

*Leuconostoc mesenteroides*의 내산성 변이주의 김치발효에 미치는 효과

김영환 · 김희중 · 김지영 · 최태부 · 강상모*
건국대학교 미생물공학과

Strain Improvement of *Leuconostoc mesenteroides* as a Acid-Resistant Mutant and Effect on Kimchi fermentation as a Starter. Kim, Young-Hwan, Hee-Zoong Kim, Ji-Young Kim, Tae-Bu Choi, and Sang-Mo Kang*. Department of Microbial Engineering, Kon-kuk University, Hwayang-dong, Kwangjin-ku, Seoul 143-701, Korea – An organic acid tolerance mutant (M-200) was obtained from *Leuconostoc mesenteroides* KCCM 35471, followed by the screening procedure using a specific organic acid medium (lactic acid: acetic acid, 2:1). The characteristics of the acid tolerance M-200 and the wild type LM-W were examined at various temperature and pH ranges (10-30°C of temp, 3.5-4.5 of pH). The growth of strain M-200 at HCl adjusted medium (10°C and pH 3.5) was observed. In the case of organic acid adjusted medium, the strain showed its growth at the pH range of 3.8. When the strain M-200 was used as a starter for Kimchi fermentation, a constant acid level (0.55) was observed during the whole fermentation period. This result indicates that the strain produces a proper level of acid content for the Kimchi fermentation. This result also indicates that the edible period of Kimchi can be extended to 3.5 fold compare to the result obtained from the LM-W used Kimchi fermentation. However the excess use of the strain M-200 showed the inhibition of growth of *Lactobacillus plantarum*, low lactic acid level content and low level of organoleptic test. In the case of organic acid content during the Kimchi fermentation, the strain M-200 showed relatively low production rate compare to the wild type (M-200: 3.5 mg/L at 21 days of fermentation, LM-W: 7 mg/L at 21 days of fermentation). Therefore a mixed Kimchi starter containing M-200 and other strains probably maintain a good Kimchi quality during the fermentation.

Key words: Kimchi, *Leuconostoc mesenteroides*, acid tolerance, mutation, starter, fermentation

한국인의 가장 중요한 부식인 김치는 야채 재배기술의 발전과 경제적, 사회적 요인의 변화에 힘입어 중요한 상품으로서의 자리를 차지하고 있고, 보존성 향상, 기능부가 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 김치의 보존성 향상에 관한 연구는 저온저장법과, 포장방법, 첨가제의 첨가 방법 등이 있으며, 많은 연구가 진행되었다. 하지만 초기투자비용의 문제나, 식품의 안정성과 제반 허가문제로 많은 문제가 있을 수 있다. 이에 본 연구에서는 김치 발효시에 첨가하는 starter 자체를 개량함으로써 김치의 저장성 향상을 꾀하고자 하였다.

김치 발효 시 초기에 많이 증식을 해서 김치 특유의 청량감을 부여하는 김치의 주 발효균인 *Leuconostoc mesenteroides*는 젖산, 초산, 숙신산, CO₂를 생성하는 hetero 젖산 발효균이다. 하지만 김치의 발효가 진행되면서 김치의 pH가 4.0 이하로 낮아지면 그 수가 급격히 낮아지고, 이때부터 *Lac. plantarum*의 증식이 왕성해 지면서 김치의 급격한 산패, 연

부 현상이 일어나게 된다. 이를 극복하고자 선행연구에서는 HCl 내산성 변이주 *Leu. mesenteroides* M-100을 김치에 starter로 첨가하였으나 젖산과 초산이 주로 생성되는 김치에서 내산성이 비교적 강하지 못하여 오랜 기간은 유지하지 못하였다[5].

이에 본 실험에서는 젖산과 초산에 내산성을 갖도록 김치 주요 발효균인 *Leu. mesenteroides*를 내산성으로 변이시켜 유기산 내산성 변이주 *Leu. mesenteroides* M-200을 유도하여 김치 starter로 적용시킴으로써 김치 발효 후기까지 성장이 가능하게 하였으며 김치 가식기간 연장 효과도 극대화할 수 있었다.

재료 및 방법

균주

*Leu. mesenteroides*는 KCCM 35471을 분양받아 사용하였다.

변이주의 획득

변이원으로 nitrosoguanidine(NTG)사용하였으며, 대장균

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3524, Fax: 82-2-3437-8360

E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

변이 처리법을 수정하여 젖산과 초산이 2:1로 함유된 pH 3.8 이하 배지에서 생육이 좋은 균주를 변이주로 획득하였다[12].

내산성 변이주의 배양 특성

MRS broth를 젖산과 초산을 2:1의 비율로 혼합한 용액(이하 유기산 용액)[2]으로 각각 pH 3.5, 3.8, 4.0, 4.5가 되도록 조정 후 *Leu. mesenteroides*의 야생균주 LM-W와 내산성 변이주 M-200을 접종하여 10°C, 20°C, 30°C 온도별 배양한 후 경시 간격으로 배양액의 pH 및 분광광도계를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로 증식정도를 측정하였다.

시료 김치의 제조

시료 김치의 제조는 12%(w/v)의 NaCl(80% 재제염) 용액에 침지시킨 후 흐르는 물에 3회 세척하여 물 빼기를 한 다음 4~5 cm 정도로 절단하였다. 배추에 부재료를 섞어 잘 버무려서 100 g 씩 비닐봉지에 담고 공기를 빼고 밀봉하였다. 재료의 배합비는 배추 100 g에 대하여 고추 2.0 g, 파 2.0 g, 젓갈 1.0 g, 마늘 0.8 g, 생강 0.5 g으로 하였고, 비닐봉지에 담은 김치의 염도는 약 2.5%가 되도록 조정하였다. 야생균주 LM-W와 내산성 변이주 M-200을 배양하여 10^8 cell/ml를 김치 부피에 대하여 0.2%(v/v)를 첨가하였다. 비닐봉지에 담은 김치는 10°C에서 발효시키면서 시료로 사용하였다[2].

염농도의 측정

김치액 10 ml 를 취하여 질산은 적정법으로 측정하였다[1].

pH 및 산도의 측정

pH는 pH meter(Suntex, SP-701)로 측정하였으며, 산도는 10 ml 김치액을 중화시키는데 소요되는 0.1N NaOH의 용량(ml)을 lactic acid 함량으로 표시하였다[4].

환원당 측정

담금액의 환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS)에 의한 비색방법으로 측정하였다[10].

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 초음파 파쇄한 후 메스실린더로 총액량을 측정하였다. 이 액을 10 ml 취한 후 원심분리하여 membrane filter(0.45 µm)로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 분석은 HPLC(model: HP-1050)으로 수행하였으며, column은 Bio AMINEX HPX-87H column, 용매는 H₂SO₄ pH 2.4, 기록지 속도는 0.6 mm/min, 그리고 column oven temperature는 50°C로 하였다. HPLC 분석에

사용된 표준 물질로는 젖산, 구연산, 타르타르산, 말산, 숙신산, 푸마르산, 그리고 초산이었다[5].

관능검사

관능검사는 다시료 비교법으로, 평가원은 약 6개월 전부터 김치맛에 대한 훈련을 실시한 건국대학교 미생물 공학과 대학원생 10명으로 구성하였다. 관능검사 평가는 김치에서 느낄 수 있는 풋내, 신내, 군덕내 3개 항목과 전체적인 기호도를 첨가한 4개 항목을 맛과 냄새로 구분하였으며, 평가항목은 5점 채점법(아주 나쁘다, 나쁘다, 양호하다, 좋다, 아주 좋다)으로 실시하였다[3, 6, 11]. 이 결과의 통계처리는 statistical analysis(SAS)로 각 처리 평균간의 유의적 점검을 하였으며, 시료간의 유의성 검토는 Duncan의 다중비교분석 방법으로 하였다[13].

총균수와 젖산균 및 효모의 계수

김치 중의 젖산균을 각 속별로 계수하기 위하여 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속은 0.1%(w/v)을 100 bromophenol blue(1 ml/MRS agar 배지 100ml)를 첨가한 MRS 배지를 사용하여, 30°C, 2~3일간 배양한 후, 균락의 색이 전체적으로 담청색, 혹은 중앙에 암청색환이 있거나, 전체적으로 흰색이면 *Lac.* 속으로, 전체적으로 암청색이면 *Leu.* 속으로 계수하였다. *Streptococcus* 속과 *Pediococcus* 속은 M-Enterococcus agar(Difco)배지를 사용하여 37°C에서 4일간 배양 후에 붉은색을 나타내는 균락은 *Streptococcus* 속으로, 흰색은 *Pediococcus* 속으로 계수하였다. 총균수는 pouring culture methods로 plate count agar(Difco)에 접종하여 30°C, 3일간 배양하여 colony counter로 계수하였다. 효모는 Potato dextrose agar(Difco)에 10% 타르타르산을 첨가하여 pH 3.5±0.1로 조정하여 30°C, 3일간 배양한 후 나타난 균락을 계수하였다[8].

결과 및 고찰

pH와 온도에 따른 증식도

가식기간 연장의 효과에 HCl 내성 균주의 효과를 김 등[5]에 의한 선행연구에서 밝혔지만, 연장효과의 극대화를 위해 김치내 주요 유기산인 젖산과 초산을 2:1로 함유한 MRS broth를 이용하여 *Leu. mesenteroides*를 개량하여 내산성 변이균주를 얻었고, 이를 M-200이라 하였다. MRS 배지를 이용하여 야생균주 LM-W와 내산성 변이균주 M-200의 생육 특성을 pH별, 온도별, HCl 및 젖산과 초산을 2:1 비율로 혼합한 유기산 별로 실험한 결과는 Fig.1~6과 같다. 이 결과에 균주개량의 효과를 가늠하기 위해 선행된 김 등[5]의 연구에서 보고된 M-100 균주의 실험결과를 점선으로 병기하였다.

Fig. 1의 30°C, pH 4.5의 조건에서 배양시 유기산으로 pH를 조절할 배지에서 배양한 *Leu. mesenteroides*가 HCl로 조

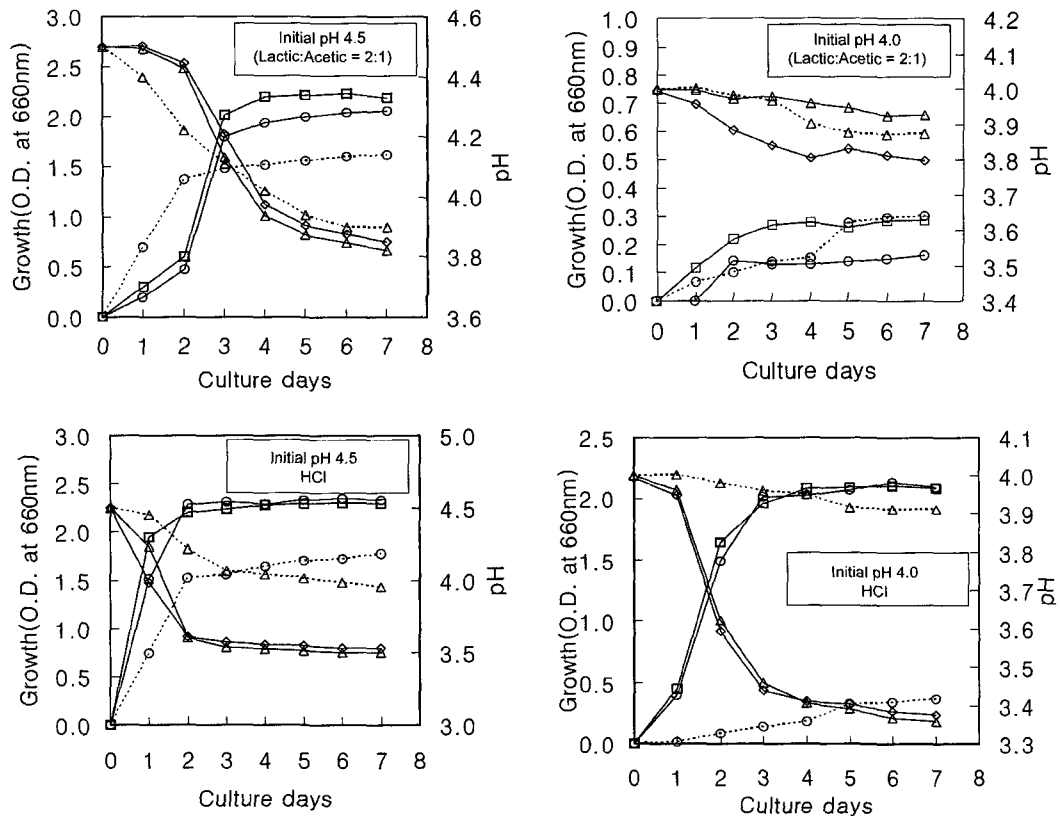


Fig. 1. Cell growth of wild and mutant strain of *Leu. mesenteroides* in MRS broth adjusted with HCl and lactic acid: acetic acid(=2:1) in 30°C. Symbols: (△) pH of LM-W; (◇) pH of M-200; (-△-) pH of M-100; (○) O.D. of LM-W; (□) O.D. of M-200; (-○-) O.D. of M-100.

절한 배지에서 배양한 것보다 2일 이상 증식이 지연되었고 pH도 서서히 떨어졌다. 유기산으로 조절한 배지의 경우는 내산성 변이균주 M-200이 야생균주 LM-W보다 높은 증식을 보였다. 그리고 HCl 내성균주 M-100은 증식은 M-200보다 빨랐으나 균 농도가 낮았다. HCl로 조절한 경우에는 배양 2일 이후 M-200과 LM-W가 동일하게 증식이 되었다. 따라서 M-200이 LM-W보다 유기산에 내성이 강한 것을 알 수 있었다. pH 4.0, 유기산 조절배지에서는 M-200의 증식이 가장 좋았으며, HCl 조절배지에서는 M-200과 LM-W가 잘 증식하였으나 M-100은 증식이 미미하였다.

Fig. 2의 30°C, pH 3.8로 유기산으로 조절한 배지에서는 LM-W는 증식하지 못하였고, M-200은 배양 2일 이후 증식하기 시작하였다. HCl로 pH를 3.8로 조절한 경우에는 M-200과 LM-W 모두 증식하였다. pH 3.5 배지에서는 HCl 조절배지에서만 M-200, LM-W가 증식하였다. 따라서 30°C 배양에서 보면 M-200이 가장 왕성한 증식을 보이는 것을 알 수 있었다.

Fig. 3은 균주를 20°C, pH 4.5 조건에서 배양한 경우로 배양 2일째 즉 대수기 초기부터 M-200과 LM-W의 증식 및 pH가 차이가 났다. 특히 배양 후반부로 갈수록 그 차이는 더욱 커졌고, M-100과도 현격한 차이를 내면서 M-200의 성장

률이 높았다. HCl로 pH를 조절한 배지에서는 배양 4일째부터 정지기에 접어든 반면, 유기산으로 조절하였을 때는 10일 이후에도 증식이 지속적으로 이뤄졌다. 이는 30°C에서 4일간 배양 이후 대수기에 접어든 것과 차이를 보이는데, 그만큼 20°C에서 증식 속도가 느린 것을 알 수 있었다. 이렇게 M-200이 유기산으로 조절한 배지에서 잘 자라는 것은 유기산으로 조절한 배지에서 균을 screening 하였기 때문이라 생각되었다. 그러나 Fig. 3의 pH 4.0 유기산 조절 배지에서 보면 HCl로 조절한 배지보다 M-100이 M-200보다 더 잘 자라는 것을 볼 수 있었다.

Fig. 4의 20°C, pH 3.8로 유기산으로 조절한 경우에는 M-200은 증식을 하였으나 LM-W와 M-100은 증식하지 못하였다. 하지만 HCl로 조절한 경우에는 M-200과 LM-W는 증식을 하였지만 M-100은 증식을 하지 못하였다. 이는 실험에 쓰인 분양받은 야생균주 LM-W의 활성이 좋기 때문이라고 생각되었다.

pH 3.5영역에서는 유기산으로 조절한 배지의 경우는 모든 균에서 증식이 없음을 알 수 있는데 이를 통해 최저 생육 pH가 3.8임을 알 수 있었다. 하지만 HCl로 조절한 배지에서는 M-100을 제외한 두 균에서 활발한 증식을 볼 수 있었다.

Fig. 5의 10°C, pH 4.5의 조건에서는 M-100이 LM-W와

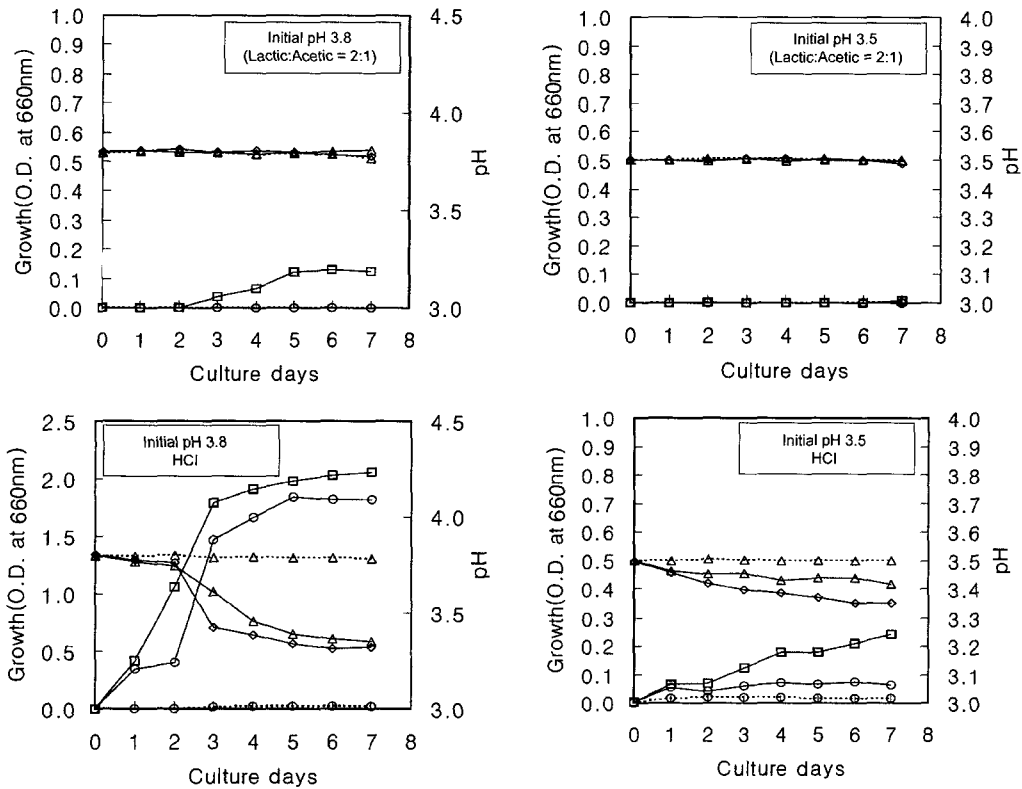


Fig. 2. Cell growth of wild and mutant strain of *Leu. mesenteroides* in MRS broth adjusted with HCl and lactic acid: acetic acid (=2:1) in 30°C. Symbols are the same as Fig. 1.

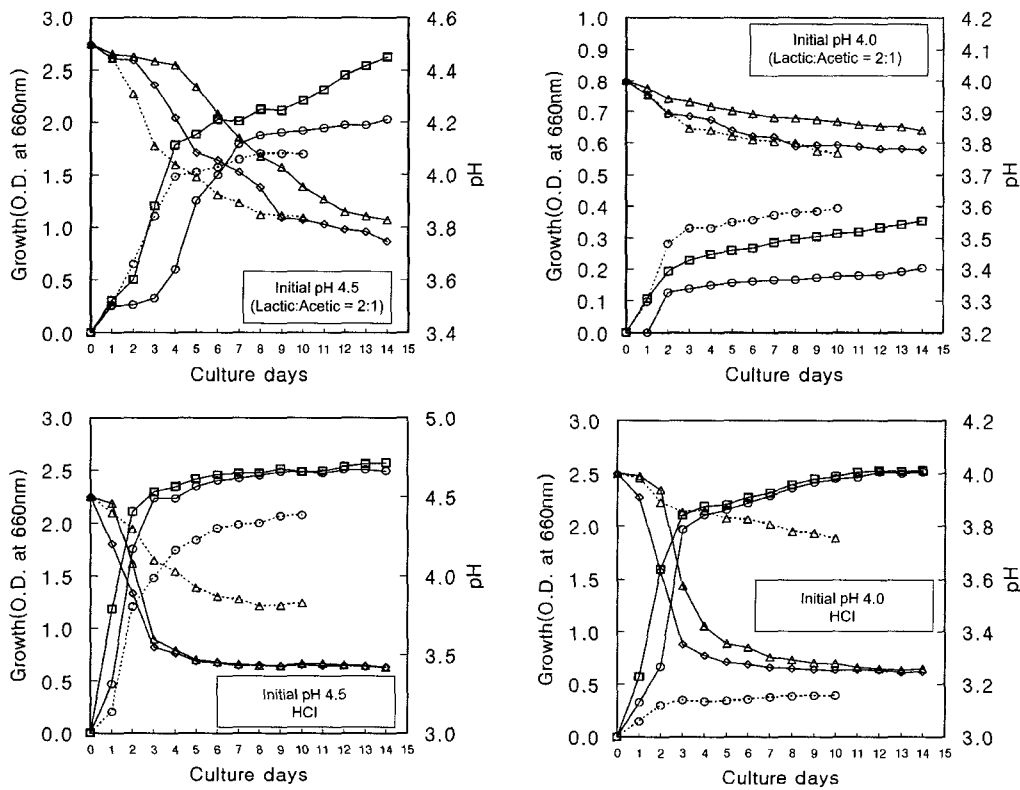


Fig. 3. Cell growth of wild and mutant strain of *Leu. mesenteroides* in MRS broth adjusted with HCl and lactic acid: acetic acid (=2:1) in 20°C. Symbols are the same as Fig. 1.

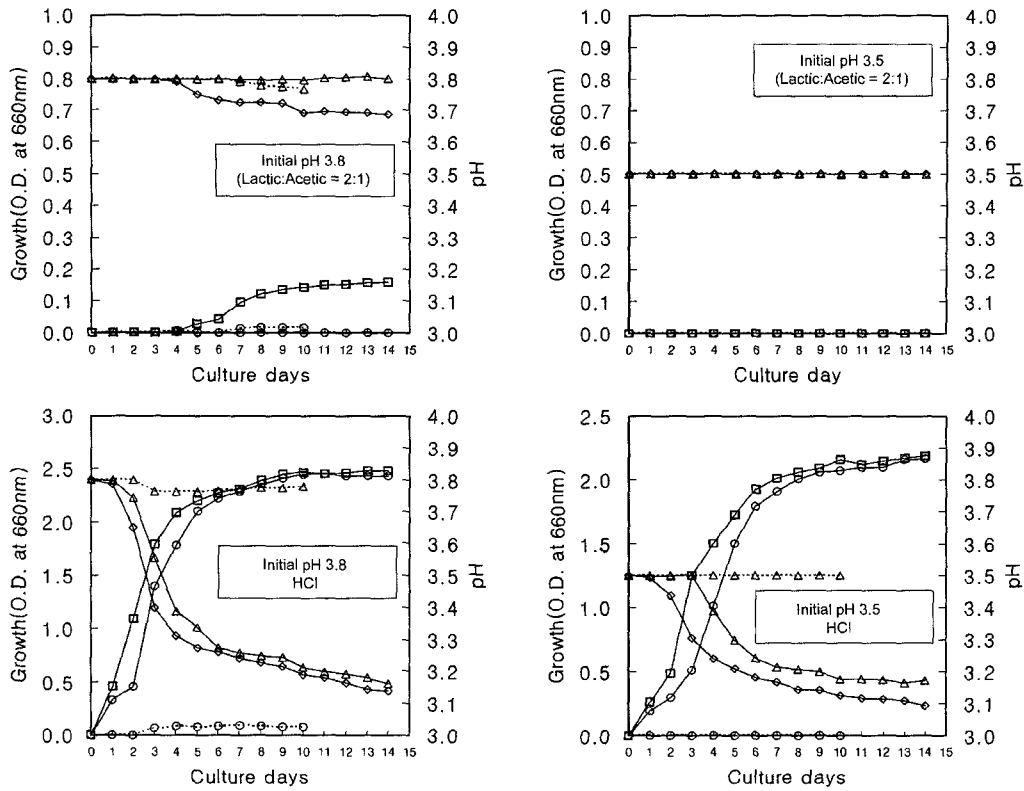


Fig. 4. Cell growth of wild and mutant strain of *Leu. mesenteroides* in MRS broth adjusted with HCl and lactic acid: acetic acid (=2:1) in 20°C. Symbols are the same as Fig. 1.

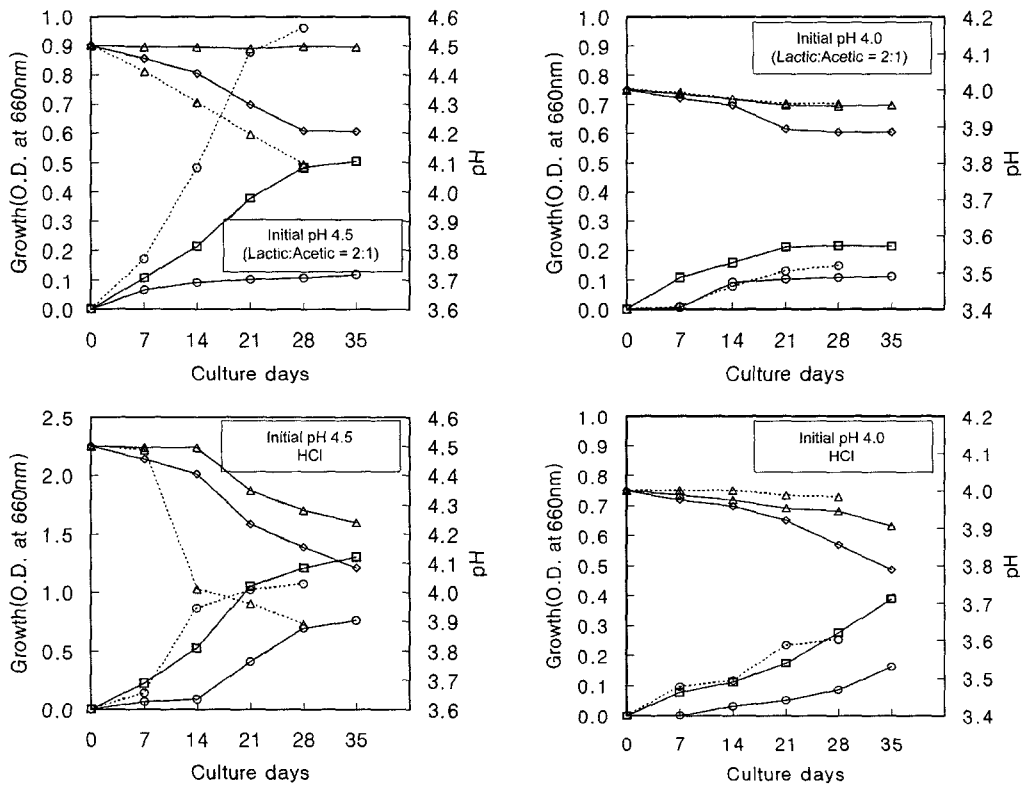


Fig. 5. Cell growth of wild and mutant strain of *Leu. mesenteroides* in MRS broth adjusted with HCl and lactic acid: acetic acid (=2:1) in 10°C. Symbols are the same as Fig. 1.

M-200보다 높은 성장을 보였다. M-200 역시 LM-W보다는 높은 성장을 보였다. 하지만 M-100보다는 성장이 느리고 활발하지 못하였는데, 특별히 이 조건에서 이런 증식곡선 차이가 크게 나타나는 것은 분양받는 균주의 특성과 내산성 변이균주 screening시 유기산과 HCl로 각각 다른 산을 이용하였기 때문으로 생각되었다. 특히 HCl에 내성을 갖도록 개량한 M-100 균주는 pH 4.5, 10°C조건에 특별하게 적응한 것으로 보였다. 그러나 pH 4.0의 경우 두 배지에서 M-200이 우세하였다.

Fig. 6의 10°C, pH 3.8의 조건에서는 유기산 배지에서는 M-200만이 약간의 증식을 보였고, HCl 배지에서는 M-200과 M-100이 약간의 증식을 보였다. pH 3.5조건에서는 유기산 조절 배지에서는 모든 균주가 증식을 보이지 못하였고, HCl 조절 배지에서는 M-200과 M-100이 미미한 증식을 보였다. 따라서 10°C에서는 의외로 M-100이 잘 증식하는 것을 볼 수 있었으나, 유기산 배지에서는 pH가 낮을수록 M-200이 더 좋은 편이었고, HCl로 조절된 배지에서는 M-100도 M-200과 비슷한 증식 정도를 보였다. 그러므로 낮은 pH의 김치 유기산에 견딜 수 있는 균은 M-200이 적합할 것으로 생각되었다.

위의 실험 결과를 통해 M-200의 유기산에 대한 내성이 LM-W와 M-100보다 전체적으로 뛰어나 유기산으로 조절한

배지에서는 다른 두 균주가 생육하지 못하는 pH 3.8, 온도 10°C의 범위까지 성장을 보여줬다. 또한 전체적으로 보면 모든 조건에서 M-200의 생육이 M-100과 LM-W보다는 월등하며, 생존력 또한 우수하였다. 특히 낮은 온도인 10°C와 김치액과 유사한 유기산 조건에서 생육이 더 활발한데 이를 통해 보면 내산성 변이균주 M-200이 야생균주에 비해 냉장상태에 있는 김치에서 더 넓은 pH의 범위에서 *Lac. plantarum* 과 경쟁적 생육이 가능할 것이라고 추정할 수 있었다.

변이균주 M-200을 starter로 첨가한 김치의 주요 발효 특성

내산성으로 개량한 변이균주 M-200과 야생균주 LM-W를 starter로 첨가한 김치의 pH 및 총산도 변화는 Fig. 7과 같다. 내산성 변이균주 M-200으로 담근 김치가 발효 7일째에는 대조군 및 LM-W 첨가군보다 낮은 pH를 유지하나, 가식 기간에 이르러 0.3정도 높아진 pH 4.3을 유지하였다. 이는 Ku 등[7]의 김치 적숙기를 pH 4.2~4.4일 때라고 발표한 자료에 비추어보면 적숙기가 M-200 첨가군이 더 오래 유지된다는 것을 보여주는 것이다. 또한 Lee 등[9]은 김치의 상미한 계점에서 젖산의 함량을 0.75%라고 보고하였다. 이러한 보고들을 바탕으로, 김치의 적숙 기간을 산도가 0.4~0.75%일 때로 본다면 무첨가군의 경우는 9~16일까지 7일간의 가식

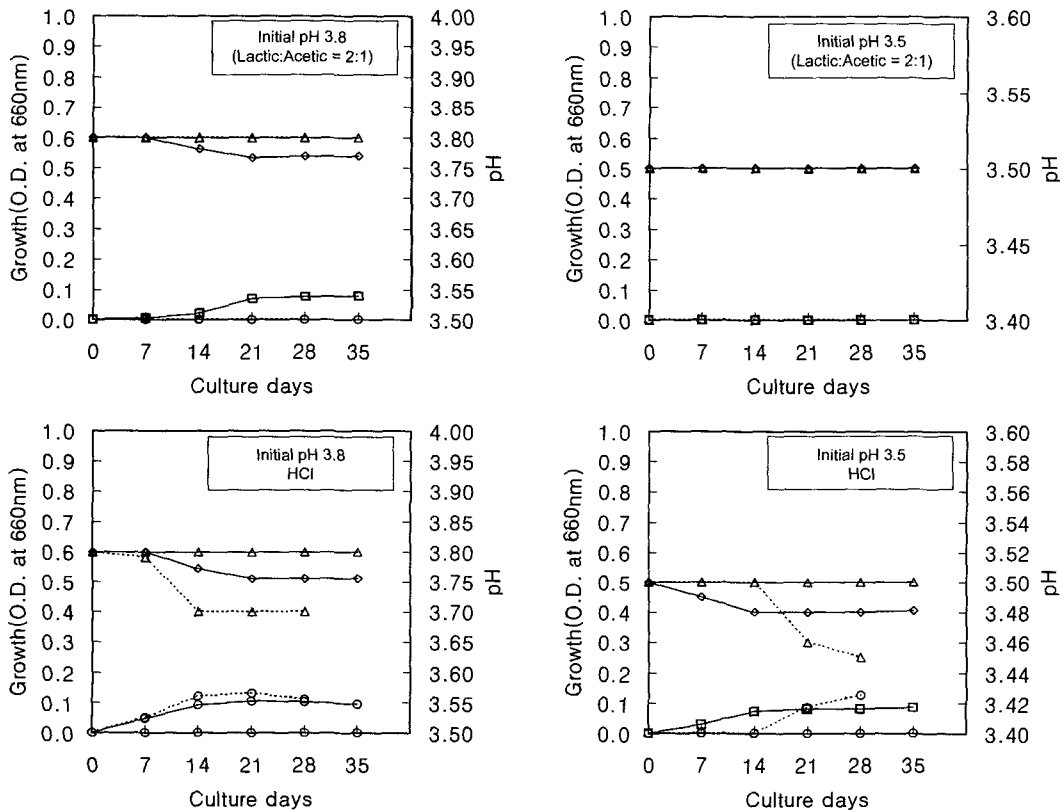


Fig. 6. Cell growth of wild and mutant strain of *Leu. mesenteroides* in MRS broth adjusted with HCl and lactic acid: acetic acid (=2:1) in 10°C. Symbols are the same as Fig. 1.

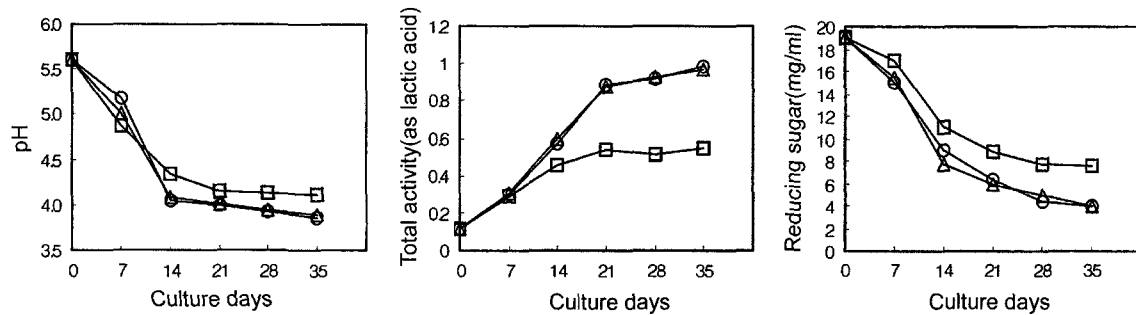


Fig. 7. Change in pH, total acidity and reducing sugar during Kimchi fermentation at 10°C. Symbols: (○) control; (△) LM-W; (□) M-200.

기간을 갖는다. 또한 LM-W의 첨가균에서도 비슷한 양상을 보였다. 하지만 M-200 첨가균은 김치숙성 10일째부터 발효 기간 35일까지 모든 기간이 산도 0.55정도로 가식 기간내에 있는 것을 알 수 있었다.

환원당

김치숙성기간 동안 환원당 함량의 변화를 측정된 결과는 Fig. 7과 같다. 초기 당 함량은 무첨가균과 야생균주 LM-W 첨가균이 18.5 mg/ml, 변이균주 M-200첨가균은 18.4 mg/ml이었으며, 모든 첨가균에서 숙성 3일째 일시적으로 증가하다가 점차적으로 감소하여 숙성 7일째부터 변이균주 M-200의 환원당이 차이를 보이기 시작하여, 숙성 35일째에는 8mg/ml로 타균에 비해 4 mg/ml 정도 높았다. 이는 내산성 변이주 M-200 첨가로 이의 증식이 우수하여, 당 이용성이 더 좋은 다른 균의 증식이 떨어졌기 때문으로 생각되었다.

김치의 유기산의 함량

Table 1은 10°C에서 발효시킨 김치의 유기산의 경시적인 변화를 나타낸 표이다. 발효 전체 기간중 젖산의 함량이 가장 많았으며, 초산, 숙신산 순이었다. 젖산은 대조군의 경우 발효가 진행될수록 계속 증가한 후 21일 이후부터 미량 감소하였는데, 이런 이유로 숙성 중기이후 김치의 pH 상승이 이뤄지는 것으로 생각되었다. 변이균주 M-200첨가균의 젖산 함량은 다른 균에 비해 낮았다. 발효 21일 이후부터는 대조군의 거의 절반정도였다. 이것은 M-200의 생장으로 *Lac. plantarum*의 생장이 억제되어 젖산의 생성이 저해되었기 때문으로 사료된다. 그리고 초산 함량은 M-200 첨가균이 상대적으로 약간씩 높은 경향을 보였다. 이는 이상발효젖산균인 *Leu.* 속의 높은 성장 때문으로 생각되었다.

관능검사

야생균주 LM-W와 변이균주 M-200을 김치에 starter로

Table 1. Change of organic acid during Kimchi fermentation at 10°C for 28 days.

Day	Sample	Citric acid	Tartaric acid	Malic acid	Lactic acid	Succinic acid	Fumaric acid	Acetic acid
0		0.025	N.D	0.200	0.045	0.014	0.0005	0.042
7	I	0.007	N.D	0.108	0.210	0.117	0.0007	0.110
	II	0.001	N.D	0.114	0.205	0.126	0.0006	0.113
	III	0.009	N.D	0.120	0.202	0.128	0.0008	0.115
14	I	0.008	N.D	0.080	0.451	0.233	0.0008	0.191
	II	0.008	N.D	0.090	0.412	0.221	0.0008	0.204
	III	0.008	N.D	0.091	0.251	0.226	0.0006	0.210
21	I	0.009	N.D	0.058	0.701	0.124	0.0006	0.229
	II	0.008	N.D	0.067	0.705	0.225	0.0006	0.219
	III	0.010	N.D	0.072	0.351	0.266	0.002	0.238
28	I	0.010	N.D	0.061	0.682	0.084	0.006	0.257
	II	0.010	N.D	0.071	0.675	0.211	0.006	0.235
	III	0.011	N.D	0.085	0.361	0.235	0.004	0.250
35	I	0.013	N.D	0.082	0.615	0.067	0.008	0.287
	II	0.009	N.D	0.115	0.667	0.202	0.007	0.230
	III	0.012	N.D	0.102	0.365	0.225	0.005	0.280

Roman letters: I. Control Kimchi; II. Kimchi added *Leu. mesenteroides* LM-W; III. Kimchi added *Leu. mesenteroides* M-200.

Table 2. Sensory evaluation of various Kimchi samples during fermentation at 10°C for 35 days.

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	4.51	4.51	4.51
3	4.30	4.00	4.30	4.00	4.14	4.14	4.50	4.50	4.50	4.00	4.25	3.85
7	4.00	4.00	4.00	3.68	3.55	3.68	4.00	4.00	4.50	3.80	4.14	3.71
10	4.00	3.90	4.00	3.22	3.22	3.22	3.68	3.68	3.85	3.63	3.85	3.54
14	3.80	3.70	3.90	2.67	2.52	3.23	3.00	3.00	3.25	3.00	3.00	2.80
21	3.20	3.20	3.05	2.34	2.18	3.01	2.46	2.46	3.20	2.46	2.62	2.10
28	2.60	2.20	2.00	2.20	2.20	3.11	2.20	2.20	3.10	2.00	2.00	1.89
35	2.05	1.84	1.20	2.05	1.84	2.90	2.00	1.84	2.91	1.75	1.66	1.34
Mean±S.D	±0.85	±0.60	±0.71	±0.89	±0.84	±0.71	±0.65	±0.79	±0.84	±0.65	±0.64	±0.79

Roman letters: I, Control Kimchi; II, Kimchi added *Leu. paramesenteroides* LP-W; III, Kimchi added *Leu. paramesenteroides* M-200.

첨가한 후 각 첨가군간의 관능 평가를 한 결과는 Table 2와 같다.

내산성 변이균주 M-200, 야생균주 LM-W, 무첨가군 모두 4주 이후 풍미가 보통이하로 떨어지며, 발효중기 이후 말기까지 발효가 진행되면 M-200 첨가군이 대조군보다 관능이 떨어지는 것을 알 수 있었다. 특히 신맛에서 발효 중기 이전까지는 대조군에 비해 더 나은 관능을 보이던 M-200 첨가군이 중기 이후 대조군에 비해 신맛 부족에 의해 관능이 좀 더 나빠지는 것을 볼 수 있었다. 적당한 신맛의 유지가 발효된 김치의 관능에 영향을 미친다고 봤을 때 M-200에 의해 *Lac. plantarum*의 생육이 저해받고, M-200의 생육이 발효중기 이후 말기까지 이뤄지기 때문에 젖산의 생성이 다른 군에 비해 적었기 때문으로 생각된다. 이 때문에 전체적인 관능 역시 중기이후 대조군과 다른군에 비해 조금씩 나빠지는 것을 볼 수 있었다. 관능평가를 통해 보았을 때 발효중기 이후 말기까지 M-200이 생육을 계속하기 때문에 신맛 부족에 의한 관능은 더 떨어지지만, 젖산의 생성으로 인한 연부현상을 일으키지 않아 조직감의 관능은 다른 군에 비해 좀 더 나은 결과를 보였다. 이를 통해 개량된 균주인 M-200을 김치 담금 시 적절히 첨가하여 발효를 시킨다면 효과적으로 김치의 산패억제 및 연부현상을 억제할 수 있을 것으로 생각되었다.

총 균수와 젖산균 및 효모의 계수

김치의 숙성 발효 기간중 주요 미생물 속의 경시적인 변화는 Fig. 8과 같다. 김치 발효초기부터 관여하는 *Leu.* 속이 *Lac.* 속보다 발효 14일까지 더 높은 균농도를 유지하는 것을 알 수 있다. *Leu.* 속의 그래프를 보면 4주째에 내산성 변이균주 M-200 첨가군(2.32×10^8 CFU/ml)이 대조군(7.43×10^7 CFU/ml), 야생균주 LM-W 첨가군(8.6×10^7 CFU/ml)에 비해 약 3배정도 많은 균수를 나타내었다. 이를 통해 M-200 첨가군의 *Leu.* 속이 더 오래 생존하여 산이 덜 생기고 산패가 지연되는 것을 알 수 있었다. *Lac.* 속은 무첨가군과 야생

균주인 LM-W 그리고 M-200 첨가군이 유사하였으나 발효 28일째를 보면 M-200 첨가군(2.52×10^8 CFU/ml)이 야생균주 LM-W첨가군(6.5×10^8 CFU/ml), 무첨가군(1.52×10^9 CFU/ml) 군에 비해 약 3-5배 정도 낮은 것을 볼 수 있었다. 이는 *Leu.* 속이 *Lac.* 속과 경쟁적으로 발효 말기까지 생육을 하였기에 나타난 결과로 생각되었다. 이와 같이 M-200 첨가군은 마지막까지 강한 생존력과 *Lac.*의 생육 억제력을 보였다.

군덕내와 연부현상을 야기하는 효모는 발효 4주째에 M-200 첨가군(5.7×10^6 CFU/ml)이 야생균주 LM-W 첨가군(6.69×10^6 CFU/ml)과 무첨가군(8.23×10^6 CFU/ml)보다 낮은 균수를 보였다. 이는 M-200 첨가군이 관능에 영향을 미치는 젖산 생성을 제대로 하지 못하였기에 나온 결과로 생각되었다. 발효 중기에 번식하는 *Pediococcus* 속은 3주까지 무첨가군, 야생균주 LM-W 첨가군, 내산성 변이균주 M-200 첨가군이 유사하며, 3주후에 내산성 변이균주 M-200의 첨가군이 다른 두 개의 군보다 낮은 군 분포를 보였다. 이는 내산성 변이균주 M-200이 다른군에 비해 *Pediococcus* 속과 경쟁적으로 더 잘 생육했기 때문으로 생각되었다. *Streptococcus* 속 역시 *Pediococcus* 속과 비슷한 양상을 보이며 발효 2주째까지 모든 군에서 비슷한 성장 양상을 보였다. 단지 3주째에 야생균주 LM-W 첨가군(5.25×10^5 CFU/ml)과 무첨가군(4.36×10^5 CFU/ml)에 비해 M-200 첨가군(9.25×10^5 CFU/ml)이 일시적으로 2배정도 많은 균수를 보였다. 하지만 4주째에 이르러서는 다시 균수가 비슷해졌다. 이는 *Pediococcus* 속과 비슷하게 내산성 변이균주 M-200 첨가군이 다른 두 군에 비해 *Streptococcus* 속과 경쟁적으로 생육했기 때문으로 생각할 수 있었다. 총균수는 4주까지 모든 군에서 비슷한 양상을 보이면서 성장을 보였다. 특히 모든 군에서 총균수는 거의 같은데 앞의 *Leu.* 속 결과와 *Lac.* 속의 결과를 보면 내산성 변이균주 M-200 첨가군이 발효 말기까지 *Lac.* 속의 증식은 억제하였고, *Leu.* 속의 증식만은 활발한 것으로 볼 수 있었다.

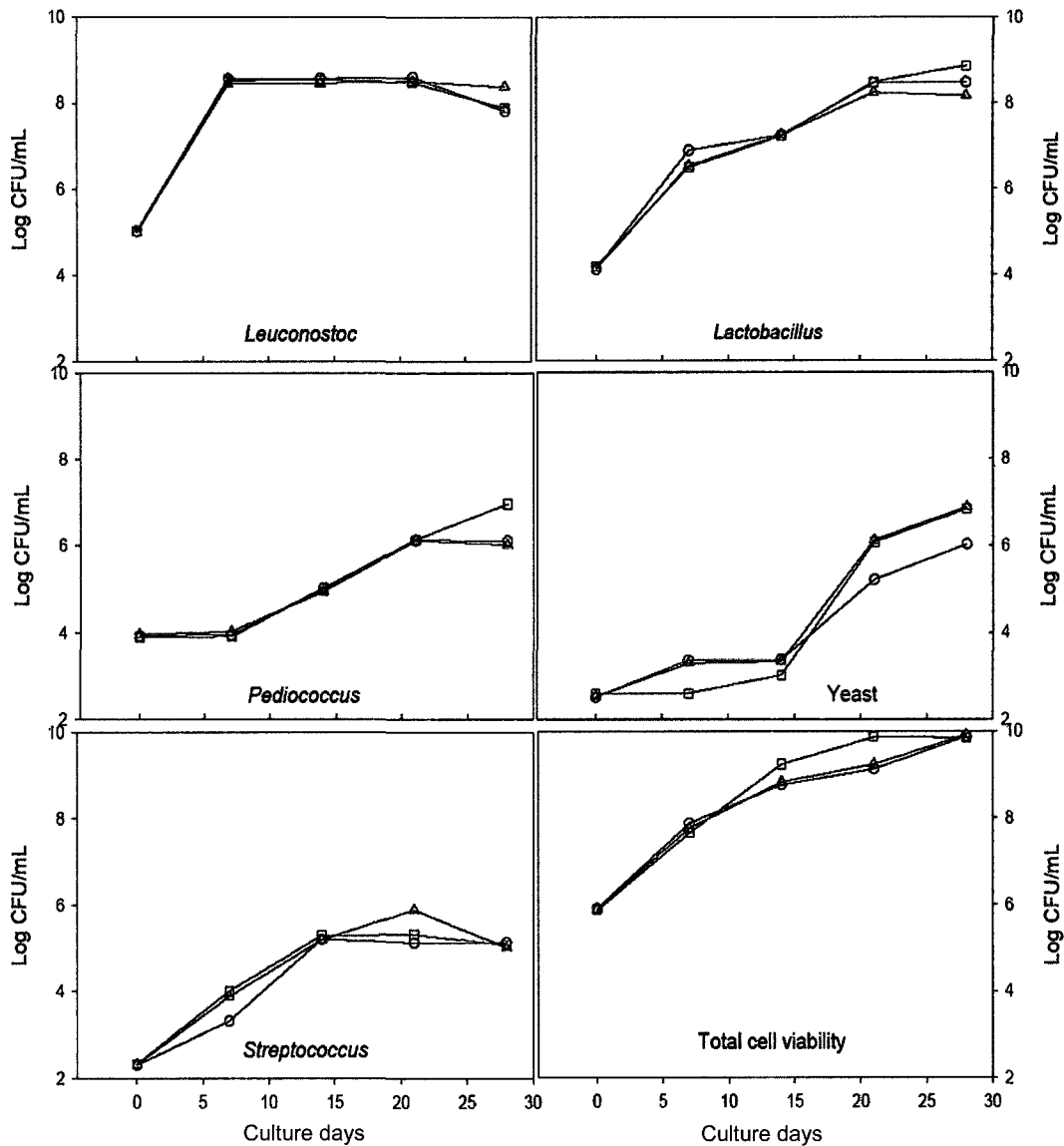


Fig. 8. Microfloral change of lactic acid bacteria and yeast during Kimchi fermentation at 10°C. Symbols: (○) Control Kimchi; (□) LM-W Kimchi added *Leu. mesenteroides* LM-W; (△) M-200 Kimchi added *Leu. mesenteroides* M-200.

요 약

Leu. mesenteroides KCCM 35471을 변이처리하고 젖산과 초산이 2:1로 함유된 유기산 조정 배지에서 screening을 하여 유기산 내성 변이균주 M-200을 얻었다. 내산성 개량균주 M-200과 야생균주 LM-W는 10°C-30°C 온도범위와 pH 3.5-4.5의 영역에서 생육 특성에 대해 실험을 행하였다. 내산성 변이균주 M-200의 경우에는 HCl로 조절한 배지에서는 10°C, pH 3.5영역에서도 증식하였다. 유기산으로 조절한 배지에서는 10°C, pH 3.8의 영역까지 증식하였다. 내산성 변이균주 M-200과 야생균주 LM-W를 김치에 starter로 첨가하여 10°C에서 발효시킨 결과를 살펴보면, 내산성 변이균주 M-200은 김치 발효가 끝나는 시점까지 산도 0.55 이하를 유

지하였다. 이는 김치의 적숙 기간을 산도가 0.4~0.75%일 때 로 본다면 내산성 변이균주 M-200을 첨가한 군은 발효기간 내내 적숙기를 유지한다는 것을 알 수 있었다. 또한 이를 야생균주 LM-W를 첨가한 군과 비교해보면 가숙기간이 약 3.5배 연장됨을 볼 수 있었다. 그러나 지나친 M-200의 생육으로 *Lac. plantarum*의 생육이 떨어지고 김치의 산도가 올라가지 못하고 신맛이 부족하여 김치의 관능이 떨어졌다. 유기산 분석에 있어서도 젖산의 생산이 대조군에 비해 발효 21일째부터는 약 절반 정도 밖에 생산하지 못하였다. 따라서 starter 첨가량 조절과 다른 변이주 들과의 혼합첨가를 한다면 좋은 관능을 갖는 김치를 생산할 수 있을 것으로 생각되었다.

감사의 글

이 논문은 2004년도 건국대학교 학술진흥연구비 지원에 의한 논문임.

REFERENCES

1. Chyun, J. H. and H. S. Rhee. 1976. Studies on the volatile fatty acids and carbon dioxide produced in different Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **8**: 90-94.
2. Kang, S. M., W. S. Yang, Y. C. Kim, E. Y. Jung, and Y. G. Han. 1995. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for kimchi fermentation and effect of starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 461-471.
3. Kim, H. O. and H. S. Rhee. 1975. Studies on the nonvolatile organic acids in kimchi fermented at different temperatures. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **7**: 74-81.
4. Kim, K. J., H. S. Kim, D. W. Lee, and W. Lee. 1994. Quantitative chemical analysis, pp. 159-176. Freedom Academy, Seoul, Korea.
5. Kim, Y. C., E. Y. Jung, E. H. Kim, D. H. Jung, S. H. Jung, D. H. Yi, T. J. Kwon, and S. M. Kang. 1998. Properties of acid tolerance of acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides* which was improved as Kimchi starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**: 102-109.
6. Ku, K. H., K. O. Kang, and W. J. Kim. 1988. Some quality change during fermentation of kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **20**: 476-482.
7. Ku, Y.C. 1992. The present state and future of Kimchi industry technology development. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 43-51.
8. 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.
9. Lee, Y. H. and I. W. Yang. 1970. Studies on the packaging and preservation of kimchi. *J. Kor. Agricultural Chemical Society* **13**: 207-218.
10. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **55**: 952-959.
11. Park, H. J. and Y. S. Han. 1994. Effect of mustard leaf on quality and sensory characteristics of kimchi. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**: 618-624.
12. Schleeif, R. F. and P. C. Wensink. 1987. Practical methods in molecular biology. p. 17-18. Springer-Verlag, Berlin.
13. Song, M. S., Y. J. Lee, S. S. Cho, and B. C. Kim. 1993. Handbook of statistical analysis using SAS. p. 101-108. Jayu Academy, Seoul, Korea.

(Received Sep. 21, 2004/Accepted Feb. 14, 2005)