

깍두기 발효 중 균상 변화 및 젖산 구균의 생리적 특성

류춘선 · 김은경 · 김영배
고려대학교 생명공학원

Changes in the Bacterial Flora during *Kakdugi* Fermentation and the Physiological Characterization of Lactic Coccal Isolates

Chun-Sun Ryu, Eun-Kyung Kim and Young-Bae Kim
The Graduate School of Biotechnology, Korea University

Abstract

Three distinct phases were observed in acidity change during the *Kakdugi* fermentation; the first increasing phase, a stable phase, and the second increase phase. *Enterobacter* strains were the dominant bacteria (more than 90%) just after preparation of *Kakdugi*. *Lactobacillus* and *Leuconostoc* sp. were the mainly isolated from properly-ripened (53 and 43%, respectively) as well as from over-ripened *Kakdugi* (63 and 37%, respectively). *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides* was the dominant one among the lactic cocci from *Kakdugi*. The isolates from properly-ripened *Kakdugi* required more amino acids for growth compared to those from over-ripened one while no difference was observed with vitamins. Their physiological characteristics such as amino acid and vitamin requirement were different from those of 9 type strains of various *Leuconostoc* species.

Key words: *Kadugi*, lactic cocci, physiological characteristics

서 론

깍두기는 무를 주재료로 하는 점이 우선 배추김치와 다를 뿐만 아니라 제조 방법 또한 같지 않으므로 기호 특성이 독특하여 단독으로, 혹은 배추김치와 함께 널리 애용되는 발효 채소류의 하나이다. 발효 채소 종류는 사용하는 재료와 담금 법에 따라서 성격이 다양한 종류의 특성을 지니며⁽¹⁾ 숙성에 관여하는 미생물 또한 중요한 영향을 끼치는 것으로 생각된다. 김치의 숙성 속도에 중요한 영향을 주는 인자가 온도 및 소금의 농도라고 보고되어 있으며⁽²⁾ 이는 또한 숙성에 관여하는 미생물의 종류나 활성에 영향력으로 해석될 수도 있다. 실제로 배추김치의 발효 중 젖산균의 경시 적인 변화도 보고되어 있다⁽³⁾. 그러나 김치 류의 발효에 관여하는 미생물 종류가 단일하지 않고 또한 어떤 특성의 종류는 특정 재료와 연관이 있는지도 정확하게 알지 못한다. 잘 숙성된 김치에서 미생물은 분리하여 동정하면 관여 미생물의 종류를 확인할 수는 있으나 그 역

할이 어느 정도의 비중을 차지하는지 알기 위해서는 발효에 관여하는 미생물 상이 밝혀져야 할 것이다⁽⁴⁾. 또한 발효의 방향에 결정적인 역할을 하며 특히 기호성에 커다란 영향을 미치는 미생물의 종류와 그 생리적 특성을 밝히는 일은 중요하며 시기 별로 어떻게 달라지는가를 밝히는 일은 발효 식품의 성격을 더욱 구명하기 위해서도, 대량 생산의 품질 관리에 기초 자료를 위해서도 필요하다고 생각된다⁽⁵⁾. 더욱이 김치에서 분리되는 젖산 구균은 간균과는 달리 당 발효 생리가 문헌과 일치하지 않는 점이 많아 동정에 어려움이 많다. 실제로 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁽⁶⁾에 *Leuconostoc* 등 3속의 젖산 구균이 등록되었으나 이후 활발한 연구 결과 젖산 구균이 9속으로 세분되고 여러 종이 새로 창설되는 등 새로운 분류법이 확립되는 group 이다. 그러나 김치류에서 분리된 균주들은 표준균주들과 일부 생리적 특성이 일치하지 않는 점이 있어 같은 종류로 보기 어려워 이들의 생리적 특성이 상세하게 연구되어야 할 필요성이 있다고 할 수 있다. 본 실험은 깍두기의 발효 시기 별로 숙성에 관여하는 세균 종류와 중요성을 알아보고 일부 생리적 특성을 밝혀려고 시도하였다.

Corresponding author: Young-Bae Kim, The Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

재료 및 방법

깍두기의 제조

무(팔도)를 씻은 후 껍질을 얇게 벗기고 다듬은 후 2 cm 크기의 육면체로 썰었다. 무 5 kg에 대하여 소금(한주) 140 g을 뿌리고 30분간 절인 다음, 고춧가루(두산 농산) 135 g, 마늘 100 g, 중과 165 g, 생강 35 g을 다지거나 적당한 크기로 썰어 넣고 혼합한 후 비닐 봉지에 담아 상자에 넣어 15°C에서 숙성시켰었다.

pH 및 산도의 측정

시료는 blender로 갈고 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 여액을 분석에 사용하였다. pH는 pH meter로 측정하였으며 산도는 0.1 N-NaOH로 적정하여 pH 8을 종말 점으로 하여 중화에 소비된 가성소다 용액의 양을 젖산으로 환산하여 나타내었다⁽³⁾.

생균수의 측정과 세균상의 조사

세균 수는 tomato juice 평판 배지에 희석한 시료 용액을 도말하여 30°C에서 3일간 배양하여 나타나는 집락의 수를 세어 측정하였다. 세균상의 조사는 균수를 세기 위하여 배양한 평판 중에서 30개 가량의 콜로니를 나타내는 것을 골라서 모두 분리하였다. 담금 직후, 발효 8일 및 40일 후에 각각 분리하여 전통적인 생화학 실험 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology⁽⁶⁾의 분류 기준에 따라 동정하였다.

아미노산 및 비타민 요구성

시험 대상 세균은 먼저 tomato juice broth에서 24시간 키운 균체를 살균된 생리적 식염수로 세척하여 접종 원으로 사용하였다. Amino Acid Assay Media⁽⁷⁾를 제조하여 His, Cys, Val, Leu, Trp, Phe, Tyr, Pro, Arg, Met, Thr, Lys, Ileu 등의 아미노산 중에서 시험하는 아미노산만이 결핍되고 나머지 아미노산을 첨가하고, 시험 균을 접종하여 성장 여부로 아미노산 요구성을 측정하였다. 비타민 요구성 시험은 Vitamin Assay Medium⁽⁸⁾와 thiamine HCl, riboflavin, pyridoxal HCl, calcium pantothenate, p-aminobenzoic acid, folic acid, biotin, niacin 등의 화합물을 사용하여 아미노산 요구성과 같은 방법으로 시험하였다⁽⁶⁾.

결과 및 고찰

깍두기 숙성 중의 균수와 산도의 변화

깍두기의 숙성 중에 균수의 변화와 pH 및 산도의

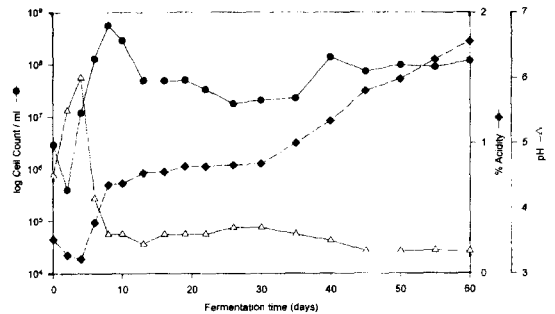


Fig. 1. Changes in cell numbers, pH, and titratable acidity during *Katugi* fermentation at 15°C.

변화도 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 담금 초기에 균수는 2.7×10^6 수준이었고 pH 및 산도는 각각 4.5 및 0.26%로 나타났다. 발효 초기 2일까지는 pH가 6까지 오르고 산도도 0.11%까지 낮아져 재료의 유기산이 소비되는 듯 보였으나 이후 즉시 활발한 산 생성과 함께 세균수도 증가하여 발효 8일 후에는 세균수가 10^8 수준 가까이 증가되고 산도도 0.7%까지 올라서 제대로 숙성되는 증거를 보여 주었다. 이후 균수는 다시 다소 감소하여 10^8 을 밑돌고 산도도 또한 뚜렷한 증가 추세를 보이지 않았으며 이러한 경향이 발효 30일까지 계속되었다. 그러나 그 후 균수의 증가를 확인할 수 없는 가운데 산도의 증가는 뚜렷하게 가속되는 등 발효 상태의 변화를 보이며 발효 60일까지 유사한 경향이 계속되어 산도가 1.7%를 넘어섰다. 담금 직후에도 균수는 낮은 편은 아니었으나 산도의 변화와 균수의 증가 추세로 미루어 볼 때 깍두기의 숙성을 주도하는 종류는 담금 후 성장하는 것으로 보인다. 한편 발효 후 40일 이후에 산 생성의 속도가 증가하는 것으로 보아 산 생성 대사가 활성화되거나 산 생성 능이 우수한 새로운 종류가 등장하는 것으로 생각된다.

깍두기 숙성 중에 분리된 세균류

발효 직후 및 적숙기와 과숙기라고 판단되는 시기에 무작위로 선발한 세균의 속의 종류와 분포를 조사하여 Table 1에 나타내었다. 세균은 분리하였던 시기는 담금 직후, 8일 후, 및 40일 후로서 이때의 pH는 각각 4.5, 3.6 및 3.5이었으며 산도는 각각 0.3%, 0.7% 및 1.2%이었다. 담금 직후에 분리된 균주는 대부분이 *Enterobacter*이었으며 기타 *Pseudomonas*와 *Staphylococcus*도 소수 분리되었다. 그러나 발효가 진행되어 적숙기에 이르면 이들은 전혀 발견되지 않아 이들의 숙성에 어떤 역할을 하는지는 미지수이다. 적숙기에는 *Lactobacillus*와 함께 *Leuconostoc*속 균주가 각각 53%

Table 1. Distribution of bacterial strains isolated from *Kakdugi* fermented at 15°C

Isolation time	Microorganisms	No. (%)
after preparation	<i>Enterobacter</i>	42 (91.3%)
	<i>Pseudomonas</i>	3 (6.5%)
	<i>Staphylococcus</i>	1 (2.1%)
	total	46 (100%)
after 8 days	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>paramesenteroides</i>	13 (43%)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	7 (23%)
	<i>Lactobacillus sake</i>	6 (20%)
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3 (10%)
	<i>Pediococcus inopinatus</i>	1 (3%)
	total	30 (100%)
after 40 days	<i>Lactobacillus sake</i>	14 (37%)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	8 (21%)
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	2 (5%)
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>paramesenteroides</i>	11 (29%)
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	3 (8%)
	total	38 (100%)

및 43%를 차지하며 우세한 종류로 나타났다. 이들 젖산 구균은 dextran을 형성하지 못하며 서로 세부적인 당 발효능이 완전 일치하지는 않으나 모두 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides*로 동정하였다. 과숙기에서는 *plantarum*, *sake* 및 *fermentum*과 같은 *Lactobacillus* 종류들(63%)과 *Leuconostoc* 종류들(37%)이 분리되어 깍두기는 과숙기에도 적숙기의 경우와 균상이 크게 변화하지 않았다. 저온 숙성 배추 김치 경우는 우점종이 적숙기에 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*에서 과숙기에 *Lactobacillus*속 균주로 비교적 뚜렷하게 구별되는 차이를 보여⁽⁴⁾ 대조를 이룬다. 분리된 균 종류들은 모두 김치에서도 분리되어 보고되었던 것들이나, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides*가 적숙기 뿐 아니라 과숙기에도 다수 분리되는 것으로 보아 깍두기 발효에서 그 역할이 특히 중요한 것으로 보인다. *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides*는 김치의 발효에 중요한 역할이 추정되는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*⁽⁴⁾와 당 발효생리에서도 근소한 차이를 보이고 있으나 당 발효 능력으로 *Leuconostoc*속의 종을 구분함이 어려움은 보고된 바 있다⁽⁴⁾.

초기에 절대 다수로 분리되었던 *Enterobacter*는 대장균군에 속하나 무 등의 주재료 혹은 파나 생강 같은 부 재료에서 다량 기원하였던 것으로 생각할 수 있다.

이들은 초기 미생물 상에 영향을 줄 수 있으나 발효가 진행되면 다시 나타나지 않으므로 대장균 군의 검사만으로 담금 직후의 깍두기의 위생 상태와 직접 관련 짓기는 어려울 것으로 판단된다. 김치 발효 중 대장균군이 검출되어도 시간이 지날수록 감소하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁰⁾.

깍두기에서 분리한 *Leuconostoc*속 균주들의 아미노산 요구성

분리 시기가 다른 *Leuconostoc*속 균주를 당 발효능 외의 생리적 특성에서 차이를 알아보기 위하여 몇 가지 아미노산 요구성을 실험하여 Fig. 2에 나타내었다. 많은 종류의 아미노산이 다수의 균주에 의하여 요구되며, 특히 적숙기에 분리된 균주는 histidine, valine, leucine, tryptophane, phenylalanine, arginine, methionine, threonine, isoleucine 등의 아미노산을 요구하는 균주의 비율이 높았다. 그러나 과숙기에 분리된 균주들에서는 tryptophan, arginine, 및 threonine 등의 아미노산을 요구하는 균주의 비율이 현저히 낮아진 것으로 나타났다. 발효가 진행되면서 환경의 변화가 여러 종류의 아미노산 요구 균주에게 불리하게 진행되는 단서로 볼 수도 있다. 분리주들과 *L. paramesenteroides* ATCC 33313 표준 균주는 아미노산 요구성에서도 다소 차이를 보였으며 오히려 다른 종의 표준 균주와 유사하게 볼 수 있다. 깍두기에서 분리한 젖산 구균은 manual에 의하여 동정하여도 일부 발효 특성 등이 다르게 나타나는 것으로 보아 더욱 적절한 방법으로 분류 체계를 개선하기 위한 연구가 진행되어야 한다고 생각한다.

깍두기에서 분리한 *Leuconostoc*속 균주들의 비타민 요구성

깍두기에서 분리된 균주들과 표준 균주들의 비타민 요구성을 조사하여 Table 3에 나타내었다. 적숙기에 분리된 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides* 균주들은 thiamine, riboflavin, pantothenate, folic acid 및 niacin을 요구하였으며 biotin의 요구성은 균주의 종류에 따라 일정하지 않았으나 pyridoxal 및 *p*-aminobenzoic acid는 요구하지 않았다. 이러한 성질은 과숙기에서 분리된 균주들에서도 변화하지 않았으나 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides* ATCC 33313를 포함하여 실험한 표준 균주의 어느 것도 같은 유형의 비타민 요구성을 보이지 않아 깍두기에서 분리된 균주들이 *Leuconostoc*속 표준 균주들과 생리적 특성에서 차이를 보였다.

Table 2. Amino acid requirement of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides* strains isolated from *Kakdugi* fermented at 15°C

isolates	total number	No. of Amino Acid Requiring Strains												
		His	Cys	Val	Leu	Trp	Phe	Tyr	Pro	Arg	Met	Thr	Lys	Ileu
after 8 days	13	+	V	+	+	+	+	V	V	+	+	+	V	V
after 40 days	11	+	V	+	+	V	+	V	V	V	V	V	V	+
Type cultures														
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>paramesenteroides</i> ATCC 33313		+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254		-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> ATCC 19255		+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
<i>L. pseudomesenteroides</i> ATCC 49371		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. amelibiosum</i> ATCC 13146		+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+
<i>L. carnosum</i> ATCC 49367		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. citreum</i> ATCC 49370		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. lactis</i> ATCC 19256		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

L.: *Leuconostoc*, +; over 85% strains required, V; 15~85% strains required, +; required, -; not required.

Table 3. Vitamin requirement of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides* strains isolated from *Kakdugi* fermented at 15°C

Isolates	Vitamins		thiamine	riboflavin	pyridoxal	pantothenate	p-amino benzoate	folate	biotin	niacin
	total									
after 8 days	13		+	+	-	+	-	+	V	+
after 40 days	11		+	+	-	+	-	+	V	+
Type cultures										
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>paramesenteroides</i> ATCC 33313			+	-	-	+	-	+	-	+
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293			-	+	-	+	-	+	-	+
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> ATCC 19254			-	+	-	+	-	+	+	+
<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> ATCC 19255			+	+	-	+	-	-	-	+
<i>L. pseudomesenteroides</i> ATCC 49371			+	+	-	+	+	+	-	+
<i>L. amelibiosum</i> ATCC 13146			-	-	-	+	-	-	-	+
<i>L. carnosum</i> ATCC 49367			+	+	-	+	-	-	+	+
<i>L. citreum</i> ATCC 49370			-	-	-	+	-	-	-	+
<i>L. lactis</i> ATCC 19256			-	+	-	+	-	-	-	+

L.: *Leuconostoc*, +; over 85% strains required, V; 15~85% strains required, +; required, -; not required.

요 약

각두기 숙성 중에는 초기와 후기에 산 생성이 활발하고 그 사이에 비교적 신도의 변화가 없는 시기가 관찰되었다. 세균들은 담금 직후에는 *Enterobacter*가 90%이상 차지하고 있었으며 적숙기인 숙성 8일 후에는 *Lactobacillus* 종류가 53%, *Leuconostoc* 종류가 43% 그리고 과숙기인 숙성 40일 후에는 *Lactobacillus* 종류

가 63%, *Leuconostoc* 종류가 37%로서 중요한 종류로 분리되었다. 젖산 구균의 대부분은 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *paramesenteroides*로서 적숙기에 분리된 균주들은 과숙기에 분리된 균주들에 비하여 요구하는 아미노산이 다소 증가되었으나 비타민 요구성에서는 차이가 없었다. 이들은 이와같은 생리특성에서 시험한 9종의 *Leuconostoc*속 표준균주와는 다른 성질을 보이고 있었다.

감사의 글

본 논문은 1997년도 한국학술진흥재단의 학술연구 조성비(신진 인력 장려금)의 지원에 의하여 연구되었으며 지원에 감사드립니다.

문헌

1. Cheigh, H.S. and Park, K.Y.: Biochemical, microbiological, and nutritional aspect of *Kimchi*. *Critical reviews in Food Sci. and Nut.*, **34**, 175-203 (1994)
2. Mheen, T.I. and Kwon, T.W.: Effect of temperature and salt concentration on *Kimchi* fermentation (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**, 443-450 (1984)
3. Lee, C.W., Ko, C.Y. and Ha, D.M.: Microfloral changes of the lactic acid bacteria during *Kimchi* fermentation and identification of the isolates (in Korean). *Kor. J. appl. Microbiol. Biotechnol.*, **20**, 102-109 (1992)
4. So, M.H. and Kim, Y.B.: Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 495-505 (1995)
5. So, M.H. and Kim, Y.B.: Cultural characteristics of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**, 506-515 (1995)
6. Garvie, E.I.: Genus *Leuconostoc*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, P.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Ed.), William and Wilkins, Baltimore, U.S.A., **2**, 1071-1075 (1986)
7. Difco Laboratories: Difco Manual, Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology. 10th ed., Detroit, U.S.A., p.1115-1120 (1994)
8. So, M.H.: Characterization of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Ph. D. Thesis*, Korea Univ., Seoul, Korea (1993)
9. Kang, K.H.: The change in classification of lactic acid bacteria and their new names (in Korean). *Bioindustry News*, **9**(3), 41-50 (1996)
10. Chung, C.H., Kim, Y.S., Yoo Y.J. and Kyung K.H.: Presence and control of coliform bacteria in *Kimchi* (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 999-1005 (1997)

(1998년 2월 12일 접수)