

식물유래 천연항균물질 첨가에 의한 김치의 발효조절

서현선 · 김선화 · 김진솔 · 한재준 · 류지훈*

고려대학교 생명과학대학 식품공학과

Control of Kimchi Fermentation by the Addition of Natural Antimicrobial Agents Originated from Plants

Hyun-Sun Seo, Seonhwa Kim, Jinsol Kim, Jaejoon Han, and Jee-Hoon Ryu*

Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

Abstract We investigated the delay of kimchi fermentation by the addition of plant extracts. Fifteen plant extracts were screened for inhibitory activity against *Lactobacillus plantarum* by using an agar well diffusion assay, and determined the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) were determined. The lowest MIC for grapefruit seed extract (GFSE; 0.0313 mg/mL) was determined, followed by *Caesalpinia sappan* L. extract (CSLE; 0.25 mg/mL), and oregano essential oil (OREO; 1.0 mg/mL). GFSE, CSLE, and OREO were individually added to kimchi, and incubated the samples at 10 for up to 20 days. Results showed that the addition of GFSE (0.3 and 0.5%), CSLE (0.1, 0.3, and 0.5%), or OREO (0.5 and 1.0%) led to a significant increase in the pH of kimchi, and also a significant reduction in the numbers of lactic acid bacteria. Taken together, the addition of natural antimicrobial agents can delay kimchi fermentation.

Keywords: kimchi, fermentation, plant extract

서 론

김치는 한국을 대표하는 전통 발효식품으로서, 주원료인 절임 배추에 고춧가루, 마늘, 생강, 파, 무 등의 여러 가지 양념류를 혼합하여 저온에서 발효시킨 제품이다(1,2). 김치는 다양한 재료와 젖산균에 의한 발효작용으로 인해 식이섬유소, 비타민, 무기질 등이 풍부할 뿐만 아니라(3), 여러 생리활성물질을 함유하여 항암, 항산화 효과 등의 건강기능성을 보여주는 것으로 알려져 있다(4,5). 이러한 김치의 우수성은 국외에도 널리 알려지고 있으며, 2006년에는 미국의 건강전문지인 헬스에서 발표한 세계 5대 건강식에 한국의 김치가 선정되기도 하였다(6-8).

김치의 영양학적 우수성과 건강기능성이 세계적으로 알려지면서 최근에는 한국, 중국, 일본, 미국의 기업들이 대량으로 김치를 생산하여 유통하고 있다. 김치는 유통, 저장 중에도 미생물에 의한 발효가 지속적으로 진행되므로, 미생물에 의해 일어날 수 있는 과숙현상을 억제하여 유통기간을 연장하기 위한 기술의 개발은 산업계의 주요 관심사이다(9,10). 김치의 발효 속도를 늦추고 저장성을 연장하기 위하여 방사선처리(11), pH 조절(12), 식품보존제의 첨가(13), 고온고압 처리(14), 그리고 효소처리와 순간 열처리의 병용(15) 등의 방법들이 연구되어 왔다. 그러나 최근에는 소비자들의 식품에 대한 건강지향적 요구가 증가되면서 화학적

처리를 기피하고(16,17), 천연물질을 이용하여 김치의 저장성을 향상시키려는 연구들이 진행되고 있다(18). 김치의 발효속도 조절을 위한 연구에 이용된 천연항균물질들은 크게 김치 부 재료, 과일류, 약용식물, 허브, 향신료, 종자 추출물 등으로 나눌 수 있다(19). 천연항균물질 탐색에 이용된 김치 부 재료로는 부추, 갓, 녹미채, 열무 등이 있고(19), 과일류로는 매실(20), 오미자(21), 감귤류(22) 등이 있다. 약용식물은 소목(23), 황금, 황백(24) 등이 김치의 발효조절 효과를 보였다. 또한 종자 추출물인 자몽종자 추출물이 천연항균물질로의 가능성을 보였으며(25), 타임, 타라곤(26), 로즈마리(27), 겨자(28) 등의 허브와 산초유, 계피유, 호프 추출물 등 식물성분의 향신료(29)를 이용하여 김치의 저장성을 향상시키려는 연구가 진행되기도 하였다. 이 외에도 키토산(30), 감잎 정유(31), 녹차(32), 솔잎(33), 뽕잎(34) 등의 다양한 추출물들이 김치의 발효속도 조절을 위해 사용되었다.

본 연구의 목적은 김치의 선도 유지 및 가식 기간을 연장시키기 위해 식물유래 천연항균물질을 이용하여 김치의 발효를 조절하는데 있다. 김치의 발효를 조절하기 위하여, 김치 과숙에 관여하는 *Lactobacillus plantarum*을 저해하는 식물추출물들을 탐색하였고, 선별된 15종의 식물추출물의 *L. plantarum*에 대한 항균력을 규명하였다. 최종적으로 가장 항균력이 강한 3종류의 식물유래 천연추출물을 배추김치에 개별적으로 직접 첨가한 후, 저장기간별로 pH와 총균 및 젖산균 개체수의 변화를 측정하여 식물추출물 첨가에 따른 김치의 발효 지연 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

사용 균주

Lactobacillus plantarum subsp. *plantarum* strain KCTC 3108 (ATCC 14917)은 한국생명공학연구원 미생물자원센터에서 분양

*Corresponding author: Jee-Hoon Ryu, Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Korea
Tel: 82-2-3290-3409
Fax: 82-2-3290-3918
E-mail: escheri@korea.ac.kr
Received July 4, 2013; revised July 28, 2013;
accepted July 31, 2013

받아 실험에 사용하였다. *L. plantarum*은 15% (v/v)의 글리세롤 (Yakuri Pure Chemicals Co., LTD, Kyoto, Japan)을 첨가한 *Lactobacilli* MRS broth (MRSB; BD/Difco, Sparks, MD, USA)에 배양액을 만든 후, -25°C에서 냉동 보관하였다. 냉동 보관된 *L. plantarum* 균주를 10 mL의 MRSB에 접종한 후, 37°C에서 24시간 배양하여 활성화시켰고, 활성화된 배양액은 10 mL의 loop를 이용하여 10 mL의 MRSB에 24시간 간격으로 세 번 계대배양한 후, 실험에 사용하였다.

식물추출물의 준비

*L. plantarum*에 대한 항균력이 우수한 식물추출물들을 선별하기 위하여 총 2,117 종의 식물추출물들을 준비하였다. 1500종의 국내자생 식물의 추출물들과 614종의 약초추출물들은 한국식물추출물은행 (<http://extract.pdrc.re.kr/extract/f.htm>)에서 구입하였고, 자몽종자 추출물(*Citrus paradisi*)과 오레가노(*Origanum vulgare*) 에센셜 오일은 FA bank (Anyang, Korea)와 Neumond (Raisting, Germany)에서 구입하였다. 선행 연구에서 *L. plantarum*에 대해 우수한 항균력을 보였던 소목(*Caesalpinia sappan* L.)은 한약재시장 (<http://www.hanyakjae.net>)에서 구입한 후, 실험실에서 직접 추출하였다. 소목가루 100 g과 3차 증류수 1 L를 플라스크(2 L)에 넣고 70°C의 항온수조에서 24시간 열처리한 후, 추출한 용액을 여과지 (No. 5; Whatman, Maidstone, UK)를 이용하여 여과하였다. 여과된 용액은 상온에서 20분간 원심분리(6,780×g)하였고, 상침액은 원심관에 담아 -80°C에서 동결 건조한 후, 항습기에 넣어 보관하였다. 고품질의 모든 추출물들은 0.2 mL의 dimethylsulfoxide (DMSO) (A.C.S. reagent, ≥99.9%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 0.8 mL의 멸균된 MRSB가 혼합한 용매(1 mL)에 20 mg/mL의 농도로 용해시켜 실험에 사용하였다.

Agar well diffusion assay

Agar well diffusion assay를 이용하여 *L. plantarum*에 대한 식물추출물들의 항균활성을 확인하였다. 300 mL의 *Lactobacilli* MRS agar (MRSA; BD/Difco)를 121°C에서 15분간 고압 멸균시킨 후, 45°C의 항온수조에서 30분간 유지하여 반고형(semisolid) 상태의 MRSA를 준비하였다. 반고형 상태의 MRSA에 *L. plantarum*의 개체수가 ca. 5.0-6.0 log CFU/mL이 되도록 접종한 후, 접종된 배지를 petri dish에 17 mL씩 옮긴 후, 실온에서 30분간 굳혔다. 배지가 굳은 후, 멸균 상태의 biopsy punch (Stiefel Biopsy Punch; Stiefel Laboratories, Research Triangle Park, NC, USA)를 이용하여 지름 6 mm의 well (6-8 wells/plate)을 만들었다. 각 well에 20 mg/mL의 추출물들을 50 mL씩 분주하고, 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후, well 주위에 형성된 저해환의 지름(mm)을 측정하여 항균활성의 유무를 확인하였다.

최소저해농도와 최소치사농도 측정

Broth microdilution method를 이용하여 선별된 15종의 식물추출물들의 최소저해농도와 최소치사농도를 알아보았다. MRSB에 식물추출물들을 희석하여 4.0000, 2.0000, 1.0000, 0.5000, 0.2500, 0.1250, 0.0625, 그리고 0.0313 mg/mL의 농도의 식물추출물 용액들을 준비하고, 96-well microtiter plate (30096; SPL Life Sciences, Pocheon, Korea)의 well에 희석된 추출물들을 100 mL씩 분주하였다. 희석된 추출물들이 분주된 각 well에 *L. plantarum* 배양액(5.0 log CFU/mL)을 100 mL씩 접종하여 96-well microtiter plate에 옮겨진 식물추출물들의 최종 농도는 2.0000, 1.0000, 0.5000, 0.2500, 0.1250, 0.0625, 0.0313, 그리고 0.0156 mg/mL이

되도록 하였다. 식물추출물들과 *L. plantarum*의 혼합액이 포함된 96-well microtiter plate를 37°C에서 24시간 배양한 후, 육안으로 관찰하였을 때, 균의 성장이 저해되는 식물추출물의 최소 농도를 최소저해농도로 결정하였다(35,36). 균이 자라지 않은 well의 혼합액을 MRSA에 희석도말하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤, 단일 콜로니가 자라지 않은 최소 농도를 최소치사농도로 결정하였다.

김치의 제조

김치 제조에 사용된 배추(*Brassica campestris* subsp. *napus* var. *pekinensis*)는 대형마트에서 구입하였다. 그 외에 무, 고춧가루, 새우젓, 마늘, 멸치젓, 배, 쪽파, 멸치액젓, 멸치젓, 생강, 양파, 설탕, L-글루타민산나트륨, 홍고추, 갖, 재제염, 그리고 물엿이 혼합된 양념은 (주)한성식품(Bucheon, Korea)에서 구입하였다.

구입한 배추는 불가식부분과 이물질 등을 제거한 후, 남은 부분을 3×4 cm (±1 cm)의 크기로 자른 후 절임통에 넣어 배추가 소금물에 잠기도록 하였다. 이때 소금물은 배추 1 kg 당 0.3 kg의 천일염과 1.7 kg의 수돗물을 혼합하여 준비하였다. 배추를 상온에서 소금물에 2시간 절인 후, 소금물과 동량의 수돗물에 3회 세척하였다. 세척된 배추는 채반을 이용하여 1시간 동안 물기를 제거한 후, 김치 제조에 이용하였다.

식물유래 천연항균물질의 첨가

자몽종자 추출물, 고품질의 소목추출물, 또는 tween 80이 첨가된 오레가노 에센셜 오일과 멸균된 증류수를 혼합하여 각각 5 g의 추출물 희석액들을 준비하였다. 준비된 추출물 희석액들은 김치용 혼합양념(30 g)에 첨가하여 1분간 혼합한 후, 이를 절임배추(105 g)와 섞어서 김치(110 g)를 제조하였다. 첨가된 자몽종자 추출물의 최종 농도는 0, 0.3, 0.5% (w/w)이었고, 소목추출물과 오레가노 에센셜 오일의 최종농도는 0, 0.5, 1.0% (w/w)였다. 제조한 김치는 플라스틱 밀폐용기(Lock&Lock. Co. Ltd., Seoul, Korea)에 담아 밀봉한 후, 10°C에서 20일간 저장하였다.

식물유래 천연항균물질 첨가에 따른 김치의 pH의 변화와 미생물(총균과 젖산균) 개체수의 변화

자몽종자 추출물, 소목추출물, 그리고 오레가노 에센셜 오일을 농도별로 첨가하여 제조한 김치를 10°C에서 20일간 저장하면서 김치의 pH와 미생물 개체수 변화를 확인하였다. pH는 천연항균물질들을 농도별로 첨가한 김치들을 한 조각씩 채취하여 petri dish에 담아 실온에서 김치 표면을 pH meter (Mettler-Toledo International Inc., Schwerzenbach, Switzerland)로 3번 반복하여 측정하였다. 총균과 젖산균의 개체수는 평판계수법을 이용하여 측정하였다. 김치 10 g과 멸균된 3차 증류수 10 mL를 stomacher bag에 넣고 균질기를 이용하여 1분간 균질화하였다. 균질화된 용액은 0.1% 펩톤수를 사용하여 단계적으로 희석한 후, 총균수는 tryptic soy agar (TSA; BD/Difco), 젖산균의 개체수는 0.02% sodium azide를 함유한 MRSA에 각각 도말하였다. 도말된 배지를 37°C에서 24시간 배양한 뒤 형성된 콜로니를 계수하였다. 평판도말법을 이용하여 계수한 미생물의 검출한계는 0.0 log CFU/g (1 CFU/g)이었고, 증균배양한 미생물의 검출한계는 1 CFU/10 g 이었다.

통계분석

모든 실험은 3번 이상 반복하여 진행하였다. 실험을 통해 얻어진 결과들은 통계분석시스템(SAS 9.1; SAS Institute, Cary, NC, USA)의 일반선형모형을 이용하여 분석하였다. 김치에 첨가한 추

출물들의 농도와 저장기간에 따른 김치의 pH 변화와 미생물 (총균과 젖산균)의 개체수 변화는 Fisher의 least significant difference (LSD) test를 사용하여 통계처리 하였으며, 5% 유의 수준에서 분석하였다($p \leq 0.05$).

결과 및 고찰

*L. plantarum*에 항균성을 보이는 식물추출물들의 선별

Agar well diffusion assay를 이용하여 *L. plantarum*을 저해하는 식물추출물을 탐색하여 15종의 식물추출물들을 선별하였다. 선별된 15종의 식물추출물들의 *L. plantarum*에 대한 MRSB에서의 최소저해농도와 최소치사농도를 측정하여 항균력이 가장 우수한 추출물 3종류를 선정하였다.

Table 1은 *L. plantarum*에 대해 항균활성을 나타낸 식물추출물들(20 mg/mL) 중 가장 큰 저해환을 보인 식물추출물 15종과 저해환의 크기, 최소저해농도, 그리고 최소치사농도를 측정한 결과를 나타내고 있다. 선별된 15종의 식물유래 천연추출물들 중에서 자몽종자 추출물은 *L. plantarum*에 21.5 mm의 가장 큰 저해환을 보였다. 그 다음으로 소목열수추출물과 소목에탄올추출물이 각각 13.5와 11.0 mm의 저해환을 보였다. 그 외에도 병솔꽃나무(*Callistemon lanceola*, 6.8 mm), 홍지네고사리(*Dryopteris erythrosora*, 6.3 mm), 관중(*Dryopteris crassirhizoma*, 5.8 mm)과 시로미(*Empetrum nigrum* var. *japonicum*, 5.8 mm), 방아풀(*Isodon japonicas*, 5.5 mm), 섬기린초(*Sedum takesimense*, 5.0 mm), 짚신나물(*Agrimonia pilosa*, 4.3 mm), 비늘고사리(*Dryopteris lacera*, 4.0 mm), 오레가노 에센셜 오일(*Origanum vulgare*, 3.5 mm), 제주지네고사리(*Dryopteris championi*, 2.5 mm), 지네고사리(*Lastrea japonica*, 2 mm), 그리고 꽃개오동(*Catalpa bignonioides*, 1.0 mm) 추출물 순서로 저해환을 보였다.

*L. plantarum*에 대한 최소저해농도는 자몽종자 추출물이 0.0313

mg/mL로 가장 낮았다. 그 다음으로 소목추출물(0.2500 mg/mL), 소목에탄올추출물과 오레가노 에센셜 오일(1.0 mg/mL), 방아풀(2.0 mg/mL), 시로미와 수호초(4.0 mg/mL) 순으로 낮은 최소저해농도를 보였다. 최소치사농도의 순서는 자몽종자 추출물(0.0625 mg/mL)이 가장 낮았고, 소목추출물과 소목에탄올추출물 및 오레가노 에센셜 오일(1.0 mg/mL), 방아풀(2.0 mg/mL), 시로미(4.0 mg/mL)였다. 이러한 결과들은 well diffusion assay에서 보인 저해환의 크기가 반드시 식물추출물의 항균활성과 비례하지는 않는다는 것을 보여준다. Bagamboula 등(37)은 이러한 현상에 대한 설명으로, well diffusion assay의 저해환의 크기는 실험물질의 배지에서의 확산속도에 의해 영향을 받는다는 점을 강조하였다. 즉, 식물추출물들이 MRSA에서의 확산속도가 다를 경우, MIC가 낮은 물질이 MIC가 높은 물질보다 작은 크기의 저해환을 보여주는 경우도 관찰된다.

자몽종자 추출물은 가장 낮은 최소저해농도와 최소치사농도를 보여 *L. plantarum*에 가장 높은 항균력을 보였다. 아직 자몽종자 추출물의 *L. plantarum*에 대한 최소저해농도나 최소치사농도가 보고된 적은 없지만, 식품에서 발생하는 다양한 식품위해세균에 대한 항균활성은 보고된 적이 있다. Park과 Kim(25)은 그람 양성균인 *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*와 그람 음성균인 *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Serratia marcescens*에 대한 자몽종자 추출물의 최소저해농도를 tryptic soy broth에서 측정한 결과, 그람 양성균에 대한 자몽종자 추출물의 최소저해농도는 12.5 ppm 정도에서 저해되어 높은 항균성을 보였다. 본 연구에서 항균활성이 높은 것으로 확인된 소목추출물과 오레가노 에센셜 오일의 *L. plantarum*에 대한 항균력은 이미 보고된 바가 있다. Lee 등(16)은 paper disc method를 이용하여 김치에서 분리한 유산균주(Homo 2균주, Hetero 2균주)에 대한 소목추출물의 항균활성을 측정한 결과, 4개의 유산균주가 점종된 MRSA배지에 뚜렷한 저해환이 형성되어 김치 숙성 관련 미생물들에 대

Table 1. Antimicrobial activities of plant extracts against *L. plantarum* in MRS medium

Source of plant extracts			
Scientific name	Zone of inhibition ¹⁾ (mm)	MIC ²⁾ (mg/mL)	MLC ²⁾ (mg/mL)
<i>Citrus paradisi</i>	21.5	0.0313	0.0625
<i>Caesalpinia sappan</i> W ³⁾	13.5	0.2500	1.0000
<i>Caesalpinia sappan</i> A ⁴⁾	11.0	1.0000	1.0000
<i>Origanum vulgare</i>	3.5	1.0000	1.0000
<i>Sedum takesimense</i>	5.0	1.0000	>4.0000
<i>Isodon japonicas</i>	5.5	2.0000	2.0000
<i>Callistemon lanceola</i>	6.8	2.0000	>4.0000
<i>Dryopteris erythrosora</i>	6.3	2.0000	>4.0000
<i>Agrimonia pilosa</i>	4.3	2.0000	>4.0000
<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	5.8	2.0000	>4.0000
<i>Dryopteris lacera</i>	4.0	2.0000	>4.0000
<i>Empetrum nigrum</i> var. <i>japonicum</i>	5.8	4.0000	4.0000
<i>Lastrea japonica</i>	2.0	4.0000	>4.0000
<i>Dryopteris championi</i>	2.5	4.0000	>4.0000
<i>Catalpa bignonioides</i>	1.0	>4.0000	ND ⁵⁾

¹⁾A total of 2,116 plant extracts were screened for antimicrobial activity against *L. plantarum* using an agar well diffusion assay. Among those, Fifteen plant extracts (20 mg/mL) showed large zone of inhibition in MRSA. The diameter of the zone of inhibition did not include the well diameter (6 mm)

²⁾The minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal lethal concentration (MLC) of 15 extracts against *L. plantarum* in MRSB were measured.

³⁾Hot water extract

⁴⁾Ethanol extract

⁵⁾Not determined

한 항균활성이 있다고 보고하였다. Kim 등(9)은 오레가노를 물, 에탄올, 에틸에테르 및 에틸아세테이트로 추출하여 0.02% sodium azide가 함유된 MRSA에 *L. plantarum*를 접종하여 항균활성을 측정하였다. 그 결과 오레가노의 물, 에탄올, 에틸에테르, 그리고 에틸아세테이트 추출물은 각각 9.0 ± 0.4 , 8.0 ± 0.3 , 9.0 ± 0.5 , 그리고 7.0 ± 0.3 mm의 저해환을 보였다.

본 연구에서는 이러한 결과를 바탕으로 김치 발효를 조절하기 위한 천연항균물질로 자몽종자 추출물, 소목추출물, 그리고 오레가노 에센셜 오일을 선정하고, 후속 실험을 진행하였다.

식물유래 천연항균물질 첨가에 따른 김치의 pH 변화

Fig. 1은 0.0, 0.1, 0.3, 0.5% (w/w)의 자몽종자 추출물, 0.0, 0.1, 0.5, 1.0% (w/w)의 소목열수추출물, 그리고 0.0, 0.1, 0.5, 1.0% (w/w)의 오레가노 에센셜 오일을 개별적으로 첨가한 김치를 10°C에서 20일간 저장하면서 김치의 pH 변화를 측정된 그래프이다. 추출물을 첨가하지 않은 김치(대조구)의 초기 pH는 6.0 ± 0.0 이었으며, 자몽종자 추출물을 0.1, 0.3, 0.5% 첨가한 김치의 초기 pH는 각각 5.8 ± 0.0 , 5.6 ± 0.0 , 5.4 ± 0.1 였다. 이처럼 자몽종자 추출물 첨가 김치의 초기 pH가 낮은 이유는 자몽종자 추출물이 함유하고 있는 유기산의 영향인 것으로 생각된다. 저장기간이 경과함에 따라, 대조구는 저장 5일만에 적숙기로 판단되는 범위 (pH 4.2)에 도달하였다. 0.1% 자몽종자 추출물을 첨가한 김치는 저장 5일 만에 pH 5.1 ± 1.0 에 도달한 반면, 0.3과 0.5%의 자몽종자 추출물을 첨가한 김치는 저장 20일까지 적숙기에 도달하지 않았다. 이러한 결과는 Park과 Chang(38)이 진행한 연구의 결과와 비슷하다. Park과 Chang(38)은 절임 배추에 자몽종자 추출물 분말제제를 0.1, 0.3, 0.5%씩 첨가하여 김치를 제조한 후 10°C에 저장하면서 pH를 측정하였다. 김치를 담근 직후 대조구의 pH는 5.40이었으며 자몽종자 추출물 분말제제를 0.1, 0.3, 0.5% 첨가한 시험구의 pH는 각각 5.32, 5.24, 5.32로 나타났다. 숙성이 진행됨에 따라, 대조구는 10°C에서 숙성 5일 만에 적숙기에 도달한 반면, 0.1% 첨가구는 숙성 9일, 0.3% 첨가구는 숙성 25일에 pH 4.19에 도달하였고 0.5% 첨가구는 숙성 30일까지 pH 4.2에 도달하지 않았다. 소목추출물을 첨가한 김치에서도 발효지연 효과가 관찰되었다. 소목추출물을 0.1% 첨가한 김치의 pH는 저장 20일에 4.5 ± 0.3 에 도달한 반면, 0.3과 0.5% 첨가구는 저장 20일까지 적숙기에 도달하지 않았다. 소목추출물의 발효지연 효과는 Lee 등(23)의 연구 결과에서도 확인할 수 있다. Lee 등(23)은 0.1% 소목추출물을 양념에 혼합하여 김치를 제조한 후 10°C에서 숙성시키면서 pH 변화를 관찰하였는데, 숙성 15일이 되었을 때 대조구는 pH 4.1, 소목첨가구는 pH 4.3을 나타냈다. 오레가노 에센셜 오일을 첨가한 경우에도 김치의 발효지연 효과가 관찰되었으나, 자몽종자 추출물과 소목추출물에 비하여 상대적으로 낮은 효과를 보였다. 오레가노 에센셜 오일을 0.1% 첨가한 김치의 pH는 저장 2일과 5일 사이에 적숙기에 도달하여 대조구와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 하지만 0.5와 1.0% 첨가구의 경우 저장 20일까지 적숙기에 도달하지 않았다.

식물유래 천연항균물질 첨가에 따른 김치의 미생물(총균과 젖산균) 개체수 변화 확인

Fig. 2는 0.1, 0.3, 0.5% (w/w)의 자몽종자 추출물, 0.1, 0.5, 1.0% (w/w)의 소목추출물, 그리고 0.1, 0.5, 1.0% (w/w)의 오레가노 에센셜 오일을 개별적으로 첨가한 김치를 10°C에서 20일간 저장하면서 김치에 존재하는 총균의 개체수 변화를 나타내고 있다. 식물추출물을 첨가하지 않은 대조구의 총균의 개체수는 초기

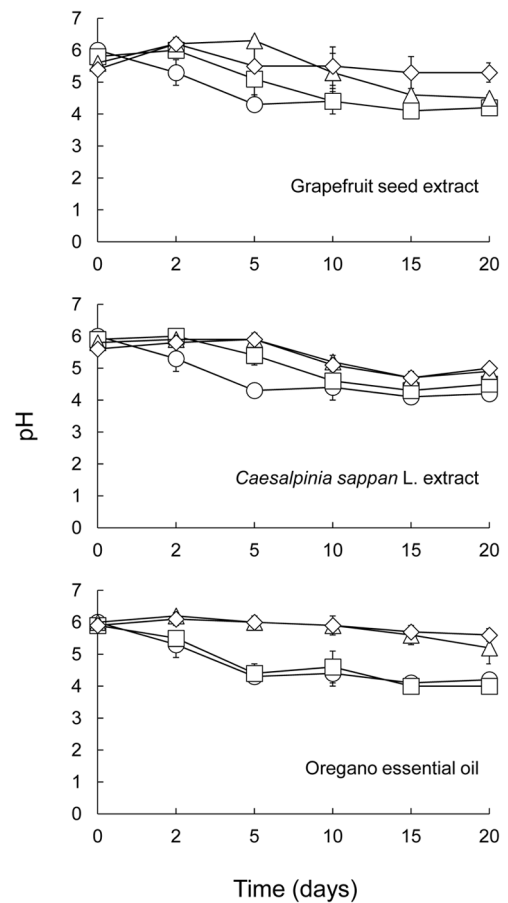


Fig. 1. Changes in pH of kimchi as affected by the addition of grapefruit seed extract, sappanin lignum (*Caesalpinia sappan* L.) extract, or oregano essential oil at 10°C for up to 20 days. Key: Grapefruit seed extract; Control (○), 0.1% (□), 0.3% (△), and 0.5% (◇), sappanin lignum extract and oregano essential oil; Control (○), 0.1% (□), 0.5% (△), and 1.0% (◇).

6.3 ± 0.1 log CFU/g에서 저장 2일에 8.0 ± 0.2 log CFU/g로 증가한 후, 저장 5일에 최고 개체수인 8.8 ± 0.4 log CFU/g에 도달하였고, 저장 20일까지 유의적으로 변하지 않고 유지되었다. 자몽종자 추출물을 첨가한 김치의 총균의 초기 개체수는 첨가농도에 관계없이 6.2 ± 0.1 log CFU/g이었다. 0.1% 첨가구의 총균의 개체수 변화는 저장 5일째 8.2 ± 0.4 log CFU/g에 도달하여 대조구와 비교하여 유의적인 차이를 보이지 않았다. 0.3% 첨가구의 총균의 개체수는 저장 10일째 최고 개체수인 7.9 ± 0.7 log CFU/g에 도달한 후 감소하여 저장 20일에 7.1 ± 0.9 log CFU/g이었다. 0.5% 첨가구의 경우, 총균의 개체수는 저장 15일만에 최고 개체수인 8.5 ± 0.2 log CFU/g에 도달하였다. 0.3% 첨가구와 0.5% 첨가구를 대조구와 비교하였을 때, 최대개체수에 도달하는데 걸리는 시간이 증가하였고, 최대개체수가 유의적으로 감소하였다. 소목추출물을 첨가한 김치에서도 총균의 생육억제 효과가 관찰되었다. 소목추출물을 0.1와 0.5% 첨가한 김치의 총균의 개체수는 저장 초기 6.3 ± 0.1 과 6.2 ± 0.1 log CFU/g에서 각각 증가하여 저장 10일에 최대 개체수인 8.3 ± 0.1 과 8.1 ± 0.2 log CFU/g에 도달하였다. 이는 대조구에 비교하여 약 5일의 발효지연효과를 보여준 것으로 판단된다. 소목추출물을 1.0% 첨가한 김치의 총균의 개체수 변화는 저장 초기 6.2 ± 0.0 log CFU/g로 시작하여, 저장 10일째에 8.2 ± 0.3 log CFU/g에 도달한 후, 저장 20일에 7.0 ± 0.8 log CFU/g로 약 1.2

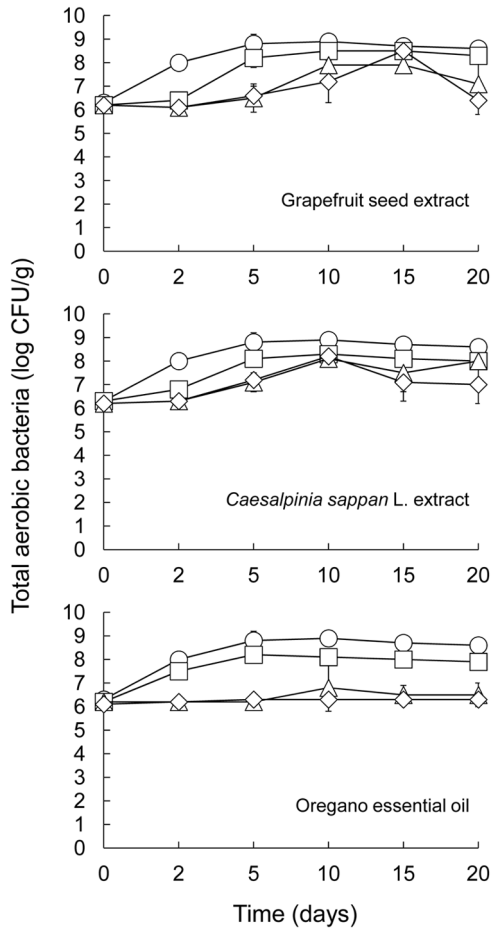


Fig. 2. Population of total aerobic bacteria in kimchi as affected by the addition of grapefruit seed extract, sappanin lignum (*Caesalpinia sappan* L.) extract, or oregano essential oil at 10°C for up to 20 days. Key: Grapefruit seed extract; Control (○), 0.1% (□), 0.3% (△), and 0.5% (◇), sappanin lignum extract and oregano essential oil; Control (○), 0.1% (□), 0.5% (△), and 1.0% (◇).

log CFU/g 감소하였다. Lee 등(23)은 1% 소목추출물을 첨가한 김치를 제조한 후 10°C에서 숙성시키면서 미생물의 개체수 변화를 관찰하였는데, 대조구의 총균수는 숙성 10일째 3.5×10^8 CFU/mL 이었고, 소목을 첨가한 김치는 1.8×10^7 CFU/mL로 대조구와 비교하여 유의적으로 적었다. 오레가노 에센셜 오일을 0.1% 첨가한 김치의 총균의 개체수 변화는 저장초기 6.2 ± 1.0 log CFU/g에서 저장 5일째 8.2 ± 0.2 log CFU/g에 도달하여 대조구와 비슷한 총균의 개체수 변화를 보였다. 하지만 0.5와 1.0%의 오레가노 에센셜 오일을 첨가한 김치에서는 총균의 생육억제효과가 뚜렷하게 관찰되어, 저장 20일까지 총균의 개체수 변화가 유의적으로 일어나지 않았다.

Fig. 3은 0.0, 0.1, 0.3, 0.5% (w/w)의 자몽종자 추출물, 0.0, 0.1, 0.5, 1.0% (w/w)의 소목추출물과 0.0, 0.1, 0.5, 1.0% (w/w)의 오레가노 에센셜 오일을 개별적으로 첨가한 김치를 10°C에서 20일간 저장하면서 젖산균의 개체수 변화를 나타낸 그래프이다. 대조구의 젖산균 개체수는 저장 초기 5.9 ± 0.1 log CFU/g, 저장 5일째 7.8 ± 0.3 log CFU/g, 저장 20일째 7.4 ± 0.3 log CFU/g이었다. 자몽종자 추출물을 첨가한 경우, 초기 젖산균이 유의적으로 저해되는 것을 확인하였다. 즉, 0.1, 0.3, 그리고 0.5%로 첨가한 김치의 젖산균 초기 개체수는 4.4 ± 0.3 , 0.3 ± 0.6 , 그리고 0.0 ± 0.0 log

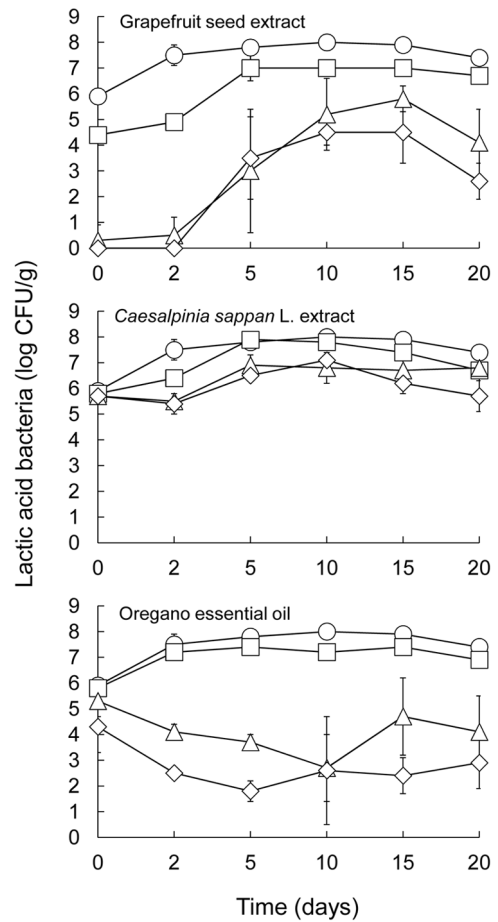


Fig. 3. Population of lactic acid bacteria in kimchi as affected by the addition of grapefruit seed extract, sappanin lignum (*Caesalpinia sappan* L.) extract, or oregano essential oil at 10°C for up to 20 days. Key: Grapefruit seed extract; Control (○), 0.1% (□), 0.3% (△), and 0.5% (◇), sappanin lignum extract and oregano essential oil; Control (○), 0.1% (□), 0.5% (△), and 1.0% (◇).

CFU/g이었다. 자몽종자 추출물을 0.1% 첨가한 김치의 젖산균 개체수는 저장 5일째 7.0 ± 0.5 log CFU/g에 도달한 후, 저장 20일까지 유의적으로 변화하지 않았다. 0.3%의 자몽종자 추출물을 첨가한 경우, 저장 15일째에 5.8 ± 0.5 log CFU/g에 도달한 후, 저장 20일째에는 유의적으로 감소하여 젖산균의 개체수가 4.1 ± 1.3 log CFU/g이 되었다. 0.5%의 자몽종자 추출물을 첨가한 경우, 저장 2일까지 0.0 ± 0.0 log CFU/g이었고, 이후 증가하여 저장 15일째 4.5 ± 1.2 log CFU/g이 되었다. 김치 젖산균에 대한 자몽종자 추출물의 저해능력은 Park과 Chang(38)의 연구에서도 확인할 수 있다. 숙성 초기 젖산균수는 대조구, 0.1%, 0.3%, 0.5%의 자몽종자 추출물 첨가구가 각각 6.5, 6.4, 4.6, 3.6 log CFU/mL이었고, 저장 20일째 젖산균수는 대조구, 0.1%, 0.3%, 0.5% 첨가구가 각각 8.6, 7.5, 6.6, 6.5 log CFU/mL로 자몽종자 추출물 분말제 첨가구가 대조구에 비하여 유의적으로 낮은 젖산균수를 보였다.

소목추출물을 첨가한 경우, 자몽종자 추출물을 첨가한 김치처럼 초기 젖산균 개체수가 감소하는 현상은 보이지 않았다. 즉, 첨가된 소목추출물의 농도와 상관없이 김치의 초기 젖산균 개체수는 $ca. 5.7 \pm 0.1$ log CFU/g이었다. 하지만 소목추출물을 첨가한 경우, 젖산균의 생육억제현상이 관찰되었다. 소목추출물을 0.1% 첨가한 김치의 젖산균의 초기 개체수는 5.8 ± 0.2 log CFU/g이었으

며, 저장 2일째 $6.4 \pm 0.3 \log \text{CFU/g}$ 로 소목추출물을 첨가하지 않은 김치와 비교하여 약 $1.1 \log \text{CFU/g}$ 만큼 젖산균의 개체수가 적었다. 하지만 저장 5일 이후에는 젖산균의 개체수가 대조구의 젖산균 개체수와 유의적인 차이를 보이지 않았다. 0.5%의 소목추출물을 첨가한 김치의 젖산균 개체수는 저장 5일째 $6.9 \pm 0.4 \log \text{CFU/g}$ 에 도달한 후 20일까지 유지되었으며, 저장기간 동안 대조구와 비교하여 유의적으로 적은 젖산균 개체수를 유지하였다. 1.0%의 소목추출물을 첨가한 김치의 경우, 저장 20일째 $5.7 \pm 0.6 \log \text{CFU/g}$ 이었으며, 이는 대조구의 유산균 개체수와 비교하여 $1.7 \log \text{CFU/g}$ 만큼 적은 개체수이다.

0.1%의 오레가노 에센셜 오일을 첨가한 경우에는 오레가노 에센셜 오일을 첨가하지 않은 경우와 비교하여 젖산균 개체수에 유의적인 차이를 보이지 않았지만, 0.5%와 1.0%를 김치에 첨가하였을 경우, 젖산균에 대한 증식억제 효과를 보여줬다. 0.5%의 오레가노 에센셜 오일을 첨가한 김치의 젖산균 개체수는 초기 $5.3 \pm 0.6 \log \text{CFU/g}$ 에서 저장 10일째에는 유의적으로 감소하여 $2.7 \pm 1.3 \log \text{CFU/g}$ 이 되었고, 저장 20일째에도 그 수준으로 유지되었다. 1.0%의 오레가노 에센셜 오일을 첨가한 김치의 경우, 20일의 저장 후, $2.9 \pm 1.0 \log \text{CFU/g}$ 의 유산균 개체수를 보였다.

본 연구에서는 자몽종자 추출물, 소목추출물, 그리고 오레가노 에센셜 오일을 첨가함으로써 김치의 발효지연 효과를 얻을 수 있다는 것을 확인하였지만, 식물추출물의 첨가가 김치의 관능특성에 미치는 영향에 대한 연구는 수행하지 않았다. 향후, 식물유래 천연추출물의 첨가에 의한 김치의 발효지연 효과를 산업적으로 적용하기 위해서는 김치의 관능평가가 반드시 수행되어야 할 것이다. 또한 여러 종류의 식물추출물의 혼합첨가에 의한 김치의 발효조절 연구도 수행되어야 할 것이다. 식물추출물을 혼합하여 처리하게 되면, 개별적으로 첨가되는 식물추출물의 양을 줄일 수 있고, 결과적으로 김치의 관능변화를 최소화할 수 있을 것이다. 또한 항균 메커니즘이 다른 두 종류의 식물추출물을 혼합하여 첨가한다면, 김치 유산균에 대한 살균시너지 효과를 얻을 수 있을 것이다.

요 약

본 연구에서는 *L. plantarum*에 대한 항균성을 보이는 식물추출물들을 탐색한 후, 선별된 식물추출물들의 항균력을 실험실배지(MRSB)에서 규명하였다. 이후, 우수한 항균력을 보인 식물추출물들을 김치에 직접 적용하면서 김치의 발효지연 효과를 확인하였다. 식물추출물 2,117종을 대상으로 agar well diffusion assay를 수행한 결과, *L. plantarum*에 대한 항균성을 보이는 15종의 식물추출물들이 선별되었다. 선별된 15종의 식물추출물의 *L. plantarum*에 대한 최소저해농도를 확인한 결과, 자몽종자 추출물(0.0313 mg/mL), 소목열수추출물(0.2500 mg/mL), 오레가노 에센셜 오일(1.0 mg/mL)이 *L. plantarum*에 가장 우수한 항균력을 나타냈다. 이들 식물추출물들의 김치 발효조절 능력을 확인하기 위하여 자몽종자 추출물(0.1, 0.3, 그리고 0.5%), 소목추출물(0.1, 0.5, 그리고 1.0%), 오레가노 에센셜 오일(0.1, 0.5, 그리고 1.0%)을 개별적으로 김치에 첨가하여 10°C에 20일간 저장하면서 김치의 pH 변화와 총균 및 젖산균의 개체수 변화를 확인하였다. 대조구의 pH는 저장 5일만에 적숙기에 도달한 반면, 자몽종자 추출물(0.1, 0.3, 그리고 0.5%), 소목추출물(0.1, 0.5, 그리고 1.0%), 그리고 오레가노 에센셜 오일(0.5와 1.0%)을 첨가한 김치는 적숙기에 도달하지 않았다. 이러한 현상은 총균과 젖산균의 개체수의 변화에서도 관찰되었다. 즉, 자몽종자 추출물(0.1, 0.3, 그리고 0.5%), 소목추출

물(0.1, 0.5, 그리고 1.0%), 그리고 오레가노 에센셜 오일(0.5와 1.0%)을 첨가한 김치는 총균과 젖산균의 개체수가 식물추출물을 첨가하지 않은 김치와 비교하여 저장기간 동안 유의적으로 적었다. 본 연구의 결과는 *L. plantarum*에 대한 항균성을 보이는 식물추출물들에 대한 기본 정보를 제공하고, 자몽종자 추출물, 소목추출물, 오레가노 에센셜 오일을 김치에 직접 첨가함으로써 김치의 발효 속도를 지연시킬 수 있다는 것을 보여준다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품기술기획평가원에서 시행한 농림수산식품 연구개발사업의 지원으로 수행된 연구(과제번호: 111138-03-2-HD110)결과이며, 이에 감사드립니다.

References

- Codex Alimentarius Committee. Codex Standard for kimchi (CODEX STAN 233). Codex, Rome, Italy (2001)
- Jang MS, Park HY, Nam KH. Changes in nutrient composition and fermentation properties of abalone *mul-kimchi* using dried pollack and licorice stock. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 613-620 (2012)
- Park KY. The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of kimchi. J. Korean Soc. Food Nutr. 24: 169-182 (1995)
- Kim HR, Kim MR. Effects of traditional salt on the quality characteristics and growth of microorganisms from kimchi. Korean J. Food Culture 25: 61-69 (2010)
- Kim JH, Jang MJ, Choi JI, Ha TM, Chung JW, Chi JH, Ju YC. Quality properties of kimchi by the addition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*) during fermentation. Korean J. Food Preserv. 12: 287-291 (2005)
- Health magazine. World's healthiest Food: Kimchi (Korea). Available from: <http://www.health.com/health/article/0,,20410300,00.html>. Accessed Jun. 16, 2013.
- Jeon CG. Marketing analysis of the imported kimchi and challenges for the domestic kimchi industry. Korean J. Food Marketing Economics. 26: 79-101 (2009)
- Cho SK, Moon JS, Kim YJ, Kim JE, Choi HY, Ahn JE, Otgonbayar GE, Eom HJ, Kim TJ, Kim YM, Kim HR, Han NS. Comparison of chemical and microbiological characteristics of commercial kimchi products in Korea and Japan. Korean J. Food Sci. Technol. 44: 155-161 (2012)
- Kim MK, Chung HJ, Kim OM, Oh YA, Kim SD. Antimicrobial activity of extracts from species on lactic acid bacteria related to kimchi fermentation. Korean J. Post-harvest Sci. Technol. Agri. Products 5: 81-87 (1998)
- Kim HS, Jung SK, Cho SH, Ku JG, Lee SC. Preparation and effect of Eudragit E100 microcapsules containing grapefruit seed extract on kimchi. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32: 1239-1244 (2003)
- Cha BS, Kim WJ, Byun MW, Kwon JH, Cho HO. Evaluation of gamma irradiation for extending the shelf life of kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 109-119 (1989)
- Kim SD. Effect of pH adjuster on the fermentation of kimchi. J. Korean Soc. Food Nutr. 14: 259-264 (1985)
- Lee SK, Kim IH, Choi SY, Jeon KH. Effect of lysozyme, glycine and EDTA on the kimchi fermentation. J. Korean Soc. Food Nutr. 22: 58-61 (1993)
- Pyun YR, Shin SK, Kim JB, Cho EK. Studies on the heat penetration and pasteurization conditions of retort pouch kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 15: 414-420 (1983)
- Kang KO, Ku KH, Lee HJ, Kim WJ. Effect of enzyme and inorganic salts addition and heat treatment on kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 183-187 (1991)
- Lee SH, Park KN, Lim YS. Effect of *Caesalpinia sappan* L. and *Lithospermum erythrorhizon* extract mixture and crab shell on the

- fermentation of kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 404-409 (1999)
17. Lee BW, Shin DH. Antimicrobial effect of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 205-211(1991)
 18. Chung HJ, Kim MK, Kim MJ, Kim SD. Growth inhibitory activity of spices for lactic acid bacteria. J. Food Sci. Technol. CUTH 9: 103-118 (1997)
 19. Kim JS, Bang JH, Beuchat LR, Kim HK, Ryu JH. Controlled fermentation of kimchi using naturally occurring antimicrobial agents. Food Microbiol. 32: 20-31 (2012)
 20. Lee SH, Choi JS, Park KN, Im YS, Choi WJ. Effects of *Prunus mume* Sie. extract on growth of lactic acid bacteria isolated from kimchi and preservation of kimchi. Korean J. Food Preserv. 9: 292-297 (2002)
 21. Lee SH, Choi WJ, Im YS. Effect of *Schizandra chinensis* (Omiija) extract on the fermentation of kimchi. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25: 229-234 (1997)
 22. Cho SH, Lee SC, Park WS. Effect of botanical antimicrobial agent-citrus products on the quality characteristics during kimchi fermentation. Korean J. Food Preserv. 12: 8-16 (2005)
 23. Lee SH, Choi WJ, Jo OK, Son SJ. Antimicrobial activity of ethanol extract of *Caesalpinia sappan* L. and effect of the extract on the fermentation of kimchi. J. Food Sci. Technol. CUTH 9: 167-171 (1997)
 24. Park MK, Jung KS, In MJ. Effects of *Scutellaria baicalensis* and *Phellodendron amurense* extracts on growth of lactic acid bacteria and kimchi fermentation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 420-426 (2004)
 25. Park HK, Kim SB. Antimicrobial activity of grapefruit seed extract. Korean J. Food Nutr. 19: 526-531 (2006)
 26. Kim MK, Kim OM, Kim ID, Kim MH, Park IK, Kang MS, Lee NH, Kim SD. The effects of water extracts from thyme (*Thymus vulgaris* L.) and tarragon (*Artemisia dracuncululus* L.) on shelf-life and quality of kimchi. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 5: 49-56 (1998)
 27. Kim JH. Effect of rosemary leaf on quality and sensory characteristics of kimchi. Korean J. Food Nutr. 16: 283-288 (2003)
 28. Seo KI, Jung YJ, Shim KH. The additive effects of mustard seed (*Brassica juncea*) during fermentation of kimchi. Korean J. Food Preserv. 3: 33-38 (1996)
 29. Moon KD, Byun JA, Kim S-J, Han DS. Screening of natural preservatives to inhibit kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 257-263 (1995)
 30. Yoo EJ, Lim HS, Kim JM, Song SH, Choi MR. The investigation of chitosan oligosaccharide for prolongating fermentation period of kimchi. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 869-874 (1998)
 31. Park SK, Kang SG, Chung HJ. Effects of essential oil in astringent persimmon leaves on kimchi fermentation. Korean. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 217-221 (1994)
 32. Park HJ, Kim SI, Lee YK, Han YS. Effect of green tea on kimchi quality and sensory characteristics. Korean J. Soc. Food Sci. 10: 315-321 (1994)
 33. Choi MY, Choi EJ, Lee E, Cha BC, Park HJ, Rhim TJ. Effect of pine needle (*Pinus densiflora* Seib. et Zucc) Sap on kimchi fermentation. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 899-906 (1996)
 34. Shin SM, La SH, Choi MK. A study on the quality characteristics of kimchi with mulberry leaf powder. Korean J. Food Nutr. 20: 53-62 (2007)
 35. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat. Protoc. 3: 163-175 (2008)
 36. Salvat A, Antonnacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM. Screening of some plants from Northern Argentina for their antimicrobial activity. Lett. Appl. Microbiol. 32: 293-297 (2001)
 37. Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. Food Microbiol. 21: 33-42 (2004)
 38. Park WP, Chang DK. Kimchi quality affected by the addition of grapefruit seed extracts powder. Korean J. Food Preserv. 10: 288-292 (2003)