



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2017年 2月

碩士學位 論文

김치의 저장 온도에 따른 유산균총의 변화와 김치 쓴 맛 원인균 규명

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

金 초 룡

김치의 저장 온도에 따른 유산균총의 변화와 김치 쓴 맛 원인균 규명

Change of lactic acid bacteria profile and identification of
responsible microorganism for bitter taste during kimchi
storage

2017年 2月 24日

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

金 초 룡

김치의 저장 온도에 따른 유산균총의 변화와 김치 쓴 맛 원인균 규명

指導教授 張 海 春

이 논문을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함

2016年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

金 초 룡

金초룡의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 이재준



委員 조선대학교 교수 이주원



委員 조선대학교 교수 장해준



2016년 11월

朝鮮大學校大學院

목 차

ABSTRACT	V
LIST OF TABLES	VI
LIST OF FIGURES	VII
제 1 장 서론	1
제 2 장 실험 재료 및 방법	4
제 1 절 사용 균주 선정	4
1. 사용균주 및 배지	4
2. Genomic DNA의 추출 및 PCR (polymerase chain re- action) 증폭	4
3. DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)를 이용 한 미생물 분석	6
제 2 절 배양 온도에 따른 배지 내에서의 유산균 공동배양	7
1. 시료 준비	7
2. 보관 온도에 따른 유산균 공동배양	7
가. 생균수 측정	8
나. Genomic DNA 추출 및 PCR-DGGE 분석	8
3. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양	9
가. 생균수 측정	9
나. Genomic DNA 추출 및 PCR-DGGE 분석	9

제 3 절 배양 온도에 따른 김치여액 내에서의 유산균 공동배양	11
1. 시료 준비	11
2. 보관 온도에 따른 유산균 공동배양	11
3. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양	12
제 4 절 김치 보관 중 쓴 맛 원인균 규명	12
1. 잠정적인 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 특성 비교	12
가. 시료 준비	12
나. 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 유산균 변화	12
다. 관능평가	13
라. 통계처리	13
제 3 장 실험 결과 및 고찰	14
제 1 절 사용 균주 선정	14
제 2 절 배양 온도에 따른 배지 내에서의 유산균 공동배양	16
1. 보관 온도에 따른 유산균 공동배양	16
가. 보관 온도 -2℃에서의 유산균 변화	16
나. 보관 온도 -1℃에서의 유산균 변화	17
다. 보관 온도 4℃에서의 유산균 변화	17
2. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양	22
가. 발효 온도 6.5℃에서의 유산균 변화	22
나. 발효 온도 15℃에서의 유산균 변화	23
다. 발효 온도 30℃에서의 유산균 변화	23

제 3 절 배양 온도에 따른 김치여액 내에서의 유산균 공동배양	28
1. 보관 온도에 따른 유산균 공동배양	28
가. 보관 온도 -2℃에서의 유산균 변화	29
나. 보관 온도 -1℃에서의 유산균 변화	32
다. 보관 온도 4℃에서의 유산균 변화	35
2. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양	38
가. 발효 온도 6.5℃에서의 유산균 변화	38
나. 발효 온도 15℃에서의 유산균 변화	41
제 4 절 김치 보관 중 쓴 맛 원인균 규명	44
1. 잠정적인 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 특성 비교	44
가. 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 유산균 변화	44
나. 관능평가	45
제 4 장 결론	51
제 5 장 참고문헌	54

ABSTRACT

Change of lactic acid bacteria profile and identification of responsible microorganism for bitter taste during kimchi storage

Kim Cho Rong

Advisor : Prof. Chang Hae Choon, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

To investigate effect of temperature on growth of lactic acid bacteria (LAB), mixture of LAB (*Weissella* spp., *Leuconostoc* spp., and *Lactobacillus* spp.) was cultivated at -2°C for 12 weeks, -1°C for 12 weeks, 4°C for 4 weeks, 6.5°C for 12 weeks 15°C for 1 week, and 30°C for 48 hr in MRS broth as well as kimchi filtrate. The LAB analysis was monitored by cell counting and PCR-DGGE. When mixture of LAB was cultivated in MRS broth, *W. koreensis* predominated at -2°C from 4 weeks, at -1°C from 2 weeks, at 4°C from 4 weeks and at 6.5°C from 5 days, and then reached its counts upto $7.5\sim 8.6$ log CFU/mL. *Lb. sakei* was the second dominance with $6.0\sim 7.7$ log CFU/mL of cell counts from 2 weeks at $-2\sim 6.5^{\circ}\text{C}$. At 6.5°C , *Leu. mesenteroides* reached its counts upto 6.3 log CFU/mL on 3 days of storage and was maintained for up to 4 weeks. *Lactobacillus* spp. predominated at 15°C from 3 days. *Leuconostoc* spp. predominated from 12 hr and then *Lactobacillus* spp. became predominance after 24 hr. In cultivation of LAB mixture in kimchi filtrate, *W. koreensis* grew most rapidly from 1~2 weeks at $-1\sim -2^{\circ}\text{C}$ and 4°C . Cell counts of *Weissella* spp. and *Leuconostoc* spp. were reached to 8 log CFU/mL at 15°C for 24 hr, thereafter *Weissella* spp. were not detected anymore in the kimchi filtrate. However, counts of *Lactobacillus* spp. were reached

to 8 log CFU/mL at 15°C for 72 hr cultivation. By using PCR-DGGE, *W. koreensis* and *Lb. sakei* were detected throughout the storage period in MRS broth and kimchi filtrate. *Leuconostoc* spp. were detected at -2~15°C in initial fermentation. Major lactic acid bacteria in MRS broth at 30°C were appeared *W. cibaria*, *Lb. sakei* and *Lb. plantarum*. In kimchi filtrate, *Leu. gelium* or *Leu. inhae* was detected at all temperature. *Lactobacillus* spp. showed more rapid growth at high temperature than low temperature. *W. koreensis* and *Lb. sakei* were dominant at low temperature and were presumed to be a cause of bitter taste in kimchi storage. When these strains were respectively applied to kimchi, *W. koreensis* was dominant when it reached 8.2~8.7 log CFU/mL. Sensory evaluation showed that kimchi filtrate inoculated with *W. koreensis* was the largest. The above results suggested that *W. koreensis* has the most psychrophilic property among the tested 6 species of LAB and was a cause of bitter taste in kimchi storage at low temperature.

LIST OF TABLES

Table 1. Pre-screening (PCR-DGGE) on 9 strains lactic acid bacteria.....	5
Table 2. Temperature and period of lactic acid bacteria co-culture.....	10
Table 3. Sensory evaluation of kimchi filtrate inoculated temporary responsible microorganism for bitter taste	50

LIST OF FIGURES

Figure 1. DGGE profile of 9 strains lactic acid bacteria.....	15
Figure 2. Growth of mixed LAB 6 strains at -2°C for weeks in MRS media (initial about 5 log CFU/mL).....	18
Figure 3. Growth of mixed LAB 6 strains at -1°C for 12 weeks in MRS media (initial about 5 log CFU/mL).....	19
Figure 4. Growth of mixed LAB 6 strains at 4°C for 4 weeks in MRS media (initial about 5 log CFU/mL).....	20
Figure 5. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from MRS media at -2°C , -1°C and 4°C	21
Figure 6. Growth of mixed LAB 6 strains at 6.5°C for 12 weeks in MRS media (initial about 5 log CFU/mL).....	24
Figure 7. Growth of mixed LAB 6 strains at 15°C for 7 days in MRS media (initial about 5 log CFU/mL).....	25
Figure 8. Growth of mixed LAB 6 strains at 30°C for 48 hours in MRS media (initial about 5 log CFU/mL).....	26
Figure 9. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from MRS media at 6.5°C , 15°C and 30°C	27
Figure 10. Growth of lactic acid bacteria at -2°C for 12 weeks in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL).....	30

Figure 11. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -2°C 31

Figure 12. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)..... 33

Figure 13. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -1°C 34

Figure 14. Growth of lactic acid bacteria at 4°C for 4 weeks in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)..... 36

Figure 15. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -4°C 37

Figure 16. Growth of lactic acid bacteria at 6.5°C for 12 weeks in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)..... 39

Figure 17. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at 6.5°C 40

Figure 18. Growth of lactic acid bacteria at 15°C for 7 days in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)..... 42

Figure 19. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at 15°C 43

Figure 20. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate..... 46

Figure 21. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate inoculated *W. koreensis* SK (initial about 6~7 log CFU/mL)..... 47

Figure 22. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate inoculated *Lb. sakei* SC1 (initial about 6~7 log CFU/mL)..... 48

Figure 23. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -1°C 49

제 1 장 서 론

김치는 여러 가지 재료와 양념을 혼합하여 발효 및 숙성시키는 우리나라 전통 발효 식품이다. 다양한 재료들을 사용함으로써 김치 안의 미생물은 유산균과 호기성 세균, 효모 등으로 다양하게 존재한다[2, 28]. 김치에 존재하는 미생물은 김치의 재료[38]와, 발효 온도[4, 8, 10, 19, 33, 36, 43], 소금의 농도[40], 미생물의 존재에 따라 김치의 맛과 생산하는 산의 종류에 영향을 미친다. 보통 김치의 발효에 관여하는 유산균은 *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속, *Pediococcus* 속, *Weissella* 속 등으로 나뉘고, 대표적으로 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc inhae*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Weissella confusa*, *Weissella cibaria*, *Weissella koreensis* 등으로 보고되었다[5, 8, 20, 22, 27, 29, 32].

김치의 저장 기간 동안 유산균들의 분포는 달라진다[24]. 김치 발효 초기에 관여하는 hetero-type의 *Leuconostoc* 속은 homo-type과는 달리 유기산과 이산화탄소를 생성하여 김치를 혐기적인 상태로 만들고, 김치에 특 쓰는 시원한 맛을 부여하고 신 맛이 적당하여 부드러운 관능적 특성을 가진다. 이러한 특성을 이용하여 김치의 starter로써 연구가 되어진 바 있다[3, 26]. Hetero-type의 균은 김치 발효 초기에 우점을 하지만 발효 후기에는 pH가 낮아져 내산성과 산생성력이 약한 *Leuconostoc* 속은 감소하고, 내산성이 강한 homo-type의 *Lactobacillus* 속이 증가한다. *Lactobacillus* 속은 다량의 유기산을 생성하여 김치를 시어지게 하고 김치의 산패에 관여한다고 알려져 있다[7, 36].

김치의 맛은 사용하는 재료 및 재료의 양, 소금의 농도, 발효 조건에 영향을 받는다. 이 중 발효 조건에 중요한 인자 중 하나는 온도로, 유산균의 생육이 온도에 민감하기 때문이다. 각 유산균마다 생육 온도가 다르므로 온도에 따라 김치 발효에 관여하는 유산균들의 다양성에 차이가 있으며 발효양상을 달라지게 함으로써 김치의 맛에 영향을 미친다[8, 36]. *Lactobacillus* 속은 중·고온에서 생육이 활발하며, *Leuconostoc* 속과 *Weissella* 속은 주로 저온에서 생육이 활발한 것으로 보고되었다[9, 39, 44].

또한, 김치의 맛을 좌우하는 조건 중 하나인 배추는 배추에 함유되어 있는 독특한 생리활성 물질인 glucosinolate에 의해 김치의 품질에 영향을 미친다. 황을 함유하는 glucosinolate는 양배추, 무, 브로콜리, 배추 등의 십자화과 채소들에 포함되어 있다. 이

십자화과 채소들은 자연적으로나 인위적인 조작으로 인해 조직의 파괴를 주면 조직에 들어있는 가수분해효소인 myrosinase에 의해 glucosinoalte가 isothiocyanate, nitrile, thiocyanate 등으로 분해된다[16, 21]. 이 분해산물들은 향균이나 향암 효과[11, 14, 17] 등의 긍정적인 측면도 있으나, 자극적인 냄새와 쓴 맛이 나는 부정적 측면도 있는 것으로 보고되고 있다[13, 45]. 특히 배추 수확기간이나 절임 조건 등에 따라 품질 변화가 발생하는데, 여름철 배추가 다른 시기의 배추에 비해 총 glucosinolates 함량이 높은 것으로 나타났고, 절임에 사용한 소금의 농도와 절임시간이 감소함에 따라 배추의 총 glucosinolates 함량이 증가하는 것으로 연구되었다. 김치를 저온으로 오랜 기간 저장하였을 때 지속적으로 쓴 맛이 나는 현상이 일어나는데, 이러한 현상으로부터 김치 쓴 맛의 원인을 배추의 glucosinolates의 함량에 따른 것이라고 보기보다는 김치가 발효함에 따라 달라지는 유산균총에 의한 요인이 보다 강하다고 추측할 수 있다.

김치 발효 미생물의 연구가 지속됨에 따라 배지를 이용하여 미생물의 형태를 동정하는 방법인 배양학적 방법 (culture dependent method) 이외에 미생물 군집의 구조와 다양성을 밝히기 위해 비배양학적 방법 (culture independent method)이 이용되고 있다. 이는 생태학 연구뿐만 아니라 김치[2, 15], 막걸리[31], 누룩[30], 치즈[12] 등과 같은 발효식품에도 많이 사용되고 있으며, 배양학적 방법이 배지 상에서 모든 미생물들을 배양하지 못하며, 형태에 따라 동정하는데 한계가 있어 이를 해결하고자 사용되고 있다. 비배양학적인 방법의 종류로는 연구로 염색체 상의 유전자를 검색할 수 있는 FISH (fluorescence *in situ* hybridization), DNA를 유전자 절단 제한 효소로 절단하여 유전자 길이에 따라 패턴을 분석하는 T-RFLP (terminal-restriction fragment length polymorphism)와 ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) 분석, 분자량에 따라 단백질을 밴드로 분리해 패턴을 분석하는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel eletrophoresis), PCR-DGGE (polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis) 등 다양한 방법이 있다[41]. PCR-DGGE는 16s rRNA 부분의 DNA를 추출하여 PCR법으로 증폭을 시키고 핵산의 이중나선구조와 변성구조가 변성제 농도와 Tm 값의 차이에 따라 핵산의 이동속도가 달라지는 점을 이용하여 미생물의 분포와 변화를 분석하는데 사용한다[28, 30, 47]. 본 연구에서는 김치 미생물의 분포를 분석하는데 있어서 배양학적 방법이 미생물 동정에 한계가 존재하므로 비배양학적 방법을 동시에 사용하여 부족한 부분을 보완하고자 실시하였다.

지금까지 김치 발효 기간 동안에 걸쳐 김치 내에 존재하는 다양한 유산균을 분석하는 방법이 도입되어 연구한 결과는 많이 보고되었으나[23, 24] 유산균의 발효 패턴을

조절하는 기술에 대한 연구 보고는 미비한 실정이다. 최근 김치의 보관기간에 따라 산패현상[7, 36]이나 쓴 맛이 나타나는 문제가 발생하고 있다. 이 때 발생하는 김치의 쓴 맛은 배추에 함유되어 있는 glucosinolate가 분해되어 나오는 분해산물에 의한 것으로 보고되었으나[13, 45] 일반 가정집에서 발효시키지 않은 김치를 저온 보관 시 쓴 맛이 발생하는 현상이 지속적으로 나타나고, 발효 후 김치를 저온에 보관하였을 때 일정 기간 동안 쓴 맛이 나타나는 것으로 보아 김치의 쓴 맛의 원인은 배추의 glucosinolate에 의한 것이 아닌 특정 유산균의 생육으로 추측하였다.

본 연구에서는 김치의 보관 및 발효 온도에 따른 유산균의 패턴이 어떻게 변화하는지 배양학적 방법으로 관찰하였고, 배양학적 방법에 의한 한계를 해결하고자 비배양학적 방법을 동시에 사용하여 관찰하였다. 이를 통해 각 온도에 따라 우점하는 유산균을 찾고 그 유산균들의 관능적 특성을 조사하여 김치 쓴 맛의 원인균을 규명하여 쓴 맛을 감소시키고자 하였다.

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절 사용 균주 선정

1. 사용균주 및 배지

본 실험에서는 여러 지역의 배추김치에서부터 분리, 동정되어 본 실험실에서 보유하고 있는 유산균 9종 (*Lactobacillus* 속 3종, *Weissella* 속 3종, *Leuconostoc* 속 3종)을 사용하였다 (Table 1). 모든 균주는 MRS (De Man Rogosa Sharpe, Difco, Sparks, MD, USA) broth 배지에 1% (v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 정치배양한 후 계대하여 사용하였다.

2. Genomic DNA의 추출 및 PCR (polymerase chain reaction) 증폭

유산균 9종의 배양 후 배양액을 원심분리 (13,475 ×g, 5 min)하여 얻어진 균체를 사용하였고, DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 16s rRNA gene을 추출하였다. 이렇게 추출한 genomic DNA들은 0.8% agarose gel에 전기영동한 다음 UV transilluminator를 사용하여 확인하였다.

각 균주의 추출된 16s rRNA gene들은 증폭시키기 위해 PCR template로 이용되었다. Primer는 universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')를 forward primer로 사용하였고, universal primer 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')는 reverse primer로 사용하였다. 반응 조건으로는, 95°C에서 4분간 초기로 열을 가한 후, 95°C에서 1분 동안 denaturation, 45°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 2분 동안 extension 하는 과정을 30회 반복한 다음, 마지막으로 72°C에서 10분간 처리하였다[15]. 증폭된 DNA는 0.8% agarose gel을 이용해 전기영동하여 확인하였다.

Table 1. Pre-screening (PCR-DGGE) on 9 strains lactic acid bacteria

Genus	Specise & Strain
<i>Lactobacillus</i> spp.	<i>Lactobacillus sakei</i> SC1
	<i>Lactobacillus sakei</i> YY1
	<i>Lactobacillus plantarum</i> HD1
<i>Weissella</i> spp.	<i>Weissella koreensis</i> SK
	<i>Weissella confusa</i> GJ6
	<i>Weissella cibaria</i> 37
<i>Leuconostoc</i> spp.	<i>Leuconostoc citreum</i> GR1
	<i>Leuconostoc kimchii</i> GJ2
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA

Reference : [46]

3. DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)를 이용한 미생물 분석

증폭된 16s rRNA gene들은 nested-PCR을 수행하기 위해 PCR template로 사용되었다. 사용된 primer는 16s rRNA 중 변이가 가장 잘 일어나는 V3 region을 증폭시키기 위해 GC-clamp가 포함된 GC-Lac 2 (5'-CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGC CCG GGG GCA CCG GGG GAT TYC ACC GCT ACA CAT G-3')를 reverse primer로, Lac 1 (5'-AGC AGT AGG GAA TCT TCC A-3')은 forward primer로 하여 코스모진텍 (Cosmogenetech, Seoul, Korea)에 주문 제작하여 사용하였다[35]. PCR 반응은 50 ng DNA와 10 pmol primer (F/R), dNTP mixture (2.5 mM each), 10 X PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 그리고 마지막으로 0.5 U *Taq* polymerase를 첨가하여 최종 부피가 50 μ L이 되게 하였다.

PCR 반응 조건으로는 Lee 등[35]의 연구 방법을 이용하여 실험하였다. 94°C에서 2분간 초기로 열을 가한 후, 94°C에서 30초 동안 denaturation, 61°C에서 1분 동안 annealing, 68°C에서 1분 동안 extension 하는 과정을 40회 반복하고, 마지막으로 68°C에서 10분간 처리하였다. 증폭된 산물은 2% agarose gel에 전기영동하여 확인하였다.

Nested-PCR을 수행하여 얻은 PCR 증폭 산물은 BIORAD DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, USA)으로 DGGE를 수행하여 분석하였다. Denaturing gradient gel은 8% polyacrylamide gels (acrylamide/bis-37.5:1)을 사용하였고, 변성제의 농도 구배는 7 M Urea와 40% formamide를 이용하여 30%에서 60%로 연속되게 제작하였다.

PCR 증폭산물을 loading 한 후, 1 X TAE buffer (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0) 에서 60°C, 50 V, 20시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 EtBr (ethidium bromide)을 사용하여 5분간 염색시켜 관찰하였다.

제 2 절 배양 온도에 따른 배지 내에서의 유산균 공동배양

1. 시료 준비

김치를 마쇄하여 멸균거즈로 2번 여과시킨 김치여액에 적용하기 전 유산균이 생육하기 적합한 환경에서 공동배양 하였을 때 각 유산균들의 변화를 관찰하기 위해 먼저 배지 내에서 실험을 진행하였다. DGGE를 통해 선발된 유산균 6종 *Lb. plantarum* HD1, *Lb. sakei* SC1, *W. koreensis* SK, *W. cibaria* 37, *Leu. mesenteroides* TA, *Leu. citreum* GR1을 대상으로 하여 5 mL MRS broth에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치 배양한 후 계대하여 본 배양에 사용하였다. 본 배양액은 각 균주를 초기균수가 약 5.0 log CFU/mL가 되게 30 mL MRS broth에 접종하여 각각의 보관 및 발효 온도에 공동 배양한 뒤 변화를 관찰하였다[46]. 이 때 담금 직후 김치의 유산균 초기균수가 약 5.0 log CFU/mL인 것을 근거로 하였다.

2. 보관 온도에 따른 유산균 공동배양

보관 온도에 따른 유산균의 변화를 관찰하기 위하여 일반 김치냉장고의 보관온도인 -2℃와 -1℃에서는 12주까지 관찰하였고, 일반 냉장고 보관온도인 4℃에서는 4주까지 관찰하였다 (Table 2).

가. 생균수 측정

시료는 멸균수로 단계희석법을 사용하여 10배 희석한 후 MRS (Difco), 0.002% bromophenol blue를 첨가한 MRS, PES (Phenyl Ethyl alcohol Sucrose), LBS (modified-*Lactobacillus* selection), LB (Luria Bertani; 1% Bacto tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl) 배지에 100 μ L씩 도말하여 30°C에 24~48시간 배양하였고, colony forming unit 계수 후 CFU/mL로 표기하였다. MRS와 MRS에 0.002% bromophenol blue를 첨가한 배지에서는 균의 colony 모양과 크기를 이용하여 *Lactobacillus* 속과 *Weissella* 속, *Leuconostoc* 속을 구별하였다[35]. An[1]의 연구 방법에 따라, PES 배지는 dextran 생성하여 점질물을 형성하는 *Leuconostoc* 속의 선택배지로 사용되었으며, *Lactobacillus* 속의 선별 배지로는 LBS 배지를 사용하였다.

나. Genomic DNA 추출 및 PCR-DGGE 분석

각 온도에서 보관되었던 유산균 배양액 (200 μ L)에서 균체를 추출하기 위해 원심분리 (13,475 $\times g$, 5 min)하여 water pump를 사용하여 상정액을 제거한 후, 균체를 사용하였고, DNeasy blood & tissue kit에 명시된 method를 참고하여 실험을 진행하였다. 균체에 enzymatic lysis buffer를 180 μ L 분주하여 잘 풀어준 후 37°C에서 40분간 처리하여 세포벽을 분해하였고, 25 μ L proteinase K를 분주하여 56°C에서 40분간 효소 처리하여 대사산물을 불활성화 시켰다. 그리고 ethanol을 이용하여 DNA끼리 응축시킨 후, Mini spin column을 사용하여 DNA 추출하였고, 추출된 DNA는 spectrophotometer (Amersham biosciences)를 이용하여 농도를 확인한 후, 0.8% agarose gel을 이용해 전기영동하여 확인하였다.

상기된 방법과 동일한 조건으로 nested-PCR을 진행하였고, GC-clamp가 붙은 GC-Lac 2와 Lac 1 primer를 사용하여 16s rRNA의 V3 부분을 증폭시켰다. 증폭된 산물은 DCode Universal Mutation Detection system를 이용하여 상기된 동일한 조건으로 DGGE를 수행하여 분석하였다.

3. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양

발효 온도에 따른 유산균의 변화를 관찰하기 위하여 김치 발효 온도인 6.5°C와 유산균의 적정 생육 온도인 30°C에서 실험을 진행하였고, 보관 기간은 Table 2에 나타내었다.

가. 생균수 측정

시료는 멸균수로 단계희석법을 사용하여 10배 희석한 후 MRS (Difco), 0.002% bromophenol blue를 첨가한 MRS, PES, LBS, LB 배지에 100 μ L씩 도말하여 30°C에 24~48시간 배양하여 colony forming unit 계수 후 CFU/mL로 표기하였다.

나. Genomic DNA 추출 및 PCR-DGGE 분석

각 온도에서 보관되었던 배양액에서 균체를 추출하기 위해 원심분리 (13,475 $\times g$, 5 min)하여 상징액을 제거한 후 사용하였고, DNeasy blood & tissue kit (Qiagen)에 명시된 method를 참고하여 실험을 진행하였다. 균체에 enzymatic lysis buffer를 분주 후 37°C에서 40분간 처리하였고, proteinase K를 56°C에서 40분간 효소 처리하였다. Mini spin column을 사용하여 DNA 추출하였다. 추출된 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 농도를 확인하였고, 0.8% agarose gel을 이용해 전기영동하여 확인하였다.

상기된 방법과 동일한 조건으로 nested-PCR을 진행하였고, GC-clamp가 붙은 GC-Lac 2와 Lac 1 primer를 사용하여 16s rRNA의 V3 부분을 증폭시켰다. 증폭된 산물은 DCode Universal Mutation Detection system를 이용하여 상기된 동일한 조건으로 DGGE를 수행하여 분석하였다.

Table 2. Temperature and period of lactic acid bacteria co-culture

Temperature		Period
Storage temperature	-2℃	1, 2, 4, 8, 12 weeks
	-1℃	1, 2, 4, 8, 12 weeks
	4℃	1, 2, 3, 4 weeks
Fermentation temperature	6.5℃	3, 5, 14, 28, 56, 84 days
	15℃	1, 3, 5, 7 days
	30℃	6, 12, 18, 24, 36, 48 hours

제 3 절 배양 온도에 따른 김치여액 내에서의 유산균 공동배양

1. 시료 준비

본 실험에서는 시중에 시판되고 있는 S사 김치를 시료로 사용하였다. 김치는 당일 제조된 것을 사용하였고, 마쇄하여 멸균거즈로 2번 여과시킨 김치여액을 30 mL씩 소분하여 실험에 사용하였다. 김치 내의 다양한 유산균이 재료와 저장온도 등의 조건에 따라 다양하게 변화하는데 유산균의 변화를 극대화하여 보기 위해 대표적으로 김치에서 많이 발견되는 유산균을 선정하여 김치여액에 첨가해주었다. 이 후 배양 온도에 따른 유산균들의 변화를 관찰하고, 대조구로 유산균을 첨가하지 않은 김치의 유산균 변화를 관찰하여 비교 분석하였다. 유산균은 앞선 실험을 통해 선정된 6종을 사용하였고, 각 균주들의 초기균수가 약 5.0 log CFU/mL가 되게 접종하였다.

2. 보관 온도에 따른 유산균 공동배양

김[45]의 연구 방법에서 명시된 김치 냉장고의 보관 온도에 따라 실험을 진행하였다. 준비된 시료를 시중에 판매되고 있는 김치 냉장고 3사의 보관온도인 -2°C 와 -1°C 에서 12주까지 유산균의 변화를 관찰하였다 (Table 2). 또 현재까지 김치 미생물의 천이에서 주로 사용되었던 일반 냉장고 온도인 4°C 에서 1주 간격으로 4주 동안 보관하여 유산균의 패턴을 관찰하였다[15, 27, 34, 35, 47]. 유산균 패턴은 상기된 실험 방법과 동일하게 배양학적 방법인 미생물 생균수 측정, 비배양학적 방법인 PCR-DGGE를 통해 분석하였다.

3. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양

김[45]의 논문에 조사된 김치 냉장고의 발효 온도에 따라 김치냉장고의 3사 발효 온도인 6.5℃와 15℃에서 실험을 진행하였다 (Table 2). 유산균 패턴 분석은 상기된 실험 방법과 동일하게 배양학적 방법인 미생물 생균수 측정과 비배양학적 방법인 PCR-DGGE를 통해 분석하였다.

제 4 절 김치 보관 중 쓴 맛 원인균 규명

1. 잠정적인 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 특성 비교

가. 시료 준비

보관 온도에 따른 김치여액 내에서의 유산균 변화를 관찰하여 김치 보관 온도인 저온에서 우점하는 유산균 2종을 선정하여 쓴 맛의 원인균을 규명하기로 하였다. 김치는 시중에 판매되고 있는 H사의 당일 제조된 김치를 사용하였고, 마쇄하여 멸균 거즈로 2번 거른 후 30 mL씩 소분하여 사용하였다. 유산균 2종은 5 mL MRS broth에 1% (v/v) 접종하여 30℃에 24시간 정지 배양하였고, 계대 후 30 mL 김치여액에 1% (v/v) 접종하여 -1℃에 정지 배양하였다.

나. 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 유산균 변화

유산균 패턴은 상기된 실험 방법과 동일하게 생균수 측정으로 관찰하였고, PCR-DGGE를 수행하여 분석하였다.

다. 관능평가

훈련된 연구원 10명을 대상으로 관능을 실시하였다. 관능에는 유산균 6종을 약 5.0 log CFU/mL가 되게 접종한 김치여액을 배양기간과 보관 온도에 따라 시료로 사용하였다. 관능은 쓴 맛의 항목을 5점 척도로 평가하여 1점은 매우 씹, 3점은 보통 그리고 5점은 쓰지 않음으로 나타내었다. 관능 시 물을 제공하여 앞서 평가한 김치여액의 맛이 뒤에 평가하는 김치여액의 맛에 영향을 미치지 않도록 하였다.

라. 통계처리

통계처리는 SPSS program 23 version을 사용하여 일원분산분석 (one-way ANOVA)으로 분석을 실시하였으며, Duncan의 다중범위검정법 (Duncan's multiple range test)을 통해 유의성을 검정하였다 ($p < 0.05$). 값은 $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$ (SD)으로 표기하여 나타냈다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 사용 균주 선정

김치로부터 분리된 균주 중 김[45]의 연구 방법에 따라 다른 유산균 속에 대해 항균 활성이 강하지 않으며 김치 내에서 주로 검출되는 유산균 9종을 사용하였고, 비배양학적 방법으로 관찰하기 위해 유산균 9종에 대해 DGGE를 실시하여 균주를 확인하였다. 선정된 9종의 유산균들은 공동 배양하여 결과를 분석 시 각각의 유산균의 확인이 요구되는데, *W. confusa* GJ6와 *W. cibaria* 37, *Leu. kimchii* GJ2와 *Leu. mesenteroides* TA, *Lb. sakei* SC1과 *Lb. sakei* YY1이 동일한 위치에 band가 나타나 본 분석법에 의해 구분이 확실하지 않았다 (Fig. 1). 이에 따라 DGGE 분석에 의해 분류가 가능한 유산균 6종 (*Lb. plantarum* HD1, *Lb. sakei* SC1, *W. koreensis* SK, *W. cibaria* 37, *Leu. mesenteroides* TA, *Leu. citreum* GR1)을 공동 배양 실험 대상 균주로 선정하였다.

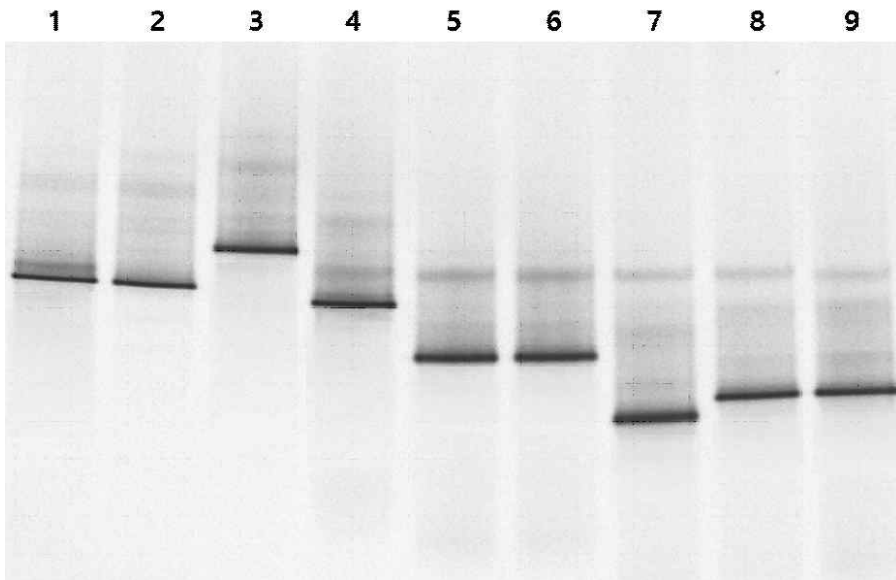


Figure 1. DGGE profile of 9 strains lactic acid bacteria

1, *Lb. sakei* SC1; 2, *Lb. sakei* YY1; 3, *Lb. plantarum* HD1; 4, *W. koreensis* SK; 5, *W. confusa* GJ6; 6, *W. cibaria* 37; 7, *Leu. citreum* GR1; 8, *Leu. kimchii* GJ2; 9, *Leu. mesenteroides* TA

제 2 절 배양 온도에 따른 배지 내에서의 유산균 공동배양

1. 보관 온도에 따른 유산균 공동배양

온도에 따른 김치 내 유산균들의 변화를 극대화하여 관찰하기 위해 김치에서 주로 관찰되는 유산균 6종을 담금 직후 김치 유산균의 초기균수인 약 5.0 log CFU/mL를 배지 내에 공동배양하여 관찰하였다. 보관 온도로는 김치 냉장고의 보관온도인 -2℃, -1℃와 일반 냉장고의 보관 온도인 4℃에서 실험을 진행하였다. 페턴 분석은 유산균의 생균수를 측정하였고 동시에 DGGE 분석으로 확인하였다.

가. 보관 온도 -2℃에서의 유산균 변화

유산균 6종 모두 -2℃에서 보관 2주까지 초기균수 약 5.0 log CFU/mL로 유지하였으며, 총균수는 보관 8주에 7.7 log CFU/mL로 최대에 도달하여 보관 12주까지 유지하였다. 보관 2주부터 *W. koreensis* SK가 점차 증가하기 시작하여 보관 4주부터 보관 12주까지 7.5~7.7 log CFU/mL로 우점하였고, *Lb. sakei* SC1이 보관 4주 이후 6.0 log CFU/mL를 유지하며 우점하였다. 나머지 유산균들은 4.8~5.3 CFU/mL로 초기 접종해 준 상태를 거의 유지하였다 (Fig. 2).

DGGE 분석 결과에서도 마찬가지로 2주 이후부터는 *W. koreensis* SK (band c)와 *Lb. sakei* SC1 (band b)가 우점하는 균으로 관찰되었다. *W. cibaria* 37 (band d)과 *Lb. plantarum* HD1 (band a)의 band는 보관 2주 이후 관찰되지 않았고, *Leuconostoc* 속 2종은 2주~4주까지 band가 관찰되다가, 보관 6주부터 관찰되지 않았다 (Fig. 5).

나. 보관 온도 -1°C 에서의 유산균 변화

보관 온도 -1°C 에서는 *W. koreensis* SK가 보관 1주부터 서서히 증가하여 보관 4주에 약 8.4 log CFU/mL에 도달하였고, *Lb. sakei* SC1은 보관 2주에 6.2 log CFU/mL에 도달하여 보관 4주 이후 7.7~8.0 log CFU/mL까지 증가하는 것으로 관찰되었다. 나머지 유산균들은 접종해 준 초기균수를 거의 유지하였다 (Fig. 3).

DGGE 분석 결과는 보관 1주부터 *W. koreensis* SK (band a)와 *Lb. sakei* SC1 (band b)의 band가 우점으로 관찰되었고, *W. cibaria* 37 (band d)과 *Lb. plantarum* HD1 (band a)의 band는 보관 2주 이후 관찰되지 않았다 (Fig. 5).

다. 보관 온도 4°C 에서의 유산균 변화

일반 냉장고의 보관 온도인 4°C 에서 보관된 시료는 보관 2주에 총균수가 9.0 log CFU/mL로 $-2\sim-1^{\circ}\text{C}$ 보다 매우 증가하는 것으로 관찰되었다. Fig. 4에서 *W. koreensis* SK는 보관 1주에 8.3 log CFU/mL에 도달하여 보관 4주까지 조금씩 증가하였고, *Lb. sakei* SC1은 보관 2주에 8.6 log CFU/mL에 도달한 이후 조금 감소하였다. *Leuconostoc* 속은 보관 1주에 관찰되었으나 점차 감소하였다. *W. cibaria* 37과 *Lb. plantarum* HD1은 초기균수인 약 5.0 log CFU/mL를 일정하게 유지하였다.

DGGE 분석 결과 또한 보관 1주 이후 *Leuconostoc* 속의 band가 관찰되지 않았으며, *W. koreensis* SK (band c)와 *Lb. sakei* SC1 (band b)이 1주부터 우점하는 균으로 관찰되었다 (Fig. 5).

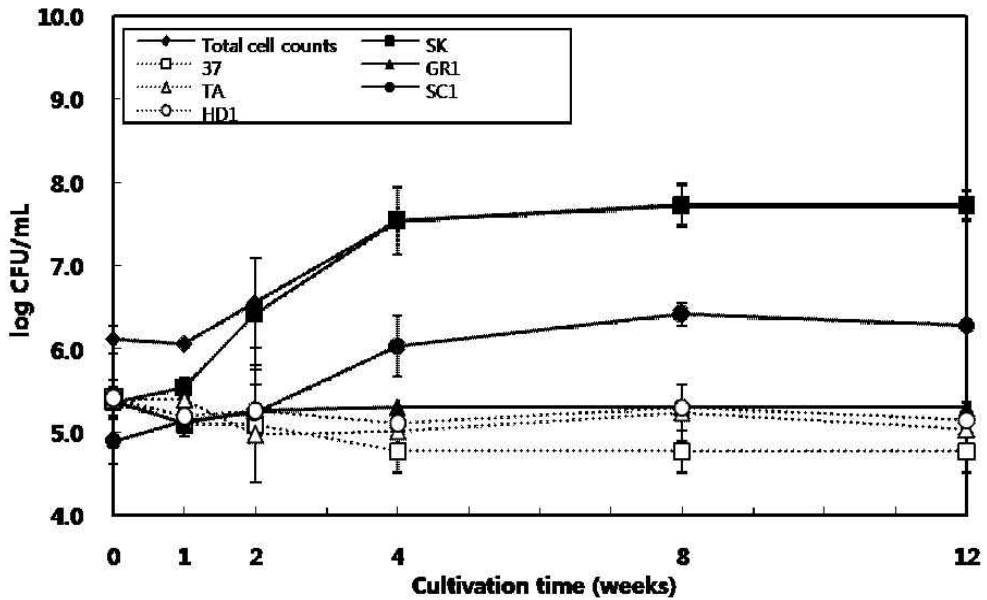


Figure 2. Growth of mixed LAB 6 strains at -2°C for 12 weeks in MRS broth (initial about 5 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GRI; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

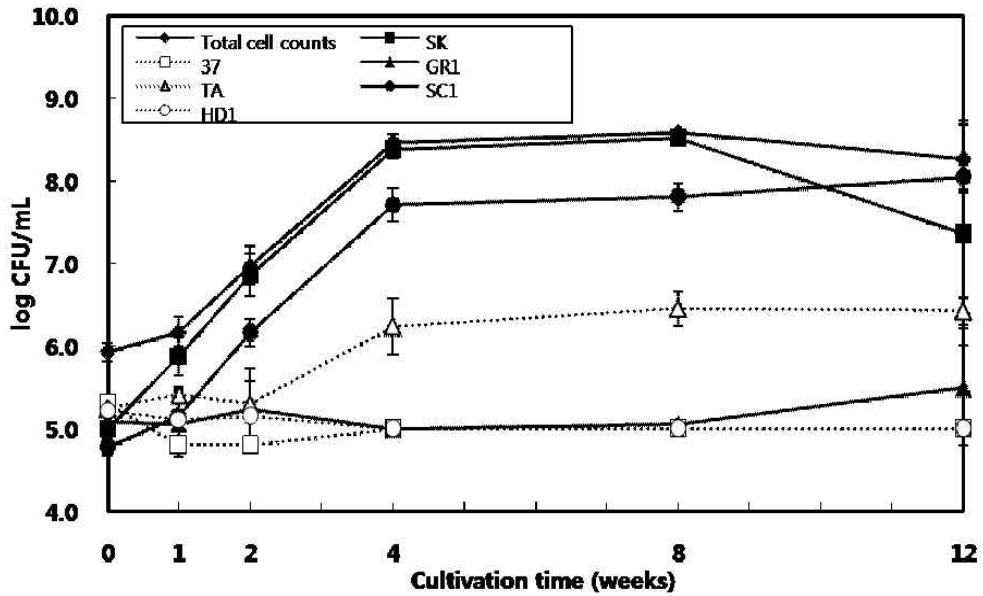


Figure 3. Growth of mixed LAB 6 strains at -1°C for 12 weeks in MRS broth (initial about 5 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GRI; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

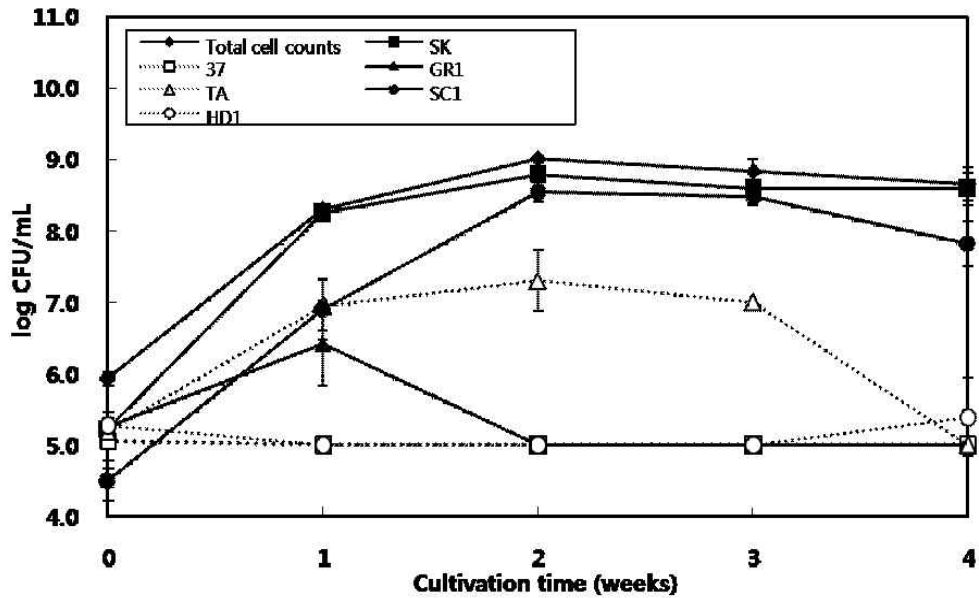


Figure 4. Growth of mixed LAB 6 strains at 4°C for 4 weeks in MRS broth (initial about 5 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GRI; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

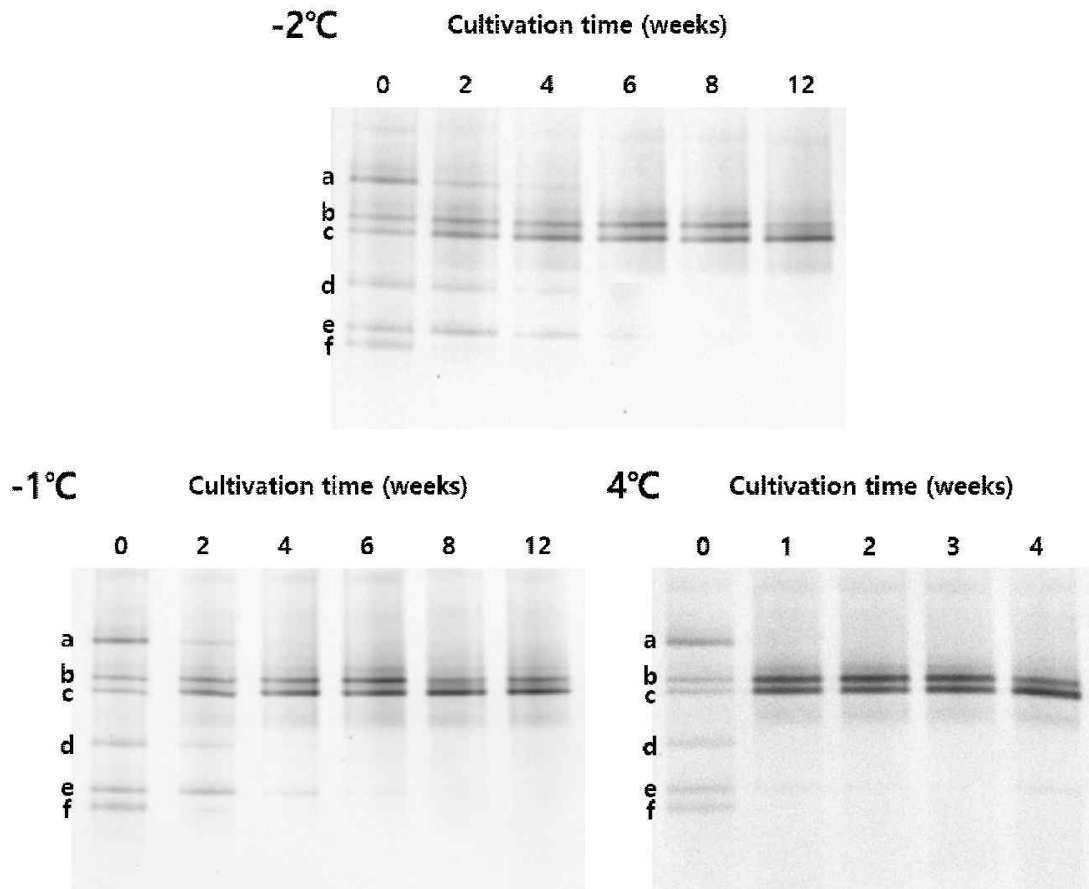


Figure 5. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from MRS broth at -2°C , -1°C and 4°C

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1

2. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양

김치의 발효 온도를 다르게 하여 보관하였을 때, 김치에 존재하는 유산균의 변화를 관찰하기 위하여 위의 방법과 마찬가지로 유산균 6종을 초기균수가 약 5.0 log CFU/mL가 되어 접종하여 배양하였다. 발효 온도로는 6.5°C와 15°C를 사용하였다.

가. 발효 온도 6.5°C에서의 유산균 변화

발효 온도 6.5°C에서의 유산균 변화를 관찰한 결과는 Fig. 6과 Fig. 9에 나타내었다. 총균수는 보관 14일에 최대 8.3 log CFU/mL로 보관 84일까지 유지하였고, *W. koreensis* SK는 보관 5일 이후 약 8.0 log CFU/mL까지 증가하였으며, *Leu. mesenteroides* TA는 보관 3일부터 증가하여 보관 4주까지 약 6.3~7.3 log CFU/mL로 유지되었다. *Lb. sakei* SC1도 보관 3일부터 증가하여 보관 84일까지 7.7 log CFU/mL로 유지되었으며, *Lb. plantarum* HD1은 보관온도에서 배양하였을 때보다 증가하여 6.2 log CFU/mL에 도달하였다.

DGGE 분석 결과 *W. koreensis* SK (band c)와 *Lb. sakei* SC1 (band b)는 보관 3일 이후 보관 84일까지 우점하였고, *Leu. mesenteroides* TA (band e)는 보관 84일까지 희미하게 관찰되었다 (Fig. 9).

나. 발효 온도 15℃에서의 유산균 변화

발효 온도 15℃에서는 유산균 6종 모두 약 7.9~9.3 log CFU/mL에 도달하여 다른 보관온도에 비해 잘 자라는 것으로 관찰되었다 (Fig. 7). 그 중 *Lb. sakei* SC1이 보관 3일에 9.3 log CFU/mL에 도달하면서 보관 7일까지 우점하였고, 다른 온도에서 균수가 증가하지 않았던 *Leuconostoc* 속인 *Leu. citreum* GR1이 보관 5일에 8.8 log CFU/mL에 도달하였다. 반면 저온에서 우점을 했던 *W. koreensis* SK는 보관 3일에 7.9 log CFU/mL에 도달하였다가 점차 감소하였다.

DGGE 분석 결과에서도 *Lb. sakei* SC1 (band b)이 가장 우점하는 것으로 나타났고, *Leu. citreum* GR1 (band f)과 *W. koreensis* SK (band c)가 7일까지 관찰되었다 (Fig. 9).

다. 발효 온도 30℃에서의 유산균 변화

30℃에서의 유산균 변화 관찰 결과를 Fig. 8과 Fig. 9에 나타내었다. 총균수가 보관 12시간 이후에 9.6 log CFU/mL로 최대에 도달한 후 보관 48시간에 조금 감소하였고, 저온에서 우점하는 *W. koreensis* SK는 보관 18시간까지 7.6 log CFU/mL 도달하였지만, 그 이후 생육이 증가하지 못하였다. 다른 보관 온도에서 자라지 못하였던 *W. cibaria* 37이 점차 증가하여 보관 12시간에 최대치인 9.6 log CFU/mL에 도달하여 보관 48시간까지 유지하였다. *Leuconostoc* 속은 보관 6시간부터 7.9~9.1 log CFU/mL에 이르다 24시간 이후 감소하였다. *Lb. plantarum* HD1은 점차 증가하다가 보관 36시간에 9.4 log CFU/mL에 최대치에 이르고 이후 유지하였다.

DGGE 분석 결과 역시 배양학적 방법과 마찬가지로 *W. cibaria* 37 (band d)와 *Lb. sakei* SC1 (band b)가 보관 48시간까지 우점하는 균으로 관찰되었고, *Lb. plantarum* HD1 (band a)는 보관 12시간까지 희미하게 관찰되다가 보관 18시간 이후 뚜렷하게 관찰되었다 (Fig. 9).

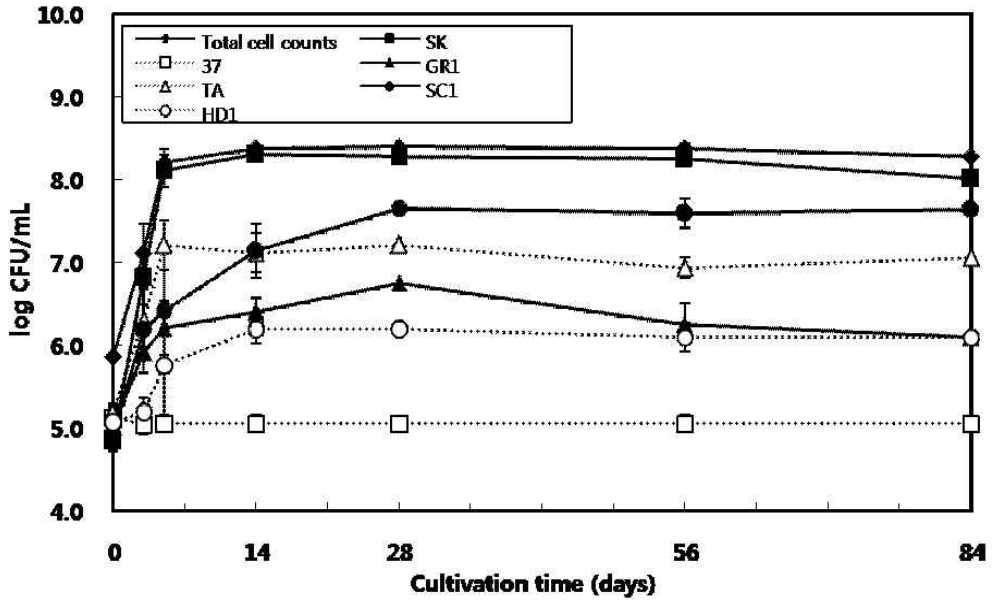


Figure 6. Growth of mixed LAB 6 strains at 6.5°C for 84 days in MRS broth (initial about 5 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GR1; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

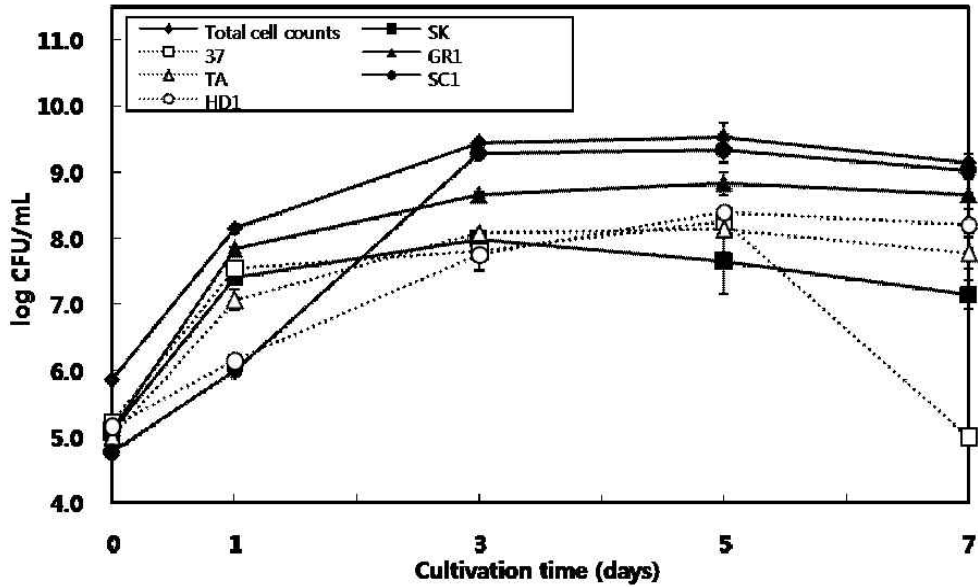


Figure 7. Growth of mixed LAB 6 strains at 15°C for 7 days in MRS broth (initial about 5 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GRI; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

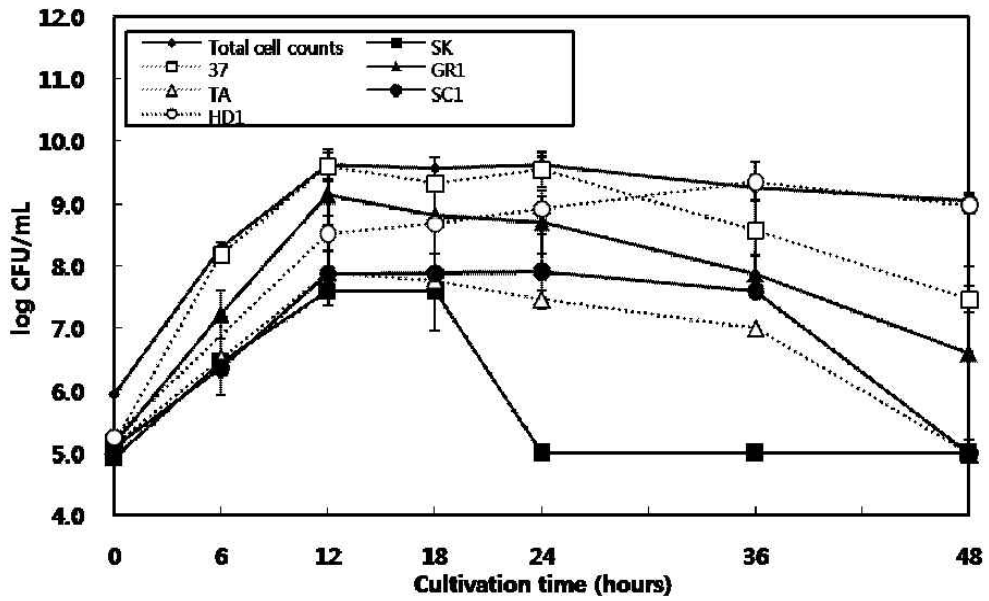


Figure 8. Growth of mixed LAB 6 strains at 30°C for 48 hours in MRS broth (initial about 5 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GR1; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

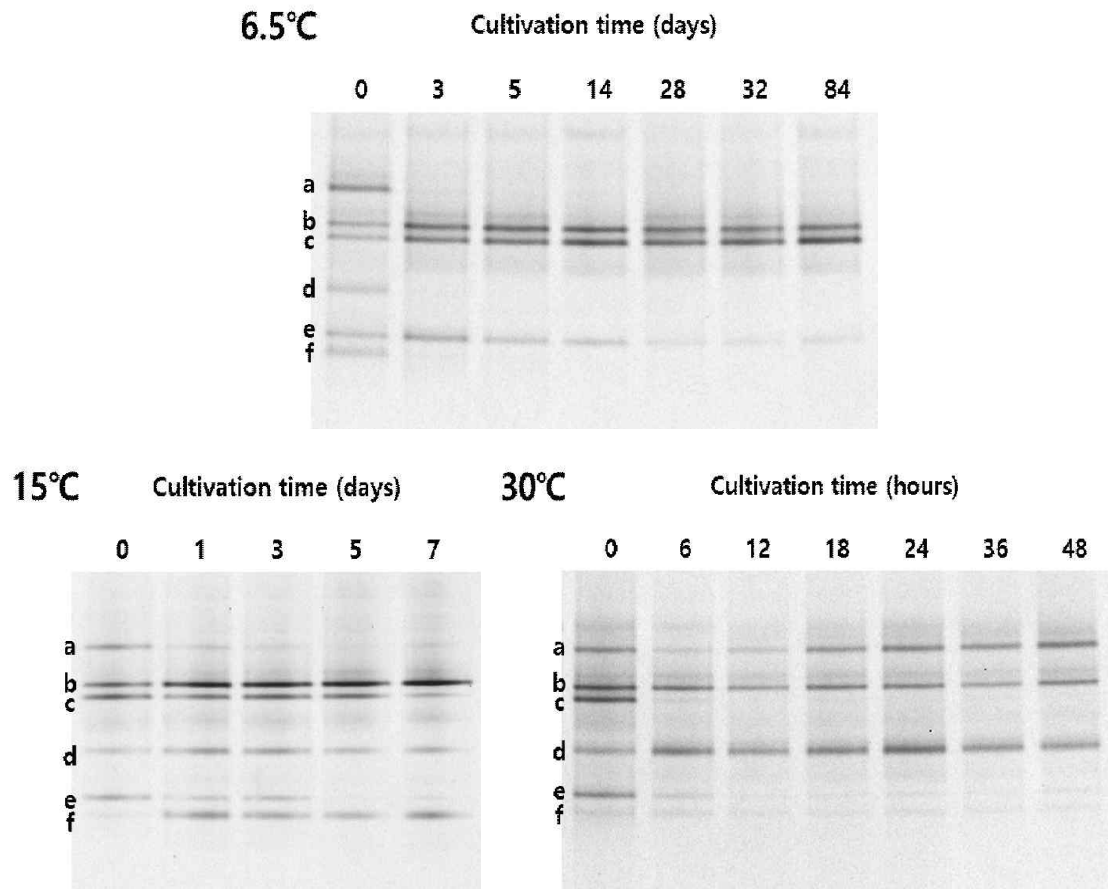


Figure 9. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from MRS broth at 6.5°C, 15°C and 30°C

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1

제 3 절 배양 온도에 따른 김치여액에서의 유산균 공동배양

1. 보관온도에 따른 유산균 공동배양

배지 내에서의 유산균 공동배양과 동일한 방법을 사용하여 실험하였다. 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 여과 후 김치여액만을 사용하여 실험을 하였는데 이는 김치 자체에서의 유산균 변화보다 김치여액에서의 유산균 변화가 더 빠르게 나타나므로 김치여액을 사용하였다. 김치여액에서 유산균의 변화를 더 극적으로 관찰하기 위해 선발된 유산균 6종 *Lb. plantarum* HD1, *Lb. sakei* SC1, *W. koreensis* SK, *W. cibaria* 37, *Leu. mesenteroides* TA, *Leu. citreum* GR1을 담금 직후 김치 유산균의 초기 균수인 약 5.0 log CFU/mL가 되게 김치여액에 접종을 하여 유산균의 패턴을 확인하고, 김치여액 자체에 존재하는 유산균 패턴과 비교하였다. 배양 온도로는 김치 냉장고의 보관온도인 -2℃, -1℃와 일반 냉장고의 보관 온도인 4℃에서 배양하였고, 패턴 분석은 유산균의 생균수를 측정하였고 동시에 DGGE를 수행하여 분석하였다.

가. 보관 온도 -2°C 에서의 유산균 변화

보관 온도 -2°C 에서의 결과는 Fig. 10와 Fig. 11에 나타내었다. 유산균 비첨가 김치 여액에서는 보관 4주까지 유산균 균총의 변화가 거의 없었다 (Fig. 10-A). 유산균수는 보관 8주에 $6.8 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달하여 보관 12주에 $7.7 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달하였다. *W. koreensis*로 추정되는 균주는 보관 8주 이후 $6.7 \log \text{CFU/mL}$ 로 우점하는 균으로 나타났다. DGGE 분석 결과 역시 *W. koreensis* 위치의 band c가 보관 8주 이후 가장 우점하였고 *Lb. sakei* 위치의 band b가 그 다음으로 우점하였다 (Fig. 11-A). *Leu. citreum* 위치의 band f가 0일부터 보관 4주까지 관찰되었고 집중해준 유산균 이외의 균이 관찰되어 (band g) 분석한 결과, *Leu. gelidum* 또는 *Leu. inhae*와 100% 상동성을 보였다.

유산균 6종을 첨가한 김치여액에서 총균수는 보관 4주에 $6.4 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달 후, 보관 12주에 $8.4 \log \text{CFU/mL}$ 까지 도달하였고, *W. koreensis* SK는 보관 4주에 $6.1 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달하여 보관 12주에 $8.3 \log \text{CFU/mL}$ 으로 우점하였다 (Fig. 10-B). DGGE 분석 결과로는 보관 2주까지 *Leu. citreum* GR1 (band f)이 가장 진하게 나타났고, 보관 4주부터 보관 12주까지 *W. koreensis* SK (band c)가 가장 우점하였으며 *Lb. sakei* SC1 (band b)가 두 번째로 우점하는 균주로 나타났다 (Fig. 10-B).

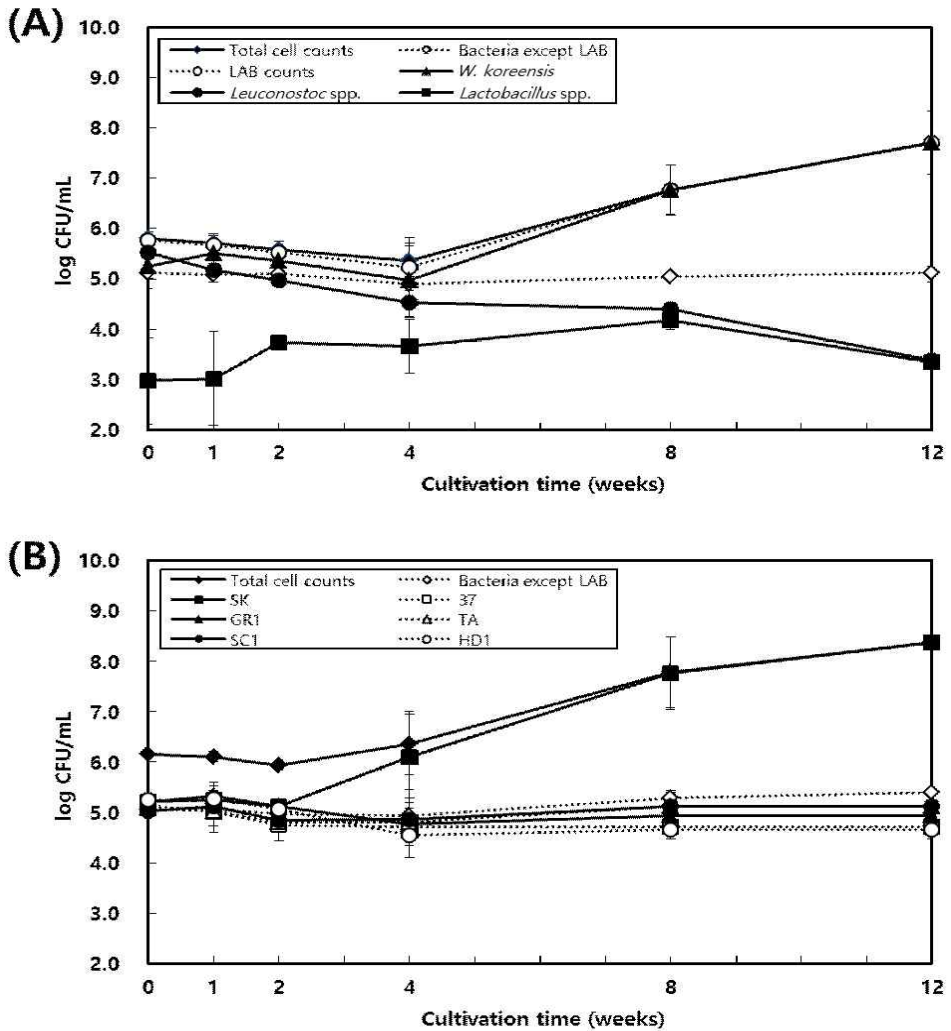


Figure 10. Growth of lactic acid bacteria at -2°C for 12 weeks in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria except LAB; ○, LAB counts; ▲, *W. koreensis*; ●, *Leuconostoc* spp.; ■, *Lactobacillus* spp.

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GR1; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

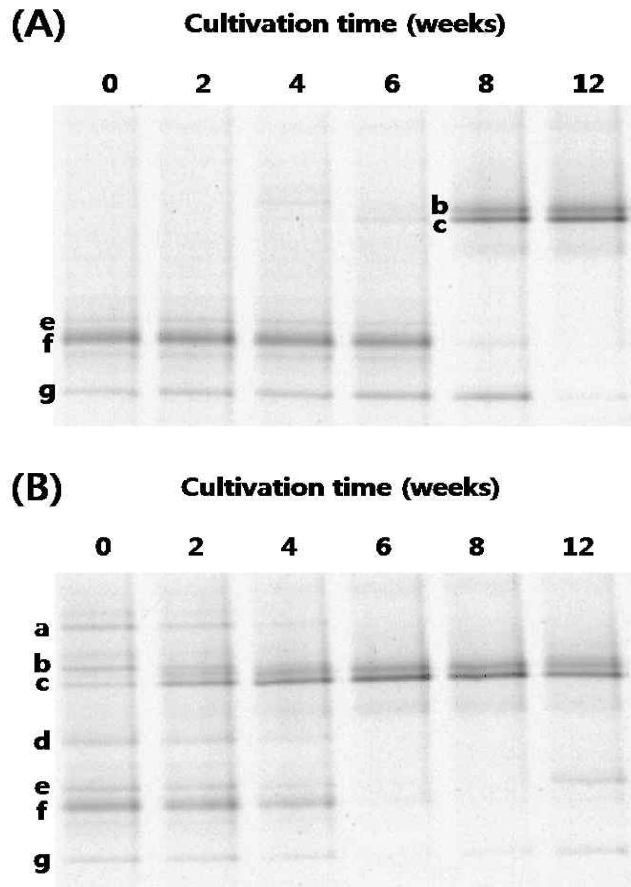


Figure 11. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -2°C

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* or *Leu. inhae*

나. 보관 온도 -1°C 에서의 유산균 변화

보관 온도 -1°C 에서의 유산균 공동배양 결과를 Fig. 12와 Fig. 13에 나타내었다. 유산균 비첨가 김치여액에서는 보관 4주까지는 미생물 군총이 변화가 거의 없었고, 유산균 첨가한 김치여액보다는 생육이 느렸지만 보관 8주에 유산균수가 동일하게 $8.2 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달하였고, 그 중 *W. koreensis*로 추정되는 균주가 $8.1 \log \text{CFU/mL}$ 로 대부분을 차지하여 우점하는 것으로 나타났다 (Fig. 12-A). DGGE 분석 결과, *Leu. citreum* 위치의 band f는 0일부터 보관 4주까지 관찰되었고, 유산균 첨가 김치액과 마찬가지로 보관 4주부터 보관 12주까지 *W. koreensis* 위치의 band c와 *Lb. sakei* 위치의 band b가 우점하는 균으로 나타났다 (Fig. 13-B). 그리고 접종해준 유산균 이외의 균이 0일부터 보관 12주까지 꾸준히 관찰되어 (band g) 분석한 결과, *Leu. gelidum* 또는 *Leu. inhae*와 100% 상동성을 보였다.

유산균 6종을 첨가한 김치여액에서는 총균수가 보관 2주에 $6.2 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달하고, 보관 8주에 $8.5 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달하였다. 마찬가지로 *W. koreensis* SK가 보관 2주에 $5.9 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달 후 보관 8주에 $8.5 \log \text{CFU/mL}$ 에 도달하여 우점하는 균으로 나타났다 (Fig. 12-B). DGGE 분석 결과, *Leuconostoc* 속은 0일차부터 보관 2주까지 관찰되었고, *W. koreensis* SK (band c)는 보관 1주부터 보관 12주까지 우점하는 균으로 관찰되었으며 *Lb. sakei* SC1 (band b)는 보관 4주부터 보관 12주까지 관찰되었다. *Leu. gelidum* 또는 *Leu. inhae* (band g)은 0일부터 보관 4주까지 관찰되었다 (Fig. 13-B).

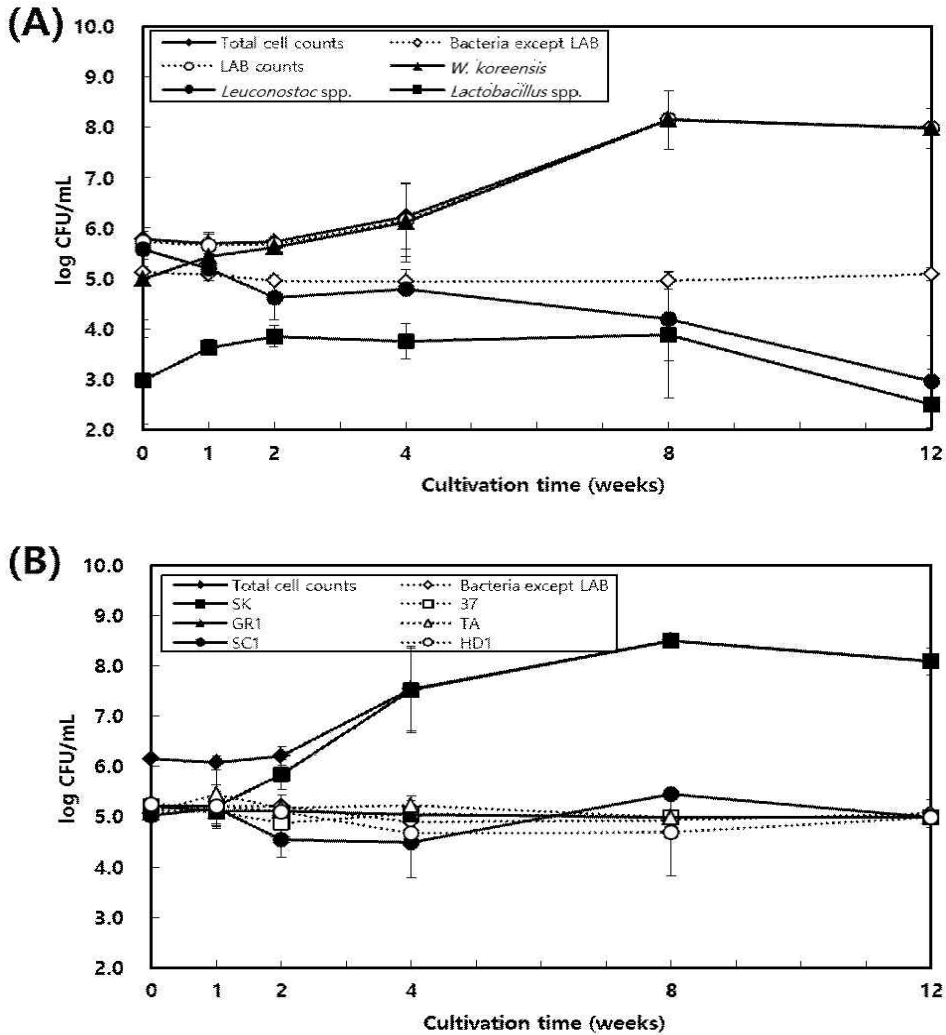


Figure 12. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria expect LAB; ○, LAB counts; ▲, *W. koreensis*; ●, *Leuconostoc* spp.; ■, *Lactobacillus* spp.

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GR1; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

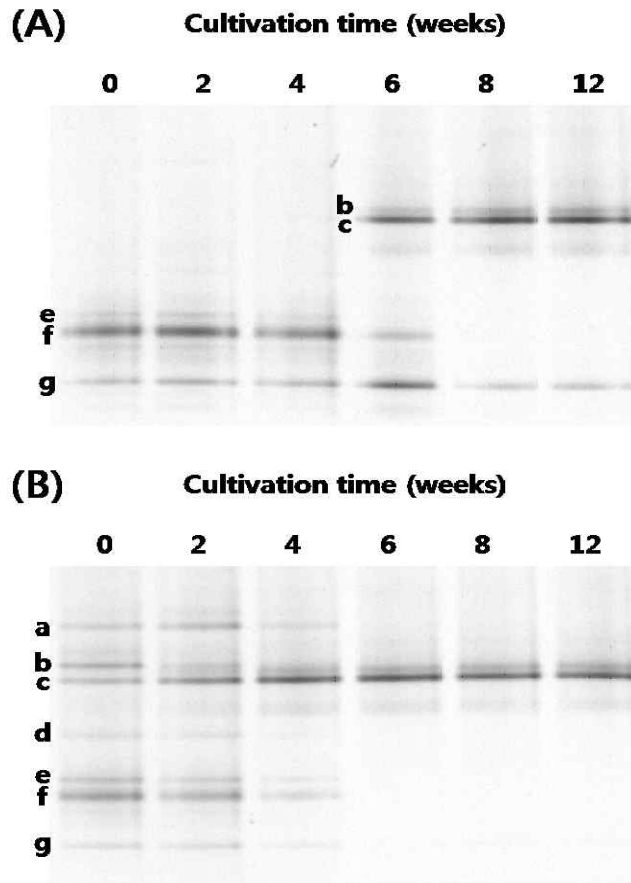


Figure 13. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -1°C

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* or *Leu. inhae*

다. 보관 온도 4℃에서의 유산균 변화

보관 온도 4℃에서의 유산균 공동배양 결과를 Fig. 14와 Fig. 15에서 나타내었다. -2~-1℃에서 보관한 김치여액보다 높은 온도인 4℃에서 보관한 김치여액에서는 유산균 수가 빠르게 증가하여 보관 2주에 약 7.0~8.0 log CFU/mL에 도달하였다. 생균수 측정 결과, 유산균 비첨가 김치여액은 유산균수가 보관 1주부터 점차 증가하여 보관 3주에 최대 8.9 log CFU/mL에 도달하였다가 보관 4주에 8.3 log CFU/mL로 감소하였다. *W. koreensis*로 추정되는 균주는 보관 1주 이후 보관 4주까지 6.1~8.3 log CFU/mL까지 도달하며 가장 우점하는 균으로 관찰되었다 (Fig. 14-A). DGGE 분석 결과, *Leu. citreum* 위치의 band f가 보관 1주까지 우점하였고, 보관 2주부터 보관 4주까지 *W. koreensis* 위치 band c와 *Lb. sakei* 위치의 band b가 우점하는 것으로 관찰되었다. *Leu. gelidum* 또는 *Leu. inhae* 위치의 band g는 0일부터 보관 4주까지 꾸준히 관찰되었다 (Fig. 15-A).

유산균 6종을 첨가한 김치여액에서 *W. koreensis* SK는 보관 2주부터 8.4 log CFU/mL에 도달하여 보관 4주까지 가장 우점하는 균으로 관찰되었다. *Leu. mesenteroides* TA가 보관 2주에 7.3 log CFU/mL에 도달하여 유지하였고, *Lb. sakei* SC1이 보관 4주에 7.3 log CFU/mL에 도달하였다 (Fig. 14-B). DGGE 분석 결과 보관 1주부터 보관 4주까지 *W. koreensis* SK (band c)와 *Lb. sakei* SC1 (band b)가 관찰되었다 (Fig. 15-B).

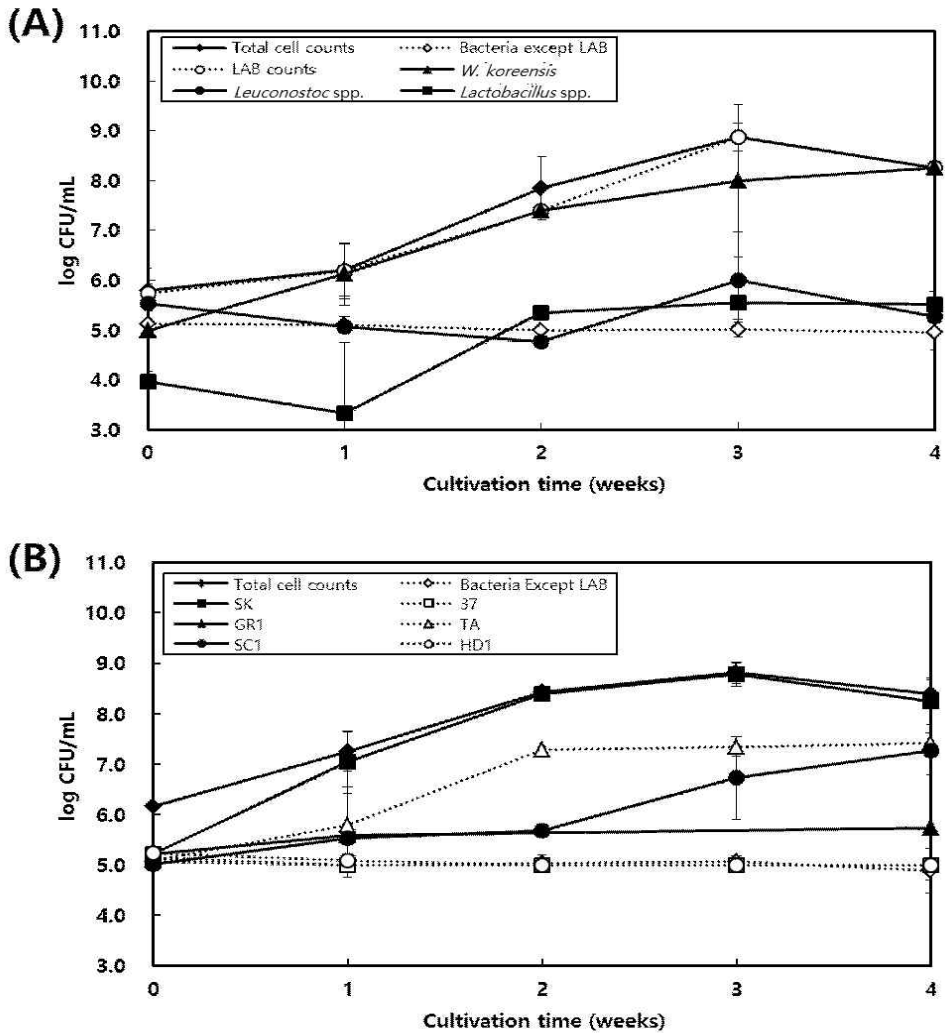


Figure 14. Growth of lactic acid bacteria at 4°C for 4 weeks in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)

(A), Single of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria expect LAB; ○, LAB counts; ▲, *W. koreensis*; ●, *Leuconostoc* spp.; ■, *Lactobacillus* spp.

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GR1; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

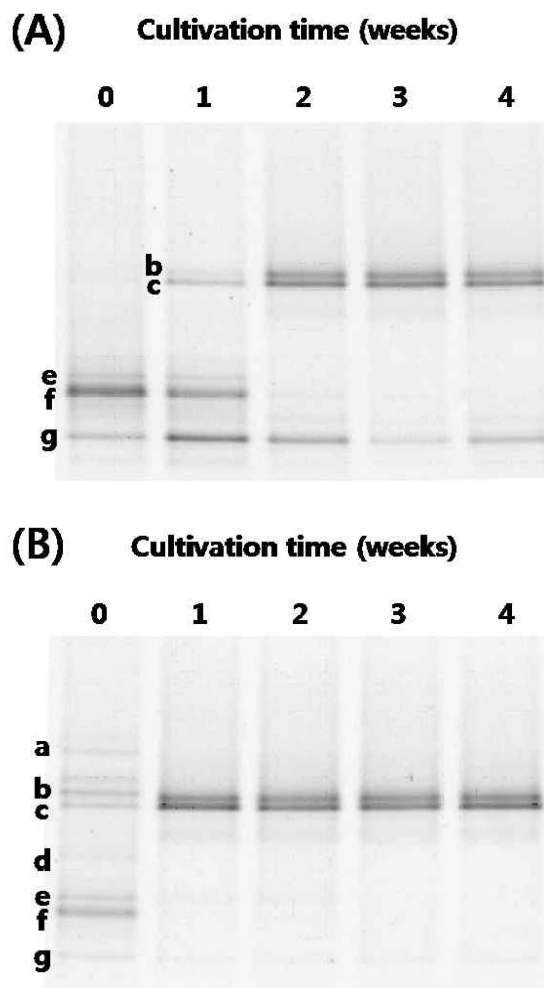


Figure 15. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -4°C

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* or *Leu. inhae*

2. 발효 온도에 따른 유산균 공동배양

김치여액에서 유산균의 변화를 더 극적으로 관찰하기 위해 선발된 유산균 6종 *Lb. plantarum* HD1, *Lb. sakei* SC1, *W. koreensis* SK, *W. cibaria* 37, *Leu. mesenteroides* TA, *Leu. citreum* GR1을 담금 직후 김치 유산균의 초기 균수인 약 5.0 log CFU/mL가 되게 김치여액에 접종하여 유산균의 패턴을 확인하고, 김치여액 자체에 존재하는 유산균 패턴과 비교하였다.

가. 발효 온도 6.5°C에서의 유산균 변화

발효 온도 6.5°C에서 발효를 시킨, 유산균 비첨가 김치여액은 유산균 첨가 김치여액보다 유산균수가 14일 늦은 보관 28일에 7.5 log CFU/mL에 도달한 후, 보관 56일에 8.3 log CFU/mL에 도달하였다. *W. koreensis*로 추정되는 균주는 보관 56일에 8.2 log CFU/mL에 도달하여 우점하였다 (Fig. 16-A). DGGE 결과 역시, *Leu. citreum* 위치의 band f는 0일부터 보관 28일까지 관찰되었고, *W. koreensis* 위치의 band c와 *Lb. sakei* 위치의 band b는 보관 28일 이후 관찰되어 우점하였다. *Leu. gelidum* 또는 *Leu. inhae* 위치의 band g는 0일부터 보관 84일까지 꾸준히 관찰되었다 (Fig. 17-A).

유산균 6종을 첨가한 김치여액의 결과는 Fig. 16-B와 Fig. 17-B에 나타내었다. 총균수는 보관 5일에 7.2 log CFU/mL로 증가하기 시작하고, 보관 14~28일에 8.2~8.4 log CFU/mL까지 도달하였다. *W. koreensis* SK는 보관 14일에 8.1 log CFU/mL에 도달하여 보관 84일까지 우점을 유지하였고, *Leu. mesenteroides* TA는 보관 14일에 7.4 log CFU/mL에 도달하여 보관 84일까지 유지하였다. 이 때, DGGE의 결과는 0일부터 보관 3일까지 *Leuconostoc* 속 (band e, f)가 관찰되었고, *W. koreensis* SK (band c)는 보관 3일부터 보관 84일까지 우점하였다. *Lb. sakei* SC1 (band b) 역시 보관 3일부터 보관 84일까지 우점하는 균으로 나타났다.

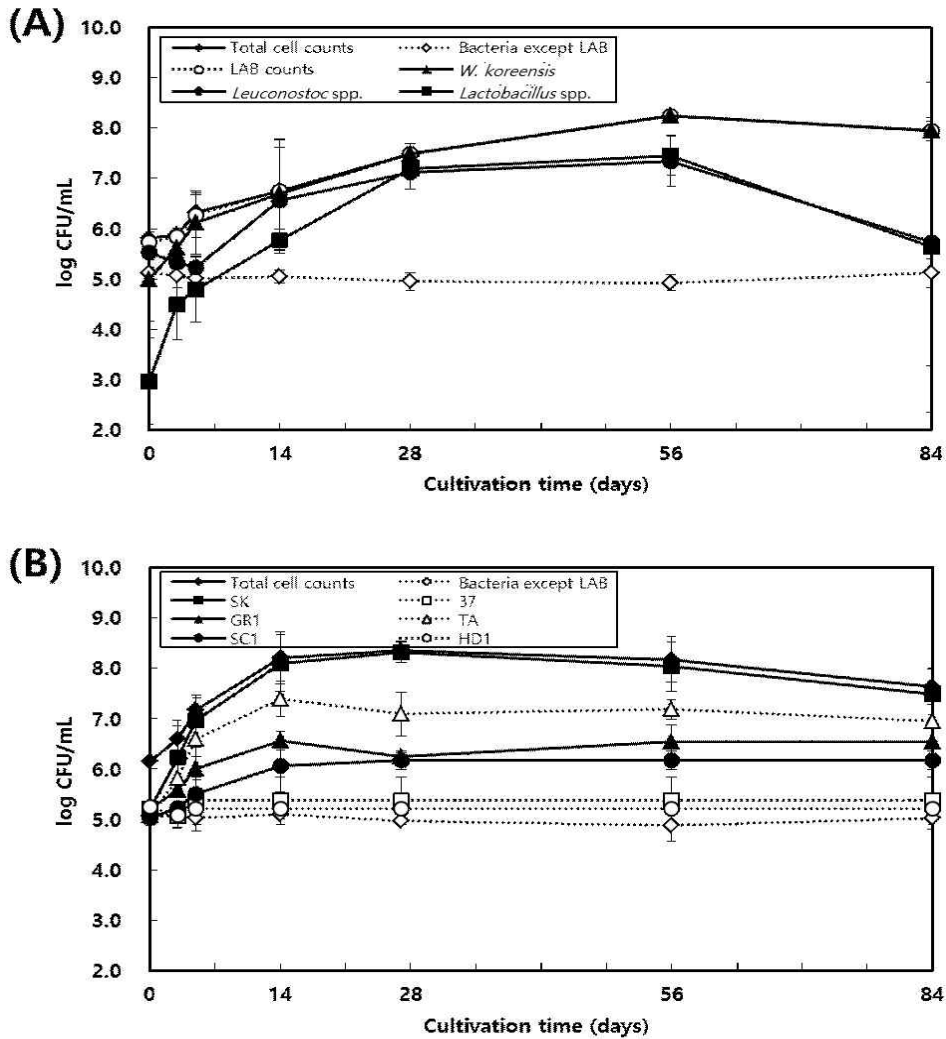


Figure 16. Growth of lactic acid bacteria at 6.5°C for 84 days in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria except LAB; ○, LAB counts; ▲, *W. koreensis*; ●, *Leuconostoc* spp.; ■, *Lactobacillus* spp.

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GR1; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

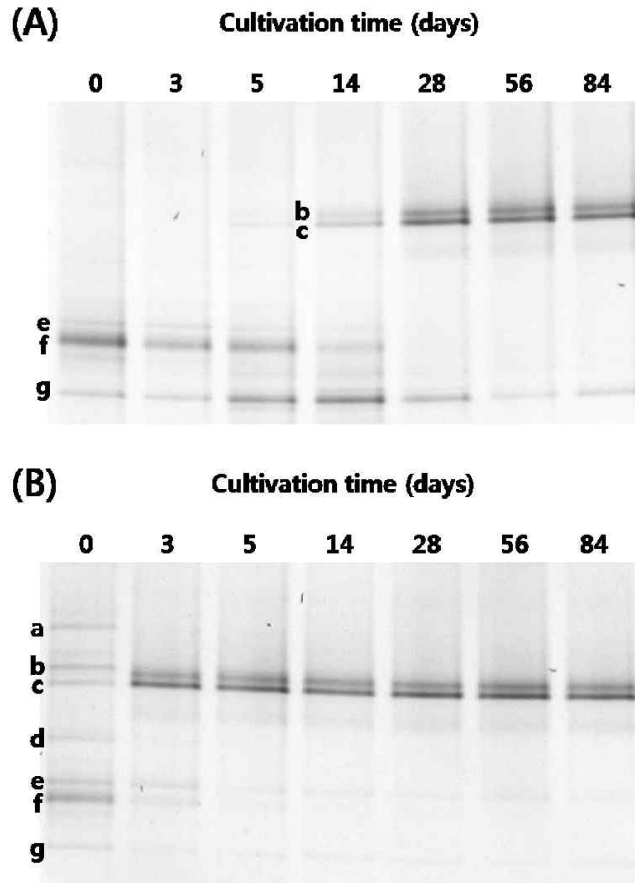


Figure 17. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at 6.5°C

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* or *Leu. inhae*

나. 발효 온도 15℃에서의 유산균 변화

발효 온도 15℃에서 유산균 비침가 김치여액의 결과는 Fig. 18-A와 Fig. 19-A에 나타내었다. 유산균수는 보관 1일 만에 8.7 log CFU/mL에 도달하여 일정하게 유지되었다. *W. koreensis*로 추정되는 균주 역시 보관 1일에 8.6 log CFU/mL에 도달하였고, *Leuconostoc* 속은 보관 3일에 8.1 log CFU/mL에 도달하였다. DGGE 분석 결과, 보관 3일 이후 보관 7일까지 *W. koreensis* 위치의 band c가 우점하는 균으로 관찰되었고, *W. cibaria* 위치의 band d가 보관 5일까지 희미하게 관찰되었다. *Leu. citreum* 위치의 band f가 보관 7일까지 관찰되었으며, *Leu. gelidum* 또는 *Leu. inhae* 위치의 band g 역시 0일부터 보관 7일까지 우점하는 균으로 관찰되었다 (Fig. 19-A).

유산균 6종을 접종한 김치여액의 결과는 Fig. 18-B와 Fig. 19-B에 나타내었다. 총균수는 1일 만에 9.3 log CFU/mL까지 도달하였다. 보관 1일에서 보관 3일에는 *Leuconostoc* 속이 8.4~8.7 log CFU/mL에 도달하였고, *Lactobacillus* 속은 점차 증가하여 보관 3일에서 보관 5일에 7.4~8.3 log CFU/mL에 도달하여 우점하였다. DGGE 분석 결과, *W. koreensis* SK가 보관 1일부터 보관 7일까지 우점하였고, 그 외의 균주 변화는 유산균 비침가 김치여액과 같은 패턴을 보였다.

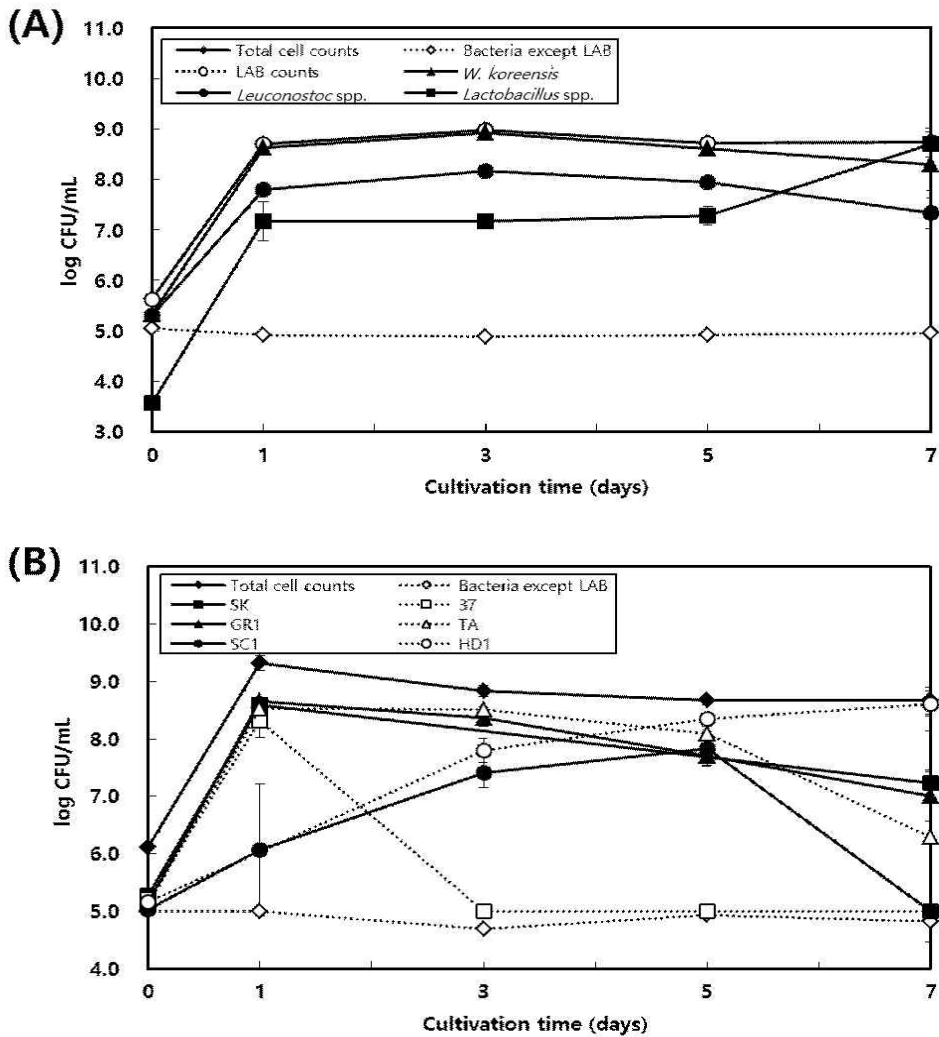


Figure 18. Growth of lactic acid bacteria at 15°C for 7 days in kimchi filtrate (initial about 5 log CFU/mL)

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria except LAB ○, LAB counts; ▲, *W. koreensis*; ●, *Leuconostoc* spp.; ■, *Lactobacillus* spp.

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ■, *W. koreensis* SK; □, *W. cibaria* 37; ▲, *Leu. citreum* GR1; △, *Leu. mesenteroides* TA; ●, *Lb. sakei* SC1; ○, *Lb. plantarum* HD1

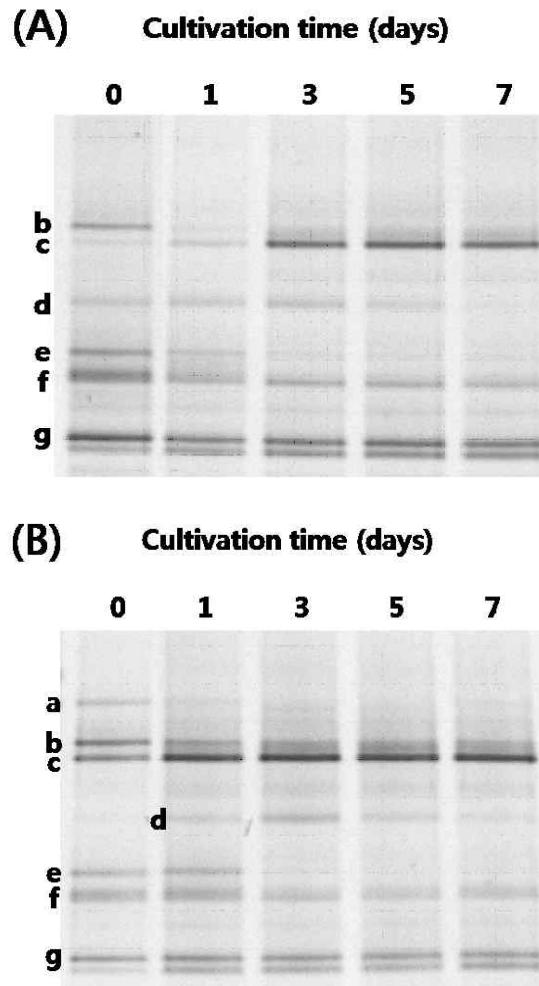


Figure 19. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at 15°C

(A), Single culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

(B), Co-culture of 6 strains of LAB in kimchi filtrate

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* or *Leu. inhae*

제 4 절 김치 보관 중 쓴 맛 원인균 규명

1. 잠정적인 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 특성 비교

김치 보관 시 나타나는 쓴 맛의 원인균을 잠정적으로 파악하는데 위의 결과를 토대로 보면 김치는 저온에서 보관되므로 저온에서 우점하는 균인 *W. koreensis* SK와 *Lb. sakei* SC1을 잠정적인 쓴 맛 원인균으로 추정할 수 있었다. 쓴 맛 원인균으로 추정된 두 균주를 김치여액에 1% (약 6.0~7.0 log CFU/mL) 접종하여 보관 온도인 -1°C에서 보관하여 미생물 변화를 관찰하였고, 쓴 맛의 원인균임을 파악하기 위해 관능검사를 실시하였다.

가. 쓴 맛 원인균 접종 김치여액의 유산균 변화

유산균 비첨가 김치여액에서의 유산균 변화는 유산균수가 보관 4주에 8.2 log CFU/mL로 최고치에 도달하였다. *W. koreensis*로 추정되는 균주 또한, 보관 4주에 7.9 log CFU/mL에 도달하여 보관 12주까지 유지하며, 가장 우점하는 균으로 관찰되었다. *W. koreensis*로 추정되는 균주를 제외한 유산균은 보관 4주 이후 점차 감소하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 20).

W. koreensis SK를 1% 접종한 김치여액은 유산균수가 보관 2주 이후 점차 증가하여 보관 8주에 8.8 log CFU/mL에 도달하였고, *W. koreensis* SK는 8.7 log CFU/mL에 도달하여 가장 우점하는 균으로 관찰되었다. 이 외의 유산균은 8.1 log CFU/mL에 도달하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 21).

Lb. sakei SC1을 1% 접종한 김치여액의 결과는 Fig. 22에 나타냈다. 유산균수는 보관 12주까지 7.3~7.6 log CFU/mL로 크게 변화하지 않은 것으로 관찰되었다. 김치여액에 접종한 *Lb. sakei* SC1은 6.8~7.2 log CFU/mL로 관찰되었고, 이를 제외한 유산균이 보관 12주까지 6.8~7.5 log CFU/mL로 *Lb. sakei* SC1에 비해 더 많이 관찰되었다.

DGGE 분석 결과, *W. koreensis* SK를 접종한 김치여액과 *Lb. sakei* SC1을 접종한 김치여액, 유산균 비첨가 김치여액 모두 *W. koreensis* 위치의 band c가 가장 우점하는 것으로 관찰되었고, 전 구간에서 *Leuconostoc* 속이 관찰되었다 (Fig. 23). *Lb. sakei* SC1을 접종한 김치여액에서는 *W. koreensis* 이외에 *Lb. sakei*가 주로 관찰되었다 (Fig. 23-C).

나. 관능평가

김치 보관 시 나타나는 쓴 맛의 원인균으로 예측되는 원인균을 앞선 결과를 토대로 선발하였다. 선발된 *W. koreensis* SK와 *Lb. sakei* SC1을 1% (약 6.0~7.0 log CFU/mL) 접종한 김치여액과 균주를 접종하지 않은 김치여액을 저장기간 동안 쓴 맛 원인균 선발을 위해 관능검사를 실시하였다. 관능평가는 6주 동안 매주 총 6회 실시하였고, 결과는 Table 3에 나타내었다. *W. koreensis* SK를 접종한 김치여액이 다른 김치여액에 비해 4주차에는 2.33 ± 1.22^a , 6주차에 2.60 ± 1.26^a 로 쓴 맛에 대한 점수가 가장 높게 측정되었다.

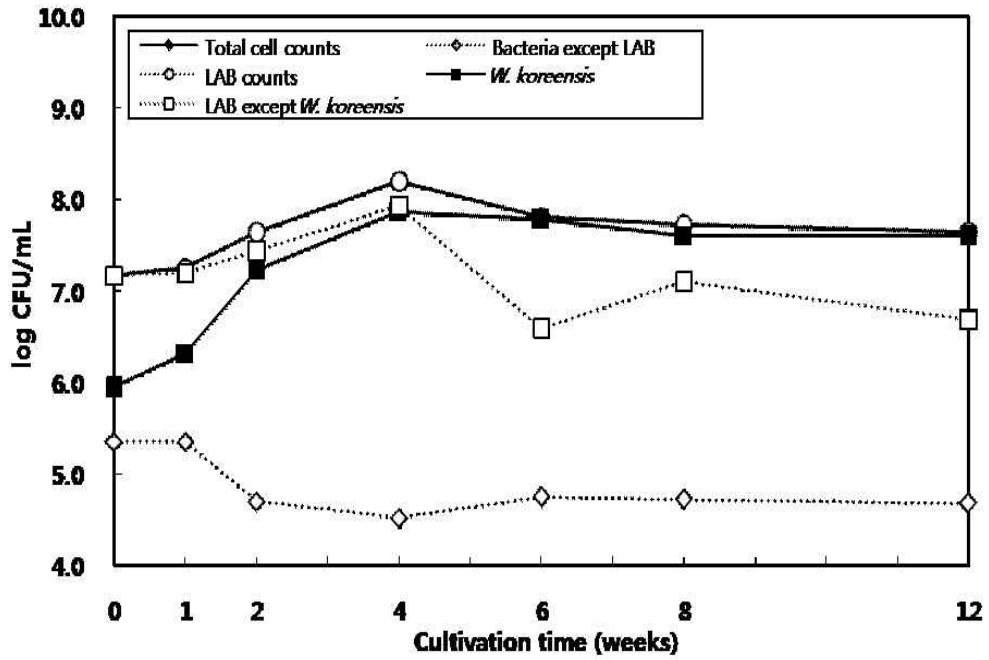


Figure 20. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria except LAB; ○, LAB counts; ■, *W. koreensis*;
 □, LAB except *W. koreensis*

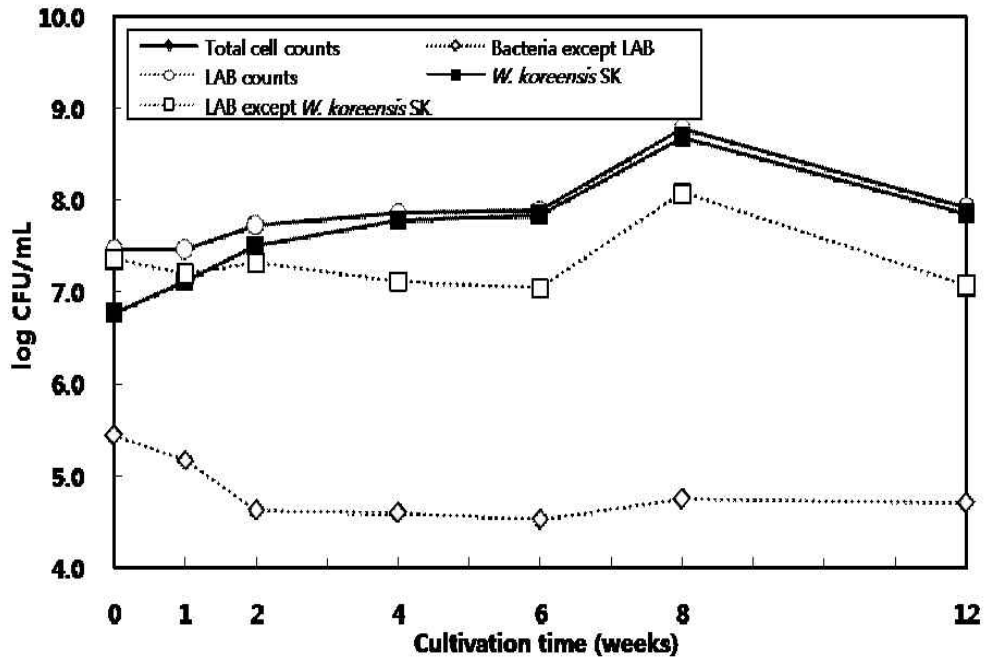


Figure 21. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate inoculated *W. koreensis* SK (initial about 6~7 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria except LAB; ○, LAB counts; ■, *W. koreensis* SK; □, LAB except *W. koreensis* SK

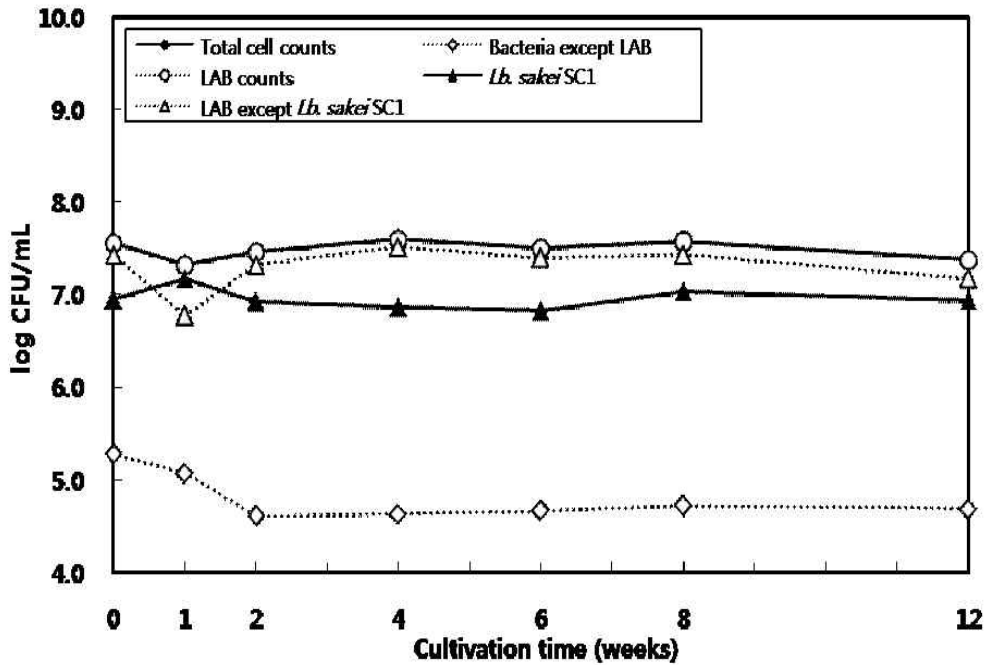


Figure 22. Growth of lactic acid bacteria at -1°C for 12 weeks in kimchi filtrate inoculated *Lb. sakei* SC1 (initial about 6~7 log CFU/mL)

◆, Total cell counts; ◇, Bacteria except LAB; ○, LAB counts; ▲, *Lb. sakei* SC1; △, LAB except *Lb. sakei* SC1

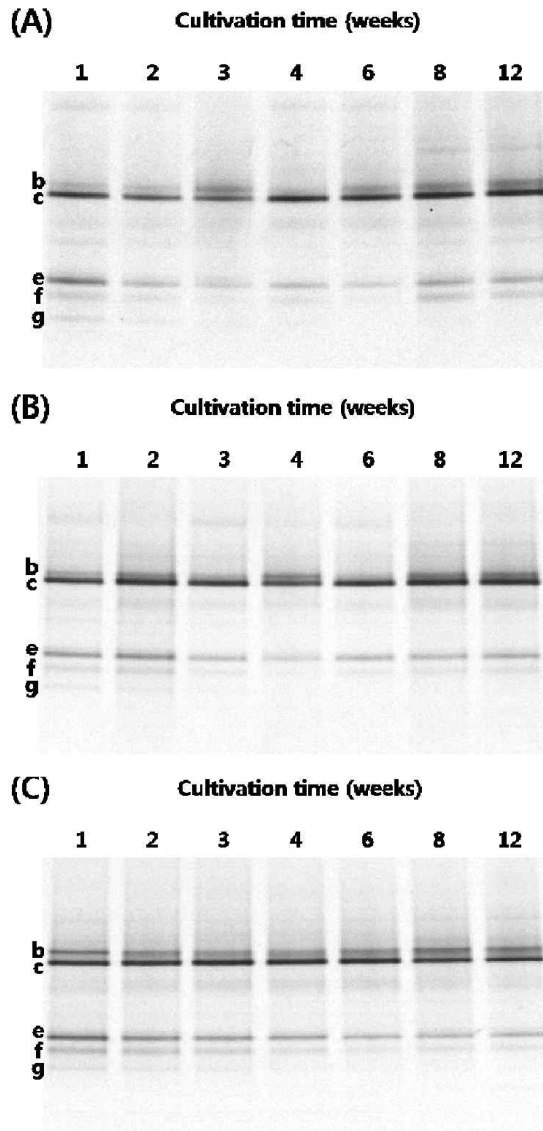


Figure 23. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from kimchi filtrate at -1°C

(A), Kimchi filtrate

(B), Kimchi filtrate inoculated *W. koreensis* SK (initial about 6~7 log CFU/mL)

(C), Kimchi filtrate inoculated *Lb. sakei* SC1 (initial about 6~7 log CFU/mL)

b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* or *Leu. inhae*

Table 3. Sensory evaluation of kimchi filtrate inoculated temporary responsive microorganism for bitter taste

Weeks	<i>W. koreensis</i> SK ¹⁾	<i>Lb. sakei</i> SC1 ¹⁾	Control ²⁾
1	2.78±1.20 ^a	3.33±1.66 ^a	2.67±1.00 ^a
2	3.25±0.71 ^a	3.50±1.07 ^a	2.62±0.92 ^a
3	2.89±1.17 ^a	3.44±1.24 ^a	3.44±0.73 ^a
4	2.33±1.22 ^a	3.89±0.78 ^b	2.89±1.05 ^{ab}
6	2.60±1.26 ^a	3.80±1.03 ^b	2.80±0.79 ^a

¹⁾ Kimchi filtrate inoculated *W. koreensis* SK or *Lb. sakei* SC1 (initial about 6~7 log CFU/mL)

²⁾ Non-inoculated kimchi filtrate

* Values are mean ± standard deviation (SD)

** Different superscripts indicate significant difference at p<0.05 by Duncan's multiple comparison.

제 4 장 결 론

과거에는 김치 발효에 관여하는 유산균들의 다양성과 천이를 형태학적 특성과 생화학적 특성만으로 관찰하여 보고되었으나[2, 8, 22, 33], 2000년 이후 분자생물학적 방법들이 적용이 되면서 기존에 보고되었던 결과와 상이하거나 보고되지 않았던 유산균들이 발견되면서 다양한 유산균들이 김치발효에 관여하는 것으로 나타났다[18]. Chin 등[6]의 연구 결과에 따르면, 김치 발효초기에 *Leu. mesenteroides*가 주로 발효에 관여하는 유일한 균이라고 밝혀졌던 기존 연구와는 달리, 발효에 관여하는 균이 *Lb. brevis*, *W. cibaria*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*로 다양하게 존재한다고 보고되었다. 이처럼 분자생물학적 기법의 발달로 인해 보다 많은 정보를 바탕으로 실제와 가까운 미생물 군집 구성과 기능적 능력을 표현할 수 있게 되었다.

김치발효에 관여하는 유산균의 종류 및 분포양상은 재료, 소금의 농도, 온도 등에 상당한 영향을 받는데, 이 중 온도의 영향을 받아 김치 발효에 관여하는 유산균의 천이를 관찰하는 연구가 많이 진행되고 있다[4, 8, 10, 34, 36]. 이러한 연구결과를 통해, 저온에서 *Leuconostoc* 속과 *Weissella* 속의 생육이 활발하며, *Lactobacillus* 속은 중, 고온에 생육이 활발한 것으로 확인되었다. 이와 같이 온도에 따라 유산균이 변화하면서 김치의 맛에 관여하는 것으로 나타나는데, 김치를 저온에서 보관하였을 때 나타나는 김치의 쓴 맛이 특정 유산균의 생육으로 인한 특성으로 추측되었고, 이를 토대로 배양학적 방법과 비배양학적 방법을 통해 발효온도에 따라 우점하는 유산균을 규명하고 그 유산균을 첨가한 김치의 특성을 관찰하여 쓴 맛의 원인균을 찾을 수 있을 것이라고 생각하였다.

본 연구에서는 보관하는 온도와 발효하는 온도에 따라 유산균총의 변화를 배지와 김치여액에서 관찰하였다. 김치에서 주로 존재하는 대표적인 유산균 9종 중 PCR-DGGE를 통해 선정된 6종을 김치담금 직후의 초기균수인 약 5.0 log CFU/mL로 접종해 공동 배양하여 실험하였을 때, 배지 내에서의 배양학적 방법으로는 -2°C에서 총 유산균의 최대 생균수가 7.7 log CFU/mL로 가장 낮게 관찰되었고, 유산균의 생육 적정 온도인 30°C에서는 가장 잘 생육하여 9.6 log CFU/mL로 관찰되었다. 그리고 -2°C~6.5°C까지 *W. koreensis* SK가 지속적으로 생균수가 높게 유지되어 저온에서 우점하는 균임을 확인하였고, 또한 *Lb. sakei* SC1은 *W. koreensis* SK 다음으로 높게 유지되는 것을 확인하였다. 반면 *W. cibaria* 37과 *Lb. plantarum* HD1은 초기균수를 그대로 유지

하는 것으로 보아 저온에서 생육이 어려운 것으로 확인되었고, 이 균주들은 15℃와 30℃에서 생육이 활발한 것으로 확인되었다. 이 결과는 15℃에서 *Lb. plantarum*이 발효 시작에서부터 종결까지 유지하면서 나타나고, *Leu. mesenteroides*가 발효 초기에 균수가 증가하였다가 후기에 급격하게 감소하는 연구 결과와 유사하게 나타났다[43].

비배양학적 방법인 PCR-DGGE 분석 결과, 저온인 Fig. 5와 Fig. 9에서 0일에 유산균 6종 모두 관찰이 되고 초기에는 *Leu. mesenteroides* TA (band e)가 관찰되었다. 보관기간이 길어질수록 *W. koreensis* SK (band c)와 *Lb. sakei* SC1 (band b)의 band가 주로 관찰되고 그 외의 유산균들은 관찰되지 않아 생균수와 같은 패턴을 보였다. 15℃와 30℃에서는 저온에 비해 균주가 다양하게 나타났고, *Lb. sakei* SC1과 *Lb. plantarum* HD1, *W. cibaria* 37, *Leu. citreum* GR1이 주로 관찰되었다.

김치여액 중 유산균 6종을 첨가한 김치여액의 경우, 배지 내에서의 결과와 패턴이 비슷하게 관찰되었다. 보관 초기부터 *W. koreensis* SK가 우점종으로 나타났고, 이어 *Lb. sakei* SC1이 증가하는 패턴을 보여, 두 균주 모두 저온에서 잘 자라는 균임을 확인하였다. 또한 초반에는 *Leuconostoc* 속이 관찰되다가, 보관 기간이 길어질수록 감소하는 것으로 나타났다. 마찬가지로 유산균 비첨가 김치여액에서도 *W. koreensis*로 추정되는 균이 모든 온도에서 유산균의 대부분을 차지하였다. 이와 같은 결과는 10℃ 또는 15℃에서 발효 후 -1℃에서 보관한 김치에서 *Leu. citreum*이 초기에 우점을 하다가 후기에 *W. koreensis*가 우점하는 연구 결과와 유사하게 나타났다[9].

DGGE 분석 결과, -2~-1℃에서는 초반 보관 4~6주까지는 *Leuconostoc* 속의 균주들이 관찰이 되다가 보관 6~8주 이후 *W. koreensis*와 *Lb. sakei*가 관찰되어 후기에 우점하는 것으로 관찰되었다 (Fig. 11-A, 13-A). 유산균 6종을 첨가한 김치여액은 4~15℃에서 초반부터 *W. koreensis*와 *Lb. sakei*가 진하게 관찰되어 우점하는 것으로 관찰되었고, 유산균 비첨가 김치여액은 4℃와 6.5℃에서 1~2주까지는 *Leuconostoc* 속이 진하게 관찰되다가 이후 *W. koreensis*와 *Lb. sakei*가 우점하는 것으로 관찰되었다. 이와 같은 결과는 4℃에서 *W. koreensis*가 발효 전 과정 동안, *Lb. sakei*는 발효 10일부터 진하게 나타나 김치 발효 과정 동안에 우점종이라는 연구 결과와 동일하게 나타났다[46]. 10~20℃에서 *W. confusa*와 *Leu. citreum*이 진하게 관찰되어 우점종으로 나타난 연구 결과[15]와는 달리, 본 실험 결과 15℃에서 발효하였을 때 *Leu. citreum*이 전 구간에서 관찰되었고, *W. cibaria*가 희미하게 관찰되었으며, *Lb. sakei*가 가장 우점하는 것으로 관찰되었다.

또한 김치여액에서 집중해주었던 유산균 6종 이외의 유산균 (band g)이 확인되었는

데, 이 유산균은 모든 온도에서 보관 기간 동안 지속적으로 관찰되었다 (Fig. 11, 13, 15, 17, 19). 관찰된 유산균을 확인하고자 동정한 결과, 동정된 길이가 짧아 두 균주로 확인되었는데 *Leu. gelidum* 또는 *Leu. inhae*와 100% 일치하였다. 이 결과는 이 균주가 1°C 이하에서 생장 가능한 저온성 균주이며, 저온에서 발효한 김치에서 우점한다는 연구 결과와 유사하게 나타났다[25, 42].

배지와 김치여액 내에서 온도에 따른 유산균의 변화를 확인한 결과, 김치를 보관하는 저온에서 *W. koreensis*와 *Lb. sakei*가 우점하는 것으로 확인되어 이 균주들에 의해 김치의 쓴 맛이 나타난다고 추측하였다. 이를 토대로 *W. koreensis* SK와 *Lb. sakei* SC1을 각각 김치여액에 접종하여 유산균의 변화와 관능을 통해 쓴 맛의 원인균을 규명하고자 하였다.

각 균주를 김치여액에 1% 접종하여 -1°C에서 보관 후 관찰한 결과, 모든 김치여액에서 *W. koreensis*가 우점하는 것으로 나타났고, 그 다음으로 *Lb. sakei*가 관찰되었으며, *Leuconostoc* 속이 희미하게 관찰되었다. 관능 결과에서는 *W. koreensis* SK를 접종한 김치여액이 보관 3~6주에 가장 쓴 맛이 강하게 나타났고, *Lb. sakei* SC1를 접종한 김치여액은 *W. koreensis*가 우점하게 관찰되었지만, 나머지 김치여액에 비해 가장 덜 쓰다고 평가되었다. Moon 등[37]의 연구 결과에서 *Lb. sakei*는 묵은지의 맛과 향을 부여하는 균으로 보고되어, *W. koreensis*의 쓴 맛이 묵은지의 맛과 향에 의해 가려지는 것으로 추측되었다.

본 연구에서는 김치 보관 시 전체 유산균의 프로파일이 어떻게 변화하는지 배양학적 방법과 비배양학적 방법을 동시에 사용하여 규명하였고, 저온에서 김치 보관 시 우점하는 유산균이 *W. koreensis*와 *Lb. sakei*임을 규명하였다. 김치에 쓴 맛의 원인균으로 추정되는 각 균주를 적용하여 쓴 맛의 원인균을 확인하였고, *W. koreensis*의 생육에 의한 현상임을 규명하였다. 향후 *W. koreensis*가 쓴 맛을 내는 기전과 김치의 쓴 맛을 감소시키기 위해 *W. koreensis*의 생육을 억제할 수 있는 조건 또는 방법에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

제 5 장 참고문헌

1. An, D. J., Lew, K., & Lee, K. P. 1999. Effects of Adipic Acid and Storage Temperature on Extending the Shelf Life of Kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 8(2), 78-82.
2. Chang, H. W., Kim, K. H., Nam, Y. D., Roh, S. W., Kim, M. S., Jeon, C. O. & Bae, J. W. 2008. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1), 159-166.
3. Chang, J. Y., & Chang, H. C. 2010. Improvements in the Quality and Shelf Life of Kimchi by Fermentation with the Induced Bacteriocin Producing Strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a Starter. *Journal of Food Science*, 75(2), M103-M110.
4. Chang, M. J., & Kim, M. H. 2000. Fermentation property of Chinese cabbage kimchi by fermentation temperature and salt concentration. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 43(1), 7-11.
5. Cheigh, H. S., Park, K. Y., & Lee, C. Y. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 34(2), 175-203.
6. Chin, H. S., Breidt, F., Fleming, H. P., SHIN, W. C., & YOON, S. S. 2006. Identifications of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(1), 68-76.
7. Cho, J. S. 1991. Changes of microflora in commercial kimchi. *Korean J Dietary Culture*, 6, 479-501.

8. Cho, J., Lee, D., Yang, C., Jeon, J., Kim, J., & Han, H. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiology Letters*, 257(2), 262-267.

9. Cho, Y., & Rhee, H. S. 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation (II). *Korean Journal of Society of Food Science*, 7, 89-95.

10. Choi, S. Y., Lee, M. K., Choi, K. S., Koo, Y. J., & Park, W. S. 1998. Changes of fermentation characteristics and sensory evaluation of kimchi on different storage temperature. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 30(3), 644-649.

11. Clarke, J. D., Dashwood, R. H., & Ho, E. 2008. Multi-targeted prevention of cancer by sulforaphane. *Cancer Letters*, 269(2), 291-304.

12. El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., & Ogier, J. C. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1248-1255.

13. Fenwick, G. R., Heaney, R. K., Mullin, W. J. & VanEtten, C. H. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 18(2), 123-201.

14. Hayes, J. D., Kelleher, M. O., & Eggleston, I. M. 2008. The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *European Journal of Nutrition*, 47(2), 73-88.

- 15 Hong, Y., & Chang, H. C. 2013. Comparison of bacterial community changes in fermenting kimchi at two different temperatures using a denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 76-84.

16. Hwang, E. S. (2010). Changes in myrosinase activity and total glucosinolate levels in Korean Chinese cabbages by salting conditions. *Korean Journal of Food and Cookery Science*, 26(1), 104-109.
17. Hwang, E. S., & Lee, H. J. 2006. Phenylethyl isothiocyanate and its N-acetylcysteine conjugate suppress the metastasis of SK-Hep1 human hepatoma cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(12), 837-846.
18. Jang, J. Y., & Kim, T. W. 2013. Lactic acid bacteria in Kimchi and their immunomodulatory activities. *Current Topic Lactic Acid Bacteria and Probiotics*, 1(1), 28-37.
19. Jeon, Y. S., Kye, I. S. & Cheigh, H. S. 1999. Changes of vitamin C and fermentation characteristics of kimchi on different cabbage variety and fermentation temperature. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 28(4), 773-779.
20. Jeong, S. H., Lee, H. J., Jung, J. Y., Lee, S. H., Seo, H. Y., Park, W. S., & Jeon, C. O. 2013. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 160(3), 252-259.
21. Jung, J. I., Hong, E. Y., Kim, M. K., Jung, J. W., Oh, J. Y., Kwon, M. S., ... & Kim, G. H. (2009). Changes in total glucosinolates levels and physico-chemical properties of Kimchi using Korean Chinese cabbage of harvest time according to various storage conditions. *Korean Journal of Food Preservation*, 16(5), 612-617.
22. Jung, J. Y., Lee, S. H., & Jeon, C. O. 2014. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2385-2393.

23. Jung, J. Y., Lee, S. H., Jin, H. M., Hahn, Y., Madsen, E. L., & Jeon, C. O. 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2), 171-179.

24. Jung, J. Y., Lee, S. H., Kim, J. M., Park, M. S., Bae, J. W., Hahn, Y. & Jeon, C. O. 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2264-2274.

25. Kim, B. J., Lee, H. J., Park, S. Y., Kim, J. & Han, H. U. 2000. Identification and Characterization of *Leuconostoc gelidum*, Isolated from Kimchi, a Fermented Cabbage Product. *Journal of Microbiology*, 38(3), 132-136.

26. Kim, C. Y., Lee, J. H., Kim, B. H., Yoo, S. K., Seo, E. S., Cho, K. S. & Kim, D. 2002. Production of mannitol using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 7(4), 234-236.

27. Kim, M., & Chun, J. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 103(1), 91-96.

28. Kim, S. Y., Yoo, K. S., Kim, J. E., Kim, J. S., Jung, J. Y., Jin, Q. & Han, N. S. 2010. Diversity analysis of lactic acid bacteria in Korean rice wines by culture-independent method using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 749-755.

29. Ko, Y. D., Kim, H. J., Chun, S. S., & Sung, N. K. 1994. Development of control system for kimchi fermentation and storage using refrigerator. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 26(3), 199-203.

30. Kwon, S. J., & Sohn, J. H. 2012. Analysis of microbial diversity in Nuruk using PCR-DGGE. *Journal of Life Science*, 22(1), 110-116.

31. Kwon, S. J., Ahn, T. Y., & Sohn, J. H. 2012. Analysis of microbial diversity in makgeolli fermentation using PCR-DGGE. *Journal of Life Science*, 22(2), 232-238.

32. Lee, C. W., Ko, C. Y., & Ha, D. M. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean Journal of Applied Microbiology and Biotechnology (Korea Republic)*.

33. Lee, D., Kim, S., Cho, J., & Kim, J. 2008. Microbial population dynamics and temperature changes during fermentation of kimjang kimchi. *The Journal of Microbiology*, 46(5), 590-593.

34. Lee, J. S., Heo, G. Y., Lee, J. W., Oh, Y. J., Park, J. A., Park, Y. H. & Ahn, J. S. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 143-150.

35. Lee, K., & Lee, Y. 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* as a starter on the food quality and microbiota of kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 641-646.

36. Mheen, T. I., & Kwon, T. W. 1984. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 16(4), 443-450.

37. Moon, S. H., Moon, J. S., & Chang, H. C. 2015. Rapid manufacture and quality evaluation of long-term fermented kimchi (mukeunji) using *Lactobacillus sakei* SC1. *Food Science and Biotechnology*, 24(5), 1797-1804.

38. No, H. K., Lee, S. H., & Kim, S. D. 1995. Effects of ingredients on fermentation of Chinese cabbage Kimchi. *Journal of The Korean Society of Food and Nutrition*, 24(4), 642-650.

39. Park, J. A., Heo, G. Y., Oh, Y. J., Kim, B. Y., Miheen, T. I., Kim, C. K., & Lee, J. S. 2003. Change of microbial communities in kimchi fermentation at low temperature. *Korean Journal of Microbiology*, 39(1), 45-50.
40. Park, S. J., Park, K. Y., & Jun, H. K. 2001. Effects of commercial salts on the growth of kimchi-related microorganisms. *Journal-Korean Society of Food Science and Nutrition*, 30(5), 806-813.
41. Pogačić, T., Kelava, N., Zamberlin, Š., Dolencić-Špehar, I., & Samaržija, D. 2010. Methods for culture-independent identification of lactic acid bacteria in dairy products. *Food Technology and Biotechnology*, 48(1), 3-10.
42. Shaw, B. G., & Harding, C. D. 1989. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 39(3), 217-223.
43. Shin, D. H., Kim, M. S., Han, J. S., Lim, D. K., & Bak, W. S. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 28(1), 137-145.
44. So, M. H., & Lee, Y. S. 1997. Influences of cultural temperature on growth rates of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *The Korean Journal of Food and Nutrition*, 10(1), 110-116.
45. Stoewsand, G. S. 1995. Bioactive organosulfur phytochemicals in Brassica oleracea vegetables – a review. *Food and Chemical Toxicology*, 33(6), 537-543.
46. 김은지, 장해춘, 2015, 김치로부터 분리한 *Weissella* 속, *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속 특성 규명, 석사학위논문, 조선대학교, 광주

47. 박정아, 허건영, 이정숙, 오윤정, 김보연, 민태익, & 안종석. 2003. 김치의 저온 발효 중 미생물 변화 양상. *미생물학회지*, 39(1), 45-50.

감사의 글

어느 덧 길기도 하고 짧기도 한 2년의 석사 생활이 끝나 논문을 마무리하게 되었습니다. 어떻게 해낼 수 있을까라는 생각도 했었지만 많은 분들의 도움이 있었기 때문에 해낼 수 있었습니다. 그동안 부족한 저에게 응원해주시고 많은 가르침을 주신 분들께 감사의 말씀을 드립니다.

먼저 항상 변함없는 모습으로 앞으로 나아가야 할 길과 방향에 대해 지도해주시고, 부족한 부분을 채워주려 해주신 장해춘 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에 논문 심사해주시고 조언해주신 이재준 교수님과 이주민 교수님 감사드립니다. 그리고 학부시절부터 전공분야에 대한 많은 지식들을 가르쳐주신 김경수 교수님, 김복희 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

학부 때부터 3년 동안 같이 동고동락했던 우리 실험실 식구들 감사합니다. 우선 겁이 많아 걱정하는 저에게 항상 응원해주시며 할 수 있다고 힘을 분뚫아 주시는 문송희 박사님, 볼 때마다 이쁘다고 해주시고 다양한 면으로 배울 게 많은 슬기언니, 실험실 분위기 메이커였던 설화언니, 처음 저에게 실험을 가르쳐주시고 같이 과제 실험하면서 많은 시간 도움을 주셨던 은지언니, 실험을 같이 하게 되면서 우여곡절을 겪으면서 더 가까워졌던 성경언니, 이제는 실험실에 없지만 하루에 한 번씩은 꼭 이름이 거론되는 에피소드 많은 해비언니, 언니들의 긍정적인 에너지와 관심으로 석사 생활을 잘 마무리 할 수 있었습니다. 진심으로 감사합니다.

같이 고생하며 묵묵히 옆에서 도움 준 내 동기 혜란이 3년이라는 시간 동안 알게 모르게 많이 의지가 되었고 고맙습니다. 그리고 엉뚱하면서도 언니들에게 웃음을 주고 있는 유빈이, 앞으로 실험실을 이끌 차세대 유망주 소영이, 혼자서도 씩씩하게 잘해내고 있는 소정이 진심으로 감사합니다.

학부 때부터 실험실 생활하며 자주 만나지 못해 맨날 언제 보냐고 물어보던 대학교 친구들, 명절날에나 가끔 보지만 힘들 때 위로해주며 힘이 되어준 12년 지기 친구들, 내 편이 되어 나를 믿어주며 응원을 아끼지 않았던 사람에게도 감사합니다.

마지막으로 항상 저를 위해 묵묵히 뒷바라지하며 고생하시는 우리 엄마, 아빠, 친구 같이 지내며 동생 잘 챙겨주는 우리 언니 사랑하고 감사합니다.

항상 아낌없이 격려해주고 응원해주신 많은 분들께 다시 한번 감사의 말씀 전해드립니다. 감사하고 항상 좋은 일들만 있길 바랍니다.