

산·학·연 논문

전통발효식품의 미생물자원 발굴 및 보존

차성관[†] · 안종석* · 안병학

한국식품개발연구원 생물공학연구본부

*한국생명공학연구원

Searching and Preservation of Microbial Resources from Traditional Fermented Foods

Seong-Kwan Cha[†], Jong-Seog Ahn* and Byung-Hak Ahn

Korea Food Research Institute, Songnam 463-746, Korea

*Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Taejeon 305-333, Korea

서 론

우리 나라의 전통발효 식품은 분류의 기준에 따라서 여러 가지 형태로 구분할 수 있으나, 사용원료를 기준으로 했을 때 김치류(발효채소), 장류(발효대두식품), 젓갈류(발효생선) 및 전통주류 등으로 분류할 수 있다. 우리 나라 전통발효식품의 지금까지의 일반적인 제조공정은 주원료에 부재료를 첨가, 혼합하여 원료나 공기 중에서 유입된 천연 미생물에 의하여 자연발효 과정을 거치게 되는 것이다. 그러나 고품질 전통발효식품의 생산, 또는 표준화 제조공정을 위하여서는 접종균 스타터의 이용이 바람직하다. 우수한 접종균 스타터의 개발을 위하여서는 우수 전통발효식품을 수집, 보존하고, 보존 식품으로부터 유용미생물의 분리 및 분리미생물을 이용한 전통발효식품 품질고급화를 위한 기초적인 연구가 이루어져야 한다. 김치발효는 여러 가지 미생물들이 복합적으로 관여하는 혼합발효이나 김치의 숙성과 풍미에 관여하는 미생물들은 젖산균들로 밝혀졌다(1-5). 국내외적으로 발효유제품 관련 젖산균에 대한 연구는 많이 이루어지고 있으나 김치발효관련 젖산균에 대한 연구는 최근에야 관심의 대상이 되고 있다. 그러나 지금까지 이루어지고 있는 김치발효관련 젖산균의 분류, 동정연구가 우유기원 젖산균들의 분류, 동정체계에 의한 것이기 때문에 서로 상이한 결과를 가져오는 등 정확한 분류, 동정체계의 혼란을 가져오고 있다(6-14). 따라서 김치발효 젖산균의 정확한 분류, 동정체계가 이루어져야 한다. 전통장류의 발효에 관여하는 미생물의 정확한 역할에 대하여도 아직까지 자세한 규명이 이루어지지 않고 있다. 전통장류의 품질개선과 신제품개발을 위한 기반조

성을 위하여 장류미생물에 대한 체계적이고 조직적인 연구가 필요하다. 젓갈류 발효관련 미생물에 대한 국내에서의 연구는 극히 초보적이고 단편적이다. 따라서 젓갈류 품질개선을 위하여 젓갈 발효관련 미생물에 대한 과학적인 조사연구가 있어야 한다. 전통주의 품질개선 및 상품화를 위해서는 필수적으로 전통곡차 제조기술의 과학화가 이루어져야 한다. 이를 위하여 누룩 미생물의 전통주에서의 정확한 역할규명에 대한 체계적인 연구가 필요하다. 본 연구는 한국의 김치, 장류, 젓갈 및 누룩으로부터 미생물 자원을 분리하고 보존하기 위하여 1995년부터 1999년까지 4년에 걸쳐 농림기술개발과제로 수행되었다. 현재 한국식품개발연구원에 이들 발효식품으로부터 분리된 8,000개의 미생물이 보존되어 있고, 필요한 연구자에게 균주분양을 할 수 있는 식품미생물 유전자은행사업(<http://www.kfri.re.kr> 참조)이 수행중에 있다. 따라서 본 사업의 홍보 차원에서 수행된 연구과제의 연구결과 및 활용가능성을 본 논단을 통하여 소개하고자 한다.

전통발효식품의 수집 및 보존

우수젓갈식품의 수집 및 보존을 위한 젓갈업체의 선정은 농림수산부 전통식품 품질 인증업체를 우선적으로 하였고 그밖의 업체로부터 젓갈종류, 생산지역 및 발효기간을 고려하여 총 187종의 젓갈식품을 수집하였다. 수집된 젓갈식품들은 총균수와 유산균수를 계수한 후 -170°C의 액체질소 탱크에 보존하였다. 미생물 계수배지의 적정 염첨가량을 결정하기 위하여 NaCl 염을 각각 0%, 5%, 10%, 15% 첨가한 SPC(Standard Plate Count) agar와 BCP 배

[†] Corresponding author. E-mail: skcha@kfri.re.kr
Phone: 82-31-780-9108, Fax: 82-31-780-9265

지를 사용하여 총균수와 젖산균수를 측정하였을 때, 기본 배지에 NaCl을 5% 첨가한 배지에서 총균수와 젖산균수가 가장 많이 측정되었다. 따라서 젓갈식품의 총균수와 젖산균수를 측정하기 위한 배지는 항상 SPC와 BCP 기본배지에 5%의 NaCl을 첨가하여 사용하였다(15). 젓갈 시료를 보존하기 위한 적정 동결보호제의 선별을 위하여 glycerol 15%, skim milk 10%, skim milk 10%+adonitol 1%, sucrose 8%+skim milk 5%+gelatin 1.5%, lactose 8%+skim milk 5%+gelatin 1.5%와 같은 5가지의 동결보호제를 사용하여 3가지 젓갈식품을 -170°C nitrogen tank와 -20°C deep freezer에서 동결시킨 후 1일과 30일 경과후의 총균수와 유산균수를 측정된 결과, -170°C 의 liquid nitrogen tank 보존 방법에서 그리고 glycerol 15%의 동결보호제를 사용할 경우 가장 높은 생존율을 보여 주고 있음을 알 수 있었다(15). 따라서 젓갈식품의 보존은 glycerol 15% 동결보호제를 이용하여 시료 당 9개씩의 2 mL cryovial에 담아 액체질소 탱크에 보존하는 방법으로 시료를 보존하였다.

누룩의 수집은 전국적으로 4년에 걸쳐서 302점의 누룩을 수집하였다. 대부분의 누룩 수집은 시장에서 판매되고 있는 누룩 중 육안적으로 종류가 다른 누룩이라고 판단되는 종류의 누룩을 모두 수집하였으며, 수집된 누룩은 1~2일 내에 실험실로 이송한 후 분쇄하여 -80°C 의 deep freezer와 4°C 의 냉장고에 보존하면서 미생물을 분리하였고, 분쇄된 누룩은 15% glycerol과 함께 2 mL cryogenic vial에 9개씩 담아 -150°C 의 액체질소 탱크에 보존하였다. 그림 1은 전국적으로 누룩이 수집된 지역의 분포도를 보여주고 있다.

김치는 주재료로 사용하는 채소나 부재료로 첨가되는 양념류와 젓갈류의 양과 종류, 담금 방법에 따라 매우 다양한 종류가 존재한다. 과거에는 채소류 재배에서 재래적 재배환경의 차이나 유통의 문제점으로 각각의 지방에서 생산되는 채소나 젓갈 등 재료의 차이점 때문이나 또 각각의 가정이나 지방에 따른 담그는 방법의 차이에 의해서도 달라졌다. 그리고 식생활 양식의 변화와 시대에 따라서도 김치종류도 여러 가지로 달라졌다. 지금까지의 주재료 혹은 김치의 형태에 따른 종류로 100여종에서 180여종의 김치가 보고되고 있다(1,2). 따라서 본 연구에서는 가능한 많은 종류의 김치를 수집하고자 주재료에 따른 다양한 김치를 가정이나 식당 혹은 김치공장을 방문하거나 김치를 제공받아서 수집하였으며 아울러 각 지방별로 특색이 있는 김치나 사찰 등의 김치를 수집하였다. 최근에 김치산업의 발전이나 김치의 전통식품 혹은 고유식품으로서의 발전을 촉진하고 장려하기 위하여 지방자치단체에서 주관하는 김치축제 또는 김치박람회가 매년 계속해서 열리고 있다. 이러한 김치축제에 출품되는 김치를 김치수집의 기회로 적절히 활용할 수 있었다. 본 연구의 수행기간 동안

매년 광주직할시청이 주관하는 광주김치 대축제를 제1회 대회(1995년 11월 10일~11월 12일, 광주염주체육관), 2회 대회(1996년 10월 19일~10월 22일), 3회 대회(1997년 10월 17일~10월 21일), 4회 대회(1998년 10월 21일~10월 24일)에까지 참석하여 다양한 김치를 수집하였다. 그리고 전라북도청이 주최하는 전라북도 김치축제(1996년 10월 23일~10월 27일, 전주공설운동장)와 중소기업중앙회 주최의 여의도 김치박람회(1997년 11월 18일~11월 21일, 여의도)에서도 다양한 김치를 수집할 수 있었다. 이상과 같은 방법으로 4년 동안의 연구기간 중 총 106종의 서로 다른 140가지의 김치를 수집할 수 있었다. 김치는 채소류 고형물과 국물이 혼재하는 반 고형물의 상태이므로 발효식품의 미생물 분리원 시료로서 보존하기 위해서는 초저온 상태에서 보존해야 한다. 그러나 중량이나 부피 혹은 시료채취시의 균질화 등의 문제점으로 그대로는 적절치 못한 상태이다. 따라서 이러한 문제점을 극복하고자 미생물 국물이 혼재한 상태의 김치를 분쇄기로 마쇄 균질화하고 일정량을 취하여 초저온의 상태로 보존하는 방법을 이용하였다. 현장에서 수집한 김치는 빙냉 하에서 실험실로 이송한 후 즉시 pH를 측정하고 시료별로 기록하였다. 수집시의 pH가 4.0 이하의 김치 경우는 적숙기 이후의 김치로 판단하고 Osterizer blender에서 마쇄하여 균질화 한 후 미생물분리용 시료로 사용하고 보존용 시료를 위하여 1 mL씩 채취하여 동물세포주 보존용 cryo tube에 넣어 deep freezer(-80°C)에서 급냉한 후 보관하였다. 수집시 김치의 pH가 4.5 이상의 경우는 15°C 의 항온기에서 발효 혹은 숙성을 진행시키면서 미숙기와 적숙기 이후의 김치시료를 구별하기 위해서 발효시간대별로 pH를 측정하여 4.0~4.5을 전후하여 적숙기의 시료와 이보다 낮은 pH의 시료를 적숙기 이후의 시료로 하였다. 각각의 수집 김치에 대한 미생물분리용 보존시료로는 분쇄하여 균질화 한 김치시료 1 mL를 담은 cryo tube 9개씩을 제작하였고 각 tube에 수집김치 시료의 일련번호를 부여하고 -80°C 에서 급냉시킨 후에 연도별로 식품개발연구원으로 이송하여 보존하였다. 이상과 같은 방법으로 미생물 분리원으로서의 김치시료를 제작하여 최종적으로 총 140여 가지의 김치에 대한 1,260개의 김치시료를 보존할 수 있었으며, 김치 시료 채취시의 pH값은 모든 시료가 3.6~4.9의 범위이었으며 예외적으로 순무백김치의 경우 pH값이 5.3 그리고 호박김치의 경우 7.0이었다.

산지별 재래 메주의 수집 및 우수 전통장류(된장, 고추장, 간장)의 수집은 8개 업체에서 메주 시료가 수집되었으며, 14개 업체에서 장류가 수집되었다. 수집된 메주 시료는 외부층(표면에서 두께 2 cm까지)과 내부층으로 분리하여 시료를 분말화 하였고, 분말화된 시료는 deep freezer(-70°C)에 보존되었다.

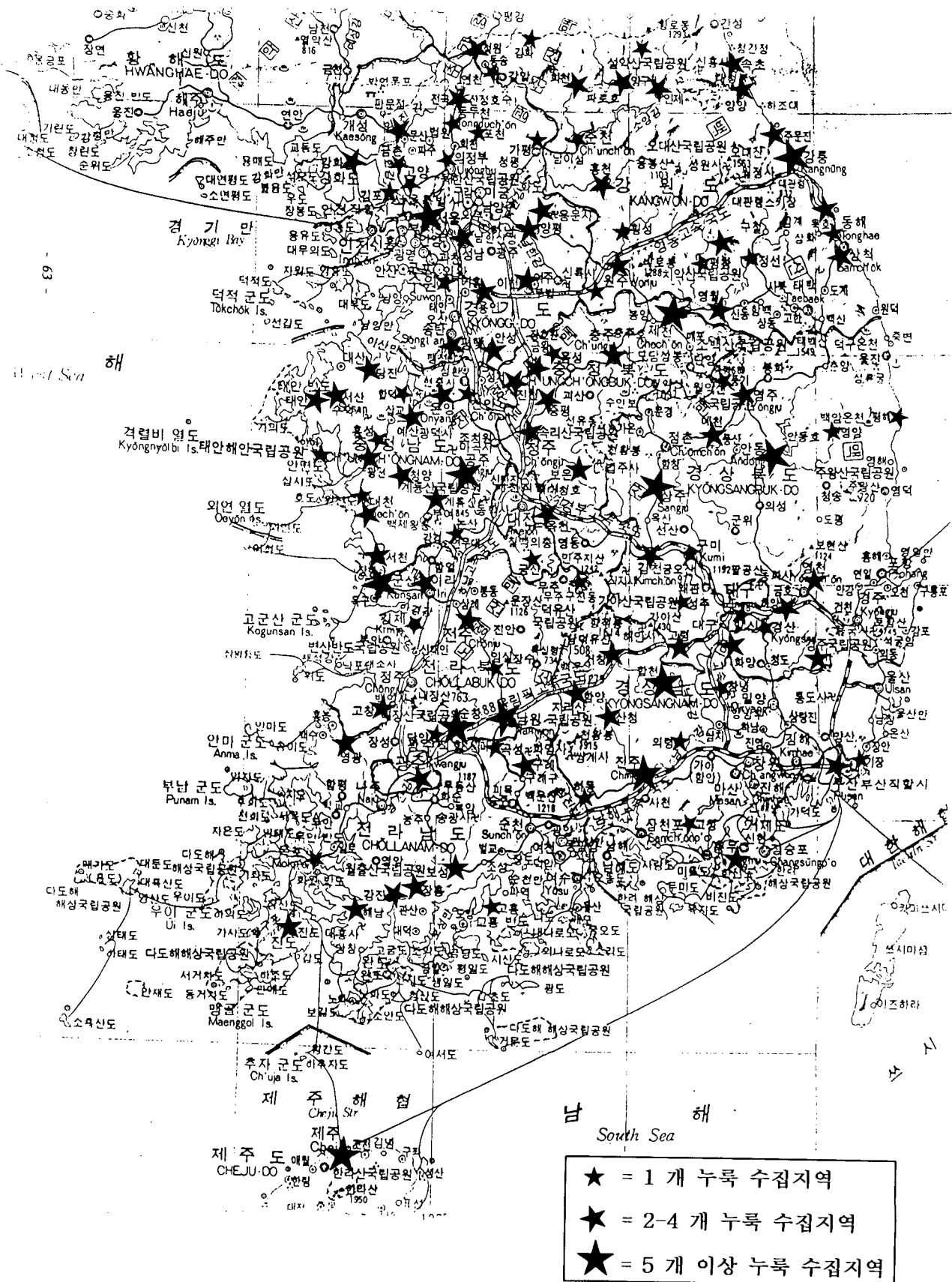


그림 1. 전국의 누룩 수집도.

전통발효식품으로부터 미생물의 분리 및 보존

수집된 젓갈식품으로부터의 미생물 분리는 일반세균수 계수에 이용되었던 한천배지에서 무작위로 50개씩의 집락을 분리하는 방법으로 제 1차년도에는 42종의 젓갈로부터 총 2100개의 미생물이 2차년도에는 48종의 젓갈로부터 2400개의 미생물이, 3차년도에는 49개의 젓갈로부터 2,450개의 젓갈이 그리고 4차년도에는 48개의 젓갈로부터 2,400개의 미생물이 분리되어, 4년 총 9,350개의 미생물이 분리되었으며, 분리된 미생물은 -70°C 의 deep freezer에 15% glycerol과 함께 보존하면서 1차적인 동정 및 2차적인 동정에 이용하였다. 이들 9,350개의 미생물 중 1차 혹은 2차 동정이 완료된 2,015개의 미생물을 동결건조 vial로 2개씩 만들어 보존하였다.

누룩미생물의 분리와 보존은 곰팡이, 효모, 젖산균으로 나누어 곰팡이와 효모는 PDA배지 그리고 젖산균은 MRS 배지를 이용하여 분리하였는데, 누룩의 곰팡이는 1~8종이 분리되었으나 평균 4종이 분리되었고, 효모는 0~9종이 분리되었으며, 젖산균은 $10^4 \sim 10^7$ 수준이 가장 많았다. 누룩의 일반세균수는 $10^3 \sim 10^9$ 까지 매우 넓은 분포를 보였으며 평균 균수는 $10^6 \sim 10^8$ 이었다. 수집된 302개의 누룩으로부터 1,845개의 미생물이 분리되었으며 분리된 미생물들은 동결건조 vial 형태로 보존되었다.

수집한 김치의 균질화 한 시료를 멸균생리식염수로 10배 단계별로 희석하여 평판배지에 접종하여 37°C 에서 콜로니가 생성될 때까지 2~3일간 배양하여 단일 콜로니를 분리하였다. 김치발효에 관여하는 주된 미생물인 젖산균 *Leuconostoc*속과 *Lactobacillus*속 젖산균을 분리하기 위해서 PES배지와 mLBS배지를 사용하였고 그 외 다양한 미생물을 분리하기 위해서는 MRS배지를 사용하였다. 한편 김치의 과숙기 이후에 나타나는 효모를 분리하기 위해서는 YPD배지를 사용하였다. 그리고 가능하면 한 김치시료에서 서로 다른 우점종의 집락을 구성하는 20균주 이상씩의 미생물을 분리하였다. 분리 미생물은 젖산균의 경우는 MRS 액체배지에서 충분히 배양한 후 균체를 회수하고 20% 탈지분유를 동결건조 보존제로 첨가하여 동결건조한 vial을 제작하여 반영구적으로 보존하였다. 수집한 140가지의 김치에서 MRS배지에서 1364균주, PES배지에서 624균주 그리고 LBS배지에서 773주 등 총 2761주의 미생물들을 단일 집락으로 1차로 분리하였고, 이들 중 액체배지에서 재배양이 가능한 2,486주의 미생물을 한 균주 당 3개의 동결건조 vial을 제작하여 총 7,458개의 vial을 보존할 수 있었다.

수집된 장류로부터는 총 2,052주의 미생물을 분리하여 동결건조 vial 형태로 보존하였다.

전통발효식품 미생물의 동정 및 균총조사

젓갈로부터 분리된 미생물을 동정하기 위하여 6가지 형태적인 그리고 생화학적인 실험(세포 및 집락의 형태관찰, 그램염색, 카타라아제 실험, 옥시데이즈 실험, oxidation/fermentation 실험)을 통하여 1차적인 동정을 실시하였다. 1차 동정결과 미생물들은 그램 음성균, 유산균(그램 양성, 카타라아제 음성, 옥시데이즈 음성), *Bacillus*(그램 양성, 카타라아제 양성 간균), *Staphylococcus*(그램 양성, 카타라아제 양성 구균) 등과 같이 몇가지 그룹 혹은 속(genus)으로 분류하는 방법으로 미생물 균총조사를 하였다. 미생물 균총조사에서는 젓갈식품의 발효기간별로 그램 음성균(대부분 오염균 및 부패균으로 추정)의 추이와 유산균은 그램 양성, 카타라아제 음성, 옥시데이즈 음성 간균의 경우 *Lactobacillus*로 그리고 그램 양성, 카타라아제 음성, 옥시데이즈 음성 구균의 경우 *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*과 같은 속으로 추정하였고, 효모의 경우는 현미경상으로 바로 구분이 가능하였다. 멸치젓의 제조과정 중 미생물 균총의 변화를 조사하기 위하여 거제와 충무에서 포획된 멸치(거제 멸치보다 충무멸치가 지방함량이 높음)를 이용하여 멸치액젓을 전통적인 담금방법에 의하여 마산에 있는 업체에서 지하탱크에 제조한 이후, 초기부터 47주 숙성과정중 주기적으로 마산의 공장에 가서 시료를 채취하였으며, 실험실로 이송된 시료는 일반세균수와 유산균수를 계수한 후, 일반세균수 계수배지에서 50개씩의 집락을 순수분리하였고, 분리된 모든 미생물들은 일차적으로 간이적인 동정을 실시하였는데, 집락 및 세포의 형태학적인 성질조사와 Gram staining, Catalase test, Oxidase test 및 O/F-test를 실시하여 젓갈의 숙성 단계별 미생물 균총의 변화를 조사하였다. 멸치젓의 숙성단계별 미생물의 균총변화를 조사한 결과는 충무 멸치젓과 거제 멸치젓에서 약간의 차이를 보였는데, 발효초기와 발효말기에 유산균이 출현하는 현상은 비슷한 경향을 보였으나, 거제 멸치젓의 경우 발효 19주째에는 yeast로 여겨지는 것들이 주점종을 이루었고 또한 Gram-세균들이 다시 출현하는 현상을 보여주었다. 바지락 조개젓의 제조과정 중 미생물 균총의 변화를 조사하기 위하여 서산에 있는 젓갈업체의 공장에서 20 kg의 바지락을 이용하여 전통적인 담금방법에 의하여 항아리에 젓갈을 담그었고, 원료에서부터 12주의 숙성과정중 일정 기간별로 서산에 있는 공장에 가서 직접 시료를 채취하여 실험실로 시료를 이송한 후, 미생물 균총변화 조사실험을 수행하였다. 소금이 각각 10%와 15% 함유된 조개젓의 12주 숙성과정 중 미생물 균총변화 및 pH-값의 변화를 조사한 결과, 초기 4 주까지 유산균의 급격한 증가를 보여주고 있고, 이후

감소된 반면에, Gram+, Catalase+ 세균과 Gram- 세균의 경우 발효에 따른 감소추세를 보여주었다(15). 효모는 8주 이후 급격히 증가되었다. 전통적인 담금방법으로 두가지 소금농도(10%, 15%)별로 소금을 첨가하여 제조된 굴젓을 두가지 숙성온도(15°C, 20°C)에서 숙성하였을 때 담금의 초기부터 숙성과정의 단계별 미생물의 균총변화와 화학적 일반성분 조사가 이루어졌다. 화학적 일반성분 조사에서는 8주의 숙성기간중 약 0.3%의 아미노태 질소량의 증가가 있었고 다른 성분에서는 큰 변화가 없었다. 숙성기간중 일반세균수 및 유산균수의 측정에 있어서는 6주와 8주간의 숙성기간중 꾸준한 유산균수의 증가 경향을 보여주었다. 일반세균수는 6~8주간의 숙성기간중 15°C에서는 $10^5 \sim 10^6$ 범위 그리고 20°C에서는 $10^6 \sim 10^7$ 범위의 균수가 측정되었다. 숙성기간 중의 미생물 균총변화에 있어서는 숙성초기에 Gram+, Catalase+ 균들이 주점종을 이루고 있었고, 숙성기간이 경과함에 따라 10% 소금첨가, 15°C의 경우 Gram-, Catalase- 균들과 Gram+, Catalase+ 균들이 주점종을 이루고, 10% 소금첨가, 20°C의 경우는 숙성에 따라 효모균이 주점종을 이루고 있었다. 15% 소금첨가의 경우는 숙성온도에 따른 뚜렷한 경향은 보여주지 않았고 Gram+, Catalase- 균과, Gram+, Catalase+ 균 그리고 효모균들이 고루 분포되는 경향을 보여주었다. 전통적인 담금방법으로 제조된 소라젓을 대상으로 담금의 초기부터 숙성과정의 단계별 미생물의 균총조사가 이루어졌다. 15%, 25% 소금이 각각 첨가된 2가지 소라젓을 상온에서 2주 숙성시킨 후 소라를 건져내어 다시 조개젓 국물에 침지한 후 2주, 4주, 8주, 12주 및 20주 후의 미생물수 및 화학적 일반성분을 조사한 결과, 15% 소금 첨가 소라젓에서는 2주간의 숙성중 일반세균수와 유산균수가 모두 증가하였고, 조개젓 국물에 침지한 후에도 일반세균수와 유산균수가 모두 증가하였으나, 25% 소금첨가 소라젓에서는 2주간의 숙성기간 중 미생물의 증식을 보여주지 않았고 또한 조개젓 국물에 침지한 후에는 일반세균수의 증식이 약간 있었을 뿐 유산균수는 오히려 감소하였다. 숙성과정 중의 미생물 균총변화를 조사한 결과 2주간의 숙성기간에 있어서는 15%와 25% 소금첨가 소라젓 모두 그램양성, catalase+ 균들이 주점종을 이루고 있었으나 조개젓 국물에 침지한 후에는 그램양성, catalase+ 간균들은 보이지 않고 그램양성, catalase+ 균들만이 약 20%의 균총분포를 보였고, 그램양성, catalase- 균들의 증가를 보여주었다. 그렇지만 침지 후에는 그램음성균이 주점종을 이루고 있었다. 꼴뚜기젓의 숙성단계별 미생물 균총변화를 알아보기 위하여 전통적인 담금 방법으로 제조된 꼴뚜기젓의 일반세균수와 유산균수를 조사한 결과는 15% 소금첨가 꼴뚜기젓의 경우 25% 소금첨가 꼴뚜기젓

보다 더욱 많은 일반세균수와 유산균수의 증가를 보여주었다. 꼴뚜기젓의 15%와 25% 모든 소금 첨가구에서 숙성과정 중 pH-값이 약간 감소하였으나 큰 변화는 일어나지 않았고, 아미노태 질소량에 있어 약간의 증가 경향을 보여주었다. 꼴뚜기젓의 숙성초기에는 15% 및 25% 소금첨가 꼴뚜기젓 모두에 있어 그램음성균이 주점종을 이루었으나 숙성이 진행됨에 따라 그램양성, 카타라아제 양성균으로 바뀌었고, 그리고 15% 소금첨가구에 있어서는 15주 숙성 이후에 다시 그램음성균이 주점종이 되었음을 발견하였다.

김치의 주 발효균은 젖산균으로 *Leuconostoc* 속의 젖산균은 김치를 숙성시키며 적숙기 이후에는 *Lactobacillus* 속의 젖산균이 주로 관여한다고 알려져 있다. 그리고 많은 연구보고에서 김치가 맛있을 때에 *Leuconostoc mesenteroides*가 많이 출현하기 때문에 김치의 주 발효균은 *Leuconostoc* 속의 젖산균이며 *Lactobacillus plantarum*은 김치가 시어졌을 때 많이 나타나기 때문에 김치의 산패에 관여할 것이라고 알려져 있다. 이러한 김치 젖산균의 증식 양상은 배추의 품종, 발효 온도, 소금농도 등 여러 환경 요인에 의해 영향을 받는 것으로 알려지고 있는데 일반적으로 소금 농도가 낮고 온도가 높을수록 빨리 진행된다. 또한 김치 부재료의 성분은 젖산균의 생육을 촉진시키기도 하고 억제하기도 한다. 그러나 이러한 연구는 대부분 배추를 주원료로 하는 배추김치의 경우로 배추김치에서 부재료로서 사용되는 파나 부추 등이 김치발효에 미치는 영향에 관한 연구였고 파나 부추를 주재료로 하는 파김치나 부추김치의 경우 연구된 바가 없었다. 따라서 본 연구에서는 김치의 주재료로서 파나 부추를 사용하는 이들 김치에서 발효 시간에 따른 젖산균의 변화와 발효 양상을 조사하여 배추김치와 비교하였다. 먼저 배추김치의 발효 중 미생물의 동태와 발효양상을 분석하기 위하여 배추김치를 실험실에서 담근 후 20°C에서 발효 숙성시키면서 총 세균수와 *Leuconostoc* 속의 젖산균, *Lactobacillus* 속의 젖산균수, *Pediococcus* 속의 젖산균수, 효모균수, pH, 산도와 환원당의 변화를 조사하였다. 젖산균 총생균수의 변화는 발효 5일 쯤까지의 적숙기까지는 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 젖산균 수가 1.0×10^8 cells/mL에서 3.0×10^9 cells/mL 정도로 비슷하게 분포하다 pH가 4.0이하로 떨어지는 6일 이후의 과숙기에는 *Leuconostoc*속 젖산균은 급속히 감소하는 반면 *Lactobacillus* 속의 젖산균은 그 수가 그대로 유지되면서 이들이 대부분의 미생물군집을 차지하게 됨을 알 수 있었다. *Pediococcus* 속의 젖산균은 발효 전기간 동안 큰 변화가 없었으며 그 수도 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 젖산균 수에 비해 매우 작은 1.0×10^6 cells/mL에서 10×10^7 cells/mL 정도에 머무르고 총

생균수의 변화에 거의 영향을 못 준다는 것을 확인하였다. 그리고 효모는 전체발효기간 20일 동안 절대적으로 젖산균의 수에 못 미치는 최대 1.0×10^4 cells/mL 밖에 도달하지 않았으며, 발효후반기에 낮은 pH와 탄소원인 환원당이 거의 소모된 과숙기에 서서히 그 수가 증가하는 결과를 나타냈다. 파김치는 족파 100 g당 10 g의 젖갈을 부어 3시간 절인 후 부재료로 마늘 10 g, 고춧가루 8 g, 설탕 1 g를 넣고 버무려 파김치를 제조하였다. 그리고 10°C와 20°C로 발효시키면서 시간에 따른 젖산균의 변화와 발효 양상을 배추김치와 비교 조사하였다. 총 생균수와 젖산균속 별 균수의 변화, pH, 총 산도의 변화를 조사한 결과 파김치가 배추김치보다 발효가 늦게 진행됨을 알 수 있었다(16). 또한 총 균수, *Leuconostoc* 속 젖산균의 최대 균수 및 *Lactobacillus* 속 젖산균의 최대 균수도 배추김치보다 파김치에서 적었고, 이러한 차이는 발효 온도가 낮은 10°C의 경우 더욱 크게 나타났다. 파김치를 10°C에서 발효시킨 경우 34일 경과 후에도 발효가 여전히 진행 중이었다. 총 당 함량을 조사한 결과 담금 직후 파김치가 배추김치보다 높았고 발효가 진행됨에 따라 감소하였으나 실험 종료 시점에서 여전히 파김치가 높은 당 함량을 보여 파김치의 발효가 배추김치보다 느리게 진행되는 것이 총 당 함량이 낮았기 때문이 아님을 알 수 있었다. 적숙기의 파김치에서 분리한 주된 젖산균은 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되어 배추김치 발효의 주된 젖산균과 차이가 없는 것으로 나타났다. 부추김치는 부추 100 g 당 10 g의 젖갈을 부어 3시간 절인 후 마늘 2 g, 고춧가루 2 g, 생강 1 g를 넣고 버무려 부추김치를 제조하였다. 그리고 10°C와 20°C로 발효시키면서 시간에 따른 젖산균의 변화와 발효 양상을 배추김치와 비교 조사하였다. 총 생균수와 젖산균속 별 균수의 변화, pH를 조사한 결과 20°C에서 발효시킨 배추김치의 경우 총 균수, *Leuconostoc* 속 젖산균 및 *Lactobacillus* 속 젖산균이 발효 3일에 최대로 되었다가 그 이후에는 계속 감소되었지만 부추김치의 경우에는 발효 3일째에 총 균수, *Leuconostoc* 속 젖산균 및 *Lactobacillus* 속 젖산균의 수가 최대로 되었다가 9일까지 그 수가 크게 감소하지 않았다. 또한 10°C에서 발효시킨 경우에는 배추김치의 경우, 발효 5일까지 총 균수, *Leuconostoc* 속 젖산균 및 *Lactobacillus* 속 젖산균의 수가 최대로 되었다가 그 이후에는 서서히 감소하였고, 부추김치의 경우에는 20일까지 총 균수, *Leuconostoc* 속 젖산균 및 *Lactobacillus* 속 젖산균의 수가 계속 증가하다가 그 이후에 서서히 감소하였다. 특히 10°C에서 발효시킨 부추김치의 경우 발효 17일까지 pH 5이상으로 유지되어 각종 젖산균이 생존할 수 있는 조건이었다. 총 당 함량을 조사한 결과 담금 직후 배추김치가 부추김치보다 높았고 발효

가 진행됨에 따라 감소하였으나 10°C에서 발효시킨 부추김치의 경우 발효 17일까지 초기의 당함량을 유지하였다.

장류의 발효에 영향을 주는 발효 미생물을 선별하여 효율적인 장류 발효미생물을 탐색하기 위하여, 장류의 숙성기간별로 수집한 시료로부터 탐색한 미생물중 대표적인 우점종을 분리하여 MIDI 동정기기를 이용하여 동정을 실시하였다(17).

보존중인 전통발효식품 및 미생물의 활용조사

액체질소에 젖갈시료를 보존하였을 때 미생물 수에 미치는 영향을 알아본 결과, 총균수에 있어서는 조개젓과 멸치젓 모두 감소하였다. 조개젓의 경우 액체질소 보관 전 10^{3-10} CFU/g sample이었는데 액체질소 보관 후에는 발효기간별로 정도의 차이는 있으나 10^{3-8} CFU/g sample로 감소하였다. 젖산균 수는 조개젓의 경우 10^{3-9} CFU/g sample에서 10^{2-6} CFU/g sample로 감소하였으며, 멸치액젓의 경우도 감소하였으나 거제 멸치액젓이 충무 멸치액젓보다 더 크게 감소하였다. 젖갈시료의 액체질소 보존 전후의 균총변화를 조사한 결과, 조개젓의 경우 전체 균주중 Gram(+) 균주의 비율은 액체질소 보관 후에 감소하였고, Gram(+) 균주들 중 간균과 구균의 비율은 보관 전에는 cocci의 비율이 더 높았던 것에 비하여, 보관 후에는 rod의 비율이 더 높아졌다. 또한 Gram(+), Catalase(-) 균주들 중 간균의 비율은 액체질소 보존 후 증가하였다. 멸치젓의 경우 Gram(+), Catalase(-) 균주의 총균수에 대한 비율은 액체질소 보존 후 증가하였으나, 효모의 비율은 크게 감소하였으며 거제 멸치젓의 경우 Gram(+) 균주들 중 간균의 비율이 액체질소 보존 후 감소하였다(17).

장류로부터 유용 미생물의 탐색 및 탐색균주를 이용한 장류의 제조를 위하여 protease activity 측정배지와 amylase activity 측정배지를 이용한 효소활성의 유무를 측정하였고, protease 및 amylase 효소활성이 높은 균을 탐색하였다. 탐색균주를 이용하여 된장을 제조하였을 때, 제조된 된장의 pH-값은 시료간 차이는 있었으나 초기의 6.68~7.02에서 60일 후 5.95~6.28로 감소하였으며, 아미노태질소의 함량은 증가함을 보여주었다. 초기 아미노태질소 함량은 323.7~500 mg%로 식품공전의 규격(160 mg%)을 훨씬 넘는 수치인데 이는 초기 제곡시 접종 균량과도 관련이 있을 것으로 판단되며, 국내 산업체 생산 된장의 아미노태질소 함량이 250~430 mg%인 점을 본다면 너무 규격이 낮게 설정된 것이 아닌가 생각된다. 제조된 된장의 수분함량은 50.4~54.9%로 시판된장(52.2, 54.8%)과 유사하였으며, 시료간 수분 차이는 제곡시 사각판의 부위별차이, 배양기 내부의 상자위치, 미생물 증식에 따른 막 형성으로

인한 시료간 수분 증발 등의 차이로 추정된다. 조단백질 함량은 14.23~16.07%, 환원당은 5.07~11.34%로, 환원당의 경우는 시료간 큰 차이를 나타냈는데 환원당은 된장에 생육하는 미생물의 영양원, 알콜발효, 유기산발효의 기질로 이용된다. Isoflavone중 daidzein과 genistein은 원료콩보다 메주나 된장에 많이 존재하며 숙성될수록 함량이 증가하는 것으로 알려졌는데 제조된 된장의 60일 후의 함량을 조사한 결과, 각 시료간의 isoflavone 함량은 *B. licheniformis*와 *B. subtilis*시료가 각각 총 함량 62.82와 62.04 mg%로 가장 높았는데, 골다공증 예방 등에 효과가 있는 것으로 알려진 daidzein함량은 *B. subtilis* 시료가, angiogenesis를 저해하여 cancer cell의 억제에 효과적으로 알려진 genistein은 *B. licheniformis* 시료가 가장 높았다. 유기산함량은 *B. licheniformis* 시료가 가장 높게 나타났으며, malate와 fumarate를 제외한 3가지 유기산이 높았다. *Asp. oryzae*를 사용한 된장에서 citrate 함량이 높다고 문헌상으로 보고된 것과 같이 본 실험에서도 citrate>oxalate>malate>succinate>fumarate 순으로 동일한 결과를 나타냈으며 미생물을 달리한 시료간에 차이가 있음을 보여주었다. 유기산은 koji 배양시 온도, 수분함량, 초기 접종균량에 따라 영향을 받는 것으로 알려졌으며 따라서 담금 초기부터 매우 세심한 주의가 필요할 것으로 사료된다. 이상의 결과로 볼 때 본 실험에서의 미생물균종을 달리하여 제조한 시료중 *B. licheniformis* 시료가 관능, 유기산함량, 아미노태질소 함량, isoflavone 등 전반적으로 품질이 우수한 것으로 나타났다.

활용에 대한 건의

본 연구과제의 최종목표인 전통발효식품 720종이 수집, 보존되었고, 8,000개 식품미생물이 분리되어 한국식품개발연구원에 보존되었다. 앞으로 남은 과제는 지금까지 수집하고 보존하고 있는 미생물을 어떻게 활용하고 이용할 수 있는가 하는 것이다. 현재 한국식품개발연구원에서는 2000년도부터 연구지원 사업으로 “식품미생물 유전자은행사업”을 수행하고 있다. 본 사업의 주요 목적은 지금까지 수집, 보존되어 있는 미생물들을 필요한 연구자에게 분양하고, 계속적으로 보존, 관리하고자 하는 것으로 사업에 대한 안내는 한국식품개발연구원의 homepage(<http://www.kfri.re.kr>)에 소개되어 있다.

감사의 글

본 연구는 1995년 농림부에서 시행한 '95 첨단 농림수산 기술개발사업에 의하여 수행된 연구결과중의 일부이며 연구비 지원에 감사 드립니다.

참고 문헌

1. 조재선, 김우정, 김용두, 오훈일, 노봉수: 김치의 과학화를 위한 식품학적 및 미생물학적 연구. 과학기술처 연구보고서 (1995)
2. 구영조, 최신양: 김치의 과학과 기술. 한국식품개발연구원 기술신서. 도서출판 창조 (1995)
3. 조재선: 김치 숙성 중 미생물의 동태와 성분 변화. 김치과학과 산업, 1, 45-67 (1992)
4. Cheigh, H.S and Park, K.Y.: Biochemical, microbiological and nutritional aspect of kimchi. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 34, 175-203 (1994)
5. 민태익, 권태완: 김치발효에 미치는 온도 및 식염농도의 영향. 한국식품과학회지, 16, 443-450 (1984)
6. 임종락, 박현근, 한홍희: 김치에 서식하는 Gram 양성세균의 분리 및 동정체계의 재평가. 한국미생물학회지, 27, 404-414 (1989)
7. 심선택, 경규향, 유양자: 젖산균의 분리 및 배추즙액 발효. 한국식품과학회지, 22, 373-379 (1990)
8. 이철우, 고창령, 하덕모: 김치발효중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지, 20, 102-107 (1992)
9. 소명환, 김영배: 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 동정. 한국식품과학회지, 27, 495-505 (1995)
10. 신동화, 김문숙, 한지숙, 임대관, 박완수: 시판김치 발효온도별 성분과 미생물 변화. 한국식품과학회지, 28, 137-145 (1996)
11. 이정숙, 정민철, 김우식, 이근철, 김홍중, 박찬선, 이현주, 주윤정, 이근중, 안종석, 박완, 박용하, 민태익: 김치유래 젖산균의 균체지방산 분석을 이용한 분류학적 연구. 산업미생물학회지, 24, 234-241 (1996)
12. Lee, J.S., Gin, C.O., Kim, H.J., Park, C.S., Lee, H.J., Park, B.K., Ahn, J.S., Park, Y.H. and Mheen, T.I.: Identification of lactic acid bacteria from kimchi by cellur FAMES analysis. *J. Microbiology*, 34, 281-287 (1996)
13. Lee, J.S., Jun, C.O., Kim, H.J., Park, C.S., Martin, H., Kim, S.B., Ahn, J.S., Park, Y.H. and Mheen, T.I.: Classification of isolates originating from kimchi using carbon-source utilization patterns. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 7, 68-74 (1997)
14. Lee, J.S., Jun, C.O., Kim, H.J., Park, C.S., Martin, H., Kim, S.B., Park, C.S., Lee, H.J., Joo, Y.J., Ahn, J.S., Park, Y.H. and Mheen, T.I.: Identification of *Leuconostoc* strains isolates from kimchi using carbonsource utilazation patterns. *J. Microbiology*, 35, 10-14 (1997)
15. 홍연, 김정희, 안병학, 차성관: 젓갈의 숙성 및 저온 저장이 미생물 균주 및 균총에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 32, 1341-1349 (2000)
16. 이현주, 박찬선, 주윤정, 박용하, 민태익, 안종석: 파김치와 배추김치 발효양상의 비교. 한국식품과학회지, 31, 488-494 (1999)
17. 유승구, 조원희, 강수민, 이선희: 전통된장 및 간장의 숙성기간별 생육 미생물의 분리 및 동정. 한국산업미생물학회지, 27, 113-117 (1999)