

## 김치숙성에 관여하는 정상발효유산균과 이상발효유산균의 변화와 선택적 저해제에 관한 연구

이신호\* · 박나영 · 최우정  
대구효성가톨릭대학교 식품공학과

**Changes of the Lactic Acid Bacteria and Selective Inhibitory Substances against Homo and Hetero Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi.** Lee, Shin-Ho\*, Na-Young Park, and Woo-Jeong Choi. Department of Food Science and Technology, Catholic University of Taegu-Hyosung, Kyungbuk 713-702, Korea - This study was carried out to investigate distribution of homofermentative lactic acid bacteria(LAB) and heterofermentative LAB during kimchi fermentation period. The number of heterofermentative LAB was decreased during the fermentation. The ethanol extracts of *Lithospermum erythrorhizon* and *Sophrora flavescens* AITON showed strong antimicrobial activities against both homofermentative LAB and heterofermentative LAB. The extracts of *Glycyrrhiza uralensis* and *Curcuma longa* showed stronger antimicrobial activity against heterofermentative LAB than against homofermentative LAB. The antimicrobial activities of the plant extracts against LAB were accelerated by mixing of two or three kinds.

**Key words:** *Lithospermum erythrorhizon*, *Sophrora flavescens* AITON, *Glycyrrhiza uralensis*, *Curcuma longa*

김치의 발효 과정은 배추 외에 야채류나 양념들의 표면에 부착되어 있는 미생물의 상호작용에 의해 자연적으로 진행된다. 김치의 발효 과정 중 나타나는 미생물들은 호기성 세균과 혐기성 세균 및 효모가 주류를 이루고[5-8, 12] 발효 초기에는 호기성 및 혐기성 세균의 성장이 증가하고 발효가 진행됨에 따라 각종 유기산이 생성되어 pH가 감소하여 내산성 혐기성 세균이 증가하고 발효 말기에는 효모에 의한 작용으로 연부현상이 나타난다는 보고가 있다[13]. 김치의 발효를 주도하는 유산균은 그람양성, 통성 혐기성균으로 발효최종산물에 따라 정상발효유산균(homofermentative lactic acid bacteria(homo-LAB))과 이상발효유산균(heterofermentative lactic acid bacteria(hetero LAB))으로 대별된다. 김치의 발효 과정 중 유산균의 변화를 보면 발효 초기에는 *Leuconostoc*속이 우세하게 증식하여 초기의 산 생성을 유도하고 발효 후기에는 *Lactobacillus*속이 우세하게 증식하는 것으로 알려져 있다[12]. *Leuconostoc mesenteroides*는 이상발효유산균으로써 lactic acid, acetic acid와 CO<sub>2</sub> 같은 대사물을 생산하여 체소류를 산성화시키고 혐기적인 환경을 조성함으로써 호기성균의 생육을 억제하는 중요한 역할을 하고 숙성 말기에는 *Leu. mesenteroides*가 조성한 환경에 의해 내산성균인 *Lactobacillus plantarum*이 김치의 숙성에 밀접히 관여하는 것으로 알려져 있다[1]. 본 실험은 김치 숙성 초기에 우세균으로써 이상발효유산균의 성장을 억제하여 김치 저장기간을 연장하거나 또는 숙성말

기에 우세한 정상발효유산균의 성장을 저해하여 김치의 산패를 방지하고자 하는 취지에서 실행되었으며, 먼저 김치 숙성 중 김치의 pH, 산도의 변화와 pH에 따른 정상발효유산균과 이상발효유산균의 분포를 알아보고, 김치의 숙성을 조절하기 위해 정상발효유산균과 이상발효유산균에 대해 선택적인 항균활성을 갖는 천연물을 검색하고자 실시하였다.

### 재료 및 방법

#### 유산균의 분리

대구 근교 일반 가정에서 제조한 김치를 수집하여 0.02% sodium azide를 함유한 MRS agar를 사용하여 분리하였으며 분리한 균은 MRS agar slant에 접종하여 32°C에서 24시간 배양 후 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

#### 정상발효유산균과 이상발효유산균의 분리

Durham's tube를 넣은 MRS broth를 멸균한 후 분리 유산균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양시켜 가스생성 유무를 검사하여 이상발효유산균과 정상발효유산균을 구별하였다[2].

#### 김치의 제조

배추는 중량 2 kg내외의 것을 사용하였으며 배추를 4등분하여 10% 소금물 용액에 18시간 동안 침지시켜 흐르는 수돗물에서 3회 세척한 후 4°C에서 3시간 동안 물빼기를 하였다. 김치 담금은 이 등[9]의 방법에 따라 실시한 후 플라스틱 용기에 3.6 kg씩 담아 10°C에서 숙성시켰다.

\*Corresponding author  
Tel. 82-53-850-3271, Fax. 82-53-850-3217  
E-mail: leesh@cuth.cataegu.ac.kr

### 김치 숙성 중 pH 및 산도측정

1/4포기(300 g)의 김치에 멸균 증류수 100 ml를 넣은 후 homogenizer를 이용하여 마쇄, 여과한 후 pH는 pH meter (ion analyzer 150, Corning, USA)로 실온에서 측정하였고, 산도는 시료액에 증류수 10 ml를 가한 후 0.1N-NaOH로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 소비량을 lactic acid %로 환산하였다[15].

총산도(%)=

$$\frac{\text{ml of 0.1N-NaOH} \times 0.009 \times \text{factor of 0.1N-NaOH}}{\text{시료량}} \times 100$$

### 김치 숙성 중 총유산균수와 *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc*의 계수

시료는 숙성 중 5일 간격으로 무균적으로 채취한 후 0.1 % peptone 용액으로 적정 희석하여 사용하였다. 유산균수는 MRS agar, *Lactobacillus plantarum*(정상발효유산균)과 *Leuconostoc*(이상발효유산균)은 bromophenol blue(BPB)를 첨가하여 제조한 MRS-BPB agar에 각각 접종하여 37°C에서 2~3일 배양한 후 colony를 계측하였다. *Leuconostoc*은 전체적으로 암청색을 띤 colony, *Lactobacillus plantarum*은 원형의 집락 모양을 가지며 전체적으로 담청색을 띤 colony를 계측하였다[4, 11].

### 한약재 ethanol 추출물의 조제

이 등[10]의 방법에 따라 오미자(*Schizandra chinensis*), 고삼(*Sophora flavescens* AITON), 단삼(*Salvia miltiorrhiza*), 자초(*Lithospermum erythrorhizon*), 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 울금(*Curcuma longa*)과 같은 한약재와 95% ethanol을 1:9의 비율로 혼합하여 24시간 추출한 후 감압증발 농축기(Heidolph WB 2000, Germany)를 사용하여 1/9로 농축하여 이것을 추출원액으로 사용하였으며, membrane filter로 멸균 처리하여 사용하였다.

### 항균활성

**Table 1. Changes of ratio of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria during kimchi fermentation**

pH	No. of isolate LAB	I <sup>1)</sup>	II
Above 5.0	96	68 (71) <sup>2)</sup>	28 (29)
4.2 ~ 4.9	129	87 (67)	42 (33)
Below 4.1	172	169 (93)	12 (7)

<sup>1)</sup>I: Homofermentative lactic acid bacteria, II: Heterofermentative lactic acid bacteria. <sup>2)</sup> ratio of LAB(%).

한약재 ethanol 추출물의 항균효과는 각각 다른 시료의 김치에서 분리한 정상발효유산균 5균주, 이상발효유산균 5균주를 사용균주로 하여 paper disc method[15]로 저해환의 생성유무를 관찰하였으며 항균 활성도는 한약재 추출물 1%를 함유한 modified MRS broth에 분리유산균을 접종한 후 37°C에서 12시간 배양하면서 생균수의 변화를 대조구와 비교하여 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 김치의 숙성도에 따른 유산균의 분포

김치를 수집하여 10°C에서 숙성시키면서 pH별로 유산균을 분리하여 정상발효유산균과 이상발효유산균의 분포를 조사한 결과는 Table 1과 같다. pH 5.0이상에서는 정상발효유산균수가 전체 유산균수의 70.8%였고 pH 4.2~4.9일 때는 67.4%, pH 4.1이하에서는 93.0%로 숙성전반에 걸쳐 높은 수치를 나타내었다. 이상발효유산균수의 경우에는 pH 5.0이상에서 29.2%, pH 4.2~4.9에서는 32.6%, pH 4.1이하의 숙성말기에는 7.0%의 아주 낮은 경향을 보였다. 과숙 기인 pH 4.1이하의 김치에서는 정상발효유산균이 93%, 이상발효유산균은 7.0%의 분포를 나타내었다. 외국의 대표적인 침채류 발효식품인 sauerkraut 발효에 있어서 *Leu. mesenteroides*는 가장 짧은 유도기를 가지기 때문에 가장 최초로 우세균으로 작용하지만 산에 대한 내성이 적기 때문에 도태속도가 빠르고 이 균에 이어 산에 저항성이 높은 *L. plantarum*, *L. brevis*가 나타나서 발효를 완결시킨다고

**Table 2. Changes of pH, titratable acidity and ecological characteristics of lactic acid bacteria during kimchi fermentation for 25 days at 10°C**

Fermentation time(days)	Kimchi juice		Lactic acid bacteria(viable cell, log No. CFU/ml)		
	pH	Acidity(lactic acid %)	Total <sup>1)</sup>	<i>L. plantarum</i> <sup>2)</sup>	<i>Leuconostoc</i> <sup>2)</sup>
0	5.09	0.37	2.58	2.00 (26.3) <sup>3)</sup>	1.85 (18.4)
5	4.90	0.39	8.58	8.04 (28.9)	7.95 (23.7)
10	4.08	1.13	9.30	8.76 (28.5)	8.83 (33.5)
15	4.03	0.88	8.66	84.5 (60.9)	7.85 (15.2)
20	3.97	0.87	8.45	8.30 (71.4)	7.23 ( 5.9)
25	3.88	0.89	7.98	7.93 (89.5)	7.41 ( 2.74)

<sup>1)</sup>count on MRS agar. <sup>2)</sup>count on MRS-BPB(Bromophenol blue) agar. <sup>3)</sup>ratio of LAB(%).

보고한 연구결과와 유사한 경향을 보였다[3, 14].

**김치 숙성에 따른 이화학적, 미생물학적 변화**

Table 1의 경향을 검증하기 위하여 동일김치의 숙성 중 유산균의 분포변화를 알아보기 위하여 김치를 담궈 10°C에서 저장시키면서 5일 간격으로 pH, 산도, 미생물의 변화를 관찰한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같다. pH의 경우에는 숙성이 진행됨에 따라 유기산의 증가로 인해 10일째 4.08을 나타내어 점차 낮아졌으며 산도는 숙성이 진행됨에 따라 pH에 비례하여 증가하는 경향을 나타내어 10일째 1.13%를 나타내었다. 김치의 숙성기간에 따른 유산균의 변화는 숙성이 진행됨에 따라 총유산균수는 증가하였으나 숙성 15일째 이후로는 점차 감소하였다. *L. plantarum*의 경우에는 시간이 지날수록 총유산균수 중 그 비율이 증가하였으나 *Leuconostoc*의 수는 pH 4.2~4.9부근에서는 그 수가 최고로 증가하다가 pH가 4.1이하로 떨어지는 숙성말기에는 수가 감소하는 추세였다. 이는 pH의 감소로 인한 결과로 판단되었다. 이는 *Leuconostoc*이 *L. plantarum*에 비해 산에 대한 내성이 약한 것으로 판단되었다.

**한약재의 항균활성**

김치에서 분리한 정상발효유산균과 이상발효유산균에 대한 여러 가지 한약재 추출물의 항균효과를 paper disc method로 측정된 결과는 Table 3과 같다. 사용된 한약재 모두 유산균에 대해 항균효과를 나타내었으며 특히 감초, 자초, 고삼은 정상발효유산균보다 이상발효유산균의 성장을 억제하는 것으로 관찰되었다. 그러나 오미자의 경우는 반대

**Table 3. Antimicrobial effects of various plants extracts on growth of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria isolated from kimchi**

(Viable cell, log No. CFU/ml)

Herbs' extract	Homofermentative					Heterofermentative				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
I <sup>1)</sup>	+ <sup>2)</sup>	+	+	+	+	+	-	+	-	+
II	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
III	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
IV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VI	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+

<sup>1)</sup>I: *Schizandra chinensis*, II: *Sophrora flavescens* AITON, III: *Salvia miltiorrhiza*, IV: *Lithospermum erythrorhizon*, V: *Glycyrrhiza uralensis*, VI: *Curcuma longa*. <sup>2)</sup>+: positive, -: negative.

**Table 4. Effect of various plants extracts on growth of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria isolated from kimchi in MRS broth at 37°C**

(Viable cell, log No. CFU/ml)

	Incubation time(hr)	Homofermentative lactic acid bacteria					Heterofermentative lactic acid bacteria				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Control	0	4.25	4.98	4.28	4.96	4.98	4.97	4.21	4.39	4.96	4.50
	12	8.42	8.25	7.28	8.22	8.30	7.82	7.04	7.32	8.23	7.30
I <sup>1)</sup>	0	4.85	4.84	4.79	4.98	5.11	4.76	4.06	4.41	4.27	4.40
	12	6.90 (1.52) <sup>2)</sup>	6.88 (1.37)	3.92 (3.36)	6.42 (1.80)	6.48 (1.82)	3.70 (4.12)	ND <sup>3)</sup> (7.04)	ND (7.32)	3.68 (4.55)	ND (7.30)
II	10	4.36	4.78	4.34	4.72	4.57	4.68	4.04	4.30	4.52	4.12
	12	2.23 (6.19)	2.36 (5.89)	ND (7.18)	ND (8.82)	<10 (8.30)	ND (7.82)	<10 (7.04)	ND (7.32)	ND (8.23)	ND (7.30)
III	0	4.71	4.73	4.37	4.74	4.47	4.35	4.21	4.28	4.18	4.23
	12	7.52 (0.90)	6.97 (1.28)	5.73 (1.55)	7.35 (0.82)	6.26 (2.04)	4.30 (3.52)	5.44 (1.60)	5.54 (1.78)	4.12 (4.11)	7.12 (0.18)
IV	0	4.01	4.17	4.01	4.06	4.39	4.05	4.06	4.23	4.35	4.05
	12	3.54 (4.88)	2.90 (5.35)	ND (7.28)	<10 (8.82)	<10 (8.30)	ND (7.82)	ND (7.04)	ND (7.32)	ND (8.23)	ND (7.30)
V	0	4.04	4.86	4.50	4.92	4.96	4.18	4.02	4.26	4.94	4.10
	12	4.98 (3.44)	4.59 (3.66)	ND (7.28)	5.00 (3.22)	2.24 (6.06)	ND (7.82)	ND (7.04)	ND (7.32)	2.97 (5.26)	<10 (7.30)
VI	0	4.72	4.99	4.45	4.68	4.75	4.39	4.09	4.35	4.92	4.16
	12	7.54 (0.88)	8.09 (0.16)	3.60 (3.68)	3.20 (5.02)	7.27 (1.03)	ND (7.82)	<10 (6.44)	ND (7.32)	ND (8.23)	2.1 (5.14)

<sup>1)</sup>I: *Schizandra chinensis*, II: *Sophrora flavescens* AITON, III: *Salvia miltiorrhiza*, IV: *Lithospermum erythrorhizon*, V: *Glycyrrhiza uralensis*, VI: *Curcuma longa*. <sup>2)</sup>log reduction. <sup>3)</sup>ND: not detected.

Table 5. Effects of mixed plant extracts on growth of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria isolated from kimchi in MRS broth at 37°C

		(Viable cell, log No. CFU/ml)									
Incubation time(hr)		Homofermentative lactic acid bacteria					Heterofermentative lactic acid bacteria				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Control	0	4.98	4.99	4.52	4.98	4.79	4.82	4.63	4.04	4.63	4.59
	12	8.31	8.37	7.92	8.27	8.23	7.16	7.95	6.37	7.08	7.31
I <sup>1)</sup>	12	2.45	1.85	ND <sup>3)</sup>	3.25	2.51	ND	ND	ND	ND	ND
		(5.86) <sup>2)</sup>	(6.52)	(7.92)	(5.02)	(5.72)	(7.16)	(7.95)	(6.37)	(7.08)	(7.31)
II	12	4.40	1.91	ND	2.03	<10	ND	ND	ND	ND	ND
		(3.91)	(6.46)	(7.92)	(6.24)	(7.13)	(7.16)	(7.95)	(6.37)	(7.08)	(7.31)
III	12	1.17	0.92	ND	1.33	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		(7.14)	(7.45)	(7.92)	(6.94)	(8.23)	(7.16)	(7.95)	(6.37)	(7.08)	(7.31)

<sup>1)</sup>I: *Salvia miltiorrhiza*+*Lithospermum erythrorhizon*+*Glycyrrhiza uralensis*(1:1:1), II: *Lithospermum erythrorhizon*+*Glycyrrhiza uralensis*(1:1), III: *Sophora flavescens* AITON+*Lithospermum erythrorhizon*+*Glycyrrhiza uralensis*(1:1:1). <sup>2)</sup>log reduction. <sup>3)</sup>ND: not detected.

는 것으로 관찰되었다.

Table 4는 clear zone을 형성하는 각 한약재 추출물의 정상발효유산균과 이상발효유산균에 대한 억제도를 생균수 측정법으로 관찰한 것이다. Paper disc method의 결과와 유사하게 사용한 모든 한약재가 유산균에 대해 항균효과를 나타내었다. 그러나 단삼은 그 억제도가 다른 한약재에 비해 떨어지는 것으로 관찰되었다. 단삼을 제외한 감초, 울금은 정상발효유산균보다 이상발효유산균에 대한 항균력이 더 강한 것으로 나타났으나 그 억제도는 균주마다 조금씩 차이가 있었다. 자초, 고삼은 정상발효유산균과 이상발효유산균 모두에 강한 항균성을 나타내어 자초, 고삼, 감초가 유산균의 생육을 억제한다는 이 등[10]의 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 이상발효유산균과 정상발효유산균의 성장에 대한 한약재의 항균효과는 종류에 따라 이상발효유산균과 정상발효유산균의 억제 정도가 달랐으나 선택적인 저해효과는 나타내지 않았다.

단독으로 사용하여 김치에서 분리한 유산균의 성장억제 활성을 나타낸 한약재들의 병용기능성을 검증하기 위하여 한약재 추출물을 혼합하여 유산균 성장억제활성을 관찰한 결과는 Table 5에서 보는 바와 같다. 모든 처리구에서 한약재를 단용하였을 때 보다 뚜렷한 유산균 억제도를 관찰할 수 있었다. 이로 보아 항균력은 뛰어나나 식품에 적용하였을 때 관능적으로 문제가 되는 한약재는 그 문제를 보완할 수 있는 다른 한약재와 복합으로 사용함으로써 한약재 특유의 항균력은 유지되면서 관능적인 단점을 해결할 수 있어 식품에의 응용가능성이 매우 높아질 것으로 사료되었다.

## 요 약

김치 숙성 중의 유산균의 분포를 알아보기 위해 김장김치를 10°C에서 25일간 숙성시키면서 pH에 따른 정상발효

유산균과 이상발효유산균의 분포를 관찰하였다. 또한 제조된 김치의 숙성기간에 따른 pH, 산도의 변화와 유산균의 분포를 관찰하였고 분리된 정상발효유산균과 이상발효유산균에 대한 한약재의 항균성을 비교하여 조사하였다. 각 pH에 따라 정상발효유산균은 pH 전 구간에 걸쳐 고른 분포를 나타내었으나 이상발효유산균은 pH가 감소함에 따라 그 수가 점차 감소하였다. 김치 숙성 기간에 따른 유산균의 변화는 숙성이 진행됨에 따라 총유산균수는 증가하였으나 15일 이후로는 감소하였다. *Lactobacillus plantarum*은 숙성 10일까지 증가하다가 그 이후부터는 점차 감소하였으며 *Leuconostoc*도 숙성 10일까지는 증가하였으나 10일 이후로는 감소하는 경향을 나타내었다. 자초와 고삼은 정상발효유산균과 이상발효유산균에 모두 강한 성장 억제도를 나타냈으며 감초, 울금은 정상발효유산균보다 이상발효유산균에 대한 성장억제도가 더 강한 것으로 나타났다. 한약재를 병용한 처리구에서는 한약재를 단용하였을 때 보다 유산균에 대한 성장억제도가 더 뛰어난 것으로 관찰되었다.

## REFERENCES

1. Cho, J. S. 1991. Changes of microflora and chemical composition during the kimchi fermentation. *K. J. Dietary culture*. 6: 479-501.
2. Collins, C. H., P. M. Lyne, and J. M. Grange. 1989. *Microbiological Methods*, p. 25. 6ed. Butterworths.
3. Frazier, W. C. and D. C. Westhoff. 1978. *Food Microbiology*, P. 369. McGraw-Hill Book Co.
4. 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.
5. Han, H. U., C. R. Lim, and H. K. Park. 1990. Determination of microbial community as an indicator of kimchi fermenta-

- tion. *Kor J. Food Sci. Technol.* **22**: 26–32.
6. Hwang, G. C., Y. S. Jeong, and H. S. Kim. 1960. Microbiological studies on kimchi. Part II. Isolation and identification of aerobic bacteria. *Guayeonhuybo* **5**: 51–55.
  7. Kim, H. S. and G. C. Hwang. 1959. Microbiological studies on kimchi. Part I. Isolation and identification of anaerobic bacteria. *Guayeonhuybo* **4**: 56–63.
  8. Kim, H. S. and J. K. Chun. 1966. Studies on the dynamic changes of bacteria during the "kimchi" fermentation. *Bulletin of Atomic Energy* **6**: 112.
  9. Lee, S. H., W. J. Choi, and Y. S. Im. 1997. Effect of *Schizandra chinensis*(Omija) extract on the fermentation of kimchi. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **25**: 229–234.
  10. Lee, S. H. and W. J. Choi. 1998. Effect of medicinal herbs' extracts on the growth of lactic acid bacteria isolated from kimchi and fermentation of kimchi. *Kor J. Food Sci. Technol.* **30**(3): 624–629.
  11. Lee, M. K., W. S. Park, and K. H. Kang. 1996. Selective media for isolation and enumeration of lactic acid bacteria from kimchi. *J. Kor Soc. Food Sci. Nutr.* **25**(5): 754–760.
  12. Lim, C. R., H. K. Park, and H. U. Han. 1989. Reevaluation of isolation and identification of gram-positive bacteria in kimchi. *Kor. J. Microbiol.* **27**: 404–413.
  13. 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.
  14. Stamer, F. R., B. O., Stoyla, and B. B. Dunnckel. 1971. Growth rates and fermentation patterns of lactic acid bacteria associated with the sauerkraut fermentation. *J. Milk Food Technol.* **34**: 521.
  15. Vanderzant, C. and D. F. Splitstoeser. 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 3ed. American Health Association.

(Received September 17, 1998)