

김치 발효 시 용기의 종류가 세균 생장에 미치는 영향

한국일 · 김미정 · 권현정 · 김용현 · 김완종 · †한만덕

순천향대학교 생명과학과

The Effect of Container Types on the Growth of Bacteria during Kimchi Fermentation

Kook-Il Han, Mi-Jung Kim, Hyun-Jung Kwon, Yong Hyun Kim, Wan-Jong Kim and †Man-Deuk Han

Dept. of Biology, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea

Abstract

This study is being performed to confirm the container effects during the fermentation processes of kimchi. Kimchi fermentation was prepared in the laboratory with four different types of containers; namely, a traditional *Onggi* vessel (Korean traditional clay pot, TOV), plastic airtight covered *Onggi* vessel (PAOV), plastic covered vessel (PCV) and plastic airtight covered vessel (PACV). The kimchi fermentation in the different containers was followed by taking samples at 48 hour intervals for 10 days. In all fermentation containers, the pH changes of kimchi were decreased with fermentation days, while salt content was the same for all types of containers. The number of lactic acid bacteria in kimchi were 1.09×10^8 CFU/ml at first. But the TOV, PAOV, PCV, and PACV after fermentation for 10 days were 1.42×10^{10} , 9.13×10^9 , 4.93×10^9 and 7.46×10^9 CFU/ml, respectively. The kimchi fermented in the TOV with the most dominant bacterial species were the following 5 strains: *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. safensis*, *Lactobacillus brevis* and *B. pumilus*. The use of different types of containers therefore influenced the number of *L. brevis* and the four *Bacillus species*. in kimchi, and may influence the characteristics of the fermented kimchi products. The TOV offered the greatest *L. brevis* numbers and suggested that it could be the best suited for preparing traditional kimchi fermentation.

Key words: kimchi, *Onggi*, fermentation container, *Lactobacillus sp.*

서 론

발효는 가장 오래된 식품 가공 및 보존 방법 중 하나로서, 전통식품의 대부분이 발효식품에 해당되어진다. 최근 들어 발효식품에 대한 인식이 세계적으로 높아짐에 따라 품질과 다양성에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 발효 과정은 장소에 따라 다를 수 있으나, 발효 품질에 핵심적인 요소는 발효 시 담그는 용기에 따라 달라질 수 있다(Kebede 등 2007). 예로부터 용기는 발효식품인 김치나 장류 등을 발효하거나 저장 용기로 사용되어 왔다. 그러나 무겁고, 깨지기 쉬운 단점과 주걱 공간 및 식생활의 서구화로 인하여 플라스틱, 김치 냉장고용 용기(polypropylene), 스테인리스, 알루미늄 그리고 유리 용기

등으로 대체되어 왔다. 최근 환경 친화적 웰빙 식품 문화와 우리 전통 발효식품의 기능성이 주목받으면서 점토로 만든 친환경적 용기에 대한 인식이 달라지고 있다. 전통적으로 김치는 발효 및 숙성시키고 저장하는데 점토로 만든 용기(항아리)를 활용하였다(Chung 등 2005). 김치 발효 및 저장 용기는 미생물학적 측면에서 김치의 품질과 발효 과정에 큰 영향을 줄 수 있다. 즉, 김치는 저온에서 숙성·저장시키는 과정을 거치므로 유산균과 같은 유용 미생물의 증식과 그 대사산물이 용기의 재질적 특성과 통기성에 영향을 미칠 수 있다(Chung 등 2004). 따라서 발효 용기에 따라 김치의 유효 미생물과 기능성 성분에도 영향을 미칠 수 있다. 김치의 기능성에 관한 연구로는 항산화 작용(Ryu 등 2004), 노화 방지 효과(Kim 등 2002),

† Corresponding author: Man-Deuk Han, Dept. of Biology, College of Natural Science, Soonchunhyang University, Asan 336-745, Korea. Tel: +82-41-530-4702, Fax: +82-41-530-1256, E-mail: mdhan@sch.ac.kr

항 돌연변이 작용 및 항암 작용(Shin 등 1998), 항균 효과(Sheo & Seo 2003), 면역 활성 증진(Kim 등 1997), 지질 분해 효과 및 체중 감량 효과(Kim 등 2004; Sheo & Seo 2004) 등이 보고되고 있다. 이러한 김치의 다양한 기능성 때문에 한국의 김치는 미국 건강 전문 월간지 “Health”에서 세계 5대 건강음식으로 선정된 바 있다(Health magazine 2008). 미생물에 의해 발효되는 김치는 발효 용기와 조건에 따라 생육되는 미생물과 대사 산물, 그리고 그 기능성이 차이가 있을 수 있다. 따라서 김치의 품질을 최적화 또는 표준화할 수 있는 조건을 찾을 수 있는 용기의 과학적 증명과 최적화된 용기의 개발이 필요하다.




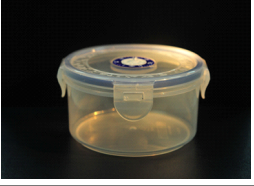
김치의 발효 과정에 관여하는 미생물에 관한 연구는 저온(4°C) 발효 시, 초기에는 *Leuconostoc citreum*(0~10일), *Le. mesenteroides*(0~25일)가 관여하며, 후기에는 *Le. gelium*(30~60일), *Le. pseudomesenteroides*(30~60일)가 관여하고, 전반에 걸쳐서 *Weissella koreensis*, *Lactobacillus sakei*가 관여하는 것으로 보고된 바 있다(Park 등 2003). 최근 김치에서 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella*, *Lactococcus* 및 *Pediococcus*인 젖산 생성균주가 분리·동정되어 보고되고 있다(Bae 등 2005). 김치는 젖산균이 풍부한 음식임에도 불구하고, 고염성 등과 같은 문제로 미생물 군집 제어를 통한 젖산균 함량이 높은 고품질 프로바이오틱스(probiotics) 김치를 생산하는 상업적 결과는 아직 미흡한 실정이다. 그러나 고품질 김치 생산을 위한 starter 개발, 부재료 첨가, 발효 온도 및 저장 방식 등과 같은 방법으로 품질 개발은 지속적으로 시도되고 있다. 발효 용기에 따른 김치 발효의 차이가 있다는 사실은 인정하나, 발효 용기에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다.

김치 발효 용기에 대한 연구는 Chung 등(2005)이 유리, polypropylene(PP), polyethylene terephthalate(PET), 스테인리스 용기, 용기에 발효식품을 담아 저장했을 때 용기의 기공에 의해 발효 미생물이 활발하게 증식된다고 보고한 바 있다. 그러나 김치용기에 따른 발효 미생물에 대한 연구 및 미생물 분리 동정에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 전통적인 김치 발효 용기인 옹기와 현재 사용되는 플라스틱 용기에 따른 발효 과정 중 미생물학적 변화를 확인하고, 실생활에 활용하고자 전통 옹기(항아리), 밀폐 옹기, 플라스틱 옹기, 밀폐 플라스틱 용기를 비교 실험을 하였다. 연구방법은 발효 과정 중 관여하는 미생물 총 균수 및 젖산균 수의 변화와 함께 김치 발효에 관여하는 우점종 균주를 분리하고, 16S rRNA를 바탕으로 분자생물학적 방법을 이용한 균주동정, 형태 및 생화학적 특성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Table 1. Appearances and components of the Onggi and other vessels used in the experiment

Type	Characteristics	Appearance
Traditional Onggi vessel (TOV)	Components : GyeongBuk clay 60% Jeongeup clay 20% Yesan clay 20% Glaze, Less than 1% Plasticity : Electric kiln Oven temperature : above 1,200°C Vessel volume : 400 ml	
Plastic airtight covered Onggi vessel (PAOV)	Components : GyeongBuk clay 60% Jeongeup clay 20% Yesan clay 20% Glaze, Less than 1% Cover : plastic air Plasticity : Electric kiln Oven temperature : above 1,200°C Vessel volume : 400 ml	
Plastic covered vessel (PCV)	Polypropylene 100% Vessel volume : 330 ml	
Plastic airtight covered vessel (PACV)	Polypropylene 100% Vessel volume : 400 ml	

본 실험에 사용된 용기는 총 4가지 종류로 옹기, 밀폐 옹기를 충남 예산옹기에서 구입하였고, 플라스틱 용기(Coolrara, Easy Film Co., Korea) 및 밀폐 플라스틱 용기(Shine hi-rock, (주)이화실업, Korea)를 사용하였다(Table 1). 플라스틱 용기를 제외한 모든 용기의 용량은 400 ml이며, 플라스틱 용기는 330 ml를 사용하였다. 배추김치를 담그기 위한 모든 재료는 배추김치 표준화 방법(Cho 등 1998)에 따라, 실험 당일 아산시의 대형마트에서 제품을 구입하여 사용하였다. 이외 백설탕(제일제당 (주))과 멸치액젓((주)하선정중합식품)을 사용하였다.

2. 김치 제조

배추김치 담금법은 표준화 방법(Cho 등 1998)에 따라 1.6 kg 배추를 10% 소금물에서 10시간 절이고, 절인 배추는 수돗

Table 2. Standardized ingredients ratio of cabbage kimchi

Ingredients	Weight (g)
Chinese cabbage	100.0
Red pepper powder	3.5
Crushed garlic	1.4
Crushed ginger	0.6
Anchovy juice	2.2
Sugar	1.0
Radish	13.0
Green onion	2.0
Final salt concentration	2.7%

물로 3회 씻고 3시간 동안 물기를 뺐다. 무와 파는 채로 썰고 고춧가루를 넣어 버무린 다음 멸치액젓과 파, 마늘, 생강을 고루 섞어 주었다. 재료 배합비는 100 g에 대한 무 13 g, 파 2 g, 고춧가루 3.5 g, 마늘 1.4 g, 생강 0.6 g, 멸치액젓 2.2 g, 설탕 1.0 g으로 하였으며(Table 2), 배추는 3×3 cm로 자른 후 버무려 각 용기(옹기, 밀폐 옹기, 플라스틱 용기, 밀폐 플라스틱 용기)에 200 g씩 넣어 15°C에서 10일간 발효시켰다(Cho 등 1998).

3. pH 및 염도 측정

김치의 숙성시간에 따른 pH는 pH meter(WTW pH 720, Germany)를 이용하여 김치용기에 직접 넣어 측정하였고, 염도는 김치액 1 mL을 취하여 conductivity meter(WTW Cond 3110, Germany)를 사용하여 측정하였다.

4. 총 균수 측정

김치의 숙성시간에 따른 총 균수는 김치액상 시료를 무균적으로 1 mL 취하여 펩톤 수(peptone 1%, sodium chloride 0.5%, pH 7.2)에 10배씩 연속 희석하였다. 희석액 1 mL를 취해 plate count agar(peptone 0.5%, yeast extract 0.25%, glucose 0.1%, agar 1.5%, pH 7.0)에 주입평판법(pour plate method)으로 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 나타난 집락수를 CFU/mL로 표시하였다.

5. 젖산균 수의 측정

김치액상 시료를 무균적으로 1 mL 취하여 펩톤수에 연속 희석한 후, 희석액 1 mL를 취해 1.5% agar powder가 첨가된 MRS broth(Difco, USA) 배지에 주입평판법(pour plate method)으로 접종하였다. 접종된 배지는 37°C에서 24시간 배양한 후 나타난 집락수를 CFU/mL로 표시하였다.

6. 김치 발효 우점종 균주의 분리·동정

1) 일반 균주

옹기에서 발효된 김치로부터 일반 균주의 분리·동정을 위하여, 15°C, 10일간 발효된 김치 액상 시료를 무균적으로 1 mL 취하여 펩톤 수에 10배 연속 희석한 후 평판도말법(spread plate method)으로 nutrient agar(Difco, USA)에 100 µL씩 접종한 후 37°C에서 1일간 배양하였다. 배양된 균주는 집락의 형태 및 색상을 비교 후 tooth pick하여 단일집락을 분리·배양한 후 3회 이상 반복하여 순수 분리하였다.

2) 젖산균 동정

4가지 김치 발효 용기 가운데 젖산균의 생장이 가장 우수한 옹기에서 15°C, 10일간 발효된 액상 시료를 1 mL 취하여 펩톤 수에 10배 연속 희석한 후 MRS 배지(Difco, USA) 및 phenylethyl alcohol sucrose agar 배지(PES medium)에 평판도말법(spread plate method)으로 100 µL씩 접종하여 각각 37°C에서 1일, 25°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 균주는 집락의 형태 및 색상을 비교 후 tooth pick하여 단일집락을 분리·배양한 후 3회 이상 반복하여 순수 분리하였다.

3) 균주의 유전학적 동정

분리된 균주는 16S rRNA identification을 통해 균주를 동정하였다. 균 동정을 위해 사용된 universal primer는 27F : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R : 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'를 사용하였으며, BLASTN program을 이용하여 NCBI data base에서 유사도를 비교 동정하였다. 또한 계통도 분석은 MEGA 5.1 program을 이용하여 수행하였다.

7. SEM을 이용한 균주의 형태학적 분석

분리된 우점종의 형태학적 특징을 관찰하기 위해 분리 시 사용된 액상 배지에 균주를 24시간 배양하였다. 배양된 균주는 0.45 µm syringe filter를 이용하여 필터 후, 필터에 걸러진 균주를 2.5% glutaraldehyde에 1시간 동안 전 고정하였다. 전 고정된 시료를 완충액(0.1 M phosphate buffered saline, pH 7.4)으로 10분씩 3회 세척한 후, 1% osmium tetroxide(pH 7.2, 0.1 M phosphate buffer)에 1시간 30분 동안 후 고정하였다. 동일한 완충용액으로 반복하여 1회 세척한 후 60%, 70%, 90%, 95%, 100%의 에탄올 용액에 각 10분씩 탈수시켰다. 준비된 시편은 임계점 건조기(HCP-2, Hitachi, Japan)를 이용하여 건조시켰다. 건조된 시료를 백금 스퍼터링을 이용하여 코팅한 후 주사전 자현미경(SEM, S-4700, Hitachi, Japan)으로 촬영하였다.

8. 분리된 균주의 생화학적 분석

옹기에서 발효된 김치로부터 분리된 우점종 균주의 생화학적 특성을 분석하기 위해 API 50 CHB kit(Biomeries, USA)를 사용하였다. 분리된 균주의 49가지 생화학적 특성을 확인

하기 위하여, 24시간 동안 각 배지에서 전 배양된 균주를 saline에 넣어 탁도가 진한 균액을 만들었다. API 50 CHB medium에 균액을 넣어 탁도를 2 McFarland로 맞춘 후 혼합액을 각 튜브에 분주하고, 30°C에서 24시간, 48시간 배양하여 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 발효 용기에 따른 김치의 pH 및 염도의 변화

발효 용기에 따른 김치의 pH 변화는 15°C에서 10일간 2일 마다 측정된 결과, Fig. 1과 같이 발효기간이 늘어남에 따라 모든 발효 용기에서 김치의 pH가 낮아지는 경향을 나타내었다. 이 같은 결과는 김치 발효 과정에 젖산균주의 효소적 활성으로 인해 유기산이 생성되기 때문이며, 보통 김치 발효기간이 길어질수록 pH가 낮아져 특유의 감칠맛과 신맛을 나타내는 원인이기도 하다. 본 실험 결과, 김치 발효 4일차에 용기 (TOV)는 pH 4.02, 밀폐 용기(PAOV) pH 4.05, 플라스틱 용기(PCV) pH 4.00, 밀폐 플라스틱 용기(PACV)는 pH 4.01로 실험된 4가지 용기는 모두 유사하게 pH가 저하되었다. 특히 용기의 경우, 김치의 pH 저하가 다른 용기에 비해 낮아져 발효 6일차에 pH 3.83, 발효 8일차에 pH 3.98, 발효 10일차에 pH 3.75로 나타내었다. 발효 10일차에 각 용기별 pH를 비교할 때 용기 pH 3.75, 밀폐 용기 pH 3.92, 플라스틱 용기 pH 3.89, 밀폐 플라스틱 용기 pH 3.99를 나타내어 용기에서 김치 발효 시 가장 낮은 pH를 보였다. 이는 용기에서 김치 발효 시 젖산균 수가 6일차부터 급증함에 따라 미생물에 의한 유기산 생산량이 높아져 pH가 낮아진 것으로 여겨진다. Lim 등(2004)은 폴리프로피렌(PP, polypropylene), 스테인리스 및 플라스틱 용기(PE, polyethylene)에 김치를 4°C 저온 발효한 결과, 31일 후에 pH는 알루미늄 용기에서 pH 4.34, 폴리프로필렌 용기(PP, polypropylene) pH 4.27, 스테인리스 용기 pH 4.29, 플라스틱 용기(PE, polyethylene) pH 4.17로 플라스틱 용기에서 가장 낮은 pH를 나타내었다고 보고한 바 있다. Lim 등(2004)은 용기를 실험 대상으로 선정하지 않았기에 본 실험 결과와 비교할 수 없으나, pH의 저하 정도를 보아 용기를 통하여 김치 발효를 한다면 다른 용기보다 유기산 축적이 더 우수할 것으로 여겨진다.

김치에서 염 농도는 삼투압 작용으로 유해 미생물 생육을 억제할 뿐만 아니라, 내염성의 젖산균이 선택적으로 성장하도록 조절하는 역할을 한다(Yu & Hwang 2011). 여러 용기에 따라 김치를 발효시키고 염분 농도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같이 초기에는 3%였으나, 발효 10일차에는 용기 2.7%, 밀폐 용기 2.6%, 플라스틱 용기 2.4%, 밀폐 플라스틱 용기 2.5%로서 발효 초기보다 약간 낮아졌다.

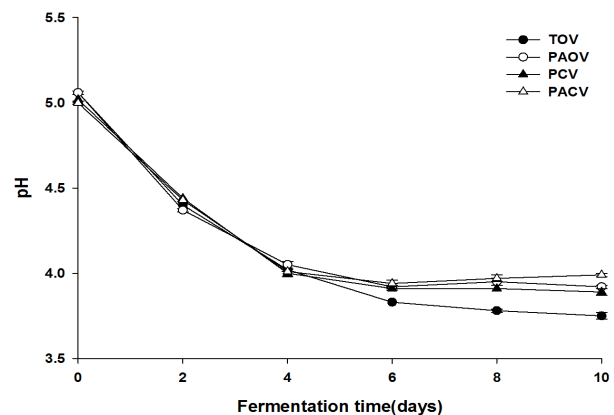


Fig. 1. The changes of pH during fermentation of kimchi at 15°C in four different fermentation vessels. ● TOV: traditional *Onggi* vessel, ○ PAOV: plastic airtight covered *Onggi* vessel, ▲ PCV: plastic covered vessel, △ PACV: plastic airtight covered vessel.

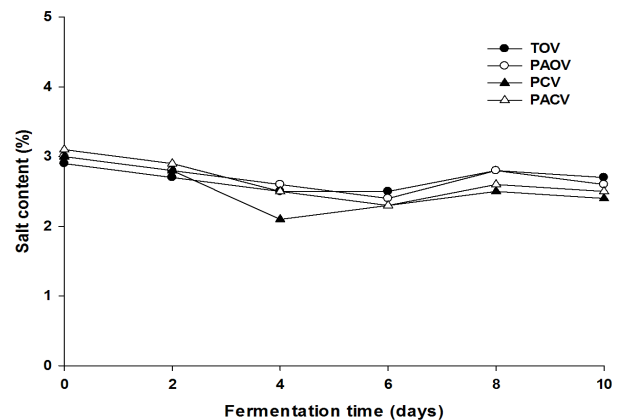


Fig. 2. The changes of salinity during fermentation of kimchi at 15°C in four different fermentation vessels. ● TOV: traditional *Onggi* vessel, ○ PAOV: plastic airtight covered *Onggi* vessel, ▲ PCV: plastic covered vessel, △ PACV: plastic airtight covered vessel.

2. 용기에 따른 김치의 총 균수 및 젖산균 변화

각각의 용기에서 김치를 발효하며 시간에 따른 총 균수 변화는 Fig. 3과 같다. 총 균수는 일반 부패 호기성 균주를 포함하므로 용기 발효 시 일반 부패 균주의 생장이 억제되어 총 균수가 다른 용기보다 적어지는 것으로 여겨진다. 본 연구에서 10일간 각 용기에 김치 발효 시, 용기는 1.2×10^9 CFU/ml, 밀폐 용기 8.2×10^9 CFU/ml, 플라스틱 용기 4.1×10^9 CFU/ml, 밀폐 플라스틱 용기에서는 6.6×10^9 CFU/ml로 측정되었다. 용기에서 발효 시 발효 2일차에는 기공율이 우수한 용기가 산소 투과율이 높아 총 세균수가 가장 많았으나, 발효 10일차에는 다른 용기보다 적어지는 경향을 나타내었다. 용기에 따른 배

추김치의 총 세균수 변화는 발효 10일차에 10^9 CFU/ml의 수준에서 6.8배 편차를 보였으며, 이 같은 결과는 Lee 등(2010)이 용기에서 식품을 발효하여 얻은 총 균수의 변화와 유사한 양상이었다. 그러나 본 실험 결과 얻은 총 균수는 혐기성 세균을 고려하지 않고 호기성 세균(aerobic bacteria)만을 측정된 결과이다. 따라서 발효 초기 김치 내 호기적 조건은 발효 과정이 진행되면서 산소가 부족한 환경으로 변하여 통성 혐기성 또는 혐기성 세균이 우점종화 될 수 있다. 그 결과 호기성 세균은 혐기성 세균들보다 상대적으로 생육이 억제되어 발효 10일차에 총 세균수는 감소하는 결과로 나타나는 경향을 보였다. 추가 실험한 김치 발효액 내 젖산균 수가 총 세균수보다 약간 많은 결과는 이러한 이유 때문인 것으로 여겨진다.

각 용기에서 발효한 김치로부터 발효시간에 따른 젖산균 수 변화는 Fig. 4와 같다. 특히 발효 6일차에 김치의 젖산균 수는 용기에서 발효된 경우 8.93×10^9 CFU/ml로 가장 많았으며, 밀폐 용기는 3.35×10^9 CFU/ml, 밀폐 플라스틱 용기는 3.20×10^9 CFU/ml, 플라스틱 용기는 1.62×10^9 CFU/ml의 세균이 측정되었다. 발효 및 숙성 10일차에는 용기의 경우 1.42×10^{10} CFU/ml로 가장 많았으며, 밀폐 용기 9.13×10^9 CFU/ml, 밀폐 플라스틱 용기 7.46×10^9 CFU/ml, 플라스틱 용기 4.93×10^9 CFU/ml로 나타났다. 용기에서 발효한 김치의 경우가 6일차부터 젖산균 수가 현저하게 증가하여 10일차에는 밀폐 용기보다 1.6배, 밀폐 플라스틱보다 1.9배, 플라스틱보다 2.9배 젖산균 수가 많았다. 김치 발효 시 총 균수와 젖산균 수에 영향을 주는 인자로는 김치 조성분, 염농도, 산소가용성(oxygen availability), 발효온도 및 pH가 가장 중요하다(Kim 등 2012). 특히 김치 내 산소가용성은 발효 초기에는 호기적 환경이나, 발효가 진행되면서 혐기적 조건으로 변한다. 이러한 변화는 젖산균의 선택적 성장을 촉진시키나, 염분 또는 낮은 pH에 약하고 호기성 세균의 생장은 억제시킨다. 따라서 김치 발효 동안 심화되는 혐기적 조건은 산화환원 전위를 지속적으로 감소시켜 호기적 세균의 생장을 억제시키는 조건이 유지된다(Cheigh and Park 1994). 본 연구에서 용기(TOV)는 김치 발효 시 젖산균 수가 총 세균수보다 상대적으로 많았다. 이는 통성혐기성 또는 혐기성 젖산균과 포자를 형성하는 *Bacillus* 균이 우점종으로 성장할 수 있는 발효 조건이 부여된 결과로 여겨진다. 또한 용기는 통기가 제한된 플라스틱 용기보다 젖산균 수가 많은 것은 적절한 통기성 때문에 발효 4-6일차부터 세균 증식에 유리한 조건 부여하는 특징 때문인 것으로 여겨진다. Chung 등(2004)은 발효 담금 용기에 따른 발효식품의 발효·숙성 시 유리 용기, PP 용기, PET 용기보다 용기에서 발효 시 젖산균 수가 많았다고 보고한 바 있다. 용기는 점토로 만들기 때문에 미세기공이 존재하고, 이곳을 통해 일정량의 공기 유입이 되어 미생물 발효에 큰 장점을 부여한다(Velraj 등 2012). 또한 용기 내 표면

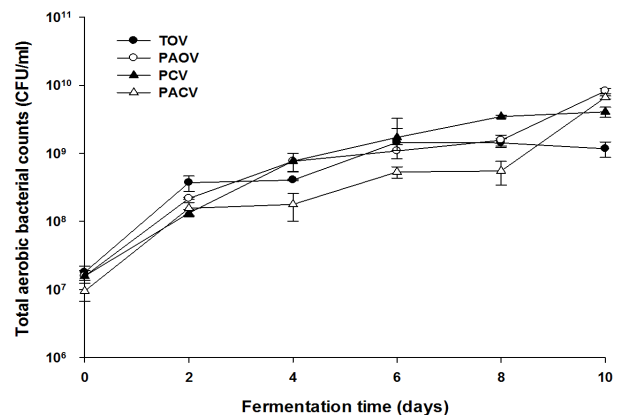


Fig. 3. Changes of total viable cell counts in kimchi fermented in each type of fermentation vessels at 15°C for 10 days. ● TOV: traditional Onggi vessel, ○ PAOV: plastic airtight covered Onggi vessel, ▲ PCV: plastic covered vessel, △ PACV: plastic airtight covered vessel.

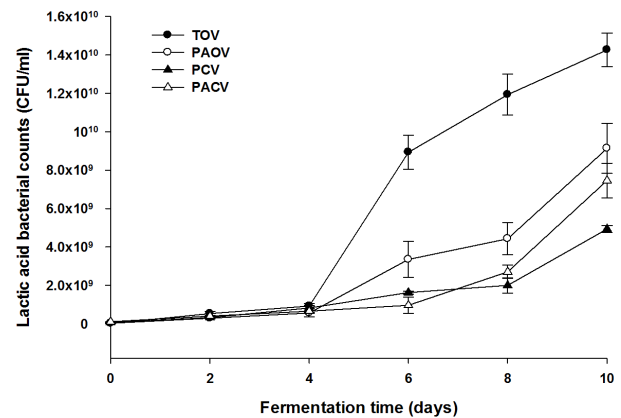


Fig. 4. The changes of predominant *Lactobacillus* sp. numbers during the production of kimchi fermentation four different types of containers. ● TOV: traditional Onggi vessel, ○ PAOV: plastic airtight covered Onggi vessel, ▲ PCV: plastic covered vessel, △ PACV: plastic airtight covered vessel.

에 존재하는 다공체는 유용한 세균이 증식하는데 미소 환경(microhabitat)을 제공하여 다른 용기에 비해 혐기성 미생물은 줄이고, 젖산균의 증식을 촉진시키는 것으로 여겨진다(Chung SK 2009; Yoo 등 2001).

3. 용기에서 발효된 김치의 우점종 세균 동정

용기에서 10일 동안 발효시킨 김치로부터 우점종을 구성하는 집락 19개를 선발하여 균주를 동정한 결과는 Table 3과 같다. 즉, nutrient agar, MRS agar, PES agar를 사용하여 김치로부터 분리한 균주에 집락의 형태 및 색상에 따라 총 19균주를 분리하였고, 16S rRNA sequencing 결과를 NCBI data base에 유전자

상동성 비교 분석 결과, 8균주가 *Bacillus subtilis*와 99%(accession no. HM753632.1), 2균주가 *B. licheniformis*와 99%(accession no. JN366748.1), 1균주가 *B. safensis*와 99%(accession no. JF411308.1), 5균주가 *Lactobacillus brevis*와 100%(accession no. JX545342.1), 3균주가 *B. pumilus*와 99%(accession no. EU594558.1)의 유전자가 일치하였다(Fig. 5). 고전적인 분류방법에 따라 김치 발효에 관여하는 우점종(predominant species)을 분류하면 주로 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus plantarum*인 것으로 알려져 왔다(Lim 등 1989). 최근 Cho 등(2006)은 분자생물학적 분류법에 따라 김치 내 젖산균 우점종을 확인한 결과, *Lb. brevis*, *Lb. sakei*, *Le. citreum*, *Le. gasicomitatum*와 *Le. gelidum* 등이 주요 젖산균이라고 보고하였다. 본 연구에서 옹기 내 김치 발효 10일차에서 우점종을 분리한 결과, 젖산균 1종(*L. brevis*)은 Cho 등(2006)의 결과와 동일하게 동정되었으나 4종의 *Bacillus* 균은 타 연구자들이 보고한 결과와 상이하하였다. 이 같은 차이는 옹기 발효 조건, 발효 용량의 최소화, 또한 10일간 발효 조건 등의 차이에 의한 것으로 사료된다. Kim 등(2012)은 15°C에서

Table 3. The dominant bacterial isolates from kimchi fermented in Onggi container

Genus	Species	Number of isolated strains ¹⁾
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>	8
	<i>B. licheniformis</i>	2
	<i>B. safensis</i>	1
	<i>B. pumilus</i>	5
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. brevis</i>	3

¹⁾ All bacteria were isolated from kimchi fermented in Onggi vessel at 10 days.

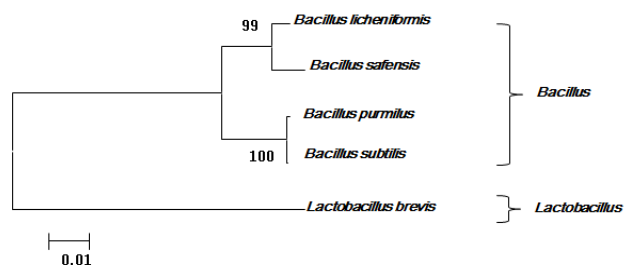


Fig. 5. The phylogenetic analysis of five predominant bacteria isolated and identified from the kimchi produced in a traditional Onggi vessel (TOV). The bacterial identification and relationship were based on 16S rRNA gene sequence analysis. The tree was created by neighbor-joining method. The numbers on the tree indicate the percentages of bootstrap based on 1,000 replication. The scale bar indicates 0.01 nucleotide substitution per nucleotide position.

김치를 배양하면 호기적 세균의 총 균수는 10일 이전부터 감소한다고 보고한 바 있다. 따라서 옹기에서의 발효 역시, 10일 이전부터 lag phase 생장기에 들어 *Bacillus* 속일 경우 spore 형성이 일어나 우점종으로 선발되었다고 사료된다. *B. subtilis*는 자연계에 널리 존재하는 세균으로서 청국장과 같은 발효식품 내에서 분리되는 유용 미생물로 알려져 있다(Cho 등 2011). *B. licheniformis*은 농업 산업에서 완두콩, 사과껍질 등에 포도당을 가수분해하는 lichenase 활성이 우수한 균이며(Chari 등 2012), *B. safensis*는 김치 발효 과정에서 분리되어지는 일반적인 균주로 보고되고 있다(Lee 등 2010). 우점종으로 분리된 *L. brevis*는 *L. mesenteroides*와 *L. plantarum*과 함께 김치 발효 과정에 주요하게 관여하는 세균이다(Rhee 등 2011). 또한 *L. brevis*는 유제품인 우유와 옥수수대를 발효시키는 probiotics로서 발효식품에서 분리되어지는 젖산간균이기도 하다(Roänkä 등 2003; Cui 등 2011). *B. pumilus*은 아프리카 콩을 발효시키는 starter로서 제시되고 있다(Ouoba 등 2004). 분리된 모든 균주는 발효 관련 미생물로서 김치뿐만 아니라, 다양한 발효식품에서 starter 및 산업적으로 유용한 미생물들이다.

4. 옹기에서 발효된 김치의 우점종 균주의 형태학적 특성

옹기에서 발효된 김치로부터 가장 많이 분리된 젖산 간균인 *L. brevis*의 형태적 특성을 알아보기 위해 주사전자 현미경으로 확인한 결과, Fig. 6과 같다. 균의 형태는 운동성기구가 없는 간균 형태로 평균 크기는 2.5×0.4 μm이었다.

5. 옹기에서 발효된 김치의 우점종 균주의 생화학적 특성

옹기에서 발효 숙성된 김치로부터 분리된 우점종 가운데

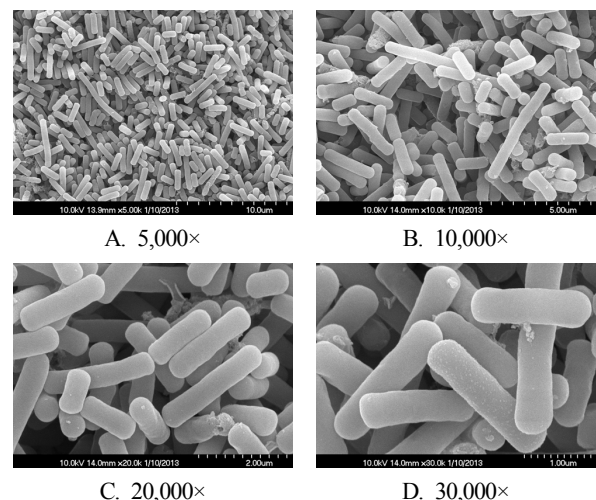


Fig. 6. A scanning electron micrograph of *L. brevis* strain isolated from kimchi. Picture was taken using a field emission scanning electron microscope.

Table 4. Biochemical characteristics of predominant bacteria isolated from kimchi fermented in traditional fermentation vessels, Onggi

Characteristics	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus safensis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Bacillus pumilus</i>
GLYcerol	+	+	+	+	+
ERYthritol	+	+	-	+	-
D-ARAbinose	+	+	-	+	-
L-ARAbinose	+	+	+	+	+
RIBose	+	+	+	+	+
D-XYLose	+	+	+	+	+
L-XYLose	+	+	-	+	-
ADOnitol	+	+	-	+	-
Methyl-B-D-Xylopyranside	+	+	-	+	-
GALactose	+	+	+	+	-
GLUcose	+	+	+	+	+
FRUctose	+	+	+	+	+
MaNnose	+	+	+	+	+
SorBosE	+	+	-	+	-
RHAMnose	+	+	-	+	+
DULcitol	+	+	-	+	-
INOSitol	+	+	-	+	-
MANnitol	+	+	+	+	+
SORbitol	+	+	-	+	-
Methyl- α , D-Mannopyranside	+	+	+	+	+
Methyl- α , D-Glucoside	+	+	+	+	+
N-Acethyl-Glucosamine	+	+	+	+	+
AMYgdalin	+	+	+	+	+
ARButin	+	+	+	+	+
ESCulin	+	+	+	+	+
SALicin	+	+	+	+	+
CELlobiose	+	+	+	+	+
MALtose	+	+	+	+	+
LACTose	+	+	+	+	-
MELibiose	+	+	-	+	-
Sucrose	+	+	+	+	+
TREhalose	+	+	+	+	+
INUlin	+	+	-	+	-
MeLeZitose	+	+	-	+	-
RAFfinose	+	+	-	+	-
Starch	+	+	-	+	-
GLYcoGen	+	+	-	+	-
XyLitol	+	+	-	+	-
GENTIobiose	+	+	+	+	+
D-TURanose	+	+	+	+	+
D-LYXose	+	+	-	+	-
D-TAGatose	+	+	+	+	+
D-FUCose	+	+	-	+	-
L-FUCose	+	+	-	+	-
D-ARabitoL	+	+	-	+	-
L-ARabitoL	+	+	-	+	-
GlucoNaTe	+	+	+	+	+
2-keto-Gluconate	+	-	-	-	-
5-keto-Gliconate	+	+	+	+	-

¹⁾ API CHB kit was used. ²⁾ Symbols: +, positive reaction; -, negative reaction.

분리된 5균주의 생화학적 특성 검사는 API CHB kit를 사용하여 49가지의 생화학적 특성을 확인하였다(Table 4). *B. subtilis*는 모든 항목에서 양성 반응을 보였고, *B. licheniformis*, *L. brevis*는 2-keto-gluconate 제외한 모든 항목에서 양성으로 나타났다. *B. safensis* 균주는 26가지 항목에서는 양성, *B. pumilus* 균주는 24가지 항목에서 양성을 나타내었다. 분리된 5균주 중 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *L. brevis*는 대부분의 carbohydrates 발효에 관여하는 것으로 나타났다.

요약 및 결론

본 연구는 한국의 전통 김치 발효 용기인 옹기의 발효 효과를 알아보기 위해 다른 용기와 비교 실험하였다. 옹기, 밀폐 옹기, 플라스틱 용기, 밀폐 플라스틱 용기를 사용하여 15°C에서 10일간 김치 발효 중 미생물학적 변화 및 품질에 미치는 영향을 확인한 결과, 옹기는 발효 6일차부터 젖산균 수가 다른 용기에 비해 현저한 증가를 보였으며, 발효 10일차에는 1.42×10^{10} CFU/ml로 가장 많은 균수를 나타내었다. 젖산균의 증가가 우수한 발효 용기 순서는 옹기, 밀폐 옹기, 밀폐 플라스틱 용기, 플라스틱 용기 순으로 높았다. 옹기에서 발효된 김치로부터 분리한 우점종은 5균주로 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. safensis*, *L. brevis*, *B. pumilus* 모두 발효식품에서 분리되어지는 균들로 확인되었다. 이 같은 결과로 볼 때 옹기는 김치 발효 시 젖산균을 증가시키는데 우수한 용기이며, 특히 *L. brevis* 같은 probiotics의 생육을 촉진하여 김치 내 유해 세균의 억제, 섭취 시 정장 효과를 얻을 수 있는 용기인 것으로 확인되었다.

Reference

- Bae JW, Rhee SK, Park JR, Chung WH, Nam YD, Lee I, Kim H, Park YH. 2005. Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71:8825-8835
- Chaari F, Kamoun A, Bhiri F, Blibech M, Ellouz-Ghorbel R, Ellouz-Chaabouni S. 2012. Statistical optimization for the production of lichenase by a newly isolated *Bacillus licheniformis* UEB CF in solid state fermentation using pea pomace as a novel solid support. *Ind Crops Prod* 40:192-198
- Cheigh HS, Park KY. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 34:175-203
- Cho EJ, Lee SM, Rhee SH, Park KY. 1998. Studies on the standardization of Chinese cabbage kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 30:324-332
- Cho JH, Lee DY, Yang CN, Jeon JI, Kim JH, Han HU. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiol Lett* 257:262-267
- Cho KM, Lee JM, Yun HD, Byung YA, Kim H, Seo WT. 2011. Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolic acids) during *cheonggukjang* soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. *J Food Comp and Analysis* 24:402-410
- Chung SK, Kim YS, Lee DS. 2005. Effects of vessel on the quality changes during fermentation of *Kochujang*. *Kor J Food Preserv* 12:292-298
- Chung SK, Lee KS, Cho SH. 2004. Effect of fermentation vessel on quality of anchovy soy sauce. *Kor J Food Preserv* 11:233-239
- Chung SK. 2009. Effect of new and reused *Onggis* on the quality of *Gochujang* as fermentation container. *J Korea Soc Packag Sci & Tech* 15:55-60
- Cui F, Li Y, Wan C. 2011. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. *Bioresour Technol* 102:1831-1836
- Kebede A, Viljoen BC, Gadaga TH, Narvhus JA, Lourens-Hattingh A. 2007. The effect of container type on the growth of yeast and lactic acid bacteria during production of Sethemi, South African spontaneously fermented milk. *Food Research International* 40:33-38
- Kim HJ, Kwon MJ, Seo JM, Kim JK, Song SH, Suh HS, Song YO. 2004. The effect of 3-(4'-hydroxyl-3',5'-dimethoxyphenyl) propionic acid in Chinese cabbage kimchi on lowering hypercholesterolemia. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:52-58
- Kim JH, Ryu JD, Song YO. 2002. The effect of kimchi intake on free radical production and the inhibition of oxidation in young adults and the elderly people. *Korean J Community Nut* 7:257-265
- Kim JS, Bang JH, Beuchat LR, Kim HK, Ryu JH. 2012. Controlled fermentation of kimchi using naturally occurring antimicrobial agents. *Food Microbiol* 32:20-31
- Kim MJ, Kwon MJ, Song YO, Lee EK, Youn HJ, Song YS. 1997. The effects of kimchi on hematological and immunological parameters *in vivo* and *in vitro*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26:1208-1214
- Lee EJ, Park SE, Choi HS, Han GJ, Kang SA, Park KY. 2010. Quality characteristics of kimchi fermented in permeability-

- controlled polyethylene containers. *Korean J Food Preserv* 17:793-799
- Lee M, Cho KH, Han ES, Lee JH. 2010. Bacterial diversity in the initial fermentation stage of Korean and Chinese kimchi. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38:207-215
- Lim CT, Park HK, Han HU. 1989. Reevaluation of isolation and identification of gram positive bacteria in kimchi. *Kor J Microbiol* 27:404-414
- Lim JW, Moon JS, Kim HD, Na DJ, Son JY. 2004. Changes quality characteristics of Kimchi by storage containers. *Korean J Food & Nutr* 17:80-85
- Ouoba LI, Diawara B, Amoa-Awua WK, Traoré AS, Møller PL. 2004. Genotyping of starter cultures of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce Soumbala. *Int J Food Microbiol* 90:197-205
- Park JA, Heo GY, Lee JS, Oh YJ, Kim BY, Mheen TI, Kim CK, Ahn JS. 2003. Change of microbial communities in kimchi fermentation at low temperature. *Kor J Microbiol* 39:45-50
- Rhee SJ, Lee JE, Lee CH. 2011. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microbial Cell Factories* 10:55-68
- Roänkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. 2003. Probiotic and milk technological properties of *Lactobacillus brevis*. *Int J Food Microbiol* 83:63-74
- Ryu BM, Ryu SH, Lee YS, Jeon YS, Moon GS. 2004. Effect of different kimchi diets on oxidation and photooxidation in liver and skin of hairless mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:291-298
- Sheo HJ, Seo YS. 2003. The antibacterial action of Chinese cabbage kimchi juice on *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Enterobacter cloacae*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32:1351-1356
- Sheo HJ, Seo YS. 2004. The effects of dietary Chinese cabbage kimchi juice on the lipid metabolism and body weight gain in rats fed high-calories-diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33:91-100
- Shin KS, Chae OH, Park IC, Hong SI, Choe TB. 1998. Antitumor effects of mice fed with cell lysates of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean J Biotechnol Bioeng* 13:357-363
- USA Health magazine. <http://eating.health.com>. 2013.2.28. 방문
- Velraj G, Ramya R, Hemamalini R. 2012. FT-IR spectroscopy, scanning electron microscopy and porosity measurements to determine the firing temperature of ancient megalithic period potteries excavated at Adichanallur in Tamilnadu, South India. *J Mol Struct* 1028:16-21
- Yoo SM, Kim JS, Shin DH. 2001. Quality changes of traditional *Doenjang* fermented in different vessels. *J Korean Soc Agric Chem Biological* 44:230-234
- Yu KW, Hwang JH. 2011. Fermentative characteristics of low-sodium kimchi prepared with salt replacement. *Korean J Food & Nutr* 24:753-760

접 수 : 2013년 3월 5일
 최종수정 : 2013년 5월 29일
 채 택 : 2013년 6월 4일