

GOVP1199904434

664.028
L293L

최 종
연구보고서

농산물을 이용한 천연보존제 개발 및
산업화 연구

Development of natural food preservatives
from agricultural products

충남대학교 농과대학 식품공학과

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “농산물을 이용한 천연 보존제 개발 및
산업화연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12.

주관연구기관명 : 충남대학교 농과대학

총괄연구책임자 : 성 창 근

세부연구책임자 : 오 만 진

세부연구책임자 : 김 미 리

연구원 : 최 원 균

연구원 : 서 대 홍

연구원 : 박 선

연구원 : 김 재 훈

연구원 : 전 형 오

연구원 : 박 정 훈

연구원 : 김 미 경

연구원 : 모 은 경

연구원 : 김 진 희

여 백

요 약 문

I. 제 목

농산물을 이용한 천연보존제의 개발 및 산업화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

1. 연구개발의 목적

본 연구의 최종 목적은 천연물로부터 식품에 사용 가능한 보존제를 개발하고 궁극적으로 이를 산업화함에 있다.

현재 식품 첨가물에 사용되는 합성 방부제 및 보존제는 그 원료 물질을 전량 수입에 의존하고 있다. 그러므로 국산 농산물로부터 신규 천연 보존제를 개발하면 외화를 절약할 수 있을 뿐만 아니라 부가가치가 매우 높은 산업 육성이 가능해진다.

따라서 본 연구를 통하여 식품 보존제의 개발과 이에 대한 산업화가 이루어지면 많은 문제를 일으켜 온 기존의 합성 방부제를 천연물로 대체할 수 있다. 뿐만 아니라 국내외로부터 지적재산권을 획득할 수 있어 거의 전량 수입에 의존하는 합성 및 천연 보존제를 국산품으로 대체시키므로 외화를 절감할 수 있다. 그리고 UR 출범에 따라 국제경쟁력이 보다 열세에 놓인 우리의 농업에 새로운 활성화 방안이 될 수 있을 것이다.

2. 연구개발의 중요성

본 연구에 의하여 수행된 천연 보존제 개발 및 산업화 연구는 천연 보존제의 산업화 과정을 통하여 제품 개발의 국제 경쟁력을 키우고 원료 생산과 공급을 통한 농업 생산력의 제고를 가져오기 위하여 매우 중요하다고

사려된다.

왜냐하면 근본적으로 나라의 경쟁력은 기업에 달려있고, 기업의 경쟁력은 신제품 개발 및 제품의 끊임없는 품질 개선에 있다고 할 수 있기 때문이다.

가. 김치 보존제 개발

최근 우리 나라의 김치가 세계적으로 크게 각광받고 있는 것은 다양한 재료를 첨가하여 그 맛과 향이 독특할 뿐만 아니라 살아있는 젖산균이 국제적으로 널리 인정되고 있는 젖산음료 못지 않다는 점이라 할 수 있다.

최근 배추김치의 제조방법, 저장 방법, 품질 평가 등에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 깍두기에 대해서는 많은 연구가 이루어지지 않았고 그의 표준적인 제조방법 및 저장 방법 등도 확립되어 있지 못한 실정이다.

따라서 본 실험에서는 김치 중에서도 깍두기를 여러 조건으로 제조하여 숙성되는 동안의 특성을 알아보고 이를 활용하여 선도를 유지할 수 있는 저장방법을 확립하고자 하였다.

나. 장유류 보존제 개발

우리가 일상 조미료로 사용하는 간장은 유통 과정에서 장기 보존을 위하여 소르빈산 염류와 안식 향산류 등의 합성 방부제를 사용하고 있다.

이들 합성 방부제를 장기간 섭취하면 인체에 만성 해독 작용이 유발될 위험이 있을 뿐만 아니라 암을 일으키는 oncogene을 활성화시키는 carcinogen이라는 보고도 있다. 따라서 이를 기피하는 경향이 있으며 보건 당국도 식품 첨가물로서의 사용을 엄격히 제한하고 있다.

본 연구는 인체에 유해성이 없는 천연 재료를 이용하여 식품 보존제를 탐색하고 이를 이용하기 위한 단계로서 간장의 방부, 특히 간장의 맛과 향

취를 나쁘게 하는 산막성 유해 효모의 발육을 억제하기 위하여 다양한 천연물들을 간장에 첨가하여 항균성을 조사하고자 하였다.

다. 수삼 보존제 개발

수삼은 미생물에 의하여 손쉽게 부패를 일으켜 장기간 저장할 수 없기 때문에 아직도 수삼은 국내시장에 자율이 유통되지 못하고 있는 실정이다. 한국은 실제적으로 고려인삼의 종주국 임에도 불구하고 수삼의 유통을 위한 기반기술을 확보하지 못하여 현재 수삼의 외국수출은 전혀 생각을 할 수 없는 실정에 있다.

따라서 수삼 부패를 불러일으키는 부패 미생물을 먼저 분리하여 동정하고 이에 대한 특성을 조사하며 항균활성을 갖는 천연물을 탐색하여 이에 대한 천연 보존제를 개발하고자 하였다.

라. 빵 보존제 개발

오늘날 전세계 인구의 40% 이상이 밀을 주식으로 하고 있다. 우리는 쌀을 주식으로 하는 문화권에 속해 있어서 빵과 인연을 맺게 된지는 그리 오래되지 않았지만 아침 식사 등에서는 점차 주식의 개념으로 자리 잡아가고 있는 등 서서히 식생활의 변화가 일어나고 있다.

그러나 빵의 유통기한은 7일로 매우 짧아 생산지에서 만든 후 물류의 흐름에 따라 전국에 산재된 시골의 작은 상점까지 빵이 도착하는데는 3일 내지 5일이 걸리게 된다. 이로인해 하루 이틀 후에는 유통기간이 지나 폐기처분 되는 현실은 빵 유통기간을 연장하기 위한 기술개발을 필요로 한다.

따라서 본 연구에서는 빵 유통기간을 연장하기 위한 천연물 유래 보존제를 선정하고 이에 대한 연구를 하고자 하였다.

마. 주류 보존제 개발

우리의 한민족이 옛날부터 즐겨 마셨던 술은 그 종류가 대단히 많고, 양조방법이 다양하였다. 이 중에서도 고급 약주로서는 소곡주, 청명주, 삼해주, 하향주, 녹파주 등을 들 수 있다.

이 중 한산 소곡주는 충청남도 무형문화재로 지정되어 있는 우리 나라 전통술의 하나로서 화입과정을 거치지 않는다. 때문에 발효에 관여한 미생물이 그대로 존재하므로 자연상태로 보관하면 여름에는 10일, 겨울에는 한달 정도면 시어져서(산도 0.5이상) 상품 가치를 잃게 된다.

그러나 “약·탁주의 변패와 미생물과의 관계”에 관한 구체적인 연구가 그동안 많이 이루어지지 않았다.

따라서, 본 연구에서는 한산 소곡주를 시어지게 하는 원인균을 규명하고 이의 유통기간을 연장시킬 수 있는 천연물을 탐색하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제인 “농산물을 이용한 천연 보존제의 개발 및 산업화” 연구는 ① 김치 보존제 개발 ② 장유류 보존제 개발 ③ 수삼 보존제 개발 ④ 빵 보존제 개발 ⑤ 주류 보존제 개발 등의 세부과제로 나뉘어져 3년간의 연구를 수행하였다.

전반적인 연구개발 내용과 범위는 다음과 같다.

1. 약용식품 생리활성 자료를 분석하여 식용 가능한 한약재, 야생식물과 각종 농산물을 수집하였다.
2. 김치, 장류, 수삼, 빵, 약·탁주의 부패 균주를 분리하고 그 특성을 규명하여 각각의 부패 균주를 동정하고 그 특성을 탐색하였다.
3. 선별된 천연물로부터 각각의 부패균에 대하여 항균활성을 검색하여 강

한 항균력을 갖는 천연물을 선별하였다.

4. 선별된 천연물들을 메탄올 및 각각의 용매로 분획하여 각 획분별 항균력을 검색하고 보존제로서 가치 있다고 사려되는 천연물의 획분을 분리·정제하였다.

5. 분리·정제된 물질의 세포독성을 조사하고 활성성분의 화학구조를 결정하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

가. 김치 보존제 개발

본 연구에서는 김치 산업의 가장 시급한 연구 과제인 상온에서 김치의 산패를 억제하여 보존성을 증가시키는 방법을 모색하고자 하였다

포공영 클로로포름 분획 추출물은 대부분의 유산균과 그람 양성균인 *S. faecalis*에서는 40mg/ml 이상의 첨가시 강하게 나타났으며, 효모인 *S. cerevisiae*에서는 세균에 비해 항균력이 약하게 나타났다.

오미자 에탄올 추출물의 항균활성을 확인하고, 오미자 추출물에 함유된 유기산을 분석하여 오미자 추출물 및 유기산 첨가 김치의 제조로 김치의 이화학적 변화와 미생물학적 특성을 살펴본 결과는 다음과 같다.

오미자 ethanol 추출물이 항균활성을 보인 물질을 D101 column chromatography와 HPLC를 이용하여 분석한 결과 succinic acid, malic acid, acetic acid, oxalic acid등이 포함되어 있었고, 이중 가장 강한 항균활성을 보인 유기산은 succinic acid였다. 항균활성은 오미자 ethanol 추출물과 비슷한 저해효과를 보여 주었다.

연화와 직접적으로 관련된 효소로 생각되는 pectinase중 pectin의 α -1,4 결합을 절단하여 환원당을 생성하는 polygalacturonase에 대한 저해효과는 25 μ g/ml 첨가시에 66.7%의 저해율을 보였고, 30 μ g/ml 첨가시에

는 92.6%의 저해율을 보였다. pectine을 ester화 시키는 pectinesterase의 경우 15~30 $\mu\text{g/ml}$ 첨가시에 15-20%의 낮은 저해율을 보였다. 이로써 오미자 ethanol 추출물을 김치에 첨가시 기대되는 효과로는 미생물의 생육을 억제하여 산도증가를 막고, 경도를 유지시켜 김치 상품성의 증대가 기대된다.

나. 장류 보존제 개발

천연 추출물중 JIM효모인 *Hansenula anomala*에 항균력을 보인 시료는 마늘과 한약재인 황기, 황금, 백강잠이었고, CHS효모인 *Torulopsis maris*에는 황금과 일반 식용식물인 마늘, 냉이잎, 달래뿌리, 길경, 도라지였다. 그 중에서도 마늘이 CHS나 JIM효모에 모두 뛰어난 활성을 보여 간장부패균의 천연 항균제로서의 가능성을 제시하였다.

이것을 산업적으로 이용하면 간장의 유통기한의 연장 및 마늘의 독특한 향미성으로 인한 제품의 기능성증진 및 기호성의 향상을 꾀할 수 있으리라 여겨진다.

다. 수삼 보존제 개발

부패된 수삼에서 부패 미생물을 분리 동정하고 이에 대하여 항미생물 활성을 가진 생약재의 추출물 및 정유성분을 검색하며 수삼 부패 억제에 효과가 있는 천연재료를 선정하여 수삼의 장기저장에 생약추출물의 활용 방안을 모색하였다.

수삼부패와 관련된 미생물을 선발 및 동정한 결과 부패한 수삼으로부터 20종의 미생물을 분리하고 이중 수삼을 빨리 부패시키는 균주 6종(세균 5종, 사상균 1종)을 분리하였다. 수삼부패 세균은 *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas putida* biotype A, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae* 및 *Klebsiella pneumoniae*로 각각 동정되었으며, 수삼 부패사상균

은 *Rhizopus oryzae*로 동정 되었다. 이 중에서 수삼부패를 가장 빨리 일으키는 균주는 *Bacillus megaterium*이었다. 수삼부패 억제물질 선택하기 위하여 생약추출물과 정유 50여 종으로부터 訶子 및 五味子の 물 추출물과 甘菊, 漏蘆, 旋覆花, 紫草 및 地愈의 정유를 *Bacillus megaterium*에 대하여 항균활성이 강한 물질로 선발하였다. 이 중 訶子추출물과 五味子 추출물은 *Bacillus megaterium*의 생육을 크게 억제하였다.

결론적으로, 訶子 및 五味子の 물추출물과 甘菊, 漏蘆, 旋覆花, 紫草 및 地愈의 정유를 수삼부패 억제활성물질로 선발하였으며 수삼의 장기저장에 이들을 검토하는 것이 필요하다고 판단된다.

라. 빵 보존제 개발

본 연구에서는 빵 부패균의 분리, 동정과 부패를 억제하는 천연보존제의 탐색하였으며 빵 부패의 원인 곰팡이들에 대해 항균활성을 갖는 천연물을 탐색한 결과 *Aspergillus niger*에 대해서는 동백꽃씨가 가장 강한 항균력을 나타내었으며 황련, 닥나무와 알로에도 강한 항균력을 나타내었다. 마늘, 생강, 금은화등도 좋은 항균활성을 보였다.

동백꽃씨는 분리된 진균류에 대하여 가장 높은 항균력을 보였으나 정제를 위한 대량으로 원료의 확보가 어려워 황련을 대상으로 물질을 정제하고 구조를 확인하였다. 황련의 대표적 화합물인 berberine의 ^1H , ^{13}C spectrum과 잘 일치하여 berberine임을 뒷받침하였다.

마. 술 보존제 개발

한국 전통 민속주의 한 종류인 한산 소곡주는 여름철에는 저장 도중 급속히 시어져 상품으로서의 가치를 잃게 되는 큰 문제점에 있다.

소곡주 시어짐의 원인인 *Lactobacillus* 속 세균에 대해서 강한 항균활

성이 있는 여러 천연물 중의 하나인 오미자를 소곡주에 첨가했을 때 소곡주의 산도 및 산도의 증가율이 다른 천연물에 비해 좋은 효과가 있었다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구의 내용인 ① 김치 보존제 개발 ② 장유류 보존제 개발 ③ 수삼 보존제 개발 ④ 빵 보존제 개발 ⑤ 주류 보존제 개발 등 다섯 과제중 장류 보존제, 수삼보존제는 활용할 가치가 충분하다고 사료되며, 빵류에 대한 보존제 연구 결과는 실증연구를 수반한 후 상품화 가치가 충분하다고 사려된다.

아울러 부록으로 첨부한 *E. coli* 0157:H7에 대한 항균제 연구도 실제 활용 가치가 있다고 사료되며, 충치 억제제 연구는 이미 특허를 기업체에서 신청하였으므로 머지 않아 상품화 될 것으로 예측된다.

Summary

I. Title

Development of natural food preservatives from agricultural products

II. Significance and purpose of research and development

1. Purpose of research and development

This studies are intended to develop the new food preservatives from the natural product including medicinal plants, and agricultural wastes.

Almost all the preservatives used for food industry have been imported from other countries rather than national manufacturing. If natural preservatives were developed from domestic agricultural product, a lot of dollars for the imports could be saved. Additionally new industry for the manufacturing of food preservatives could be constructed for this country.

Therefore, if natural preservatives were developed through these studies, synthetic preservatives causing in many health problems can be replaced with natural preservatives. Besides patents on this studies could be acquired domestically as well as internationally, and dollars for purchasing synthetic preservatives through trade can be saved. This idea finally might activate domestic industry, even though this country were encountered WTO and UR which make seriously

difficult situation to the farmer.

2. Significance of research and development

The development of noble preservatives originated from natural product is very important in terms of improving the level of agricultural productivity through the supply and production of raw materials, as well as cultivation of international competition by the product development.

It could be said that national competitiveness are dependent on the level of domestic industry. Also industry's competitiveness is depended on the new product developments and endless product improvement.

(1) Development of kimchi preservatives

There are many reasons korean kimchi is recognized well in the world. The first thing would be a unique taste and flavor from the many fresh raw materials added, as well as *Lactobacillus* spp resources, which is good to human intestines providing being comfortable and various vitamins.

The early studies on Korean Kimchi are quite limited to only on manufacturing, recipe formulations, quality evaluation, micro floral changes during the fermentation, and a little preservation ways of the cabbage kimchi. But radish kimchi was not studied at all on its standard method of making, quality control, and preservation technology so far.

Therefore, this study was carried out to investigate

characteristics during fermentation in radish kimchi and finally provided the ways of extending self-life.

(2) Development of salted soy sauce(Ganjang) preservatives

Synthetic preservatives like salts of sorbate and benzoic acid derivatives have been used in soy sauce manufacturing for storage at long time circulating process(this period was usually one year).

If this synthetic preservatives were dieted to the peoples for a long time, it could be highly exposed to potential carcinogen, as well as it was known to activate various oncogene that known to cause cancer. Therefore, use of synthetic preservatives as food additives must be avoided and limited strictly, also even the health authorities administrate very tightly the amount of use and the place of use.

In this study, we have screened food preservatives from natural materials which have been known to nontoxic to our health, and searched antimicrobial activity in soy sauce to inhibit growth of harmful yeast that provide bad taste and flavor of soy sauce.

(3) Development of preservatives for ginseng root

Ginseng roots are used to be decayed by the various microbes easily so that it is very difficult to the marketing on time. Although Korea is actually a main country of Korea Ginseng, she has no essential high techniques for marketing of raw ginseng (so called Susam, water ginseng).

In this study, search and development of natural substances providing antimicrobial activity against causing fresh raw ginseng rotting were investigated.

(4) Development of bread preservatives

Nowadays, 40% of the world population used to take wheat as their food. As the mainly traditional reasons, the rice has been the staple food of these nation's people for a long history. The food culture of bread in this country, comparatively, is rather short, however it has gradually served as more and more people's breakfast.

We know the bread's shelf life is generally very short (about 7 days). The transportation time distributed over the country from bread manufacturer to sale stores usually took 3~5 days, therefore after 2 or 3 days later of distribution, it's self life will be easily expired.

In the view of this fact, to develop the techniques for elongating the bread's shelf life is seriously needed.

To meet this requirement, we set out to do study on the natural material for elongation shelf life of bread.

(5) Development of rice wine preservatives

So many kinds of various wine and spirits have been served for the Korean folks. Among those wine and spirits, Sogokju, Chungmyungju, Smhaeju, Hahyungju, and Nokpaju were counted to the representatives.

Sogokju is one of the representative wine is appointed to formless

curtural assets. Processing to prepare this rice wine do not force to heat treatment due to classical manufacturing manners. In this main reason, so many bacteria are still alive in its bottle. This cause in easy souring during the time of distribution from market to customer (for the souring, around 10 days in summer, or 30 day in the winter).

Unfortunately "the relationships between souring of rice wine and microorganism" are not completely elucidated so far. This studies are intended to identify the souring phenomenon causing organisms, and screen out natural compounds revealing the antimicrobial activity against microorganism responsible for the wind souring.

III. Scope and range of research and development

This title "Development of natural preservatives from agricultural products" are carried out three years and divided to five subsection as follows:

- ① Development of Kimchi(fermented vegetable with Chinese cabbage) preservatives.
- ② Development of soy source(fermented source with soybean) preservatives.
- ③ Development of raw ginseng root(so called Susam) preservatives.
- ④ Development of bread(factory manufactured) preservatives.
- ⑤ Development of rice wine(mainly focused work with Sogokju) preservatives

Overall scope and range of research and developments could be summarized as follows:

1. By analyzing various classical archives including Bonchogangmok

(editor Lee sijeon, Chinese), and Dongwibogam (editor Herjoon, Korean of Yee dynasty), various medicinal plants and natural products are collected from the across the country.

2. Various strains responsible for the putrefying(or souring, or rotting etc.) Kimchi, soy sources, raw ginseng, Factory manufactured bread, and rice wine were screened from its resources, and characterized to understand its putrefying properties.

3. Natural preservatives which show antibiotal activities against each putrefying microorganism selected the each purpose

4. Active fractions showing specific antibiotal activities were further purified using such various techniques as preparative TLC, HPLC, Ion exchange chromatography, elucidated its organic structures for the valuable one.

5. The selected compounds are assayed for the toxicity

IV. Results and proposal for the practical use

(1) Development of kimchi preservatives

These attempts are carried out to find the ways of extending shelf-life of easily soured Radish kimchi in room temperature.

The Chloroform fraction of Pugonyoung revealed relatively high antibiotal activities against almost all lactic acid bacteria, and *S. faecalis* when addid more than 40mg/ml. But *S. cerevisiae* showed the rather weak inhibition in the this fraction.

Schizandra chinensis has been used to chinese medicine of popular remedy for a long time. This study have been carried out to screen of useful components, physiological study, and antimicrobial activity. It has been reported that lignans of *Schizandra chinensis* have antimicrobial and phygiological activity.

This study mainly focused on to investigate the effects of *Schizandra chinensis* on the growth of a bacterium, CS6 which was isolated from Kimchi. CS6 was identified to *Lactobacillus plantarum* that causes acidification of Kimchi. The ethanolic extract of *Schizandra chinensis*(EES) inhibited the growth of *L. plantarum*. Minimum lethal concentration of EES on *L. plantarum* was 62.5 mg/ml. In broth culture, 5 µg/ml of EES completely inhibited the growth of *L. plantarum* during fermentation.

It have been considered that pectinase directly related to the softness of Kimchi's texture. Addition of EES also inhibited polygalacturonase, and pectineserase. Whereas EES did not significantly suppressed the activity of pectinesterase.

In conclusion, the present experiment demonstrated that EES inhibited the growth of *L. plantarum*, and various enzyme activity. EES-containing Kimchi was sustained the hardness, and initial acidity during fermentation. EES was considered as the possible additive of Kimchi and EES added in Kimchi increase the quality, and storage period of Kimchi.

(2) Development of salted soy sauce(Ganjang) preservatives

We have screened out garlic, Whanggeum, Backgngjam, kilkyung, doragy, etc as food preservatives to inhibit growth of harmful yeast, *Hansenula anomala* and *Torulopsis maris*, that provide bad taste and flavor of soy sauce which was isolated

from soy sauce.

Garlic was finally selected as the best material so that it will provide to extend preservation period for the soy sources.

(3) Development of preservatives for ginseng root

Ginseng roots used to decayed by the various microbes easily so that it is very difficult to the marketing on time without another trial.

In this study, Gaja(訶子), Omija(五味子), and Gamgook providing antimicrobial activity against causing fresh raw ginseng rotting, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas putida* biotype A, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae*, and *Klebsiella pneumoniae*, were screened.

The extract of Gaja and Omija, respectively, showed the most strong antimicrobial activity against *Bacillus megaterium*, which are considered the most responsible organism to decay

(4) Development of bread preservatives

The most frequently isolated strain from the rotten bread was the *Aspergillus niger*, and *Aspergillus oryzae*, and *Penicillium* sp.

With these two fungi, Natural preservatives to extend shelf life of bread are screened finally to seed of Dongback flower and Whangyeon. The active component was elucidated to berberine by the jointing interpretation of ^1H , ^{13}C spectrum from Whangyeon.

(5) Development of rice wine preservatives

Because many of the rice wine have been encountered the short shelf life especially in the summer season, it is very important to elucidate the souring phenomenons in model system of Sogokju, representative Korean traditional rice wine.

It was concluded that Omija showed high growth inhibition to the *Lactobacillus* spp. causing in souring phenomenon. When Omija was added in the rice wine of around 16% alcohol concentration, the shelf life was extended to two time than that of control.

여 백

CONTENTS

Part1. Searching for natural herbs to extend Kacdugi's shelf-life

Chapter 1 Introduction	39
Chapter 2 Research method	43
Section 1 Kacdugi's short & long storage properties of herbs and vegetables' extract by water	43
section 2 effect of Kacdugi's ripening by spicy ingridients	45
section 3 effect of antimicrobs and Kacdugi's ripening to Kacdugi's saprogenous <i>bacillus</i> by Omiza & Baekgangzam extracts	48
1. Kacdugi's manufacturing	48
2. pH and total acidity	50
3. total micribs number	51
4. property of Texture	51
5. color index	51
6. antimicrobial test	52
7. invert sugar content	52
section 4 effect of Kimch Lactobaciilus and inhibition yeast by herbs extract	52
1. materials	52
2. Kacdugi's manufacturing	53

3. addition manufacturing	53
4. pH and total acidity	53
5. hardness	54
6. used microbes and medium	56
7. extraction method	56
8. partition of extracts	57
9. Soluble silid content	57
10. antimicrobial test	57
11. heat stability of antimicrobial material	59
12. pH stability of antimicrobial material	60
13. growth rate and pH	61
14. MIC (minium inhibitory concentration)	61
15. antimicrobial effect by each chloroform concentrative extracts	61
16. antimicrobial activity by patition extracts	62
Chapter 3 Results	63
Section 1 Kacdugi's short & long storage properties of herbs and vegetables' extract by water	63
1. properties of short storage	63
2. properties of long storage	75
Section 2 effect of Kacdugi's ripening by spicy ingridients	85
1. red pepper	86
2. galic	87
3. green onion	89

4. salt	89
5. water	90
6. abstract	90
section 3 effect of antimicrobs and Kacdugi's ripening to Kacdugi's saprogenous <i>bacillus</i> by Omiza & Baekgangzam extracts	91
1. effect of antimicrobs and Kacdugi's ripening to Kacdugi's saprogenous <i>bacillus</i> by& Baekgangzam extracts	91
2. effect of antimicrobs and Kacdugi's ripening to Kacdugi's saprogenous <i>bacillus</i> <u>by Omiza extracts</u>	92
3. abstract	93
section 4 effect of Kimch Lactobacillus and inhibition yeast by herbs extract	95
1. Change of pH and acidity during Kacdugi's ripening	95
2. effect of Kacdugi's ripening by natural herbs	95
3. antimicrobial test of extract by water	99
4. heat stability of antimicrobial marerials	101
5. pH stability of antimicrobial material	102
6. growth rate and pH	103
7. MIC (minium inhibitary concentration)	105
8. antimicrobial effect by each chloroform concent rative extracts	105

9. antimicrobial activity by patition extracts	105
10. abstract	111
Chapter 4 Reference	113

Part 2. Development of soy souce preservatives

Chapter 1 Introduction	121
Chapter 2 Materials and Methods	124
Section 1. Materials	124
1. Culture and Identification of strain	124
2. Natural and others materials	124
Section 2. Methods	124
1. Isolation of expansive strain	124
2. Morphological identification by microscope	125
3. Biochemytrical identification by API kit	125
4. Extraction of Oleoresine	126
5. Experiments of anti-microbial	126
Chapter 3. Result	128
Section 1. anti-microbial activity assay of natural materials	128
1. Biochemystrical identification of soy souce yeast	128
2. Result of expansion test	131
3. Extract of Oleoresine	132
4. Experiments of anti-microbial	133
Chapter 3. References	137

Part 3. Reserch of ginseng preservatives

Chapter 1. Introduction	141
Chapter 2. Material and methods	143
Section 1 Material	143
Section 2 Methods	145
1. Isolation and identification of rotten wet ginseng microbes	145
2. Antimicrobial test	145
3. Inhibition of wet ginseng's rottenness	145
Chapter 3 Results & discussion	147
Section 1 Results	147
1. rotten wet Genseng microbs	147
2. Identification of rotten wet Genseng microbs	147
3. antimicrobial test of rotten wet Genseng microbs	148
4. Isolation of antimicrobial substances in Gaja extract	151
5. antimicrobial test of rotten wet Genseng microbs bynatural herbs' essential	151
6. Inhibitary effect of rotten wet Genseng microbs in Gaja extract	157
Section 2 Abstract	158
Chpter 4 References	159

part 4. Developement of bread preservatives.

Chapter 1. Introduction	163
Chapter 2. Material and methods	164
Section 1 Material	164
Section 2 Methods	164
1. Isolation and identification of rotten bread	
microbes	164
2. Antifungal test	165
Chapter 3. Results	167
Section 1. Isolation and identification of rotten bread	
microbes	167
Section 2. Screening of antimicrobial natural preservativ-	
es	169
Section 3. Isolation and Identification of Coptis Japonica	
Makino	175
Chapter 4. References	175

Part 5. Development of alcohol preservation

Chapter 1 Introduction	179
Chapter 2 Methods	181
Section 1 Han-san sogokju	181
Section 2 Screening of natural materials preservitives	182
Chapter 3 Results	184
Section 1 Han-san sogokju	184
1. Isolation and identification of microorganisms which	
exsit in Sogokju	184

2. Change of pH and acid composition of Sogokju ...	185
3. Change of microorganisms distribution in Sogokju as time course	186
4. Organic acid composition of sogokju and soured sogokju	187
5. Growth stop temperature of souring microorganism preserving period of sogokju's quality in stop temperature	188
Section 2. natural preservatives	190
1. Activity screening against sogokju microorganism and acidity observation	190
2. Change of acidity in sogokju as omisa addition ...	191
Section 3. Passibility of application as natural preservative of omisa	193
Chapter 4. References	194
APPENDIX	195

여 백

목 차

제 1 세부과제. 깍두기 저장성연장을 위한 식물성 천연물의 탐색

제 1 장 서론	39
제 2 장 연구방법	43
제 1 절 한약재 및 채소류 물추출물 첨가 깍두기의 단기 및 장 기 저장 특성	43
제 2 절 양념류가 깍두기 속성에 미치는 영향	45
제 3 절 오미자 및 백강잠 추출물의 깍두기 부패균에 대한 항균 성 및 깍두기 속성에 미치는 영향	48
1. 깍두기의 제조	48
2. pH 및 총산도의 측정	50
3. 총균수의 측정	51
4. Texture 특성	51
5. 색도 측정	51
6. 항균력 측정	52
7. 환원당 함량 측정	52
제 4 절 한약재 분획추출물에 의한 김치 유산균 및 효모의 저해 효과	52
1. 실험재료	52
2. 깍두기의 제조	53
3. 첨가물의 제조	53
4. pH 및 총산도의 측정	53
5. 경도의 측정	54

6. 사용균주 및 배지	56
7. 추출 방법	56
8. 추출물의 분획	57
9. Soluble silid의 함량 측정	57
10. 항균력 측정	57
11. 항균성 물질의 열안정성 측정	59
12. 항균성 물질의 pH안정성 측정	60
13. 균 생육도 및 pH 측정	61
14. 최소 저해농도 측정	61
15. 클로로포름 추출물농도별 항균효과 측정	61
16. 추출물의 분획별 항균성과 항미생물성 활성 측정	62
제 3 장 연구결과	63
제 1 절 한약재 및 채소류 물추출물 첨가 깎두기의 단기 및 장 기 저장 특성	63
1. 단기저장시의 특성	63
2. 장기저장의 특성	75
제 2 절 양념류가 깎두기 숙성에 미치는 영향	85
1. 고추가루	86
2. 마늘	87
3. 파	89
4. 식염	89
5. 물	90
6. 요약	90
제 3 절 오미자 및 백강잠 추출물의 깎두기 부패균에 대한 항균 성 및 깎두기 숙성에 미치는 영향	91

1. 백강잠 추출물의 깍두기 부패균에 대한 항균성 및 깍두기 숙성에 미치는 영향	91
2. 오미자 추출물의 깍두기 부패균에 대한 항균성 및 깍두기 숙성에 미치는 영향	92
3. 요약	93
제 4 절 한약재 분획추출물에 의한 김치 유산균 및 효모의 저 해 효과	95
1. 깍두기 숙성중의 pH 및 산도의 변화	95
2. 깍두기 숙성에 미치는 식물성 천연물의 영향	95
3. 물 추출물의 항균성 검색	99
4. 항균성 물질의 열안정성	101
5. 항균성 물질의 pH 안정성	102
6. 균의 생장 곡선 및 pH	103
7. 최소 저해농도 측정	105
8. 클로로포름 추출물의 농도별 항균효과	105
9. 추출물의 분획별 항균성 및 항미생물 활성	105
10. 요약	111
제 4 장 참고문헌	113

제 2 세부과제. 장류보존제 연구

제 1 장 서론	121
제 1 장 실험재료 및 방법	124
제 1 절 실험재료	124
1. 균주배양 및 균주의 동정	124
2. 천연물 및 기타재료	124

제 2 절 실험방법	124
1. 팽창균주의 순수분리	124
2. 현미경 관찰을 통한 형태학적 동정	125
3. API kit를 이용한 생화학적 동정	125
4. Oleoresine의 추출	126
5. 항균력 실험	126
제 3 장 연구결과	128
제 1 절 천연물의 항균활성 실험	128
1. 간장 효모의 생화학적 동정	128
2. 팽창 Test의 결과	131
3. Oleoresin의 추출	132
4. Paper disc법을 이용한 항균실험	133
제 4 장 참고문헌	137

제 3 세부과제. 수삼보존제 연구

제 1 장 서론	141
제 1 장 재료 및 방법	143
제 1 절 실험재료	143
제 2 절 실험방법	145
1. 수삼 부패균의 분리 및 동정	145
2. 항균활성의 검색	145
3. 수삼부패의 억제	145
제 3 장 실험 결과 및 고찰	147
제 1 절 실험결과	147

1. 수삼부패균의 분리	147
2. 수삼부패균의 동정	147
3. 수삼부패균에대한 항균활성	148
4. 訶子 추출물내의 항미생물 물질의 분리	151
5. 생약정유의 수삼 부패균주에 대한 항균활성	151
6. 訶子 추출물의 수삼 부패 억제효과	157
제 2 절 요약	158
제 4 장 참고문헌	159

제 4 세부과제. 빵보존제 개발

제 1 장 서론	163
제 2 장 실험재료 및 방법	164
제 1 절 실험재료	164
제 2 절 실험방법	164
1. 빵 부패균의 분리, 동정	164
2. 곰팡이에 대한 항균력 측정	165
제 3 장 실험결과	167
제 1 절 빵 부패균의 분리 및 동정	167
제 2 절 빵 부패를 저해하는 천연 보존제의 탐색	169
제 3 절 황련의 분리, 정제	175
제 4 장 참고문헌	175

제 5 세부과제. 주류 보존제 연구

제 1 장 서론	179
제 2 장 연구방법	181
제 1 절 한산소곡주	181
제 2 절 천연물 보존제의 탐색	182
제 3 장 연구결과	184
제 1 절 한산 소곡주	184
1. 소곡주에 존재하는 부패균 분리 및 동정	184
2. 시간경과에 따른 소곡주의 pH와 산의 함량 변화	185
3. 시간 경과에 따른 소곡주의 미생물 군총 변화	186
4. 소곡주와 시어진 소곡주의 유기산 조성	187
5. 시어짐의 원인균 생육 정지 온도와 이 온도에서 소곡주 품질이 유지되는 기간	188
제 2 절 천연물 보존제	190
1. 소곡주 부패균에 대한 항균활성 검색 및 산도 관찰	190
2. 오미자 첨가시 소곡주의 산도 변화	191
제 3 절 오미자의 천연보존제로서 사용 가능성	193
제 4 장. 참고문헌	194
부 록	195

제 1 세부과제. 깎두기의 저장성 연장을
위한 식물성 天然物의 탐색

여 백

제 1 세부과제, 깍두기의 저장성 연장을 위한 식물성 天然物の 탐색

제 1 장 서 론

김치는 장, 국과 함께 일상식의 기본이 되는 우리 나라 고유의 전통 발효 음식으로서 채소를 소금에 절여서 먹던 것이 그 시작으로 알려져 있으며⁽¹⁾, 우리 식생활에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 또한 발효 과정에서 생성된 유기산, 유리아미노산 등과 조미 향신료의 향미가 조화를 이루어 특유한 맛과 향을 지니며 우수한 영양 성분이 다량 함유되어 있어 소화력이 높아 건강 식품으로서의 가치를 지니고 있다.

김치의 생산 및 소비 양상은 과거에는 가정에서 제조하여 소비되어 왔으나, 오늘날에는 공장에서 제조되어 소비되는 추세이다. 김치 제조가 산업화되면서 가장 문제시 되는 점은 김치 품질의 균일화와 신선도 유지 기간의 연장이다.

우리 나라에서 생산·소비되는 무의 양은 채소 가운데 배추 다음인 2위를 차지하고 있으며⁽²⁴⁾, 무는 김치, 단무지, 무말랭이 등으로 가공되어 이용되고 있다. 특히 무 김치 중에서는 제조가 용이한 깍두기가 대부분을 차지한다. 깍두기에 대한 연구는 주로 깍두기의 향기 성분^(25~26), 유기산^(25~28), 질감 특성^(27~28) 등이 있으며, 깍두기의 저장성 연장에 관한 연구는 깍두기의 연화 방지를 위한 염혼합물의 첨가, 가열처리 등에 의한 연구외에는 찾아보기 어렵다. 김치는 주재료에 따라서 그 특성이 매우 다를 뿐 아니라 깍두기는 주재료가 무이며, 배추김치에 비해 제조가 간단하고 소비량

도 많다.

현재까지 김치의 선도유지를 위해 수행된 방법은 크게 3 가지로 분류할 수 있다. 첫째, 물리적인 처리를 한 경우로 방사선 (radurization) 조사 (6-7), 감압처리(8), 산소량·숙성온도의 조절(9-11), 가열살균(12) 등이 있다. 둘째는 김치제조시 첨가물을 넣는 방법으로 sorbic acid, sodium dehydroacetate와 같은 방부제의 첨가(13-14), pH 조절을 위한 완충제 및 염혼합물의 첨가(15-18), 김치 발효·숙성·변패과정에 관여하는 미생물의 생육조절을 위한 천연물의 첨가(19-22), 젓갈과 같은 김치 부재료를 조절하여 저장기간을 연장시키려는 연구(23-24) 등을 들 수 있으며 세째는 포장기법에 관한 연구로 포장방법의 변화와 통조림의 제조에 관한 연구 등이 있다(13,25-26). 이상의 방법들은 유용한 효과가 있을 것으로 보고되었으나 각기 지니고 있는 단점들 때문에 실용화되고 있지 못하다. 즉, 방사선 조사는 pH, 산도 면에서는 우수한 결과를 나타내었으나 색을 변하게 하고, 방부제의 첨가는 소비자가 상당히 기피하는 경향이 있고, 완충제나 염혼합물은 향미에 바람직하지 못한 영향을 미치며 가열살균은 김치의 장기저장을 위한 효율적인 방법의 하나이나 가열에 의해 조직이 연화되는 단점을 갖고 있다. 따라서 상기 방법들은 김치의 대량생산·유통에서 유용하게 이용되지 못하고 있는 실정이다.

김치의 품질 평가를 위해 pH, 산도, 생균수의 측정이 수행되고 있으나 김치처럼 상식하는 경우에는 기계적 측정보다 관능적 품질의 평가가 보다 중요할 것으로 사료된다. 김치의 관능적 품질 요소로는 외관, 맛과 냄새 및 texture가 중요하며 이들은 김치의 신선미를 좌우하는 중요한 요소이다(3). Texture는 향미성분과 함께 김치의 전반적인 맛에 많은 영향을 미치는데 숙성적기가 지나면 상당히 물러진다. 이는 호기성 산막 미생물이 분비하는 polygalacturonase의 활성이 증가되기 때문으로 보고되어 있다

(4). 김치의 texture를 표현하는 주요 용어에는 경도 (hardness), 깨어지는 성질 (brittleness, crispiness), 씹히는 성질 (chewiness) 및 입자의 배열형태 등이 있다(5).

김치는 품질보존에 많은 어려움이 있어 보존법의 연구개발에 국가적 관심이 기울어지고 있으나 아직 저장중 산패와 연부방지를 위한 효과적인 해결방안을 얻지 못하고 있다. 따라서 본 연구에서는 김치산업의 가장 시급한 연구과제인 상온에서 김치의 산패를 억제하여 보존성을 증가시키는 방법을 모색하고자 하였다. 무를 주재료로 하여 일반적으로 사용되고 있는 양념류인 고추, 파, 마늘, 생강, 설탕을 첨가하였고 김치의 선도를 연장할 것으로 사료되는 식물성 천연물을 깍두기 제조시에 첨가하여 김치숙성도와 가장 밀접한 관계가 있는 pH, 총산도 및 생균수의 변화를 측정하였고 깍두기의 관능특성과 밀접한 관련이 있는 texture를 측정하고자 물성분석을 수행하였으며 깍두기의 색변화를 경시적으로 측정하여 천연재료 첨가에 의한 김치의 보존성 향상을 검토하였다.

현재 우리나라 식품위생법에서는 sorbic acid, benzoic acid등 총 13종의 화학합성품이 보존료로 사용이 허가되어 종류별로 사용기준이 설정되어 있으나, 실제로 이들 보존료의 사용기준이 제대로 지켜지지 않는 경우도 허다하다. 또한, 식품의 보존성 증대를 위한 천연항균제는 대부분이 저급 지방산 에스테르, 유기산, 글리신, 에틸알콜 등을 중심으로 한 혼합물이며 합성보존료에 비해 그 효과가 떨어진다. 또한 생약제 성분, 향신료 정유 및 식용 식물체 추출물은 김치 맛 자체에 영향을 주거나, 항균활성이 미약하기 때문에 실용화가 어려운 실정이며, 이들 보존료들이 지속적으로 체내에 축적될 경우에 만성독성, 발암성, 돌연변이 유발성 등의 우려가 있어 소비자들은 이들 식품첨가물의 사용을 배제하려는 경향이 있으나, 식품의 다양성, 품질보존성, 경제성등의 문제가 수반되기 때문에 식품보존료의 사

용을 배제할 수 없는 실정이므로 인공합성 보존료 대신 인체에 해가 없는 식용 식물 및 생약 등의 천연물로부터 특정성분을 추출하여 천연식품 보존제를 개발하려는 시도가 이루어지고 있다.⁽¹⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 김치 산업의 가장 시급한 연구 과제인 상온에서 김치의 산패를 억제하여 보존성을 증가시키는 방법을 모색하고자 약용식물로 이용되는 식물성 천연물의 열수추출물의 첨가가 깍두기의 저장성을 연장시킬 수 있는 생약재를 예비 검색하여 우수한 효과가 인정되는 식물 추출물을 대상으로 이들을 각 용매 별로 분획하여 김치 유산균 및 산막형성 효모의 항균성 저해 효과를 알아 보고자 하였다

제 2 장 연구방법

제 1 절 한약재 및 채소류 물추출물 첨가 깍두기의 단기 및 장기 저장 특성

1. 실험재료

주재료인 무와 파, 마늘, 생강, 고추 가루 및 채소류는 1997년 3월 대전 오정동 농수산물 시장에서 구입하였고 소금은 정제염인 한주 소금을, 설탕은 백설탕 (제일제당)을 사용하였다. 약재는 단양의 약재 시장에서 구입하였다. NaOH는 Juncei 사 제품이었고 phenolphthalein은 Sigma 사 제품이었으며 그외의 모든 시약은 GR 급을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 깍두기의 제조

무를 깨끗이 씻어 뿌리와 머리 부분에서 각 5 cm 절단한 중간 부위 무를 사용하였다. 2×2×2 cm 크기로 썬 무 50 g에 고추 가루 1.17 g, 파 1.67 g, 마늘 0.84 g, 생강 0.25 g, 설탕 1.17 g, 물 또는 물추출물 10 mL를 polyethylene bag에 넣고 혼합하여 공기를 제거하고 밀봉하여 20±1℃의 항온조 (Low Temp. Incubator LTI-1000SD, Eyla)에 15일간 저장하면서 경시적으로 채취하여 실험에 사용하였다.

나. 첨가물의 제조

첨가물은 통풍이 잘 되는 용달에서 건조한 후 곱게 마쇄 (Food mixer FM-700W, 한일)하여 체 (Standard Testing Sieve, Aperture 250 μm, No.

60)에 쳐서 입자를 추출 (Shaking Incubator, VS-8480, SR)한 후 여과 (Toyo No.2)한 상등액을 사용하였다.

다. pH 및 총산도의 측정

pH는 pH meter (Hanna Instruments 8521)를 사용하여 각두기 국물의 pH를 측정하였다. 산도는 각두기와 국물을 마쇄하여 여과한 후 여액을 사용하였으며 여액의 붉은색은 활성탄에 흡착시켜 제거하였다. 지시약으로 0.1% phenolphthalein 용액을 사용하여 분홍색으로 변하는 점까지 적정한 후 소비된 1.0 N NaOH 용액을 총산도 (Lactic acid, %)로 나타내었다.

라. 경도 (Hardness)의 측정

각두기 및 생물의 경도 (Hardness)는 Texture Analyser (XR, RA Dimension, Stable Micro Systems, Version 3.7)를 이용하여 TPA (Texture Profile Analysis)를 측정하여 구하였으며 TPA 측정시의 조작 조건은 Table 1과 같다. 평가된 경도는 Texture Analyser로 시료를 2회 연속적으로 침입시켰을 때 얻어지는 force - time curve의 first bite 중에서 최대 peak의 높이로 하였다.

Table 1. Condition of texture analyzer for texture profile analysis.

Sample rate	400 pps
Force threshold	20 g
Distance threshold	0.5 mm
Contact area	38.47 mm ²
Contact force	50 g
Pre test speed	10 mm/sec
Post test speed	10 mm/sec
Test speed	10 mm/sec
Strain	75 %
Time	0.5 sec
Trigger type	Auto @ 20 g

마. 유산균수의 측정

각두기 발효 과정에 영향을 미치는 유산균 수를 측정하기 위해 각두기 국물을 여과한 후 여액 1 mL에 멸균중류수를 첨가하여 단계 농도로 희석한 후 100 μ 를 취하여 유산균 분리용 배지인 MRS 배지 (de Man, Rogosa & Sharpe agar)에 접종하고 유리 막대로 도말하였다. 시료를 도말한 배지를 30℃의 배양기 (Incubator, VS-1203 P3, Vision Sci. Co.)에서 24 시간 동안 배양한 후 나타난 colony를 plate agar를 사용하여 계수하였다.

제 2 절 양념류가 각두기 숙성에 미치는 영향

1. 실험재료

주재료인 무와 파, 마늘, 생강, 고추가루 및 채소류는 1997년 3월 대전 오정동 농수산물 시장에서 구입하였고 소금은 정제염인 한주소금을, 설탕은 백설탕 (제일제당)을 사용하였다. 약재는 단양의 약재시장에 구입하였고 맥반석은 한국바이오맥반석 (주)에서 기증받았다. 품종이 각두기 숙성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 계절별, 품종별 무는 흥농종묘(조치원)에서 분양받은 대형무로써, 봄무는 1997년 4월말에 수확한 백광, 하우스봄무, 천하대형, 91144 및 95307의 5품종, 여름무는 1997년 7월에 강원도 고랭지에서 재배하여 수확한 관동, 대진, 대부령, 92343, 95307의 5품종, 가을무는 1996년 11월말에 수확한 백광, 하우스, 태백, 청운, 백자, 대진 및 대부령의 7품종을 사용하였다. NaOH는 Juncei 사 제품이었고 phenolphthalein은 Sigma 사 제품이었으며 그외의 시약은 GR 급을 사용하였다.

2. 실험방법

가. 깻두기의 제조

1) 대조군 깻두기의 제조

무를 깨끗이 씻어 잔뿌리를 제거한 후 중간 부분만 2×2×2cm 크기로 썰어 50g씩 나누어 고춧가루 1.17g, 파 1.67g, 마늘 0.84g, 생강 0.25g, 소금 1g, 물 10mL을 polyethylene bag에 넣고 버무려 섞은 뒤 공기를 제거하고 밀봉하여 20±0.1℃의 항온기(Low Temp incubator, LTI-1000SD, Eyela)에 20일간 저장하면서 경시적으로 채취하여 실험에 사용하였다.

2) 양념 첨가 깻두기의 제조

물, 소금, 고춧가루+소금, 소금+마늘, 소금+생강, 소금+파를 무2×2×2cm 크기로 50g에 각각 첨가해 polyethylene bag에 넣고, 버무려 섞은 뒤, 공기를 제거하고 밀봉하여 20±0.1℃의 항온기(Low Temp incubator, LTI-1000SD, Eyela)에 저장하면서 경시적으로 채취하여 실험에 사용하였다.

나. 첨가물의 제조

첨가물은 통풍이 잘 되는 용달에서 건조한 후에 곱게 마쇄 (Food mixer FM-700W, HANIL)하여 체 (Standard Testing Sieve, Aperture 250 μm, No. 60)에 쳐서 입자를 고르게 하였다. 첨가물 10g (건조중량)에 물 100ml를 넣고 60℃에서 48시간 동안 shaking (Shaking incubator, VS-8480, SR)한 물추출액을 제조하여 상징액 10ml를 깻두기 제조시 첨가하였다. 또한, 오미자와 백강잠의 시료 추출물은 삼각 플라스크에 시료와 95%에탄올을 1:9의 비율로 각각 첨가하여 30℃에서 24시간 추출한후 추출액을 멸균여과지로 여과하고 감압증발 농축기(EYELA, TOKYO RIKAKIKAI CO., LTD, A-39, Tokyo, Japan)로 최초량의 1/9로 농축하여 membrane filter(Whatman 0.2

μm)로 여과한 액을 사용하였다.

다. pH 및 총산도의 측정

pH는 pH meter (HANNA Instruments 8521)를 사용하여 깎두기 국물의 pH를 측정하였다. 산도는 깎두기와 국물을 마쇄하여 여과한 후 여액을 사용하였으며 여액의 붉은색은 활성탄에 흡착시켜 제거하였다. 지시약으로 0.1% phenolphthalein 용액을 사용하여 분홍색으로 변하는 점까지 적정한 후 소비된 0.1 N NaOH 용액을 총산도 (Lactic acid, %)로 나타내었다.

라. 총균수의 측정

깎두기 발효과정에 영향을 미치는 미생물의 총균수를 측정하기 위해 평판배양법을 사용하였다. 깎두기 국물을 여과하여 여액 1ml를 멸균증류수를 이용하여 단계농도로 희석한 후 0.1ml를 취하여 일반세균 분리용 배지인 영양배지(NA)와 유산균 분리용 배지인 MRS(de Man, Rogosa & Sharpe agar) 배지에 접종하였다. 시료를 도말한 배지를 30℃에서 24시간 배양 (Incubator, VS-1203 P3, Vision Scientific Co.)한 후 나타난 colony를 plate agar를 사용하여 계수하였다.

마. Texture 특성

생무는 깎두기 제조시에 사용하는 부위와 크기를 그대로 사용하였다. Texture 특성은 Texture Analyser (XR.RA Dimension, Stable Micro Systems, Version 3.7)를 이용하여 TPA (Texture Profile Analysis)를 측정하여 구하였으며 TPA 측정시의 조작 조건은 전보⁽⁹⁾와 동일하였다. 평가된 경도는 Texture Analyser로 시료를 2회 연속적으로 침입시켰을 때 얻어지는 force - time curve의 first bite 중에서 최대 peak의 높이로 하였

다.

바. 색도 측정

저장기간의 증가에 따른 깎두기의 색 변화를 측정하기 위해 양념을 제거한 깎두기와 국물을 각각 백색판 위에 놓고 색도를 3회 측정(Color difference meter, CR-300, JAPAN, Minolta)하여 Hunter의 L, a, b 값으로 나타내었다.

제 3 절 오미자 및 백강잠 추출물의 깎두기 부패균에 대한 항균성 및 깎두기 숙성에 미치는 영향

1. 깎두기의 제조

가 깎두기 제조

무우50g(2x2x2)에 소금1g, 파1.67g, 마늘0.84g, 생강0.25g, 고춧가루 1.17g, 물 10ml. 를 첨가해서 20℃(Incubator LTD-1000SD, EYELA)에 저장하였다.

나. 오미자 및 백강잠 추출물의 제조

1) 식물성 천연물의 열수추출액의 제조

오미자와 백강잠을 통풍이 잘 되는 응달에서 건조한 후 곱게 마쇄 (Food mixer FM-700W, Hanil)하여 체 (Standard Testing Sieve, Aperture 250 μ m, No. 60)에 쳐서 입자를 고르게 하였다. 천연물의 농도가 10%가 되도록 증류수를 첨가하여 60℃에서 2일간 추출 (Shaking Incubator, VS-8480, SR)한 후 여과 (Toyo No.2)한 상정액을 사용하였다.

2) 에탄올 추출물의 제조

시료와 95%에탄올을 1:9 비율로 30℃에서 24hr 추출한 후 멸균여과지로 여과한후 농축(감압 증발 농축기, EYELA, Japan)하여 1% 및 3% 사용하였다.

3) 용매분획물의 제조

한약재 메탄올 추출물을 그림과 같이 용매계통 분획하여 사용하였다.

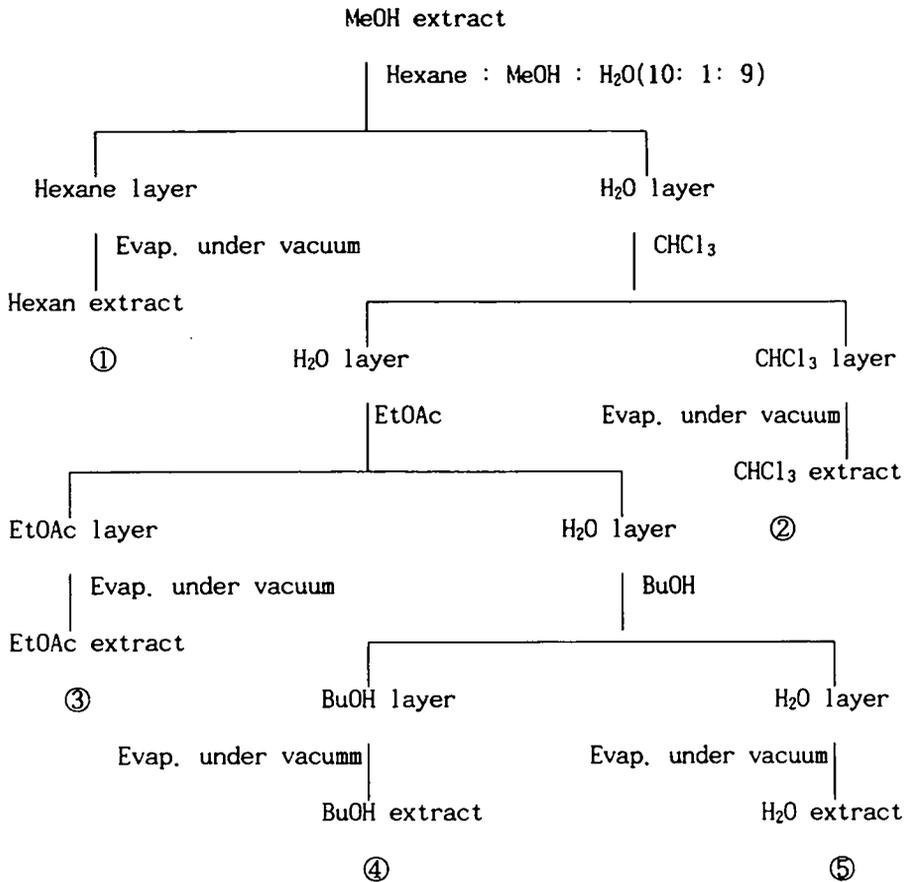


Fig 1. Solvent extraction from methanol extract using various solvent

2. pH 및 총산도의 측정

pH는 pH meter (HANNA Instruments 8521)를 사용하여 각두기 국물의 pH를 측정하였다. 산도는 각두기와 국물을 마쇄하여 여과한 후 여액을 사용하였으며 여액의 붉은색은 활성탄에 흡착시켜 제거하였다. 지시약으로 0.1% phenolphthalein 용액을 사용하여 분홍색으로 변하는 점까지 적정한 후 소비된 0.1 N NaOH 용액을 총산도 (Lactic acid, %)로 나타내었다.

3. 총균수의 측정

각두기 발효과정에 영향을 미치는 미생물의 총균수를 측정하기 위해 평판배양법을 사용하였다. 각두기 국물을 여과하여 여액 1ml를 멸균증류수를 이용하여 단계농도로 희석한 후 0.1ml를 취하여 일반세균 분리용 배지인 영양배지(NA)와 유산균 분리용 배지인 MRS(de Man, Rogosa & Sharpe agar) 배지에 접종하였다. 시료를 도말한 배지를 30℃에서 24시간 배양(Incubator, VS-1203 P3, Vision Scientific Co.)한 후 나타난 colony를 plate agar를 사용하여 계수하였다.

4. Texture 특성

생무는 각두기 제조시에 사용하는 부위와 크기를 그대로 사용하였다. Texture 특성은 Texture Analyser (XR.RA Dimension, Stable Micro Systems, Version 3.7)를 이용하여 TPA (Texture Profile Analysis)를 측정하여 구하였으며 TPA 측정시의 조작 조건은 전보⁽⁹⁾와 동일하였다. 평가된 경도는 Texture Analyser로 시료를 2회 연속적으로 침입시켰을 때 얻어지는 force - time curve의 first bite 중에서 최대 peak의 높이로 하였다.

5. 색도 측정

저장기간의 증가에 따른 각두기의 색 변화를 측정하기 위해 양념을 제거한 각두기와 국물을 각각 백색판 위에 놓고 색도를 3회 측정(Color difference meter, CR-300, JAPAN, Minolta)하여 Hunter의 L, a, b 값으로 나타내었다.

6. 항균력 측정

항균력은 Paper Disc Method로써 부패에 제일 많이 관여하는 균주에 대해서 측정하였다. broth에 24hr 배양시킨 균주를 증충배지(0.75 % agar)에 100 : 1 비율로 접종하여 고충배지에 Pouring하고 오미자 및 백강잠 용매 계통추출물을 100 μ 흡수시킨 disc를 올려놓은 다음 SDW(멸균수) 65 μ 로 확산 시켰다. 그리고 30°C에서 24 hr 배양하여 disc주위의 clear zone(cm)의 크기로 항균력을 측정하였다.

7. 환원당 함량 측정

김치즙액의 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)로 측정하였다, 즉, 다양한 농도의 glucose 표준용액(0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4mg/ml)과 100배 희석된 깎두기액 1ml에 DNS 시약 2ml를 가해 잘 교반하고 끓는 물에서 10분간 반응시키고 냉각시킨 후 발색된 용액을 UV spectrophotometer를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 미리 구해놓은 glucose 표준곡선에 의해 glucose 양으로 환산하였다.

제 4 절 韓藥材 分劃抽出物에 의한 김치 유산균 및 효모의 沮害 效果

1. 실험재료

주재료인 무와 파, 마늘, 생강, 고추 가루 및 채소류는 대전 오정동 농수산물 시장에서 구입하였고 소금은 정제염인 한주 소금을, 설탕은 백설탕(제일제당)을 사용하였다. NaOH는 Juncei 사 제품이었고 phenophthalein은 Sigma 사 제품이었으며 그외의 모든 시약은 GR 급을 사용하였다.

약재(Table 2)는 중등 약재 시장에서 구입하였으며, 이들 시료를 미세하

게 마쇄(Food mixer FM-700W, HANIL)하여 체(Standard Testing Sieve, Aperture 250 μ m, No. 60)에 쳐서 입자를 고르게한 후 추출용 시료로 사용하였다.

2. 깍두기의 제조

무를 깨끗이 씻어 뿌리와 머리 부분에서 각 5 cm 절단한 중간 부위 무를 사용하였다. 2×2×2 cm 크기로 썬 무 50 g에 고추 가루 1.17 g, 파 1.67 g, 마늘 0.84 g, 생강 0.25 g, 설탕 1.17 g, 물 또는 물추출물 10 mL를 polyethylene bag에 넣고 혼합하여 공기를 제거하고 밀봉하여 20±1℃의 항온조 (Low Temp. Incubator LTI-1000SD, Eyela)에 15일간 저장하면서 정기적으로 채취하여 실험에 사용하였다.

3. 첨가물의 제조

첨가물은 통풍이 잘 되는 용달에서 건조한 후 곱게 마쇄 ((Food mixer FM-700W, 한일)하여 체 (Standard Testing Sieve, Aperture 250 μ m, No. 60)에 쳐서 입자를 추출 (Shaking Incubator, VS-8480, SR)한 후 여과 (Toyo No.2)한 상장액을 사용하였다.

4. pH 및 총산도의 측정

pH는 pH meter (Hanna Instruments 8521)를 사용하여 깍두기 국물의 pH를 측정하였다. 산도는 깍두기와 국물을 마쇄하여 여과한 후 여액을 사용하였으며 여액의 붉은색은 활성탄에 흡착시켜 제거하였다. 지시약으로 0.1% phenolphthalein 용액을 사용하여 분홍색으로 변하는 점까지 적정한 후 소비된 1.0 N NaOH 용액을 총산도 (Lactic acid, %)로 나타내었다.

5. 경도 (Hardness)의 측정

각두기 및 생물의 경도 (Hardness)는 Texture Analyser (XR.RA Dimension, Stable Micro Systems, Version 3.7)를 이용하여 TPA (Texture Profile Analysis)를 측정하여 구하였으며 TPA 측정시의 조작 조건은 Table 2와 같다. 평가된 경도는 Texture Analyser로 시료를 2회 연속적으로 침입시켰을 때 얻어지는 force - time curve의 first bite 중에서 최대 peak의 높이로 하였다.

Table 2. List of natural plants addition on kakdoogi fermentation at 20±1℃

Korean name	Scientific name	Korean name	Scientific name
갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i>	쇠무릅	<i>Achyranthes japonica</i>
감국	<i>Chrysanthemum sinense</i>	속지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>
결명자	<i>Cassia tora</i>	승마	<i>Cinicifuga foetida</i>
구판	<i>Chinemys reevesii</i>	신이화	<i>Manfnolia liliflora</i>
금은화	<i>Lonicera japonica</i>	어성초	<i>Hauttuynia cordata</i>
길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	엄나무	<i>Ralipanax pictum</i>
녹차	<i>Camellia sinensis</i>	영지	<i>Ganderma lucidum</i>
당귀	<i>Angelicae gagatis</i>	오가피	<i>Acanthopanax sessiflorum</i>
대황	<i>Rheum undulatum</i>	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>
도인	<i>Prunus persia</i>	은행잎	<i>Ginko biloba</i>
두충	<i>Eucommia ulmoides Oliver</i>	음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>
만형자	<i>Vitex rotundifolia</i>	인진쑥	<i>Aritemisiae capillaris thunb</i>
모과	<i>Chaenomeles lagenaria</i>	작약	<i>Peonia lactiflora</i>
목향	<i>Saussurea lappa</i>	죽엽	<i>Phyllostachys edulis</i>
방풍	<i>Phellopterus littoralis</i>	진피	<i>Citrus tangerina</i>
백모근	<i>Imperata cylindrica</i>	차전자	<i>Plantage asiatica</i>
백복령	<i>Pachyma hoelen</i>	천궁	<i>Cnidium officinale</i>
백작약	<i>Paeonia albiflora</i>	천우슬	<i>Cyathula officinale</i>
백지	<i>Angelicae dahuricae</i>	천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>
백하수오	<i>Cynanchum silfordii</i>	청호	<i>Artemisiae annuae herba</i>
사상자	<i>Cnidium monnier</i>	초피	<i>Zanthoxylum pipertum</i>
산두근	<i>Sophora subprostrata</i>	축백	<i>Thuja orientalis</i>
산사	<i>Crataegus pinnatifoda</i>	택사	<i>Alismatis plantago</i>
산약	<i>Dioscorea batatas</i>	토사자	<i>Cuscuta australis</i>
산초	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	포공영	<i>Taraxacum mongolicum</i>
상백피	<i>Morus alba</i>	행인	<i>Prunus armeniaca</i>
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	향부자	<i>Cyperus rotundus</i>
소엽	<i>Erillae herba</i>	현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>
솔잎	<i>Pinus rigida</i>	홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>
송화가루	<i>Pinus rigida</i>	황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>

Table 3. Conditions for Texture Profile Analyser

Grape type	Force vs Time
Acquisition rate	200pps
Force threshold	20
Force unit	Grams
Contact force	5.0g
Distance format	Strain
Test speed	10.0 mm/sec
Trigger type	Auto 20 (Ø 0.432 cm)

6. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 그람 양성균 1종과 유산균 3종 및 효모 1종을 사용하였으며 (Table 4), 균 생육배지는 세균은 brain heart infusion과 agar(Difco), 유산균은 Lactobacilli MRS broth와 agar(Difco), 효모는 YM broth와 agar(Difco)를 각각 사용하였다.

Table 4. List of used microorganisms

Gram positive bacteria	<i>Streptococcus faecalis</i>	KCTC 2011
Lactic acid	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCYC 3108
	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCTC 3102
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KCTC 3505
Yeast	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCTC 7904

7. 추출 방법

한약재를 메탄올로 상온에서 24시간 추출, 여과하여 농축한 후 클로로포름과 물을 1:1의 비율로 3회 추출하여 농축하여 사용하였다.

8. 추출물의 분획

100%메탄올로 추출하여 얻은 포공영 메탄올 추출물을 클로로포름과 물을 1:1의 비율로 가해 3번 추출한 후, 용매분획 하였다.(Fig. 1) 즉, 이와같이 얻은 클로로포름 추출물을 분획여두에서 hexan:90%메탄올을 1ℓ씩 3회 추출하여 hexan 추출 분획 (7.84g)을 얻고, 계속해서 같은 방법으로 90%메탄올 층을 사염화탄소:80%메탄올을 1ℓ씩 3회 추출한 후, 다시 80%메탄올 층을 염화메틸렌:60%메탄올을 1ℓ씩 3회 추출하여 최종적으로 60%메탄올 분획물 (2.22g)을 얻어 적당한 농도로 희석하였다.⁽¹⁵⁾

9. Soluble solid 함량 측정

Soluble solid 함량은 감압 농축된 추출물 1ml를 취하여 105℃에서 건조한 후 증발잔사의 무게를 측정하여 첨가량(mg)으로 나타내었다.⁽¹⁶⁾

10. 항균력 측정

본 실험에 사용한 항균성 시험대상 식물은 생약재⁽²³⁾ 혹은 우리가 오랫동안 식용해왔던 식물 및 그 부산물로서 1차 시험에서 선정된 것으로 그 식물명은 Table 5와 같다. 항균성 검색에 사용한 균주는 slant에 배양된 각 균주 1백금이를 취하여 10ml broth 균 생육배지에 접종하고, 30℃에서 18~24시간 배양하여 사용하였다.

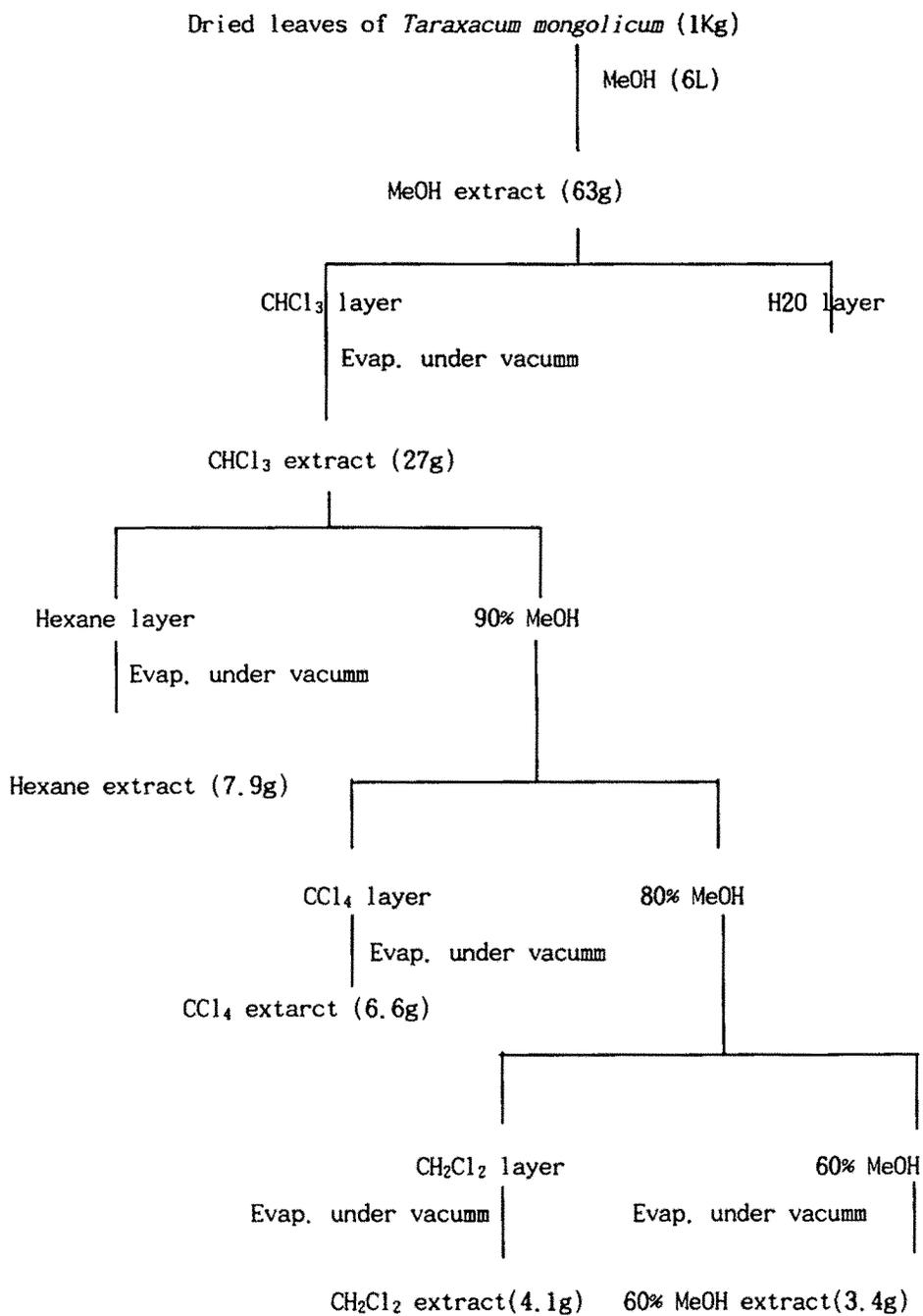


Fig 2. Fractionation of the chloloform extract from *Taraxacum mongolicum*.

항균성 시험용 평판배지의 조제는 각각의 생육배지로 멸균된 기층용 배지를 petridish에 15ml씩 분주하여 응고시키고, 증충용배지를 각각 5ml 시험관에 분주하여 멸균한 후, 각종 시험균액(멸균식염수로 균현탁액을 만들어 균 농도를 660mm에서 흡광도가 0.3이 되게 한 균현탁액) 0.1ml를 무균적으로 첨가하여 잘 혼합한 후 기층용 배지위에 분주한 뒤 고르게 응고시켜 2중의 균접종 평판배지를 만들었다. 추출물을 멸균된 filter paper disc(Toyo seisakusho, 8mm)에 일정량씩 흡수시킨 후, 추출용매를 완전히 날려 보낸 다음, 평판배지 표면에 놓아 밀착시키고 냉장고(4℃)에서 1시간 동안 방치한 후, 30℃ incubator에서 24~48시간 동안 배양한 다음 disc 주변의 clear zone 직경(mm)을 측정하여 항균력을 비교하였다. ⁽¹⁷⁾

11. 항균성 물질의 열안정성 측정

추출물 중 항균활성을 나타내는 물질의 열 안정성은 추출물을 60 ~10 0℃까지 10℃ 간격으로 각각 30분동안 열처리한 후 대조구와 한천배지 확산법(disc plate method)으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다. ⁽¹⁷⁾

Table 5. List of herbs used for antimicrobial experiment

Korean name	English name	Botanical name	plant part
결명자	Cassiae torae semen	<i>Cassia tora</i>	Seeds
구기자	Lycium Fruit	<i>Lycium chinense MILLER</i>	Seeds
금은화	Lonicerae flososs	<i>Lonicera japonica</i>	Flower
길경	Platycodi radix	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De CANDOLLE	Root
대황		<i>Rheum palmatum</i>	
백모근		<i>Imperata cylindrica</i>	
백작약		<i>Paeonia albiflora</i>	
백지		<i>Angelicae dahuricae</i>	
산사		<i>Crataegus pinnatifida</i>	
산약		<i>Dioscorea batatas</i>	
은행잎		<i>Ginko biloba</i>	
포공영	Taraxaci herba	<i>Taraxacum mongolicum</i>	Leaves
복분자			
목단피	Moutan radicis cortex	<i>Paeonia suffruticosa</i>	Bark
지골피			
느릅나무			
만삼			
백출			
진피		<i>Citrus tangerina</i>	
석창포		<i>Acorus gramineus</i> Soland	Root
초피		<i>Zanthoxylum piperitum</i>	
홍화		<i>Carthamus tinctorius</i>	

12. 항균성 물질의 pH안정성 측정

pH안정성은 추출물을 염산이나 수산화나트륨으로 pH1~13까지 조절한 후 상온에서 1시간 방치한 다음, 다시 pH7로 중화시켜서 열 안정성과 동일한 방법으로 생육저해환을 측정하여 비교하였다.⁽¹⁷⁾

13. 균 생육도 및 pH 측정

Broth에 각 대상균주의 slant에서 배양된 균주 1백금을 취해 10ml broth에 접종, 30℃, 24시간 동안 배양시키면서 2시간마다 미생물의 생육 정도를 spectrophotometer(Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000)를 사용하여 660nm에서 흡광도와 pH를 측정하였다.

14. 최소 저해농도 측정(MIC, minimum inhibitory concentration)

최소 저해농도 측정은 액체배지 희석법으로 측정하였는데, 각 추출물을 membrane filter(0.2 μ m)로 제균시키고, 액체배지를 준비하여 액체배지에 균현탁액을 각각 0.1ml씩 접종하고 30℃에서 12시간 배양한 다음 5, 10, 20, 40, 80mg/ml의 각 추출물을 첨가하여 12시간후 분광 광도계를 사용하여 660nm에서 optical density(OD) 측정하였다.

15. 클로로포름 추출물의 농도별 항균효과 측정

클로로포름 추출물의 농도별 항균효과는 액체배지 희석법을 이용하여 측정하였다. 포공영 클로로포름 추출물이 세균 및 효모증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 추출물을 membrane filter(0.2 μ m)로 제균시키고, 각 추출물을 고형물 함량 5, 10, 20, 40, 80mg/ml 농도가 되도록 조절하여 균 증식을 측정하였다. 즉, 멸균된 배지 9.8ml에 균 희석액 0.1ml와 검액 0.1ml를 가하고 멸균수로 10ml가 되도록 한 다음, 30℃에서 배양하면서 경시적으로 미생물의 생육 정도를 spectrophotometer(Pharmacia Biotech, Ultrospec 3000)로 660nm에서 optical density(OD) 측정하였다. Blank는 추출물을 넣은 배지를 사용하였으며, 균 접종액은 시험균을 생리 식염수에 현탁하여 흡광도가 0.3이 되도록 조정된 배양액을 사용하였다.⁽¹⁹⁾

16. 추출물의 분획별 항균성과 항미생물 활성 측정

배지에 추출물의 분획별 추출물을 membrane filter(0.2 μ m)로 제균시키고, 액체배지를 준비하여 액체배지에 균현탁액을 각각 0.1ml씩 접종하고 30℃에서 12시간 배양한 다음, 각 추출물의 분획별 추출물을 첨가하여 12시간 후 분광 광도계를 사용하여 660nm에서 optical density(OD) 측정하였다. 저해력은 다음 식에 의해 산출하였다. ⁽¹⁸⁾ 이때 blank는 각 시료를 첨가한 것으로 하였다.

$$\% \text{ inhibitory effect} = \frac{(\text{control-control blank}) \times (\text{treatment treatment blank})}{(\text{control-control blank})}$$

제 3 장 연구결과

제 1 절 한약재 및 채소류 물추출물 첨가 깍두기의 단기 및 장기 저장 특성

1. 단기 저장시의 특성

가. 깍두기 숙성 중의 pH 및 산도의 변화

깍두기를 제조하여 20℃에 저장하면서 경시적으로 pH와 산도를 측정된 결과는 Fig 3과 같다. 제조 직후의 깍두기의 pH는 6.0, 산도는 0.08%(lactic acid)로 제조 직후의 배추 김치의 pH (pH 5.5 정도), 산도 (0.2% 정도)와는 약간의 차이를 나타내었다.^(19,29~31) 김 등⁽³⁴⁾이 무의 뿌리 무게가 1 kg 정도인 20여종의 대형무로 깍두기를 제조하여 제조 직후의 측정된 산도는 약 0.1% (lactic acid)인 것으로 나타나 본 연구의 결과와 유사하였다. 또한 남궁 등⁽³⁵⁾이 깍두기와 배추김치를 25℃에서 13일간 저장하면서 pH를 측정된 결과 저장 기간이 증가하면서 깍두기의 pH는 계속 감소하였으나 배추김치는 저장 중기부터 다시 pH가 상승한다고 보고하였는 바 김치의 주원료인 배추와 무에 따라 김치 발효 양상이 다른 것으로 사료되었다.

본 실험에서는 깍두기의 pH는 감소하여 저장 2.5일에 4.2일에 달하였다가 완만하게 감소하였으며, 산도는 저장 직후부터 증가하여 저장 2.5일에 0.6%(lactic acid)에 도달하였고 그 이후 계속 증가하는 양상을 보여 전형적인 김치 숙성 양상을 나타내었다.

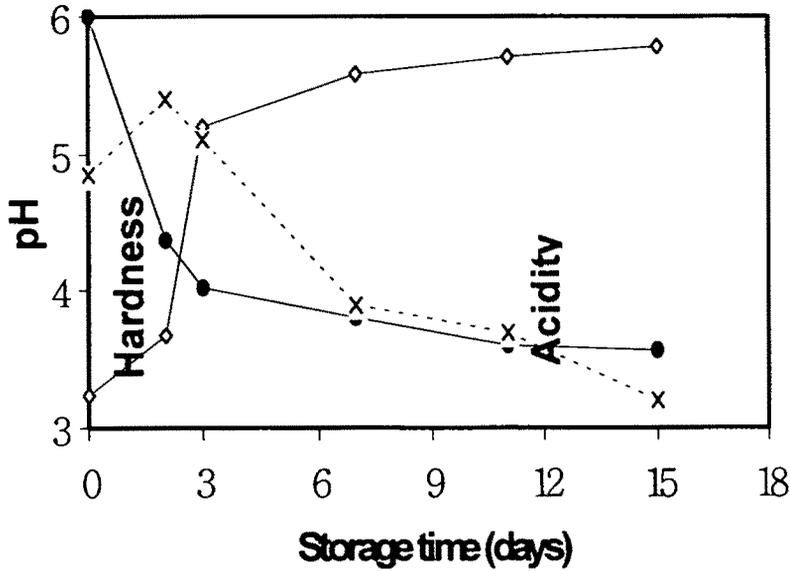


Fig 3. Change in pH, Acidity and Hardness of kakdoogi during fermentation at 20°C

나. 깍두기 숙성 적기의 결정

깍두기의 숙성 적기를 결정하기 위해서 본 실험에서는 pH와 산도를 측정하였고, 깍두기 무의 경도(hardness)가 깍두기 품질 특성에 영향을 주는 정도가 클 것으로 사료되어 TPA(texture profile analysis)에 의한 경도를 측정하였다. 숙성 적기의 pH를 4.2로 보았을 때 예비 실험 결과 20°C에서 저장한 깍두기는 저장 2.5일에 pH 4.2에 도달하였고, 숙성 적기의 산도를 0.6%(lactic acid)로 보았을 때 저장 2.5일에 숙성 적기에 도달하였으며 저장 7일 이후에는 증가폭이 완만해졌다. 따라서 깍두기를 20°C에서 저장하였을 때, 숙성 적기는 2.5일로 사료되었고, 저장 7일 이후에는 시어지는 것으로 관찰되었다. 깍두기의 경도는 저장 2일 째에 최고치를 나타낸 후 그 이후 감소하여 저장 7일째부터는 생무보다 낮은 경도를 나타내었다. 또

한, 깍두기의 숙성도와 경도를 관능적으로 평가하였을 때 저장 2.5일에 적당한 신맛과 경도를 나타내었으며, 저장 7일 이후에는 신맛이 매우 강하였으며, 조직은 물러져 경도는 낮아지는 것으로 나타났다.

다. 깍두기 숙성에 미치는 한약재의 영향

한약재 68종의 열수추출액을 깍두기에 첨가하여 20℃에 저장하면서 대조군의 숙성 적기인 저장 2.5일(60시간)에 도달하였을 때의 pH, 산도 및 경도를 측정된 결과를 Table 6에 나타내었다. 숙성 적기는 산도가 0.6%(lactic acid)에 도달하는 데 걸리는 시간으로 나타내었다.

Table 6에서와 같이 저장 2.5일째에 산도가 대조군에 비해 높거나 유사하게 나타난 것은 결명자를 비롯한 15종의 천연물(결명자, 두충, 만형자, 사상자, 석채, 쇠무릎, 어성초, 엄나무, 연교, 외술, 조각자, 천궁, 천마, 현호색, 황금) 첨가 깍두기이었다. 이들을 첨가한 깍두기는 저장 2.5일째의 산도가 대조군보다 높았을 뿐 아니라 적정 산도에 도달하는 기간도 대조군보다 짧거나 동일(18-60시간)하여 깍두기의 저장 기간을 연장시키는 효과가 없을 것으로 사료되었다. 상기 15종 중에서 만형자, 사상자, 쇠무릎 또는 연교를 첨가한 깍두기의 산도가 대조군보다 높게 나타난 것은 문 등⁽¹⁹⁾의 결과와 유사하였다. 그러나 황금 첨가 깍두기는 숙성적기의 산도가 대조군과 유사하게 나타나 문 등⁽¹⁹⁾의 결과와는 상이하였다. 한편 상기 15종의 천연물 첨가 깍두기에 대하여 저장 2.5일째에 경도를 측정하였을 때 결명자, 두충, 사상자, 쇠무릎, 엄나무, 오미자, 또는 천궁 첨가 깍두기는 깍두기 무의 경도가 대조군보다 낮았고, 그외의 천연물을 첨가한 깍두기 무의 경도는 대조군보다 경도가 높게 나타났다. 특히 만형자, 신선초, 외술, 조각자, 또는 황금 첨가 깍두기의 경도는 대조군보다 높았고, 저장 기간이 경과되어도 경도가 낮아지지 않아 대조군보다 높게 나타났다.

고삼, 삼백초, 오미자, 은행잎, 포공영 또는 황기 첨가 깎두기는 적정 산도에 도달하는 기간이 대조군보다 1-15시간 정도만 연장되었으므로 깎두기의 저장성 연장에는 효과적이지 않을 것으로 사료되었다. 길경, 송마 첨가 깎두기의 산도가 대조군보다 낮게 나타난 것은 배추 김치의 경우와 유사하였다.⁽⁹⁾

또한 차전자, 행인 또는 현삼 첨가 깎두기의 산도는 본 연구에서는 낮게 나타났으나 문 등⁽⁹⁾의 배추김치에서는 대조군과 별 차이를 나타내지 않았다고 보고하여 깎두기와는 다른 양상을 나타내었다.

대조군의 숙성적기인 60시간에서의 산도 0.6%를 기준으로 하였을 때, 천연물 첨가 깎두기의 산도가 대조군의 숙성적기인 저장 2.5일째에 대조군의 산도인 0.6%보다 50%이하로 낮은 산도를 나타낸 천연물로는 갈근, 감국, 구판, 금은화, 길경, 당귀, 대황, 모과, 목향, 방풍, 백모근, 백목련, 백복령, 백작약, 백지, 산두근, 산사, 산약, 산초, 상백피, 석창포, 소엽, 솔잎, 속지황, 송마, 영지, 오가피, 음양곽, 인진쑥, 작약, 죽엽, 진피, 차전자, 천우슬, 천하분, 청호, 측백, 택사, 행인, 향부자, 현삼, 홍화의 42종이었다. 이들 천연물 첨가 깎두기에 대하여 숙성 적기의 산도인 0.6%에 도달하기까지 20℃에서 저장하면서 적정 산도에 도달하는 기간을 측정하였을 때, 상기 48종 천연물 첨가 깎두기의 숙성 적기는 모두 120시간 이상으로 나타났다.

한편, 숙성 중 깎두기 무의 경도 변화를 알아보기 위해 Texture analyzer로 경도를 측정하였을 때, 대조군보다 숙성적기에 도달하는 기간을 연장시킨 천연물 중에서 대조군의 깎두기 경도에 비해 낮은 경도를 나타낸 것으로는 대황, 백목련, 산두근, 속지황, 은행잎, 길경, 산초, 송화, 송마, 신이화 또는 청호 첨가 깎두기였다. 특히 대조군에 비해 30% 정도 낮은 경도를 나타낸 것은 대황, 송화, 오미자, 신이화, 백목련, 산두근 또

는 속지황 첨가 깎두기였다. 숙성 적기에 도달하는 기간이 대조군의 2배인 120시간 이상이지만 깎두기의 경도가 낮은 것은 길경, 대황, 백목련, 산두근, 산초, 속지황, 승마, 모과, 청호의 10종이었다. 저장 2.5일째의 산도가 0.3%이하이면서 대조군에 비해 깎두기 무의 경도가 높은 천연물로는 갈근, 감국, 금은화, 당귀, 모과, 목향, 방풍, 백모근, 백복령, 백작약, 백지, 산사, 산약, 상백피, 석창포, 소엽, 솔잎, 영지, 오가피, 음양곽, 행인, 향부자, 현삼, 홍화 25종이었다. 이 가운데서 깎두기 무의 경도가 대조군에 비해 40-50%정도 높게 나타난 것으로는 금은화, 모과, 목향, 방풍, 백모근 산약 6종이었다. 산도가 대조군의 50%(0.3% lactic acid)이하이면서 경도가 30% 이상 높은 것은 금은화, 모과, 목향, 방풍, 백모근, 산약, 죽엽, 차전자, 택사의 9종이었다.

Table 6. Effect of hot water extract of medicinal plants on the fermentation of kadoogi

Sample		pH	Acidity (Lactic acid, %)	Time (hr)	Hardness (sample/control)	Sensory score (-3~+3)
No.	Korean Scientific name					
C	Control	4.20	0.60	60	1.00 [†]	
1	갈근 <i>Pueraria thunbergiana</i>	4.65	0.25 [†]	122	1.12	+2
2	감국 <i>Chrysanthemum sinense</i>	4.83	0.24 [†]	134	1.11	0
3	결명자 <i>Cassiae tora</i>	1.63	0.69	44	0.93	0
4	고삼 <i>Sophora angustiflora</i>	4.02	0.51	61	1.11	0
5	구판 <i>Chinemys reevesii</i>	4.84	0.20 [†]	140	1.12	+2
6	금은화 <i>Lonicera japonica</i>	5.22	0.18 [†]	150	1.48	+3
7	길경 <i>Platycodon grandiflorum</i>	4.46	0.24 [†]	142	0.94	+2
8	당귀 <i>Angelicae gagatis</i>	3.96	0.19 [†]	155	1.19	-3
9	대황 <i>Rheum undulatum</i>	5.42	0.20 [†]	252	0.72	+1
10	도인 <i>Prunus persia</i>	4.26	0.31	108	1.15	+3
11	두충 <i>Eucommia ulmoides</i>	4.53	1.31	34	0.99	+1
12	만형자 <i>Vitex rotundifolia</i>	4.34	0.71	57	1.21	-1
13	모과 <i>Chaenomeles lagenaria</i>	3.99	0.20 [†]	174	1.46	+3
14	목향 <i>Saussurea lappa</i>	4.40	0.25 [†]	130	1.42	0
15	방풍 <i>Phellopterus littoralis</i>	3.85	0.26 [†]	120	1.37	0
16	백모근 <i>Imperata cylindrica</i>	4.68	0.29 [†]	136	1.71	+3
17	백목련 <i>Magholiakobushimayerbesser</i>	4.96	0.20 [†]	168	0.75	0
18	백복령 <i>Pachyma hoelen</i>	4.64	0.30 [†]	126	1.15	0
19	백작약 <i>Paeonia albiflora</i>	5.59	0.13 [†]	204	1.19	+1
20	백지 <i>Angelicae dahuricae</i>	4.67	0.18 [†]	216	1.04	-1
21	백하수오 <i>Cynanchum sifordii</i>	4.72	0.32	116	1.08	+3
22	사상자 <i>Cnidium monnier</i>	4.37	1.14	30	0.87	0
23	산두근 <i>Sophora subprostrata</i>	1.55	0.27 [†]	167	0.75	+1
24	산사 <i>Crataegus pinnatifoda</i>	4.94	0.23 [†]	130	1.28	+3
25	산약 <i>Dioscorea batatas</i>	4.94	0.21 [†]	239	1.43	+3
26	산초 <i>Zanthoxylum bungeanum</i>	4.75	0.30 [†]	120	0.79	0
27	삼백초 <i>Saururus chinensis</i>	3.98	0.53	63	1.32	+1
28	상백피 <i>Morus alba</i>	4.96	0.15 [†]	150	1.04	+2
29	석창포 <i>Acorus gramineus</i>	5.27	0.17 [†]	220	1.24	0
30	석채 <i>Sedum sarmentosum</i>	3.84	0.69	44	1.54	0
31	소엽 <i>Erillae herba</i>	4.59	0.26 [†]	122	1.02	0
32	솔잎 <i>Pinus rigida</i>	4.40	0.27 [†]	130	1.24	-3
33	송화가루 <i>Pinus rigida</i>	4.40	0.31	112	0.58	+1
34	쇠무릎 <i>Achyranthes japonica</i>	4.27	1.39	23	0.88	-2
35	속지황 <i>Rehmannia glutinosa</i>	3.97	0.22 [†]	171	0.76	-3

- 1) Time (hour) to reach the optimum ripeness that shows acidity of 0.6% (lactic acid)
 - 2) Hardness of control is 5870 kg. continued
- + Acidity below 50% compared with control

Table 6. Effect of hot water extract of medicinal plants on the fermentation of kakdoogi.

No.	Sample		pH	Acidity (lactic acid, %)	Time	Hardness (sample/control)	Sensory score (-3~+3)
	Korean	Scientific name					
C	Control		4.20	0.60	60	1.00 ²⁾	
36	승마	<i>Cinicifuga foetida</i>	4.76	0.29 ⁺	138	0.99	-1
37	신이화	<i>Magnolia liliflora</i>	4.69	0.32	105	0.76	-1
38	어성초	<i>Houttuynia cordata</i>	4.41	0.94	30	1.31	0
39	엄나무	<i>Ralipanax pictum</i>	4.32	0.52	54	0.97	0
40	연교	<i>Forsythia suspensa</i>	4.50	0.60	60	1.15	-1
41	영지	<i>Ganoderma lucidum</i>	4.20	0.30 ⁺	206	1.15	+3
42	오가피	<i>Acanthopanax sessiflorum</i>	4.61	0.26 ⁺	151	1.12	+2
43	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	4.12	0.54	63	0.74	0
44	외술	<i>Pinus rigida</i>	3.97	1.53	18	1.46	+1
45	은행잎	<i>Ginkgo biloba</i>	4.57	0.44	71	0.92	0
46	음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	4.58	0.30 ⁺	156	1.27	+1
47	인진쑈	<i>Artemisia capillaris thunb</i>	4.75	0.29 ⁺	137	1.21	+3
48	작약	<i>Peaonia lactiflora</i>	3.96	0.20 ⁺	147	1.23	+1
49	조각자	<i>Gleditsia sinensis</i>	4.04	0.92	53	1.11	-1
50	죽엽	<i>Phyllostachys edulis</i>	4.74	0.25 ⁺	130	1.30	0
51	진피	<i>Citrus tangerina</i>	4.78	0.28 ⁺	172	1.03	+3
52	차전자	<i>Plantage asiatica</i>	3.97	0.25 ⁺	135	1.31	-3
53	천궁	<i>Cnidium officinale</i>	4.37	0.68	30	0.95	-1
54	천마	<i>Gastrodia elata blume</i>	4.03	0.63	59	1.15	0
55	천우슬	<i>Cyathula officinalis kuan</i>	4.62	0.30 ⁺	140	1.27	+2
56	천하분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	4.58	0.30 ⁺	136	1.27	0
57	청호	<i>Artemisia annuae herba</i>	4.76	0.30 ⁺	138	0.83	0
58	속백	<i>Thuja orientalis</i>	4.44	0.25 ⁺	139	1.02	0
59	택사	<i>Alismatis plantago</i>	4.14	0.27 ⁺	319	1.33	-3
60	토사자	<i>Cuscuta australis</i>	4.10	0.34	114	1.22	0
61	포공영	<i>Traxacum plantycarpum</i>	4.79	0.39	71	1.15	-3
62	행인	<i>Prunus armeniaca</i>	4.38	0.24 ⁺	148	1.22	+1
63	향부자	<i>Cyperus rotundus</i>	3.90	0.21 ⁺	179	1.23	+3
64	현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	4.43	0.30 ⁺	125	1.04	0
65	현호색	<i>Corydalis turtsch aninowii</i>	3.87	0.61	60	1.33	-1
66	홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	4.37	0.24 ⁺	219	1.15	+3
67	황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	4.06	1.59	19	1.32	0
68	황기	<i>Astragalus membranaceus</i>	4.07	0.56	62	1.24	-3

1) Time (hour) to reach the optimum ripeness that shows acidity of 0.6% (lactic acid)

2) Hardness of control is 5870 kg. continued

+ Acidity below 50% compared with control

라. 깍두기 숙성에 미치는 채소 및 향신료의 영향

채소 및 향신료 37종의 열수추출액을 깍두기에 첨가하여 20℃에 저장하면서 대조군의 숙성 적기인 저장 2.5일(60시간)에 도달하였을 때의 pH, 산도 및 경도를 측정한 결과를 Table 7에 나타내었다. 숙성 적기는 산도가 0.6%(lactic acid)에 도달하는 데 걸리는 시간으로 나타내었다.

Table 7에서와 같이 저장 2.5일째에 산도가 대조군에 비해 높거나 유사하게 나타난 것은 고구마를 비롯한 16종의 채소 및 향신료(고구마, 고추, 두릅, 들깻잎, 무순, 부추, 비름, 상추, 샐러리, 시금치, 쪽갓, 연근, 완두, 청경채, 취, 호박) 첨가 깍두기이었다.

이들을 첨가한 깍두기는 저장 2.5일째의 산도가 대조군보다 높았을 뿐 아니라 적정 산도에 도달하는 기간도 대조군보다 짧거나 동일(18-60시간)하여 깍두기의 저장 기간을 연장시키는 효과가 없을 것으로 사료되었다. 상기 16종 중에서 고추, 무순, 부추, 비름, 샐러리를 첨가한 깍두기의 산도가 대조군보다 높게 나타난 것은 문 등⁽¹⁹⁾의 결과와 유사하였다. 그러나 상추 첨가 깍두기는 숙성 적기의 산도가 대조군과 유사하게 나타난 것은 문 등⁽¹⁹⁾의 결과와는 상이하였다. 비름, 샐러리 또는 무순 첨가군의 pH는 대조군보다 낮았고, 산도는 높았는데, 이는 문 등⁽¹⁹⁾이 비름, 샐러리 또는 무순을 배추김치에 첨가했을 때와 유사한 결과이었다. 상추 첨가군은 대조군보다 적정 산도에 도달하는 기간이 짧아 배추 김치에 상추를 첨가했을 때와는 상이한 결과이었고, 파슬리 첨가군도 적정 산도에 도달하는 기간이 대조군보다 14시간 더 연장되어 문 등의 연구와는 상이한 결과를 나타내었다. 부추추출물이 배추김치의 발효 및 관련 미생물에 유익한 효과를 미친다는 김 등의 보고⁽⁴¹⁻⁴²⁾가 있었으나 본 연구에서는 부추 첨가가 깍두기의 숙성 적기를 연장시키지는 못하였다. 이는 부추추출물의 양과 추출 용매의 차이에서 기인하는 것으로 사료되었다. 즉 김 등은 본 연구보다 많

은 양의 부추추출물을 김치에 첨가하였고, 항균 효과를 나타낸 것은 수용액 층이 아닌 유기 용매층 이었으며, 김 등의 수용액층에서는 김치 저장에 유익한 항균 효과가 나타나지 않아 본 연구 결과와 유사하였다. 한편, 상기 36종의 천연물 첨가 각두기에 대하여 저장 2.5일째에 경도를 측정하였을 때, 고추, 두릅, 들깻잎, 무순, 부추, 비름, 샐러리, 시금치, 신선초, 쪽갓, 연근, 완두, 청경채, 취, 치커리, 호박 첨가 각두기의 경도는 대조군보다 높았고, 저장 기간이 경과되어도 경도가 낮아지지 않아 대조군보다 높게 나타났다.

대조군의 숙성적기인 저장 2.5일째에 대조군의 산도인 0.6%보다 산도를 나타내는 채소 및 향신료 중에서 갓, 다임, 달래, 당근, 미나리, 쪽, 아욱, 양배추, 양파, 월계수잎 또는 파슬리 첨가 각두기는 적정 산도에 도달하는 기간이 대조군보다 1-15시간 정도만 연장되었으므로 각두기의 저장성 연장에는 효과적이지 않을 것으로 사료되었다. 겨자, 녹차, 양고추냉이, 정향 첨가 각두기의 산도가 대조군보다 낮게 나타난 것은 배추김치의 경우와 유사하였다.⁽⁹⁾

대조군의 숙성적기인 60시간에서의 산도 0.6%를 기준으로 하였을 때, 천연물 첨가 각두기의 산도가 대조군의 숙성적기인 저장 2.5일째에 대조군의 산도인 0.6%보다 50%이하로 낮은 산도를 나타낸 채소 및 향신료로는 겨자, 계피, 녹차, 양고추냉이, 정향, 초피의 6종이었다. 이들 천연물 첨가 각두기에 대하여 숙성 적기의 산도인 0.6%에 도달하기까지 20℃에서 저장하면서 적정 산도에 도달하는 기간을 측정하였을 때, 상기 6종의 채소 및 향신료 첨가 각두기의 숙성 적기는 모두 120시간 이상으로 나타났다. 한편, 숙성 중 각두기 무의 경도 변화를 알아보기 위해 Texture analyzer로 경도를 측정하였을 때 대조군보다 숙성적기에 도달하는 기간을 연장시킨 채소 및 향신료 중에서 대조군의 각두기 경도에 비해 낮은 경도를 나타낸 것으로는

녹차, 초피 첨가 깎두기였다. 숙성 적기에 도달하는 기간이 대조군의 2배인 120시간 이상이지만 깎두기의 경도가 낮은 것은 녹차 첨가 깎두기였다. 저장 2.5일째의 산도가 0.3%이하이면서 대조군에 비해 깎두기 무의 경도가 높은 채소 및 향신료는 겨자, 계피, 양고추냉이 초피 4종이었다. 이 가운데서 깎두기 무의 경도가 대조군에 비해 40-50%정도 높게 나타난 것으로는 초피 1종이었다. 산도가 대조군의 50%(0.3% lactic acid) 이하이면서 경도가 30%이상 높은 것은 계피, 정향, 초피 3종이었다.

Table 7. Effect of hot water extract of vegetables and herbs on the fermentation of kakdoogi

No.	Sample		pH	Acidity (Lactic acid, %)	Time (hr)	Hardness (sample/control)	Sensory score (-3~+3)
	Korean	Scientific name					
C	Control		4.20	0.60	60	1.00 ²⁾	
1	갓	<i>Brassica juncea</i>	4.57	0.44	68	1.33	+2
2	거자	<i>Brassica cernua</i>	5.68	0.28 ⁺	168	1.21	+2
3	계피	<i>Cinnamomum verum</i>	5.74	0.11 ⁺	160	1.37	-3
4	고구마	<i>Ipomoea batatas</i>	4.49	0.63	59	1.14	0
5	고추	<i>Capsium annuum</i>	3.95	1.16	24	1.06	0
6	녹차	<i>Camellia sinensis</i>	4.65	0.26 ⁺	158	0.81	+3
7	다임	<i>Thymus vulgaris</i>	3.92	0.59	61	1.00	-3
8	달래	<i>Allium monanathum</i>	4.76	0.53	63	1.32	+2
9	당근	<i>Daucus carota</i>	4.62	0.39	75	1.11	+2
10	두릅	<i>Aralia elata</i>	4.12	0.89	36	1.22	0
11	들깻잎	<i>Perilla frutescens</i>	4.00	0.92	42	1.23	+3
12	무순	<i>Raphanus sativus</i>	3.99	0.70	56	1.43	0
13	미나리	<i>Oenanthe japonica</i>	4.68	0.52	64	1.27	+3
14	부추	<i>Allium tuber</i>	3.95	1.23	25	1.20	+1
15	비름	<i>Amaranthus patulus</i>	4.03	0.67	54	1.18	+3
16	상치	<i>Lactuca sativa</i>	3.96	1.27	47	1.39	0
17	셀러리	<i>Apium graveolens</i>	3.90	0.82	36	1.13	0
18	시금치	<i>Spinacia oleracea</i>	4.06	1.17	51	1.25	0
19	쑥	<i>Artemisia asiatica</i>	3.99	0.42	71	1.17	0
20	쑥갓	<i>Chrysanthemum coronarium</i>	3.80	1.04	29	1.46	-2
21	아욱	<i>Malva verticillata</i>	4.03	0.59	61	1.18	0
22	양고추냉이	<i>Moringa oleifera</i>	5.67	0.15 ⁺	249	1.12	-1
23	양배추	<i>Brassica oleracea</i>	4.71	0.55	63	1.14	+3
24	양파	<i>Allium cepa</i>	4.53	0.53	63	1.31	+2
25	연근	<i>Nelumbo nucifera</i>	3.78	0.69	56	1.14	+3
26	오이	<i>Cucumis sativus</i>	3.84	0.32	118	1.23	0
27	완두	<i>Pisum sativum</i>	4.00	1.48	27	1.07	+3
28	월계수잎	<i>Laurus nobilis</i>	4.14	0.54	63	1.00	0
29	정향	<i>Eugenia caryophyllate</i>	6.06	0.18 ⁺	323	1.35	-3
30	청경채	<i>Brassica oleracea</i>	3.87	1.02	29	1.07	+2
31	초피	<i>Zanthoxylum pipertum</i>	4.85	0.30 ⁺	153	1.84	0
32	취	<i>Aster saber</i>	4.15	0.66	53	1.52	+3
33	치커리	<i>Cichorium intybus</i>	4.19	0.90	50	1.15	0
34	케일	<i>Brssica oleracea</i>	4.03	1.16	26	0.97	0
35	파슬리	<i>Petroselinum crispum</i>	4.05	0.50	74	1.26	0
36	호박	<i>Cucurbita moschata</i>	4.16	0.61	46	1.35	0
37	산선초	<i>Angelica keiskei</i>	4.02	1.20	26	1.41	+2

1) Time (hour) to reach the optimum ripeness that shows acidity of 0.6% (lactic acid)

2) Hardness of control is 5870 kg. continued

+ Acidity below 50% compared with control

한편, 무의 경도도 대조군보다 높고, 적정 산도에 도달하는 기간도 연장시킨 12종(계피, 금은화, 모과, 목향, 방풍, 백모근, 산약, 정향, 죽엽, 초피, 차전자, 택사)의 천연물 첨가 깍두기의 숙성 3일째의 유산균 수를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 대조군의 유산균수는 3.7×10^8 cfu/ml이었으며 대조군보다 낮은 천연물은 없었으며, 유사한 것으로는 산약, 계피, 택사, 차전자, 금은화였다. 모과, 목향, 방풍, 백모근, 정향, 초피는 대조군보다 높게 나타났다. 이들 천연물로 담근 김치의 산도는 대조군보다 낮았으나 유산균의 성장을 촉진시키는 물질이 있는 것으로 사료되었다.

따라서 105종의 식물성 천연물 중에서 계피, 금은화, 모과, 목향, 방풍, 백모근, 산약, 정향, 죽엽, 초피, 차전자, 택사의 12종은 적정 산도에 도달하는 기간은 연장시켰고, 깍두기 무의 경도도 대조군보다 30%이상 높았으므로 깍두기의 저장성 연장에 효과적인 물질로 사료되었다.

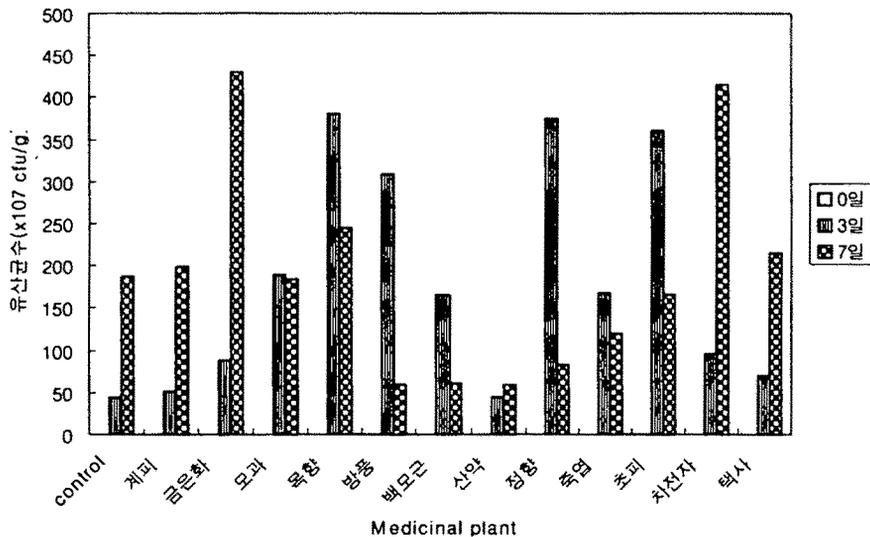


Fig. 4 한약재 추출물 첨가 깍두기의 숙성 중 유산균 수의 변화

2. 장기 저장의 특성

깍두기 단기 저장시 숙성 적기에 도달하는 기간이 길어 깍두기의 숙성을 지연시킬 수 있는 것으로 사료되는 천연물 중에서 적정 산도에 도달하는 기간이 긴 순서로 나열하면 정향(13일)>대황, 양고추냉이, 백모근(11일)>산약(10일)>석창포, 택사, 홍화(9일)>모과, 백목련, 영지(8일)>상백피, 초피(7일)>당귀, 음양곽, 인진쑥, 작약, 천우늘, 행인(6일)이었다. 적정산도인 0.6%(lactic acid)에 도달한 후 산도 증가가 완만하여 숙성 15일에도 0.8%정도를 유지하는 물질은 정향, 택사, 진피, 석창포, 모과, 백목련, 영지, 대황, 양고추냉이, 백모근, 당귀, 인진쑥, 작약, 천우슬, 행인이었다. 숙성 적기에 도달하는 기간이 길게 나타난 천연물의 열수추출액을 깍두기에 첨가한 후 20℃에서 15일간 저장하면서 경시적으로 pH, 산도, 경도를 측정된 결과를 Table 8, 9, 10에 나타내었다. 20℃에서 저장한 대조군의 숙성 적기는 2.5일이었으며, 이 시기에 대조군과 유사한 산도를 나타내어 저장성 연장효과가 없다고 사료되었던 물질 중에서 15일간 장기 저장하면서 산도를 측정된 결과, 7일 이상 저장하는 동안 산도가 대조군보다 낮은 물질로는 당귀, 모과, 방풍, 백복령, 산두근, 산사, 오미자, 월계수잎, 천우슬, 택사의 10가지였다. 이 물질들은 단기 저장시에는 깍두기 저장성 연장에 효과가 없었으나, 오히려 장기 저장시 초기에는 산도가 대조군과 유사하여 깍두기의 저장성 연장에 효과가 없는 것으로 사료되었으나 숙성 3일 이후에 오히려 산도가 크게 증가되지 않았으므로 가식기간을 연장시켜 줄 수 있는 물질로 사료되었다.

저장 초기에는 대조군보다 산도가 낮았으나 저장 후반기 (11~15일)에 대조군보다 높은 산도를 나타내어 깍두기의 저장 기간을 연장시키는데 효과적이지 않은 첨가물로는 감국, 구판, 목향, 백작약, 백지, 승마, 오이, 천하분이었다. 승마 첨가군이 저장 초기에 대조군보다 낮은 산도를 나타낸

것은 문 등⁽⁹⁾이 배추 김치에 승마를 첨가했을 때와 유사한 결과이었다. 그러나 목향 첨가군의 경우, 저장 초기에 대조군보다 낮은 산도를 나타내었으나 유산균수는 대조군보다 높아 배추 김치에서와는 상이한 결과이었다. 목향이 *Lactobacilli sp.*의 생육을 억제하기 때문으로 사료되었다⁽⁹⁾. 상기 8개 천연물 첨가군이 저장 초기에서 중기에 걸쳐 낮은 산도를 나타낸 것은 산에 대한 완충 효과이거나 저장 초기에 관여하는 *Leuconostoc sp.*과 같은 정상발효젖산균의 생육을 억제하기 때문으로 사료되었다^(21,24~27).

Table 8. Characteristics of 3-day fermented *kakdoogi* at 20°C

No.	Sample		pH	Acidity (%)	Hardness (Sample/control)	Lactobacilli ($\times 10^5$, cfu/g)	Bacteria ($\times 10^5$, cfu/g)
	Korean name	Scientific name					
c	대조군		4.03	0.86	1.00	347	0.21
1	갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i>	4.29	0.34	1.04	330	0.08
2	감국	<i>Chrysanthemum sinense</i>	4.60	0.27	1.13	393	0.21
3	겨자	<i>Brassica cernua</i>	5.80	0.45	1.25	299	0.28
4	계피	<i>Cinnamomum verum</i>	5.48	0.11	1.46	530	
5	구만	<i>Chinemys reevesii</i>	4.71	0.23	1.06	335	0.14
6	금은화	<i>Lonicera japonica</i>	5.21	0.21	1.36	900	
7	길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	4.35	0.27	1.14	33	0.15
8	녹차	<i>Camellia sinensis</i>	4.33	0.29	0.77	172	0.26
9	당귀	<i>Angelicae gagatis</i>	3.91	0.18	1.14		
10	대황	<i>Rheum undulatum</i>	5.35	0.23	0.56		
11	도인	<i>Prunus persia</i>	3.96	0.43	1.06	401	6
12	모과	<i>Chaenomeles lagenaria</i>	3.89	0.24	1.49	1,880	
13	목향	<i>Saussurea lappa</i>	3.80	0.32	1.43	714	1
14	방풍	<i>Phellopterus littoralis</i>	3.75	0.32	1.44	236	4
15	백모근	<i>Imperata cylindrica</i>	4.10	0.44	1.90	1,510	
16	백목련	<i>Magnolia kobushi mayer besser</i>	4.70	0.24	0.61		
17	백복령	<i>Pachyma hoelen</i>	4.25	0.36	1.13	646	17
18	백지	<i>Angelicae dahuricae</i>	4.28	0.45	1.26	296	29
19	백하수오	<i>Cynanchum sifordii</i>	4.40	0.36	1.06	402	7
20	산두근	<i>Sophora subprostrata</i>	4.33	0.27	0.67	143	12
21	산사	<i>Crataegus pinnatifoda</i>	4.90	0.23	1.11	378	32
22	산약	<i>Dioscorea batatas</i>	4.57	0.29	1.14	243	5
23	산초	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	4.34	0.43	1.00	308	1.3
24	상백피	<i>Morus alba</i>	4.92	0.18	0.94	248	5
25	석창포	<i>Acorus gramineus</i>	5.01	0.23	1.07		
26	소엽	<i>Erillae herba</i>	4.29	0.32	1.05	408	0.19
27	솔잎	<i>Pinus rigida</i>	4.13	0.27	1.18	269	0.03
28	송화가루	<i>Pinus rigida</i>	4.32	0.41	0.53	320	0.01
29	송마	<i>Cinicyfuga foetida</i>	4.45	0.32	0.97	375	0.03
30	신이화	<i>Manfnolia liliflora</i>	4.29	0.36	0.80	196	0.09
32	양고추냉이	<i>Moringa oleifera</i>	5.60	0.19	1.14		
33	영지	<i>Ganderma lucidum</i>	5.17	0.35	1.10		
34	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	4.03	0.81	0.76	510	0.09

Table 8. Characteristics of 3-day fermented kakdoogi at 20°C

No.	Sample		pH	Acidity (%)	Hardness (Sample/control)	Lactobacilli ($\times 10^5$, cfu/g)	Bacteria ($\times 10^5$, cfu/g)
	Korean name	Scientific name					
c	대조군		4.03	0.86	1.00	347	0.21
35	은행잎	<i>Ginkgo biloba</i>	4.32	0.62	0.96	163	0.17
36	오가피	<i>Acanthopanax sessiflorum</i>	4.19	0.34	1.02	260	0.02
37	음양각	<i>Epimedium koreanum</i>	4.32	0.32	1.20	1007	0.05
38	인진쑈	<i>Artemisiae capillaries thunb</i>	4.47	0.38	1.12		
39	작약	<i>Peonia lactiflora</i>	3.89	0.28	1.24		
40	정향	<i>Eugenia caryophyllate</i>	6.12	0.25	1.42	310	0.16
41	죽엽	<i>Phyllostachys edulis</i>	4.46	0.27	1.34	1590	
42	진피	<i>Citrus tangerina</i>	4.50	0.33	0.99	310	0.13
43	차전자	<i>Plantage asiatica</i>	3.95	0.32	1.18	838	0.23
44	천우슬	<i>Cyathula officinalis kuan</i>	4.43	0.52	1.01		
45	천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	4.23	0.36	1.13	317	0.05
46	청호	<i>Artemisiae annuae herba</i>	4.34	0.34	0.80	715	0.13
47	초피	<i>Zanthoxylum pipertum</i>	4.74	0.38	0.81	3590	
48	측백	<i>Thuja orientalis</i>	3.91	0.32	0.99	639	0.11
49	포공영	<i>Traxacum plantycarpum</i>	4.23	0.62	1.04	435	0.38
50	택사	<i>Alismatis plantago</i>	3.93	0.38	1.36	630	
51	토사자	<i>Cuscuta australis</i>	4.07	0.41	1.08	838	0.09
52	행인	<i>Prunus armeniaca</i>	3.93	0.33	1.11		
53	현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	4.23	0.32	1.08	83	0.15
54	홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	3.87	0.34	1.18		

Table 9. Characteristics of 7-day fermented *kakdoogi* at 20°C

No.	Sample		pH	Acidity (%)	Hardness (Sample/control)	Lactobacilli ($\times 10^5$, cfu/g)	Bacteria ($\times 10^5$, cfu/g)
	Korean name	Scientific name					
c	대조군		3.80	1.04	1.00	490	25
1	갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i>	4.08	0.83	1.09	3048	13
2	감국	<i>Chrysanthemum sinense</i>	3.60	0.77	0.94	1925	6
3	겨자	<i>Brassica cernua</i>	5.51	0.60	0.97	1188	1
4	계피	<i>Cinnamomum verum</i>	5.04	0.65	0.89	1930	
5	구만	<i>Chinemys reevesii</i>	3.90	0.77	0.96	1408	12
6	금은화	<i>Lonicera japonica</i>	4.24	0.69	0.92	4210	
7	길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	3.85	0.73	1.40	462	5
8	녹차	<i>Camellia sinensis</i>	4.23	0.65	0.62	270	11
9	당귀	<i>Angelicae gagatis</i>	3.89	0.68	1.53		
10	대황	<i>Rheum undulatum</i>	4.91	0.39	0.47		
11	도인	<i>Prunus persia</i>	3.78	0.90	1.13	878	6
12	모과	<i>Chaenomeles lagenaria</i>	3.79	0.54	1.62	1700	
13	목향	<i>Saussurea lappa</i>	3.78	0.79	1.82	2445	1
14	방풍	<i>Phellopterus littoralis</i>	3.73	0.90	1.47	538	4
15	백모근	<i>Imperata cylindrica</i>	4.01	0.68	1.09	625	
16	백복련	<i>Magmolia kobushi mayer besser</i>	3.78	0.60	0.72		
17	백복령	<i>Pachyma hoelen</i>	3.57	0.77	0.97	1224	17
18	백지	<i>Angelicae dahuricae</i>	3.65	0.92	1.17	1432	29
19	백하수오	<i>Cynanchum sifordii</i>	3.75	0.86	1.04	1512	7
20	산두근	<i>Sophora subprostrata</i>	3.58	0.65	0.57	677	12
21	산사	<i>Crataegus pinnatifoda</i>	3.67	0.83	1.09	488	32
22	산약	<i>Dioscorea batatas</i>	4.00	0.45	0.95	1360	5
23	산초	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	3.62	0.92	0.96	644	1.3
24	상백피	<i>Morus alba</i>	3.82	0.61	0.84	366	2
25	석창포	<i>Acorus gramineus</i>	3.71	0.54	1.07		
26	소엽	<i>Erillae herba</i>	3.69	0.83	1.33	1001	0.4
27	솔잎	<i>Pinus rigida</i>	3.65	0.83	0.73	575	13
28	송화가루	<i>Pinus rigida</i>	3.97	0.81	0.65	2400	1
29	승마	<i>Cinicifuga foetida</i>	3.77	0.72	0.94	107	2
30	신이화	<i>Manfnolia liliflora</i>	3.59	1.04	1.04	730	1.2
32	양고추냉이	<i>Moringa oleifera</i>	5.30	0.30	1.07		
33	영지	<i>Ganderma lucidum</i>	4.43	0.52	0.96		
34	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	3.93	1.01	1.03	598	12

Table 9. Characteristics of 7-day fermented *kakdoogi* at 20°C

No.	Sample		pH	Acidity (%)	Hardness (Sample/control)	Lactobacilli ($\times 10^5$, cfu/g)	Bacteria ($\times 10^5$, cfu/g)
	Korean name	Scientific name					
c	대조군		3.80	1.04	1.00	490	25
35	은행잎	<i>Ginkgo biloba</i>	3.65	0.72	1.49	468	7
36	오가피	<i>Acanthopanax sessiflorum</i>	3.75	0.65	0.92	335	14
37	음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	3.65	0.40	0.89	503	1
38	인진쑈	<i>Artemisiae capillaries thunb</i>	4.18	0.71	0.75		
39	작약	<i>Peaonia lactiflora</i>	3.78	0.69	1.41		
40	정향	<i>Eugenia caryophyllate</i>	5.60	0.30	0.97	1309	11
41	죽엽	<i>Phyllostachys edulis</i>	3.75	0.79	1.45	1170	
42	진피	<i>Citrus tangerina</i>	3.65	0.59	1.32	654	7
43	차전자	<i>Plantage asiatica</i>	3.92	0.74	1.14	1119	1
44	천우슬	<i>Cyathula officinalis kuan</i>	4.15	0.64	0.73		
45	천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	3.84	0.72	1.05	572	11
46	청호	<i>Artemisiae annuae herba</i>	3.58	0.72	0.64	954	14
47	초피	<i>Zanthoxylum pipertum</i>	4.21	0.64	0.69	1620	
48	측백	<i>Thuja orientalis</i>	3.64	0.72	0.84	2240	2
49	포공영	<i>Traxacum plantycarpum</i>	3.91	0.91	0.86	1170	4
50	택사	<i>Alismatis plantago</i>	3.82	0.56	1.77	2050	
51	토사자	<i>Cuscuta australis</i>	3.76	0.77	0.99	1816	5
52	행인	<i>Prunus armeniaca</i>	3.92	0.67	0.96		
53	현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	3.79	0.83	1.37	984	23
54	홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	3.81	0.51	1.65		

Table 10. Characteristics of 11-day fermented *kakdoogi* at 20°C

No.	Sample		pH	Acidity (%)	Hardness (Sample/control)
	Korean name	Scientific name			
c	대조군		3.60	1.18	1.00
1	갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i>	3.71	1.08	0.99
2	감국	<i>Chrysanthemum sinense</i>	3.60	1.10	1.00
3	거자	<i>Brassica cernua</i>	4.30	0.98	0.84
4	계피	<i>Cinnamomum verum</i>	4.40	0.93	0.84
5	구판	<i>Chinemys reevesii</i>	3.67	1.15	1.15
6	금은화	<i>Lonicera japonica</i>	4.22	0.96	0.93
7	길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	3.76	1.08	1.32
8	녹차	<i>Camellia sinensis</i>	3.76	0.88	0.68
9	당귀	<i>Angelicae gagatis</i>	3.80	0.77	1.30
10	대황	<i>Rheum undulatum</i>	4.76	0.63	0.64
11	도인	<i>Prunus persia</i>	3.66	0.99	1.01
12	모과	<i>Chaenomeles lagenaria</i>	3.76	0.87	1.71
13	목향	<i>Saussurea lappa</i>	3.71	1.17	1.68
14	방풍	<i>Phellopterus littoralis</i>	3.63	0.96	1.56
15	백모근	<i>Imperata cylindrica</i>	4.14	0.77	0.89
16	백목련	<i>Magnolia kobushi mayer besser</i>	3.58	0.79	0.80
17	백복령	<i>Pachyma hoelen</i>	3.35	0.96	1.00
18	백지	<i>Angelicae dahuricae</i>	3.62	1.17	0.90
19	백하수오	<i>Cynanchum sifordii</i>	3.61	1.15	1.03
20	산두근	<i>Sophora subprostrata</i>	3.74	1.04	0.79
21	산사	<i>Crataegus pinnatifoda</i>	3.70	1.06	1.07
22	산약	<i>Dioscorea batatas</i>	3.79	0.65	0.87
23	산초	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	3.85	1.04	0.79
24	상백피	<i>Morus alba</i>	3.51	0.79	0.98
25	석창포	<i>Acorus gramineus</i>	3.65	0.64	1.06
26	소엽	<i>Erillae herba</i>	3.65	1.01	1.42
27	솔잎	<i>Pinus rigida</i>	3.62	1.06	0.81
28	송화가루	<i>Pinus rigida</i>	3.92	1.08	0.83
29	승마	<i>Cinici fuga foetida</i>	3.66	1.02	1.21
30	산이화	<i>Manfnolia liliflora</i>	3.74	1.04	0.79
32	양고추냉이	<i>Moringa oleifera</i>	4.50	0.66	1.04
33	영지	<i>Gandema lucidum</i>	3.75	0.71	0.85
34	오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	3.68	1.43	1.09

Table 10. Characteristics of 11-day fermented kakdoogi at 20°C

No.	Sample		pH	Acidity (%)	Hardness (Sample/control)
	Korean name	Scientific name			
c	대조군		3.60	1.18	1.00
35	은행잎	<i>Ginko biloba</i>	3.63	0.96	1.59
36	오가피	<i>Acanthopanax sessiflorum</i>	3.45	1.04	0.89
37	음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	3.48	0.95	0.93
38	인진쑈	<i>Artemisiae capillaries thunb</i>	3.59	0.81	0.73
39	작약	<i>Peonia lactiflora</i>	3.74	0.44	1.49
40	정향	<i>Eugenia caryophyllate</i>	5.28	0.44	0.94
41	죽엽	<i>Phyllostachys edulis</i>	3.71	1.04	1.53
42	진피	<i>Citrus tangerina</i>	3.62	0.68	1.39
43	차전자	<i>Plantage asiatica</i>	3.80	0.83	1.06
44	천우슬	<i>Cyathula officinalis kuan</i>	3.71	0.71	0.66
45	천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	3.81	0.92	0.99
46	청호	<i>Artemisiae annuae herba</i>	3.72	0.99	0.76
47	초피	<i>Zanthoxylum pipertum</i>	3.68	0.79	0.68
48	속백	<i>Thuja orientalis</i>	3.49	1.01	0.78
49	포공영	<i>Traxacum plantycarpum</i>	3.73	1.24	0.75
50	택사	<i>Alismatis plantago</i>	3.71	0.63	1.08
51	토사자	<i>Cuscuta australis</i>	3.37	0.92	0.82
52	행인	<i>Prunus armeniaca</i>	3.74	0.71	0.88
53	현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	3.62	1.06	0.81
54	홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	3.54	0.68	1.09

대조군은 저장 7일 이후에는 산도가 1.0% 이상으로 매우 높았으며 경도도 낮아 관능적으로 수용도가 매우 낮아 먹기에 적당하지 않았으므로 대조군 즉, 20°C에서 저장한 깍두기의 가식기간을 7일로 보았다. 천연물 첨가 깍두기의 가식기간도 대조군과 동일하게 산도가 1.0% 미만에 도달할 때까지의 기간으로 보았을 때, 천연물 첨가 깍두기의 저장 14일 또는 15일에 산도가 1.0% 미만으로 대조군에 비해 가식기간이 2배 이상 연장된 천연물

은 26종으로 계피, 녹차, 당귀, 대황, 모과, 방풍, 백모근, 백목련, 백복령, 산약, 산초, 상백피, 석창포, 양고추냉이, 영지, 음양곽, 인진쑥, 작약, 정향, 진피, 차전자, 천우슬, 토사자, 택사, 행인 또는 홍화 첨가 깎두기이었다. 이들중에서 적정산도에 도달한 후 산도 증가가 완만하여 숙성 15일에도 0.8%(lactic acid)정도를 유지하는 천연물로는 당귀, 대황, 모과, 백모근, 백목련, 석창포, 인진쑥, 작약, 정향, 택사, 진피, 천우슬, 토사자, 행인의 14종이었다. 가식기간을 5일이상 (12 또는 13일) 연장시킨 천연물로는 금은화, 도인, 백작약, 백지, 산두근, 숙지황, 초피, 향부자이었다. 3일 이상 가식기간을 연장시킨 천연물(10또는 11일) 로는 갈근, 감국, 길경, 산사, 솔잎, 오가피, 월계수잎, 죽엽, 청호, 측백, 현삼이었다.

Table 11. Fermentation times to reach the acidity of 1.0% (lactic acid) *kakdoogi* containg water extract of medical plants or vegetables.

Time (days)	Medical plants or vegetables
7	control
10	갈근, 감국, 길경, 산사, 솔잎, 양배추, 오가피, 월계수잎, 죽엽, 청호, 측백, 현삼
12	갓, 겨자, 금은화, 당근, 도인, 백작약, 백지, 산두근, 숙지황, 양파, 은행잎, 초피, 향부자, 백복령, 산초, 소엽, 계피, 녹차, 당귀, 모과, 방풍, 백모근, 백목련, 산약, 상백
15	피, 석창포, 양고추냉이, 영지, 음양곽, 인진쑥, 작약, 정향, 진피, 차전자, 천우슬, 토사자, 택사, 행인, 홍화

한편, 숙성기간 중 유산균수의 변화를 측정한 결과 숙성 3일째 대조군의 유산균수보다 적게 나타난 천연물로는 갈근, 겨자, 구판, 길경, 녹차, 방풍, 백지, 산두근, 산약, 산초, 상백피, 솔잎, 송화, 신이화, 오가피, 은행잎, 정향, 천하분, 향부자, 현삼이었다. 이들 가운데서 숙성 7일째 유산

균수가 급증하여 대조군보다 높게 나타난 것은 겨자, 백지, 산약, 송화, 정향, 현삼이었으며, 숙성 7일째의 유산균수가 증가하지 않고 대조군보다 낮은 것은 길경, 녹차, 방풍, 산사, 상백피, 승마, 오가피, 은행잎이었다.

또 깍두기 숙성중 깍두기 무의 경도 변화를 관찰하면, 구판, 또는 백작약 첨가 깍두기는 저장 기간이 경과되면서 경도가 낮아져 저장 후반기에는 대조군보다 낮았고, 감국 또는 천화분 첨가군은 대조군의 경도 변화와 유사하였으며, 목향, 백지, 승마 또는 오이 첨가군은 저장 기간이 증가하여도 경도가 낮아지지 않아 저장 기간이 증가하면서 대조군에 대한 경도가 높았다. 숙성 15일에 산도가 1.0% 미만인면서 전 숙성기간 동안 경도가 대조군 보다 높은 천연물로는 당귀, 모과, 석창포, 양고추냉이, 작약, 정향, 진피, 택사, 홍화의 9종이었다. 앞으로 이들 천연물들에 대해 어떤 성분이 김치의 숙성을 지연시키는지에 대해 더 자세한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

Table 12 Hardness of kakdoogi containing water extract of medical plants or vegetables during fermentation.

Higher than control	Lower than control
	겨자, 계피, 금은화, 백모근,
길경, 당귀, 도인, 모과, 방풍,	백복령, 백하수오, 산약,
산사, 석창포, 양고추냉이,	상백피, 솔잎, 영지, 오가피,
작약, 정향, 죽엽, 진피, 택사,	음양과, 인진쑥, 차전자,
현삼, 홍화	천우슬, 토사자, 행인,
	향부자

식물성 천연 물질 105가지의 10% 열수추출물 (60℃, 2일간 추출)을 깍두기 제조시에 첨가하여 20℃에서 저장하면서 경시적으로 숙성도 (pH, 산도

및 경도)를 측정하였다. 숙성 적기의 산도 (Lactic acid, %)를 0.6%로 보았을 때, 대조군의 숙성 적기인 2.5일째에 대조군의 산도인 0.6% 보다 50% 이하로 낮은 산도를 나타낸 천연물로는 한약재 48종, 채소 및 향신료 6종으로 총 54종이었다. 이들 천연물 중에서 숙성 2.5일째에의 깍두기 무의 경도가 대조군보다 30% 이상 높게 나타난 한약재로는 금은화, 모과, 목향, 방풍, 백모근, 산약, 죽엽, 차전자, 택사, 계피, 정향, 초피의 12종이었다. 그러나 이들 12종의 유산균수는 대조군에 비해 적게 나타나지는 않았다.

제 2 절 양념류가 깍두기 숙성에 미치는 영향

본 실험에서는 깍두기에 모든 양념을 첨가한 대조군과 물, 소금, 소금+고춧가루, 소금+마늘, 소금+생강, 소금+파를 각각 첨가한 시료를 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 저장하면서 각 양념을 첨가한 깍두기의 숙성도를 살펴보았다.

대조군의 pH는 저장기간이 경과함에 따라 저하되어 숙성 2일에 pH 5.2에서 숙성 3일에 4.8, 숙성 5일에 4.1로 급격히 감소되었으나 5일 이후부터는 pH 3.8정도를 유지하였다. 산도는 12일까지 급속히 증가되다가 그 이후부터 완만하게 증가되었다. 경도는 5일째까지 증가하였다가 그 이후 감소하는 경향을 보였다.

숙성기간동안 대조군보다 pH가 높게 유지된 군은 마늘 또는 생강을 첨가한 깍두기였고, 소금만을 첨가한 깍두기는 숙성 5일까지는 높았으나, 그 이후부터는 대조군보다 낮았다. 대조군과 유사한 pH와 산도를 보인 군은 물만 첨가한 깍두기와 고춧가루만 첨가한 깍두기였다. 대조군보다 낮은 산도를 보인 군은 생강>소금>마늘>파의 순으로 나타났고 소금만을 첨가한 군과 파를 첨가한 군은 숙성 초기 3일까지는 산도가 낮았으나, 그 이후부터 산도가 증가하였으나, 대조군보다는 낮았다. 숙성적정기의 산도를 0.6%

(Lactic acid)로 보았을 때, 숙성적기에 도달하는 기간이 대조군이 5일인데 비해 고춧가루 첨가군은 대조군과 유사하고, 파 첨가군은 7일, 마늘 첨가군은 8일, 소금만 넣은 군은 10일, 생강 첨가군은 15일이었다.

깍두기의 경도를 TPA로부터 측정하였을 때, 고춧가루를 첨가한 군의 경도는 대조군과 유사한 경향을 보였으며, 물만 첨가한 깍두기는 대조군 및 양념첨가군에 비해 숙성 전기간동안 매우 낮았다. 소금과 고춧가루를 넣은 깍두기는 숙성 초기부터 9일까지 대조군보다 낮았으나, 숙성 9일부터 약간 증가되는 경향을 보였다. 파, 마늘, 생강첨가군은 숙성 초기보다 숙성 말기에 경도가 증가하는 경향을 보이다가 다시 감소하였다.

1. 고춧가루

본 실험에서는 고춧가루는 숙성 전기간 동안 대조군 보다 낮은 pH를 유지하였으며 산도는 대조군과 거의 유사하였으나 숙성 12일 이후부터는 오히려 저하되었다.

고춧가루는 pH변화에서 5일째에 다른 양념을 넣은 것에 비해 가장 낮은 값을 나타내었다. 산도는 숙성기의 적정산도를 0.6%로 보았을 때, 대조군이 0.6%에 도달하는 기간이 5일인데 비해, 고춧가루를 첨가한 시료가 모든 양념을 첨가한 대조군보다 늦게 적정산도에 도달했지만, 7일째에 도달했다. 또한 다른 양념에 비해 2일째에서 3일째 이르는 기간에 빠른 상승을 보이는 것으로 보아, 고춧가루는 깍두기의 숙성에 영향을 미친다고 볼 수 있다. 그리고 고춧가루의 산도가 12일 이후 낮아진 것은 부패되었다고 사료된다.

마른 고추에는 비타민 A의 전구체인 carotene이 많고, 비타민 C의 함량도 높다. 그러나 비타민 C는 매우 불안정하여 산화하기 쉬우나 고추나 마늘의 매운맛 성분은 이것의 산화를 막아준다. 고추의 매운맛 성분은

capsaicin으로 주로 과피에 포함되어 있으며 과피의 약 0.41%를 가지고 있다.

고추는 김치의 발효를 촉진시키며 그 배합비율이 증가함에 따라 김치의 숙성이 촉진된다. 이것은 고추중에 김치발효균이 젖산균, 특히 *Leuconostoc mesenteroides*의 생장을 촉진하여 김치의 맛을 촉진하여 김치의 맛을 좋게 하는데 도움이 되는 부재료이며, 생육촉진 효과물질은 당류라고 이⁽¹⁰⁾는 추정하였다.

2. 마늘

본 실험에서는 pH는 대조군에 비해 높게 유지되었으며 숙성 7일부터 숙성 12일까지 pH4를 유지하였고, 산도도 대조군보다 숙성 전기간동안 낮게 유지되었다.

마늘 첨가군은 산도 0.6%에 도달한 시간이 8일 걸렸다. 그리고, 5일까지는 산도의 증가가 고춧가루 첨가군에 이어 빠르게 증가했지만, 그후로는 다른 양념에 비해 느리게 증가하는 경향을 보였다. 또한, pH의 변화에서 5일째까지는 급격히 저하되지만 다른 양념보다는 높은 값을 보인다. 그후 12일까지는 변화가 거의 없는 것으로 보아 숙성은 빨리 시키는 역할을 하지만 저장성을 높이는 효과가 있는 것으로 사료된다. 이는 이 등⁽¹⁴⁾은 마늘 첨가구가 숙성 2일째까지는 대조구에 비해 높은 경향을 나타내었다가 3일 이후 오히려 낮은 경향을 나타내었다는 보고와 비슷한 경향을 보이고 있다.

또한 이는 이⁽¹⁰⁾의 보고에서 마늘이 젖산균의 발효를 비교적 낮은 수준으로 오래 지속되게 하여 김치의 가식일수를 늘이는 저장성 향상에 필요한 부재료라고 서술한 것과 일치하였다.

마늘은 백합과의 식물로 살균, 정장, 간장 등에 효과가 있다. 또한, 마

늘 속에 들어 있는 allicin은 효소 allinase의 작용으로 allicin으로 되어 매운맛을 내며 allicin은 비타민 B1의 효과를 높인다.

마늘은 고추와 마찬가지로 김치의 숙성을 촉진한다는 연구결과가 많이 보고되고 있다. 이⁽¹¹⁾의 연구에서는 마늘의 함량(0-6%)을 달리하여 담근 김치를 21℃에서 8일간 숙성시키면서 화학성분의 함량변화를 측정한 실험에서 마늘의 양이 많을수록 적정산도는 빠르게 증가한다고 보고하였다. 이는 마늘첨가로 *Leuconostoc mesenteroides* 등의 젖산균의 생육이 촉진되었기 때문이라고 여겨진다.⁽¹²⁾ 우⁽¹³⁾의 결과에서는 3%만을 가된 김치의 숙성이 초기에는 빠른 것으로 보고하였는데, 이는 마늘이 발효초기에 호기성 세균의 번식을 억제하여 상대적으로 젖산균 발효를 우세하게 했기 때문이라고 하였다.

생강 첨가균은 숙성초기부터 전 숙성 기간동안 높은 pH와 낮은 산도를 유지하였다. 특히 숙성 7일 이후도 pH 4 이상을 유지하였다.

적정산도인 0.6%까지 이르는 기간이 15일로 대조군이 5일인 것에 비해 12일이나 늦게 도달하였다. 또한 pH변화도 저장 18일째에도 0.39로 높은 값을 보였다.

경도 변화도 다른 양념을 넣은 시료에 비해 대체적으로 높은 값을 보였다.

생강 첨가균은 숙성 3일째까지는 소금만 넣은 시료보다 산도가 높지만 그후에는 다른 양념에 비해 월등히 낮은 값을 보였다. 이와 같은 결과로 볼 때 생강은 깍두기의 숙성을 억제하므로 저장성을 연장시키는 양념이라고 사료된다. 이 같은 결과는 이 등⁽¹⁴⁾의 보고에서 절임배추에 생강을 3%씩 첨가하여 25℃에서 4일간 숙성시킨 결과, 생강 첨가균이 숙성을 지연시키는 결과를 나타낸 것과 유사한 결과이다.

생강은 매운 맛 성분인 gingeron과 shagol과 향기성분인 citral

linalool등이 함유되어 있다. 생강이 김치의 숙성에 관여하는 젖산균 *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. cerevisiae*, *L. mesenteroides*의 성장을 억제한다는 보고가 있다.^(14, 15)

또한 젖산균, 특히 *L. mesenteroides*의 생육을 촉진한다는 최근의 결과 또한 나와 있다.

3. 파

파는 숙성 2일까지는 pH가 대조군보다 높았으나 3일 이후부터 대조군보다 낮았으며 산도는 대조군보다 낮게 나타났다.

이와 같은 파만을 배추에 첨가하여 12-16℃에서 7일간 숙성한 경우, 숙성 초기에는 낮았으나 숙성 4일째에 산도가 급격히 증가한 것으로 보아 파가 숙성 촉진 효과와 연관이 있으리라는 연구 결과⁽¹⁶⁾와는 약간 다른 양상이 나타났다. 박 등⁽¹²⁾은 생강과 파를 각각 농도를 달리하여 첨가했을 때 발효속도, pH 및 적정산도가 대조구와 큰 차이가 없음을 발견하였다. 파는 자극성분인 황하ally이 있어 살균, 살충의 효력이 있다. 칼슘, 인, 철분이 많고 비타민이 많은 것이 특색이며 녹색부분에는 비타민 A와 C가 많다.

4. 식염

소금만 첨가한 깍두기는 대조군에 비해 숙성 3일까지는 pH가 높고 산도는 가장 낮았으나 숙성 3일 이후에는 산도가 급격히 증가하였으나, 대조군 보다는 낮게 유지되었다. 식염만을 첨가한 깍두기는 숙성적정 산도의 0.6%에 도달하는 시간이 10일로써 다른 시료에 비해 산도의 증가가 늦은 편이다. 이 깍두기군은 숙성 기간 중 다른 양념을 넣은 시료에 비해 경도가 대체로 낮은 경향을 나타내었다.

소금은 김치 숙성에서 미생물의 발육을 막고 발효를 억제하는 작용이 있

다. 배추, 무 등의 채소를 소금에 절이면 삼투압의 차이에 의해서 소금은 채소에 들어가지 않고 채소 세포에서 수분이 빠져나와 원형질분리를 일으켜 세포는 죽게 되고 원형질막의 반투성이 없어져서 세포안팎의 용액교류가 자유롭게 이루어져 숙성하게 된다.⁽¹⁷⁾ 김치저장의 효과적인 염농도가 3%로 보고^(18, 19)된 바 있으나, 안⁽²⁰⁾은 김치발효에 있어서 식염의 첨가효과는 3%미만에서는 김치의 숙성을 촉진하고, 4%이상에서는 김치발효를 크게 억제한다고 보고하였다. 이와 유사하게 김⁽²¹⁾도 김치제조에는 3%정도의 식염이 알맞으며 이보다 식염의 양이 적으면 김치의 빛깔은 좋으나 쉽게 산패되고 연부현상이 일어나기 쉬우나 6%이상을 사용하면 잘 익지않고 색깔과 맛이 나빠진다고 하였다. 한편, 민과 권⁽¹⁸⁾은 김치발효시 고온, 저식염 농도에서 보다 저온, 고식염 농도에서 발효기간이 연장되었다고 하였다.

5. 물

물만을 깎두기에 첨가한 것은 산도가 5일째까지 급격히 증가하다가 그 후로 월등히 낮은 값을 나타내는 것으로 보아 물은 무가 무르게 하는 역할을 하고, 숙성 초기에 숙성을 돕지만, 저장성에서는 나쁜 영향을 주는 것으로 추측된다.

6. 요약

숙성적정기의 산도를 0.6%(Lactic acid)로 보았을 때, 숙성적기에 도달하는 기간이 대조군이 5일인데 비해 고춧가루 첨가군은 대조군과 유사하고, 파 첨가군은 7일, 마늘 첨가군은 8일, 소금만을 첨가한 군은 10일, 생강 첨가군은 15일이었다.

이로 보아, 고춧가루는 깎두기의 숙성을 촉진한다. 그러나 마늘은 소금, 생강은 깎두기의 숙성을 억제하고, 가식일수를 늘이는 저장성 향상에 효과

적이다. 식염은 깎두기의 숙성은 지연시키지만 숙성 후기에는 촉진시켜 저장성을 높이지는 못하는 것으로 나타났다.

제 3 절 오미자 및 백강잠 추출물의 깎두기 부패균에 대한 항균성 및 깎두기 숙성에 미치는 영향

1. 백강잠 추출물의 깎두기 주부패균에 대한 항균성 및 깎두기 숙성에 미치는 영향

백강잠의 에탄올 추출물 1% 및 3%, 또는 물추출물 10%를 깎두기 제조시에 각각 첨가하여 20℃에서 저장하면서 경시적으로 pH, 산도, 환원당, 유산균수 및 질감특성(경도)을 측정된 결과는 다음과 같다.

pH 는 숙성 3일에 대조구는 4.41인데 비해 에탄올 3%첨가구는 5.24, 에탄올1%첨가구는 4.97로 대조구보다 높았다. 숙성적기의 산도(Lactic acid, %)를 0.6%로 보았을때, 에탄올 1%첨가구는 3.2일, 에탄올 3%첨가구는 3.8일이었다. 숙성3일째의 유산균수는 대조구는 87×10^6 (cfu/ml)에 비해 에탄올 1%첨가구는 55×10^6 (cfu/ml), 에탄올 3%첨가구는 33.1×10^6 (cfu/ml)로 대조구보다 매우 낮았다.

경도는 대조구의 경우 숙성 3일 이후부터 숙성말기까지 서서히 감소하였다. 에탄올 1%첨가구는 숙성 6일 동안 대조구보다 높은 경도를 유지하다가 숙성7일 이후엔 감소하였다. 환원당은 에탄올추출물은 숙성 전기간동안 대조구에 비해 환원당이 높았다. 백강잠 물추출물은 에탄올추출물보다 효과가 크지 않았으나 대조구보다는 저장성이 약간 크게 나타났다. 항균력은 깎두기에서 분리한 주부패균에 대해 Paper Disc Method로 측정하였는데, 백강잠의 계통별 용매 추출 분획물에 대한 항균test한 결과, 백강잠의 항

균력은 나타나지 않았다. 숙성도(pH, 산도, 유산균수), 질감특성(경도), 환원당, 항균력을 측정한 결과를 종합해 볼때 백강잠 물추출물은 에탄올 추출물보다 효과가 크지는 않았으나 대조구보다 저장성이 약간 연장 되었으며, 백강잠의 에탄올 추출물은 깍두기의 저장기간을 연장시키는데 효과적인 천연물질로 사료되었다.

2. 오미자 추출물의 깍두기 주부패균에 대한 항균성 및 깍두기 숙성에 미치는 영향

오미자의 에탄올 추출물 1%, 3% 또는 물추출물 10%를 깍두기 제조시에 첨가하여 20℃에서 저장하면서 경시적으로 pH, 산도, 환원당, 유산균수 및 질감특성(경도)을 측정한 결과는 다음과 같다.

pH는 숙성 3일에 대조구는 4.41인데 비해 에탄올 1%첨가구는 4.57로 대조구보다 높았으나 에탄올3%첨가구는 4.06으로 대조구 보다 낮았다. 숙성 적기의 산도(Lactic acid, %)를 0.6%로 보았을때, 에탄올1%첨가구는 4.2일, 에탄올3%첨가구는 대조구에 비해 매우 높게 나타났다. 숙성3일째의 유산균수가 대조구는 87×10^6 (cfu/ml)에 비해 에탄올 1%첨가구는 27.1×10^6 (cfu/ml), 에탄올 3%첨가구 37.3×10^6 (cfu/ml)이었다. 또 깍두기 숙성 중 깍두기 무의 경도는 대조구의 경우 숙성 3일 이후부터 숙성말기까지 서서히 감소하였다. 에탄올 3%첨가구는 숙성전기간 동안 대조구보다 높았으며, 에탄올 1%첨가구는 숙성3일 이후엔 높은 경도를 유지하다가 숙성7일 이후엔 경도가 감소하였다.

깍두기 숙성중 환원당 함량의 변화는 다음과 같다. 오미자 에탄올추출물을 첨가한 깍두기는 숙성전기간 동안 대조구에 비해 환원당이 높았다. 오미자 물추출물을 첨가한 깍두기의 저장성은 연장효과가 없었다.

한편 항균력은 깍두기에서 분리한 주부패균에 대해 Paper Disc Method로 측정하였으며, 오미자의 계통별 용매 추출 분획물에 대한 항균력을 test하

였다. 항균력 test결과는 오미자 부탄을 용매 분획에서 1.2cm의 clear zone이 나타나 강한 항균력을 나타내었다.

숙성도(pH, 산도, 유산균수), 질감특성(경도), 환원당, 항균력을 측정된 결과를 종합해 볼때 오미자 물추출물은 깍두기의 저장성 연장효과가 없었으며, 오미자의 에탄올추출물은 깍두기의 저장기간을 연장시키는데 효과적인 천연물질로 사료되었다.

3. 요약

김치의 저장성 연장을 위한 연구는 배추김치를 대상으로 많이 이루어져 왔고 깍두기에대한 연구는 미비하다. 김치는 주재료에 따라서 김치의 특성이 다를 뿐 아니라 깍두기는 배추김치에 비해 제조가 간단하고 소비량도 많으므로 본 연구에서는 오미자 및 백감장의 물 또는 에탄올 추출물이 깍두기의 저장성을 연장시킬 수 있는지 알아보하고자 하였다.

오미자의 에탄올추출물은 시료와 95%에탄올을 1:9의 비율로 각각 첨가하여 30℃에서 24시간 추출한후 추출액을 멸균여과지로 여과하고 농축(감압 증발농축기, EYELA 및 3%, Japan) 하여 membrane filter(Whatman 0.2 μ m)로 여과한액 에탄올 추출물 1% 를 또는 물추출물 10%를 깍두기 제조시에 첨가하여 20℃에서 저장하면서 경시적으로 pH, 산도, 환원당, 유산균수 및 질감특성(경도)을 측정하였다. pH는 숙성 3일 에 대조구는 4.41인데 비해 에탄올 1%첨가구는 4.57로 대조구보다 높았으나 에탄올 3%첨가구는 4.06으로 대조구보다 낮았다. 숙성적기의 산도(Lactic acid, %)를 0.6%로 보았을때, 에탄올 1%첨가구는 4.2일, 에탄올 3%첨가구는 대조구에 비해 너무 높게 나타났다. 숙성3일째의 유산균수가 대조구는 87×10^6 (cfu/ml)에 비해 에탄올 1%첨가구는 27.1×10^6 (cfu/ml), 에탄올 3%첨가구는 37.3×10^6 (cfu/ml)이었다. 경도는 대조구의 경우 숙성3일 이후부터 숙성말기까지 서서히 감소하였다. 에탄올 3%첨가구는 숙성전기동안 대조구보다 높았으며, 에탄

을 1%첨가구는 숙성3일 이후엔 높은 경도를 유지하다가 숙성7일 이후엔 경도가 감소하였다. 환원당을 측정된 결과 오미자 에탄올추출물은 숙성전기간동안 대조구에 비해 환원당이 높았다. 오미자 물추출물은 깎두기의 저장성 연장효과가 없었다. 항균력은 깎두기에서 분리한 주부패균에 대해 Paper Disc Method로 측정하였다. 오미자의 계통별 용매 추출 분획물에 대한 항균력 test한 결과, 오미자 부탄을 용매 분획에서 1.2cm의 clear zone이 나타났다.

백강잠의 에탄올추출물은 시료와 95%에탄올을 1:9의 비율로 각각 첨가하여 30℃에서 24시간 추출한후 추출액을 멸균여과지로 여과하고 농축(감압증발농축기, EYELA, Japan)하여 membrane filter(Whatman 0.2 μ m)로 여과한액 에탄올 추출물 1% 및 3%를 또는 물추출물 10%를 깎두기 제조시에 각각 첨가하여 20℃에서 저장하면서 경시적으로 pH, 산도, 환원당, 유산균수 및 질감특성(경도)을 측정하였다. pH는 숙성 3일에 대조구는 4.41인데 비해 에탄올 3%첨가구는 5.24, 에탄올 1%첨가구는 4.97로 대조구보다 높았다. 숙성적기의 산도(Lactic acid, %)를 0.6%로 보았을때, 에탄올 1%첨가구는 3.2일, 에탄올 3%첨가구는 3.8일이었다. 숙성3일째의 유산균수가 대조구는 87×10^6 (cfu/ml)에 비해 에탄올 1%첨가구는 55×10^6 (cfu/ml), 에탄올 3%첨가구는 33.1×10^6 (cfu/ml)로 대조구보다 매우 낮았다. 경도는 대조구의 경우 숙성 3일이후부터 숙성말기까지 서서히 감소하였다. 에탄올 1%첨가구는 숙성 6일동안 대조구보다 높은 경도를 유지하다가 숙성 7일이후엔 감소하였다. 환원당은 에탄올추출물은 숙성전기간동안 대조구에 비해 환원당이 높았다. 백강잠 물추출물은 에탄올추출물보다 효과가 크지 않았으나 대조구보다는 저장성이 약간 크게 나타났다. 항균력은 깎두기에서 분리한 주부패균에 대해 Paper Disc Method로 측정하였다. 백강잠의 계통별 용매 추출 분획물에 대한 항균test한 결과, 백강잠의 항균력은 나타나지 않았다.

제 4 절 韓藥材 分劃抽出物에 의한 김치 유산균 및 효모의 沮害 效果

1. 깍두기 숙성중의 pH 및 산도의 변화.

깍두기를 제조하여 20℃에 저장하면서 경시적으로 PH 와 산도를 측정한 결과, 제조 직후의 pH는 6.0, 산도는 0.08%였으며, 깍두기의 pH는 감소하여 저장 2.5일에 4.2에 달하였다가 완만하게 감소하였으며, 산도는 저장 직후부터 증가하여 2.5일에 0.6%(lactic acid)에 도달하였고 그 이후 계속 증가하는 양상을 보여 전형적인 김치숙성 양상을 나타내었다. 따라서 깍두기를 20℃에서 저장하였을 때, 숙성 적기는 2.5일로 사료되었고 저장 7일 이후에는 시어지는 것으로 관찰되었다.

2. 깍두기 숙성에 미치는 식물성 천연물의 영향

약용 식물 60종의 식물성 천연물의 열수추출액을 깍두기에 첨가하여 20℃에 저장하면서 대조군의 숙성 적기인 저장 2.5일(60시간)에 도달하였을 때의 pH산도 및 경도를 측정한 결과를 Table 13.에 나타내었다. 숙성적기는 산도가 0.6%(lactic acid)에 도달하는 데 걸리는 시간으로 나타내었다. 대조군의 숙성적기인 저장 2.5일(60시간)의 산도 0.6%를 기준으로 하였을 때 대조군의 산도인 0.6%보다 50%이하로 낮은 산도를 나타낸 천연물은 갈근, 감국, 금은화, 길경, 녹차, 대황, 백모근, 백목련, 백작약, 백지, 산사, 산약, 상백피, 석창포, 영지, 진피, 초피, 포공영, 홍화 등의 44종이었다. 이들 천연물 첨가 깍두기에 대하여 숙성 적기의 산도인 0.6%에 도달할 때까지의 20℃에서 저장하면서 적정산도에 도달하는 기간을 측정하였을 때, 상기 44종 천연물 첨가 깍두기의 숙성 적기는 모두 120시간 이상으로

나타났다.

깍두기 무의 경도가 대조군에 비해 40~50%정도 높게 나타난 것으로는 금은화, 목향, 방풍, 백모근, 산약, 초피의 6종이었다. 산도가 대조군의 50%(0.3% lactic acid)이하이면서 경도가(30%이상) 높은 것은 금은화, 목향, 방풍, 백모근, 산약, 죽엽, 초피, 차전자의 9종이었다. 따라서 60종의 식물성 천연물 중에서 금은화, 백모근, 산약, 초피 등의 12종은 적정산도에 도달하는 기간을 연장시켰고, 깍두기 무의 경도도 대조군보다 30%이상 높았으므로 깍두기의 저장성 연장에 효과적인 물질로 사료되었다.

Table 13. Effect of medicinal plants addition on kakdoogi fermentation for 60 hours.

Sample name		pH	Acidity (Lacticacid ,%)	Time (hr)	Hardness (Sample/ Control)
Korean	Scientific				
Control		4.20	0.60	60 1)	1.00 2)
갈근	<i>Pueraria thunbergiana</i>	4.65	0.25*	122	1.12
감국	<i>Chrysanthemum sinense</i>	4.83	4.65*	134	1.11
결명자	<i>Cassia tora</i>	4.63	0.69	44	0.93
구판	<i>Chinemys reevesii</i>	4.84	0.20*	140	1.12
금은화	<i>Lonicera japonica</i>	5.22	0.18*	150	1.48
길경	<i>Platycodon grandiflorum</i>	4.46	0.24*	142	0.94
녹차	<i>Camellia sinensis</i>	4.65	0.26*	158	0.81
당귀	<i>Angelicae gagatis</i>	3.96	0.19*	155	1.19
대황	<i>Rheum undulatum</i>	5.42	0.20*	252	0.72
도인	<i>Prunus persia</i>	4.26	0.31	108	1.15
두충	<i>Eucommiulmoides Oliver</i>	4.53	1.31	34	0.99
만형자	<i>Vitex rotundifolia</i>	4.34	0.71	57	1.21
모과	<i>Chaenomeles lagenaria</i>	3.99	0.20*	174	1.46
목향	<i>Saussurea lappa</i>	4.40	0.25*	130	1.42
방풍	<i>Phellopterus littoralis</i>	3.85	0.26*	118	1.37
백모근	<i>Imperata cylindrica</i>	4.68	0.29*	136	1.71
백복령	<i>Pachyma hoelen</i>	4.64	0.34*	126	1.15
백작약	<i>Paeonia albiflora</i>	5.59	0.13*	204	1.19
백지	<i>Angelicae dahuricae</i>	4.67	0.38*	104	1.04
백하수오	<i>Cynanchum silfordii</i>	4.72	0.21	116	1.08
사상자	<i>Cnidium monnier</i>	4.37	1.14	30	0.87
산두근	<i>Sophora subprostrata</i>	4.55	0.27*	167	0.75
산사	<i>Crataegus pinnatifoda</i>	4.94	0.23*	130	1.28
산약	<i>Dioscorea batatas</i>	4.94	0.21*	239	1.43
산초	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	4.75	0.31*	104	0.79
상백피	<i>Morus alba</i>	4.96	0.15*	169	1.04
석창포	<i>Acorus gramineus</i>	5.27	1.17*	255	1.24
소엽	<i>Erillae herba</i>	4.59	0.26*	122	1.02
솔잎	<i>Pinus rigida</i>	4.40	0.27*	130	1.24
송화	<i>Pinus rigida</i>	4.40	0.31	112	0.58

1) Time (hour) to reach the optimum ripeness that shows acidity of 0.6%(lactic acid).

2) Hardness of control is 5870kg

* acidity below 50% compared with control continued.

Table 13. Effect of medicinal plants addition on kakdoogi fermentation for 60 hours

Sample name		PH	Acidity (Lacticacid,%)	Time (hr)	Hardness (Sample/ Control)
Korean	Scientific				
Control		4.20	0.60	60	1.00
쇠무릅	<i>Achyranthes japonica</i>	4.27	1.39	23	0.88
속지황	<i>Rehmannia glutinosa</i>	3.97	0.22*	171	0.76
승마	<i>Cinicifuga foetida</i>	4.76	0.29*	138	0.99
신이화	<i>Manfnolia liliflora</i>	4.69	0.30	105	0.76
어성초	<i>Hauttuynia cardata</i>	4.41	0.94	30	1.31
엄나무	<i>Ralipanax pictum</i>	4.32	0.52	54	0.97
영지	<i>Ganderma lucidum</i>	4.20	0.32*	206	1.15
오가피	<i>Acanthopanax sessiflorum</i>	4.61	0.26*	151	1.12
오미자	<i>Schizandra chinensis</i>	4.12	0.54	63	0.74
은행잎	<i>Ginko biloba</i>	4.57	0.44	71	0.92
음양곽	<i>Epimedium koreanum</i>	4.58	0.30*	203	1.27
인진쑈	<i>Aritemisiae capillaris thunb</i>	4.75	0.31*	131	1.21
작약	<i>Peonia lactiflora</i>	3.96	0.20*	147	1.23
죽엽	<i>Phyllostachys edulis</i>	4.74	0.25*	130	1.30
진피	<i>Citrus tangerina</i>	4.78	0.28*	178	1.03
차전자	<i>Plantage asiatica</i>	3.97	0.25	135	1.31
천궁	<i>Cnidium officinale</i>	4.37	0.68	30	0.95
천우슬	<i>Cyathula officinale</i>	4.62	0.37	136	1.08
천화분	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	4.58	0.30	136	1.27
청호	<i>Artemisiae annuae herba</i>	4.76	0.31*	138	0.83
초피	<i>Zanthoxylum pipertum</i>	4.85	0.35*	153	1.84
측백	<i>Thuja orientalis</i>	4.44	0.25*	139	1.02
택사	<i>Alismatis plantago</i>	4.14	0.27*	319	1.33
토사자	<i>Cuscuta australis</i>	4.10	0.34	114	1.22
포공영	<i>Taraxacum mongolicum</i>	4.79	0.39	71	1.15
행인	<i>Prunus armeniaca</i>	3.99	3.24*	148	1.22
향부자	<i>Cyperus rotundus</i>	3.90	0.21*	179	1.23
현삼	<i>Scrophularia buergeriana</i>	4.43	0.30*	125	1.04
홍화	<i>Carthamus tinctorius</i>	4.37	0.24*	219	1.15
황금	<i>Scutellaria baicalensis</i>	4.06	1.59	19	1.32

Table 14. Antimicrobial activities of chloroform extract on the several microorganisms

Plant	Clear zone on plate (mm)					Solublesolid Content (mg/disc)
	<i>L. mesent</i>	<i>L. plant</i>	<i>L. brevis</i>	<i>S. faeca</i>	<i>S. cere</i>	
	<i>-eroides</i>	<i>-arum</i>		<i>-Lis</i>	<i>-visiae</i>	
결명자	11	14	18	0	0	0.08
구기자	0	0	0	0	0	0.8
금은화	12	12	11	10	10	2.1
대황	11.5	14	18	12	10	0.06
백모근	0	0	9	0	0	0.06
백작약	12	0	0	0	0	0.2
백지	15	12	15	10	0	0.3
산사	15	0	10	0	0	0.14
산약	0	0	0	0	0	0.07
은행잎	13	13	9	11	16	0.3
포공영	15	0	0	17	0	0.1
복분자	0	0	12	13	13	0.2
목단피	17.5	14	17	15	14	0.29
지골피	0	0	0	0	0	0.1
느릅나무	0	0	0	0	0	0
만삼	0	0	0	0	0	0.28
백출	12	13	13	12	9	0.4
진피	0	0	0	0	0	0.18
석창포	14.5	16	18	14	11	0.1
초피	15	14	15	13	14	0.1
홍화	0	0	12	11	0	0.15

3. 물 추출물의 항균성 검색

21종의 약재 물 추출물로 그람 양성균 1종과 유산균 3종과 효모 1종에 항균성을 검색한 결과는 Table 15와 같다. 즉, *L. mesenteroides*에는 항균성을 나타내는 추출물이 없었으며, *L. plantarum*과 *L. brevis*에는 산사 추출물이, *S. faecalis*에는 산사, 은행잎 등의 추출물이 항균성을 가진것으

로 검색되었고, *S. cerevisiae*에는 항균성을 나타내는 추출물이 없었다. 클로로포름과 물 추출물에 대한 항균성 검색에서 클로로포름 분획물의 경우가 훨씬 강한 항균력을 나타내었다. 이 등은(16) 31종의 식물을 에탄올과 물로 추출하여 얻은 추출물로 *B. subtilis*와 *L. plantarum*등에 대한 항균성을 검색하였는데 거의 대부분 에탄올 추출물의 항균성이 물추출물보다 높았다고 하였다. 또한 이 등은(20) 느릅뿌리의 클로로포름 분획에서 항균 효과를 보였다고 하였다. 따라서 일반적으로 극성보다는 비극성인 용매에 용해되는 성분이 높은 항균성을 보인다고 사료된다.

Table 15. Antimicrobial activities of water extract on the several microorganisms

Plant	Clear zone on plate (mm)					Soluble solid Content (mg/disc)
	<i>L. mesent</i>	<i>L. plant</i>	<i>L. brevis</i>	<i>S. faeca</i>	<i>S. cere</i>	
	<i>-eroides</i>	<i>-arum</i>		<i>-lis</i>	<i>-visiae</i>	
결명자	0	0	0	0	0	0.18
구기자	0	0	0	13	0	1.48
금은화	0	0	0	0	0	1.0
대황	0	0	0	0	0	1.1
백모근	0	0	0	0	0	1.2
백작약	0	0	0	0	0	1.0
백지	0	0	0	0	0	0.8
산사	0	12	13	20	0	1.1
산약	0	0	0	0	0	0.3
은행잎	0	0	0	14	0	0.6
포공영	0	0	0	0	0	0.3
복분자	0	0	0	0	0	0.3
목단피	0	0	0	0	0	0.9
지골피	0	0	0	0	0	0.5
느릅나무	0	0	0	0	0	0.9
만삼	0	0	0	11	0	1.7
백출	0	0	0	0	0	0.8
진피	0	0	0	0	0	1.4
석창포	0	0	0	0	0	0.2
초피	0	0	0	0	0	0.5
홍화	0	0	0	13	0	0.8

4. 항균성 물질의 열 안정성

포공영 클로로포름 추출물에 함유되어있는 항균활성 물질의 열 안정성을 조사하기 위하여 추출물을 60~100까지 10℃간격으로 1시간동안 열처리한 후 *S. faecalis*에 대한 생육 저해환을 측정한 결과(Fig. 5), 100℃에서 1시간동안의 열처리에 의해서도 균주의 생육 저해환의 크기가 대조구와 비

슷한 것으로 보아 포공영 클로로포름 추출물 중의 항균활성 물질은 열에 안정하였다.

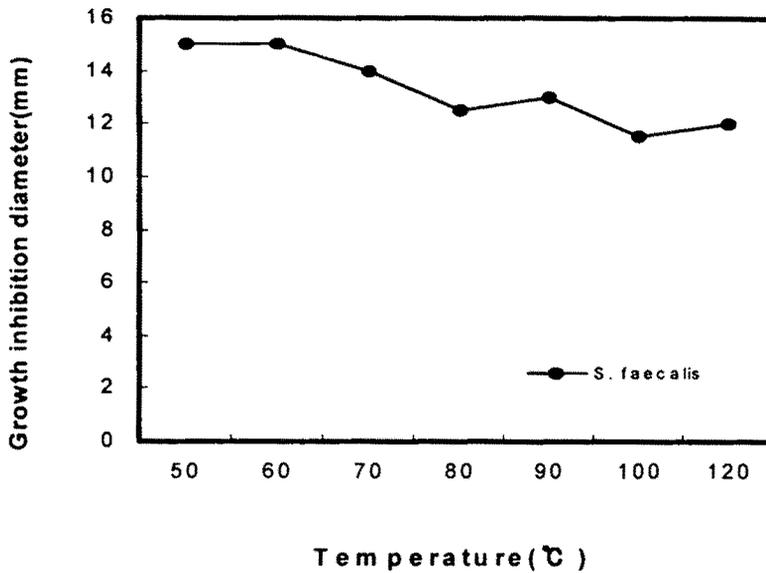


Fig 5. Effect of heat treatment on the growth inhibitory activity of chloroform extract for *Streptococcus faecalis* KCTC 2011.

5. 항균성 물질의 pH 안정성

포공영 클로로포름 추출물에 함유 되어있는 항균활성 물질의 pH안정성을 조사한 결과(Fig. 6), pH 1~13 에서도 항균활성의 변화가 거의 없었다.

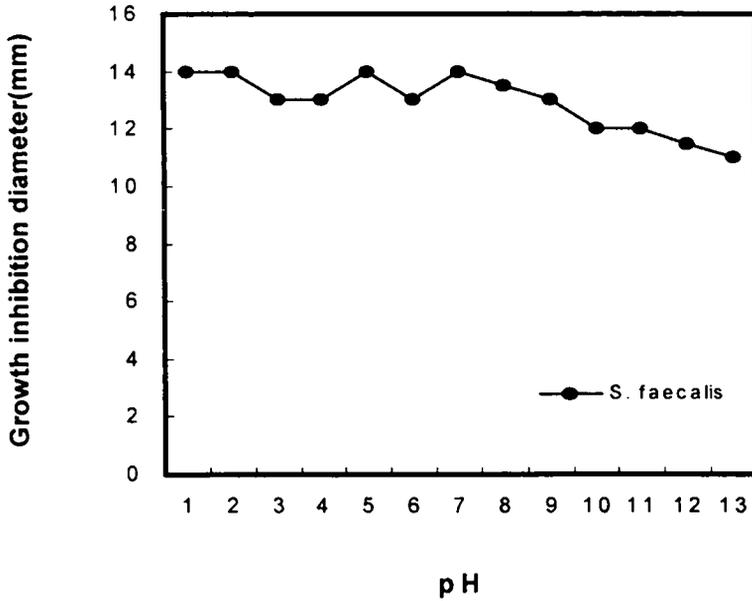


Fig 6. Effect of pH treatment on the growth inhibitory activity of chloroform extract for *Streptococcus faecalis* KCTC 2011.

6. 균의 생장 곡선 및 pH

본 실험에 사용한 균주의 생장곡선 및 pH 는 Fig. 7과 Fig. 8에 나타낸 바와 같다.

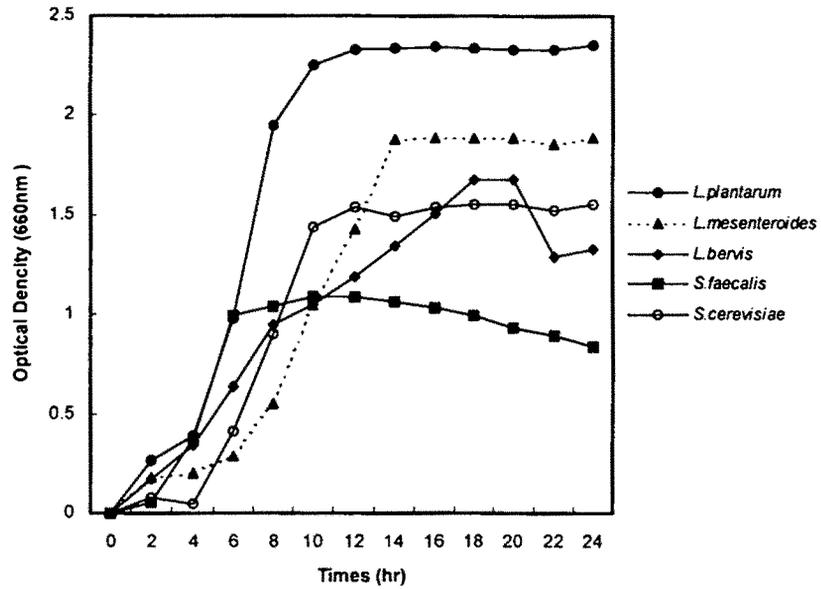


Fig 7. Growth curve of the several microorganisms for 24 hours.

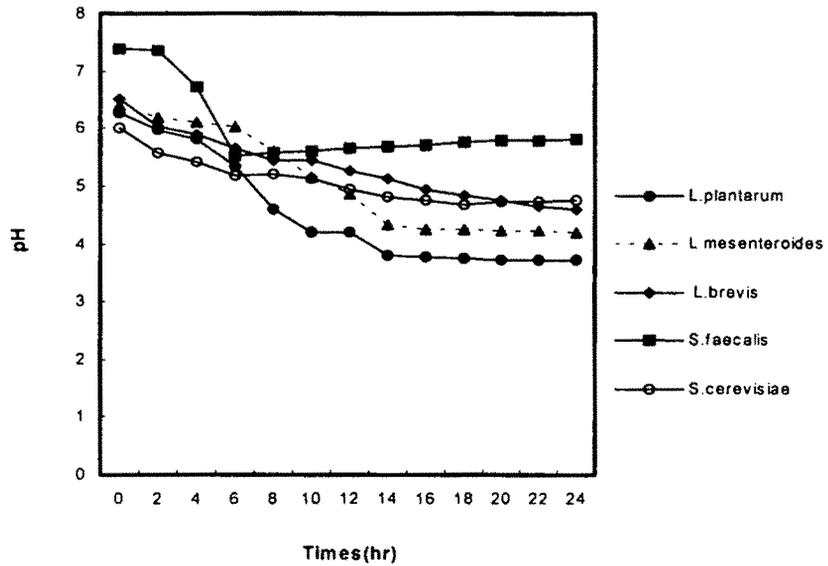


Fig 8. pH of the several microorganisms for 24 hours.

7. 최소 저해농도 측정

클로로포름 추출물의 최소 저해농도를 측정한 결과는 Fig 9와 같다. 클로로포름 추출액의 최소 저해농도는 그람 양성균인 *S. faecalis*는 20mg/ml였고, 유산균인 *L. mesenteroides*, *L. plantarum*, *L. brevis*는 5mg/ml로 가장 낮았으며, 효모인 *S. cerevisiae*는 10mg/ml를 나타냈다.

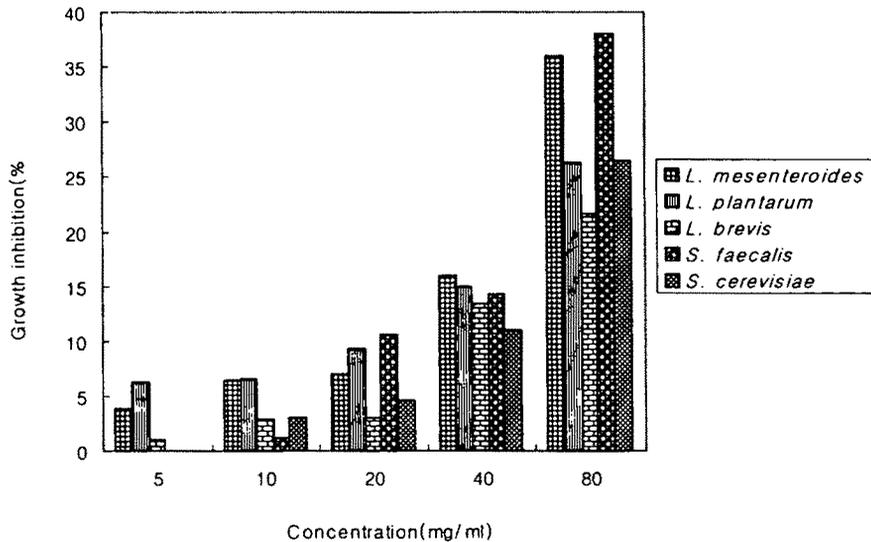


Fig 9. Minimum inhibitory concentration(MIC) of the chloroform extract against several microorganisms

8. 클로로포름 추출물의 농도별 항균효과

포공영 클로로포름 추출물을 5~80mg/ml까지 농도별로 첨가한 배지에서 균 증식을 조사한 결과, 그람 양성균인 *S. faecalis*는 Fig 13, 유산균인 *L. mesenteroides*는 Fig 10, *L. plantarum*은 Fig 11, *L. brevis*는 Fig 12,

효모인 *S. cerevisiae*는 Fig 14에 나타낸 바와 같다.

그람 양성균인 *S. faecalis*는 20mg/ml이하에서 12시간까지 균 증식이 약간 증가하다가 그 이후 서서히 감소하였고, 40mg/ml에서는 증식 저지효과를 나타내어 80mg/ml에서는 성장이 억제되었다.

유산균인 *L. mesenteroides*는 10mg/ml이하의 추출물을 함유한 배지에서는 균 증식이 약간 증가함을 보였으나 24시간 이후부터는 서서히 균 증식이 감소하다가 20mg/ml에서는 억제되다가, 40mg/ml에서는 균증식이 억제되었다. *L. plantarum*은 10mg/ml이하의 추출물을 함유한 배지에서는 36시간까지 오히려 균증식이 촉진되다가 48시간 이후부터 균 증식이 서서히 감소하였으며, 40mg/ml에서 다소 균증식이 억제되다가 80mg/ml에선 상당히 감소되었다. *L. brevis*는 추출물의 첨가구별로 차이는 있으나 배양시간이 증가함에 따라 점차 증가하였으며, 40mg/ml에서 감소하다가 80mg/ml에서 다소 억제되었다. 효모인 *S. cerevisiae*는 10mg/ml이하의 저농도에서는 오히려 촉진되었으며, 40mg/ml에선 대조구보다 약간 감소하였으며, 80mg/ml에선 다소 감소하였다.

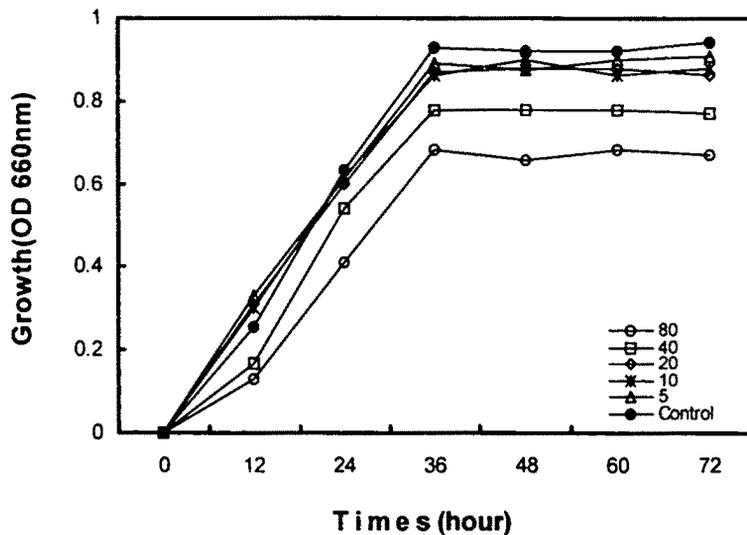


Fig 10. Effect of growth inhibition by chloroform extract of *Taraxacum monglicum* on *Lenconostoc mesenteroides* KCTC 3505.

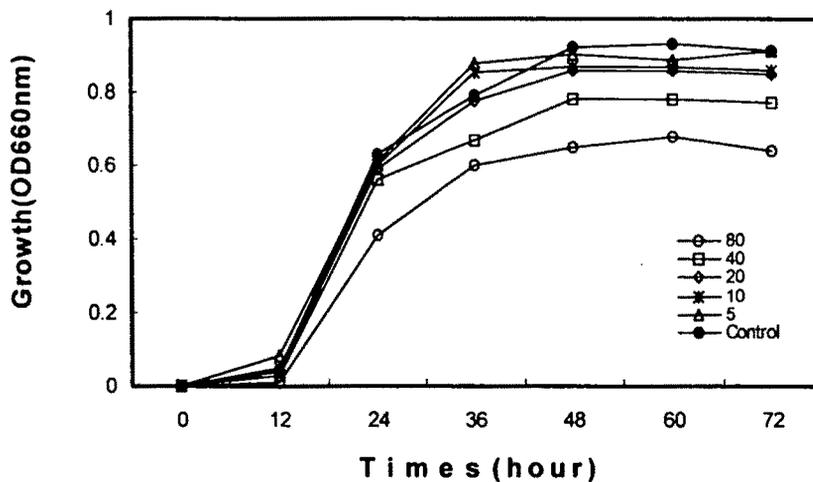


Fig 11. Effect of growth inhibition by chloroform extract of *Taraxacum monglicum* on *Lactobacillus plantarum* KCTC 3108.

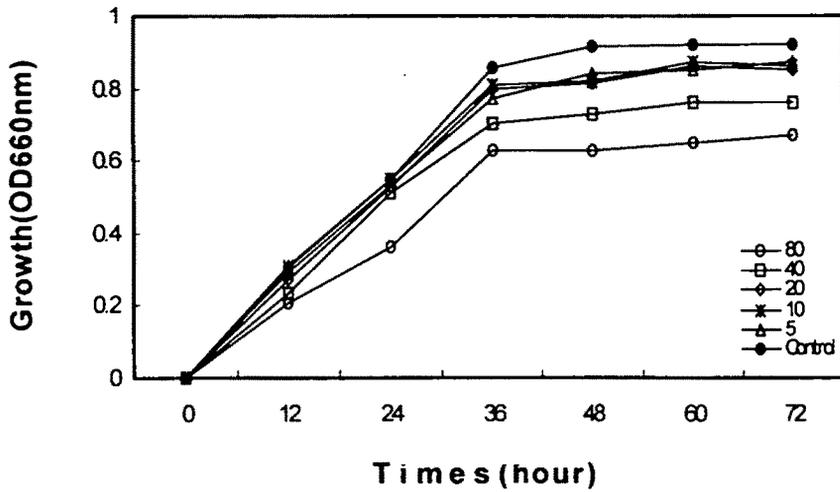


Fig 12. Effect of growth inhibition by chloroform extract of *Taraxacum monglicum* on *Lactobacillus brevis* KCTC 3102.

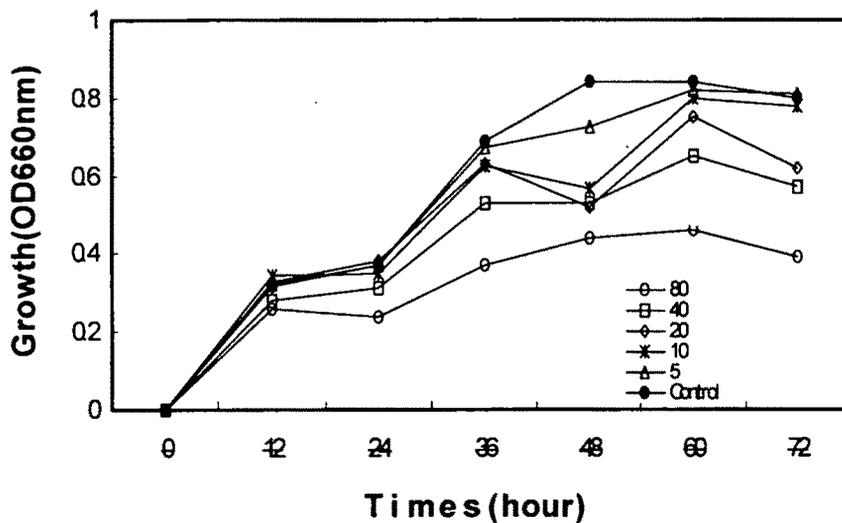


Fig 13. Effect of growth inhibition by chloroform extract of *Taraxacum monglicum* on *Streptococcus faecalis* KCTC 2011.

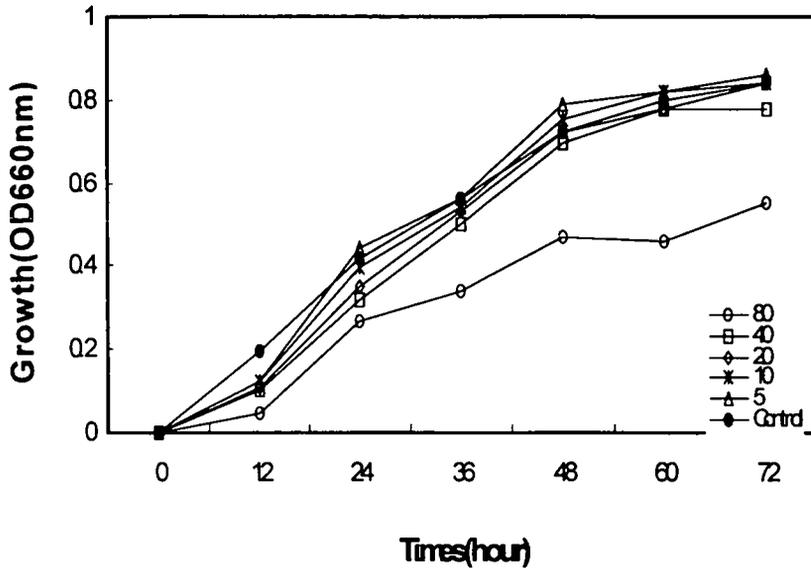


Fig 14. Effect of growth inhibition by chloroform extract of *Taraxacum mongolicum* on *Saccharomyces cerevisiae* KCTC 7904.

9. 추출물의 분획별 항균성 및 항미생물 활성

포공영 클로로포름 분획 추출물 중의 항균성 물질을 분리할 목적으로 용매 계통분획하여 얻은 핵산, 사염화탄소, 염화메틸렌 및 60%메탄올 분획물의 항균활성을 disc plate method에 의한 생육 저지환을 측정하여 각 균주에 대한 억제효과를 검색한 결과는 Table 16과 같다.

세균의 경우 그람 양성균과 유산균 모두 60%메탄올 분획물에서 현저한 생육억제효과가 나타났으며, 염화메틸렌 분획물에서도 60%메탄올 분획물보다는 낮지만 대부분의 균주에 대하여 항균활성을 보였다. 핵산 분획물에서는 *L. mesenteroides*와 *S. faecalis*가 다른 균주와는 달리 약간의 항균효과를 보였다. 효모의 경우는 세균에서와는 달리 60%메탄올 분획물에서만 발

육억제효과를 나타내었다. 이상의 결과로 볼 때 포공영 클로로포름 추출물의 항균성 물질은 특정용매에만 용해되지 않고 일부 다른 용매에도 용해되는 성분으로서 한가지 성분이라기 보다는 여러 가지 성분이 서로 복합적으로 작용하고 있는 것을 알 수 있으며, 포공영 클로로포름추출물의 항균활성물질이 염화메틸렌과 60%메탄올의 두 분획물로 많이 이행되었음을 알 수 있었다.

추출물의 분획별 항미생물활성을 측정한 결과는 Fig. 15와 같다. 4개의 fraction중 용매분획별로 살펴보면 핵산이 가장 높았고 그 다음이 사염화탄소, 60% 메탄올 그리고 염화메틸렌 층의 순이었다. 이러한 결과는 액체배지가 고체배지보다 활성이 더 높은 것은 균중식에 대한 물리적인 조건이 고체배지에서보다 양호하기 때문으로 생각된다. 즉, 고체배지에서는 한천의 사용량과 추출물의 물리적 성질에 따라 항균성 물질의 확산정도와 각 균종에 대한 감수성이 달라질 것으로 예측된다.(13)

Table 16. Antimicrobial activities of fractions from chloroform extract of *Taraxacum mongolicum* against several microorganisms.

Solvent	Clear zone on plate (mm)					Soluble solid content (mg/disc)
	<i>L. mesent</i>	<i>L. plant</i>	<i>L. brevis</i>	<i>S. faeca</i>	<i>S. cere</i>	
	<i>-eroides</i>	<i>-arum</i>		<i>-lis</i>	<i>-visiae</i>	
Hexane	11	0	0	10	0	0.1
CCl ₄	0	0	0	11	0	0.4
CH ₂ Cl ₂	12	13	15	11	0	0.5
60% MeOH	17	15	15	14	10	0.2

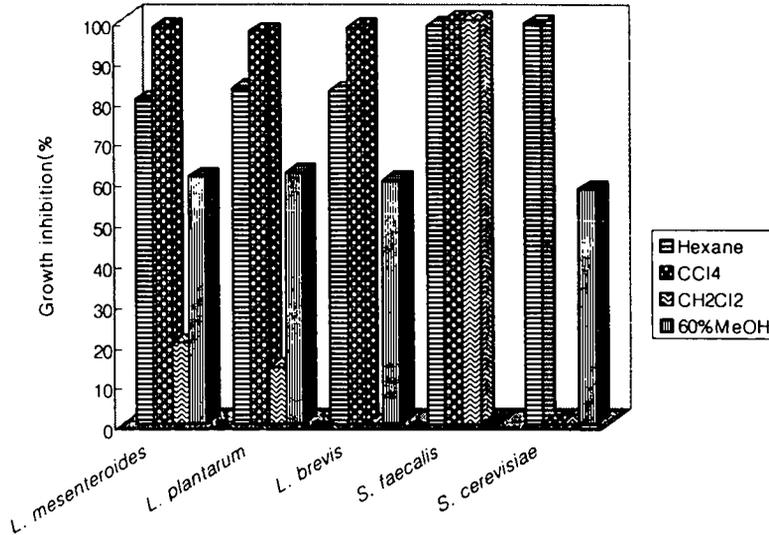


Fig 15. Antimicrobial effect of chloroform fraction in *Taraxacum mongolicum* on the growth of several microorganisms.

10. 요약

상온에서 김치의 산패를 억제하여 보존성을 증가시키는 방법을 모색하고자 약용식물로 이용되는 식물성 천연물의 열수추출물의 첨가가 깎두기의 저장성을 연장시킬수 있는지를 예비검색하여 우수한 효과가 인정되는 천연물을 실험대상으로 클로로포름과 물로 분획추출하여 김치의 산패 및 연부현상에 관여하는 유산균 및 산막효모 5균주에 대하여 항균활성을 측정한 결과 그중 항균 spectrum이 전체적으로 나오는 천연물을 제외하고 특정균에 특이적인 천연물을 대상으로 하였는데, 특히 항균력이 강한 포공영을 대상으로 하여 클로로포름 분획추출물로 농도별 항균성을 시험하였고, 헥산, 사염화탄소, 염화메틸렌, 60%메탄올 순으로 용매분획하여 얻은 분획물의 항균 활성을 검토한 결과는 다음과 같다. 포공영 클로로포름 분획추출

물은 5균주중 *L. mesenteroides*와 *S. faecalis*의 2균주에서 항균효과가 나타났는데, 특히 유산균 3종의 최소 생육저해 농도가 5mg/ml로 가장 낮게 나타났다. 또한 클로로포름 분획추출물의 항균성 검색결과 가장 항균력이 강했던 *S. faecalis*는 120℃.에서 30분간 가열한 후에도 활성이 유지되었으며, pH의 변화에도 영향을 받지 않았다. 그리고 포공영 클로로포름 분획추출물이 미생물의 증식에 미치는 영향과 전자현미경에 의한 세균의 형태 변화를 살펴본 결과, 포공영 클로로포름 분획추출물의 농도별 항균활성은 대부분의 유산균과 그람 양성균인 *S. faecalis*에서는 40mg/ml이상의 첨가시 강하게 나타났으며, 효모인 *S. cerevisiae*에서는 세균에 비해 항균력이 약하게 나타났다.

제 4 장 참 고 문 헌

1. 백수경, 최숙경, 김복희, 윤혜영, 모수미, 김인숙, 강성구, 김종락 : 충북 벽촌 지역 국민학교 아동의 식생태에 관한 연구. 한국식문화학회지, 5, 217 (1990)
2. 차보숙, 김우정, 변명우, 권중호, 조한옥 : 김치의 저장성 연장을 위한 gamma 선 조사. 한국식품과학회지, 21, 1039 (1989)
3. 김순동, 윤수홍, 강명수, 박남숙 : 깍두기의 숙성에 미치는 감압 및 polyethylene film 포장 처리 효과. 한국영양식량학회지, 15(1), 39(1988)
4. 민태익, 권태완 : 김치발효에 미치는 온도 및 식염 농도의 영향. 한국식품과학회지, 16, 443 (1984)
5. 최동원, 김주봉, 유명식, 변유량 : 배추 조직의 가열 연화의 속도론적 연구. 한국식품과학회지, 19(6), 515 (1987)
6. 송석훈, 조재선, 김권 : 김치 보존에 관한 연구 - 김치 발효에 미치는 방부제의 영향에 관하여. 기술연구보고, 5, 5 (1966)
7. 김우정, 강근옥, 경규향, 신재익 : 김치의 저장성 향상을 위한 염혼합물의 첨가. 한국식품과학회지, 23, 188 (1991)
8. 안숙자 : 김치에서 분리한 유산균의 생육에 미치는 식염과 식품보존료의 영향. 한국조리과학회지, 4(2), 39 (1988)
9. 문광덕, 변정아, 김석중, 한대석 : 김치의 선도 유지를 위한 천연보존제의 탐색. 한국식품과학회지, 27(2), 257 (1995)
10. 황인주, 윤의정, 황성연, 이철호 : 보존료, 젓갈, $CaCl_2$ 첨가가 김치 발효중 배추잎의 조직감 변화에 미치는 영향. 한국식문화학회지,

393, 309 (1988)

11. 임향의, 양익환 : 우리 나라 김치의 포장과 저장 방법에 관한 연구. 한국농화학회지, 13, 207 (1970)
12. 이철우, 고창영, 하덕모 : 김치 발효 중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지, 20(1), 102 (1992)
13. 안선정, 이귀주 : 김치의 발효 과정 중 펙틴질과 조직감의 변화에 대한 젓갈과 chitosan 첨가의 영향. 한국조리과학회지, 11(3), 97 (1995)
14. 이진희, 이해수 : 양파가 김치발효에 미치는 영향. 한국조리과학회지, 8(1), 27 (1992)
15. 김경제, 경규항, 명원경, 심선탐, 김현구 : 김치류 저장 기간 연장을 위한 무 품종 선발에 있어서 발효성 당함량의 역할. 한국식품과학회지, 21(1), 100 (1989)
16. 남궁석, 조종호, 신광순 : 김치류의 저장 중 pH 및 질산염과 아질산염 함량의 변화. 한국영양학회지, 15(1), 39 (1982)
17. 김우정, 구경형, 조한옥 : 김치의 절임 및 숙성 과정 중 물리적 성질의 변화. 한국식품과학회지, 20(4), 483 (1988)
18. 구경형, 강근옥, 김우정 : 김치의 발효과정 중 품질 변화. 한국식품과학회지, 20(4), 476 (1988)
19. 이광혁, 조형용, 변유량 : 총산도를 기준한 김치의 품질수명 예측모델 연구. 한국식품과학회지, 20(4), 483 (1988)
20. 김선재, 박근형 : 부추추출물의 김치발효지연 관련 미생물 증식 억제. 한국식품과학회지, 27(5), 813 (1995)
21. 김선재, 박근형 : 식물성 김치재료 추출물의 항미생물활성. 한국식품

- 과학회지, 27(2), 216 (1995)
22. 김미리, 김진희, 손명춘, 안계화, 신은자 : 무품종이 깎두기 숙성에 미치는 영향, 한국식품과학회, 추계학술발표 p105, 1997
 23. 김미리, 김진희, 김혜영 : 절임유무에 따른 깎두기 숙성도 변화, 한국식품영양과학회, 추계학술발표 p75, 1997
 24. 조영, 이진희 : 김치 부재료가 *Leuconostoc mesentroides* 및 *Lactobacillus plantarum*의 생육에 미치는 영향, 한국조리과학회지, 10(1), 35 (1994)
 25. 장경숙 : 김치용 천연 pH 조정제 연구. 한국영양식량학회지, 18(3), 327 (1989)
 26. 박옥연, 장동석, 조학래 : 한약재 추출물의 항균 효과 검색. 한국영양식량학회지, 21(1), 91 (1992)
 27. 이병완, 신동완 : 식품 부패미생물의 증식을 억제하는 항균성 물질의 검색, 한국식품과학회지, 23(2), 200 (1991)
 28. Paul, P.C and Palmer, H.H : Food theory and application. Helen Charly, p 251 (1972)
 29. 이양희, 양익환 : 우리나라 김치의 포장과 저장 방법에 관한 연구 한국농화학학회지. 13.207(1970)
 30. 정호권 : 김치통조림의 간헐적 열처리 방법. 특허 공보 제 150호 (1967)
 31. 권숙표, 최건우 : 김치의 산패방지 보존법. 특허 공보 제 152호 (1967)
 32. 김창식, 김정호, 정병호 : 김치 통조림 제조법. 특허 공보 제 135호 (1967)
 33. 조인석, 이석연 : 김치의 산패 방지법. 특허 공보 제 163호(1968)

34. 송석훈, 조재선, 김 권 : 김치 보존에 관한 연구.
35. 정호권 : Studies on the effect of furyl furamide(AF-2) on Korean Kimchi. 한국농화학회지. 12. 57(1969)
36. 김순동 : 김치숙성에 미치는 pH조성제의 영향. 한국영양식량학회지. 14. 259(1985)
37. 구경형, 강근옥, 김우정 : 김치의 발효과정중 품질변화. 한국식품과학회지 20. 4. 476(1988)
38. 이진희 : 부재료가 김치 발효에 미치는 영향. 한국농화학회지(1991)
39. 이상금, 신일식, 정덕영, 홍운호, 임현숙 : 마늘 첨가량을 달리한 김치의 숙성도에 따른 변화. 한국식품학회지. 21. 68.(1989)
40. 박우포, 김재옥 : 향신료가 김치 발효에 미치는 영향. 한국농화학회지. 4. 161.(1989)
41. 이선화, 우순자: 배추김치 숙성중 일부 첨가 재료가 질산염, 아질산염 및 Vitamin C함량에 미치는 영향.
42. 이신호, 김순동: 김치의 부재료가 김치 숙성에 미치는 효과. 한국영양식량학회지, 17. 249(1988)
43. 장경숙: 배추김치의 숙성에 미치는 mono sodium glutamate의 영향. 한국영양식량학회지. 19. 342(1990)
44. 유재연, 이혜성, 이혜수: 재료의 종류에 따른 김치의 유기산 및 휘발성 향미성분의 변화. 한국식품과학회지. 16. 169(1984)
45. 이신호, 김순동: Starter첨가가 김치의 숙성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지. 17. 342(1988)
46. 민태익, 권태완: 김치 발효에 미치는 온도 및 식염 농도의 영향. 한국식품과학회지. 16. 443(1984)

47. 최신양, 이한웅, 정건섭 : 저장 김치의 *Leuconostoc mesenteroides* IFO 1260 및 niacin 첨가에 의한 *Escherichiaoh*의 소장. 한국영양식량학회지, 21. 414(1992)
48. 안승효: 김치제조에 관한 연구(제1보) 조미료 첨가가 김치 발효에 미치는 효과. 국립공업연구소 연구보고. 20. 61(1970)
49. 김상순: 김치이야기. 식품공업. 66.23(1970)
50. 한국식품연감, 농수축산신문, pp 496 (1991)
51. 정귀화, 이혜수., 숙성기간에 따른 무 김치의 텍스처와 섬유소, 한국조리과학회지, 2(2):68 (1986)
52. 김소연, 엄진영, 김광옥., Calcium acetate 및 potassium sorbate를 첨가한 깍두기의 품질특성, 한국식품과학회지, 23(1):1 (1991)
53. 이신호, 임용숙., 김치에서 분리한 유산균의 생육에 미치는 오미자 추출물의 영향, 국산업미생물학회지, 25(2):224(1997)
54. 정대균, 유리나 : 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지, 27(6), 1035(1995)
55. 강성구, 성낙계, 김용두, 신수철, 서재신, 최갑성, 박석규 : 갯추출물의 항균활성 검색. 한국영양식량학회지, 23(6), 1008(1994)
56. Kupchan's partition scheme, J. Org. Chem. 38:178(1973)
57. 강성구, 성낙계, 김용두, 이재근, 송보현, 김영환, 박석규: 갯의 에탄올 추출물이 미생물 생육에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 23(6), 1014(1994)
58. K. J. Klindworth, D.M. Davidson, C.J. Brekke, A.L. Brekke and A.L. Branen: Inhibition of *Clostridium perfringens* by Butylated Hydroxyanisole. J. Food Sci., 44(2): 564 (1979)
59. 이명완, 신동화: 식품부패미생물에 대한 천연항균성물질의 농도별 및

- 분획별 항균 특성. 한국식품과학회지, 23(2), 205(1991)
60. 조성환, 이상열, 김재원, 고경력, 서일원: Grapefruit 종자 추출물로 부터 광범위 항균제 개발 및 응용에 관한 연구- Grapefruit종자 추출 물의 항균제 검색. 한국식품위생 안전성학회지, 10, 33(1995)
 61. 박옥연, 장동석, 조학래 : 자초추출물의 항균특성. 한국영양식량학회 지, 21(1), 97(1992)
 62. 안은영, 한지숙, 신동화 : 상백피 추출물중 *Listeria monocytogenes* 증식억제 물질의 분리 및 효과. 29(6), 1236(1997)
 63. Wang-GD., Zhang-YM., Xiong-XY : Clinical and experimental study of burns treated locally with Chinese herbs. Chung-His-I-Chieh-Ho-Tsa-Chin, 11(12), 727(1991)
 64. 신동화, 김문숙, 한지숙 : 국내산 약용식물 추출물에 대한 항균성 검 색과 농도별 및 분획별 항균특성. 한국식품과학회지, 29(4), 808(1997)
 65. 김순임, 한영실 : 산초로부터 항균성 화합물의 분리 및 동정. 한국식 품과학회지, 13(1), 56(1997)
 66. 서권일, 박석규, 박정로, 김홍출, 최진상, 심기환 : 겨자 가수분해물 의 항균성 변화. 한국영양식량학회지, 25(1), 129(1996)

제 2 세부과제. 장류 보존제 연구

여 백

제 2 세부과제. 장류 보존제 연구

제 1 장 서 론

우리나라의 전통식품인 장류는 발효조미료로서 어떤 합성조미료보다 우리의 기호에 적합하며 가장 널리 사용됨으로써 생활 필수품과 마찬가지로 취급되고 있는 실정이다. 종래에 미생물 배양으로 생산된 효소에 의해 콩 단백질의 분해가 일어나는 발효속성에 관한 연구⁽¹⁾와 숙성후의 독특한 향미와 향기성분에 관한 분석보고들^(2,3)이 간장과 된장의 주된 연구 결과이었다. 다른 각도에서 간장의 높은 식염농도에서 생육할 수 있는 미생물들⁽⁴⁾도 분리 동정되어 있는 상태이다.

장류 공업은 일본과 더불어 우리나라에서 많은 연구와 발전을 이룩하였음에도 불구하고 앞으로 장류가 하나의 상품으로서의 가치를 높이기 위해 다른 각도에서 연구를 단행해야 한다고 본 연구자는 생각하여 간장의 제품으로서의 손실을 유발하는 팽창의 원인인 균주를 동정하고자 했다. 본 연구에서는 간장이 제품으로 생산되어 시중에서 유통되는 중에 장기간 방치되었을 경우 발생하는 제품의 손상을 규명하고자 시도를 하였다. 시판되고 있는 간장제품이 시야로도 확인 가능할 정도로 팽창한 것을 보고 분리와 동정을 통해서 팽창 원인균주가 효모라는 것을 밝혀냈다. 이미 간장 koji에는 다수의 효모가 존재한다는 사실이 밝혀졌고, 제조일수의 경과에 따라 효모균수도 증가한다는 사실이 보고되었다^(5,6). 효모는 덧에 생육하면서 당류를 발효하여 알코올과 기타의 향기성분을 만들며, 대부분이 내염성 효모로 제조과정에 생육하는 효모중 대부분은 담금기가 경과함에 따라 도태되고 내염성 효모만이 생육하게 된다고 한다⁽⁷⁾.

Saccharomyces rouxi⁽⁸⁾중에는 유용효모외에 산막성 유해효모인 *Zygosaccharo-mycetes salsus*, *Zygosaccharomyces japonicus*도 있는데, 이것은 호기적으로 간장덧이나 제품표면에 산막을 형성하면서 번식하여 외관뿐 아니라 실제적으로 악영향을 끼친다는 보고도 있다^(3,8). 우리가 동정해낸 효모는 유해성 효모이며 산막효모라기 보다는 팽창의 주범인 팽창효모이다. 이것은 기존의 유해성 효모와 다른 맥락의 효모이기 때문에 상당한 의의를 갖는다고 생각한다. 이 효모의 번식을 방지하기 위한 보존제에 대한 연구도 시도했다. 간장을 오래 방치하면 발생하는 *Saccharomyces rouxi*의 유연균이나 *Pichia*, *Hansenula*와 같은 유해성 미생물의 번식을 막기 위해 이미 간장의 보존제로서 POBA ester(p-hydroxybenzoic acid ester)류와 안식향산 및 안식향산의 Na염등이 사용되고 있는 실정이다⁽³⁾. 그러나 이런 기존의 보존제가 합성화합물이기 때문에 인체에 유해할 수도 있다는 면을 간과할 수 없는 추세이다. 이런 이유로 해서 천연에 존재하는 보존제의 탐색이 시급한 실정이다. 본 연구는 간장제품 외관의 악영향의 주범인 미생물의 탐색과 이 미생물에 항균력을 갖는 천연보존제에 대해서도 조사 연구하였다.

또한 한국인의 식생활에 있어 조미용 식품으로서 필요불가결한 것으로 전부터 널리 이용되어져온 마늘은 항균작용, 항산화작용 및 합황화합물들에 의한 약리효능등은 이미 익히 알려진 사실이며 최근에는 마늘의 생리적 활성물질에 의한 항진균작용, 항암작용, 혈압강화작용 및 당뇨병예방등의 성인병 예방에도 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

마늘중에 약 0.3%-0.4% 존재하는 allicin은 Gram 양성균과 Gram음성균 모두에 대하여 포자의 발아와 균의 성장을 억제하는 항균성을 가지며 대사 질환에 대한 약리작용도 있음이 보고되었다. 마늘이 식용 및 의약용으로 이용되게 된 것은 마늘의 합황아미노산의 일종인 allicin이 분해되면서 마

늘 특유의 자극신미성분을 생성시키기 때문인 것으로 보고되었다.

건조한 마늘은 생마늘보다 냄새와 자극취가 약하게 된다. 그러나 물을 가하여 복원시켜서, 효소가 작용하는 상태로 되면 냄새가 발현된다. 희석되지 않은 상업용 garlic oil 의 경우 flavor의 강도는 건조한 마늘의 200 배, 생마늘의 약 900배에 달한다고 한다. garlic oleoresin은 휘발성냄새의 강도에 있어서 건조 마늘의 약 12배, 생마늘의 50배에 해당된다고 한다.

이에 본 연구에서는 여러 천연물과 함께 마늘도 간장부패균에 대한 항균성실험을 같이 행하면서 요즘 각광받고 있는 마늘에서 oleoresine을 추출하여 역시 항균활성을 검사하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

1. 균주배양 및 균주의 동정

균주 배양에 사용한 PDA배지와 PDB배지는 Difco사의 제품을 사용하였으며, 간장은 시판되고 있는 부패성이 보이는 제품을 구입하였고, tartaric acid는 선택배지를 만들기 위해 PDA배지에 첨가했다. 분리한 균주를 동정하기 위해 API사의 당분석 kit인 API 20C AUX(BIO MERIEUX, France)를 사용하였다.

2. 천연물 및 기타재료

본 실험에서 사용한 마늘은 단량재래종으로 1997년 대전시 유성시장에서 구입하여 엽경을 제거하고 인경부위만을 취하여 마늘 추출물의 원료로 상하였다.

항균Test는 각종 천연물을 수취해서 직접 유기용매로 추출해서 농축시킨 것을 사용하였다. 팽창 Test는 160ml의 용기와 가로11cm, 세로 13cm의 비닐을 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 팽창균주의 순수분리

제품으로 나온 간장중 부패하여 용기가 팽창한 간장을 선별하여 다음과 같은 방법으로 균주를 분리하였다. 0.85% NaCl가 9ml씩 들어있는 시험관에

간장의 표층을 1ml을 취하여 넣고 잘 섞어 준후 10^5 까지 희석한 것을 PDA 배지에 평판도말하였다. 30℃에서 48시간 배양하여 Domain 으로 작용한 균주를 선별하였고, Tartaric acid 10%를 첨가하여 만든 선택배지에서 이들 균주를 도말하여 얻은 2가지 단일 균락을 JIM, CHS라고 각각 명명하였다.

2. 현미경 관찰을 통한 형태학적 동정

순수 분리한 2가지 균주의 동정의 첫 단계는 현미경 관찰을 통해 두 균주를 비교하였다. 방법은 다음과 같다. Slide glass 에 증류수 한 방울을 떨어뜨리고 그 위에서 CHS Yeast와 JIM Yeast를 각각 한 백금이 따서 얇게 펴 바른 후 Cover glass를 덮고 현미경 배율을 400배로 관찰하였다. CHS와 JIM Yeast의 형태를 더 구체적으로 구분, 비교하기 위해 사진을 찍어 관찰하였다.

3. API kit를 이용한 생화학적 동정

프랑스에서 개발한 API kit의 종류중 효모 동정용으로 만들어진 API 20C AUX를 사용하였다. 이것은 당발효⁽⁹⁾를 통해서 효모의 종을 밝히는 것으로서 kit의 사용 manual대로 따르면 된다. 위에서 분리한 효모를 3일동안 액체배양을 한 24시간 이전의 효모를 사용하였고, 0.85% NaCl용액으로 2번 세척을 한 후 kit중 c medium에 효모를 균질화 시켰다. 이것을 ample의 coupule에 멸균한 pasteur pipet으로 채웠다. 뚜껑을 덮고, 30℃에서 배양하면서 24시간, 48시간, 72시간 경과후의 결과를 확인하고 기록하였다.

4. 팽창성 여부 확인 실험

진미와 청실효모로 순수 분리된 plate의 집락을 일백금이 취해서 PDB가 든 flask에 넣어 잘 섞은 후 30℃ 배양기에서 3일 동안 액체 배양한 것을

사용하였다. 3면이 봉해진 비닐과 160ml의 용기를 소독한 후 멸균한 간장을 비닐에는 50ml씩 용기에는 100ml씩 넣어서 JIM효모와 CHS 효모를 각각 비닐에는 5ml, 용기에는 20ml을 넣었다. 비닐과 용기의 control로는 멸균 간장을 효모액량만큼 첨가하여 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉하고, 30℃ 배양기에서 배양하였고 그 경과를 지켜보았다.

5. Oleoresine의 추출

박피하여 마쇄시킨 마늘에 6종의 유기용매를 이용하여 여러 비율로 가하여 일정 온도로 유지되는 항온기 내에서 시간별로 진탕(80strokes/min, 15cm, stroke length)시키면서 추출한 후 여과(Toyo No. 5A)하였다. 여액에 무수 황산나트륨을 가하여 냉암소에서 하룻밤 방치하여 수분을 제거하고 감압 농축기로 40℃에서 농축시켜 oleoresin추출물로 하였으며 이때 추출수율을 측정하였다.

6. 항균력 실험

국내의 한약방과 대전 인근 지역의 들이나 산에서 자라는 야생의 식물을 채취하여 얻은 농축액을 이용하였다. 이 천연시료는 90가지를 사용하였으며, 10g의 분말화된 시료를 methanol, chloroform, H₂O, hexane의 각각의 유기용매에 3일간 침지하고, 그로부터 얻어진 여액을 evaporator로 용매를 제거시킨후 농축시켜서 액상의 시료로 만들었다.

생육배지로서 petri dish에 기충용배지 (1.5% agar)를 부어 응고시킨후 55℃의 수욕상에 미리 flask에 준비해둔 중충용배지(0.75% agar)에 시험균액 일정량(배지:액체배양균=3ml:30 μ l)을 무균적으로 첨가한 후 혼합하였다. 기충용 배지에 중충용배지를 3ml 부어 고르게 도포시켜 응고시킨것에 추출물을 묻힌 disc를 꽃잎처럼 놓아 밀착시켰고, 0.85% 식염수(75 μ l)를

pipet으로 disc위에 떨어뜨려 천연물이 묻은 disc의 화합물을 확산되도록 하였다^(10,11). disc를 시험용 평판배지 위에 놓아 밀착시켜 4℃ 냉장고에서 1시간동안 방치한 다음 30℃ 배양기에서 24~48hr동안 배양시킨 후, disc 주변의 clear zone의 직경을 측정하였다. 각 시료의 항균의 여부와 역가가 나타나는 시료의 환의 범위를 측정하였다.

제 3 장 연구결과

제 1절 천연물의 항균활성실험

1. 간장효모의 생화학적 동정

동정은 API 사의 당 Test kit의 identification index에 근거하여 다음과 같이 동정되었다.

CHS효모

	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH

Ident.:

6052000: *Torulopsis maris* %id= 99.4 (ADO 16%) (XLT 83%)

6052004: *Candidas rugosa* %id= 68.9 (XLT 79%) (ADO 5%)

Torulopsis maris %id= 25.5 (ADO 16%) (XLT 83%)

(HYPH 16%)

JIM효모

	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
O	GLU	GLY	2KG	ARA	XYL	ADO	XLT	GAL	INO	SOR	MDG	NAG	CEL	LAC	MAL	SAC	TRE	MLZ	RAF	H/PH

Ident.:

6406273: *Hansenula anomala* 99.8% (Hyphae 86%)

6406377: " 99.9%

상기 결과를 보면 CHS 효모는 Identity 83%의 *Torulopsis maris*였고,

JIM 효모는 Identity 99%의 *Hansenula anomala*로 동정되었다(Fig. 1).

그것의 현미경적 검사결과를 보면 Fig. 2와 같다.

*Hansenula*속은 유포자 효모류에 속하며, 배양액면에 피막을 형성하여 *Pichia*속과 같이 산막효모로 알려진다. 보통 ethyl acetate와 같은 ester를 생성하는 것이 많다. 질산염을 동화하는 것이 *Pichia*속과 다르다. 당의 발효성은 종에 따라 없거나 미약하며 동태 또는 이태접합을 하는 것이 있다.

*Hansenula anomala*는 *Hansenula* 속의 대표적인 종으로 포자를 형성하고 포자는 내부에 유적을 가지며 모자형이다. 과일향과 같은 ester를 생성하며 청주 등 주류의 후숙에 관여한다. 세포는 구형, 반구형 또는 타원형, 가성균사를 간혹 볼 수 있으며 자낭은 접합에 의하지 않고 형성된다. 자낭 포자는 모자형, 1자낭중에 1~4개의 포자를 내생한다. 질산염을 이용하고, glucose발효를 하며, 최소한 이당류의 하나는 발효를 한다. 형태학적인 결과와 생화학적 동정의 결과를 볼 경우 CHS효모는 *Torulopsis maris*이었고, JIM효모는 *Hansenula anomala*였다. 여기에서 *Hansenula anomala*는 산막효모로도 이미 알려져 있다.

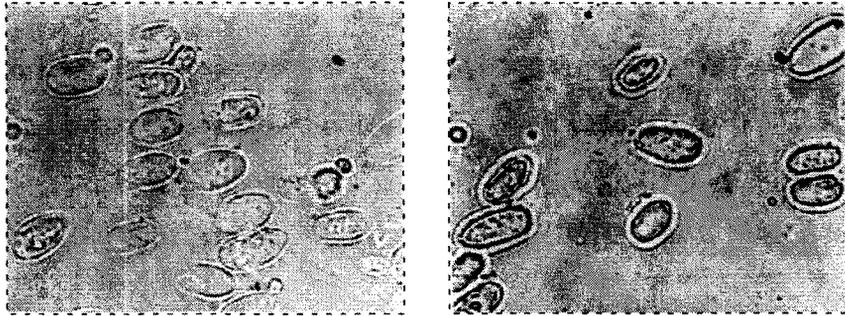


(A)



(B)

Fig. 1. Application of API 20C AUX for CHS Yeast(A) and JIM Yeast (B)



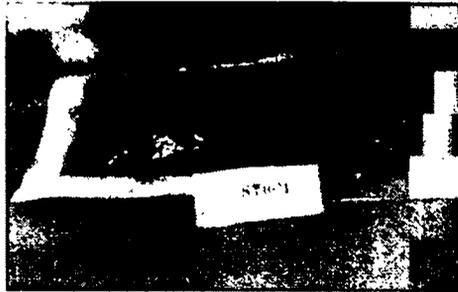
(A)

(B)

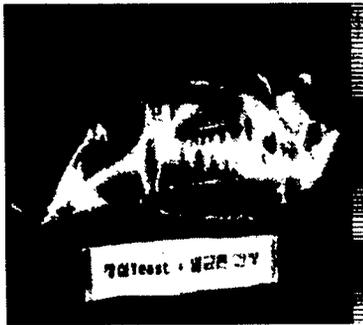
Fig.2. Morphology of CHS Yeast(A) and JIM Yeast(B) isolated soy sauce by using electromicroscope

2. 팽창 Test의 결과

비닐과 용기에 각각 멸균한 간장을 넣고, JIM효모와 CHS효모를 일정량 넣어서 control과 함께 30℃에서 정치 배양한 결과는 다음과 같았다 (Fig.1). 전체적으로 비닐이 용기보다 더 뚜렷한 변화를 확인할 수 있었고, CHS효모를 투입한 비닐과 용기가 JIM효모를 투입한 것보다 팽창하는 시간이 더 짧았고, 또한 팽창되는 정도도 컸다. 배양 7~8일째에 CHS효모 쪽에서 먼저 부풀어 올랐고, 배양 10일째에 아주 팽팽하게 비닐이 부풀어 올랐음은 Fig.2에서 확인 할 수 있다. 이 실험의 결과로 본 연구는 간장에서 분리한 균주가 팽창효모임을 증명하였다.



(A)



(B)



(C)

Fig.3. Swelling test of Soy sauce added Yeast: Identification from soy sauce

(A) Sterilized Soy sauce (B) Sterilized Soy sauce + CHS Yeast

(C) Sterilized Soy sauce + JIM Yeast

3. Oleoresin의 추출

잘게 썰어 마쇄시킨 후 20mesh의 체를 통과시킨 마늘 마쇄물 20g 에 6종의 유기용매를 5배량 가하여 25℃에서 1시간 동안 진탕 추출시켰을 때의 oleoresin수율을 Table에서 나타내었다. methanol을 사용하여 추출한 경우 추출수율이 20.3%로서 6종의 유기용매 중에서 가장 높았고, 그 다음이 ethanol, acetone순으로 높았으나 ethylether, hexane등은 수율이 1% 이내로 극히 저조하였다. 이러한 수율의 차이는 사용 용매간의 극성차에 따른 것으로 생각되며 본 실험에 사용한 마늘의 수분 함량이 64%이고 그외 고형물의 대부분이 탄수화물인 점을 감안한다면 대체로 극성이 강한 methanol이 hyrophilic component 들을 충분히 함유하는 oleoresin 추출에 적합할 것으로 여겨진다. 그러나 추출후 농축과정 중 용매를 회수시킬 때 미량이나마 잔류하게되는 methanol의 완전 제거가 다소 문제가 된다. 또한 마늘의 overall flavor를 좌우하는 성분으로서 마늘 생체 중량의 0.2%정도 함유된 volatile oil 이 있어, 이것의 조성 중 60%는 diallyl disulfide, 20%는 diallyl trisulfide 및 6%는 allyl propyl disulfide가 차지하는데 이들 성분을 효과적으로 추출해 낼 수 있는 용매로서는 낮은 비점과 비인화성이며 회수가 용이한 것들이었다.

Table.1. Antibiotic effect of solvents on loeoresin extraction from freshy garlic

Solvent	Yield(% day basis)	Clear zone(cm)	
		CHS Yeast	JIM Yeast
Methanol	20.3	4.1	5.5
Acetone	3.8	3.8	3.6
Ethanol	6.7	3.6	4.9
Ethyl acetate	2.5	1.2	1.3
Ethyl ether	1.2	-	-
Hexane	1.4	-	-

4. Paper disc법을 이용한 항균실험

유기용매로 추출, 진공 농축한 천연 추출물을 이용하여 JIM와 CHS효모에 대한 항균력 test를 하였다. 이 두가지 효모에 대하여 항균력을 갖는 특정 시료를 찾기위해 증충용 배지에 clear zone을 형성하는 petri dish의 disc 주변의 직경을 측정하였다. 그 결과는 아래의 표와 같았다(Table.1).

여러개의 천연 추출물이 clear zone을 형성하였고, 그 추출물들은 마늘, 황기, 황금, 냉이잎, 달래뿌리, 질경, 백강잠등이었다. 그중 JIM효모인 *Hansenula anomala*에 효과를 보이는 천연 추출물은 마늘, 황기, 황금, 백강잠이었는데, 그중에서도 마늘이 4.4cm, 황기가 3.8cm의 clear zone을 형성하여 가장 역가가 컸다. CHS효모인 *Torulopsis maris*에는 마늘이 6.8cm의 큰 환을 형성하여 부패효모에대해 놀라운 활성을 보여주었고, 황금, 냉이잎, 달래뿌리, 질경, 도라지가 각각 활성을 보였고, 또한 3.2cm의 clear zone을 형성한 황금이 마늘 다음으로 역가가 가장 컸다(Table. 2).

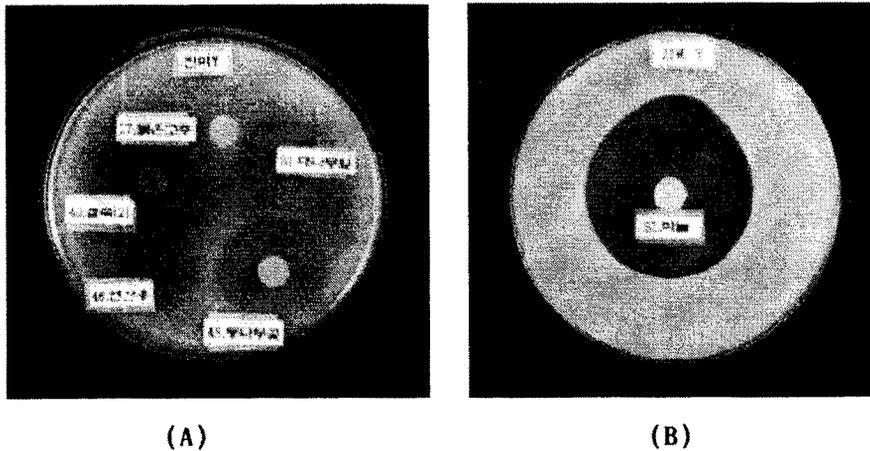


Fig. 4. Clear zone of media added natural preservatives about JIM Yeast

생약 재료에서 항균효과가 컸다는 것은 한방에서 흔히 쓰이는 이 약재가 식품의 보존제로서의 기능도 가지고 있다는 것을 시사하기도 하는 바 앞으로 많은 검토의 대상이 될 것이다. 우선 JIM효모와 CHS효모에 항균성을 보인 천연추출물에 관한 자료를 아래에 제시하였다.

위 실험결과를 정리하면 다음과 같다.

발효조미료로 쓰이는 간장의 유통기간중 발생할 수 있는 팽창에 주원인인 균주를 분리하였고, 균주의 현미경에 의한 형태학적인 특성과 API 20C AUX의 당분석 kit를 이용한 생화학적인 특성을 조사한 결과 JIM효모와 CHS효모는 각각 *Hansenula anomala*와 *Torulopsis maris* 로 판정되었다.

또한 이 분리된 효모가 팽창원인 균주임을 확인하기위해 멸균된 간장에 동정한 효모를 각각 넣어줌으로써 팽창성 여부를 검토해 본 결과 확실히 팽창을 유발하는 미생물이었다. 산업적으로 유용성을 향상시키기위해 간장 제품의 손상 방지 목적으로 첨가하는 보존제로서 합성보존제가 아닌 생약재나 야생초와 같은 천연 추출물을 이용한 천연보존제로서 사용가능성을 시험하기 위하여 팽창효모에 대한 항균 여부도 조사하였다.

그 결과 천연추출물중 JIM효모인 *Hansenula anomala*에 항균력을 보인 시료는 마늘과 한약재인 황기, 황금, 백강잠이었고, CHS효모인 *Torulopsis maris*에는 황금과 일반 식용식물인 마늘, 냉이잎, 달래뿌리, 길경, 도라지였다. 그중에서도 마늘이 CHS나 JIM효모에 모두 뛰어난 활성을 보여 간장 부패균의 천연 항균제로서의 가능성을 제시하였다. 마늘은 앞에서 말한대로 우리의 식생활과 밀접한 식물로서 그 항균성이나 기타 생리활성은 이미 검토되어진바 있다. 이것을 산업적으로 이용해볼 때 간장의 유통기한의 연장 및 마늘의 독특한 향미성으로 인한 제품의 기능성증진 및 기호성의 향상을 꾀할수 있으리라 여겨진다. 이에 이미 시중에는 마늘의 상품화가 활발히 이루어지고 있는데 그중에서 Oleoresin에 관한 연구가 잘 이루어지

고 있다. 강한 보존성과 함께 천연으로 방치하는 마늘과 비교해서 더 활성이 있는 것으로 보아 이것을 간장이나 기타 장류에 첨가물로 사용하는것도 생각해볼만 하겠다.

간장 팽창원인 균주의 번식을 억제하기 위해 사용되는 천연보존제의 연구가 여러각도에서 이루어져야 할 것이며, 장류의 부패원인균을 분리 동정하고, 그 부패균에 대한 항균물질의 탐색이 보다 활발히 이루어져야 할 것이다. 또 간장의 식염농도별 천연 보존제의 항균 역가와 항균력을 보유하는 천연 보존제의 성분과 그의 정제에 관한 연구도 이루어져야 함을 간과할 수 없을 것이다. 그리고, 마늘에서 제조된 oleoresin의 항균활성의 성분을 알아보기 위한 정제와 관련된 실험이 함께 병행되어야 할 것이다.

Table 2. Antimicrobial activities of natural preservatives against JIM Yeast and CHS Yeast causing soy sauce swelling. (cm)

천연물	JIM Yeast Clear zone	CHS Yeast Clear zone	천연물	JIM Yeast Clear zone	CHS Yeast Clear zone
산약	-	-	족제비싸리	-	-
인질숙	1.1	-	망개	-	-
백작약	-	-	담배잎	-	-
천우슬	-	-	역귀	1.6	-
백모근	-	-	양파	-	-
고추	-	-	소나무껍질	-	-
붉은고추	-	-	탕자나무잎	-	-
대나무잎	-	-	머위	-	-
철쭉2	1.1	-	붉은단풍잎	-	-
등나무꽃	1.2	-	단풍잎	-	-
연산홍	-	-	물냉이	3.2	-
과꽃	-	-	등굴레	-	-
청매실	-	-	애기뽕풀	-	-
마늘	4.4	6.8	열무뿌리	-	-
은행	-	-	머느리말씻개	-	-
감자껍질	-	-	호두나무잎	-	-
냉이잎	-	1.7	외솔잎	-	-
냉이뿌리	-	-	외솔송화가루	-	-
달래뿌리	-	1.5	조선솔	-	-
지골피	-	-	장미	-	-
진삼	-	-	수국화	-	-
삼지구엽초	-	-	네잎클로버꽃	-	-
감국	-	-	철쭉	-	-
갈근	-	-	아카시아	-	-
길경	-	1.3	민들레씨	-	-
박하	-	-	민들레꽃	-	-
백강잠	1.2	-	카네이션	-	-
방풍	-	-	고삼나무	-	-
목향	-	-	느릅나무	-	-
모과	-	-	익모초	-	-
삼백초	-	-	오미자	-	-
소엽	-	-	조각자	-	-
어성초	-	-	작약	-	-
엄나무	-	-	지황	-	-
승마	-	-	현호색	-	-
대나무	-	-	황기	3.8	-
죽엽	-	-	일천궁	-	-
도라지	-	1.5	황금	3.6	3.2

제 4 장 참고문헌

1. 鄭東進 편저. 1994. 增補 효소학. 先進文化社
2. 김종규, 강대호. 1975. 한국재래식 간장의 맛 성분에 관한 연구. 한국식량영양 학회지 7(2).
3. 張智鉉. 1967. 한국 간장중의 유기산에 대하여. 농화학회지. 8: p 1~9
4. 金燦조, 金敎昌, 金道榮, 吳萬鎭, 李錫健, 李壽晤, 鄭무澤, 鄭址석. 1993. 醱酵工學. 先進文化社. p 237~268
5. 이택수 외 2인. 1970. 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구 (제2보). 한국농화학회지. 13(2): p 171
6. 이택수, 이석건. 1970. 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구(제1보). 제국중에 생육하는 효모에 대하여. 한국농화학회지. 13: p 97~103.
7. 權東鎭. 1988. 재래식 간장의 내염성효모에 의한 휘발성 유기산의 생성. p 15~22. 동국대학교 1987학년도 碩士學位 請求論文.
8. 권동진, 하덕모. 1994. 간장에서 분리한 *Zygosaccharomyces rouxii*의 휘발성 유기산 생성에 미치는 식염농도의 영향. 22(2): p 120~125.
9. 조규홍, 조윤경, 홍승서, 이현수. 1995. 고생산성 젖산생성균 분리 및 배양 최적화. 산업미생물학회지. 23: p 6~11
10. 정대균, 유리나. 1995. 김치 발효미생물에 대한 대나무잎 추출물의 항균력. 한국식품과학회지. 27(6): p 1035~1038.
11. 심기환, 서권일, 강갑식, 문주석, 김홍출, 1995. 겨자종류 성분중의 항균성 물질. 한국식량영양학회지. 24(6): p 948~995.
13. 유태종, 홍재훈, 김영배, 이호, 김영애, 황한준, 소명환, 이효구 편저. 1995. 최신식품미생물학. 文運堂
14. J. A. Barnett, R. W. Payne, D. Yarrow. 1990. Yeasts:

Characteristics and identification.

15. Robert A. Samson, Ellen S. Hoekstra, Connie A. N. Van Oorschot. 1981. Introduction to food-borne fungi.
16. Hubert Verachtert, Rene De Mot. 1990. Yeast: Biotechnology and Biocatalysis. Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved.
17. 김태정. 1990. 빛깔있는 책들 95 약용식물. 대원사 p 28
18. 高庚式 著. 1991. 韓國植物檢索圖監 (봄편). 아카데미서적.
19. 김태정. 1989. 빛깔있는 책들 94, 약이되는 야생초. 대원사
20. 과학·백과사전출판사 편. 1991. 일월건강(17) 약초의 성분과 이용. 일월서각. p 74, p 668.

제 3 세부과제. 수삼보존제 연구

여 백

제 3 세부과제. 수삼보존제 연구

제 1 장 서 론

오갈피나무과(*Araliaceae*)에 속하는 인삼은 고유의 생약으로 민간 또는 한방에서 효능을 인정받아 왔다. 인삼에 대한 약리적 효능이 과학적으로 입증되고 있다. 인삼은 약용뿐 아니라 최근에는 기능성 식품으로도 널리 이용되고 있어 그 기호에 따라 인삼차, 인삼정, 인삼 엑기스, 인삼 음료, 인삼주, 인삼 과자 등의 다양한 형태로 제조되어 국내외에 널리 알려지면서 우리 나라의 특산물로 확고한 자리를 잡고 있다. 한편 인삼에 대한 다양하고 광범위한 보고가 있었으며, 항암, ^{1,2)}항통증, ³⁻⁶⁾ 항당뇨, ⁷⁻¹⁰⁾ 간 기능 항진 효능, ^{11,12)} 항혈전, ^{13,14)} 항염증^{15,16)} 등에 대한 효과가 보고되었다. 또 인삼은 여러 가지 생리활성 물질을 함유하고 있어서 미생물의 성장과 대사작용에 영향을 주는 것으로도 알려져 있다. 홍삼 제품의 부산물인 홍삼정박은 곰팡이의 생육촉진과 항산화성 물질이 상당량 함유되어 있는 것으로 보고되었다.

그러나 지금까지 연구로는 대부분 약리효능 및 성분에 관한 연구가 주가 되고 있으며 수삼의 적정 품질유지를 위한 저장방법에 관한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 최근 소비자층의 저변확대와 인삼에 대한 인식 제고로 수삼의 소비량이 날로 증가되고 있으나, 수삼의 품질수명을 연장할 수 있는 연구가 미진하여 수삼의 유통, 저장 및 제2차 가공에서의 문제점이 크게 대두되고 있다. 수삼은 신선한 채소류와 같이 생명을 갖고 있기 때문에 저장중 호흡을 하며 따라서 내부저장 영양분을 소모하게 되고 이화학적 변화가 일어나게 된다. 따라서 저장후의 상품적 가치가 떨어지며 유통과정

이나 수송, 보관중에서 토양미생물이나 세균이 쉽게 오염되어 품질저하가 일어나기 쉽고 표피의 수분증발로 원상유지가 어렵게 된다. 최근 생과 및 야채의 저장방법으로 CA 및 MA 저장 방법이 널리 이용되고 있다. 산소와 탄산가스의 적정 농도설정이 필수적이며 재배조건, 속도, 품종 등에 차이가 있지만 대체로 2~5% 범위이다.

국내에서 보고된 수삼관련 연구는 1976년 이¹⁷⁾ 등이 수삼을 급속 냉동하여 저장하였다가 필요시 해동하여 홍삼제조용 원료 수삼으로 사용하는 연구를 수행한 바 있으나 해동시 조직의 연화로 홍삼제조 적성이 불량하여 응용되지 못하고 있는 실정이며 현재는 수삼을 0~5℃의 저온에서 1주일 이내로 저장후 원료수삼으로 사용하는 단기적 저장방법이 응용되고 있을 뿐이다. 인삼은 수삼으로서 8~10월에 채굴되어 단기간내 가공처리 되어야 하므로 원료처리량의 과다로 인한 제조 공정상의 문제를 수반하고 있으며 가격 및 수급조절도 가장 큰 문제점으로 대두되고 있는 실정이다.

한국담배인삼공사 홍삼 제조장은 연중 사용할 수 있는 홍삼제조 시설을 갖추고 있으나 현재까지는 원료수삼의 수확기인 가을부터 2~3개월만 홍삼을 제조하고 나머지 기간동안에는 홍삼제조 시설을 가동하고 있지 않다. 그 주요 원인은 수삼이 미생물에 의하여 쉽게 부패되어 장기간 저장할 수 없기 때문으로 판단된다. 홍삼제조 시설을 연중 무휴 가동하고 양질의 홍삼을 보다 많이 생산하기 위해서는 효율적인 원료삼(수삼) 저장방법의 확립이 필요하다고 생각된다.

따라서 본 연구는 부패된 수삼에서 부패 미생물을 분리 동정하고 이에 대하여 항미생물 활성을 가진 생약재의 추출물 및 정유성분을 검색하며 수삼 부패 억제에 효과가 있는 천연재료를 선정하여 수삼의 장기저장에 생약 추출물의 활용방안을 모색하였다.

제 2 장 연구 방법

제 1 절 실험 재료

1. 수삼

수삼은 1993년 12월 대전시 부사동 소재 금산인삼유통센터에서 750g(1차)당 15 편 크기의 것을 구입하여 상온에서 보관하며 부패된 수삼을 시료로 사용하였다. 수삼부패균의 부리를 위하여 사용된 배지는 Malt Extract agar(ME) 배지와 Nutrient Agar(NA) 배지를 사용하였다.

2. 추출 방법

가. 생약 시료의 물 추출물 조제

미생물 억제 물질의 검색에 사용된 한약재 및 생약시료는 대전시내 한약재상에서 19종을 구입하여 사용하였고, 물 추출물 조제에 사용된 생약제의 종류는 Table. 1과 같다. 생약제의 물 추출물의 제조는 먼저 준비된 생약제를 60-80 mesh로 분쇄한 시료 100 g 당 1000 ml의 증류수를 가하여 상온에서 24시간 진탕하며 추출하여 감압 농축하여 부패미생물 억제 물질의 검색에 이용하였다.

나. 생약 시료의 정유 성분의 조제

정유 성분의 추출에 사용된 생약제의 종류는 Table. 2와 같다. 감초, 오미자등의 34종의 생약제를 Dean-Stark 장치와 중시 증류 추출장치를 이용하여 정유성분을 제조하여 사용하였다. 천연시료의 비교는 현재 천연 보존제로 시판중인 자몽씨 추출액을 구입하여 사용하였다.

Table. 1. List of water extract preparations

Contents	Contents
Acori graminei Rhizoma(石菖蒲)	Morindae Radix (巴戟)
Agastachis Herba (排草香)	Paeoniae Radix Rubra (赤芍藥)
Asiasarum Root (細辛)	Rosae Paevigatae Fructus (金櫻子)
Bitter Cardamon (益智仁)	Rubi Fructus (覆盆子: 未熟果)
Cinnamomi Ramulus (桂枝)	Rubi Fructus (覆盆子: 完熟果)
Cinnamon Bark (桂皮)	Salviae Radix (丹參)
Clove (丁香)	Schizandra Fructus (五味子)
Epimedii Herba (淫羊藿)	Spirodela Herba (浮萍草)
Ginger (乾薑)	Terminaliae Fructus (訶子)
Male Fern. (貫衆)	

Table 2. List of essential oil preparations

Contents	Contents
Achyranthes Root (牛膝)	Echinopsis Radix (漏蘆)
Alisma Rhizome (澤)	Ecliptae Herba (旱蓮草)
Angelicae koreanae Radix (羌活)	Fargarae Flos (款冬花)
Angelicae tenuissima Radix (本)	Gardenia Fruit (梔子)
Apricot Kernel (杏仁)	Inulae Flos (旋覆花)
Araliae cordatae Radix (獨活)	Korean Angelica (當歸)
Artemisiae apiaceae Herba (青)	Lithospermum Root (紫草)
Artemisiae capillaris Herba (茵蒿)	Melandrii Herba (王不留行)
Artemisiae princeps Herba (艾葉)	Mentha Herb (薄荷)
Asiasarum Root (細辛)	Peach Kernel (桃仁)
Atractylodes Rhizome (蒼朮)	Rehmanniae Radix (地黃)
Atractylodes Rhizome White (白朮)	Sanguisorbae Radix (地榆)
Chelidonii Herba (白屈菜)	Schizandra Fructus (五味子)
Chrysanthemi Flos (甘菊)	Scirpi Rhizoma (三稜)
Chrysanthemi sibirici Herba(九節草)	Ulm Cortex (榆白皮)
Cirsii Herba (대계)	Zizyphus spinosus Seed (酸棗仁)
Codonopsis pilosulae Radix (蔓參)	

제 2 절 실험 방법

1. 수삼 부패균의 분리 및 동정

수삼 부패균의 분리는 부패한 수삼을 무균 상태에서 조각을 내어 멸균수 10 ml에 $10^1 \sim 10^6$ 까지 희석하여 ME와 NA배지에 각각 100 μ l씩 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 단일 colony를 선택하였고, 미생물의 동정은 그 중에서 단일 colony를 선택하여 분리 균주의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양적, 생화학적 제특성을 API kit를 이용하여 조사하였으며, 세포벽의 지방산 조성을 분석한 후 분리균의 동정은 Microbial Identification System Aerobe Library Ver. 3.7이에 따라 실시하였고, 여기에서 분리된 균주를 공시균주로 사용하였다.

2. 항균활성의 검색

추출물의 항균력 검색은 한천배지 확산법 (paper disc plate method)으로 측정하였다. 기층배지 (1.5% agar)를 10 ml씩 분주하여 응고시키고, 그 위에 중층배지(0.75% agar)는 배양된 균주(1/100, v/v)를 혼합하여 5 ml씩 기층배지 위에 분주한 후 응고 시켜 실험용 배지로 사용하였다. 실험용 평판배지 위에 분말상태의 오미자 Ethanol 추출물을 g/ml로 Ethanol에 녹여, 멸균된 filter paper disc (TOYO seisakusho, 8mm, Japan)에 100 μ l씩 흡수시켜 용매를 완전히 휘발시킨 후 평판배지 위에 밀착시킨 다음, 멸균수 75 μ l로 확산 시켰다. incubator (37℃)에서 24시간 동안 배양하여, disc 주변의 clear zone(cm)의 직경을 측정하여 항균활성을 확인하였다.

3. 수삼부패의 억제

수삼의 동체 표면에 칼로 흠집을 내고 천연재료 추출액(1% 수용액)에 5분간 침지시켰다가 꺼내어 수삼부패세균인 *Bacillus megaterium*을 접종한

후 30℃에서 보관하며 이취의 생성 여부와 수삼의 흡집 부위의 색이 갈색으로 변화를 조사하여 수삼의 부패에 미치는 영향을 조사하였다.

제 3 장 연구 결과

제 1 절 실험 결과

1. 수삼 부패균의 분리

부패한 수삼으로부터 20종의 미생물(세균 10종, 사상균 10종)을 분리한 결과 및 수삼 부패 능력은 Table.3. 과 같다. 분리된 균주를 수삼의 흡집부위에 접종하여 흡집부위의 갈변과 이취의 정도를 확인한 결과 세균 5종(B-2, B-3, B-8, B-9, B-10)과 사상균 1종(F-9)을 수삼 부패균주로 선발하였다. 선발된 균주중 수삼을 가장 빨리 부패시키는 균주는 B-8로 접종 2일째에 수삼의 색이 갈색으로 변하였고 자극적인 이취가 발생하기 시작하였다.

2. 수삼 부패균의 동정

가. 세 균

수삼부패세균의 형태 및 생리, 생화학적 특성을 API 20E kit로 검색하고 세포벽의 지방산 조성을 분석한 후 Microbial Identification System Aerobe Library Ver. 3.7과 대조한 결과 세균 5종(B-2, B-3, B-8, B-9, B-10)에 대한 동정 결과는 Table 4~6과 같다. B-2는 *Pseudomonas putida*, B-3은 *Pseudomonas putida* biotype A, B-8은 *Bacillus megaterium*, B-9는 *Enterobacter cloacae*, B-10은 *Klebsiella pneumoniae*로 각각 동정되었다.

또한 사상균 F-9에 대한 동정 결과는 Table. 7과 같다. *Rhizopus oryzae*로 동정되었다.

Table 3. Rottening of fresh ginseng root by isolated micro organisms

Isolate No.	Rottening ^a	Isolate No.	Rottening ^b
B-1	-	F-1	-
B-2	+	F-2	-
B-3	+	F-3	-
B-4	-	F-4	-
B-5	-	F-5	-
B-6	-	F-6	-
B-7	-	F-7	-
B-8	++	F-8	-
B-9	+	F-9	+
B-10	+	F-10	-

Scar was made on the epidermis of fresh ginseng root washed with 70% ethanol. Test microorganisms were inoculated on the scar and covered the scar with wet cheesecloth to prevent excessive drying. a: incubated at 30°C, b: 25°C. B and F indicate bacteria and fungus, respectively. -: non-decay, +: mild decay, ++: severe decay.

3. 수삼 부패균에 대한 항균활성

약재 물 추출물 19종의 수삼부패세균 B-8 (*Bacillus megaterium*)에 대한 항균활성을 paper disc법으로 검정한 결과는 Table. 8과 같다. 訶子, 五味子, 細辛, 淫羊藿, 覆盆子추출물은 항균활성을 나타내었다. 특히 訶子추출물과 五味子추출물은 천연 보존제로 시판되고 있는 DF-100(자몽씨 추출액)과 비슷한 수준의 항균력을 나타내었다. 訶子和 五味子추출물 및 DF-100을 수삼부패세균 *Bacillus megaterium*에 처리하고 3일간 액체 배양한 후 660nm에서 흡광도를 측정한 결과는 Fig 1~4와 같다. 세균수와 흡광도 간에는 正의 상관관계($r=0.9975^{**}$)가 있었다. 가자 추출물은 30 ppm 이상 처리시, 오미자추출물은 100 ppm 이상 처리시, DF-100은 50 ppm 이상 처리시 3일이 경과할 때까지 세균수가 거의 증가하지 않아 가자의 물 추출물은 수삼부패세균에 대하여 DF-100과 비슷한 수준의 항균력을 가지고 있다고 판단된다.

Table 4. Morphological and biochemical characteristics of fresh ginseng root-rottening bacteria

Characteristics	Isolated No.				
	B-2	B-3	B-8	B-9	B-10
Gram reaction	-	-	+	-	-
Oxidase	+	+	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Morphology	rod	rod	rod	rod	rod
Spore formation	-	-	+	-	-
Motility	+	+	+	-	+
β -Galactosidase(ONPG)	-	-	-	+	+
Arginine dihydrolase	+	+	-	+	-
Lysine decarboxylase	-	-	-	-	-
Ornithine decarboxylase	-	-	-	+	-
Citrate utilization	+	+	+	+	+
H ₂ S production	-	-	-	-	-
Urease production	-	-	-	-	-
Tryptophan deaminase	-	-	-	-	-
Indole production	-	-	-	-	-
Acetoin production (VP reaction)	-	+	+	+	+
Gelatin liquefaction	-	-	+	-	-
Acid from Glucose	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	+	+(g)	+(g)
Inositol	-	-	-	-	+
Sorbitol	-	-	-	+(g)	+
Rhamnose	-	-	-	+	+
Saccharose	-	-	-	+(g)	+
Melibiose	+	+	-	+	+
Amygdalin	-	-	-	+(g)	+(g)
Arabinose	-	+	+	+	+(g)

(g) indicates gas production

Table 5. Cell wall fatty acid composition of the bacteria isolates

B-3		B-8	
Fatty acid	Composition	Fatty acid	Composition
10:0 30H	3.72 %	13:0 iso	1.53 %
12:0	3.46	13:0 anteiso	0.94
12:0 20H	3.71	14:0 iso	3.49
12:0 30H	4.50	14:0	0.73
14:0	0.45	15:0 iso	28.93
16:1 ω7c	28.80	15:0 anteiso	42.96
15:0 iso 20H	5.71	16:1 ω7c alcohol	6.20
/16:1 ω7t		16:0 iso	2.70
16:0	26.19	16:1 ω11c	1.75
17:0 cyclo	0.93	16:0	1.22
18:1 ω7c/ω9t/ω12t	21.90	Iso 17:1 ω10c	2.65
18:0	0.63	17:0 iso I/anteiso B	2.71
		17:0 iso	2.16
		17:0 anteiso	2.02
Total	100.00 %	Total	99.99 %

Methyl esters of fatty acids were analyzed using gas chromatograph equipped with a HP-1 fused silica capillary(0.25mm id × 30m, 0.25 μm thick, Hewlett-Packard) and a flame ionization detector.

Table 6. Identification of bacteria isolates inducing fresh ginseng root - rotting

Isolate No.	Identification	Similarity
B-2	<i>Pseudomonas putida</i>	69.3 %
B-3	<i>Pseudomonas putida</i> biotype A	79.2
B-8	<i>Bacillus megaterium</i>	< 10.0
B-9	<i>Enterobacter cloacae</i>	99.6
B-10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	95.8

Similarity was calculated by the comparison with "Microbial Identification Aerobe Library Ver. 3.7 (Microbial ID Inc., Newark, Delaware)"

Table 7. Morphology of F-9 isolate*

Morphology	Observance	Characteristics
Colony	Color	Whitish-brownish grey
Stolon	Wall type	Smooth
	Color	Yellowish brown
Rhizoid	Color	Brownish
Sporangiophore	Branching	Solitary or grouped up to 5
Collumella	Shape	Ovoid or globose
	Wall type	Smooth
Sporangium	Shape	Globose or subglobose
	Color	Dark brown to black-brown
Sporangiospore	Shape	Globose, ovoid, or irregular
		Globose, ellipsoidal or cylindrical stolons with chlamydo spores
Chlamydo spore	Shape	

* F-9 was identified to be *Rhizopus oryzae*.

4. 孢子 추출물내 항미생물 물질의 분리

孢子的 물 추출물을 산성 및 알칼리성 조건하에서 열 안정성, 유기용매 추출성, 활성탄 및 이온교환수지 흡착성 등을 고려하여 22개 분획으로 구분하고 수삼부패세균인 *B. megaterium*에 대한 항균활성을 paper disc법으로 검정한 결과는 Table 9과 같다. 孢子추출물의 항균활성물질은 약한 지용성을 띠는 극성의 산성물질일 것으로 추정된다. 현재 이 물질을 분리, 정제중에 있다.

5. 생약정유의 수삼 부패균주에 대한 항균활성

생약정유 34종의 수삼부패세균 B-8 (*Bacillus megaterium*)에 대한 항균활성을 paper disc법으로 검정한 결과는 Table.10과 같다. 甘菊, 羌活, 漏蘆, 대계, 薄荷, 旋覆花, 紫草, 地愈, 蒼朮의 정유는 항균활성을 나타내고

있고, 이중에서 甘菊, 漏蘆, 旋覆花, 紫草 및 地榆는 천연 보존제로 시판되고 있는 DF-100과 비슷한 수준의 항균활성이 있었으며 특히 地榆의 정유가 강한 활성을 보였다.

Table 8. Antimicrobial activities of water extract preparations on *Bacillus megaterium*

Preparations	Inhibition zone ^a	Activity ^b	Remarks ^c
Acori graminei Rhizoma	-	-	
Agastachis Herba	-	-	
Asiasarum Root	10 mm (0.7)	+	Selected (4)
Bitter Cardamon	-	-	
Cinnamomi Ramulus	-	-	
Cinnamon Bark	-	-	
Clove	-	-	
Epimedii Herba	10 (0.7)	+	Selected (4)
Ginger	-	-	
Male Fern	-	-	
Morindae Radix	-	-	
Paeoniae Radix Rubra	-	-	
Rosae laevigatae Fructus	-	-	
Rubi Fructus (unripe)	12 (0.9)	+	Selected (3)
Rubi Fructus (ripe)	-	-	
Salviae Radix	-	-	
Schizandra Fructus	15 (1.1)	++	Selected (2)
Spirodela Herba	-	-	
Terminaliae Fructus	19 (1.4)	+++	Selected (1)
DF-100 (0.2%)	14 mm (1.0)	++	
" (0.5%)	19 (1.4)	+++	

Concentrations of the water extract preparations were adjusted to 1%. a: Each value in parenthesis indicate relative activity against DF-100 (0.2%). b: Activity was classified according to the diameter of inhibition zone. -: non, +: 8~12mm, ++: 12~16mm, +++: 16~20mm. c: Active principle will be isolated. Each value in parenthesis indicates rank of activity.

Table 9. Stability and preliminary purification test of Terminaliae Fructus - water extract preparation

Treatment	Fraction	Inhibition zone
Gain water extract	pH 7	17 mm
Stability(100°C,15min)	pH 2	18
	7	19
	10	12
Extraction with EtOAc	pH 2 EtOAc phase	13
	Aqueous phase	17
	10 EtOAc phase	-
	Aqueous phase	18
Extraction with n-BuOH	pH 2 BuOH phase	17
	Aqueous phase	16
	10 BuOH phase	16
	Aqueous phase	16
Adsorption on active carbon	pH 2 Pass	17
	Eluate	-
	10 Pass	18
	Eluate	22
Adsorption on Amberlite on Amberlite XAD-2, and elute with acetic acid	Pass	15
	Eluate	18
Adsorption on Dowex-1	Pass	14
	Eluate	20
Adsorption on Dowex-50	Pass	16
	Eluate	-

Bacillus megaterium was used for the test microorganism. Eluate of active carbon was concentrated ($\times 2$). EtOAc: ethyl acetate, n-BuOH: n-butanol.

Table 10. Antimicrobial activity of essential oil preparations on *Bacillus megaterium*

Preparations	Inhibition zone ^a	Activity ^b	Remarks ^c
Achyranthes Root	-	-	
Alisma Rhizome	-	-	
Angelicae koreanae Radix	12 mm (0.9)	+	Selected(8)
Angelicae tenuissima Radix	-	-	
Apricot Kernel	-	-	
Araliae cordatae Radix	-	-	
Artemisiae apiaceae Herba	-	-	
Artemisiae capillaris Herba	-	-	
Artemisiae princeps Herba	-	-	
Asiasarum Root	-	-	
Atractylodes Rhizome	13 (0.9)	++	Selected(6)
Atractylodes Rhizome White	-	-	
Chelidonii Herba	-	-	
Chrysanthemi Flos	15 (1.1)	++	Selected(5)
Chrysanthemi sibirici Herba	-	-	
Cirsii Herba	13 (0.9)	++	Selected(6)
Codonopsis pilosulae Radix	-	-	
Echinopsis Radix	16 (1.1)	++	Selected(5)
Ecliptae Herba	-	-	
Fargarae Flos	-	-	
Gardenia Fruit	-	-	
Inuliae Flos	16 (1.1)	++	Selected(2)
Korean Angelica	-	-	
Lithospermum Root	16 (1.1)	++	Selected(2)
Melandrii Herba	-	-	
Mentha Herb	11 (0.8)	+	
Peach Kernel	-	-	
Rehmanniae Radix	-	-	
Sanguisorbae Radix	18 (1.3)	+++	Selected(1)
Schizandra Fructus	-	-	
Scirpi Rhizoma	-	-	
Ulmi Cortex	-	-	
Zizyphus spinosus Seed	-	-	
DF-100 (0.2%)	14 mm (1.0)	++	
" (0.5%)	19 (1.4)	+++	

Concentrations of the essential oil preparations were adjusted to 0.1%. a: Each value in parenthesis indicate relative activity against DF-100 (0.2%). b: Activity was classified according to the diameter of inhibition zone. -: non, +: 8~12mm, ++: 12~16mm, +++: 16~20mm. c: Active principle will be isolated. Each value in parenthesis indicates rank of activity.

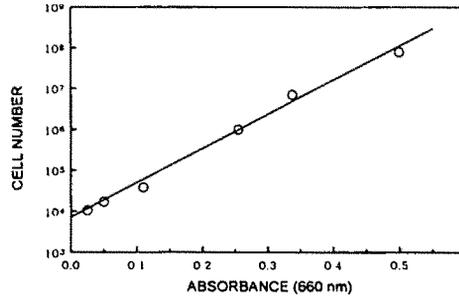


Fig. 1. Relationship between cell number of *Bacillus megaterium* and turbidity(absorbance at 660nm) of the bacterial culture.

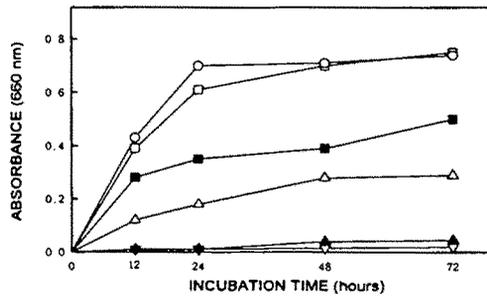


Fig. 2. Antibacterial activities of Terminaliae Fructus (訶子) extract.

The culture of *Bacillus megaterium* was incubated at 30°C and the antibacterial activities were assayed by turbidimetry. ○-○ control: □-□ 1.5 ppm: ■-■ 3 ppm: △-△ 15 ppm: ▲-▲ 30 ppm: ▽-▽ 150 ppm

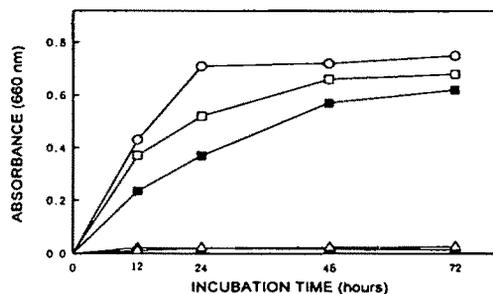


Fig. 3. Antibacterial activities of *Schizandra Fructus*(五味子) extract.

The culture of *Bacillus megaterium* was incubated at 30°C: and the antibacterial activities were assayed by turbidimetry. ○—○ control : □—□ 10 ppm : ■—■ 50 ppm : △—△ 100 ppm : ▲—▲ 500 ppm.

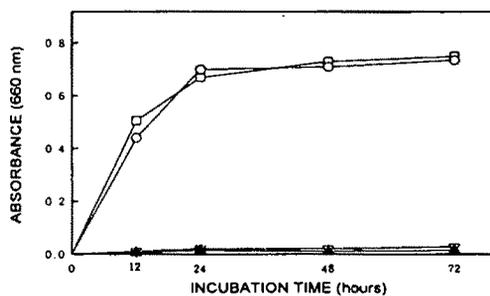


Fig. 4. Antibacterial activities of DF-100.

The culture of *Bacillus megaterium* was incubated at 30°C: and the antibacterial activities were assayed by turbidimetry. ○—○ control: □—□ 10 ppm : ▽—▽ 50 ppm : ▲—▲ 100 ppm.

6. 訶子추출물의 수삼부패 억제효과

訶子추출물이 수삼의 부패를 억제시키는 결과는 Table. 11과 같다. 가자 추출물을 처리하지 않은 대조군은 보관 2일째에 이미 흠집부위가 부패되어 갈색으로 변하였고 5일 경과시에는 자극적인 냄새가 심하게 발생하였으나, 訶子 추출액에 침지시킨 처리군은 두 구의 시료 중 한 구는 5일째에 부패가 약간 관찰되었으나 다른 한 구는 5일 경과시 부패, 변색 또는 이취 발생이 없었으며 10일째에 약간의 갈변이 관찰되었다. 따라서 수삼을 訶子 추출액에 일정시간 침지시켰다가 저장하면 세균에 의한 부패를 억제시킬 수 있을 것으로 판단된다.

Table 11. Effect of Terminaliae Fructus - water extract treatment on the rotting of fresh ginseng root by *Bacillus megaterium*

Treatment	Incubation time (Days)		Remarks
	2	5	
Non-treated	1	++	+++
	2	++	+++
Treated	1	-	-
	2	-	(+)

Scarred fresh ginseng root was soaked in Terminaliae Fructus - water extract (1%) for 5 minutes, and suspension of *Bacillus megaterium* was inoculated on the scar as mentioned in Table 3. Duplicate samples were employed for each treatment. -: mild decay, ++: severe decay, +++: severe decay with bad odor.

제 2 절 요약

수삼부패와 관련된 미생물을 선발 및 동정한 결과 부패한 수삼으로부터 20종의 미생물을 분리하고 이중 수삼을 빨리 부패시키는 균주 6종(세균 5종, 사상균 1종)을 분리하였다. 수삼부패 세균은 *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas putida biotype A*, *Bacillus megaterium*, *Enterobacter cloacae* 및 *Klebsiella pneumoniae*로 각각 동정되었으며, 수삼 부패사상균은 *Rhizopus oryzae*로 동정 되었다. 이중에서 수삼부패를 가장 빨리 일으키는 균주는 *Bacillus megaterium*이었다. 수삼부패 억제물질 선택하기 위하여 생약추출물과 정유 50여 종으로부터 訶子 및 五味子の 물 추출물과 甘菊, 漏蘆, 旋覆花, 紫草 및 地愈의 정유를 *Bacillus megaterium*에 대하여 항균활성이 강한 물질로 선발하였다. 이 중 訶子추출물과 五味子 추출물은 *Bacillus megaterium*의 생육을 크게 억제하였다. 특히 訶子추출물은 천연 보존제로 시판되고 있는 DF-100(자몽씨 추출액)과 비슷한 수준의 항균력을 나타내었고, 訶子추출물의 항균활성물질은 약한 지용성을 띠는 극성의 산성물질로 판단되며 현재 이물질을 분리, 정제 중에 있다. 수삼을 訶子추출물의 1% 수용액에 5분간 침지하였으나 30℃에서 보관하였을 때 *Bacillus megaterium*에 의한 부패가 다소 억제되었다. 결론적으로, 訶子 및 五味子の 물추출물과 甘菊, 漏蘆, 旋覆花, 紫草 및 地愈의 정유를 수삼부패 억제 활성물질로 선발하였으며 수삼의 장기저장에 이들을 검토하는 것이 필요하다고 판단된다.

제 4 장 참 고 문 헌

1. Lee, S. H. and Wang, W. I.: Korean J. Ginseng Sci., 10(2), 141 (1986)
2. Jeon, B. S., Kim, N.M., Park, C. K., Yang, J. W. and Chang, K. S.:Korean J. Ginseng Sci., 20(3), 262 (1996)
3. Nabata, H.,Saito, H. and Takagi , K. :Jap. J. Pharmacol., 23, 29 (1973)
4. H. Saito, H. Morita, M. and Takagi , K. :Jap. J. Pharmacol., 23, 43 (1973)
5. Ramarao, P. and Bhargava, H. N.: Gen. Pharmacol.,21,877(1990)
6. Shin, Y. H. Jeong, O.M.Nah, J.J.Yoon,S.R.Nam,K.Y.Kim,S.k.Kim, Korean J. Ginseng Sci.,22(1), 43(1998)
7. Yokozawa, T. Kobayashi, T. Oura,H, and Kawashima. : Wakan Yaku Gakkaishi,1,22(1984)
8. Waki, I. Kyo, H. Yasuda, M. and Kimura, M.:J. Pharm.DYN.,5, 547(1982)
9. Huo, Y. and Chen, Y:J. Traditional Chinese Medicine, 8(4), 293(1988)
10. Elma, Z. T. and Ilian, E. Z. and Christian, I, H.: Phytotherapy Res.,5(1),46(1991)
11. Yokozawa, T. and Oura, H: J Natural Produccets 53(6),1514(1990)
12. Oura, H. and Hiai, S : "Physiological Chemistry of Ginseng." Metabolism & Disease,10,564(1973)
13. Fang, Y. X. Shen, N. and Chen. X. : Acta Pharmacologica

Sinica, 7(3), 226(1986)

14. Zhang, Y. Xu xh and Jiang Y. P: *Chung Hua Hseub Tsa Chi*, 74(10), 626(1994)
15. Matsuda, H. Samukawa, K. and Kubo, M.: *Planta Med.*, 56, 19(1990)
16. Grandhi, A. Mujiundar, A. M. and Patwarrdhan, B. I.: *J. Ethnopharmacology*, 44, 131(1994)
17. 이양희, 김길환, 신현경, 배정기, 이 철: 수삼의 장기저장법에 관한 연구 1차 보고서, 23(1975)

제 4 세부과제. 빵보존제 연구

여 백

제 4 세부과제. 빵보존제 연구

제 1 장 서론

오늘날 전세계 인구의 40% 이상이 밀을 주식으로 하고 있다. 특히 밀을 주식으로 하는 서구인들은 빵을 신이 인간에게 내린 선물이라 생각하고 있다. 우리는 쌀을 주식으로 하는 문화권에 속해 있어서 빵과 인연을 맺게 된지는 그리 길지 않지만 예전에 비해 많은 식생활의 변화가 일어나고 있고 특히 여성들이 빵을 애용하고 있으며 점차 주식의 개념으로 자리 잡아 가고 있다. 빵에는 밥 못지 않은 영양소가 들어있으며 뇌 세포 성장을 도와주는 DHA 등이 첨가된 기능성을 가진 빵도 만들어지고 있다. 그리고 밀과 더불어 보리, 옥수수 등 순수한 곡식을 이용하여 만든 건강빵과 우리땅에서 자란 우리밀로 만든 우리밀빵을 만들어 우리 농산물 애용운동에 기여하고 있다.

앞으로 우리 식생활에서 빵이 차지하는 비중은 더욱 늘어갈 것이라 보이지만 빵의 유통기한은 7일로 다른 식품에 비해 비교적 짧아 산업적으로 이용가치를 높이기 위해선 보존제의 첨가가 불가피하다. 하지만 이 보존제의 대부분이 소비자에게 거부감을 주는 합성 보존제이므로 이를 대체할만한 보존제를 천연물로부터 탐색하는 연구가 시급하다고 사료된다.

본 연구는 빵부패균의 분리, 동정과 부패를 억제하는 천연보존제의 탐색에 초점을 맞추었다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 재료

본 실험에 사용한 카스테라, 단팥빵, 식빵등은 시중에서 직접 구입하였고, 실험에 사용된 50여종의 한약제는 대전 시내의 건재상에서 구입하였다. 미생물의 분리에 사용된 배지는 PDA(Potato, Dextrose, Agar, Difco, USA)를 사용하였고, 빵에서 분리된 곰팡이의 항균활성 검색을 위해 사용된 계면활성제인 Tween 80과 Tartaric acid등은 일급시약을 사용하였다.

제 2 절 실험방법

1. 빵 부패균의 분리, 동정

시중에서 구입한 카스테라, 단팥빵, 식빵 등을 상온에 보관하면서 그 부패를 관찰하며, 빵의 부패에 관여하는 여러 가지 곰팡이를 순수분리, 동정하였다. 부패한 빵 표면에 생긴 곰팡이를 종류별로 각각 일백금으로 취하여 Potato Dextrose Agar(PDA)배지 위에 접종하여 30℃ Incubator에서 2-3일간 배양하였다. 또한 빵내부의 곰팡이도 증류수10 ml에 희석하여 plate에 분주하였다. 곰팡이가 배양된 petri dish에서 각기 다른 곰팡이들을 PDA배지에 접종하여 각각을 분리하여 배양하였다.

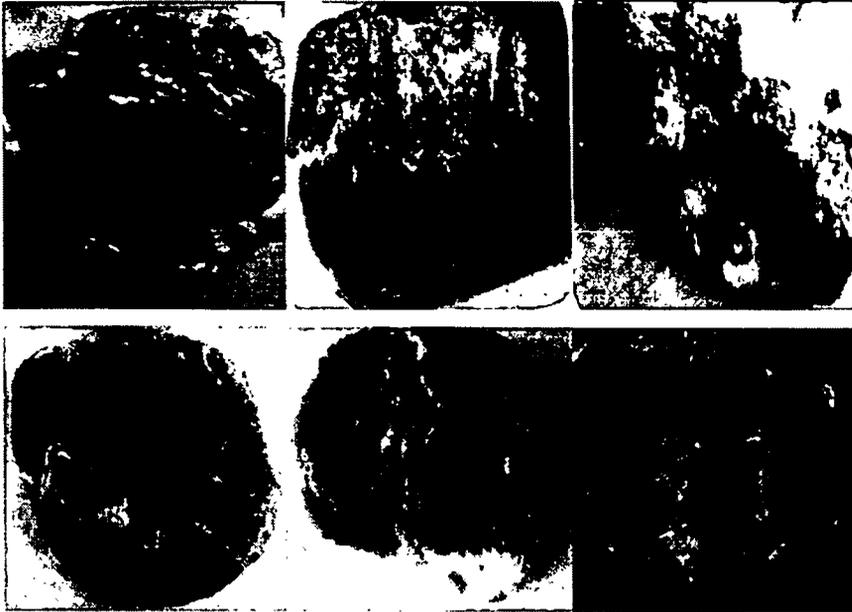


Fig 1. Various putrefied breads collected from bread market

2. 곰팡이에 대한 항균력 측정

빵에서 분리된 곰팡이에 대한 항균력 측정방법은 PDA배지를 멸균하여 petri dish에 부어 기층배지를 만들어서 기층배지에 각각의 곰팡이를 접종하여 30℃ incubator에서 72hr 배양하여 실험용 곰팡이를 준비하고 0.01% Tween 80을 멸균하여 Falcon tube에 일정량을 넣고 각각의 곰팡이를 현탁시켜서 준비한다.

PDA배지에 agar 1.5%를 넣어 멸균하고 배지가 45℃가 되었을 때에 10% Tartaric acid를 1.9ml/100ml를 첨가하고 준비된 곰팡이 현탁액을 1ml/15ml의 비율로 첨가하여 배지를 분주한다.

paper disc에 각각의 천연물 시료를 일정량씩 점적하여 배지 위에 올려 놓고 30℃에서 72hr 배양하여 균주가 다 자란 후 나타난 clear zone을 확인한다.

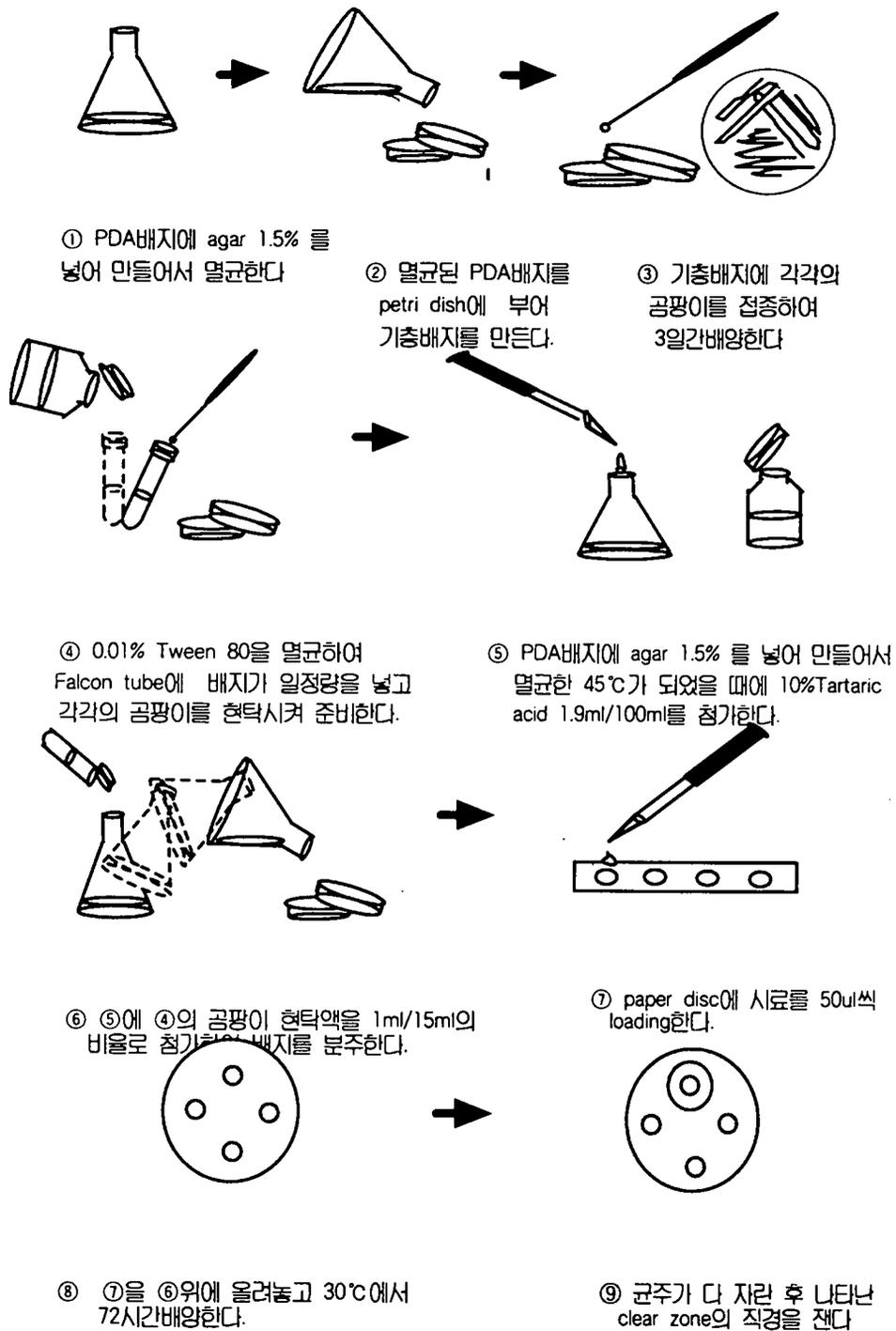


Fig2. Antifungal test method

제 3 장 실험결과

1. 빵 부패균의 분리, 동정

빵 부패에 관여하는 곰팡이를 분리한 결과 검은색, 녹색, 흰색의 곰팡이가 주로 분리되었으며 검은색 곰팡이는 *Rhizopus nigricans*와 *Aspergillus niger*로 녹색 곰팡이는 *Penicillium stoloniferum*으로 흰색 곰팡이는 *Trichosporon variable*로 동정되었다.

Table 1. Identification of isolated *Rhizopus nigricans* from rottened breads

Species	<i>Rhizopus nigricans</i>
Sporangiophore: length(mm)	1.0-1.5
Sporangium: size(um)	170-184
Sporangiospore: marking, shape and size(um)	striate, globose
Chlamydospore	present
Growth on MEA at 25°C (mm)	35-60
Growth on G25N at 25°C and 37°C (mm)	rapid, rapid
Color of colony	brownish grey

Table 2. Identification of isolated *Aspergillus niger* from rottened breads

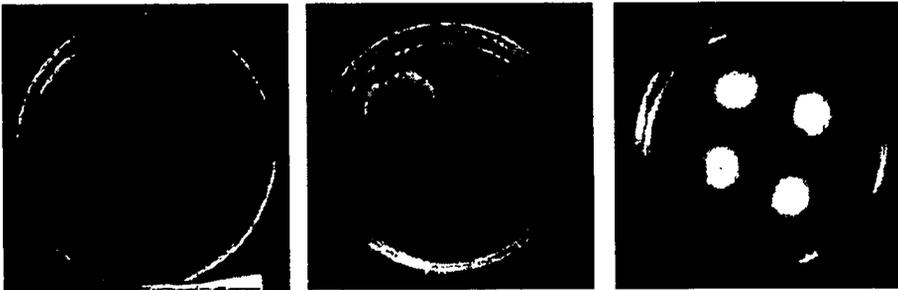
Species	<i>Aspergillus niger</i>
Conidiophores' marking, color and length(μm)	smooth, colorless, 1000-1200
Conidial head' shape and color	radiate, black
Vesicle' shape, fertile area, color and size(μm)	globose, whole, colorless, 55-58
Phialide: arrangement	biseriate
Conidia: shape, marking and color	subglobose, rough, black
Size of metulae and phialides(μm)	18-25X4.5-5.5, 6-7.5X3-3.5

Table 3. Identification of isolated *Penicillium stoloniferum* rottened breads

Species	<i>Penicillium stoloniferum</i>
Conidiophores: marking and length(um)	smooth, 100-250
Metulae: (um)	absent
Phialides: (um)	6-10
Conidia: marking, shape and size(um)	spiny, globose, 3.0-3.3
Colony at 25°C color and size(mm)	(O)dark green (R)colorless, 40-43
Growth at 37°C	no growth
62Surface of colony	109velent and floccose

2. 빵부패를 저해하는 천연보존제의 탐색

빵 부패의 원인 곰팡이들에 대해 항균활성을 갖는 천연물을 탐색한 결과 *Aspergillus niger*에 대해서는 동백꽃씨가 가장 강한 항균력을 나타내었으며 황련, 닥나무와 알로에도 강한 항균력을 나타 내었다. 마늘, 생강, 금은화등도 좋은 항균활성을 보였다. 푸른곰팡이 *Penicillium stoloniferum*에 대해서는 황련이 가장 강한 항균력을 나타냈고 역시 동백꽃씨, 닥나무도 강한 항균력을 보였으며 다시마와 금은화 또한 비교적 항균력이 좋은 편이었다. 흰곰팡이 *Trichosporon variable*에 대해서도 황련, 동백꽃씨, 닥나무, 굴껍질, 녹차잎과 금은화등이 좋은 항균력을 나타냈다. 황련과 동백꽃씨, 닥나무와 금은화가 빵 곰팡이들에 대해 비교적 강한 항균력을 나타내었으며, 이 천연물들중 전반적으로 강한 항균활성을 보인 황련을 분획하고 분리·정제하였다.



(1)

(2)

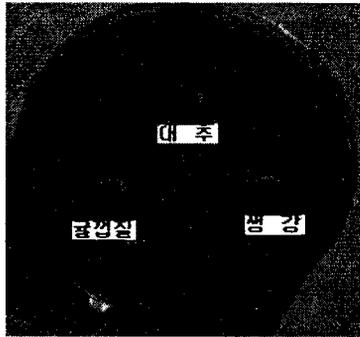
(3)

Fig. 3. Isolation and identification of rottenig-bread fungi isolated from bread (1): *Aspergillusniger*, (2): *Penicillium stoloniferum*, (3): *Trichosporon variable*)

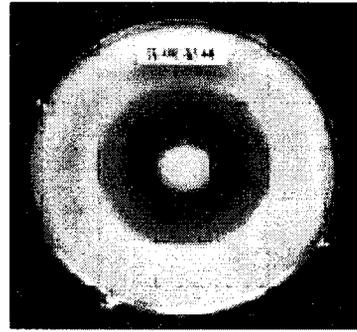
Table 4. 빵 부패에 관여하는 곰팡이 억제제 실험

Natural product Name	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Trichosporon variable</i>
마늘	+++	++	+
다시마	-	+++	++
파슬리	-	-	+
녹차	-	++	+++
대추	-	-	++
생강	++	-	+
귤껍질	++	++	+++
알로에	+++	+	++
은행잎			
다나무	+++	+++	++++
인삼	-	-	-
연자유	-	-	-
산약	-	-	-
캐일자	-	-	-
겨자	-	-	-
씀바귀	-	-	-
황련	+++	++++	++++
등글레	-	-	-
주머니털버섯	-	-	-
셀러리	-	-	-
연근	-	-	-
치커리	-	-	-
동백꽃씨	++++	++	+++
참치	-	-	-
무화과	-	-	++
솔잎	-	-	+
영지			
금은화	+++	+++	+++
감잎	++	++	++
미나리	-	-	-

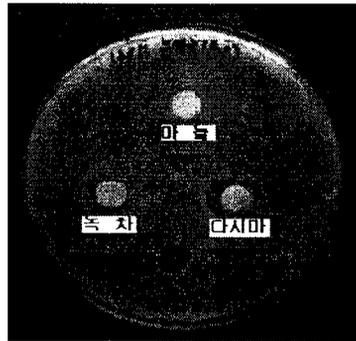
-: no inhibition, +: inhibition size 1-3mm, ++: inhibition size 4-5mm, +++: inhibition size of over the 7mm



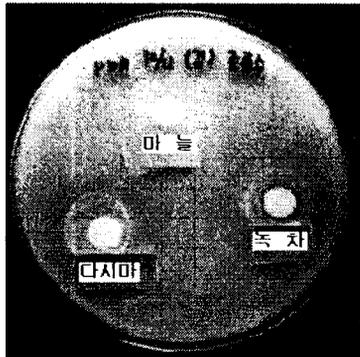
(1)



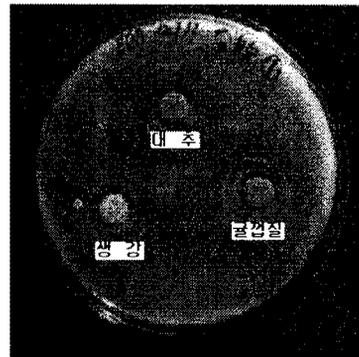
(2)



(3)



(4)



(5)

Fig. 4. Screening of antimicrobial natural products on bread-rotting fungi isolated from bread

(1),(2) : *Aspergillus niger*, (3) : *Penicillium stoloniferum*,

(4),(5) : *Trichosporon variable*

3. 황련의 분리·정제

분리된 빵곰팡이들에 대해 가장 항균활성이 좋게 나타난 황련을 용매로 분획하여 분리하고 정제하였다.

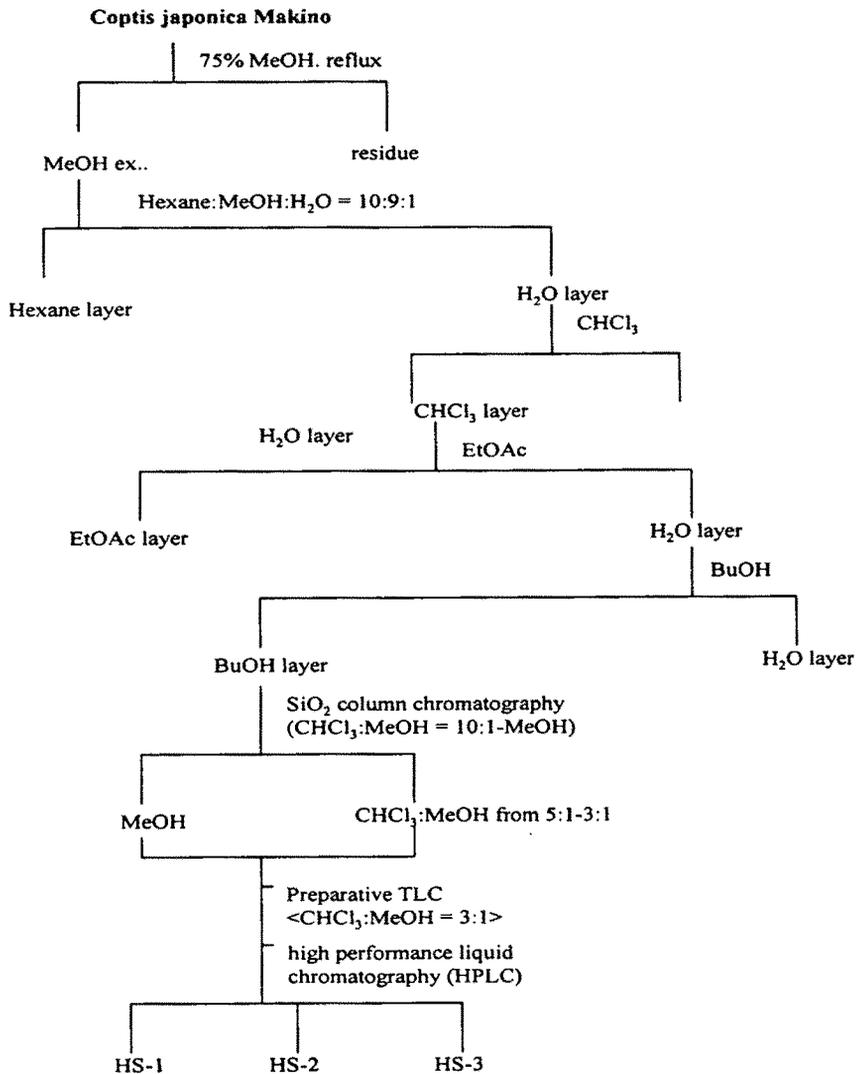
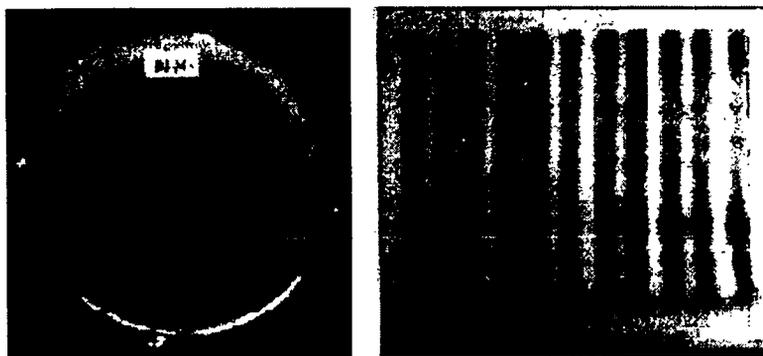


Fig. 5. Isolation and Identification of *Coptis Japonica Makino*



(1)

(2)

Fig. 6. Antifungal effect and separation by TLC method of *Coptis Japonica Makino*

$^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 측정한 결과 11개의 프로톤 피크가 관찰되었다. 그 중 methine 피크는 7.66, 6.96, 8.12, 7.99, 8.70 ppm으로 6개이며 이 중 8.12와 7.99 ppm은 $J=9.3$ Hz로 *ortho*-coupling 하고 있다. Methylene은 모두 2개(3.25, 4.92 ppm)로 이 들은 $J=6.3$ Hz로 coupling하고 있음을 알 수 있었다. 또한 2개의 methoxy기가 4.11과 4.2 ppm에서 나타났다.

$^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼에서는 20개의 카본 피크가 관찰되었다. 역시 대부분의 피트가 100-150 ppm 사이에 나타나 방향족의 이중결합탄소에 기인한 것으로 예측하였다. 57.7과 62.5 ppm 에서는 methoxy기가 확인 되었고 28.2와 57.2 ppm에서는 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 이 존재함을 나타내었다. 이상의 결과를 토대로 문헌검색을 실시한 결과 황련의 대표적 화합물인 berberine의 ^1H , ^{13}C spectrum과 잘 일치하여 berberine임을 뒷받침하였다.

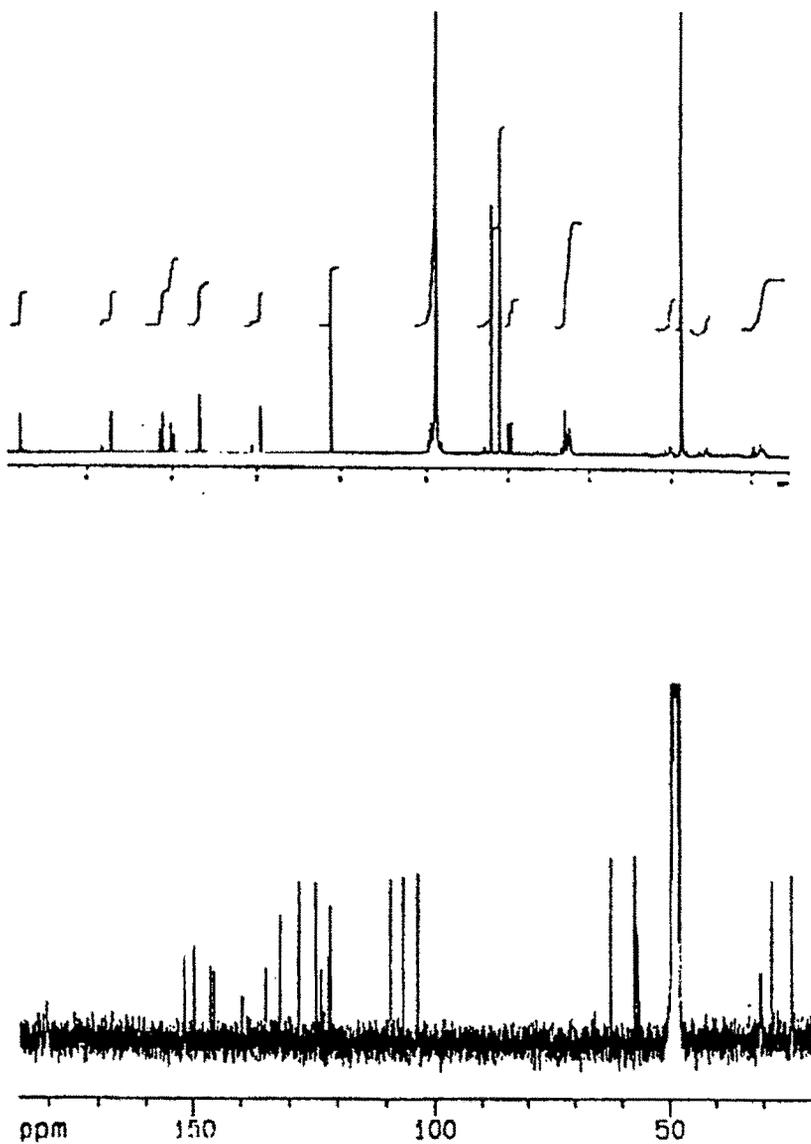


Fig. 9. ^1H and ^{13}C -NMR spectrum of in *Coptis Japonica Makino* in CD_3OD

제 4 장 참고문헌

1. Houlihan, C. M. and Ho, C.T., Chapter 6 in " Flavor chemistry of fats and oils", edited by Min, D.B. and Smouse, T.H., American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, USA, 1985.
2. Ramarathnam, N. Osawa, T. Namiki, M. Kawakishi, S., Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. Isolation fractionation and partial characterization, J. Agric. Food. Chem. 36, 732, 1988.
3. Toda, S., Tanisawa, H. Arichi, S. and Takino, Y., Inhibitory effects of methanol extracts of crude drugs on the air oxidation of linoleic acid. Yakugaku Zasshi, 104, 394, 1984.
4. 이연재, 신동화, 장영상, 강우석, 붉나무 순차 용매 추출물의 항산화 효과 비교, 한국 식품 과학 회지, 25, 667, 1993.
5. 장영상, 최웅, 신동화, 신재익, 항산화 효과가 있는 붉나무 추출물의 몇 가지 synergist 첨가 효과, 한국 식품 과학 회지, 24, 149, 1992.
6. 최웅, 신동화, 장영상, 신재익, 식물성 천연 항산화 물질의 검색과 그 황산화력 비교, 한국 식품 과학 회지 24, 142, 1992
7. Lake, B. G. :Preparation and charaterisation of microsomal frations for studies on xenobiotic metabolism, in Biochemical Toxicology(edited by K. Snell and B. Mullock), IRL Press, oxford. Washington DC, p183, 1987.
8. Su, J. Osawa, T. Kawakishi, S. and Namiki, M., Antioxidative flavonoids isolated from *Osbeckia chinensis* L, Agric Biol. Chem., 51, 2801, 1987.
9. Su, J. Osawa, T. Kawakishi, S. and Namiki, M., Tanin antioxidants

from *Osbeckia chinesis*. *Phytochemistry* 27. 1315, 1988.

10. Zahang, K. Yongdo, B. Rosen, R. T. and Ho, C., Antioxidative components of Tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bung). *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1194, 1990.

제 5 세부과제. 주류 보존제의 탐색

여 백

제 5 세부과제. 주류 보존제의 탐색

제 1 장 서 론

우리의 한민족이 옛날부터 즐겨 마셨던 술은 그 종류가 대단히 많고, 양조방법이 다양하였음을 산림경제(山林經濟), 양주방(釀酒方), 규각총서(閩關叢書), 방사제요(放事提要) 등의 고문헌을 통하여 알 수 있으며, 이 중에서도 고급 약주로서는 소곡주, 청명주, 삼해주, 하향주, 녹파주 등을 들 수 있다⁽¹⁾. 이 중 한산 소곡주는⁽¹⁻⁵⁾ 충청남도 무형문화재로 지정되어 있는 우리 나라 전통술의 하나이다. 소곡주와 유사한 제조과정을 거치는 청주 등의 제품 중에 포함되어 있는 유기산의 신맛은 제품의 특이한 술맛을 구성하는데에 필수적인 요소이다 그러나, 화입공정을 거치는 청주 등^(6,7)과는 다르게 전통적인 제조과정의 소곡주는 화입과정을 거치지 않기 때문에 발효에 관여한 미생물이 그대로 존재하므로 자연상태로 보관하면 여름에는 10일, 겨울에는 한달 반 정도면 시어져서 상품으로서의 가치를 잃어버리게 된다. 19세기말 프랑스 파스퇴르의 포도주 산패에 관한 고전적인 연구가 있는 후 포도주·과실주의 시어짐에 관한 많은 연구보고가 있었으나, 국내에서 “약·탁주의 변패와 미생물과의 관계”에 관한 구체적인 연구는 거의 없었다^(8,9).

본 연구에서는 한산 소곡주를 시어지게 하는 원인을 규명하기 위하여 소곡주의 유기산 조성, 소곡주에 존재하는 미생물 균총, 시간 경과에 따른 소곡주의 pH와 산 함량변화, 시간 경과에 따른 소곡주의 미생물 균총의 변화, 시어진 소곡주의 유기산 조성, 시어짐을 일으키는 원인균의 생육 정지 온도, 그 온도에서 소곡주 품질이 유지되는 기간 등을 조사하였고 소곡주

의 시어짐을 방지하는 천연보존제로서 오미자의 효과를 고찰하였기에 보고하는 바이다.

제 2 장 연구 방법

제 1 절 한산소곡주

1. 실험 재료

가. 소곡주 제조

소곡주는 충남 서천군 한산면에 위치한 '한산 소곡주(대표 : 라장연)'에서 제공받아 본 실험에 사용하였다. 소곡주의 제법은 다음과 같다.

누룩물에 흰무리떡가루인 술밥을 넣고 발효시켜 밀술을 만든다. 밀술을 여과한 후 이 밀술을 물 대신 사용하여 다시 누룩물을 만들고 여기에 술밥을 첨가해 발효시킨 후 '여과, 누룩물 제조, 술밥 첨가, 발효' 과정을 다시 한 번 행한다. 그 다음 이를 통에 담아 지하실에서 100일 동안 숙성시킨 에탄올 함량 16.0~16.8%의 술을 시료로 하였다⁽¹⁾.

2. 실험방법

가. 소곡주에 존재하는 미생물 균총의 분리 및 동정

소곡주에 존재하는 미생물 상을 살피기 위하여 LB plate배지에 소곡주 액 0.1 mL을 접종하여 30℃에서 배양하고, 혐기성 plate배지에 소곡주 액 0.1 mL을 접종한 후 이 위에 2% agar 용액을 45℃로 식혀 부어 중층을 만들어 굳힌 후 역시 30℃에서 배양하였다⁽⁹⁾. Colony가 얼어지면 이들을 먼저 형태에 따라서 분해한 후 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라서 genus 수준까지 동정하였다.

나. 시간경과에 따른 소곡주의 pH와 산 함량 변화

멸균된 용기에 소곡주를 넣고 밀봉한 후 30℃ 배양기에 매 24시간마다 pH와 산 함량을 18일간 측정하였다. 산 함량을 시료 10 mL에 pH 값이 7이 될 때까지 가한 0.1 N NaOH 용액의 양(mL)으로 나타내었다^(2,12).

다. 소곡주의 유기산 분석

정상적인 소곡주 제품과 30℃에서 18일간 보관되어 시어진 소곡주의 유기산 조성을 HPLC로 분석하였다. 분석을 실온에서 하였으며 이때 column은 Aminex Ion Exclusion HPX-87H를 사용했고 용리액으로는 0.008 N의 H₂SO₄ 용액을 사용했다. Flow rate는 1.0 mL/min로 하였고 검출은 파장 214 nm를 이용했으며 injection volume는 20 µL로 하였다.

제 2 절 천연물 보존제의 탐색

1. 실험 재료

가. 배지 제조

항균력 시험용 평판배지는 LB배지로 살균된 기층용 배지(1.5% agar)를 petry dish에 10ml씩 분주하여 응고시키고 그 위에 계대 배양된 *Lactobacillus* 속 세균을 접종시킨 증충용 배지(0.8% agar)를 10ml씩 분주하여 응고시킨 증충배지를 이용한다.

나. 오미자, 청매실 물 추출물의제조

충남 금산에서 구입한 오미자와 대전 유성에서 구입한 청매실 각각을 분쇄한 시료에 증류수를 가한 후 8시간 동안 상온에서 진탕하면서 3회 반복하여 추출하였다. 추출한 후 여지로 여과하고, 60℃에서 감압 농축하였다.

다. 황금, 금은화 methanol 추출물의 제조

충남 금산에서 구입한 황금과 금은화를 분쇄한 후 시료에 methanol 1.5L 을 가한 후 8시간 동안 상온에서 진탕하면서 3회 반복하여 추출하였다. 추출한 후 여지로 여과하고, 60℃에서 감압 농축하였다.

2. 실험 방법

가. 소곡주 부패균에 대한 항균활성

소곡주 부패균인 *lactobacillus* 속 세균에 대한 항균활성은 직경 8mm인 paper disc를 이용하였고 여러 천연물 추출액에 대해 활성을 시험하였다.

나. 천연물 추출액 첨가시 산도 변화

여러 가지 천연물 추출액 중에서 소곡주 부패균인 *lactobacillus* 속 세균에 비교적 강한 항균효과를 보인 천연물 추출액인 오미자, 황금, 금은화, 청매실을 소곡주에 각각 0.1%씩 첨가하고, 30℃에 17일간 저장하여 산도의 변화를 관찰하였다.

다. 오미자 추출물 첨가시 산도 변화

오미자의 한산소곡주 저장성을 알아보기 위해 오미자 물 추출액과 오미자 powder를 각각 0.1%, 0.2%, 0.3%씩 술에 첨가하고, 오미자 powder의 경우 1%까지 술에 첨가하여 30도에서 10일간 산도의 증가율을 관찰하였다.

제 3 장 연구결과

제 1 절 한산 소곡주

1. 소곡주에 존재하는 부패균 분리 및 동정

시판 소곡주 제품에서 8종류의 colony를 형성하는 미생물들이 발견되었다(Table 1). 이 중 4종류는 *Lactobacillus* 속 세균이었고, 2 종류는 *Bacillus* 속 세균이었으며, 그리고 2 종류는 *yeast*로 판명되었다. 그러므로 소곡주에는 *Lactobacillus* 속 세균 이외의 젖산균은 존재하지 않음을 알 수 있었다. Table 1에서 볼 수 있듯이 a와 e, b와 f, c와 g, d와 h는 각각 그 형태가 서로 거의 동일하며, 동정 결과에서 동일한 결과를 나타내었으므로 LB와 혐기성 plate에 각각 같은 종류의 균에 의해 형성된 colony라고 판정하였다. 그리고 a와 e colony를 형성한 균을 *Lactobacillus* B, c와 g colony를 형성한 균을 *Bacillus* C, d와 h colony를 형성한 균을 *yeast* D라고 명명하였다. 가장 많은 수를 차지하고 있는 세균은 *Lactobacillus* A로서 5.7×10^5 CFU/mL이었으며 *yeast* D의 세포수는 8.25×10^3 CFU/mL이었다.

Table 1. Microorganisms in normal sogokju

Medium	Colony name	Colony shape	Shape	Gram staining	Catalase	Spore	Oxygen demand	Genus	Number (CFU/ml)
LB	a	round, yellow	rod	+	-	-	microaerophilic	Lactobacillus	560000
LB	b	round, white	rod	+	-	-	microaerophilic	lactobacillus	8900
LB	c	circular cone, yellow	rod	+	+	+	facultative anaerobic	Bacillus	1700
LB	d	round (large), yellow	yeast		+	+	microaerophilic	Yeast	8500
AM	e	round, white	rod	+	-	-	microaerophilic	Lactobacillus	580000
AM	f	round, white	rod	+	-	-	facultative anaerobic	Lactobacillus	9000
AM	g	round, yellow	rod	+	+	+	facultative anaerobic	Bacillus	1500
AM	h	oval (large), yellow	yeast		+	+	facultative anaerobic	Yeast	8000

¹⁾ AM=Anaerobic medium

2. 시간 경과에 따른 소곡주의 pH와 산 함량 변화

시간 경과에 따른 소곡주의 pH와 산 함량 변화는 Fig. 1과 같다. 정상적인 소곡주의 초기 pH는 4.01이었으며, 30℃에 방치한 후 8일이 경과되었을 때부터 pH가 급격하게 하강하여 15일 후 3.31에 도달하였으며, 16일 이후 부터는 소곡주가 산패되어 상품으로서의 가치를 잃어버렸음을 관능검사 결과로 알 수 있었다.

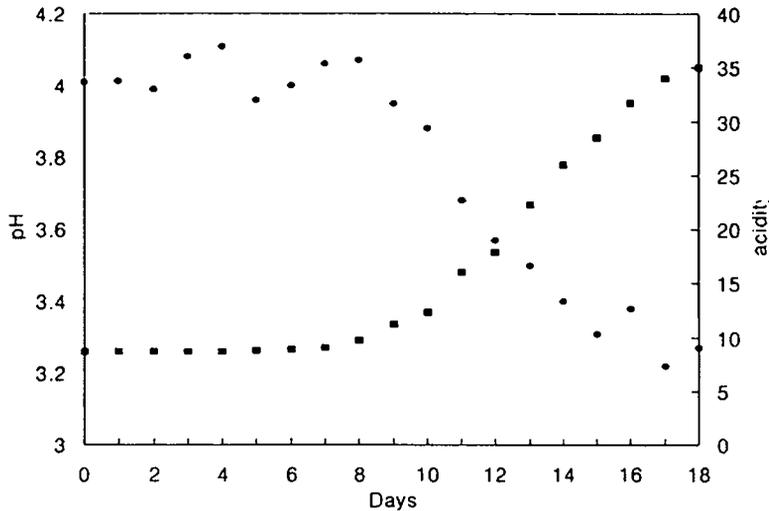


Fig. 1. Change of pH and titrable acidity of sogokju as time course ●-●: pH, ■-■: titrable acid

3. 시간 경과에 따른 소곡주의 미생물 균총 변화

시간 경과에 따른 소곡주의 미생물 균총 변화는 Fig. 2와 같다. Bacillus C를 제외한 나머지 균들은 시간이 경과함에 따라 전반적으로 수가 감소하였다. Yeast D의 감소현상은 소곡주내 영양분의 점차적인 고갈과 시어짐 원인균이 일으킨 유기산 량의 증가에 의한 pH의 감소가 yeast D의 생육을 저해했기 때문인 것으로 해석된다. Bacillus C를 액체 LB 배지에서 배양한 결과 배지 표면에 막을 형성하였고 점성을 띤 물질을 대량 생산해 냈는데 18일간 방치한 이 소곡주 sample에서는 이러한 일이 일어나지 않았다. 이 사실은 Bacillus C가 소곡주 내에서 생육이 거의 일어나지 않고 내생포자 형태로 계속 존재해 왔을 것이라는 생각을 뒷받침해주는 증거이다. 따라서 Bacillus C는 시어짐의 원인균이 아님을 알 수 있다.

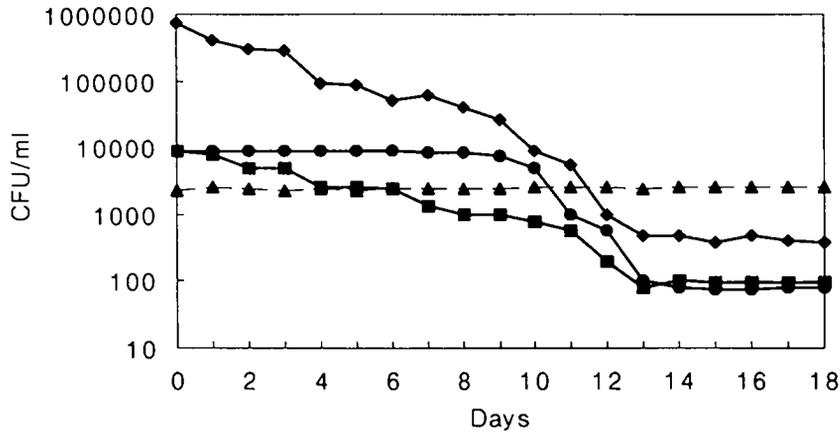


Fig. 2. Numerical change of each microorganism in *so-gokju* as time course. Average value of number in LB plate medium and number in anaerobic plate medium ◆-◆ : *Lactobacillus A*, ■-■ : *Lactobacillus B*, ▲-▲ : *Bacillus*, ●-● : *Yeast D*

4. 소곡주와 시어진 소곡주의 유기산 조성

정상 소곡주 제품과 시어진 소곡주의 유기산 조성은 Table 2와 같다. 소곡주에 존재하는 유기산의 대부분이 lactic acid였으며 그 외의 유기산으로는 acetic acid, malic acid, propionic acid가 lactic acid의 10분의 1 이하로 존재하였으며, citric acid, oxalic acid, fumaric acid, succinic acid, butyric acid 등은 존재하지 않았다. 이 결과와 시어진 소곡주의 유기산 조성을 비교해보면 lactic acid 만이 30 mM 정도 증가하였으며, 기타 유기산의 함량은 거의 차이가 없음을 알 수 있다. 즉, 소곡주의 시어짐 현상은 저장 기간동안에 이루어진 lactic acid의 추가적인 생성으로 인한 것임을 알 수 있다. 따라서 소곡주에 존재하는 젖산균인 *Lactobacillus A*와 *Lactobacillus B*가 소곡주의 시어짐의 원인균일 것이라고 추측하였다. 이는 약주와 탁주가 발효보관 중에 시어지는 이유가 약·탁주 중의 알코올을

초산균이다 낙산균에 의하여 초산이나 낙산으로 전환되는 데에 그 이유가 있다고 한 정 등의 보고⁽¹³⁾와는 다른 것이며, 민 등은⁽¹⁴⁾ 이를 해결하기 위하여 탁주에 5-nitro-2-furaldehyde-semicarbazone의 첨가를 시도하였다.

Table 2. Organic acids in normal *sogokju* and soured *sogokju*

Organic acid	Normal <i>sogokju</i>	Soured <i>sogokju</i>
Acetic acid	15	14
Citric acid	-	-
Lactic acid	161	192
Oxalic acid	-	-
Fumaric acid	-	-
D,L-Malic acid	3.8	5.1
Succinic acid	-	-
Propionic acid	9.4	10.8
Butyric acid	-	-

unit=mM

5. 시어짐의 원인균 생육 정지 온도와 이 온도에서 소곡주 품질이 유지되는 기간

시어짐의 원인균으로 생각되는 *Lactobacillus A*와 *Lactobacillus B*의 각 온도에 따른 colony 형성에 필요한 기간을 Table 3과 같다. 두 젖산균의 생육 정지 온도는 15°C에서의 소곡주 품질 변화는 Table 4와 같았다. 즉 두 젖산균이 자라지 못하는 15°C에서 약 41일 동안 약주인 소곡주로서의 고유한 향기와 맛을 지닌 품질이 유지됨을 알 수 있었다. 따라서 *Lactobacillus A*와 *Lactobacillus B*를 소곡주의 시어짐 원인균일 것이라고 결정하였으며, 15°C 이하의 온도가 소곡주 보관의 적정온도임을 알게 되었다. 앞에서 제시한 Fig. 1과 Fig. 2를 비교해보면 8~14일 사이에 산 함량은 급격히 증가했는데 시어짐 원인균일 것이라고 판정한 두 균의 수는 급격히 감소함을 알 수 있다. 본 연구에서는 pH가 크게 떨어지고 산 함량이

크게 증가한 상태인 14~18일 사이에 일정 수로 계속 유지된 *Lactobacillus* A, B가 낮은 pH에 저항성을 갖는 strain이고 이들에 의해 대부분의 젖산이 생성되어졌기 때문에 이러한 결과가 얻어졌을 것이라고 추정하였다. 그리고 소곡주를 냉장고에 보관했을 때 품질이 유지되는 기간은 45일 정도였다 즉, 특별한 기술적 처리없이 소곡주를 보관하려 할 경우 보관 가능 기간은 45일 정도이다.

Table 3. Growth of *Lactobacillus* A and *Lactobacillus* B in each temperature

Period at 15°C(days)	pH	Titration acidity	Taste
0	3.77	11.5	normal
14	3.74	11.5	normal
18	3.71	11.7	normal
27	3.73	11.9	normal
34	3.70	12.1	normal
41	3.70	12.5	normal
45	3.66	14.0	sour

*Taste was determined by five pannelist

Table 4. Change of Sogokju's quality at 15°C

Period at 15°C (days)	pH	Titration acidity	Taste
0	3.77	11.5	normal
14	3.74	11.5	normal
18	3.71	11.7	normal
27	3.73	11.9	normal
34	3.70	12.1	normal
41	3.70	12.5	normal
45	3.66	14.0	sour

이상의 결과를 고찰해 봄으로써 한산 소곡주를 시어지게 하는 원인균은 *Lactobacillus* 속 세균일 것으로 판정할 수 있었으며, 이 균들의 생육 정지온도는 15°C이었으므로, 한산 소곡주의 보관을 위한 적정온도는 15°C이하임을 알 수 있었다. 이상의 연구 결과가 소곡주 제조와 보관에 적용된다면 유익한 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

제2절 천연물 보존제

1. 소곡주 부패균에 대한 항균활성 검색 및 산도 관찰

여러 천연물 중에서 소곡주의 시어짐의 원인인 부패균주 즉, *Lactobacillus* 속 세균에 대해 비교적 강한 항균활성을 보인 4가지 천연물 추출액 오미자 (H₂O), 황금 (MeOH), 금은화 (MeOH), 청매실 (H₂O)를 선택하여 소곡주에 각각 0.1%씩 첨가하고, 30도에 17일간 저장하여 산도의 변화를 관찰하였다. 각각 0.1%씩 사용하여 술의 산도 변화를 관찰한 결과는 table 5와 같다. 30°C 저장후 6일 경과까지 모든 첨가구에서 대조구와 비

슷한 산도를 나타냈으나, 16일 경과후 오미자 첨가구의 산도가 대조구에 비해 약 0.4% 낮은 결과를 보였다.

Table 5. Changes in acidity of rice wine by adding primary selected natural preservatives

Time(days)	Control	Omiija	Whangunn	Gumunwha	Maesyl
0일	0.258%	-	-	-	-
2일	0.276%	0.276%	0.264%	0.264%	0.273%
6일	0.521%	0.526%	0.543%	0.660%	0.499%
16일	1.014%	0.609%	1.188%	1.188%	0.960%

2. 오미자 첨가시 소곡주의 산도 변화

위의 실험에서 다른 천연물보다 효과가 뛰어난 오미자의 첨가량을 달리 하여 소곡주의 산도변화를 관찰한 결과 Fig 3에서 보는 것과 같이 소곡주의 산도가 모든 처리구에서 대조구보다 낮음을 볼 수 있었다. 오미자(H₂O) 추출액과 오미자 powder를 각각 0.1%에서 0.3%까지 첨가한 시료의 경우 대조구와 비교할 때 커다란 산도 변화의 차가 없었다. 그러나, 오미자 powder 1% 첨가구의 경우 8일까지 대조구와 비교할 때 산도가 절반밖에 되지 않았다. Fig.4는 오미자 첨가량에 따른 산도 증감율을 관찰한 것이다. 오미자 powder 1% 첨가시 소곡주 산도의 증감율이 8일 까지 대조구에 비해 절반에도 미치지 못함을 볼 수 있었고 대부분 오미자 첨가구의 산도 증감율이 대조구에 비해 낮음을 볼 수 있었다. 이것으로 보아서 오미자를 약 1% 정도 첨가할 경우 소곡주의 저장성 향상에 도움을 줄 것으로 사료된다.

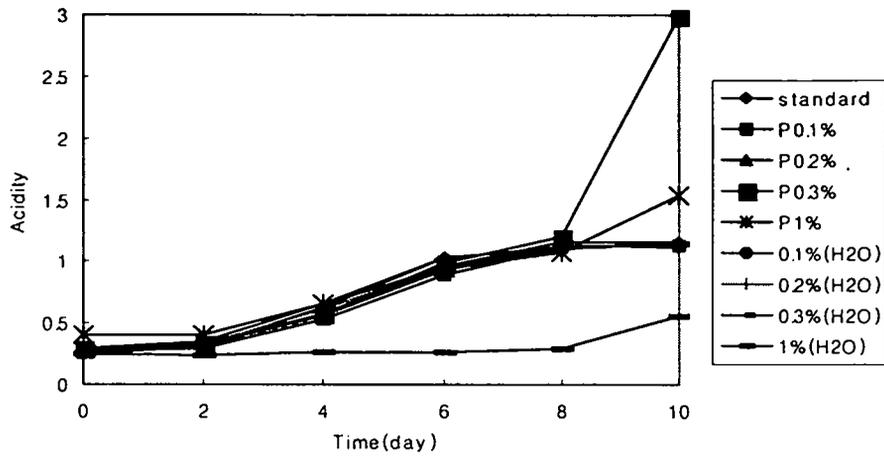


Fig.3 Effect to Sogokju acidity on the amount of Omija extract addition

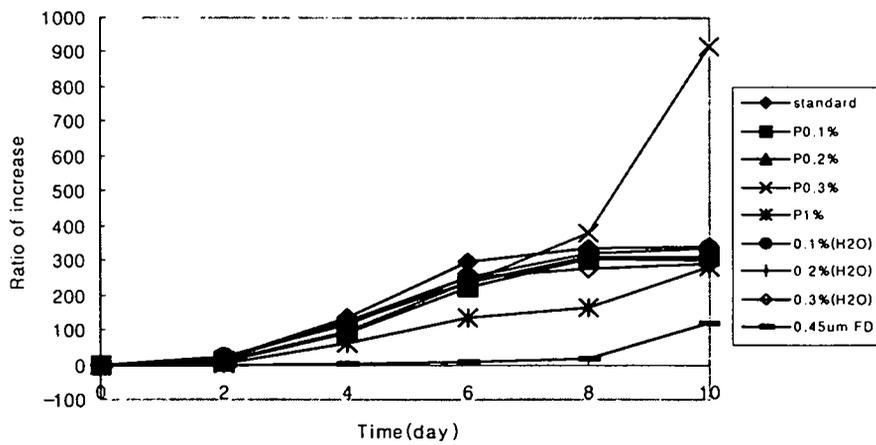


Fig.4 Increase of Sogokju acidity on the amount of Omija extract addition

제 3 절 오미자의 천연보존제로서 사용 가능성

한국 전통민속주의 한 종류인 한산 소곡주는 여름철에는 저장 도중 급속히 시어져 상품으로서의 가치를 잃게 된다. 본 연구에서는 이 시어짐의 원인을 규명하기 위하여 소곡주 제품에 잔존하고 있는 미생물의 분리 및 동정, 정상 소곡주와 시어진 소곡주에서의 미생물 균총의 차이, pH 변화, 유기산 함량 등을 조사하였다. 정상 소곡주에 존재하는 유기산의 대부분은 lactic acid였고 그 농도는 161 mM였으며 그 외에도 소량의 acetic acid, malic acid, propionic acid가 존재하였다. 소곡주에 존재하는 미생물 균총은 *Lactobacillus* 속 균, *Bacillus* 속 균, 그리고 yeast로 동정되었다. 30 °C에 18일 동안 방치한 소곡주는 pH가 4.01에서 3.29로 떨어졌고 산함량은 9에서 24.86으로 증가했다. 정상 소곡주와 비교한 경우 시어진 소곡주에 현저하게 증가한 양이 존재하는 유기산은 lactic acid로서 그 농도는 192 mM이었으며, 그 외의 다른 유기산의 농도는 거의 변화가 없었다. 따라서 소곡주 시어짐의 원인은 소곡주 내에 잔존하는 *Lactobacillus* 속 세균에 의한 추가적인 젖산의 생성 때문인 것으로 추정되었다. 소곡주의 품질은 15°C에서 41일 동안 유지되었다.

소곡주 시어짐의 원인인 *lactobacillus* 속 세균에 대해서 강한 항균활성이 있는 여러 천연물 중의 하나인 오미자를 소곡주에 첨가했을 때 소곡주의 산도 및 산도의 증가률이 다른 천연물에 비해 효과가 있었음을 알 수 있었다. 이것으로 비추어 볼 때 오미자는 소곡주의 시어짐을 방지하여 저장성을 높여주므로 주류의 천연보존제로 사용될 수도 있음을 알 수 있다.

제 4 장 참고문헌

1. 고려대 민족문화연구소: 고려대 한국민속대관(2). 고려대 민족문화연구소 출판부, p. 493(1982)
2. 이현재: 한국민족문화 대백과사전 12권. 한국정신문화연구원, 5th ed, p. 647(1994)
3. 한국민속사전 편찬위: 한국민속대사전 2권. 민족문화사, p. 860(1991)
4. 충청남도 도청 문화재계: 충청남도 지정 문화재자료집. 내무부, p. 245(1970)
5. 박호준: 고향음식의 맛과 먹. 한국문화재보호협회, p. 112(1990)
6. 이갑상, 홍재식, 최동성, 노완섭: 응용미생물학. 학문사, pp. 178-179(1990)
7. 장기중, 유태중: 소곡주와 시판 약주의 성분에 관한 연구. 한국식품과학회지, 13, 307(1981)
8. 김영신 편저: 한국 주류문헌해제(현대편). 진로(주), pp. 128-197(1982)
9. 한국미생물학회: 미생물학 실험. 아카데미서적, p. 25(1987)
10. Macfaddin, J.F. *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed., Williams & Wilkins, p. 51(1980)
11. Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Holt, J.G. and Sharpe, M.e.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2, Williams & Wilkins, p. 1104(1986)
12. 김재욱: 식품학 실험서. 개문사, p. 247(1985)
13. 정동효: 한국 식품연구문헌 총람. Vol 2, 한림원, p. 304(1997)
14. 민경락, 정우태 : 탁주 양조에 있어서 5-nitro-2-furaidehyde-semicarbazone의 방부효과. 충북대학 논문집, 4, 311(1970)

부 록

본 연구를 통하여 부수적으로 얻어진 결과를 아래와 같이 첨부합니다.

I. Screening of Antimicrobial Activity against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from Plants in Korea

II. 충치균 생육억제 및 충치유발 효소 활성억제 물질(특허)

부록 1.

Screening of Antimicrobial Activity against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 from Plants in Korea

ABSTRACT

We screened the methanol extracts from 133 plant species growing in Korea for antimicrobial activity against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Those plants are selected from three plant groupings; traditional medicinal herbs, edible plants, and flowers. They were tested by the disk diffusion assay. From the evaluation of the inhibition zone diameter of microbial growth, we found that the flower extract of *Rhododendron Schlipenbachii* Max has the most significant antimicrobial activity. Among the medicinal herbs, the extracts of *Prunus mume* S. et Z. has the best antimicrobial activity against this bacteria. Extracts from most of the vegetables and plants did not show the antimicrobial activity except the leaves of *Ginkgo biloba* L. and the seeds of *Prunus Sallicina* L.

Key words: antimicrobial activity, *Escherichia coli* O157:H7, Korea, plants

INTRODUCTION

Escherichia coli O157:H7 was firstly identified during the 1982 outbreak of severe diarrhea and hemorrhaging symptoms in the United States, whose presence was traced back the contaminate hamburgers. Since then, annually more than 20 000 cases of infection occurred in the country, leading to about 250 fatal cases (1). Enterohemorrhagic strains of *E. coli* O157:H7 produce Shiga-like toxins, which put the patients into a spectrum of illnesses, such as milk diarrhea, severe bloody diarrhea, hemolytic uremic syndrome, and death (2), especially among young children and the elders (1,3). Its occurrence has been closely associated with either the consumption of contaminated ground beef, raw milk and fermented hard salami or the person-to-person transmission by the fecal-oral route (1, 4-7).

Globally, the infection cases have been reported in more than two dozens of countries including Canada, Britain and France (8). The largest outbreak of the *E. coli* O157:H7 infections with approximately 6 000 patients was reported in Japan in 1996 (9). In Korea, the O157 bacteria has been recently found in the imported beefs from the United States (Sep 26, 1997), in the hamburger patties at a snack bar in Kwangju (May 19, 1998). Also an infection case was reported by the Chungbuk University medical center (May 17, 1998). These cases have driven the Korean government enforcing a more strict test rule against *E. coli* O157:H7 to imported foods through the National animal quarantine service and Korea food and drug administration.

For the reduction and elimination of *E. coli* O157:H7, they have studied the effects of gamma irradiation (10-12), bovine

lactoferrin and lactoferricin B (13), bacteriocin (14), vinegar (15), fumaric acid (16), spices (17) as well as several antimicrobial agents (18). Several Korean plants were also put into the antimicrobial screening test against food-borne pathogens and food spoilage organisms including *E. coli* from Korean plants (19-21). Until now, however, no report has yet appeared on the any significant antimicrobial activity against *E. coli* O157:H7 among the Korean medicinal herbs and wild plants.

In this report, we have conducted an antimicrobial screening test against enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 on the 142 methanol extracts from the 133 plant species growing in Korea which were selected primarily on the basis of their antibacterial activity in the traditional oriental medicinal formulations.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

The plant materials were collected out of the Chungchung-Do district in Korea during March ~ October in 1996. These materials were identified referring to botanical encyclopedia (22). The vegetable samples and the medicinal herbs were purchased from the several local markets in Korea. The plant materials were shade dried and stored at room temperature for a few days until further processing.

Preparation of extracts

Preparation of extracts from the dried plant materials (10 g) was done by fine grinding and extraction with 100 mL of methanol for 24 h on a shaker. The plant extract was filtered, and then the filtrate was evaporated to dryness under reduced pressure at 50°C.

Test organisms

We used both *E. coli* O157:H7 and *E. coli* ATCC (American type culture collection, NJ, USA) 25922 as the test organisms.

Antimicrobial activity test

We adopted the disc-plate method used for the antibacterial screening developed by Lennette (23) with some modifications: One hundred L of the diluted culture was spread on a sterile Muller-Hilton agar (BBL) plate. For the preparation of base plates, we poured the nutrient agar and the tryptic soy agar (TSA, Difco) including peptone and beef extracts into sterile Petri-dishes (9 cm), which was then allowed to set. The impregnated discs were then placed on the plates and incubated for 30 min for the ingredients to be diffused homogeneously. Then methanol was introduced in the same amount as the extracts; 20 L per disk. The plates has been incubated for 24 ~ 48 h until the resulting zone of inhibition was observed and recorded. The diameter of the inhibitory zone was observation recorded with the resolution of 1 mm. The test was triply duplicated to insure the reproducibility.

RESULTS AND DISCUSSION

The plants used in the traditional Korean medicines and foods were selected from three plant groupings; flowers, traditional medicinal herbs, and edible plants. The antibacterial activities of the 24 methanol extracts of the flowers were screened by the modified disc plate diffusion assay. Table 1 presented the results of antibacterial activity of 24 of flowers. Out of the 24 samples, as shown in Table the antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25922 was observed in 13 extracts. Against *E. coli* O157, however, only the extracts from *Rhododendron Schlipenbachii* Max showed any effective antimicrobial activity.

Table 2 presents the antibacterial activity of the 64 Korean traditional medicinal herbs, mostly used against bacterial infections, among which 28 herbs are also used as food (24). Even though these plants have been reported to have the antimicrobial effect against the clinical and the food pathogenic microorganisms (19,25,26), they showed only minor antimicrobial activities against *E. coli* O157:H7 in this study. Among the 64 medicinal herbs, the highest antimicrobial activity against the bacterial was observed from the extracts of *Prunus mume* S. et Z., *Lonicera japonica*, *Paeonic albiflora* and *Euenia caryophyllata* Thunb. It is worth mentioning that the addition of *Euenia caryophyllata* Thunb and *Cinnamomum cassia* Blume into cooked meals can exhibit the antibacterial activity against *E. coli* O157:H7 (17). Against *E. coli* O157:H7, the excellent antibacterial activity of *Prunus mume* S. et Z. may be closely related to its high activity. However, considering that *E. coli* O157:H7 can easily survive in the acidic condition (27), we cannot exclude the possibility of the presence of some unknown

compounds in *Prunus mume* S. et Z., which may effectively act against the bacterial.

The antibacterial activity results of vegetables and plants are presented in Table 3. Against *E. coli* O157, most extracts from vegetables and plants has only minor antimicrobial activity compared with the medicinal herbs, except the leaves of *Ginkgo biloba* L. and the seeds of *Prunus sallicina* L. In one hamburger study, *Allium satium* var. *pekinense* (garlic) is found to have the excellent inhibitory effect against the *E. coli* O157:H7 (17); however, its methanol extract didnt show any activity in our study. It suggests that *Allium satium* var. *pekinense* may have some antimicrobial active compounds that cannot be extracted by methanol.

CONCLUSION

In this report, we present the antimicrobial screening result of the selected 133 plant species growing in Korea against *E. coli* O157:H7. Out of the 133 polant species, five species were found to have the signigicant antibacterial activities; *Rhododendron Schlipenbachii* Max, *Prunus mume* S. et Z., *Lonicera japonica*, *Ginkgo biloba* L. and *Prunus Sallicina* L.

We hope that this report may serve as a primary guide for future works on the isolation and elucidation of the antibacterial compounds against *E. coli* O157:H7.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support from R & D Promotion Center for Ministry of Agriculture and Forestry in Korea.

REFERENCE

1. Griffin, P. M. and Tauxe, R. V. : The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.*, **13**, 60(1991)
2. Griffin, P. M., Ostroff, S. M. and Tauxe, R. V. : Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections: a broad clinical spectrum. *Ann. Intern. Med.*, **109**, 705(1988)
3. Tarr, P. I. : *Escherichia coli* O157:H7: clinical, diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.*, **20**, 1(1995)
4. Steele, B. T., Murphy, N. and Rance, C. P. : An outbreak of hemolytic uremic syndrome associated with ingestion of fresh apple juice. *J. Pediatr.*, **101**, 963(1982)
5. Padhye, N. V. and Doyle, M. P. : *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. *J. food Prot.*, **55**, 555(1992)
6. Besser, R. E., Lett, S. M., Wever, J. T., Doyle, M. P., Barrett, T. J., Wells, J. G. and Griffin, P.M. : An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA*, **269**, 2217(1993)

7. Tarr, P. I. : *Escherichia coli* O157:H7: Clinical diagnostic, and epidemiological aspects of human infection. *Clin. Infect. Dis.*, **20**, 1(1995)
8. Slutsker, L., Altekruze, S. F. and Swerdlow, D. L. : Foodborne diseases. Emerging pathogens and trends. *Infect Dis. Clin. North Am.*, **12**, 199(1998)
9. Yoh, M., Aoki, T., Akao, M., Sakaue, Y., Tsubura, E. and Honda, T. : Report of questionnaire about enterohemorrhagic *Escherichia coli* cases caused in the area including Sakai City in 1996. *Kansenshogaku Zasshi*, **71**, 1144(1997).
10. Thayer, D. W. and Boyd, G. : Elimination of *Escherichia coli* O157:H7 in meats by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1030(1993)
11. Clavero, M. R., Monk, J. K., Beuchat, L. R., Doyle, M. P. and Braddett, : Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2069(1994)
12. Byun, M. W., Kwon, O. J., Yook, H. S. and Kim, K. S. : Gamma irradiation and ozone treatment for inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in culture media. *J. Food Prot.*, **61**, 728 (1998)
13. Shin, K., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Hayasawa, H., Tomita M., Otsuka, Y. U. and Yamazaki, S. : Antibacterial activity of bovine lactoferrin and its peptides against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.*, **26**, 407(1998)
14. Murinda, S. E., Roberts, R. F. and Wilson, R. A. : Evaluation of colicin for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 3196(1996)
15. Entani, E., Asai, M., Tsujihata, S., Tsukamoto, Y. and Ohta,

- M. : Antibacterial action of vinegar against food-borne pathogenic bacteria including *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Prot.*, **61**, 953(1998)
16. Podlak, R. K., Zayas, J. F., Kastner, D. L. and Fung, D. Y. C. : Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* during storage on beef sanitized with fumaric, acetic, and lactic acids. *J. Food Safety*, **15**, 283(1995)
17. Ceylan, E., Kang, D. H. and Fung, D. Y. C. : Reduction of *E. coli* O157:H7 in ground meat by selected species. 1998 Annual Meeting & FOOD EXPO, Atlanta, USA, June 21(1998)
18. Oie, S., Kamiya, A., Tomita, M., Matsusaki, S., Katayama, A. and Iwasaki, A. : *In vitro* susceptibility of *Escherichia coli* O157 to several antimicrobial agents. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 584(1997)
19. Choi, O. K. and Sung, C. K. : Screening for antimicrobial activity from Korean Plants. *Korean J. of Appl. Microbiol. and biotechnol.* (1998) in press
20. Lee, B. W. and Shin, D. H. : Screening of natural antimicrobial plant extract on food spoilage microorganisms. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 200(1991)
21. Yang, M. S., Ha, Y. L., Nam, S. H., Choi, S. U. and Jang, D. S. : Screening of domestic plants with antibacterial activity. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **38**, 584(1995)
22. Song, J. T. : Botanical encyclopedia, Kubook Press Inc., Seoul (1986)
23. Lennette, E. H.: Manual of Clinical Microbiology (4th Edn.). American Association for Microbiology. Washington, D.C., (1985)
24. Korean Food Sanitation Law, Ministry of Health and Welfare, Republic of Korea, p. 122(1996)

25. Shin, K. H., Chi, H. J., Lim, S. S. Cho, S. H., Moon, H. I. and Yu, J. H. : Antimicrobial activities of volatile essential oils from Korean aromatic plants. *Natural Product Sciences*, **3**, 141(1997)
26. Bae, O. S., Hwang, J. O., Ahn, D. K., Woo, E. R., Seo, S. H., Kim, H. J. and Park, H. : Screening of oriental herbal medicines for antibacterial activities. *Natural Product Sciences*, **4**, 32(1998)
27. Clavero, M. R. and Beuchat, L. R. : survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 2735(1996)

Table 1. Antimicrobial activity of the flowers extracts by disk diffusion assay

Botanical name	English name	Inhibition zone (mm) per microorganism	
		<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Allium fistulosum</i> L. var. <i>Giganteum</i> Makino	Welsh onion	—	14
<i>Castanea crenata</i> Sieb. et. Zucc.	Chestnut	—	14
<i>Celosia cristata</i> L.	Cockscomb	—	12
<i>Dianthus caryophyllus</i> L.	Carnation	—	—
<i>Hibiscus syriacus</i> L.	Rose of sharon	—	10
<i>Hosta plantaginea</i> Ascher	Hosta	—	10
<i>Hydrangea macrophylla</i> Sering var. <i>Otakasa</i>	Japanese hydrangea	—	17
<i>Koelreuteria paniculata</i> Lax	Golden rain tree	—	15
<i>Lespedeza bicolor</i> Turcz var. <i>Japanica</i> Nak	Bush clover	—	—
<i>Lilium lancifolium</i> Thunb	Lily	—	—
<i>Magnolia kobus</i> A.P. DC.	Kobus Magnolia	—	—
<i>Magnolia liliflora</i> Desr.	Lily Magnolia	—	14
<i>Malus Pumila</i> Mill	Apple	—	—
<i>Nicotiana Tabacum</i> L.	Tabacco	—	11
<i>Prunus serrulata</i> L. var. <i>Spontanea</i> Makino	Japanese flowering cher	—	—
<i>Rhododendron schlipenbachii</i> Max	Rhododendron	15	13
<i>Robinia pseudoacacia</i> L.	Black locust	—	—
<i>Rosa centifolia</i> L.	Rose	—	16
<i>Rudbeckia laciniata</i> L.	Chrysanthemum	—	—
<i>Syringa Vulgaris</i> L.	Lilac	—	10
<i>Tagetes Patula</i> L.	French marigold	—	—
<i>Taraxacum platycarpum</i> Dahlst	Dandelion	—	—
<i>Trifolium repense</i> L.	Clover	—	15
<i>Wistaria Floribunda</i> De Candolle	Japanese Wistaria	—	—

Table 2. Antimicrobial activity of the medicinal herbs extracts by disk diffusion assay

Botanical name	English name	Plant parts	Inhibition zone (mm) per microorganism	
			<i>E. coli</i> 0157:H7	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Acanthopanax gracilistylus</i> W. W. Smith	C o r d e x Acanthopanax	fruits	—	—
<i>Achyranthes bidenta</i> var. <i>japonica</i> M.	Niux i	roots	—	—
<i>Acorus tatarinowii</i> Schott.	Rhizoma tatarinowii	Acori roots	—	—
<i>Adenophoratriphyta</i> D.C.	Ginsang	roots	—	—
<i>Alisma orientalis</i> (Sam.) Juzeeep.	Rhizoma alismatis	stems	—	—
<i>Aloe vera</i> L.	Aloe	leaves	—	—
<i>Angelica sinensis</i> Oliv Diels	Radix sinensis	Angelicae roots	—	—
<i>Astragalus membranaceus</i> Bunge	Astragalus	roots	—	—
<i>Aucklandia lappa</i> Decue	Radix Aucklandiae	roots	—	—
<i>Biota orientalis</i>	Oriental arborviae	leaves	—	—
<i>Carthamus tinctorium</i> L.	Flos carthami	flowers	—	—
<i>Cassia obtusifolia</i> L.	Semen cassiae	fruits	—	—
<i>Chaenomeles sinensis</i> Koehne	Chinese Quince	fruits	—	—
<i>Chrysanthemum indicum</i> L.	Chrysanthemum	stems, leaves	—	—
<i>Cibotium barometz</i> L. J. Sm.	Rhizoma Cibotii	roots	12	—
<i>Cimicifuga foetida</i> L.	Rhizoma cimicifugae	leaves	—	—
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	Cinnamon	barks	13	13
<i>Crataegus pinnatifida</i> Bunge	Hawthorn	fruits	—	—
<i>Cuscuta chinensis</i> Lam.	Semen cuscutae	seeds	—	—
<i>Cyathula officinalis</i> Kuan	Chuanniuxi	roots	—	—
<i>Cyperus rotundus</i> L.	Rhizoma cyperi	roots	—	—
<i>Dioscorea japonica</i> Thunb.	Throatwort	roots	10	15
<i>Epimedium brevicornum</i> Max.	Herba epimedii	leaves	—	—
<i>Epimedium koreanum</i> Nakai	Barberry	leaves	—	—
<i>Eucommia ulmoides</i> Oliv	Cortex eucommiae	stems	—	—
<i>Eunia caryophyllata</i> Thunb	Clove	buds	15	—
<i>Forsythia suspensa</i> Thunb Vahi	Fructs forsythiae	fruits	—	—
<i>Ganoderma lucidum</i> (Fr) Karsten	Lingzhi Cao	body	10	12
<i>Gastrodia elata</i> Blume	Tian Ma	roots	—	—
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo	nuts	—	—
<i>Gleditsia sinensis</i> Lam.	Spina gleditsiae	spine	—	—
<i>Glycyhiza glabra</i> L.	Liconce	bark	—	—
<i>Houttuynia cordata</i> Thunb	Herba houttuyniae	stems	—	—

Table 2. (Continued)

Botanical name	English name	Plant part	Inhibition zone (mm) per microorganism	
			<i>E. coli</i> 0157:H7	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Kalopanax pictum</i> Nakai	Kalopanax	bark	—	—
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	Motherwort	whole	—	—
<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	Rhizoma chuanxiong	roots	—	15
<i>Lonicera japonica</i>	Honeysuckle	flowers	30	—
<i>Lycium chinense</i> Miller	Night shade	roots	—	—
<i>Morus alba</i> L.	Cortex mori	roots	—	—
<i>Paeonia albiflora</i>	Peony	roots	20	—
<i>Perillae herba</i>	Perilla herb	leaves	—	—
<i>Phyllostachys bambusoides</i> Siebold	Bamboo	leaves	—	—
<i>Plantago asiatica</i> L.	Plantain seed	seeds	—	—
<i>Platycodon grandiflorum</i> Jacq. A. D.C.	Radix Platycodi	roots	—	—
<i>Polygala tenuifolia</i> Wild	Chalk milk wort	body	—	—
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunb	Radix polygoni multif	roots	—	—
<i>Poria cocos</i> Wolf	Polyporaceae	body	—	—
<i>Prunus armeniaca</i> var. Ansu Max.	Apricot	seeds	—	—
<i>Prunus mume</i> S. et Z.	Ume	fruits	34	20
<i>Prunus persica</i> L. Batsch	Semen persicae	seeds	—	—
<i>Pueraria lobata</i> Ohwi	Radix puerariae	roots	—	—
<i>Rehmannia glutinosa</i>	Radix Rehmanniae	roots	14	—
<i>Rehmannia glytinos</i> Libosch.	Radix Rehmanniae	roots	—	—
<i>Rheum officinale</i> Baill.	Radix et Rhizomare	roots	—	—
<i>Rubus chingii</i> Hu.	Fructus Rubi	fruits	—	—
<i>Saposhnikovia divaricata</i> Turcz. Sch	Radix Saposhinkoviae	roots	—	—
<i>Saururus chinensis</i> Lour. Baill.	Rhizoma saururi	stems	—	—
<i>Schizandra chinensis</i> (Turcz.) Baill	Fructus schisandrae	fruits	10	—
<i>Scrophularia ningpoensis</i> Hemsl.	Radix scrophulariae	roots	—	—
<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	Radix Scutellariae	roots	—	—
<i>Sophora flavescens</i> Ait	Radix sophorae	roots	—	—
<i>Trigonella foenumgraecum</i> L.	Semen trigellae	seeds	—	—
<i>Ulmus parvifolia</i> Jacq. var. <i>Coreana</i> Elm	Elm	roots	—	—
<i>Vitex trifolia</i> L. var. <i>Simplicifoli</i>	Fructus viticis	fruits	—	—

**Table 3. Antimicrobial activity of the
vegetables and plants extracts by disk
diffusion assay**

Botanical name	English name	Plant parts	Inhibition zone (mm) per microorganism	
			<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Acer palmatum</i> Thunb.	Japanese Maple (red)	leaves	—	10
<i>Acer palmatum</i> Thunb.	Japanese Maple (blue)	leaves	11	—
<i>Actinidia arguta</i> Planch	Cotton boll	whole	—	—
<i>Albizia julibrissin</i> Purazzini	Silk tree	leaves	—	—
<i>Allium cepa</i> L.	Onion	roots	—	15
<i>Allium sativum</i> var. <i>pekinense</i>	Garlic	bulb	—	16
<i>Allium monanthum</i> Max.	Wild rocambole	roots	—	—
<i>Allium monanthum</i> Max.	Wild rocambole	leaves	—	—
<i>Allium tuberosum</i> Roth	Leek	leaves	—	—
<i>Amaranthus mangostanus</i> L.	Amaranthus	leaves	10	—
<i>Amorpha fruticosa</i> L.	Bastard Indigo	leaves	—	15
<i>Arachis hypogaea</i> L.	Peanut	nuts	—	—
<i>Aretium lappa</i> L.	Burdock	roots	—	—
<i>Artemisia asiatica</i> Nakai	Mugwort	leaves	—	—
<i>Berchemia berchemiaefolia</i> Mak. Koidzumi	Korean Berchemia	leaves	—	19
<i>Capsella bursa-pastoris</i> L. Medicus	Shepherd's purse	roots	—	—
<i>Capsella bursa-pastoris</i> L. Medicus	Shepherd's purse	leaves	—	—
<i>Capsicum annuum</i> L.	Red pepper	fruits	—	—
<i>Capsicum annuum</i> L.	Unripe pepper	fruits	—	—
<i>Chelidonium majus</i> var. <i>asiticum</i> (HARA) Ohwi	Chelidonium majus	leaves	—	—
<i>Codonopsis lanceolata</i> S. et. Z. T.	<i>Codonopsis lanceolata</i>	roots	—	—
<i>Colocasia antiquorum</i> Schott. var. <i>esculentum</i>	Taro	roots	—	—
<i>Colocasia antiquorum</i> Schott. var. <i>esculentum</i>	Taro	leaves	—	—
<i>Diospyros Kaki</i> L. fil	Persimmon	leaves	—	13
<i>Diospyros Kaki</i> L. fil	Persimmon	fruits	—	—
<i>Doncirus trifoliata</i> Rafinesque	Trifoliata orange	seeds	—	—
<i>Persicaria senticosa</i> Nakai	Persicaria senticosa	leaves	—	—
<i>Petasites japonicus</i> S. et. Z. Maxim	Butterbur	fruits	10	—

Table 3. (Continued)

Botanical name	English name	Plant parts	Inhibition zone (mm) per microorganism	
			<i>E. coli</i> O157:H7	<i>E. coli</i> ATCC 25922
<i>Gardenia jasminoides</i> for. <i>grandiflora</i>				
Makino	Gardenia seed	fruits	—	—
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Ginkgo	leaves	22	—
<i>Heimerocallis longituba</i> Miq	Day lily	leaves	—	—
<i>Juglans sinensis</i> DC. Dode	Chinese walnut	leaves	—	—
<i>Juniperus chinensis</i> L.	Chinese juniper	leaves	—	—
<i>Lactuca indica</i> L.	Agave	leaves	10	11
<i>Lilium lancifolium</i> Thunb	Lily	seeds	10	—
<i>Morus alba</i> L.	White mulberry	seeds	—	—
<i>Oenanthe javanica</i> BL. DC.	Dropwort	leaves	—	—
<i>Perilla frutescens</i> Brit var. <i>japonica</i> Hara	Green perilla	leaves	—	—
<i>Persicaria hydropiper</i> L.	Persicaria	leaves	—	10
<i>Pinus densiflora</i> S. et Z.	Japanese red pine	bark	—	—
<i>Pinus densiflora</i> S. et Z.	Japanese red pine	leaves	—	13
<i>Pinus densiflora</i> S. et Z.	Japanese red pine	flowers	13	10
<i>Pinus rigida</i> Miller	Pitch pine	leaves	—	14
<i>Polygonatum odoratum</i> var. <i>pluriflorum</i> OHWL	Redoute	roots	—	—
<i>Prunus Salicina</i> L.	Japanese plum	fruits	—	15
<i>Prunus Salicina</i> L.	Japanese plum	seeds	15	—
<i>Ricinus communis</i> L.	Castor oil plant	fruits	—	—
<i>Rorippa nasturtium</i> Beck	Shepherd's purse	leaves	—	—
<i>Sedum sarmentosum</i> Bunge	Sedum	leaves	—	—
<i>Semiaquilegia adoxoides</i> Makino	Semiaquilegia adoxoid	whole	—	—
<i>Solanum tuberosum</i> L.	Potato	peel	—	—
<i>Taraxacum platycarpum</i> Dahlst	Dandelion	seeds	—	—
<i>Xeris dentata</i> Thunb. Nakai	Lettuce	leaves	—	—
<i>Zingiber officinale</i> ROSC	Ginger	roots	—	—

부록 II.

발명의 제목: 충치균 생육억제 및 충치유발 효소 활성억제 물질
연락처: 대전시 유성구 궁동 220번지 충남대학교 농대 식품공학과
발효공학/분자생물학연구실 성장근(821-6722(O), 822-2287(F))

요 약 서

오미자는 목련과 오미자속에 속하는 낙엽성 목본식물로 정신육체피로 신경쇠약, 저혈압, 시력회복 기침, 천식 등의 치료약으로 예로부터 민간이나 한방에서 한약재로 쓰여왔다.

오미자에서 분리되어 구조가 밝혀진 본 물질은 충치를 유발하는 주 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 강한 항균활성을 나타내며 아울러 plaque 형성을 억제한다.

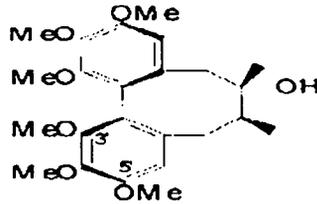
본 발명은 기존의 충치예방 물질로 쓰이는 불소와 같은 효과를 지녔으나 (예: 음료수의 수질기준은 0.8ppm 이하), 불소는 할로젠 화합물로서 매우 낮은 농도에서도 반상치(치아의 에나멜질에 흰반점이 생기는 현상), 강한 독성과 함께 뼈조직 와해 및 골연화증, 대기오염 등의 심한 부작용을 갖는데 비하여 본 발명의 물질은 전혀 독성을 보이지 않고 있다.

본 발명은 충치를 예방하고 치료하여 국민의 구강건강에 이바지하는데 그 목적이 있다.

명 세 서

1. 발명의 명칭 : 충치균 생육억제 및 충치유발 효소 활성억제 물질
2. 발명의 간단한 설명
가. 물질명 : Schzandrol A

나. 구조 :



3. 발명의 상세한 설명

가. 발명의 상세한 설명

1) 발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래 기술

본 발명은 우리 나라 자생종이며 예로부터 한약재로 쓰여왔던 오미자로부터 분리된 충치균 생육저해 및 충치유발효소 활성 저해제에 관한 것이다.

구강내에는 *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *Bacteroides gingvalis* 등 여러 미생물이 존재하며 충치는 이들 구강내에 존재하는 미생물에 의한 감염성 질환으로 이중 *Streptococcus mutans*가 주요 원인균으로 알려져 있다.

본 발명은 충치의 주 원인균인 *Streptococcus mutans*의 생육을 선택적으로 억제할 뿐만 아니라 매우 특이하게도 충치유발효소인 당분해효소의 활성 및 플라그의 형성까지 저해함으로써 충치를 아주 효과적으로 예방할 수 있다.

일반적으로 충치는 우식원 세균, 즉 *Streptococcus mutans*에 의해 생성된 산에 의하여 치아의 광질을 이탈하여 치아의 표면이 파여 나감으로서 생기는 질환이다. 즉 *Streptococcus mutans*가 텍스트란을 만들고 이 텍스트란이 치아표면에 막을 생성한다. 여기에 음식물 찌꺼기가 부착되어 플라그가 형성되며 플라그 속의 세균에 의해 생성된 산이 치아의 에나멜 표면을 탈회하여 충치를 진행시킨다. 플라그가 한층 더 진행되어 치석으로 발전하면 치은염, 치육염, 치조 농루증등의 치주질환을 유발하게 된다.

이에 본 발명자는 따라서 오미자 추출물에서 강한 항균 활성이 있음을

확인 한 후 이를 정제를 통하여 활성물질을 분리하였으며, 각종 식물 추출물에서 *Streptococcus mutans*에 대한 항균 효과 및 플라그 형성 억제효과를 탐색한 결과 오미자 추출물에서 *S. mutans*에 대하여 뛰어난 항균효과를 나타낼 뿐만 아니라, 플라그 형성에 중요한 역할을 하는 *S. mutans*의 균체의 효소인 glucosyl transferase(GTase) 및 amylase에 대해서도 여러 식물 추출물보다 우수한 저해효과를 가진 것을 확인하였다.

이하 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

실시에 1: 물질의 정제와 구조 확인

① 추출물의 제조

오미자 700g를 분쇄한 후 분쇄한 시료에 petroleum ether 1.5L를 가한 후 8시간 동안 상온에서 진탕하면서 3회 반복하여 추출하였다. 추출한 후 여지로 여과했으며 50℃에서 감압 농축하였다. 농축된 오미자 petroleum ether 추출물의 가용성 고형분 함량은 농축추출물 1ml를 취한 후 105℃에서 건조시켜 증발잔사의 무게를 측정하였다. 추출물의 양은 40g으로 수득률은 5.71%였다.

② 배지의 제조

항균력 시험에 사용된 균은 *Streptococcus mutans*이며 배지는 BHI broth (Brain Heart Infusion broth)를 사용하였다. 항균력 시험용 평판배지의 조제는 생육배지로 살균된 지층용 배지(1.5% agar)를 petri dish에 10ml씩 분주하여 응고시키고 그 위에 계대 배양된 충치균을 접종시킨 중층용 배지(0.8% agar)를 10ml씩 분주하여 응고시킨 중층배지를 사용하였다.

③ 활성 물질 분리

그림1과 같이 항균활성 물질을 분리하기 위해 silica gel column chromatography, thin layer chromatography(TLC), Sephadex gel chromatography, HPLC를 하였다.

한편 활성 물질을 분리하기 위해 Benzene-Acetone 용매계를 사용하여 silica gel column chromatography를 하였다. 용매의 비율은 Benzene: Acetone = 100: 0→0: 100으로 순차적으로 acetone의 비율을 높여 주었다. 예비실험 결과 BA= 94:6에서 *S. mutans*에 대하여 활성이 나왔다. 활성 측

정은 paper disc method를 사용하였다.

오미자 petroleum ether 추출물 40g을 활성이 나온 BA = 94 : 6의 단일 용매계를 사용하여 silica gel column chromatography <63~200 mesh>를 실시하였다. 모두 6개의 획분을 얻었으며 2, 3, 4, 5, 6획분에서 높은 활성이 나왔다. 이 중 2, 3번과 4, 5번은 TLC에서 분리된 형태가 같아 합하였다. 이 중 수득량이 많은 2, 3번 획분(5.89g) 을 Hexane-Ethyl acetate 용매계를 사용하여 다시 column chromatography를 하였다.

이어서 HE = 70:30의 용매 비율로 silica gel column chromatography <230~400 mesh>를 하였으며 모두 16개의 획분을 얻었다. 이 중 2,3,9,10,11,12,13,14,15번 획분에서 활성이 나왔다. 활성 나온 획분 중 수득량이 많은 3번 획분(2765mg 중 900mg)을 TLC 하였다. 다음은 preparative 1mm TLC plate를 사용하였고 용매는 Hexane:Acetone = 70:30으로 하였다. 아래에서 위로 모두 7개의 밴드로 나뉘어졌으며 TLC plate 위의 밴드를 모아 MeOH : CHCl₃ = 1 : 1의 용매에 녹인 후 활성물질을 용출하였다. 아래에서 1~4의 밴드에서 활성이 나왔으며 이 중 2번 획분 (428mg)을 Sephadex gel chromatography 하였다. Sephadex gel은 LH-20을 사용하였고 용매는 MeOH : CHCl₃ = 1 : 1로 하였다. 총 32개의 획분을 받았으며 7, 8, 9, 10, 11, 20 ~28획분에서 비교적 활성이 강하게 나왔다. 이 중 수득량이 많은 8번 획분(170mg)을 다시 TLC 하였으며 용매는 Petroleum ether : EtOAc = 70 : 30으로 하였고, 이때는 0.5mm TLC plate를 사용하였다. 모두 6개의 밴드를 얻었으며 활성 측정 결과 밑에서 첫 번째 밴드에서 활성이 나왔다. 1번 밴드의 물질을 MeOH : CHCl₃ = 1 : 1의 용매에서 용출 하였는데 수득량은 30mg 이었다.

이 물질이 단일 물질인지 HPLC로 확인해 본 결과 단일 피크가 아니라 4개의 피크 크로 분리가 되어 이때부터 HPLC를 이용하여 정제를 시도하였다. HPLC 컬럼은 C₁₈을 사용하였으며 유속은 0.9ml /min, 용매는 MeOH : Acetonitrile = 1 : 1, 주입량은 20 μ l으로 하였다. HPLC로 4개의 획분을 받았으며 각각의 획분에 대해 활성을 측정해 본 결과 2번째 획분에서 활성이 나왔다. 이 2번 획분이 순수한지 HPLC로 확인한 결과 단일 피크임을 확인하였다. 이 물질의 수득량은 11mg이었다.

이 물질을 H-NMR, C-NMR, ES⁺-MASS로 분석을 한 결과 분자량이 432인 Schizandrol A로 확인되었다(그림 2).

다음은 이상의 분리 정제 방법을 개략적으로 나타내었고, 그 다음은 Schizadrol A의 H-NMR spectrum이다.

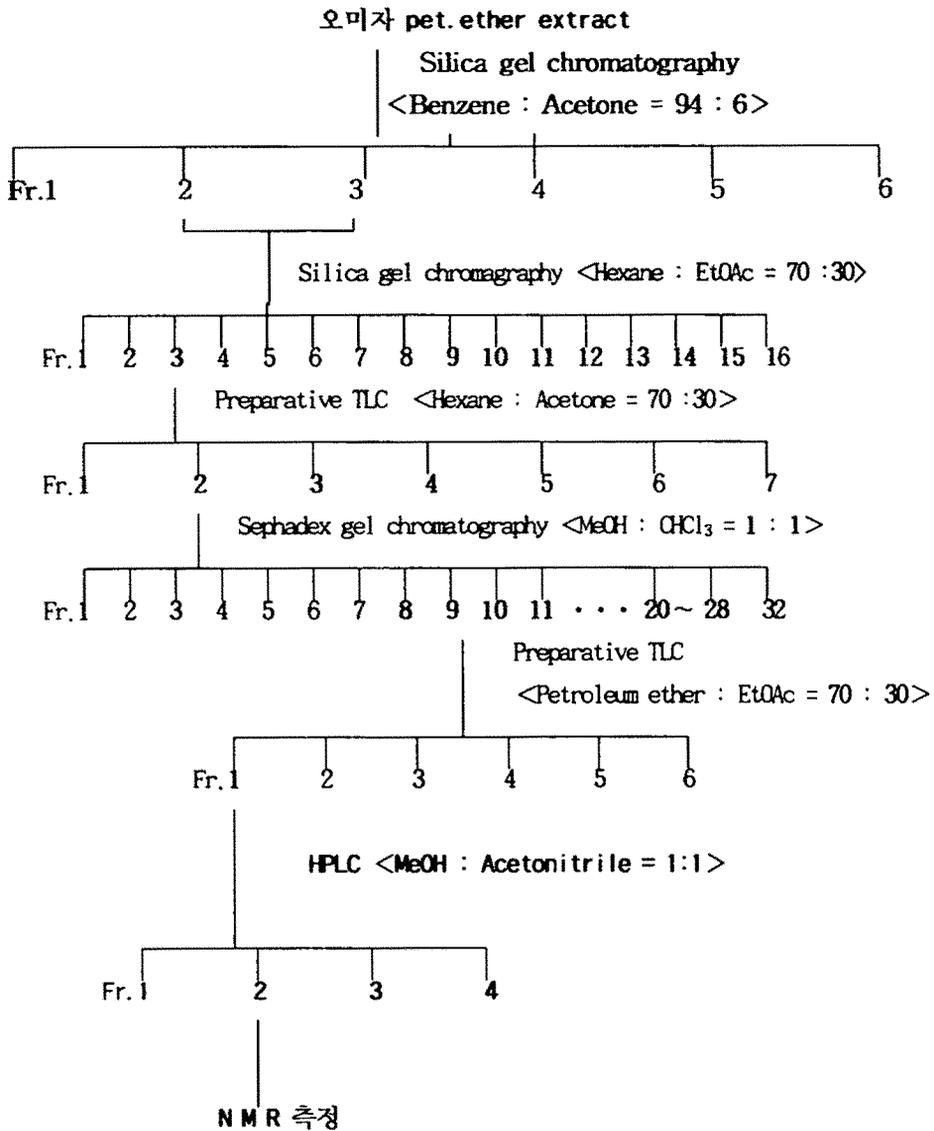


그림 1. 오미자로부터 총치생육저해제의 분리와 정제과정

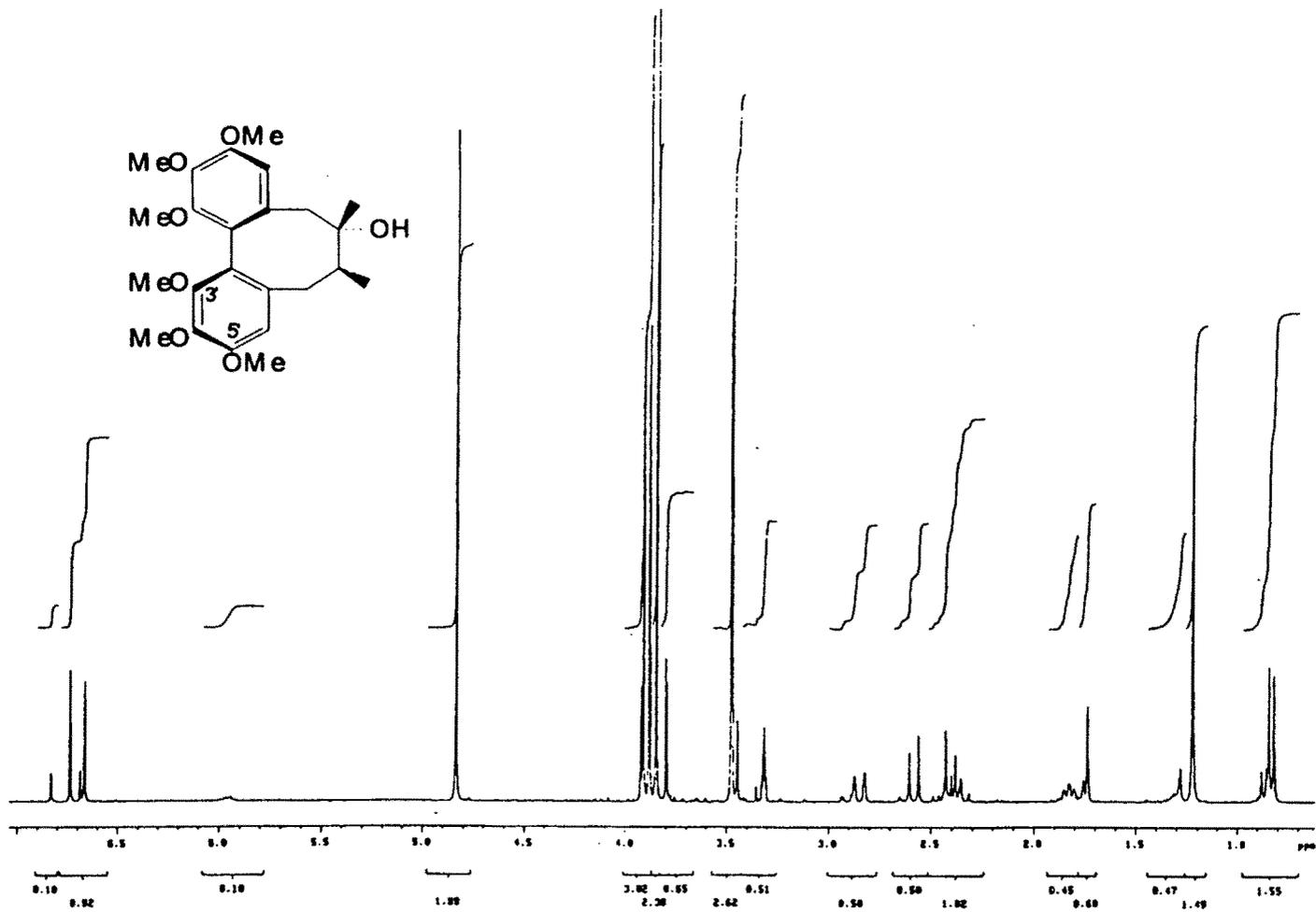


그림 2. Schizandrol A의 H-NMR spectrum

④ 활성 측정 방법

각 단계별 활성측정은 *S. mutans* 중층배지에 TLC plate를 처리하여 활성을 확인하였다. 이 방법은 활성물질이 있는 곳에서는 *S. mutans*가 생육 저해를 일으켜 뚜렷한 clear zone이 형성되었다.

Silica gel column chromatography의 획분 또는 Sephadex gel column chromatography의 획분 및 HPLC 획분의 활성 측정은 각각의 획분을 농축하여 1mg/0.5ml로 희석한 후 상기에서 설명한 바와 같이 TLC aluminium sheet에 10 μ l씩 spot하여 이를 *S. mutans* 중층배지에 처리하여 clear zone으로 활성을 확인하였다.

TLC에서의 활성 측정은 그림3과 같이 TLC 한쪽 끝 1cm를 잘라서 상기와 같은 방법으로 clear zone이 형성됨으로 활성을 확인하였다.

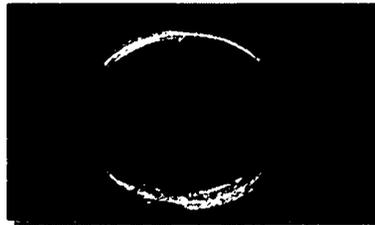


그림 3. 활성물질 분리 중 각 단계별 활성확인

⑤ 오미자 추출물 및 정제물질의 충치균에 대한 최저 생육저해농도(MIC)

오미자 추출물 및 정제된 물질의 충치균(*Streptococcus mutans*)에 대한 최소저해농도를 알아보기 위하여 희석법에 의하여 오미자 정제과정중의 각각의 물질을 희석하고 10⁶/ml의 충치균을 접종한후 24시간 후 micro plate reader를 사용하여 충치균의 생육도를 관찰하였다. 그결과 표1과 같이 낮은 농도에서 최소저해농도를 보였다.

표1. 오미자 추출물들 및 정제된 화합물의 증치균 최소 생육저해농도

화합물	최소 생육저해 농도(ml)
오미자 petroleum ether 추출물	0.280 ppb
오미자 물 추출물	0.460 ppb
오미자 에탄올 추출물	0.680 ppb
오미자 아세톤추출물	4.600 ppb
schizandrol A	0.002 ppb

실시에 2. 오미자 petroleum ether(SPE) 추출물의 증치유발 효소 활성저해

① α -amylase의 저해

오미자 petroleum ether(SPE) 추출물의 α -amylase 활성 저해효과를 측정하였다(그림4).

즉 기질은 0.5% soluble starch를 0.05M acetate buffer(pH5.5)에 녹여 사용하였고, 효소는 SIGMA 사 제품을 구입하여 2 unit 단위로 희석하여 첨가한 후, 40℃에서 10분간 반응 시킨 후 3 M의 acetic acid 10ml로 반응을 종료시켰다. 이를 1/300N의 요오드화 시액 1ml를 가하여 발색시킨 후 660nm 흡광도를 측정하여 효소액의 흡광도 값에서 불활성 효소액의 흡광도 값을 뺀 흡광도 값이 시료에 들어있는 α -amylase에 의한 흡광도 이므로, 기질로 사용된 starch를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 여기에 효소액의 흡광도를 대입하여 얻은 값으로 효소역가를 계산하였고, 저해율을 확인하였다.

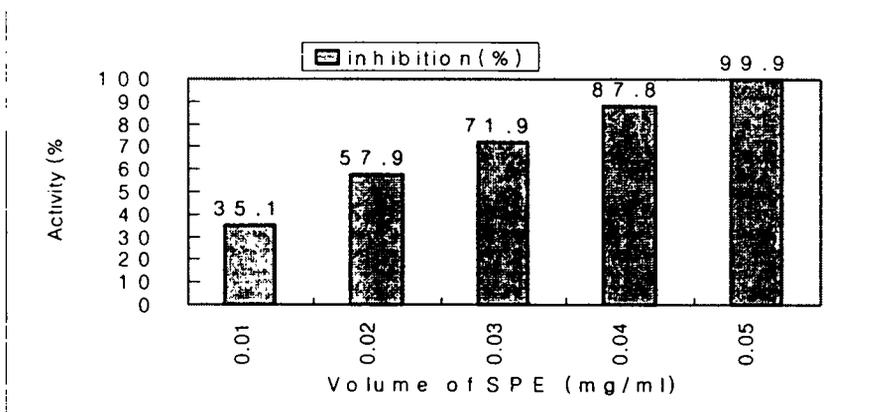


그림 4. 오미자 petroleum ether에 의한 α -amylase 활성 저해

② Glucosyltransferase의 저해

*S. mutans*의 외부 세포벽합성 효소이며, sucrose에서 dextran을 형성하는 효소인 Glucosyltransferase의 저해 실험을 위하여 효소액을 추출하였다. 먼저 Tryptic Soy Broth 20ml을 connician flask에 담아 상기 균주를 100 μ l 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 진탕(150rpm)하면서 혐기적 조건에서 배양하였다.

배양후 배양배지를 원심 분리하여 상등액을 Glucosyltransferase의 효소액으로 사용하였다. 효소의 활성은 0.2M phosphate buffer(pH 7.0)에 0.25M의 sucrose를 녹여 기질로 사용하였다. 이 0.25M sucrose액을 0.9ml 취하고, 0.1ml의 효소액을 취하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시키고, 환원당의 정량은 dinitrosalisilic acid(DNS)법으로 분해된 환원당을 정량하였다.

오미자 petroleum ether 추출물의 Glucosyltransferase활성 저해 효과 실험은 0.2M의 phosphate buffer(pH 7.0)에 0.25M의 sucrose액 0.9ml, 효소액 0.1ml, 그리고 오미자 petroleum ether추출물을 1, 2, 4, 6 μ g/ μ l을 첨가하였다. 그리고 phosphate buffer(pH 7.0)로 총 부피 2ml로 정용하여 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 반응시킨 후 생성된 환원당의 농도를 정량하였고 이로서 저해율을 계산하였다.

본 물질은 매우 적은 양으로도 충치를 억제할 수 있고, 기존의 소화합물의 충치억제제 보다는 부작용이나 독성이 없는 특성을 가지고 있다.

기존의 충치 억제제로는 첫째, 페니실린, 에리스로마이신, 테트라사이클린과 같은 항생제로 생체내 실험이나 생체의 실험에서 효과적이었으나 장내 세균총에 영향을 주는 등 부작용이 크고, 둘째, 시클로로헥시딘으로 충치형성을 저지하는 효과가 있으나 구강점막의 궤양이나 박리 등의 부작용이 있고, 셋째, 충치예방백신이나 텍트라나제 등의 효소로도 충치 억제를 시도하고 있으나 그 효과는 아직 불분명하다.

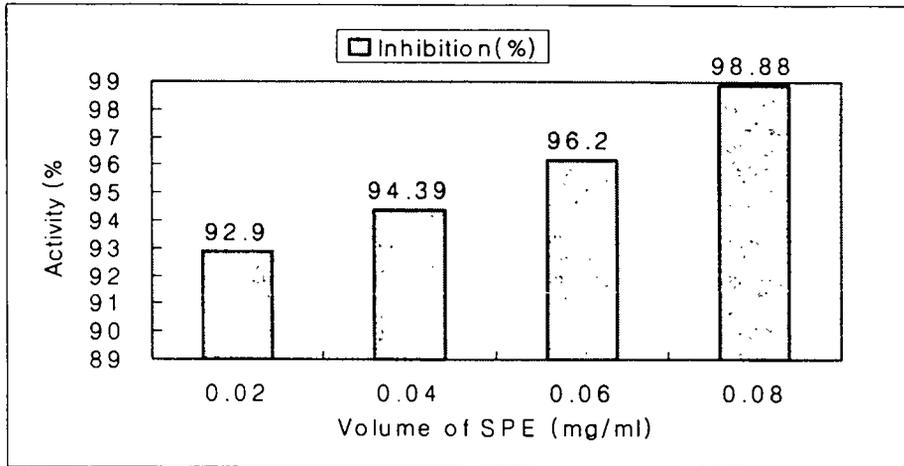


그림 5. 오미자 petroleum ether에 의한 Glucosyltransferase 활성 저해

현재의 충치 예방은 불소 혼입치약 또는 sealant법에 의존하고 있으며, 부작용 없는 충치 치료제는 아직도 개발되고 있지 않다.

최근에 감미료인 자일리톨이 충치를 억제한다고는 알려져 있지만 효과가 크지 못하고 그나마 원료는 외국에서 수입해야 하는 실정이다. 그렇기에 본 발명품이 치약, 구강청정제 등의 원료로 사용되면 놀랄만큼 충치 예방 및 치료에 대단히 도움이 될 것이다.

2) 발명으로 이루고자하는 기술적 과제

본 물질이 분리된 오미자는 1996년에 보건복지부에 의해 필요에 따라 특별한 인허가 없이 식품으로 사용될 수 있도록 규정되어 있으며, 종래의 충치 치료제와는 달리 독성 및 부작용이 전혀 없다.

본 물질의 목적은 충치치료 및 예방을 위한 치약이나 구강 청결제 등의 원료 또는 충치예방 껌이나 과자 등의 기능성식품의 소재로 제공하는데 있다.

나. 발명의 구성 및 작용

충치는 치아 우식증이라고도 하며 구강내 존재하는 세균에 의해 발생하는 세균성 질환으로 *Streptococcus mutans*가 주 원인균이며, 이 우식원 세균에 의해 생성된 산, 즉 lactic acid에 의해 치아의 광질이 이탈하여 치아의 표면이 파여 나감으로써 생기는 질환이다.

오미자에서 분리해 낸 schizandrol A는 리그난 화합물로 단일 물질이다. 이 물질은 매우 소량으로도 충치 원인균인 *Streptococcus mutans*의 생육을 완전히 억제한다.

또, 구강내에 존재하는 탄수화물을 분해하는 효소인 glucosyltransferase와 fructosyltransferase의 활성을 저해하여 lactic acid의 생성을 억제하므로 충치를 효과적으로 예방할 수 있다. 그리고 *Streptococcus mutans*의 생육이 억제되어 플라그가 형성되지 않아 충치예방에 더욱 효과적이다.

다. 발명의 효과

오미자에서 분리되어 구조가 밝혀진 본 물질은 충치를 유발하는 주 원인균인 *Streptococcus mutans*에 대한 강한 항균활성을 나타내며 또한 plaque 형성도 억제한다.

더구나 오미자는 이미 식품으로 규정되어 있어 독성이나 부작용에 대한 걱정없이 치약이나 구강청결제 및 충치예방 기능성 식품 등의 원료로 안심하게 사용할 수 있다.

우리 나라에서 자생하는 오미자에서 국내외 처음으로 강력한 충치억제물질인 schizandrol A가 분리됨으로서 충치를 예방하고 치료하여 국민의 구강 건강에 커다란 기여가 있을 것으로 사료된다.

4. 특허청구범위

가. 충치예방 물질로서 오미자 추출물의 치약 및 구강청정제 원료로의 사용

나. 충치예방 물질로서 schizandrol A에 대한 치약 및 구강청정제 원료로의 사용

다. 충치치료 물질로서 오미자 추출물의 의약품 원료로의 사용

라. 충치치료 물질로서 schizandrol A에 대한 의약품 원료로의 사용

마. 음료를 포함하는 기능성 식품의 원료로서 오미자 추출물 및 schizandrol A의 사용

바. 껌에 향충치 물질로서 오미자 추출물이나 schizandrol A의 사용