



Research Article

# Production of *Dendropanax morbiferus* extract containing multi-functional ingredients by serial fermentation using *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* KS2020

## 고초균-젖산균의 순차적 복합 발효를 통한 복합 기능성 물질 함유 황칠나무 추출물의 생산

Su-Jin Son<sup>1</sup>, Hye-Mi Kang<sup>1</sup>, Yun-Ho Park<sup>1</sup>, Mi-Hyang Hwangbo<sup>2</sup>, Sam-Pin Lee<sup>1,3\*</sup>

손수진<sup>1</sup> · 강혜미<sup>1</sup> · 박윤호<sup>1</sup> · 황보미향<sup>2</sup> · 이삼빈<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Nutrition and Cookery, Keimyung College University, Daegu 42601, Korea

<sup>3</sup>The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학과, <sup>2</sup>계명문화대학교 식품영양조리학과,

<sup>3</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

**Abstract** The production of poly- $\gamma$ -glutamic acid ( $\gamma$ -PGA) and  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) was optimized by serial fermentation of *Dendropanax morbiferus* extract (DME) using *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* KS2020. The 1<sup>st</sup> alkaline fermentation was performed on 60% DME including 2% glucose and 10% monosodium L-glutamate (MSG) as a precursor. The 1<sup>st</sup> fermented DME had 57 mg% tyrosine. Consequently, the 2<sup>nd</sup> lactic acid fermentation for 5 days increased the tyrosine content of 106 mg%. The mucilage containing  $\gamma$ -PGA showed a high content of 3.50% on the first day of alkaline fermentation and then increased to 4.10% after 2 days. The precursor (MSG) remaining in the 1<sup>st</sup> fermented DME was efficiently converted to GABA by the 2<sup>nd</sup> lactic acid fermentation in the presence of 5% skim milk, 1.5% glucose and 0.5% yeast extract, resulting in the production of 18.29 mg/mL GABA. The viable cells of lactic acid bacteria increased and indicated 9.49 log CFU/mL on the fermentation for 5 days, and the acidity of co-fermented DME indicated the highest value of 1.55%. Conclusively, the serial fermented DME has multi-functional ingredients containing  $\gamma$ -PGA, GABA, peptides and probiotics.

**Keywords** *Dendropanax morbiferus*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, GABA,  $\gamma$ -PGA



**Citation:** Son SJ, Kang HM, Park YH, Hwangbo MH, Lee SP. Production of *Dendropanax morbiferus* extract containing multi-functional ingredients by serial fermentation using *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* KS2020. Food Sci. Preserv., 31(1), 138-148 (2024)

**Received:** October 24, 2023  
**Revised:** November 13, 2023  
**Accepted:** November 21, 2023

**\*Corresponding author**  
Sam-Pin Lee  
Tel: +82-53-580-5030  
E-mail: splee@kmu.ac.kr

Copyright © 2024 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. 서론

황칠은 두릅나무과에 속하며 아열대성의 넓은 잎의 상록교목이다. 껍질의 진액은 옷과 함께 광택이 우수한 천연도료로 사용되고 있다. 민간약용으로서의 황칠은 본초강목 등의 고문서에서 확인할 수 있다(Kim, 2015). 황칠나무의 학명 *Dendropanax morbiferus*는 그리스어로 병을 가져간다는 뜻으로, 모든 병을 치료할 수 있는 만병통치 약용나무라고 알려져 왔다

(Jeong, 2015; Kang, 2022). 황칠나무에 대한 기능성 연구는 국내에서 많이 진행되고 있으며, 황칠나무에서 추출된 특정물질은 chloroquine에 민감한 균주에 대한 성장 억제능(Ahn, 2017)과 면역세포 활성화 증진 효과(Chung 등, 2009), 질병에 대한 면역체계 및 생체방어체계 강화(Lee 등, 2009)에 효능을 보였다. 전통 의학에서 편두통, 피부 질환 등을 치료하는 데 황칠나무의 뿌리 및 줄기가 이용되었으며, 황칠나무 잎은 항산화 물질인 플라보노이드, 셀레늄 및 폴리 아세틸렌 화합물 등을 함유하고 있는 것으로 확인되었다(Mo와 Oh, 2013; Park 등, 2004). 현재 황칠나무 추출액은 음료, 화장품 등의 원료로 활용되고 있으며, 황칠을 이용한 화장품, 비누, 고추장, 된장, 간장, 차 등으로 제품화되고 있다.

고초균은 콩을 원료로 제조하는 전통 발효식품에 중요한 역할을 하는 발효 미생물이다(Sung 등, 2005). Poly- $\gamma$ -glutamic acid( $\gamma$ -PGA)는 고초균인 *Bacillus subtilis*가 생산하는 고분자 점질물질로서 면역증강, 수용성, 생분해성의 특징을 갖고 있으며 식용이 가능하다(Moon, 2011). 생고분자  $\gamma$ -PGA는 glutamic acid  $\gamma$ -carboxyl group과  $\alpha$ -amino group 사이의 amide 결합에 의해 결합된 homopolymer이다(Kwon 등, 2004; Park, 2002). 또한  $\gamma$ -PGA는 식품의약품안전처로부터 면역증진 및 칼슘흡수에 도움을 주는 건강기능식품소재로 인증받았으며, 보습제, 화장품 등의 다양한 식품, 의약 분야에서 다양하게 이용되고 있다(Oppermann et al., 2002; Tanaka et al., 1993, Wang et al., 2020).

젖산균은 대표적인 probiotics로 발효성 당으로부터 젖산을 생성하는 통성혐기성균이다. 주로 김치와 젓갈 등 전통 발효식품에 존재하며, 유기산 등의 대사산물을 생산하면서 발효식품의 저장성과 기호성을 높이고 식품의 기능성을 향상시킨다(Kang 등, 2021; Troy, 1937). 특히 *L. paracasei*, *L. brevis*, *L. plantarum* 등의 젖산균은  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)를 생합성하는 것으로 보고되었다(Carr et al., 2022; Kim, 2013; Lim, 2013).

GABA는 4개의 탄소로 구성된 비단백성 아미노산으로서 신경전달 억제물질로 알려져 있다(Troy, 1973). GABA는 식약처로부터 혈압 강하 효능으로 건강기능식품 소재로 인정받았으며, 수면 유도 호르몬 분비 증가를 통해 불면증과

우울증의 개선 효과 등이 있다고 보고되었다(Ge et al., 2006; Park, 2001; Park, 2019). 천연소재로 발아곡류 등에 함유되어 있는 GABA 농도는 매우 낮아 생리 활성의 효과를 기대하기가 어려움이 있어, 미생물에 의한 고농도 GABA 합성이 필요하다. 이러한 과정은  $\gamma$ -glutamic acid decarboxylase(GAD)와 pyridoxal-5-phosphate(PLP) 합성 효소에 의해 기질인 glutamate로부터 생합성하여 고농도의 GABA를 만들 수 있다(Higuchi et al., 1997; Pouliot et al., 2013).

건강 장수시대에 삶의 질이 향상되고 성인병 예방 등을 위해서 식품의 역할은 더 이상 생명유지의 기능에 머물러 있지 않으며, 질병 예방 및 건강 증진에 있다. 천연 한방소재로서 황칠 추출물에 대한 많은 기능성 연구는 보고되었지만, 황칠나무 추출물을 이용하여 발효를 통한 기능성 소재화에 관한 연구는 아직 미비하다. 이러한 황칠 추출물에 고초균과 젖산균의 순차적 복합 발효를 통한 GABA, probiotics,  $\gamma$ -PGA, peptides 등의 기능성 물질들이 강화된 황칠 추출물 발효액을 제조함으로써 다양한 기능성 소재로 활용 가능한 차별화된 황칠 발효 소재 개발이 필요하다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 재료

황칠나무 추출물(*Dendropanax morbiferus* extract, DME)은 옷가네 식품(Jecheon, Korea)에서 생산된 원료를 제공받아  $-18^{\circ}\text{C}$ 에서 냉동 보관하여 사용하였다. 부원료인 MSG와 glucose는 각각 CJ Cheiljedang(Seoul, Korea), Samyang Genex Corporation(Incheon, Korea)에서 구입하였고, skim milk는 서울우유(Seoul, Korea)에서 구입하였다. MRS broth는 Difco<sup>TM</sup> Lactobacilli MRS (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)사의 제품과 그 외 실험에 사용된 시약은 특급 시약들을 사용하였다.

### 2.2. 사용 균주 및 starter 제조

*Bacillus subtilis* HA(KCCM 10775P) 균주는 청국장에서 분리한 후 기탁한 한국미생물보존센터로부터 분양받아 1차 고초균 발효에 사용하였다. 5% skim milk broth에

MRS 고체배지에서 배양된 고초균 한 colony를 접종하여 42°C에서 24시간 160 rpm으로 진탕배양 후 *B. subtilis* HA를 스타터로 사용하였다.

*Lactobacillus plantarum* KS2020(KCCM 12782P)는 김치에서 분리된 GABA 생성능이 우수한 균주로서, MRS agar plate에서 30°C, 48시간 배양한 후 멸균한 MRS broth에 순수 배양된 *L. plantarum* 한 백금이 접종한 뒤 30°C 항온배양기에서 24시간 동안 정치 배양하여 2차 젖산균 발효 스타터로 사용하였다.

### 2.3. 황칠 추출물 발효

#### 2.3.1. 점질물 생산을 위한 1차 고초균 발효

DME(60%)은 121°C, 15분간 고압증기 멸균시킨 후 멸균된 50% glucose 및 50% MSG 용액(w/v)을 각각 2% (v/v), 10%(v/v)가 되도록 첨가하였다. 5% skim milk 배지에서 배양한 *B. subtilis* HA 스타터 5%(v/v)를 접종하여 진탕배양기에서 42°C, 160 rpm으로 2일 동안 진탕 배양한 후 발효물의 이화학적 분석을 하였다.

#### 2.3.2. GABA 생산을 위한 2차 젖산균 복합 발효

1차 고초균 발효물에 멸균된 skim milk 5%, glucose 1.5% 및 yeast extract 0%, 0.1%, 0.5%(w/v)를 추가적으로 첨가한 후 *L. plantarum* KS2020 스타터 1%(w/v)를 접종하여 항온배양기에서 30°C로 5일간 정치 배양하였다.

### 2.4. 황칠 추출물 발효물의 이화학적 분석

#### 2.4.1. 생균수 측정

생균수는 발효물을 10<sup>6</sup>까지 단계별 희석하여 MRS agar 배지에 20  $\mu$ L 도달한 후, *B. subtilis* HA는 42°C 항온배양기에서 24시간 배양하였다. *L. plantarum* KS2020은 30°C 항온배양기에서 48시간 배양하였으며 생균수 측정은 log CFU(colony forming unit)/mL로 나타내었다.

#### 2.4.2. pH 및 적정 산도 측정

pH는 발효물 10 mL를 취하여 pH meter(Digital pH meter 420A+, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도는 pH meter를 이용하여 배양액의 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정

하고, 소비량을 lactic acid 함량(% , v/v)으로 환산하여 나타내었다.

#### 2.4.3. 고초균 발효물의 점질물 함량 측정

발효물 5 g에 증류수 5 mL를 첨가하여 희석한 후 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리를 통해 회수한 상등액에 -20°C에 보관한 isopropyl alcohol을 2배 첨가하여 점질물을 응집시켜 회수하였다. 회수한 점질물은 95% ethyl alcohol에 세척 후 50°C에서 24시간 감압건조기를 이용하여 건조 후 측정하였다.

#### 2.4.4 고초균 발효물의 점조도 측정

점성측정을 위한 점조도 값은 Rheometer System (HAKKE RheoStress1, Karlsruhe, Germany)에 cone plate device(Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter, gap clearance 1.00 mm)를 이용하여 측정하였다. 시료 1 mL를 취하여 plate에 올린 후 20°C에서 shear rate( $\dot{\gamma}$ ) 1-100 s<sup>-1</sup>의 범위에서 shear stress(Pa)를 측정하여 유동특성을 분석하였다. 점조도 및 점조도 지수는 Power law model로 측정하였다.

$$\text{Power law model: } \sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

$\sigma$ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수 (consistency index, Pa·s<sup>n</sup>),  $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s<sup>-1</sup>), n은 유동성 지수(flow behavior index)이다.

#### 2.4.5. 발효물의 GABA 및 MSG 함량 정성 분석

MSG 및 GABA의 정성분석은 silica gel TLC plate (10×20 cm)를 활용한 Thin Layer Chromatography (TLC) 사용하여 분석하였다. 발효물과 standard 용액을 TLC plate 하단에 2  $\mu$ L씩 점적한 뒤 건조하여 전개용매에 전개하였다. 용매는 n-butyl alcohol:acetic acid glacial: distilled water를 3:1:1로 혼합한 후 2시간 이상 포화시켰다. 전개 후 TLC plate는 100°C 감압건조기에서 건조한 후 0.2% ninhydrin 발색 시약 용액을 뿌려 100°C에서 5분 정도 발색시켜 MSG와 GABA의 spot을 확인하였다.

#### 2.4.6. 발효물의 peptide 함량 측정

발효물의 peptide 생성 정도를 측정하기 위하여 Folin-phenol시약을 이용하여 발효물에 존재하는 tyrosine 함량을 측정하였다(Kang, 2022). 황칠 추출물 발효액을 0.44 M TCA 용액을 동량 첨가하여 37°C에 30분간 반응시킨 후 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mL와 3배 희석된 phenol reagent 0.5 mL를 순차적으로 혼합하였다. 이후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer(Amersham Biosciences, Amersham, UK)를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.4.7. SDS-PAGE 분석

복합 발효시킨 황칠 추출액 발효물의 단백질 가수분해 정도를 확인하기 위해 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel(SDS-PAGE) 전기영동(Hofer Scientific Instrument, CA)을 수행하였다(Yoon, 2019). 발효물을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, SDS-sample buffer(×5, 0.15 M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 5% β-mercaptoethanol)에 녹인다. 100°C에서 5분간 가열하여 gradient SDS-PAGE(5-13%, O-RAD, Seoul, Korea)에 시료를 10 μL 주입한 후 전기 영동하였다. Gel의 염색은 Instant Blue 용액(Expediton Ltd., Cambridgeshire, UK)을 사용하였으며, standard는 0.5% skim milk 용액, 표준 단백질은 10 kDa, 15 kDa, 25 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 55 kDa, 70 kDa, 130 kDa, 170 kDa으로 조합되어 있는 marker 단백질(Thermo scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하였다.

#### 2.4.8. GABA 및 glutamic acid의 정량 분석

발효물의 유리아미노산 함량 측정은 건조시킨 시료를 실온에서 30분 동안 유도체화하여 건조시킨 후 A 용매(140 mM NaHAc, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH<sub>3</sub>CN, pH 6.1)에 혼합하여 원심분리 하였다. 상등액을 0.45 μm syringa filter로 여과한 후 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석 시 검출기는 Fluorescence detector(λ<sub>ex</sub> 250 nm, λ<sub>em</sub> 395 nm)를 이용하며 column은 Waters AccQ·Taq™(3.9×150 nm)를 이용하였고 mobile phase(A:

Waters AccQ Taq Eluent A, B: acetonitrile, C: 3차 증류수)를 유속 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었다.

#### 2.4.9. Protease activity 측정

복합 발효물의 단백질 분해 효소활성 측정을 위해 0.6% casein 용액을 기질로 하여 발효물에 존재하는 protease의 활성을 측정하였다. 황칠 복합 발효물을 13,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액 0.35 mL를 취하여 0.6% casein 용액과 혼합하였다. 혼합액을 37°C에 10분간 반응시킨 후 0.44 M TCA 용액 0.7 mL를 첨가하여 37°C에 30분간 반응하였다. 이후 13,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 침전물을 제거하였으며, 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.5 mL와 3배 희석된 Folin reagent 0.5 mL를 순차적으로 넣고 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 반응액의 흡광도는 spectrophotometer(Amersham Biosciences)로 660 nm에서 측정하였다.

### 2.5. 통계처리

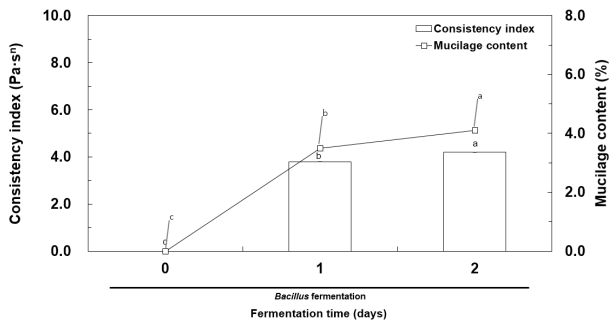
실험결과는 Statistical Package for the Social Science(SPSS, Version 27.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균(n=3)과 표준편차(mean±SD)를 구하였으며, 각 집단 간 평균치 차이를 검증하기 위하여 one way-ANOVA 및 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 결과에 대한 검증은 p<0.05 수준에서 검증하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 황칠 추출물 고초균 발효물의 점조도 및 점질물 생성 변화

황칠 추출물의 1차 고초균 발효 2일 동안 발효물의 점조도 및 점질물 생성을 측정하였다. 발효물의 점조도는 1일 차 3.8 Pa·s<sup>n</sup> 까지 증가한 후 2일 차에는 완만하게 증가하여 4.21 Pa·s<sup>n</sup>을 나타내었다. 또한, 발효물의 점질물은 1일 차 3.50%로 측정되었으며 2일 차에 증가하여 4.10%의 점질물이 회수되었다(Fig. 1).

일반적으로 고초균의 액상배양을 통해서 2% 수준의 점질물이 생성됨을 보고(Kwak, 2022)하였으며, 동일한 고초균을 이용한 옷 추출물 발효물의 경우에 발효 2일 차 점질



**Fig. 1.** Consistency index and mucilage content in DME fermented by *Bacillus subtilis* HA. n=3 for each group. Different letters (a-c) indicate significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

물 함량은 3.70%로 유사한 값을 보였다(Kang, 2022). 헛개나무 추출물을 이용한 고초균 젖산균 복합 발효를 통해서 고분자 점질물 생산은 3.27% 수준으로 보고되었다(Yoon, 2019). 황칠나무 추출물 배지에서 고초균의 액상발효를 통한 점질물 생산은 매우 높은 것으로 판단된다. 이는 아미노산 영양원으로 첨가된 전구물질인 MSG가 10% 수준으로 기존의 액상발효보다 높은 농도가 사용된 결과로 판단된다. 고분자 점질물에 포함된  $\gamma$ -PGA 생산은 전구물질 MSG로부터 고초균의 세포내 합성 효소들에 의해서 고분자물질로 생합성되어 세포외로 분비되는 것으로 보고되었다(Luo et al., 2016).

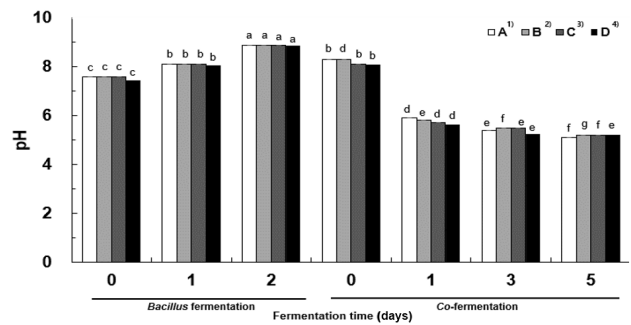
### 3.2. 황칠 추출물의 복합 발효 중 pH 및 산도 변화

황칠나무 추출물의 고초균 발효 0일 차 발효물은 pH 7.6, acidity 0%에서 2일 차 pH 8.9, acidity 0%로 pH는 증가하였으며 잔존하는 유기산이 없는 것으로 나타났다. 순차적 복합 발효를 위해서 1차 고초균 발효물에 skim milk를 5% 혼합한 후 추가적으로 포도당과 yeast extract를 첨가하지 않은 조건(A)과 포도당 1.5%에 yeast extract를 각각 0, 0.1%, 0.5% 농도별로 첨가한 B, C, D 조건에서 2차 젖산균 발효를 수행하였다.

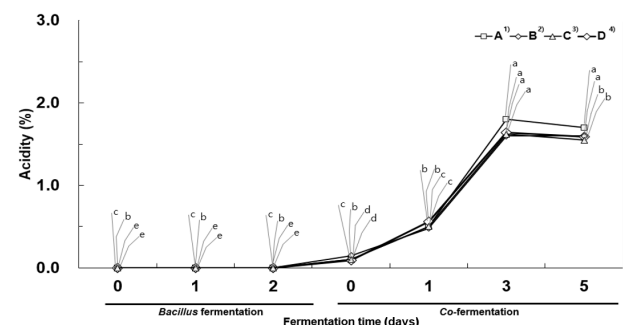
젖산균 발효 0일 차 조건 A는 pH 8.3, 산도 0.1%를 보였고, 발효 5일 차에는 유기산 생성으로 pH 5.1, 산도 1.7%를 나타내었다. Yeast extract가 무 첨가된 조건 B는 pH 8.30, 산도 0.15%에서 발효 5일 차에는 pH 5.20, 산도 1.6%로 증가하였다. 포도당 1.5%에 추가적으로 yeast

extract 0.1%, 0.5% 첨가된 조건 C, D는 pH 8.1, 산도 0.1%에서 발효 5일 차에는 pH 5.2와 산도 1.55%-1.59%로 유사한 값을 나타내었다.

천연물에 존재하는 발효성당이 젖산균 발효를 통해서 젖산의 생성으로 발효물의 산도가 증가하는 것처럼, 황칠나무 추출물의 2차 젖산균 발효과정에서 발효 1일에 산도가 0.5% 수준으로 증가한 후 발효 5일까지 급격하게 증가하여 1.6% 정도 산도를 나타내었다. 황칠 추출물의 순차적 복합 발효가 진행될수록 네 가지 조건 모두 pH는 감소하여 pH 5.2를 보였으며, 산도는 크게 증가하여 1.5% 이상의 높은 값을 보였다(Fig. 2, 3).



**Fig. 2.** Change of pH in DME co-fermented by *Bacillus subtilis* HA and *L. plantarum* KS2020. <sup>1</sup>A: glucose 0%, <sup>2</sup>B: glucose 1.5%+YE 0%, <sup>3</sup>C: glucose 1.5%+YE 0.1%, <sup>4</sup>D: glucose 1.5%+YE 0.5%. n=3 for each group. Different letters (a-g) indicate significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.



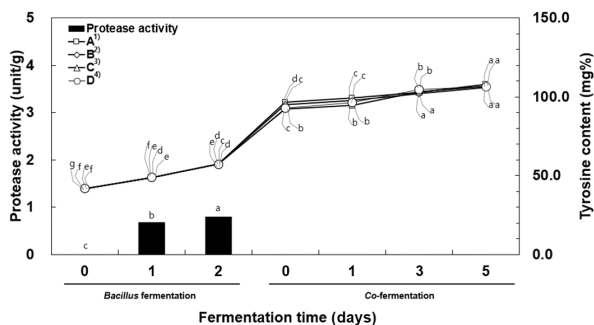
**Fig. 3.** Acidity changes for DME co-fermented by *Bacillus subtilis* HA and *L. plantarum* KS2020. <sup>1</sup>A: glucose 0%, <sup>2</sup>B: glucose 1.5%+YE 0%, <sup>3</sup>C: glucose 1.5%+YE 0.1%, <sup>4</sup>D: glucose 1.5%+YE 0.5%. n=3 for each group. Different letters (a-e) indicate significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

이는 2차 젖산균 복합 발효시에 추가적으로 첨가된 skim milk의 유당과 포도당이 발효과정에서 젖산균에 의해서 유기산으로 전환되면서 최종 발효물의 산도가 증가한 것으로 사료된다. 동일한 고초균과 젖산균을 이용하여 복합 발효시킨 옷 추출물의 경우 최종 발효물의 산도가 1.2% 정도로 유사한 값을 보였다(Kang, 2022).

### 3.3. 황칠 추출물의 복합 발효 중 protease activity와 peptides 생성

황칠 추출물을 이용한 1차 고초균 발효과정에서 발효 0일 차 protease 활성은 검출되지 않았으며, 발효 1일 차 0.68 unit/g으로 protease 활성을 나타내었으며, 발효 2일 차 0.8 unit/g으로 유사한 값을 보였다(Fig. 4).

황칠 복합 발효물의 단백질 분해산물인 펩타이드의 생성 정도를 비교하기 위해서 tyrosine 함량을 측정하였다. 고초균 발효시에 초기에 41.72 mg%에서 발효 2일 차에 57.23 mg%로 증가하였다. 발효 0일 차에 높은 함량의 tyrosine 함량이 측정되었다. 이는 황칠 추출물이 높은 페놀화합물의 함량으로 발효 초기 높은 tyrosine 함량 값으로 나타난 것으로 판단된다. 2차 젖산균에 의한 복합 발효가 진행될 때 추가적인 영양성분 첨가로 인해 1차 발효물이 희석됨에 따라 tyrosine 함량이 조금 감소한 후 완만하게 증가하는 경향을 나타내었다. A 조건의 경우 복합 발효 5일 차 107.74 mg%로 증가되었으며 B, C, D 조건에서도 유사한 값을 보



**Fig. 4.** Protease activity and tyrosine content for DME fermented by *Bacillus subtilis* HA and tyrosine content of DME co-fermented by *L. plantarum* KS2020. <sup>1</sup>A: glucose 0%, <sup>2</sup>B: glucose 1.5%+YE 0%, <sup>3</sup>C: glucose 1.5%+YE 0.1%, <sup>4</sup>D: glucose 1.5%+YE 0.5%. n=3 for each group. Different letters (a-g) indicate significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

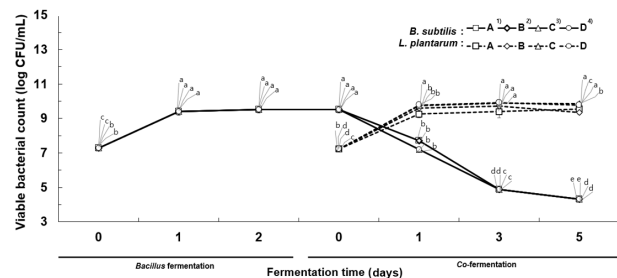
였다. 따라서 2차 젖산균 발효시에 첨가되는 yeast extract에 농도 의존성은 없는 것으로 나타났다.

동일한 고초균과 젖산균을 이용하여 수행된 옷 추출물의 복합 발효 5일 차에서 124.40 mg%의 tyrosine 함량을 보고(Kang, 2022) 하였으며, 본 연구의 황칠 추출물의 복합 발효물의 최적 조건에서 tyrosine 함량이 106.55 mg%로 약간 낮은 값을 보였다. 이는 1차 고초균 발효 중에 생성된 단백질 분해효소에 의해서 우유 단백질 가수분해가 진행되었으며, yeast extract 첨가에 관계없이 2차 젖산균에 의한 복합 발효동안 완만하게 증가하는 경향을 보였다.

### 3.4. 황칠 추출물의 복합 발효 중 생균수 변화

황칠 추출물의 고초균 발효물에서 *B. subtilis* HA의 생균수는 발효 초기 7.27 log CFU/mL로 측정되었으며, 발효 2일 차 9.50 log CFU/mL까지 크게 증가하였다. 순차적 복합 발효과정에서 크게 감소하면서 발효 5일 차에 고초균은 4.30 log CFU/mL로 나타났다. 이는 2차 젖산균 발효과정에서 생성된 유기산 등의 대사산물과 관련이 있으며, 산성 조건에서 고초균의 생육이 억제되고 일부 사멸하는 것으로 판단된다.

젖산균 복합 발효가 진행되면서 네 조건 모두 발효 초기 *L. plantarum* KS2020의 생균수는 7.23 log CFU/mL에서 시작하여 발효 5일 차에 A조건은 9.56 log CFU/mL, B조건은 9.34 log CFU/mL, C조건은 9.85 log CFU/mL, D조건은 9.77 log CFU/mL로 모두 높은 값을 나타내었다(Fig. 5).



**Fig. 5.** Viable bacterial count for DME co-fermented by *Bacillus subtilis* HA and *L. plantarum* KS2020. <sup>1</sup>A: glucose 0%, <sup>2</sup>B: glucose 1.5%+YE 0%, <sup>3</sup>C: glucose 1.5%+YE 0.1%, <sup>4</sup>D: glucose 1.5%+YE 0.5%. n=3 for each group. Different letters (a-d) indicate significant difference at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test.

웃 추출물에 동일한 고초균과 젖산균을 이용하여 1차 고초균 발효물에서 고초균의 생균수는 발효 2일 차에 8.8 log CFU/mL까지 증가하였고, 연속적 복합 발효가 진행되면서 7.68 log CFU/mL로 감소하였다. 반면에 젖산균을 이용한 2차 발효과정에서 젖산균의 생균수는 최종 발효물에서 9.12 log CFU/mL까지 증가됨을 보고하였다(Kang, 2022). 천연물로서 웃 추출물과 유사한 용도로 사용되는 황칠 추출물을 이용한 고초균과 젖산균의 복합 발효시에 젖산균의 생균수가 웃 추출물 발효물 보다 더 높은 생균수를 보였다.

3.5. 황칠 추출물을 이용한 복합 발효물의 GABA 정성분석

순차적 복합발효 동안 1차 고초균 발효물에 잔존하는 MSG로부터 GABA 전환을 Thin Layer Chromatography를 통해 확인하였다. 1차 고초균 발효물에 추가적으로 포도당이 무 첨가된 경우에 2차 젖산균 복합발효 7일 차가 되도록 MSG가 GABA로의 전환이 미비하였다(Fig. 6(A)). B, C, D 조건의 경우 연속적 복합 발효 3일 차에 대부분의 MSG가 소진되면서 GABA로 전환되는 것으로 나타났다(Fig. 6(B)-(D)) 하지만 발효 1일 차 spot을 볼 때 yeast extract 함량이 높을수록 발효 속도가 빨라지는 것을 확인하였다.

웃 추출물 고초균 및 젖산균 복합 발효물의 GABA 정성 실험에서도 복합 발효 3일 차부터 MSG 잔존 없이 GABA로 완전히 전환된 것을 보고 하였다(Kang, 2022). 황칠 추출물의 복합 발효물 생산 최적 조건(D)에서 젖산균 발효 1일 차부터 GABA 전환이 시작하여 3일 차에는 MSG 잔존 없이 GABA로 전환된 것으로 나타났다(Fig. 6(D)). 이는 황칠 추출물을 이용한 고초균 및 젖산균 복합발효를 수행할 때 1차 고초균 발효물에 추가적으로 포도당 1.5%, yeast extract 0.5%를 첨가하여 2차 젖산균 발효를 수행하는 것이 GABA를 효과적으로 생성하는 최적 조건인 것으로 판단된다.

3.6. 황칠 추출물의 복합 발효중 단백질 가수분해 비교

황칠 복합 발효중에 첨가된 탈지분유 단백질의 가수분해 정도를 SDS-PAGE 전기영동을 통해 확인하였다(Fig. 7). 황칠 고초균 발효물을 젖산균 복합 발효한 A, B, C, D 모든 조건에서 카세인 단백질이 가수분해되어 저분자화된 것으로 나타났다. 이는 고초균 발효물에 존재하는 단백질 분해 효소에 의해서 기질인 우유 단백질이 가수분해되는 것으로 사료된다.

단백질 분해효소의 생산 균주인 고초균이 조직 대두 단백질 발효중에 발효 1일 차에 저분자 펩타이드로 전환되었

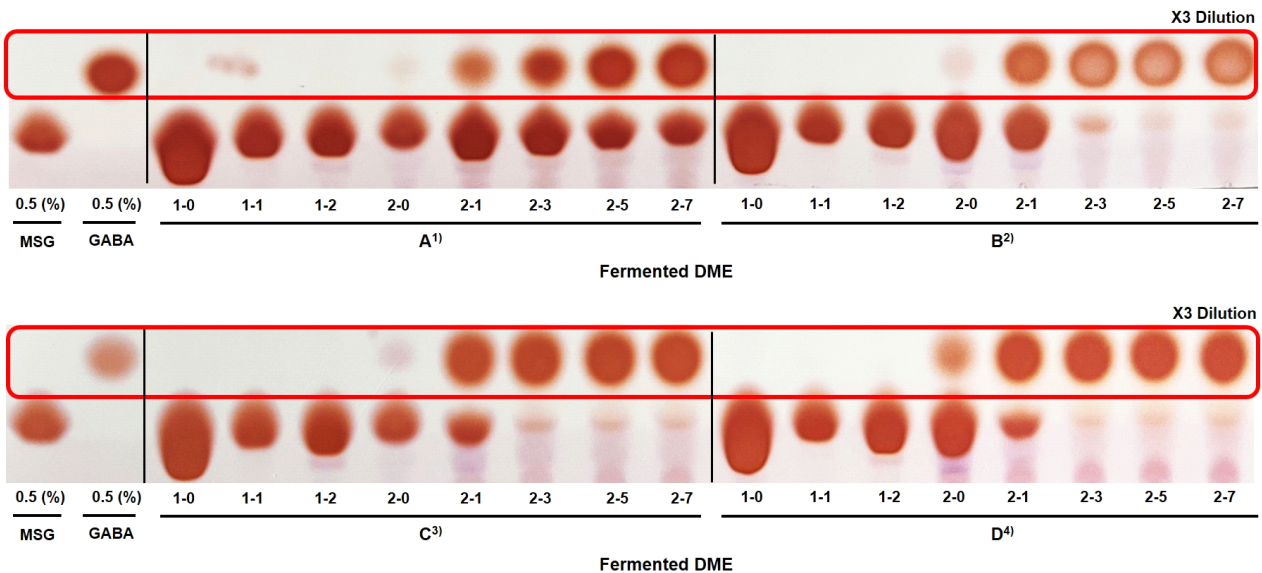
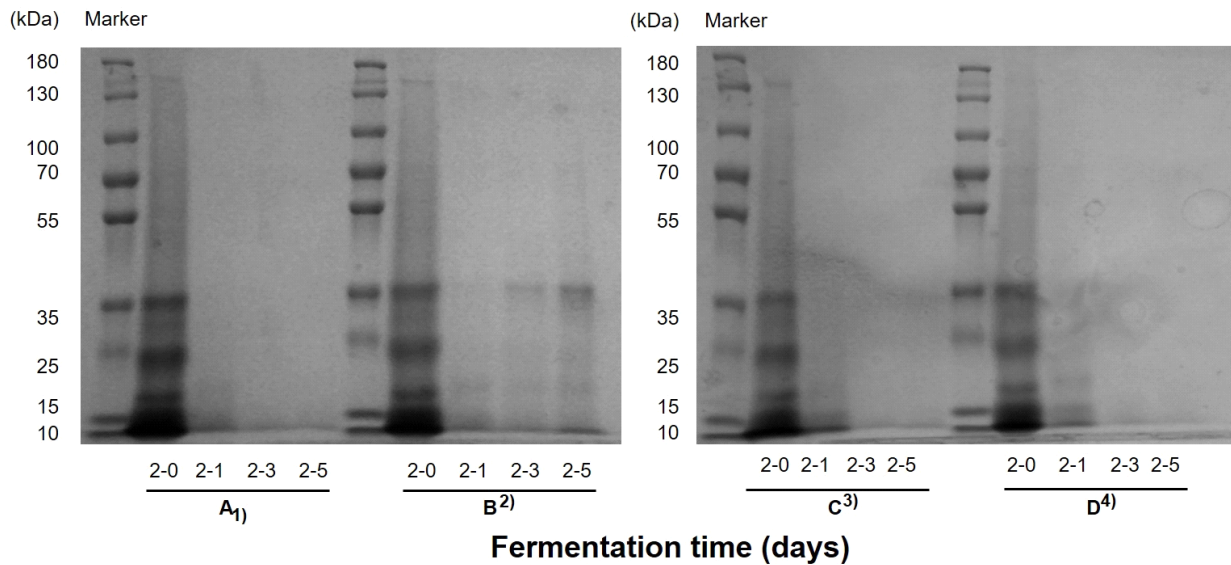


Fig. 6. TLC of DME by *Bacillus subtilis* HA and *L. plantarum* KS2020. <sup>1</sup>A: glucose 0%, <sup>2</sup>B: glucose 1.5%+YE 0%, <sup>3</sup>C: glucose 1.5%+YE 0.1%, <sup>4</sup>D: glucose 1.5%+YE 0.5%.



**Fig. 7.** SDS-PAGE pattern of co-fermented DME. <sup>1</sup>A: glucose 0%, <sup>2</sup>B: glucose 1.5%+YE 0%, <sup>3</sup>C: glucose 1.5%+YE 0.1%, <sup>4</sup>D: glucose 1.5%+YE 0.5%.

으며 발효 2일 차 이후에는 저분자로 펩타이드의 분자량이 감소하면서 gel 상에 밴드가 확인되지 않았음을 보고하였다(Kim, 2009).

본 연구에서 황칠 고초균 발효물에 첨가한 우유 단백질이 젖산균 복합 발효 1일 차에 저분자 펩타이드로의 전환이 빠르게 이루어지며, 발효 3일 차 이후에는 펩타이드의 분자량 감소로 gel 상에 밴드가 확인되지 않음을 확인하였다(Fig. 7). 따라서 연속적 복합 발효과정에서 첨가된 포도당 및 yeast extract에 관계없이 1차 고초균 발효에 의해서 생성된 단백질 분해효소가 2차 젖산균 복합 발효시에 첨가된 탈지분유의 카세인 단백질을 분해시켜 10 kDa 이하의 펩타이드로 저분자화시키는 것으로 나타났다.

### 3.7. 황칠 추출물 복합 발효물의 GABA 정량분석

황칠 순차적 복합 발효중에 최적조건이라 생각되는 D조건(Glucose 1.5%+YE 0.5%)의 glutamic acid 및 GABA 함량은 다음과 같다. 황칠 복합 발효 7일 차에 발효물의 glutamic acid는 0.44 mg/mL이었으며, GABA는 18.29 mg/mL를 나타내었다(Table 1).

웃 추출물에 동일한 고초균과 젖산균을 이용하여 발효시킨 복합 발효물의 생산과정에서 약 1.79% 정도의 GABA가 생성됨을 보고(Kang, 2022)하였으며, 최종 황칠 추출

**Table 1.** Change in GABA contents of co-fermented DME using HPLC

Culture method	Free amino acid	Co-fermentation time (7 days)
Baffle flask	Glutamic acid (mg/mL)	0.44±0.01
	GABA (mg/mL)	18.29±0.64

물 복합 발효물도 약 1.829% 정도의 높은 GABA를 포함하였다.

## 4. 요약

황칠나무 추출물의 순차적 복합발효를 통한 복합 기능성 물질들을 강화시킨 발효소재를 개발하였다. 황칠 추출물에 MSG와 glucose를 첨가한 후 1차 *B. subtilis* HA 발효를 통해  $\gamma$ -PGA와 단백질 분해효소를 생성시켰다. 이후 skim milk와 glucose, yeast extract를 추가적으로 첨가하여 30°C에서 *L. plantarum* KS2020에 의한 2차 복합 발효를 통해서 기능성 물질인 GABA를 생산하였다. 황칠 추출물의 고초균 발효에서 생성된 점질물 및 점조도는 발효 2일  $4.21 \pm 0.04$  Pa·s,  $4.1\% \pm 0.48\%$ 로 높은 점조도 값과 점질물을 함량을 보였다. pH 및 산도는 각각  $8.9 \pm 0.01$ ,  $0.00 \pm 0.00$ 이었으며 생균수는  $7.27$  log CFU/mL에서 발



효 2일에 9.50 log CFU/mL로 높은 생균수를 보였다. 순차적 복합 발효가 진행되면서 고초균의 생균수는 4.30 log CFU/mL로 크게 감소하였으며 젖산균은 9.12 log CFU/mL로 증가하였다. Protease 활성 및 tyrosine 함량은 각각 0.8 unit/g, 57 mg%로 측정되었다. 이후 연속적 복합 발효 과정에서 발효 5일 차 106 mg% 정도로 증가되었으며, SDS-PAGE를 이용하여 casein 단백질이 분해된 것을 확인하였다.

GABA 정성분석 결과 skim milk 5%만을 첨가한 조건을 제외하고 glucose, yeast extract가 추가로 첨가된 모든 조건에서 전구물질 MSG가 소진되면서 GABA로 전환되었다. 이중 최적 조건을 골라 정량분석을 진행하였으며 18.29 mg/mL의 GABA 함량을 나타내었다. 최종 향칠 복합 발효물은  $\gamma$ -PGA, peptides, 고농도 GABA를 함유한 발효소재로써 다양한 식품의 원료 활용이 기대된다.

#### Funding

None.

#### Acknowledgements

None.

#### Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

#### Author contributions

Conceptualization: Lee SP. Formal analysis: Son SJ, Kang HM, Park YH. Writing - original draft: Son SJ, Park YH, Lee SP. Writing - review & editing: Hwangbo MH, Lee SP.

#### Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

#### ORCID

Su-Jin Son (First author)

<https://orcid.org/0009-0000-9096-1371>

Hye-Mi Kang

<https://orcid.org/0000-0001-7978-9224>

Yun-Ho Park

<https://orcid.org/0000-0001-9541-8554>

Mi-Hyang Hwangbo

<https://orcid.org/0000-0001-7472-1052>

Sam-Pin Lee (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0001-9413-2482>

## References

- Ahn HS. Quality characteristics of pork meat cooked with the aqueous extracts from *Dendropanax morbiferus*. Ph D Thesis, Suncheon National University, Korea, p 1-2 (2017)
- Carr FJ, Chill D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol*, 28, 281-370 (2002)
- Chung IM, Kim MY, Park SD, Park WH, Moon HI. In vitro evaluation of the antiplasmodial activity of *Dendropanax morbifera* against chloroquine-sensitive strains of *Plasmodium falciparum*. *Phytother Res*, 23, 1634-1637 (2009)
- Ge S, Goh EL, Sailor KA, Kitabatake Y, Ming GL, Song H. GABA regulates synaptic integration of newly generated neurons in the adult brain. *Nature*, 439, 589-593 (2006)
- Higuchi T, Hayashi H, Abe K. Exchange of glutamate and gamma-aminobutyrate in a *Lactobacillus strain*. *J Bacteriol*, 179, 3362-3364 (1997)
- Kang HM. Optimization of the production for poly-r-glutamic acid and r-aminobutyric acid in *Toxicodendron vernicifluum* extract by co-fermentation of *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* KS2020. MS Thesis, Keimyung University, Korea, p 28-72 (2022)
- Kang HM, Lim JS, Lee SP. Higher production of r-aminobutyric acid in *Toxicodendron vernicifluum* extract by co-fermentation using yeast and lactic acid bacteria. *Korean J Food Preserv*, 28, 129-140 (2021)

- Kim DY. A Study on the chemical Structure and physiological activity of *Dendropanax morbifera*. MS Thesis, Ajou University, Korea, p 4-5 (2015)
- Kim IW, Shin DH, Jang YS. Antioxidative activity of some antioxidants and emulsifiers in bulk and emulsion systems. Korean J Food Sci Technol, 31, 1077-1083 (1999)
- Kim JE. Production of Bioactive compounds of the fermented textured vegetable protein by *Bacillus subtilis* HA and evaluation of ACE inhibitory activity. Ph D Thesis, Keimyung University, Korea, p 25-26 (2009)
- Kim JH. Isolation and characterization of high GABA producing yeast isolated from fermented bokbunja wine. MS Thesis, Chonbuk National University, Korea, p 40-48 (2013)
- Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. Isolation of immuno-stimulation strain *Bacillus pumilus* JB-1 from *Chungkookjang* and fermentational characteristics of JB-1. Kor J Microbial Biotechnol, 32, 291-296 (2004)
- Lee SH, Lee HS, Park YS, Hwang B, Kim JH, Lee HY. Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* lev. Korean J Medicinal Crop Sci, 10, 109-115 (2002)
- Lim JY. Optimization for the production of roasted wheat bran fortified with mucilage and GABA by mixed fermentation using *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* K154. MS Thesis, Keimyung University, Korea, p 1-2 (2013)
- Luo Z, Guo Y, Liu J, Qiu H, Zhao M, Zou W, Li S. Microbial synthesis of poly- $\gamma$ -glutamic acid: Current progress, challenges, and future perspectives. Biotechnol Biofuels, 9, 1-12 (2016)
- Mo JH, Oh SJ. Tyrosinase inhibitory activity and melanin production inhibitory activity of the methanol extract and fractions from *Dendropanax morbifera* Lev. Korea J Aesthet Cosmetol, 11, 275-280 (2013)
- Moon H. Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax morbifera* in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Hum Exp Toxicol, 30, 870-875 (2011)
- Oppermann-Sanio FB, Steinbchel A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganism and biotechnological production. Naturwissenschaften, 89, 11-22 (2002)
- Park BY, Min BS, Oh SR, Kim JH, Kim TJ, Kim DH, Bae KH, Lee HK. Isolation and anticomplement activity of compounds from *Dendropanax morbifera*. J Ethnopharmacol, 90, 403-408 (2004)
- Park JH. Optimization of  $\gamma$ -aminobutyric acid production in homogenized hydroponic ginseng by fermentation using *Bacillus subtilis*, *Leuconostoc citreum* and *Lactobacillus plantarum*. MS Thesis, Keimyung University, Korea, p 1-2 (2019)
- Park JS. Preparation and characterization of poly  $\gamma$ -glutamic acid hydrogel from *Bacillus subtilis* BS62. Ph D Thesis, Chungnam National University, Korea, p 1-6 (2002)
- Pouliot-Mathieu K, Gardner-Fortiera C, Lemieux S, St-Gelais D, Champagne CP, Vuilleumard JC. Effect of cheese containing gamma-aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria on blood pressure in men. Pharma Nutrition, 1, 141-148 (2013)
- Sung MH, Park C, Kim CJ, Poo H, Soda K, Ashiuchi M. Natural and edible biopolymer poly- $\gamma$ -glutamic acid: synthesis, production, and applications. Chem Rec, 5, 323-411 (2005)
- Tanaka T, Yaguchi T, Hiruta O, Futamura T, Uotani K, Satoh A, Taniguchi M, Susumu O. Screening for microorganism having poly- $\gamma$ -glutamic acid endohydrolase activity and the enzyme production by *Myrothecium* sp. TM-4222. Biosci Biotechnol Biochem, 57, 1809-1810 (1993)
- Troy FA. Chemistry and biosynthesis of the poly ( $\gamma$ -D-glutamyl) capsule in *B. licheniformis*. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. J Biol Chem, 248, 305-315 (1973)

Wang G, Liu Q, Wang Y, Li J, Chen Y, Wen Q, Zheng D, Kang W, Quan H. The application and functional progress of  $\gamma$ -Poly-Glutamic acid in food: A mini-review. *Curr Pharm Design*, 26, 5347-5352 (2020)

Yoon WK. Optimum production of  $\gamma$ -PGA and GABA in *Hovenia dulcis* extract by co-fermentation using *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* EJ2014. MS Thesis, Keimyung University, Korea p 19-20 (2019)