

*Leuconostoc paramesenteroides*의 내산성 변이주로의 개량과 starter로의 첨가효과

김영찬 · 정은영 · 김은혜 · 정대현 · 이옥숙 · 권태종 · 강상모*
건국대학교 미생물공학과

Strain Improvement of *Leuconostoc paramesenteroides* as a Acid-Resistant Mutant and Effect on *Kimchi* Fermentation as a Starter. Kim, Young-Chan, Eun-Yung Jung, Eun-Hae Kim, Dai-Hyun Jung, Ock-Sook Yi, Tae-Jong Kwon, and Sang-Mo Kang*. Department of Microbiological Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea - The *Leuconostoc paramesenteroides* dominated at refrigeration temperature range was isolated from *kimchi*, and improved its growth properties by mutation for competitive growth against *Lactobacillus plantarum* at lower pH. It was found that the minimal pH for the wild type *Leuconostoc paramesenteroides* Pw growth was pH 4.5 adjusted with HCl and pH 5.0 adjusted with organic-mixture (lactic acid:acetic acid=1:2), respectively. The mutant P-100 could grow in pH 4.0, 4.5, respectively, in MRS broth. Two strains Pw and P-100 were added into *kimchi* as starter and compared the quality characteristics of *kimchi*. The total acceptability of Pw and P-100 inoculated *kimchi* were evaluated better than that of control *kimchi* (no starter added) by sensory test and extended the optimal pH range of *kimchi* up to about 2.2, 2.5 times, respectively. In *kimchi* added P-100, the succinic acid was more abundant than others and the total number of *Lactobacillus plantarum* was down about 2.5 times in contrast to control *kimchi*.

Key words: *Leuconostoc paramesenteroides*, *Kimchi*, mutation, starter, fermentation

김치 미생물의 균분포에 영향을 주는 인자로는 발효 온도, 유기산의 조성, 산소, 탄산 가스의 농도, 영양분 조성의 변화 등이 있으나, 특히 발효 온도는 미생물 세포막의 조성, 증식 속도, 형태, 영양원 이용성, 대사산물의 양과 종류에 큰 영향을 미치고, 김치에 있어서는 미생물 속과 균종의 분포를 결정하는 가장 중요한 인자가 된다[6]. So와 Kim[24, 25]은 저온에서 발효시킨 김치가 여름철에 숙성 발효시킨 김치보다 관능적으로 우수하고 풍미성분의 생성량이 많다고 하였다. 또한 Park 등[18]은 온도를 달리한 김치 발효에서의 종의 분포와 빈도를 조사한 바, *Leu. mesenteroides* 3종과, *Leu. paramesenteroides*가 온도가 낮을수록 출현 빈도가 증가하여 5°C 발효에서 그 빈도가 57.9%로 저온에서는 *Leuconostoc* 속에 의해 김치가 숙성됨을 보고하였다. 특히 *Leu. paramesenteroides*는 25°C에서는 0.7%, 15°C는 1.6%이며, 5°C에서는 20.4%로 나타나, 저온발효인 5-7°C에서의 빈도가 특이적으로 증가한다고 하였다[8].

따라서 저온발효시킨 김치가 보다 관능적으로 우수한 이유는 풍미향상에 좋은 역할을 하는 *Leu. mesenteroides*와 함께 *Leu. paramesenteroides*가 우세 미생물로 작용하여 각종 유기산을 생산하고, 생성된 탄산가스가 저온으

로 인해 용존농도가 높아져 김치에 청량감을 부여하기 때문인 것으로 생각된다.

그러나 Bergey's manuals에 의하면[22], *Leuconostoc* 속은 pH 4.5 이하에서 증식이 크게 제한된다고 알려져 있다. 따라서 *Leuconostoc* 속은 5-25°C시 김치 발효중 비교적 초기에 많이 나타나고 빨리 감소하므로 김치에 풍미를 부여하는 기간이 짧게 제한된다고 하겠다.

*Leu. paramesenteroides*는 저온성 젖산균으로 생화학적 특성은 *Leu. mesenteroides*와 유사하나 최적 증식 온도는 상이한데, 5°C이하의 냉장온도에서 비교적 왕성하게 증식할 수 있어, *Leu. mesenteroides*와는 차이가 있다.

최근에 가정에서나 산업적으로 생산되는 김치가 가식 기간 연장 및 맛의 유지[2, 3, 20]를 위하여 냉장보관 또는 냉장유통을 하고 있다는 점에서 저온 김치 발효 균주에 대한 집중적인 연구가 필요하다고 생각된다. 또한 저온발효 김치가 갖는 뛰어난 맛을 중저온 발효에 응용할 때 김치의 관능성 향상에도 기여할 수 있으며, 연중 겨울 김장김치 맛을 내는 김치를 제조할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나, 김치 발효에 저온성 젖산균인 *Leuconostoc paramesenteroides*를 starter로 첨가하여, 그 이용성을 연구한 보고는 없다.

본 연구실에서는 이전에 *Leuconostoc mesenteroides*를 내산성 변이균주로 개량한 후 김치에 starter로 첨가한 결

*Corresponding author
Tel. 82-2-450-3524, Fax. 82-2-450-3517

과, 김치의 산패지연과 관능성 향상에 좋은 효과가 있음을 보고하였다[13]. 따라서 본 실험에서는 김치의 저온발효에 관여되는 대표적인 젖산균종인 *Leu. paramesenteroides*를 김치로부터 분리하여 균주의 특성을 조사하였으며, 이 균은 산에 대한 내성이 *Lac. plantarum*보다 약해 김치발효 말기까지 지속적으로 관여할 수 없으므로 내산성 변이균주 P-100을 만들고, starter로 첨가하여 본 변이균주 P-100이 김치발효말기까지 주도적으로 관여하여 기호도 증대 및 김치 가식기간이 연장되는 것을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리, 변이처리 및 배양

5℃ 김치 발효에서 관여하는 균주중 약 65%가 *Leu. paramesenteroides*이므로[23], 김치를 5℃에서 발효시키면서, 산패기 이전인 20일 이내에 김치시료로부터 김치즙을 회석하여 sucrose 대신 glucose를 탄소원으로 첨가하여 dextran이 생성되지 않는 PES배지(trypticase peptone 5.0, yeast extract 0.5, glucose 20, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ K_2HPO_4 , phenylethyl alcohol 2.5, agar 15 g/1 L pH 6.8)에 도말하고 5℃에서 배양하였다. Plate에 나타나는 colony를 단일 분리하고, 이를 계대배양하면서 세 종의 후보 균주를 순수분리하였다. 세 종의 후보 균주들 중 김치 첨가 예비 실험을 통해 가장 풍미가 우수한 균종을 얻어, 전보[13]에서와 같은 방법으로 변이 처리하여 내산성 변이균주 P-100을 획득하였다.

분리된 야생 균주 Pw는 pH 6.2 MRS 배지에, 변이균주 P-100은 pH를 4.5로 조정된 MRS 배지에 일정 간격으로 계대하며 실험하였으며, 김치 starter로 사용할 때에는 MRS 배지에, 본 실험의 김치 숙성 및 저장온도인 10℃에서 대수기까지 배양하고 원심분리한 후, 세척 및 회석하여 균체수가 10^8 cell/mL되도록 조정된 후, 예비실험 결과 가장 관능이 우수한 첨가농도인 김치 무게의 0.5 w/w%(wet weight)를 첨가하였다.

균주의 생리 화학적 특성과 동정

분리된 균주는 Bergey's manual of systematic bacteriology[22] 및 기타 동정법[11, 17]에 따라 동정하였다.

내산성 변이균주 P-100의 배양 특성

MRS broth를 HCl 그리고 젖산과 아세트산을 1:2의 비율로 혼합한 용액(이하 유기산 혼합용액)으로 각각 pH 3.5, 3.8, 4.0, 4.5가 되도록 조정된 후 *Leu. paramesenteroides* 야생균주 Pw와 내산성 변이균주 P-100을 접종하여 10℃, 20℃ 30℃ 온도별로 배양한 후 경시 간격으로 배양액의 pH 및 spectrophotometer를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로 증식정도를 측정하였다.

시료 김치의 제조

시료 김치의 제조는 전보[13]에서 행한 방법으로 제조하였으며, 변이균주 P-100은 김치무게에 대하여, 각각 0.5 w/w%(wet weight) 첨가하였다. 비닐봉지에 담은 김치는 현행 식품위생법상 냉장 상한 온도인 10℃에서 발효시키면서 시료로 사용하였다.

변이균주 P-100을 starter로 첨가한 김치의 주요 발효 특성 측정

pH, 총산도 및 환원당의 측정 보관된 김치시료를 마쇄 및 균질화시켜 거즈로 여과하고, 원심분리한 후 그 상등액을 시료로 사용하였다. pH는 pH meter(M-8S, Horiba CO.)로 측정하였으며, 산도는 A.O.A.C 방법[1]에 의하여 김치액을 중화시키는데 소요되는 0.05 N NaOH의 용량(mL)을 젖산의 함량으로 표시하였다. 김치액의 환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 비색방법[7]으로 측정하였다.

유기산 분석 김치 시료 50 g을 250 mL 비이커에 취한 후, 증류수 80 mL를 넣고 균질화시켰다. 새로운 비이커에 증류수 80 mL를 담고, homogenizer에 잔류된 시료를 세척하여 위의 시료액과 혼합하였다(2회반복). 본 시료액을 약 20분간 음파 파쇄한 후 메스실린더로 총액량을 측정하였다. 이 액을 10 mL 취한 후 원심분리하여 membrane filter(0.45 μm)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 분석은 HP 1050으로 수행하였으며, column은 Bio AMINEX HPX-87H column, 용매는 H_2SO_4 pH 2.4, 기록지 속도 chart speed는 0.6 mL/min, 그리고 column oven temperature는 50℃로 하였다. HPLC 분석에 사용된 표준 물질로는 젖산, 구연산, 타르타르산, 말산, 숙신산, 푸마르산, 그리고 아세트산 등이었다.

관능검사 관능검사는 전보[13]에서 행한 방법으로 하였으며, 결과의 통계처리는 statistical analysis (SAS) [19]에 의한 평균간의 유의적 검정을 하였으며, 유의성 검정은 다중비교 분석법으로 하였다.

총 균수와 젖산균 및 효모의 계수 김치 중의 젖산균을 각 속별로 계수하기 위하여 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속은 0.1% bromophenol blue(1 mL/MRS agar 배지 100 mL)를 첨가한 MRS 배지를 사용하여, 30℃, 2-3일간 배양한 후, 균락의 색이 전체적으로 담청색, 혹은 중앙에 암청색환이 있거나, 전체적으로 흰색이면 *Lactobacillus* 속으로, 전체적으로 암청색이면 *Leuconostoc* 속으로 계수하였다[9]. *Streptococcus* 속과 *Pediococcus* 속은 M-Enterococcus agar(Difco)배지를 사용하여 37에서 4일간 배양 후에 붉은색을 나타내는 균락은 *Streptococcus* 속으로, 흰색은 *Pediococcus* 속으로 계수하였다. 총균수는 pouring culture method로 plate count agar (Difco)에 접종하여 30℃, 3일간 배양하여 colony coun-

ter로 계수하였다[16].

효모는 Potato dextrose agar(Difco)에 10% 타르타르 산을 첨가하여 pH 3.5±0.1로 조정하여 30℃, 3일간 배양한 후 나타난 균락을 계수하였다[5].

결과 및 고찰

야생균주 Pw와 변이균주 P-100의 생리화학적 특성 및 동정

Leu. paramesenteroides 야생균주 Pw와 변이균주 P-100의 생리 화학적 특성을 Table 1에 나타내었다. 야생균주 Pw의 경우 생리적인 특성이 Bergey's manuals에 나타나 있는 *Leu. paramesenteroides*의 특성과 거의 일치 하였으므로 *Leu. paramesenteroides*로 동정하였다. 변이균주 P-100의 경우, 그것의 생리 화학적 특성을 야생균주 Pw와 비교하여 보면 6.5% salt tolerance, esculin 자화성과 항생물질 내성 등의 생리적 특성이 변화되었음을 확인할 수 있었다.

Table 1. Physiological characteristics of the *Leuconostoc paramesenteroides* Pw and P-100

Characteristics	Strain		
	Pw	P-100	KCCM40114
Agar colony	Small, white	Small, white	Small, white
Gram's staining	+	+	+
Size(μm)	1.0-1.2	1.0-1.2	1.0-1.2
Spore formation	-	-	-
Gas from glucose	+	+	+
Motility	-	-	-
Catalase	-	-	-
Opt. temp.(°C)	25	25	25
Salt tolerance(NaCl 6.5%)	-	(+)	-
Gelatin liquification	-	-	-
Litmus milk	-	-	-
Sucrose broth	Turbid, gelatinous	Turbid, gelatinous	Turbid, gelatinous
Dextran formation	-	-	-
Hydrolysis of Esculin	-	「+」	-
Arginine	-	-	*+
Urea	-	-	-
Growth in Peptone base	+	+	+
Bacitracin	-	+	-
Optochin	-	+	-
Growth at initial pH 6.8	+	+	+
Acid from glucose	+	+	+
trehalose	(-)	+	+
pyruvate	-	-	-
pullulan	-	-	-
xylose	+	-	*-
arabinose	+	+	*-
mellibiose	(-)	(-)	(-)
sucrose	+	+	-
lactose	-	-	*+
sorbitol	-	-	-
raffinose	-	-	-
melezitose	-	-	*+
salicin	-	-	-
mannitol	-	-	*+
inulin	-	-	-
cellobiose	-	「+」	-
ribose	(+)	-	-
catalase	-	-	-

(-): Not accorded with Bergey's manual. *Not accorded with other organism. 「」: Unreliable result.

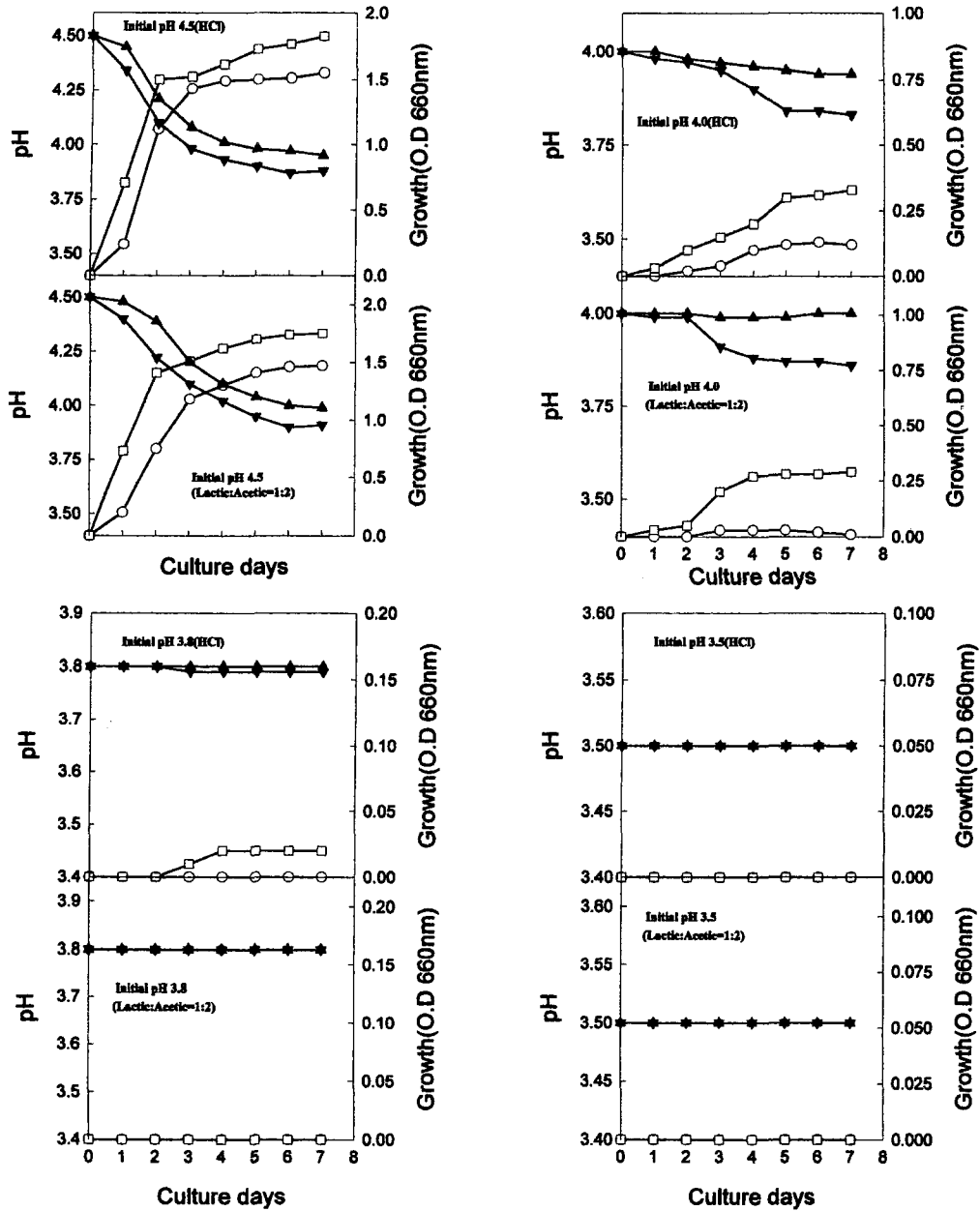


Fig. 1. Cell growth of Pw and P-100 in MRS broth adjusted with HCl and acid mixture (lactic acid: acetic acid=1 : 2) at 30 °C. Symbols: ▲, pH of the Pw; ▼, pH of the P-100; ○, O.D of the Pw; □, O.D of the P-100.

Conlondre 등[4]에 의하면 MNNG는 알킬화제로서 변이균주의 90% 이상이 GC → AT 전이(transition)가 발생된다고 보고하였으며, Singer[21]는 DNA복제시에 DNA polymerase의 작용 기구에 변화를 준다고 보고하였는데, 본 실험의 변이균주도 세포막 구조의 변화와 DNA변이로 인해 일부 특성이 변환된 것으로 사료된다.

Leu. paramesenteroides 균주의 생육 특성
pH와 온도에 따른 증식도 MRS broth를 이용하여 야

생균주 Pw와 내산성 변이균주 P-100의 생육 특성을 pH별, 온도별, HCl 및 젖산과 초산을 1:2 비율로 혼합한 유기산 별로 실험한 결과는 Fig. 1~3과 같다.

*Leu. paramesenteroides*는 일반 젖산균의 최적 증식 온도인 34°C에 비해 저온성이며, 최적 증식 온도가 25°C이지만, 10°C이하의 냉장온도에서 비교적 왕성하게 증식할 수 있다고 하였다[6]. 본 실험에서는 야생균주 Pw의 경우, 10°C, 20°C, 30°C 모두 HCl과 유기산 혼합용액으로 각각 조절했을 때, pH 4.0 이상에서부터 증식을 보였으며, 온도별로 큰 차이는 볼 수 없었다. 그리고, HCl은

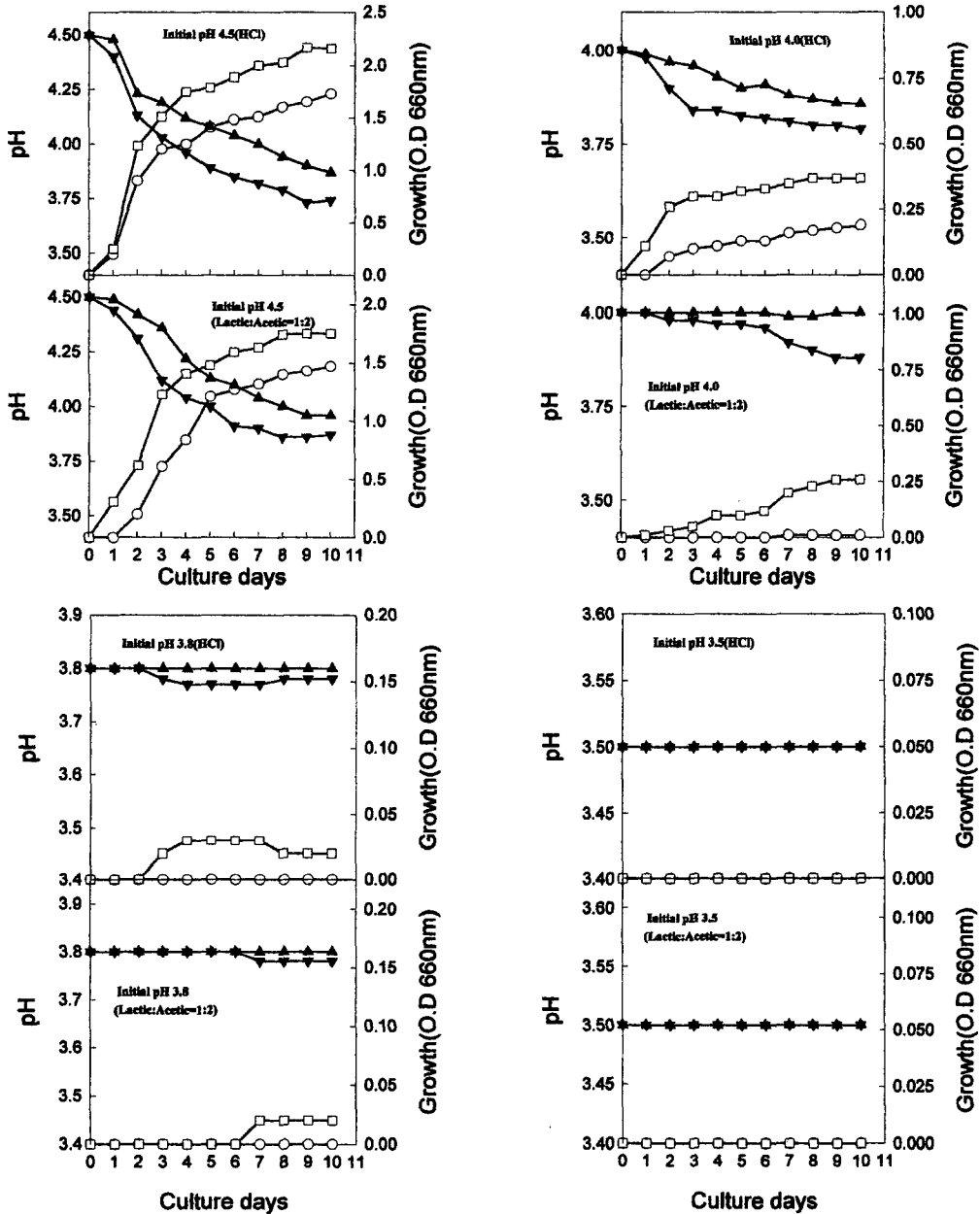


Fig. 2. Cell growth of Pw and P-100 in MRS broth adjusted with HCl and acid mixture (lactic acid: acetic acid=1 : 2) at 20 °C. Symbols: ▲, pH of the Pw; ▼, pH of the P-100; ○, O.D. of the Pw; □, O.D. of the P-100.

pH 4.5 이상부터, 유기산 혼합용액의 경우는 pH 5.0 이상에서부터 왕성한 증식을 보였다. 변이균주 P-100의 경우 온도 별로 차이를 보였는데, HCl로 조절했을 때 30℃, 20℃에서는 pH 3.8에서 낮은 증식 양상을 보이다가, pH 4.0 이상부터 비교적 높은 증식을, pH 4.5부터 활발한 증식을 보였다. pH 3.5의 경우 30℃, 20℃에서는 증식이 보이지 않았으나, 10℃에서는 배양 기간을 28일까지 연장한 결과 배양 21일째부터 증식을 나타내었다. 유기산 혼합용액으로 조절한 경우는 10℃, 20℃, 30℃ 모두 pH 4.0 이상부터 증식을 보였다.

변이균주 P-100이 야생균주 Pw에 비해 10℃에서 증식이 높은 것은, 변이처리한 후 10℃에서 계대 배양하면서 안정화시켰으므로, 저온에서 증식이 가능하였던 것으로 생각된다. 배지를 HCl로 조절한 경우보다 유기산 혼합용액으로 조절한 경우 균주의 증식 속도가 낮았다. 이것은 HCl에 비하여 젖산의 해리도(1.38×10^{-4})와 초산의 해리도(1.8×10^{-5})가 낮아 같은 pH를 나타내기 위하여 더 많은 젖산, 초산이 배지에 첨가되게 되며, 이 유기산들이 세포내 들어가 해리하므로 균의 생육이 어렵게 되기 때문으로 생각된다.

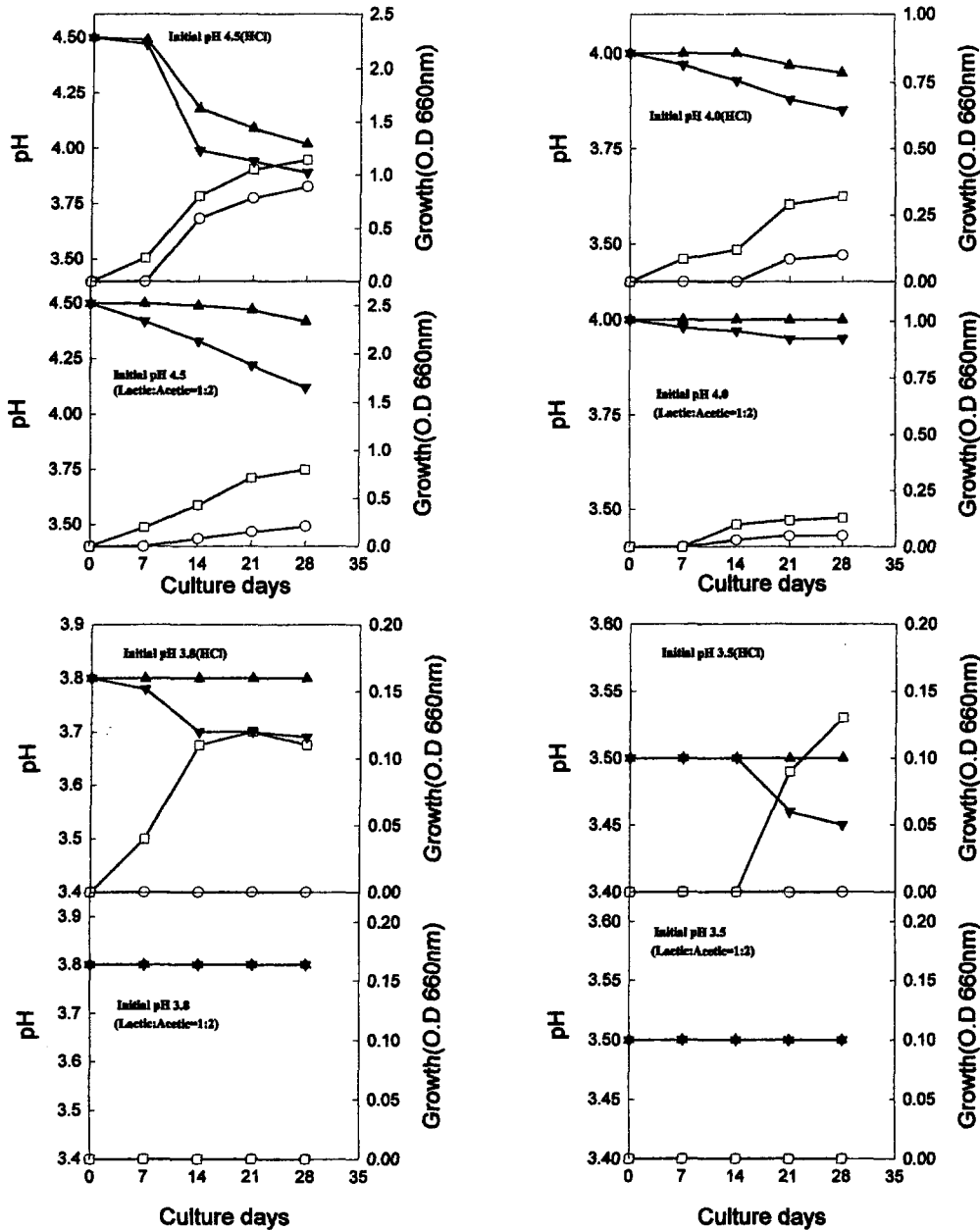


Fig. 3. Cell growth of Pw and P-100 in MRS broth adjusted with HCl and acid mixture (lactic acid: acetic acid=1:2) at 10 °C. Symbols: ▲, pH of the Pw; ▼, pH of the P-100; ○, O.D. of the Pw; □, O.D. of the P-100.

변이균주 P-100을 starter로 첨가한 김치의 주요 발효 특성

pH 및 총산도의 변화 내산성으로 개량한 변이균주 P-100과 야생균주 Pw를 starter로 김치에 접종하여 10 °C에서 저장발효시키면서, pH 및 총산도의 변화를 본 결과는 Fig. 4와 같다. 야생균주 Pw와 변이균주 P-100 첨가균은 초기 pH가 5.5에서 숙성 28일째에는 각각 pH 4.2, 3.8로 감소하였다. 또한, 무첨가균은 숙성 17일째부터, 야생균주 Pw 첨가균은 숙성 24일째 이후부터 pH 상승을 보였다. 지금까지의 관능 평가 경험상 김치 발효중

pH의 하강 후 증가하는 김치의 맛이 변하는 것을 느낄 수 있었으며, 품질이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 이렇게 볼 때 pH의 하강 후 상승시부터 연부효모에 의한 군덕내가 나기 시작하는 것으로 생각된다.

따라서 무첨가균과 야생균주 Pw 첨가균은 발효 기간 28일 이내에 pH가 상승하였으므로, 군덕내의 발생이 빨리 시작되었다고 볼 수 있고, 변이균주 P-100 첨가균은 숙성 28일까지 계속 감소하여 군덕내의 발생시기를 지연시킬 수 있었다고 하겠다.

10°C에서 총산도의 변화를 보면, 모든 첨가균에서 초

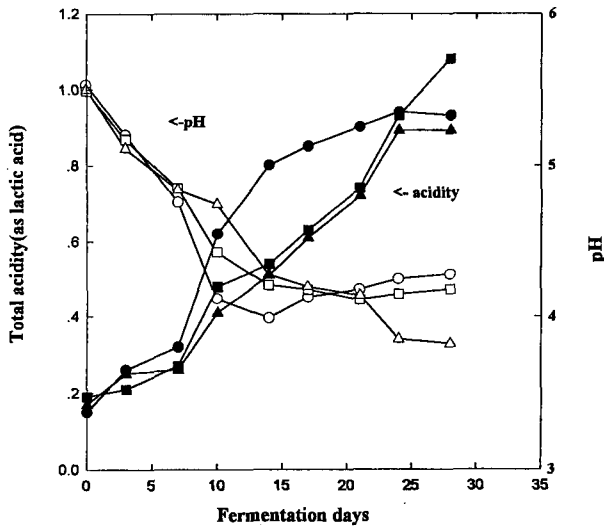


Fig. 4. Changes in pH and total acidity during *Kimchi* fermentation at 10°C.

Symbols: —○—, pH of the control *kimchi*;

—□—, pH of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* Pw;

—△—, pH of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* P-100;

—●—, acidity of the control *kimchi*;

—■—, acidity of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* Pw;

—▲—, acidity of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* P-100.

기에는 0.17-0.19% 정도로 거의 비슷하였으며, 무첨가군은 숙성 10일에 산도가 0.80%로 급격히 증가하다가 발효 말기까지 완만한 속도로 증가하였다. 반면에 야생균주 Pw와 변이균주 P-100 첨가군은 전숙성기간을 통해 무첨가군보다 훨씬 낮은 산생성을 나타내었으며, 숙성 21일 이후부터 급격히 증가하였다.

Ku 등[15]은 김치 적숙기를 pH 4.2-4.4일 때라고 하였으며, Hong 등[12]은 김치의 상미한계점에서 젖산의 함량을 0.75%라고 보고하였다. 이러한 보고들을 바탕으로, 김치의 적숙기간을 산도가 0.4-0.75%일 때로 본다면 무첨가군의 경우는 김치숙성 7.5-13일째의 4.5일간이었으나, 야생균주 Pw 첨가군은 8.5-20일까지 11.5일간, 변이균주 P-100 첨가군은 9.5-21.5일까지 12일간으로 나타났다. 따라서 무첨가군에 비해 야생균주 Pw 첨가군은 2.25배, 변이균주 P-100 첨가군은 2.67배 정도의 산패 지연 효과를 나타내었다. 그리고 무첨가군은 숙성 17일째부터, 야생균주 Pw 첨가군은 숙성 24일째부터 pH 상승을 보였으나 변이균주 P-100 첨가군은 실험 28일째까지 pH 상승이 일어나지 않았으며, 발효 말기까지 가장 좋은 관능을 나타내며, 발효 말기로 갈수록 Pw와의 차이를 보였다(Table 3).

환원당 김치숙성기간 동안 환원당 함량의 변화를 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. 초기 당함량은 무첨가군과 야생균주 Pw 첨가군이 20.8 mg/mL, 변이균주 P-100 첨가군은 21.9 mg/mL이었으며, 모든 첨가군에서 숙성 3일

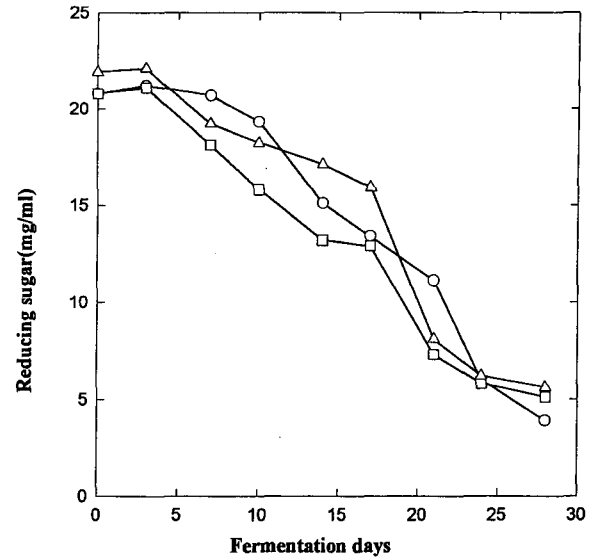


Fig. 5. Changes of reducing sugar during *Kimchi* fermentation at 10°C.

Symbols: —○—, reducing sugar of the control *kimchi*;

—□—, reducing sugar of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* Pw;

—△—, reducing sugar of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* P-100.

째 일시적으로 증가하다가 점차적으로 감소하여 숙성 28일째에는 무첨가군이 3.9 mg/mL로 크게 감소하였고, 야생균주 Pw 및 변이균주 P-100 첨가군은 각각 5.1 mg/mL, 5.6 mg/mL로 무첨가군보다 덜 감소하였다. 무첨가군의 환원당의 감소가 발효초기에 완만한 반면, 야생균주 Pw 및 변이균주 P-100 첨가군은 발효초기부터 급격하게 감소하였는데, 이는 야생균주 Pw나 변이균주 P-100의 첨가로 전체 microflora에서의 균체량이 늘어났기 때문에 초기 환원당의 감소량이 무첨가군에 비해 높게 나타났으며, 발효 중기 이후부터는 야생균주 Pw와 변이균주 P-100 첨가군이 환원당의 소모가 적었으나, 큰 특징은 발견할 수 없었다.

유기산 10°C에서 발효시킨 김치의 유기산의 경시적인 변화는 Table 2와 같으며, 분리된 유기산은 젖산, 구연산, 말산, 숙신산, 푸마르산, 및 아세트산 등이며, 발효 전체기간중 젖산, 아세트산, 숙신산 순으로 함량이 많았으며, 풍미와 관련이 있는 숙신산의 경우 변이균주 P-100 첨가군에서 가장 많은 함량을 보였다. 특히 무첨가군에 비해 첨가군에서 아세트산의 함량이 많았는데, Chyun 등[3]과 Kim 등[14]에 의하면 저온에서 숙성시킨 김치가 실온에서 숙성시킨 김치보다 휘발성 유기산인 아세트산의 함량과 탄산 가스의 생성량이 많고 이러한 김치가 더욱 맛이 있다고 보고하였다. 본 실험에서도 야생균주 Pw 및 변이균주 P-100 첨가군이 무첨가군에 비해 아세트산 함량이 많았는데, 이는 이상발효젖산균인

Table 2. Changes of organic acid during Kimchi fermentation at 10 °C for 28days

Day	Sample	Organic acids (% w/v)						
		Citric acid	Tartaric acid	Malic acid	Lactic acid	Succinic acid	Fumaric acid	Acetic acid
0		0.116	N.D	0.260	0.116	0.019	0.00082	0.229
7	I	0.030	N.D	0.037	0.290	0.124	0.00096	0.207
	II	0.040	N.D	0.025	0.285	0.110	0.00100	0.250
	III	0.042	N.D	0.028	0.288	0.115	0.00107	0.253
14	I	0.028	N.D	0.021	0.415	0.227	0.00085	0.294
	II	0.045	N.D	0.021	0.354	0.211	0.00077	0.322
	III	0.048	N.D	0.020	0.354	0.211	0.00077	0.350
21	I	0.020	N.D	0.024	0.412	0.185	0.00085	0.362
	II	0.018	N.D	0.017	0.376	0.197	0.00036	0.386
	III	0.017	N.D	0.017	0.376	0.197	0.00036	0.386
28	I	0.018	N.D	0.023	0.402	0.097	N.D	0.387
	II	0.015	N.D	0.015	0.371	0.108	N.D	0.390
	III	0.013	N.D	0.013	0.372	0.188	N.D	0.390

N.D: Not Detected, I: Control kimchi, II: kimchi added *Leu. paramesenteroides* Pw, III: kimchi added *Leu. paramesenteroides* P-100.

Table 3. Sensory evaluation of various Kimchi samples during fermentation at 10 °C

Day	Flavor			Sourness			Texture			Total acceptability		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
0	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	4.50	5.00	5.00	5.00	4.50	4.50	4.50
3	4.00	3.90	3.95	3.90	3.90	3.90	4.50	4.50	4.50	4.20	4.00	4.00
7	4.23	3.85	3.85	4.28	3.80	3.90	4.20	4.50	4.50	4.24	4.00	4.00
10	4.00	3.95	3.90	4.20	3.90	3.90	4.10	4.10	4.10	4.12	3.92	3.95
14	3.95	3.85	3.90	4.00	3.80	3.85	3.95	4.00	4.05	3.80	3.95	3.95
17	3.40	3.90	3.90	3.24	4.00	4.15	3.12	3.10	3.10	3.30	3.80	3.85
21	2.95	4.00	4.05	2.55	4.20	4.23	3.00	3.00	3.00	2.83	4.00	4.00
24	2.50	2.70	2.70	2.45	2.60	2.60	2.75	2.80	2.80	2.75	2.80	2.85
28	2.00	2.50	2.50	2.15	2.43	2.45	2.40	2.50	2.60	2.33	2.50	2.55
Mean	3.50	3.68	3.69	3.47	3.68	3.72	3.67	3.72	3.74	3.56	3.71	3.74
±S.D	±0.85	±0.65	±0.65	±0.89	±0.70	±0.71	±0.88	±0.89	±0.87	±0.78	±0.64	±0.62
	a*	b	b	a*	b	b				a*	b	b

*:Means with the same superscripts in a row are not significantly different ($P < 0.05$). Roman numerals were the same as in Table 2.

Leuconostoc 속의 첨가에 기인된 것으로 생각된다. 젖산은 모든 실험군에서 발효가 진행될수록 계속 증가하였으며, 무첨가군은 숙성 14일째 가장 많은 함량을 보인 반면, starter 첨가군에서는 숙성 21일째에 가장 많은 함량을 보였다. 이러한 결과는 Fig. 6에서 *Leuconostoc* 속의 균분포가 가장 높을 때였다. 말산과 구연산은 발효초기에 많은 함량을 나타내다가 발효가 진행될수록 감소하였으며, 무첨가군에 비해 더 낮은 함량을 보였다. 이것은 *Leu. paramesenteroides*의 변이균주 P-100이 발효말기까지 생육하여 citrate 대사에서 말산과 구연산을 이용하였기 때문인 것으로 사료된다.

일반적으로 김치는 숙성 말기의 연부현상 초기에는 pH가 상승하고, 중기부터는 젖산 함량이 감소하는 것으로 보고하였는데[10], 본 실험에서 무첨가군에서 숙성 말기에 젖산이 감소한 것은 숙성중기 이후 군데내가 발

생한 것과 일치한다고 볼 수 있다.

관능검사 야생균주 Pw와 변이균주 P-100을 김치에 starter로 첨가한 후 각 첨가군간의 관능 평가를 한 결과는 Table 3과 같다. 배추조직을 씹을 때의 관능적인 성질인 texture는 모든 첨가군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. Flavor의 경우 starter 첨가군 간에는 유의적인 차이가 없었으나, starter 첨가군과 무첨가군과는 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타냈다. 신맛은 숙성초기에는 거의 비슷한 점수를 보였으나, 변이균주 P-100 첨가군이 숙성 21일까지 높은 점수(4.23)를 보였고, 무첨가군과 첨가군 간에 평균점수에 있어서 $p < 0.05$ 수준의 유의적인 차이가 있었다.

전체적인 기호도의 경우, 숙성 초기에는 무첨가군이 첨가군에 비해 높은 점수를 얻었는데, 이것은 Fig. 6에 나타난 바와 같이 숙성 중기 이후부터 풍미에 관여하는

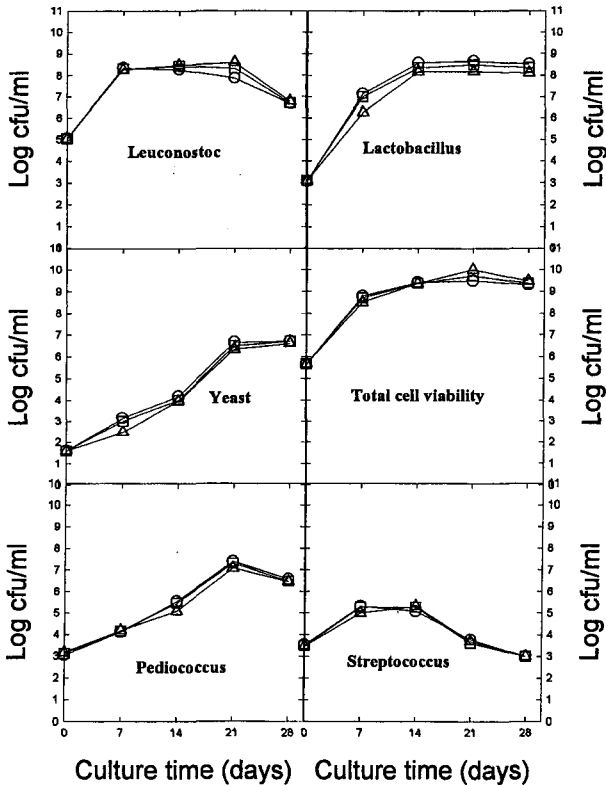


Fig. 6. Microfloral changes of lactic acid bacteria and yeast during *Kimchi* fermentation at 10 °C.

Symbols: —○—, cell number of the control *kimchi*;
 —□—, cell number of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* Pw;
 —△—, cell number of the *kimchi* added *Leu. paramesenteroides* P-100.

Leuconostoc 속의 수가 첨가균에서 높았으며, 특히 숙성 21일째 매우 높은 기호도 점수(4.0)를 얻었는데, 이는 청량감을 부여하는 CO₂와 풍미향상 물질인 숙신산 등을 생산하는 *Leuconostoc* 속의 분포도가 가장 높았기 때문으로 생각된다.

총 균수와 젖산균 및 효모의 계수 김치의 숙성 발효 기간중 주요 미생물 속의 경시적인 변화는 Fig. 6과 같다. 각 첨가균 간에 있어서 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, 및 *Pediococcus* 속은 숙성이 진행되는 동안 거의 일정한 균수로 증가하였다. *Leuconostoc* 속은 숙성 초기부터 급속히 증가하여 김치적숙기에 해당하는 기간인, 무첨가균은 숙성 7일째(2.2×10^8 cell/mL), 야생균주 Pw 첨가균은 숙성 14일째(2.7×10^8 cell/mL), 변이균주 P-100 첨가균은 숙성 21일째(4.01×10^8 cell/mL)에 최고 균수에 도달한 후 감소하였다. 김치 발효말기까지 주요 숙성균으로 알려진 *Lactobacillus* 속은 숙성 7일까지 급속히 증가하다가, 숙성 21일째 무첨가균은 4.6×10^8 cell/mL, 그 외 야생균주 Pw와 변이균주 P-100 첨가균들은 각각 3.2×10^8 cell/mL, 1.53×10^8 cell/mL로 최고 균수에 도달한 후, 숙성 말기에는 감소하였으며, 특히

변이균주 P-100 첨가균은 무첨가균에 비해 *Lactobacillus* 속의 분포가 약 2.5배 적게 나타나 숙성 말기 21일째 *Leuconostoc* 속의 생육이 *Lactobacillus* 속보다 더 우세하게 나타났다. *Streptococcus* 속의 경시적 변화는 *Leuconostoc* 속과 유사한 경향을 보였고, *Pediococcus* 속의 경시적인 변화는 변이균주 P-100 첨가균에서 낮은 분포를 보였다. 따라서 내산성 변이균주 P-100을 첨가함을 통해서 *Leuconostoc* 속 균수가 가장 높은 분포를 *Lactobacillus* 속은 가장 낮은 분포도를 나타내었다. 김치 젖산균의 분포도는 실험 방법 및 실험자에 따라 오차가 나타날 수 있으나, 본 결과들은 반복 실험에서도 같은 경향을 나타내었다. 따라서, *Lactobacillus* 속의 분포가 낮은 것은 *Leuconostoc* 속과의 경쟁적 생육관계에 있어서 내산성 P-100에 의한 생육저해가 유발된 것으로 생각할 수 있다.

효모수의 변화는 무첨가균, 야생균주 Pw 첨가균은 숙성 초기부터 완만히 증가한 반면 변이균주 P-100 첨가균은 초기부터 가장 낮은 균분포를 보였으며, 모두 숙성 21일까지 계속 증가한 후, 발효말기에 거의 일정한 수준을 유지하였다. 총 균수에서도 모든 균에서 숙성 7일째에 급격히 증가하다가 숙성이 진행되는 동안 거의 일정한 균수를 유지하였다.

요 약

김치로부터 *Leu. paramesenteroides*의 야생균주 Pw를 분리하여 내산성 변이균주 P-100으로 개량하였다. 야생균주 Pw는 HCl로 조정된 pH 4.0이상에서부터 증식하였으며, 유기산 혼합용액으로 조정된 pH 4.0에서는 증식하지 못하였다. 변이균주 P-100은 HCl로 조정된 pH 3.8 이상부터 증식하였으며, 유기산 혼합용액으로 조정된 pH 4.0에서부터 증식하였다.

내산성으로 개량한 변이균주 P-100과 야생균주 Pw를 starter로 김치에 첨가하여 10°C에서 발효시킨 결과를 보면, 무첨가균에 비해 야생균주 Pw 첨가균은 2.25배, 변이균주 P-100 첨가균은 2.67배 정도의 산패지연 효과를 나타내었다. 유기산 함량의 변화에서도 숙신산 및 아세트산 함량이 변이균주 P-100 첨가균과 야생균주 Pw 첨가균에서 무첨가균에 비해 상대적으로 높고, 젖산의 함량은 상대적으로 낮았다. 관능검사에 있어서 전체적인 기호도의 경우, 숙성 21일째 첨가균에서 무첨가균보다 매우 높은 기호도 점수(4.0)를 얻었다. 김치 발효 기간중 *Leuconostoc* 속 균수는 내산성 변이균주 P-100 첨가균, 야생균주 Pw 첨가균, 그리고 무첨가균의 순이었으며, *Lactobacillus* 속 균수는 이와 반대를 보여 *Lactobacillus* 속 균이 생육억제됨을 확인하였다.

이상 젖산 발효균으로서 산 생성 수율이 낮고 풍미 향

상에 기여할 수 있는 내산성 변이균주 *Leu. paramesenteroides* P-100을 starter로 첨가함으로써 발효말기까지 *Lac. plantarum*과 경쟁적으로 생육이 가능하여 김치 가식 기간의 연장과 함께 기호도가 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처의 선도기술개발과제 연구비 지원에 의하여 이루어진 내용의 일부로서 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. AOAC. 1995. Fruits and products acidity(titratable) of fruit products, p. 10. *Official Methods of Analysis*, 16th ed, AOAC International.
2. Bak, W. S., D. H. Shin, and M. S. Kim. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial *Kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 137-145.
3. Chyun, J. H. and H. S. Rhee. 1976. Studies on the volatile fatty acids and carbon dioxide produced in different *Kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **8**: 90-94.
4. Conlondre, C. and J. H. Miller. 1977. Genetic studies of the *lac* repressor. IV. Mutagenic specificity in the *lacI* gene of *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **117**: 577-606.
5. Difco Laboratories. 1984. p. 689. 10th ed. Detroit, Michigan.
6. Farrel, J. and A. H. Rose. 1987. Temperature effects on microorganism. *Annu. Rev. Microbiol.* **21**: 17-90.
7. Gail, L. M. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**: 426.
8. Han, H. U. 1995. Ecology of lactic acid bacteria in *Kimchi*. *The Microorganisms and Industry* **17**: 68-75.
9. Han, H. U. and H. K. Park. 1991. Differential counts of lactic acid bacteria genera on bromophenol blue medium. *Bulletin of the Institute for Basic Science*, Inha University. **12**: 89-94.
10. Han, H. U., C. R. Lim, and H. K. Park. 1990. Commensalism between *B. custersii* and *K. oxytoca* in *Kimchi* spoilage. *Bulletin of the Institute for Basic Science*, Inha University. **11**: 171-178.
11. Han, H. U., C. R. Lim, and H. K. Park. 1990. Determination of microbial community as an indicator of *Kimchi* Fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**: 26-32.
12. Hong, S. I., J. S. Park, and N. H. Park. 1995. Quality changes of commercial *Kimchi* products by different packaging methods. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 112-118.
13. Kang, S. M., W. S. Yang, and Y. C. Kim. 1995. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for *Kimchi* fermentation and effect of starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 461-471.
14. Kim, H. O. and H. S. Rhee. 1975. Studies on the non-volatile organic acids in *Kimchi* fermented at different temperatures. *Korean J. Food Sci. Technol.* **7**: 74-81.
15. Ku, K. H., K. O. Kang, and W. J. Kim. 1988. Some quality changes during fermentation of *Kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **20**: 476-482.
16. Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during *Kimchi* fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
17. MacFaddin, J. F. 1980. *Biochemical test for identification of medical bacteria*. 2th ed. Willams and Ilhins, London.
18. Park, H. K., C. R. Lim, and H. U. Han. 1990. Microbial succession in *Kimchi* fermentation at different temperatures. *Bulletin of the Institute for Basic Science*, Inha University. **11**: 161-169.
19. SAS. 1988. SAS User's Guide Statistics.
20. Sin, D. H. 1994. Physicochemical and microbial properties of market *Kimchi* during fermentation in different containers, pp. 82-136. Korean Society of Food Science and Technology, *Bulletin of 1st Symposium on Science of Kimchi*.
21. Singer, B. 1986. O-Alkyl pyrimidines in mutagenesis and carcinogenes occurrence and significance. *Cancer Res.* **46**: 4879-4885.
22. Sneath, P. H. A., H. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 988-1216. Vol. 2, Williams and Wilkins.
23. So, M. H. 1994. Characteristics of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*, pp. 62-81. Korean Society of Food Science and Technology, *Bulletin of 1st Symposium on Science of Kimchi*.
24. So, M. H. and Y. B. Kim. 1995. Cultural characteristics of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 506-515.
25. So, M. H. and Y. B. Kim. 1995. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 495-505.

(Received October 10, 1997)