

## 김치발효의 지표로서 미생물군집의 측정

한홍의 · 임종락 · 박현근  
인하대학교 이과대학 생물학과

### Determination of Microbial Community as an Indicator of *Kimchi* Fermentation

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

Dept. of Biology, College of Science, Inha University

#### Abstract

Attempts were made to define the characteristics of microbial community as an indicator of *Kimchi* fermentation. Determination of communities was carried out by simple Gram-stain, followed by direct microcopic counts. In room-temperature (15°C) fermentation, microbial succession was occurred in the order of communities of Gram-positive bacteria, yeasts and Gram-negative bacteria. It was characteristic that Gram-positive bacterial community was developed during the production of lactic acid, yeasts community was developed to cause rancidity, and Gram-negative bacterial community was relevant to maceration (or softening) as well as rancidity. The fluctuation of apparent Gram-negative reaction group might be used as a criterion of death or aging of Gram-positive bacterial populations. In low-temperature fermentation (5°C), however, it was found that yeasts and Gram-negative bacterial communities did not developed but only Gram-positive bacterial community did. It follows from these results mentioned above that maturity of *Kimchi* depends on the development of Gram-positive bacterial community. Thus, the size and occurrence of microbial community are available for an indicator of *Kimchi* fermentation, and also determination of community could be a useful method to predict the maturity.

Key words: *Kimchi*, microbial community, succession

#### 서 론

김치의 발효과정은 배추 외에 야채류와 양념들의 표면에 부착되어 있는 미생물들의 상호작용에 의하여 자연적으로 진행된다. 그러나 이 연속과정 중에서 어느 단계까지를 먹기에 알맞은 김치발효라고 규정할 것인가는 논란의 대상이 되고 있다<sup>(1)</sup>. 그리고 적절한 발효단계가 규명된다 할지라도, 이 단계를 어떤 지표를 사용함으로써 신속히 발효를 예측할 수 있는가도 문제시 되고 있다.

이러한 문제를 해결하기 위한 방법으로 이 등<sup>(2)</sup>은 판능검사를, 우 등<sup>(3)</sup>은 산화환원제인 resazurin 시약을 이용하여 김치숙성도를 측정할 수 있음을 제시하였다. 그리고 pH와 산도에 의한 김치숙성도를 측정하는 방

법도 있으나<sup>(4)</sup>, 그 숙성도에 해당하는 pH와 산도는 일치되지 않았다. 예를들면, 최적 숙성기의 산도 0.45%일 때 pH는 3.7, 4.1, 4.5 등으로 일정하지 않았다<sup>(3,5,6)</sup>. 이와 같은 이화학적 측정으로 김치의 숙성을 알아낼 수도 있지만 김치발효는 근본적으로 미생물군집의 작용에 의하여 산화·환원력, pH, 산생성됨은 주지의 사실이므로, 미생물을 지표(microbial indicator)로 사용하여 발효단계를 파악하는 방법이 김치발효 단계를 예측, 측정하는 하나의 방법이 될 수 있다고 사료된다. 그럼에도 불구하고 김치에서 지표미생물을 이용한 연구보고는 김치발효미생물로는 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Sarcina* 등의 Gram 양성세균속(Genus)과 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium* 등의 그람음성세균속이 분리동정되었으며, 균류로는 *Saccharomyces*, *Candida*, *Brettanomyces*, *Citromyces*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*,

Corresponding author: Hong-Ui Han, Department of Biology, Inha University, Yonghyundong, Namgu, Incheon, 402-751

*Aspergillus*, *Penicillium*, *Scopulariopsis* 속들이 분리 동정되었다<sup>(7-15)</sup>. 이들 속(Genus) 중에는 여러 종들이 포함되어 있으므로, 어떠한 단일종을 지표로 할 것인가는 상당히 어려운 문제이나 장차 연구가 되어야 할 분야이다.

따라서 단일종의 지표사용인 개체군(population)의 개념을 벗어나 여러 단일종의 집합인 군집(community)개념으로 김치발효과정을 해석하고자 시도하였다. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*<sup>(16)</sup>에 의하면 세균을 Gram 양성 및 음성군 군(division)으로 대별하고 있는데, 그 군내의 Gram 양성군 음성군은 수많은 종(species)으로 구성되어 있으므로 군(division)을 군집(community)으로 표현할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 이 개념을 도입하였다.

현재까지 김치내의 미생물의 수를 파악하는데 있어서, 주로 평판배양법에 의하여 3-7일 동안 배양한 후 그 세균수의 측정 뿐만 아니라 각 개체군의 종류와 동적변화를 파악해오고 있다. 그러나 이 방법은 발효가 훨씬 경과된 후에나 그 수를 파악하는 결점이 있으므로, 김치발효 중의 미생물의 수에 대한 변화를 신속히 측정할 수 없으므로 적합하지 않다고 볼 수 있다. 그러므로, 장 등<sup>(17)</sup>이 대마침지와 김치발효에서 세균군집 측정에 이용한 Gram 염색법을 사용하면 이러한 문제점을 해결할 수 있을 것으로 판단된다. Gram 염색에 소요되는 시간은 현미경 관찰 시간을 포함하여 약 20분이 필요하기 때문이다. 자연생태계에서 장 등<sup>(18)</sup>은 호수의 Gram 음성군 군집의 분포를 측정할 예를 찾아 볼 수 있다.

따라서 본 연구는 미생물군집 발달과정과 김치발효의 조건이 되는 총산도, pH 그리고 온도와의 관계를 검토함으로써 Gram 양성군과 음성군 군집 및 효모군집을 지표로 하여 김치발효과정을 예측 혹은 측정할 수 있는 가능성을 제시하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 김치의 재료비율 및 발효

김치의 재료배합비율은 배추 100g 당 소금농도는 2.5%, 파, 마늘, 고춧가루는 각각 1.5g 씩을 혼합하여 사용하였다. 배추는 약 5cm 크기로 절단하여 사용하였으며, 우 등<sup>(9)</sup>의 배추의 절임과정을 생략한 방법을 본 연구에서 선택하였다. 미생물의 군집변화를 용이하게 관찰하기 위하여 재료배합 후 배추무게의 절반에 해당되는 양의 소금물을 농도에 따라 조절하여 첨가하였

다. 발효온도는 5°C와 15°C로 설정하여 항온순환기로 조절하였다.

### 발효용기

김치발효용기는 원통아크릴관(30 cm, L×12 cm, D; 약 3.5l)으로 제작하였으며, 일정온도를 조절하기 위하여 외부에 물이 순환되도록 이중관으로 만들었으며, 시료를 채취하기 위하여 상·중·하층부(24 cm, 13 cm, 2 cm)에 시료채취구를 만들었다. 뚜껑은 완전히 밀폐할 수 있도록 하였고, 뚜껑에는 공기출입구를 설치하였다.

### 미생물군집의 측정

정량적으로 김치내의 세균수를 측정하기 위하여 장 등<sup>(17)</sup>이 사용한 군집측정법을 이용하였다. 즉 slide glass 상에 2cm 지름의 원을 유성펜으로 그린 후, 그 원내에 50 μl의 김치국물을 떨어뜨려, 원내에 미생물이 잘 분포되도록 도말하여, 대기 중에서 건조시켰다. 그 다음 단계적으로 Gram 염색을 하였다. 그 후 직접 현미경계수법(Direct Microscopic Count)으로 현미경의 대안렌즈에 나타난 현미경면적(120 μm: 지름)내의 세균수를 임의로 5-10회 계수하여 그 평균값을 면적당 세균수로 하였다. 이를 단위용량(ml)으로 환산하면 다음과 같다.

$$\text{총세균수/ml} = \text{평균 세균수} \times 5.6 \times 10^5$$

$$= \text{평균 세균수} \times \frac{\text{slide 원의 면적}}{\text{현미경의 대안렌즈 면적}} \times \frac{1 \text{ ml}}{\text{시료량}}$$

이 때 총 세균수는 Gram 양성 및 음성군군집의 합계로 표시한다. 그리고 효모는 세균과 형태적으로 다름으로 별도로 효모군집으로 표시할 수 있다.

### 총산도, pH, 염도 측정

김치국물시료의 pH 측정은 pH meter(TOYO, PT-62DE)를 사용하였고, 총산도는 시료 20ml에 pH 전극을 꽂아 0.1N NaOH로 적정하여 pH 7.0이 될 때까지의 양을 적산의 양으로 환산하였다. 염도는 본 연구실에서 전도도의 원리를 이용하여 제작한 염도계로 측정하였으며, 사용범위는 0-24% 소금농도이며 50°C까지였다.

### 분리군의 Gram 염색

15°C 김치발효과정 중 Gram 음성군 존재를 확인하기 위하여 평판배지에서 분리한 세균을 Gram 염색을

하였다. 배지는 MRS<sup>(16)</sup>, TGY, NA<sup>(19)</sup>를 사용하였고, 그 외에 김치발효 중의 김치국물 50ml와 3% agar 용액 50ml를 각각 고압살균한 후 60°C로 식힌 후 무균적으로 혼합하여 김치배지를 만들었다. 김치발효조의 하층으로부터 일정시간 간격으로 김치국물을 채취하여 멸균증류수로 희석한 후 도말하였고, 배지는 김치발효 온도와 동일한 15°C에서 배양하였다. 각 배지에서 육안으로 구별이 가능한 균락(colony)을 모두 분리하여 Gram 염색을 하였다.

**결과 및 고찰**

미생물군집의 동적변화(dynamics)로부터 김치발효의 단계별 특성과 역할을 어떻게 해석해야 할 것인가를 알아보았다. 발효조건은 방법에서 서술된 원·부재료 배합을 하고, 소금농도는 2.5%로 하여 15°C에서 20일간 발효시키며, 발효용기의 상·하층으로부터 시료를 채취하였고, 5°C에서는 55일간 발효시키며 발효용기 하층으로부터 시료를 채취하여 미생물군집의 변화를 측정하였다(그림 1, 2).

**15°C의 김치발효**

**Gram 양성세균군집**

김치발효에 관여하는 미생물들은 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *L. brevis*, *Streptococcus faecalis* 그리고 *Pediococcus cerevisiae* 였다고 보고하였다<sup>(10,20)</sup>. 이들 미생물은 모두 유산생성 균들이며 Gram 양성세균들이다. 그리고 김치 내에는 현재까지 알려진 모든 유산생성균이 번식하고 있다는 것이 특징적이라 할 수 있다. 따라서 본 연구방법으로 사용한 Gram 염색법에 의하여 분별측정된 Gram 양성 세균군집은 거의 유산생성균으로 간주할 수 있다. 김치 발효 중·하층의 Gram 양성세균군집은 초기부터 군집 크기가 증가하면서 6일째에  $5 \times 10^7$ 세균/ml로 최대에 도달되었고, 그 후 점진적으로 감소하여  $10^5$ 세균/ml로 되었다. 반면에 상층의 Gram 양성세균군집은 발효 10일까지 하층의 그 군집과 동일하게 발달하였으나 그 후 약간 증가( $3 \times 10^7$ 세균/ml)한 다음 다시 그 수가 서서히 감소하여  $10^5$ 세균/ml로 되었다. 그리고 Gram 양성세균군집이 발달될 때 총산도와와의 관계를 살펴보면 Gram 양성세균군집(유산세균군집)이 최대로 되는 6일째보다 2일 후인 8일째 총산도가 0.75%로 최대로 된 후 이 값을 유지하였다(그림 1A, E). 그리고 pH 변화는 김치발효 6일째 약 4.0에서 8일째 약 3.6으로 저하된 후

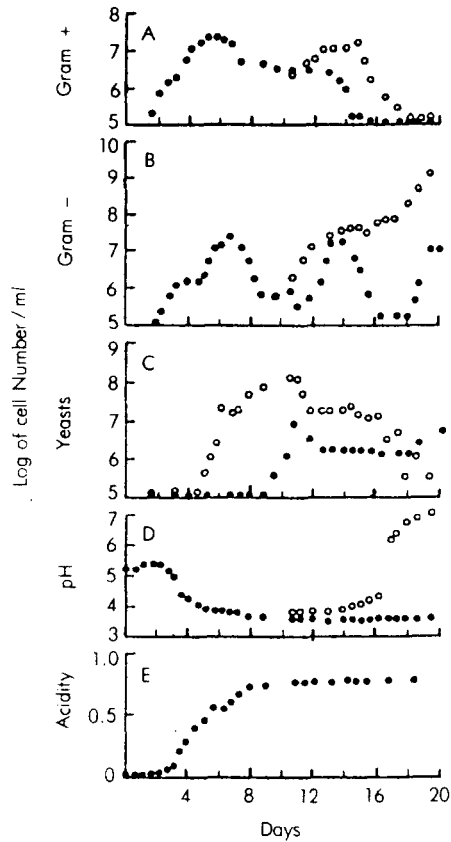


Fig. 1. Microbial communities dynamics, total acidity and pH during the Kimchi fermentation for 20 days at 15°C

○: upper layer, ●: lower layer

유지되었다(그림 1D).

Gram 양성세균군집의 수적감소에 대한 이유로는 다음과 같이 설명이 가능하다. 즉, 이 군집에 의하여 생성된 유산에 의하여 일정기간이 지나면 pH가 감소함으로써 생장이 억제되어 총세균수는 어느 정도 일정한 값을 유지하게 되나 대부분의 세균은 세포분열을 하지 않으므로 autolysis이 분비되더라도 새로운 세포막을 합성할 수 없다. 따라서 자발적 분해(spontaneous lysis)가 일어남으로써 수적감소가 일어난다고 생각할 수 있다<sup>(21)</sup>. 그리고 세포가 사세포로 되거나 대사활동이 정지된 경우는 Gram 염색반응에서 Gram 양성이 Gram 음성으로 관찰될 수 있다<sup>(22)</sup>. 실제로 김치에서 분리한 단일유산균(pure cultures)을 배양하면서 Gram 염색을 하면 시간이 경과함에 따라 Gram 음성으로 변하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 김치에서 확인되지 않았으나 유산균에 기생하는 phage에 의하여 분해됨으로써 군집의 수적감소가 일어날 수 있다고도 볼 수 있다.

김치의 유산량은 군집이 최대로 된 이후에도 증가됨으로, 김치발효는 Crueger 등<sup>(23)</sup>에 의한 발효형의 분류에 의하면 제 1, 2 발효형에 속한다. 이는 군집의 크기가 최대로 될 때 총산도는 약 0.55%가 됨으로(그림 1E), 최대의 군집 크기는 총산도면에서 양호한 상태와 일치하고 있으나, 그 후 산도가 0.75%까지 증가함으로써 산패를 일으키게 됨을 의미하고 있다. 따라서 최대의 Gram 양성균군집 크기는 산패가 일어나지 않은 상태의 지표로 이용될 수 있다고 본다. 그리고 가식범위 이상으로 산도가 증가되는 것은 단일개체군이 아니라 군집에 의한 발효형이므로 그 산도의 증가를 억제하여 산패를 방지하려면 군집내 개체군 분석이 이루어져야 할 것이다.

**Gram 음성균군집**

하층 Gram 음성균군집은 김치발효 6일째까지 Gram 양성균군집과 병행하여 발달한 후 발효 10일째 감소하다가 다시 증가와 감소를 반복함으로써 불규칙적인 군집변동(fluctuation)을 나타내었고, 그 군집크기는 6일, 16일, 20일에 증가되었으나 대략  $4 \times 10^7$ 세균/ml를 초과하지 않았다(그림 1B).

Gram 염색에서 Gram 양성균이 노화 혹은 사멸되어 Gram 음성으로 관찰됨으로써 오관될 수 있음으로 실제로 Gram 음성이 존재하는지를 확인하기 위하여 평판배양법에 의하여 김치국물에서 정시적으로 20일까지 약 300개의 세균집락을 분리하여 Gram 염색을 한 결과는 표 1에서 보는 바와 같다. 발효 숙성기간인 4일부터 18일까지는 Gram 음성균으로 염색되는 집락은 전혀 없었다. 이로부터 판단할 때 발효 18일까지는 Gram 음성균 군집의 변화는 Gram 양성균이 노화되어 Gram 음성으로 계수되었다고 볼 수 있다. 이는 표 1에서 보는 바와 같이, 발효 4일째부터(그림 1B에서는 약 2일부터) 15일까지(그림 1B에서는 약 16일까지) 실제로 Gram 음성균 군집이 존재하지 않으므로 외관상으로 나타난 Gram 음성균군으로 볼 수 있다. 따라서 이는 군집이라고 할 수 없으므로 그 대신에 군(group)으로 보는 것이 타당하며, 이를 Gram 양성균이 노화 내지는 사멸에 의하여 Gram 음성균으로 판독되기 때문에 용어상 외관상의 Gram 음성균군(apparent Gram-negative reaction group)으로 구별하였다. 따라서 외관상의 Gram 음성균군의 발달은 Gram 양성균군집 내의 개체군의 노화 정도를 나타내는 지표로 볼 수 있다. 개체군의 노화 정도를 지표로 본다면 외관상 Gram 음성균군의 변화 중 이루어지는 정점(peak)은, 노화 내지는 사멸되는 개체군의 수로 나타

날 수 있다고 추정할 수 있다. 그림 1B에서 보는 바와 같이 발효 18일 전까지 군집천이 중 3개의 개체군이 사멸되었다고 가정하면 1) Gram 양성균 군집이 최대로 되며, pH 3.9 정도이고, 총산도가 0.55%되었을 때(그림 1D, E), 2개의 미생물개체군이 소멸되었다고 볼 수 있다. 이러한 현상은 김 등<sup>(10)</sup>에 의한 세균의 동적변화에서 경시적으로 각 세균(개체군에 해당됨)이 사멸되는 과정을 보면, 사멸순서는 첫단계로 *Streptococcus faecalis*와 *Leuconostoc mesenteroides* 이었고, 그 다음에 *Lactobacillus brevis* 이었다. 그러나 *L. plantarum*과 *Pediococcus cerevisiae*는 계속 유지되었다. 2) 그 후 발효 6-12일까지 Gram 양성균군집이 감소될지라도, 총산도가 0.75%로 증가하며, pH는 3.8 정도로 유지되는 기간에는 *Lactobacillus plantarum*과 *Pediococcus cerevisiae*가 서서히 성장하면서 산패를 일으켰다고 추정되며, 그 후 사멸됨으로 발효 14일에는 외관상의 Gram 음성균군이 증가되는 현상을 나타냈다고 생각할 수 있다. 3) 발효 18일 이후 성장하는 Gram 음성균군집은 Gram 양성균의 사멸 혹은 노화에 의한 현상이 아니고 실제적으로 Gram 음성균이 출현되었음을 알 수 있었다(표 1). 그리고 발효 18일 이후 상층에서 Gram 음성균 군집이 발달하면서 pH가 상승되었고, 연화되는 현상이 관찰되었다. 이와 같은 현상은 김치의 장기저장에 중요함으로 앞으로 연구되어야 할 것이다.

**효모군집**

김치발효 중 하층의 효모군집 발달은 발효 9일까지는 거의 관찰되지 않았으며, 발효 10-12일까지  $3 \times 10^6$ 효모/ml로 증가한 후 유지되었다. 반면에 상층의 효모군집은 발효 5일에서 12일까지 증가되어  $2 \times 10^8$ 효모/

Table 1. The number of viable microorganisms in various communities during Kimchi fermentation at 15°C by plate method

days	Community		
	Gram-positive	Gram-negative	Yeast
1	8	38	2
4	48	—	—
6	34	—	2
7	38	—	—
9	38	—	4
11	32	—	2
15	21	—	8
19	11	11	4
Total	230	49	22

m/에 도달된 다음 서서히 감소하였다(그림 1C). 이 때 하층의 총산도와 pH는 변화되지 않았으나 상층의 pH는 약간 증가되었다. 그 증가원인은 상층의 Gram 음성균군집인지 상·하층의 효모균집인지는 구별하기가 애매하였다. 특히 상층의 효모균집이 출현된 후부터는 악취가 나기 시작했다.

김치 미생물의 천이

이상의 결과로부터 김치발효 중 미생물군집의 천이과정(succession)을 살펴보면 1단계는 하층의 Gram 양성균군집 즉, 유산균군집의 발달로 pH는 낮아지고 총산도가 증가되었으며, 2단계는 상·하층의 효모균집의 발달로 하층의 산도는 변하지 않았으나 상층의 pH는 약간 증가추세를 나타내었다. 그리고 상층의 효모균집의 번식으로 김치의 외관이 좋지 않았고, 악취가 심하게 되었다. 3단계는 상층 Gram 음성균군집의 발달로 pH가 급격히 증가되었으며, 악취와 더불어 상층부의 김치가 연화되는 현상이 뚜렷하였다. 그리고 상층 Garm 음성균군집은 단위 m/당  $1 \times 10^6$ 으로 조직의 변화가 일어났고, 상층 효모균집은 단위 m/당  $2 \times 10^8$ 으로 악취가 생겼다. 따라서 김치의 부패는 상층에 출현하는 Gram 음성균과 효모균집의 크기로부터 예측, 판단할 수 있다.

그러나, 김치발효란 그 의미하는 바로 먹기에 알맞은 가식범위 내에서 이루어지는 발효단계를 뜻하고 있으나, 실질적으로 김치의 가식범위를 규정짓기는 어려운 문제점이 있다. 왜냐하면 김치는 발효단계 이후 부패과정으로 이어지는 연속과정이기 때문이다. 따라서 Gram 염색에 의한 직접현미경계수법을 이용한 전과정의 관찰로 김치의 발효, 산패, 연부단계를 신속히 파악할 필요가 있다. 뿐만 아니라 군집의 크기를 측정하므로써 김치발효단계의 예측이 가능하다고 생각된다.

5°C의 김치발효

5°C와 15°C의 김치발효과정 중 미생물의 천이과정을 비교하기 위해서 5°C에서 55일간 김치를 발효시키면서 하층의 미생물군집의 동적변화와 이 때의 pH와 총산도의 변화를 측정하였다(그림 2). Gram 양성균군집의 발달은 15°C에서와 같이 초기부터 5일째까지 급속히 증가하여  $5 \times 10^6$ 세균/m/까지 증가한 후, 서서히 감소하여 55일째에는  $10^5$ 세균/m/로 감소한 반면, 외관상의 Gram 음성균군은 초기부터  $4 \times 10^6$ 세균/m/를 넘지 못하고, 발달이 형성되지 않았으며, 효모균집 또한 발달이 이루어지지 않았다(그림 2A). 이 때 pH의 변화는 Gram 양성균군집이 최대로 되는 5일째까지 급격히 낮

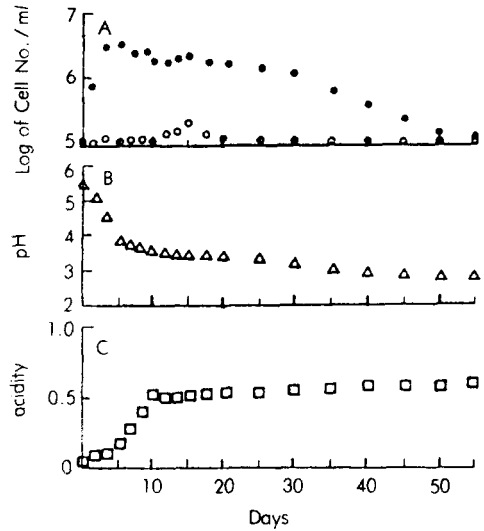


Fig. 2. Microbial communities dynamics, total acidity, and pH during the Kimchi fermentation for 55 days at 5°C

● : Gram positive bacteria, ○ : Gram negative bacteria

아져 3.8이였으며, 그 후 55일까지 서서히 낮아져 3.0 이었다. 또한 산도는 10일째까지 0.5%까지 증가한 후 서서히 증가하여 55일에는 0.6%까지 증가하였다.

15°C 김치발효와 비교하면 5°C에서는 특징적으로 Gram 양성균군집만이 발달되고, 이로 인하여 pH의 저하와 산도의 증가가 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 15°C의 총산도가 0.75%(그림 1E)에 비해 5°C의 총산도는 0.6%(그림 2C)를 넘지 못하는 결과로 볼 때 5°C의 김치발효에서는 산패를 일으키는 *L. plantarum*과 *P. cerevisiae*의 생장이 억제되었다고 추측할 수 있으며, 외관상의 Gram 음성균군의 발달이 이루어지지 않는 것은 5°C에서 대사활성이 감소되어 생존이 길어지므로(24) 노화나 사멸되는 세포수가 적기 때문이라고 생각할 수 있다.

숙성김치의 군집크기

김치발효 중 발달한 미생물의 크기와 김치의 숙성도를 비교하여 보았다. A 단계는 총산도가 0.45% 미만 이고 덜익은 상태의 김치이였으며, 김치 적숙기의 총산도를 0.45-0.55%로 본다면, 이 때 김치국물 m/당 미생물군집의 크기는 그림 3에서 보는 바와 같이 B 단계에 해당되므로 이 때의 Gram 양성균군집의 크기는  $2 \times 10^6$ - $6 \times 10^7$ (중양값  $10^7$ ), 외관상의 Gram 음성균(사세포)의 크기는  $1 \times 10^6$ - $7 \times 10^6$ (중양값  $10^6$ ), 효모균집은  $1 \times 10^5$ - $5 \times 10^5$ (중양값  $3 \times 10^5$ )의 범위내 이었

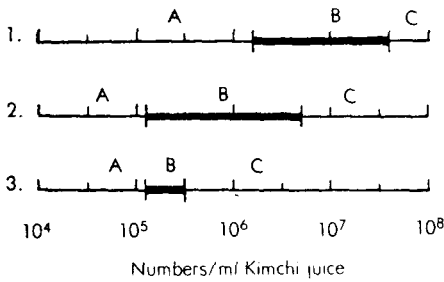


Fig. 3. Relationship between community sizes and mature conditions based on Kimchi fermentations 1. Gram-positive bacterial community, 2. Apparent Gram-negative group, 3. yeasts community. A, raw and low acid Kimchi; B, mature and medium acid Kimchi; C, over-mature and high acid Kimchi. The appearance of Gram-negative bacteria and yeast leads to spoilage. The sizes of community were measured by Gram staining direct microscopic counts (DMC).

다. 그리고 C 단계는 과숙되어 총산도가 0.55% 이상으로 산패가 일어나기 시작한 김치이었다. 특히, C 단계에서 효모군집이  $5 \times 10^5$  효모/ml 이상 존재하면 이취를 내었고, 실질적인 Gram 음성군집이 존재하면 연부현상이 시작되었다. 따라서, 김치발효의 단계 및 적숙기 등의 판정은 이상의 각 단계를 종합하므로써 가능하였다.

김 등<sup>(10)</sup>과 Mheen, et al.<sup>(20)</sup>은 김치 내의 총생균수의 크기를 평판배양법(plate count)에 의해 약  $10^9$  세균/ml 으로 보고하였다. 그러나 본 연구에서 Gram 염색법에 의한 직접현미경계수법(Direct Microscopic Count; DMC)에 의하면  $5 \times 10^7$  세균/ml 이었다. 따라서 평판배양법에 의한 생균수는 직접현미경계수법보다 약 1.5대수(log)만큼 많았다. 상기 언급한 두 방법에 의한 총세균수의 차이는 없어야 됨에도 불구하고 차이점이 생기는 이유는 치사이하(sub-lethal)의 환경변화를 줄 경우 개체군의 초기생장이 유도되어 그 수가 증가하는 현상으로 설명할 수 있다. 환경변화의 예로는 증류수 혹은 완충액으로의 희석, 파지의 오염, 전기충격, 단식(starvation), 영양이 없던 상태에서 영양이 풍부한 상태로 옮길 경우에 일어남이 보고되었다<sup>(25-28)</sup>. 그러므로 김치 내의 총세균수를 생균수로 표시할 경우 흔히 증류수 혹은 완충액으로 희석하는 방법을 택하고 있으므로 실제의 세균수보다 많아지는 결과를 가져오게 된다. *Escherichia coli* 를 증류수로 희석할 경우 실제 수보다 약 1.5대수(log)가 증가되는 현상<sup>(25)</sup>과 유사하다고 말할 수 있다. 이러한 현상을 피하기 위해서 본 연구에서는 직접현미경계수법으로 총세균

수를 측정하는 방법을 택하였다.

한편, 김치발효온도에 따른 Gram 양성군집의 최대크기는 저온(5°C)에서는  $5 \times 10^6$ (그림 2A)이었고, 상온(15°C)에서는  $5 \times 10^7$ (그림 1A)이었으므로, 군집 크기와 발효온도는 상관관계를 보여주었다. 그러므로 Gram 양성군집의 크기로서 김치발효온도를 예측할 수 있다고 생각된다.

예를들면, 김치발효 중 어떤 임의의 시점에서 Gram 양성군집과 외관상 Gram 음성군의 크기가 각각  $2 \times 10^7$ 세포/ml 와  $1 \times 10^6$ 세포/ml 이었다고 가정하자. 이때의 김치상태를 그림 3에 의하여 평가하면 총산도가 0.45-0.55% 범위이고, 대략 10°C 범위의 온도에서 발효되었으며, 효모와 실제 Gram 음성군집이 출현하지 않았으므로 먹기 좋은 상태의 김치라고 말할 수 있다.

지금까지의 결과를 요약하면 김치발효의 지표로서 사용할 수 있는 각 군집의 특징은 다음과 같다. 15°C 김치발효과정에서 1) Gram 양성군집은 김치발효의 주된 군집이며 비교적 이 군집이 발달되는 시기가 김치의 최적발효라 할 수 있다. 특히 이 군집의 크기가 최대로 될 때 총산도는 0.55%이고 pH는 약 4.0이었다. 2) Gram 음성군집은 Gram 양성군이 노화 혹은 사멸되었기 때문에 발생하는 군집이므로 사실상 Gram 음성군이 아니었다. 그러나, 이 군집의 불규칙한 변동이 일어나는 현상은 Gram 양성군의 사멸되어가는 과정으로 추정할 수 있다. 그리고, 발효후기에 출현하는 Gram 음성군집은 pH를 상승시켰으며 김치의 이취와 연부에 관계되었다. 3) 효모군집은 김치의 이취를 나타내었다. 그런데 5°C의 김치발효에서는 Gram 양성군집만이 발달되는 것이 특징적이었고, 총산도는 약 0.5%, pH는 3.0이었다.

## 요 약

김치발효 지표로서 미생물군집의 특성을 밝히고자 하였다. 군집크기는 Gram 염색법에 의한 현미경직접계수에 의하여 측정하였다. 실온(15°C)에서 김치발효는 Gram 양성군집, 효모군집 그리고 Gram 음성군집이 순서적으로 천이되었다. Gram 양성군집은 김치를 발효시키는 유산균으로 구성되어 있다. 효모군집의 발달은 김치의 악취를 내는 원인이 되며, Gram 음성군집은 악취와 더불어 김치의 연화작용에 관계된다는 사실이 특징적이었다. 그리고, 외관상의 Gram 음성군

균은 Gram 양성균군집 내의 개체균의 노화와 사멸을 평가하는데 이용될 수 있었다. 특히 저온(5°C) 김치발효에서는 효모군집과 Gram 음성균군집이 발달되지 않고 Gram 양성균군집만이 발달됨을 알았다. 이 사실로부터 숙성된 김치는 Gram 양성균군집에 의하여 만들어짐을 의미한다. 따라서 미생물군집의 발달과 크기는 김치발효의 지표로 이용될 수 있고, 또한 김치숙성도를 수십분 내에 예측하는데 중요한 방법이 될 수 있다.

## 문 헌

1. 간담회초록: "김치국제화에 따른 간담회" 초록, 식품과학, 20(3), 64(1987)
2. 이양희, 양익환: 우리나라 김치의 포장과 저장방법에 관한 연구, 한국농화학회지, 13(3), 207(1970)
3. 우순자, 이혜준: 김치숙성도 판정기준을 위한 신속한 검사법 Resazurin test에 관한 연구, 한국식품과학회지, 19(3), 250(1987)
4. 최신양: 김치발효와 보존성, 식품과학, 21(1), 19(1988)
5. 김순동: 김치 숙성에 미치는 pH 조정제의 영향, 한국영양식량학회지, 14(3), 259(1985)
6. 윤석인: 김치보존성 연구, 한국식품공업협회 식품연구소, pp.27-117(1987)
7. 권승표: 김치의 세균학적 연구(제1보), 중앙화학연구소 보고, 4, 41(1955)
8. 김호식, 황규찬: 김치의 미생물학적 연구(제1보, 호기성 세균의 분리와 동정), 과연회보, 4(1), 56(1959)
9. 김호식, 정운수: 김치 및 김에서 분리한 호기성 세균의 동정에 관하여, 한국농화학회지, 3, 19(1966)
10. 김호식, 전재근: 김치발효 중 세균의 동적변화에 관한 연구, 원자력연구소 논문집, 6, 112(1977)
11. 황규찬, 정운수, 김호식: 김치의 미생물학적 연구(제2보), 호기성 세균의 분리와 동정, 과연회보, 5(1), 51(1960)
12. 최연호, 김영호, 이서래: 고추가루 중 미생물의 분리 및 방사선 감수성, 한국식품과학회지, 9(3), 205(1977)
13. 최국지: 김치에서 분리한 효모에 관한 연구, 효모의 분리동정, 한국미생물학회지, 16(1), 1(1978)
14. 이주식, 이귀련, 조두현: 한국발효식품의 미생물군주 개발에 관한 연구, 주정공업 통권 제35호, 110(3), 60(1980)
15. 조남철, 전덕영: 김치에서 분리한 호기성 세균의 생육에 관한 마늘의 영향, 한국식품과학회지, 20(3), 357(1988)
16. Sneath, P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., and Holt J. G.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.2, Williams & Wilkins, p.988, 1216(1986)
17. 장진경, 임종락, 정계효, 한홍의: 수정된 그람염색법에 의한 혼합세균 개체균의 분별 측정, 한국미생물학회지, 25(3), 244(1987)
18. Kang Hum and Humitake Seki: The gram-stain characteristics of the bacterial community as a function of the dynamics of organic debris in a mesotrophic irrigation pond, Arch. Hydrobiol., 98(1), 39(1983)
19. Difco Manual Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, 10th ed., Difco Laboratories, Detroit Michigan 48232 USA, p.616(1984)
20. Mheen, T.I. and Kwon T.W.: Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol., 16(4), 443(1984)
21. Brock, T.D. and Madigan M.T.: Biology of Microorganisms, 5th ed. Prentice Hall, Inc. p.79(1988)
22. Starr, M.P., Stolp H., Truper H.G., Balows A. and Schelegel H.G.: The Prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, Vol.1, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, p.183(1981)
23. Crueger, W. and Crueger A.: Biotechnology, A Textbook of industrial microbiology. Sinauer Associates, Inc., p.60(1984)
24. Snell, J.J.S. Maintenance of Microorganisms a Manual of Laboratory Methods, ed. by Kirsop, B.E. and Smell J.J.S., Academic Press, 15(1984)
25. 양문, 한홍의: 수질환경에서 *Escherichia coli*의 생존 중 영양요구체 형성과 파동생장, 인하대학교 기초과학연구소 논문집, 10, 203(1989)
26. 이오형, 이주식: 성장 및 포장형성 중인 *Bacillus subtilis* SNU816의 SP816 박테리오파지에 대한 감수성에 관하여, 한국미생물학회지, 22(2), 111(1984)
27. 정지환, 조성부, 한홍의: 전기충격에 의한 *Saccharomyces cerevisiae* 개체균의 정제기에서 초기생장 유도의 조건, 인하대학교 기초과학연구소 논문집, 9, 129(1988)
28. Morita, R.Y.: In "Advances in Microbial Ecology", Marshall, K.C. ed., Plenum Press. New York, 6, 177(1982)

(1989년 9월 12일 접수)