

김치에 있어서의 amylolytic enzyme과 protease 활성에 관한 연구

한영숙 · 오지영 · 송주은^{1*}

성신여자대학교 식품영양학과, ¹동우대학 호텔조리과

The Study on Amylolytic Enzyme and Protease Activities of *Kimchi*

Young-Sook Hahn, Ji-young Oh and Joo-Eun Song^{1*}

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

¹Department of Hotel Culinary Arts, Dong-U College

The amylolytic enzymes (α -amylase, β -amylase, glucoamylase) and protease activities were studied during *Kimchi* fermentation. The optimum pH of *Kimchi* was 4.1 within 2 days at 20°C. The optimum acidity calculated as lactic acid was 0.44% within 2 days at 20°C. On the first day of fermentation, α -amylase activity was reduced from 0.49 unit/mg protein to 0.20 unit/mg protein but increased in the later stage of fermentation. In case of β -amylase, glucoamylase and protease showed the highest activity of 505.73, 13.43 and 1.72 unit/mg protein at the 2nd day of fermentation at 20°C. In the sensory evaluation of *Kimchi* were estimated taste, color, texture and overall acceptability. Overall acceptability of *kimchi* showed the highest score value on the 2nd day of fermentation, respectively.

Key words: *kimchi*, amylase, glucoamylase, protease, sensory evaluation

서 론

김치는 독특한 맛을 지닌 우리나라 고유의 전통식품으로 예부터 이용되어 온 중요한 부식 중의 하나이다⁽¹⁾. 김치는 원 재료 및 부재료에서 유래된 당을 기질로 하여 젖산발효로 대표되는 복잡한 발효공정을 거쳐 재료 중의 탄수화물과 단백질 등이 분해되어 당류 및 아미노산 등 여러 저분자 물질들을 생성함으로써 독특한 맛과 풍미를 형성하게 된다⁽²⁾. 김치 재료에서 유래되는 효소류 중 amylase는 전분질 등 탄수화물의 거대분자를 가수분해시켜 미생물의 영양이 되는 당류를 생성하고⁽³⁾, protease는 단백질을 가수분해시켜 아미노산을 생성함으로써 정상형 젖산균의 번식환경을 조성하게 된다⁽⁴⁾. 김치 숙성 초기에는 일반적으로 아미노산의 요구성이 낮은 이상형의 젖산균이 번식하나 protease의 작용으로 각종 유리 아미노산이 생성되면 젖산 생성량이 높은 정상형의 젖산균이 번식하게 된다⁽⁵⁻⁶⁾.

무 김치는 가정에서 배추김치 다음으로 많이 섭취되는 김치로 통배추 김치가 보편화 되기 시작한 100여년 전 이전에는 주로 무, 오이, 가지, 동아 등이 김치의 재료로 많이 사

용되어 신라시대부터 조선전기에는 주로 나박 김치류나 동치미, 무김치, 석박지 등이 이용되었다⁽⁷⁻⁸⁾. 예부터 무를 많이 먹으면 속병이 없다는 말이 있는데 그 이유는 무속에는 여러 가지 소화효소를 많이 함유하고 있기 때문이었다. 무의 효소는 전분 분해 효소인 amylase가 가장 많이 함유되어 있으며, 떡이나 밥 등의 곡물 음식을 먹을 때 함께 섭취하면 소화를 돕는 작용을 한다고 여겨져 왔다⁽⁹⁻¹¹⁾. 지금까지의 김치와 관련된 효소에 대한 연구는 배추, 무 등의 조직감에 관련된 효소 연구⁽¹²⁻¹³⁾가 일부 있을 뿐 김치의 맛에 직접적으로 영향을 주는 가수분해 효소에 대한 연구는 극히 일부이다.

본 연구에서는 김치의 발효, 숙성에 따른 amylolytic enzyme과 protease의 활성을 측정하였으며, 관능적으로 가장 우수한 시기의 김치와 효소활성과의 관계를 살펴보았다. 효소 활성 측정은 amylolytic enzyme이 복합 효소임을 고려하여 α -amylase, β -amylase, glucoamylase로 구분하여 활성을 측정하였으며, 또한 protease활성이 무 김치 발효와 김치의 맛에 어떤 관련성이 있는지를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

김치 제조

무는 실험 당일 성북구 동선동 소재 재래시장에서 2.0~2.5 kg의 신선한 무를 구입하여 세척한 후 2.5 cm cube로 잘라서 2.0% NaCl로 1시간 절였다. 무를 절인 후 무 중량에 대해 마늘 2.0%, 홍고추 4.0%, 파 6.0%를 첨가하여 무 김치

*Corresponding author : Young-Sook Hahn, Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University, 249-1 Dongsun-Dong 3 Ga, Sungbuk-Gu, Seoul 136-742, Korea
Tel: 82-2-920-7210
Fax: 82-2-925-4501
E-mail: yshan@cc.sungshin.ac.kr

를 제조한 후 1회 실험 분량인 300 g씩 polypropylene bag에 나누어 넣어 20°C에서 발효시켰으며 1개월 간격으로 3회 무김치를 제조하여 시료로 사용하였다.

pH와 산도 측정

김치 50 g을 측량한 후 후드믹서(FM-680W, 한일, Korea)로 마쇄하여 4겹의 거즈로 여과한 김치액을 시료로 사용하였다. 시료액의 pH는 pH meter(Mettler, Toledo 345)로 측정하였고, 산도는 시료액 10 mL를 취해서 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여, 이 때의 NaOH 소비량을 lactic acid(%)로 환산하여 계산하였다.

조효소액 추출

시료 200 g을 동량의 20 mM sodium acetate buffer(pH 4.0)로 질소를 충전하면서 4°C에서 1분간 균질화한 후 nylon gauze로 여과하였다. 여과액을 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하고, 상정액을 취하여 얼음을 채운 수조에서 75% ammonium sulfate로 염석하여 단백질을 침전시켰다. 염석이 완료된 시료액을 4°C에서 7,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 pellet을 취하고, 10 mL의 10 mM sodium acetate buffer(pH 4.0)로 용해시킨 다음 같은 buffer로 하룻밤 동안 투석하였다. 투석이 완료된 시료액을 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 상정액을 취하여 조효소액으로 사용하였다.

α -Amylase 활성 측정

조효소액 1.0 mL에 기질로 0.5% 호화전분을 2.0 mL 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후, 반응액 0.3 mL를 취해서 0.1 N hydrochloric acid을 포함한 0.01 N I_2 solution 0.1 mL를 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합액에 증류수로 10 mL가 되도록 정용한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 10분 동안 위의 조건에서 파란색의 흡광도가 50% 감소했을 때로 하였다⁽¹⁴⁾.

β -Amylase 활성 측정

조효소액 1.0 mL에 기질로 0.5% 호화전분을 2.0 mL 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후, 반응액 0.2 mL를 취해서 0.6 mL의 DNS(dinitrosalysilic acid)시약을 첨가하여 혼합하였다. 혼합액을 끓는 물에서 3분간 유지시켜 효소를 실활시킨 후 즉시 냉각하였다. 이 반응액에 증류수 3.2 mL를 첨가하여 잘 혼합한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 1분 동안 위의 조건에서 1 μ mole의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다⁽¹⁴⁾.

Glucoamylase 활성 측정

조효소액 1.0 mL에 기질로 0.5% 호화전분 용액 2.0 mL를 첨가하여 50°C에서 10분간 반응시킨 후 반응액 1.0 mL를 취해서 Glucose Assay Reagent(Kit GAGO-20, Sigma) 2.0 mL을 가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 12 N H_2SO_4 2.0 mL를 첨가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 1 unit은 1분 동안 위의 조건에서 1 μ mole의 glucose를 생성하는 효소의 양으로 하였다⁽¹⁵⁾.

Protease 활성 측정

조효소액 1.0 mL에 기질로 0.6% hammarsten casein 1.0 mL를 첨가하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 10% TCA(trichloroacetic acid) 2.5 mL를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 30분간 반응액을 정지하여 단백질을 침전시킨 후 상정액을 2.0 mL를 취해서 0.55 M Na_2CO_3 5.0 mL를 첨가하고, 2/3 N Folin reagent 1.0 mL를 첨가하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 1 unit은 1분 동안 위의 조건에서 1 μ mole의 tyrosine을 생성하는 효소의 양으로 하였다⁽¹⁴⁾.

단백질량 측정

단백질은 Bradford 측정법⁽¹⁶⁾에 기초를 둔 Bio-Rad 단백질 측정법(Protein Assay Kit, Bio-Rad)법⁽¹⁷⁾으로 측정하였고, BSA(bovine serum albumin)를 농도별로 제조하여 standard로 하였다.

관능검사

김치의 관능적 특성은 김치를 제조하여 발효 일수 별로 0, 1, 2, 3, 6일째의 김치를 취하여 -20°C에서 냉동보관 후 4-7°C 냉장고에서 해동시킨 후 시료로 하였고, 패널요원은 김치 맛에 대한 차이 식별능력이 있는 대학원생 중 예비실험을 거쳐 9명을 선정하여 관능평가를 수행하였다. 평가는 5점 만점 척도로 하여 차이식별검사를 하였고, 김치의 맛(짠맛, 신맛), 색, 질감, 전반적인 기호도로 나누어 평가하였다. 평가 결과는 이원분산분석(two-way ANOVA)에 의해서 유의성을 검정하였고, 다중범위검정(Duncan's multiple range test)로 각 조건에 따른 유의적인 차이를 $p < 0.05$ 의 수준으로 하여 비교하였다⁽¹⁸⁾.

결과 및 고찰

무 김치의 발효 과정 중 pH 및 산도 변화

무 김치의 발효, 숙성 중 pH 및 산도 변화는 Fig. 1에 나타내었다. pH의 경우 무 김치 제조 당일 5.6에서 김치가 숙성되면서 점차 감소하여 발효 2일째 pH 4.1, 발효 6일째 3.8을 나타내었다. 산도는 무 김치 제조 당일과 발효 1일째 각각 0.18%, 0.17%에서 김치가 숙성되면서 증가되어 발효 2일째 0.44%, 발효 6일째 0.78%로 증가되었다. 김치의 숙성적기는 일반적으로 pH는 4.3, 산도는 0.5%로 알려져 있는데^(19,20), 본 연구에서는 pH 4.1, 산도 0.44%를 나타낸 발효 2일째가 숙성적기임을 알 수 있었다.

α, β -Amylase 활성

무 김치의 발효 일수별 α, β -amylase 활성을 측정한 결과는 Fig. 2와 3에 나타내었다. α -amylase의 경우 발효 0일째가 0.49 unit/mg protein으로 효소 활성이 가장 컸고 발효 1일째 급격히 감소되어 0.20 unit/mg protein의 활성을 보인 후 점차 증가되어 발효 6일째 0.45 unit/mg protein의 활성을 보였다. 오 등⁽³⁾은 김치 숙성 전 α -amylase 활성이 6.78 units였으나 숙성 후 5.50 units로 감소되었다가 pH가 감소되는 시기에 다

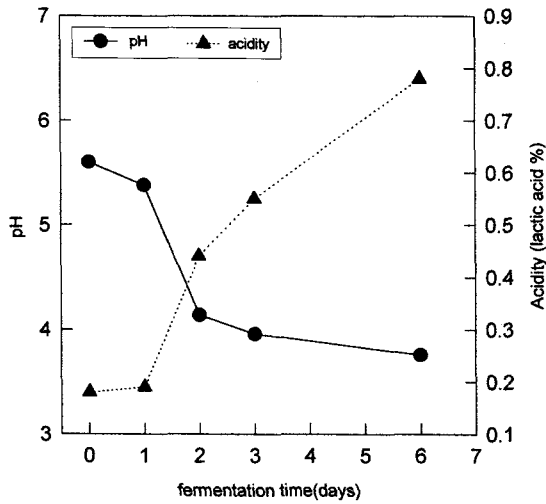


Fig. 1. Changes in pH and acidity of *Kimchi* during fermentation.

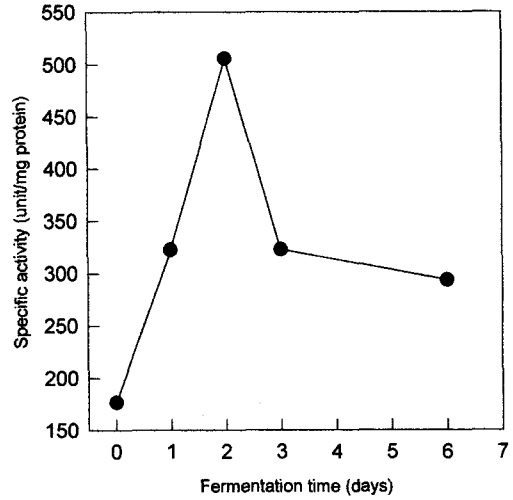


Fig. 3. Changes in β -amylase activity of *Kimchi* during fermentation.

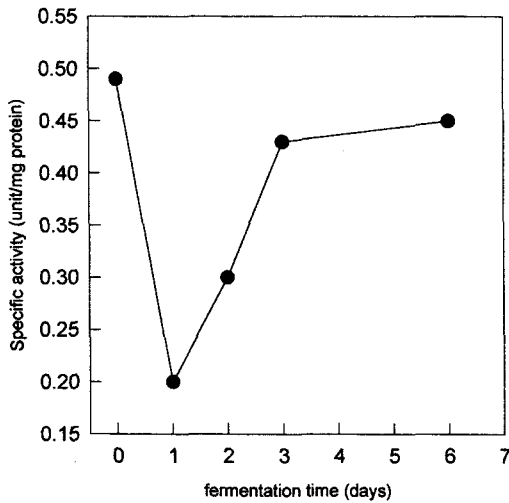


Fig. 2. Changes in α -amylase activity of *Kimchi* during fermentation.

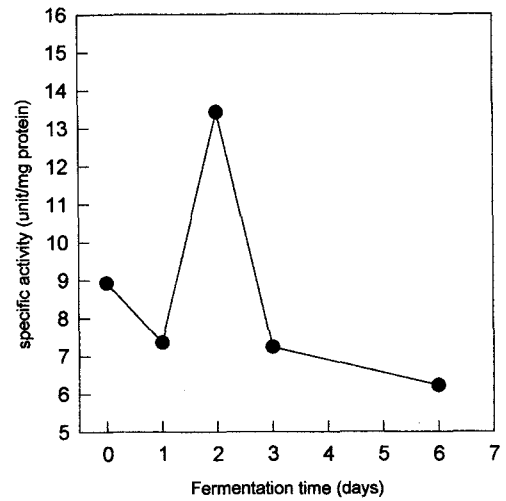


Fig. 4. Changes in glucoamylase activity of *Kimchi* during fermentation.

시 7.52 unit로 증가된다고 하였으며, 초기에는 김치 재료에서 유래된 효소로 인해 활성이 높고 후기에 효소 활성이 증가되는 것은 김치 숙성에 따라 미생물이 증식하면서 미생물로부터 유래되는 효소라 하였다.

발효 전 김치의 α -amylase 활성이 높은 이유는, 예비실험에서 효소액 추출 buffer의 pH를 4.0, 5.0, 6.0으로 조정하여 활성을 측정했을 때 pH 6.0에서 최대 활성을 보여, 김치가 숙성되면서 pH가 저하되어 α -amylase 활성이 낮아졌으며 발효 2일 이후는 미생물 증식에 따른 효소활성 증가로 생각되었다. β -amylase의 경우 예비 실험에서 pH가 4.0인 경우 효소의 최대 활성을 보였는데, 무 김치의 발효 과정 중 β -amylase의 활성은 발효 0일째 176.77 unit/mg protein이었고, pH 4.1을 보였던 발효 2일째 505.73 unit/mg protein으로 β -amylase가 최대 활성을 나타내어 김치의 숙성 적기인 pH 4.0 부근이 이 효소의 활성 범위임을 알 수 있었다. 이후 무 김치가 숙성되면서 점차 활성이 감소되어 발효 6일째 293.69 unit/mg protein으로 낮아졌다.

Glucoamylase 활성

Glucoamylase는 전분에 작용하여 α -1,4 결합, α -1,6 결합, 또는 α -1,3 결합 등을 가수분해하여 포도당을 생성하는 효소로 무 김치의 glucoamylase 활성은 발효 0일째 8.93 unit/mg protein이었으나 무 김치의 최적 숙성기간인 발효 2일째 13.43 unit/mg protein으로 최대 활성을 보인 후 감소되어 발효 6일째 6.22 unit/mg protein을 나타내었다(Fig. 4).

Nagasaka 등⁽¹⁵⁾은 glucoamylase의 최적 pH가 생전분의 경우 4.0, 호화전분의 경우 4.5~5.5 부근이라 하였는데 본 연구에서는 glucoamylase 활성이 pH 4.1를 보인 발효 2일째에 최대 활성을 보여 유사한 결과를 보였다. 또한, 균류 중 *Rhizopus oryzae*에서 정제한 glucoamylase의 효소적 특성의 경우 효소 반응 최적 온도는 50°C, 최적 pH는 5.0으로 나타나 무 김치에서 추출한 glucoamylase와 비교시 반응온도는 50°C로 일치되었으나 반응 최적 pH는 4.0보다 다소 높게 나타났다⁽²¹⁾.

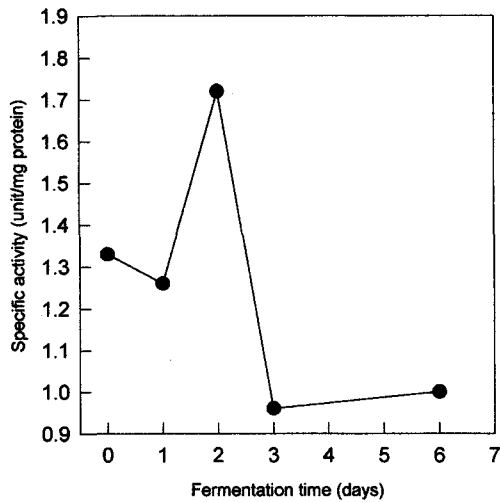


Fig. 5. Changes in protease activity of *Kimchi* during fermentation.

Protease 활성

무 김치의 발효 속성에 따른 결과는 Fig. 5에 나타내었다. protease의 활성은 glucoamylase 활성과 유사한 경향으로 발효 0일째 1.33 unit/mg protein이었고, 발효 2일째 1.72 unit/mg protein으로 최대 활성을 보인 후 발효 3일 이후는 급격히 감소되어 발효 6일째 1.0 unit/mg protein을 나타내어 역시 김치 최대 숙성시기에 protease 활성도 높았다. 김치의 경우 배추, 무 등 담금 재료로부터 유래하는 효소작용은 소금 절임으로 인해 활성화되면서 담금 초기 즉, 미생물의 생육 유도기에 해당하는 2~3일 중에 본격적으로 작용하는 것으로 보고된⁽³⁾ 바와 같이 본 연구에서도 김치의 숙성시기인 발효 2일째 효소활성이 높은 것으로 나타났다. 배추의 소금 절임과 숙성 중 효소류의 활성 변화에 관한 연구에서 절임 배추와 절임 액의 효소활성의 합이 원배추의 protease 활성보다 높게 나타나 소금 절임으로 인해 효소활성이 촉진되는 것으로 이는 절임 전 세포조직과 결합하여 비 활성형으로 존재하던 것이 소금 절임으로 인해 조직에서 효소가 일탈되어 활성화되는 것이라 보고하였다⁽³⁾.

관능검사

무 김치를 발효 일수별(0, 1, 2, 3, 6일)로 취하여 맛, 색,

조직감, 기호도로 나누어 관능평가를 하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 항목별로 보면 신맛과 색에서 시료간 유의적인 차이를 보였으며 다른 항목에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 신맛의 경우 발효 3일째, 6일째 각각 4.2, 4.0으로 발효 0, 1, 2일째 김치와 유의적인 차이를 보였다. 또한 발효 0일째 김치는 1.5로 발효 1, 2일째 김치와 역시 유의적인 차이를 보여 신맛이 가장 낮게 평가되었다. 색의 경우 김치 숙성 적기인 발효 2일째 4.1로 가장 우수하였고 발효 3일째 김치와 유의적인 차이를 보였다. 전반적인 기호도 면에서는 발효 2일째 김치가 3.8로 가장 우수한 기호도를 보여, 김치 숙성적기에 역시 기호도도 높게 평가되는 것을 나타내었다.

요 약

무는 소화 효소가 많이 함유되어 있어 소화작용을 돕는 것으로 알려져 있는 채소류로 배추에 비해 amylase 함량이 월등히 높은 채소이다. 본 연구에서 무 김치를 제조하여 발효 일수별로 전분가수분해 효소인 α -, β -amylase, glucoamylase와 protease의 활성을 측정하고 전분 가수분해 효소 중 α -amylase는 김치 제조 직후 0.49 unit/mg protein으로 최대 활성을 보인 후 감소되었다가 발효 2일 이후 활성이 증가되었다. 반면, β -amylase, glucoamylase, protease는 모두 pH 4.1, 산도 0.44%를 보인 무 김치의 숙성적기였던 발효 2일째 각각 505.73, 13.43, 1.72 unit/mg protein으로 최대활성을 보였다. 무 김치의 발효 일수별 관능 평가에서도 역시 효소 활성이 최대를 나타내었던 발효 2일째 전반적인 기호도가 가장 높게 나왔다. 김치의 숙성 적기에는 전분 가수분해 효소와 단백질 가수분해 효소가 활발히 작용하여 탄수화물과 단백질이 가수분해되어 유리당과 아미노산을 생성하면서 김치의 맛도 상승되는 것으로 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 성신여자대학교 이세웅 박사 학술진흥과제 연구비 지원에 의해 수행된 연구 결과이며 이에 감사드립니다.

Table 1. Sensory evaluation of *Kimchi* during fermentation

characteristics	sample	Fermentation time (days)				
		0	1	2	3	6
Taste	saltness	3.5	3.1	3.3	2.8	3.0
	sour	1.5 ^c	2.3 ^{bd}	3.0 ^{bd}	4.2 ^a	4.0 ^a
Aroma	well ripen	1.7	2.8	3.0	3.3	3.5
Color	color	3.3 ^{ab}	2.8 ^{ab}	4.1 ^a	2.3 ^b	3.4 ^{ab}
Texture	firmness	3.5	3.2	2.8	2.1	3.2
Overall acceptability		2.6	2.4	3.8	2.7	3.4

^{a-d}sample in a row followed by the same letter are not significantly different according to Dunncan's multiple range test ($p < 0.05$).

문헌

1. Lee, S.W. Study on movements and interchange of *Kimchi* in China, Korea and Japan. J. Korean Soc. Food Nutr. 4: 71-95 (1975)
2. Ryu, J.Y., Lee, H.S. and Rhee, H.S. Changes of organic acids and volatile flavor compounds in *Kimchi* fermented with different ingredients. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 169-174 (1984)
3. Oh, Y.A. and Kim, S.D. Changes in enzyme activities of salted chinese cabbage and *Kimchi* during salting and fermentation. J. East Asian Soc. Dietary Life 26: 404-410 (1997)
4. Kim, H.J. and Jeon, J.K. The study of microflora changes during *Kimchi* fermentation. Atomic Energy Thesis 6: 112-115 (1966)
5. No, W.S., Hawer, Y.H. and Oh, H.K. The study of microflora on *Kimchi* fermentation. Thesis, Seoul Health College 2: 15-18 (1981)
6. Bang, Y.S., Cho, Y.G. and Woon, S.L. The change of free amino acid composition during radish *Kimchi* fermentation. J. Korean Home Economics Asso. 23: 55-60 (1985)
7. Kim, J.M., Shin, M.K., Hwang, H.S. and Kim, H.T. Effects of salting process on ascorbic contents, α -amylase activity, seasoning penetration and microbial counts of radish cubes for *Kakdugi*. Korean J. Food Sci. Technol. 22: 492-495 (1990)
8. Yoon, S.S. The history of *Kimchi*. Korean J. Soc. Food Sci. 4: 89-95 (1988)
9. You, T.J. Source book of food, pp. 168-169. Seo-Woo, Seoul (1993)
10. Woon, B.S. and Lee, K.S. Food Ingredients. pp. 83-84. Su-Hak Sa, Seoul (1985)
11. Cho, J.S. Food Ingredients, pp. 150-151. Moon-Un Dang, Seoul (1987)
12. Baek, H.H., Lee, C.H., Woo, D.H., Park, K.H., Pek, U.H., Lee, K.S. and Nam, S.B. Prevention of pectinolytic softening of *Kimchi* tissue. Korean J. Food Sci. Technol. 21: 149-153 (1989)
13. Park, H.O., Kim, K.H. and Yoon, S. A study of characteristics of pectinesterase, polygalacturonase and peroxidase in *Kimchi* materials. Korean J. Dietary Culture 5: 443-448 (1990)
14. Kim, H.J., Lee, J.J., Cheigh, M.J. and Choi, S.Y. Amylase, protease, peroxidase, and ascorbic acid oxidase activities of *Kimchi*. Korean J. Food Sci. Technol. 30: 1333-1338 (1998)
15. Nagasaka, Y., Kurrosawa, K., Yokota, A. and Tomita, F. Purification and properties of the raw-starch-digesting glucoamylases from *Crostitium rolfsii*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 323-339 (1998)
16. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)
17. Bio Rad Protein Assay, Bio Rad Laboratories Instruction Manual (1979)
18. Elizabeth, L. Methods for Sensory Evaluation of Food. Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada (1970)
19. Lee, Y.H. and Yang, I.W. Studies on the packaging and preservation of *Kimchi*. J. Korean Agri. Soc. 13: 207-218 (1970)
20. Rhje, S.G. and Chun, S.K. The influence of temperature on fermentation of *Kimchi*. J. Korean Soc. Food Nutr. 11: 63-67 (1982)
21. How, W.N. and Chung, M.J. Enzymatic characteristics of two forms of the purified glucoamylase from *Rhizopus oryzae*. Korean J. Food Sci. Technol. 16: 392-397 (1984)

(2001년 11월 2일 접수)