

## 송이버섯 추출액의 항균력 확인과 저염젓갈 생산에 적용 가능성

김진성<sup>1</sup>, 박재범<sup>1</sup>, 장승원<sup>1</sup>, 권덕호<sup>1</sup>, 장미희<sup>2</sup>, 이미옥<sup>2</sup>, 하석진<sup>1\*</sup>

### Determination of Antibacterial Activity from *Tricholoma matsutake* Extract and Its Application to Low Salted *Jeot-gal*

Jin-Seong Kim<sup>1</sup>, Jae-Bum Park<sup>1</sup>, Seung-Won Jang<sup>1</sup>, Deok-Ho Kwon<sup>1</sup>, Mi-Hee Jang<sup>2</sup>, Mi-Ok Lee<sup>2</sup>, and Suk-Jin Ha<sup>1\*</sup>

Received: 23 July 2015 / Revised: 7 October 2015 / Accepted: 16 October 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** The antibacterial activity from *Tricholoma matsutake* extracts were confirmed by minimum inhibitory concentration (MIC) test against various bacteria. *Tricholoma matsutake* extracts was applied for manufacturing low salted *Jeot-gal* with sodium DL-malate and sodium nitrite as food preservatives. Due to antibacterial activity from *Tricholoma matsutake* extracts, MIC of sodium DL-malate and sodium nitrite were significantly reduced to 0.025 g/L and 0.25 g/L, respectively. As a result of this study, a premium low salted *Jeot-gal* can be developed with low concentration of food preservatives by adding *Tricholoma matsutake* extracts.

**Keywords:** *Tricholoma matsutake*, Antibacterial, Minimum inhibitory concentration, *Jeot-gal*

일반적으로 수산식품의 유통기한을 향상시키기 위해 많은 양의 식염 처리를 하게 되며 그 대표적인 예가 젓갈이라고 할 수 있다. 젓갈은 보통 어패류를 이용하며 그 중 살과 내장 또는 알을 식염처리한 뒤 상온에서 발효를 통해 만드는 한국의 전통적인 수산발효식품이다 [1]. 젓갈의 발효는 자가소화

효소와 단백질분해 효소에 의해 이루어지며, 단백질, 탄수화물 및 유기산들이 분해되고 분해된 아미노산은 감칠맛을 낸다 [2]. 식염처리로 절이는 과정에서 20~25%의 다량의 염을 첨가하여 젓갈의 부패에 관여하는 박테리아 또는 유해세균의 번식을 억제하고 이에 따라 장기간 보관에 용이한 장점을 가지고 있다 [3,4]. 하지만 소비 트렌드가 웰빙에 맞춰지면서 기존의 높은 염 농도의 젓갈보다 저염 젓갈의 수요가 증가하고 있으나 젓갈의 염 농도가 낮아짐에 따라 부패균의 빠른 증식으로 인하여 보관기간이 짧아지는 문제점이 발생하고 있다 [5,6].

송이버섯 (*Tricholoma matsutake*)은 전통적으로 식용이 가능하고, 민간약재로 사용이 되었으며 아시아에서 건강과 장수를 목적으로 식용 및 민간 약재로 널리 이용해왔다 [7]. 송이버섯의 효능으로는 고단백, 저칼로리 식품으로써 콜레스테롤을 저하시켜 성인병 예방에 도움을 주며 항암작용과 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있다 [8-10]. 송이버섯의 항암작용은 자실체로부터 분리한 단백질 다당체를 이용하여 면역체계의 대식세포를 활성화하는 연구결과와  $\beta$ -glucan 다당체 성분으로 항산화 효과를 확인한 연구결과가 보고되었다 [11,12]. 송이버섯의 항균효과에 대한 결과는 아직까지는 보고되지 않았으나 영지버섯 또는 아가리쿠스 분말을 추출하거나 꽃송이 버섯 배양액을 이용하여 *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*과 같은 식중독 균에 대한 생육억제 효과를 확인한 바 있다. [13-15]. 또한 *Vibrio parahaemolyticus*와 같은 어병 세균에 상항버섯의 에탄올 추출물을 이용하여 항균효과를 확인한 연구가 보고되었다 [16]. 본 연구에서는 (주)해송KNS으로부터 제공받은 송이버섯의 항균력을 확인하고 이를 바탕으로 저염 젓갈에 송이버

<sup>1</sup>강원대학교 생물공학과

<sup>1</sup>Department of Bioengineering and Technology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea  
Tel: +82-33-250-6278, Fax: +82-33-243-6350  
e-mail: sjha@kangwon.ac.kr

<sup>2</sup>(주)해송KNS

<sup>2</sup>Research Institute of Haesong KNS Co., Ltd., Chuncheon 200-160, Korea

섯의 항균활성을 적용하기 위한 실험을 수행하였다.

먼저 공급 받은 송이버섯의 흙을 털고 세척하여 불순물을 제거하고 가로×세로 1 cm 크기로 절단 한 후 증류수를 이용하여 추출시간과 추출온도에 따른 항균력의 변화를 확인하였다. 추출액은 동결건조 과정을 거쳐 20배 농축한 후 실험에 사용하였으며 송이버섯 농축액의 항균력을 측정하기 위한 방법으로 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration, MIC) 확인 실험을 이용하였다 [17]. 증류수를 이용하여 추출 시간과 추출온도 조건의 최적화를 위한 실험에서 송이버섯 농축액의 항균력을 확인하기 위해 표준 균주로 *S. aureus*를 사용하였다. 추출에 사용되는 가열맨틀의 온도를 각각 100 °C, 150°C, 200°C로 달리 하고 추출시간을 2시간, 3시간, 4시간, 5시간으로 달리하여 추출한 후 20배 농축하여 항균력을 확인한 결과 맨틀온도 150°C 이상의 온도에서 3시간 이상의 시간 동안 추출한 경우 *S. aureus*에 대한 항균력을 확인할 수 있었다. 따라서 최적 추출조건은 맨틀온도 150°C에서 3시간으로 결정하였다.

다양한 박테리아에 대한 송이버섯 농축액의 항균력을 확인하기 위해 Table 1과 같이 4종류의 그람 음성 균과 5종류의 그람 양성 균을 이용하여 최소저해농도 확인 실험을 수행하였다. 9종류의 박테리아를 각각 5 mL의 액체배지에  $10^8$  CFU/mL 농도로 접종한 후 송이버섯 추출액을 20배 농축한 농축액을 각각 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ L로 첨가하여 균주 성장이 저해되는 최소저해농도를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이때 송이버섯 농축액의 건조중량은 48.8 mg/mL로 확인되었다. 최소저해농도 확인실험결과 9가지 박테리아에 대해 모든 균주의 성장이 저해되는 것을 확인할 수 있었으며 각 박테리아에 대한 송이버섯 농축액의 최소저해농도는 Table 1과 같다. 그람 음성 균인 *E. coli*의 경우 최소 60  $\mu$ L를 첨가한 경우에서 균체의 성장이 저해를 받아 0.59 g/L의 가장 낮은 최소저해농도를 나타내었다. *V. parahaemolyticus*, *A. naeslundii*, *E. faecalis*, *B. cereus*의 경우엔 최소 80  $\mu$ L를 첨가한 경우에서 균체의 성장이 저해를 받아 0.78 g/L의 최소저해농도를 나타내었으며 *P. fluorescens*, *V. anguillarum*, *S. aureus*, *S. mutans*의 경우엔 최소 100  $\mu$ L를 첨가한 경우에서 균체의 성장이 저해를 받아 0.98 g/L의 가장 높은 최소저해농도를 나타내었다. 충치를 유발시키는 것으로 알려져 있는 *S. mutans*와 생선의 비린내를 유발시키는 것으로 알려져 있는 *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*의 경우에 각각 균체의 성장이 저해를 받는 것으로 확인되었으므로 송이버섯 농축액은 충치 억제 효과 뿐만 아니라 젓갈 등의 수산식품에 적용된다면 생선의 비린내를 감소시키는 효과도 추가로 얻을 수 있을 것으로 예상된다 [18,19]. 송이버섯 추출물이 다양한 박테리아에 항균력을 갖는다는 결과는 이제껏 보고된 바가 없으며 본 연구를 통해 송이버섯 추출물의 어떠한 성분이 항균력을 갖는지를 연구할 중요한 기초자료가 될 것으로 사료된다. 따라서 항균력이 확인된 송이버섯 농축액을 저염 젓갈에 적용하기 위해 기존에 사용되던 식품보존제와 동시에 이용하여 최소저해농도를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 사용된 식품보존제로

**Table 1.** Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Tricholoma matsutake* extract for various Gram positive or negative bacteria

	Strain name	MIC (g/L)
Gram negative	<i>Escherichia coli</i>	0.59
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.98
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.78
	<i>Vibrio anguillarum</i>	0.98
Gram positive	<i>Actinomyces naeslundii</i>	0.78
	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.98
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0.78
	<i>Bacillus cereus</i>	0.78
	<i>Streptococcus mutans</i>	0.98

는 사과산나트륨 (Sodium DL-malate, Qingdao Fuso Refining & Processing, 중국)과 아질산나트륨 (Sodium nitrite, General Chemical Corporation, 미국)을 사용하였다 [20]. 최소저해농도를 확인하기 위한 표준 균주로는 *S. aureus*를 사용하였다.

사과산나트륨 또는 아질산나트륨이 단독으로 사용되었을 경우 *S. aureus*에 대한 최소저해농도를 알아보기 위한 실험을 수행한 결과 Table 2와 같이 각각 5 g/L와 1.4 g/L로 나타났다. 다음으로 각각의 식품보존제를 송이버섯 농축액과 혼합하였을 경우 *S. aureus*의 성장 저해 정도를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 이전의 실험에서 송이버섯 농축액을 단독으로 사용하였을 경우 건조중량 기준 최소 0.98 g/L을 첨가하였을 때 *S. aureus*의 성장을 저해하였으므로 그보다 낮은 농도인 0.50 g/L를 첨가하고 사과산나트륨 또는 아질산나트륨의 *S. aureus*에 대한 최소저해농도를 알아보았다. 사과산나트륨의 경우에는 송이버섯 농축액의 첨가와 무관하게 단독으로 사용하였을 경우와 마찬가지로 5 g/L의 최소저해농도를 나타내었으나, 아질산나트륨의 경우에는 송이버섯 농축액 첨가로 인해 최소저해농도가 1.4 g/L에서 0.5 g/L로 낮아졌음을 확인할 수 있었다 (Table 2). 다음으로 일반적인 저염 젓갈 제조에 사용되는 소금 4% 조건에 송이버섯 농축액을 건조중량 기준으로 0.50 g/L 첨가한 후 사과산나트륨 또는 아질산나트륨의 *S. aureus*에 대한 최소저해농도를 알아보았다. 이 경우 사과산나트륨과 아질산나트륨의 경우엔 최소저해농도가 각각 1.0 g/L와 0.1 g/L로 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이때 4% 소금의 첨가로 인해 사과산나트륨과 아질산나트륨의 최소저해농도가 감소하였는지 여부를 확인하기 위하여 소금 4%를 첨가하고 사과산나트륨과 아질산나트륨의 최소저해농도를 알아본 결과 사과산나트륨과 아질산나트륨이 단독으로 사용되었을 경우와 같은 결과인 5 g/L와 1.4 g/L로 나타났으므로 소금의 첨가로 인한 최소저해농도의 감소 효과는 없는 것으로 판단된다. 따라서 소금 4%에 송이버섯 농축액을 첨가함으로써 사과산나트륨과 아질산나트륨의 최소저해농도가 크게 감소하는 효과를 확인할 수 있었다.

최종적으로 소금 4%에 송이버섯 농축액을 건조중량 기준으로 0.50 g/L 첨가한 후 사과산나트륨과 아질산나트륨을 동시에 첨가한 후 *S. aureus*에 대한 최소저해농도를 확인하였다. Table 3과 같이 사과산나트륨과 아질산나트륨의 농도는

**Table 2.** Minimum inhibitory concentration of sodium DL-malate and sodium nitrite in various conditions using *S. aureus*

Food preservatives	Food preservatives only		With <i>Tricholoma matsutake</i> extract (0.5 g/L)		With <i>Tricholoma matsutake</i> extract (0.5 g/L) and salt (4 g/L)	
	Concentration (g/L)	Cell growth	Concentration (g/L)	Cell growth	Concentration (g/L)	Cell growth
Sodium DL-malate	5 g/L	-	5 g/L	-	3 g/L	-
	4 g/L	+	4 g/L	+	2 g/L	-
	3 g/L	+	3 g/L	+	1 g/L	-
	2 g/L	+	2 g/L	+	0.5 g/L	+
Sodium nitrite	1.6 g/L	-	1.2 g/L	-	1.0 g/L	-
	1.4 g/L	-	1 g/L	-	0.5 g/L	-
	1.2 g/L	+	0.5 g/L	-	0.1 g/L	-
	1.0 g/L	+	0.25 g/L	+	0.05 g/L	+

**Table 3.** Minimum inhibitory concentration of sodium DL-malate and sodium nitrite with *Tricholoma matsutake* extract (0.5 g/L) and salt (4 g/L) against to *S. aureus*

Sodium DL-malate (g/L)	Sodium nitrite (g/L)	Cell growth
1.0	0.1	-
0.5	0.05	-
0.25	0.025	-
0.125	0.0125	+

이전실험에서 확인된 최소저해농도인 각각 1.0 g/L와 0.1 g/L를 기준으로 하여 순차적으로 2배씩 희석하며 *S. aureus*에 대한 저해효과를 확인하였다. 실험 결과 각각 4배 낮은 농도인 0.25 g/L와 0.025 g/L의 최소저해농도를 확인하였다. 결과적으로 4%의 저염 젓갈의 제조공정에 있어서 송이버섯 농축액의 첨가로 인해 식품보존제인 사과산나트륨과 아질산나트륨의 첨가량을 크게 낮출 수 있음을 확인하였다. 이전에 보고된 연구결과에 따르면 항균력을 갖는다고 알려진 천연물질인 꿀, 감초, 울금, 베리 추출물 등을 이용하여 젓갈의 유통기한 증진에 관한 연구가 이전에 진행되었으며 송이버섯 농축액 또한 이와 유사한 기능을 할 것으로 예상된다 [2,21].

## 요약

송이버섯 추출액의 박테리아에 대한 항균력을 측정하기 위하여 최소저해농도를 확인한 결과 젓갈 제조시 빈번하게 발생하는 부패균, 어병원인 균등 9가지 박테리아에 대해 성장이 저해되는 것을 확인하였다. 확인된 송이버섯 추출액의 항균력을 저염 젓갈의 제조 공정에 적용하기 위해 식품보존제인 사과산나트륨과 아질산나트륨을 함께 첨가하여 *S. aureus*에 대한 최소저해농도를 확인하였다. 그 결과 사과산나트륨과 아질산나트륨의 최소저해농도가 각각 0.25 g/L와 0.025 g/L로 크게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 항균력을 갖는 송이버섯 추출액을 첨가함으로써 일반적으로 첨가되는 식품보존제의 농도를 크게 낮출 수 있었을 뿐 아니라 송이버섯의 다양한 기능성이 추가된 고급화된 저염 젓갈

을 개발할 수 있을 것으로 예상된다.

## Acknowledgements

This research was financially supported by the Ministry of Trade, Industry and Energy (MOTIE) and Korea Institute for Advancement of Technology(KIAT) through the Research and Development for Regional Industry.

## REFERENCES

- Kim, Y.-M., W. J. Lee, Y. M. Jeong, S. H. Hur, and S. H. Choi (1995) Processing conditions of low - salt fermented squid and its flavor components - 2. Effects of temperature, salinity and ph on the growth of bacteria from isolated low salt fermented squid. *J. Food Sci. Nutr.* 24: 631-635.
- Chae, S.-K. (2011) Studies on microbial and enzymatic actions during the ripening process of salted alaska pollack tripe. *Korean J. Food Nutr.* 24: 340-349.
- Lee, K. G. and S. M. Kim (2012) Quality changes in low-salted squid Jeot-gal during fermentation and determination of shelf-life. *J. Food Sci. Nutr.* 41: 687-694.
- Hong, Y., J. H. Kim, B. H. Ahn, and S. K. Cha (2000) The effects of low temperature storage and aging of Jeot-Kal on the microbial counts and microflora. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1341-1349.
- Hong, W. J. and S. M. Kim (2013) Quality characteristics, shelf-life, and bioactivities of the low salt squid Jeot-gal with natural plant extracts. *J. Food Sci. Nutr.* 42: 721-729.
- Han, J.-S., H. R. Cho, and H. S. Cho (2005) Study for the establishment of the quality index of low-salted Myungran-jeot. *Korean J. Food Cookery Sci.* 21: 440-446.
- Park, M.-L., S. K. Choi, and G. I. Byun (2007) A study on the establishing the preparation conditions for pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.) granular tea. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 17: 689-695.
- Liu, K., J. Wang, L. Zhao, and Q. Wang (2013) Anticancer, antiox-

- idant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. *Food Chem. Toxicol.* 58: 375-380.
9. Ren, M., L. Ye, X. Hao, Z. Ren, *et al.* (2014) Polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and *Lentinus edodes* enhance 5-fluorouracil-mediated H22 cell growth inhibition. *J. Tradit. Chin. Med.* 34: 309-316.
  10. Kim, Y. E., J. W. Yang, C. H. Lee, and E. K. Kwon (2009) ABTS radical scavenging and anti-tumor effects of *Tricholoma matsutake* Sing. (pine mushroom). *J. Food Sci. Nutr.* 38: 555-560.
  11. Hyun, H., Y. I. Choi, and T. S. Lee (2008) Antitumor and immunopotentiating activity against mouse sarcoma 180 by crude polysaccharides extracted from fruiting body of *Tricholoma matsutake*. *J. Life Sci.* 18: 1290-1298.
  12. Yu, S. H., M. S. Chong, H. J. Kim, and K. N. Lee (2007) Studies on the extraction method and polysaccharide of *Tricholoma matsutake* using the supersonic wave and microwave. *Korean J. Parasitol.* 21: 1431-1436.
  13. Kim, H. J., J. T. Bae, and I. S. Lee (2005) Inhibitive effects of edible mushrooms extracts on pathogenic bacteria and proliferation of cancer cells. *Korean J. Food Preserv.* 12: 637-642.
  14. Lee, E. J., J. E. Kim, M. J. Park, D. C. Park, and S. P. Lee (2013) Antimicrobial effect of the submerged culture of *sparassis crispa* in soybean curd whey. *Korean J Food Preserv.* 20: 111-120.
  15. Choi, S. Y., N. N. Kim, Y. E. Kim, Y. M. Lee, S. J. Kim, and J. H. Kim (2011) Inhibitory effects of cultured *Tricholoma matsutake* mycelia on melanin biosynthesis. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 240-242.
  16. Kim, I. H., E. J. Jin, and J. H. Lee (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of cambodian mushroom, *Phellinus linteus*. *Environmental Mutagens & Carcinogens* 26: 41-44.
  17. Kim, Y. D., K. J. Kim, and D. B. Cho (2003) Antimicrobial activity of *Lentinus edodes*. *Korean J. Food Preserv.* 10: 89-93.
  18. Ito, Keisuke, *et al.* (2011) Crystal structure of glucansucrase from the dental caries pathogen *Streptococcus mutans*. *J. Mol. Biol.* 408: 177-186.
  19. Kang, S. Y. (2005) The antimicrobial compound of rhus verniciflua barks against fish pathogenic gram-negative bacteria, *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *J. Fish Pathol.* 18: 227-237.
  20. Ryu, J. S., J. W. Park, and D. Y. Min (1995) Effect of sodium nitrite on *Trichomonas vaginalis*. *Korean J. Parasitol.* 33: 349-356.
  21. Cho, H. R., U. Y. Park, and D. S. Chang (2002) Studies on the shelf-life extension of *Jeotkal*, salted and fermented seafood. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 652-660.