

솔잎(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 물추출물 첨가김치의 숙성 중 젖산균수와 효소활성의 변화

오영애* · 최경호* · 김순동

대구효성가톨릭대학교 식품공학과
*대구효성가톨릭대학교 식품영양학과

Changes in Enzyme Activities and Population of Lactic Acid Bacteria during the *Kimchi* Fermentation Supplemented with Water Extract of Pine Needle

Young-Ae Oh[†], Kyoung-Ho Choi* and Soon-Dong Kim

Dept. of Food Science and Technology, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan 713-702, Korea

*Dept. of Food and Nutrition, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungsan 713-702, Korea

Abstract

To understand the effect of supplement of water extract of pine needle(WEPN) on shelf-life enhancement of the *kimchi*, activities of four enzymes and number of lactic acid bacteria, during fermentation of the *kimchi*, were assayed. Enzyme activities of *kimchi* fermented for 7 days with supplement by 2% water extract of pine needle showed amylase of 86.4%, protease of 85.8%, polygalacturonase of 61.5% and β -galactosidase of 58.8% against the control *kimchi*. WEPN showed weak inhibitory effect when it was applied to the isolated enzymes *in vitro* than those manifested by the *kimchi in vivo*. Number of total bacterial cell of WEPN supplemented *kimchi* increased by 10 folds than control between 7 to 14 days of fermentation. On contrast, number of lactic acid bacteria decreased maximally to 21% of control by fermentation. The clear zone formed on paper disk by WEPN against *L. plantarum* was larger than that of *Leu. mesenteroides*.

Key words: pine needle, *kimchi*, enzymes activities, antimicrobial activity

서 론

김치의 가식기간을 연장시키고자 하는 연구는 김치 내의 미생물을 제어함으로써 보존성을 증진코자 하는 연구(1-3)가 주로 이루어지고 있다. 김치 제조는 소금 절임, 발효숙성 및 산패의 과정으로 이루어지는데 소금 절임은 삼투작용으로 인한 탈수와 소금의 침투로 효소가 이탈되어 활성화하는 과정이다(4-8). 발효숙성은 초기에는 재료 유래의 각종 효소류가 작용하여 젖산균이 잘 번식할 수 있는 환경을 조성하며, *Leu. mesenteroides*의 번식이 현저하다(9). 후기에는 김치내에서 번식한 미생물 유래의 효소가 활성화하는 시기로 *L. plantarum*이 증가하는 반면에 *Leu. mesenteroides*는 감소하는 시기이다(10,11). 생성된 미생물에 의해 과도한 산을 생성하게 되며 동시에 조직의 연화를 초래하여 산패하게 된다

(2). 배추에는 각종 효소들이 함유되어 있으며 소금절임시에 활성화되기 시작한다(12-14). 따라서 효소적 측면에서의 연구 또한 보존성과 밀접한 관련이 있을 것으로 생각된다(15,16). 김치 보존성은 어느 한 연구에 국한되어 연구하는 것은 효과를 거두기가 어렵다. 저장성을 늘리기 위해서는 효소작용과 미생물의 동시에 제어할 수 있는 종합적인 기능성 물질이 요구된다.

국내 부존자원 중 솔잎에 대해서는 그다지 많이 밝혀지지 않았지만 최근 천연 종합 기능성 식품의 이용으로 솔잎에 대하여 많은 연구(17-21)가 이루어지고 있다. 강 등(22,23)은 약용식물, 향신료, 과채류 등 총 102종을 검색한 결과 솔잎이 김치의 보존성 증진에 효과가 있음을 발표하였지만 그러나 뚜렷한 이유에 대해서는 언급치 않고 있다. 본 연구에서는 솔잎 물추출물이 김치 보존성에 미치는 영향을 미생물의 생육과 효소작용의 동

[†]To whom all correspondence should be addressed

시적 제어에 초점을 두어 조사하였다.

재료 및 방법

재료

배추는 1.5~2.0kg의 가을 결구배추(*Brassica campestris* var. *pekinensis* cv.)를 0°C에서 저장하면서 공시하였다. 무우, 부추, 마늘, 생강, 고추가루, 소금 및 액체육젓은 (주)아진농산에서 제공받아 사용하였으며, 솔잎은 대구효성가톨릭대학교 야산에 서식하는 솔잎(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.)을 동결건조시킨 분말(30 mesh)을 사용하였다.

솔잎 물추출물의 제조

솔잎분말에 10배량의 물을 가하여 80~90°C에서 5시간 동안 가열한 후 여과하고 이를 40°C에서 감압농축하여 g/ml의 용액을 만들어 김치 첨가용의 시료(WEPN: water extract of pine needle)로 하였다.

소금절임

배추의 겉걸질을 제거한 후 4등분하고, 배추량에 대하여 10% 소금물 1.5배량을 가하여 10°C에서 24시간 절임하였다. 절임 중 염도를 균일하게 하기 위하여 절임용기의 밑부분으로부터 상부로 회전시키는 방법으로 염수를 3회 섞어 주었다. 절임 후는 10배량의 수도물로 세척하여 최종 염도를 3%로 조절하였다.

담금 및 숙성

담금은 4등분한 절임배추 100g에 대하여 채썰은 무우 8.9g, 부추 2.47g, 생강 0.52g, 마늘 2.39g, 멸치액젓 5.84g, 고추가루 5.84g를 잘 혼합하여 절임배추에 골고루 잘 버무렸으며, 담금량은 절임배추량으로 300g씩을 380ml의 유리병에 넣은 후 밀봉하여 10°C에서 숙성시켰다. 솔잎첨가 김치는 양념에 솔잎 물추출물을 절임배추 100g에 대하여 2g이 되게 잘 혼합하여 무침가구와 동일하게 처리하였다.

pH 및 산도

김치국물과 조직을 합하여 Polytron homogenizer로 파쇄한 후 miracloth(Biochem. Co., USA)로 여과한 여액을 측정용 시료로 사용하였으며, pH는 pH meter(Mettrohm 632, Swiss)로, 산도는 시료액의 중화에 소비된 0.1N-NaOH량을 lactic acid %로 환산하였다.

총균수 및 젖산균수 측정

배추김치의 국물과 조직을 합한 것을 살균 Polytron homogenizer로 균질화한 후 0.1% peptone 수로 희석하여, 총 균수는 plate count agar(5g tryptone, 2.5g yeast extract, 1g dextrose, 1.5% agar, 1L distilled water, pH 7.0), 젖산균수는 0.02% sodium azide와 0.06% bromocresol purple를 함유하는 MRS agar(10g peptone, 10g Lab-lenco meat extract, 5g yeast extract, 20g glucose, 1g tween 80, 2g K₂HPO₄, 5g sodium acetate, 0.2g MgSO₄ · 7H₂O, 0.05g MnSO₄ · 4H₂O, 2g triammonium citrate, 1L distilled water, pH 7.0)에 접종, 37°C에서 각각 평판 배양하여 나타난 colony를 계측하였다. *Leu. mesenteroides*는 sodium azide sucrose 고체배지(24)에, *L. plantarum*은 modified Rogosa SL 액체배지(25,26)를 이용하여 30~37°C에서 2~3일간 배양하여 최확정수법으로 계수하였다.

항균력 유무 조사

검정균에 대한 솔잎 추출물의 항균력은 보관 중인 각 균주를 배지에 접종하여 하룻동안 활성화시키고, 멸균 nutrient agar에 1% 접종한 후 petri dish에 분주하여 냉장고에 24시간 방치하였다. 멸균된 paper disc(직경 8mm, Whatman No. 2)에 추출물의 일정량을 흡수시켜 plate 표면 위에 가볍게 고정시킨 후 냉장고에서 하룻밤 방치시킨 다음, 35°C에서 48시간 배양한 후 disc 주위에 생성된 inhibitory zone의 크기로 항균력을 측정하였다(27,28).

Amylase의 추출 및 활성도 측정

Moshrefi와 Luh(29)의 방법을 기본으로 하여 다음과 같이 행하였다. 김치의 파쇄한 김치즙액 100ml를 취하여 80% ammonium sulfate로 염석한 후 8,000g에서 30분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.1N acetate buffer (pH 5.0)에 녹여 조효소액으로 하였다. 기질용액은 1g의 corn starch를 50ml의 증류수에 현탁시키고 2N NaOH 용액 50ml를 가하여 30°C에서 3시간 호화, 2N acetic acid로 pH 5.6으로 조정하여 최종 농도를 4mg/ml로 하였다. 이 기질용액 2.5ml에 조효소액 100μl, 20mM acetate buffer 900μl(pH 5.0)를 가하여 37°C에서 20분간 반응시키고 생성된 당을 Somogyi-Nelson법(30,31)으로 측정하였으며, 효소 활성도는 김치 1g에 시간당 생성된 glucose mg으로 나타내었다.

Protease의 추출 및 활성도 측정

효소 추출은 윤 등(32)의 방법에 따라 0.1M phosphate

buffer(pH 6.0) 100ml를 가하여 30분간 균질화한 후, 10,000g에서 20분간 원심분리하여 얻은 상정액을 ammonium sulfate 80%로 포화시키고, 다시 30분간 교반한 후 12,000g에서 20분간 원심분리하였다. 침전물을 0.1M phosphate buffer(pH 6.0)에 녹여 조효소액으로 사용하였다. 효소활성은 Kunitz법(33)에 따라 기질용액 20mM phosphate buffer(pH 7.0)에 녹인 1% ham-masten casein용액 2.5ml에 효소용액 0.2ml와 증류수 1.8ml를 가한 후 40°C에서 20분 동안 반응시킨 다음 5% trichloroacetic acid용액으로 반응을 정지하여 30분간 방치한 후 Whatman No. 40 여과지로 여과하고 여액을 280nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성도는 김치 1g에 시간당 흡광도로 나타내었다.

Polygalacturonase의 추출 및 활성도 측정

Tucker 등(34)의 방법에 준하여 김치를 파쇄한 착즙액에 같은 부피의 1M NaCl용액을 가하여 잘 혼합한 후 0.1N NaOH용액으로 pH를 6.0으로 조정하여 4°C에서 24시간 동안 침출시켰다. 이것을 miracloth로 여과한 후 원심분리하여 75% ammonium sulfate로 염석하고 13,000g에서 20분간 원심분리하여 얻은 침전물을 0.01M acetate buffer(pH 5.0)에 녹여 같은 용액으로 투석시켜 조효소액으로 하였다. Polygalacturonase의 활성도는 Gross 등(35,36)의 방법에 준하여 0.5% polygalacturonic acid를 함유하는 buffer용액(pH 5.0) 100μl에 효소액 50μl를 가하여 30°C에서 30분간 반응시킨 다음 100mM borate buffer용액(pH 9.0) 1ml를 vortex 상에서 가하여 반응을 정지시켰으며 Somogyi-Nelson시약에 의하여 정색하여 520nm에서 흡광도를 측정, 표준품 galacturonic acid로 검량선(galacturonic acid μg/6.5mL=OD₅₂₀×83.3-0.083, r=0.9790)을 구하였다. 효소활성도는 김치 100g이 1분간 작용하여 생성된 galacturonic acid의 μg으로 하였다.

β-Galactosidase의 추출 및 활성도 측정

Moshrefi와 Luh(29)의 방법을 기본으로 하여 다음과 같이 행하였다. 즉 김치착즙액 100ml를 취하여 80% ammonium sulfate로 염석한 후 8,000g에서 30분간 냉동원심분리하여 얻은 침전물을 10mM Tris buffer용액(pH 7.0)에 녹여 0~4°C에서 24시간 동안 분자량 6,000 이하를 제거하는 membrane tubing을 사용하여 동일 buffer로써 투석한 후 정용하여 조효소액으로 하였다. 모든 추출조작은 4°C에서 행하였다. 활성도 측정은 기질 p-nitrophenyl-β-galactoside를 가수분해하여 생성

된 β-nitrophenol 함량을 측정하였다. 즉 p-nitrophenyl-β-galactoside 100mg%와 100mM 2-mercaptoethanol을 함유하는 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 MgCl₂ 10mM, NaCl 100mM이 되게 한 용액 2ml에 효소액 0.5ml를 가하여 30°C에서 30분간 반응시키고 즉시 vortex상에서 200mM의 Na₂CO₃ 1ml를 가하여 반응을 정지시킨 후 420nm에서의 흡광도를 측정하였다. 활성도는 표준품 p-nitrophenol(Sigma Co.)의 검량선(p-nitrophenol mg%=4.76×OD₄₂₀-0.22, r=0.95)에 의하여 함량을 산출한 후 김치 100g에 효소가 1분간 작용하여 생성된 p-nitrophenol mg를 활성도로 나타내었다.

통계처리

모든 data는 3반복 실험 평균치로 표시하였으며, 평균치간의 유의성은 SAS program(37)을 이용하여 Duncan's multiple range test에 의하여 검증하였다.

결과 및 고찰

pH와 산도

슬일 물추출물을 2%첨가한 김치를 10°C에서 숙성시키는 동안 pH와 산도의 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 2에 각기 나타내었다. 담금 7일째까지는 첨가김치와

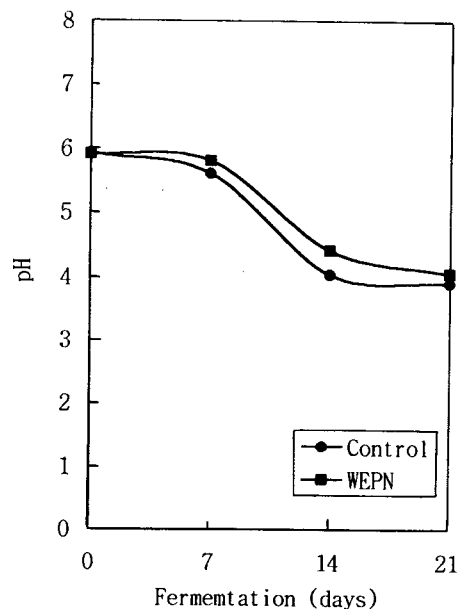


Fig. 1. Changes in pH the WEPN-supplemented kimchi during fermentation.

WEPN(2%) was supplemented to the kimchi at initial seasoning. Fermentation was carried out at 10°C.

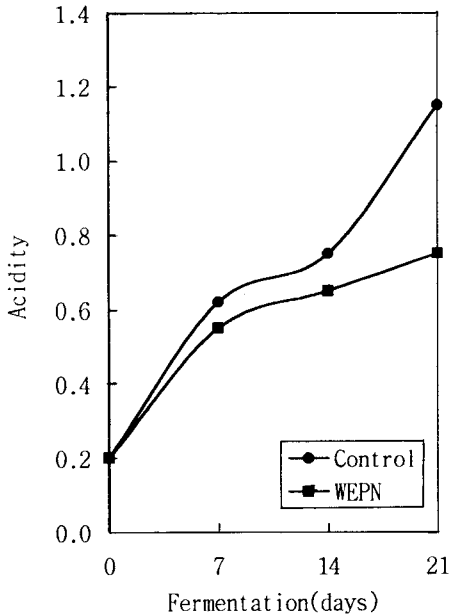


Fig. 2. Changes in acidity of the WEPN-supplemented kimchi during fermentation. Acidity was represented as the percent of lactic acid estimated from consumed alkali solution to neutralize the kimchi. Other experimental conditions were the same as Fig. 1.

무첨가 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 담금 14일째에는 첨가김치는 4.40, 무처리 김치는 4.03이었으며, 21일째는 각각 4.05, 3.89로 무첨가 경우 보다 첨가 김치에서 높은 pH를 나타내어 숙성이 지연되는 현상을 나타내었다. 김치는 10°C에서 저장할 경우 15일간 정도는 먹을 수 있는 반면에 첨가김치는 21일째에도 pH 4.0 이상을 유지하여 가식기간이 연장되었다. 산도의 측정 결과도 pH의 결과와 거의 일치하였는데 14일

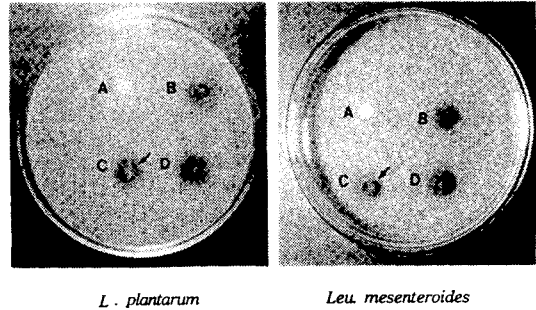


Fig. 3. Inhibitory effect of various concentrations of WE-PN against *L. plantarum*(LP) and *Leu. mesenteroides*(LM).

An arrow represented inhibitory zone.
A: Control, B: 1%, C: 2%, D: 3%

째의 무첨가 김치의 산도가 0.75인데 비해 첨가김치는 20일째 0.75를 유지하여 가식기간이 7일정도 연장되었다.

항균력

솔잎 추출물의 항균력을 paper disc법(25,38,39)으로 조사한 결과는 Fig. 3에서와 같다. 그 결과 두 균주 모두에 대해 inhibitory zone이 형성되었다. 같은 농도에서 비교해 볼 때 항균범위는 *Leu. mesenteroides* 보다 *L. plantarum*에서 inhibitory zone이 더욱 크게 나타남과 동시에 선명한 생육저지환을 형성하였다. Table 1은 추출 용매별, 솔잎 농도별로 항균력을 측정하여 inhibitory zone의 크기를 지름으로 표시한 값으로 물, 에탄올, 메탄올, 에테르로 추출한 솔잎 추출물 모두에서 항균력이 있었으며, 특히 그 중 물 추출물의 저지환 크기가 가장 크게 나타났다. *Leu. mesenteroides*와 *L. plantarum*에 대한 생육저지환의 크기를 비교해 보면 4가지 추출물 모두가 *L. plantarum*에 대한 저지환 크기가 더 크게 나

Table 1. Anti-microbial effect(diameter¹⁾of inhibitory zone) of various pine needle extracts (mm)

Solvents	<i>Lactobacillii</i>	Concentration of WEPN ²⁾ (%)			
		0	1	2	3
Water	<i>L. plantarum</i>	0 ^{dA3)}	14.2 ^{cA}	17.1 ^{bA}	19.0 ^{aA}
	<i>Leu. mesenteroides</i>	0 ^{dA}	10.0 ^{eB}	12.1 ^{bB}	13.6 ^{aB}
Methanol	<i>L. plantarum</i>	0 ^{dA}	12.3 ^{cA}	13.5 ^{bA}	15.7 ^{aA}
	<i>Leu. mesenteroides</i>	0 ^{dA}	9.4 ^{eB}	10.5 ^{bB}	11.2 ^{aB}
Ethanol	<i>L. plantarum</i>	0 ^{cA}	11.3 ^{bA}	12.0 ^{aA}	12.3 ^{aA}
	<i>Leu. mesenteroides</i>	0 ^{cA}	10.5 ^{bB}	11.0 ^{aB}	10.9 ^{aB}
Ether	<i>L. plantarum</i>	0 ^{cA}	10.4 ^{bA}	10.4 ^{bA}	13.0 ^{aA}
	<i>Leu. mesenteroides</i>	0 ^{dA}	8.6 ^{bcB}	8.9 ^{bB}	9.2 ^{aB}

¹⁾Numbers in the Table represents mean of inhibitory zone diameter. Diameter of paper disc was 8mm.

²⁾WEPN: Water extracts pine needle

³⁾Different superscripts within a column(a~d) and raw(A~B) indicate significant differences(p<0.05).

타났음을 볼 수 있다. 강 등(22)은 술잎에 있는 polyphenolic compounds가 항균력이 있다고 보고하였고, 한(40-42)은 술잎이 항암효과가 있음을 보고하여서 술잎 추출물은 항균력과 항암효과가 있음을 알 수 있다.

김치의 보존성의 증진에 대한 관심은 어느 때보다 높은 것으로 특히 최근에 보존성과 관련하여 다수의 특허(43-45)가 출원되고 있으며 관련 연구(46,47)도 많이 이루어지고 있다. 이들 연구는 주로 미생물을 저해함으로써 보존성 효과를 나타내는 것들로 알려져 있다(48, 49). 김치의 숙성은 미생물 발효에 의해서 이루어짐으로 미생물의 번식이 중단된다면 김치로서의 가치를 상실하기 때문에 김치가 될 수 있는 적당한 항균력을 지니는 저해제 즉 미생물을 선택적으로 저해할 수 있는 천연 기능성 물질이 요구된다. 김치발효 초기는 재료에 부착된 미생물로 발효가 시작되어 불필요한 미생물도 번식하지만 이시기를 지나면 크게 두가지 형태의 젖산균이 번식하게 된다(50). 전기에는 젖산 생성량이 적고 산의 내성이 약한 *Leu. mesenteroides*가 번식하고 그 후에는 젖산 생성량이 많으며 산내성이 강한 *L. plantarum*이 번식한다(10,25,26). 그러므로 김치가 젖산발효를 일으키면서 가식기간을 늘이기 위해서는 가능한 한 *Leu. mesenteroides*의 번식에는 무관하면서 젖산 생성량이 높은 젖산균을 선택적으로 제어할 수 있는 항균제의 개발이 요망되고 있다.

젖산균의 생육

김치 숙성 중에 젖산균 수의 변화를 측정한 결과는 Table 2와 같다. 숙성 전반에 걸쳐 *Leu.*와 *Lactobacilli* 모두 술잎을 첨가한 경우가 무첨가 보다 적었다. *Leu. mesenteroides*는 김치의 주 발효균으로 김치 발효에서 숙성 초·중기에 가장 많이 나타나며 젖산, 초산, succinic acid를 생성하는 것으로 알려져(51,52) 있으며, *L.*

*plantarum*은 김치숙성 후기에 많이 번식하여 다량의 산을 생성함으로 김치의 가식기간을 결정적으로 단축시키는 젖산균으로 알려져 있다(25,53,54). 김치숙성 기간 중에 총 균수와 젖산균수(Table 2)는 술잎을 첨가한 경우가 무첨가 보다 숙성 전반에 걸쳐 총 균수와 젖산균수가 모두 적었다. 이 결과는 술잎첨가로 인한 저해효과로 인해서 생기는 영양원의 공급부족으로 해석된다.

효소활성

술잎 물추출물의 첨가가 amylase, protease, β -galactosidase 및 polygalacturonase 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 *in vitro* 실험을 행한 결과는 Fig. 4와

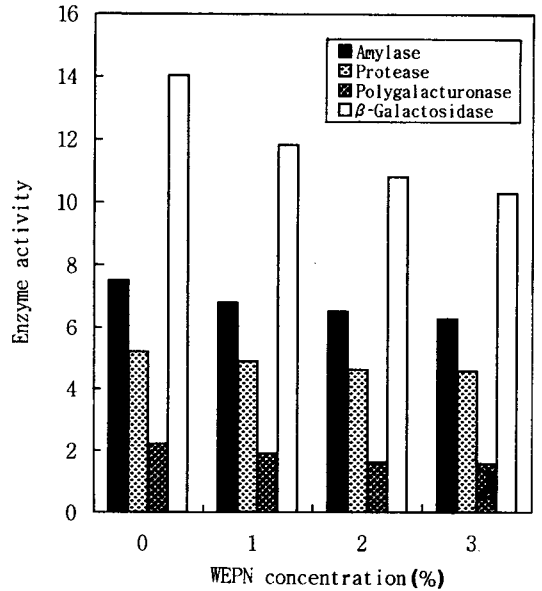


Fig. 4. Effect of WEPN concentration on activity of some enzymes acting on kimchi during fermentation.

Table 2. Changes in number of total microorganism and lactic acid bacteria in WEPN added kimchi(2%) during fermentation at 10°C (CFU/1g of kimchi)

Treatments	Fermentation time(days)				
	0	7	14	21	
Total microorganism(TM)	Control	1.15×10 ⁸	4.86×10 ⁹	1.84×10 ¹⁰	2.66×10 ⁹
	WEPN	1.50×10 ⁸	4.34×10 ⁹	5.16×10 ⁹	2.38×10 ⁹
Total lactic acid bacteria(TL)	Control	0.40×10 ⁷	1.81×10 ⁹	1.25×10 ¹⁰	2.31×10 ⁹
	WEPN	0.50×10 ⁷	1.73×10 ⁹	1.59×10 ⁹	2.13×10 ⁹
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Control	0.09×10 ⁷	1.15×10 ⁹	0.51×10 ¹⁰	0.41×10 ⁹
	WEPN	0.08×10 ⁷	1.01×10 ⁹	0.66×10 ⁹	0.29×10 ⁹
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Control	0.01×10 ⁷	0.61×10 ⁹	0.69×10 ¹⁰	1.81×10 ⁹
	WEPN	0.10×10 ⁷	0.47×10 ⁹	0.71×10 ⁹	1.43×10 ⁹
Ratio of lactic acid bacteria TL/TM×100	Control	3.48	38.89	67.93	86.84
	WEPN	3.33	3.98	3.08	8.95

TL: Total lactic acid bacteria, TM : Total microorganism

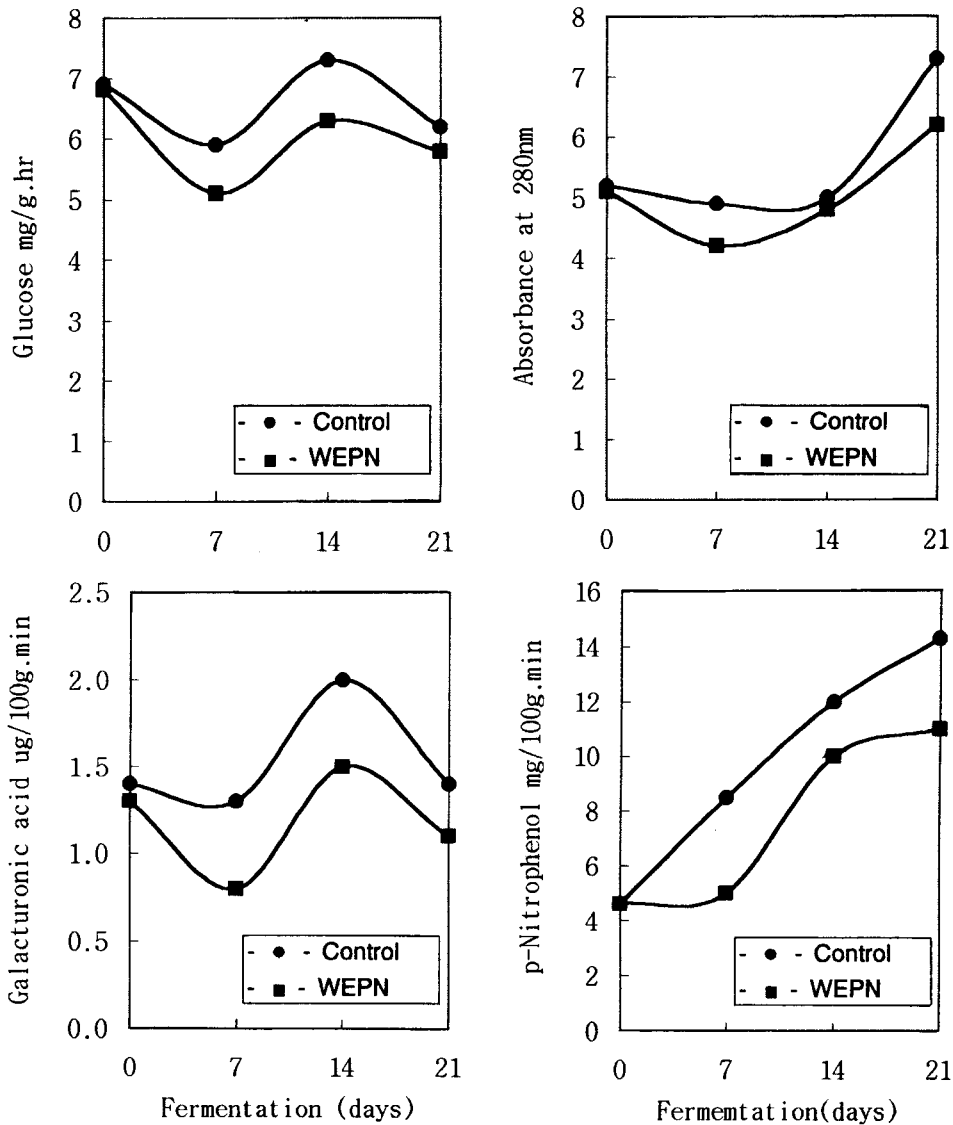


Fig. 5. Changes in enzyme activities of WEPN supplemented *kimchi* during fermentation WEPN(2%) was supplemented. Enzyme activities were assayed as described in Fig. 4.

같다. 4가지 효소의 활성이 모두 솔잎 물추출물에 대해 활성이 낮았으며, 솔잎 물추출물량이 많을수록 저해율은 높게 나타났다. 솔잎 물추출물을 2% 첨가한 결과 amylase는 약 16%, protease는 5.8%, β -galactosidase는 14.3%, polygalacturonase는 18.1%가 각각 저해되었다. 솔잎내에 이들 효소류의 활성을 저해하는 물질에 대하여는 연구된 바 없으나 강 등(22)은 솔잎첨가 김치에서 보존성의 증진효과를 나타내는 물질로서 polyphenol성 물질을 추정하였다. 그리고 양(55)은 솔잎으로부터 trypsin 저해제를 분리하였으며, 이(56)는 솔잎으로부터 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase

의 저해물질을 분리하였다. 솔잎 물추출물(WEPN)을 김치에 첨가한 후 숙성 중의 효소활성 변화에 대해 조사한 결과는 Fig. 5에서와 같다. Amylase의 경우 무첨가 김치에서는 담금 당일 6.81 units였으나 7일까지 점차 감소하여 5.81 units를 나타내었다가 14일까지 다시 증가하였고, 21일까지는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. WEPN 김치의 경우는 담금 당일에서부터 숙성 초·중기에 무첨가에 비해 효소활성을 크게 저해되었다. 그러나 숙성 후기에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 WEPN 김치는 숙성 초기에 담금재료에서 유래하는 amylase 활성을 저해시킴으로서 중·후기의

젖산균 증식을 둔화시키는 것으로 사료된다. Protease 역시 무첨가 김치 경우는 숙성 초·중기에 활성이 떨어지다가 숙성 후기에는 급격히 증가하는 경향을 나타내었는데 WEPN 김치에서는 숙성전반에 걸쳐 무첨가구보다 활성이 낮게 나타났다. Polygalacturonase는 숙성 초기에는 WEPN 김치가 무첨가 경우보다 효소의 활성이 크게 떨어졌으나, 숙성 중·후기에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. β -Galactosidase는 무첨가 경우에 활성이 직선적으로 증가하는 반면 WEPN을 첨가한 경우는 무첨가구와 같은 경향이었으나 증가율은 둔하였다. 이상의 결과에서 보면 무첨가구 김치에서는 amylase, polygalacturonase, β -galactosidase 및 protease 모두가 담금 당일에 활성이 매우 높게 나타났으며 다시 숙성 중·후기에 증가하는 현상을 볼 수 있고, WEPN을 첨가하였을 때는 숙성 초기에 현저한 저해효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 담금 초기에 이들 효소류의 활성이 높게 나타난 것으로 미루어 소금절임 직후부터 효소의 작용이 활발히 진행되고 있음을 잘 나타내 주고 있으며 이는 소금절임으로 인하여 효소류가 활성화됨을 시사한다. 즉 세포벽에 결합된 효소류가 소금절임시 조직의 손상과 함께 이탈되어 활성화되는 것으로 보인다(7). 또, 세포벽이 손상되면서 원형질을 이루는 각종 영양물질이 빠져 나오게 되며, 김치숙성의 근간을 이루는 젖산균의 번식환경을 조성하게 된다(8,15). 숙성 7일째까지는 효소류의 활성이 줄곧 감소하고 그 이후 다시 증가하는 이 시기는 김치에 존재하는 유리상태의 영양원이 미생물의 증식에 의하여 고갈되고 나면, 미생물이 고분자물질을 분해할 수 있는 체외효소를 방출하는 것이 아닌가 생각된다(57,58). WEPN을 첨가하였을 때 숙성 초기에 효소류의 활성을 저해시킨 현상과 술잎 물추출물의 가식기간이 연장된 현상을 관련지어 볼 때 술잎 첨가로 인한 가식기간 연장효과는 술잎내 특정 성분인 재료에서 유래하는 효소작용을 저해시킴으로서 김치의 숙성 중·후기에 번식하는 젖산 생성량이 높은 젖산균의 생육을 저해하게 되어 나타난 현상이라 판단된다. 따라서 김치의 보존성 연구는 미생물의 제어 측면에서만 접근해서는 효과를 얻기 어렵다 하겠다. 이러한 이유에서 볼 때 술잎은 효소저해 작용과 미생물의 동시적 제어 및 종합적인 기능성을 가진 김치 보존성을 연장시킬 수 있는 천연보존제로 아주 적합한 것으로 판단된다.

요 약

술잎 물추출물(WEPN)이 김치의 숙성관련 효소활성과 젖산균의 생육에 미치는 영향을 조사하였다. 2% WE-

PN 첨가는 *in vitro*에서 amylase는 13.2%, protease는 10.8%, polygalacturonase는 26.7% 및 β -galactosidase는 23.0%를 저해하였다. WEPN을 2% 첨가한 김치에서는 발효 7일째에 효소의 저해율이 가장 높았으며 대조구에 7일째의 활성이 비하여 amylase 13.6%, protease 14.2%, polygalacturonase 38.5%, β -galactosidase는 41.2%가 각각 낮았다. 젖산균의 생육에 미치는 영향은 술잎의 물, 에탄올, 메탄올, 에테르 추출물의 농도별에 따른 inhibitory zone의 직경을 측정된 결과 추출물 모두 *Leu. mesenteroides*보다 *L. plantarum*에 대하여 더 큰 항균성을 보였다. WEPN을 김치에 첨가하여 숙성시키면서 균수를 조사한 결과 *Leu. mesenteroides*와 *L. plantarum* 모두 무첨가 김치보다 숙성전반에 걸쳐 균수가 적었으며, *Leu. mesenteroides*보다 *L. plantarum*의 수가 적었다.

감사의 글

본 논문은 1996년도 과학기술처 선도기술개발과제 연구비 지원에 의해 수행된 결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

문헌

1. 박연희, 권정주, 조도현, 김수일: 김치에서 분리한 젖산균의 미생물 생육저해. 한국농화학회지, 26, 35(1983)
2. 강상모, 김혜자, 이철수, 양차범: 김치의 내산성균주를 이용한 산폐지연 및 관능 향상에 관한 연구. 한국식품과학회지 '김치의 과학' 심포지엄논문집(1994)
3. 이갑상, 김동환, 백승화: 양념류와 pH 조절제가 김치 미생물의 생육에 미치는 영향. 원광대논문집, 24, 507(1990)
4. 김중만, 김인숙, 양희천: 김치용 간절임 배추의 저장에 관한 연구, 배추의 간절임 일어나는 이화학적 및 미생물학적 변화. 한국영양식량학회지, 16, 75(1987)
5. 김순동, 오영애, 김미경: 김치의 보존성 증진방안. 식품산업과영양, 1, 71(1996)
6. 김동관, 김명환, 김병용: 배추의 열절임 및 탈염공정중 물질이동. 한국영양식량학회지, 22, 317(1993)
7. 변유량, 유명식, 조형용, 최동원: 열절임 및 열처리 과정 중 배추의 물리적 특성 조직의 변화. 한국식품과학회지, '김치의 과학' 심포지엄논문집(1994)
8. 오영애, 김순동: 열화칼슘을 함유하는 소금용액에서의 절임이 김치숙성에 미치는 영향. 동아시아식생활학회지, 5, 287(1995)
9. 이철우, 고창영, 하덕모: 김치 발효중 젖산균의 경시적 변화. 한국산업미생물학회지, 20, 102(1992)
10. 김호식, 황규찬: 김치의 미생물학적 연구(제1 보), 혐기성 세균의 분리와 동정. 과연회보, 5, 51(1959)
11. 황규찬, 정운수, 김호식: 김치의 미생물학적 연구(제2 보), 호기성 세균의 분리와 동정. 과연회보, 5, 51(1960)
12. 박희옥, 김유경, 윤선: 김치 숙성과정 중의 enzyme system에 관한 연구. 한국조리과학회지, 7, 1(1991)
13. 박희옥, 김기현, 윤선: 김치재료에 존재하는 pectines-

- terase, polygalacturonase 및 peroxidase 특성에 관한 연구. 한국식품과학회지, 7, 443(1990)
14. 박관화, 고영환, 육철, 백형희, 정대규, 안승요, 백운화, 이규순 : Pectin 분해효소와 김치류의 연화방지 및 통조림. 한국식품과학회 제1회 김치의 과학 논문집, p.352(1994)
 15. 하순석 : 펙틴분해효소 및 산막미생물이 침채류의 연부에 미치는 영향. 과연회보, 5, 39(1960)
 16. 정대규, 문태화, 박관화 : 배추 polygalacturonase의 열안정성. 한국식품과학회지, 25, 576(1993)
 17. 據影雅辛, 李奉柱, 朴種喜, 難波恒雄 : 韓國産生藥の研究(第7報). 日本生藥學雜誌, 45, 336(1991)
 18. 이윤형, 신용목, 차상훈, 최용순, 이상영 : 솔잎추출물 (*Pinus strobus*)을 함유한 건강식품의 개발. 한국영양식량학회지, 25, 379(1996)
 19. 김일경 : 솔잎과 인삼첨가가 동치미 품질에 미치는 영향. 경산대학교 석사학위논문(1996)
 20. 황수진 : 기능성음료개발. 식품과 위생, 8, 56(1995)
 21. 정희중, 황금희, 유맹자, 이순자 : 송순차를 제조를 위한 송순 및 솔잎의 화학적 조성. 한국식생활문화학회지, 11, 635(1996)
 22. 강운한, 박용곤, 오상룡, 문광덕 : 솔잎과 쑥 추출물의 기능성 검토. 한국식품과학회지, 27, 978(1995)
 23. 문광덕, 변정아, 김석중, 한대석 : 김치의 선도유지를 위한 천연보존제의 탐색. 한국식품과학회지, 27, 257(1995)
 24. Mayeux, J. V. and Colmer, J. R. : Selective medium for *Leuconostoc* detection. *J. Bacterol.*, 81, 1009(1961)
 25. Mundt, J. O. and Hamer, J. L. : Suppression of *Leuconostoc mesenteroides* during isolation of *Lactobacilli*. *Appl. Microbiol.*, 14, 1044(1966)
 26. Mundt, J. O. and Hamer, J. L. : *Lactobacilli* on plants. *Appl. Microbiol.*, 16, 1326(1966)
 27. Branen, A. L., Go, H. C. and Genske, R. P. : Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetilactis* and *Luconostoc citrovorum*. *J. Food Sci.*, 40, 446(1975)
 28. Farag, R. S., Daw, J. Y., Hewedi, F. M. and El-Baroty, G. S. A. : Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Prot.*, 52, 665(1989)
 29. Moshrefi, M. and Luh, B. S. : Purification and characterization of two tomato polygalacturonase isoenzymes. *J. Food Biochem.*, 8, 39(1984)
 30. Nelson, N. : A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153, 375(1944)
 31. Somogyi-Nelson, N. : 食品分析法. 日本食品工業學會, 食品分析法編集위원회編, 光琳(日本), p.170(1982)
 32. 윤선, 최혜정, 이진실 : 키위 단백질 분해효소가 카제인의 기능성에 미치는 영향. 한국조리과학회지, 7, 93(1991)
 33. Kunits, M. : Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J. Gen. Physiol.*, 30, 297(1947)
 34. Tucker, G. A., Robertson, N. G. and Grierson, D. : Changes in polygalacturonase isoenzymes during the ripening of normal and mutant tomato fruit. *Eur. J. Biochem.*, 112, 119(1980)
 35. Gross, K. C. : A rapid and sensitive spectrophotometric method for assaying polygalacturonase using 2-cyanoacetamide. *Hortscience*, 10, 624(1975)
 36. Gross, K. C. and Wallner, S. J. : Degradation of cell wall polysaccharides during tomato fruit ripening. *Plant Physiol.*, 63, 117(1979)
 37. SAS : SAS/STAT Guide for Personal Computers. Version 6th ed., SAS Institute Inc., NC, p.378(1985)
 38. Harrigan, W. F. and McCance, M. E. : Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London, p.347(1976)
 39. 한홍의, 박현근 : Bromphenol blue 배지상에서 유산균들의 분별추정. 인하대학교 기초과학연구소 논문집, 제12편(1991)
 40. 한영복 : 솔잎의 항암효과에 대한 효과. 대한수의학지, 33, 701(1993)
 41. 국주희, 마승진, 박근형 : 솔잎에서 항미생물 활성을 갖는 cinnamic acid의 분리 및 동정. 한국식품과학회지, 29, 823(1997)
 42. 국주희, 마승진, 박근형 : 솔잎에서 항미생물 활성을 갖는 benzoic acid의 분리 및 동정. 한국식품과학회지, 29, 204(1997)
 43. 신재익, 김우정, 이형재, 남희섭 : 김치의 저장기간 연장방법. 특허공보(B1) 1888호(1990)
 44. 변명우, 권중호 : 배추김치의 장기저장방법. 특허공보(B1) 2385호(1991)
 45. 이진섭 : 김치의 보존기간 연장방법. 특허공보(B1) 2443호 p.1(1991)
 46. 노홍균 : 김치 재래 보존법의 검증. 과학기술처, G7-과제1차 연도보고서(1995)
 47. 홍완수, 윤선 : 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치 발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 21, 331(1989)
 48. 정대균, 유리나 : 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지, 27, 1035(1995)
 49. 신미경, 신용서 : 김치에서 분리한 *Pediococcus pentosaceus*와 *Lactobacillus brevis*에 대한 녹차물추출물의 항균효과. 동아시아식생활학회지, 5, 309(1995)
 50. 조재선 : 김치숙성중 미생물의 동태와 성분변화. 한국식문화학회지, 6, 479(1991)
 51. 박석규, 조영숙, 박정로, 문주석, 이용수 : 갓김치 숙성중 당, 유기산, 유리아미노산 및 핵산관련 물질 함량의 변화. 한국영양식량학회지, 24, 48(1995)
 52. 박인경, 김순희, 김순동 : 배추의 소금절임시 유기산 첨가가 김치 숙성에 미치는 영향. 동아시아식생활학회지, 6, 195(1996)
 53. 한홍의, 임종락, 박현근 : 김치발효의 지표로서 미생물 군집의 측정. 한국식품과학회지, 22, 26(1990)
 54. 김순동 : 김치산업의 연구개발 현황과 전망. 생물관업, 8, 2(1995)
 55. 양일 : 솔잎으로부터 분리한 trypsin 저해제의 억제제 (Anti-TI)에 관한 연구. 서울대학교 농대석사논문(1994)
 56. 이윤형 : 솔잎추출물로부터 3-hydroxy-3-methylglutaryl Co A reductase 저해제 탐색 및 응용에 관한 연구. 강원대학교 박사논문(1994)
 57. 김순동, 장경숙, 오영애, 김미정, 정용진 : *Lactobacillus acidophilus*가 생성하는 polygalacturonase의 성질. 한국영양식량학회지, 20, 488(1991)
 58. 김순동, 장경숙, 오영애, 김미정, 강명수, 이명숙, 김미향 : *Lactobacillus acidophilus*가 생성하는 β -galactosidase의 성질. 한국영양식량학회지, 21, 54(1992)