

키토산 및 키토산 올리고당의 김치 관련 미생물에 대한 항균 특성

김명희 · 오세욱 · 홍상필 · 윤석권*

한국식품개발연구원, *동덕여자대학교 식품영양학과

Antimicrobial Characteristics of Chitosan and Chitosan Oligosaccharides on the Microorganism related to *Kimchi*

Myung-Hee Kim, Se-Wook Oh, Sang-Pill Hong and Suk-Kwon Yoon*

Korea Food Research Institute,

*Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University

Abstracts

Antimicrobial activity of chitosan and chitosan oligosaccharides on the microorganism related to *Kimchi* was investigated. 5 kinds of chitosan, which have different deacetylation degrees and molecular weights were prepared and its effect on the organoleptic characteristics, pH and titrable acidity of *Kimchi* in the storage time were examined. C-4 and C-5 chitosan (D.A.: 92~99%, M.W.: 16,000~32,000) recorded high score in the texture and showed pH 4.9 and titrable acidity 0.35%, compared with control (pH 4.1, titrable acidity 0.50%) evaluated to optimal ripening time. The chitosan oligosaccharides containing relatively large amount of pentamer-heptamer were chosen from C-4 chitosan hydrolyzates. Antimicrobial activity of C-4 and chitosan oligosaccharides against *B. subtilis*, *B. cereus*, *Pse. fluorescens*, *E. coli*, *Lac. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *Lac. brevis*, *Ent. faecalis* and 3 kinds of microflora from *Kimchi* were examined. The clear zone against microorganism were 9~20 mm at 3.0% C-4 chitosan and 8~24 mm at 5.0% chitosan oligosaccharides, and MIC of chitosan and chitosan oligosaccharides was shown 0.01~0.05% and 0.05~0.2%, respectively. The antimicrobial effect of chitosan and chitosan oligosaccharides was also observed in 3 kinds of total microflora from *Kimchi* and was most strong in the microflora from the ripening stage of *Kimchi*, suggesting C-4 chitosan and chitosan oligosaccharides could be applicable to extending shelf-life of *Kimchi*.

Key words: chitosan, oligosaccharides, *Kimchi*, antimicrobial activity

서 론

김치의 저장성을 향상시키는 방법으로 냉장 또는 냉동, 가열살균방법, 약제처리법, 방사선처리법, 방부제첨가, 염혼합물의 첨가, 보존료 첨가, 열처리를 이용한 방법 등 여러가지 방안이 제시되고 있으나⁽¹⁻³⁾ 김치의 풍미저하가 유발되어 식기호도가 저하되며 또한 소비자의 기피현상 등으로 아직까지 상업적으로 널리 사용되고 있지 못하고 있는 실정이다. 최근에는 천연물 중 항균력을 갖는 재료의 첨가로 저장성을 향상시키는 방법⁽⁴⁾이 선호되고 있다. 이러한 물질들은 김치발효 속성 및 변패 전과정에 걸쳐 미생물 생육을 억제함으로써 김치의 선도를 유지할 수 있는 것으로 기대되

고 있다.

천연 항균성 물질로는 계란에 함유된 conalbumin, avidin, lysozyme과 우유의 lactoferrin 등의 단백질 성분, citric acid, succinic acid, benzoic acid, lactic acid, propionic acid 등의 유기산, 생물체 조직에 소량 존재하는 탄소수 12~18개의 중쇄지방산, thyme, oregano, cinamon, cloves 등의 정유성분, glycine, cystine, tryptophan 등의 아미노산, flavonol류와 proanthocyanins (tannins) 등의 색소관련 성분, 해면동물의 benzoic acid, okadaic acid, dinophysistoxin-1, 해조류의 지방산, 함황 화합물, phloroglucinol, tannin, bromophenol, terpenoid 등이 보고되어 있다^(1-3,5). 그 밖에도 humulone과 lupulone, hydrocinnamic산 유도체, caffeine, theophylline과 theobromine, phytoalexin 등과 미생물 유래의 bacteriocin 등이 알려져 있다⁽⁶⁾.

이상의 천연물질 등은 김치의 선도를유지에 효과적이

Corresponding author: Sang-Pill Hong, Korea Food Research Institute, San 46-1 Backhyun-dong, Bundang-gu, Kyonggi-do 463-420, Korea

라는 문헌과 특허가 다수 있으나 이들 성분의 향미가 김치고유의 향미에 영향을 미치기 때문에 김치에 직접 응용하는데에는 한계가 있어 최근에는 셀룰로오스와 구조가 유사한 천연 고분자 물질인 키토산을 김치의 저장성 향상에 응용하려는 연구가 진행되고 있다^(6,9).

키토산은 *Fusarium solani*, *F. oxysporum cepae* 등 식물성 병원균에 대해서 항균효과를 보이며 탈아세틸화도가 높을수록 우수한 효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다. 또한 키토산과 그 분해물은 *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *S. aureus*에 대해서 강한 살균력을 나타내고 있는 것으로 보고된 바 있어 키토산의 항균특성을 김치의 저장성 향상에 응용하려는 연구가 최근에 보고 되고 있다⁽⁹⁾.

키토산을 김치에 적용한 사례는 소금절임시 키토산 첨가가 김치의 보존성에 미치는 효과 연구⁽¹⁰⁾, 키토산과 다른 보존제 첨가에 따른 김치의 저장성 향상 연구⁽⁶⁾, 저분자 키토산이 배추김치 모델시스템의 보존성에 미치는 영향 연구⁽⁷⁾ 등이 있으나 분자량 및 탈아세틸화도가 상이한 키토산 및 키토산 올리고당에 대한 연구는 거의 없다. 특히 키토산은 김치에 직접 사용할 경우 수용화가 어렵기 때문에 효과적인 항균효과를 기대하기 어렵고 또한 키토산의 특유 짙은 맛에 의하여 김치의 기호도를 크게 저하하는 요인이 되어 그 사용에 제한 요소가 되고 있다.

따라서 김치의 저장성 향상을 위한 키토산 제재의 개발을 위해서는 키토산 및 키토산 올리고당의 탈아세틸화도, 분자량 등에 따른 체계적인 항균성 검토 및 이를 이용한 재현성 있는 김치의 저장성 개선 효과에 대한 연구가 요구되고 있다.

따라서 본 연구에서는 김치의 천연보존제 개발의 일환으로 탈아세틸화도, 분자량이 상이한 키토산을 김치에 첨가하여 관능 특성을 파악하였으며, 그 결과 김치에 응용 가능성이 높은 키토산을 선별하였고 이를 효소분해하여 키토산 올리고당을 조제하고 이 중 항균력이 우수한 올리고당을 선정하여 김치 관련 세균 및 숙성시기 별 김치 총 microflora에 대한 항균 특성을 검토하였다.

재료 및 방법

키토산의 조제

홍게(*Chionoectes opilio*) 껍질을 이용하여 Hackman 방법⁽¹¹⁾을 부분 수정하여 제조하였다. 즉, 껍질을 분쇄한 후 이를 3% 염산으로 3시간 교반하여 탄산칼슘을 제거하였다. 계속해서 물로 수차례 수세한 후 5%

Table 1. Characterization of chitosan used in this study

Kinds of chitosan	M.W.	D.A. ¹⁾ (%)	Colour	Solubility (% 1% HCl)
C-1	280,000	99	white brown	3.0
C-2	280,000	85	white brown	1.0
C-3	280,000	70	white brown	0.5
C-4	16,000	99	beige	6.0
C-5	32,000	92	yellow	6.0

¹⁾D.A.: degree of deacetylation.

NaOH로 90°C에서 12시간 처리하여 키토산을 얻었다. 조제된 키토산을 50% NaOH에서 100°C, 12시간 처리하고 세척 건조하는 공정을 반복함으로써 분자량 및 탈아세틸화도별 키토산을 얻었으며 그 특성은 Table 1과 같다. 탈아세틸화도의 측정은 PVSK법⁽¹²⁾으로 하였다.

점도측정 및 분자량⁽¹³⁾

키토산의 점도는 Ostwald 점도계를 이용하여 25°C에서 상대점도를 측정하였고 미리 작성한 점도와 분자량의 표준곡선 관계식으로부터 분자량을 환산하였다.

키토산 올리고당의 조제

분자량 16,000, 탈아세틸화도 99%인 키토산을 1% 염산에 농도가 5.5% (w/v) 되도록 용해하고 NaOH로 pH가 5.0~5.5 되도록 하여 chitosanase (名治製藥, 日本) 0.00136% (w/v)를 가하여 40~50°C에서 연속 교반하면서 시간별로 가수 분해한 후 90°C에서 10분간 효소를 실활시킨 후 냉각하고, 5점의 gauze에 여과한 후 동결 건조하여 사용하였다.

키토산 올리고당의 HPLC 분석⁽¹⁴⁾

TSK gel NH₂-80 (250 mm × 4.6 mm) 칼럼을 사용하여 mobile phase를 CH₃CN:0.2M H₃PO₄=40:60, 유속을 0.7 mL/min으로 하여 실온에서 refractive Index detector로 측정하였다.

pH 및 키토산 올리고당 함량의 측정

pH는 Orion사의 pH meter를 이용하여 측정하였고 키토산 올리고당의 함량은 식품공전에 명시된 바대로 측정하였다⁽¹⁴⁾.

김치의 제조

시판 배추김치에 천연염을 가해 절인 후 3% 염도가 되도록 세척하고 키토산 혹은 키토산 올리고당을 분말형태로 일정량 양념에 첨가 혼합하여 김치를 제조하여 20°C에 저장하면서 관능검사 및 이화학적 분석

에 사용하였다. 사용한 김치의 혼합비율은 배추 100 g에 대하여 파 3.1, 고추분 1.8, 마늘 1.5, 생강 0.4, 물 2.9 g이었다.

산도 측정⁽¹⁵⁾

김치를 무균적으로 마쇄하여 여액 10 mL의 pH가 8.3이 되는데 필요한 0.1N NaOH의 적정량을 측정하여 구하였다. 계산식은 다음과 같다. 총산(%)=a×f×F×10×mL/g a: 0.1N NaOH의 소비량, f: 0.1N NaOH의 factor, F: 0.1N NaOH의 1 mL에 상당하는 유기산 계수

키토산 및 키토산 올리고당의 항균력 측정

키토산 및 키토산 올리고당의 항균력을 측정하기 위하여 일반 부패미생물로 알려져 있는 *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Bacillus cereus* (YUFE 2004), *Pseudomonas fluorescens* (KCTC 1645), *Escherichia coli* (KCTC 1039)와 젖산균 *Lactobacillus plantarum* (KCTC 3104), *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC 3100), *Lactobacillus brevis* (KCCM 35464), *Enterococcus faecalis* (KCTC 3095) 4종 및 김치 숙성시기에 따라 서로 상이한 microflora 조성을 가지는 김치 자체의 총미생물을 대상으로 paper disk 방법⁽¹⁶⁾으로 항균력을 측정하였다.

김치의 total microflora를 이용한 항균력 측정

김치는 숙성시기에 따라 상이한 microflora의 조성을 가지므로 숙성초기, 숙성적기, 숙성말기에 도달한 김치의 total microflora에 대하여 직접 항균력을 측정하고자 하였다. 김치를 무균적으로 파쇄하여 여과한 액을 시험균액으로 하여 위에 서술한 항균력 측정방법에 따라 측정하였다. 이때 사용한 김치의 pH와 적정산도는 다음 Table 2와 같다.

MIC (minimal inhibition concentration)의 측정⁽¹⁶⁾

키토산 및 키토산 올리고당을 농도별로 각 미생물의 생육조건에 적합한 nutrient 또는 MRS 배지에 시험균주를 접종하여 37°C에서 72시간 배양하면서 640 nm에서의 흡광도를 측정하여 균주의 성장여부에 따

라 MIC를 결정하였다.

통계분석

pH, 산도 등에 대하여 3회 반복측정하여 그 평균치를 데이터로 사용하였으며 관능검사의 경우 결과를 각각 분산 분석하고 Duncan의 방법⁽¹⁷⁾으로 평균간 다중비교하였다.

결과 및 고찰

키토산 첨가에 따른 김치의 관능특성

김치에 응용가능한 범위의 분자량 및 탈아세틸화도를 고려한 키토산 5가지 종류(Table 1)를 김치 제조시 양념에 분말상으로 0.5% 되도록 첨가하여 20°C에서 숙성시키면서 숙성 적기인 3일째와 과숙기인 7일째에 맛, 조직감, 전체적 기호도에 대한 관능검사를 실시하였다(Table 3).

숙성 적기에 상당하는 3일째에 대한 관능검사 결과, 분자량 16,000인 C-4 처리구 및 분자량 32,000인 C-5 처리구는 맛에 있어서 대조구와 유의한 차이를 나타내지 않았으나 분자량이 280,000인 기타 처리구에서는 키토산 특유의 떼은 맛이 나타나는 특징이 있었으며 조직감에 있어서는 대조구와 키토산 처리구간에 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편, 과숙기에 상당하는 7일경의 김치는 키토산 특유의 떼은 맛이 김치의 강한 산미 및 발효미에 의해 상쇄되어 비교적 약하게 측정되었다. 특히적으로 키토산의 분자량이 16,000~32,000 범위이고 탈아세틸화도가 92~99%에 해당하는 C-4, C-5 처리구가 조직감이 우수하고 키토산 특유의 떼은 맛을 나타내지 않는 특성을 보였다. 이 결과는 저분자 키토산을 김치에 첨가할 경우 발효 6일 이후부터는 대조구에 비해 신맛이 현저히 감소한다고 한 김 등⁽⁷⁾의 결과와 키토산 수용액을 김치에 첨가했을

Table 2. Titrable activity and pH of various ripening stage of Kimchi used for detection of antimicrobial activity of chitosans

	Pre-ripened	Optimum-ripened	Over-ripened
pH	4.57	4.02	3.78
Titrable acidity	0.25	0.75	1.24

Table 3. Sensory score¹⁾ of Kimchi samples during fermentation

Type	Taste		Texture		Overall quality	
	3 day	7 day	3 day	7 day	3 day	7 day
Control	4.21 ^{a2)}	3.75 ^a	4.11 ^a	3.59 ^b	3.98 ^a	3.64 ^{ab}
C-1	2.94 ^b	3.26 ^b	4.15 ^a	3.57 ^b	3.16 ^c	3.34 ^{ab}
C-2	3.02 ^b	3.16 ^b	4.15 ^a	3.49 ^b	3.19 ^c	3.37 ^a
C-3	3.15 ^b	3.42 ^{ab}	4.19 ^a	3.68 ^b	3.42 ^b	3.41 ^b
C-4	4.19 ^a	3.76 ^a	4.12 ^a	4.01 ^a	4.16 ^a	3.89 ^a
C-5	4.22 ^a	3.68 ^a	4.10 ^a	4.13 ^a	4.15 ^a	3.92 ^a

¹⁾Means of replications: means not followed by the same letter in the same column differ significantly each other (p<0.05).

²⁾5: most acceptable, 1: least acceptable.

때 김치의 숙성을 어느정도 억제시키고 김치의 향미를 그대로 유지시켰다고 한 이⁽¹⁸⁾의 결과와 비교적 유사하였다.

한편 内田⁽¹⁹⁾은 키토산의 항균성은 탈아세틸화도가 높을수록 우수하다고 보고한 바 있다.

키토산 첨가에 따른 김치의 적정산도 변화

상기의 예비실험 결과, 김치의 저장성 연장 가능성이 인정된 C-4 및 C-5 키토산을 김치에 첨가한 후 김치의 일반적인 숙성온도인 10°C에서 숙성중의 pH 및 적정산도 변화를 검토하였다.

Fig. 1에 나타낸 바와 같이 숙성 초기에는 대조구와 키토산 첨가구간의 유의적인 차이가 인정되지 않았으나 숙성 2일경부터 4일경 까지 키토산 첨가구의 pH가 대조구에 비해 0.8 정도 높게 유지되었으며 4일 이후에도 키토산 처리구가 대조구에 비하여 pH가 비교적 높게 유지되는 경향이였다.

Fig. 2는 C-4와 C-5 키토산을 첨가한 김치의 숙성중 적정산도(titratable acidity)의 변화를 나타낸 것으로 숙성 초기의 산도는 모든 처리구에서 0.2%이었으며 숙성이 진행됨에 따라 키토산 처리구가 대조구에 비해 전체적으로 낮은 산도를 나타내고 있었고 C-4와 C-5간에는 큰 차이를 보이지 않았다.

일반적으로 김치의 적숙기의 최적 pH는 4.2이고 발효후기의 pH는 3.6 정도를 보이며 산도의 경우는 적숙기의 경우 0.5~0.6%, 발효후기에는 0.98%까지 나타나는 것으로 보고되어 있는데⁽⁶⁾ 본 실험에서는 숙성

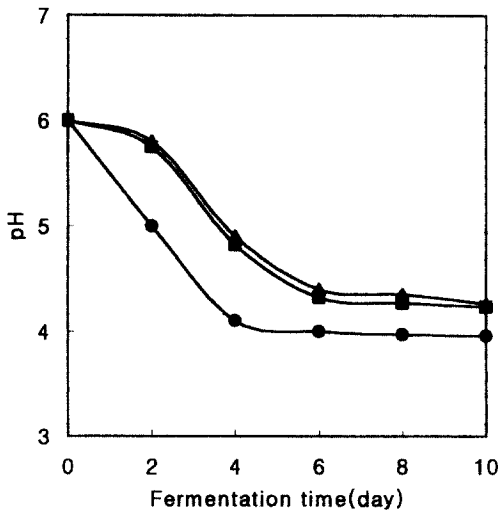


Fig. 1. Changes in pH of Kimchi samples during fermentation at 10°C. ●—●: control, ▲—▲: C-4, ■—■: C-5.

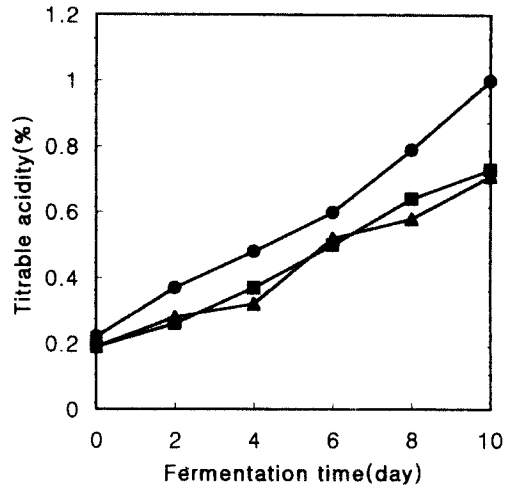


Fig. 2. Changes in titratable acidity of Kimchi samples during fermentation at 10°C. ●—●: control, ▲—▲: C-4, ■—■: C-5

3일경에 대조구가 pH 4.1 및 산도 0.50%를 나타내고 있어 이 시점이 적숙기로 판단되었으며 이때의 키토산 처리구는 pH 4.9 및 산도 0.35%를 나타내었으며 이러한 상대적인 숙성기간 연장 경향은 실험기간 전반에 걸쳐 유지되는 특성을 나타내었다.

이상의 결과는 김 등⁽⁶⁾의 키토산을 첨가시 발효 2일 이후부터 키토산 첨가구의 pH가 대조구에 비하여 높은 값을 나타내었고 발효 8일에도 pH 4.47~4.77 수준을 유지하였다는 결과와 조⁽⁹⁾의 glycerine 및 ethyl alcohol과 함께 초산에 녹인 키토산 0.5%를 김치에 첨가하였을 때 pH 4.0~4.2에 도달하는 기간이 대조구보다 2배 정도 연장되었다는 결과와 유사한 것으로 키토산의 첨가에 의하여 김치의 숙성에 관여하는 세균의 생육 억제와 관련성이 있기 때문으로 생각되었다.

한편, 김치의 숙성은 젖산균이 관여하는 것으로 키토산이 김치의 숙성을 억제하는 효과는 이들 젖산균의 생육억제에 깊은 관련이 있을 것으로 예상되고 있다. 따라서 키토산을 첨가한 김치의 젖산균 변화를 검토하는 것은 김치의 저장성과 키토산의 항균성과의 관계를 결정짓는데 매우 중요하다고 생각된다.

그러나 본 연구에서 C-4와 C-5 키토산을 첨가하여 제조한 김치의 숙성중 총젖산균의 변화를 측정할 바, 키토산 처리구의 총 젖산균수는 대조구와 유의한 차이를 보이지 않은 것으로 나타났다(data not shown). 이 결과는 키토산이 김치 숙성중 젖산균의 생육을 억제할 것으로 예상된 결과와 다른 것으로 이는 키토산의 항균 스펙트럼에 해당하는 젖산균의 부분적인 성

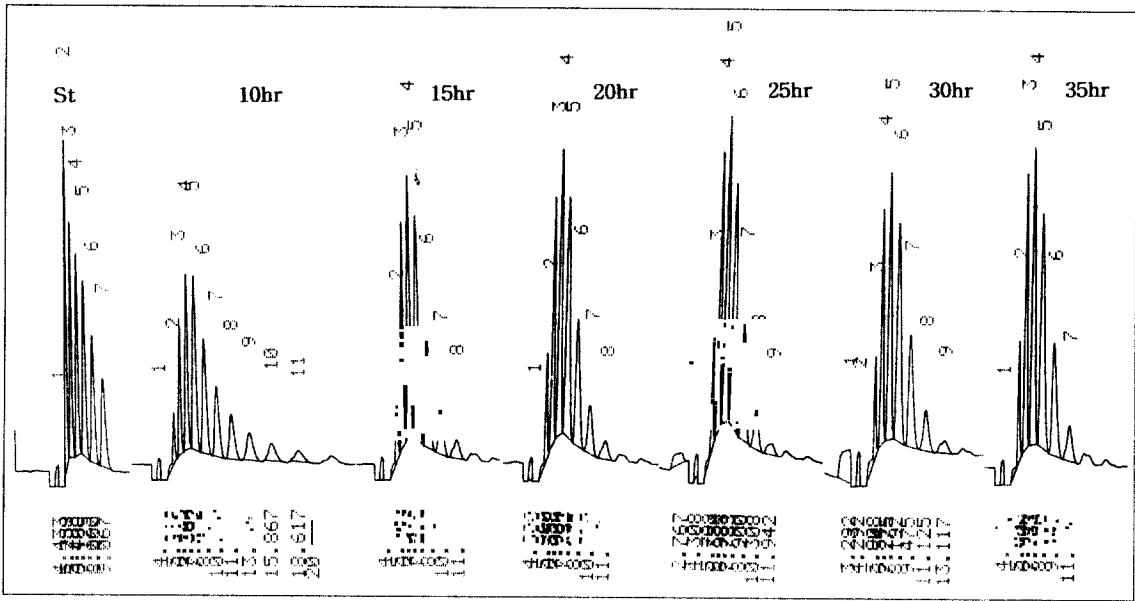


Fig. 3. Time course of HPLC pattern of chitosan hydrolyzates by the chitosanase.

장억제 및 기타 젖산균의 성장촉진 등으로 그 결과가 상쇄되었을 가능성이 있으므로 김치의 숙성에 관여하는 젖산균에 대한 키토산의 항균성에 대하여 정밀 검토가 필요하다고 생각되었다.

유효 키토산 올리고당의 효소적 제조와 특성

키토산은 분자량 및 탈아세틸화도에 따라 항균력이 다양한 것으로 알려지고 있으나⁽¹⁹⁾ 일반적으로 키토산은 분자량이 크고 물이나 용매에 녹지 않고 또한 맛이 짝어 식품첨가물로 이용하기 위해서는 수용화가 가능한 올리고당화가 필요하며 또한 올리고당 조성에 의해서도 항균성에 큰 차이가 있는 것으로 알려지고 있다.⁽¹⁹⁾

키토산의 가수분해물은 3~4량체가 주성분인 경우 보다는 5~7량체 이상의 당이 주성분인 분해물이 항균성이 강한 것으로 알려져 있으므로⁽⁶⁾ 키토산 올리고당은 주로 5~7량체의 함량이 많은 것이 김치의 저장성 연장에 효과적일 것이라고 생각된다.

따라서 본 연구에서는 5~7량체의 함량이 상대적으로 많은 키토산 올리고당을 얻기 위하여 탈아세틸화도가 99%인 분자량 16,000의 C-4 키토산을 대상으로 일본 名治社의 chitosanase를 이용하여 최적조건에서 연속교반하면서 35시간까지 분해하여 분해시간에 따른 올리고당의 생성 경향을 HPLC로 분석하였다(Fig. 3).

Table 4 및 Fig. 4에는 키토산 분해물의 올리고당의 조성 및 5~7량체의 시간별 생성량을 나타낸 것으로 5,

6 및 7량체의 생성량은 분해 20시간에 각각 17.31%, 7.51% 및 3.86%로 최대에 달하였으며 이후부터는 5~7량체의 함량이 점차 감소하는 경향을 보였다. 한편 올리고당 생성수율의 경우에는 25시간 분해물이 98.04%로 가장 높게 나타났고 5~7량체의 생성율이 가장 높게 나타난 20시간 분해물의 경우에는 94.49% (Elson-Morgan법에 의한 키토산 올리고당 함량: 89.0%)로 비교적 높은 수준의 생산수율을 보이고 있어 항균성이 높다고 보고된⁽¹⁹⁾ 5~7량체의 키토산 올리고당 함량이 상대적으로 많은 20시간 분해물이 김치 관련

Table 4. Changes in degree of polymerization of chitosan oligosaccharides produced by enzymatic hydrolysis at the optimum condition

Oligomer unit	Chitosan oligosaccharides (%)					
	10 hr	15 hr	20 hr	25 hr	30 hr	35 hr
2	3.59	5.36	5.81	7.25	6.51	6.36
3	7.31	13.23	14.55	16.77	13.59	15.97
4	11.39	18.45	20.07	22.15	18.30	20.77
5	16.79	23.50	25.38	26.40	22.69	24.67
6	14.86	16.33	17.31	16.47	15.61	15.57
7	10.36	7.43	7.51	6.23	6.53	5.75
8	7.82	3.88	3.86	2.77	2.91	-
9	5.95	-	-	-	-	-
10	4.40	-	-	-	-	-
11	3.01	-	-	-	-	-
Total	85.48	88.18	94.49	98.04	86.14	89.09

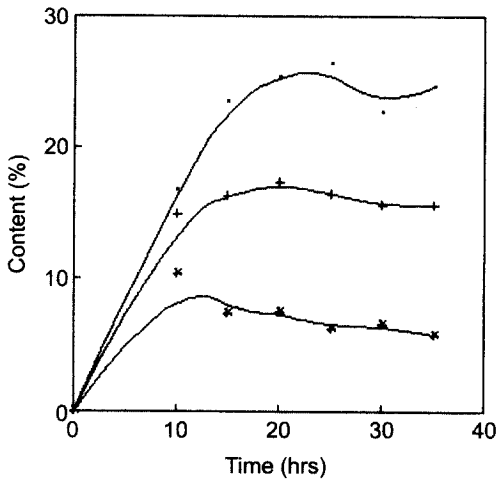


Fig. 4. Time course of production pattern of chitosan pentamer, hexamer and heptamer by chitosanase.

미생물에 대하여 유효한 항균성을 나타낼 것으로 기대되었다.

일반 부패 미생물에 대한 항균력

키토산 중에서 비교적 분자량이 작아 김치에 응용이 기대된 C-4 키토산(분자량: 16,000, 탈아세틸화도: 99%) 과 5~7량체의 함량이 가장 많이 함유된 20시간 키토산 분해물(이하 키토산 올리고당이라 칭함)을 이용하여 일반 식품 부패 미생물로 알려진 *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli* 4종에 대하여 항균력을 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 키토산 및 키토산 올리고당에 의한 균주의 성장 억제로 나타내는 clear zone은 3.0%(w/v) 키토산 및 5.0% (w/v) 키토산 올리고당 처리구에서 명확히 관찰되었으며 균주의 성장 억제환을 측정할 바(Table 5), 3.0% 키토산의 경우는 13~20 mm 범위를 5.0% 키토산 올리고당의 경우는 8~11 mm의 범위를 보여 키토산 및 키토산 올리고당이 모두 일반 부패미생물에 대하여 우수한 항균력을 나타내었다.

김치 부패미생물에 대한 항균력

김치의 숙성 및 부패에 관여한다고 알려져 있는 젖산균 4종(*Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *Enterococcus faecalis*)을 대상으로 상기와 같이 항균력을 측정하였다.

Fig. 6에 나타난 바와 같이 clear zone은 3.0% 키토산 및 5.0% 키토산 올리고당 처리구에서 명확히 관찰되었으며 3.0% 키토산의 경우는 9~20 mm 범위를 보

Fig. 5. Antimicrobial effect of chitosan and chitosan oligosaccharide solution on the bacteria. A: control, B: 3.0% chitosan, C: 0.1% chitosan oligosaccharide, D: 1.0% chitosan oligosaccharide, E: 3.0% chitosan oligosaccharide, F: 5.0% chitosan oligosaccharide.

였고 5.0% 키토산 올리고당의 경우는 8~24 mm의 범위를 나타내어(Table 5) 키토산 및 키토산 올리고당 모두 김치의 숙성 및 부패에 관여하는 젖산균에 대하여 항균성이 우수한 것으로 나타났다.

한편, *Lactobacillus plantarum*은 김치 숙성 적기 및 적기 이후에 출현하여 김치를 산패시키는 주요균으로

Table 5. Growth inhibition of microorganism demonstrated by chitosan and chitosan oligosaccharides

Microorganism	Clear zone on plate (mm)	
	Chitosan (3.0%)	Chitosan oligosaccharides (5.0%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	18	10
<i>Escherichia coli</i>	20	9
<i>Bacillus subtilis</i>	18	11
<i>Bacillus cereus</i>	13	8
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	16	11
<i>Lactobacillus brevis</i>	16	24
<i>Lactobacillus plantarum</i>	9	21
<i>Enterococcus faecalis</i>	20	16
Kimchi-I ¹⁾	14	11
Kimchi-II ²⁾	23	18
Kimchi-III ³⁾	15	12

¹⁾Kimchi I: pre-ripened.

²⁾Kimchi II: optimum ripened.

³⁾Kimchi III: over-ripened.

미생물의 억제력이 다양한 것으로 생각되었다. 따라서 본 연구결과에서는 키토산 및 키토산 올리고당이 김치의 산패에 관여하는 것으로 알려진 *Lactobacillus plantarum*에 대해서 강한 항균 활성을 나타내었으므로 키토산 및 키토산 올리고당은 김치 숙성 적기 이후에 높은 항균력을 나타낼 수 있을 것으로 기대되었다.

김치 유래 총 microflora에 대한 항균력

김치는 숙성시기에 따라 매우 다양한 종류의 젖산균이 성장하거나 도태되기도 한다. 따라서 키토산 및 키토산 올리고당의 항균력을 측정하는 가장 정확한 방법은 숙성시기에 따라 서로 상이한 microflora 조성을 가지는 김치 자체의 총미생물을 대상으로 항균력을 측정하는 것이 필요하다고 판단되었다.

Fig. 7에 나타낸 바와 같이 숙성시기가 상이한 모든 김치구에서 키토산 및 키토산 올리고당에 의한 총 microflora의 성장 억제환이 확인되었고 측정된 clear zone의 크기는 키토산이 14~23 mm, 키토산 올리고당이 11~18 mm의 범위를 보였다(Table 5). 키토산 및 키토산 올리고당의 항균력은 특히 숙성적기에 도달한 김치(Kimchi-II)에 대하여 가장 높은 항균성을 보이고 있는데 이 결과는 키토산 및 키토산 올리고당이 김치 숙성 적기 이후에 높은 항균력을 나타낼 수 있을 것으로 기대된 Fig. 6의 *Lactobacillus plantarum*에 대한 항균성의 결과와 관련이 있을 것으로 판단되었다.

Table 6 및 7에는 이상의 균주들을 72시간 배양하면서 640 nm에서 흡광도를 측정하여 항균효과를 계량화한 것으로 이들 균주에 대한 MIC는 키토산의 경우

Fig. 6. Antimicrobial effect of chitosan and chitosan oligosaccharide solution on the lactic acid bacteria related to Kimchi. A: control, B: 3.0% chitosan, C: 0.1% chitosan oligosaccharide, D: 1.0% chitosan oligosaccharide, E: 3.0% chitosan oligosaccharide, F: 5.0% chitosan oligosaccharide.

알려져 있다. 손 등⁶⁾은 고분자 키토산이 *Lactobacillus plantarum*의 생육을 효과적으로 억제한다고 하였으며 안⁴⁾은 sorbic acid와 같은 식품 보존제가 *Lactobacillus plantarum*보다는 *Leuconostoc*속 미생물의 생육을 더욱 억제시켰다고 하여 사용하는 보존제에 따라 대상

Fig. 7. Antimicrobial effect of chitosan and chitosan oligosaccharide solution on the bacteria from Kimchi at the various fermentation stage. A: control, B: 3.0% chitosan, C: 0.1% chitosan oligosaccharide, D: 1.0% chitosan oligosaccharide, E: 3.0% chitosan oligosaccharide, F: 5.0% chitosan oligosaccharide, Kimchi-I: pre-ripened, Kimchi-II: optimum-ripened, Kimchi-III: over-ripened.

Table 6. Antimicrobial effect of chitosan on the bacteria related to Kimchi

Microorganism	Chitosan(%)						MIC (%)
	0	0.01	0.03	0.05	0.07	0.10	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+++	+ ¹⁾	- ²⁾	-	-	-	0.03
<i>Escherichia coli</i>	+++	-	-	-	-	-	0.01
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++	+	-	-	-	0.05
<i>Bacillus cereus</i>	+++	+	-	-	-	-	0.03
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+++	+	-	-	-	-	0.03
<i>Lactobacillus brevis</i>	+++	++	+	-	-	-	0.05
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	++	+	-	-	-	0.05
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	+	-	-	-	-	0.03

¹⁾+: Degree of growth in 72 hrs.²⁾ -: No growth.**Table 7. Antimicrobial effect of chitosan oligo-saccharides on the bacteria related to Kimchi**

Microorganism	Chitosan oligosaccharides (%)						MIC (%)
	0	0.05	0.10	0.20	0.30	0.40	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+++	+ ¹⁾	- ²⁾	-	-	-	0.10
<i>Escherichia coli</i>	+++	-	-	-	-	-	0.05
<i>Bacillus subtilis</i>	+++	++	+	-	-	-	0.20
<i>Bacillus cereus</i>	+++	+	-	-	-	-	0.10
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+++	+	-	-	-	-	0.10
<i>Lactobacillus brevis</i>	+++	++	+	-	-	-	0.20
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+++	++	+	-	-	-	0.20
<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	+	-	-	-	-	0.10

¹⁾+: Degree of growth in 72 hrs.²⁾ -: No growth.

0.01~0.05% 범위였고 키토산 올리고당의 경우에는 0.05~0.2% 범위로 키토올리고당이 키토산에 비해 높게 나타났다.

키토산 올리고당이 키토산에 비해 MIC가 낮게 나타난 것은 키토산에 비해 키토산 올리고당의 분자량이 낮고 올리고당 중에는 항균 능력이 거의 없는 2~4량체의 성분이 상대적으로 다량 포함되어 있기 때문으로 생각되며 이 결과는 세균에 대한 키토산 올리고

당의 MIC가 키토산의 MIC보다 약 2배 높게 나타난 丙田⁽⁹⁾의 실험결과와 유사하였다.

이상의 결과로부터 키토산 및 키토산 올리고당은 김치 관련 미생물에 대하여 우수한 항균력을 나타내며 특히 적숙기 이후에 관여하는 미생물을 제어하여 김치의 저장성 향상에 응용될 수 있을 것으로 기대되었다.

요 약

키토산 및 키토산 올리고당의 김치관련 미생물에 대한 항균특성을 검토하였다. 분자량 및 탈아세틸화도가 다른 5종의 키토산을 조제하여 김치에 첨가한 후, 관능검사, pH 및 산도를 검토한 결과, C-4 및 C-5(탈아세틸화도 92~99%, 분자량 16,000~32,000)가 우수한 조직감을 나타내었고 숙성적기로 평가된 대조구의 pH 4.1, 산도 0.50% 시점에서 pH 4.9 및 산도 0.35%를 나타내었다. 한편, C-4 키토산(분자량: 16,000, 탈아세틸화도: 99%)으로부터 5~7량체의 함량이 높은 키토산 올리고당을 조제하고 *B. subtilis*, *B. cereus*, *Pse. fluorescens*, *E. coli*, *Lac. plantarum*, *Leu. mesenteroides*, *Lac. brevis*, *Ent. faecalis*에 대하여 항균력을 측정할 바, 3.0% (w/v) 키토산은 9~20 mm, 5.0% (w/v) 키토산 올리고당은 8~24 mm의 성장억제환을 나타내었으며 키토산의 MIC는 0.01~0.05% (w/v), 키토산 올리고당의 MIC는 0.05~0.2%로 나타났다. C-4 키토산 및 키토산 올리고당은 또한 초기, 적기 및 후기의 김치 유래 총 microflora에 대해서도 항균력을 나타내었고 특히 적숙기의 microflora에 대해서 가장 강한 항균력을 보였다. 따라서 C-4 및 키토산 올리고당은 김치의 저장성 개선제로서 응용이 가능할 것으로 기대되었다.

문 헌

- Hong, W.S. and Yoon S.: The effects of low temperature heating and mustard oil on the Kimchi Fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **21**, 331-337 (1989)
- Kim, S.J. and Park, K.H.: Antimicrobial activities of the extracts of vegetable Kimchi stuff (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 216-220 (1995)
- Hong, S.P., Kim, D.S. and Hwang, J.K.: Biological function and production technology of chitin and chitosan (in Korean). *Food Science and Industry*, **30**, 44-52 (1997)
- Ahn, S.J.: The effect of salt and food preservative on the growth of lactic acid bacteria isolated from Kimchi (in Korean). *Korean J. Dietary Culture*, **4**, 71-77 (1994)
- Korean society of food science and technology : *Kimchi science*. 1st Symposium, p.82 (1994)

6. Son, Y.M., Kim, K.O., Jeon, D.W. and Kyung, K.H.: The effect of low molecular weight chitosan with or without other preservatives on the characteristics of *Kimchi* during fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **28**, 888-896 (1996)
7. Kim, K.O., Moon, H.A. and Jeon, D.W.: The effect of low molecular weight chitosans on the characteristics of *Kimchi* during fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 420-427 (1995)
8. Kim, K.O. and Kang, H.J.: Physicochemical properties of chitosan produced from shrimp shell under the different conditions and their influences on the properties of *Kakdugi* during storage (in Korean). *Korean J. Dietary Culture*, **9**, 71-77 (1994)
9. Jo, H.L.: Antimicrobial activity and food preservative function of a low molecular weight chitosan. Ph.D Thesis, Busan National fisheries Univ., Seoul, Korea (1989)
10. No, H.K., Park, I.K. and Kim, S.D.: Extension of shelf-life of *Kimchi* by addition of chitosan during salting (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 932-936 (1995)
11. Hackman, R.H.: Studies on Chitin 1. Enzymic Degradation of chitin and chitin esters. *Austr. J. Biol. Sci.*, **1**, 168 (1954)
12. 欠吹念: キチンキトサンマニュアル, 枝報堂出版, p.1 (1990)
13. Yu, J.H.: Experiments in Food Science and Enzymology, Tamku Press, Seoul, Vol. 1, p.121 (1989)
14. Hong, S.P.: Study on the chitin/chitosan oligosaccharide production and separation technology. Korean Food Research Institute Report, p.16 (1997)
15. Yu, J.H.: Experiments in Food Science and Enzymology, Tamku Press, Seoul, Vol. 1, p.731 (1989)
16. Zaika, L.L.: Spice and herbs; Their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety*, **9**, 97-100 (1988)
17. Zar, J.H.: Biostatistic Analysis. 2nd edition, Prentice-Hall International Edition, p.188 (1984)
18. Lee, J.S.: Method in enhancing shelf-life of *Kimchi*. Patent 91-6614, Korea (1991)
19. 内田 泰: キチン,キトサシの抗菌性. フトケミカル, **2**, 22-29 (1988)

(1998년 8월 7일 접수)