

119033-02

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개()발간등록번호(O)

**맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업 2021년도
최종보고서**

발간등록번호

11-1543000-003496-01

**김치 가식기간 연장을 위한, 호모발효
유산균에 선택적 항균활성을 가지는
Allicin을 포함하는 천연 김치 보존제 개발**

2021.05.07.

주관연구기관 / (주)비에스티

**농림축산식품부
농림식품기술기획평가원**

김치 가식기간 연장을 위한 호모발효 유산균에
선택적 항균 활성을 가지는 a l l i c i n 을
포함하는 천연 김치 보존제 개발

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “맞춤형혁신식품 및 천연안심소재개발기술사업”(개발기간 : 2019.05. ~ 2020.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2021. 05. 07.

주관연구기관명 : (주) 비에스티 (대표자) 이 호



주관연구책임자 : 이 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	119033-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2019.05.20. ~ 2020.12.31	단 계 구 분	(해당단계)/ (총 단 계)
연구 사업 명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 개발기술사업			
연구 과제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	김치 가식기간 연장을 위한, 효모발효 유산균에 선택적 항균 활성을 가지는 Allicin을 포함하는 천연 김치 보존제 개발			
연구 책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 5명 내부: 5명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 146,000천원 민간: 34,000천원 계: 194,700천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 7명 내부: 7명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 248,000천원 민간: 82,700천원 계: 330,700천원	
연구기관명 및 소속 부서 명	(주) 비에스티 기업부설연구소			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	✓	✓									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)

- 천연 소재의 복합 조성을 통한 선택적 미생물 제어 활성을 갖는 천연 보존제의 제조 방법 확립
- 천연 보존제의 효능 검증 Clear zone ; 7.0 - 10.5mm / MIC value - 0.1% 이하 (목표 초과 달성)
- 개발 제품의 기타 생리 활성 평가 ; 개발 제품의 항산화 활성을 DPPH / ABTS radical 소거능 평가를 통하여 검증
- DPPH / ABTS radical RC₅₀은 0.16~0.2 %로 확인
(목표 1.0% 이하 초과달성)
- 개발 시제품의 관능적 영향력 외부기관을 통하여 검증
(개발 시제품 2.0% 첨가 시 관능 향상)
- 개발 시제품에 대한 안정성 및 안전성 확보.
(안정성- 가혹 조건 6개월에서 정상/항균 활성 변화 없음, 안전성- 5% 이하에서 세포독성 없음.)
- 지적 재산권 및 제품화 완료 (지적 재산권 - 논문 1건/특허2건, 제품화 2건)

보고서 면수
54

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연 항균 소재에 대한 데이터베이스 구축 및 발효 제어 기술 확보 ○ 김치(발효 식품)에 최적화된 미생물 및 유산균 제어, 가스 발생 억제 항균 소재 개발 ○ 본 개발 제품을 통하여 김치 중주국으로써 경쟁력 확보 및 시장 성장기여 <ul style="list-style-type: none"> - 김치 및 발효 식품의 유통/판매 과정에서의 가스 팽창 등으로 인한 폐기율 감소 및 손실 비용 절감. - 안전한 먹거리를 소비자에게 제공함으로써 신뢰도 및 구매의사 증가 유도. - 중소 제조업체의 해외 진출 장벽 완화 및 그로 인한 다양한 상품 개발 유도. [다양한 상품 개발은 국내뿐 아니라 해외 소비자 취향 고려한 제품 개발 가능성.] - 국내 제조사 수출 물류비 및 국가 지원 자금 절감 유도. [절감된 국가 지원금은 홍보 및 행사 전략 비용 증설 가능.] - 유산균 제거가 아닌 제어를 통한 김치 및 기타 발효식품의 건강식품 이미지 강화. ○ 발효 식품 컨트롤에 대한 지적 재산권 확보를 통한 관련 분야 경쟁력 확보. <hr/> <ul style="list-style-type: none"> ○ 시중 김치 중 이상 발효 균주 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 시중 김치 ; 개발 제품 첨가 여부에 따른 차이 확인 시 미생물 분리 동정 실시 ○ 항균 활성을 갖는 천연 후보 물질 개선 공정 <ul style="list-style-type: none"> ∴ 천연 후보 물질의 추출 공정 개선 (열수 추출) - Paper disc diffusion method (Clear zone) : 최소 7mm 이상 (최상위 5종 선별) - Minimum Inhibitory Concentration assay : 2.0% 이하 - 상기 검토 미생물은 <i>L. plantarum</i> or 김치에서 직접 분리한 이상 발효 균주 ○ 사전 연구를 통해 도출 된 천연 후보 물질 확인 <ul style="list-style-type: none"> - 배합 비율에 따른 제어 여부 확인 ○ 개발 제품의 특성 규명 <ul style="list-style-type: none"> - 안정성 평가 ; [광(빛), 온도 등 가혹 조건에서의 변화 여부] ○ Lab scale <ul style="list-style-type: none"> - 자사 사전 연구 방법 [Screening 소재의 김치 적용 결과] 동일한 방법으로 실시 후보군 2종 이상의 Sample 추가 선별 - 적용 농도 1/2n 단계별 적용 및 적정 농도 구간 설정 ○ Challenge Test (세계 김치 연구소 참여) <ul style="list-style-type: none"> ∴ 김치의 저장 중 품질 특성 분석 - 이화학적 분석 : pH, 산도, 염도, 가스발생 [pH 4.5 이상/산도 2.0% 이하] - 미생물학적 분석 : 일반 세균, 젖산균 [무첨가구 대비 90% 이상 생존] ○ Field Test (수요 업체 참여) <ul style="list-style-type: none"> ∴ 관능적 영향 & 가스 발생 여부 중점 평가 - 관능 평가 ; 제조(첨가) 직후 ~ 한 달 간격으로 진행. - 가스 발생 여부 ; 저장 온도 & 포장 사이즈 ○ 최종 시제품의 식품 품목 제조 등록을 통하여 안전성 및 사용 편의성 확보
------------------------	--

<p>연구개발성과</p>	<p>○ 천연 소재의 Library 확립 및 발효 공정 컨트롤 가능한 천연 항균제 개발.</p> <p>○ 이상 발효 관여 미생물 제어력을 갖는 항균제로 발효 식품에 적용 및 응용 가능</p> <p>○ 개발 제품을 통하여 곡물 가공 식품 유통/판매 환경 개선 및 식품 미생물 안전화 확보</p> <p>○ 개발 제품 적용시 소비자에게 도달할 때 풍부한 유산균 제공(섭취) 가능.</p> <p>○ 김치 식품의 미생물적 안전성 확보 및 이미지 인식으로 구매 유도 및 소비 증가.</p> <p>○ 소비자의 건강과 차별화된 제품의 Needs를 충족하기 위한 다양한 상품 개발</p> <p>○ 예상되는 연구개발 성과 유형</p> <table border="1" data-bbox="414 521 1399 683"> <thead> <tr> <th rowspan="2">구분</th> <th rowspan="2">논문</th> <th rowspan="2">특허</th> <th rowspan="2">보고서 원문</th> <th rowspan="2">연구 시설 · 장비</th> <th rowspan="2">기술 요약 정보</th> <th rowspan="2">소프트 웨어</th> <th rowspan="2">화 합 물</th> <th colspan="2">생명자원</th> <th colspan="2">신품종</th> </tr> <tr> <th>생명 정보</th> <th>생물 자원</th> <th>정보</th> <th>실물</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>예상성과 (N/Y)</td> <td>Y</td> <td>Y</td> <td>Y</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>					구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종		생명 정보	생물 자원	정보	실물	예상성과 (N/Y)	Y	Y	Y								
구분	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 · 장비	기술 요약 정보									소프트 웨어	화 합 물	생명자원		신품종															
						생명 정보	생물 자원	정보	실물																								
예상성과 (N/Y)	Y	Y	Y																														
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 기술적 기대성과</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 천연 Library 구축 및 업데이트를 통한 천연 소재의 활용도 및 상품화 촉진 2. 이상 발효 관여 미생물 제어력을 갖는 항균제로 발효 식품에 적용 및 응용 가능 3. 발효 공정 제어를 통한 다양한 기능성 원료에 적용함으로써 부가적 기능 유도 가능. 4. 생물 전환에 최적화된 미생물 선별 및 데이터 구축을 통한 발효 식품 또는 기능성 식품분야의 연구 활성화 유도 <p>○ 사업적 성과</p> <p>∴ 개발 제품에 의한 (포장) 김치 시장 성장</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 김치의 이상 발효로 인한 가스 발생 및 과숙성 억제를 통한 저온 저장 및 특수 포장재 등 부가적 비용 절감 2. 본 개발 제품 적용시 소비자에게 도달할 때 풍부한 유산균 제공(섭취) 가능. [기존 공법은 유용한 유산균을 제거하여 제품 유통의 안정성을 확보] 3. 기존 저장/운반 등 물류 지원비가 큰 비중을 차지하였으나, 대폭 절감 가능. [국가 지원금 활용안을 물류 지원비에서 홍보비/자동화 설비로 변경 유도] 4. 농림축산식품부는 2022년도 19,020억원을 목표로 발표하였으나, 개발 제품으로 인한 기존 성장률 +a로 기존 목표를 초과한 20,900억원 달성 가능할 것으로 전망 5. 김치 식품의 국내 시장 확대 및 해외 수출 기회 증대를 통한 제조업체 소득 증대 6. 김치 식품의 미생물적 안전성 확보 및 이미지 인식으로 구매 유도 및 소비 증가. [13' 중국산 김치/ 18' 국내 유통 김치의 식중독 유발균 검출 등 미생물적 이슈는 소비자로 하여금 구매 욕구를 낮추며, 시장 성장의 걸림돌이 될 수 있음.] 																																
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	김치	발효식품	미생물 제어	알리신	천연 보존제																												
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Kimchi	Fermented Food	Microbial control	Allicin	Natural Preservative																												

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	7
가. 연구개발의 목적	7
나. 연구개발의 필요성	8
다. 연구개발 범위	16
2. 연구수행 내용 및 결과	24
가. 항균 활성을 갖는 후보 물질 추가 선별	24
나. 선별 천연 소재의 복합 조성	26
다. Challenge TEST	27
라. lab Scale pilot 평가	29
마. 기타 생리활성 평가	30
바. 자사 2차 Challenge TEST 및 제조사 평가	31
사. 관능평가	36
아. 제품 안정성 평가	38
자. 제품 안전성 평가	39
차. 지적 재산권 확보	40
카 식품 품목 보고	41
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	42
4. 연구결과의 활용 계획 등	44
붙임. 참고 문헌	45

<별첨1> 연구개발보고서 초록

<별첨2> 자체평가의견서

<별첨3> 연구결과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

- 천연 항균 소재에 대한 데이터베이스 구축 및 발효 제어 기술 확보

- 김치 및 발효 식품에 최적화된 미생물 및 유산균 제어, 가스 발생 억제 항균 소재 개발
 - I. In vitro TEST
 - 개발 제품의 항균 활성 : Clear zone 7mm 이상 & MIC 2.0% 이하
 - 개발 제품의 생리 활성 : DPPH assay & ABTS assay ; RC₅₀ 값 0.5% 이하
[또는 무첨가 대비 99% 이상]
 - 개발 제품의 안전성 : MTT assay ; 무첨가구 대비 95% 이상 생존
 - II. Lab scale & Challenge TEST
 - 가스 발생률 : 무첨가구 대비 40% 이상 감소
 - 발효 균주 생존률 : 무첨가 대비 90% 이상
 - 산도 : 2% 이하 (무첨가 대비 저장 기간 동안)

- 본 개발 제품을 통하여 김치 중주국으로써 경쟁력 확보 및 시장 성장기여
 - 김치 및 발효 식품의 유통/판매 과정에서의 가스 팽창 등으로 인한 폐기율 감소 및 손실 비용 절감.
 - 안전한 먹거리를 소비자에게 제공함으로써 신뢰도 및 구매의사 증가 유도.
 - 중소 제조업체의 해외 진출 장벽 완화 및 그로 인한 다양한 상품 개발 유도.
[다양한 상품 개발은 국내뿐 아니라 해외 소비자 취향 고려한 제품 개발 가능성.]
 - 국내 제조사 수출 물류비 및 국가 지원 자금 절감 유도.
[절감된 국가 지원금은 홍보 및 행사 전략 비용 증설 가능.]
 - 유산균 제거가 아닌 제어를 통한 김치 및 기타 발효식품의 건강식품 이미지 강화.

- 발효 식품 컨트롤에 대한 지적 재산권 확보를 통한 관련 분야 경쟁력 확보.

나. 연구개발의 필요성
 (1). 연구개발의 개요



- 우리나라 전통 발효 식품인 '김치'는 과거 가정단위에서 자가 제조하여 소비하였으나, 수년 전부터 생활 패턴 변화로 마트, 시장 등에서 소량으로 구매해 소비하는 경향이 점차 증가 되면서 최근엔 일반화 되었다. 이러한 추세를 반영하듯이 2018' 한국 농수산물식품 유통공사 보고에 따르면 전체 김치 시장은 2015년까지 꾸준히 성장해 왔으며, 2016년 기준으로 성장세가 점차 가파르게 높아진 것으로 파악되었다. 국내 전체 김치 시장은 39,600억 원으로 추정 하였으며, 그 중 상품(포장) 김치 시장은 12,724억 원으로 파악하였다. B2C, B2B에 해당되는 상품(포장) 김치의 경우 꾸준한 상승세를 보여 오다 최근 들어 가파르게 성장하고 있으며, 2017년 13,983억 원으로 2016년 대비 약 10.0% 증가하였다.
- 또한 2018년 1월 영국 매체 '가디언'에서 세계 5대 건강식품 중 하나로 김치를 소개하며 전 세계적으로 관심이 더욱 증가하고 있는 추세이다. 이러한 추세를 반영하듯 '농식품부'조사에 따르면 2018년 김치 수출이 9750만불로 전년 대비 20% 증가한 수치로 약 1,100억원에 다다 른다. 미국은 24%, 일본 23%, 호주 22% 대만은 15% 등 식문화가 다른 서양에서도 김치에 대한 인지도가 높아지고 있으며, 수출 증가로 이어지고 있다.
- 하지만 지속적 성장에도 불구하고 몇 가지 문제점이 성장세의 걸림돌로 존재하는데, 김 등 보고에 따르면 가스 발생은 숙성 초기에 나타나며, 팽창에 의한 용기 파손 및 내용물 누수 (?) 특히 수출 포장 김치의 경우 이러한 문제점이 빈번하게 되며, 이러한 문제점을 해결하기 위해 특수한 포장재 사용, 저온 보관/운송 등 부가 비용 발생하고 있는 실정이다.
- 농축산부 주관 2018 김치산업과 수출대응반안 전략 워크숍에서는 김치 산업 성장의 어려움 요소 중 수출물류비, 저온저장고 구입 예산을 쪼는 등 중소 제조업체의 경우 '과숙성 및 가스 발생 억제'를 위하여 투자하는 부가비용이 상대적으로 부담을 가중 시키고 있다. 이처럼 '김치의 과숙성 및 가스 발생 억제'는 현장에서 공통적으로 제기 되고 있는 문제점 중 하나

- 이다. 가스 발생 억제에 대한 문제점은 이미 오래전부터 인식되어 왔으며, 해결하고자 가스 흡수제, 특수 필터, 용기 등 다양한 연구 개발이 현재까지도 진행되고 있다.
- 상기 서술한 문제점은 발효 제품의 특성이라 볼 수 있으며, 박 등은 김치 발효 초기에 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*가 hetero-lactic fermentation을 통하여 기타 산물 및 CO₂ 등을 생성한다고 보고하였다. 한 등은 김치의 선도를 유지할 수 있는 방법으로 방사선 조사, (합성) 방부제 첨가 등 이미 연구 되어 왔으나, 선별적 미생물 제어가 아닌 무작위적 제어로 사용 방법에 따라 발효 제품의 장점인 풍부한 유산균을 제거하는 단점이 있다. 현재 「식품공전」 식품별 기준 및 규격 중 김치류에는 보존료가 불검출로 규정하고 있어 합성 보존제의 첨가도 어려운 실정이다. 또한 가장 큰 문제점은 소비자의 인식 변화로 현실적으로 사용 불가능한 점을 꼽았다. (Korean J. Food SCI. Technol. Vol. 27) 그 외 류 등 보고에 따른 오레가노 에센셜 오일, 자몽종자 추출물, 소목추출물 등 천연 추출물을 이용한 *L. plantarum*에 대한 제어 활성에 대하여 검증한바 있다. (Korean J. Food SCI. Technol. Vol. 45) 하지만 이러한 천연 추출물 base 소재들은 향미의 변화, 높은 단가, 어려운 사용성 (용해도) 등 문제점이 확인되어 대부분의 개발 상품이 상용화되지 못하고 있다.
 - 현재 특수 용기를 통한 가스 제거/배출을 통하여 용기 팽창에 의한 파손을 줄이는 방법으로 가장 많이 사용하고 있지만 소규모의 영세한 업체 등은 용기 개발 등 투자에 대한 부담감으로 문제점을 해결하지 못하고 소량 생산/소비를 지향하고 있다. 또한 중소기업의 경우도 수출에 있어 과숙성 및 가스 발생을 제어하고자 저온보관 운송을 진행함에 있어 막대한 비용이 발생하고 있다. 또한 2016' 동향 보고에 의하면 중국의 경우 국토 면적이 넓고 냉장유통 시스템이 낙후돼 있어 상기와 같은 문제점이 자주 발생되어 업계의 애로가 많다고 하였다.
 - 식품의약품안전처에 따르면 2012', 2013' 연속으로 중국산 김치에서 대장균이 검출되어 회수 조취에 나선 걸로 확인되었으며, 이는 비단 중국산 김치 뿐 아니라 국내 업소용 김치 및 절임 배추 등에서 다수의 대장균 등 식중독 균이 확인된 바 있다.
 - 따라서 본 연구에서는 김치의 가식기간 연장 즉, 과숙성 및 가스 발생 등을 제어하고자 선택적 항균 활성을 가지는 polyphenol-thioctic acid 천연 김치 보존제를 개발하고자 한다. 기존 합성 보존제와 같이 미생물(유산균)의 사멸이 아닌 성장 cycle 지연을 통한 제어를 목표로 하고 있으며, 이는 김치의 발효 속성에 영향을 미치지 않는 제품을 개발하고자 함이다. 초기에 hetero-lactic fermentation를 지연시킴으로써 유통(수출)상 제품 파손우려를 낮추며, 소비자들이 섭취시 정상 fermentation cycle을 통하여 시원함, 탄산감을 느낄 수 있게 제어가 가능할 것으로 사료된다. 또한 식중독 유발 미생물에 의한 소비자의 안전성 확보가 가능하며, 이는 기존 식중독 등 유해 미생물에 대한 우려를 해소하며 믿고 구매할 수 있는 김치 이미 지 등을 인식 시켜 구매 유도 및 제조업체의 매출 증대로 이어 질것으로 보인다. 더 나아가 다른 발효 식품 분야에 대한 적용 연구를 통하여 발효시기를 제어 할 수 있는 원료로 활용 가능하며, 수출 적 어려움이 있던 여러 식품군에 적용 가능할 것으로 사료된다.

(2). 연구개발 대상의 국내·외 현황

(가). 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

경쟁사명	제품명	수/출입 여부	기술
D사	- (개발사 특허)	국내	선별 유산균으로 선 숙성 / 후 저온 열처리
Popular	CO ₂ 흡수제	국내	용기(포장) 내 이산화탄소 흡수
Specific	가열살균법	-	열처리를 통한 발효 미생물 제어
Popular	천연 소재 첨가 (키토산, 그 외 추출물)	국내	키토산, 그 외 추출물 첨가를 통한 김치의 가식 기간연장을 목표로 하나 상용화된 제품 전무

국내 기술 현황을 분석한 결과, 김치의 가식 기간을 연장하기 위하여 다양한 연구가 진행해온 것을 알 수 있었다. 저장 온도 조절, 가열살균, 천연소재 첨가, 특정 유산균 처리 등 다양한 방면으로 탐색 및 연구가 진행 되어 왔는데, 보편적으로 사용되는 CO₂ 흡수제의 경우 개봉 시 파손되어 김치에 혼입될 우려가 있으며, 김치의 pH/산도 조절이 불가능하여 가식 기간 연장에 큰 역할을 하지 못하고 있다.

가열살균법은 특정 제품에서 사용되고 있는 방법으로 열처리를 통한 유산균 및 기타 미생물을 제어하여 가스발생/관능적(맛) 변화를 차단한다는 장점을 갖고 있다. 하지만 앞서 서술했듯이 유용 미생물중 하나인 유산균의 사멸, 아삭한 식감을 크게 감소시키는 등 문제점이 있다. 특정 미생물 사전 배양 및 김치에 적용하여 선 숙성 시키는 기술은 특허, 로열티 등으로 중소기업 등 영세한 제조사들은 사용하기 어려운 점이 있다.

하여 천연 소재 첨가를 통한 가식 기간 연장을 유도하는 연구 개발들이 활발히 이루어지고 있다. 현 실정은 키토산 등 pH/산도 조절, 천연 추출물 기능성 김치 등에 국한되어 있기에 본 과제에서는 poly phenol-thioctic acid를 활용한 효모 발효 유산균의 선택적 제어 활성과 그를 통한 가스 발생 억제 유도 가능한 제품을 개발하며 세계김치연구소 및 수요기업 평가를 통하여 상용화/제품화를 도출할 계획이다.

○ 시장현황

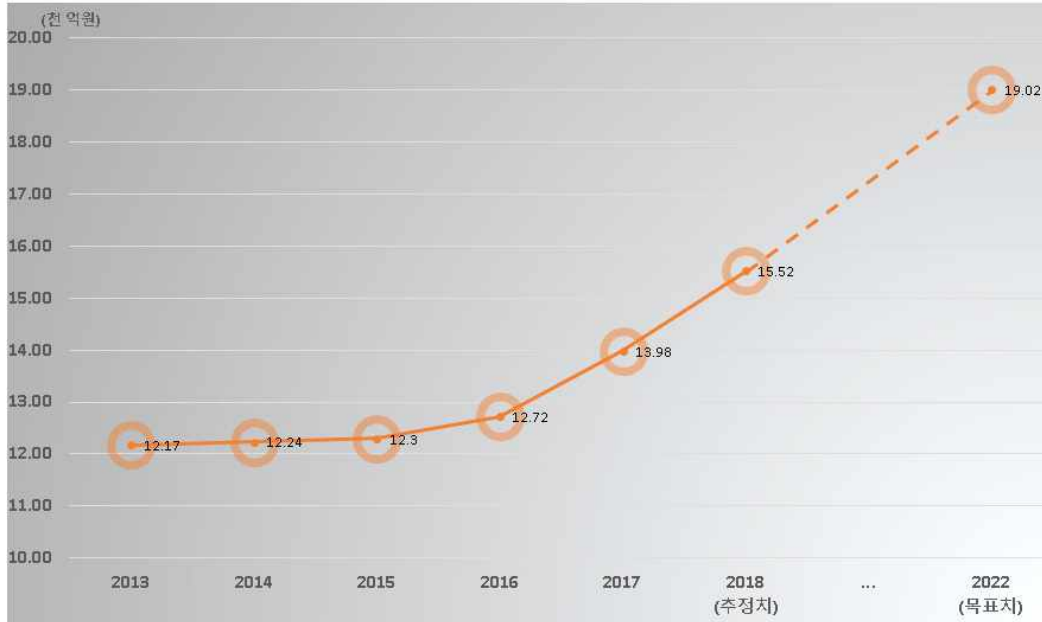


그림. 상품(포장) 김치의 국내 시장 규모 및 추이

◎ 국내 김치 시장 현황

식품산업통계정보 자료에 따르면 국내 김치 시장 규모를 2016년 약 3조 9600억 원으로 추정하고 있다. 이는 상품김치 12,700억 원 및 담금 김치(가정 제조) 2,6900억 원으로 규모는 매년 증가하고 있는 추세이다. 김치 생산액은 2015년 대비 2016년에는 약 10.0% 가까이 증가하였으며, 같은 기간 생산량, 출하량 모두 증가하는 경향을 보였다. 다양한 종류의 김치 및 식감, 맛을 향상 시킨 우수한 제품들이 개발되면서 점차 소비자의 수요가 늘어날 전망이지만 김치의 가식 기간, 가스 발생으로 인한 파손 등 문제점이 김치 시장 성장에 큰 걸림돌이 되고 있는 실정이다.

◎ 상품(포장) 김치 시장 현황

2016년 기준 상품 김치의 시장은 전체 김치 시장의 약 30% 정도로 약 12,700억 원에 다다르며, 이는 점차 증가하는 추세를 보이고 있다. 자가 제조/소비에서 오프라인 소매채널 및 반찬가게, 온라인 등 유통구조 다양화 및 시간, 가격 경쟁력으로 구매/소비 패턴으로 변하고 있는 추세를 반영한 것으로 보인다. 또한 주목해야 될 점은 기존 시대변화로 온라인 구매시장이 증가한 반면 상품(포장) 김치의 경우 오프라인 성장속도가 더욱 가파르게 증가하고 있다. 예전과 다르게 김치를 ‘저장하며 섭취하는 음식’이 아닌 ‘필요에 의해, 원할 때 구매/섭취하는 음식’으로 인식이 변화하면서 나타난 특징 중 하나이다. 이는 김치의 가식 기간 연장에 필요성을 나타내는 요인 중하나라 판단되는데, 제조 후 소비자에게 도달하는 기간이 짧은 것이 이상이지만 제조단가 / 인건비등을 고려하면 어려운 실정이다. 이에 소비자가 구매 했을 때 김치 초기의 맛을 유지하는 가식 기간 연장 가능한 기술 개발이 매우 중요할 것으로 사료된다.

◎ 관능적 변화, 가스 팽창으로 인한 문제점

국내의 경우 ‘김치 종주국’으로 세계김치연구소, 대기업 등에서 김치와 관련된 많은 연구들이 활발히 진행되고 있으나 그러한 기술력들을 중소기업과 같이 영세한 제조업체에서 쉽게 접근하기 어려운 실정이다. 또한 국내외 김치를 구매/소비하기 꺼려하는 이유 중 하나로 과숙성 되었을 때의 시큼한 향 등을 꼽는 듯 성장세에 걸림돌이 되고 있다. 이러한 문제점을 해결하며 가식 기간 연장을 유도하여 국내뿐 아니라 국외 시장 성장세에 증폭제가 될 수 있을 거라 사료된다.

이렇게 개발된 천연 보존제의 경우 김치에 한정하여 사용하는 것이 아니라 기술을 파생시켜 다른 발효 제품의 유산균을 컨트롤 할 수 있는 기술로 응용할 수 있을 거라 사료되며 개발 제품 및 응용 제품의 수출 증대로 국가 경쟁력 제고에 기여할 것으로 기대된다.

○ 지식재산권현황

구분	문헌 종류	출원번호 (출원일)	공개번호 (공개일자)	국가	출원인 (저자)	명칭
특허	등록	10-2001-0031165	10-2012-0113450 (2012.10.15)	대한민국	김연구	김치 숙성 억제 조성물
특허	등록	10-2002-0079673	특2003-0048370	대한민국	박호준	식품 보존제 조성물 및 이를 포함하는 식품
특허	등록	10-2014-0018967	10-2015-0097996 (2015.08.27.)	대한민국	박상규	녹차잎 추출물을 이용한 발효 식품 보존제의 제조 방법과 그 조성물
특허	등록	10-2016-0003315 (분할)	10-2016-0009702 (2016.01.26.)	대한민국	대상에프엔에프 주식회사	가스발생 억제 및 숙성 조절 방법

○ 특허정보넷 키프리스 연구개발 현황 검색 결과 Hitting 98건 중 6건 유사 특허 선별

본 기술 개발의 독창성 및 진보성 검증을 위하여, 특허 정보넷 키프리스 (www.kipris.or.kr/)에서 검색식 “김치*보존*항균*제어*유산균”으로 검색한 결과 총 98건의 특허가 확인되었다. 그 중 69건만이 공개 또는 등록되어 있는 상태며, 본 기술과 다소 유사한 기술로 총 6건 정도 선별 할 수 있었다.

단, polyphenol-thioctic acid 및 타겟지표, 비외부 처리 등 과 관련된 식품 분야의 유효 특허는 (현) 국내에 일치/유사한 기술이 없는 것으로 사료된다.

○ 「김치 숙성 억제 조성물(공개특허 10-2012-0113450)」의 차별성 및 신뢰성

특허 「김치 숙성 억제 조성물(공개특허 10-2012-0113450)」는 계란껍질과 (게 또는 새우 등) 키토산을 분말화 하여 김치 제조시 첨가하여, 원료 특성인 염기성으로 인한 유산균이 생성한 산을 중화시켜주는 방법이다.

본 과제 의 핵심기술은 polyphenol-thioctic acid를 이용한 천연 보존제이며, 이는 병원성 미생물 제어 및 유산균 성장 지연을 통한 김치의 가식기간을 연장하는 것을 목표로 하고 있다. 상

기 특허의 관능적 평가 외 김치 내의 미생물 수, 산도, pH, 가스 발생여부 등을 평가하여 신뢰성을 확보할 예정이다. 본문에 서술한대로 초기 발효에서 발생하는 가스 제어 여부가 김치 시장 확장 및 수출 증대의 주요 핵심이라고 판단되며, 그 외 복수 지표를 설정 및 평가하여 적정 사용량, 유효 효과 정량 등을 도출 할 수 있을 거로 사료된다.

○ 「**녹차잎 추출물을 이용한 발효 식품 보존제의 제조 방법과 그 조성물(공개특허 10-2015-00979960)**」의 차별성 및 신뢰성

특허「녹차잎 추출물을 이용한 발효 식품 보존제의 제조 방법과 그 조성물(공개특허 10-2015-00979960)」는 특정 분자량을 갖는 키토산과 녹차 잎으로부터 수득한 지용성 물질을 활용하고 있다. 미세구화된 두 물질은 특정 시기에 용해되어 김치의 발효시기를 늦추는 것으로 초기에 발효 공정에는 개입을 하지 않는 것으로 판단된다.

녹차 잎의 지용성 물질을 수득하기 위하여 초임계 추출을 및 다양한 화학 첨가물들이 사용되는데, 이는 본문에서 지적한 사용자의 기피 및 단가 상승의 요인이 될 것으로 사료된다. 또한 발효 공정 초기에는 개입을 하지 않는 것으로 보아 가스 발생 관련하여 제어할 수 있는 요소가 전혀 없는 실정이다.

○ 「**가스발생 억제 및 숙성 조절 방법 (공개특허 10-2016-0009702)**」의 차별성 및 신뢰성

특허「가스발생 억제 및 숙성 조절 방법 (공개특허 10-2016-0009702)」는 포장 김치의 팽창 정도 즉, 가스 발생을 제어하고자 목표가 가장 유사한 기술이다. 류코노스톡 메센테로이드 균주를 이용한 선 숙성 후 단기간의 저온 열처리를 처리하여 가스 팽창을 억제하면서 숙성된 김치의 맛을 유지하는 제조 방법이다. 90일 이상의 우수한 가스 억제력을 보이는 등 우수한 효능을 갖고 있으나, 열처리에 의한 유산균 손실을 동반하였다. 비열처리에서는 8 log cfu/g 높은 유산균을 수를 보이는 반면 열처리 한 김치에서는 1 log cfu/g 내외로 현격히 낮은 것으로 확인되었다.

우수한 가스 제어를 보이지만 그로 인한 유산균 손실을 동반은 발효 식품으로서의 중요한 손실중 하라 판단되어 유산균을 완전히 사멸시키지 않으며 일정기간 이후 풍부한 유산균을 소비자들이 섭취 할 수 있게 하는 것을 목표로 하고 있다.

(나). 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

경쟁사명	제품명	유래	기술
F사	자몽종자추출물	식물	단일 추출물 / 정제 / 농축 우수한 항균 활성 / 관능적 영향
Popular	나이신 (Nisin)	미생물	미생물 배양 / 미생물 제어 / 정제 그람 양성균에 대한 강력한 항균 활성
Popular	키토산 (Chitosan)	동물	(전환) 가공 / 정제
USA / JP	미생물(유산균) 배양액	미생물	미생물 배양 / 정제 대량 생산 가능

국외 기술 현황을 분석한 결과, 김치관련 연구 결과는 국내 연구진에 의해 보고되거나 그 외는 극히 드문 것으로 확인되었다. 이에 기존 천연 소재를 이용한 보존제와 비교함으로써 본 과제를 통하여 개발 예정인 polyphenol-thioctic acid에 의한 선택적 제어 가능한 보존제의 차별성, 신뢰성을 검증하고자 한다. F사의 제품은 현재 국내외로 가장 많이 사용되는 천연 보존제 중 하나이다. 하지만 관능적 영향 및 높은 단가로 일정 이상의 첨가가 어려운 실정이며, 전반적인 미생물 제어로 유용한 유산균 사멸을 유도하여 현장에서는 사용을 기피하고 있다. Nisin 제품 또한 병원성 및 일반 미생물뿐만 아니라 유산균 사멸을 유도하며, 국내의 경우 가공치즈 이외는 사용이 불가하다. 이처럼 김치 유산균의 생육을 지연하며 그로인한 가스 발생을 억제할 수 있는 제품은 전무한 실정이다.

○ 시장현황



그림. 수출 물량 및 금액 동향 (출처; 한국농수산물유통공사)

‘김치’에 대한 국외 시장은 국내에서 수출하는 물량 및 금액을 바탕으로 조사하였다. 2015년부터 꾸준히 성장한 수출 물량은 2018년에 28천톤을 웃돌았으며, 같은 기간 수출액은 73백만 불에서 97백만 불로 약 33% 증가하였다. 이는 동일문화권인 일본, 중국, 대만 등에서 한류 열

풍 및 국가적 홍보를 통하여 관심도 증가로 꾸준한 증가 추세를 보이고 있으며, 그 외 미국, 호주, 유럽 등과 같이 다른 문화권에서도 건강식품으로써 인지도가 높아지며 구매 수요가 점차 증가하고 있다. 해외 수출에 있어 가격경쟁력, 품질 유지 방법 등 해결해야 될 문제가 있으나 종주국 및 전통성, 제품의 다양화를 통하여 꾸준한 증가 추이를 보일 것으로 전망하고 있다. (2018' 한국농수산물유통공사)

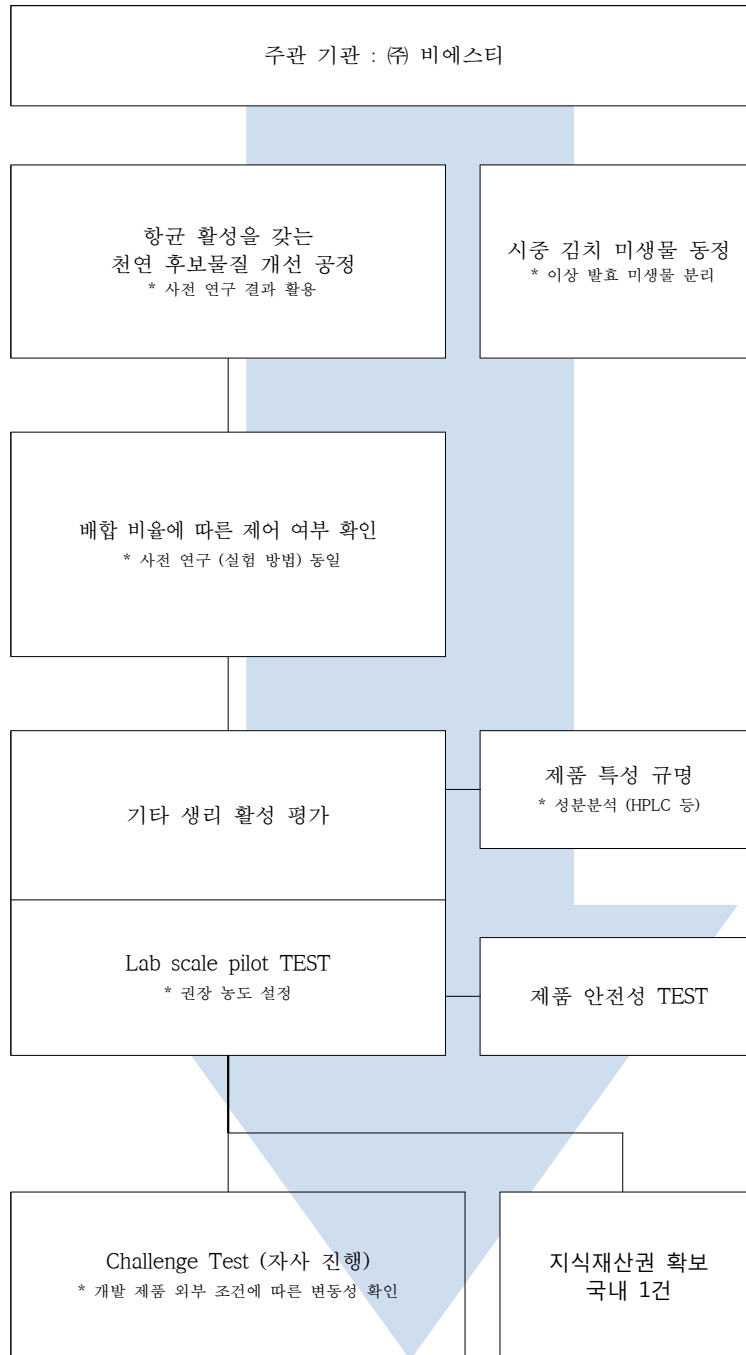
○ 지식재산권현황

해외 관련 지식재산권현황 검토를 위하여, 특히 정보넷 키프리스 (www.kipris.or.kr/)에서 검색식 “Kimchi“로 검색한 결과 미국 1,208건, 유럽 349건, 일본 174건으로 확인이 되었으며, 이는 국내 개발자에 의해 공동 출원된 것이 상당수 포함되어 있다. 김치 종주국인 대한민국에서 가장 활발한 연구 개발이 되고 있는 것으로 사료되는바, 본 과제 완료 후 국외 특허 출원 등 다양한 방면으로 차별성 및 신뢰성을 구축하고자 한다.

다. 연구개발 범위

(1). 1차년도 연구개발 목표

(가) 1차년도 연구개발 절차



(나). 1차년도 연구개발 세부 내용 ; 주관연구기관((주)비에스티)

① 항균 활성을 갖는 천연 후보 물질 개선 공정

∴ 천연 후보 원료 추가 선별

- 사전 선별된 천연 추출물 외 추가 65종에 대한 연구 & 탐색을 통한 후보 물질 확보
- 후보 물질 선별 선별 기준

> Modify (Multi-layer) Agar diffusion method (Clear zone)

입자의 크기 및 밀도가 다른 2가지 이상의 Agar를 층별로 쌓아 고체배지를 만든 후 천연 후보 물질을 loading 시켜 보다 신속하게 미생물 제어 활성도 평가

∴ 천연 후보 물질의 전처리 및 추출 공정 개선 (열수 추출)

- 추출 공정에 따른 미생물 제어 활성도 평가
 - * 천연 원료의 경우 전처리 (보관 온,습도 / 추출 전 열처리 / 시간 등)에 따른 유효 성분의 함량 변화 및 생리 활성도 변화로 평가를 통한 생산 Process 확립
- 생산 Process 공정 확립 기준

> Paper disc diffusion method (Clear zone) : 최상위 5그룹 선별

미생물이 접종된 Agar plate 위에 천연 원료가 주입된 paper disc 또는 well을 이용. 상대적 비교 및 미생물 별 제어 활성도 즉 선택적 제어 가능 원료 선별 예정.

> Minimum Inhibitory Concentration assay : 2.0% 이하

생산 Process 조건별 처리된 원료 Sample을 액체배지에 미생물과 함께 주입 후 24시간 incubator에서 배양한 후 미생물의 생육정도를 UV-VIS spectro-photometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정 또는 검안선을 이용하여 비교 및 선별 예정.

② 시중 김치 제품 미생물 순수 분리 확보

- C*, D*, P*의 대표 상품 1종 선별 및 미생물 분리
 - * 대형 제조사의 김치 상품의 미생물 유형 분석을 통한 맞춤형 개발 또는 복합적 제품 개발 예정.
- 지역 농협 특성화 김치 3종 이상 선별하여 미생물 분리
 - * 제품 특성상 미생물 종의 균일성이 다소 낮을 것으로 판단. 따라서 공통적 지수가 높은 미생물 선별 및 ‘가식성’ 영향력 DB화 예정.

③ 배합비율에 따른 제어 활성도 평가 및 제품 구성비 확립

- 천연 원료의 경우 각각의 특성으로 제어 가능한 미생물 group 및 활성도가 다르게 나타남. 따라서 본 연구개발을 통하여 타겟으로 하는 미생물 제어활성이 높은 천연 원료를 3종 이상 선택하여 배합 조성 설정. 초기 조성은 큰 범위내에서 20% 내외로 조정하여 1차적 평가를 진행한 후 세부 배합 조정을 진행 예정.
- 선택 미생물 제어 활성이 높은 배합 비율을 선별하여 Challenge TEST에 활용 예정

* 배합 비율에 따른 미생물 제어 활성화도 평가는 상기 Paper disc diffusion /
Minimum Inhibitory Concentration method 이용.

④ 1차 Challenge TEST

- 3. 배합비율에 따른 선택적 제어 활성이 높은 샘플을 Screening 수준의 제품에 적용.
- 김치에서 분리된 유산균 및 병원성 미생물 5종을 각각의 적합한 액상 배지에 접종.
그 후 미생물의 생균수를 측정하여 가능성여부를 확인.
- 김치와 멸균수를 균질화한 샘플에 상기의 미생물 (유산균 포함)을 혼합하여 접종.
이후 선택 배지를 통하여 미생물 생균수 변화를 측정 예정.
그에 따른 무침가구 대비 비교 / 실용화 & 제품화 가능성 여부 확인.

⑤ 기타 생리 활성

∴ 천연 후보의 생리활성_1 (항산화 활성)

- DPPH assay

본 실험은 전자 공여능에 의한 산화율을 수치화하는 실험법으로 DPPH 용액에
개발 제품을 농도별 혼합하여 변화를 관찰. 이는 특정 파장의 흡광도를 측정하여
소거능(%)을 수치화 할 수 있어 상대적 비교에 매우 적합한 방법.

- ABTS assay

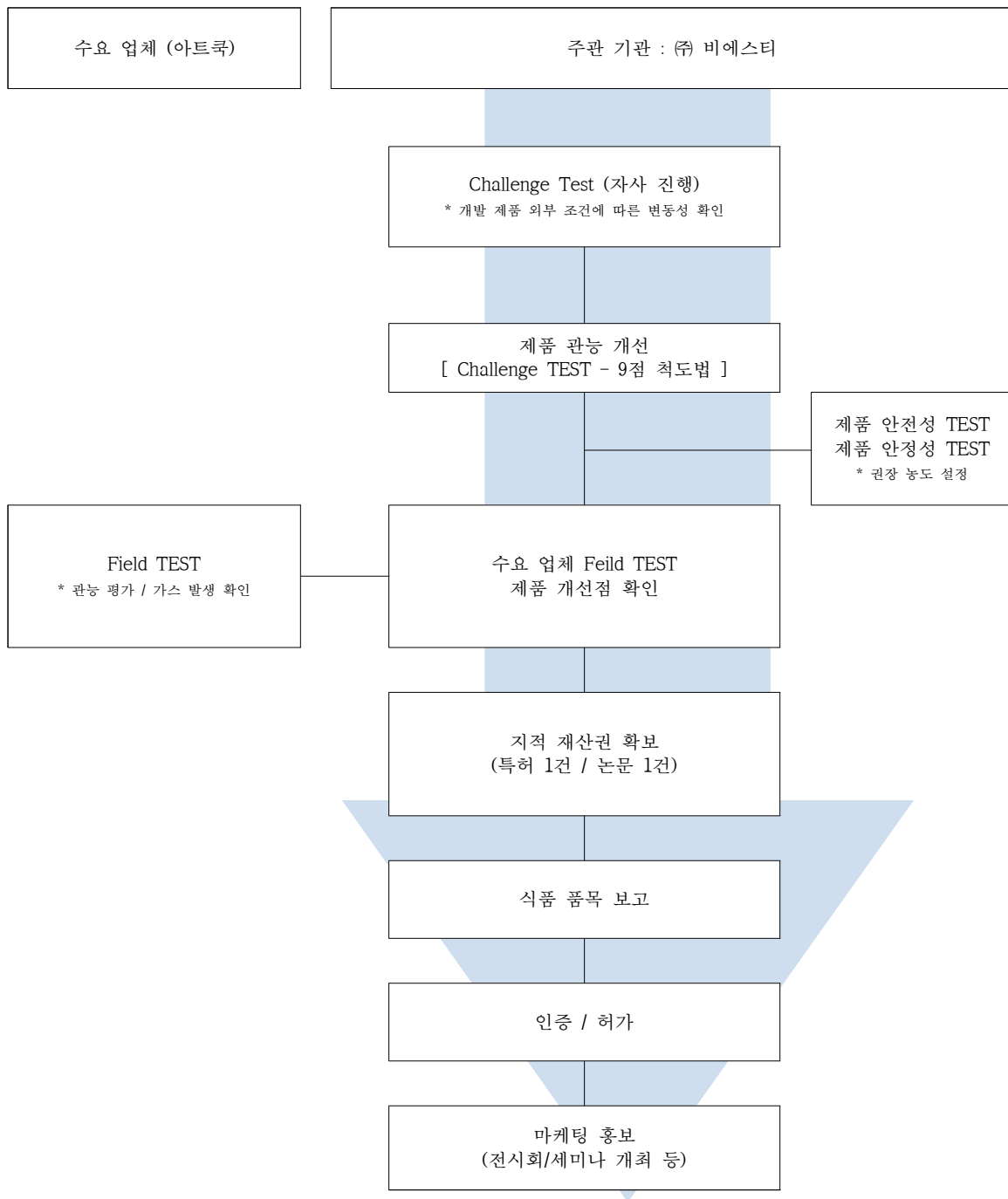
산화의 경우 다양한 원인으로 진행되고 있으며 본 실험은 DPPH와는 다른 과정의
산화/환원 반응을 측정하는 방법. 천연 원료의 경우 원료 고유의 색으로 흡광도(색)
측정법의 경우 오차가 발생할 수 있음. 다양한 시험법을 도입하여, 생리활성에 대한
효능 유무를 평가 및 판단 할 예정.

⑥ Lab scale pilot TEST

∴ BST_ 자체 TEST Method

- 제조 후 48시간이 지나지 않은 김치 100g과 멸균수 100g을 멸균팩에 넣은 후
Stomacher(speed 4 / Time 5min)이용하여 균질화. 각각의 Sample을 농도별
(김치 w/w) 첨가하여 동일한 조건으로 균질화 시킨 후 25℃ Incubator에 정치 보관.
- 김치의 상품성 2가지 기준 및 가스 발생량 / 미생물 변화 관찰 예정.
- 본 TEST를 통하여 추후 TEST 사용 농도에 대한 설정이 가능할 것으로 사료됨.

(2). 2차년도 연구개발 목표
 (가) 2차년도 연구개발 절차



(나). 2차년도 연구개발 세부 내용 ; 주관연구기관((주)비에스티)

① 2차 Challenge TEST (BST 기업부설연구소)

∴ Challenge 실험 조건

- 종류 : 배추(포기)김치
- 실험구 : 배추(포기)김치(무첨가_대조구) / 개발 원료 2~3종 (첨가구)
- 저장온도 및 기간 : 4℃, 10℃, 25℃ 중 택 1 이상 / 10주

∴ 배추(포기)김치의 품질 특성 분석

- 김치의 상품성 판단 기준인 pH와 산도를 주기별 측정하여 가식기간 연장성에 대한 객관적 데이터화 및 효율성 확인 예정.
- 배추(포기)김치의 경우 낮은 염도로 제조시 미생물의 급격한 증가로 상품성 zero 하지만, 개발 원료를 첨가한 제품의 경우 낮은 염도에서도 미생물의 생육을 억제함 다양한 제품군 파생 할 것으로 판단되며, 그 가능성을 확인 예정.
- 미생물학적 품질 특성 분석 (일반 세균, 병원성 세균, 유산균 등)과 가스 발생 정도를 평가하여 상호간에 상관관계 확인 및 DB화

② 제품 관능 평가 및 개선

- 관능 검사 전문 기업 센소 매트릭스 와 (주)비에스티에서 관능 평가 진행
- 1차 피드백을 통한 개발 제품 개선 및 향상 후 수요기업을 통한 Scale up 생산 및 관능검사 진행.
- 상기 관련 관능검사 외 수요기업 만족도 조사 포함.

③ 제품 안전성 및 안정성 평가

- 제품의 안정성
 - > 유통 또는 보관 등에 따른 개발 제품의 효능 및 유통기한 설정을 위한 평가 진행
 - > 온도, 일광, 등 가혹(가속) 조건 설정 및 6개월간 변화 검사
 - > 6개월 종료 후 항균 활성 및 미생물 검사 자체 기업부설연구소 또는 외부기관 의뢰
- 제품의 안전성
 - > 세포독성을 통한 무첨가구 대비 95% 이상 생존률 확인
 - [세포독성 평가의 경우 pH의 일률적 보정이 필요하다 판단.]
 - [해당 최종 보고시 외부기관에 의뢰 및 Modify Method 진행.]

④ Field TEST [수요기업 협동]

- 2차 Challenge TEST에서 다양한 농도를 검토를 통하여 적용 권장량 도출 / 활용.
- Field TEST에서는 수요기업과 협동하여 진행 할 예정이며, 조건은 하기와 같음.

- > 저장 온도 : 업체 저장 방법 / 포장사이즈 : 중 (1~5kg)
- (주)비에스티는 이화학적 품질 특성 분석 / 미생물학적 품질 특성 분석
수요기업의 경우 관능검사 중점적 / 가스 발생 여부 등 확인 예정.

⑤ 지적 재산권 확보 (특허, 논문)

- 지적 재산권 확보를 위한 국외 특허 추가 출원.
 - * 특허 특성상 출원 후 심사까지 최소 1년에 2년 경과 후 결과 통보로 성과목표를 출원으로 설정.
- 선별된 2가지 제품군 또는 제형에 따른 식품 품목보고 과제 종료 전 2건 완료.

⑥ 식품 품목 보고

- 적용 제품군의 특성상 합성 또는 첨가물의 원료는 소비자 기피 할 가능성 있음.
이에 (주)비에스티는 개발 제품을 '기타 가공품'으로 등록 예정이며, 이는 수요업체의 사용성 및 마케팅적 요소로 큰 활용도를 보일 것으로 사료됨.

(3). 연구개발 목표 및 평가

주요 성능지표	단위	최종 개발목표	가중치	비고
천연 항균 후보 물질 추가 선별	종	상위 후보군 3종 이상 선별	5	
배합 비율에 따른 제어 여부 확인	개	복합 조성 그룹 4개 이상	7.5	
1 st Challenge 평가	-	Clear zone - 7mm 이상 MIC - 2.0 % 이하	10	
lab scale 평가	-	최종 시제품 선별 및 농도 설정	15	
기타 생리활성 평가	%	DPPH / ABTS - RC ₅₀ 0.5%	5	
Filed(제조사) 평가	-	pH, 산도, 미생물 가스발생률, 관능평가	20	
관능 평가	-	외관, 맛, 식감, 뒷맛, 선호도 - 무첨가 제품과 동등 이상	10	
제품 안정성 평가	-	광, 온도(습도) 가혹 조건 - 6개월 성상 - 변화 없음 미생물 - 불검출 항균 활성 - 초기와 동등	7.5	
제품 안전성 평가	%	무첨가 대비 95% 이상 생존	7.5	
지적 재산권 확보	건	국내 특허 2건 논문 1건	5	
식품 품목 보고	건	제품화 2건	2.5	
마케팅 홍보	건	마케팅 홍보 3건	5	

(4). 연구개발 성과 목표

○ 대표 물성치

i. Clear zone 7mm 이상, MIC value 2.0% 이하

ii. 가스 발생률 40% 감소

(단, 가스 발생이 문제되는 김치 제품군과 비교)

iii. 발효 균주 생존률 90% 이상 (최종 발효 단계)

성과목표	연구기반지표																			
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		논문 평균 IF	학술 발표			정책 활용	홍보 전 시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10			15		35			25									15		
최종목표	2			2		2			2			1						3		
1차년도	1								1									1		
2차년도	1			2		2			1			1						2		
소 계	2			2		2			2			1						3		
종료 1차년도		1					22													
종료 2차년도		1					9													
종료 3차년도																				
소 계		2																		
합 계	2	2		2		2			2			1						3		

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 항균 활성을 갖는 천연 후보 물질 추가 선별

(1). 천연 추출물 및 미생물 배양액 제조

천연 추출물 제조시 사용된 원물을 재래시장 또는 인터넷을 통하여 구입하였으며, 미생물의 경우는 한국생명공학연구원(KCTC, Deajon, Korea)과 (사)한국중균협회(KCCM, Seoul, Korea)를 통하여 분양 받아 사용하였다. 구입된 원물은 세척수에 여러번 세척한 후 물기를 제거하였으며, 완전히 제거된 원물을 적당한 크기로 세절하였다. 원물의 중량대비 10배수의 정제수를 투입 후 조건(50 ~ 100°C, 2 - 8 시간)에 맞게 추출한 후 여과지(110mm, Adcantec, Tokyo Roshi Kaish Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 여과액을 얻었다. 분양 받은 미생물을 각각 MRS(Difco, Detroit, MI, USA), Potato Dextrose Agar(PDA, Difco), Nutrient Agar(NA, Difco)에 희석 도말 한 후 Single conoly를 취하여 Yeast Extract(Difco)에 배양하였다. 3차 활성화가 된 배양액을 새로운 Yest Extract 배양액에 5% (v/v)가 되도록 혼합 후 배양 조건은 KCTC에서 제공하는 각각의 미생물의 최적 배양 온도를 선택하여 배양하였다. 배양이 종료 후 원심 분리기(12,000 RPM, 10분)와 제균 필터 (0.22 μ m membrane filter)로 미생물을 제거하였으며, Agar Plate에 미생물 잔존 여부를 확인하였다. 미생물이 검출되지 않은 배양액은 감압농축기를 통하여 45 ~ 60°C에서 농축하였으며, 얻어진 농축액은 필터를 통하여 이물을 제거한 후 미생물 배양액으로 사용하였다.

(2). 천연 후보 물질의 Poly-phenol 함량 측정 방법

- 추출물 200 μ l 와 Folin-ciocalteu's reagent 200 μ l를 혼합하여 상온에서 5분간 반응시키고, 10% Na₂CO₃ 400 μ l와 water 1,600 μ l를 첨가한다. 30분간 반응을 시킨 후에 12,000rpm 원심분리하여 상층액을 96well plate에 200 μ l/well이 되도록 옮기고, Microplate Spectrophotometer를 이용하여 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 tannic acid를 표준용액으로 하였다.

(3). 항균 활성 평가

(가). 사용 균주 및 배지

- 본 항균 활성 평가를 위해 사용된 균주는 Escherichia coli(KCTC 1231, Deajeon, Korea)를 사용하였으며, 배지는 Plate Count Agar (PCA, Difco)와 Luria-Bertani Broth miller (LB Broth, Difco)를 사용하였다.

(나). Paper disc method

- 항균 활성 평가를 위해 paper disc-diffusion method를 사용하였으며, 각 추출물을 0.22 μ m membrane filter로 제균시켜 준비하였다. 균주 100 μ l가 균일하게 도발된 배지 위에 각각의 paper disc (ϕ 6mm, Advantec)를 올려놓고 추출물 또는 미생물 배양액을 40 μ /disc씩 흡수시켜 24시간 동안 incubator에서 배양한 후 paper disc 주위에 형성된 생육 저지대(clear zone)의 직경(지름)을 측정하여 항균 활성의 유무와 강도를 비교한다. 용해 용매인 DMSO 및 H₂O의 영향을 조사하기 위해 DMSO 및 H₂O를 대조구로 하였다.

(4). Poly-phenol 함량 측정 및 항균 활성 평가 결과

표 1. 천연 소재의 total poly-phenol 함량 및 항균활성 screening

구분	후보군	total Polyphenol 함량 (mg/g)	항균 활성
천연추출물	마늘 추출물	4.5	++++
	대추 추출물	75.7	+++
	깻잎 추출물	5.9	+++
	새싹보리 추출물	99.0	++
	고추 추출물	26.1	+++
	고추냉이(whole) 추출물	18.2	++++
	구기자 추출물	9.5	+++
	녹차 추출물	98.2	++++
	다시마 추출물	37.1	++
	늪은 호박 추출물	17.7	+
	두충나무 나무껍질 추출물	36.5	++
	그 외 추출물	0.5 ~ 10.0	+ 이하
미생배양액	<i>Leuconostoc spp.</i>	-	++++
	<i>Pichia spp.</i>	-	++++
	<i>Bacillus spp.</i>	-	+++
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	++
	<i>Streptococcus thermophilus</i>	-	+++
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	+++
	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	-	++++
	<i>Aspergillus oryzae</i>	-	++

- 본 평가는 추가적 후보 물질을 선별하기 위하여 진행하였으며, 총 폴리페놀 함량 측정을 통하여 1차적 선별 및 항균 활성 Paper disc-diffusion method를 통하여, 총 폴리페놀 함량 및 항균 활성이 우수한 8종을 선별하였다. 추가 천연 추출물 중에서 폴리페놀 함량이 높은 후보군은 새싹보리 추출물과 녹차 추출물, 대추 추출물이었으며, Tannic acid 기준으로 환산시 99.0 mg/g, 98.2 mg/g, 75.7 mg/g로 확인되었다. *E. coli*에 대한 항균 활성이 우수한 후보군은 마늘 추출물, 고추냉이(whole) 추출물, 녹차 추출물로 확인되었으며, Clear zone은 18.1 mm, 17.8 mm, 15.2 mm로 윤인숙(2009)이 보고 결과와 유사한 수치를 보였다. 하지만 총 폴리페놀 함량과 항균 활성과의 연관성을 확인하지 못하였으며, 이는 김보량 등 보고와 같이 폴리페놀이 항균 활성을 나타내는 물질 중 하나이나 총 폴리페놀 함량과 항균 활성의 연관성보다 천연소재가 갖고 있는 다양한 phyto-chemical에 의해서 항균 활성의 정도가 결정되는 것으로 보

고 있다. 또한, 미생물 배양액은 *Sacharomyces cerevisiae*, *Pichia spp.*, *Leuconostoc spp.* 순으로 항균활성이 우수한 것으로 확인되었으며, Clear zone은 각각 15.3 mm,, 12.1 mm, 11.9 mm로 확인하였다.

나. 선별 천연 소재의 복합 조성

(1). 복합 조성 조성물의 항균 활성 평가 방법

- 복합 조성 조성물의 항균 위해 앞서 사용한 paper disc-diffusion method를 균 농도를 제외하고 동일하게 진행하였다. 도말된 균 농도의 경우 보다 가혹 조건속에서 항균 활성의 상대적 비교를 위하여 10배 많게 계대 배양하여 사용하였다.

(2). 선별 천연 소재의 복합 조성에 따른 항균 활성 결과

표 2. 천연 소재의 복합 조성 및 *E. coli*에 대한 항균 활성 평가

구분	천연 추출물		미생물 배양액	항균 활성	비고
3개 조성	마늘	고추냉이	<i>Leuconostoc spp.</i>	+++++	3-1
	마늘	새싹보리	<i>Leuconostoc spp.</i>	+++	3-2
	마늘	깻잎	<i>Leuconostoc spp.</i>	++++	3-3
	마늘	녹차	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	+++++	3-4
	고추냉이	새싹보리	<i>Pichia spp.</i>	++	3-5
	깻잎	새싹보리	<i>Pichia spp.</i>	++	3-6
	깻잎	고추	<i>Pichia spp.</i>	++	3-7

구분	천연 추출물			미생물 배양액		항균 활성	비고
5개 조성	깻잎	고추냉이	마늘	<i>Leuconostoc spp.</i>	<i>Pichia spp.</i>	+++++	5-1
	깻잎	마늘	고추	<i>Leuconostoc spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	+++	5-2
	깻잎	마늘	새싹보리	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Leuconostoc spp.</i>	++	5-3
	마늘	구기자	대추	<i>Pichia spp.</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	+++++	5-4
	대추	깻잎	새싹보리	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Leuconostoc spp.</i>	+++	5-5
	대추	마늘	녹차	<i>Pichia spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>	++++	5-6
	고추	마늘	구기자	<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Pichia spp.</i>	++++	5-7

- 본 평가는 천연 후보 물질을 복합 조성에 따른 항균 활성 효과를 확인하기 위하여 진행하였으며, 기존 Paper disc-diffusion method는 확산 속도와 한계점에 따른 항균 활성 비교에 한계가 있기 때문에 균 농도를 높여 문제점을 보완하였다. 그 결과 3개 조성 그룹에서는 마늘 추출물, 고추냉이 추출물, *Leuconostoc spp.* 배양액 조성(이하 3-1 샘플)과 마늘 추출물, 녹차 추출물, *Sacharomyces cerevisiae* 배양액 조성(이하 3-4 샘플)이 가장 우수한 항균 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 5개 조성 그

룹에서는 깻잎 추출물, 고추냉이 추출물, 마늘 추출물, *Leuconostoc spp.* 배양액, *Pichia spp.* 배양액 조성 (이하 5-1 샘플)과 마늘 추출물, 구기자 추출물, 대추 추출물, *Pichia spp.* 배양액, *Streptococcus thermophilus* 배양액 조성(이하 5-4 샘플)이 가장 우수한 항균 활성을 갖는 것으로 확인되었다. 그 외 3개 조성 그룹에서 1개(이하 3-3 샘플), 5개 조성 그룹에서 1개(이하 5-6 샘플)를 추가 선별하였다.

다. Challenge TEST

(1). 1차 Challenge TEST - 1st

표 3. 복합 조성물의 선택적 항균 활성 평가 확인

	1)Antibacterial activity		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. plantarum</i>
3-1	+++	+++	++
3-3	++	++	++
3-4	+++	++++	+
5-1	+++	++++	+++
5-4	++	+++	+
5-6	++	+++	++

1) ++++ : clear zone more than 13mm +++ : clear zone more than 10mm, ++ : clear zone more than 7mm, + : clear zone less than 7mm, - : not detected of antibacterial activity

- 본 평가는 앞서 평가를 통하여 선별된 복합 조성 시제품을 대표 병원성 미생물 2종과 유산균 1종 항균 활성 평가를 재진행하였다. 병원성 미생물 2종에 대하여 항균 활성이 우수한 복합 조성은 3-4 와 5-1 이었으며, E.coli는 12.4 mm, 10.1 mm, S. aureus는 17.1 mm, 15.8 mm로 확인되었다. *Lactobacillus plantarum*에 대한 항균 활성은 3.5 mm, 10.9 mm로 5-1의 경우 병원성 미생물뿐만 아니라 유산균에대한 항균 활성이 높게 확인되었다. 이는 3-4 개발 시제품이 김치(발효 식품)에 적합할 것으로 예상하며, Modify MIC (BST type)를 통하여 최종 선별 예정이다.

(2). 1차 Challenge TEST - 2nd

(가). 1차 Challenge TEST - 2nd 방법

- 본 Challenge TEST (Modify MIC)를 위해 사용된 균주는 일반 미생물에는 *Escherichia coli* 및 시중 김치 제품에서 분리한 균주 3종을 혼합하여 사용하였으며, 유산균은 *Lactobacillus plantarum*을 사용하였다. 배지는 LB Broth와 MRS Broth를 사용하여 활성 및 TEST를 진행하였다. 최종 균 농도는 일반 미생물은 7.0 log cfu/g, 유산균은 6.0 log cfu/g이 되도록 준비하였으며, 천연 후보 물질을 각각 첨가한 후 정치 보관하였다. 보관 조건은 25 ± 1.0 °C에서 72시간 하였으며, Agar plate 배지에 도말하여 생균수를 측정하였다. 측정된 생균수는 시험전 균주 농도와 비교하여 감소된 정도로 표기하였다.

(나). 1차 Challenge TEST - 2nd 결과

표 4. 복합 조성물의 Modify MIC 확인

구분	구분	농도	일반 미생물	유산균
3개 조성	3-1	0.75	2.53 log cfu/g 감소	1.02 log cfu/g 감소
		1.25	5.01 log cfu/g 감소	3.63 log cfu/g 감소
	3-3	0.75	2.71 log cfu/g 감소	1.13 log cfu/g 감소
		1.25	3.00 log cfu/g 감소	2.41 log cfu/g 감소
	3-4	0.75	3.03 log cfu/g 감소	1.07 log cfu/g 감소
		1.25	5.02 log cfu/g 감소	1.78 log cfu/g 감소
구분	구분	농도	일반 미생물	유산균
5개 조성	5-1	0.75	3.52 log cfu/g 감소	1.93 log cfu/g 감소
		1.25	4.81 log cfu/g 감소	5.03 log cfu/g 감소
	5-4	0.75	2.18 log cfu/g 감소	-
		1.25	4.75 log cfu/g 감소	2.11 log cfu/g 감소
	5-6	0.75	2.01 log cfu/g 감소	1.0 log cfu/g 이하 감소
		1.25	3.61 log cfu/g 감소	3.14 log cfu/g 감소

- 본 평가는 천연 후보 물질 복합 조성 시제품이 미생물의 생육 억제 및 사멸 유도 가능성에 대한 평가를 하기 위해 진행하였으며, 1차 Challenge TEST - 1st와 경향성을 비교하여 최종 개발 제품을 선별하고자 한다. 일반 미생물 (병원성 미생물 포함)에서 항균 활성이 우수한 시제품은 3-1, 3-4, 5-1, 5-4 였으며, 1.25% 농도에서 생균수의 감소 폭이 평균 4.90 ± 0.15 log cfu/g 였다. 반대로 유산균에서 항균 활성이 낮은 시제품은 3-3, 3-4, 5-4로 생균수 감소폭이 평균 2.1 ± 0.3 log cfu/g 으로 확인되었다. 최종적으로 1차 Challenge TEST - 1st / 2nd 결과를 종합해 본 결과 3-4 시제품으로 선정하였으며, 해당 복합 조성은 「마늘 추출물 30%, 녹차 추출물 45%, 효모 배양액(*Sacharomyces cerevisiae*)25%」를 기반으로 하였다.

라. Lab Scale pilot 평가

표 5. 복합 조성물을 적용한 김치의 이화학적 변화 확인

구분	농도	pH		산도 (%)		가스 발생량 (ml/500g)	
		0 day	7 day	0 day	7 day	0 day	7 day
대조구	-	5.2	4.1	0.18	0.83	-	230
3-1	1.0%	4.9	4.5	0.20	0.63	-	51
3-4	1.0%	5.1	4.8	0.18	0.35	-	38
5-1	1.0%	4.8	4.6	0.21	0.50	-	45
5-4	1.0%	4.9	4.6	0.18	0.69	-	79

- 본 평가는 수요기업 협동 평가에 앞서 시제품 적용을 통하여 김치의 이화학적 및 가스 발생량을 확인하였다. 대조구(무첨가)의 경우 저장 기간에 따른 pH 감소, 산도 증가, 가스 발생량의 변화 폭이 가장 크게 확인되었으며, 시제품 첨가구에서는 변화 폭이 감소된 것을 확인하였다. 후보 시제품이 첨가된 김치는 맛의 기준인 pH 4.5 / 산도 0.6 ~ 0.7% 조건에 부합하였다. 특히 선별된 3-4 시제품의 경우 가스 발생을 극히 억제하는 것으로 7일차에 38ml/500g으로 무첨가 230ml/500g의 1/6이하로 확인되었다. 이는 이상 발효 균주 또는 생육 조건을 제어하며, 김치의 과숙성을 억제하는 것으로 사료된다. 이에 선별된 3-4 시제품을 BGC-F 2.0이라 명명하였다.

마. 기타 생리활성 평가

(1) 항산화 활성 평가 방법

- 항산화 활성 측정 중 DPPH method는 Brand-Williams 등의 문헌을 수정하여 진행하였으며, BGC-F 2.0(농도별) 0.2 mL과 0.2 mM 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) solution 1.8 mL을 혼합 후, 암소에서 30분간 정치 후 UV/Vis spectrophotometer로 517nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS method는 Re 등(1999)의 문헌을 수정하여 진행하였으며, 2.45 mM potassium persulfate에 녹인 7 mM ABTS를 암소에서 16-24시간 반응 시켜 준비하였으며, 준비된 ABTS 용액 3.8 mL과 샘플 0.2 mL을 혼합 후 암소에서 10분간 정치시켜 732nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 아래의 산출식에 대입하여 환산하였으며, 대조구는 L-ascorbic acid를 사용하였다.

$$\text{Antioxidant activity(\%)} = \frac{\text{Control O.D} - \text{Sample O.D}}{\text{Sample O.D}} \times 100$$

(2) 개발 시제품의 항산화 활성 평가

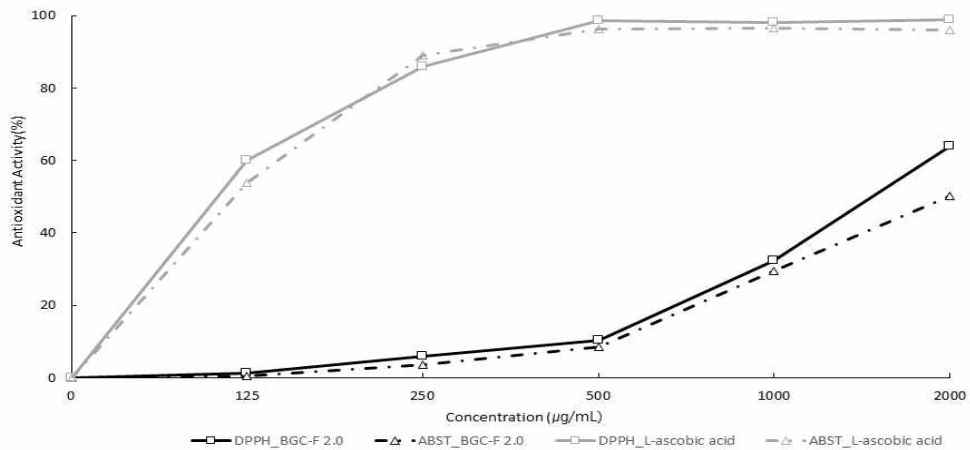


그림 1. BGC-F 2.0과 L-ascorbic acid의 라디칼 소거 활성

- BGC-F 2.0에 대한 기타 생리 활성 평가를 위하여 항산화 활성 평가를 진행하였으며, DPPH, ABTS 방법을 통하여 확인하였다. DPPH radical을 50% 소거하는데 필요한 농도(RC₅₀)는 BGC-F 2.0 1632.3 µg/mL, L-ascorbic acid 119.4 µg/mL로 확인되었으며, free radical을 소거율 90% 이상까지는 농도 의존적 경향을 보였다. ABTS radical을 50% 소거하는데 필요한 농도(RC₅₀)는 BGC-F 2.0 1969.2 µg/mL, L-ascorbic acid 106.9 µg/mL로 DPPH method와 유사한 경향으로 확인되었다. 종합적으로 DPPH와 ABTS method 모두 BGC-F 2.0 보다 L-ascorbic acid의 항산화 활성이 우수한 것으로 나타났으나, 김치에 적용 농도인 1.0 ~ 2.0%보다 낮은 0.16 ~ 0.2% 농도에서 RC₅₀ value를 확인하였기에 BGC-F 2.0 1.0% 이상 적용 시 유의미한 항산화 활성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

바. 자사 2차 Challenge TEST 및 제조사 평가

(1). 자사 2차 Challenge TEST

(가). 산도

표 6. BGC-F 2.0 첨가 농도 및 저장기간에 따른 이화학적 변화 - 산도 (%)

보관 조건	BGC-F 2.0 농도	저 장 기 간				
		0일차	7일차	14일차	21일차	28일차
냉장	무첨가	0.33	0.72	1.24	1.02	1.04
	1.00%	0.31	0.75	0.59	0.57	0.54
	3.00%	0.32	0.68	0.7	0.62	0.67
상온	무첨가	0.33	1.28	0.83	1.22	1.83
	1.00%	0.31	0.66	0.82	1.06	0.77
	3.00%	0.32	1.11	0.58	0.68	0.64

- 본 실험은 김치의 이화학적 기준 중 하나인 산도를 평가 함으로 저장/유통 기간 연장 가능성을 확인하였다. 0일차에는 BGC-F 2.0의 첨가 여부와 관계없이 0.32 ± 0.01로 차이를 보이지 않았으나 14일차 이후 뚜렷하게 차이를 보였다. 냉장 조건의 경우 BGC-F 2.0 무첨가 김치의 산도는 1.24%로 0.91 %p 증가한 반면, BGC-F 2.0 1.0%, 3.0% 첨가한 김치에서는 0.28 %p, 0.38 %p 증가한 것으로 확인되었다. 28일차에서는 1.04%(무첨가), 0.54%(BGC-F 2.0 1.0%), 0.67%(BGC-F 2.0 3.0%)로 확인되었다. 상온 조건의 경우는 28일차에 가장 뚜렷한 차이를 보였으며, 무첨가 1.83%, BGC-F 2.0 1.0% 0.77%, BGC-F 2.0 3.0% 0.64%로 무첨가 김치의 산도는 2.0% 기준에 근접한 수치를 보였다. 냉장/상온 모두 BGC-F 2.0을 첨가하였을 시 산도 증가를 뚜렷이 억제하는 것을 확인하였으나, 농도 의존적 경향을 보이지는 않았다.

(나). pH

표 7. BGC-F 2.0 첨가 농도 및 저장기간에 따른 이화학적 변화 - pH (pH value)

보관 조건	BGC-F 2.0 농도	저 장 기 간				
		0일차	7일차	14일차	21일차	28일차
냉장	무첨가	6.04	4.45	4.13	4.6	4.45
	1.00%	6.17	4.87	4.63	5.2	5.2
	3.00%	5.90	4.87	4.84	4.95	4.87
상온	무첨가	6.04	4.14	4.49	4.31	3.89
	1.00%	6.17	5.18	4.62	4.55	4.9
	3.00%	5.90	4.7	4.52	4.74	5.12

- 본 실험은 두 번째 이화학적 기준인 pH를 평가하였다. BGC-F 2.0 첨가 여부에 따른 미세한 pH 차이가 있으나, 농도 의존적이지 않으며 경향성이 없는 것으로 보아 김치 제조시 발생한 오차라고 사료된다. 저장기간 전 구간에서 BGC-F 2.0 첨가 김치가 무처리 대비 다소 높은 pH를 유지하였으며, 28일차에는 0.36 ~ 1.23 p의 차이를 보였다. 냉장 보관시 상온 보관 김치보다 pH의 값이 높게 유지 되었으며, 28일차 까지 기준치 이상을 유지하였다. 하지만 상온

보관 김치의 경우 무첨가 김치가 3.89로 기준치 4.0 이하로 상품성이 떨어진 것을 확인 할 수 있었다.

(다). 총 세균

표 8. BGC-F 2.0 첨가 농도 및 저장기간에 따른 미생물학적 변화 - 총 세균 (log cfu/g)

보관 조건	BGC-F 2.0 농도	저 장 기 간				
		0일차	7일차	14일차	21일차	28일차
냉장	무첨가	3.91	5.15	4.71	7.75	6.63
	1.00%	4.58	3.81	4.62	4.23	3.85
	3.00%	4.71	3.99	4.57	5.73	4.28
상온	무첨가	3.91	8.08	7.59	7.60	8.18
	1.00%	4.58	4.63	5.11	7.08	5.82
	3.00%	4.71	5.15	4.59	6.15	5.52

- 김치의 미생물학적 기준 중 하나인 총 세균은 0일차를 제외한 저장 기간 내에서 BGC-F 2.0를 첨가시 무첨가 대비 2 ~ 3 log cfu/g 감소한 경향을 보였다. 냉장 보관시 21일차와 28일차에서 뚜렷한 차이를 보였는데, 무첨가 6.63 log cfu/g, BGC-F 2.0 1.0% 3.85 log cfu/g, BGC-F 2.0 3.0% 4.28 log cfu/g로 BGC-F 2.0 첨가시 총 세균의 생균 수가 낮게 확인되었다. 상온 보관시에도 유사한 경향을 보였으며, 28일차에 무첨가 8.18 log cfu/g, BGC-F 2.0 1.0% 5.82 log cfu/g, BGC-F 2.0 3.0% log cfu/g 로 뚜렷하게 미생물을 억제하는 것을 확인하였다. Cho 등(1988) 보고에 따르면 마늘 추출물의 첨가량이 증가할수록 김치에서 분리한 호기성 세균의 생육이 억제된다고 되어 있다. 이는 본 연구 결과 BGC-F 2.0 첨가시 총 세균의 생육 저해를 유도하는 것과 일치하였으나, 농도 의존적 경향을 보이지 않는 것으로 최종 확인되었다.

(라). 유산균

표 9. BGC-F 2.0 첨가 농도 및 저장기간에 따른 미생물학적 변화 - 유산균 (log cfu/g)

보관 조건	BGC-F 2.0 농도	저 장 기 간				
		0일차	7일차	14일차	21일차	28일차
냉장	무첨가	5.49	8.87	7.48	7.99	7.76
	1.00%	5.76	3.08	3.83	4.15	3.00
	3.00%	5.65	3.04	2.70	5.11	4.00
상온	무첨가	5.49	8.53	6.89	7.63	7.88
	1.00%	5.76	8.04	6.30	8.00	6.20
	3.00%	5.65	8.30	4.18	6.46	5.79

- 김치의 미생물학적 기준 중 하나인 유산균은 냉장은 0일차, 상온은 0 ~ 21일차까지는 BGC-F 2.0 첨가 여부와 무첨가 김치와 뚜렷한 차이는 없는 것으로 확인되었으며, 냉장은 7 ~ 28일 상온은 28일차에 무첨가 대비 BGC-F 2.0 첨가시 유산균이 감소한 것으로 확인되었다. 냉장과 상온에서 확연히 다른 경향을 보인 것과 유산균의 생균수는 연관성이 있을 것으로 판단

되며, Lee 등(1992)에 의하면 저장 온도 및 그에 따른 유산균 생육 성장이 다른 것으로 보고하였다. 이는 50일차 샘플 조사 및 제조사(Filed) 평가를 통하여 재확인하였다.

(마). 50일차 이화학적(pH) 및 미생물학적(유산균) 평가

표 10. BGC-F 2.0 첨가 후 50일차 김치의 pH 및 유산균 수 변화.

보관 조건	BGC-F 2.0 농도	검 사 항 목	
		pH	유산균 (log cfu/g)
냉장	무첨가	3.85	7.63
	1.00%	4.31	6.94
	3.00%	4.29	7.93

- 본 실험은 앞선 BGC-F 2.0 첨가에 따른 유산균 변화 측정시 무첨가군과 뚜렷한 차이를 보였기 때문에 추가적으로 평가를 진행하였다. 김치 제조 후 50일차 관찰 결과 pH는 무첨가 3.85, BGC-F 2.0 1.0% 4.31, BGC-F 2.0 3.0% 4.29로 무첨가 김치는 pH 기준치 4.0 이하로 유통 김치로서는 상품성이 떨어진 것을 확인하였다. 또한 유산균의 경우는 6.94 ~ 7.63 log cfu/g 으로 뚜렷한 차이를 보이지 않았으며, 29일차에 확인한 유산균의 경향과는 많이 다른 것을 확인하였다.

(2). 제조사(Filed) 평가

pH

구분	저 장 기 간		
	0 day	7 day	14 day
무첨가 김치	5.64	5.02	4.25
배추 절임시 첨가	5.97	4.29	3.85
김치 양념에 첨가	5.13	5.06	5.00

산도

(%)

구분	저 장 기 간		
	0 day	7 day	14 day
무첨가 김치	0.23	1.41	1.73
배추 절임시 첨가	0.26	1.40	1.91
김치 양념에 첨가	0.20	0.73	0.95

일반세균		(log cfu/g)		
구분	저 장 기 간			
	0 day	7 day	14 day	
무첨가 김치	4.75	5.86	7.15	
배추 절입시 첨가	5.09	6.53	6.36	
김치 양념에 첨가	5.24	5.51	5.94	

유산균		(log cfu/g)		
구분	저 장 기 간			
	0 day	7 day	14 day	
무첨가 김치	3.12	5.87	5.87	
배추 절입시 첨가	2.89	6.15	6.44	
김치 양념에 첨가	3.05	6.67	6.84	

(누적) 가스발생량		(ml/kg)		
구분	저 장 기 간			
	0 day	7 day	14 day	
무첨가 김치	-	451	548	
배추 절입시 첨가	-	398	463	
김치 양념에 첨가	-	71	106	

- 본 실험은 개발 제품 BGC-F 2.0이 2차 challenge와 in vitro의 재현성/연관성을 입증하기에 다소 부족하여 수요 업체인 김치 제조사에서 실제 생산공정을 거쳐 제조된 김치를 평가하였다. 김치는 제조 직후 냉장보관이 아닌 1-3일 상온 숙성을 거친 뒤 냉장 보관하는 과정이 통상적으로 사용되는 방법으로 본 실험의 보관 조건으로 설정하였다. 그 결과 무첨가 김치의 경우 pH 변화가 5.64(0일차), 5.02(7일차), 4.25(14일차)로 확인되었으며, BGC-F 2.0을 양념에 첨가하여 제조시 5.13(0일차), 5.06(7일차), 5.00(14일차)로 확인되었다. 하지만 배추 절입 공정에 BGC-F 2.0을 첨가한 경우 5.97(0일차), 4.29(7일차), 3.85(14일차)로 BGC-F 2.0의 투입 공정 시기에 따라 다른 결과를 확인 할 수 있었다. 산도 또한 유사한 경향을 보였으며, 무첨가 김치 0.23(0일차), 1.41(7일차), 1.73(14일차)이며, BGC-F 2.0을 양념에 첨가 제조시 0.20(0일차), 0.73(7일차), 0.95(14일차)로 BGC-F 2.0을 양념에 첨가한 김치가 가장 변화 폭이 작았다. 일반 세균의 생균수(log cfu/g)는 무첨가 김치 4.75(0일차), 5.86(7일차), 7.15(14일차)이며, BGC-F 2.0을 양념에 첨가 제조시 5.24(0일차), 5.51(7일차), 5.94(14일차)로 확인되었다. 두 실험군 모두 증가하였으나, 무첨가 김치는 2 ~ 3 log cfu/g 수준으로 큰 변화폭을 보인 반면, 저장 기간에 BGC-F 2.0을 양념에 첨가한 김치는 일반 세균이 극히 낮은 수준으로 증가하였다. 유산균의

생균수(log cfu/g)는 무첨가 김치 3.12(0일차), 5.87(7일차), 5.87(14일차)로 확인되었으며, BGC-F 2.0를 김치 양념에 첨가한 김치는 3.05(0일차), 6.67(7일차), 6.84(14일차)로 확인되었다. 이는 일반 세균과 다른 경향을 보였는데, 일반 세균의 경우는 BGC-F 2.0을 양념에 첨가한 김치가 생균수 변화 폭이 적은 반면, 유산균에서는 무첨가 김치가 변화폭이 적었다. 이는 BGC-F 2.0을 양념에 첨가한 김치는 일반 세균을 큰 폭으로 제어하며 유익균인 유산균에는 일정한 수준으로 작용한 것으로 사료된다. 또한 가스 발생량을 측정함으로써 유산균의 이상발효 여부를 판단하였다. 무첨가 김치의 경우 0 ~ 7일차 사이에 급격한 가스가 발생하여 451 ml/kg가 생성되었으며, 14일차 누적 가스발생량은 548 ml/kg으로 확인되었다. BGC-F 2.0을 양념에 첨가한 김치 또한 0 ~ 7일차에 많은 가스발생량이 최대였지만, 71 ml/kg으로 무첨가 대비 현저히 낮은 수준이었으며, 14일차에는 106 ml/kg으로 무첨가 대비 1/5 수준으로 확인되었다.

사. 관능 평가

(1). 관능 검사 방법

- 관능 검사는 20 ~ 50대 여성 34명을 무작위 선정하였으며, 사전 평가용 시료를 통하여 관능 감사를 수행 할 수 있도록 교육 후 진행하였다. 김치의 부위 별로 각각 3조각씩 담은 후 소량의 김치국물을 포함하여 제공하였으며, 총 다섯 개의 시료로 무첨가를 포함한 BGC-F 2.0 1 ~ 3%, BGC-FP (파우더 타입) 3%을 평가 시료로 사용하였다. 평가 항목은 종합 선호도와 세부 기호 (외관, 맛, 식감, 뒷맛)로 각각 5점 척도와 9점 척도 평가를 진행하였다.

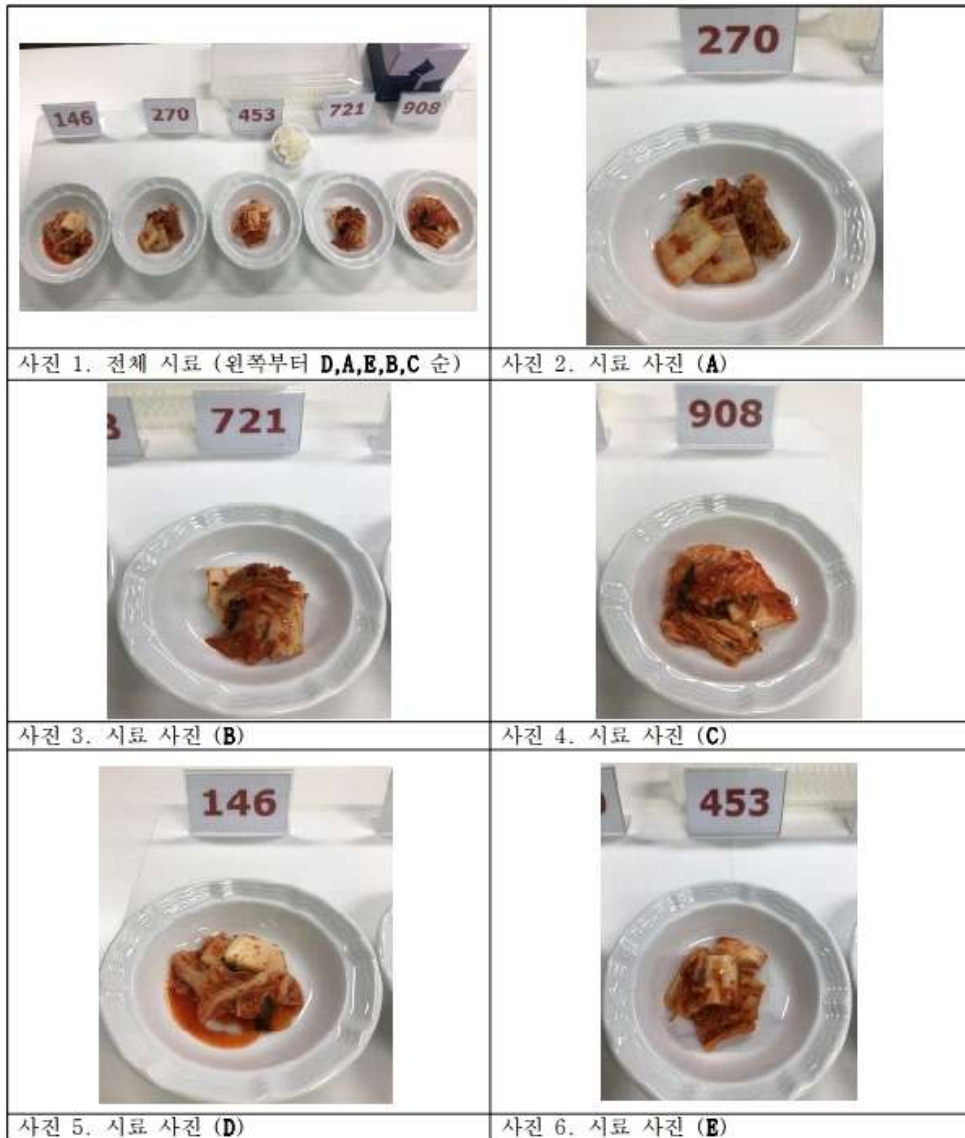


그림 2. 관능 검사 제공 시료

(2). 농도별 개발 시제품이 첨가된 김치의 관능 평가

(가). 종합선호도

- <표 11>은 종합선호도 결과로 1순위부터 5순위까지 순서대로 1점 ~ 5점을 부여하여 전체 합을 상대적 비교하였다. BGC-F 2.0 2%를 첨가한 김치의 경우 75점으로 가장 선호도가 높았으며, 무첨가와 BGC-F 2.0 1%, BGC-FP 2.0 3%가 오차 범위 내에서 선호도가 유사한 것으로 평가되었다. BGC-F 2.0 3%의 경우 뚜렷하게 선호도가 낮은 것으로 확인 되었다. 하지만 개발 시제품의 첨가가 농도에 따라 기존 제품의 관능을 향상 시킬 수 있다는 결과는 상당히 유의미한 것으로 사료된다.

표 11. 농도별 BGC-F 2.0 첨가시 김치에 대한 종합 선호도

제품	종합선호					
	순위합 ¹⁾	1순위	2순위	3순위	4순위	5순위
BGC-F 2.0 1%	95 ^{b 2)}	7	9	5	10	3
BGC-F 2.0 2%	75 ^a	11	9	10	4	0
BGC-F 2.0 3%	160 ^c	0	1	2	3	28
BGC-FP 2.0 3%	89 ^b	8	6	12	7	1
무첨가	91 ^b	8	9	5	10	2

1) 종합선호도 순위 합 : 순위 합이 낮을수록 선호도가 높은 것을 의미함

2) 동일한 알파벳은 유의차가 없다는 것을 의미 (95% 신뢰수준)

(나). 세부 기호

- <표 12>는 각각의 항목에 대한 9점 척도한 결과이며, 무첨가를 기준으로 BGC-F 2.0 2% 첨가한 김치의 전체적인 맛과 뒷맛에서 동등 또는 보다 높은 만족도를 확인하였다. BGC-F 2.0 3%의 경우 맛과 뒷맛에 있어 뚜렷하게 낮은 평가를 받았으나, 파우더 타입의 BGC-FP 2.0 3%는 무첨가와 유사하다는 평가를 확인하였다. 이는 복합 조성물을 파우더하는 공정에서 맛에 영향을 주는 요인이 감소되는 것으로 유추된다.

표 12. 농도별 BGC-F 2.0 첨가시 김치에 대한 세부 기호

제품	세부 기호			
	외관	맛	식감	뒷맛
BGC-F 2.0 1%	6.82	5.53	6.79	5.38
BGC-F 2.0 2%	6.47	6.26	6.91	5.88
BGC-F 2.0 3%	6.00	3.15	5.79	2.74
BGC-FP 2.0 3%	7.21	5.97	6.65	6.00
무첨가	6.24	6.03	7.00	5.88

세부 기호 : 9점 척도 (1 ; 대단히 싫다. ~ 9 ; 대단히 좋다.)

아. 제품 안정성 평가

(1). BGC-F 2.0 기능(활성) 안정성 평가

(가). Paper disc method

- 본 실험은 BGC-F 2.0의 기능(활성) 안정성을 평가하기 위하여, 가혹(가속) 조건에서 정 처보관 후 항균 활성을 평가하였다. 6개월 이상 가혹 조건을 주었으며, 그 결과 일광 조건의 BGC-F 2.0은 *E. coli*와 *S. aureus*에 대해 각각 7.2mm와 10.2mm로 무첨가와 유의미한 차이는 없는 것으로 확인되었으며, 온도(-20℃~45℃)/습도(20 ~ 95%)는 6.7mm와 10.5mm로 마찬가지로 뚜렷한 차이는 없는 것으로 확인되었다.

표 13. 가혹(가속) 조건 보관시 BGC-F 2.0의 항균 활성 변화 - Clear zone

미생물 구분	가혹 조건		
	Clear zone (mm)		
	무처리	일광	온도/습도
<i>Esherichia coli</i>	7.0	7.2	6.7
<i>Staphylococcus aureus</i>	10.5	10.2	10.5

(나). MIC method

- 본 실험은 BGC-F 2.0의 기능(활성) 안정성에 대한 신뢰성을 높이고자 추가 진행하였으며, *E. coli*와 *S. aureus*에 대해 최소생육 저해농도를 확인하였다. 그 결과 무처리 및 가혹(가속)조건의 BGC-F 2.0 모두 0.01 %의 매우 우수한 생육 저해 농도를 보였으며, Clear zone과 비교하였을시 상대적으로 우수한 결과를 확인하였다. 이는 BGC-F 2.0이 Agar plater에서 상대적으로 확산되는 속도가 느려 Clear zone과 MIC 값이 차이 나는 것으로 사료된다.

표 14. 가혹(가속) 조건 보관시 BGC-F 2.0의 항균 활성 변화 - MIC value

미생물 구분	가혹 조건		
	MIC value (%)		
	무처리	일광	온도/습도
<i>Esherichia coli</i>	0.01	0.01	0.01
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.01	0.01	0.01

(2). BGC-F 2.0 제형 안정성 평가

- 제형 안정성 평가는 성장, 이물, 세균수, 진균수를 검사하여 확인하였다. 보관 조건은 냉장, 일광, 온도/습도로 진행하였으며, 냉장 보관 제품의 경우 모든 항목에서 초기와 변화가 없었다. 일광과 온도/습도 조건의 BGC-F 2.0은 세균수 10 cfu/g 이하로 검출되었지만, 실험 진행시 오차범위 내 불검출로 확인되었으며, 그 외 나머지 검사항목은 변화가 없었다. 일광 및 온도/습도의 평가 결과를 봤을 때 BGC-F 2.0은 가혹(가속) 조건에서 제형적 안정성을 유지하고 있는 것으로 사료된다.

표 15. 가혹(가속) 조건 보관시 BGC-F 2.0의 품질 변화

검사항목	가혹 조건		
	Clear zone (mm)		
	냉장	일광	온도/습도
정상	적합	적합	적합
이물	불검출	불검출	불검출
세균수 (cfu/g)	-	10	5
진균수 (cfu/g)	-	-	-

자. 제품 안전성 평가

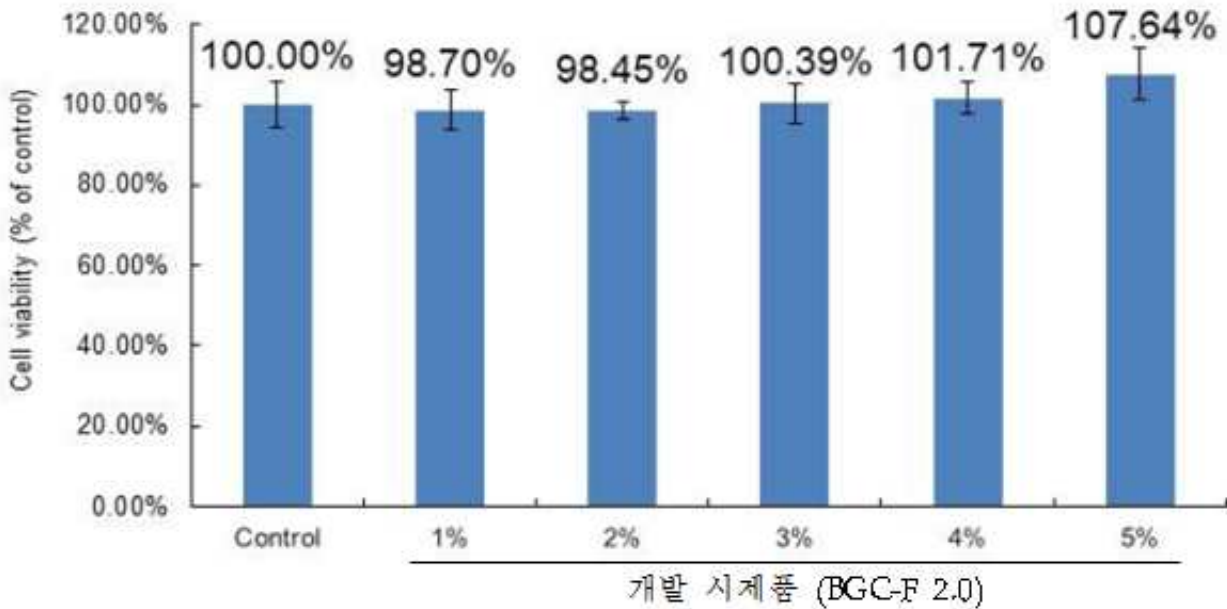


그림 3. BGC-F 2.0의 세포독성 평가 - MTT assay

- BGC-F 2.0의 안전성 평가를 확인하기 위하여 MTT assay를 통하여 세포독성을 확인하였으며, 세포주로는 Fibroblast (CCD-986SK)를 사용하였다. 개발 시제품의 농도는 1 ~ 5%로 다섯 개 구간으로 세포 생존율은 98.45 ~ 107.64%로 확인 되었다. 이는 의뢰기관 기준 세포 생존율이 70% 미만시 세포독성이 있는 것으로 판정함으로 개발 시제품은 세포독성이 없는 것으로 사료된다. 또한 ㈜비에스티에서 목표한 무침가 대비 95% 이상을 첨가한 모든 구간에서 달성하였으며, 김치에 적용하는 첨가 농도는 세포독성 농도 구간에 포함되어 안전성을 확인하였다.

차. 지적재산권 확보

표 16. 연구 개발 기간내 확보된 지적 재산권 목록

구분	종류	제목
1	특허 출원	저장성 향상을 위한 김치용 선도 유지 조성물 출원번호 ; 10-2019-0175542
2	특허 출원	고추냉이 발효 추출물을 함유하는 향균 및 항바이러스용 복합 천연 추출 조성물 및 이의 제조방법 출원번호 ; 10-2020-0135594 PCT/KR2020/016705
3	논문	마늘 추출물을 포함하는 복합 보존제의 제조방법 및 이를 처리한 김치의 미생물학적 특성 식품영양과학회 : K20-12-14

- 1차년도에 빠른 지적 재산권 확보하였으며, 2차년도 추가 실험에 따른 지적 재산권 출원을 진행하였다. 해당 기술 및 제품 등 개발 기술은 해외 진출을 목표로 하고 있기 때문에 PCT를 진행함으로써 지적 재산권에 대한 권리를 확보하였으며, 추후 미국, 일본 등 해외 특허 출원/등록을 계획하고 있다. 또한 lab sacle & 2nd Challenge TEST 결과를 정리하여 논문 투고를 진행하였으며, 심사 중인 상황이다.

카. 식품 품목 보고

발급번호 : MAMB-AB88-JTX-YGAS-RKME		발급번호 : MAMB-AB88-YMGM-YRTW-FEJE										
식품 · 식품첨가물 품목제조보고서				식품 · 식품첨가물 품목제조보고서								
보고인	성명	이호		성명	이호		성명	이호				
	주소	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 1418동 8층		주소	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 1418동 8층		주소	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 1418동 8층				
	전화번호	031-857-1434		전화번호	031-857-1434		전화번호	031-857-1434				
발급소	신청(보조) (주)비앤스타	2008030405		신청(보조) (주)비앤스타	2008030405		신청(보조) (주)비앤스타	2008030405				
	소재지	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 1418동 808호 상(주)비앤스타(비앤스타)		소재지	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 1418동 808호 상(주)비앤스타(비앤스타)		소재지	경기도 성남시 중원구 사기막골로45번길 1418동 808호 상(주)비앤스타(비앤스타)				
	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호	200803040580	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호	200803040588	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호	200803040588
제품정보	제품명	비앤스타농축분말 2.0 (BGC-F 2.0)		제품명	비앤스타농축분말 2.0 (형분명 : BGC-F 2.0)		제품명	비앤스타농축분말 2.0 (형분명 : BGC-F 2.0)				
	유통기한	제조일로부터 24개월까지		유통기한	제조일로부터 24개월까지		유통기한	제조일로부터 24개월까지				
	유통유지기간			유통유지기간			유통유지기간					
	방사성물질 또는 보존료 또는 색소첨가물	방출액 기재		방사성물질 또는 보존료 또는 색소첨가물	방출액 기재		방사성물질 또는 보존료 또는 색소첨가물	방출액 기재				
	향도	향출액 기재		향도	향출액 기재		향도	향출액 기재				
	보존방법 또는 포장재료	방출액 기재		보존방법 또는 포장재료	방출액 기재		보존방법 또는 포장재료	방출액 기재				
	포장방법 및 포장단위	방출액 기재		포장방법 및 포장단위	방출액 기재		포장방법 및 포장단위	방출액 기재				
	첨료	고형의 비핵소 첨가물 기재도 기재. 비핵소가 없는 연노랑-노란색 분말 상태		첨료	고형의 비핵소 첨가물 기재도 기재. 비핵소가 없는 연노랑-노란색 분말 상태		첨료	고형의 비핵소 첨가물 기재도 기재. 비핵소가 없는 연노랑-노란색 분말 상태				
	품목의 특성				품목의 특성				품목의 특성			
	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고형분, 저지방 식품 해당 여부]예 []아니오 [0]해당 없음 ■ 알, 유아용 섭취대상으로 표시]예 [0]아니오 ■ 알레르기 유발 식품 해당 여부]예 [0]아니오 ■ 알코올, 알코올 함유 식품 해당 여부]예 [0]아니오 				<ul style="list-style-type: none"> ■ 고형분, 저지방 식품 해당 여부]예 []아니오 [0]해당 없음 ■ 알, 유아용 섭취대상으로 표시]예 [0]아니오 ■ 알레르기 유발 식품 해당 여부]예 [0]아니오 ■ 알코올, 알코올 함유 식품 해당 여부]예 [0]아니오 				<ul style="list-style-type: none"> ■ 고형분, 저지방 식품 해당 여부]예 []아니오 [0]해당 없음 ■ 알, 유아용 섭취대상으로 표시]예 [0]아니오 ■ 알레르기 유발 식품 해당 여부]예 [0]아니오 ■ 알코올, 알코올 함유 식품 해당 여부]예 [0]아니오 			
<p>「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p>2020년 08월 29일 보고인 이호</p> <p>경기도 성남시장 귀한</p> <p>품목제조번호 : 200803040580</p> <p>최종부서 환경보건국 위생정책과 최리자장관 민세희 최리자장관 2020년 12월 07일</p>				<p>「식품위생법」 제37조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품 (식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</p> <p>2020년 12월 07일 보고인 이호</p> <p>경기도 성남시장 귀한</p> <p>품목제조번호 : 200803040588</p> <p>최종부서 환경보건국 위생정책과 최리자장관 민세희 최리자장관 2020년 12월 07일</p>								

그림 4. 개발 시제품(BGC-F 2.0)의 식품 품목제조보고서

- 본 개발 제품은 수요 업체의 요청에 따라 액상과 가루 형태로 품목보고 되었으며, 식품 유형은 ‘기타 가공품’이다. ‘기타 가공품’의 경우 다양한 식품에 적용할 수 있으며, 사용적 제한이 적은 식품 유형으로 수요 업체의 편의성을 고려하였다. 또한, 개발 제품의 유통기한을 ‘제조일로부터 24까지’ 확보함으로써 생산 계획의 변동성이 큰 소규모 업체에서 장기 보관하며 사용할 수 있도록 개발되었다.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

가. 목표

- 천연 향균 소재에 대한 데이터베이스 구축 및 발효 제어 기술 확보
- 김치 및 발효 식품에 최적화된 미생물 및 유산균 제어, 가스 발생 억제 향균 소재 개발
- 본 개발 제품을 통하여 김치 중주국으로써 경쟁력 확보 및 시장 성장기여
 - 김치 및 발효 식품의 유통/판매 과정에서의 가스 팽창 등으로 인한 폐기율 감소 및 손실 비용 절감.
 - 안전한 먹거리를 소비자에게 제공함으로써 신뢰도 및 구매의사 증가 유도.
 - 중소 제조업체의 해외 진출 장벽 완화 및 그로 인한 다양한 상품 개발 유도.
[다양한 상품 개발은 국내뿐 아니라 해외 소비자 취향 고려한 제품 개발 가능성.]
 - 국내 제조사 수출 물류비 및 국가 지원 자금 절감 유도.
[절감된 국가 지원금은 홍보 및 행사 전략 비용 증설 가능.]
 - 유산균 제거가 아닌 제어를 통한 김치 및 기타 발효식품의 건강식품 이미지 강화.
- 발효 식품 컨트롤에 대한 지적 재산권 확보를 통한 관련 분야 경쟁력 확보.

나. 목표 달성여부

◎ 대표 물성치

1. Clear zone 7mm 이상, MIC value 2.0% 이하 - 「달성」
2. 가스 발생률 40% 감소 - 「달성」
3. 발효 균주 생존률 90% 이상 (최종 발효 단계) - 「달성」

주요 성능지표	단위	최종 개발목표	달성여부
천연 항균 후보 물질 추가 선별	종	상위 후보균 3종 이상 선별	달성
배합 비율에 따른 제어 여부 확인	개	복합 조성 그룹 4개 이상	달성
1 st Challenge 평가	-	Clear zone - 7mm 이상 MIC - 2.0 % 이하	달성
lab scale 평가	-	최종 시제품 선별 및 농도 설정	달성 (BGC-F 2.0 1-3%)
기타 생리활성 평가	%	DPPH / ABTS - RC ₅₀ 0.5%	달성
Filed(제조사) 평가	-	pH, 산도, 미생물 가스발생률, 관능평가	평가 완료 (달성)
관능 평가	-	외관, 맛, 식감, 뒷맛, 선호도 - 무첨가 제품과 동등 이상	달성
제품 안정성 평가	-	광, 온도(습도) 가혹 조건 - 6개월 성상 - 변화 없음 미생물 - 불검출 항균 활성 - 초기와 동등	달성
제품 안전성 평가	%	무첨가 대비 95% 이상 생존	달성
지적 재산권 확보	건	국내 특허 2건 논문 1건	달성
식품 품목 보고	건	제품화 2건	달성
마케팅 홍보	건	마케팅 홍보 3건	2건 (COVID-19)

다. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- >> 2020년 COVID-19로 인한 전시회 취소로 2건중 1건 달성
이에 (주)비에스티는 뉴스 레터, 수요 업체와 비대면 미팅으로 대체

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 기술적 기대성과

- (1). 천연 Library 구축 및 업데이트를 통한 천연 소재의 활용도 및 상품화 촉진
- (2). 이상 발효 관여 미생물 제어력을 갖는 항균제로 다양한 발효 식품에 적용 및 응용 가능
- (3). 발효 공정 제어를 통한 식품뿐 아니라 다양한 기능성 원료에 적용함으로써 부가적 기능 유도 가능.
- (4). 생물 전환에 최적화된 미생물 선별 및 데이터 구축을 통한 발효 식품 또는 기능성 식품 분야의 연구 활성화 유도

나. 사업적 성과

- (1). 김치의 이상 발효로 인한 가스 발생 및 과숙성 억제를 통한 저온 저장 및 특수 포장재 등 부가적 비용 절감
- (2). 본 개발 제품 적용시 소비자에게 도달할 때 풍부한 유산균 제공(섭취) 가능.
[기존 공법 (열처리, 감마선 등)은 유용한 유산균을 제거하여 제품 유통의 안정성을 확보]
- (3). 기존 저장/운반 등 물류 지원비가 큰 비중을 차지하였으나, 대폭 절감 가능.
[국가 지원금 활용안을 물류 지원비에서 홍보비/자동화 설비로 변경 유도]
- (4). 농림축산식품부는 2022년도 19,020억원을 목표로 발표하였으나, 개발 제품으로 인한 기존 성장률 +a로 기존 목표를 초과한 20,900억원 달성 가능할 것으로 전망
[15,520억원(18') * {최근 5년간 평균 성장률(10%)
+ 파급 효과에 따른 시장 전망 (성장률 기여도 10%=1%)]

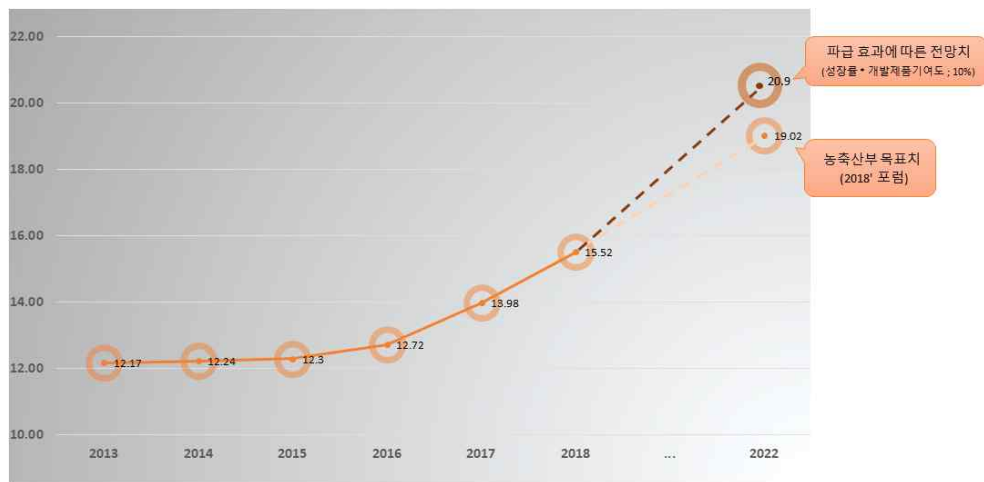


그림. 개발 제품으로 인한 (포장) 김치 시장 성장률

- (5). 김치 식품의 국내 시장 확대 및 해외 수출 기회 증대를 통한 제조업체 소득 증대
- (6). 김치 식품의 미생물적 안전성 확보 및 이미지 인식으로 구매 유도 및 소비 증가.
[13' 중국산 김치의 위생적 문제 / 18' 국내 유통 김치의 식중독 유발균 검출 등 미생물적 이슈는 소비자로 하여 구매 수요를 낮추며, 시장 성장의 걸림돌이 될 수 있음.]

붙임. 참고문헌

- 윤인숙. 마늘추출물의 식중독균에 대한 항균검사. 한국콘텐츠학회논문지. 2009. Vol. 9 No. 2
- 김보람, 물풀레나무 껍질의 항산화 및 항균활성. 아시안뷰티화장품학술지. 2015. Vol. 13 No. 3
- An DJ, Lew K, Lee KP. Effects of Adipic Acid and Storage Temperature on Extending the Shelf Life of Kimchi. Food Sci. Biotechnol. 1999. 8:78-82
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Tech. 1995. 28:25-30.
- Cho NC, Jhon DY. Effect of Garlic Extracts on the Aerobic Bacteria Isolated from Kimchi. Korean J. Food Sci. Tehcnol. 1988 20:357-262
- Han GJ, Jang MS. Changes in the Quality Characteristics of Storing Time of *Aralia continentalis* Kitagawa *Kimchi*. Korean J. Food Cookery SCI. 2006. 23:681-689
- Han GJ, Choi HS, Lee SM, Lee EJ, Park SE, Park KY. Addition of Starters in Pasteurized Brined Baechu Cabbage Increased Kimchi Quality and Health Functionality. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011. 40:110-115
- Kang HW. Characteristics of Kimchi Added with Anchovy Sauce from Heat and Non-heat Treatments. The Korean Journal of Culinary Research. 2013. 19:49-58
- Kim HO, Suh SR, Kim YT, Choi YS, Yoo SN, Lee JD. Standardization of salting process of Chinese cabbages for production of kimchi. KSAM. 2007. 12:87-92
- Kim SD, Kim MH, Kim DH. Effect of Dandelion (*Traxancum platycarpum* D.) Extracts on the Growth of Lactic Acid Bacteria and Gas Formation from Kimchi. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 2000 7:321-325
- Kim SD. Effect of pH Adjuster on the Fermentation of Kimchi. J. Korean Soc. Food Nutr. 1985. 14:259-264
- Kim YJ. Isolation and Culture Characterization of Garlic Resistant Lactic Acid Bacteria for Feed Additives. Master's thesis. Kyungwon University. Seongnam. Korea. 2009.
- Kwon MJ, Chun JH, Song YS, Song YO. Daily kimchi consumption and its hypolipidemic effect in middle-aged men., J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 1999. 28:1144-1150
- Lee CW, Ko CY, Ha DM. Microfloral of the Lactic acid Bacteria during Kimchi Fermentation and Identification of the Isolates. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1992. 20:102-109
- Lee KM, Jeong GT, Park DH. Study of Antimicrobial and DPPH Radical Scavenger Aactivity of Wood Vinegar. Korean J. Biotechnol. Bioeng. 2004. 19:381-384
- Lee SH, Choi WJ. Effect of Medicinal Herbs' Extracts on the Growth of Lactic acid bacteria isolated from Kimchi and Fermentation of Kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 1998. 30:624-629
- Ministry of Food and Drug Safety. 2020. Korea Food Code. [cited 2020 Dec 09] Available from:http://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_03.jsp?idx=34
- Moon SH. Effects of Experiences in Food Culture of Kimchi on the Intake of Kimchi. Master's thesis. Sookmyung University. Seoul. Korea. 2004.

- Park KY. The Nutritional Evaluation, and Antimutagenic and Anticancer Effects of Kimchi. J. Korean Soc. Food Nutr. 1995. 24:169-182
- Park SB, Han BK, Oh YJ, Lee SJ, Cha SK, Park YS, Choi HJ. Bioconversion of Green Tea Extract Using Lactic Acid Bacteria
- Re. R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Biology & Medicine. 1999. 26:1231-1237
- Shin SM, Park JY, Kim EJ, Hahn YS. Investigation of some Harmful Bacteria in Commercial Kimchi. Korean J. Food Cookery SCI. 2005. 21:195-200
- Yoon SJ, Hwang SJ. A Survey on the Level of Recognizing Kimchi among Housewives in Seoul Area. Korean J. Food Cultrue. 2005. 20:405-415

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문) 김치 가식기간 연장을 위한, 효모발효 유산균에 선택적 항균활성을 가지는 Allicin을 포함하는 천연 김치 보존제 개발 (영문) Delvelopment of Natural preservatives using allicin with selective antimicrobial activity for extend edible period of kimchi				
주관연구기관	(주) 비에스티	주 관 연 구 책 임 자	(소속) (주)비에스티		
참 여 기 업			(성명) 이 호		
총연구개발비 (330,700 천원)	계	330,700	총 연 구 기 간	2019. 05.~ 2020. 12.(1년 8월)	
	정부출연 연구개발비	248,000	총 참 여 구 원 수	총 인 원	7
	기업부담금	82,700		내부인원	7
	연구기관부담금			외부인원	
<p>○ 연구개발 목표 및 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> - Allicin을 포함하는 복합 조성물 선별 : 항균 활성을 갖는 천연 추출물 및 유용성 미생물 배양액 선별 및 복합 조성을 통한 선택적 미생물 제어 활성을 갖는 그룹 선별. - 김치 (발효) 식품에 적합한 천연 보존제 개발 : 합성 보존제를 사용할 수 없는 식품군으로 과도한 가스발생 또는 유통기간 중 품질 저하로 인한 상품 가치 하락하는 문제점 발생. 이에 선택적 미생물 제어 및 기타 생리활성을 갖는 시제품 개발 및 최종 수요업체를 통한 효능 확인. 이를 통한 김치를 포함한 발효 식품 제조업체의 애로 사항 해결. <p>○ 연구내용 및 결과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 천연 소재의 복합 조성을 통한 선택적 미생물 제어 활성을 갖는 천연 보존제의 제조방법 확립 - 천연 보존제의 효능 검증 Clear zone - 7mm 이상 / MIC value - 2.0% 이하 초과 달성 - 기타 생리활성 검증을 통한 DPPH / ABTS radical 소거능 확인 및 RC₅₀ 0.16~0.2 % 달성 - 개발 시제품의 관능적 영향력 외부기관을 통하여 검증 (개발 시제품 2.0% 첨가시 관능 향상) - 개발 시제품에 대한 안정성 및 안전성 확보. - 지적 재산권 및 제품화 완료 <p>○ 연구성과 활용실적 및 계획</p> <ul style="list-style-type: none"> - (사업화) : 자체기술실시로 제품화 완료 2차년도 수요업체 1곳과 평가 완료 및 추가 수요 업체와 제품 평가 논의 중 [추가 수요 업체 제품 평가 완료 후 납품 관련 협의 예정] - (지적재산권) : 특허 2건 출원 및 PCT 1건 진행 / 논문 1건 심사 중 					

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	119033-02		
사업구분	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 개발기술사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재개발기술사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	김치 가식기간 연장을 위한 효모발효 유산균에 선택적 항균활성을 가지는 Allicin을 포함하는 천연 김치 보존제 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	(주)비에스티			연구책임자	이호
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	19.05.20 - 19.12.31	102,000	34,000	136,000
	2차연도	20.01.01 - 20.12.31	146,000	48,700	194,700
	3차연도				
	4차연도				
	5차연도				
	계		248,000	82,700	330,700
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구기관		-	

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020.01.21

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)비에스티	대표이사	이호

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약



I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

천연물에 의한 기능성원료는 관능과 효능이 문제인데, 관능에 크게 영향을 주지 않는 범위내에서 효능이 작동되어 개발 결과는 우수하다 판단됩니다

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

우리나라는 김치뿐 아니라 유사한 발효 업체류를 다양하게 섭취하고 있기에 응용분야는 넓을 것으로 생각되며 김치의 경우 국내수요뿐 아니라 해외에 프리미엄급으로 수출할 수 있는데 많은 도움이 되리라 판단합니다

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

상품화 하기에 완벽한 기술이 아니므로 올해 상반기 기술을 보완개발해서 하반기부터 시장에 적용할 예정입니다

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

보다 더 많은 결과를 목표로 했으나 생각만큼 결과가 나오지 않았고 시간도 조금 부족했습니다.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

발표된 논문은 심사 중에 있고 특허는 2건 목표이나 3건으로 초과달성 하였습니다.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
천연 항균 후보 물질 추가 선별	5	100	천연 항균 후보군 3종 이상 선별
배합 비율에 따른 제어 여부 확인	7.5	100	복합 처방 그룹 6개 선별
1 st Challenge 평가	10	100	Clear zone - 12.4 ~ 17.1mm MIC value - 0.02% 이하 외부 기관 추가 입증 완료
Lap scale 평가	15	100	BGC-F 2.0 1.0 ~ 3.0 % 권장 처방
기타 생리활성 평가	5	100	DPPH, ABTS RC ₅₀ - 0.16 ~ 0.20% * 외부기관 부재로 자체 실시
Filed(제조사) 평가	20	100	제조사 평가 완료
관능 평가	10	100	외부 기관 및 제조사 평가 완료 (BGC-F 2.0% 관능 향상)
제품 안정성 평가	7.5	100	가혹(가속) 조건속 시제품 안정성 확인 외부 기관 평가 완료
제품 안전성 평가	7.5	100	세포독성 없음 확인 외부기관 평가 완료
지적 재산권 확보	5	100	국내 특허 2건 / 해외 PCT 1건 완료
식품 품목 보고	2.5	100	품목보고 2건 완료
마케팅 홍보	5	66	COVID-19로 2020년 미달성 뉴스레터, 비대면 미팅으로 대체
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

개발 결과는 상반기에 다소 보완되어 하반기부터 시장에 적용할 수 있을 정도의 결과를 가져 코비드 상황의 호전과 함께 상품화가 가능할 것으로 판단됩니다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

개발된 원료를 상용화 할 수 있는 회사와 전략적 파트너쉽을 가지고 개발되어 효능, 관능, 가성비등을 고려한 상품화 가능성이 중요할 것으로 판단됩니다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

함께 개발한 김치 제조회사에서 사용화를 한 다음 다른 김치 제조업체와 업체류 제조업체 등에 활용할 것으로 판단됩니다.

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

하반기 상품화되기 전까지 보안이 필요합니다

2. 연구기관 자체의 검토결과

하반기 상품화되기 전까지 보안이 필요합니다

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input checked="" type="checkbox"/> 자유응모과제 <input type="checkbox"/> 지정공모과제		분 야	
연구과제명	김치 가식기간 연장을 위한 효모발효 유산균에 선택적 항균활성을 가지는 Allicin을 포함하는 천연 김치 보존제 개발			
주관연구기관	(주) 비에스티		주관연구책임자	이 호
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	248,000	82,700		330,700
연구개발기간	2019.05.20. ~ 2020.12.31			
주요활용유형	<input type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체 제품화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 천연 항균 후보 물질 추가 선별	천연 항균 후보균 3종 이상 선별
② 배합 비율에 따른 제어 여부 확인	복합 처방 그룹 6개 선별
③ 1 st Challenge 평가	Clear zone - 12.4 ~ 17.1mm MIC value - 0.75% 이하 외부 기관 추가 입증 완료
④ Lap scale 평가	BGC-F 2.0 1.0 ~ 3.0 % 권장 처방
⑤ 기타 생리활성 평가	DPPH, ABTS RC ₅₀ - 0.16 ~ 0.20% ● 외부기관 부재로 자체 실시
⑥ Filed(제조사) 평가	제조사 평가 완료
⑦ 관능 평가	외부 기관 및 제조사 평가 완료 (BGC-F 2.0% 관능 향상)
⑨ 제품 안정성 평가	가혹(가속) 조건속 시제품 안정성 확인 외부 기관 평가 완료
⑩ 제품 안전성 평가	세포독성 없음 확인 외부기관 평가 완료
⑪ 지적 재산권 확보	국내 특허 2건 / 해외 PCT 1건 완료
⑫ 식품 품목 보고	품목보고 2건 완료
⑬ 마케팅 홍보	COVID-19로 2020년 미달성 뉴스레터, 비대면 미티어로 대체

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I							
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10			15		35			25								15			
최종목표	2			2		2			2			1					3			
연기기간내 달성실적	2			1		2			2			1 심사 중					2			
달성율(%)	100			50		100			100			100					66			

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	천연 항균 후보 물질 선별 (배양, 전처리, 추출 조건 등 포함)
②	Allicin을 포함하는 천연 소재의 복합 조성물 제조 방법
③	김치 (발효) 식품에 적합한 천연 보존제

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개발	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장에로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술					v					v
②의 기술				v	v	v				
③의 기술		v				v	v	v		

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	해당 원물에 대한 추가적 활용을 위한 기능성 탐구 및 사업화 추진
②의 기술	복합 조성물에 대한 기능성 원료 개발 활용 검토.
③의 기술	김치 제조 업체에 홍보 및 비대면 미팅을 통한 사업화 진행 그 외 발효 식품 제조 업체 등 다양한 식품 분야에 홍보 및 매출 발생 상기 계획을 수행함으로써 매출 발생 및 식품 업계의 애로사항 해결

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책 활용-홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		논문평균IF	학술발표			정책활용	홍보진시	
												SCI	비SCI							
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명					
가중치	10			15		35			25								15			
최종목표	2	2		2		2			2			1					3			
연구기간내 달성실적	2			1		2			2			1					2			
연구종료후 성과창출 계획		2					229										1			

8. 연구결과물의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

핵심기술명 ¹⁾	저장성 향상을 위한 김치용 선도 유지 조성물		
이전형태	<input checked="" type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	3,472천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input checked="" type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간	-	실용화예상시기 ³⁾	2021.01.01. ~ 2040.12.31
기술이전시 선행조건 ⁴⁾	자체 실시		

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재개발기술 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재개발기술사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.