

김치숙성과정 중의 Enzyme System에 관한 연구

박 회 옥* · 김 유 경 · 윤 선

연세대학교 생활과학대학 식품영양학과

*경기간호보건전문대학 식품영양과

A Study of Enzyme System during Kimchi Fermentation

Hee Ok Park*, Yoo Kyeong Kim and Sun Yoon

Dept. of Food a Nutrition, Yonsei University

**Dept. of Food a Nutrition, Kyonggi Jr. College*

Abstract

The object of this study was to investigate the enzyme system in kimchi during fermentation. The results were as follows;

1. Pectinesterase (PE) activity initially increased, following a decrease in kimchi juice but progressively decreased in kimchi solid.
2. Polygalacturonase (PG) activity in kimchi juice initially increased following a decrease near to absence and then increased again. PG activity in kimchi solid, initially decreased following a increase.
3. Peroxidase (POD) activity in kimchi juice initially increased, following a decrease and that in kimchi solid progressively decreased.
4. The activity of ascorbic acid oxidase (AAO) in kimchi juice slightly decreased, following a increase but decreased again. The activity of AAO in kimchi solid, progressively decreased. The cause for the slight increase of the activities of enzymes in kimchi juice after kimchi making was thought to be the extracting effects from kimchi solid. The disappearance of all enzyme activities in fermentation was due to the decrease of pH and the inactivation of enzymes owing to prolongation of fermentation. The cause of increase of PG activity in late fermentation, may be the proliferation of aerobic organisms.

서 론

한국인의 고유한 발효식품인 김치는 발효과정 중에 탄수화물, 아미노산 등에서 저분자화합물이 생성되어 독특한 산미와 진미를 가진 식품이다¹⁻³⁾. 이러한 김치에 대한 연구는 발효미생물의 개략적 연구로부터 시작하여 관여미생물⁴⁻⁷⁾ 김치성분 및 성분변화⁸⁻¹⁰⁾, 포장과 저장 방법^{11,12)} 등에 관하여 많이 행하여져 왔다. 그러나 김치 내의 enzyme system에 관한 연구는 매우 적은 편이다. 식품의 품질에 영향을 주는 효소에는 조직감과 관련이 있는 pectinesterase (PE)와 polygalacturonase (PG), 식품의 이취와 색소 및 영양소파괴와 관련이 있는 peroxidase (POD), 그리고 아스코르빈산 파괴와 연관되는 ascorbic acid oxidase (AAO) 등이 있다¹³⁾.

야채가 가공을 거치게 되면 식물조직은 파괴가 되고 따라서 각종 효소와 기질의 접촉이 가능하여진다. 수분은 효소작용을 위한 medium이 되고 또 기질을 운반하는 역할을 수행하여 효소가 기질에 작용할 수 있도록 하게 한다. 김치에는 효소와 기질을 이동시킬 수 있는 수분이 다량 존재하고, 또한 김치재료 및 미생물에서 분비되는 각종 효소가 존재할 것으로 추측되며 따라서 이들이 김치의 품질에 영향을 줄 것으로 기대된다. 이에 본 실험에서는 김치 숙성과정에 관여하는 enzyme system을 밝힘으로써 이들이 김치의 품질에 미치는 영향을 연구하는데 기초자료를 제공하고자 한다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

김치제조에 사용된 재료는 신선시장의 일정점포에서 구입하였으며 전 공정에서 사용한 소금은 성분이 균일한 정제염(한주소금)이었다. PE 활성측정을 위해 사용한 기질은 9.5%의 methoxyl 함량을 갖는 citrus pectin (No. P-9135, Sigma)이었고, PG 활성측정을 위해서는 기질로 polygalacturonic acid (No. P-3889, Sigma)와 발색제로 DNS(dinitrosalicylic acid, No. D-1510, Sigma)를 사용하였다. POD 활성측정을 위해 guaiacol (No. G-5502, Sigma)을 그리고 AAO 활성측정을 위해 아스코르빈산(Sinyo)을 기질로 사용하였다. 기타 실험에 사용한 시약들은 특급 혹은 1급시약을 사용하였다.

Table 1. Composition of Kinchi Materials

Materials	Amounts
Salted chirese cabbage	1,000 g
Red pepper powder	25 g
Garlic	25 g
Ginger	5 g
Fermented anchovy juice	12 ml
Salt	adjust to 3%

2. 김치의 제조

식용할 수 없는 외엽과 근부를 제거한 배추를 날장씩 뜯어 10% 소금용액에 12시간 침지시킨 후 흐르는 물에 3회 세척하고 증류수에 행구어 소쿠리에 담아 물기를 제거하였다. 물기가 거의 제거된 배추를 4~5 cm 길이로 절단하여 상법에 따라 Table 1과 같은 조성으로 골고루 혼합하여 200 g씩 polyethylne과 nylon이 층판된 봉투(28×26 cm)에 넣고 탈기포장하였다.

위와같은 방법으로 제조하여 15°C와 10°C의 항온기(B.O.D incubater, KMC)에 넣고 보관하면서 4일 간격으로 분석하였다.

3. 김치고형분과 김치국물의 효소활성 측정

1) 시료 준비

숙성과정에 따른 김치내 효소활성변화를 측정하기 위하여 날개 포장된 김치를 꺼내어 김치고형분에서 김치국물과 양념을 떼어내고 고형분과 국물을 분리 하였다. 고형분은 곱게 썰어 3% NaCl 용액과 1:1(W/V)의 비율로 넣고 waring blendec에서 2분동안 마쇄하였다. 4걸가아제에 걸러 9,000×g에서 원심분리(J2-21, Beckman)하여 상층액을 효소액으로 사용하였다. 김치국물은 1걸가아제에 걸러 다음 9,000×g에서 원심분리하여 상층액을 효소액으로 사용하였다.

2) 효소활성 측정

① Pectinesterase

육등¹⁴⁾의 방법을 변형시켜 사용하였다. 0.15M NaCl 함유 0.45% 펙틴용액 25 ml를 pH 7.0 이상으로 조절한 다음 효소액 1 ml를 넣었다. 정확하게 pH 7.0으로 조정 한 다음 이 순간부터 pH 7.0에서 3분동안 생성되는 산을 0.01N~NaOH로 적정하였다.

PE 역가는 pH 7.0에서 1분동안 1×10^{-7} M의 카르복

실기를 유리시킬 때 1단위로 나타내었다.

② Polygalacturonase

PG 활성은 효소의 작용으로 유리되는 환원당인 galacturonic acid의 함량을 DNS에 의한 비색법으로 측정하였다¹⁵⁾.

0.45% polygalacturonic acid 용액(0.1M NaCl 함유 0.03M citrate-phosphate 완충액, pH 5.5) 0.48 ml에 효소액 0.02 ml를 넣고 30°C 항온조에서 교반하면서 2 시간동안 반응시켰다. 100°C 수조에서 3분간 끓여 효소를 불활성화시킨 다음 0.1N-NaOH 0.5ml를 넣어 알칼리용액으로 만든 후 DNS 용액 1 ml를 첨가하고 다시 100°C 수조에서 5분간 끓였다. 곧 흐르는 물에 냉각시키고 증류수 5 ml를 넣어 충분히 혼합시킨 후 2,500×g에서 5분간 원심분리하였다. 공실험은 기질용액에 불활성화시킨 효소액을 첨가한 다음 위의과정을 똑같이 거쳤다. 520 nm에서 흡광도를 측정하여 α-D-galacturonic acid로 만든 표준곡선에서 환원당의 양을 구했다. PG 역가는 2시간 동안 1 mg의 환원당을 생성할 때 1단위로 정하였다.

③ Peroxidase

POD의 활성도는 김¹⁶⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 0.05 M potassium-phosphate 완충액(pH 6.5) 2.4 ml에 효소액 0.15 ml, 150 mM guaiacol 0.3 ml를 가하였다. 여기에 100 mM H₂O₂ 0.15 ml를 넣고 잘 저어준 다음 곧 470 nm에서의 흡광도 증가를 측정하였다. POD 역가는 1분동안 470 nm에서 흡광도 1.0을 증가시킬 때 1단위로 나타내었다.

④ Ascorbic acid oxidase

김등¹⁷⁾의 방법을 수정하여 AAO 활성을 측정하였다. 0.1 M potassium-phosphate 완충액(pH 5.5)에 아스코르빈산을 가하여 제조한 2×10⁻⁴ M 아스코르빈산용액 3 ml에 효소액 2 ml를 가하고 잘 혼합하여 30°C 수조에서 30분동안 효소를 작용시킨 다음 효소불활성화를 위하여 6% HPO₃ 5 ml를 가하였다. 2500×g에서 5분간 원심분리하여 hydrazine 비색법으로 아스코르빈산을 정량하였다¹⁸⁾. 공실험은 상기와 같이 제조한 2×10⁻⁴ M 아스코르빈산 용액 3 ml에 6% HPO₃ 5 ml를 넣은 다음 효소액 2 ml를 넣어 효소작용을 불활성화시키고 2,500×g에서 5분간 원심분리하여 hydrazine 비색법으로 아스코르빈산을 정량하였다.

540 nm에서 비색하고 아스코르빈산 표준곡선을 이용

하여 아스코르빈산 양을 구하였다. AAO 역가는 김치국물 및 김치고형분 1g이 30분동안 1μg의 아스코르빈산을 산화시켰을 때 효소활성 1단위로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

김치숙성과정 중 효소활성의 변화

1. Pectinesterase(PE)

김치제조 후 김치국물 내 PE 활성은 김치제조 초기에 0.5 unit/g kimchi juice이던 것이 10°C 저장의 경우 김치제조 9일(pH 4.02) 후에, 15°C 저장의 경우 김치제조 5일(pH 4.17) 후에 적숙기 근처에서 1.0~1.2 unit/g kimchi tissue로 최대 활성을 보인 후 감소하여 적숙기를 지난 김치제조 13일과 9일(순서대로)에는 거의 활성이 나타나지 않았다(Fig. 1과 Fig. 2).

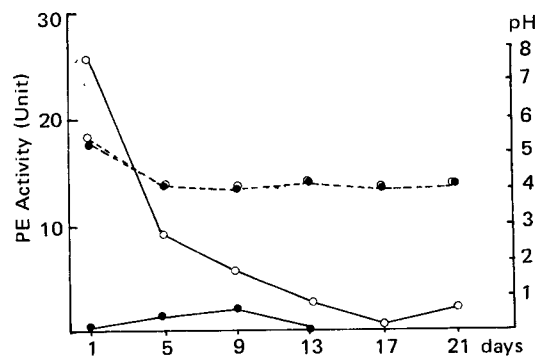


Fig. 1. Pectinesterase activity and pH in kimchi juice (●—● : PE activity, ●---● : pH) and kimchi solid (○—○ : PE activity, ○---○ : pH) for storage at 10°C.

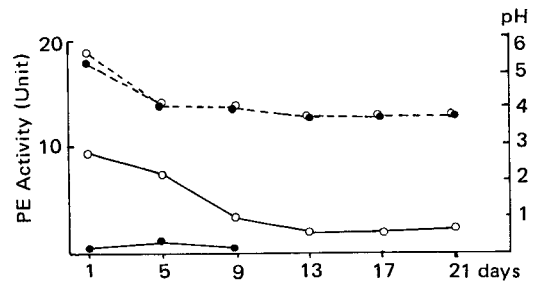


Fig. 2. Pectinesterase activity and pH in Kimchi juice (●—● : PE activity, ●---● : pH) and kimchi solid (○—○ : PE activity, ○---○ : pH) for storage at 15°C.

김치제조 직후부터의 김치국물내 PE 활성 증가는 김치조각의 손상으로 인하여 김치고형분에서 국물로의 유출결과로 생각되며, 이후 감소현상은 제조일 증가에 따른 활성 현상으로 추측된다.

김치고형분에서의 PE 활성변화는 김치제조 후 첫날에 가장 높은 활성을 보이다가 점차 감소하여, 10°C 저장의 경우 적숙기가 지난 김치제조 후 17일(15°C 저장의 경우 13일)이 지나자 활성이 상당히 낮아졌음을 알 수 있었다.

이것은 PE 활성이 pH 4.0 이하에서 현저히 떨어짐을¹⁹⁾ 고려할 때 숙성적기가 지난 김치에서는 PE가 김치내에서 활성을 나타내지 않을 것임을 말해준다.

2. Polygalacturonase(PG)

김치숙성과정 중의 김치국물 및 김치고형분에서 PG 활성변화를 측정된 결과를 Fig. 3과 Fig. 4에 각각 나타내었다.

김치국물의 PG활성은 김치제조 초기에 1.0 unit/g kimchi juice도 안되는 정도로 낮았으나 숙성이 진행되면서 증가현상을 보이다가 감소하여 김치제조 후 13일에 최저활성을 보인 후 숙성말기에 다시 활성증가 현상이 나타났다.

김치숙성과정 중 김치고형분내 PG활성변화는 김치제조후부터 감소하기 시작하여 김치 제조후 13일이 지나자 활성이 거의 사라진 다음 김치숙성 말기에 활성증가 현상이 현저히 나타났다.

이러한 현상은 김치 발효 초기에는 PG활성이 낮았으나 김치액 표면에 산막 미생물이 번식하여 연부될 때 PG활성이 증가하였다는 하 등²⁰⁾의 보고와 일치하고 있다. 육 등²¹⁾은 PG역가가 김치가 숙성함에 따라 감소하다가 말기에 증가하는 양상을 보였다 하고, 후기 활성증가 현상을 미생물이 분비하는 PG 때문으로 추정했다.

따라서 김치숙성 초기의 김치국물내의 PG활성 증가 현상은 김치고형분에서 김치국물로의 유출효과로, 그리고 김치 숙성 후기의 김치국물과 김치 고형분의 PG활성 증가 현상은 미생물의 번식으로 생성된 PG로 추정된다.

3. Peroxidase(POD)

김치제조 후 숙성과정에 따른 김치국물과 김치고형분내 POD 활성변화를 Fig. 5, 6에 나타내었다.

김치국물내 POD 활성은 김치숙성초기에 10°C 저장의

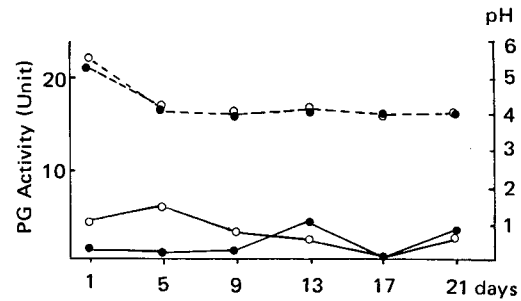


Fig. 3. Polygalacturonase activity in kimchi juice (●-● : PG activity, ●-● : pH) and kimchi solid (○-○ : PG activity, ○-○ : pH) for storage at 10°C

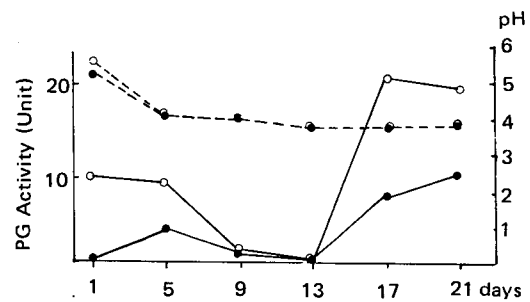


Fig. 4. Polygalacturonase activity and pH in kimchi juice (●-● : PG activity, ●-● : pH) and kimchi solid (○-○ : PG activity, ○-○ : pH) for storage at 15°C.

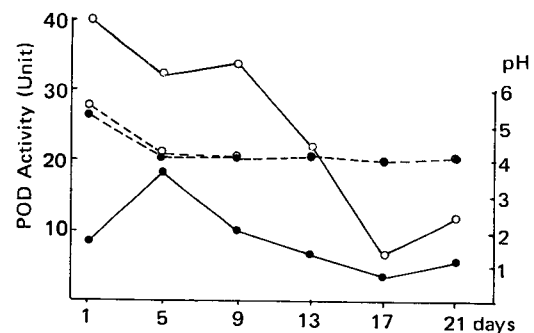


Fig. 5. Peroxidase activity and pH in kimchi juice (●-● : POD activity, ●-● : pH) and kimchi solid (○-○ : POD activity, ○-○ : pH) for storage at 10°C.

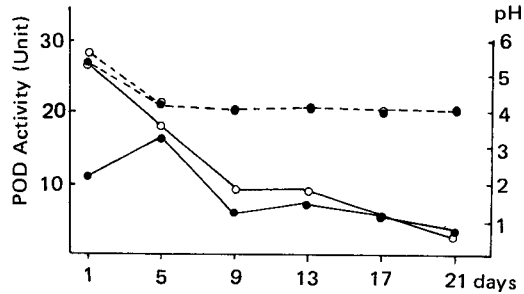


Fig. 6. Peroxidase activity and pH in kimchi juice (●—● : POD activity, ●—● : pH) and kimchi solid (○—○ : POD activity, ○—○ : pH) for storage at 15°C.

경우 8.5 unit/g kimchi juice, 15°C 저장의 경우 11.4 unit/g kimchi juice이던 것이 증가하여 적숙기 근처인 5일 후(각각 pH 4.09와 pH 4.17)에 순서대로 18.4 unit/g kimchi juice와 16.3 unit/g kimchi solid로 최대 활성을 보인 후 숙성이 진행됨에 따라 점차 감소하기 시작하였다.

김치고형분의 POD 활성은 김치 숙성초기에 10°C 저장의 경우 40.2 unit/g kimchi solid, 15°C 저장의 경우 26.8 unit/g kimchi solid에서 숙성이 진행됨에 따라 점차 감소하였으나 숙성 말기에도 활성이 상당량 존재하였다.

Bueschei등²²⁾은 오이피클을 저장하는 동안 이취 및 색소변화의 원인이 될 것으로 생각되는 POD 활성을 측정 한 결과 오이피클조직 내에서는 POD 활성이 점차 감소하는 경향이었으나 피클용액에서는 제조초기에 효소 활성이 존재하지 않다가 점차 활성이 증가한 다음 다시 감소하기 시작하여 오랜시간 잔존하다가 소멸하였다고 하였다. 이러한 현상은 본 연구의 결과와 일치하였다. 따라서 김치내의 POD 활성이 높은 사실로 미루어 김치 제조 후 숙성과정에서 나타나는 풋내와 같은 이취발생에 POD가 관여를 하리라 추정된다.

4. Ascorbic acid oxidase (AAO)

김치에 존재하는 AAO의 활성은 김치고형분의 경우 김치담금 제 1일부터 감소하기 시작하였으며 김치국물에서는 김치담금 제 5일(10°C 저장의 경우: pH 4.09, 15°C 저장의 경우: pH 4.17)에 약간의 감소현상을 보이다가 증가하여 10°C 저장에서는 제 13일(pH 4.14)에

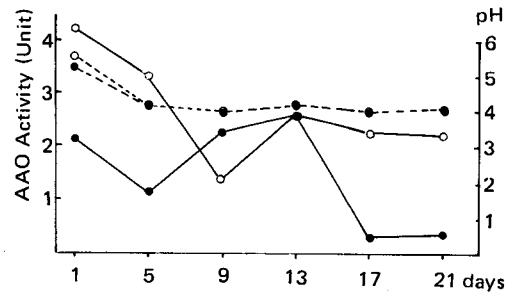


Fig. 7. Ascorbic acid oxidase activity and pH in kimchi juice (●—● : AAO activity, ●—● : pH) and kimchi solid (○—○ : AAO activity, ○—○ : pH) for storage at 10°C.

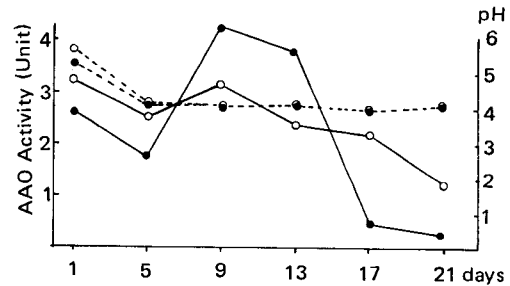


Fig. 8. Ascorbic acid oxidase activity and pH in kimchi juice (●—● : AAO activity, ●—● : pH) and kimchi solid (○—○ : AAO activity, ○—○ : pH) for storage at 15°C.

3.5 unit/g kimchi juice, 15°C 저장에서는 제 9일(pH 4.08)에 4.2 unit/g kimchi juice로 최대효소 활성을 보인 후 점차 감소하기 시작하였다(Fig. 7과 Fig. 8).

고등식물에 존재하는 AAO의 최적 pH는 일반적으로 pH 5.0~7.0사이로 알려져 있으며^{17,23,24)} pH 3.5이하에서는 실활된다²⁴⁾. 비타민 C는 김치내에 존재하는 glucose와 galacturonic acid로부터 생합성될 수 있고^{10,25)}, 또 김치발효시의 호기적 조건은 비타민C를 파괴한다²⁵⁾. 이등¹⁰⁾은 김치숙성 감소하다가 증가하여 숙성정기에 최고함량을 보이다가 다시 감소하기 시작한다고 보고하였다.

이러한 결과들로부터 김치제조 이후의 비타민C 파괴는 김치내 AAO 활성에 기인하는 것으로 보이며, 호기적 조건일때 더욱 큰 영향을 줄 것으로 생각된다. 따라서 김치숙성과정에 혐기적 상태를 유지시켜 주는 것이

비타민C 파괴를 억제하는데 효과적일 것이다.

IV. 요약

본 연구는 숙성과정에 관여하는 enzyme system을 밝힘으로써 이들이 김치의 품질에 미치는 영향을 연구하고자 시도되었다. 그 결과는 다음과 같다.

1. 김치국물에서의 pectinestrase (PE)활성은 담금 초기에 약간의 증가를 보이다가 이후 점차 감소하여 적숙기 이후에는 활성이 거의 나타나지 않았으며 김치고형분내의 PE활성은 김치제조 후 첫날에 최고활성을 보인 후 점차 감소하였다.

2. 김치국물의 polygalacturonase (PG)활성은 김치 제조 후 증가하는 경향을 보이다가 감소하여 활성이 거의 없어진 후(pH 4.0이하) 김치숙성 말기에 다시 증가하기 시작하였다. 김치고형분의 경우, 담금초기부터 감소하여 활성이 없어진 후 김치국물과 같이 다시 증가하기 시작하였다.

3. 김치국물내 peroxidase (POD)활성은 김치제조 후 증가하여 제 5일째에 가장 높은 활성을 보인 후 감소하였으며, 김치고형분의 경우엔 지속적인 감소현상을 보였주었다.

4. 김치에 ascorbic acid oxidase (AAO)가 존재하였으며, 김치국물내 AAO의 활성은 약간 감소한 이후 상승하였다가 다시 감소하였고, 김치고형분은 AAO 활성이 계속적으로 감소하였다.

김치국물내 효소들의 활성이 김치제조후 약간의 상승을 보이는 이유는 김치 고형분에서의 유출효과로 생각된다. 각 효소들이 김치숙성후기에 소멸되는 현상은 pH감소와 제조일 증가에 따른 불활성화 때문으로 생각되며, 김치숙성후기에 PG 활성이 증가하는 현상은 호기성 미생물의 번식 때문일 것이다.

참고 문헌

- 조영, 이혜수, 김치 맛성분에 관한 연구, 한국식품과학회지 **11(1)**:26, 1979.
- 류재연, 이혜성, 이혜수, 재료 종류에 따른 김치의 유기산 및 휘발성 향미성분의 변화, 한국식품과학회지 **16(2)**:169, 1984
- 허우덕, 하재호, 석호문, 남영중, 신동화, 김치의 저장중 향미성분의 변화, 한국식품과학회지 **20(4)**:511, 1988.
- 황규찬, 정운수, 김호식, 김치의 미생물학적 연구(제2보). 호기성세균의 분리와 동정, 과연회보 **5(1)**:51, 1960
- 김호식, 전재근, 김치발효중의 세균의 동적변화에 관한 연구, 원자력논문집, **6**:112, 1966
- Yildiz, F. and Westhoff, D., Associative Growth of Lactic Acid Bacteria in Cabbage Juice, *J. Food Sci.*, **46**:962, 1981
- Naewbanij, J.O., Stone, M.B. and Fung, D.Y.C., Growth of Lactobacillus Plantarum in Cucumber Extract Containing Various Chloride Satts, *J. Food Sci.*, **51(5)**:1257, 1986
- 김점식, 김일석, 정동효, 김치성분에 관한 연구(제1보). 동치미 숙성과정에 있어서의 성분동태, 과연회보, **4(1)**:35, 1959
- 윤진숙, 이혜수, 김치의 휘발성 향미 성분에 관한 연구, 한국식품과학회지, **9(2)**:116, 1977
- 이태영, 이정원, 김치숙성 중 Vitamin C 함량의 소장 및 Galacturonic acid의 첨가효과, 한국농화학회지, **(2)**:139, 1981.
- 이양희, 양익환, 우리나라 김치의 포장과 저장방법에 관한 연구, 한국농화학회지 **13(3)**:207, 1970
- 윤석인, 김치보존성 연구, 한국식품공업협회 식품연구소, 1987.
- Fennema, O.R., Food Chemistry: 6, Enzymes. T. Richardson and D.B. Hyslop, Dekker PP. 371-476, 1985
- 육철, 장금, 박관화, 안승요, 예비열처리에 의한 김치의 연화방지, 한국식품과학회지, **17(6)**:447, 1985.
- 정동효, 장현기, 최신식품 분석법, 식품 규격공정시험법, 삼중당, 1985.
- 김정아, Isoperoxidase A₄의 정제 및 특성에 관한연구, 연세대학교 석사학위논문, 1987
- 김정원, 박은순, 윤선, 오이의 ascorbic acid oxidase에 관한 연구, 한국영양학회지, **18(4)**:312, 1985
- 이현기, 황호관, 이성우, 박원기, 이용천, 식품화학실험, 수학사, 1989.
- 박희옥, 김기현, 윤 선, 김치재료에 존재하는 Pectinesterase, Polygalacturonase 및 peroxidase 특성에 관한 연구, 한국식문화학회지, **5(4)**:443, 1990
- 하순섭, Pectin 분해효소 및 산막미생물이 침채류의 연부에 미치는 영향에 관하여, 과연회보, **2**:139, 1960
- 육 철, 장 금, 박관화, 안승요, 예비열처리에 의한 무우김치의 연화방지, 한국식품과학회지, **17(6)**: 447, 1985
- Buescher, R.W., McGluire, C. and Skulman, C. Catalase, Lipoxygenase and Peroxidase Activities

- in Cucumber pickles as Affected by Fermentation, Proessing and Calcium Chloride, *J Food Sci* **52(1)**: 228, 1986
- 23) Vines, H.M. and Oberbacher, M.F., Citrus Fruit Enzymes: 1. Ascorbic Acid Oxidase in Orange Peel, *Physiol* **38**:333, 1963
- 24) Stelaharel, J.K. and Ben-Shalom, N., Ascorbate Oxidase in Mature Orange Peel, *J. Food Sci.*, **46**: 1407, 1981.
- 25) 이경자, 김치의 숙성환경이 비타민C의 생합성 및 파괴에 미치는 영향, 서울대학교 석사학위논문, 1968