

# 김치에 서식하는 Gram 양성세균의 분리 및 동정의 재평가

임종락 · 박현근 · 한홍의  
인하대학교 이과대학 생물학과

## Reevaluation of Isolation and Identification of Gram-Positive Bacteria in Kimchi

Lim Chong-Rak, Hyun-Kun Park and Hong-Ui Han

Department of Biology, College of Science, Inha University

**ABSTRACT:** Attempts were made to isolate and identify Gram-positive or lactic acid bacteria in Kimchi fermentation. Species diversity depended on isolation media and temperatures, and diversity tended to be reduced with decrease of temperature. MRS and KM (natural medium prepared from Kimchi materials) were suitable respectively for isolation and present number of species. Identification of isolates was performed by dichotomous identification schemes arranged on the basis of Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986). Gram-positive bacteria isolated at different temperatures (5, 15, 25°C) were 5 species of *Leuconostoc*, 4 species of *Streptococcus*, 3 species of *Pediococcus*, 2 species of *Bacillus* and 18 species of *Lactobacillus*. Species with high frequency of appearance were *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* at 25°C, *L. plantarum*, *Lactobacillus fructosus*, *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* at 15°C and *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Lactobacillus multaromicus* at 5°C. In general, Kimchi fermentation was achieved by *Lactobacillus* spp. (59.7% frequency) at 25°C and *Leuconostoc* spp. (65.2% frequency) at 5°C. *Pediococcus cerevisiae* and *Streptococcus faecalis* which have been so far known as bacteria of Kimchi fermentation were not isolated.

**KEY WORDS** □ Kimchi, dichotomous identification, lactic acid bacteria

김치류는 소금에 절인 배추와 무우에 각종 양념들을 혼합하여 일정기간 동안 발효를 시킨 식품이며, 주로 젖산을 생성함으로 일종의 산 발효식품이라 규정하였다(조, 1988; 최, 1987). 그리고 이 등(1970)은 김치발효 재료자체의 효소에 의한 것이 아니라 미생물의 작용에 의한 발효임을 확인하였다. 그러므로 김치발효의 제반문제점을 해결하기 위해서는 김치발효에 역할을 하는 미생물에 대한 체계적이며 정확한 세균의 분리동정이 우선되어야 한다. 그러나 1930년 경부터 시작된 김치에 대한 연구 중에서 김치의 맛, 성분분석, 산패 등에 비해 김치미생물의 분리동정은 많지 않다(조, 1979).

지금까지 김치미생물의 분리 및 동정방법은 그

체계성이 결여되었다고 할 수 있다. 첫째, 김치의 발효온도와 분리배지의 배양온도가 서로 일치하지 않았다. 즉, 김치의 발효온도가 5°C 또는 냉장실의 온도였으나, 분리배지의 배양온도는 30°C 이상인 경우가 보고되어 있다. 둘째, 사용한 배지에 따라 선택적인 분리가 일어날 수 있으나, 김치미생물 분리에 적절한지를 검토없이 임의의 배지를 사용하여 오고 있다. 셋째, 분리된 집락(colony) 중 그 일부만을 동정하였다. 넷째, 체계적인 동정표를 작성하지 않고, 몇 가지 성질을 이용하여 단편적으로 비교하여 동정하였다(민 등, 1984; 조 등, 1988).

따라서 김치에서 미생물의 분리동정을 체계적으로 실험하여 김치에 서식하는 미생물의 재평가가

필요하다. 그러므로 본 연구에서는 위와 같은 분리동정의 문제점을 제거하기 위하여 발효온도를 달리하며 각각 다른 분리배지를 사용하여 김치발효에 직접 관계되는 Gram 양성세균들을 분리동정하였다.

## 재료 및 방법

### 김치발효조 성분 및 온도조절

**발효조:** 김치발효조는 실험과정 중 내부를 육안으로 관찰할 수 있게 하기 위하여 투명 아크릴관으로 제작하였다. 아크릴관의 지름이 13 cm와 15 cm인 두 개의 관으로 이중관을 만들어 관 사이에는 온도조절 냉각수가 흐를 수 있도록 제작하였다. 또한 아크릴관의 높이는 33 cm로 하였으며, 시료채취를 위해 발효조의 상, 중, 하에 시료채취구를 설치하였다. 발효 중에 발생하는 기체가 외부로 방출되도록 뚜껑에는 공기출입구를 설치하였고, 외부공기의 유입으로 인한 오염을 방지하기 위해 공기출입구에는 솜마개를 끼워 놓았다. 배추가 김치액에 잠기도록 아클릴로 누르개를 만들어 김치발효조 내부에 설치하였다.

**김치 구성성분:** 김치재료는 배추 100g 당 파, 마늘, 고춧가루를 1.5%에 해당되는 1.5g을 각각 넣었으며, 각 재료는 학교 주위의 소매점에서 구입하였다. 소금농도는 2.5%가 되게 하였으며, 김치발효 중 김치국물을 세균분리용 시료로 채취하기 위하여 배추가 발효액에 잠길 수 있도록 배추 무게의 반에 해당되는 소금물을 발효조에 넣었다.

**온도 조절:** 본 실험에서 김치발효온도는 상온에 해당되는 25°C와 일반적으로 겨울 김장철과 냉장고의 냉장실에 해당되는 5°C 그리고 이 두 온도의 중간인 15°C로 선택하였다. 25°C와 15°C의 온도조절은 항온 배양기를 이용하였고, 5°C는 온도조절 순환기(LKB 2219 Multitemp II Thermostatic circulator)를 이용하여 김치발효조의 이중관 사이로 냉각수가 순환되게 하였다. 온도의 확인은 각각의 발효조 내부에 수은 온도계를 넣어서 외부에서 육안으로 온도를 확인하였다.

### 분리배지

김치발효 중 세균의 분리에 이용한 배지는 5가지로서, 이들 중 2가지는 일반적으로 젖산균의 분리에 선택배지로 이용되는 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe agar)와 TGY(Tryptone Glucose Yeast extract agar) 배지이고, 한 가지

는 일반세균의 배양배지로 많이 이용된 NA (Nutrient agar)이며 (Difco manual, 1984), 나머지 2가지는 자연배지에 해당되는 것으로서, 하나는 김치재료 성분을 실험에 사용한 동일한 비율로 섞은 후 jucer(삼성 J500)로 갈아 얻은 용액에 한천을 넣어 만든 비발효김치 배지인 KM (Kimchi material agar)이며, 다른 하나는 김치 발효액을 반으로 희석한 발효김치 배지인 KF (Kimchi fermented-liquor agar)이었다.

KF 배지를 준비할 때에는 김치발효액의 pH 저하(약 pH 4.0 이하)로 고체배지를 만들기 위해 넣은 한천이 고압멸균술으로 멸균할 때, 산 가수분해가 일어나 고체배지가 만들어지지 않으므로, 김치발효액과 한천용액을 각각 분리하여 멸균한 후, 약 60°C로 식힌 후 무균적으로 혼합하여 고체배지를 만들었다.

### 세균의 분리 및 생화학적 시험

**분리:** 발효과정의 군집 (community)의 변화는 Gram 염색하여 직접 현미경계수법 (direct microscopic count : DMC)으로 세균수의 증감을 관찰하면서 (장 등, 1987), 25°C에서는 15일간 발효하여 11회, 15°C에서는 30일간 발효하여 10회, 5°C에서는 60일간 발효하여 9회 시료를 채취하였다. 채취한 시료는 멸균증류수에 희석한 후 준비된 5가지 분리배지마다 3개의 petri dish에 도말한 후 각 발효온도와 동일한 온도에서 배양하여 생장된 집락 (colony)을 분리하였다. 집락은 색깔, 모양, 크기 등으로 구별하였고, 평판배지 상에 나타난 집락을 해부현미경하에서 관찰하여, 최대 한도로 구별이 가능한 모든 집락을 분리하였다. 이런 특징으로 구별, 분리된 집락은 각각의 사면 (slant) 배지에 또는 MRS 사면배지에 계대배양하며 실험에 사용하였다.

**성질시험 및 동정:** 김치에서 분리된 Gram 양성세균의 동정에 사용된 생화학적 성질은 Manual of methods for general bacteriology (Gerhardt, P. et al., 1981)와 Methods in Microbiology vol.16 (Bergan, 1984)에 의해 실험하였다. 생화학적 및 형태실험의 종류는 Table 1, 1-1, 1-2, 1-3과 Table 2, 2-1에 수록하였다.

분리균의 동정은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology vol.2 (Sneath, et al., 1986)에 의하여 작성된 이분동정표에 의하여 이루어졌다. 이분동정표 (dichotomous identification scheme)의 유의성의 검토와 성질시험의 표준성을 확인하기 위하여 *Bacillus cereus* ATCC 12480, *Bacil-*

*lus macerans* ATCC 8244, *Leuconostoc mesenteroides* KFCC 35471, *Streptococcus faecalis* KFCC 11729, *Pediococcus acidilactici* KFCC 11728, *Lactobacillus plantarum* KFCC 11322, *Lactobacillus brevis* KFCC 35464 를 한국 유전자 은행과 종균협회로부터 구입하여 비교 실험하였다.

## 결과 및 고찰

### 동정표와 그 유의성

분리된 세균의 동정은 일반적으로 Bergey's manual 을 기준으로 삼고 있으며, 동정이 곤란할 경우 기타 문헌을 참고로 하여 최종적인 동정을 하고 있다. 동정에 제시된 많은 성질 중 어떤 성질은 모든 속과 종(genus and species)을 구별하는데 이용할 수 있으나 그렇지 않은 성질도 포함되어 있다. 그러므로 동정과정은 상당한 시간이 필요하므로, 이를 해결하기 위하여 간단하고 유의성있는 동정표 작성이 요구된다.

동정(identification)이란 분리된 미생물이 이미 확정되고 이름지어진 분류군(taxa)들 중 어느 하나에 속하는가를 확인하는 과정이라 하였다. 이 목적을 달성하기 위하여 흔히 동정표를 작성하여 이용하는데 작성에 필요한 조건들은 1) 어떤 군(group)은 갖고 있으며, 다른 군은 갖지 않은 성질들을 조합해야 하고, 2) 하나 혹은 둘 이상의 성질을 선택할 수 있고, 3) 유전정보와 연관된 표현적 성질(phenotic characters)을 선택해야 하고, 쉽게 실험결과를 얻을 수 있어야 하며, 4) 선택된 성질은 널리 사용되고 있는 것이어야 한다고 하였다(Sneath, *et al.*, 1986). 그리고 동정표에 이용되는 성질을 yes 와 no 로 표시할 때 이분동정표(dichotomous identification key)라 하였다(Starr, *et al.*, 1981).

이분동정표의 예는 Bergey's manual of Systematic Bacteriology 의 제 1권(Krieg, *et al.*, 1984) 중에서 *Bacteroides*, *Fusobacterium* 속의 종동정, 제 2권(Sneath, *et al.*, 1986) 중에서 *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Eubacterium* 속의 종동정, 그리고 제 3권(Staley, *et al.*, 1989) 중에서 4개의 속과 2개의 종동정이 있다. 임 등(1988)은 대마침지 중 분리균을 동정하기 위하여 Enterobacteriaceae 과의 이분동정표를 제시하였고, 이 등(1989)은 용균 *Bacillus* 속의 종을 동정

하기 위하여 이분동정표를 이용하였다. 그러나 Gram 양성균이며, 유산균에 속하는 *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus* 등의 속과 이들에 속하는 종의 이분동정표는 제시된 바가 없다.

본 연구에 사용한 Gram 양성 혹은 유산균의 이분동정표는 Bergey's manual 제 2권(Sneath, *et al.*, 1986)을 근거로 하여 작성하였다. 동정에 사용된 성질(characters)은 90% 이상의 값을 갖는 양성(+) 및 음성(-)을 선택하였고 또한 실험이 용이한 것을 대체적으로 선택하였다. 작성방법은 1) 어떤 속과 종이 공통적으로 모두 시험된 성질들 중에서 양성과 음성만으로 이분될 수 있는 성질을 선별하였다. 2) 이분될 수 있는 성질이 한 개 이상일 경우에는 가능한한 속과 종이 대별되는 성질을 택하였다. 3) 어떤 속과 종이 d(20-80%) 값을 포함하여 양성 및 음성성질만으로 이분되지 않을 경우는 1개의 d 값이 포함되도록 하였다. 4) 어떤 하나의 성질에 의하여 양성과 음성으로 이분된 한 쪽 즉 양성 혹은 음성성질은 위와 같은 방법으로 다시 이분하였다. 5) 이와 같이 이분법은 최종적으로 종(species)을 확정할 때까지 반복하였다. 김치에서 분리된 Gram 양성균은 Bergey's manual 제 2권(Sneath, *et al.*, 1986) 중에서 Gram 양성구균(section 12), 내생포자형성 Gram 양성간균과 구균(section 13) 그리고 포자불형성 Gram 양성 규칙적 간균(section 14)에 속하였다. 내생포자형성 Gram 양성 간균과 구균에 속하는 *Bacillus* 속의 동정은 이 등(1989)을 참조하였다. Gram 양성구균에 속하는 15개 속을 구별하는 이분동정표는 Table 1 과 같다. 김치의 분리균들은 *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속들로 동정되었고, 이들 각각의 종동정표는 Table 1-1, 1-2, 1-3 과 같다. 그 다음 포자불형성 Gram 양성 규칙적 간균에 속하는 7개 속의 이분동정표는 Table 2 와 같다. 김치의 분리균은 *Lactobacillus* 속으로 동정되었고, 이 속의 종동정표는 Table 2-1 과 같다. 즉 김치에서 분리된 세균들은 유산균인 *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 그리고 *Lactobacillus* 의 4개 속과 *Bacillus* 속으로 동정되었다.

Bergey's manual 에 의하면 Table 1-1 에서 보는 바와 같이 *Leuconostoc* 속에 속하는 4개의 종 중에서 *L. mesenteroides* 는 3개의 아종(subspecies)으로 분류하였으며, 이들을 동정하기 위하

**Table 1.** Dichotomous identification scheme of genera in Grampositive Cocci (Section 12)

1. Gram stain +2, - <i>Gamella</i>
2. Oxygen requirements
Aerobes; 3
Facultative anaerobes; 5
Anaerobes; 10
3. Cellular arrangements
Clusters, tetrads; <i>Micrococcus</i>
Pairs, tetrad; 4
4. Mol% G + C of DNA
39-52%; <i>Planococcus</i>
65-70%; <i>Deinococcus</i>
5. Catalase +6, -7
6. Capsule formation + <i>Stomatococcus</i> , - <i>Staphylococcus</i>
7. Glucose anaerobic fermentation
Acid/gas; <i>Leuconostoc</i>
Acid/No gas; 8
8. Cellular arrangement
Chains, pairs; <i>Streptococcus</i>
Pairs, tetrads; 9
9. Greening reaction on blood agar (due to Hydrogen peroxide) + <i>Aerococcus</i> , - <i>Pediococcus</i>
10. Cell shape
Regular cocci; 11
Irregular cocci; 12
11. Cellular arrangement
Chains, pairs; <i>Streptococcus</i>
Cuboidal packets; <i>Sarcina</i>
12. Peptone fermented + 13, - 14
13. Mol% G + C of DNA
27-45%; <i>Peptostreptococcus</i>
50-51%; <i>Peptococcus</i>
14. Glucose fermentation
Acid/gas; 15
Acid or No acid/No gas; <i>Peptostreptococcus</i>
15. Butyrate or longer carbon-chained acids produced + <i>Coprococcus</i> , - <i>Ruminococcus</i>

여 제시된 11개의 성질 중에서 4개의 성질을 선택하고, Table 1-2에서는 *Streptococcus* 속에 속하는 29개의 종을 동정하기 위하여 제시된 65개의 성질 중에서 19개의 성질을 선택하고, Table 1-3

**Table 1-1.** Dichotomous identification scheme of species in Genus *Leuconostoc*

1. Acid from sucrose +2, - 5
5. Dextran formation +3, - 4
3. Acid from arabinose
+ <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ,
- <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
4. Acid from trehalose + <i>L. paramesenteroides</i> ,
- <i>L. lactis</i>
5. Acid from trehalose (fructose) + <i>L. oenos</i> ,
- <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>

에서는 *Pediococcus* 속에 속하는 8개의 종을 동정하기 위하여 제시된 33개의 성질 중에서 7개의 성질을 선택하고, 그리고 Table 2-1에는 *Lactobacillus* 속의 44개 종을 동정하기 위하여 44개의 성질 중에서 22개의 성질을 택하여 이분동정표를 작성하였다. 이들 표에 의하여 동정된 종명은 Table 3에서 보는 바와 같다.

이렇게 작성된 이분동정표의 유의성을 검토하고, 성질시험의 표준성을 확인하기 위하여 김치발효 중 분리한 Gram 양성세균과 같은 속에 속하는 기지의 세균 *Bacillus cereus* ATCC 12480, *Bacillus macerans* ATCC 8244, *Leuconostoc mesenteroides* KFCC 35471, *Streptococcus faecalis* KFCC 11729, *Pediococcus acidilactici* KFCC 11728, *Lactobacillus plantarum* KFCC 11322, *Lactobacillus brevis* KFCC 35464를 한국 유전자은행과 종균협회로부터 구입하여, 본 연구에서 작성한 이분동정표에 의하여 비교 실험하였다. 그 결과 동일한 종명으로 동정되었으므로 작성된 이분동정표가 유의성이 있음을 확인하고, 아울러 실험의 표준성도 확인하였다.

Table 2-1의 번호 1, 2와 같이 각각 4개와 2개의 균을 구별하는데 2~3개의 성질을 같이 이용하므로서 정확도를 높일 수 있었다. 각 동정표에서 중복되게 사용된 특성의 수는 *Leuconostoc*에서는 1개 *Streptococcus*에서는 5개, *Lactobacillus*에서는 17개이었다 (Table 1-1, 1-2, 1-3, 2-1). 따라서 성질실험을 중복하여 사용함으로써 성질실험의 수와 종류를 감소시킬 수 있는 것이 특징적이었다. 더불어 동정시간도 감소시킬 수 있었다. 본 연구실의 경험으로 한명이 300개 집락을 동정하는데 약 1개월이 소요되었다.

본 이분동정표에 수록된 성질 이외의 여러 종류

**Table 1-2.** Dichotomous identification scheme of species in Genus *Streptococcus*

1. Growth at 10°C +2, -11	17. Hydrolysis of arginine + <i>S. rattus</i> , -18
2. Growth at 45°C +3, -6	18. Production of hydrogen peroxide + <i>S. sobrinus</i> , -19
3. Reduction of tetrazolium +4, -5	19. Fermentation of raffinose +20, - <i>S. ferus</i>
4. Acid from L-arabinose + <i>S. gallinarum</i> , - <i>S. faecalis</i>	20. Mol% of G + C of DNA 36-38% <i>S. mutans</i> , 42-44% <i>S. cricetus</i>
5. Ammonia from arginine + <i>S. faecium</i> , - <i>S. avium</i>	21. Hippurate hydrolysis +22, -23
6. Esculin hydrolysis +7, -10	22. Arginine dihydrolase + <i>S. agalactiae</i> , - <i>S. acidominimus</i>
7. Acid from mannitol +8, -9	23. $\beta$ -hydrolysis +24, -25
8. Acid from sorbitol + <i>S. uberis</i> , - <i>S. iniae</i>	24. Acid from lactose + <i>S. pyogenes</i> , - <i>S. equi</i>
9. Acid from raffinose + <i>S. raffinolactis</i> , - <i>S. lactis</i>	25. Arginine dihydrolase +26, -27
10. Fermentation of trehalose + <i>S. agalactiae</i> , - <i>S. lactis</i>	26. Acid from raffinose + <i>S. pneumoniae</i> , - <i>S. sanguis</i>
11. Obligate anaerobes +12, -15	27. Esculin hydrolysis +28, - <i>S. mitior</i> , <i>S. thermophilus</i>
12. Acid from fructose +13, -14	28. Acid from inulin + <i>S. salivarius</i> , <i>S. bovis</i> , -29
13. Acid from lactose + <i>S. parvulus</i> , - <i>S. pleomorphus</i>	29. Starch into oligosaccharide + <i>S. equinus</i> , - <i>S. bovis</i>
14. Acid from lactose + <i>S. hansenii</i> , - <i>S. mobillorum</i>	
15. Carbon dioxide requirement +16, -21	
16. Fermentation of mannitol +17, - <i>S. milleri</i>	

**Table 1-3.** Dichotomous identification scheme of species in Genus *Pediococcus*

1. Growth at 40°C +2, -3
2. Growth at pH 4.2 +4, -5
3. Growth at pH 4.2 +6, -7
4. Acid from maltose + <i>P. pentosaceus</i> , - <i>P. acidilactici</i>
5. Acid from starch + <i>P. dextrinicus</i> , - <i>P. urinaequi</i>
6. Growth at 35°C + <i>P. damnosus</i> , - <i>P. parvulus</i>
7. Growth at 18% NaCl + <i>P. halophilus</i> , - <i>P. inopinatus</i>

의 성질시험 결과가 Bergey's manual에 제시된 성질의 시험결과와 일치되지 않는 경우도 발생되었는데, 그 유의성은 약 80% 정도였다. 그리고 이분동정표도 90%의 유의성을 갖고 작성되었으므로 10%의 오차가 생길 가능성도 배제할 수 없다. 그러므로 이러한 오차를 줄이거나 또는 동정표에 선택된 성질의 실험표준성을 증대시키기 위해 이미 알려진 또는 이미 동정되어 있는 비교균주를 이용하여 작성된 이분동정표의 성질대로 시험하여 동일한 증명을 확인하므로써 본 동정표의 유의성을 확인할 수 있고, 또한 특성시험의 표준성을 증대시킬 수 있다. 그러나 이러한 오차범위에도 불구하고 비교균주의 시험에서 동일한 증명으로 동

**Table 2.** Dichotomous identification scheme of genera in Regular, Nonsporeing Gram-Positive Rods (Section 14)

1. Oxygen requirements	Facultative anaerobes; 2 Aerobes; 3
2. Catalase +4, -5	
3. Mol% G + C of DNA	36-38%; <i>Kurthia</i> 41-46%; <i>Caryophanon</i> 53%; <i>Rcnibacterium</i>
4. Motility(20-25°C) + <i>Listeria</i> , - <i>Brochothrix</i>	
5. Hydrogen sulfide product + <i>Erysipelothrix</i> , - <i>Lactobacillus</i>	

정된 것에 대해서는 앞으로도 많은 검토가 필요하리라 생각된다.

김치로부터 분리한 젖산균을 동정하는데 이용한 일반적인 성질로는 세균의 모양, 발효형태 그리고 dextran 형성여부로서의 3가지 성질만을 비교하여 *L. plantarum*, *L. brevis*, *S. faecalis*, *P. cerevisiae*, *L. mesenteroides* 그리고 젖산을 소량생성하는 *Lactobacillus*로 구분 동정하였다(민 등, 1984;

Table 2-1. Dichotomous identification scheme of species in Genus *Lactobacillus*

1. Growth at 15/45 °C +/- 20, -/+ 3, +/- 2, -/- 51	27. Sucrose + <i>L. minor</i> , - <i>L. halotolerans</i>
2. Lactose, trehalose/xylose +/- <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> -/+ <i>L. confusus</i>	28. Melibiose + 31, -29
3. Ammonia from arginine +4, -9	29. Xylose + <i>L. hilgardii</i> , -30
4. Salicin +5, -7	30. Mannitol + <i>L. kandleri</i> , - <i>L. fructivorans</i>
5. Lactose + <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , -6	31. Melezitose + <i>L. buchneri</i> , -32
6. Mol% G+C of DNA 35-37% <i>L. jensenii</i> , 40-41% <i>L. amylovorus</i>	32. Xylose +33, -34
7. Lactose +8, - <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	33. Cell shape Single, short chain; <i>L. brevis</i> Long- filament, palisades irregular clump; <i>L. Collinoides</i>
8. Mannose + <i>L. fermentum</i> , - <i>L. reuteri</i>	34. Mol% G+C of DNA 41-42% <i>L. kefir</i> 44-47% <i>L. brevis</i>
9. Ribose +10, -11	35. Ribose +36, -44
10. Arabinose/melezitose -/+ <i>L. agilis</i> +/- <i>L. murinus</i>	36. Sucrose +37, -42
11. Sucrose +13, -12	37. Melibiose +38, -41
12. Galactose + <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgarius</i> , - <i>L. helveticus</i>	38. Mannitol +39, -40
13. Mannose +14, - <i>L. salivarius</i>	39. Raffinose + <i>L. plantarum</i> , - <i>L. maltaromicus</i>
14. Melibiose, Raffinose +15, -16	40. Trehalose + <i>L. sake</i> , - <i>L. bavaricus</i>
15. Mol% G+C DNA 33-37% <i>L. acidophilus</i> , <i>L. vitulinus</i> , <i>L. gasseri</i> 41-44% <i>L. animalis</i> 44-47% <i>L. ruminis</i>	41. Mannitol + <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i> , - <i>L. casei</i> subsp. <i>pseudoplantarum</i>
16. Esculin, salicin +17, - <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	42. Mannitol, Rhamnose, + <i>L. bif fermentans</i> , -43
17. Lactose +19, -18	43. Gluconate, Galactose + <i>L. crvatus</i> , - <i>L. homohiochii</i>
18. Mol% G+C of DNA 40-41% <i>L. amylovours</i> 33-35% <i>L. gasseri</i>	44. Gluconate +45, -46
19. Mol% G+C of DNA 33-38% <i>L. acidophilus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. gasseri</i> 49-51% <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	45. Fructose/Rhamnose +/+ <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i> , +/- <i>L. coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i> , -/- <i>L. sanfransico</i>
20. Ammonia from arginine +21, -35	46. Lactose +47, -48
21. Ribose +23, -22	47. Mannose, Maltose, Esculin, + <i>L. sharpeae</i> , - <i>L. casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i>
22. Sucrose + <i>L. farciminis</i> , - <i>L. amylophilus</i>	48. Maltose +49, -50
23. Mannose +24, -28	49. Galactose + <i>L. amylophilus</i> , - <i>L. viridescens</i>
24. Lactose + <i>L. maltaromicus</i> , -25	50. Sucrose, Mannose, Salicin, + <i>L. yamanashiensis</i> , - <i>L. fructosus</i>
25. Salicin +26, -27	51. Ribose + <i>L. vaccinostercus</i> , -52
26. Trehalose/xylose +/- <i>L. divergens</i> , -/+ <i>L. confusus</i>	52. Mol% G+C DNA 34-37% <i>L. vitulinus</i> 44-47% <i>L. ruminis</i>

Table 3. Frequency of Gram-positive bacteria isolated from Kimchi fermented at 25°C, 15°C and 5°C.

Genus	No	Species	Subspecies	25 °C	15 °C	5 °C
<i>Leuconostoc</i>	1	<i>mesenteroides</i>	<i>mesenteroides</i>	6.3	12	31.5
	2	<i>mesenteroides</i>	<i>cremoris</i>	4.8	4	0
	3	<i>mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	1.6	0	10.1
	4	<i>paramesenteroides</i>		0.8	3	23.6
	5	<i>lactis</i>		0	1	0
<i>Streptococcus</i>	6	<i>lactis</i>		1.6	0	4.5
	7	<i>iniac</i>		0.8	0	0
	8	<i>agalactiae</i>		0.8	0	0
<i>Pediococcus</i>	9	<i>raffinolactis</i>		11.1	0	0
	10	<i>pentosaccus</i>		4.0	0	0
	11	<i>inopinatus</i>		0	6	2.2
<i>Lactobacillus</i>	12	<i>acidilactici</i>		0	1	0
	13	<i>plantarum</i>		36.5	15	0
	14	<i>maltaromicus</i>		5.6	8	12.3
	15	<i>homochiochii</i>		4.8	7	0
	16	<i>brevis</i>		3.2	0	0
	17	<i>curvatus</i>		2.4	0	0
	18	<i>minor</i>		0.8	3	10.1
	19	<i>sake</i>		0.8	9	4.5
	20	<i>confusus</i>		0.8	0	0
	21	<i>hilgardii</i>		0.8	0	0
	22	<i>fructosus</i>		0.8	15	0
	23	<i>farciminis</i>		1.6	3	0
	24	<i>coryniformis</i>	<i>coryniformis</i>	0.8	0	0
	25	<i>casei</i>	<i>rhamnosus</i>	0.8	0	0
	26	<i>divergens</i>		0	0	1.1
27	<i>alimentarius</i>		0	4	0	
28	<i>bavaricus</i>		0	2	0	
29	<i>yamanashiensis</i>		0	4	0	
30	<i>amylophilus</i>		0	1	0	
<i>Bacillus</i>	31	<i>cereus</i> group*		4.8	0	0
	32	<i>circulans</i>		4.0	0	0

\**B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*

Unit: percentage

조 등, 1988). 그런데 이러한 성질만을 이용해서 동정하는 경우에는 *Leuconostoc paramesenteroides* 가 동정될 수 없게 되어있다. 그 이유는 *L. paramesenteroides* 는 sucrose 배지에서 dextran 을 형성할 수 없기 때문이다. 또한 *Lactobacillus* 내의 여러 종들 중 *L. plantarum* 만 정상발효, *L. brevis* 만을 이상발효라 판단하는 것은 무리가

있다. 그 이유로서는 현재 Bergey's manual (Sneath, et al., 1986)에는 *Lactobacillus* 속에 총 44개의 종들이 있으며, 이들 중 절대정상발효는 15개 종이며, 통성 이상발효는 11개 종이고, 절대 이상발효는 18개 종이었다. 그리고 *L. plantarum* 은 통성이상발효이며, *L. brevis* 는 절대이상발효에 속한다. 따라서, 이와 같은 성질만을 이용하여

동정하는 경우에는 *L. plantarum*의 동정이 불확실하다고 볼 수 있다. 그러므로 김치 내의 유산균 종류를 몇 가지 실질실험을 통하여 분리동정하는 진단적이며 선택적 방법은 보다 더 연구가 되어야 할 것으로 사료된다.

#### 온도별 김치발효의 Gram 양성세균

김치의 발효온도에 따라서 분리된 Gram 양성세균의 동정결과와 그 출현빈도는 표 3에서 보는 바와 같다. 25°C에서 발효 중인 김치로부터 분리된 Gram 양성세균 집락은 총 126개였고, 이들은 5개 속, 24개 종이였다. 15°C에서 발효 중인 김치로부터 분리된 Gram 양성세균 집락은 총 106개였으며, 이들은 3개 속, 17개 종이였다. 또한 5°C에서 분리된 Gram 양성세균 집락은 총 88개였으며, 이들은 4개 속, 9개 종이였다.

따라서 김치발효 온도가 25°C에서 5°C로 감소됨에 따라서 종의 수와 다양성이 감소됨이 특징적이었다. 저온의 김치발효에서 세균의 분리와 동정은 김치 내에 호냉성세균(psychrophiles)이 존재함으로 주의를 요함을 강조하였다(권, 1955). 그 후 오(1979)의 연구논문에서 보면 4°C와 25°C에서 발효된 김치의 미생물의 변화를 비교하였을 때, 4°C에서의 호기성세균, 혐기성세균 및 호모 군집들의 크기가 25°C의 그것들 보다 크다고 보고함으로써 본 연구와 상반된 결과를 얻었다. 이것은 오(1979)의 실험방법에서 4°C의 김치발효에서 생장하는 미생물 군집의 크기를 파악하기 위하여 미생물 분리온도를 4°C로 선택하지 않고 35°C로 정하였으므로 4°C에서 번식하는 미생물 군집의 크기를 분석하였다기 보다 오히려 상온에서 번식하는 미생물도 포함하여 계수하였기 때문에 25°C 김치발효의 군집이 크게 나타났다고 생각된다. 그러나 온도 이외에도 여러가지 인자가 작용할 수 있으므로, 이러한 문제점을 배제하기 위하여 낮은 온도에서 발효 중인 미생물을 분리하고자 할 때는 당연히 낮은 온도에서 분리해야 될 것으로 생각된다. 따라서, 본 연구에서는 김치의 발효온도와 분리배지의 배양온도를 같이하여 세균을 분리한 후 동정함으로써, 각각 다른 온도의 김치발효에서 주된 역할을 하는 Gram 양성세균이 서로 다름을 알 수 있었다.

분리된 세균의 출현빈도로 볼 때, 25°C 김치발효에서 주된 발효세균은 *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus raffinolactis*와 *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*이었고, 15°C는 *Lactobacillus plantarum*, *L. fructosus*와 *Leu-*

*conostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*이었으며, 5°C는 *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*와 *Lactobacillus maltaromicus*이었다. 여기서 확실한 근거는 없으나 김치의 산패균으로 알려진 *L. plantarum*이 5°C에서는 번식을 하지 않은 결과가 특징적이라 할 수 있다. 1950년대부터 지금까지 김치의 미생물 연구에서 세균을 분리동정한 연구논문은 11편에 달하며(김 등, 1959; 황 등, 1960; 김 등, 1962; 김 등, 1966; 신, 1973; 이 등, 1980; 권, 1983; 민 등, 1984; 황, 1985; 박 등, 1986; 조 등, 1988), 여기에 보고된 세균은 모두 20여종이었고, 이들 중 8종은 Gram 음성세균이고, 나머지 12종은 Gram 양성세균이었다. 이들 Gram 양성세균은 5속 12종이며 각 학명은 *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus faecalis*, *S. faecalis var. liquefaciens*, *S. cerevisiae*, *Pediococcus cerevisiae*, *P. pentosaseus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Bacillus megaterium*, *B. macerans*, *B. subtilis*, *B. mesentericus*이었다. 이들 김치미생물 외에 새로 분리동정된 종은 Table 3에서 보는 바와 같다. 이들 중에서도 각 온도에 따라 출현빈도가 높은 5개의 종으로는 *L. paramesenteroides*, *S. raffinolactis*, *L. maltaromicus*, *L. minor* 그리고 *L. fructosus*이었다. 특히 5°C의 김치발효는 출현빈도의 총합이 65.2%인 *Leuconostoc* 속에 의하여 발효된다고 볼 수 있고, 25°C의 김치발효는 출현빈도의 총집합이 59.7%인 *Lactobacillus* 속에 의하여 발효가 됨을 알 수 있었다. 그리고 15°C 김치발효는 이들 속이 모두 관여하여 이루어짐도 알 수 있었다.

김치에서 분리한 Gram 양성세균 중 젖산균에 속하지 않는 것으로서는 *Bacillus* 속 뿐이었으며, 이들 *Bacillus*도 5°C와 15°C에서는 분리되지 않았으며 25°C에서만 분리되었다. 이들은 25°C에서 김치발효 초기에 해당되는 10시간과 24시간에 채취한 시료에서만 분리되었으나 그 후 발효가 진행되는 동안에는 분리되지 않았으며, 그 이후에는 젖산균만이 생장 분리되었다. 이것은 야채를 발효할 때, 환경조건이 호기성세균들에게는 좋지 않은 조건이지만, 한편으로는 젖산균들에게 좋은 조건이라는 설명과 일치한다(Pederson, 1979).

지금까지의 연구보고에서, *B. megaterium*, *B. macerans*, *Bacillus* spp. 4군주를 분리동정하였으나(김 등, 1962, 1966; 이 등, 1980), 본 연구결



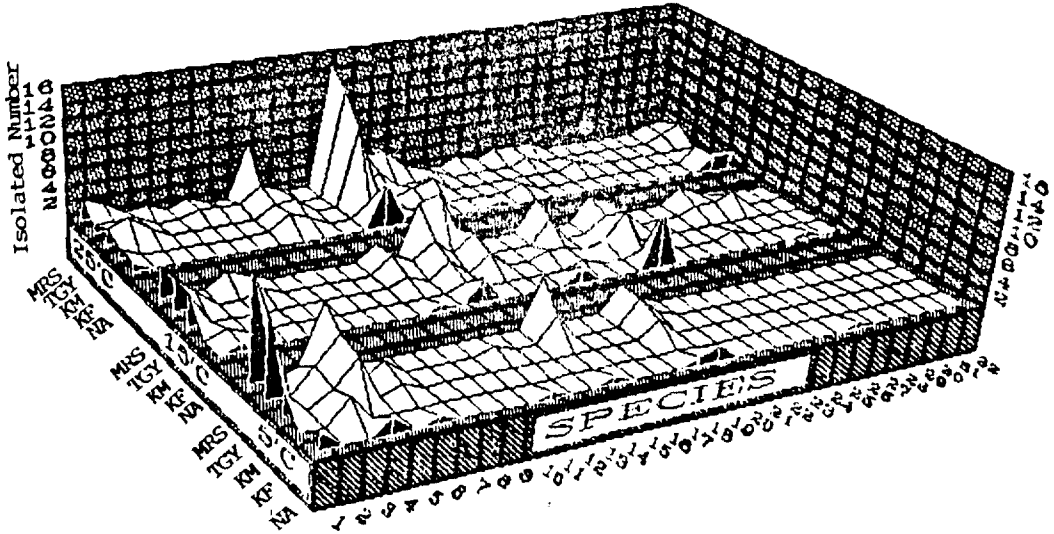


Fig. 1. Distribution of Gram-positive bacteria at different isolation media and temperatures.

The number of species refers to Table 3.

과와 같이 *B. cereus* group과 *B. circulans*로 분리동정된 결과보고는 지금까지 보고되지 않았다. *Bacillus cereus* group은 제시된 성질로서 구별하기가 곤란하며(이 등, 1989), 또한 DNA-DNA hybridization에서도 높은 상동성(high homologies)을 나타내므로 *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis* 4군주를 하나의 군(group)으로 간주하였다(Sneath, *et al.*, 1986). 이는 김치의 발효에 관계되는 미생물은 재료로 이용되는 야채의 표면에 부착된 것으로서, 각 김치의 재료로 이용된 야채류의 성장환경요인에 의해 다양한 차이가 있을 수 있다 생각된다.

#### 배지별 세균의 출현빈도

김치발효에 관여하는 세균의 정확한 분리를 위하여 yeast extract를 첨가한 MRS와 TGY 그리고 peptone을 첨가한 NA의 3개의 합성배지와 김치재료를 모두 혼합하여 마쇄하여 얻은 즙으로 만든 비발효김치배지 KM과 김치발효액으로 만든 발효김치배지 KF의 2개의 자연배지를 이용하였다. 각각의 배지에서 분리동정한 세균수를 온도별로 표시한 결과는 Fig.1에서 보는 바와 같다. 배지별 분리된 집락의 총합은 320개였으며, 이 중에서 MRS가 112개, TGY가 89개, KM이 55개, NA가 45개 그리고 KF가 19개 집락의 순서로 분리되었다. 그리고 각 온도에서 배지별 분리비율도 집락분리순서와 동일하였다. 온도와 배지의 종류에 따라서 총집락수 내지는 생균수(viable

cells)가 큰 차이를 보여주었다. 이러한 차이는 yeast extract, 아미노산을 첨가한 MRS와 TGY 배지에서 집락수가 많이 출현하는 결과로 볼 때, 성장인자(growth factors)의 유무에 좌우된다고 볼 수 있다. 실제로 분리된 집락들은 *Bacillus* 속을 제외하고 유산균으로 복잡한 성장인자를 요구하고 있다(Sneath, *et al.*, 1986). 성장인자 외에도 미생물생장에 필요한 물리·화학적 환경인자, 즉 온도, 탄소 및 질소원, 산소의 요구정도, 영양염 등에도 좌우된다고 볼 수 있다(Atlas, *et al.*, 1987). 그리고 *Bacillus* 속의 종들은 발효 초기에만 검출되었다. 그 이유는 이들 종들이 호기성 상태에서 잘 생장함으로 김치발효가 진행되면서 혐기성 상태로 전환되었기 때문이라 할 수 있다.

발효김치액으로 만든 KF 배지가 균분리할 때 김치의 조건과 거의 같다고 볼 수 있으나 비발효김치로 만든 KM 배지보다 오히려 집락의 수가 적게 분리되었다. 그 이유는 KF 배지는 발효과정의 진행에 따라 생장에 필요한 영양원이 부족하게 되었기 때문이라고 생각할 수도 있다. Table 3에서 보는 바와 같이 각 온도별로 출현빈도가 3% 이상을 차지하는 종들이 Fig.1에 나타난 배지의 종류에 따라 출현한 종들과 비교하여 보면 종의 다양성은 MRS, TGY, KM에서 별 차이가 없었으나 KF에서는 여러 개의 종들이 출현하지 않았다. 종의 수도(abundance)는 KM이 MRS와 TGY 보

다 대략 2배 정도 낮았다(Fig.1). 그리고 KM 배지에서 배양시간이 더 길었으며, 집락의 크기(colony size)도 훨씬 작게 나타났다. 이와 같이 종 다양성은 별로 차이가 없고, 종의 수도는 낮고, 집락의 크기가 작은 이유는 1)김치재료로부터 특히 배추로부터 삼출되는 저해 내지는 억제물질이 존재하고 있음을 시사해 주고 있으며, 이러한 결과는 김치재료를 마쇄하여 발효시킬 때마다 관찰되었다. 2) 방법에서 서술한 바와 같이 삼출액의 열처리에 의하여 필요한 영양원이 변화 또는 파괴되었다고 볼 수 있으나, 열처리에 무관하게 수도는 낮았다. 3) 세균이 김치 내의 어떤 물질에 저해를 받음으로서 손상된 세포(injured cells)가

생장인자가 포함된 MRS와 TGY 배지로 옮김으로서 KM보다 수도가 높다고 볼 수 있다(Jay, 1986). 이러한 현상을 'phoenix phenomenon'이라 하였다. 이러한 관점에서 김치환경 내에 유산균의 실질적인 활동과 역할을 파악한다고 보면, MRS와 TGY 배지보다도 오히려 KM 배지로 각종의 수도를 측정하는 방법이 보다 충실도가 있다고 볼 수 있다. 이상의 결과를 요약하면, 사용된 각 배지에서 출현하는 종의 다양성은 별로 차이가 없었으나, 수도에는 큰 차이가 있었다. 김치 내의 유산균 분리용 배지는 MRS 배지가 그리고 수도의 측정에는 KM 배지가 가장 적합하였으며, 환경인자로서는 온도가 가장 중요하였다.

### 적 요

김치발효 중 Gram 양성세균 또는 유산균의 분리와 동정을 시도하였다. 종의 다양성은 분리배지와 온도에 영향을 받았고, 다양성은 온도가 낮아질수록 감소하는 경향이였다. MRS는 세균의 분리에 KM(김치재료로 만든 자연배지)은 종의 수를 파악하는데 각각 적합하였다. 분리균의 동정은 Bergey's manual of Systematic Bacteriology (1986)를 기초로 하여 작성한 이분동정표(dichotomous Identification scheme)에 의하여 실행하였다. 각 온도(5, 15, 25°C)에서 동정된 Gram 양성세균은 *Leuconostoc* 5종, *Streptococcus* 4종, *Pediococcus* 3종, *Bacillus* 2종 그리고 *Lactobacillus* 18종이었다. 각 온도에서 출현 빈도가 높은 종은 25°C에서 *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* 이었고, 15°C에서 *L. plantarum*, *Lactobacillus fructosus*, *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* 이었고, 5°C에서 *L. mesenteroides subsp. mesenteroides*, *Leuconostoc paramesenteroides*, *Lactobacillus mallaromicus* 이었다. 일반적으로 김치발효는 25°C에서 *Lactobacillus* spp.(59.7% 빈도), 그리고 5°C에서 *Leuconostoc* spp.(65.2% 빈도)에 의하여 이루어졌다. 그리고 각 온도에 따른 김치발효 중 지금까지 알려진 *Pediococcus cerevisiae*와 *Streptococcus faecalis*는 분리되지 않았다.

### 사 사

본 연구는 서울기독병원 정계효 원장의 연구비 지원으로 수행되었다.

### 참고문헌

1. 권숙표, 1955. 김치의 세균학적 연구, 제 1보, 분리한 균에 대하여, 중앙화학연구소보고, 4, 41-47.
2. 권정주, 1983. 김치에서 분리된 젖산균의 다른 미생물의 생육저해에 관한 연구, 중앙대학교 석사학위논문.
3. 김호식, 황규찬, 1959. 김치의 미생물학적 연구(제 1보), 혐기성세균의 분리와 동정, 과연회보, 4(1), 56-63.
4. 김호식, 정운수, 1962. 김치 및 김에서 분리한 호기성세균의 동정에 관하여, 한국농화학회지, 3호, 19-24.
5. 김호식, 전재근, 1966. 김치 저장 중의 세균의 동적 변화에 관한 연구, 원자력연구소 논문집, 제 6집, 112-118.
6. 박연희, 조도현, 1986. 김치에서 분리한 *Pediococcus*의 미생물 생육저해, 한국농화학회지, 29(2), 207-211.
7. 신동숙, 1973. 김치발효에 있어서 젖산균의 생육 촉진인자에 관한 연구, 숙명여자대학교 석사학위논문.
8. 오현근, 1979. 김치의 발효속성에 관여하는 미생물의 소장에 관한 연구, 동국대학교 석사학위논문.
9. 이양희, 양익환, 1970. 우리나라 김치의 포장과 저장방법에 관한 연구, 한국농화학회지, 13(3), 207-218.
10. 이정환, 한홍의, 1989. 용궁성 *Bacillus pumilus*의 분리 및 특성, 인하대학교 기초과학연구소 논문집 10, 213-221.
11. 이주식, 이귀련, 조두현, 1980. 한국발효식품의 미생물주 개발에 관한 연구, 주정공업 통권 35호, 10(3), 60-87.

12. 장진경, 임종락, 정계효, 한홍희, 1987. 수정된 Gram 염색법에 의한 혼합세균 개체군의 분별측정, *Kor. Jour. Microbiol.*, **25**(3), 244-248.
13. 조남철, 전덕영, 신말식, 홍운호, 임현숙, 1988. 마늘농도가 김치미생물에 미치는 영향, *한국식품과학회지* **20**(2), 231-235.
14. 조재선, 1979. 우리나라 발효식품 연구의 어제와 오늘, *주정공업*, **9**(1), 70-80, **9**(2) : 67-78.
15. 조재선, 1988. 김치류심포지움, *한국전통발효식품 연구의 현황과 전망*, 논문집, 13-28.
16. 최신양, 1987. 김치의 연구현황 및 제조지침서, *종합식품연구원*, p.5.
17. 황규찬, 정운수, 김호식, 1960. 김치의 미생물학적 연구(제 2보), *호기성세균의 분리와 동정*, 과학회보, **5**, 51-55.
18. 황규찬, 1985. 김치젓산균 *Pediococcus pentosaceus*의 분리와 동정, *서울공업전문대학 논문집* **5**, 347-355.
19. Atlas, R.M. and R. Bartha, 1987. *Microbial Ecology Fundamentals and Applications*, 2nd ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC., pp.233-258.
20. Bergan, T., 1984. *Method in Microbiology* vol. 16, Academic press, pp.147-178.
21. Difco manual, *Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology*, 1986, Tenth Edition, Difco Laboratories Detroit Michigan 48232 USA, p.619.
22. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg and G. B. Phillips, 1981. *Manual of methods for General Bacteriology*, American Society for Microbiology, pp.409-443.
23. Jay, J.M., 1986. *Modern Food Microbiology*, 3rd ed, Van Nostrand Reinhold Company, New York, pp.110-117, 582.
24. Krieg, N.R. and J.G. Holt, 1984. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, vol.1, Williams & Wilkins Baltimore/London, p.607, 633.
25. Mheen, T.I. and T.W. Kwon, 1984. Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**(4), 443-450.
26. Pederson, C.S., 1979. *Microbiology of Food Fermentations*, 2nd ed, AVI publishing Co. INC pp.153-171.
27. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, 1986. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, Williams & Wilkins, pp. 988-990, 999-1260.
28. Staley, J.T., M.P. Bryant, N. Pfenning and J. G. Holt, 1989. *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, vol.3, p.1873, 1893, 1994, 2015, 2159, 2167.
29. Starr, M.P., H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows and H.G. Schlegel, 1981. *The Prokaryotes*, vol. 1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, pp.189-190.

(Received September 12, 1989)