

김치 유래 젖산균의 세포외 효소활성의 측정

최신양* · 정병문 · 김현정 · 성승희 · 김왕준 · 박완수
한국식품개발연구원

Extracellular enzyme activities of the lactic acid bacteria isolated from kimchi. Choi, Shin-Yang*, Byung-Moon Jung, Hyun-Jung Kim, Seung-Hee Seong, Wang-June Kim, and Wan-Soo Park. Korea Food Reserch Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea - The various extracellular enzymes produced by lactic acid bacteria isolated from kimchi were assayed to improve the shelf-life of kimchi. Peroxidase was not detected in all tested lactic acid bacteria and small amount of ascorbic acid oxidase was detected in *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus brevis*. In case of α -amylase, 27.8 and 20.9 unit/mg were shown in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus*, respectively but β -amylase and protease activities were very low. The enzyme related to textural property of kimchi, pectinesterase showed low activity but polygalacturonase activity was 0.28 unit/mg in *Lactobacillus homohiochii* and 0.27 unit/mg in *Lactobacillus plantarum*.

Key words: lactic acid bacteria, enzyme, kimchi

김치의 숙성은 원부재료의 탄수화물과 단백질이 분해되어 당류 및 아미노산 등의 저분자물질들이 생성되어 김치 특유의 맛과 풍미를 형성하게 된다. 김치 발효와 관련된 각종 효소들은 김치의 숙성과정에만 관여하는 것이 아니라 김치 숙성이후에도 계속 작용하여, 김치 조직의 연화 등 여러가지 물리화학적 변화를 일으켜 김치의 품질 저하를 야기하게 된다. 김치의 품질에 영향을 주는 효소로는 조직감과 관련된 효소로 펙틴의 α -1, 4 결합을 가수분해하여 펙틴 분자의 크기를 감소시켜 조직의 연화를 촉진하는 polygalacturonase와 펙틴의 탈에스테르화를 일으켜다가 이온들이 존재할 때 김치 조직을 단단하게 해주는 pectinesterase가 있으며[1], 가수분해효소로서 발효원으로 사용되고 균체 증식에 필수적인 당 및 아미노산의 생산에 관여하는 amylase 및 protease, 고온에서 안정한 hemoprotein으로 식품을 저장하는 동안 이취와 색소변화를 초래하는 것으로 알려져 있는 peroxidase[2] 그리고 ascorbic acid의 파괴에 관여하는 ascorbic acid oxidase 등이 있다[2]. 김치 발효의 초기에는 김치 원부재료 유래의 각종 효소가 작용하며, *Leuconostoc mesenteroides*의 번식이 현저하다[3]. 발효 후기에는 김치내에서 번식한 미생물 유래의 효소가 활성화하는 시기로 *Lactobacillus plantarum*이 증가하는 반면, *Leu. mesenteroides*는 감소하는 시기이다. 이러한 미생물에 의해 과도한 산과 여러 가지 효소들이

생성되어 조직의 연화를 초래하여 산패하게 된다[4]. 김치의 저장성 향상을 위한 효소적 측면에서의 연구는 최근 원부재료 유래의 효소관련 연구가 일부 수행되고 있으나, 미생물 유래의 효소와 관련된 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 김치에서 분리한 젖산균들이 생산하는 효소들 중에서 김치의 품질저하에 영향을 주는 효소들의 활성을 조사하고, 원부재료 유래의 효소들과의 양적 분포를 비교하여 김치의 저장성 향상을 위한 기초 자료를 제시하고자 한다.

본 연구에 사용된 김치관련 젖산균은 당 연구원에서 보관중인 김치에서 분리한 균주를 사용하였으며, 효소의 역가를 측정하기 위한 시약은 특급시약을 사용하였고, 젖산균은 MRS broth(Merck)를 사용하여 배양하였다. 배양은 멸균된 MRS broth에 균주를 접종하고 37°C에서 48시간 배양 후 배양액을 10,000 × g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 효소활성측정을 위한 조효소로 하였으며, 이 때 모든 처리는 4°C를 유지하였다. 미생물 균체 생육은 650 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 단백질 농도 측정은 Lowry법을 이용하여 측정하였으며, 표준 단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하여 정량하였다[5]. Polygalacturonase 활성 측정은 0.1 M NaCl을 함유하는 0.03 M phosphate buffer에 polygalacturonic acid를 0.45 % (w/v)가 되게 녹인 후, 이 용액 0.48 ml에 효소액 0.02 ml을 첨가하여 30°C 항온조에서 교반하면서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 100°C 수조에서 3분간 끓여 효소를 불활성화시킨 다음 0.1 N NaOH 0.05 ml을 넣어 알카리용액으로 만든 후 DNS용액 1 ml을 첨가하고 다시 100°C 수조에서 5분간 끓였다. 즉시 이 용액을 흐르는 물에 냉각

*Corresponding author
Tel. 82-342-780-9107, Fax. 82-342-709-9877
E-mail: choisy@kfri.re.kr

시키고 증류수 5 ml을 첨가하여 혼합시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하여 α -D-galacturonic acid로 만든 standard curve와 비교, 환원당의 양을 구했다. Polygalacturonic acid의 역가는 단백질 1 mg이 2시간 동안 1 mg의 환원당을 생성할 때를 1 unit으로 정의하였다[6]. Pectinesterase 활성 측정은 0.15 M NaCl을 함유하는 0.45 % (w/v) pectin용액 50 ml에 효소액 2 ml을 넣은 후 정확하게 pH 7.0으로 조절하고, 이 순간부터 30분 동안 생성되는 산을 0.01 N NaOH로 적정하였다. 효소 활성 단위는 측정조건에서 매 분당 1 μ M의 carboxyl group을 유리하는 효소량으로 정의하였다[7]. Ascorbic acid oxidase 활성 측정을 위한 기질로는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 5.6)에 용해시킨 ascorbic acid를 사용하였으며, 동량의 기질과 효소액을 혼합하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 1.5배 부피의 6% HPO₃를 가하여 반응을 중지시켰다. 반응하기 직전과 10분간 반응 후의 ascorbic acid 함량을 Hydrazine 법[8]에 의해 측정하여 10분 동안 산화된 ascorbic acid의 양을 효소활성으로 표시하였다[9]. Peroxidase의 활성 측정은 0.05 M phosphate buffer (pH 6.0) 2.4 ml에 효소액 0.15 ml과 150 mM guaiacol 0.3 ml을 가한 후 100 mM H₂O₂ 0.15 ml을 넣고 혼합한 후 즉시 470 nm에서의 흡광

도 변화를 측정하였다. 효소의 활성은 1분 동안 470 nm에서 흡광도를 1.0 증가시킬 때를 1 unit으로 하였다[10]. β -amylase 활성 측정을 위한 기질로는 0.5% potato starch (pH 5.9)를 사용하였으며 기질 2 ml에 효소액 1 ml을 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 혼합액 중 0.3 ml을 취하고 여기에 0.01N I₂ solution을 첨가한 후 증류수를 총 10 ml이 되도록 가하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 660 nm에서 blue color density가 10분 동안 50% 감소했을 때를 1 unit으로 하였다[11]. β -amylase 활성은 2 ml의 0.5% potato starch (pH 5.9)에 1 ml의 효소액을 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켜서 생성된 당을 DNS법으로 측정하였다. β -amylase의 활성은 이 조건에서 10 mole의 glucose가 생성될 때를 1 unit으로 하였다[11]. Protease 활성 측정은 0.6% hammarsten casein solution을 기질로 하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 2.5 ml의 TCA를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 30분간 정지하고 침전물을 제거한 후 상등액 2 ml에 대하여 5 ml의 0.55M Na₂CO₃와 1 ml의 2/3N Folin reagent를 첨가하고 30°C에서 30분간 반응시켜 660 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 L-tyrosine용액을 사용하였으며, 효소의 활성은 효소액 1 ml이 1분 동안 30°C에서 1 μ g의

Table 1. Enzyme activities of lactic acid bacteria isolated from kimchi

Lactic Acid Bacteria	Strain No.	Cell growth (OD at 650 nm)	Total protein (mg/ml)	Polygalacturonase (unit/mg)	Pectinesterase (unit/mg)	α -amylase (unit/mg)	β -amylase (unit/mg)	Protease (unit/mg)
<i>Lb. confusus</i>	KFRI 227	0.88	8.39	0.05	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i>	KFRI 228	0.86	9.36	0.03	0.01	-	-	-
<i>Lb. hilgardii</i>	KFRI 229	0.73	9.93	0.07	0.01	-	-	-
<i>Lb. curvatus</i>	KFRI 231	1.18	9.78	0.14	0.01	-	-	-
<i>Lb. homohiochii</i>	KFRI 234	0.38	10.55	0.28	0.01	-	-	-
<i>Lb. sake</i>	KFRI 237	1.03	9.73	0.09	-	-	-	-
<i>Lb. amylophilus</i>	KFRI 238	0.74	9.73	0.07	0.01	-	-	-
<i>Lb. brevis</i>	KFRI 239	0.96	9.11	0.03	-	-	-	-
<i>Lb. acidophilus</i>	KFRI 804	0.30	10.70	0.02	0.01	7.3	0.01	0.01
<i>Lb. brevis</i>	KFRI 805	0.81	9.44	0.05	-	-	-	-
<i>Lb. brevis</i>	KFRI 806	0.70	9.99	0.03	-	-	-	-
<i>Lb. casei</i>	KFRI 808	0.09	10.70	0.02	0.01	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	KFRI 813	1.25	9.80	0.14	-	-	-	-
<i>Lb. plantarum</i>	KFRI 814	0.94	10.63	0.05	-	-	-	0.01
<i>Lb. plantarum</i>	KFRI 815	1.01	10.30	0.27	-	-	-	-
<i>Leu. mesenteroides</i>	KFRI 218	0.20	11.15	0.02	-	-	-	-
<i>Leu. lactis</i>	KFRI 232	0.31	9.78	0.05	0.01	-	-	-
<i>Leu. cremoris</i>	KFRI 241	0.75	10.67	0.06	-	-	-	-
<i>Leu. mesenteroides</i>	KFRI 819	1.11	10.01	0.03	-	-	-	-
<i>Leu. mesenteroides</i>	KFRI 820	0.60	9.67	0.21	-	-	-	-
<i>Ped. acidilactici</i>	KFRI 830	0.60	9.83	0.03	-	27.8	-	-
<i>Ped. pentosaceus</i>	KFRI 832	0.60	9.45	0.11	-	20.9	0.03	-
<i>Ped. pentosaceus</i>	KFRI 834	0.73	9.70	0.18	-	-	-	0.02
<i>Ped. pentosaceus</i>	KFRI 835	0.22	10.56	0.12	-	-	-	-

Peroxidase and ascorbic acid oxidase activities were not detected.

tyrosine을 생성할 때를 1 unit으로 하였다[12].

김치관련 젖산균이 생산하는 효소들 중 식품 저장시 이취와 색소변화를 일으키는 효소인 peroxidase와 ascorbic acid 파괴에 관여하는 ascorbic acid oxidase의 활성을 측정된 결과, 모든 김치관련 젖산균에서 거의 활성을 나타내지 않았다. 김 등[13]이 보고한 김치재료의 peroxidase의 활성은 배추와 무에서 각각 0.17 unit/mg, 3.61 unit/mg의 활성을 나타내었으며, ascorbic acid oxidase의 활성은 배추와 무에서 각각 0.28 unit/mg, 1.72 unit/mg으로 나타나 이와 비교해 보면 김치 관련 젖산균이 생산하는 peroxidase와 ascorbic acid oxidase는 거의 없는 것으로 사료되었다. 이와 같은 결과로 김치의 품질저하에 관련된 효소들 중 peroxidase와 ascorbic acid oxidase는 주로 김치의 원부재료에서 유래되며, 젖산균에 의한 이취 발생 등의 김치의 관능적 품질저하는 효소적 측면에서라기 보다는 lactic acid, acetic acid 등의 과다한 유기산의 생성과 휘발성 물질의 생성에 기인한다고 사료된다. 한편 Table 1에서 보는 바와 같이 가수분해효소로서 발효원으로 사용되고 균체 증식에 필수적인 당 및 아미노산의 생산에 관여하는 amylase 및 protease의 활성을 측정된 결과 β -amylase의 경우 *Pediococcus acidilactici*와 *Pediococcus pentosaceus*가 각각 27.8 unit/mg, 20.9 unit/mg으로 김 등[13]이 보고한 무의 활성보다는 낮았지만 배추의 활성보다는 높은 값을 나타내었다. 그러나 β -amylase의 경우와 protease의 경우는 원부재료의 활성에 비해 거의 없는 것으로 나타났다. 김치에서 분리한 젖산균들이 생산하는 효소들 중 김치의 조직감과 관련된 효소로 펙틴의 α -1, 4결합을 가수분해하여 조직의 연화를 촉진하는 polygalacturonase와 펙틴의 탈에스테르화를 일으켜 다가 이온들이 존재할 때 김치 조직을 단단하게 해주는 pectinesterase의 활성을 측정된 결과 Pectinesterase의 경우 *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus homohiochii* 등이 0.01 unit/mg으로 나타났으나 다른 젖산균들에 비해 큰 유의성은 보이지 않았으며, 김 등[14]이 보고한 배추와 무의 pectinesterase의 활성과 비교하면 거의 없는 것으로 사료되었다. 그러나 polygalacturonase의 경우에는 *Lactobacillus homohiochii*의 비활성이 0.28 unit/mg으로 가장 높았으며, *Lactobacillus plantarum*이 0.27 unit/mg으로 높은 활성을 나타내었다. 이는 김 등[14]이 보고한 김치원부재료 중의 polygalacturonase활성 측정 결과와 비교해 볼 때 무, 오이, 멸치젓의 활성보다는 낮았지만, 배추와 다른 원부재료의 polygalacturonase의 활성보다는 높은 활성을 나타내었다. 이와같은 결과로 미루어 볼 때 김치 원부재료 유래의 효소 뿐만 아니라 김치 발효에 관여하는 미생물에 의해 생산되는 효소에 의해서도 김치 조직의 연화현상이 일어난다는 것을 알 수 있었다. 따라서 이러한 미생물들을 제어함으로써 김치의 품질개선이나 저장성을 향상시킬 수 있다고

사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림부의 '97년도 농림수산물개발사업 기획연구 과제 사업비의 지원으로 수행된 연구결과와 일부로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Yook, C., K. Chang, K. W. Park, and S. Y. Ahn. 1985. Pre-heating treatment for prevention of tissue softening of radish root kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **17**: 447-453.
2. Fennema, O. R. 1985. *Food Chemistry*. pp. 371-476. Dekker
3. Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
4. Kang, S. M., H. J. Kim, C. S. Lee, and C. B. Yang. 1984. Studies on delay of acidification and improvement of flavor using acid resistant strains of Kimchi. *Kor. J. Food Sci.* 'Science in Kimchi' symposium proceeding.
5. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-269.
6. Koh, Y. H. and K. H. Park. 1984. Purification and characterization of chinese cabbage pectinesterase. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **16**: 235-241.
7. Hou, W. N. and B. L. Walker. 1995. A study on the extraction of thermostable pectinesterase from valencia orange. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 658-665.
8. Yu, J. H. 1975. Experiments in food science and engineering, pp 274. Department of food engineering, Yonsei Univ., Korea.
9. Kim, J. W., E. S. Park, and S. Yoon. 1985. Characteristics of ascorbic acid oxidase in cucumber. *Kor. J. Nutr.* **18**: 312-317.
10. Kim, J. A. 1987. Studies on the purification and characterization of isoperoxidase A4. *M.S. Thesis*, Yonsei Univ., Korea
11. Yamamoto, T., I. Miyara, S. Yamamoto, K. Fujita, and K. Mizokami. 1990. α -amylase of *Rhizopus niveus*: Its isolation and some enzymatic properties. *Denpun Kagaku.* **37**: 129-136.
12. Yu, J. H. 1975. Experiments in food science and engineering, pp. 476-478. Department of food engineering, Yonsei Univ., Korea.
13. Kim, H. J., J. J. Lee, M. J. Cheigh, and S. Y. Choi. 1998. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of kimchi ingredient. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30**: 1333-1338.
14. Kim, H. J., J. J. Lee, K. S. Chung, and S. Y. Choi. 1999. Pectin-degrading enzymes of kimchi ingredient. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 263-266.

(Received August 19, 1999)