

김치 starter 용으로 분리한 효모의 동정

김혜자¹ · 이철수² · 김영찬² · 양차범¹ · 강상모^{2*}

¹한양대학교 식품영양학과, ²건국대학교 미생물공학과

Identification of Yeasts Isolated from Kimchi for Kimchi Starter. Hye-Ja Kim¹, Cheol-Soo Lee², Young-Chan Kim² and Sang-Mo Kang*. Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea. ²Department of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea - The eleven strains, which could be used lactic and acetic acids as carbon sources, were isolated from kimchi and identified; the strains were facultative microorganisms which could be grown at low temperature (10°C) and around pH 3.2. As results of morphological, biochemical and physiological tests, 5 species of 3 genera were identified as *Debaryomyces coudertii*, *Pichia media*, *Pichia chambardii*, *Pichia haplophilia* and *Saccharomyces fermentati*. Each strain was grown in basal media. In acidic resistance and acid utilization test, *Saccharomyces* sp. YK-17 and *Saccharomyces fermentati* YK-19 were grown well in basal and YM media containing 0.3% lactic acid. And two strains were grown in basal and YM media containing 0.3% lactic acid and 0.6% acetic acid. Since strain YK-19 was grown better at 10°C than that in 25°C, strain YK-19 was known to be a psychrophilic strain.

김치의 재료중에는 야생적으로 존재하는 여러가지 미생물이 있으나 절임과정에서 대부분의 호기성 세균들은 제거되고 김치발효에 관여하는 젖산균들이 주로 생육하게 되며 발효가 진행되면서 젖산을 비롯한 각종 유기산이 생성됨에 따라 pH가 떨어지면 그 다음에는 내산성 세균들이 자라게 된다. 이처럼 김치가 발효 속성되는 동안 젖산균 등의 여러 가지 미생물들에 의해 단순한 젖산발효만이 아닌 복잡한 발효 과정을 통하여 재료중의 탄수화물, 아미노산 등으로부터 산미, 지미, 방향을 내는 저분자 물질들이 생성됨으로써 김치는 독특한 맛과 향을 갖추게 되는 것이라고 알려져 있다(1, 2).

즉, 김치의 숙성 중 세균의 경시적인 변화는 발효 초기부터 혐기성 세균의 생균수가 급격히 증가되어 발효 후기에 일정한 수준에 도달하나 호기성 세균은 발효 초기에 약간의 증가를 보이다가 발효가 점차 진행되면서 생육이 억제되어 균체수가 감소된 후 저장 후기에 다시 급증하는 것으로 나타났다(3, 4). 이 때 주된 호기성 세균은 *Pseudomonas mira*, *Pseudomonas nigrifaciens*, *Bacillus macerans*이며(3, 4), 혐기성 세균으로는 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Streptococcus faecalis*, *Pediococcus cerevisiae* 등이 분리 동정되었다(5). 김치발효 초기에는 *Leuconostoc mesenteroides*가 크게 관여하고 뒤이어 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus brevis*가 관여하는 것으로 알려져 있다(6). 김치에서는 *Leuconostoc mesen-*

*teroides*와 *Lactobacillus brevis*에 의한 이상발효로 김치의 풍미에 관련된 젖산, 초산, 알콜, 탄산가스, 만니톨, 덱스트린의 생성에 큰 영향을 주는 것으로 나타났고, *Lactobacillus plantarum*에 의한 정상발효로 젖산이 생성되어 결국 산패에 이르는 것으로 알려져 있다(6).

이렇듯 김치의 젖산균에 관련된 연구는 많이 이루어져 있으나 효모에 관련된 연구는 적어 1960년 하순변(7)에 의해서 산막효모와 비산막효모가 분리된 적이 있으며, 1978년 최국지(8)에 의해서 숙성된 겨울김치로부터 효모를 분리 동정한 보고가 있고, 한 등(9)은 산막효모중 연부현상에 관여하는 효모를 분리 동정한 바 있다.

好井 등(10)에 의하면 효모는 김치 발효에 있어서 알콜 생성, 방향 및 풍미 등을 부여하며, 산막효모는 김치의 외관을 손상시키고, 알콜, 젖산을 산화 분해하여 유기산에 의해 억제되었던 변패 균의 증식이 활발하게 되어 보존성에 큰 악영향을 미친다고 한다.

김치의 산패방지 내지는 지연의 목적으로 냉장법(11), 항생물질과 합성보존료(12), 방사선 처리(13) 및 통조림 방법(14) 등 많은 연구들이 이루어져 왔으나, 살균에 의한 신선도의 저하, 보존제의 사용규제, 경제성, 안정성 등의 문제점이 많아 실용화가 어려웠다고 할 수 있다.

따라서 김치의 산패를 지연시킬 수 있는 조건에 맞는 starter 개발이 필요하다. 즉, 김치를 산패시키는 유기산 중 특히 젖산과 초산을 탄소원으로 이용할 수 있으며, 김치의 숙성 상태 즉 어느 정도 혐기적, 저온성 및 내산성의 환경에서 자랄 수 있어야 하며, 방향을 생성하여 김치의 군덕내를 masking할 수 있어야 하겠다.

본 연구에서는 이러한 조건에 맞는 균을 김치 starter로 개발할 목적으로 유기산을 탄소원으로 이용하며,

*Corresponding author.

Key words: Kimchi, starter, yeast, identification, flavour, *Debaryomyces coudertii*, *Pichia media*, *Pichia chambardii*, *Pichia haplophilia*, *Saccharomyces fermentati*, lactic acid, acetic acid

김치발효과정에서 생육가능한 통성균으로, 어느 정도 저온성 및 내산성의 성질을 갖는 균을 김치로부터 순수분리하여 이들 균주를 형태적, 배양적 및 생리적 특징에 따라 동정하였으며, 유기산 이용성을 보았다.

재료 및 방법

균주의 분리원

서울 시내의 20 가정에서 적당히 숙성된 배추김치를 적량 취하여 그 김치 즙액을 균주 분리용 시료로 하였다.

사용 배지

균주 분리, 배양 및 동정용 배지 최소배지 I(g/L : glucose 10.0, (NH₄)₂SO₄ 5.0, K₂HPO₄ 2.0, KH₂PO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, MnSO₄·5H₂O 0.01, FeSO₄·5H₂O 0.01, ZnSO₄·7H₂O 0.01, NaCl 10.0)와 최소배지 II(g/L : glucose 10.0, (NH₄)₂SO₄ 1.0, K₂HPO₄ 1.0, MgSO₄·7H₂O 1.0, CaCl₂ 0.01, NaCl 10.0, tap water 1L)에 필요에 따라 포도당대신 젖산과 초산을 첨가하여 사용하였다. 고체배양일 경우는 agar를 15.0 g/L 되도록 첨가하였다. 완전배지로서는 YM(15)(g/L : yeast extract 3.0, glucose 10.0, malt extract 3.0, pepton 5.0, pH 5) broth와 YPD(g/L : yeast extract 10, glucose 20, pepton 20, pH 5~8) broth를 각각의 용도에 따라 사용하였다.

균주의 생육도를 측정할 때는 YM 배지에서 전배양한

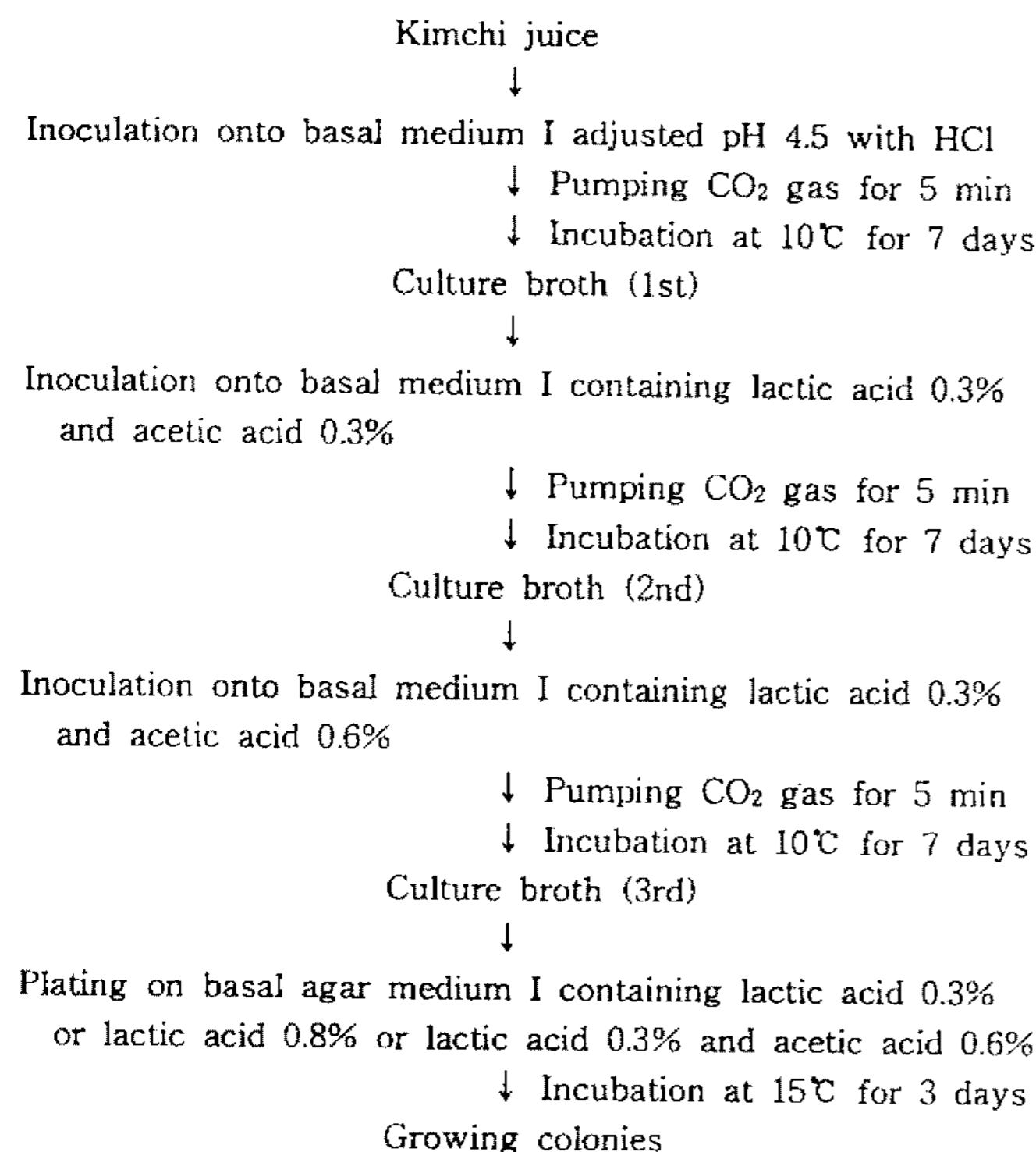


Fig. 1. Procedure of isolation and screening for kimchi starter.

균주를 원심분리 후 균체만을 접종(전배양액 1%)하여 25°C, 10°C의 항온기에서 배양하면서 12시간마다 적량 취하여 pH와 660 nm의 흡광도로써 균주의 생육도를 측정하였다.

균주분리 및 선별

균주의 분리 및 선별 절차는 Fig. 1과 같다. 즉 김치액을 pH 4.5인 배지에 접종하고 산소를 가능한한 제거하고 저온에서 배양하므로 이런 조건에서 빨리 자라는 균을 선별하고자 하였다. 여기에서 균이 자라는 것이 확인되어 탄소원으로 초산 0.3%와 젖산 0.3%을 이용할 수 있는 균을 선별하고자 하였으며, 이들 유기산 농도를 증가시키면서 균들의 내산성을 유도하고 이런 조건에서 생육이 좋은 균들을 선별하였다.

균주의 동정

실험균주의 동정에 있어서는 형태적, 배양적 및 생리적 특성을 Lodder(16)와 Kreger-Van Rij(17)의 방법에 준하여 조사하였고, Barnett 등(18), 長谷川(19)의 분류 key에 따라 동정하였다.

결과 및 고찰

내산성 균주의 분리 및 선별

시료 김치즙 배양액을 여러 조건의 내산성 균주 분리용 평판배지에 도말하여 15°C에서 5일간 배양한 후, colony의 생성 유무를 관찰하였는데 젖산 0.2%와 0.8%를 각각 첨가한 배지 및 젖산 0.3%와 초산 0.3%를 함께 첨가한 배지 모두에서 colony의 생성을 확인할 수 있었다. 이들 중 외관으로 보았을 때 다른 형태의 균주로 보여지는 colony를 순수분리한 후, 다시 젖산 0.8%를 첨가한 배지와 젖산 0.3%와 젖산 0.6%를 함께 첨가한 두 종류의 평판배지에 배양하여 생육상태가 다른 colony를 선별하였다.

균주의 동정

형태적, 배양적 특성 균주의 동정은 유기산 농도를 틀리게 하여 3차로 선별된 12균주 중 효모의 배양 특성을 나타내는 11주에 대해 행하였다(8, 16, 17).

형태학적 성질의 시험은 영양세포의 형태 및 크기, 증식형태, pseudomycelium 및 ascospore의 형성을 기준으로 하였고 배양적 성질의 시험은 gas의 발생, 생육상태, colony의 성상을 주로 관찰하여 Table 1과 같은 결과를 얻었다.

11 균주의 형태를 관찰한 결과 육안으로는 대부분의 균주가 cream 색을 나타냈으며 이중 2 균주는 후에 갈색의 pigment를 형성하였다. 현미경으로 관찰한 결과 2 균주는 작은 구형이었고 나머지는 난형을 보였다. 또한 크기는 대부분 2.9×5.6 μm 정도로서 효모의 보통

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the isolated 11 strains

Strain	Shape	Cell size (μm)	Bud type	Pseudo-mycelium	Spore	Colony type	Colony colour	Pigment
YK-6	spheroidal to short oval	4.5×5.3	multiple	—	oval 1~2	wrinkled & entired	white to gray	+ (brown)
YK-10	spheroidal to oval	4.7×5.6	multiple	—	oval 1~2	wrinkled & entired	white to gray	+ (brown)
YK-11	oval	3.5×4.7	multiple	—	hat-shape	raised & entired	white or cream	—
YK-12	oval	3.3×4.5	multiple	—	spheroidal 1~2	raised & entired	white or cream	—
YK-17	oval	3.5×4.4	multiple	—	spheroidal 1~2	raised & entired	white or cream	—
YK-18	oval	3.2×3.9	multiple	—	spheroidal 1~2	raised & entired	white or cream	—
YK-19	oval	2.9×3.5	multiple	—	spheroidal 1~2	raised & entired	white or cream	—
YK-20	oval	3.0×3.5	multiple	—	spheroidal 1~2	raised & entired	white or cream	—
YH-3	oval	3.5×4.0	multiple	—	spheroidal 1~2	raised & entired	cream	—
YH-4	oval	3.7×4.4	multiple	—	hat-shape	raised & entired	cream	—
YH-5	oval	4.0×5.1	multiple	—	hat-shape	raised & entired	cream	—

+; positive, -; negative

크기(5.5×7.5)에 비하여 작은 편이었다. YK-6과 YK-10 균주는 효모의 분리에 있어서 중요한 지표가 되는 색소(갈색)를 나타냄으로써 육안만으로도 분리된 다른 균들과는 틀리는 속임을 쉽게 판별할 수 있었다. 모든 균주들은 pseudomycelium을 형성하지 않았다. YK-6과 YK-10 균주는 oval형의 spore를 형성하였고 YK-11, YH-4 및 YH-5 균주는 모자형의 포자를 보였으며, 나머지는 구형에 가까운 spheroidal형으로 관찰되었으며 자낭포자당 1~4개의 포자를 가지고 있었다. Colony의 표면은 YK-6과 YK-10의 경우 wrinkled형이었으며 나머지는 raised형을 보였다. Colony 주변의 형태는 모두 entired형을 보였다. 광택은 일반적으로 shiny 또는 dull 형태를 보였다. 분리 균주 중 방향생성이 뛰어나 본 논문에 이어 계속된 연구로서 방향성분의 분석과 실제 김치에 starter 용으로 결정된 YK-17, YK-19 균주(20)의 형태학적인 특성을 광학 및 전자현미경으로 관찰한 결과 Fig. 2, 3에서 보는 바와 같았으며, YH-3과 함께 multiple budding하는 난형의 전형적인 효모의 특성을 지니고 있는 것을 확인할 수 있었다.

생리적 특성 효모의 속은 형태적 및 배양적 성질에 의해서 대략적으로 결정할 수 있지만 생리적인 특성은 종의 분류, 동정에 결정적인 지표가 되기 때문에 현재 각 종의 효모에 대해서 실시되고 있는 시험 항목중

당류의 발효성, 탄소화합물의 자화성, 질산염의 자화성 등 균주의 동정에 확정적인 단서를 제시해 줄 항목들을 선택하여 실험하였으며 그 결과는 Table 2와 같다.

탄소원의 발효성에 있어서는 YK-6, YK-10, YH-4 및 YH-5 균주는 발효성을 전혀 보이지 않았으며 YK-11 균주는 1개의 당만을 발효하였고, YK-17, YK-19, YK-20 및 YH-3 균주는 탄소원별로 차이는 있으나 각각 3개씩의 당을 발효하였다. 탄소원의 자화성에 있어서는 대부분의 균주들이 D-galactose, L-sorbose, glucose, mannose, mannitol, trehalose, sucrose, maltose, citrate 등의 탄소원을 자화하였으나 L-arabinose, D-arabinose, cellobiose, raffinose는 자화를 잘 못하였다. 이상의 결과에서 보면 YK-12, YK-17, YK-19, YK-20 및 YH-3 균주는 탄소원의 발효성 뿐만 아니라 자화성이 모두 우수한 균주들로 밝혀졌다.

Nitrate는 모든 균주가 자화하지 않았으며 starch의 이용성에 있어서는 YK-6, YK-11 및 YK-12 균주가 양성을 보였고 전분유사물질 생성은 모든 균주에서 음성이었다. Urea 가수분해능은 YK-10, YK-11, YH-4 및 YH-5 균주는 음성을 보였고 나머지 균주들은 양성을 나타내었다.

효모의 내삼투압성을 볼 수 있는 10% NaCl과 5% glucose 첨가한 배지에서의 생육 상태는 YK-11 균주를

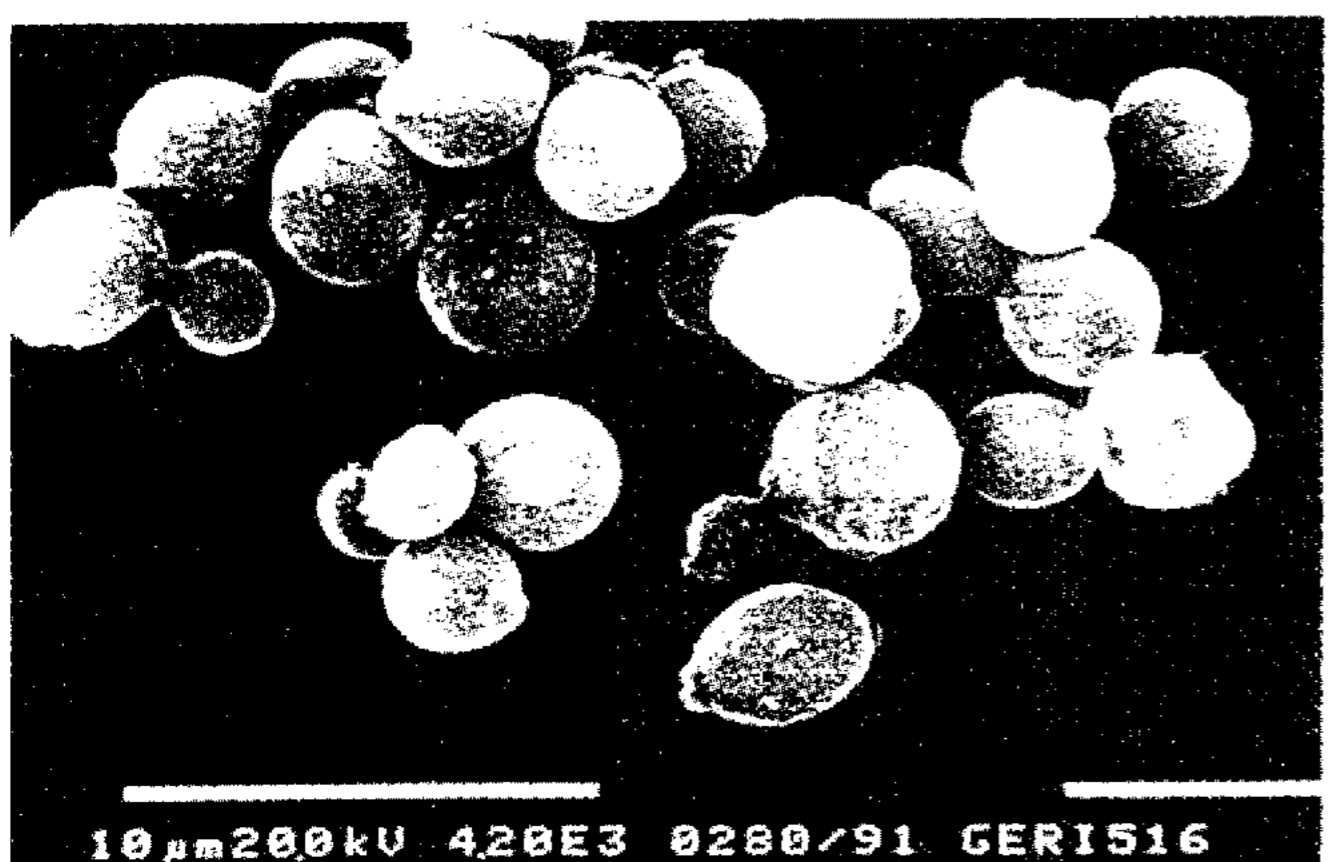


Fig. 2. Electron microphotographs of isolated YK-17.

제외한 모든 균주에서 양호하여 대부분 내삼투압성을 보였다. 1% 초산과 0.01% cyclohexamide 내성은 모든 균주가 음성이었다.

생육 pH는 모든 균주가 pH 3 이하에서 생육하지 못하였으며, pH 4~9에서는 생육이 가능하였고 최적 pH는 5.5×0.2 내외였다. 그리고 분리한 균주들의 가장 큰 특징 중의 하나는 20°C에서 30°C까지는 생육이 우수하였으나, *Saccharomyces cerevisiae*는 40°C까지도 자랄 수 있는 데에 반해 이들 균주들은 37°C에서도 생육하지 못한다는 점이였다.

Debaryomyces 속은 자낭포자를 형성하며 포자 형태는 spheroidal이고 자낭당 1개의 포자를 형성한다. 발효능력은 없으며, 37°C에서 자라지 못하며 arbutin 분해능력이 없다. Lactose, sucrose, soluble starch, D-arabinose 자화능력이 없으며, 그외 당들은 대부분 잘 이용한다. Nitrate 자화능력은 없다(16, 18, 19). 이러한 특징을 갖는 것으로, YK-6과 YK-10 균주는 *Debaryomyces* 속으로 분류되었으며, 이 중 YK-10 균주는 soluble starch 등의 당이용성 없는 것 등으로 *Debaryomyces coudertii*로 분류되었다.

Pichia 속은 malt agar 상에서 2일간 배양했을 때 세포는 oval 혹은 난형으로 single 또는 pair이다. 대부분 pseudomycelium을 형성하지 못하며, 발효능이 없다. 37°C에서 자라지 못하며, Nitrate 자화성도 없다

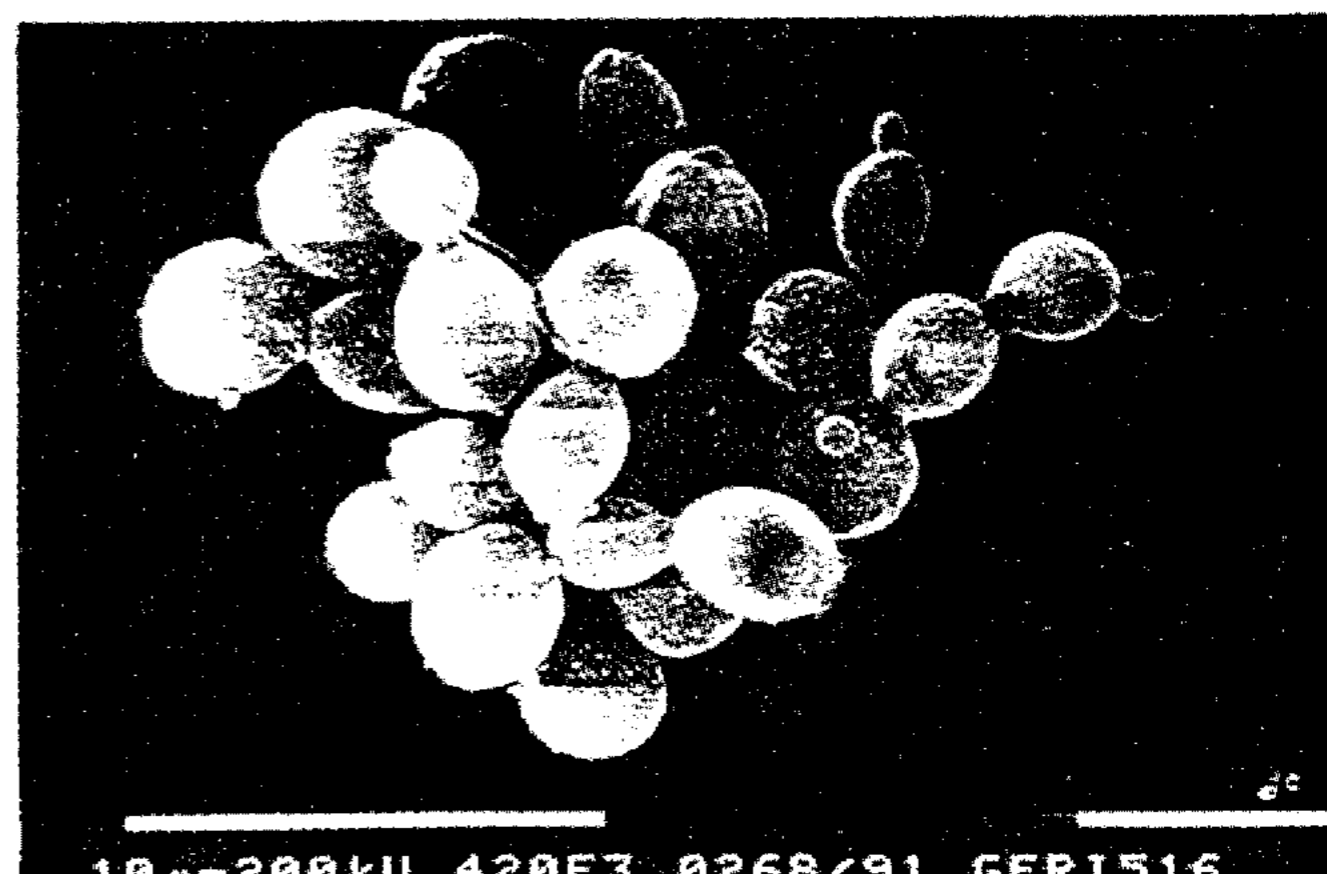
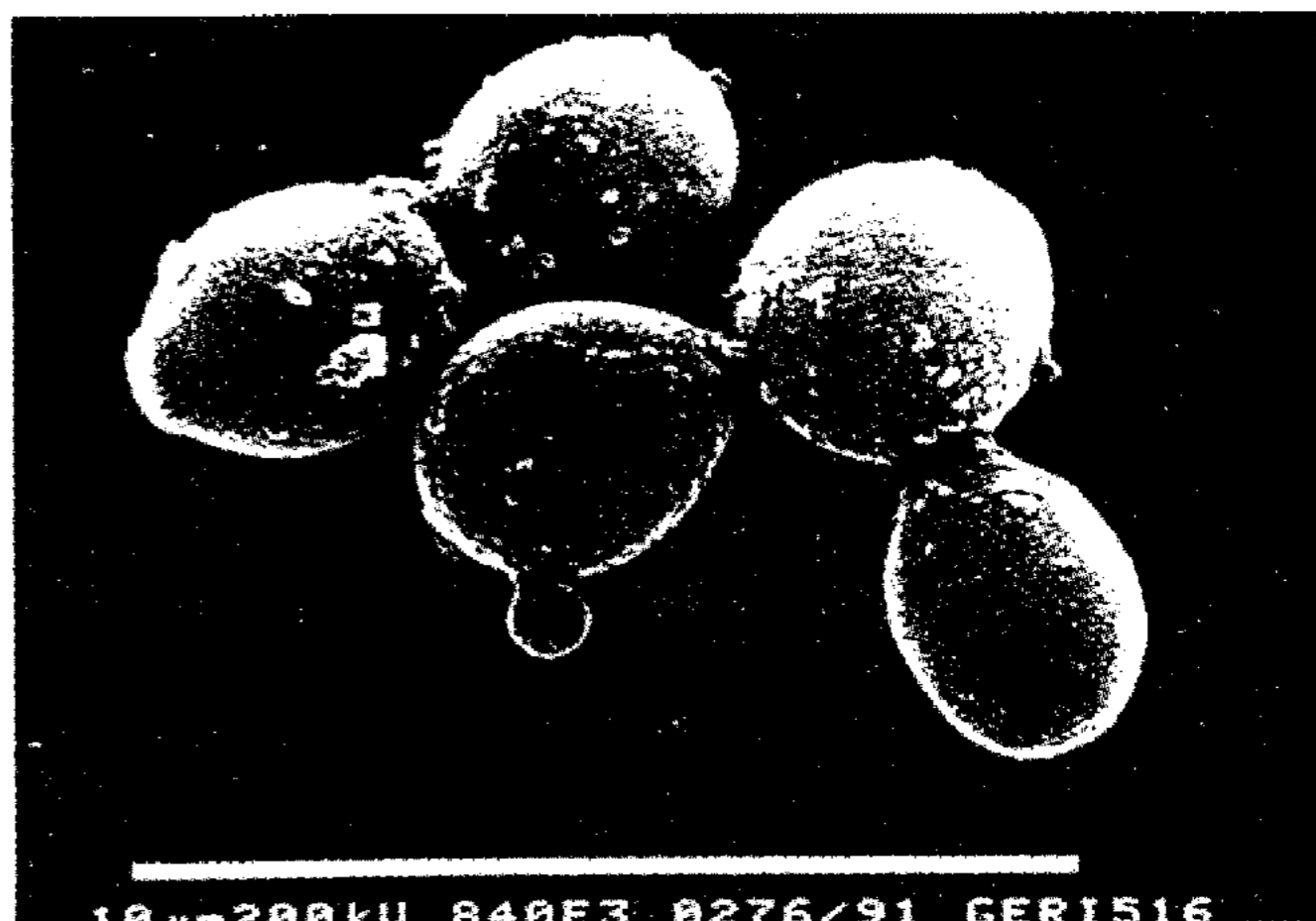


Fig. 3. Electron microphotographs of isolated YK-19.

(16, 18, 19). YK-11 균주는 pseudomycelium을 형성하지 않으며 자낭포자를 형성하고 포자 형태는 모자형이고 자낭당 1~2개 포자를 형성한다. Lactose, arabinose, sucrose의 자화능력이 없으며 특징적으로 soluble starch를 약하게 자화할 수 있어 *Pichia media*로 분류되었다. YH-4 균주는 primitive pseudomycelium을 형성하나 곧 결실되며 glucose, galactose, mannitol은 잘 이용하나 그외의 당들은 잘 이용 못하는 것으로 *Pichia chambardii*로 분류되었다. YH-5 균주는 glucose, galactose는 잘 이용하나 그외의 당들은 이용하지 못하는 것으로 *Pichia haplophilia*로 분류되었다.

Saccharomyces 속은 malt agar 상에서 28°C 3일간 배양시 세포는 spheroidal, globose 하며 경우에 따라서는 ellipsoidal한 형태를 보인다. 자낭포자는 구형이며, lactose, nitrate 자화성이 없어(16, 18, 19). YK-12, YK-17, YK-18, YK-19, YK-20 및 YH-3 균주는 *Saccharomyces* 속으로 분류되었다. 특히 이 중에서 YK-19 균주는 glucose, sucrose, maltose를 발효하고, lactose, soluble starch, D-arabinose, L-arabinose 분해능이 없고 cyclohexamide 내성이 없어 *Saccharomyces fermentati*로 분류되었다.

최국지(8)는 겨울 배추김치로부터 *Brettanomyces* 속,

Table 2. Physiological characteristics of the isolated yeasts

Strain	YK-6	YK-10	YK-11	YK-12	YK-17	YK-18	YK-19	YK-20	YH-3	YH-4	YH-5	Sacc.*
Fermentation												
Glucose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Maltose	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+
Sucrose	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Mannose	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Assimilation of carbon compounds												
D-Galactose	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
L-Arabinose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Maltose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Cellobiose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Arbutin	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Erythritol	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Assimilation of nitrogen compounds												
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth												
at 25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
at 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
at 37°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
at pH 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
at pH4~9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cyclohexamide (0.01%)												
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1% acetic acid												
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10% NaCl and 5% glucose												
	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ester production												
	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
Extracellular starch-like compounds production												
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea hydrolysis												
	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+

+; positive, -; negative

*Reference strains for identification; *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763

*Candida*속, *Citeromyces*속, *Kluyveromyces*속, *Pichia*속, *Rhodotorula*속, *Saccharomyces*속, *Torulopsis*속을 분리하였는데, 본 논문에서 동정한 속과 같은 것은 *Pichia*속과 *Saccharomyces*속 뿐이며, *Debaryomyces*속은 없었다. 따라서 이 속은 김치속에 흔히 존재하지 않는 균으로 생각되며, 산막효모로 발표된 *Pichia*속으로 *Pichia anomala*, *Pichia membranefaciens* 등이 있으나 본 논문에서 동정된 *Pichia*속과는 종에서 달랐다.

그리고 본 screening법으로 분리한 효모 속의 종류가 적은 것은 일반적으로 김치속에 존재하는 효모들과는 달리 비교적 저온이며 고농도의 젖산과 초산이 존재하며, 최소배지에서 생육가능하며, 이런 조건들에서 starter 목적으로 생육이 비교적 빠른 균을 screening한 때문이라고 생각한다.

최소배지에서의 생육도

분리균주를 최소배지 I에 비하여 주로 미량금속이 함유되지 않은 최소배지 II에 접종하여 균주의 pH 및 생육도를 25°C에서 측정한 결과 Table 3과 같다. *Debaryomyces* sp. YK-6과 *Debaryomyces coudertii* YK-10 균주의 경우 초기 균체의 생육상태가 다른 균주들보다 빠른 반면에 배양 3일째까지 별로 큰 차이를 보이지 않았으며, 나머지 균주들은 초기에 다소 늦었으나 배양 36시간 이후부터 서서히 성장하기 시작하여 배양 60시간 이후는 *Debaryomyces* sp. YK-6과 *Debaryomyces coudertii* YK-10 균주보다 생육도가 훨씬 높게 나타났으며, 특히 *Saccharomyces fermentati* YK-19 균주의 경우 2배 정도의 높은 생육도를 보였다.

균주의 초기 pH는 5.10이었으며 최종 pH는 2.8~3.7의 범위로 낮아졌다. 민 등(21)은 pH 4.2, 산도 0.6~0.8%일 때 적당한 정도로 익었다고 하였고, 구 등(22)은 pH 4.2~4.4일 때가 가장 먹기에 적당한 신맛 범위라고 하였다. 따라서 Table 3의 모든 균들은 김치에 starter로 첨가시 김치의 가식기간 내에서는 적어도 생육

할 수 있는 산 내성을 가지고 있다고 할 수 있으며, 이 균들은 초기 screening 최소배지와 틀리는 최소배지 II에서 자라는 것으로 보아, 탄소원을 포도당으로 한 대부분의 최소배지에서 증식가능한 것을 알 수 있었다.

젖산과 초산의 이용성

젖산과 초산을 첨가한 미량의 금속이온들이 함유되지 않은 최소배지 II에 전배양한 분리균주들을 접종하여 25°C에서 생육도를 측정한 결과 Table 4와 같다. *Debaryomyces* sp. YK-6과 *Debaryomyces coudertii* YK-10 균주의 경우 3종류의 배지에서 생육상태가 대부분 좋았으며, 그외에 젖산을 0.1% 첨가한 배지에서는 *Saccharomyces* sp. YK-17 균주가 다른 균주들보다 월등하게 좋았으며, 초산을 0.1% 첨가한 배지에서는 *Saccharomyces* sp. YK-12, *Saccharomyces* sp. YK-20, *Pichia chambardii* YH-4 균주의 생육도가 높게 나타났다. 반면에 *Saccharomyces* sp. YK-18, *Saccharomyces fermentati* YK-19, *Saccharomyces* sp. YH-3 균주의 경우 젖산과 초산을 각각 단독으로 첨가한 배지에서는 생육도가 낮았는데 반해 두 유기산을 함께 첨가한 배지에서는 생육상태가 상당히 좋게 나타났다. 그리고 YK-10을 제외하고 젖산보다는 초산에서 생육상태가 좋아 초산에 대한 내성이 더 강하고 이용능이 뛰어난 것으로 보인다. 그리고 이들 균은 초기 screening 최소배지와 틀리는 최소배지 II에서 자라는 것으로 보아, 탄소원을 초산과 젖산으로 한 대부분의 최소배지에서 증식 가능한 것으로 생각된다.

한편 이들 균주들을 김치에 starter로 첨가하여 관능검사에서 우수한 것으로 나타난 균주가 *Saccharomyces* sp. YK-17, *Saccharomyces fermentati* YK-19이다 (20). 이들 두 균주들의 고농도 유기산의 이용성을 보았다. 균 screening시 사용한 최소배지 I에서 최소배지 II보다 균의 생육상태가 더 좋아 최소배지 I을 이용하여 유기산의 고농도 첨가 효과를 보았다. Fig. 4의 A는 최

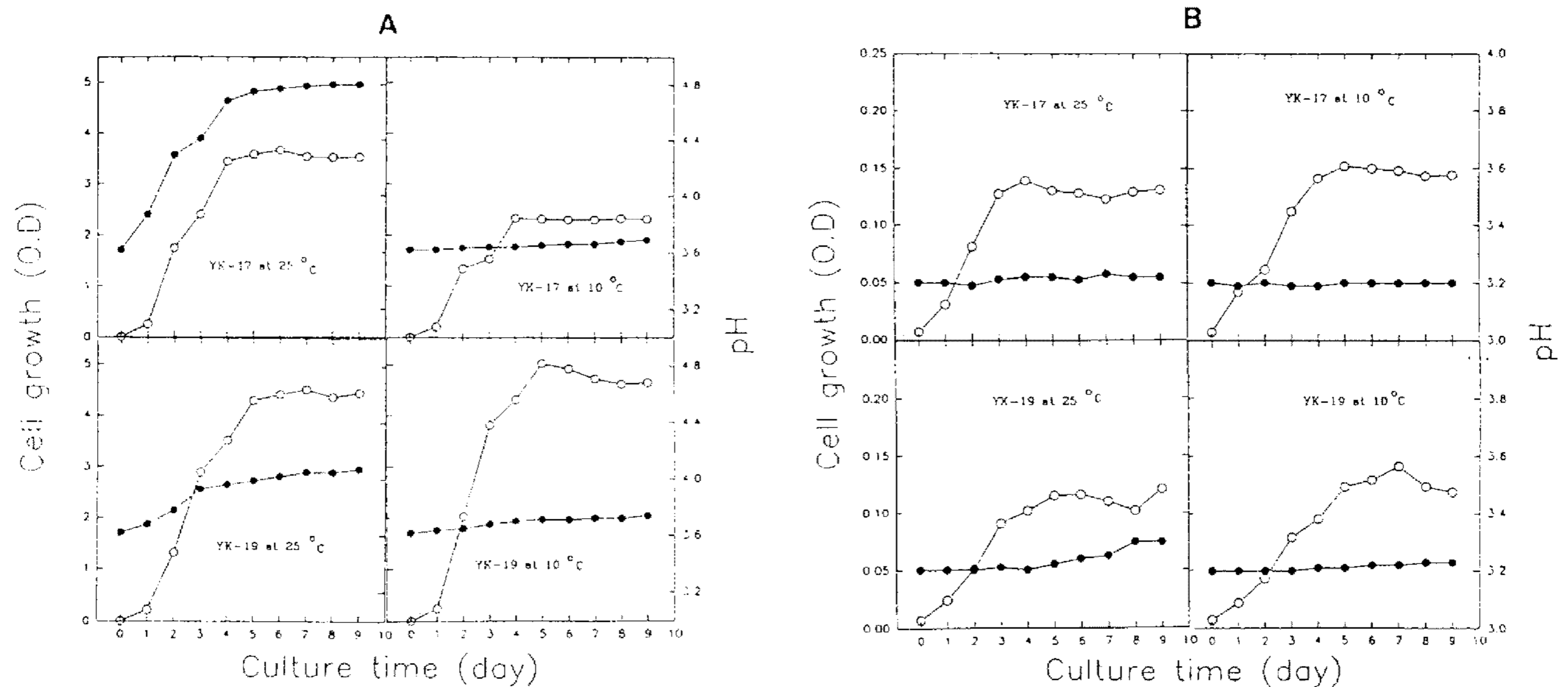
Table 3. Growth pattern and pH of the isolated yeasts in the basal medium II

Strain	Cell growth (O.D. _{660 nm})						Final pH
	12	24	36	48	60	72 (hr)	
<i>Debaryomyces</i> sp. YK-6	0.15	0.30	0.35	0.42	0.46	0.53	3.70
<i>Debaryomyces coudertii</i> YK-10	0.18	0.30	0.31	0.38	0.46	0.48	3.60
<i>Saccharomyces</i> sp. YK-12	0.03	0.05	0.19	0.33	0.71	0.93	2.87
<i>Saccharomyces</i> sp. YK-17	0.05	0.05	0.22	0.36	0.83	0.92	2.83
<i>Saccharomyces</i> sp. YK-18	0.05	0.05	0.28	0.43	0.91	0.98	2.84
<i>Saccharomyces fermentati</i> YK-19	0.08	0.08	0.29	0.45	0.86	1.00	2.84
<i>Saccharomyces</i> sp. YK-20	0.04	0.05	0.13	0.21	0.55	0.66	2.86
<i>Saccharomyces</i> sp. YH-3	0.06	0.06	0.19	0.36	0.77	0.82	2.82
<i>Pichia media</i> YK-11	0.03	0.05	0.23	0.30	0.66	0.76	2.89
<i>Pichia chambardii</i> YH-4	0.05	0.08	0.14	0.23	0.51	0.75	2.88
<i>Pichia haplophilia</i> YH-5	0.06	0.06	0.26	0.45	0.82	0.87	2.81

Table 4. Growth pattern of the isolated yeasts in acid-containing media

Strain	Cell growth (O.D. _{660 nm})														
	0.1% Lactic acid					0.1% Acetic acid					0.05% L.A.*+0.05% A.A.**				
	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10	2	4	6	8	10(days)
<i>Debaryomyces</i> sp.															
YK-6	0.06	0.11	0.15	0.25	0.30	0.13	0.21	0.26	0.34	0.42	0.08	0.15	0.20	0.31	0.34
YK-10	0.08	0.16	0.12	0.19	0.21	0.11	0.22	0.28	0.19	0.17	0.15	0.24	0.26	0.38	0.45
<i>Saccharomyces</i> sp.															
YK-12	0.03	0.04	0.04	0.05	0.06	0.08	0.18	0.19	0.24	0.28	0.08	0.12	0.16	0.18	0.19
YK-17	0.03	0.05	0.05	0.08	0.13	0.03	0.09	0.10	0.13	0.17	0.04	0.13	0.14	0.15	0.18
YK-18	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.03	0.10	0.11	0.15	0.18	0.08	0.16	0.16	0.18	0.22
YK-19	0.02	0.03	0.03	0.04	0.06	0.02	0.06	0.09	0.12	0.16	0.09	0.16	0.18	0.20	0.23
YK-20	0.02	0.05	0.05	0.06	0.07	0.07	0.17	0.19	0.25	0.29	0.07	0.13	0.15	0.18	0.19
YH-3	0.02	0.03	0.03	0.04	0.05	0.08	0.15	0.16	0.20	0.26	0.09	0.16	0.21	0.22	0.23
<i>Pichia</i> sp.															
YK-11	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.04	0.17	0.17	0.22	0.25	0.07	0.12	0.14	0.15	0.17
YH-4	0.02	0.03	0.03	0.03	0.04	0.10	0.28	0.26	0.30	0.32	0.09	0.16	0.17	0.20	0.22
YH-5	0.03	0.02	0.03	0.03	0.04	0.06	0.14	0.18	0.19	0.23	0.08	0.15	0.18	0.19	0.19

*L.A.; lactic acid, **A.A.; acetic acid.

**Fig. 4. Growth pattern of the isolated yeasts in lactic acid and acetic acid-containing basal media I.**

Basal medium A containing 0.3% lactic acid, basal medium B containing 0.3% lactic acid and 0.6% acetic acid.

Symbols: (○) OD_{660 nm}; (●) pH.

소배지 I에 젖산을 0.3% 첨가한 것이며, 그리고 김치 내의 유기산은 주로 초산과 젖산으로 그 비가 약 2:1 이므로 젖산 0.3%와 초산 0.6%를 동시에 첨가한 것(pH 3.2)이 Fig. 4의 B이다. Fig. 4의 A에서 젖산 0.3%만 첨가하는 *Saccharomyces fermentati* YK-19 균주가 *Saccharomyces* sp. YK-17 균주보다 25°C, 10°C 모두에서 증식상태가 더 좋았으나, 특히, YK-19 균주의 경우 10°C 배양에서 오히려 25°C 배양보다 균 증식력이 약간 더 좋았고, 이 때의 pH 변화는 25°C보다 적었다. YK-17

균주는 25°C에서는 YK-19에 비하여 pH 변화가 심하였으며, 10°C에서는 증식력과 pH 변화 모두 낮았다. 초산만 0.3% 첨가하는 배양 5일만에 겨우 최고값으로 *Saccharomyces* sp. YK-17는 25°C시 OD₆₆₀=0.17, 10°C시 OD₆₆₀=0.14이며, *Saccharomyces fermentati* YK-19는 25°C시 OD₆₆₀=0.04, 10°C시 OD₆₆₀=0.05로 YK-17 균주가 더 좋아 두 균주 사이의 유기산의 이용능이 틀리게 나타났으며, 초산의 이용능은 Table 4와는 틀리게 젖산에 비하여 모두 떨어졌다. 따라서 최소배지에서 초산

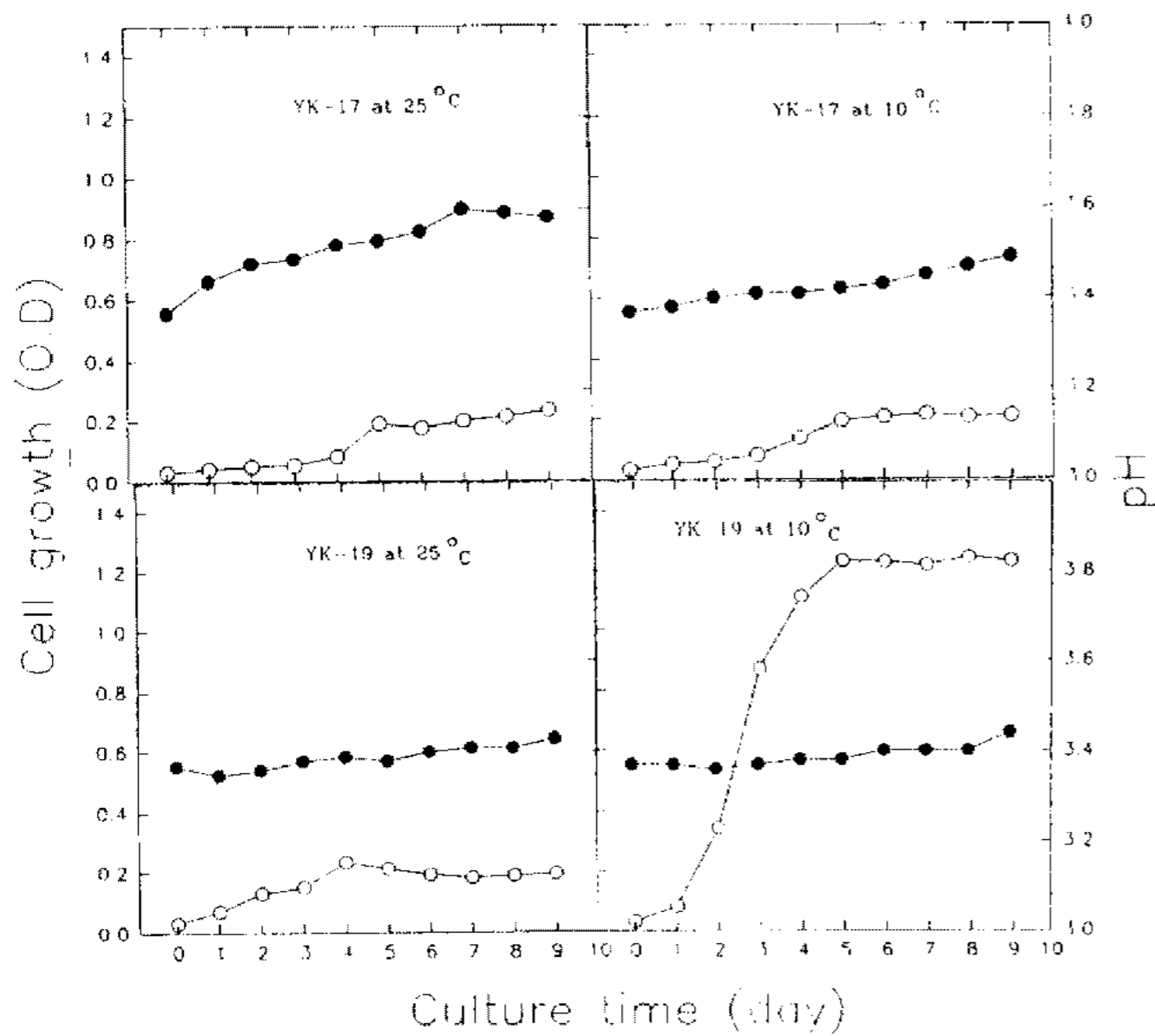


Fig. 5. Growth pattern of the yeasts in YM medium containing 0.3% lactic acid and 0.6% acetic acid.

Symbols: (○) OD_{660nm}; (●) pH.

0.3%는 0.1%보다 균 생육 저해성을 보였다. 또한 두 균주 모두 젖산 0.3%와 초산 0.6%가 함유된 최소배지 I에서는 증식력이 Fig. 4의 B와 같이 젖산 0.3% 함유된 것에 비하여 매우 떨어져, 초산 0.6% 첨가에 의한 생육 억제성을 보였다. YK-17의 경우 10°C에서도 25°C만큼 증식력이 좋아 젖산만의 경우와 틀리는 경향을 보였으며, YK-19는 10°C에서 25°C보다 증식력이 오히려 약간 더 좋은 젖산 0.3% 함유된 경우와 같은 증식 능력을 보였다.

그리고 YM 배지에 포도당대신 젖산 0.3%와 초산 0.6%를 동시에 첨가한 것이 Fig. 5이다. YK-17 균주는 Fig. 4의 B에서와 같이 증식력이 모두 떨어졌다. 그러나 YK-19 균주의 경우는 10°C에서 예상과 달리 매우 왕성한 증식력을 보였는데 이것은 Fig. 4에서도 더 좋은 증식을 보여, 이 균주는 YK-17 균주보다 저온성 균주인 것을 알 수 있었다.

한편 YM 배지에 포도당대신 젖산 0.3% 첨가시, 배양 5일째 최고 수준으로 YK-17의 경우 25°C에서 OD₆₆₀ = 7.30, 10°C에서 OD₆₆₀ = 3.30, YK-19의 경우 25°C에서 OD₆₆₀ = 5.45, 10°C에서 OD₆₆₀ = 5.21로 비교적 높은 증식력을 보였으며, 초산 0.3% 첨가시는 배양 5일째 최고 수준으로 YK-17의 경우 25°C에서 OD₆₆₀ = 0.41, 10°C에서 OD₆₆₀ = 0.41, YK-19의 경우 25°C에서 OD₆₆₀ = 2.32, 10°C에서 OD₆₆₀ = 2.30으로 젖산의 경우보다 생육이 떨어졌는데, YK-17 균주의 경우가 더 큰 생육저해를 받았으나, Fig. 5의 경우보다는 생육저해가 덜 하였다. 역사 초산이 완전배지에서도 어느 정도 생육 억제성을 보였으며, 여기에 젖산의 동시 첨가는 생육억제가 심하게 나타났다.

따라서 Fig. 4, 5에서와 같이 고농도 유기산의 복합 첨가는 균주의 생육을 어느 정도 억제시키나 완전배지 저온에서 YK-19 균주는 증식력이 상대적으로 매우 왕성하게 나타나 이 균주는 저온성 균주로 판명되었으며 완전배지 형태인 실제 김치의 저온발효(10°C)에서 더 좋은 결과가 기대된다.

이와 같이 김치의 유기산을 탄소원으로 이용할 수 있는 균들을 김치로부터 분리 동정하였으며, 이들을 김치에 첨가시 김치내의 유기산들을 이용할 가능성이 매우 높은 것으로 생각되며, 특히 YK-19 균주가 매우 바람직한 것으로 생각된다.

요 약

김치발효로 인해 생성되는 유기산 중 젖산과 초산을 탄소원으로 이용하며, 통기적 성질을 가지며, 어느 정도 저온성(10°C)과 내산성(pH 3.2)의 성질을 갖는 11균주를 김치로부터 순수분리하였다. 이들 분리 균주는 형태적, 배양적 및 생리적특성에 의해 진균류에 속하는 3종류의 속으로 분류되었다. 첫번째로 YK-6과 YK-10 균주는 *Debaryomyces*속으로 분류되었으며, 이 중 YK-10 균주는 *Debaryomyces coutertii*로 동정되었고, 두번째로 YK-11, YH-4 및 YH-5 균주는 *Pichia*속으로 분류되었다. 이 중 YK-11 균주는 *Pichia media*, YH-4 균주는 *Pichia chamberdii*, 그리고 YH-5 균주는 *Pichia haplophilia*로 동정되었다. 세번째로 YK-12, YK-17, YK-18, YK-19, YK-20 및 YH-3 균주는 *Saccharomyces*속으로 분류되었으며, 이 중 YK-19 균주는 *Saccharomyces fermentati*로 동정되었다.

분리균주의 산 이용성을 실험하기 위하여 최소배지 및 젖산과 초산의 유기산 첨가 배지에서 생육도를 측정하였는데 균분리시와 틀리는 미량금속이 함유되지 않은 최소배지에서도 모두 자랐다. 특히 *Saccharomyces* sp. YK-17와 *Saccharomyces fermentati* YK-19가 생육상태가 비교적 좋았으며, 두 균주 모두 젖산 0.3%와 초산 0.6%가 첨가된 균분리시 사용한 최소배지에서 증식을 보였으며, YM 배지에 젖산 0.3%를 탄소원으로 첨가시는 좋은 생육을, 젖산 0.3%와 초산 0.6% 첨가시는 낮은 생육을 보였다. 이 중 YK-19 균주는 25°C에서보다 10°C에서 더 잘 자라는 저온성 균주로 판명되었다.

참고문헌

1. 이태녕, 김점식, 정동효, 김호식. 1960. 김치숙성 과정에 있어서의 Vitamin 함량의 변화. 과연회보 5(1): 43-50.
2. 최신양. 1988. 김치발효와 보전성. 식품과학 21(1): 19-24.
3. 김호식, 정윤수. 1962. 김치 및 김에서 분리한 호기성 세균의 동정에 관하여. 한국농화학회지 3: 19-24.
4. 황규찬, 정윤수, 김호식. 1960. 김치의 미생물학적 연구(제 2보). 호기성 세균의 분리와 동정. 과연회보 5(1): 51-55.

5. 김호식, 황군찬. 1959. 김치의 미생물학적 연구(제 1보). 혐기성 세균의 분리와 동정. 과연회보 4(1): 56-63.
6. 민태익, 권태완. 1984. 김치발효에 미치는 온도 및 식염 농도의 영향. 16(4): 443-450.
7. 하순변. 1960. Pectin 분해효소 및 산막미생물이 침채류의 연부에 미치는 영향에 관하여. 과연회보 5(2): 139-147.
8. 최국지. 1978. 김치에서 분리한 효모에 관한 분류 -효모의 분리 동정-. 한국산업미생물학회지 16: 1-10.
9. 한홍의, 임종락, 박현근, 문상식, 박영선, 주홍택. 1990. 김치 부패시 *Brettanomyces custersii*와 *Klebsiella oxytoca*의 편리공생. 인하대학교 기초과학 논문집 11: 171-178.
10. 好井久雄, 金子秀之, 山口和夫. 1973. 食品微生物學. 技段堂, 144-146.
11. 이양희, 양익환. 1970. 우리나라 김치의 포장과 저장 방법에 관한 연구. 한국농화학회지 13: 207-218.
12. 박경자, 우순자. 1988. Na-acetate 및 Na-malate와 K-sorbate가 김치발효 중 pH, 산도 및 산미에 미치는 효과. 한국식품과학회지 20: 40-44.
13. 정병선. 1963. 방사선을 이용하는 식품보장에 관한 연구 -김치저장에 관하여. 원자력연구논문집 3: 67-72.
14. 이춘녕, 김호식, 전재근. 1968. 김치 통조림 제조에 관한 연구. 한국농화학회지 10: 33-38.
15. DIFCO Manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology DIFCO laboratories. Detroit michigan U.S.A.
16. Lodder. 1971. The yeasts. North-Holland Publishing Company-Amsterdam, London.
17. N.J.W. Kreger-Van Rij. 1984. The Yeasts. Elsevier Science Publishers B.V.-Amsterdam.
18. Barnett, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 1983. Yeast characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge.
19. 長谷川武治. 1984. 微生物の分類と同定(上). 學會出版センター.
20. 김혜자, 김영찬, 양차범, 강상모. 1996. 김치로부터 분리한 효모가 생산하는 휘발성 화합물이 김치의 풍미에 미치는 효과. 한국산업미생물학회지 투고중.
21. 민태익, 권태완. 1984. 김치발효에 미치는 온도 및 식염 농도의 영향. 한국식품과학회지 16(4): 443-450.
22. 구경형, 강근옥, 김우정. 1988. 김치의 발효중 품질변화. 한국식품과학회지 20: 476-482.

(Received 18 March 1996)