

비가열식품의 품질 고도화를 위한 Pediocin의
고발현 · 정제기술 및 적용기술 개발

Development of high expression, purification and
application technology of pediocin to improve
quality of non-heated foods

연구기관

한국식품연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “비가열식품의 품질 고도화를 위한 pediocin의 고발현·정제기술 및 적용기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 14일

주관연구기관명 : 한국식품연구원
총괄연구책임자 : 정승원(한국식품연구원)
세부연구책임자 : 정승원(한국식품연구원)
세부연구책임자 : 안병학(한국식품연구원)
연 구 원 : 정진웅(한국식품연구원)
연 구 원 : 김영호(한국식품연구원)
연 구 원 : 박기재(한국식품연구원)
연 구 원 : 김선희(한국식품연구원)
연 구 원 : 김종찬(한국식품연구원)
연 구 원 : 김성철(한국식품연구원)
연 구 원 : 공인수(부경대학교)
연 구 원 : 김선희(부경대학교)
연 구 원 : 윤광섭(대구가톨릭대학교)
연 구 원 : 황성희(대구가톨릭대학교)
연 구 원 : 박혜식(대구가톨릭대학교)
연 구 원 : 이장성(대구가톨릭대학교)

요 약 문

I. 제 목

비가열식품의 품질 고도화를 위한 pediocin의 고발현·정제기술 및 적용기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 경제발전과 더불어 곡류의 소비는 점차 감소되는 반면 육류와 청과물의 소비량은 급증되고 있고 특히 최소가공 및 비가열 식품의 소비가 확대되고 있다. 이러한 소비의 패턴은 건강문제에 소비자의 관심이 집중되면서 더욱 확산될 것으로 예상되고 있다.
- 따라서 최소가공 및 비가열식품의 가공과 유통에 있어서는 영양학적 품질을 손실하지 않은 채로 편리한 형태의 제품을 공급하되 제품의 품질을 유지하는 것이 중요하며, 제품이 목적하는 소비자에게 도착하기까지 충분한 유통기간을 가질 수 있어야만 한다. 또한 영양학적, 관능적 특성뿐만 아니라 미생물학적 품질을 최대한 보장할 수 있는 가공방법의 개선이 필요하다. 또한 일반 소비자들도 점차 편리하고 바로 이용 가능(ready-to-use)하거나 바로 먹을 수 있는(ready-to-eat) 상태의 비가열 식품을 원하는데, 다만 이들 상품은 반드시 천연재료만 들어 있고 가공처리를 거치지 않은 듯한 신선한 상태의 고품질을 유지하여야만 상품으로서의 가치를 지닌다.
- 그러나 충분한 유통기한을 확보하기 위해서는 기존의 화학적 합성품과 가혹한 조건에서의 살균을 대체할 수 있는 천연보존료의 개발과 가혹한 살균법을 대체할 수 있는 가공방법의 개발이 필수적으로 따라야만 한다. 이러한 관점에서 이미 선진국에서는 기존 화학적 합성품을 대체할 수 있으며 인체에 무해하고 체내에서 완전히 분해될 수 있는 박테리오신을 미생물학적 안전성과 저장성을 확보할 수 있는 가능성이 높은 범용성의 천연물로 인식하고 있으며 hurdle technology에 박테리오신을 활용한 기술이 연구되고 있어 향후 박테리오신의 활용도는 보다 확대될 전망이다.
- 비가열식품중 신선 과채류 편의식품은 구미 선진국, 특히 영국이나 프랑스에서는 1990년대 초부터 이미 그 시장이 폭발적으로 성장하였고, 미국 소매점에서 판매되

는 모든 제품의 30% 이상을 이들 신선 편의식품이 잠식할 것이라고 예측되고 있어 국내시장도 그 시장세가 급성장할 것으로 예측되고 있다. 또한 건강에 대한 소비자의 관심의 증가는 생식, 선식과 같은 새로운 형태의 비가열식품의 등장과 시장의 확대도 새로운 식품보전 기술 개발의 필요성을 촉진시키고 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발의 내용

- Pediocin 대량생산기술 개발
 - Pediocin 생산 transformant 개발
 - *P. acidilactici* 최적 배양조건 확립
- Pediocin의 고효율 대량정제기술 개발
- 김치 발효조절을 위한 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 생산기술 개발
- 비가열식품에의 pediocin 적용기술개발
 - Pediocin의 품질열화 및 병원성 미생물별 항균 및 감수성 확인
 - 최소가공 과채류, 저수분식품, 막걸리에 대한 적용기술개발
 - 김치의 발효조절을 위한 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 적용기술개발
- 산업화를 위한 비가열 제품별 적정 가공표준의 설정

2. 연구개발의 내용

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002년)	<input type="checkbox"/> Pediocin 생산 vector의 construction <input type="checkbox"/> <i>P. acidilactici</i> 최적배양조건 확립 <input type="checkbox"/> Pediocin의 고효율 대량정제를 위한 부분정제기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 고발현 vector의 construction <ul style="list-style-type: none"> - 최적 발현 host cell의 선정 - 최적 활성 strong promoter의 도입 ○ Transformant 생산 pediocin의 발현 형태 및 효율 확인 ○ Induction 인자의 탐색 ○ <i>P. acidilactici</i>의 최적 대량배양 조건 확립 ○ Pediocin 분리정제를 위한 배양균 최적 처리 조건의 결정 ○ 흡착-탈착에 의한 분리조건의 확립 ○ 부분정제 조건의 확립

(계속)

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차 년도 (2002년)	<input type="checkbox"/> 비가열 대상 제품별 최적처리를 위한 항균활성 및 처리조건의 결정 <input type="checkbox"/> 김치 발효조절을 위한 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 생산 균주 탐색 및 선정	<ul style="list-style-type: none"> ○ Pediocin의 품질열화 및 병원성 미생물에 대한 항균 및 감수성 확인 ○ 대상 제품별 이화학적 특성에 따른 항균활성 조사 ○ 김치로부터의 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 생산균주의 탐색 ○ 김치 발효 미생물에 대한 항균활성 조사 ○ 적정 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin의 선정
2차 년도 (2003년)	<input type="checkbox"/> Pediocin 생산 transformant의 개발 <input type="checkbox"/> Pediocin의 효율적인 생산을 위한 정제기술의 확립 <input type="checkbox"/> 비가열식품 적용 복합처리 hurdle 인자의 선정 및 복합처리 방법 개발 <input type="checkbox"/> 김치 발효 조절을 위한 고효율 발현 vector의 native 균주에서의 발현	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발현 pediocin의 적용 안정성 검정 ○ 최적 induction을 위한 inducer 농도 결정 ○ 배양방법 및 배양조건에 따른 생산조건의 최적화 ○ 부분정제 pediocin의 탈염조건 확립 ○ 정제 pediocin의 제제화 방법 검토 ○ Pediocin 단독처리에 의한 제품별 미생물학적 품질 특성 변화 검토 ○ 복합처리 hurdle 인자의 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 생물학적, 물리적, 화학적 인자 ○ 복합처리 방법의 개발 ○ 복합 처리 hurdle 인자별 pediocin 활성 상승효과 검토 ○ 고효율 발현 vector의 construction 및 native 균주에서의 발현 ○ 김치 발효과정중의 vector reconstruction 균주의 안정성 검토

(계속)

구 분	연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3차 년도 (2004년)	<input type="checkbox"/> 제품별 적정 처리기술의 개발 <input type="checkbox"/> 처리조건별 저장중 비가열식품의 품질특성 변화 검토 <input type="checkbox"/> 김치 발효조절을 위한 pediocin-like bacteriocin의 적용 <input type="checkbox"/> 산업화 방안 연구	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활성 최적화를 위한 적정 처리방법의 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 침지(단일 및 연속), 분무, 직접배합 및 피막법 등 ○ 처리군별 품질특성 변화 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 처리군 : pediocin 단독 및 타 hurdle 인자와의 복합처리 - 품질특성 : 이화학적, 관능적, 미생물학적 품질특성 ○ 최적 발현 조건 검토 ○ Pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 생산균주 첨가에 의한 발효지연 효과 확인 ○ 경제성 분석 및 비가열 제품별 최적 처리 표준 설정

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

- 본 연구는 경제성장과 더불어 신선식품 등 비가열식품의 소비가 증가함에 따라 기존의 가혹한 조건에서의 살균이 어려운 식품군에 대한 천연항균제의 개발 필요성이 대두됨에 따라 Nisin으로 대표되는 미생물 유래의 천연 peptide인 *Pediococcus acidilactici* M이 생산하는 pediocin의 활용도 증진을 위해 대량생산을 위한 기반기술 및 적용기술을 개발하고자 하는데 일차적인 목적을 두었다.
- 대량생산 체계의 개발을 위해 고발현 vector의 개발은 pediocin의 gene의 PCR과 pGEX-4T-1과의 ligation을 통해 *E. coli* BL21(DE3)로의 transformation을 통해 GST-fused pediocin을 GST-bind resin으로 분리하여 활성을 가지는 GST 절단 pediocin을 분리하여 pediocin의 대량 생산을 위한 시스템을 개발하

였다.

- Pediocin의 최적 대량생산 조건 확립은 *Pedococcus acidilactici* M 원균주의 native pediocin의 생산조건 최적화를 위해 정치배양, 진탕배양 및 stirred cell에서의 배양 등 배양방법별, 그리고 초기 pH와 peptone, typtone, yeast extract 등의 질소원 및 MgSO₄와 MnSO₄의 영향을 검토하여 whey를 기반으로 하는 YTG 배지의 조성을 확립하였다.
- 상업적으로 활용가능한 대량정제법의 개발을 위해 흡착-탈착법을 이용한 pediocin의 대량정제법과 Amerlite XAD 6 resin을 활용하는 방법과 xylene을 이용한 추출법을 검토하여 pH 2 extract후 dialysis 이전단계에 적용하는 정제법을 확립함으로써 전체적인 정제도를 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다.
- 비가열식품별 최적 pediocin 활성 농도의 결정 및 최적처리방법의 확립을 위해 분리한 pediocin의 비가열식품에의 적용성 검토를 위한 protease 등의 각종효소, 30~90°C, 및 121°C의 열처리, pH 3~9에서의 항균활성을 검토하여 적용성을 확인하였다. 한편, 최소가공 과채류, 저수분식품, 막걸리에 대한 적용성 검토를 위하여 *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. 등의 품질열화 미생물과 *Salmonella* sp., *E. coli.*, *Listeria monocytogens*등의 병원성 미생물에 대해 pediocin의 감수성을 검토하였다.
- Pediocin 및 nisin, polypeptide 계통의 polylysine의 단독처리에 의한 과채류 hurdle로서의 적용 가능성을 검토해 보고자 샐러드용 재료로 사용량이 많은 당근, 양배추, 사과, 상치 및 오이의 표면 미생물에 대한 생육 저해 효과를 검토한 결과, total microflora에 대해서는 전반적으로 pediocin은 당근, 오이 등에서 일정한 억제효과를 보였다.
- 아오리 사과를 대상으로 직접 dipping solution 처리를 실시하여 18°C에서 저장 중 미생물학적 품질 변화를 관찰한 결과, pediocin 처리구는 저장 초기 처리구 간별로 1 log cycle 정도의 차를 나타내었으며 저장 3일에는 최대 3 log cycle의 차를 나타내었고 저장 6일까지 최소 2 log cycle 정도의 지속적인 차이를 나타내었다. 색도의 변화를 측정한 결과에서도 pediocin은 25~500ppm 처리구가 무처리구에 비해 높은 L값을 유지하였다. Polylysine 및 nisin도 4,000ppm 및 8,000ppm, 그리고 500ppm 이상에서만 무처리과와 뚜렷한 차이를 보였고 저장 6일까지 지속적인 생육억제 효과를 가지는 것으로 나타났으나 polylysine은 25ppm 이상 처리구 모두에서 무처리구에 비해 낮은 L값을 나타내어 polylysine

첨가가 선택을 저하시키는 요인으로 작용하는 것으로 나타났으며, 이러한 경향을 nisin에서도 유사하였다.

- 생식재료 및 떡류 등 저수분식품에 대한 적용성 검토를 위하여 pediocin과 nisin의 *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. 등의 품질열화 미생물과 *Salmonella* sp., *E. coli* 등의 병원성 미생물을 선정하였으며, 선정 미생물에 대해 pediocin 및 nisin의 감수성을 검토하였으며 온도 및 pH에 따른 활성 변화를 검토하였다. 또한 약식을 대상식품으로 하여 복합 hurdle 처리를 검토한 결과, pediocin과 nisin 및 hinokitiol을 복합처리한 경우 저장중 2 log cycle의 미생물 생육억제와 색도, 관능적 특성 모두에서 우수한 결과를 얻을 수 있었다.
- Pediocin과 복합처리가 가능한 hurdle factor를 검토한 결과 40°C PLMA, PLMA+AACC 및 40°C PLMA+AACC 처리구에서는 10일차까지 세균의 생육을 전혀 보이지 않아 갈변 억제 및 과육의 연화 방지 측면에서도 AACC가 첨가된 처리구에서 뛰어난 효과를 확인할 수 있었다. 더불어 pediocin과 nisin 및 hinokitiol을 복합처리한 경우 저장중 미생물 생육억제 및 색도, 관능적 특성에서 우수한 결과를 얻을 수 있었다.
- *P. acidilactici*로부터 유래한 pediocin의 *Leuconostoc mesenteroides*에서 유래한 *ped M* gene의 발현을 위해 shuttle vector인 pUB9을 construction하였으며, 형질전환된 *E. coli* DH5 α 에서의 pediocin gene의 발현 패턴을 조사, pediocin gene의 발현이 확인된 transformant *E. coli*로부터 pUBP13 vector를 다량 분리하여 electroporation을 통해 *L. mesenteroides*로의 transformation을 통해 발현됨을 확인하였다.
- 김치의 위생적 품질 향상을 위해 신규로 탐색한 3,315 LAB로부터 상대적으로 활성이 높은 11개 균주를 최종 선정하였다. 이들 균주를 gram staining, catalase test, mobility test, API 50 CHL 동정 및 morphology 확인을 실시한 결과, 1종의 *Pediococcus* sp., 6종의 *Lactococcus* sp. 및 4종의 *Leconostoc* sp.로 추정되었으며 현재 정확한 균주 동정을 위해 16S RNA 분석을 진행하고 있다. 이들 11종 균주의 배양액을 분리하여 항균력을 시험한 결과, *Lactobacillus* sp.를 제외한 *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *E. coli*, *Salmonella typimurium* 등의 위해성 미생물과 병원성 *Vibrio*에 대해서도 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 11종의 균주중 상대적으로 활성이 높은 *Lactococcus* sp. 2774, 2775 및 2777 균주를 *E. coli* KFRI 1242 등 3종의 *E. coli*,

Salmonella typhimurium KFRI 00251 등 5종의 *Samonella* sp.를 대상으로 생육 저해능을 경시적으로 확인하였으며 막김치를 제조하여 *P. acidilactici* M, 2774, 2775 및 2777번 균주를 약 10^6 CFU/g의 균수로 스타터 첨가하여 함께 가한 *E. coli* KFRI 1242의 소장패턴을 관찰한 결과 *Lactococcus* sp. 계통으로 추정되는 2775를 스타터로 첨가한 김치, 2777을 스타터로 첨가한 김치에서는 발효 3일 후부터 급격한 대장균 소장이 일어남을 확인하였다.

- Polyamide 수지 용액과 미생물 유래의 천연 항균 peptide를 혼합하여 OPP(Oriented polypropylene) 플라스틱 필름층에 코팅하여 polypeptide 코팅 필름을 제조하고, 항균물질의 지속적인 용출 정도와 지시균주에 대한 항균활성을 확인하였다.

2. 활용에 대한 건의

- 고품질 비가열 식품의 효율적인 천연항균제의 활용과 hurdle technology 개발의 일환으로 포장후 유통중의 총균수 증식, 갈변화 및 조직 약화 등의 품질 저하 요인을 최소화시키기 위한 최적의 처리방법을 모색하기 위하여 본 연구를 수행하였다.
- 본 연구과제를 통해 개발된 연구결과와 특허출원을 추진하고 있는 기술은 관련 산업체의 요구가 있을 경우 기술 이전을 통해 산업현장에서 활용할 수 있도록 할 계획이며 세미나, 학회발표 및 심포지움 등을 통해 천연항균제를 활용한 안전하고 위생적인 비가열 식품의 전처리 기술의 확립을 추진할 것이다.
- 특히 새로운 균주로 선발된 *Weisella* sp.를 활용한 김치의 산패에 대한 연구나 스타터 개발, hinokitiol을 hurdle factor로 활용한 약식 등 저수분식품에 대한 선도유지 활용기술은 관련 산업계에 실용화가 가능한 기술로 활용도 측면에서 산업체의 요구에 따라 실용화가 가능한 것으로 판단된다.
- 또한 본 연구의 결과는 국내산 주요 과채류의 신선 편의식품 생산시 공정관리 지침과 공정의 표준화 및 매뉴얼화로 소포장 센터의 자동화 공정을 유도하기 위한 기초자료로 활용 가능하다.

3. 주요 연구실적 및 성과

- 특허출원 : 1건

- 정승원 : 새로운 *Weisella* sp. 193이 생산하는 항균성 bacteriocin(추진중)
- 논문개제 : 6건
 - 김성철, 김종찬, 박기재, 최종욱, 정승원 : polylysine 코팅 필름의 항균활성, 한국저장유통학회지, 12(4), 2005 등 2건(계제)
 - Fresh-cut 사과와 품질 보존성 향상을 위한 dipping solution의 개발, 한국식품과학회 등 2건(투고중)
 - *Leconostoc* sp.에서의 pediocin gene의 발현 등 2건(준비중)
- 국내외 학회발표 : 2건
 - 정승원 등 : 천연항균제를 활용한 fresh-cut 사과와 hurdle technology, 한국식품영양과학회 제55차 학술대회, 2004 등
- 학위논문 : 2건
 - 김종찬 : Fresh-cut 사과와 선도 유지를 위한 천연항균제 및 hurdle technology의 적용, 경북대학교 석사학위논문, 2004 등

SUMMARY

This study was aimed to develop fundamental and application technology of pediocin, natural peptide produced by microorganism *Pediococcus acidilactici* M for improvement of non-heated foods.

To develop mass production of pediocin transformations to host cell *E. coli* BL21(DE3) was carried out by PCR and ligation of pGEX-4T-1 pediocin gene. After separation of GST-fused pediocin by GST-bind resin, active GST cut-off pediocin was separated.

For optimizing growth of native *Pediococcus acidilactici* M and pediocin production, culture conditions such as culture method including standing culture, shaking culture and stirred cell culture, influence initial pH, nitrogen sources including peptone, tryptone, yeast extract et al., and influence of MgSO₄ and MnSO₄ were investigated. Finally, the composition of whey based YTG medium (2% acidified whey, 3% yeast extract, 3% tryptone and 1% glucose medium) was determined.

Mass purification method of pediocin applicable commercial production was established based on pH 2 extraction method after studying adsorption-desorption method, Amerlite XAD 6 resin chromatography, and xylene extraction. Through this pH 2 extraction method, purity of extracted pediocin was became higher to proper level.

Optimum active pediocin concentration and pre-treatment conditions to apply non-heated foods was determined by investigation of enzyme treatment such as protease, amylase et al., heating at 30~90°C and 121°C, pH condition at pH 3~9. Also bactericidal activities to deterioration microorganism such as *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. et al., some pathogene such as *Salmonella* sp., *E. coli*, *Listeria monocytogens* was tested.

For purpose of improving the preservation of fresh-cut fruits by securing the safety from microbial decaying, natural additive was experimented with fresh-cut fruits in order to assess the usability and the applicability as hurdle factor in

altering or minimizing the use of chemical compounds, and basic information needed for developing control and combination technology of hurdle intensity was produced.

Through preliminary experiment, pre-treatment method including hurdle and treatment conditions for long shelf-life preservation was determined. With a standard that hurdle effect associated with microbial inhibition is top firstly considered, PLMA(polylysine 0.6% : malic acid 1.0%) dips solution for use in immersion was selected as the primary hurdle. The secondary hurdle included mild heating for 1 minute at 40°C as part of physical treatment which was accomplished by direct immersion in 40°C dips solution as parallel treatment not sequential one, and ascorbic acid 1.0% and the calcium chloride 0.75% aimed at texture strengthening, in consideration of the browning of fresh-cut fruits which is thought to be the most impacting to the seeming quality. Cold storage(4°C), which is essential for long shelf-life preservation, was also applied as a hurdle factor, which demonstrated the possibility of long term distribution more than 15 days initially intended in the beginning of the study, and the effect of inhibiting microbial growth and the quality degradation in the fresh-cut apples under storage.

Experiment results showed that, in the aspect of microbial growth inhibition, all treatments had antimicrobial activity superior to the control, especially 40°C PLMA, PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0% + calcium chloride 0.75%) and 40°C PLMA+AACC treatments didn't show any bacterial growth even in the 10th day samples. Also, AACC added treatment demonstrated excellent effects in inhibiting the browning and the softening of fruits. Acidity and vitamin C content decreased with the storage time, while total free sugar increased first and decreased with storage time in all treatments. In the sensory test, the treatments were assessed similar or a little higher than the control, demonstrating that hurdle application didn't give negative effect in sensory aspect. Also, pediocin, nisin and hinokitiol mixture was showed good growth inhibition of 2 log cycle, colors and organoleptic properties during the storage.

Shuttle vector pUB9 to expression *ped M* gene in *Leuconostoc mesenteroides*

was constructed, and expression pattern of pediocin gene in *E. coli* DH5 α was investigated, transformant of *L. mesenteroides* was confirmed by electroporation of pUBP13 vector.

Also, treatment of hurdles for yaksik was studied, pediocin, nisin and hinokitiol mixture was showed good growth inhibition of 2 log cycle, colors and organoleptic properties during the storage.

To improve hygienic quality of Kimchi, 11 kinds of strain was selected from newly isolated 3,315 LAB. Through gram staining, catalase test, mobility test, API 50 CHL test and morphology test, it was presumed that 11 strains was 1 strain of *Pediococcus* sp., 6 strain of *Lactococcus* sp. and 4 strain of *Leconostoc* sp. These strain showed high bactericidal activity against *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* and pathogenic *Vibrio* spp. *Lactococcus* sp. 2774, 2775 and 2777 strains showed relative high bactericidal activity against 3 strains of *E. coli* including *E. coli* KFRI 1242, 5 strains of *Salmonella* sp. including *Salmonella typhimurium* KFRI 00251. Decreasing pattern of *E. coli* KFRI 1242 was investigated by addition as starter in Kimchi. After 3 days of fermentation, decrease of *E. coli* of Kimchi added strain 2775 as starter was showed.

A study on antimicrobial packaging materials is actively being progressed these days. Among the diversely antimicrobial packaging materials, its antimicrobial effect comes to be greatly different depending on a kind of antimicrobial agents, a method of adding the antimicrobial agent and of modeling a film, and a kind of films. The objectives of this study, it blended the polyamide resin solution, in which a polymer chain is swelled in case of absorbing moisture, with polylysine, which is the naturally anti-biotic peptide from the origin of a microorganism, coated it on the plastic-film layer of OPP (Oriented polypropylene), fabricated the polylysine coating film, confirmed the migration of polylysine and it's antimicrobial activity from the coated film, and then evaluated the stable activity by applying it to the packed tofu.

In terms of fabrication the polylysine coating film, it could be seen that there is difference in each of antimicrobial activity depending on polylysine concentration,

polyamide concentration and the thickness of a coated film. In other words, it was shown that the anti-microbial activity is high in the film, which was manufactured under the condition in which the concentration of polylysine is more than 1.0 %, the concentration of polyamide is 40 %, and the thickness of a film is more than 50 μm . As for the polylysine migration of the manufactured polylysine coating film, it could confirm the migration of about 20 ppm up to for 3 days after soaking in the distilled water, and since then, it was maintained with a equilibrium state. As a result of trying to confirm the characteristics of migration depending on temperature, the migration was most at 25 $^{\circ}\text{C}$, and was smoothly attained even at the comparatively low temperature. As for the degree of migration depending on pH, the migration was easiest at pH 7.0 and the migration characteristics of polylysine depending on the concentration of salt failed to obtain the significant result.

As for the antimicrobial activity of polylysine coating film, as a result of measuring the anti-microbial activity as to some food-borne pathogens and Tofu spoilage bacteria, it could confirm the antimicrobial activity in most of strains, and in particular, it was shown to be highest in the inhibition effect (10^2 - 10^5 CFU/mL) of microbial counts as to *Bacillus cereus*. As for the antimicrobial activity in relation to a change in temperature, pH, and the salt concentration. In case of temperature, the antimicrobial activity was high at the comparatively low temperature, and in case of the antimicrobial activity depending on pH, the antimicrobial activity was shown to be highest in spite of low released quantity in the early of pH 3.0. Also, the antimicrobial activity depending on the concentration of salt, the antimicrobial activity was shown to be comparatively high in less than 2 % of salt.

As a result of examining the stable activity of a microorganism by applying the fabricated film to the packed Tofu, the PCF(polylysine coating film) packaged sample was shown to be smaller than the control sample, after measuring the total microbial counts and the coliform counts. In case of PCF sample, the growth of microorganism was delayed very effectively in initial storage time, thus it was shown that the polylysine, which was released from the film, safely has the

antimicrobial activity against the microorganism, which exists in Tofu. In case of color, it was shown to have no influence on the color of Tofu surface due to polylysine, which was released from polylysine coating film. As for the sensory properties of the packed Tofu, PCF area was shown to have received higher values than the control area in all items on the whole.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction on the project	23
Section 1 Need for research	23
1. Technological view	24
2. Economical and industrial view	25
3. Social and cultural view	26
Section 2 Scope of research	27
Chapter 2 Status of technical development	28
Section 1 Fundamental research on bacteriocin and pediocin	28
Section 2 Application research on bacteriocin and pediocin	29
Section 3 Application technology of hurdle technology	30
Chapter 3 Results and discussion	35
Section 1 Materials, preparation and pre-treatment of sample	35
1. Materials	35
A. Microorganism	35
B. Materials	36
C. Reagent and media	37
2. Separation and purification of pediocin	38
A. Extraction of pediocin	38
B. Separation by Amerlite XAD	39
C. Purification by semi-preparative HPLC	39
3. Pre-treatment of sample	39
A. Pre-treatment of minimally processed fruits and vegetables	39
B. Selection of optimum dips solution and pre-treatment for applying hurdle technology	41
C. Selection of optimum dips solution	42
D. Search of physical hurdles	43

E. Preparation of <i>Kimchi</i>	42
F. Preparation of <i>Takju</i>	43
G. Preparation of coating film	43
H. Preparation of packaged <i>Tofu</i>	44
I. Preparation of <i>yaksik</i>	44
J. Storage of pre-treated fruits and vegetables	44
Section 2 Measure and analytical method	47
1. Determination of bactericidal activity	47
2. Purity of pediocin	47
A. HPLC analysis	47
B. SDS-PAGE analysis	47
3. Physicochemical treatment of pediocin	48
4. Determination of protein	48
5. Screening of pediocin-like bacteriocin	48
A. Bacterial strains and media	48
B. Isolation of LAB(lactic acid bacteria)	48
C. Screening of bacteriocin-producing LAB	49
6. Cultural condition of <i>P. acidilactici</i> M	49
7. High-expression of pediocin	50
A. High-expression of pediocin in <i>E. coli</i>	50
B. Expression of pediocin in <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	52
8. Determination of microbial counts	54
A. Total counts	54
B. Coliforms and <i>E. coli</i>	55
C. Lactic acid bacteria	55
D. <i>Bacillus cereus</i>	55
9. Color	55
10. pH and acidity	56
11. Amino nitrogen	56
12. Elution of peptide from bactericidal coated film	57
13. Bactericidal activity of coated film	57

14. Testing of physical characteristics of coated film	57
A. Water solubility(WS)	57
B. Morphology	58
15. Elution of polylysine from bactericidal coated film	58
16. Texture	58
17. Vitamin C	59
18. Free sugars	59
19. Rate of weight loss	61
20. Titrable Acidity	61
21. Sensory evaluation	61
Section 3 Results and discussion	62
1. Development of mass production technology of pediocin	62
A. Development of pediocin-producing transformant	62
B. Establishment of condition for optimum pediocin production	71
2. Development of application technology for pediocin on non-heated foods	103
A. Bactericidal and sensitivity of pediocin against deterioration and pathogenic microorganism	103
B. Development of application technology for minimally processed fruits and vegetables	103
C. Development of application technology of pediocin and pediocin-like bacteriocin for <i>Kimchi</i>	172
D. Development of application technology for <i>Takju</i>	186
E. Development of application technology for low-moisture foods	190
F. Hurdle effects of combination treatment of natural antibacterial agents and organic acids	187
G. Development of bactericidal film using antibacterial peptide	211
3. Establishment of processing standards on each non-heated foods for industrialization	233
A. Processing standard for minimally processed fruits and vegetables	233
B. Processing standard for <i>yaksik</i>	233

Chapter 4 Practical use plans of results	238
Section 1 Results of research	238
Section 2 Recommendation for practical use	240
Chapter 5 Reference	242

목 차

요 약 문	2
SUMMARY	10
제 1 장 연구개발과제의 개요	23
제 1 절 연구개발의 필요성	23
1. 기술적 측면	24
2. 경제·산업적 측면	25
3. 사회·문화적 측면	26
제 2 절 연구개발의 범위	27
제 2 장 국내의 기술개발 현황	28
제 1 절 박테리오신 및 pediocin에 대한 기초 연구	28
제 2 절 Bacterocin 및 Pediocin의 적용에 관한 연구	29
제 3 절 Hurdle Technology의 적용기술	30
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	35
제 1 절 실험재료, 시료의 제조 및 전처리	35
1. 실험재료	35
가. 미생물 균주	35
나. 실험재료	36
다. 시약 및 배지	37
2. Pediocin의 분리·정제	38
가. Pediocin의 추출	38
나. Amerlite XAD에 의한 분리	39
다. Semi-preparative HPLC에 의한 정제	39
3. 시료의 전처리	39
가. 최소가공 과채류의 전처리	39

나. 최적 dips solution 선정 및 hurdle의 적용을 위한 시료의 전처리	41
다. 최적 dips solution 선정	41
라. 물리적 방법의 hurdle 탐색	42
마. 김치의 제조	43
바. 막걸리의 제조	43
사. 코팅 필름 제조	43
아. 포장두부의 제조	44
자. 약식의 제조	44
차. 전처리 과채류의 저장	44
제 2 절 측정 및 분석방법	47
1. 항균 활성의 측정	47
2. Pediocin의 정제도 확인	47
가. HPLC에 의한 확인	47
나. SDS-PAGE에 의한 확인	47
3. Pediocin의 물리화학적 처리	48
4. 단백질 정량	48
5. Pediocin-like bacteriocin의 분리	48
가. Bacterial strains and media	48
나. Isolation of LAB(lactic acid bacteria)	48
다. Bacteriocin-producing LAB의 screening	49
6. <i>P. acidilactici</i> M의 배양조건 시험	49
7. Pediocin의 대량 발현	50
가. <i>E. coli</i> 에서의 pediocin M 대량 생산	50
나. <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 에서의 pediocin의 발현	52
8. 미생물군수의 측정	54
가. 총균수	54
나. 대장균 및 대장균군	55
다. 젓산균	55
라. <i>Bacillus cereus</i>	55
9. 색도	55
10. pH 및 산도	56

11. 아미노산성 질소	56
12. 코팅 필름의 항균제 용출	57
13. 코팅 필름의 항균활성	57
14. 코팅 필름의 물리적 특성 시험	57
가. 수분용해도	57
나. 필름의 형상 관찰	58
15. 코팅 필름의 polylysine 용출 및 항균특성	58
16. 조직감	58
17. Vitamin C 함량	59
18. 유리당 함량	59
19. 중량감소율	61
20. 산도 측정	61
21. 관능평가	61
제 3 절 결과 및 고찰	62
1. Pediocin 대량 생산기술 개발	62
가. Pediocin 생산 transformant 개발	62
나. Pediocin의 최적 대량배양 확립	71
다. Pediocin의 고효율 대량정제기술의 개발	94
2. 비가열식품에의 pediocin 적용기술개발	103
가. Pediocin의 품질열화 및 병원성 미생물별 항균 및 감수성 확인	103
나. 최소가공 과채류에 대한 적용기술 개발	103
다. 김치 발효 조절을 위한 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 의 적용기술개발	172
라. 막걸리의 발효조절을 위한 적용기술 개발	186
마. 저수분식품에 대한 적용기술개발	190
바. 항균성 peptide를 활용한 포장재 개발	211
3. 산업화를 위한 비가열 제품별 적정 가공표준의 설정	233
가. 최소가공 과채류의 가공표준	233
나. 약식의 가공표준	235
제 4 장 연구개발결과의 활용계획	238

제 1 절 연구개발 결과	238
제 2 절 활용에 대한 건의	240
제 5 장 참고문헌	242

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

- 경제발전과 더불어 곡류의 소비는 점차 감소되는 반면 육류와 청과물의 소비량은 급증되고 있고 특히 최소가공 및 비가열 식품의 소비가 확대되고 있다. 이러한 소비의 패턴은 건강문제에 소비자의 관심이 집중되면서 더욱 확산될 것으로 예상되고 있다.
- 따라서 최소가공 및 비가열식품의 가공과 유통에 있어서는 영양학적 품질을 손실하지 않은 채로 편리한 형태의 제품을 공급하되 제품의 품질을 유지하는 것이 중요하며, 제품이 목적하는 소비자에게 도착하기까지 충분한 유통기간을 가질 수 있어야만 한다. 또한 영양학적, 관능적 특성뿐만 아니라 미생물학적 품질을 최대한 보장할 수 있는 가공방법의 개선이 필요하다. 또한 일반 소비자들도 점차 편리하고 바로 이용 가능(ready-to-use)하거나 바로 먹을 수 있는(ready-to-eat) 상태의 비가열 식품을 원하는데, 다만 이들 상품은 반드시 천연 재료만 들어 있고 가공처리를 거치지 않은 듯한 신선한 상태의 고품질을 유지하여야만 상품으로서의 가치를 지닌다.
- 그러나 충분한 유통기한을 확보하기 위해서는 기존의 화학적 합성품과 가혹한 조건에서의 살균을 대체할 수 있는 천연보존료의 개발과 가혹한 살균법을 대체할 수 있는 가공방법의 개발이 필수적으로 따라야만 한다. 이러한 관점에서 이미 선진국에서는 기존 화학적 합성품을 대체할 수 있으며 인체에 무해하고 체내에서 완전히 분해될 수 있는 박테리오신을 미생물학적 안전성과 저장성을 확보할 수 있는 가능성이 높은 범용성의 천연물로 인식하고 있으며 hurdle technology에 박테리오신을 활용한 기술이 연구되고 있어 향후 박테리오신의 활용도는 보다 확대될 전망이다.
- 비가열식품중 신선 과채류 편의식품은 구미 선진국, 특히 영국이나 프랑스에서는 1990년대 초부터 이미 그 시장이 폭발적으로 성장하였고, 미국에서는 2000년까지 미국 소매점에서 판매되는 모든 제품의 30% 이상을 이들 신선 편의식품이 잠식할 것이라고 예측되고 있어 아직 초기 단계에 머물러 있는 국내시장도 그 시장세가 급성장할 것으로 예측되고 있다. 또한 건강에 대한 소비자의 관심의 증가는 생식, 선식과 같은 새로운 형태의 비가열식품의 등장과 시장의 확대도 새로운 식품보전

기술 개발의 필요성을 촉진시키고 있다.

1. 기술적 측면

- 비가열식품은 제품의 특성상 신선도 및 영양학적, 기호적 품질특성을 최대한 보장할 수 있어야 하기 때문에 기존의 가혹한 조건에서의 살균기술의 적용에 많은 제약이 따른다. 따라서 비가열식품은 미생물학적 안전성과 저장성 유지에 한계를 가지고 있으며, 비가열식품에 대한 소비자 기호도의 증가에도 불구하고 제품의 개발, 생산의 고품질화에 큰 장애요인이 되고 있어 소비확대의 걸림돌이 되고 있다. 그러므로 비가열식품의 시장확대와 제품안정성의 확보를 위해서는 미생물학적 안전성과 저장성을 개선시킬 수 있는 새로운 기반 기술의 개발이 반드시 필요하다.
- 이와 더불어 건강지향성 소비심리의 확대와 비가열식품에 대한 선호도는 기존의 화학적 합성품을 대체할 수 있는 신규 대체물질의 개발을 요구하고 있으며 이러한 개발의 필요성에 따라 차세대의 천연 보존료로 주목되고 있는 것이 미생물 유래의 박테리오신(bacteriocin)이다.
- 박테리오신은 일반적으로 안전한 것으로(GRAS ; Generally recognized as Safe) 확인되고 있으며, 폭넓은 항균범위(antimicrobial spectrum)와 안전성(safety), 안정성(stability)을 가지고 있고 다양한 병원성 미생물과 식품의 부패와 관련된 미생물에 대해 효과적인 항균능력을 가지고 있음이 입증되고 있다. 박테리오신중 이미 상업적 생산이 이루어지고 있는 nisin은 미국에서 1988년 식품첨가물로 승인이 되었으며 1990년대 이후 47개국 이상에서 식품보존료로 승인되어 선진국에서는 nisin의 활용기술에 대해 많은 연구가 진행되고 있다. 한편 nisin 이후 가장 식품산업에 적용 가능성이 높은 박테리오신으로 pediocin이 주목되고 있으며 이의 추가 승인이 세계적으로 issue화되고 있는 실정이다.
- LAB(Lactic acid bacteria) 박테리오신에 대한 관심의 증가는 비가열 및 최소가공 식품에 대한 소비자의 요구에 기인한 것으로 식생활이 선진 서구화되고 있는 국내에서도 박테리오신의 활용 기술에 대해 적극적인 연구와 적용 기술의 개발이 필요하다.
- 더불어 상업용 nisin 제제가 kg당 40만원대 이상의 고가인 점을 고려할 때 향후 pediocin의 상업적 생산이 이루어지면 독점생산에 따른 막대한 양의 외화반출이 우려되므로 국내에서도 이에 대비하여 자체적인 생산기술과 활용기술을 개발, 향후

의 pediocin 상업화에 대비할 필요성이 시급히 요구된다.

- 한편 시장개방의 가속화와 식품산업의 세계적 네트워크(global network)에 따라 저가의 수입 농축산물에 대해 국내산 농축산물이 상대적 우위를 확보하기 위해서는 품질 고급화를 추구하는 것이 유일한 대안임을 감안할 때 새로운 비가열식품 가공기술 개발 필요성은 더욱 절실하다고 판단된다.

2. 경제·산업적 측면

- 건강지향성 및 편의성을 중시하는 식생활의 패턴 변화로 비가열식품에 대한 소비심리가 확대되고 있으며 시장에서의 비가열식품의 비중도 급격히 증가하고 있는 추세이다. 이러한 소비패턴의 변화는 현재의 비가열식품의 양적 팽창 이후 필연적으로 종류의 다양화와 질적 개선을 필요로 하게 될 것으로 예상된다.
- 그럼에도 불구하고 건강에 대한 소비자 관심의 급증은 화학적 합성품으로 대표되는 기존의 보존료에 대한 기피 현상을 가속화시키고 있어 비가열식품에 적합한 새로운 보존기술의 개발이 필요하다.
- 식품소비에 있어 나타나고 있는 특징적인 변화는 종전의 칼로리 및 영양성 위주에서 건강지향성과 편의성이 중시되고 있고, 식품소재별로는 신선과채류와 냉장포장육, 생식 등 비가열식품에 대한 소비지향이 급신장하고 있는 특징을 보이고 있다. 또한, 경제성장에 따른 산업화는 독신자 증가, 맞벌이 부부 증가, 단체급식의 증가, 외식산업의 증가와 함께 젊은세대의 증가로 패스트푸드 산업이 크게 신장함에 따라 비가열 최소가공 과채류 소비가 증가하고 있어 이러한 비가열식품의 안전성과 품질 보장기술의 개발을 통한 국민 건강증진의 향상이 필요하다.
- 한편, 건강기능성 식품시장의 확대와 국내산 전통식품에 대한 새로운 조명과 개발로 전통식품 시장이 활성화되고 있으나 전통식품의 특성상 비가열 식품의 비중이 높은 관계로 제품의 품질을 보장할 수 있는 적합한 기술의 개발이 절실히 요구되며 이는 국내 산지가공 및 전통식품 생산업체의 활성화에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다. 또한 우수 전통식품의 제품 안전성 및 안정성 확보로 세계시장에서 품질우위를 통한 시장확대와 수출확대에도 기여할 수 있을 것으로 판단된다.
- 또한, 식품산업의 세계적 네트워크에 따라 저가의 외국 농축산물의 수입 확대에 따라 국내산 농축산물의 시장 경쟁력 확보를 위해서는 보다 안전하며 고품질의 비

가열식품 생산기술을 확보할 필요성이 있으며, 위생적이며 안전한 천연보존료의 대체기술 개발은 국민의 건강증진에도 일익을 담당할 것으로 생각된다.

3. 사회·문화적 측면

- 식생활 형태가 편리화, 서구화되면서 신선 편의식품 등 비가열식품에 대한 소비의 증가가 두드러지고 있으며 외식 및 조리산업에서의 식재료로서의 최소가공식품에 대한 수요도 급증하고 있는 추세이다. 또한, 식품의 구매행동도 질과 서비스 및 가격과 가치의 균형을 중시하는 경향이 있으며, 소비자 건강에 관심이 집중되면서 화학적 합성품 보존료 사용을 기피하는 소비 패턴을 보이고 있다.
- 한편 생식, 절임류, 발효식품 등 많은 전통식품이 비가열제품 형태로 생산, 유통되고 있으나 전통식품에 대한 일반 소비자의 인식이 화학적 보존료와 첨가물 사용에 대해 부정적 이미지를 가지고 있어 전통식품의 활성화를 위해서는 화학적 합성품 사용을 최소화할 수 있는 가공기술의 개발이 이루어져야만 한다.
- 또한, 상치, 썩갯 및 딸기 등 대부분의 청과물은 세정후 그대로 식용하는 기회가 증가하며, 또한 건강문제가 대두되면서 샐러리, 신선초 등을 착즙하여 음용하는 가정이 증가함에 따라 최소가공된 채소의 유통이 콜드체인 형태로 일반화되고 있으나 과채류 표면에 오염되어 있는 대부분의 위해요소들은 세척만으로서 적절히 해결할 수 없기 때문에 식용시 국민건강 측면에서 문제를 야기시킬 수 있어 생산후 유통과정에서 제품의 미생물학적 안전성을 확보할 수 있는 가시적인 가공기술의 개발이 절실히 요구되고 있다.
- 신선 과채류 편의식품을 산업적 측면에서 살펴보면 최근 들어 식품산업에서 그 규모가 날로 확장되고 있는 단체급식(catering) 업계는 비용, 노동력, 위생적인 이유로 박피, 제심, 절단, 세척 등의 최소가공 공정을 거쳐 완성된 과채류를 구입하고자 하는 경향이 급증하고 있으며 일반 소비자들도 점차 편리하고 바로 이용 가능(ready-to-use)하거나 바로 먹을 수 있는(ready-to-eat) 상태의 과채류에 대한 선호가 증가함에 따라 기존 과채류의 유통 방법에서 탈피하여 상당량의 신선 농산물은 점차 최소가공 처리되어 유통될 것으로 예상되고 있다.

제 2 절 연구개발의 범위

1. Pediocin 대량생산기술 개발

가. Pediocin 생산 transformant 개발

- 고발현 transformant의 개발
- Host cell의 안정성 검증 및 host에 따른 최적 발현 조건 확립

나. *P. acidilactici* 최적 배양조건 확립

- *P. acidilactici*에서의 pediocin induction 인자의 탐색
- Pediocin 생산을 위한 *P. acidilactici*의 최적 배양 조건 확립

다. Pediocin의 고효율 대량정제기술 개발

라. 김치 발효조절을 위한 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 생산기술 개발

- 김치로부터의 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 생산 균주의 탐색
- 김치 발효 미생물에 대한 항균활성 조사
- 최적 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin의 선정
- Pediocin 및 pediocin-like bacteriocin의 고효율 발현 plasmid의 construction 및 native 균주에서의 발현

2. 비가열식품에의 pediocin 적용기술개발

가. Pediocin의 품질열화 및 병원성 미생물별 항균 및 감수성 확인

나. 최소가공 과채류, 저수분식품, 막걸리에 대한 적용기술개발

- 대상식품별 이화학적 특성에 따른 pediocin의 항균활성 조사
- Pediocin 단독처리에 의한 미생물학적·이화학적 품질 특성 변화 검토
- Pediocin 단독처리를 위한 대상식품별 최적 활성 농도의 결정
- 최적 항균활성을 위한 적정 복합처리 hurdle 인자의 선정
- Hurdle의 복합처리 방법 결정
- 제품별 적정 전처리 방법 설정
- 처리조건별 저장중 품질변화 검토

다. 김치의 발효조절을 위한 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 적용기술개발

- Pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 최적생산 조건 검토
- Pediocin 및 pediocin-like bacteriocin 생산균주 첨가에 의한 발효지연 효과 확인

라. 산업화를 위한 비가열 제품별 적정 가공표준의 설정

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 박테리오신 및 pediocin에 대한 기초 연구

- 선진국의 경우 박테리오신의 천연 식품보존료로서의 잠재력을 높이 평가하고 있으며 다양한 발효식품으로부터 다종다양의 박테리오신 생산균주를 분리하여 이들에 대한 유전자 수준의 조절 기작(gene regulation mechanism), 단백질의 구조 및 기능, 대상미생물에 대한 박테리오신의 작용기작 등에 대한 심층적인 연구를 진행하고 있다.
- 현재까지 밝혀진 박테리오신은 Klanhammer에 의해 크게 4가지 class로 분류하고 있으며 class I은 lanthionine과 dehydrated 아미노산을 함유하고 있는 nisin과 같은 lantibiotics와 membrane-active peptide(<5 kDa)이며, class II는 내열성의 비 lanthionine을 함유하며 membrane active peptides(<10 kDa)이고 Gly-Gly-1***+1Xaa이 bacteriocin의 전구체의 processing site로 작용하는 그룹으로 class IIa, class IIb, class IIc의 3가지로 다시 분류된다. Class III는 내열 protein으로 helveticin J, lactacin A와 B 등이 여기에 속하며 30 kDa 이상이다. Class IV는 복합 박테리오신(complex bacteriocin)으로 단백질과 한 개 또는 두 개의 chemical moieties인 lipid와 carbohydrate를 가지고 있으며 plantaticin, lactacin 27과 leucocin S가 여기에 속한다.
- 현재까지의 박테리오신에 관한 연구는 분리된 단백질의 1차 구조의 규명과 단백질 domain 등의 다양한 절편 연구 등을 통해 단백질의 binding mechanism, pore formation mechanism, biological activity 등 고유한 기능에 대한 연구가 주를 이루어 진행되어 왔다.
- pediocin(pediocin AcH/PA-1)은 bacteriocin class IIa에 속하는 44개의 아미노산으로 구성된 pepetide로 *Pediococcus*속이 주로 생산하며 유제품의 경우 *Streptococcus thermophilus*에 의해서도 생산되는 것으로 보고되어 있다. Pediocin의 작용 기작은 대상미생물의 세포막에 pore를 형성하는 것으로 알려져 있고 C-terminal쪽의 disulfide bond는 positive patch를 형성하여 활성화에 중요한 역할을 담당하나 N-terminal hydrophobic domain에 있는 disulfide bond는 항균활성에 영향을 주기 않는다고 알려져 있다. Miller 등은 detergent micelle을 이용하여

membrane binding structure를 예측하였다.

- Pediocin의 활성과 관련된 구조 및 기작에 관련된 연구와 대상 미생물의 감수성에 대한 연구외에 pediocin 유전자 또는 pediocin과 nisin 등의 유전자를 *E. coli* 및 *S. cerevisiae* 등에서 발현시켜 발효식품의 starter로서 활용하기 위한 응용연구와 유청 등을 배지로 활용한 배양방법 등에 관련된 연구결과가 있으나 활용도 증진을 위한 박테리오신의 대량생산과 관련된 연구 결과는 거의 없는 실정이다.
- 한편 국내의 박테리오신 관련 연구는 선진국과 비교하여 아직 초보적인 단계에 머물러 있으며 매우 제한적 범위에서의 연구가 진행되고 있을 뿐이다. 더불어 이들의 연구는 주로 생산균주를 발효식품으로부터 분리, 균주 특성과 유용성에 대한 연구가 대부분이며 박테리오신을 순수분리한 경우는 pediocin 등 일부로 매우 한정적이다. 유 등은 *Lactococcus* sp. BL-1을 전통식품으로 분리하여 박테리오신을 crude하게 분리하여 면류 및 주류 등에 활용 가능성이 있음을 시사하였고, 동일 연구에서 안 등은 lactococcin 및 plantaricin을 분리하고 식품별 길항성과 생산조건 등을 검토하였으며, 이 등은 lactococcin Y의 대량생산에 관련된 기초적인 연구를 수행한바 있다.
- 그러나 pediocin과 관련된 국내의 연구는 권 등이 전통발효미생물로부터의 식품보존용 박테리오신의 탐색 및 개량기술개발 연구를 통해 실험실 규모의 *P. acidilactici*의 배양조건과 pediocin을 순수분리하고 pediocin 합성 연구를 통해 pediocin의 산업적 유용성을 위한 기초적 연구를 수행한 바 있으나 pediocin의 대량생산을 위한 기초적인 연구에 머물러 대량생산을 위한 보다 광범위하고 체계적인 추가 연구가 필요한 실정이다.

제 2 절 Bacterocin 및 Pediocin의 적용에 관한 연구

- 식품에 적용한 박테리오신의 활용에 관한 특허와 활용에 관한 연구는 Table 1 및 Table 2와 같이 유 및 유제품과 육제품 및 주류 등을 대상으로 한 것이 주를 이루는 데 이는 연구의 대상되었던 대부분의 미생물이 유 및 육제품을 기원으로 하고 있으며, starter로서의 활용도에 관한 연구가 대다수이기 때문이다.
- 천연 보존료로서 사용된 박테리오신의 활용 사례의 연구 결과는 박테리오신의 단독처리보다는 다른 hurdle effect와의 조합이 보다 효과적임을 보여주고 있다.

Nisin의 경우에는 N_2 , CO_2 및 저온, sucrose fatty acid ester, pulsed electric field 를 병용한 연구가, Pediocin AcH의 경우에는 수압 및 고압, sodium diacetate를 병용한 연구가, Nisin A의 경우는 milk lactoperoxidase 및 저온, calcium alginate gel, 유화제를 병용한 연구가 이루어져 있다. 한편, 박테리오신은 적용 식품의 화학적 조성 및 물리적 상태에 따라 활성의 변화가 큰 경우가 많으며 nisin의 경우에는 pH 2에서의 활성이 pH 8에서의 활성에 비해 228배가 높다는 연구 결과가 있어 대상 식품의 화학적, 물리적 상태에 따른 개별적인 연구가 필요함을 제시하고 있다.

- 박테리오신을 생산하는 미생물을 직접적으로 활용한 연구는 치즈 등의 유제품에 주로 생산균주 자체를 발효 starter로 적용한 연구가 대부분이며, 직접 박테리오신을 첨가한 경우는 치즈를 대상으로 *Clostridium* 및 *Listeria*의 생육억제를 위한 것 등이 있다. 국내의 경우에도 김과 박 등이 김치에 nisin을 적용한 연구 결과가 보고되어 있으나, 이외에는 새로운 균주의 탐색과 생산균의 생화학적, 생리적 특성 조사에 국한되어 있는 경우가 대부분이며 산업적 규모의 실제 활용에는 거의 없는 실정이다. 따라서 박테리오신 특히, pediocin의 산업화를 위해서는 고발현 기술의 개발과 더불어 대량 분리·정제기술, 그리고 활용도 증진을 위한 적용기술의 적극적인 개발이 필요하다.

제 3 절 Hurdle Technology의 적용기술

- 최소가공기술은 저비용의 기술로 건강지향성과 편의성, 환경친화성 등의 다양한 장점을 지니고 있음에도 불구하고 비가공 과채류에 비해 상대적으로 짧은 제품수명, 과도한 합성 chemical의 사용 가능성 및 이로 인한 관능적 품질의 저하, 그리고 낮은 공정 효율성은 향후 해결해야 하는 중요한 과제이다. 특히 최소가공 과채류 제품은 박피, 절단, 세절 등의 과정에서 과채류 표면이 노출됨으로써 필연적으로 미생물학적 오염 및 증식 가능성이 증가하게 되나 통상적으로 재가열 없이 바로 섭취하기 때문에 미생물학적 안전성의 확보가 무엇보다도 중요하다.
- 최소가공 과채류(fresh-cut fruits and vegetables)는 살아있는 생체이기 때문에 최소가공 공정으로 인해 생리적 노화, 생화학적 변화, 미생물학적 변패가 비가공 과채류에 비해 상대적으로 가속화되므로 이를 최대한 지연하고자 하는 연구가 국내외적으로 활발히 진행되고 있다. 국외의 경우 fresh-cut 과채류의 품질유지에 관한

Table 1. An example of patent applied bacteriocins on foods.

Author	US Patent	Patent Title
Vandenberg et al	5,817,362 (10.06.98)	Method for inhibiting bacteria using a novel lactococcal bacteriocin
Blackburn et al	5,753,614 (05.19.98)	Nisin compositions for use as enhanced, broad range bacteriocides
Wilhoit	5,573,801 (11.12.96)	Surface treatment of foodstuffs with antimicrobial compositions
Vedamuthu	5,445,835 (08.29.95)	Method of producing a yogurt product containing bacteriocin PA-1
Boudreaux et al	5,219,603 (06.15.93)	Composition for extending the shelf life of processed meats
Hukins et al	5,186,962 (02.16.93)	Composition and method for inhibiting pathogens and spoilage organism in foods
Collison et al	5,015,487 (05.14.91)	Use of lanthionines for control of post-processing contaminating in processed meat
Vandenberg et al	4,929,445 (05.29.90)	Method for inhibiting L. monocytogens using a bacteriocin
Gonzalez	4,883,673 (11.28.89)	Method for inhibiting bacterial spoliage and resulting compositions
Matrozza et al	4,790,994 (12.13.88)	Method for inhibiting psychrotrophic bacteria in cream of milk based products using pediococcus

Table 2. An example of applications proposed bacteriocins as food preservatives.

Bacteriocin	Application	Conclusion
Nisin A	Incorporation of nisin into a meat binding system	Addition of nisin can reduce undesirable bacteria in restructured meat products
Enterocin 4	Use of an enterocin producer <i>Ent. faecalis</i> INIA4 as a starter culture for production of Manche cheese	Use of an <i>Ent. faecalis</i> INIA4 starter inhibits <i>L. monocytogenes</i> Ohio, but not <i>L. monocytogenes</i> Scott A
Linocin M-18	Use of <i>Bre. lines</i> as a starter culture for production of red smear cheese	Causes 2 log reduction of <i>L. ivanovi</i> and <i>L. monocytogenes</i>
Nisin A	Use of nisin to control <i>L. monocytogenes</i> in ricotta cheese	Nisin effectively inhibits <i>L. monocytogenes</i> for 8 weeks
Piscicolin 126	Use of piscicolin 126 to control <i>L. monocytogenes</i> in devilled ham paste	More effective than commercially available bacteriocins
Leucocin A	Use of a leucocine-producing <i>Leu. gelidum</i> UAL187 to control meat spoilage	Inoculation of a vacuum packed beef with the bacteriocin-producer delays the spoilage by <i>Lactob. sake</i> for up to 8 weeks
Lactocin 705	Use of lactocin 705 to reduce growth of <i>L. monocytogenes</i> in ground beef	Lactocin 705 inhibits growth of <i>L. monocytogenes</i> in ground beef
Enterocin	Add enterocin to inoculated ham, pork, chicken breast, pate, sausage	Controlled growth of <i>L. monocytogenes</i> under several conditions
Pediocin AcH	Use of the pediocin producer <i>P. acidilactici</i> to inhibit <i>L. monocytogenes</i>	<i>P. acidilactici</i> (Ped ⁺) starter culture contributes to effective reduction of <i>L. monocytogenes</i> during manufacture of chicken summer sausage
Pediocin	Expression of pediocin operon in <i>Sac. cerevisiae</i>	Potential application in preserving wine and baked products
Pediocin AcH	use of a pediocin AcH producer <i>Lactob. plantarum</i> WHE 92 to spray on the Munster cheese surface at the degining of the repening period	Spary prevents outgrowth of <i>L. monocytogenes</i> and can be used as an antilisterial tratment
Pediocin PA-1	Use of <i>P. acidilactici</i> (Ped ⁺) strain as a starter culture in sausage fermentation	Pediocin effectively contributes to inhibition of <i>L. monocytogenes</i>

연구로 주로 lactic acid, chlorinated water, citric acid, calcium chloride, garlic extract, ascorbic acid, cystein 등을 처리한 연구와 최소가공에 hurdle technology의 응용연구 등이 활발히 보고되고 있으며, 국내의 경우에는 fresh-cut 과채류의 갈변과 관련한 연구 등이 일부 보고되고 있으나, 식품의 안전성 확보와 미생물에 의한 비가열 식품의 부패 및 품질열화와 관련한 연구 등은 선진국에 비해 다소 미비한 실정이다.

- Hurdle technology(유사 명칭 : combind methods, combined processes, combination preservation, combination techniques)는 개별 hurdle의 이해와 조합에 의해 식품의 관능·영양·경제성·미생물적 안정성 등을 보장하기 때문에 매우 효과적인 것으로 증명되고 있어 새로운 hurdle의 탐색과 조합에 대한 지속적인 연구가 이루어지고 있으며, 식품보존에 이용되어지는 hurdle로는 크게 물리적, 물리화학적 그리고 미생물에서 유래된 것 등으로 대별할 수 있다(Table 3).
- Hurdle technology에 의한 식품저장은 가공 및 저장방법이 쉽고, 안전성 면에서 우수하다는 장점을 가지고 있지만, 관능적 특성의 저하, 새로운 첨가제의 법적 승인 문제, 첨가제들에 의한 불필요한 부반응 발생 등의 문제점을 안고 있다. 따라서 이러한 이유로 관능적 특성에 영향을 주지 않고 부반응 발생 가능성이 적은 천연 보존제가 화학적 합성품을 대체할 수 있는 대안으로 주목을 받고 있으며 선진국에서는 이미 새로운 천연물의 탐색과 적용성 검토를 연구하여 새로운 hurdle로 활용하고자 하는 노력이 지속적으로 이루어지고 있는 실정이다.

Table 3. An examples of hurdles used to preserve foods.

Type of hurdle	Examples
Physical hurdles	<p>Aseptic packaging</p> <p>Electromagnetic energy(microwave, radio frequency, pulsed magnetic fields, high electric fields)</p> <p>High temperatures(blanching, pasteurisation, sterilisation, evaporation, extrusion, baking, frying)</p> <p>Ionising radiation</p> <p>Low temperatures(chilling, freezing)</p> <p>Modified atmospheres</p> <p>Packaging films(including active packaging, edible coatings)</p> <p>Photodynamic inactivation</p> <p>Ultra-high pressures</p> <p>Ultrasonication</p> <p>Ultraviolet radiation</p>
Physico-chemical hurdles	<p>Carbon dioxide, Ethanol, Lactic acid</p> <p>Lactoperoxidase, Low pH, Low redox potential</p> <p>Low water activity, Maillard reaction products</p> <p>Organic acids, Oxygen, Ozone</p> <p>Phenols, Phosphates, Salt</p> <p>Smoking, Sodium nitrite/nitrate</p> <p>Sodium or potassium sulphite</p> <p>Spices and herbs</p> <p>Surface treatment agents</p>
Microbially derived hurdles	<p>Antibiotics</p> <p>Bacteriocins</p> <p>Competitive flora</p> <p>Protective cultures</p>

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실험재료, 시료의 제조 및 전처리

1. 실험재료

가. 미생물 균주

본 실험에 사용한 pediocin의 생산균주는 *Pediococcus acidilactici* M은 김 등이 분리한 균주로 *Pediococcus acidilactici* KFRI 168로 알려진 균주를 사용하였다. Pediocin의 활성 측정을 위한 Indicator strain은 *Enterococcus faecalis* KFRI 354를 사용하였다.

모든 배양균주는 50% glycerol을 첨가하여 -80℃에서 냉동보관하면서 실험에 사용하였으며 실험전 균주활성을 위해 10mL의 MRS broth(Difco lab.)에서 12~15시간 배양한후 사용하였다. 다음의 균주는 지시된 배지에서 생육시켰다.

- *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactococcus diacetylactis*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus cerevisiae*, *Pediococcus halophilus*, *Leconostoc mesenteriodes*, *Leconostoc paramesenteriodes*, *Leconostoc mesenteriodes subsp. dextranicum*, *Propionibacterium freudenreichii* : Lactobacillus MRS medium
- *Bacillus subtilis*, *Shigella flexneri*, *Bacillus coagulans*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Aeromonas hydrophila* : Nutrient medium
- *Clostridium perfringens* : Oxoid CM 149
- *Micrococcus luteus* : Enriched nutrient medium
- *Enterococcus faecium* : Trypticase soy medium
- *Listeria monocytogens* : Brain heart infusion.

항균활성 측정용 지시균주는 한국식품연구원(KFRI), 한국종균협회(KCCM) 및 한국생명공학연구원(KCTC)에서 동결건조 상태로 분양 받아 시험 전 생육배지에서

overnight culture하여 activation시킨 다음 항균활성 측정에 사용하였다.

*E. coli*에서의 pedM 발현에 *Escherichia coli* DH5 α 와 *E. coli* BL21(DE3)는 각각 Promega사와 Novagen사로부터 구입하였다. Cloning과 overexpression vector로는 Takara사의 pCold TF DNA vector를 구입하여 사용하였다. *E. coli* DH5 α 는 *E. coli* cloning manipulation을 위해 사용하였고 *E. coli* BL21(DE3)는 overexpression host로 사용하였다. *E. faecalis*는 37 $^{\circ}$ C에서 MRS broth을 사용하여 배양하였고 모든 *E. coli* stain들은 적당한 항생제를 포함한 LB (Luria-Bertani) medium을 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 모든 배지들은 Difco Laboratories사로부터 구입하여 사용하였다. Transformant들을 배양할 때 사용한 항생제는 ampicillin으로 최종 농도가 50ug/mL이 되도록 첨가하였다.

pediocin M을 생산하는 형질전환 *Leuconostoc mesenteroides*에 사용된 모든 bacterial strain과 plasmid는 Table 4에 나타내었다. *Escherichia coli* DH5 α 는 *E. coli* cloning manipulation을 위해 사용하였다. *Leuconostoc mesenteroides*와 *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus acidilactici* M은 37 $^{\circ}$ C에서 MRS broth을 사용하여 정치배양하였고 모든 *E. coli* stain들은 적당한 항생제를 포함한 LB (Luria-Bertani) medium을 사용하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 모든 배지들은 Difco Laboratories사로부터 구입하여 사용하였다. 사용한 항생제들은 다음과 같은 농도로 첨가하였다: ampicillin, 50ug/mL; erythromycin 200ug/mL.

나. 실험재료

실험에 사용한 사과, 양배추 등의 과채류와 생식, 미숫가루 등과 배추, 고춧가루 등의 김치 제조용 재료는 경기도 분당지역의 대형 유통점에서 구입하여 사용하였으며, 사과는 국내산 오존처리 후지 및 쓰가루 품종의 사과(풍기농협, 경북 영주)와 국내산 양배추, 당근, 청오이, 양상추로 성남시 소재의 대형마트(농협 하나로마트)에서 구매하여, 5 $^{\circ}$ C 이하의 RH 90~95% 조건에 냉장 보관하면서 실험에 이용하였다.

막걸리 제조용 원료 멥쌀은 경기미, 누룩은 경북의 대홍농산에서 생산된 것을 구입하여 사용하였다. 막걸리 제조용 원료로 멥쌀은 국내산 신선철원 오대쌀(5kg, 동송농협)을 성남시 소재의 대형할인마트에서 구입하여 사용하였으며, 누룩(당화력 300 SP)은 경북 안동의 대홍농산에서 생산된 것을 구입하여 사용하였고, 주모 제조용 효모는 활성건조효모(*Saccharomyces cerevisiae*, Lallemand, French)를 사용하였다.

Table 4. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strains, plasmids	Genotype or relevant marker	Reference or source
Bacterial strains		
<i>Leu. mesenteroides</i>	Wild-type strain	KFRI ^a 820
<i>P. acidilactici</i> M	Contains pediocin plasmid, Ped ^r plasmid	KFRI
<i>E. faecalis</i>	Sensitive indicator strain for pediocin	KFRI 354
<i>E. coli</i> DH5 α	Δ80ΔlacZΔM15 <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK ⁻ mK ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169	Promega Co.
Plasmids		
pUC19	<i>E. coli</i> cloning vector, Amp ^r , 2.7kb	Promega Co.
pCW4	<i>E. coli</i> -LAB shuttle vector, Em ^r , 5.3kb	Park et al. (2004)
pCW5	pCW4 :: P32 promoter, GFP, Em ^r , 6.3kb	Park et al. (unpublished)
pUCFP23	pUC19 :: 4.4kb <i>pedA</i> upstream~ <i>pedD</i> PCR product, Amp ^r	This study
pUCPM5	pUC19 :: 3.4kb <i>pedA</i> ~ <i>pedD</i> PCR product, Amp ^r	This study
pCWPM30	pCWPM30 :: 3.4kb <i>pedA</i> ~ <i>pedD</i> PCR product, Em ^r	This study

^aKFRI, Korea Food Research Institute, Korea.

김치의 경우 공정중간품 시료 채취는 (주)정안농산에 협조를 구하여 제조공정 과정에서 실시하여 ice box로 실험실로 운반하여 즉시 균주분리에 사용하였다.

코팅필름의 항균 활성 적용식품 재료는 당일 제조된 두부를 성남시 소재의 대형할인마트에서 구매 후 제조된 필름으로 즉시 포장하여 실험에 사용하였다.

다. 시약 및 배지

균주의 배양에 사용한 *Lactobacillus* MRS agar 및 broth, Nutrient agar 및 broth

등의 배지는 모두 Merk사 또는 Difco lab.의 것을 사용하였으며 TFA, NaCl, NaH₂PO₄, NaH₂PO₄, Amerlite XAD 4, Amberlite XAD 6등의 chemicals 및 resin은 모두 Sigma Co.의 것을, 그리고 HPLC에 사용한 water 및 acetonitril은 Mallinckrodt Baker사의 것을 사용하였다. 신선편의 과채류의 전처리용 침지액에 사용된 polylysine 과 nisin은 신승하이캡과 Sigma의 제품을 각각 사용하였다.

본 실험에 사용한 코팅 필름용 항균제인 nisin(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 및 polylysine(Chisso Co., Tokyo, Japan)은 구입하여 코팅용액으로 사용하기 전 Ultrafiltration membrane(MWCO 10,000, Spectrum laboratories Inc., CA) 으로 여과하여 사용하였고, pediocin은 *pediococcus acidilactici*로부터 분리하여 사용하였다. 코팅필름 제조용 코로나 표면처리기재인 OPP(Orineted polypropylene, Oxygen transmission rate: 250 cc/m²/24h/73F/0% RH)는 (주) 대림산업에서 구입하여 사용하였고, 결합제로 사용된 코팅 용액용 수지인 Polyamide[Poly(dimer acid-co-alkyl polyamine), Sigma Chemical Co., St. Louis, USA]는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

2. Pediocin의 분리·정제

가. Pediocin의 추출

Pediocin의 추출은 Yang 등에 의한 흡착-탈착법으로 실시하였다. 즉, *Pediococcus acidilactici* M의 배양액(1.8L 기준)으로부터 pediocin의 분리는 권 등의 방법에 준하였다. 즉, 36±1℃에서 15시간 동안 배양한 *Pediococcus acidilactici* M의 MRS broth 배양액을 70℃의 water bath에서 30분간 가열한후 bacteria cell에 pediocin을 흡착 4M NaOH로 pH를 6.0으로 조정하고 실온에서 30분간 교반하였다. 교반후 배양액을 원심분리(10,000×g, 4℃)하여 pellet을 100mL의 5mM sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 2회 세정하여 다시 원심분리(10,000×g, 4℃, 30분)하였다. Pellet을 40mL의 100mM NaCl에 다시 재현탁시킨 다음 pediocin의 탈착을 위해 5% H₃PO₄로 pH를 2로 조정하고 4℃에서 24시간 동안 교반하였다. 이를 다시 원심분리(18,000×g, 4℃, 30분)하여 상층액을 0.20μm bottle top filter로 여과하고 Spectra Por7 dialysis membrane(Spectrum Co., cut-off 1,000 Da)으로 투석한 다음 동결건조기(Ilsin Lab)로 동결건조하였다. 동결건조한 시료는 데시케이터에 넣어 4℃에 보관하면서 분리·정제 시험에 사용하였다(Fig. 1).

나. Amerlite XAD에 의한 분리

Pediocin의 hydrophobic한 특성을 이용하여 amberlite XAD 4와 amberlite XAD 6을 이용하여 흡착 chromatography를 실시하였다. 먼저 amberlite XAD 4와 amberlite XAD 6에의 pediocin 흡착-탈착 조건을 알아보기 위해 50g의 amberlite XAD 4와 amberlite XAD 6을 수지량의 5배량 가량의 1%(w/v) TFA를 첨가한 water로 수세하고 empty column에 packing한 다음 MRS broth에서 15시간 배양한 배양액을 원심분리(10,000 ×g, 4 °C, 30분)한 다음 상층액 500mL을 column에 apply시켰다. 흡착후 다시 250mL의 1%(w/v) TFA를 첨가한 water로 수세로 한 다음 elution solvent로서 1%(w/v) TFA를 첨가한 ethanol과 1%(w/v) TFA를 첨가한 acetonitrile 250mL로 각각 용출한 다음 vaccum rotary evaporator(Büchi RE121, Switzerland)에서 용매와 TFA를 제거한 다음 agar-well diffusion법으로 pediocin acitivity를 assay하였다.

흡착-탈착법에서의 정제 효율 향상을 위해 흡착-탈착후 원심분리액을 amberlite XAD 6에 흡착한 다음 elution solvent로서 1%(w/v) TFA를 첨가한 ethanol로 용출하고 vaccum rotary evaporator에서 농축하고 동결건조하여 agar-well diffusion법으로 pediocin acitivity를 assay하였다(Fig. 2).

다. Semi-preparative HPLC에 의한 정제

Pediocin의 semi-preparative RP-HPLC 정제는 Vydac 218TP1010(C₁₈, 10 μm, 10.0×250 mm) semi-preparative HPLC column으로 HPLC system(Jasco, Japan)을 이용하여 Table 4과 같은 조건하에서 실시하였다. 이 때 사용한 이동상은 0.1%(w/v) TFA in 100% water(solvent A)와 0.1%(w/v) TFA in 60% acetonitrile(solvent B)이였으며 solvent A와 solvent B의 gradient 조건은 다음과 같았다: 0~5분, solvent A 70%, solvent B 30%, 40분, solvent A 20%, solvent B 80%, 50분, solvent A 0%, solvent B 100%.

3. 시료의 전처리

가. 최소가공 과채류의 전처리

선별한 사과와 core를 제거한 다음 5.5mm 두께로 slicing(Mirra 275, Sirman Co., Italy)하고 유수에 세척한 후 자연탈수하여, 침지액에 3분간 dipping 후 상온에서 표면탈수시켜 polypropylene film에 포장한 다음 18°C의 저장고에 보관하면서 실험에 이용하였다.

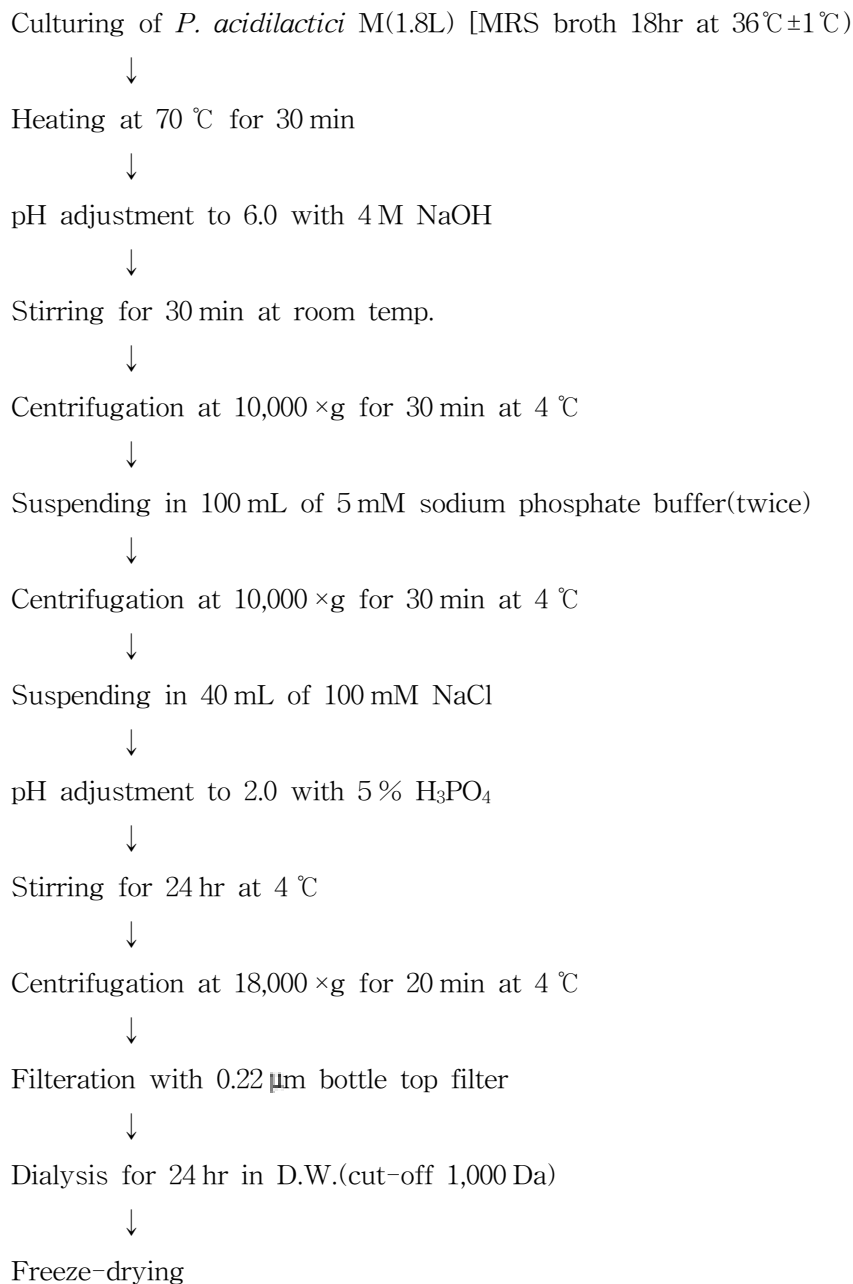


Fig. 1. Extraction of pediocin from *P. acidilactici* M using adsorption-desorption method.

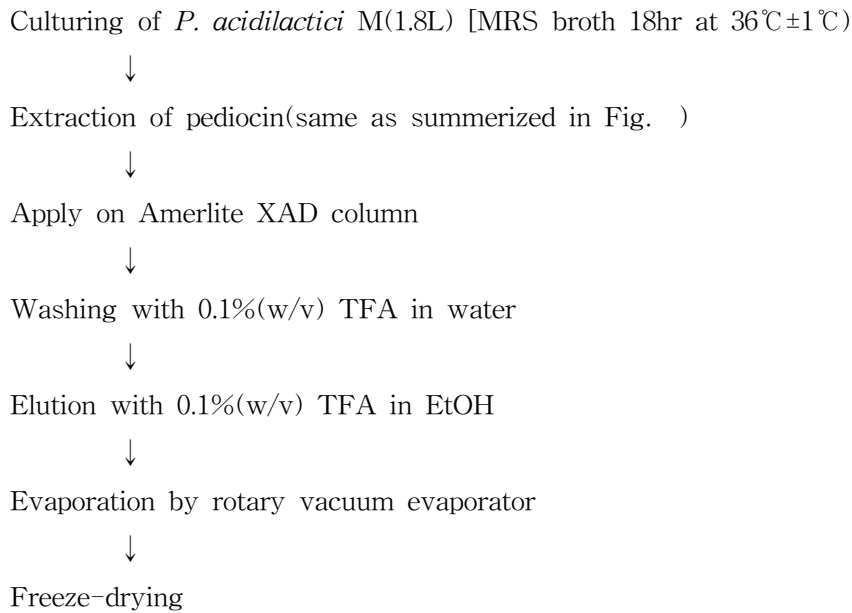


Fig. 2. Extraction of pediocin from *P. acidilactici* M using amberlite XAD 6 column.

나. 최적 dips solution 선정 및 hurdle의 적용을 위한 시료의 전처리

선별한 사과 core를 제거한 다음 5.5 mm 두께로 slicing(Mirra 275, Sirman Co., Italy)하고 유수에 세척한 후 자연 탈수하여, 선별하고자 하는 침지액에 3분간 dipping 후 상온에서 표면탈수 시켜 포장한 다음 18°C의 저장고에 보관하면서 실험에 이용하였다.

다. 최적 dips solution 선정

본 실험에서 이용한 천연항균제로는 미생물에서 유래한 polylysine(Chisso Co., Japan), nisin(Sigma Chemical Co., USA), pediocin(isolated from *Pediococcus acidilactici*)과 동·식물에서 유래한 lysozyme(Sigma Chmical Co., USA), chito-oligosaccharide(노디케이-F, (주)벤스랩), GSE(Grape Seed Extract) (DF-100, (주)에프에이뱅크) 및 비타텐-S(Daepyung, Korea), β -thujaplicin(hinokitiol)(Aldrich,

Table 4. RP-HPLC condition for the purification of native pediocin.

	Analytical	Semi-preparative	
Column	Vydac 218TP54 (C ₁₈ , 5 μm, 4.6×250 mm)	Vydac 218TP1010 (C ₁₈ , 10 μm, 10.0×250 mm)	
Flow rate	1.0mL/min	2.0mL/min	
Detector	UV/VIS, 220 nm		
Column temp.	40°C		
Mobile phase	A : 0.1%(w/v) TFA in water B : 0.1%(w/v) TFA in 60% acetonitrile		
	Time(min)	A(%)	B(%)
Gradient condition	0~5	70	30
	40	20	80
	50	0	100

USA)이며 유기산으로는 citric acid(Junsei Chemical Co., Japan)와 malic acid(Yakuri Pure Chemicals Co., Japan)를 이용하였으며, 이를 이용하여 각각의 농도로 제조한 침지액에 침지한 후 18°C 저장에 따른 각 첨가제의 사용 농도별 정균 효과 및 관능적인 면을 확인하였다. 이렇게 선행된 실험의 결과에 따라 그 효과가 인정되는 천연첨가제를 혼용함으로써 천연첨가제 혼용에 의한 항균효과 및 색도 변화를 확인하였으며, 또한 천연항균제와 유기산을 혼용함으로써의 미생물 생육 저해 효과와 사과외의 갈변도도 함께 확인하였다.

라. 물리적 방법의 hurdle 탐색

물리적인 hurdle 처리 방법으로, 먼저 열수 침지 및 열풍 방법을 모두 이용하여 각각의 효과를 탐색해 보았다. 즉, 열수 침지 방법의 경우, 증류수를 열전달 매체로 사용하여 40~70°C에서 30초~2분간 mild heating 처리하였으며, 열풍에 의한 방법의 경우, 시료의 절단면 표면온도가 15~50°C로 되는 수준에서 1~3분간 송풍을 통해 열처리하였다. 그 결과 효과가 인정되는 방법을 택하여 선정된 dips solution(혼합 침지액)과 병행함으로써 hurdle factor로서의 적합성을 검토하였다.

마. 김치의 제조

배추를 약 4×4cm 크기로 절단하여 배추 무게의 약 5%의 소금을 골고루 뿌린 뒤 다시 8 % (w/v) 염수에 담궈 3시간 절이고 유수에 씻은 다음 약 30분간 실온에서 자연 탈수하였다. 다진 생강, 마늘을 비롯한 부재료는 절인배추 80%(w/w), 채썬 무 8.8%(w/w), 고춧가루 4.6%(w/w), 다진 생강 0.4%(w/w), 다진 마늘 1.8%(w/w), 채썬 대파 1.5%(w/w), 설탕 1.8%(w/w), 소금 1.2%(w/w)의 배합비로 혼합하여 절인 배추에 버무려서 김치를 제조하였다. 이 때 stater로 첨가한 젖산균은 *P. acidilactici* M, *Lactococcus* sp.(No. 2774, 2775 및 2777)을 무를 착즙하여 0.2 μ m membrane filter로 여과한 여과액에서 37 $^{\circ}$ C, 24시간 배양한 것을 약 10⁴CFU/g의 비율이 되도록 첨가하였다.

바. 막걸리의 제조

1) 멥쌀의 전처리

증미는 멥쌀을 일반 수도수에 세척하여 5시간 가량 물에 침지한 후 1시간 가량 탈수시킨 것을 찜솥으로 30분 가량 증자하고, 상온에서 냉각하여 사용하였다.

2) 주모 제조

주모 제조는 멥쌀을 증자한 증미 77g, 누룩 16g 및 건조효모 1.9g을 일반 수도수 108mL에 잘 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 2일간 발효시켜 주모를 제조하였다.

3) 막걸리 담금 및 발효

본배양은 입국 *Aspergillus kawachii* 중량을 기준(당화력 60 SP)으로 물 160를 넣었으며, 이어서 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양한 주모를 총 부피의 6%로 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양시켰다. 배양기간 중에는 매일 5~6회씩 교반하여 품온 조절과 산소공급을 하였으며, 초단사입은 입국 254g, 증미 1,270g, 주모 200mL에 물 2,046mL를 가해 25 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양시켰고 2단사입은 초단 후 48시간에 증미 2.5kg, 입국 77g 및 물 4L를 계속 첨가하여 25 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양시켜 완성하였다. Pediocin, polylysine 및 nisin은 2단사입시에 첨가하였으며 2단사입 후에는 4 $^{\circ}$ C에 저장하면서 품질변화를 관찰하였다.

사. 코팅 필름 제조

Polylysine 코팅 필름 제조는 Kim 등(31)의 방법을 변형하였다. 즉, 분말의

polylysine을 20% ethanol(v/v)용액에 5%농도(w/v)로 용해시키고, 결착제로 사용한 polyamide(PA)수지용액은 n-propanol과 iso-propanol 2 : 1(v/v)인 유기용매에 농도별(w/v)로 혼합하여 polylysine 코팅 용액을 만든 다음 High frequency generator(Model BD-20, Electro-Technic products. Inc., cicago, USA)에 의하여 코로나 처리된 두께 약 50 μm 내외의 polypropylene 필름 위에 도포 시키고 이를 상온에서 1일 정도 건조시켜 제조하였다. polylysine 및 PA 농도결정 및 두께 결정은 각각의 농도 및 두께를 달리하여 제조된 필름을 4 × 4 cm^2 로 절단하여 지시균주의 생육도를 UV Spectrophotometer (Jasco, V-570, Japan)를 사용하여 OD₆₆₀에서 흡광도를 통해 항균활성을 측정하여 확인하고 최적 농도를 결정하였다. polylysine 코팅 필름의 제조공정도는 Fig. 3과 같다. Nisin 및 pediocin 코팅 필름 또한 동일한 방법으로 제조하였다.

아. 포장두부의 제조

두부는 성남시 소재의 대형할인마트에서 당일 제조된 두부를 구입하여 실험재료로 사용하였다. 두부(4×6×1 cm^3)는 각각의 필름(10×14 cm^2)에 포장하여 10 °C에 저장하면서 두부의 총균수, 대장균군, 색도 및 관능적 특성을 측정하였다. 대조구는 OPP 및 1% nisin 코팅필름을 사용하였다.

자. 약식의 제조

국내산 찹쌀을 주원료(73.72%)로 하여 밥, 땅콩, 건포도, 호두, 잣, 참기름 및 카라멜화한 정백당을 혼합하여 제조한 후 PP(polypropylene) 필름으로 포장하고 20°C 저장고에 저장하면서 실험에 사용하였다. 그 제조공정은 Fig. 4와 같다.

차. 전처리 과채류의 저장

Slice한 사과를 40°C로 유지시킨 dips solution에 1분간 침지 시킨 후 상온에서 표면 탈수 시켜 polypropylene film에 포장하였다. 이때 저장 온도는 장기저장을 위한 하나의 hurdle factor로써 4°C, RH 90~95% 유지되는 저장고에 보관하면서 저장기간에 따른 총균수, 갈변도, texture 등 품질변화를 관찰하였다.

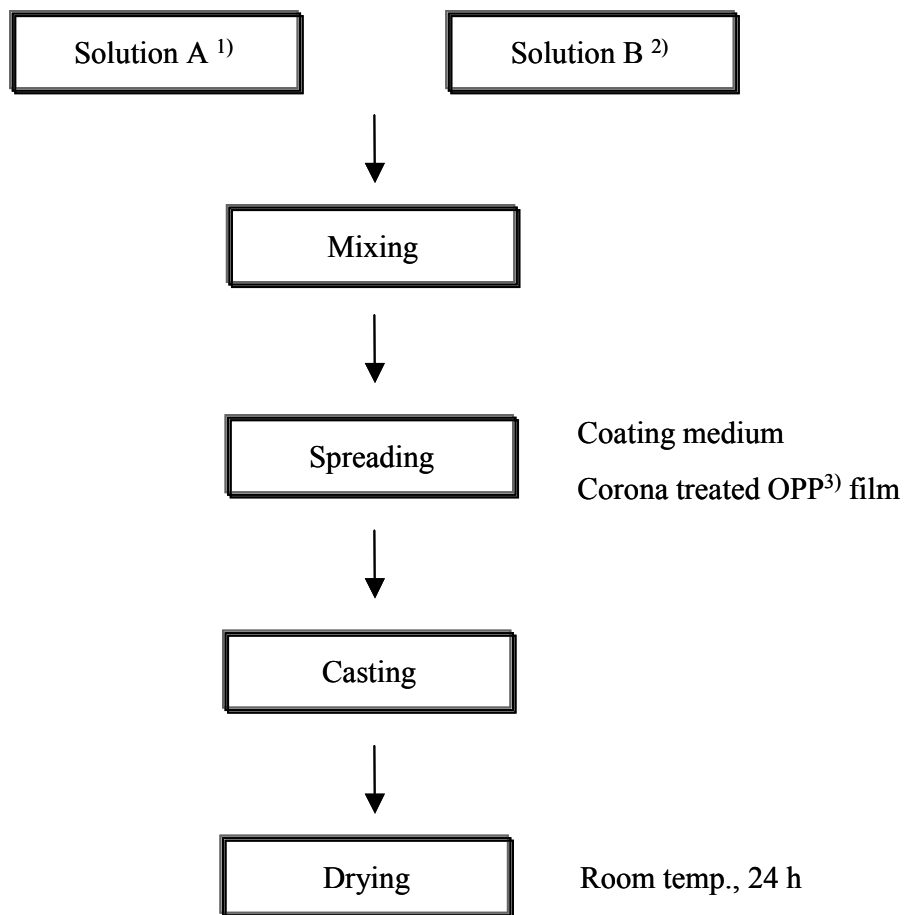


Fig. 3. The scheme of fabrication of polylysine coating film.

¹⁾ Solution A : 10 % bacteriocin solution in 20% ethanol.

²⁾ Solution B : 20 % polyamide solution in 2:1 *i*-propanol/*n*-propanol.

³⁾ OPP film : Oriented polypropylene film.

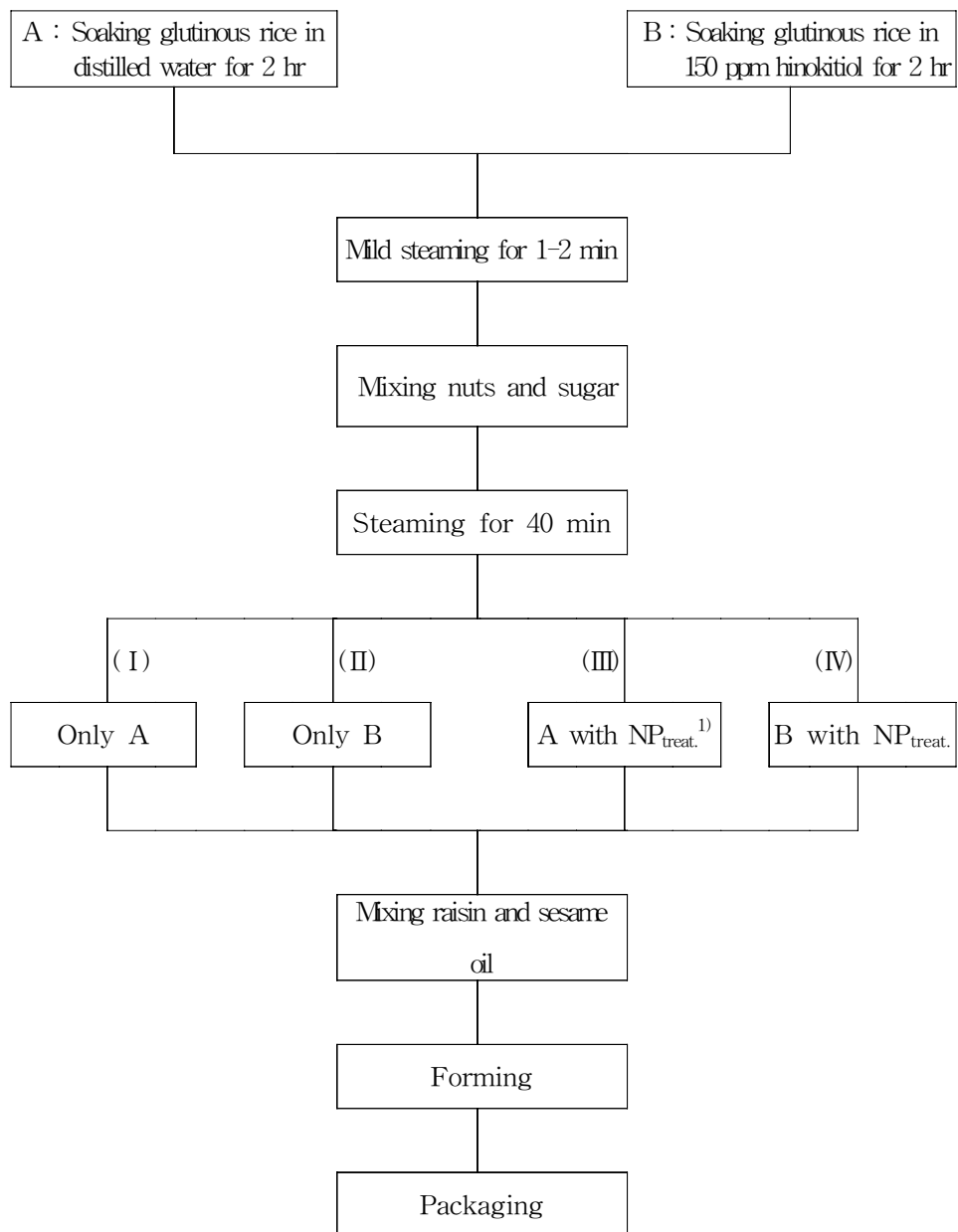


Fig. 4. Flow sheet of *yaksik* prepared by various condition

¹⁾NP treat. : 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin

제 2 절 측정 및 분석방법

1. 항균 활성의 측정

Pediocin의 분지·정제 과정중의 활성은 Tagg와 MacGiven의 agar-well diffusion 법으로 실시하였다. *Enterococcus faecalis* KFRI 354 indicator strain을 10mL의 MRS broth에 접종하여 overnight culture후 배양액 1mL를 MRS soft agar와 혼합한후 MRS agar에 증층하여 고형화하였다. 분리한 pediocin 70 μ L를 well에 가하고 overnight 배양하여 저해활성을 측정하였다.

시료의 전처리시 Pediocin, polylysine 및 nisin이 미생물의 생육에 미치는 영향을 확인하기 위해, 각 시료(사과, 양배추, 당근, 청오이, 양상추)에 3배수의 nutrient broth를 가한 후 스토마커로 균질화 하고 그 여액을 30 $^{\circ}$ C의 incubator에 12시간 배양하여 이를 사용균주로 이용하였다. Nutrient broth에 각각의 pediocin, polylysine 및 nisin을 0, 25, 50, 75, 100, 125, 250ppm(v/v)의 농도로 첨가하고, 동시에 각 시료에서 배양된 균주를 10%(사과, 양배추, 오이) 및 3.3%(당근, 양상추)씩 접종하여 30 $^{\circ}$ C의 incubator에서 배양하면서 배양시간별 균주의 생육도를 UV Spectrophotometer(Jasco V-570, Japan)를 사용하여 OD₆₆₀에서 흡광도 값으로 측정하고 경시적 변화를 관찰하였다.

2. Pediocin의 정제도 확인

가. HPLC에 의한 확인

Pediocin의 analytical RP-HPLC에 의한 확인은 상기의 semi-preparative RP-HPLC와 동일한 system을 사용하였으며 이때 사용한 column은 Vydac 218TP54(C₁₈, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm) analytical HPLC column이었다. 사용한 이동상과 gradient 조건은 semi-preparative RP-HPLC와 동일하였다.

나. SDS-PAGE에 의한 확인

분리한 pediocin의 SDS-PAGE는 Schagger와 Von Jagow의 방법을 약간 변형한 Tricine SDS-PAGE로 실시하였으며 40% acrylamide mix를 사용하고 coomassie blue로 staining하였다. 이때 사용한 molecular weight marker는 ultra low marker(Sigma Co.)를 사용하였다.

3. Pediocin의 물리화학적 처리

분리한 pediocin의 pH, 열, 에탄올, 효소처리에 의한 특성을 조사하였다. 동결건조하여 HPLC용 water에 용해한 pediocin을 100 μ L를 1M citric acid buffer(pH, 2.0, 5.0), 1M acetic acid buffer(pH 5.0, 6.0), 1M phosphate buffer(pH 6.0, 8.0), 1M Tris buffer(pH 8.0, 10.0)에 각각 혼합하고 실온에서 30분간 정치한후 agar-well diffusion 방법으로 pediocin activity를 assay하였다.

Pediocin의 열처리는 pediocin 분리액을 37 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 60 $^{\circ}$ C, 70 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열하였으며 121 $^{\circ}$ C에서는 15분간 가열처리한후 agar-well diffusion방법으로 pediocin activity를 assay하였다. 에탄올처리는 100 μ L의 pediocin 분리액에 동량의 99.9% ethanol을 가한후 30분간 방치한 다음 에탄올을 휘발시켜 제거하고 agar-well diffusion방법으로 활성을 assay하였다. 효소처리는 catalase(Sigma Co.), protease(Sigma Co.), α -amylase(Boehringer Mannheim), nuclease(Sigma Co.), endoprotease ASP-N(Boehringer Mannheim), trypsin(Boehringer Mannheim)를 사용하여 10 μ L의 각각의 효소용액에 50 μ L의 pediocin 분리액을 가하고 catalase, α -amylase 및 nuclease는 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안, 그리고 endoprotease ASP-N과 Trypsin은 instruction manual에 따라 반응한후 agar-well diffusion방법으로 활성을 assay하였다.

4. 단백질 정량

단백질의 정량은 BCA micro-assay법(bicinchoninic acid micro-assay method)으로 실시하였으며 단백질 standard는 bovine serum albumin(Sigma Co.)을 사용하였다.

5. Pediocin-like bacteriocin(Class IIa bacteriocin)의 분리

가. Bacterial strains and media

Pediocin-like bacteriocin을 생산하는 LAB(lactic acid bacteria)를 선별하기 위한 indicator strain으로는 *Enterococcus faecalis*를 사용하였으며 이 균주는 MRS broth (Difco lab.)를 사용하여 36 $^{\circ}$ C에서 배양하였다.

나. Isolation of LAB(lactic acid bacteria)

Lactic acid bacteria를 isolation하기 위해 여러 제조사로부터 다양한 종류의 김치와 김치 원재료를 분리원으로 사용하였다. 0.85%(w/v) saline solution을 사용하여 김치즙

액을 취해 10배씩 serial dilution한 다음 sodium axide를 첨가한 MRS agar에 spreading하여 36°C에서 2일간 배양하였다. 얻어진 colony들은 MRS broth에서 액체 배양하여 glycerol이 20%(w/v) 되도록 첨가한 뒤 -80°C에 동결보존 하면서 screening에 사용하였다.

다. Bacteriocin-producing LAB의 screening

항균활성의 측정을 위해 agar-well diffusion method(Stoffels et al.)를 변형하여 사용하였다. Isolation한 LAB를 MRS broth에 배양한 다음 원심분리를 통하여 각각의 supernatant를 얻어 75 μ L를 항균활성 측정에 사용하였다. Agar 증층 plate는 1.4% MRS agar plate에 indicator strain을 2% inoculation한 5mL의 0.8% MRS agar를 pouring하여 준비하였다. Paper disc에 시료를 가한 다음 36°C에서 배양하여 clear zone을 확인하였다.

6. *P. acidilactici* M의 배양조건 시험

Pediococcus acidilactici M의 배양조건 확립을 위해 우선적으로 진탕배양, 정치배양 및 stirred cell 배양의 3가지 배양방식으로 배양하면서 배양중 균증식 속도, pH 및 pediocin activity(AU/mL)를 측정하였다. 이때 stirred cell은 cell culture용 stirred cell(Wheaton, 2.5L)을 사용하였으며 120rpm의 교반속도로 stirring하였고 진탕배양은 진탕배양기에서 200rpm의 교반속도로 진탕하였다.

또한 autoclaving후 초기 pH가 각각 pH 7.0, pH 6.8, pH 6.4, pH 6.0, pH 5.8, pH 5.6, pH 5.4가 되도록 autoclaving전에 5%(w/v) H₃PO₄와 5M NaOH로 pH를 조정하였다.

Tween 80을 첨가하지 않은 TF-MRS broth의 배지조성은 배지 1L당 tryptic soy broth 10 g, beef extract powder 10 g, yeast extract 5 g, dextrose 20 g, ammonium citrate 2 g, sodium acetate 5 g, magnesium sulfate 0.1 g, manganese sulfate 0.05 g, dipotassium phosphate 2 g이었으며 초기 pH는 5%(w/v) H₃PO₄로 6.8로 조정하였다.

MgSO₄ 및 MnSO₄ 농도에 따른 pediocin 생산량 변화를 검토하기 위해 MgSO₄ 및 MnSO₄를 제외한 다른 배지성분의 농도는 MRS와 동일하게 가하고 MgSO₄는 0.01%(w/v), 0.02%(w/v), 0.04%(w/v), 0.06%(w/v) 및 0.10%(w/v)로, 그리고 MnSO₄는 0.005%(w/v), 0.015%(w/v), 0.025%(w/v), 0.035%(w/v) 및 0.045%(w/v)로 각각 첨가하여 배양중 균증식 속도, pH 및 pediocin activity(AU/mL)를 측정하였다.

Nitrogen source의 영향을 알아보기 위해 Verellen 등이 사용한 바와 같이 1.9%(w/v) tryptone, 3.4%(w/v) peptone, 1.9%(w/v) meat extract 및 2.5%(w/v) yeast extract를 nitrogen source로 대체하여 배양중 균증식 속도, pH 및 pediocin activity(AU/mL)를 측정하였다.

배양시험에 사용한 배양온도는 모두 $36\pm 1^\circ\text{C}$ 였으며, 접종량은 0.1%(v/v)으로 10mL의 MRS broth에 0.1%(v/v)으로 stock culture를 접종하여 $36\pm 1^\circ\text{C}$ 에서 seed culture한 것을 사용하였다.

7. Pediocin의 대량 발현

가. *E. coli*에서의 pediocin M 대량 생산

1) DNA manipulation

*E. coli*의 plasmid DNA는 alkaline lysis procedure을 통해 분리하거나 Qiagen 사의 QIAprep spin plasmid kit를 이용하여 분리하였다. T4 DNA ligase와 restriction endonuclease는 Takara 사로부터 구입하여 사용하였다. DNA ligation 반응은 16°C 에서 18시간 처리하였다. Restriction enzyme digestion에 의해 준비된 DNA fragment는 agarose gel electrophoresis에 의해 separation되었고 ethidium bromide staining에 의해 visualization되었다. 또한 DNA restriction fragment는 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen Co.)를 사용하여 agarose gel로부터 purification하였다.

2) Plasmid construction

Overexpression plasmid를 construction하기 위해 *Sac* I site (underline)를 가진 primer ped-XaM-up-1 (5'-GCG CGA GCT CAT CGA AGG TAG GAA ATA CTA CGG TAA TGG GGT TAC TTG TGG C-3')와 *Hind* III site (underline)를 가진 primer ped-MSt-rp (5'-GGC CAA GCT TCT AGC ATT TAT GAT TAC CTT GAT GTC C-3')를 사용하여 Factor Xa protease에 의해 인식이 가능한 아미노산 서열의 codon (이텔릭체)을 포함한 mature *pedA*를 Takara 사의 Ex Taq. polymerase를 사용하여 PCR (polymerase chain reaction)로 증폭시켰다. 이 PCR product는 *Sac* I과 *Hind* III restriction enzyme으로 digestion한 뒤 약 150bp의 DNA fragment를 agarose gel에서부터 isolation하여 *Sac* I과 *Hind* III로 digestion한 pCold TF DNA vector의 corresponding cloning site에 ligation시켰다(Fig. 5).

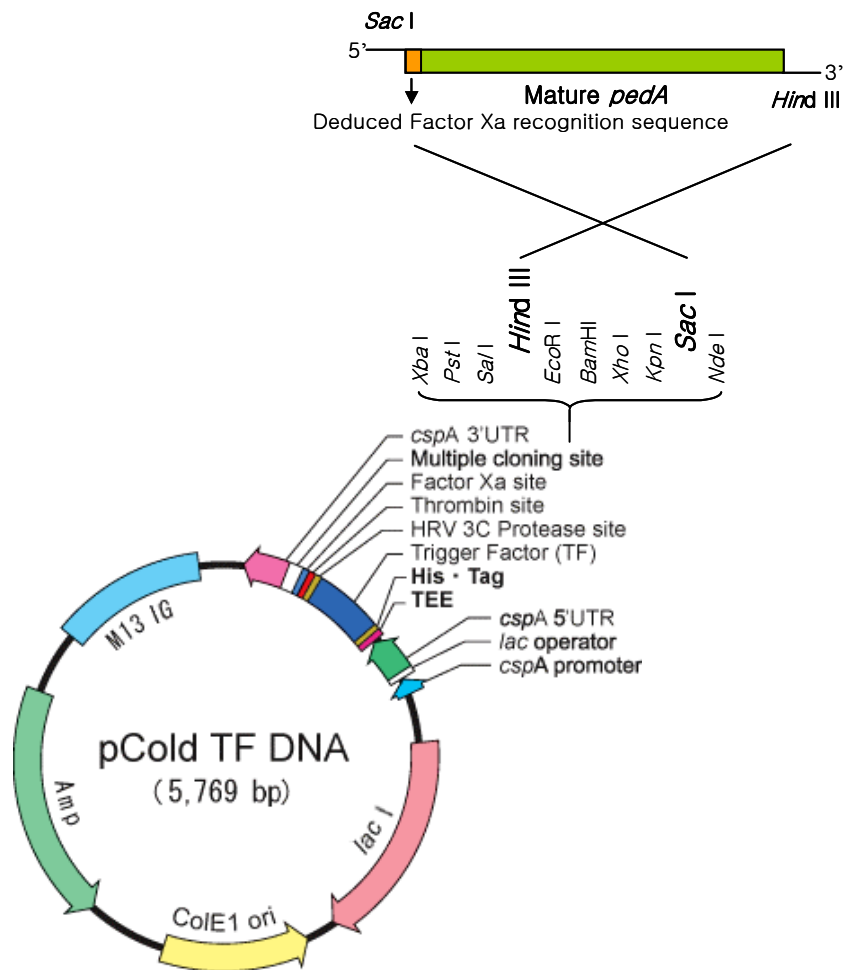


Fig. 5. Cloning of mature *pedA* PCR product into pCold TF DNA vector.

3) Transformation

E. coli competent cell은 CaCl₂ challenge method에 따라 준비하거나 Real Biotech Corporation으로부터 구입하여 사용하였다. Transformation은 heat shock method에 따라 수행하여 LB agar plate에 ampicillin과 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside), IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside)를 각각 100ug/mL, 80ug/mL, 1mM이 되도록 첨가하여 selection하였다.

4) Pediocin M overexpression by *E. coli* BL21(DE3)

pCold TF DNA vector는 expression host인 *E. coli* BL21(DE3)에 transformation시킨 뒤 cold shock method에 따라 fusion protein의 대량 발현을 유도하였다. 그 과정은 다음과 같다; transformant를 ampicillin 첨가 배지에 접종하여 37°C shaking incubator에서 O.D₆₀₀=0.4~0.5가 될 때까지 액체 배양한 뒤 15°C에서 30분간 놓아두었다. 그런다음 IPTG를 넣고 15°C shaking incubator에서 24시간 배양하였다. 이렇게 배양한 균액을 원심분리하여 상등액을 모아 His·bind purification kit (Novagen Co.)를 이용하여 histidine이 fusion된 목적 protein을 정제하였다.

나. *Leuconostoc mesenteroides*에서의 pediocin의 발현

1) DNA manipulation

*E. coli*의 plasmid DNA는 alkaline lysis procedure을 통해 분리하거나 Qiagen 사의 QIAprep spin plasmid kit를 이용하여 분리하였다. T4 DNA ligase와 restriction endonuclease는 Takara 사로부터 구입하여 사용하였다. DNA ligation 반응은 16°C에서 18시간 처리하였다. Restriction enzyme digestion에 의해 준비된 DNA fragment는 agarose gel electrophoresis에 의해 separation되었고 ethidium bromide staining에 의해 visualization되었다. 또한 DNA restriction fragment는 QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen Co.)를 사용하여 agarose gel로부터 purification하였다.

2) Transformation

E. coli competent cell은 CaCl₂ challenge method에 따라 준비하거나 Real Biotech Corporation으로부터 구입하여 사용하였다. Transformation은 heat shock method에 따라 수행하여 LB agar plate에 적당한 항생제와 필요에 따라 X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)과 IPTG (isopropyl-β

-D-thiogalactopyranoside)를 각각 80ug/mL, 1mM이 되도록 첨가하여 selection하였다. *Leu. mesenteroides*의 electroporation은 Gene Pulser (Bio-Rad)를 25uF, 2.5kV, 200ms로 조절하여 0.2cm cuvette을 이용해 수행하였다. Electrocompetent cell은 Raya et al.의 방법에 따라 준비하였다.

3) Plasmid Construction

Pediocin M expression vector를 construction하기 위해 pUC19과 pCW4를 shuttle vector로 사용하였다. Insert DNA들은 Ped⁺ plasmid를 주형으로하여 PCR로 증폭시켜 각각의 restriction enzyme으로 digestion하여 준비되어진 shuttle vector의 corresponding cloning site에 ligation시켜 pUCFP23과 pUCPM5, pCWPM30을 각각 construction하였다 (Fig. 5). 이 때 사용한 primer들과 restriction enzyme들은 Table 5에 나타내었다.

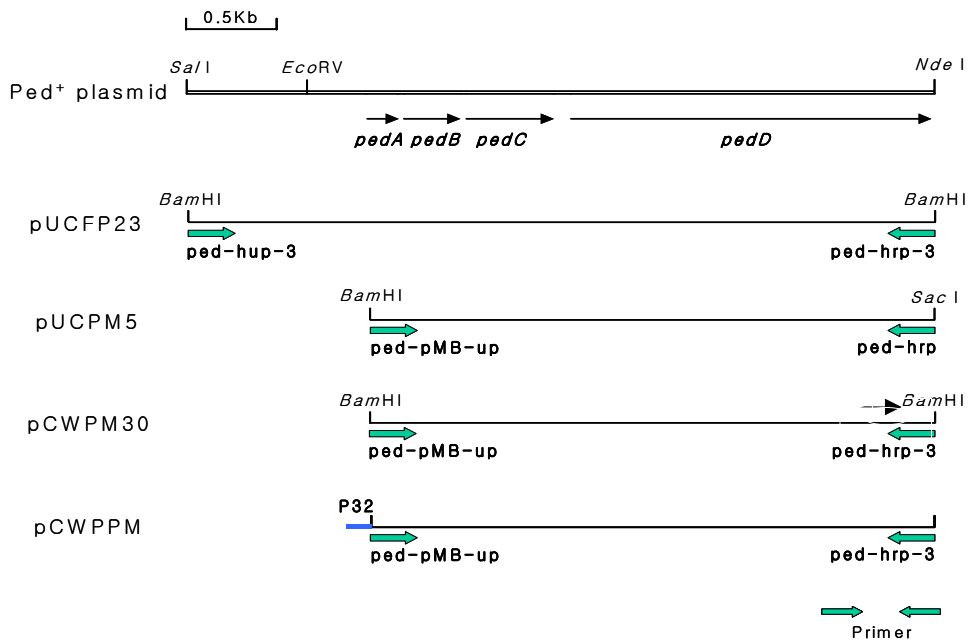


Fig. 5. Schematic representation of the construction of the plasmids. The horizontal lines represent the inserts of the various plasmids. Arrow(→) indicates the direction of translation.

Table 5. Nucleotide sequence of PCR primers used in this study

Primer	Nuclotidesequence(5'→3')	Restriction enzyme	Source
ped-hup-3	GGC <u>CGG ATC CGT</u> CGA CCG GAA ATG A	<i>Bam</i> H I	This study
ped-hrp-3	GGC <u>CGG ATC CCT</u> ATT CTT GAT TAT GAA TTA ACC G	<i>Bam</i> H I	This study
ped-pMB-up	<u>GGA TCC</u> GTG ATG AAA AAA ATT	<i>Bam</i> H I	This study
ped-hrp	GGC <u>CGA GCT CCT</u> ATT CTT GAT TAT GAA TTA ACC G	<i>Sac</i> I	This study
P32-SI-up	GCG <u>CGT CGA CAG</u> ATT AAT AGT TTT AGC T	<i>Sal</i> I	This study
P32-Sc-tp	GCG <u>CGA GCT CGA</u> ATT TTT CTG CTG AAA C	<i>Sac</i> I	This study
ped-srp-1	GGC CGC ATT TAT GAT TAC CTT GAT		This study
ped-Crp-1	GGC CCT ACT GAT TAT TGT AAT CAG		This study

*Underline is the restriction enzyme site

4) Pediocin activity detection

Pediocin activity를 알아보기 위해 Agar well diffusion method를 변형시켜 사용하였다. pUCFP23과 pUCPM5, pCWPM30의 *E. coli* transformant들은 항생제가 포함되어 있지 않은 LB broth를 사용하여 37°C에서 18시간 동안 배양하여 원심분리 후 그 상층액 100ul를 test에 적용하였다. Positive control로써 *P. acidilactici* 배양액을 사용하였다.

8. 미생물균수의 측정

가. 총균수

Hurdle 효과 시험을 위한 과채류 및 두부 등의 총균수는 시료에 10배수의 멸균생리

식염수[0.85%(w/v) NaCl]를 가한 후 스토마커(Seward, Stomacher 400 circulator)로 균질화(260rpm, 2min)한 다음, 10진 희석하여 희석시료에 Plate Count Agar(Difco)를 pour plating 하고 35±1℃ incubator에서 48시간 동안 배양한 후 나타난 colony를 CFU/g으로 환산하였다.

나. 대장균 및 대장균군

대장균군은 시료에 10배수의 멸균생리식염수[0.85%(w/v) NaCl]를 가한 후 균질기(Stomacher 400 circulator, Seward, UK)로 균질화 한 다음, 1 mL를 취한 후 단계 희석하고 배지에 pour plating한 후 37℃ incubator에서 24~48시간 동안 배양한 다음 plate당 25~250개의 colony를 형성한 plate를 취하여 계수하고 시료 1 g 당 총균수로 환산하였다. 균수측정용 배지는 Coliform agar(Merch, Germany)를 이용하였다. 배양 후 나타난 적색 colony는 대장균군수로 자주색 colony는 대장균수로 판별하고 CFU/g으로 환산하였다.

다. 젖산균

시료에 10배수의 멸균생리식염수[0.85%(w/v) NaCl]를 가한 후 스토마커(Seward, Stomacher 400 circulator)로 균질화(260rpm, 2min)한 다음, 10진 희석하여 BCP plate count agar(Eiken Chemical Co., Japan)를 pore plating한 후 37℃에서 48시간 배양한 후 나타난 colony를 CFU/g으로 환산하였다.

라. *Bacillus cereus*

검체 중량의 9배수 멸균생리식염수[0.85%(w/v) NaCl]를 가한 후 스토마커(400 circulator, Seward, UK)로 균질화한 다음, 10배 단계 희석하여 각 단계 희석액 1 mL씩을 무균적으로 취한 후 Chromogenic *Bacillus cereus* selective supplement(Oxoid, UK)를 첨가한 Chromogenic *Bacillus cereus* agar(Oxoid, UK)를 분주하였다. 37±1℃에서 24시간 배양(HB-103M, Hanbaek, Korea)한 후 전형적인 집락을 형성한 집락을 계수하여 환산하였다.

9. 색도

시료의 갈변도 및 색도 변화는 spectrophotometer(UltraScan XE, Hunter Lab., USA)를

사용하여 RSIN(Reflectance Specular Included) mode로 시료 당 2개를 선정하여 표면부위 4 곳을 각각 2회 반복 측정 후, Hunter's value의 lightness를 나타내는 L값의 변화를 이용하여 나타내었으면 spectrophotometer의 조작조건은 Table 6과 같았다. 이때 Hunter 색차계의 밝은 정도를 나타내는 L값(Lightness), 붉은 색의 정도를 나타내는 a값(redness), 노란색의 정도를 나타내는 b값(yellowness) 및 ΔE 값을 측정하였다. 이때 표준 백색판(L : 97.83, a : -0.34, b : +1.98)을 표준판으로 이용하였다.

Table 6. Spectrophotometer operating condition for color change test.

Specification	Conditions
Instrument	HunterLab UltraScan XE
Scale	Hunter Lab
Illuminant	D65
Mode	RSIN
Port size	1.00"

10. pH 및 산도

pH는 pH meter (Mettler Delta 345, UK)로 측정하였으며 김치의 pH는 김치를 거즈로 착즙한후 착즙액의 pH를 pH meter (Mettler Delta 345, UK)로 측정하였다. 산도는 pH를 측정한 시료에 0.1N NaOH 용액으로 pH 8.1±0.2가 될 때까지 적정하여 NaOH 용액의 소비량(mL)을 구한 다음 lactic acid로 환산하여 산도를 구하였다.

11. 아미노산성 질소

시료 5g을 탄산가스를 제거한 물 250mL로 희석, 균일화하여 이중 25mL를 취하여 Formal법으로 아미노산성 질소량을 측정하였다.

$$\text{아미노산성 질소(mg\%)} = (V_1 - V_0) \times F \times 0.0014 \times D \times 1000 \times \frac{100}{S}$$

여기에서 V_1 : 본시험 소요된 0.1N-NaOH 용액의 양(mL)

V_0 : 공시험 소요된 0.1N-NaOH 용액의 양(mL)

F : 0.1N-NaOH 용액의 역가

D : 희석배수

S : 시료의 채취량(g)

0.0014 : 0.1N-NaOH 용액 1mL에 상당하는 질소량(g)

12. 코팅 필름의 항균제 용출

제조된 필름의 항균제 용출량을 측정하기 위해서 polylysine 코팅 필름을 $4 \times 4 \text{ cm}^2$ 크기로 절단하여 20 mL의 멸균증류수가 들어 있는 50 mL conical tube에 넣은 후 polylysine 용출량을 측정하였다. 측정방법은 BCA assay를 통해서 용출된 polylysine의 함량 변화를 측정하였다. protein 표준용액은 BSA(Bovine Serum Albumin, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

13. 코팅 필름의 항균활성

제조된 필름을 각각의 지시균주에 대한 항균활성은 agar diffusion method와 생균수 측정법을 이용하였다. agar diffusion method는 각각의 제조된 필름을 $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 로 절단한 필름을 agar plate에 위치시킨 후 저지환을 확인하였고, 생균수의 측정은 각각 1.0×10^6 CFU/mL 수준의 지시균주가 접종된 phosphate buffer(pH 7.0) 및 peptone water(pH 8.6)에 박테리오신 코팅필름($4 \times 4 \text{ cm}^2$)을 접촉시켜 지시균주의 생균수를 측정하였다.

14. 코팅 필름의 물리적 특성 시험

Polylysine 코팅 필름의 물성은 일반적으로 사용하는 범용성 필름을 대조구로 하여 이용성에 미치는 영향과 수분식품에 적용 시 수분에 의한 변화를 살펴보기 위하여 제조된 필름에 대해서 수분용해도 및 수분에 의한 polyamide 표면의 구조변화를 살펴보기 위해 주사현미경(S-2380N, HITACHI, Japan)을 이용하여 morphology를 관찰하였다.

가. 수분용해도(Water Solubility ; WS)

필름의 용해도는 용해도 측정용 필름을 $4 \times 4 \text{ cm}^2$ 의 크기로 절단하여 30 °C의 건조기에서 24시간 건조하여 초기의 건물함량을 측정하고, 건조된 필름을 50 mL 용량의 비이커에 넣은 후 증류수 약 30 mL를 첨가하고 입구를 parafilm으로 밀봉하여 25 °C의 정온기에 넣고 6시간마다 흔들어 주면서 24시간 동안 유지하였다. 필름의 용해도는

초기의 건물에 대한 물에 용해된 양을 백분율로 나타내었다.

나. 필름의 형상(Morphology) 관찰

Polylysine 코팅 필름의 표면이 수분에 접촉되었을 때의 필름의 형상이 어떻게 변형되는지를 조사하고자 주사 현미경(Scanning Electron Microscope, S-2380N, Hitachi, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 측정은 각각의 시편을 액체 질소하에 1.0×1.0 cm²로 절단한 후 이온코팅기(Model Eiko IB-3, Japan)를 사용하여 약 500 Å 두께의 금을 Sputtering 한 후 주사현미경으로 전압 18 kV, 전류 90 Å 조건하에서 2,000배 배율로 관찰하였다.

15. 코팅 필름의 polylysine 용출 및 항균특성

제조된 polylysine 코팅 필름의 온도, pH 및 식염농도에 따른 polylysine 용출 및 항균활성의 영향을 살펴보기 위해서 위의 4-2와 4-3의 방법으로 측정하였다.

16. 조직감

과육의 조직감은 Texture analyzer(TA-XT2, Stable Micro System, England)를 이용하여 7mm의 두께로 절단한 사과를 rupture test로 측정하였다. 측정결과는 probe가 접촉한 시료에 가해진 힘 force(kg) 값으로 나타내었으며 처리구당 3개의 시료를 무작위로 선택, 각 시료에 대해 4회 반복 측정한 후 평균치를 나타내었으며, 측정조건은 Table 7과 같다.

Table 7. Operation conditions of Texture analyzer

Specification	Condition
Mode	Measure force in compression
Distance format	25% strain
Pre-test speed	2.0 mm/s
Test speed	1.0 mm/s
Post-test speed	2.0 mm/s
Probe	Plastic plunger(cylindrical type, 10 mm diameter)

저장에 따른 약식의 경도 변화는 Texture analyzer(TA-XT2, Stable Micro System, England)를 이용하여 약식 밥알을 rupture test로 측정하였다. 측정결과는 probe가 접촉한 시료에 가해진 힘 force(g) 값으로 나타내었고 모든 측정은 10회 이상 반복 측정한 후 평균치로 나타내었으며, 측정조건은 Table 8과 같다.

Table 8. Operation conditions of Texture analyzer

Specification	Condition
Mode	Measure force in compression
Distance format	50% strain
Pre-test speed	5.0 mm/s
Test speed	1.0 mm/s
Post-test speed	5.0 mm/s
Probe	Plastic plunger(cylindrical type, 10 mm diameter)

17. Vitamin C 함량

시험용 시료의 vitamin C 함량은 HPLC법으로 측정하였다. 즉, 시료 약 10 g을 취하여 일정량의 5%(w/v) metaphosphoric acid를 가하여 저온에서 신속히 추출한 다음 원심분리(2000 rpm × 10 min)한 뒤 상등액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 HPLC 분석시료로 이용하였다. 이 때 분석조건 Table 9와 같으며, 다음 식으로 vitamin C의 함량을 계산하였다.

$$\text{비타민 C 함량(mg/100g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체채취량}(g)} \times \frac{100}{1000}$$

S : 검량곡선 상에서 구한 비타민 C의 함량(μg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

18. 유리당 함량

시료 약 5 g을 100 mL의 공전 플라스크에 취하고 약 50%(v/v) 에탄올 용액 100

mL를 가한 다음 필요에 따라 10% 수산화나트륨을 사용하여 중화하였다. 30분간 초음파로 추출하고 추출액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC 분석시료로 이용하였다. 이 때 분석조건은 Table 10과 같으며 표준당 검량곡선으로부터 다음 식으로 유리당 함량을 계산하였다.

$$\text{당함량(g/100g)} = S \times \frac{a \times b}{\text{검체채취량(g)}} \times \frac{100}{1000}$$

S : 검량곡선 상에서 구한 당의 함량(mg/mL)

a : 시험용액의 전량(mL)

b : 시험용액의 희석배수

Table 9. HPLC operating conditions for the analysis of vitamin C

Specification	Conditions
Instrument	JASCO HPLC system
Detector	UV/VIS 254 nm
Oven temp.	40°C
Flow rate	1.0 mL/min
Column	Waters μ Bondapak C ₁₈ (3.9 mm×300 mm)
Mobile phase	50 mM sodium phosphate : MeOH = 9 : 1

Table 10. HPLC operating conditions for the analysis of free sugar

Specification	Conditions
Instrument	JASCO HPLC system
Detector	RI
Oven temp.	40°C
Flow rate	1.0 mL/min
Column	Carbohydrate Cartridge(4.6 mm×250 mm)
Mobile phase	CH ₃ CN : H ₂ O = 75 : 25

19. 중량감소율

중량감소율은 처리 직후 PP필름에 포장한 다음 필름의 중량을 뺀 사과와 중량에서 저장 중 측정된 시료의 중량을 뺀 값으로 처리 직후 중량에 대한 백분율로 나타내었다.

20. 산도 측정

시료의 산도는 시료의 각 부위별로 균일하게 채취하여 blender(Oster 861-66L, USA)로 균질화하고 시료액 50~100 mL를 비이커에 취한 다음 pH meter(ORION 520A, Orion Research Inc., USA)를 이용하여 0.1 N NaOH(Yakuri pure chemical Co., Japan) 용액으로 pH 8.2까지 적정하고 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{산도(젓산\%)} = \frac{V \times f \times 0.009}{W} \times 100$$

V : 시료액을 적정하는데 소요된 0.1 N NaOH 용액의 양(mL)

W : 적정에 사용된 시료액의 양(mL)

f : 0.1N-NaOH 용액의 역가

21. 관능평가

포장 두부의 관능평가는 맛, 색, 향 및 종합적인 기호도에 대하여 차이 식별 능력이 있는 10명의 panel을 선정하여 최고 5점, 최저 1점으로 5단계 기호도척도법으로 실행하였다. 이때 관능평점은 5 대단히 좋다(very good), 4 약간 좋다(good), 3 보통이다(fair), 2 약간 나쁘다(poor), 1 대단히 나쁘다(very poor)로 하였다.

각 저장시료에 대한 관능검사는 7명으로 구성된 패널요원이 Kader 등⁽²⁸⁾의 방법에 따라 종합적으로 관찰하여 9점 척도로 평가하였으며, 종합적 기호도는 5점까지를 저장수명의 한계로 설정하였다.

제 3 절 결과 및 고찰

1. Pediocin 대량 생산기술 개발

가. Pediocin 생산 transformant 개발

1) Pediocin 생산 vector의 construction

Pediococcus acidilatici M의 total DNA를 template로 하여 designed primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과 132bp의 크기의 증폭된 DNA fragment를 얻었다(Fig. 6).

증폭된 DNA fragment를 제한효소로 처리하고, 미리 준비하여둔 pGEX-4T-1와 ligation시켜 *E. coli* BL21(DE3)에 transformation시켰다. Transformant를 OD 600=0.6 일때 1mM IPTG를 첨가하여 배양하였고, *E. coli* cell 내에서 pediocin의 induction 여부를 total cell의 SDS-PAGE를 수행하여 확인하였다(Fig. 7). 그결과 예상되는 단백질 크기인 30kDa에서 overexpression된 것을 확인할 수 있었다. 이 크기는 Pediocin 단백질 4kDa과 GST 단백질 26kDa이 fusion되어 발현된 크기로 예상되었던 결과이다.

Pediocin이 대량발현된 균주를 초음파 파쇄기를 이용하여 cell내의 protein을 얻은후, GST-bind resin을 이용하여 pediocin만을 분리·정제하였다. 정제된 단백질에 thrombin protease를 처리하여 GST부분만을 절단해내고 이를 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다(Fig. 8).

분리정제된 GST fused pediocin은 예상되었던 약 30kDa 크기임을 확인하였고, thrombin protease를 처리하여 확인한 결과 35kDa 정도의 thrombin protease band와 26kDa의 GST 단백질의 band가 확인되었고, 4kDa의 pediocin 단백질은 크기가 작은 관계로 본 정기영동으로써는 detection하기 힘들었으나, 본 실험의 결과로 미루어 볼 때 약 4kDa의 크기로 발현되었을 것으로 추정할 수 있었다.

2) 발현 pediocin 유전자의 준비

Pediocin 유전자를 ped-GST up, ped-GSTfull rp primer들을 이용하여 PCR을 수행한 결과 pedA, pedB, pedC, pedD의 크기를 합한 3kb 가량의 signal을 확인할 수 있다(Fig. 9).

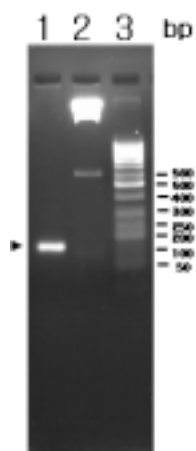


Fig. 6. Electrophoresis of pediocin PCR product.
 lane 1 : amplified pediocin fragment, lane 2 : lamda DAN digested with HindIII, lane 3 : 50bp DNA ladder

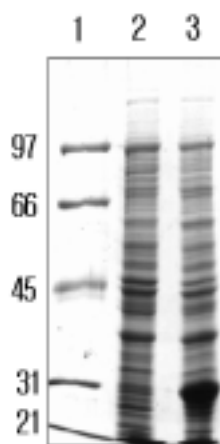


Fig. 7. SDS-PAGE of total cell protein.
 lane 1 : low range marker, 2 : cells of transfected with pET-22b(+) vector, lane 3 : cultured cells after induction

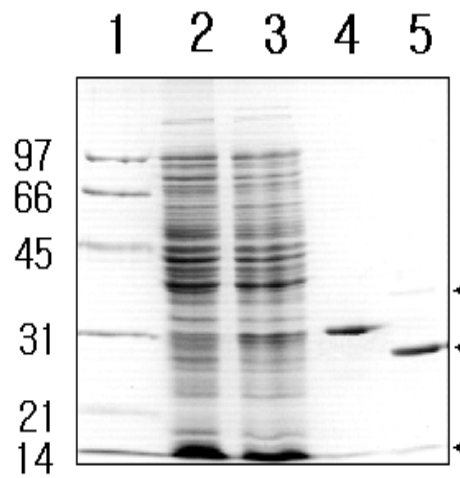
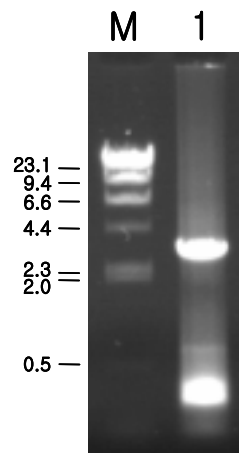


Fig. 8. SDS-PAGE of purification steps.

lane 1 : low range marker, lane 2 : cells of transfected with pET-22b(+) vector, lane 3 : cultured cells after induction, lane 4 : GST-bind resin elution fraction, lane 5 : treated with thrombin protease



9. Pediocin PCR product.

3) 재조합 유전자의 구축

Transformant에 construction된 DNA를 찾기 위하여 colony PCR을 수행하였다. 그 결과 3.5kb의 pediocin유전자와 같은 크기의 signal을 가진 colony를 찾았고, 이 colony로부터 plasmid를 분리하였다. 분리된 plasmid는 *EcoRI*으로 digestion하여 그 크기를 다시 한번 확인하였다(Fig. 10).

4) 재조합 pediocin의 정제 및 활성측정

overexpression host인 *E. coli* BL21(DE3)가 생산하는 GST-fused pediocin을 GST-bind resin으로 분리하여 GST-fused pediocin과 GST가 절단된 pediocin의 활성을 indicator strain으로 *E. faecalis*를 이용하여 측정한 결과, GST-fused pediocin은 활성을 나타내지 않았으나 GST가 절단된 pediocin에서는 clear zone을 확인할 수 있어 pediocin의 활성을 확인할 수 있었다. *E. coli* BL21(DE3)을 실험실에서 2주회 1회씩 5회 계대배양하면서 paper disk법으로 활성을 측정한 5회 계대 이후에도 안정적으로 활성이 유지됨을 확인하였다. 현재 분리한 pediocin의 온도, pH, 유기용매 등에서의 활성을 측정하였다.

5) 고효율 발현 vector의 construction 및 발현

(가) Construction of pUCFP23

Venema et al.에 따르면 *pedA*의 352bp upstream에 위치하고 있는 *Sal I-EcoR V* DNA fragment를 deletion 시켰을 때 *P. pentosaceus*에서의 pediocin 생산이 전혀 되지 않는다고 보고하였다. Coderre et al.의 보고에서는 아마도 이 upstream region이 control element일 것으로 여겨지지만 *E. coli*나 다른 균주에서 실제로 꼭 필요한 region은 아닌 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과들로 보아 *pedA* upstream region은 pediocin을 생산하는 wild type의 균주에서 강력한 promoter와 같은 역할을 하는 것으로 여겨지며 다른 균주에서는 그 host cell에 맞는 promoter가 존재할 때 이 region은 필요없는 부분일 것으로 예상된다. 따라서 이번 연구에서는 첫 번째로 *pedA*의 352bp upstream에 위치하고 있는 *Sal I-EcoR V* DNA fragment를 pUC19에 insertion시켜 *E. coli*에서의 그 발현 유무를 먼저 확인해 보고 *E. coli*-LAB shuttle vector인 pCW4에 도입하여 *L. mesenteroides*에서의 발현을 유도해 보고자 하였다. 왜냐하면 pCW4 vector에는 강력한 promoter region이 없기 때문이다. 그 결과 pUCFP23이라는 vector를 construction하였다 (Fig. 11).

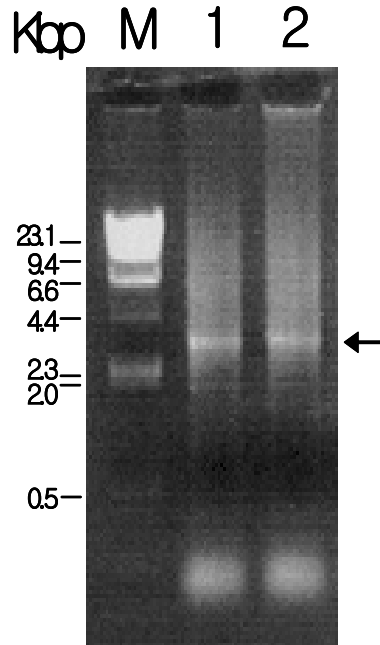


Fig. 10. colony PCR.

이 vector는 PCR로 재확인 과정을 거친 것으로 이 때 사용한 ped-srp-1은 pedA의 3' region에 상보적인 primer를 제작하여 사용한 것으로 1.2kb의 PCR product가 나오면 양성인 것으로 확인되어질 수 있다. pUCFP23을 *E. coli* DH5 α 에 transformation하여 얻어진 colony를 agar well diffusion method로 pediocin activity를 알아본 결과 pediocin M 발현이 되지 않았음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 pUC19 vector에 이미 존재하고 있던 *E. coli*에서 이용가능한 promoter (lacZ promoter)와 LAB에서 promoter로 작용할 것으로 여겨지는 pedA의 upstream region이 함께 존재하게 되어 lacZ의 promoter 활성이 떨어진 것으로 추측되어진다. 또 다르게는 이러한 이중 promoter들의 상호작용으로 인한 promoter 활성저하로 pediocin M의 발현이 저지된 것이 아니라 삽입하고자 했던 insertion DNA가 역방향으로 pUC19에 ligation되어 들어가 있을 경우를 생각해 볼 수 있다. 이러한

경우에는 *lacZ* promoter로부터 전사되는 *pediocin* gene의 방향이 반대이기 때문에 원래의 단백질 발현이 될 수 없다. 이러한 의문점은 차후 DNA sequencing을 통해 확인해 볼 예정이다.

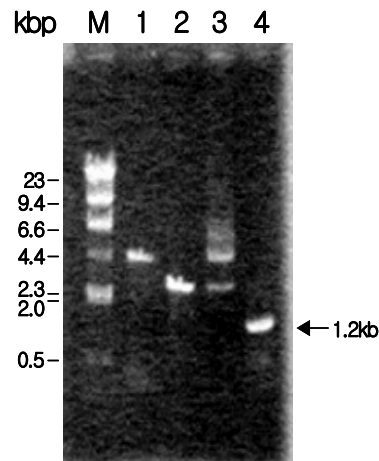


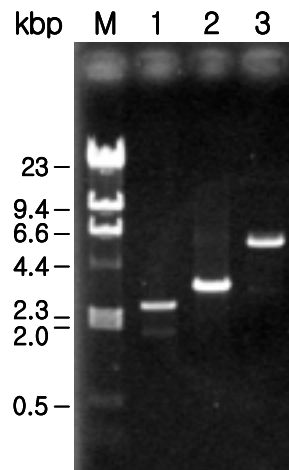
Fig. 11. Confirmation of recombinant DNA: pUCFP23.

Lane M, λ DNA digested with *Hind* III; lane 1, 4.4kb insert DNA (PCR product); lane 2, pUC19 digested with *Bam*H I; lane 3, pUCFP23 digested with *Bam*H I; lane 4, 1.2kb PCR product for transformant detection.

(나) Construction of pUCPM5

pUCFP23에서처럼 두 개의 이중 promoter가 함께 존재함으로써 그 활성이 떨어진다 는 가정하에 두 번째로 *pedA*의 upstream region을 포함시키지 않은 나머지 *pediocin* gene만을 cloning하였다. 즉, signal peptide를 암호화하고 있는 부분을 포함한 premature *pedA*에서부터 *pedD*까지의 DNA region을 PCR로 증폭시켜 pUC19에 insertion하였다. 그 결과 pUCPM5를 construction하였다(Fig. 12). 이 plasmid에는 *lacZ* promoter만이 존재하여 이중 promoter의 영향을 받지 않고 발현을 유도할 수 있어 premature form의 *pediocin* M이 발현되고 *pedD*로부터 premature form *pediocin* M을 active *pediocin* M으로 processing하는 protein이 발현되어 *pediocin* activity가 나타날 것으로 예상하였다.

A.



B.

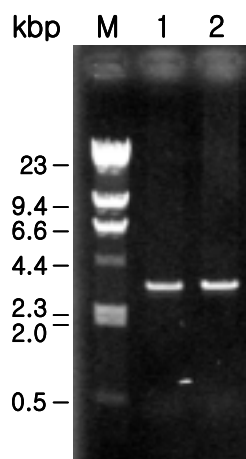


Fig. 12. Confirmation of recombinant DNA: pUCPM5.

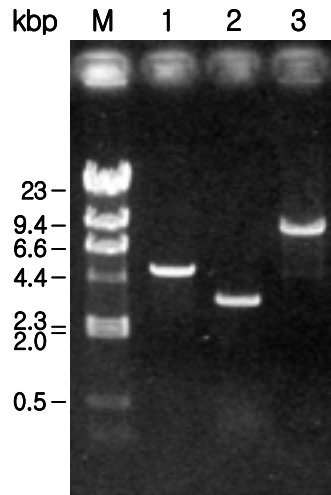
A, restriction enzyme treatment. Lane M, λ DNA digested with *Hind* III; lane 1, pUC19 digested with *Bam*H I; lane 2, premature *pedA*~*pedD* PCR product; lane 3, pUCPM5 digested with *Bam*H I. B, PCR amplification using *ped*-pMB-up and *ped*-hrp-3 primer set. Lane 1, *P. acidilactici*; lane 2, pUCPM5 as a PCR template.

그러나 pUCPM5 또한 pUCFP23과 마찬가지로 pediocin activity가 나타나지 않았다. 이러한 현상은 Coderre et al.의 보고에서도 보여지고 있는 결과로 여기에 이차적으로 *repA* 라는 replicon과 p2201이라는 promoter를 *pedA* upstream region에 insertion시켰을 때에는 *E. coli* DH5 α 에서 pediocin activity를 나타낸다고 보고하였다. 또 Bukhtiyarova et al.에 따르면 promoter를 가지지 않은 *E. coli*-*Bacillus subtilis* shuttle vector에 pediocin gene인 *papA*~*papD*를 삽입했을 때 *E. coli* JM109에서는 pediocin activity가 존재하는 것으로 나타나 있다. 이러한 결과들로 미루어 보아 promoter의 존재 유무가 꼭 pediocin 발현 유무와 절대적 관련이 있는 것은 아님을 알 수 있었다.

(다) Construction of pCWPM30

여러 균종으로부터 분리되어 연구되어지고 있는 많은 Small cryptic plasmid들이 있다. 이들은 전체 size가 작고 replicon을 가지고 있기 때문에 Food-grade vector를 만드는데 많이 이용되어지고 있다. Biet F. et al.의 논문을 살펴보면 *L. mesenteroides* subsp. *Mesenteroides* Y110으로부터 pTXL1이라는 약 2.7kb의 cryptic plasmid를 분리하여 replication에 필요한 최소한의 DNA region인 replicon에 erythromycin resistance gene을 insertion시켜 Food-grade vector로 development 시켰다. 이 논문에서는 bacteriocin class II에 속하는 mesentericin Y105의 DNA를 개발한 vector에 insertion하여 *Leuconostoc* sp. (non bacteriocin activity)로부터 mesentericin Y105의 발현을 보여주었다. 그러므로 이번 연구에 필요한 vector의 구비조건으로는 *L. mesenteroides*에서 replication가능한 replicon과 pediocin M의 발현을 이끄는 promoter 그리고 selection marker가 필요함을 알 수 있다. 경희대 생명과학부 유전공학전공 정대균 교수님 연구실로부터 pCW4와 pCW5 vector를 제공받았다. pCW4 vector에는 pC7, Em^r, ColE1, MCS (multiple cloning site)가 존재하며 pCW5 vector에는 pCW4 vector의 구성외에 P32 promoter와 GFP (green fluorescent protein)가 추가적으로 삽입되어있어 LAB-*E. coli* shuttle vector로 사용할 수 있다. pCW5는 P32 promoter를 이용하고자 할 때 사용하였다. 여기서 pC7은 *Lactobacillus paraplantarum* C7으로부터 분리된 약 2.1kb의 small cryptic plasmid로 위의 pTXL1과 같은 기능을 기대할 수 있다. 이번 연구에서는 먼저 일차적으로 pCW4에 135bp의 mature pediocin gene을 삽입하여 pCWPM30이라는 vector를 construction하였다(Fig. 13A). PCR로 확인결과 예상했던 1.1kb의 band가 나타났다(Fig. 13B).

A.



B.

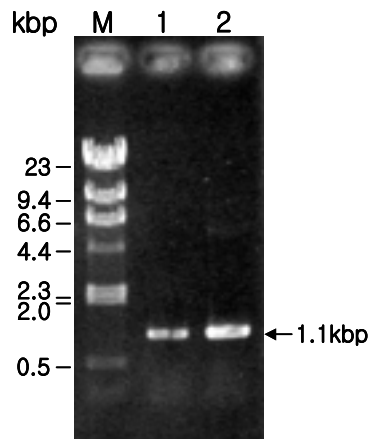


Fig. 13. Confirmation of recombinant DNA: pCWPM30.

A, restriction enzyme treatment. Lane M, λ DNA digested with *Hind* III; lane 1, pCW4 digested with *Bam*H I; lane 2, premature *pedA*~*pedD* PCR product; lane 3, pCWPM30 digested with *Sac* I. B, PCR amplification using *ped*-pMB-up and *ped*-Crip-1 primer set. Lane 1, *P. acidilactici*; lane 2, pCWPM30 as a PCR template.

이 때 사용한 ped-Crp-1은 *pedC*의 3' region에 상보적인 primer로 제작한 것이다. 이 vector를 *E. coli* DH5 α 에 transformation시켜 pediocin activity를 test해 본 결과 예상했던 것처럼 음성으로 나타났다(Fig. 14). 왜냐하면 pCWPM30에는 promoter가 없기 때문인 것으로 현재 pCW5에서부터 P32를 PCR로 증폭시켜 pCWPM30에 insertion하는 실험을 수행중이다. pCW5의 P32 promoter에 의해 발현조절되는 GFP와 마찬가지로 premature pediocin과 그 외 필요한 protein들이 문제없이 발현되어 pediocin activity가 나타나 질 것으로 예상된다.

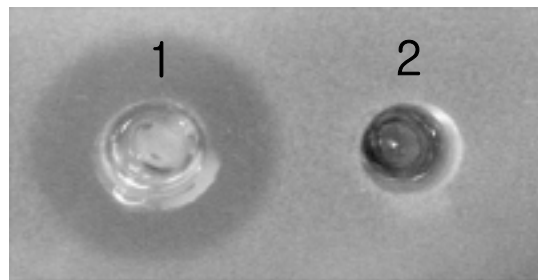


Fig. 14. Antimicrobial activities of *E. coli* DH5 α containing pCWPM30 transformant. 1, *P. acidilactici* supernatant; 2, *E. coli* DH5 α harboring pCWPM30 supernatant.

나. Pediocin의 최적 대량배양 확립

Pediocin A, pediocin PA-1, pediocin AcH, pediocin SJ-1, pediocin N5P 등 *Pediococcus* spp.가 생산하는 다양한 pediocin의 생산 보고가 있었으나, *Pediococcus* spp.에 의한 직접적인 pediocin의 생산에 관한 보고는 거의 없는 실정이다. 또한 연구보고의 대부분도 생산균주의 유전자조작에 초점이 맞추어진 것이 대부분이다. Bacteriocin의 생산은 일반적으로 생육과 연관이 되어 있거나 반드시 생육속도가 bacteriocin의 생합성량과 관련이 있는 것은 아니라고 알려져 있다. 최적생산조건이 아닌 pH 또는 생육온도가 오히려 생합성량을 촉진한다는 보고도 있다. 본 연구에서는 pH, 다양한 질소원, 망간, 마그네슘 등의 발효조건을 검토하여 *Pediococcus acidilactici* M의 최적 pediocin 생산조건을 확립하는 것을 목표로 하였다.

1) MRS 배지에서 배양조건

Pedococcus acidilactici M 원균주의 native pedicin의 생산조건 최적화를 위해 일반적으로 LAB의 배양에 가장 널리 사용되고 있는 MRS broth에서 배양한 결과 배양 시간 12시간에서 1,020AU/mL의 가장 높은 pedicin 활성을 나타내었다(Fig. 15). Tween 80은 bacteriocin의 생합성을 촉진하는 효과를 가지지만 분리와 정제시에는 분리와 정제를 어렵게 한다고 알려져 있다. Tween 80을 첨가하지 않는 TF-mMRS broth에서의 배양 결과 Fig. 16에서와 같이 배양 27시간후 390AU/mL의 pedicin activity를 나타내어 MRS broth에서의 배양에 비해 약 1/3정도 생산량이 감소하였다.

정치배양, 진탕배양 및 stirred cell에서의 배양 등 배양방법에 따른 pedicin activity와 *Pedococcus acidilactici* M의 생산량의 비교한 결과 진탕배양은 Fig. 17에서와 같이 배양 15시간후 810AU/mL의 pedicin 활성을 나타낸 반면, Fig. 18에서와 같이 정치배양은 배양 12시간후 1,066AU/mL의 pedicin activity를 나타내어 진탕배양보다는 정치배양이 보다 적합한 것으로 나타났다. Stirred cell 배양에서는 배양 12시간후 1,050AU/mL로 정치배양에 비해 pedicin activity는 거의 차이를 보이지 않았으나 생육속도는 다소 빠른 것으로 나타났다(Fig. 19).

한편, 통상적으로 bacteriocin의 생산량에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려진 pH의 영향을 알아보기 위하여 초기 pH를 달리하여 생육기간중 native pedicin의 생산량을 측정한 결과 초기 pH 5.4가 초기 생육속도는 다소 느리나 최대생산량에서는 1,066AU/mL 이상으로 가장 우수한 것으로 나타났다(Fig. 20~22).

질소원으로는 Yeast extract를 질소원으로 하여 배양한 경우 배양 15시간후 1,086AU/mL의 pedicin activity를 나타내어 가장 높은 활성을 나타내었으며, Tryptone은 배양 18시간후 620AU/mL을, Peptone은 배양 15시간후 886AU/mL을, 그리고 Meat extract는 배양 15시간후 933AU/mL을 나타내었다(Fig. 23~25).

MgSO₄와 MnSO₄의 영향을 검토한 결과 MgSO₄ 0.015% 농도에서 배양 15시간후 1,200AU/mL을(Fig. 26), 그리고 MnSO₄ 0.020% 농도에서 배양 15시간후 1,220AU/mL(Fig. 27)로 가장 높은 pedicin activity를 나타내었다.

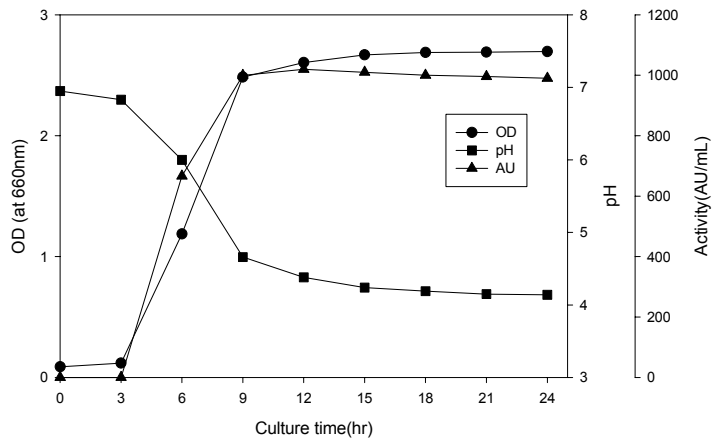


Fig. 15. Production of pediocin during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth.

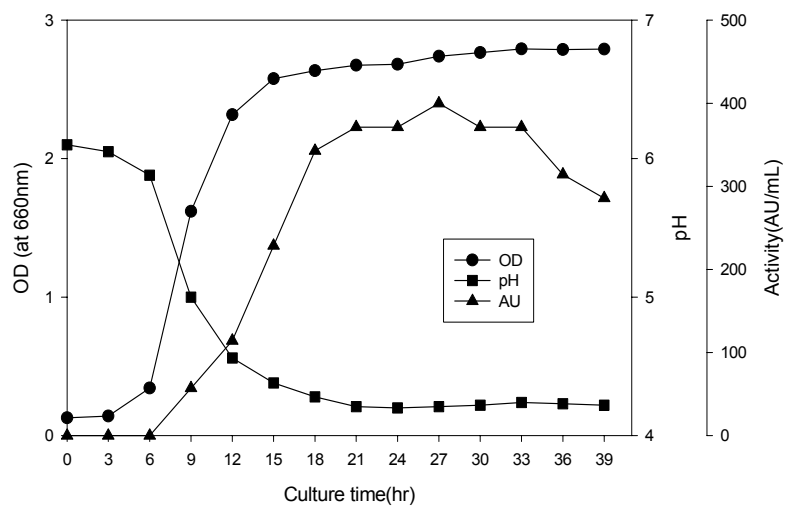


Fig. 16. Production of pediocin during growth of *Pediococcus acidilactici* M in Tween 80 free MRS (TF-mMRS) broth.

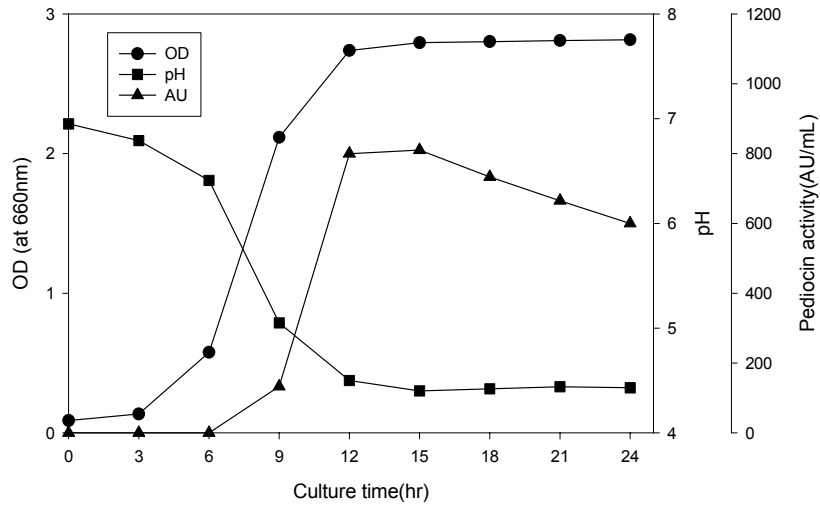


Fig. 17. Production of pediocin during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth by shaking incubation.

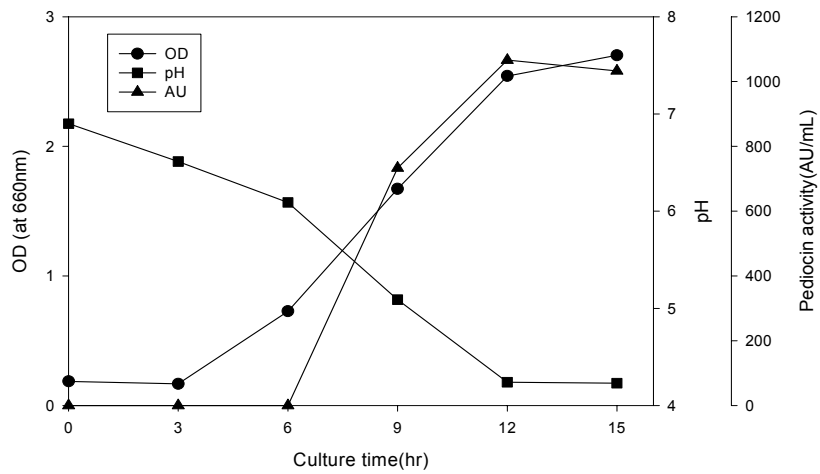


Fig. 18. Production of pediocin during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth by standing culture.

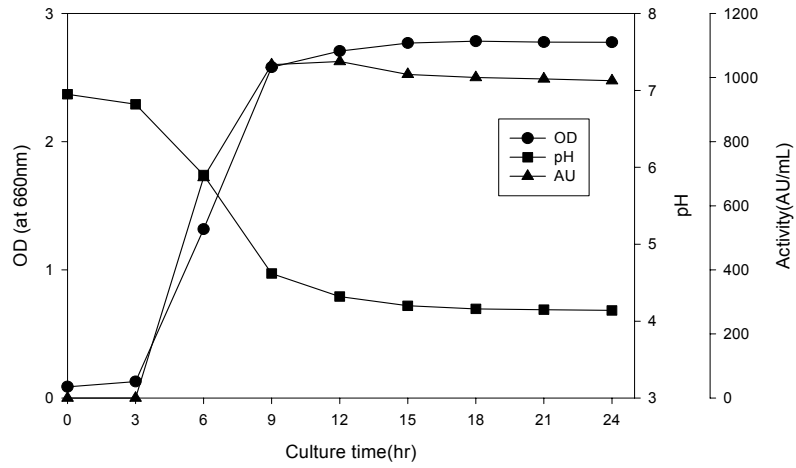


Fig. 19. Production of pediocin during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth by stirred cell culture.

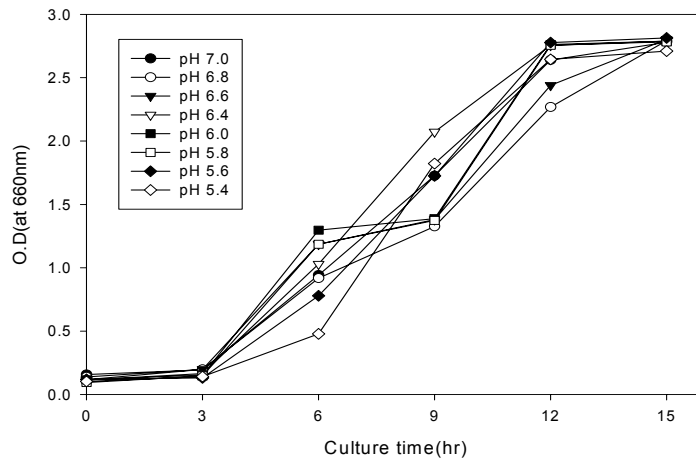


Fig. 20. Production of pediocin during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth with various initial pH.

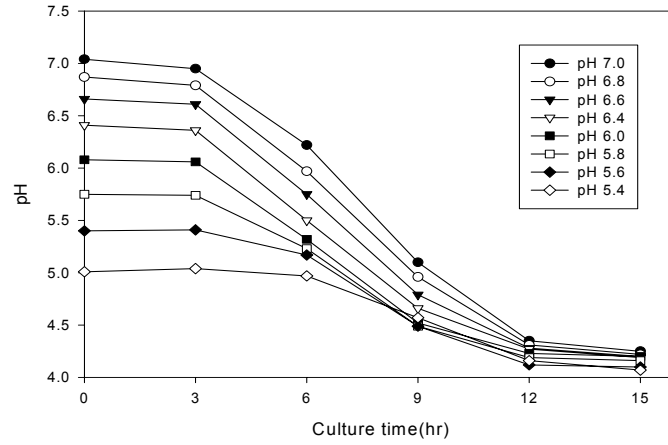


Fig. 21. Changes in pH during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth with various initial pH.

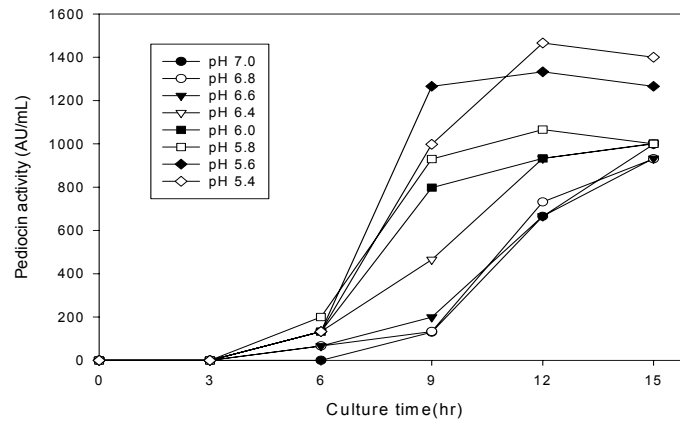


Fig. 22. Changes in pediocin activity during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth with various initial pH.

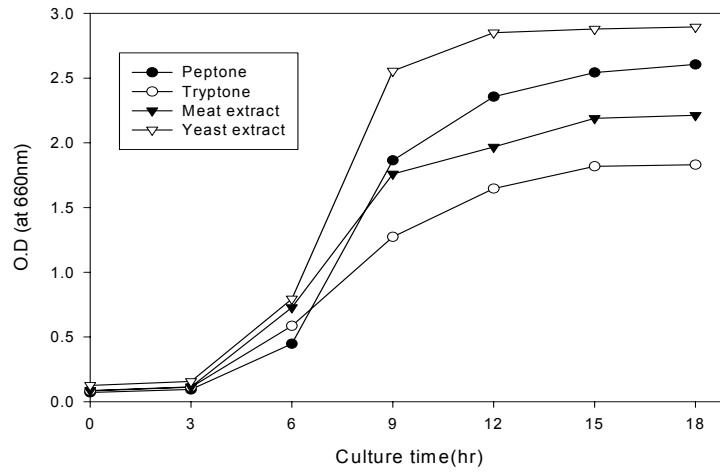


Fig. 23. Changes in OD of MRS broth during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth with various nitrogen sources.

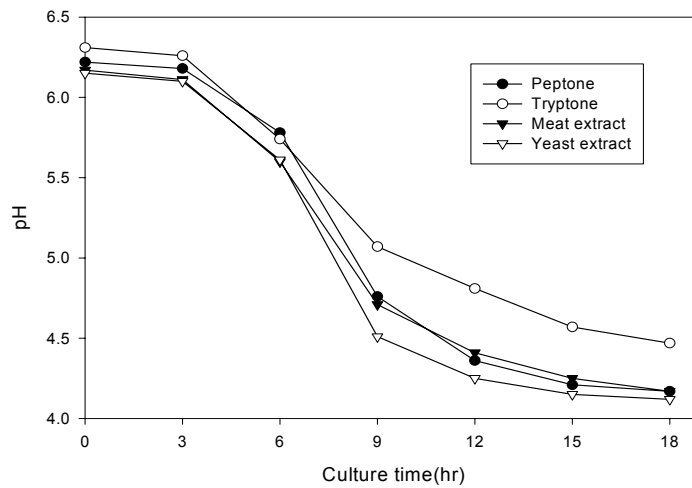


Fig. 24. Changes in pH of MRS broth during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth with various nitrogen sources.

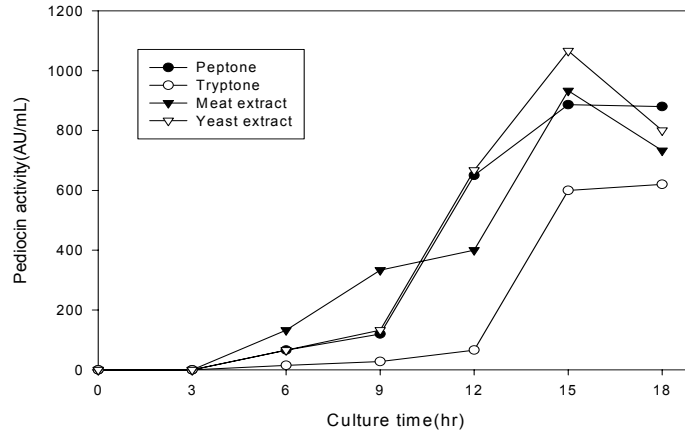


Fig. 25. Changes in pediocin activity of MRS broth during growth of *Pediococcus acidilactici* M in MRS broth with various nitrogen sources.

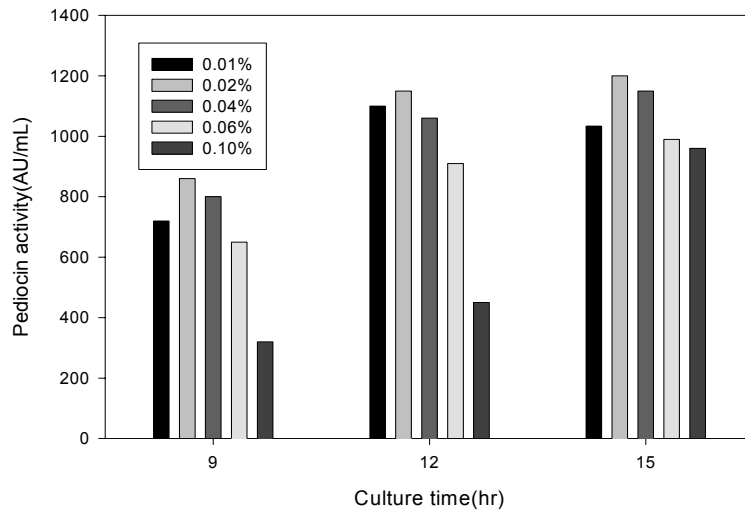


Fig. 26. The effect of $MgSO_4$ on the production of pediocin.

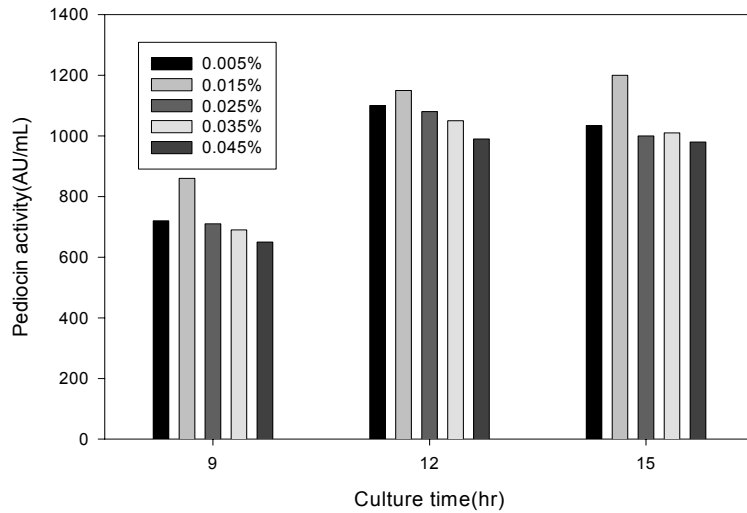


Fig. 27. The effect of $MnSO_4$ on the production of pediocin.

2) pediocin 최적 배양조건 확립

상업화된 nisin이 whey를 기반으로 하는 배지를 통해 생산이 되고 있는 점과 whey가 젖산균의 배양에 효율적이라는 기존의 연구 결과를 바탕으로 하여 본 pediosin의 생산에 있어서도 whey를 기반으로 하는 최적 생산배지와 배양 조건을 검토하였다.

whey를 구성하는 단백질, 지방질 및 탄소원의 자화 능력을 향상시키기 위해 HCl을 이용하여 whey를 산분해시킨 결과를 Table 11에서와 같다. Whey의 농도를 각각 10%, 20% 및 30%로 하고 이때 가열전 최종 pH를 각각 4.5 4.0 및 3.5로 조정하여 121℃에서 15분간 가압가열한후 이를 냉각하고 8,000rpm에서 원심분리하여 불용성의 cluster를 분리제거한후 각각의 조단백질 함량, 단백질 함량, 조회분, 환원당 함량, hexose 함량을 측정된 결과, 조단백질 함량은 초기 whey의 농도가 높을 수록, pH가 낮을 수록 함량이 증가하였으며, 단백질 함량도 동일한 경향을 나타내었다. 환원당 함량은 10% whey가 6~8%, 20% whey가 15~17%, 30% whey가 25~27% 수준이었으나 hexose의 함량은 pH가 낮을 수록 대체적으로 함량이 감소하였는데 이는 가열에 의한 전환으로 인해 함량이 감소하는 것으로 추정되었다.

Table 11. Component of acidified whey according to whey concentration and acidifying pH

Acidifying condition		Content(%)				
Concentration of whey(%)	Final pH	Crude protein	Protein	Crude ash	Reducing sugar	Hexose
10	4.5	0.65	0.43	1.03	6.55	5.62
10	4.0	0.77	0.49	1.13	6.96	4.64
10	3.5	0.94	0.71	1.20	8.31	1.58
20	4.5	1.28	1.15	1.81	17.88	3.33
20	4.0	1.31	1.26	1.98	15.78	5.41
20	3.5	1.42	1.12	2.17	15.63	5.71
30	4.5	1.80	1.66	2.71	26.69	2.21
30	4.0	1.82	1.72	2.86	27.52	6.00
30	3.5	1.79	1.65	3.18	25.32	2.66

가) whey 및 질소원에 따른 생육패턴

Whey의 농도를 배지의 최종농도로 각각 0.2%, 0.0% 및 10%로 하고 *P. acidilactici* M seed culture 1mL(v/v)를 접종하여 배양한 결과는 Fig. 28과 같이 whey만을 사용했을 경우 *P. acidilactici* M의 생육에 적합한 환경을 제공하지 못하는 것으로 나타났다. Fig. 29에서와 같이 Whey의 농도를 배지의 최종농도로 각각 0.2%, 0.0% 및 10%로 하고 Tryptone을 각각 1%, 2% 및 3%로 첨가한 경우에는 whey만을 사용한 경우에 비해 증식이 향상되었으나 대조구인 MRS에 비해서는 현저한 차를 보였다. Yeast extract를 각각 1%, 2% 및 3%로 첨가한 경우에도 whey만을 사용한 경우에 비해 증식이 향상되었으나(Fig. 30) 대조구인 MRS에 비해서는 현저한 차를 보였지만 Tryptone을 첨가한 배지에 비해서는 Yeast extract 3%와 2%의 whey를 첨가한 배지가 상대적으로 좋은 증식을 보였다. Beef extract 및 Peptone을 각각 1%, 2% 및 3%로 첨가한 경우에도 전반적으로는 첨가량이 증가할 수록 증식은 향상되는 것으로 나타났다. Yeast extract에 비해서는 증식속도가 낮은 것으로 나타났다(Fig. 31~36).

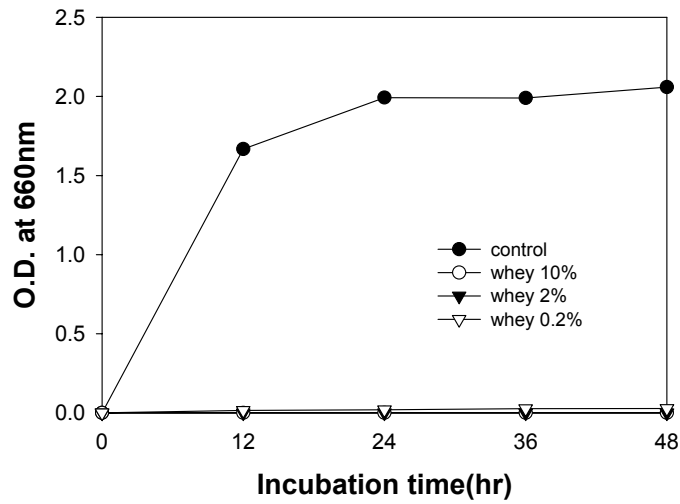


Fig. 28. Growth of *P. acidilactici* M in medium containing different concentration of whey during incubation at 37°C.

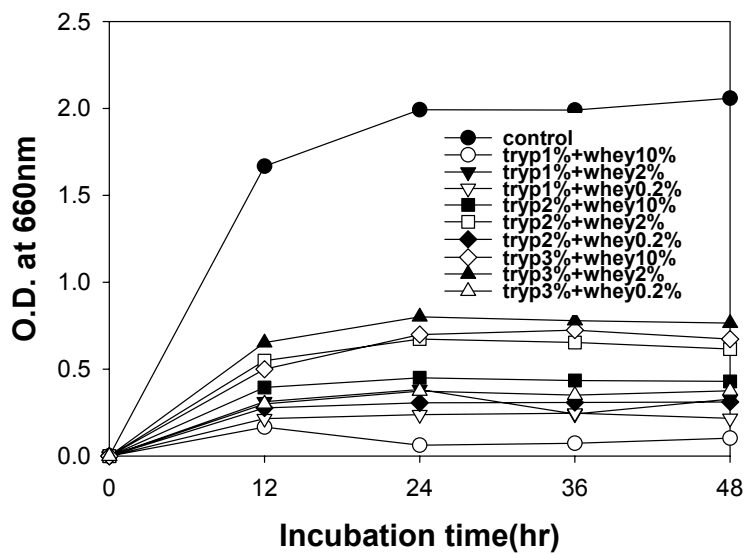


Fig. 29. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of whey and tryptone during incubation at 37°C.

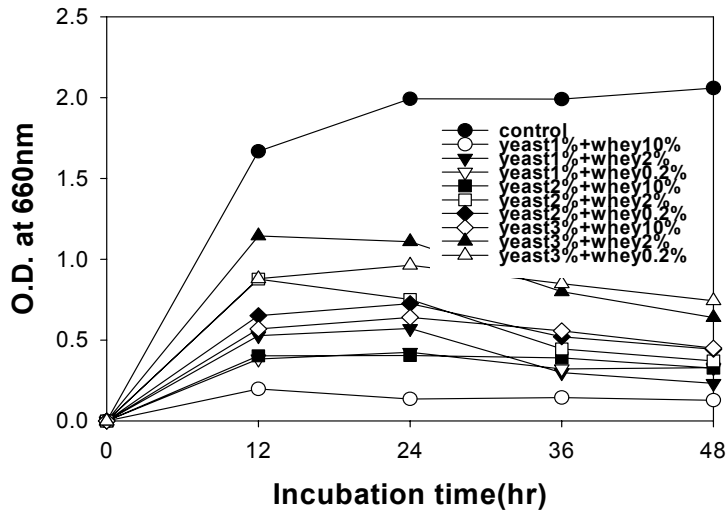


Fig. 30. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of whey and yeast extract during incubation at 37°C.

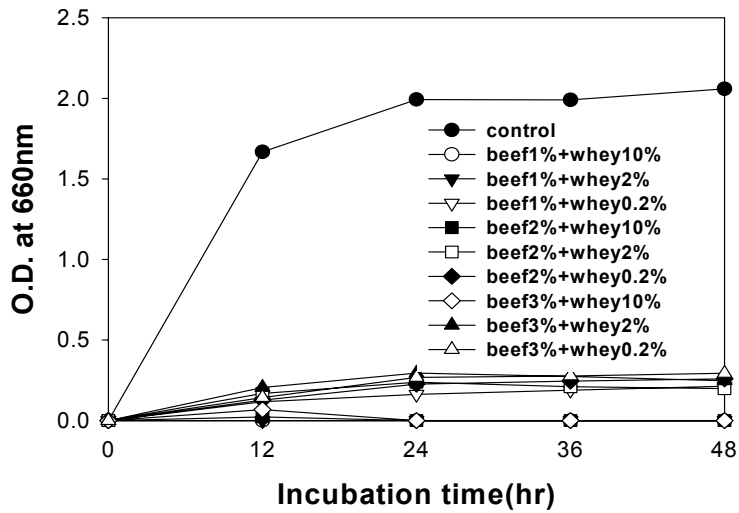


Fig. 31. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of whey and beef extract during incubation at 37°C.

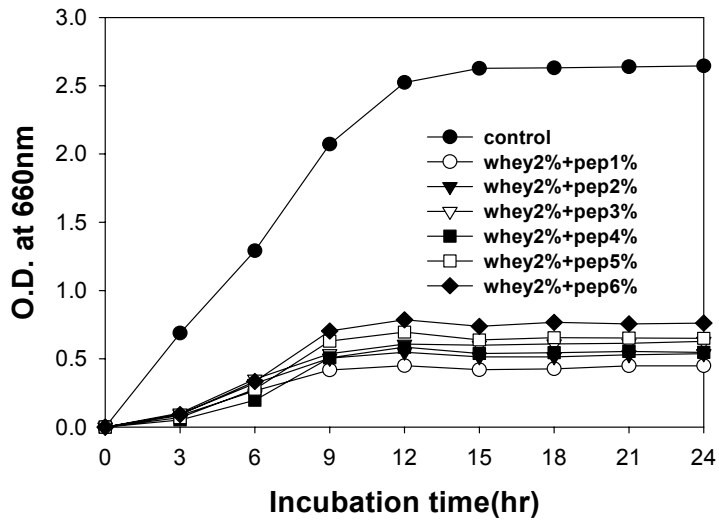


Fig. 32. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 2% whey and different concentration of peptone during incubation at 37°C.

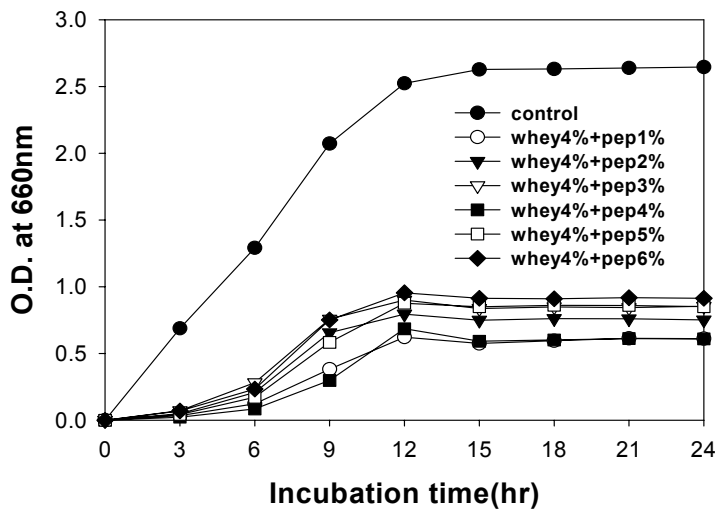


Fig. 33. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 4% whey and different concentration of peptone during incubation at 37°C.

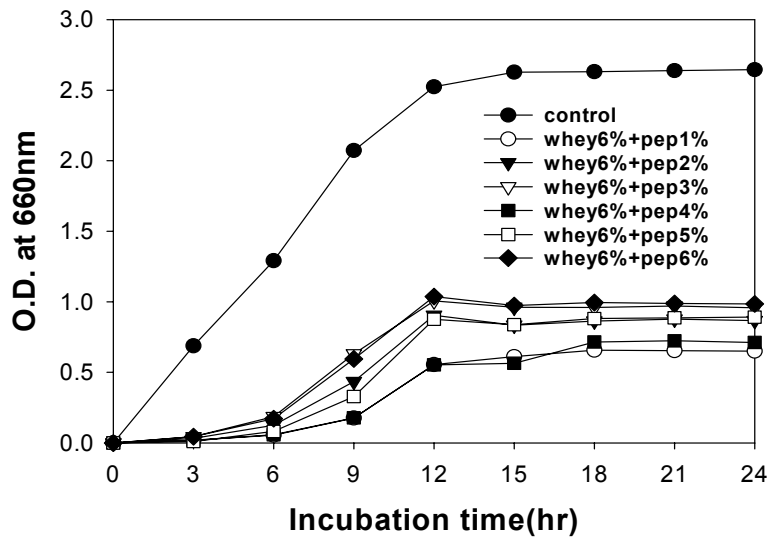


Fig. 34. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 6% whey and different concentration of peptone during incubation at 37°C.

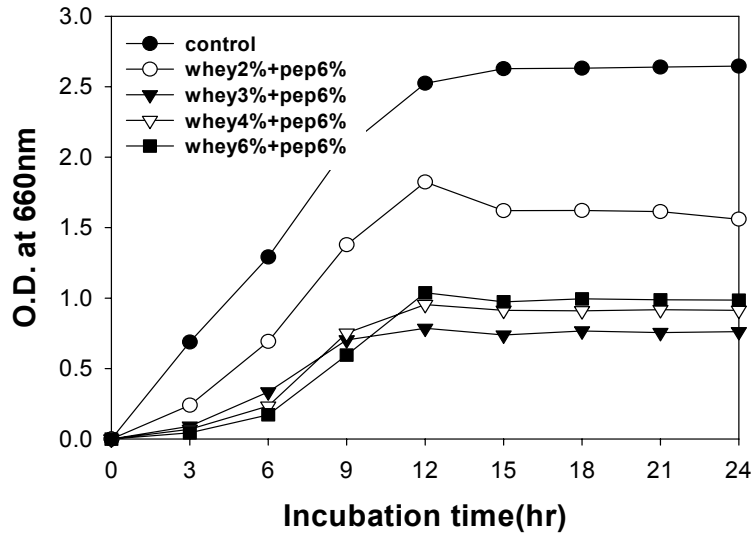


Fig. 35. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 6% peptone and different concentration of whey during incubation at 37°C.

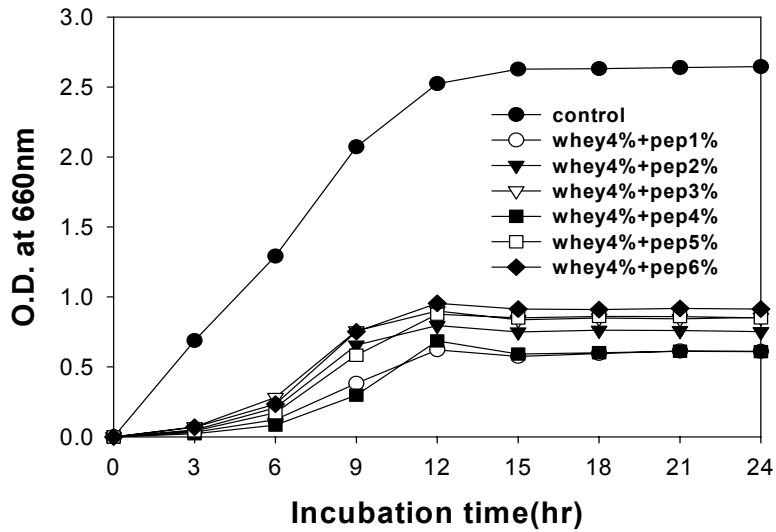


Fig. 36. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 4% whey and different concentration of peptone during incubation at 37°C.

나) Yeast extract 농도에 따른 생육패턴

Yeast extract의 농도를 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 및 6%로 증가시키면서 whey 2%, 4% 및 6%에서의 *P. acidilactici* M의 생육속도를 알아본 결과는 Fig. 37~40과 같다. whey의 농도가 증가할 수록 Yeast extract의 농도에 따라 증식속도에 다소의 차를 보이기는 하였으나 whey의 농도보다는 Yeast extract의 첨가량 증가에 따라 증식속도가 크게 영향을 받는 것으로 나타났으며 Fig. 에서와 같이 Yeast extract의 농도를 6%로 고정하고 whey의 농도를 2%, 4% 및 6%로 달리하여 첨가한 배지에서의 배양에서는 첨가농도 차에 따른 증식속도차가 거의 없는 것으로 나타났다.

다) Glucose 첨가량에 따른 생육패턴

Whey에는 lactose가 주 탄소원으로 작용할 가능성이 크므로 탄소원으로 glucose 첨가량을 결정하기 위하여 glucose의 첨가량을 각각 1%, 2% 및 3%로 증가하면서 생육속도를 측정한 결과는 Fig. 41~47와 같았다.

Yeast extract를 단일의 질소원으로 하여 glucose의 첨가량을 달리한 경우 yeast extract를 첨가하지 않은 경우를 제외하고는 1%와 2% 및 3% 첨가에 따른 증식속도의 증가는 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 glucose를 1%로 고정하고 Yeast extract의 농도를 1~6%로 증가하여 배양실험을 실시한 결과 낮은 첨가량 즉 1% 및 2% 첨가구와 5% 및 6% 첨가구에서는 뚜렷한 차를 나타냈으나 3% 및 4%와 이들과의 차는 거의 없는 것으로 판단되었다.

라) Peptone 및 glucose 첨가에 따른 생육패턴

질소원으로 단일의 Yeast extract외에 peptone을 1%, 2%, 3%, 4%, 5% 및 6%로 각각 첨가했을 경우 생육패턴은 Peptone을 단일 질소원으로 한 경우에 비해 Yeast extract 3%와 Peptone 3% 및 glucose 1%를 첨가한 배지에서의 생육이 Peptone 6%와 1%의 glucose를 첨가한 배지에 비해 생육이 양호하였으며 Yeast extract 3%와 Peptone 3% 및 glucose 1%를 첨가한 배지에서의 생육보다는 Yeast extract를 단일의 질소원으로 하고 1%의 glucose를 탄소원으로 첨가한 경우가 보다 양호한 생육을 나타내었다(Fig. 48). Glucose를 2%로 증가하여 시험한 결과(Fig. 49)에서도 이와 유사한 결과를 나타내어 Peptone 6%와 2%의 glucose를 첨가한 배지보다는 Yeast extract 6%와 1%의 glucose를 첨가한 배지에서의 생육이 보다 양호하였다. Glucose를 3%로 증가하여 시험한 결과(Fig. 50)에서도 이와 유사한 결과를 나타내어 질소원으로 Peptone의 영향은 거의 없는 것으로 판단되었다

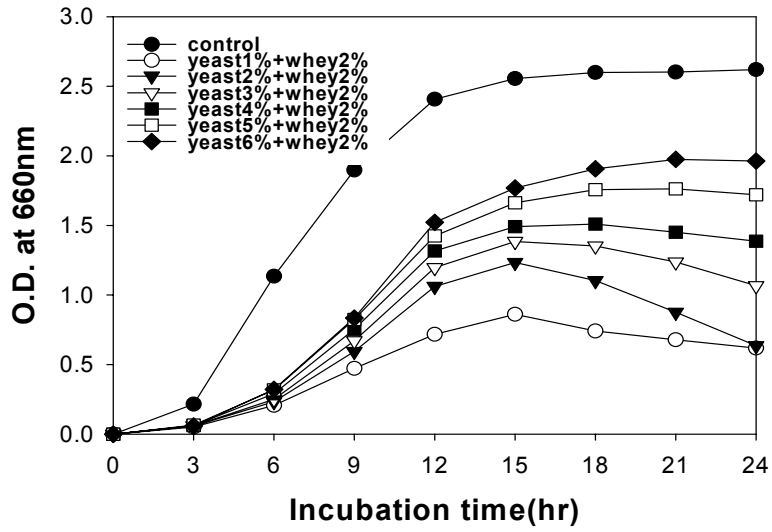


Fig. 37. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 2% whey and different concentration of yeast extract during incubation at 37°C.

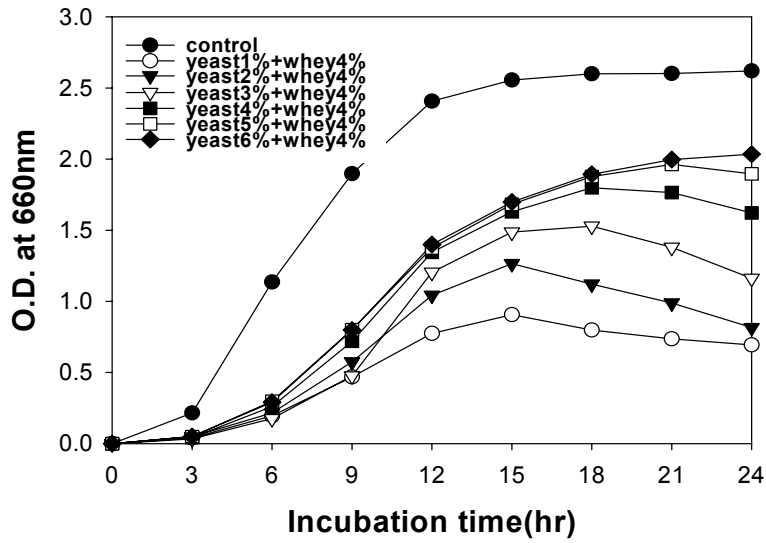


Fig. 38. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 4% whey and different concentration of yeast extract during incubation at 37°C.

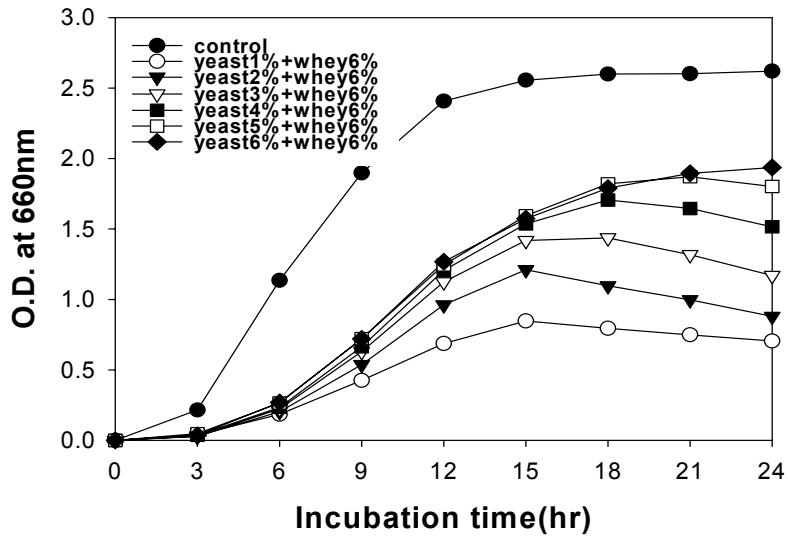


Fig. 39. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 6% whey and different concentration of yeast extract during incubation at 37°C.

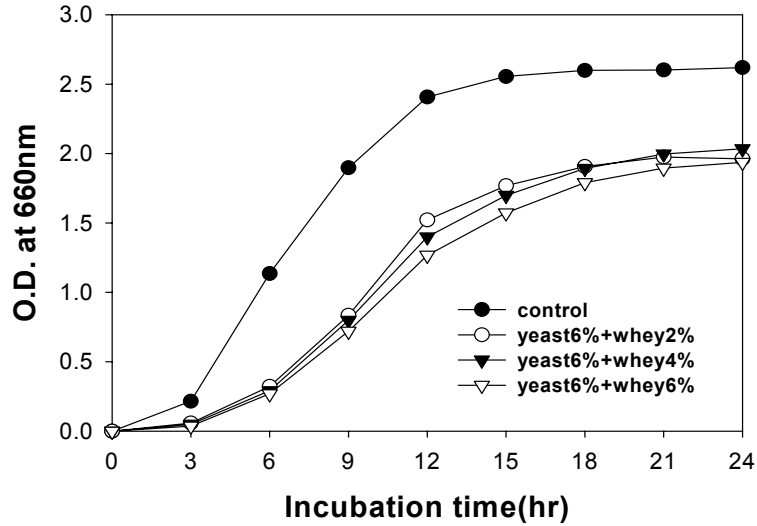


Fig. 40. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 6% yeast extract and different concentration of whey during incubation at 37°C.

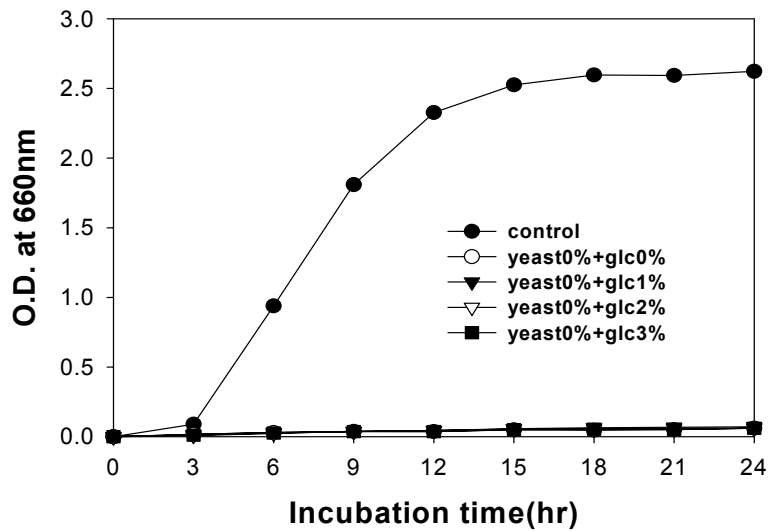


Fig. 41. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 0% yeast extract and different concentration of glucose during incubation at 37°C.

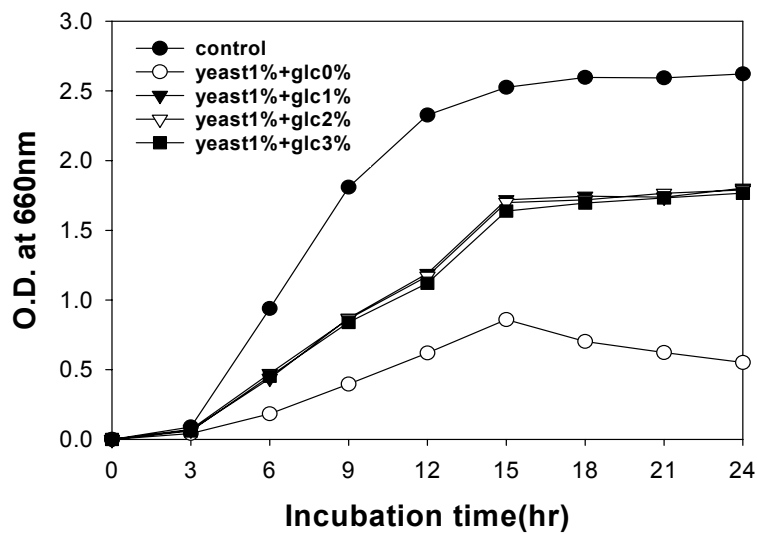


Fig. 42. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 1% yeast extract and different concentration of glucose during incubation at 37°C.

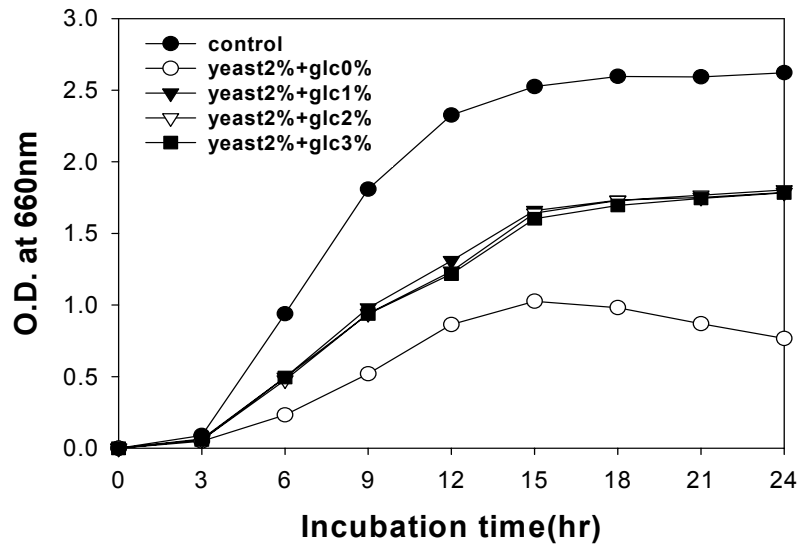


Fig. 43. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 2% yeast extract and different concentration of glucose during incubation at 37°C.

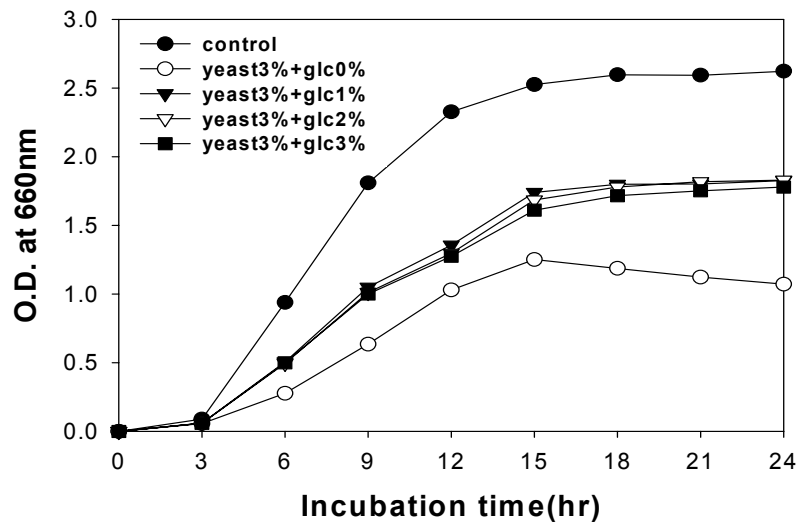


Fig. 44. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 3% yeast extract and different concentration of glucose during incubation at 37°C.

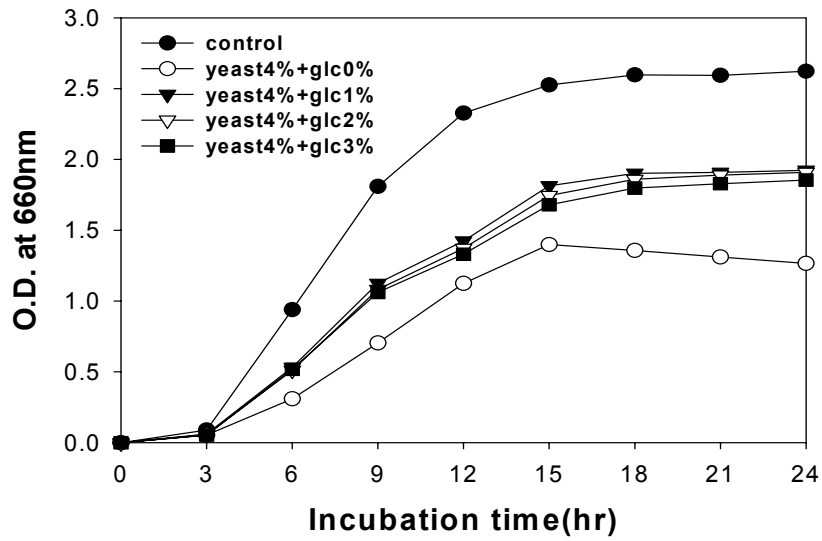


Fig. 45. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 4% yeast extract and different concentration of glucose during incubation at 37°C.

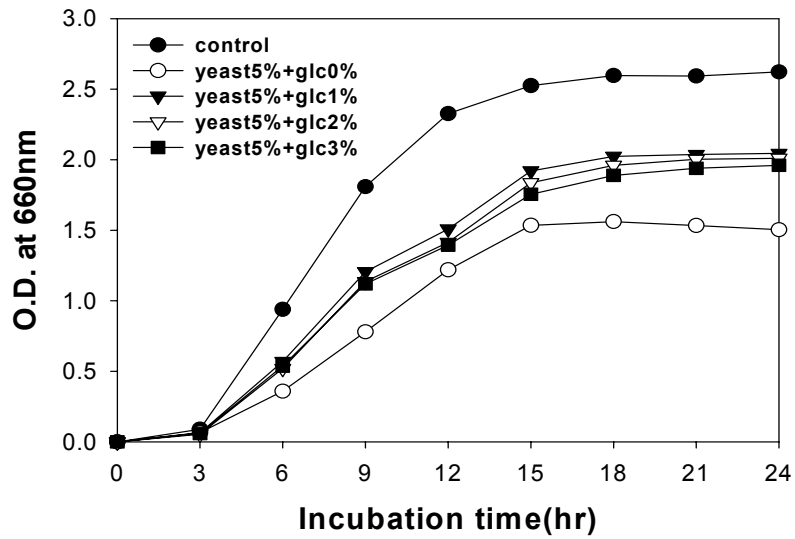


Fig. 46. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 5% yeast extract and different concentration of glucose during incubation at 37°C.

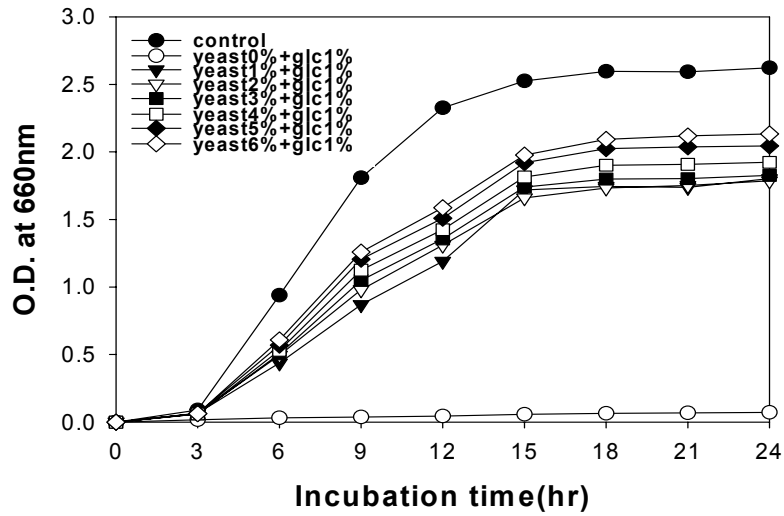


Fig. 47. Growth of *P. acidilactici* in medium containing 1% glucose and different concentration of yeast extract during incubation at 37°C.

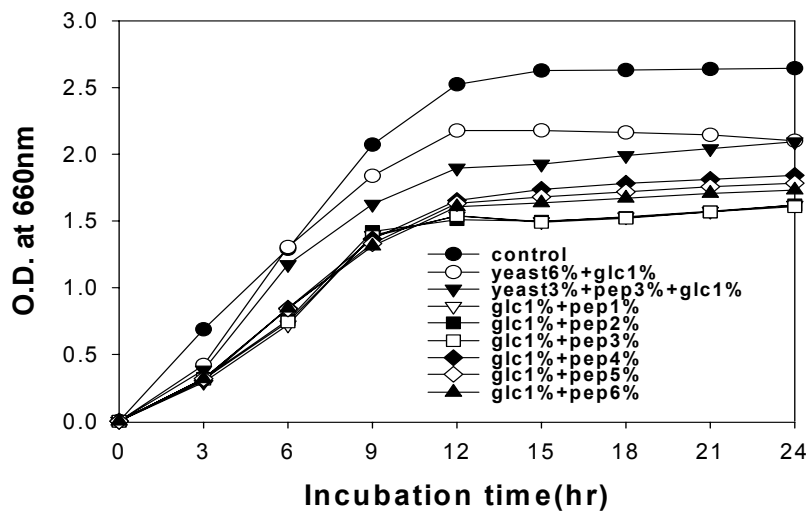


Fig. 48. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of nitrogen sources (yeast extract and peptone) and 1% glucose during incubation at 37°C.

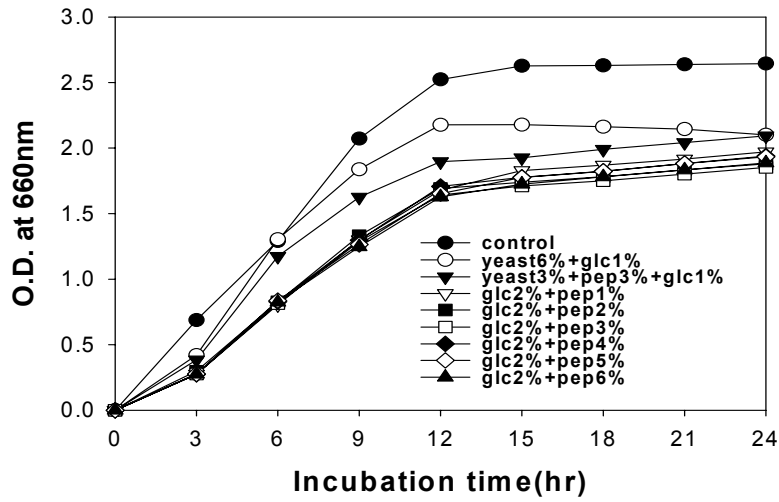


Fig. 49. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of nirtogen sources(yeast extract and peptone) and 2% glucose during incubation at 37°C.

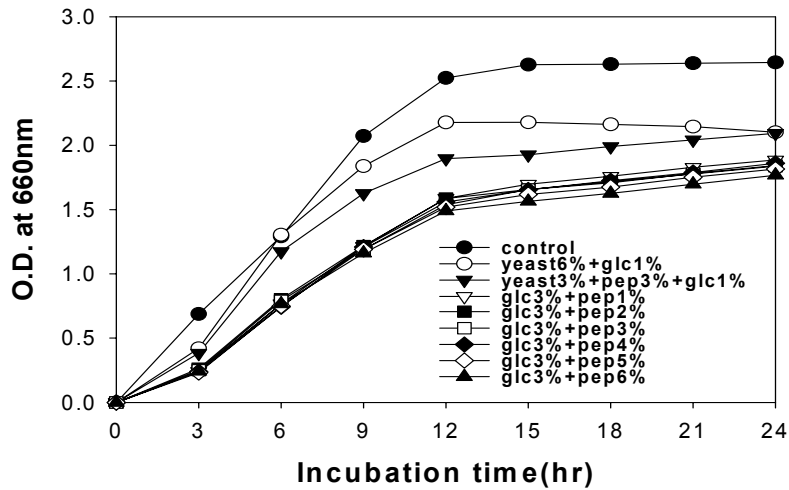


Fig. 50. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of nirtogen sources(yeast extract and peptone) and 3% glucose during incubation at 37°C.

한편 Yeast extract 6%에 1% glucose를 첨가한 배지, 3% Yeast extract와 3% Peptone 및 1% glucose를 첨가한 배지, 1% Peptone와 1% glucose를 첨가한 배지에서 생육속도를 측정된 결과 Yeast extract 6%에 1% glucose를 첨가한 배지가 가장 양호한 생육속도를 나타내는 것으로 나타났다.

마) 질소원 조합에 따른 생육패턴

Yeast extract를 3%로 고정하고 Tryptone 및 Beef extract를 각각 1%, 2% 및 3%로 첨가한 배지에서의 생육속도를 측정된 결과 3% Yeast extract에 Beef extract를 첨가한 배지보다는 Tryptone을 첨가한 경우가 상대적으로 생육속도가 양호하였으며 3% Tryptone을 첨가한 배지가 가장 우수하였다. 대조구인 MRS에 비해서는 다소 낮은 생육속도를 나타내었으나 6% Yeast extract만을 첨가한 배지에 비해서는 우수하였다(Fig. 51~54).

바) Seed culture의 접종량에 따른 생육패턴

Polysorbate-free MRS에서 12시간 배양한 *P. acidilactici* M을 seed culture로 하여 접종량에 따른 생육패턴을 검토한 결과는 Fig. 55와 같았다. 접종량에 따른 전형적인 생육패턴이 나타났으며 4% 및 5% 접종이 가장 양호한 생육패턴을 보였다. 이상의 결과를 바탕으로 하여 최종적인 pediocin 생산용 배지의 조성은 2% whey, 3% yeast extract, 1% glucose 및 3% Tryptone으로 결정하였다. 선정된 최적 배지에서의 균생육, pH 및 활성을 측정된 결과(Fig. 56), 배양시간에 따른 OD값은 MRS 배지상에서의 생육에 비해 다소 낮았으나 활성은 오히려 최대 1,700AU/mL로 MRS 배지 생육시의 1,000AU/mL에 비해 1.7배 가량 높은 활성을 나타내었다.

다. Pediocin의 고효율 대량정제기술의 개발

Pediocin의 특성을 활용한 흡착-탈착법을 이용하여 pediocin의 대량정제법을 검토하였다. pediocin은 흡착-탈착법과 semi-preparative HPLC을 통하여 충분히 정제가 가능하였으며(Fig 57~59), 흡착-탈착을 이용할 경우 정제도는 배양액으로부터 semi-preparative HPLC 정제시까지 약 3,460가 증가하였으며 수율은 24.1% 수준이었다(Table 12). 이는 권 등의 결과 44% 수준에 비해서는 낮은 수준이나 Nieto 등의 결과 10%에 비해서는 높은 수준이었다.

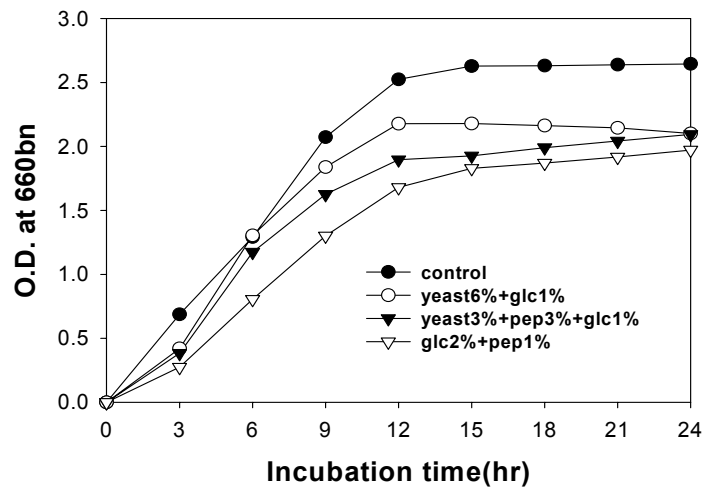


Fig. 51. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of nitrogen sources(yeast extract and peptone) and glucose during incubation at 37°C.

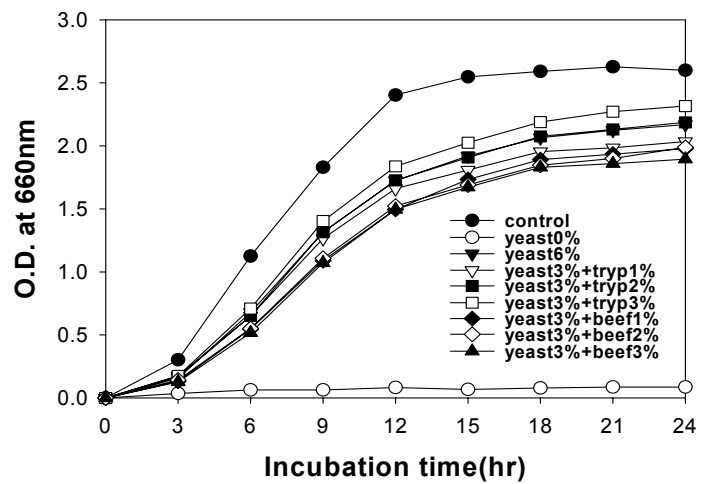


Fig. 52. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of nitrogen sources(yeast extract, peptone and beef extract) during incubation at 37°C.

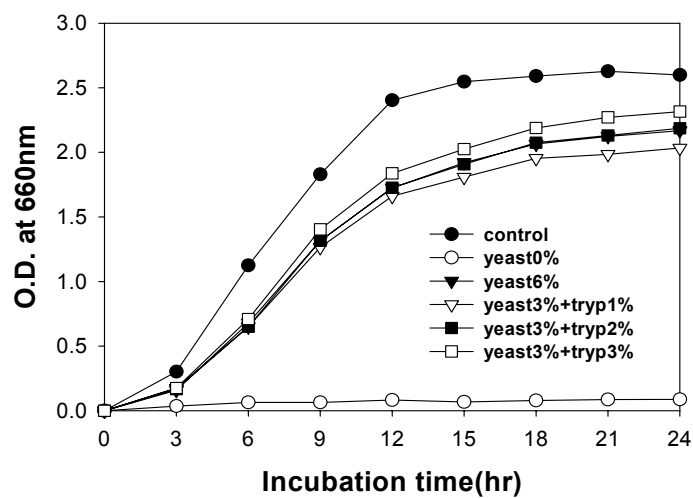


Fig. 53. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of nitrogen sources(yeast extract and tryptone) during incubation at 37°C.

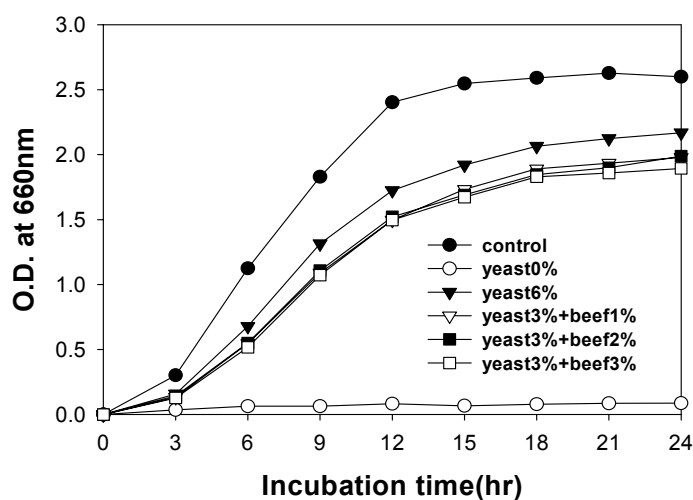


Fig. 54. Growth of *P. acidilactici* in medium containing different concentration of nitrogen sources(yeast extract and beef extract) during incubation at 37°C.

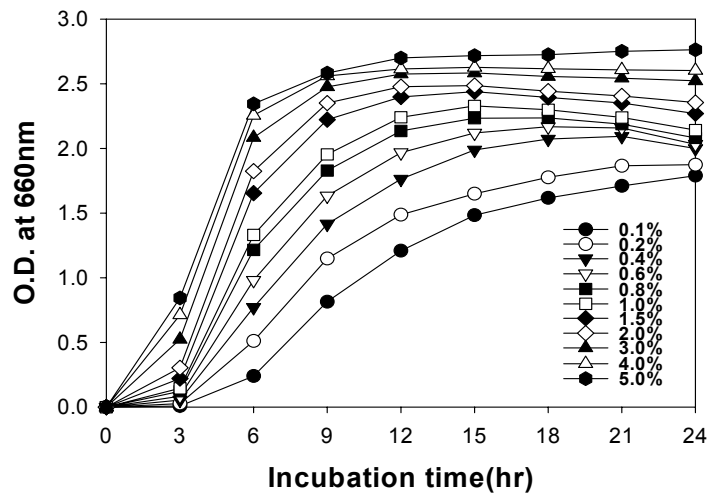


Fig. 55. Growth of *P. acidilactici* in medium by inoculation volume of seed culture during incubation at 37°C.

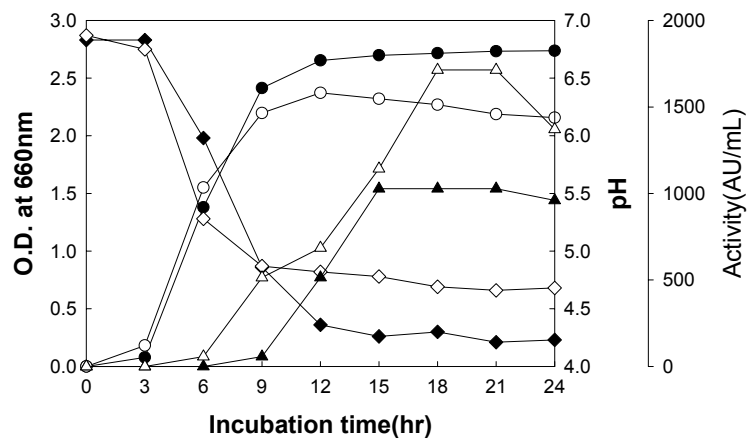


Fig. 56. Growth of *P. acidilactici*, pH and activity in medium MRS and WYG medium during incubation at 37°C.

-●- : OD(MRS), -○- : OD(WYG), -◆- : pH(MRS), -◇- : pH(WYG),
 -▲- : Activity(MRS), -△- : Activity(WYG)

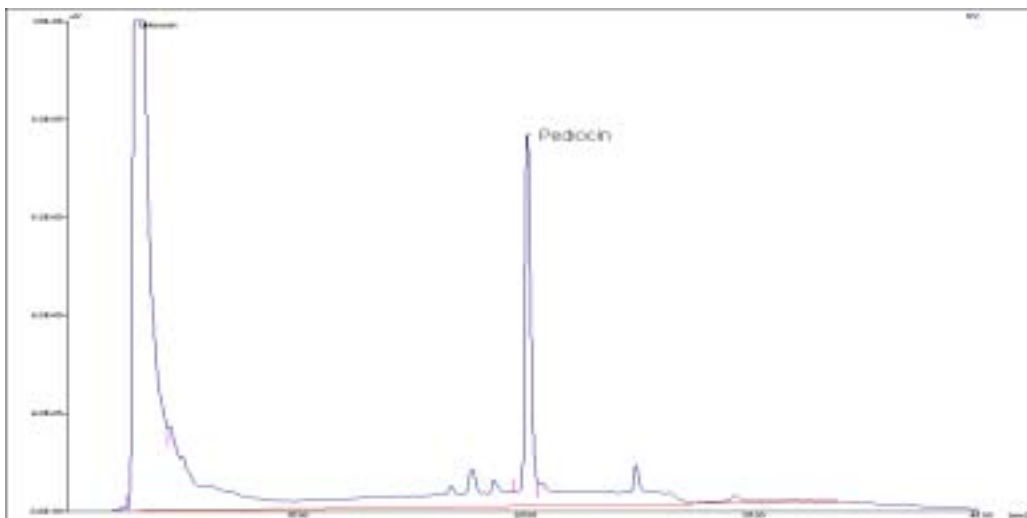


Fig. 57. RP-HPLC separation of pediocin from pH 2 extract. Individual fraction was assayed for pediocin activity. Activity was detected only in "pediocin" marked fraction. Gradient conditions were the same as described in Table 4.

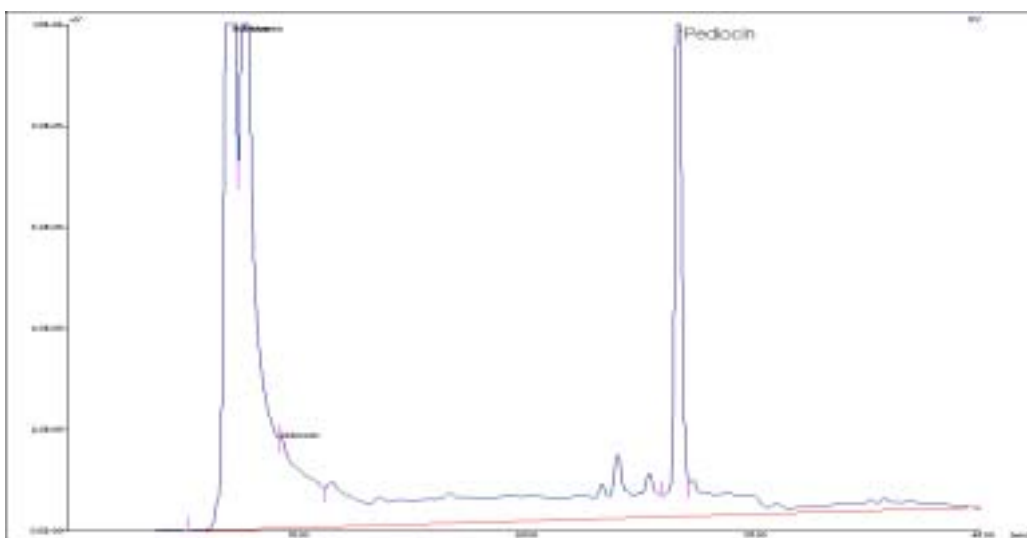


Fig. 58. Semi-preparative RP-HPLC separation of pediocin from pH 2 extract. Gradient conditions were the same as described in Table 4.

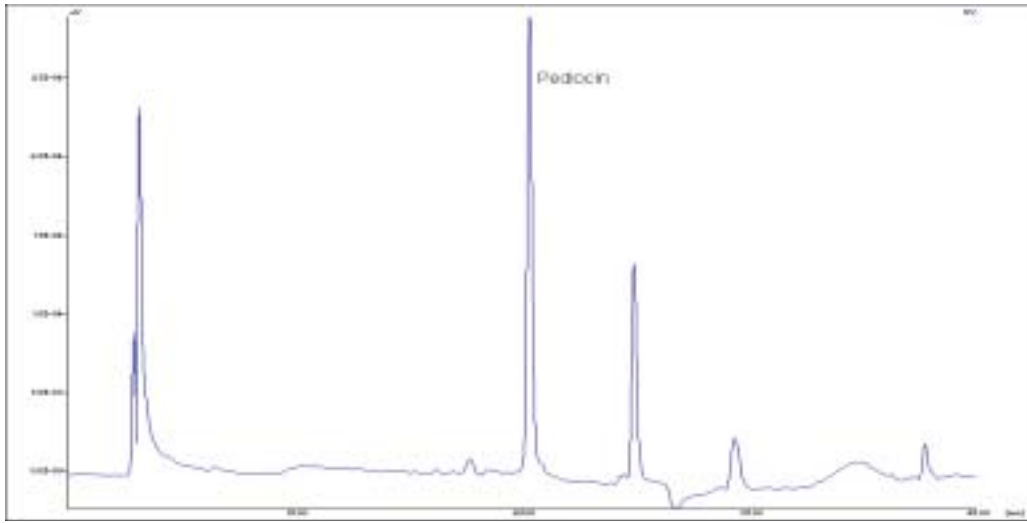


Fig. 59. Semi-preparative RP-HPLC separation of pediocin from pH 2 extract. Gradient conditions were the same as described in Table 4.

Table 12. Summary of pediocin purification

Step	Culture	pH 2 extract	Column chromatography	HPLC fractionation
volume (mL)	1,800	40	60	4.3
Protein (mg/mL)	2.75	0.51	0.27	0.148
Activity (AU/mL)	996	30,420	20,100	100,380
Total activity (AU)	1,792,800	1,215,800	1,206,000	431,634
Specific activity (AU/mg)	362	59,600	74,440	678,243
Yield (%)	100	67.8	67.2	24.1

또한 “pediocin”으로 표시된 peak의 pediocin activity를 확인한 결과 Fig. 60과 같이 명확한 활성을 확인할 수 있었으며 Tricine SDS-PAGE(Fig. 61)에서도 단일의 band를 확인할 수 있었다.

Specific activity는 배양후 362AU/mg에서 semi-preparative HPLC 정제후 300,380AU/mg 수준으로 증가하는 것으로 나타났다.

Amerlite XAD 6 resin을 pH 2 extract후 dialysis 이전단계에 적용할 경우 전체적인 정제도를 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다. 정제효율 향상을 위해 배양액으로부터 직접적으로 Amberlite 수지에 흡착하는 정제법을 다양하게 시도하여 왔으나 배양액으로부터 Amberlite XAD 6 수지를 활용하여 직접 흡착시킨후 정제과정을 거치는 것은 Amberlite XAD 6의 비특이적인 흡착능으로 인해 오히려 정제 수율을 감소시키는 것으로 나타나 정제수율 향상을 오히려 저하시키는 것으로 판단되었다.

Whey를 기반으로 한 대량정제법 개발을 위하여 추출단계별 단백질 함량을 측정한 결과는 Table 13과 같았다. 동결건조후 시료의 무게는 864mg/L이었으며, 이때 단백질 함량은 9.68mg/L이었다. 추출단계별 total activity는 추출후 1,071,480AU로서 약 78% 정도가 회수되는 것으로 나타났다(Table 14). 흡착조건을 재검토하기 위하여 pH와 흡착시간에 따른 잔류 activity를 측정한 결과(Table 15), pH 6.0, 30분의 흡착조건이 가장 양호한 것으로 판단되었으며 이때 초기 1,371AU/mL 이었던 활성의 약 95%가 흡착되어 5% 정도의 loss가 발생하는 것으로 나타났다.



Fig. 60. Bioassay plate showing the bactericidal activity.

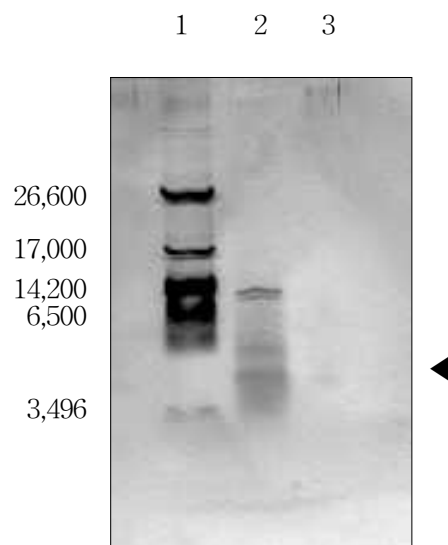


Fig. 61. Tricine SDS-PAGE analysis of extracted and purified pediocin.

lane 1 : molecular weight marker, lane 2 : extracted crude pediocin, lane 3 : pediocin purified by RP-HPLC.

Table 13. BCA protein assay in each extraction steps

Extraction step ¹⁾	Protein assay		
	Volume/weight	contents($\mu\text{g}/\text{mL}$) ²⁾	total protein(mg)
1st	500mL	17850.0	8925
2nd	50mL	163.9	8.19
3rd	432mg	112.0	4.84

¹⁾ 1st step : after cultured broth, 500mL, 2nd step : ater adsorption and desorption, 100mM NaCl 50mL, 3rd step : after freeze drying.

²⁾ BCA assay, Protein standard solution; BSA, O.D. at 562nm.

Table 14. Total activity in each extract steps

	Extraction step ¹⁾		
	1st	2nd	3rd
Activity(AU/mL)	1,371.84	25,722.4	1,071,480

¹⁾ 1st step : after cultured broth, 500mL, 2nd step : ater adsorption and desorption, 100mM NaCl 50mL, 3rd step : after freeze drying.

Table 15. Antimicrobial activity in culture broth after adsorption by adsorption conditions

Adsorption conditions	Antimicrobial activity(AU/mL)					
	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
pH 5.5	1,371	1028	514	684	684	684
pH 6.0	1,371	514	64	64	64	64
pH 6.5	1,371	684	225	225	280	256
pH 7.0	1,371	914	800	684	684	684

2. 비가열식품에의 pediocin 적용기술개발

가. Pediocin의 품질열화 및 병원성 미생물별 항균 및 감수성 확인

최소가공 과채류, 저수분식품, 막걸리에 대한 적용성 검토를 위하여 *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. 등의 품질열화 미생물과 *Salmonella* sp., *E. coli*., *Listeria monocytogenes* 등의 병원성 미생물에 대해 pediocin의 감수성을 검토한 결과, species에 따른 특이성을 나타내긴 하였으나 대부분 높은 감수성을 나타내었다(Table 16).

나. 최소가공 과채류에 대한 적용기술 개발

1) 이화학적 특성에 따른 pediocin의 항균활성

분리한 pediocin의 비가열식품에의 적용성 검토를 위한 protease, α -amylase, endoprotease Asp-N, pepsin, lipase, lyozyme, catalase 등 9종의 효소처리를 실시한 결과 대부분의 protease 계통의 enzyme에 digestion되는 것으로 나타났다(Table 17). 또한 30~90°C에서의 3분간, 그리고 121°C에서의 15분간의 열처리 결과 121°C에서의 15분간의 열처리에서만 변성이 발생하여 pediocin activity를 소실하는 것으로 나타났다(Table 18). 한편, pH 범위가 다른 buffer에서의 pediocin activity 측정 결과에서는 pH 3~9에서의 항균활성을 유지하였다(Table 19). Pediocin은 대부분의 protease 계통의 enzyme 처리에 의해 활성이 소실되는 것으로 나타났으나 α -amylase와 lipase 등의 작용에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났고, 열처리는 30~90°C의 온도에서는 활성을 유지하여 최소가공 등에서의 열처리와 병행 처리가 가능한 것으로 판단되었다. 또한 pH에 의한 영향도 pH 3~9 범위에서는 활성도에는 영향이 있으나 전반적으로 활성이 소실되지는 않아 다양한 pH 범위에서의 적용이 가능한 것으로 판단되었다.

Table 16. Antimicrobial activity of extracted pediocin

Bacterial species	Results	Bacterial species	Results
<i>Lactococcus diacetyllactis</i>	-	<i>Pediococcus halophilus</i>	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	+	<i>L. paramesenteroides</i>	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	<i>Leuconostoc dextraninum</i>	+
<i>Lactobacillus confusus</i>	+	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	+
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	<i>Bacillus cereus</i>	+
<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	<i>Bacillus coagulans</i>	-
<i>Lactobacillus sake</i>	+	<i>Micrococcus luteus</i>	+
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	+
<i>Lactobacillus casei</i>	+	<i>Enterococcus faecium</i>	+
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+
<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	<i>Escherichia coli</i>	+
<i>Lactobacillus gasseri</i>	+	<i>Clostridium perfringens</i>	+
<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	<i>Listeria monocytogenes</i>	+
<i>Lactobacillus pentosus</i>	+	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	<i>Salmonella typhimurium</i>	+
<i>Pediococcus cerevisiae</i>	+		

Table 17. Residual pediocin activity after various enzyme treatments

Enzyme	Result
Protease K	-
Trypsin	-
Endoprotease Asp-N	-
Pepsin	-
Lipase	+
α -amylase	+
Lysozyme	-
Catalase	-
RNase	+

Table 18. Thermal stability of extracted pediocin

Temperature(°C)	Result
37	+
50	+
60	+
70	+
80	+
90	+
121	-

Table 19. Stability of extracted pediocin on pH

pH	Result
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+

2) pediocin 단독처리에 의한 품질 특성 변화

천연 항균성 물질중 bacteriocin 계통의 pediocin 및 nisin, 그리고 상업용으로 판매되고 있는 polypeptide 계통의 polylysine의 단독처리에 의한 과채류 hurdle로서의 적용 가능성을 검토해 보고자 샐러드용 재료로 사용량이 많은 당근, 양배추, 사과, 상치 및 오이의 표면 미생물에 대한 생육 저해 효과를 검토한 결과는 다음의 Fig. 62~77과 같았다. 당근의 경우에는 polylysine 25ppm 이상의 첨가에서 완전한 생육억제를 확인할 수 있었으나 pediocin 및 nisin의 경우에는 첨가농도에 따른 효과가 미미하거나 차를 나타내지 않았다. 사과와 양배추의 경우에는 polylysine, nisin 모두에서 지속적인 일정한 생육억제 효과를 나타내었으나 pediocin의 경우 오히려 약간의 생육촉진 효과를 보인바 이는 pediocin 추출물의 영향에 의한 것으로 판단되었다. 상치의 경우에는 polylysine만이 뚜렷한 억제효과를 나타내었으나 오이의 경우에는 polylysine이 가장 우수한 억제 효과를 나타내었고 pediocin 및 nisin도 일정한 억제 효과를 가지는 것으로 판단되었다. 이상의 결과로 미루어볼 때 전반적으로 polylysine이 pediocin이나 nisin보다 우수한 효과를 나타내는 것을 polypeptide 계통의 물질이 대상 미생물에 대해 비특이적 억제효과를 가지는 반면 pediocin이나 nisin 등의 bacteriocin은 대상 미생물에 대해 특이성을 가짐으로 total microflora를 대상으로 한 본 실험에서는 대체적으로 뚜렷한 억제효과를 보이지 못한 것으로 판단된다.

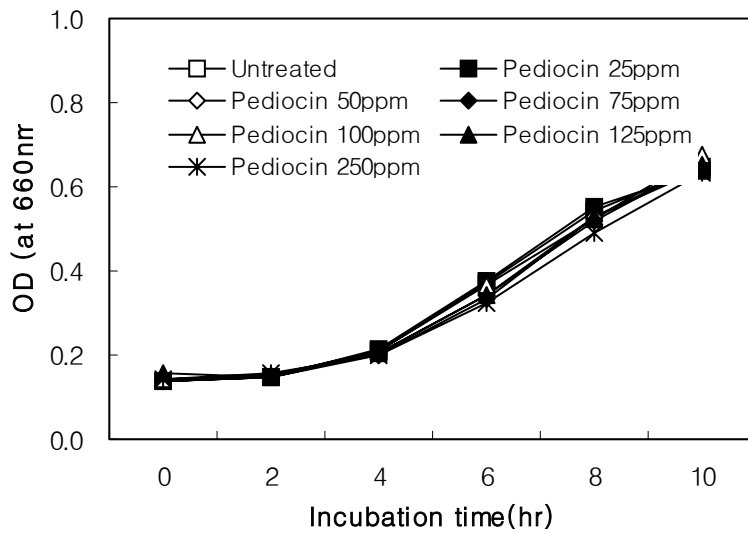


Fig. 62. Growth inhibitory effect of pediocin against microorganisms from carrot at 30°C.

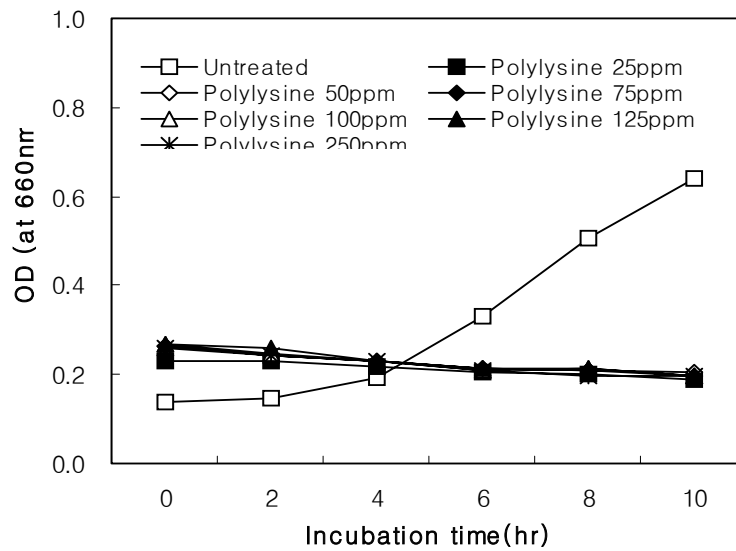


Fig. 63. Growth inhibitory effect of polylysine against microorganisms from carrot at 30°C.

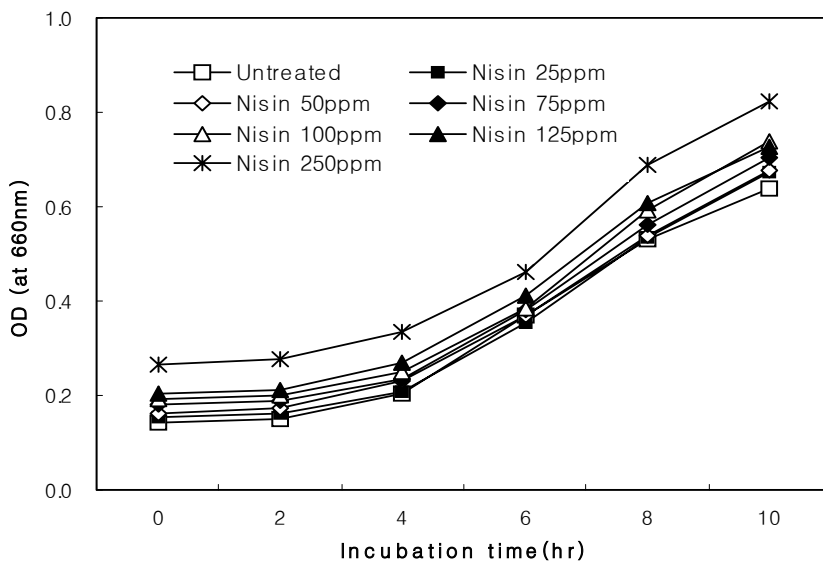


Fig. 64. Growth inhibitory effect of nisin against microorganisms from carrot at 30°C.

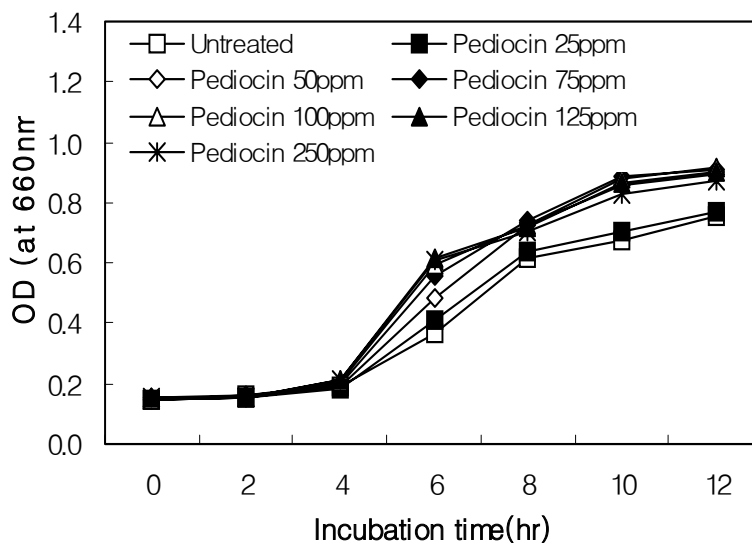


Fig. 65. Growth inhibitory effect of pediocin against microorganisms from apple at 30°C.

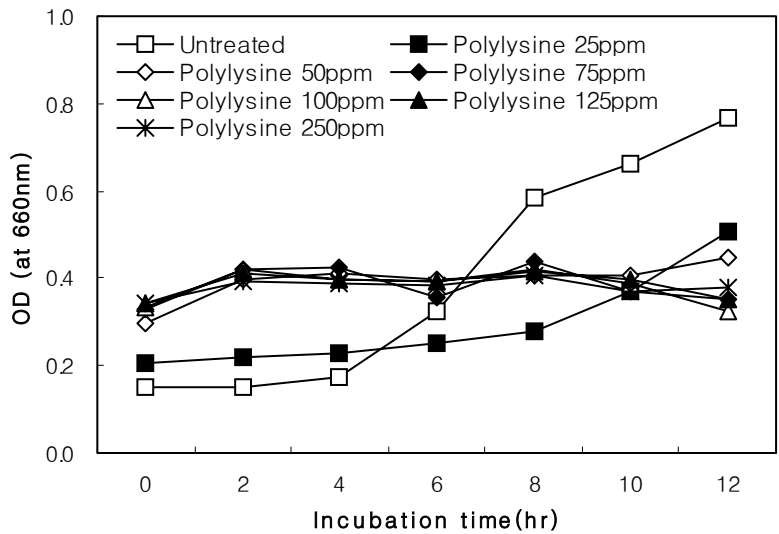


Fig. 66. Growth inhibitory effect of polylysine against microorganisms from apple at 30°C.

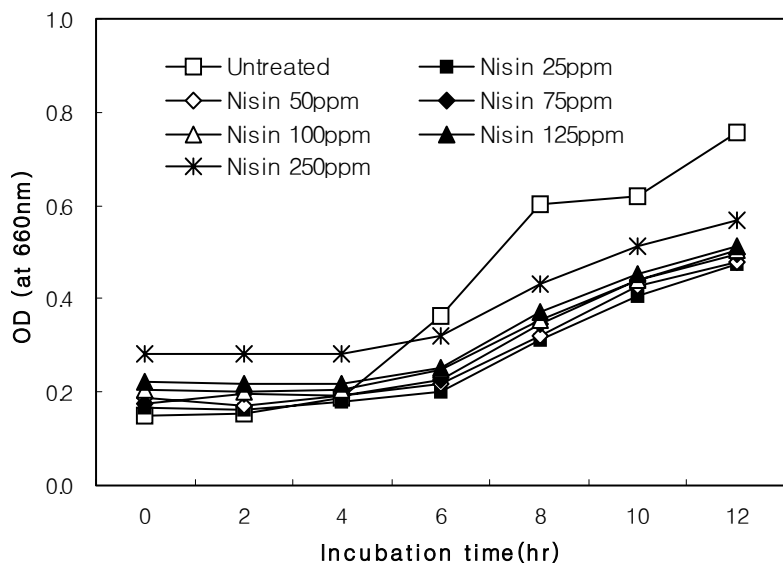


Fig. 67. Growth inhibitory effect of nisin against microorganisms from apple at 30°C.

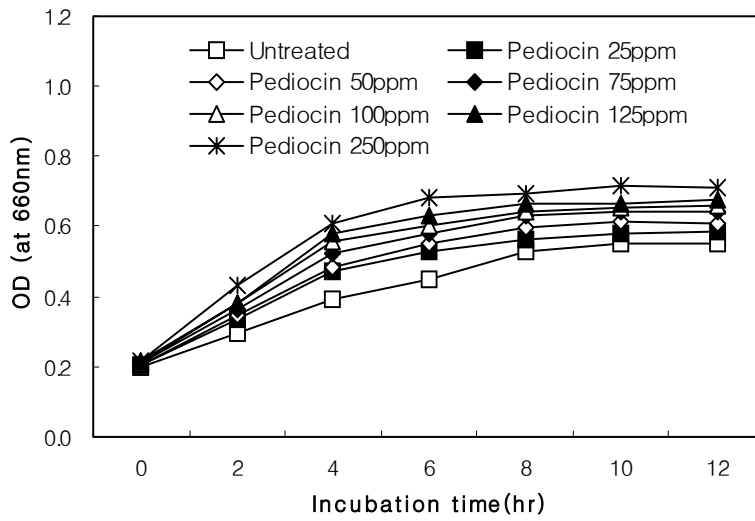


Fig. 68. Growth inhibitory effect of pediocin against microorganisms from cabbage at 30°C.

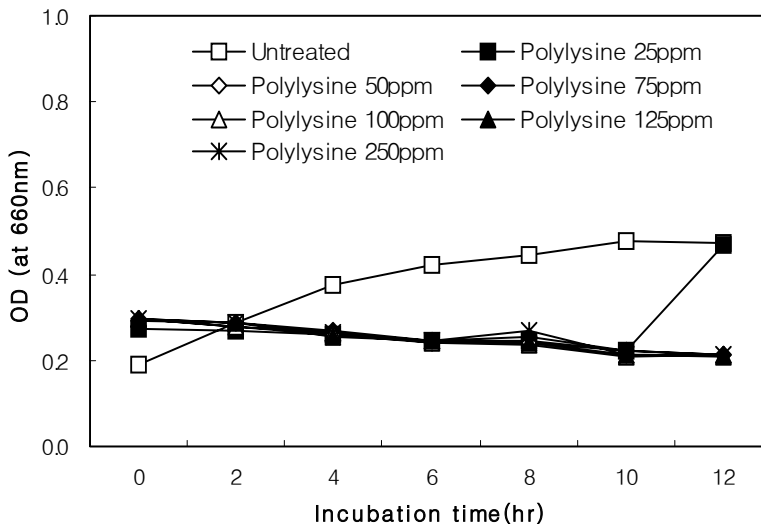


Fig. 69. Growth inhibitory effect of polylysine against microorganisms from cabbage at 30°C.

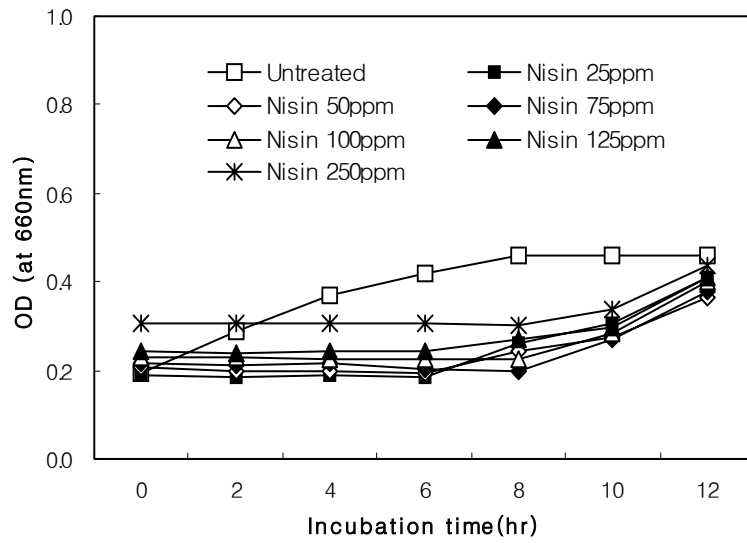


Fig. 70. Growth inhibitory effect of nisin against microorganisms from cabbage at 30°C.

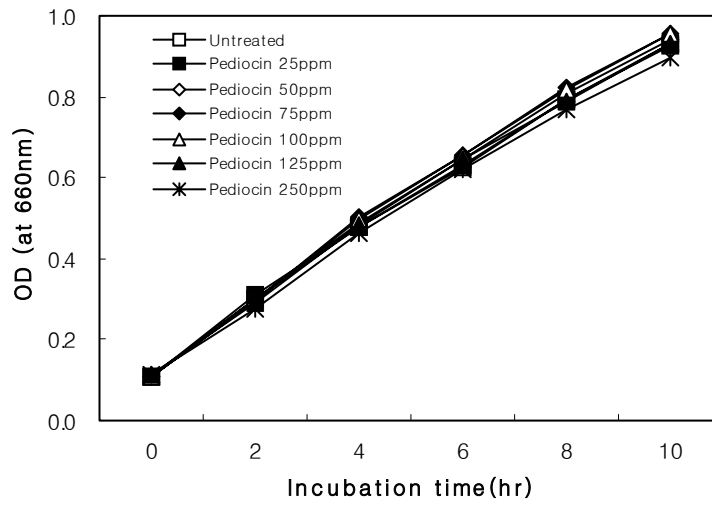


Fig. 71. Growth inhibitory effect of pediocin against microorganisms from lettuce at 30°C.

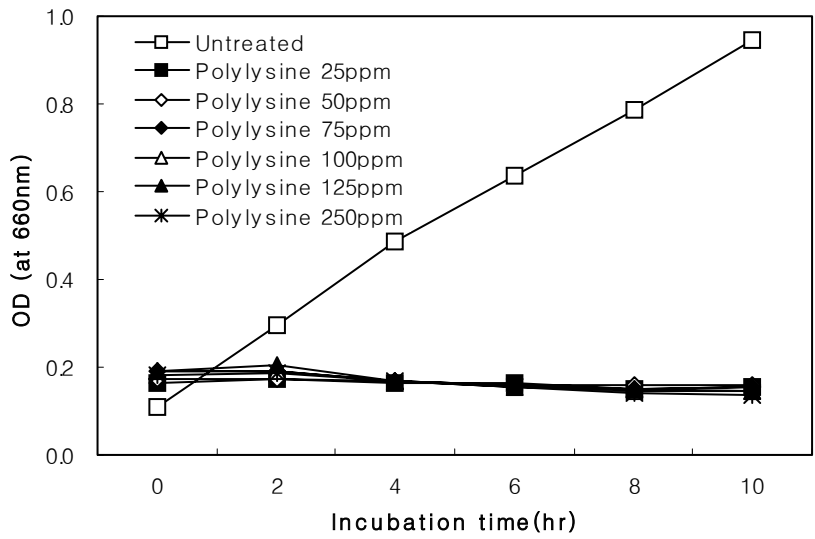


Fig. 72. Growth inhibitory effect of polylysine against microorganisms from lettuce at 30°C.

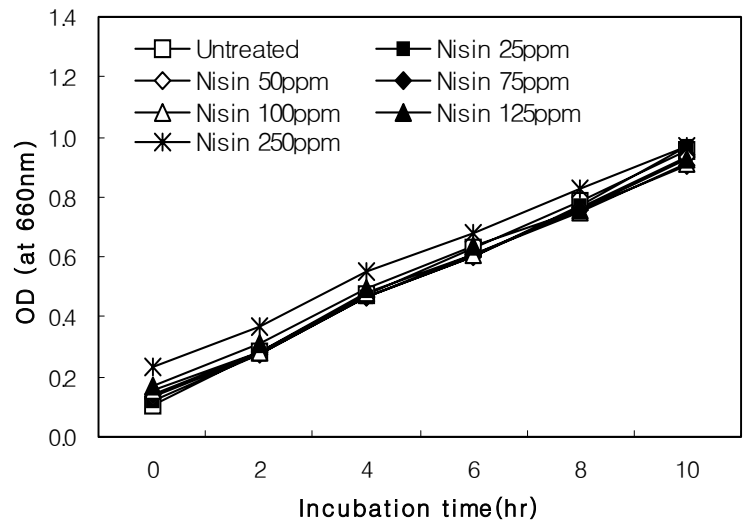


Fig. 73. Growth inhibitory effect of nisin against microorganisms from lettuce at 30°C.

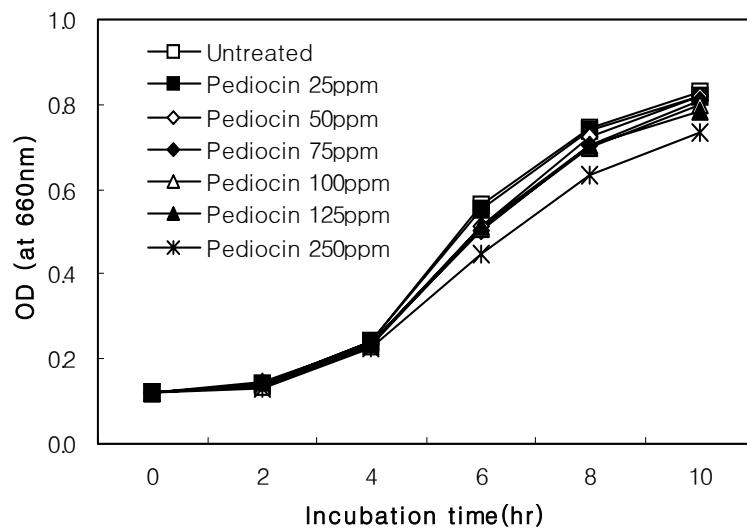


Fig. 74. Growth inhibitory effect of pediocin against microorganisms from cucumber at 30°C.

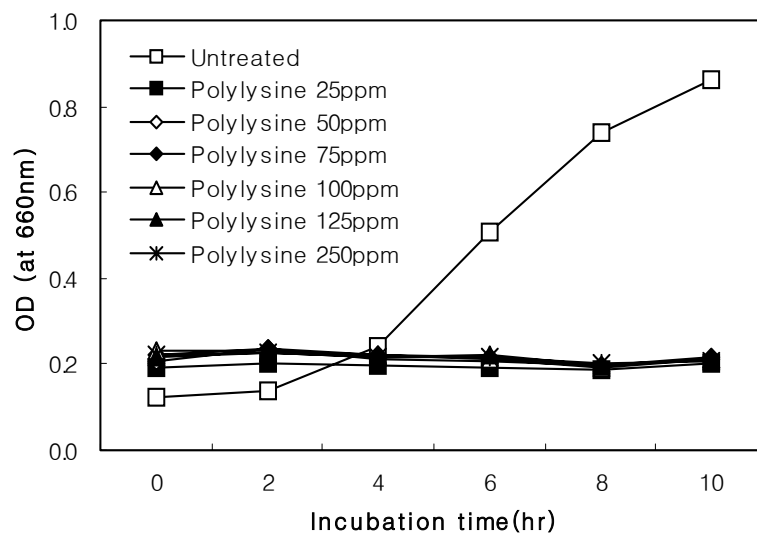


Fig. 75. Growth inhibitory effect of polylysine against microorganisms from cucumber at 30°C.

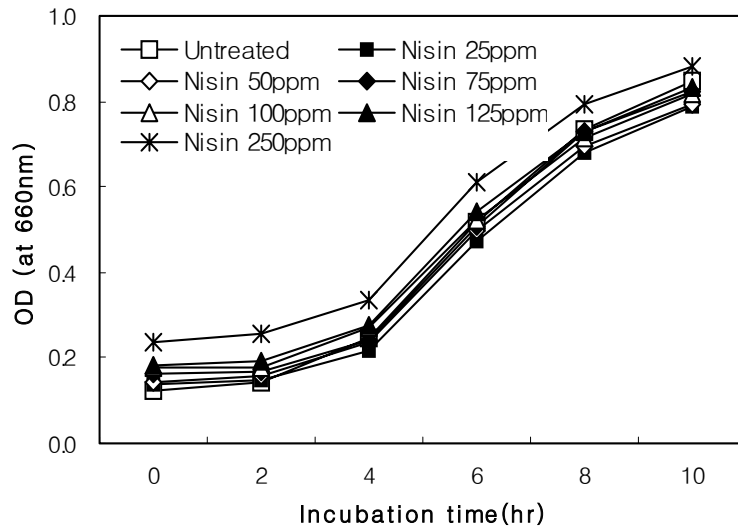


Fig. 76. Growth inhibitory effect of nisin against microorganisms from cucumber at 30°C.

3) 적정 복합처리 hurdle 인자의 선정

아오리 사과를 대상으로 직접 dipping solution 처리를 실시하여 18°C에서 저장중 미생물학적 품질 변화를 관찰한 결과는 다음의 Fig. 77~79과 같았다. Pediocin의 경우에는 저장 초기 처리구간별로 1 log cycle 정도의 차를 나타내었으며 저장 3일에는 최대 3 log cycle의 차를 나타내었고 저장 6일까지 최소 2 log cycle 정도의 지속적인 차이를 나타내었다. Polylysine의 경우 저장 3일까지는 무처리에 비해 4,000ppm 및 8,000ppm dipping solution 처리구에서 3 log cycle 이상의 현격한 미생물 억제 효과를 보였으나 저장 6일에는 오히려 무처리구에 비해 1 log cycle 이상 미생물수가 증가하는 것으로 나타났다. Nisin의 경우에는 500ppm 이상에서만 무처리과와 뚜렷한 차이를 보였고 저장 6일까지 지속적인 생육억제 효과를 가지는 것으로 나타났다.

색도의 변화를 측정한 결과에서도 pediocin은 25~500ppm 처리구가 무처리구에 비해 높은 L값을 유지한 반면 polylysine은 25ppm 이상 처리구 모두에서 무처리구에 비해 낮은 L값을 나타내어 polylysine 첨가가 색택을 저하시키는 요인으로 작용하는 것으로 나타났으며, 이러한 경향을 nisin에서도 유사하여 nisin 25ppm 이상의 첨가구에서는 모두 L값이 무처리구에 비해 낮은 값을 나타내었다(Fig. 80~82).

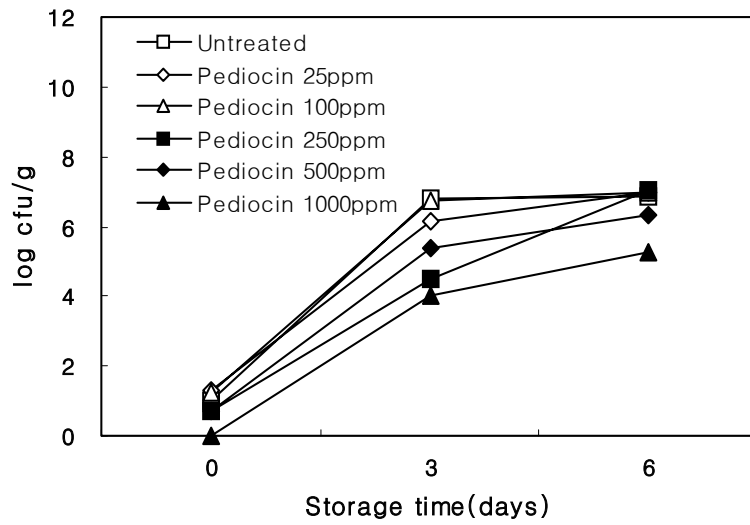


Fig. 77. Hurdle effect on microbial count of fresh-cut *Tsugaru* apples treated with 0~1,000ppm pediocin during storage at 18°C.

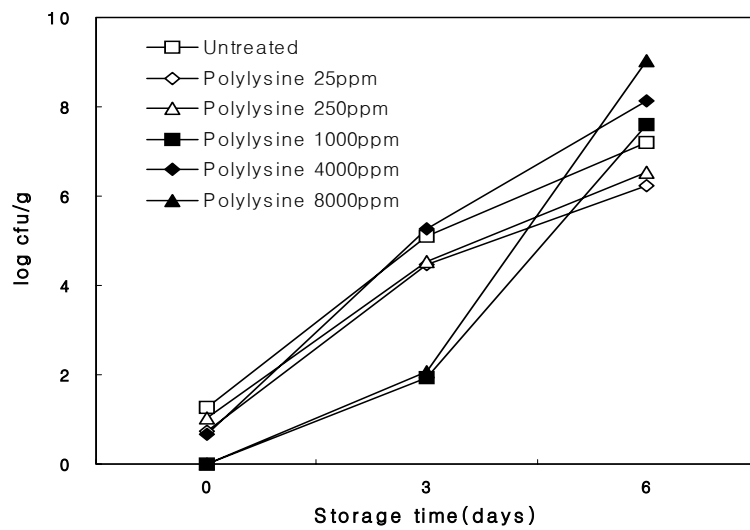


Fig. 78. Hurdle effect on microbial count of fresh-cut *Tsugaru* apples treated with 0~ 8,000ppm polylysine during storage at 18°C.

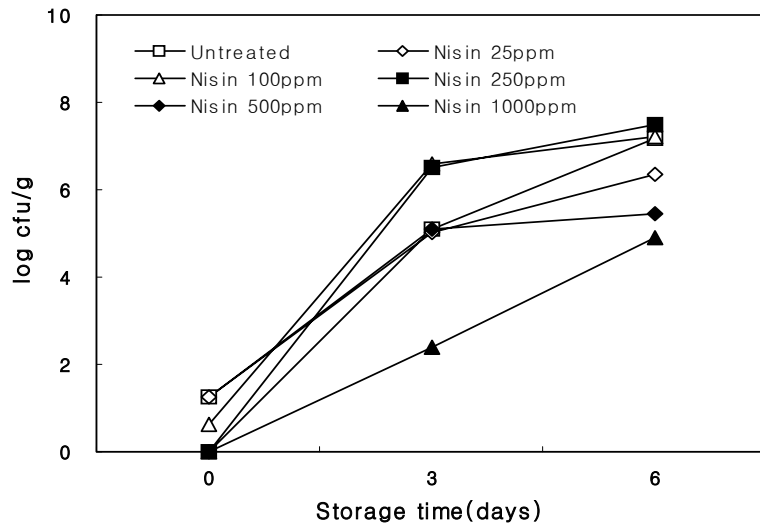


Fig. 79. Hurdle effect on microbial count of fresh-cut *Tsugaru* apples treated with 0~1,000ppm nisin during storage at 18°C.

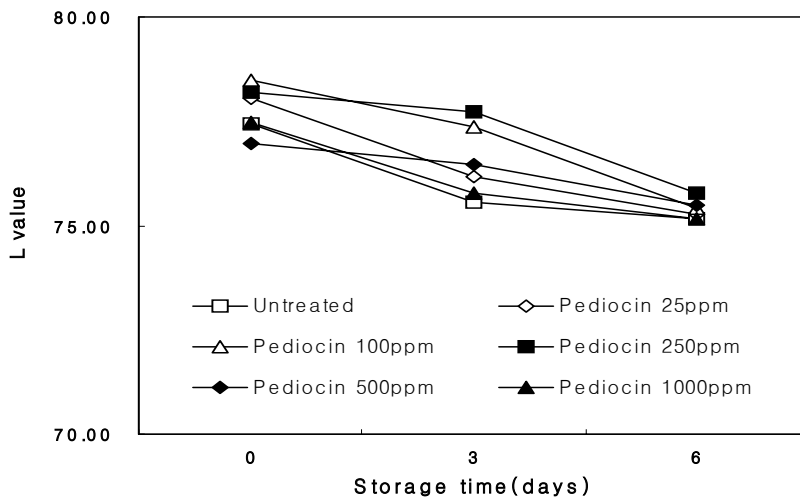


Fig. 80. Color changes of fresh-cut *Tsugaru* apples treated with 25~1,000ppm pediocin during storage at 18°C.

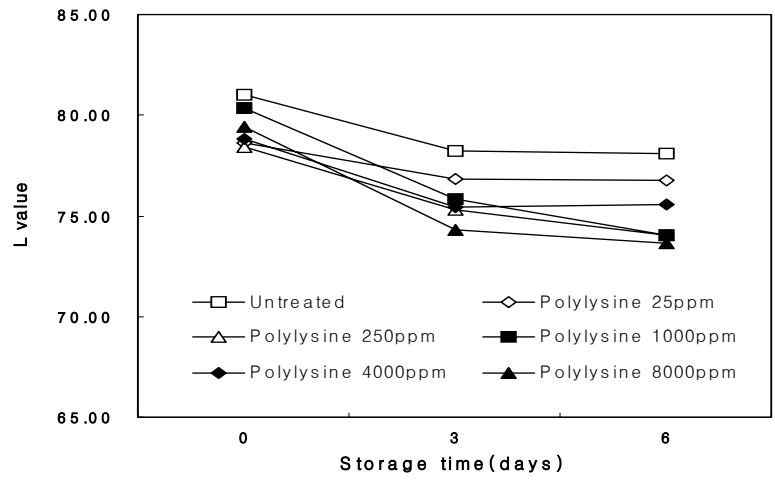


Fig. 81. Color changes of fresh-cut *Tsugaru* apples treated with 25 ~ 8000ppm polylysine during storage at 18°C.

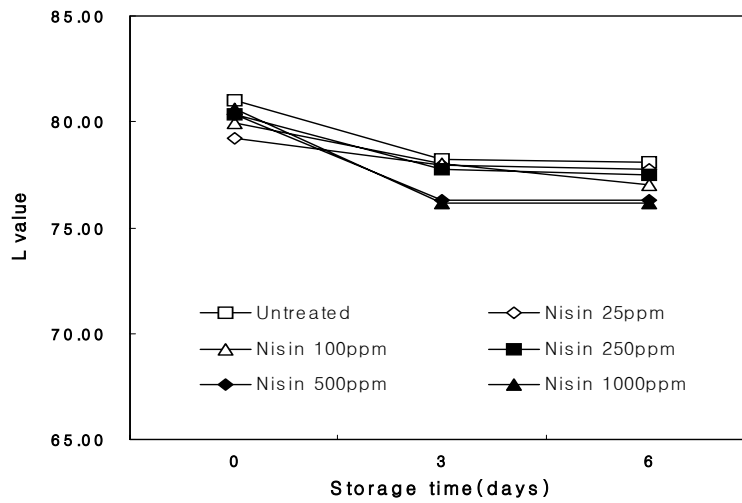


Fig. 82. Color changes of fresh-cut *Tsugaru* apples treated with 25 ~ 1000ppm nisin during storage at 18°C.

4) 최적 dips solution 선정

가) 천연항균물질에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화

Fresh-cut 사과를 전처리할 때 이용할 효과적인 항균 물질 및 농도를 선정하기 위하여 미생물 생육 저해와 관련된 기존의 문헌을 조사하여, 미생물 유래의 천연항균물질인 polylysine, nisin, pediocin과 동물 및 식물에서 유래한 천연항균물질인 lysozyme, chito-oligosaccharide 및 GSE(Grapefruit Seed Extract)를 이용하여 혼합 침지액(dips solution) 제조를 위한 첨가제로 각각의 효과 즉, 저장에 따른 총균수 및 색도 변화에 대한 실험을 실시하였다.

나) 미생물 유래의 천연항균물질에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화

Polylysine은 방선균의 일종인 *Streptomyces albulus*가 생성하는 이형의 peptide라고 할 수 있는 L-lysine의 homopolymer의 ϵ -polylysine으로, 항균효과는 플러스로 하전된 ϵ -polylysine의 아미노기가 미생물의 세포벽에 흡착해 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. Nisin은 유산균의 일종인 *Lactococcus lactis*에 의해 생성된 peptide성 항균물질(bacteriocin)로 그 작용 기작은 아직 명확하게 규명되지는 않았지만, cytoplasmic membrane에 흡착한 뒤 membrane을 손상시켜 세포 내 물질의 유출로 결국 lysis를 일으킨다는 의견이 유력하다. Pediocin (pediocin AcH/PA-1)은 44개의 아미노산으로 구성된 peptide로 *Pediococcus*속이 주로 생산하며 유제품의 경우 *Streptococcus thermophilus*에 의해서도 생산되는 것으로 보고되어 있다. Pediocin의 작용 기작은 대상미생물의 세포막에 pore를 형성하는 것으로 알려져 있고 C-terminal 쪽의 disulfide bond는 positive patch를 형성하여 활성화에 중요한 역할을 담당하나 N-terminal hydrophobic domain에 있는 disulfide bond는 항균활성에 영향을 주지 않는다고 알려져 있다.

따라서 fresh-cut 사과를 대상으로 이러한 항균성 천연첨가제를 각각 이용하여 그에 대한 미생물 제어효과와 색도(L value) 변화 및 관능적 특성을 확인하였다.

(1) Polylysine

Polylysine 농도를 0.2~1.5% 농도로 제조한 침지액에 slice 사과를 침치하여 18℃ 저장 중 총균수 및 색도를 측정하였다. 침지 후 초기 미생물의 수는 무처리구와 polylysine 1.5% 처리구에서 약 1 log CFU/g 수준으로 나타났으며, polylysine 0.2~0.8% 농도에서는 0.2 log CFU/g 수준으로 나타났다(Fig. 83).

3일차에 무처리구에서는 약 5 log CFU/g 수준을 나타내었으며, polylysine 0.4% 이상에서는 약 2~3 log CFU/g 수준으로 나타나 뚜렷한 미생물 생육 저해 효과를 보여, 최소 농도가 0.4% 수준임을 알 수 있었다. 그러나 예상과 달리 polylysine 1.0% 이상에서는 무처리구와 비슷한 총균수를 나타내었으며, 저장 6일차에 polylysine 1.0% 이상의 처리구에서는 무처리구 보다 다소 많은 약 8 log CFU/g 수준을 나타내었다. 반면, polylysine 0.6% 처리구에서는 3일차에서 나타난 미생물 생육 저해 효과가 지속되어 약 6 log CFU/g 의 수준으로 가장 우수한 효과를 보였다.

저장기간의 경과에 따른 색도(L value) 변화에 있어서는, Fig. 84와 같이 polylysine 의 농도가 높아짐에 따라 대조구와 비슷하거나 약간 낮은 L value를 나타내었으며 저장 6일차까지 비슷한 양상을 나타내었다. 그러나 fresh-cut 사과와 갈변을 촉진시키는 데는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되어, dips solution 제조시 한 첨가제로서 사용 가능할 것으로 판단되었다.

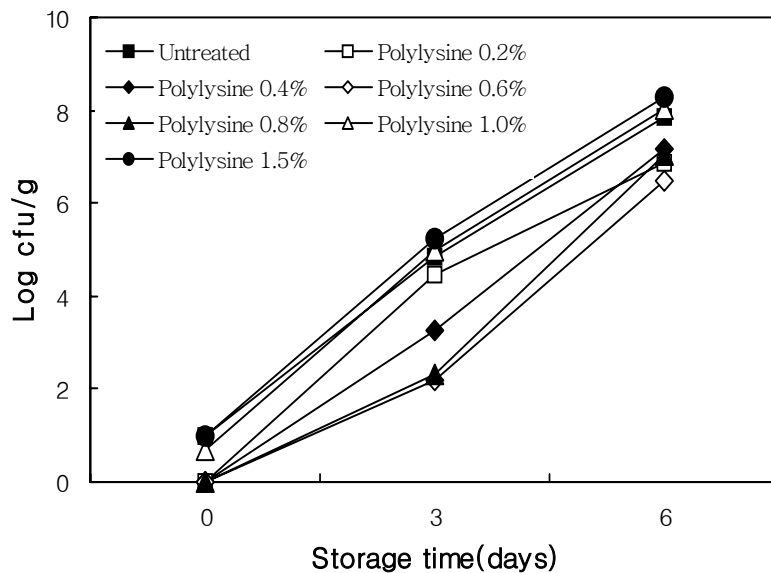


Fig. 83. Hurdle effect of 0.2~1.5% polylysine on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C

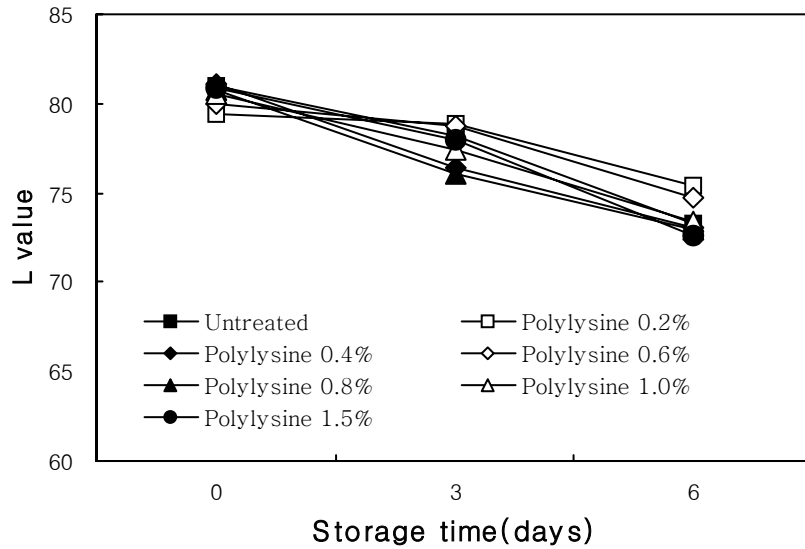


Fig. 84. Color changes of fresh-cut apples treated with 0.2~1.5% polylysine during storage at 18°C.

(2) Nisin

Nisin은 유산균의 일종인 *Lactococcus lactis*에 의해 생성된 peptide성 항균물질로 그 작용 기작은 아직 명확하게 규명되지는 않았지만, cytoplasmic membrane에 흡착한 뒤 membrane을 손상시켜 세포내 물질의 유출로 결국 lysis를 일으킨다는 의견이 유력하다. 오늘날 nisin은 유럽을 중심으로 30여국 이상에서 사용이 인정되고 있으며, 영국의 Apin & Barrett 회사에서는 Nisaprin이라는 상품명으로 판매되고 있다. 이러한 nisin은 식품분야에 다양하게 사용하고 있으며, 특히 유제품, 통조림, 알코올 제품 분야 등에 많이 이용되고 있는 실정이다.

본 연구에서는 nisin의 신선편이 식품 적용 가능성을 확인함과 동시에 최적 농도를 확인하고자 nisin의 농도를 0-1200 ppm으로 제조한 침지액에 편절 사과를 침지하여 18°C 저장 중 총균수 및 색도 변화를 측정하였다. 침지 후 무처리구의 초기균수는 6.3×10^1 CFU/g 수준으로 가장 높게 나타났으나 저장 기간이 경과함에 따라 200 ppm

이하의 nisin 처리구와 유사한 수준의 총균수를 나타내었다. 반면, 400 ppm nisin 처리구의 초기균수는 2.1×10^1 CFU/g 수준으로 나타나 무처리구와 약 0.5 log cycle 수준의 차를 보였으며 저장 3일경에도 유사한 수준의 미생물 저해 효과를 나타내어 최소 농도가 400 ppm 수준임을 알 수 있었다(Fig. 85). Nisin 농도별 처리 후 저장기간에 따른 절편 사과 표면색도(L value) 변화에 있어서는 Fig. 86에서 보는 바와 같이 상대적으로 고농도의 처리구에서 높은 L value를 나타내어 농도 증가에 따른 갈변 심화 현상은 나타나지 않았으며, 이는 fresh-cut 과실류의 한가지 hurdle factor로서의 가능성을 보여주었다.

(3) Pediocin

Pediocin을 0-1200 ppm 농도로 제조한 침지액에 편절 사과를 침지하여 18°C 저장 중 총균수 및 색도 변화를 측정하였다. 그 결과, 초기 미생물 제어 효과 측면에서는 전반적으로 nisin 처리구보다는 다소 우수한 결과는 보여 최대 약 1 log cycle 수준의 생육 억제 효과를 나타내었다. 저장 3일경에는 nisin 처리구가 상대적으로 우수한 미생물 저해 효과는 나타낸 반면, 저장 6일경에는 무처리구와 비슷한 수준을 나타낸 nisin 처리구에 비해 pediocin 처리구에서는 약 0.5 log cycle 수준의 정균효과를 유지하였다. 초기 가장 우수한 정균효과는 나타낸 200 ppm pediocin 처리구는 저장 6일경 8.7×10^8 CFU/g 수준의 총균수를 보여 오히려 무처리구 보다 다소 높은 수준의 값을 나타내었으며, 400 ppm pediocin 처리구에서는 초기 약 1 log cycle 수준의 정균효과를 나타내어 저장기간이 경과함에 따라 그 효과는 다소 상실되었으나 저장기간 내내 약 0.5 log cycle 수준의 미생물 제어 효과를 보여 최소농도가 약 400 ppm 수준으로 판단되었다(Fig. 87).

저장기간의 경과에 따른 표면색도 변화에 있어서는 Fig. 88과 같이 처리구간 농도비에 따른 유의적 차이는 확인하기 어려웠으나, pediocin 첨가가 fresh-cut 사과의 갈변에 미치는 영향은 거의 없는 것으로 판단되었다.

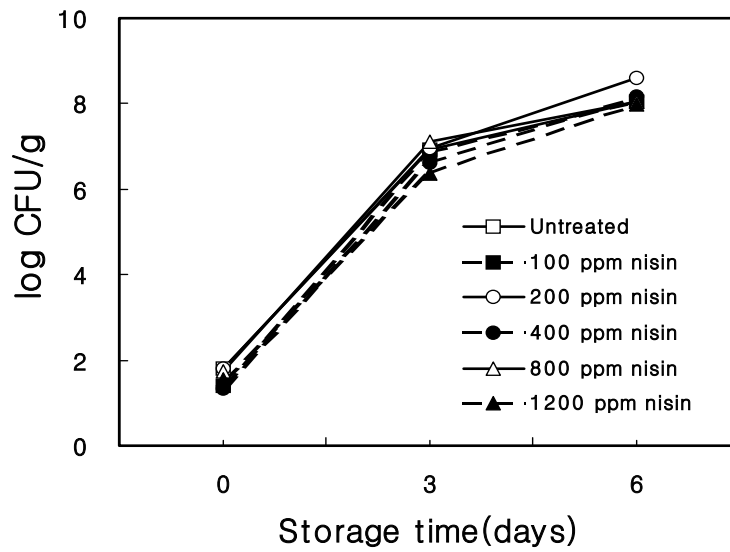


Fig. 85. Hurdle effect of nisin on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

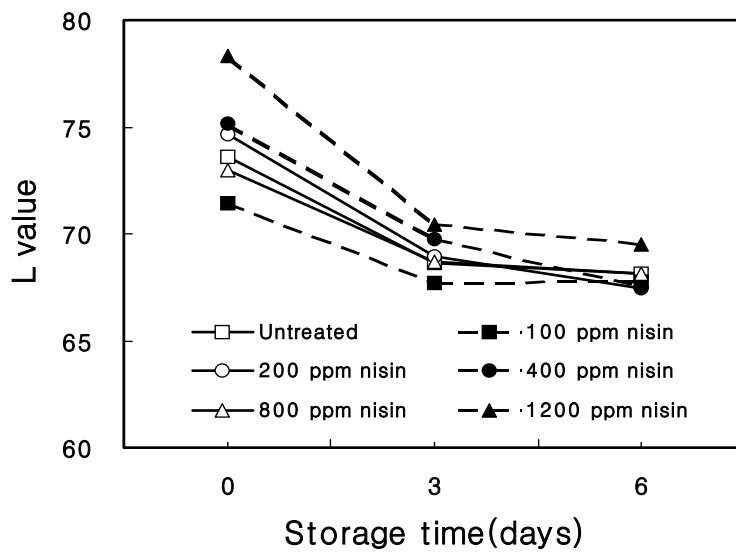


Fig. 86. Color changes of fresh-cut apples treated with nisin during storage at 18°C.

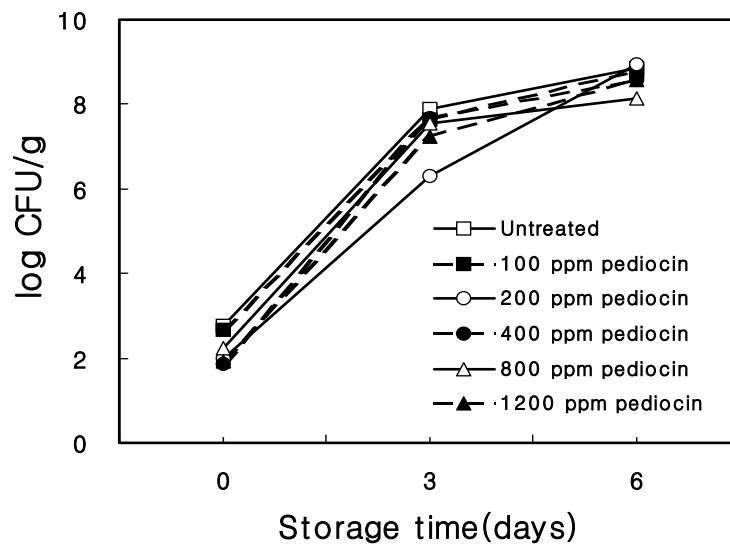


Fig. 87. Hurdle effect of pediocin on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

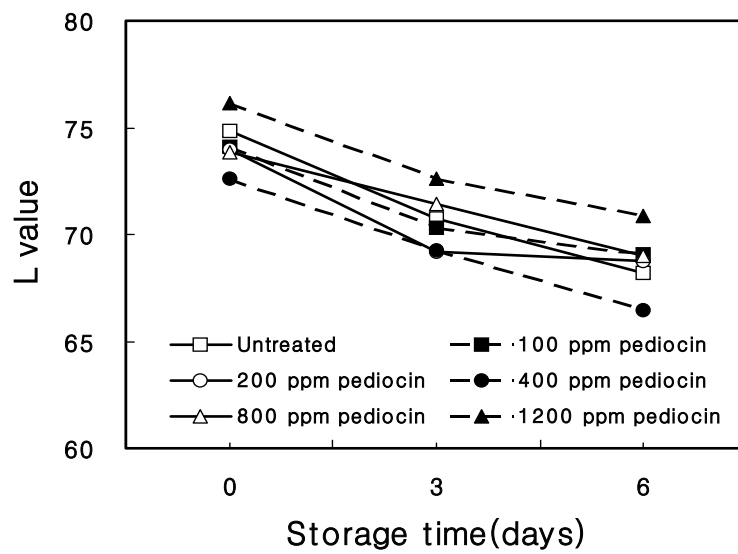


Fig. 88. Color changes of fresh-cut apples treated with pediocin during storage at 18°C.

다) 기타 천연항균물질에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화

(1) Lysozyme

Lysozyme은 계란의 난백에 다량 함유되어 있으며, 분자량 14,400, 129개의 아미노산으로 구성된 염기성 polypeptide로 현재 식품첨가물로 사용되는 것은 계란 난백유래의 염화 lysozyme이 주류를 이루고 있다. Lysozyme의 작용은 세균 세포벽의 peptidoglycan 층의 *N*-acetylmuramic acid와 *N*-acetylglucosamine 사이의 β -1,4-glucoside 결합을 절단하여 용균작용을 일으키는 것으로, 이러한 특성 때문에 Gram 양성 세균에는 쉽게 작용하지만 Gram 음성 세균의 경우 표면의 lipoprotein-리포다당층으로 용해작용이 방해되어 용균작용에까지 미치지 못하는 것으로 알려져 있다. Lysozyme은 미생물 생육 저해 용도의 식품보존료로 많은 연구가 진행되어 왔으며, 주요 대상 식품은 치즈, 청주, custard cream, 면류 및 소시지류 등의 축육제품으로 적용대상 식품에 따라서는 상당한 효과를 보여 상당 부분 산업적으로 이용되고 있다.

본 연구에서는 fresh-cut 사과에 적용하기 위해 실질적으로 적용 가능한 수준의 최적 농도를 확인함과 동시에 lysozyme 자체가 가지는 초기 미생물 제어 효과와 사용 농도에 따른 관능적 특성을 확인하고자 하였다. 먼저, 산업적으로 적용이 가능한 농도인 0.01~0.5%의 수준에서 제조한 침지액에 slice 사과를 침지하여 18°C에서 저장하면서 총균수의 변화를 확인하였다. Fig. 89에서 보는 바와 같이 3 log CFU/g 수준의 대조구에 비해 평균 1 log cycle에서 최대 2 log cycle의 초기 총균수 감소를 확인할 수 있었다. 그러나, 18°C 저장 3일차 및 6일차에서는 그 효과가 없는 것으로 나타난 바, 장기저장 시 전처리에 이용할 dips solution 제조에 적용하기 어려운 것으로 판단되었다.

Lysozyme이 저장 중 색도(L value)의 변화에 미치는 영향은 효과가 없거나 일부 변색시키는 것으로 보였다. 즉, Fig. 90에서 보는바와 같이 lysozyme 농도 0.3~0.5%수준에서는 L값 기준으로 변색에 미치는 영향이 크지 않은 것으로 보였으나, lysozyme의 농도 0.01~0.1%수준의 농도에서는 평균 Δ L값이 5수준 감소되는 것으로 나타났다.

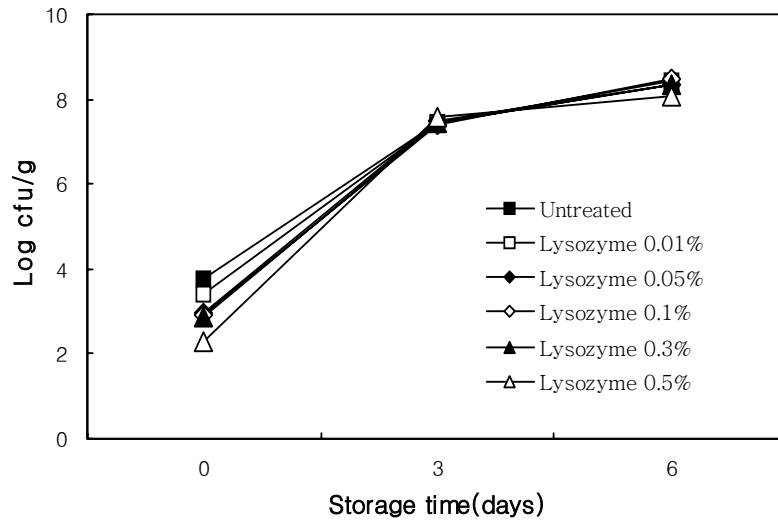


Fig. 89. Hurdle effect of 0.01~0.5% lysozyme on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

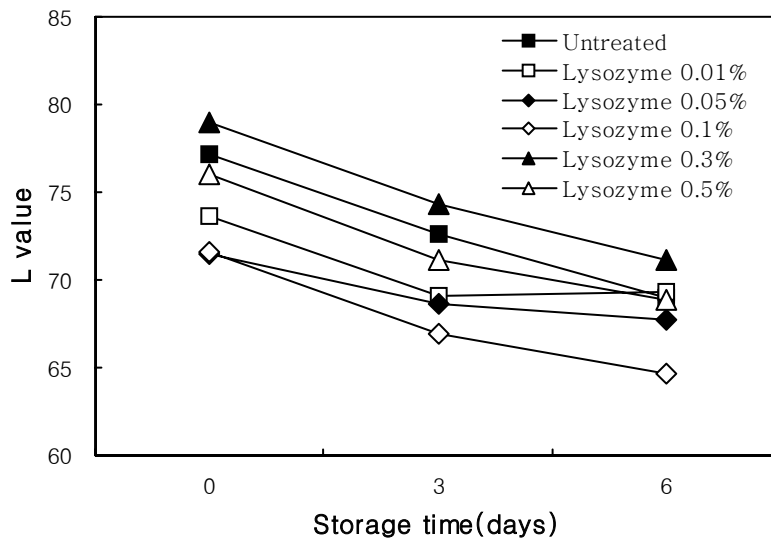


Fig. 90. Color changes of fresh-cut apples treated with 0.01~0.5% lysozyme during storage at 18°C.

(2) Chito-oligosaccharide

Chito-oligosaccharide는 키토산을 강산으로 화학적 분해하는 방법 혹은 키토산 분해효소를 이용하는 효소적 분해로 제조된 것으로 현재 식품공전에서는 효소적 분해로 제조된 것만을 인정하고 있는 향균성의 천연보존료이며, 최근에 건강기능성이 보고되면서 식품첨가물로의 용도가 주목되는 물질이다.

본 연구에서는 침지액 제조를 위한 천연 첨가제의 일환으로 시중에 유통되고 10% chito-oligosaccharide 액상제품을 구입하여 chito-oligosaccharide 자체가 가지는 초기 미생물 제어 효과와 변색방지 효과 및 사용 농도에 따른 관능적 특성을 확인하였다. 먼저, chito-oligosaccharide 농도 0.05~0.3% 범위의 처리구 모두에서 초기미생물 생육 저해 효과를 볼 수 있었다(Fig. 91). Chito-oligosaccharide 농도가 0.05%일 때 저장초기(0일차)의 저해효과는 1 log cycle 수준이었으며, 0.1% 및 0.3%의 농도에서는 2 log cycle 수준의 초기미생물 생육 저해 효과를 볼 수 있었다. 그러나 저장 3일차에서는 0.3%의 농도만이 2 log cycle 수준의 효과를 유지하였으며, 그 이하의 농도에서는 효과를 인정하기가 어려운 것으로 판단되었다. 또한 저장 6일차의 경우 chito-oligosaccharide 첨가농도가 높을수록 오히려 총균수가 증가되는 양상을 보였으며, 이러한 결과는 여러 차례의 반복 실험에서도 동일하였는 바, 저장 후반기에는 chito-oligosaccharide 자체 혹은 올리고당과 같은 분해물이 오히려 미생물의 증식을 촉진한 것으로 추정되었다.

Chito-oligosaccharide가 색도(L value)의 변화에 미치는 영향은 매우 부정적인 측면이 많은 것으로 확인되었다. 즉, Fig. 92에서 보는 바와 같이 저장초기(0일차)에 이미 갈변이 급속히 진행되어 lightness를 나타내는 L value가 대조구에 비해 평균 10 수준 감소되었다. 즉, 0.05%의 낮은 농도에서의 L value는 대조구에 비해 8 수준 감소하였고, 0.1% 및 0.3%에서는 각각 11 및 15 수준 감소되었다. 이러한 결과는 외관을 중심으로 한 관능검사에서도 그대로 반영되어 저장 초기부터 관능적 제품가치를 상실한 것으로 판단되었는바, 첨가제로의 사용이 불가한 것으로 판단하였다.

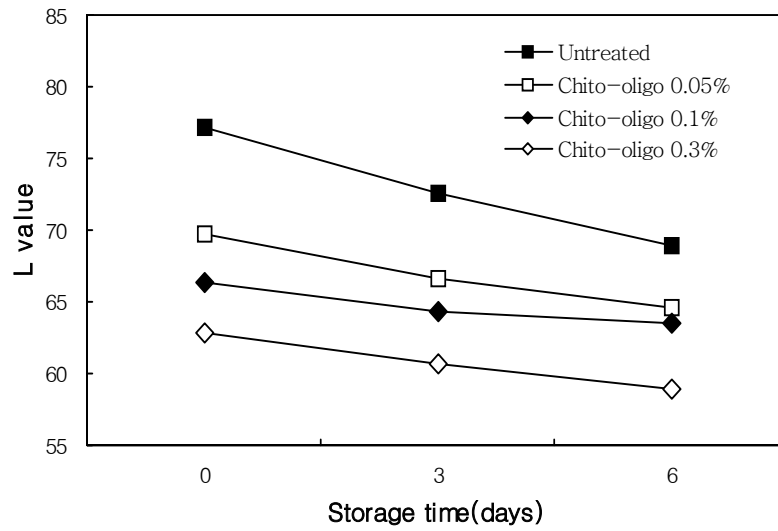


Fig. 91. Color changes of fresh-cut apples treated with 0.05~0.3% chito-oligo-saccharide during storage at 18°C.

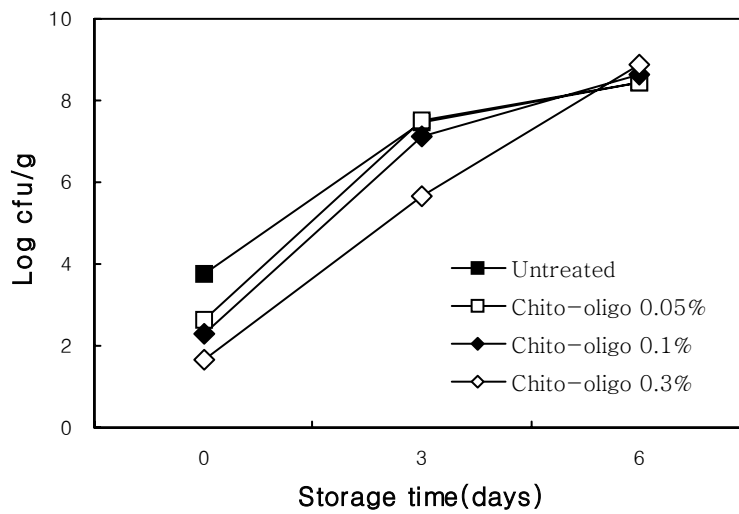


Fig. 92. Hurdle effect of 0.05~0.3% chito-oligosaccharide on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

(3) GSE(Grapefruit Seed Extract)

자몽종자추출물(grapefruit seed extract)은 항균성이 높은 천연물질로 자몽(*Citrus paradise*)의 종자를 물, 에틸알코올 또는 글리세린으로 추출한 것이다. 이의 주요 성분은 지방산, 플라보노이드 등으로 천연항균성 식품첨가물 소재에 응용이 많이 되고 있다. 그 응용분야가 매우 넓어, 수박을 수확한 후 수박의 자루 및 표피에 적용하여 수박의 신선도 유지를 연장시키기도 하며, 수확 후 밀감의 병해방지 및 선도유지, 김치, 어묵 등 다양한 농산물과 수산물에 대해 상업적으로 적용되고 있다. 이에 본 연구에서는 slice 사과를 대상시료로 하여 GSE의 항균특성 등을 확인하고자 하였다. 실험에 사용한 GSE는 글리세린으로 추출한 것으로 DF-100(QUINABRA- Quimica Natural, Brazil)이라는 제품명으로 판매되고 있으며, 그 성분은 GSE 50%와 glycerin 50%로 구성된 것이다.

GSE 농도를 50, 250, 500 및 1000 ppm으로 구분하여 slice 사과를 대상시료로 적용하였다. Fig. 93에서 보는 바와 같이 저장초기(0일차)의 경우 GSE의 농도가 높아질수록 확실한 총균수의 감소를 확인할 수 있어, 실험에 사용한 최대농도인 1,000 ppm의 경우 초기미생물이 거의 나타나지 않는 수준까지 총균수를 조절할 수 있었다. 그러나, 이러한 결과에도 불구하고 저장 3일차에 실험한 결과는 정반대의 상황으로 나타나, 오히려 GSE를 사용한 농도가 높을수록 총균수가 많은 현상이 발생하였으며, 최대농도인 1000 ppm의 경우 대조구에 비해 무려 2 log cycle 수준의 총균수가 증가하였음을 알 수 있었다(Fig. 94). 이러한 결과는 그 동안 보고된 내용과는 대치되는 것으로, 결국 본 실험에서 GSE를 사용하는 것이 현실성이 없음을 보여준다고 판단되었다.

한편, 색도의 실험결과도 매우 부정적인 것으로, Fig. 12에서 보는 바와 같이 저장초기(0일차)부터 GSE를 사용한 처리구 모두에서 색도가 매우 불량하였다. 이러한 결과는 저장기간 내내 동일한 양상이었으며, GSE의 농도가 높을수록 낮은 L value를 나타내었다.

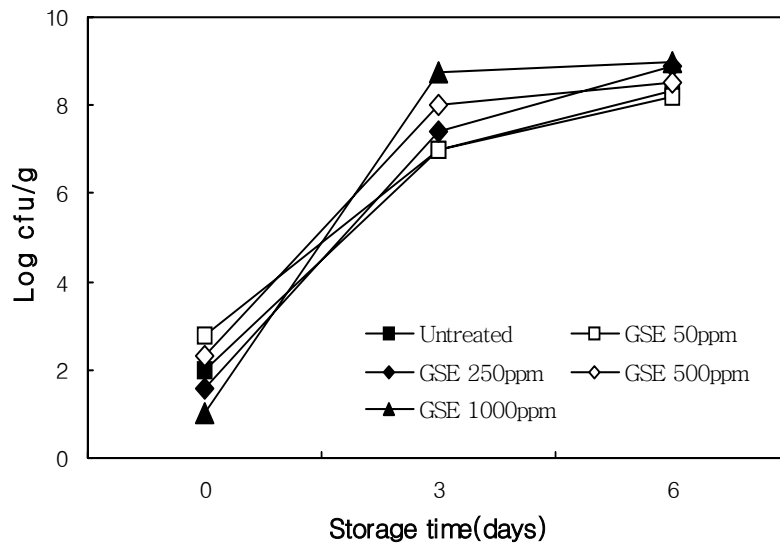


Fig. 93. Hurdle effect of 50~1,000 ppm GSE on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

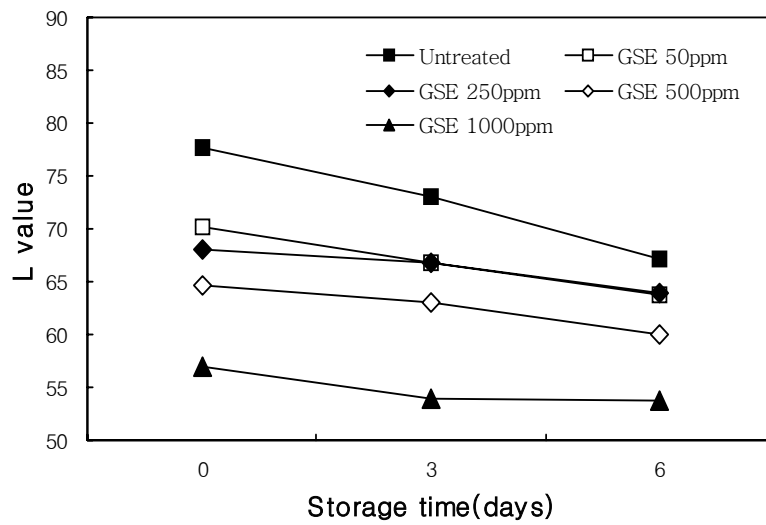


Fig. 94. Color changes of fresh-cut apples treated with 50~1,000 ppm GSE during storage at 18°C.

(4) Vitaten-S

Thiamine dilaurylsulfate를 주원료로 하여 유화제, 주정 및 정제수로 구성된 vitaten-S는 영양강화 용도로 식품에 많이 사용되며, 일본에서는 thiamine dilaurylsulfate가 영양강화제 및 보존항상제로서 그 이용이 서서히 확대되어 장류, 단무지, 절임야채류 등에 보존력 향상 목적으로 많이 사용되고 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 절단된 사과를 대상으로 vitaten-S의 항균특성 및 관능적 특성을 확인하여 fresh-cut 과채류의 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

Vitaten-S 농도를 0 ppm, 100 ppm, 1000 ppm 및 10000 ppm으로 구분하여 편절 사과를 침지하여 18℃ 저장 중 총균수 및 표면색도 변화를 확인하였다. Fig. 95에서 보는 바와 같이 저장기간 내내 무처리구와 유사하거나 다소 높은 수준의 총균수를 나타내어 중온균에 대한 생육 저해 효과는 없는 것으로 판단되었으며, 또한 모든 vitaten-S 처리구 뿐 아니라 농도 증가에 따른 강한 이취 및 이미로 인해 신선편이 식품의 전처리 용도로는 현실성이 없다고 판단되었다. 한편, 표면색도의 결과도 매우 부정적인 것으로 Fig. 96에서 보는 바와 같이 vitaten-S의 농도가 높을수록 낮은 L value를 나타내었으며 저장기간 내내 동일한 양상이었다.

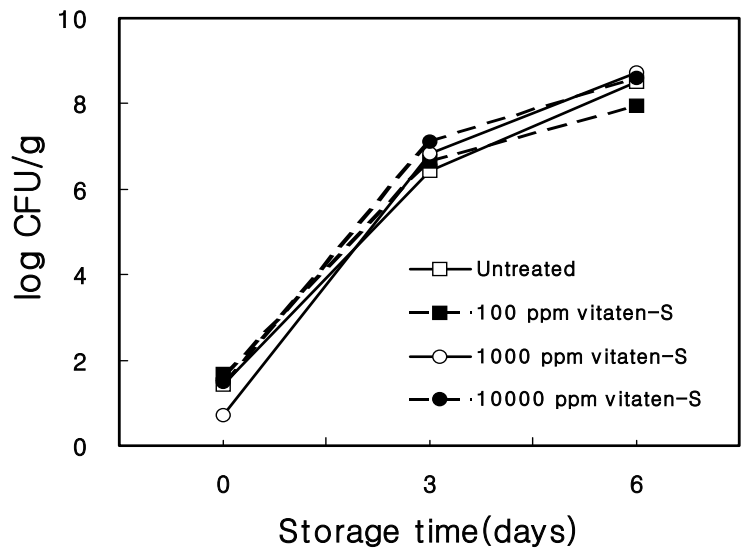


Fig. 95. Hurdle effect of vitaten-S on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

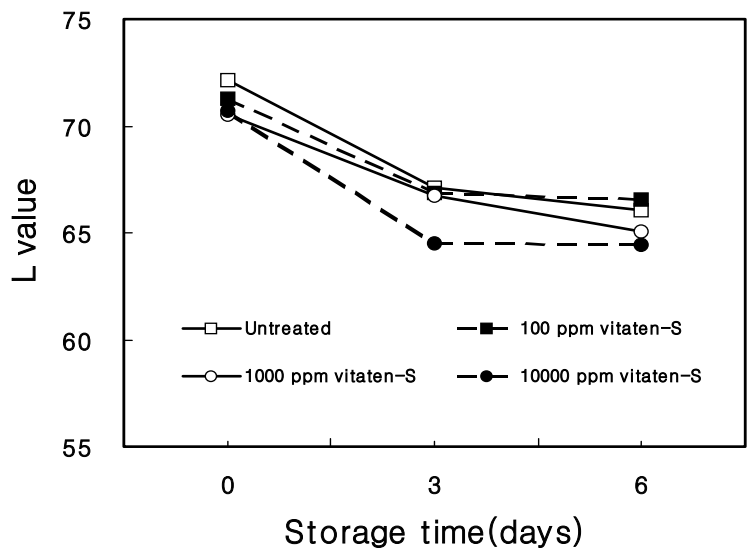


Fig. 96. Color changes of fresh-cut apples treated with vitaten-S during storage at 18°C.

(5) Hinokitiol

식물 유래의 천연물인 hinokitiol의 혼용처리에 따른 최적 농도를 알아보고자 하였다. Hinokitiol은 7원환 구조를 가지는 troporone이라는 화합물에 isopropyl기가 붙은 동족체로 편백나무에서 추출한 천연물질이며, 항균, 곰팡이 방지, 호흡 억제 작용 등이 있는 것으로 보고되고 있고, 또한 열, 산, 알칼리, 공기 등에 장기간 저장하여도 상당히 안정한 물질이며 유전 독성도 없다고 알려져 있다.

먼저, hinokitiol 농도 0-200 ppm을 사용하여 제조한 침지액에 편절 사과를 침지하여 18℃ 저장 중 총균수 변화를 확인하였다(Fig. 97). 저장 초기, 모든 hinokitiol 처리구에서 미생물 생육 억제 효과를 확인할 수 있었으며, 그 정도는 대조구와 비교시 약 1 log cycle 수준이었다. 저장 3일경, 농도에 따른 정균효과는 더욱 확연한 차를 나타내어 무처리구의 경우 1.3×10^7 CFU/g 수준이었으며, 100 ppm hinokitiol 처리구는 8.3×10^6 CFU/g, 150 ppm 이상의 hinokitiol 처리구에서는 7.4×10^5 CFU/g 수준을 나타내어 무처리구에 비해 최대 약 1.5 log cycle 정도의 정균효과를 나타내었다. 이에 혼용 처리시 최적 농도는 150 ppm 수준인 것으로 판단되었으며, hinokitiol 처리에 따른 색도변화에 있어서 Fig. 98에서 보는 바와 같이 부정적 영향은 없는 것으로 여겨졌다.

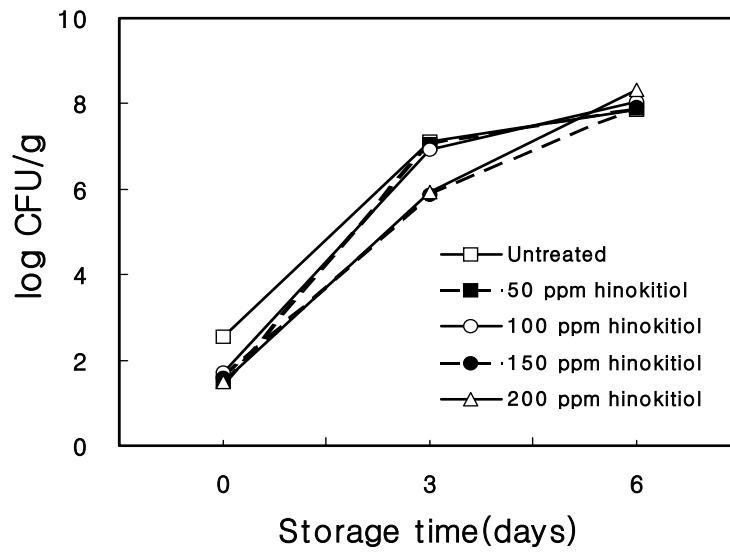


Fig. 97. Hurdle effect of hinokitiol on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

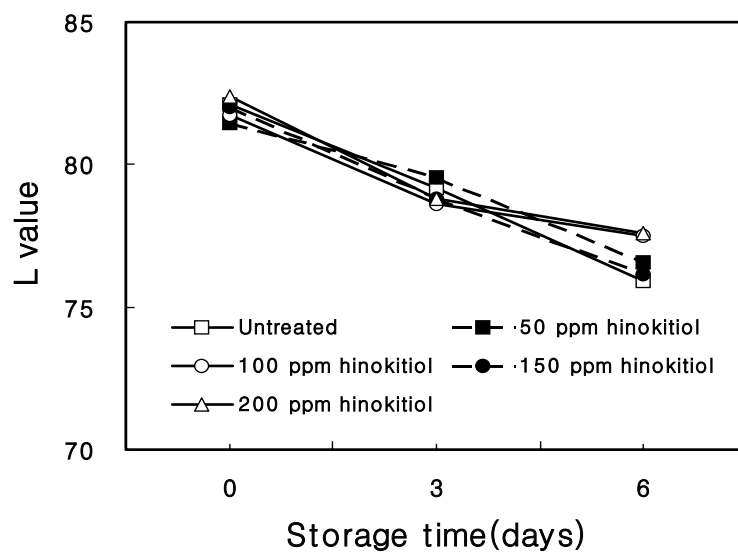


Fig. 98. Color changes of fresh-cut apples treated with hinokitiol during storage at 18°C.

라) 천연항균물질 혼용에 따른 효과

앞서 실험한 천연항균물질 종류에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화의 연구결과에서 그 효과가 인정되며, 산업적으로 적용이 가능할 것으로 판정되는 소재, 즉, polylysine과 nisin을 혼용처리 하여 저장 중 미생물 생육 저해 측면에서의 synergy 효과를 확인함과 동시에 색도에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 이때, 적용한 각 첨가물 소재의 사용 농도는 일정수준 앞선 실험에서 효과가 인정되는 최소 농도를 기준으로 하여 최소 농도 이상으로 침지액을 제조하면서 절단한 사과를 침치하여 18℃ 저장 중 총균수 및 색도를 측정하였다(data not shown).

그 결과, 저장 초기에는 무처리구에서 약 2 log CFU/g 수준으로 나타났으며, polylysine과 nisin을 혼용한 처리구 모두에서는 약 1 log cycle 감소한 1 log CFU/g 수준으로 나타났다. 그러나 저장 3일차에는 무처리구의 경우 약 5 log CFU/g 수준으로 나타났고, 예상과 달리 혼용 처리구에서 오히려 더 많은 총균수인 약 6 log CFU/g 수준으로 나타났으며 저장 6일차까지 같은 양상으로 총균수가 증가하여 무처리구의 경우 8 log CFU/g 수준이었으며, 혼용처리구의 경우에는 9 log CFU/g 수준으로 나타났다. 이러한 결과는 여러 차례 반복 실험에서도 동일하였으며, 이는 두 첨가제의 혼용에 의한 부반응에 의해 미생물의 생육을 촉진시키는 것으로 추정되었다. 이러한 hurdle의 조합에서 부반응을 일으키는 보고는 미비한 실정으로 보다 심도 있는 연구가 앞으로 진행되어야 할 것으로 여겨진다.

혼용처리 후 저장 중 색도 변화(L value)에 미치는 영향은 polylysine 단독처리의 결과와 유사하게 나타났으며, 이는 두 첨가제의 혼용에서 색도에 미치는 부정적 영향은 크지 않은 것으로 판단되었다.

앞서 실험한 첨가제 종류에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화의 연구 결과에서 그 효과가 인정되는 소재 즉, nisin과 pediocin을 혼용처리 하여 저장에 따른 미생물 생육 저해 측면에서의 synergy 효과 및 색도에 미치는 영향을 알아보려고 하였다. 이때 적용한 각 첨가물 소재의 사용 농도는 앞선 실험에서 일정수준 효과가 인정되는 최소 농도를 기준으로 하여 다음과 같은 비율로 제조하여 전처리한 후 18℃ 저장에 따른 총균수 및 표면색도 변화를 측정하였다.

Treatment I	nisin : pediocin = 400 ppm : 400 ppm
Treatment II	nisin : pediocin = 400 ppm : 800 ppm

Treatment III	nisin : pediocin = 400 ppm : 1,200 ppm
Treatment IV	nisin : pediocin = 1,200 ppm : 400 ppm
Treatment V	nisin : pediocin = 1,200 ppm : 800 ppm
Treatment VI	nisin : pediocin = 1,200 ppm : 1,200 ppm

그 결과, 처리 직후 무처리구를 포함한 모든 처리구의 초기균수가 평균 1.0×10^7 CFU/g 수준으로 매우 낮은 분포를 보여 처리구간 초기 미생물 제어 효과를 확인하기 어려웠으나, 저장 3일경 혼용처리구 모두 무처리구에 비해 0.5-1.0 log cycle 수준의 정균효과를 나타내어 단용처리 때보다 상대적으로 우수한 미생물 제어 효과를 확인할 수 있었다. 특히, 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin 혼용처리구의 경우 초기균수가 5.3×10^6 CFU/g 수준으로 나타났으며, 또한 저장기간 내내 가장 우수한 미생물 제어 효과를 보여 저장 6일경에는 3.2×10^6 CFU/g 수준으로 나타나 무처리구보다 약 1 log cycle 수준의 정균효과를 유지하였다(Fig. 99).

저장기간에 따른 사과 색도 변화는 Fig. 100과 같이 초기 L value가 nisin의 농도에 의존하는 경향을 보여 1,200 ppm nisin 처리구 모두 무처리구보다 높은 L value를 보였으며, 이러한 양상은 저장 6일경에도 유사하게 나타나, 혼용처리에 의한 갈변 심화는 발생하지 않는 것으로 판단되었다.

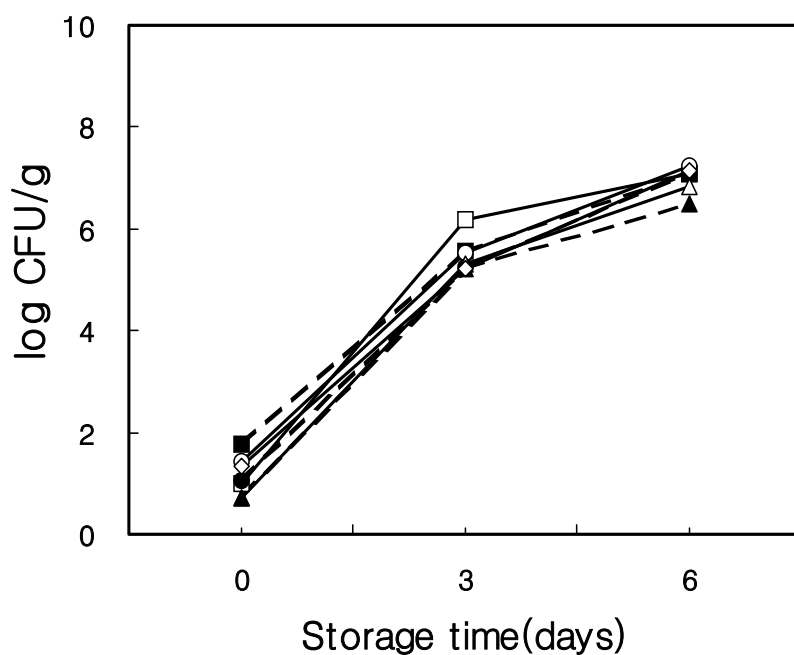


Fig. 99. Hurdle effect of nisin and pediocin mixture on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

[—□— : Untreated, --■-- : 400 ppm nisin + 400 ppm pediocin, —○— : 400 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- : 400 ppm nisin + 1,200 ppm pediocin, —△— : 1,200 ppm nisin + 400 ppm pediocin, --▲-- : 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, —◇— : 1,200 ppm nisin + 1,200 ppm pediocin]

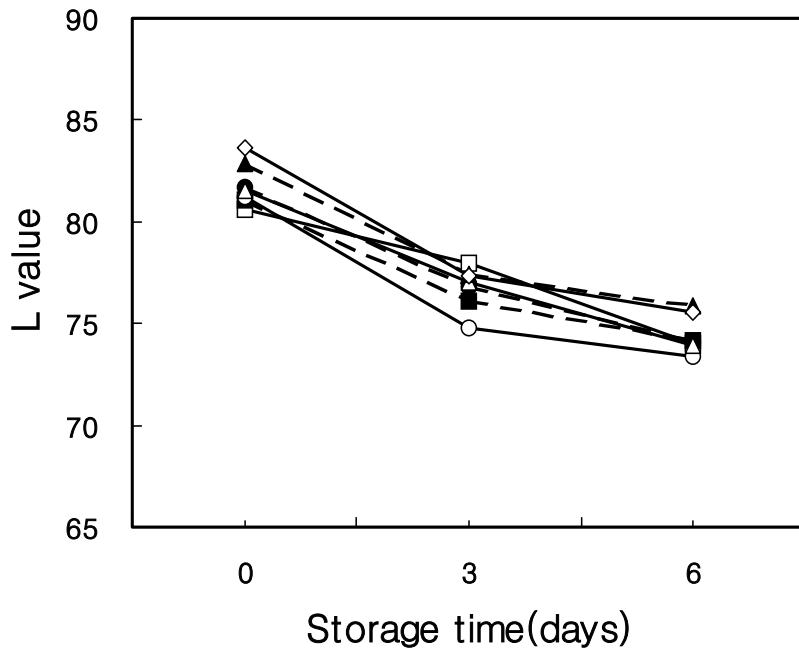


Fig. 100. Color changes of fresh-cut apples treated with nisin and pediocin mixture during storage at 18°C.

[—□— : Untreated, --■-- : 400 ppm nisin + 400 ppm pediocin, —○— : 400 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- : 400 ppm nisin + 1,200 ppm pediocin, —△— : 1,200 ppm nisin + 400 ppm pediocin, --▲-- : 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, —◇— : 1,200 ppm nisin + 1,200 ppm pediocin]

마) 유기산 처리에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화

앞서 실험에서 이루어진 천연 첨가제 혼용에 의한 미생물 생육 저해 측면에서의 synergy 효과는 긍정적인 결과를 얻지 못하였다. 이에 천연첨가물 즉, polylysine에 유기산을 혼용하는 방법을 모색하기 위해 산업에서 널리 사용되고 있는 citric acid와 malic acid의 단독 효과를 확인하고 병용에 적합한 농도를 결정하고자 하였다. 유기산의 항균성은 pH 저하작용에 기초함과 동시에 유기산 자신이 갖고 있는 항균력에 의한 것으로 알려져 있으며, 이런 특성을 이용하여 채소류 등의 농산물 전처리 공정에서 세정 시 표면 미생물의 감소를 목적으로 사용되고 있다. 따라서 이러한 유기산을 이용하여 사과를 전처리 한 후 저장기간에 따른 총균수 및 색도 변화를 확인하고자 실험을 실시하였다.

(1) Citric acid 처리에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화

Citric acid 0.1~1.5% 농도로 제조한 침지액에 slice 사과를 침지하여 18°C 저장 중 총균수의 변화 및 색도 변화를 확인하였다. 침지후 초기 미생물의 수는 무처리구와 0.25% 이하 citric acid 처리구에서의 총균수는 2 log CFU/g 수준이었으며, 0.5% 이상 citric acid 처리구에서는 1 log CFU/g 수준으로 나타났다. 즉, 0.5% 수준의 citric acid 농도에서 초기 3일간 미생물수 양상에 뚜렷한 차이를 보여, 최소 농도가 0.5% 수준임을 알 수 있었다. Citric acid 농도 0.5% 이상의 처리구를 비교해 볼 때(Fig. 101), 1.0% citric acid 처리구가 가장 우수한 것으로 나타나 3일차에 4 log CFU/g, 6일차에는 6 log CFU/g 수준을 보였다. 한편, 0.75% 이상의 citric acid 처리구에서는 저장 4일차를 전후해서부터 무처리 및 0.5% 이하의 citric acid 처리구에 비해 오히려 총균수가 증가하는 현상을 보였다.

저장기간에 따른 색도(L value)의 변화에 있어서는 총균수의 경우와 다른 양상을 보여 저장기간에 관계없이 무처리가 가장 우수한 것으로 나타났으며, 저장 초기부터 3일까지는 citric acid의 농도가 높아질수록 L value가 낮은 것으로 나타나 갈변이 심화됨을 알 수 있었다(Fig 102). 특히, 초기미생물 제어 측면에서 우수한 1.0% citric acid 처리구의 경우, 저장 초기부터 L value가 가장 낮은 것으로 나타났으며, 이러한 결과는 저장 6일까지 지속되었다.

한편, 관능적 특성에 있어 전반적으로 저장 3일까지에는 무처리구 및 1.25% citric acid 처리구를 제외하고 열등한 수준이었으며, 저장 6일의 경우 대부분의 처리구가 매우 열등한 것으로 나타났다.

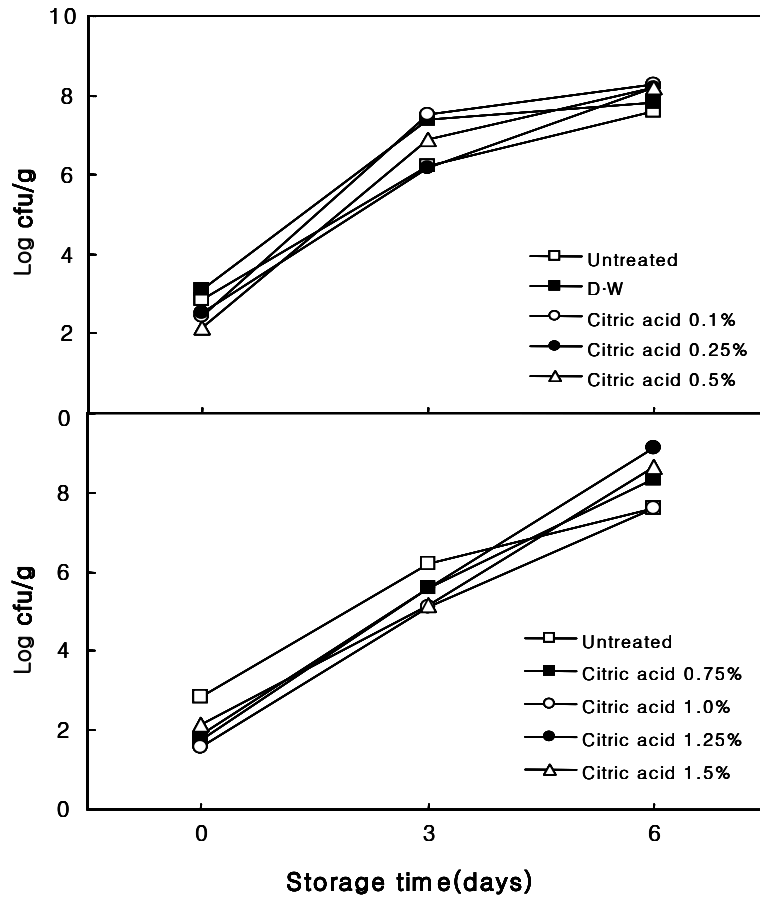


Fig. 101. Hurdle effect of 0.1~1.5% citric acid on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

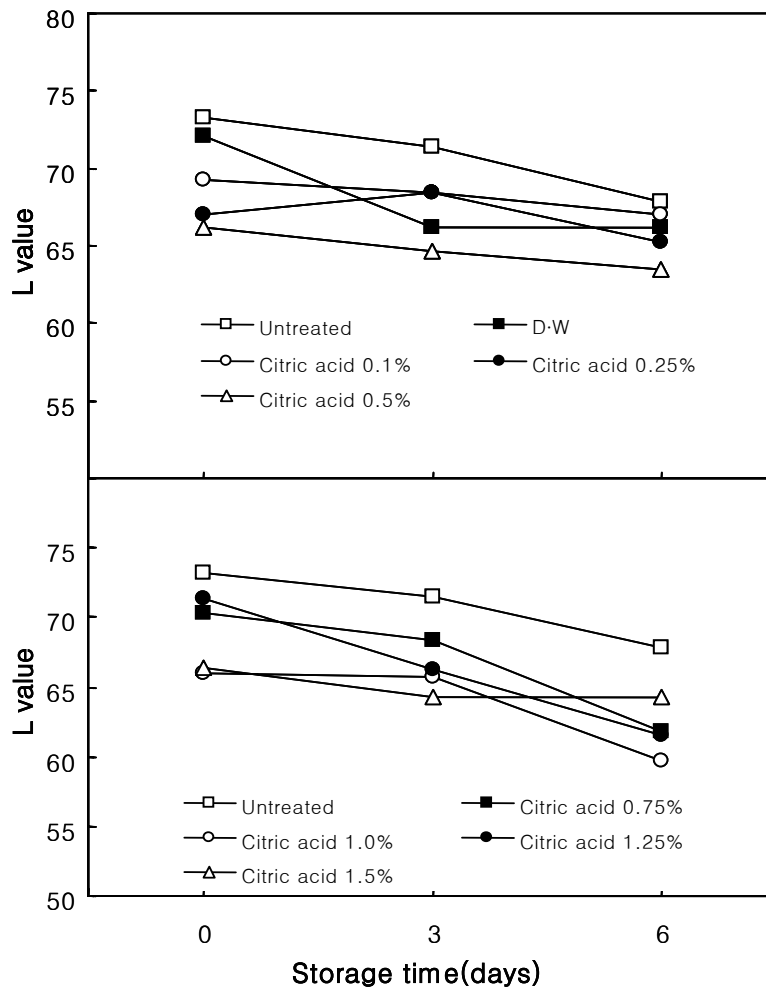


Fig. 102. Color changes of fresh-cut apples treated with 0.1~1.5% citric acid during storage at 18°C.

(2) Malic acid 처리에 따른 미생물 제어 효과 및 색도 변화

Malic acid 농도 0.1~1.5%를 사용하여 제조한 침지액에 slice 한 사과를 침지하여 18℃ 저장 중 총균수의 변화 및 관능적 특성을 확인하였다. 침지 후 초기 미생물수의 수준을 확인한 결과 무처리구의 경우 3 log CFU/g 수준이었으며, 0.1% 이상의 모든 malic acid 처리구에서는 1 log CFU/g 수준을 보였다(Fig. 103) 18℃ 저장 3일차를 볼 때, malic acid의 농도가 높아질수록 총균수의 증가가 억제되는 것을 알 수 있었으며, 특히, 0.75% 수준 이상의 malic acid 농도에서는 총균수가 4 log CFU/g 수준 이하로 저해되는 것으로 나타났다. 이러한 정균작용은 citric acid의 농도에 따른 결과와 비교할 때에 citric acid 1.0% 처리구에서 볼 수 있는 억제수준에 해당된다. 한편, malic acid의 경우 citric acid 처리구에서 보인 것과 같은 0.75% 이상의 비교적 높은 citric acid 농도에서 저장 후반기에 오히려 총균수가 증가하는 현상은 나타나지 않았다.

Malic acid의 농도별 처리 후 저장기간에 따른 사과의 색도(L value) 변화에 있어서는 citric acid 처리의 경우와 유사하게 전반적으로 malic acid의 농도가 높아질수록 L value가 낮은 것으로 나타나 갈변이 심화됨을 알 수 있었다(Fig. 104). 특히, 1.25% 이상의 malic acid 처리구에서는 저장 초기에 가장 낮은 L value를 나타내었으며, 저장 3일차부터는 현저하게 저하되어 상품적 가치를 잃어버리는 것으로 보여져 실제 적용에 어려움이 있는 것으로 판단되었다.

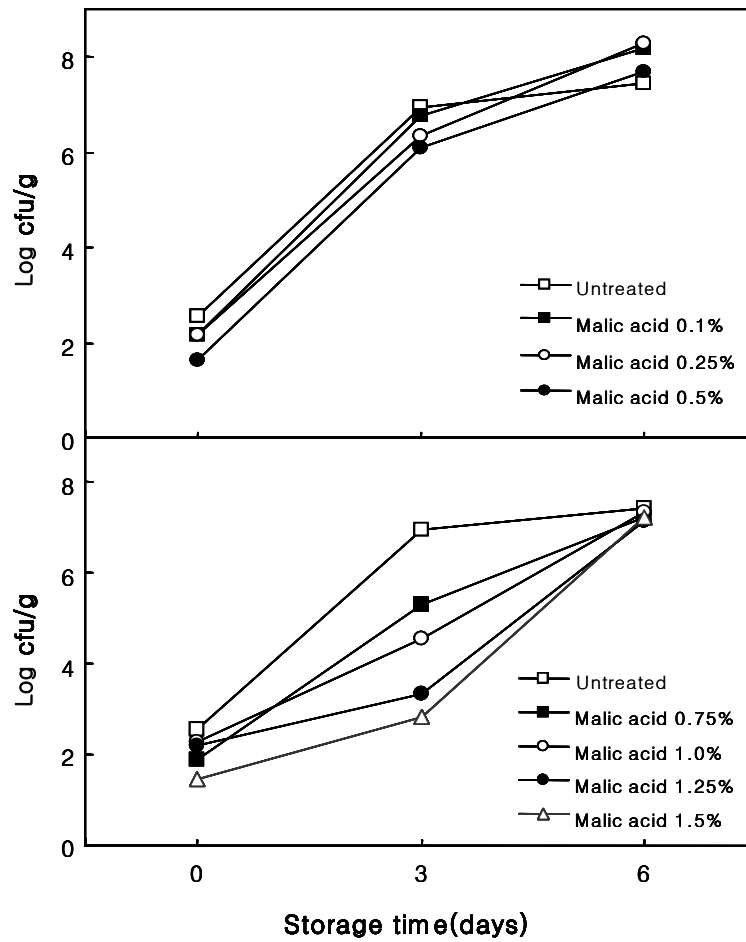


Fig. 103. Hurdle effect of 0.1~1.5% malic acid on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

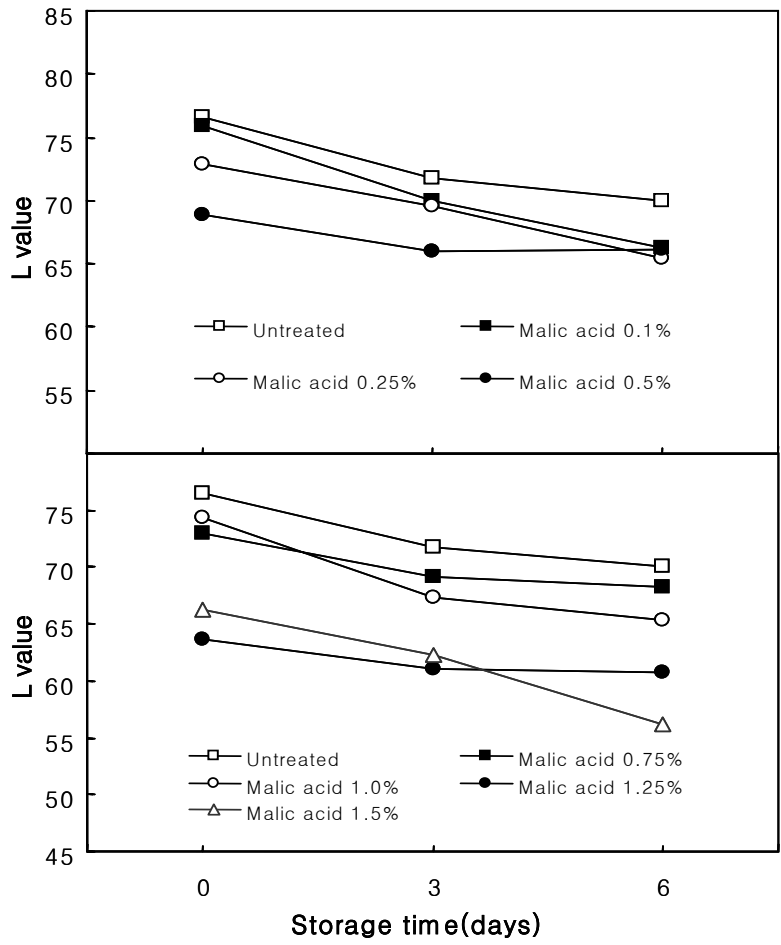


Fig. 104. Color changes of fresh-cut apples treated with 0.1~1.5% malic acid during storage at 18°C.

바) 천연항균물질과 유기산 혼용에 따른 hurdle effect

선행된 실험에서 천연 첨가물 중 가장 우수한 미생물 생육 저해 효과를 나타낸 polylysine에 유기산 중 상대적으로 더 높은 항균활성을 나타낸 malic acid를 혼용하여 최적의 항균활성을 나타내는 농도를 알아보고자, 다음과 같은 13가지의 농도비로 구성된 침지액에 slice 사과를 침지하여 18℃ 저장 중 총균수 및 색도 변화를 측정하였다.

처리구 I	Untreated
처리구 II	polylysine : malic acid = 0.4% : 0.25%
처리구 III	polylysine : malic acid = 0.4% : 0.5%
처리구 IV	polylysine : malic acid = 0.4% : 0.75%
처리구 V	polylysine : malic acid = 0.4% : 1.0%
처리구 VI	polylysine : malic acid = 0.6% : 0.25%
처리구 VII	polylysine : malic acid = 0.6% : 0.5%
처리구 VIII	polylysine : malic acid = 0.6% : 0.75%
처리구 IX	polylysine : malic acid = 0.6% : 1.0%
처리구 X	polylysine : malic acid = 0.8% : 0.25%
처리구 XI	polylysine : malic acid = 0.8% : 0.5%
처리구 XII	polylysine : malic acid = 0.8% : 0.75%
처리구 XIII	polylysine : malic acid = 0.8% : 1.0%

그 결과, Fig. 105에서 보는 바와 같이 저장기간 내내 처리구 IX(polylysine : malic acid = 0.6% : 1.0%)에서 가장 높은 미생물 저해 효과를 나타내었다. 특히 저장 3일차에서는 무처리구 뿐 아니라 타처리구에 비해서도 매우 높은 항균력을 나타내는 것으로 확인되었으며, 또한 앞서 실험에서 행해진 polylysine 및 malic acid의 단독처리 3일차 결과에서 나타난 항균활성을 서로 비교해 볼 때, 적절한 농도로 혼용 시 항균활성 측면에서의 synergy 효과도 확인할 수 있었다. 한편, 저장 6일차에서는 처리구 IX(polylysine : malic acid = 0.6% : 1.0%)와 처리구 VII(polylysine : malic acid = 0.6% : 0.5%)에서 서로 비슷한 항균 활성을 보여 약 6 log CFU/g의 수준을 보였으며, 이는 polylysine 단독처리 6일차에서 나타난 항균활성과 유사한 수준이었다.

저장 중 색도 변화에 있어서는, polylysine 및 malic acid의 농도에 따른 처리구간의 정확한 유의성을 확인하기가 어려웠으나(Fig. 106), 가장 높은 농도인 처리구 XIII (polylysine : malic acid = 0.8% : 1.0%)에서 저장초기 가장 낮은 L value를 보였다. 이는 첨가물이 과도하게 이용되어 침지액의 농도가 일정 수준 이상일 경우 색도 변화에 부정적 영향을 미치는 것으로 판단되어졌다.

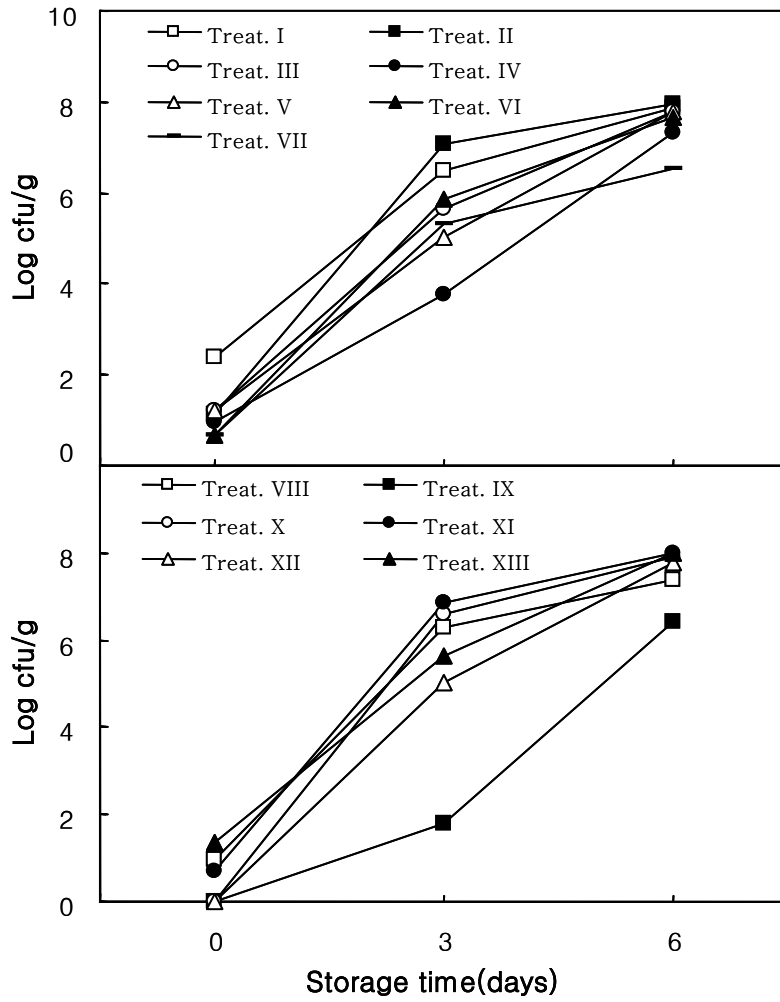


Fig. 105. Hurdle effect of polylysine and malic acid mixture on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

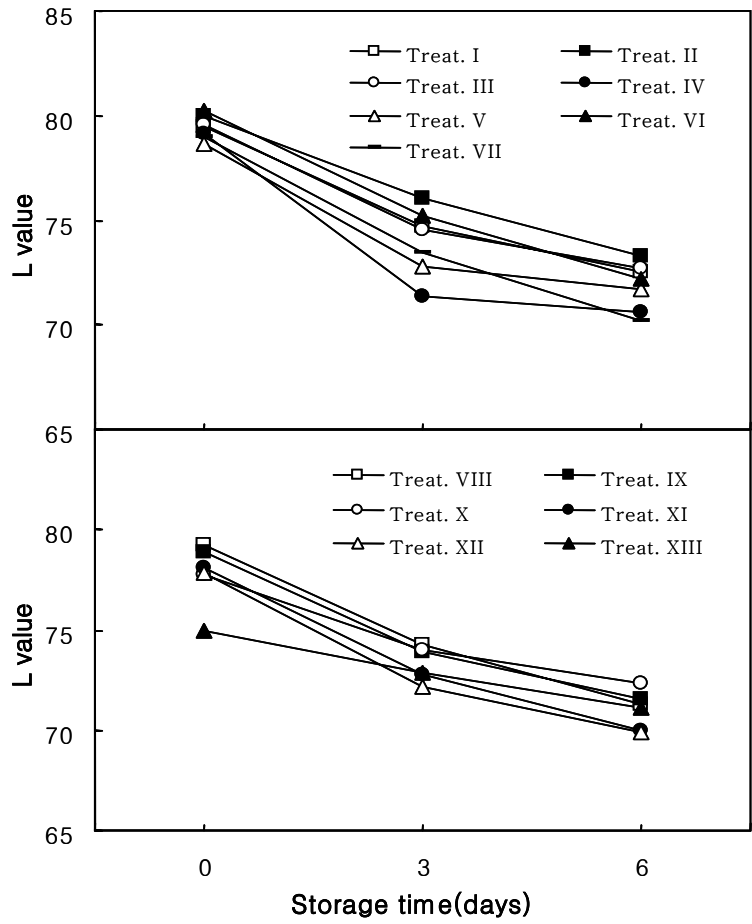


Fig. 106. Color changes of fresh-cut apples treated with polylysine and malic acid mixture during storage at 18°C.

사) 물리적 방법의 hurdle 탐색

이상에서 언급한 첨가제 처리만으로 fresh-cut 사과와 장기저장을 위한 효율적인 hurdle 기술적용을 충족시키기에 미흡하며, 또한 많은 첨가제의 혼용은 관능적인 면에서 품질 저하를 야기시킬 수 있을 것이라고 생각하여, 산업에서 바로 적용이 가능할 정도로 간단하며 경제적인 방법이 강구되어야 할 것으로 판단되었다. 이에 첨가제가 아닌 물리적 방법의 일환으로 heating 처리를 적용하고자 하였으며, 그 방법으로 열풍 및 열수 침지 방법으로 실험을 진행하였다.

(1) 증탕 열처리

증탕된 증류수를 열전달 매체로 사용하여 40~70℃에서 30초~2분간 mild heating 처리하면서 18℃ 저장 중의 hurdle effect를 확인하였다. 결론적으로 40℃-1분-dipping 처리가 가장 우수한 hurdle effect를 보여(Fig. 107), 18℃ 저장 3일차에 대조구에 비해 2 log cycle 수준 이상의 효과를 보였으며, 이러한 결과는 저장초기(0일차)부터 저장 6일까지 지속되었다. 효과의 강도는 40℃-1분-dipping에 미치지 못하였으나 40℃-2분-dipping 및 50℃-1분-dipping 처리구의 경우도 1 log cycle 이상의 효과를 보였다. 반면에 예상과는 달리 처리구 중에서 가장 높은 온도 조건인 70℃-1분-dipping 처리구는 대조구와의 효과 차이를 확인 할 수가 없었다.

색도의 경우에는 거의 모든 처리구가 18℃ 저장기간동안 대조구와 비슷한 수준 혹은 약간 높은 L value를 유지하였다(Fig. 108). 그러나, 70℃-1분-dipping 처리구 색도에 매우 부정적인 영향을 미쳐, 저장초기(0일차) 다른 처리구에 비해 L값이 15수준 이상 감소하였고, 이러한 양상은 저장 6일차까지 계속되었다.

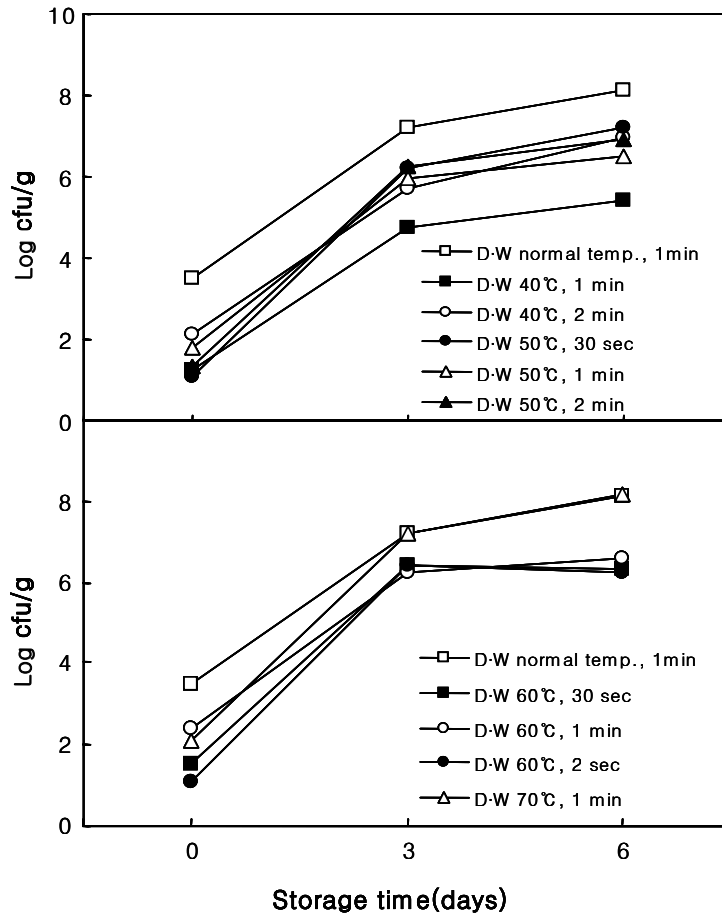


Fig. 107. Hurdle effect of heat treatment on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

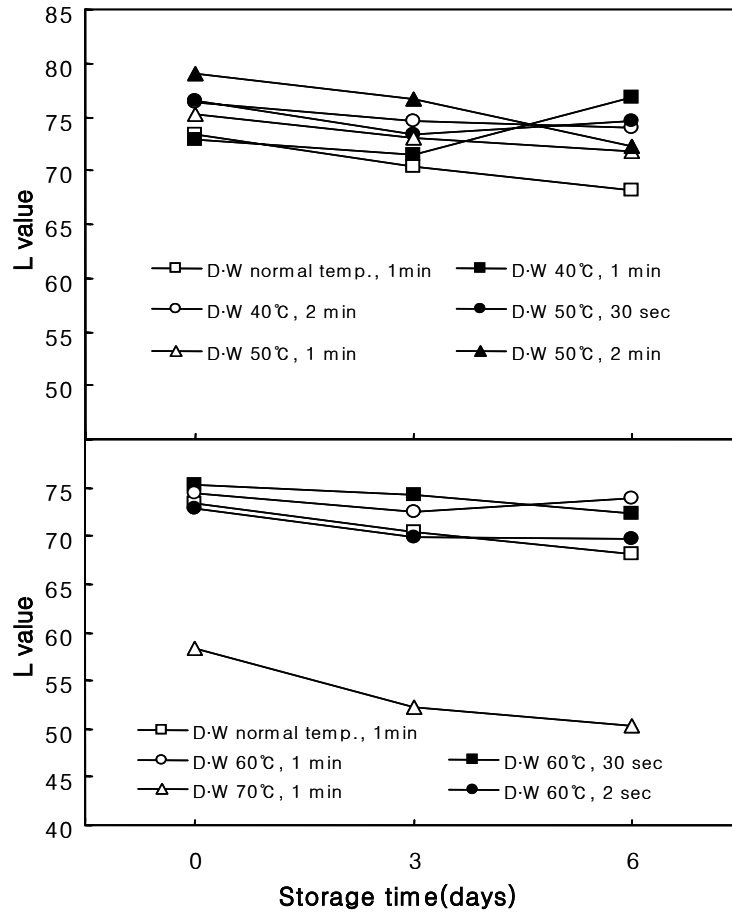


Fig. 108. Color changes of fresh-cut apples treated with heating during storage at 18°C.

(2) 송풍식 열전달

송풍을 통한 열전달은 작업의 편리성 측면에서 시도해봄직한 측면이 있는 바, 침지한 사과와 절단면 표면온도가 15, 30, 40 및 50℃로 되는 수준에서 1~3분간 송풍을 통한 열처리를 시행하였다(data not shown). 결론적으로 총균수 및 색도 모두에서 처리온도 및 처리시간에 따른 처리구간의 유의성을 확인하기가 어려웠으며, 관능적 측면에서 외관상 시료 표면의 건조가 과도하게 진행되는 문제점이 발생하였고, 또한 시료의 표면온도를 열송풍을 통해 통제하기에도 여러가지 문제점이 있는 것으로 들어나 능률적인 측면으로 볼 때 무리가 있을 것으로 판단되었다. 그러나 처리구내에서는 40℃-3분-열풍 및 50℃-1분-열풍 처리구가 초기 미생물 제어에 가장 우수하였으며, 다른 처리구에 비해 1 log cycle 전후 수준의 총균수 제어 효과를 보였다.

아) 갈변 억제제와 조직 강화제의 적용 방안

본 연구에서는 사과의 외관적 품질을 고려한 첨가제의 혼용을 위해 갈변 억제제로 잘 알려진 ascorbic acid의 농도를 결정하고자 하였다. 먼저, ascorbic acid 농도 0.1~1.0%를 사용하여 제조한 침지액에 slice 사과를 침지하여 18℃에 저장하면서 색도 변화와 함께 총균수의 변화를 확인하였다. 저장기간에 따른 색도(L value)의 변화에 있어서는 Fig. 109와 같이 농도별로 뚜렷한 차이를 볼 수 있어, ascorbic acid의 농도가 높을수록 변색이 억제되는 것을 알 수 있었다. 특히, ascorbic acid 0.5% 이상의 농도에서는 저장 3일차에도 L값이 70이상으로 색도가 양호한 것으로 나타나, 색도 측면에서 ascorbic acid의 최소농도가 0.5% 수준임을 알 수 있었다. 또한 ascorbic acid의 농도가 높아짐에 따라 일정수준의 미생물 생육 저해 효과(Fig. 110)를 볼 수 있었으며, 0.1% ascorbic acid 처리구에 비해 1.0% ascorbic acid 처리구가 약 1 log cycle 수준의 생균수 감소 효과를 나타내어 hurdle의 한 조건으로도 적용 가능할 것이라 판단되었다.

조직강화를 위해 사용하는 것을 목적으로 현 산업에서 많이 이용하는 calcium chloride의 최적 농도를 선정하기 위해 농도에 따른 관능적 특성을 확인하고자 하였다. 먼저, calcium chloride 농도 0.1~1.0%에서 제조한 침지액에 slice 사과를 침지하여 18℃에서 저장하면서 관능적 특성을 조사한 결과, 저장 6일차에서도 모든 calcium chloride 처리구의 조직이 양호하였으며, ascorbic acid의 경우와 마찬가지로 calcium chloride를 처리함에 따라 변색이 억제되는 것을 볼 수 있었으며, 그 효과는 저장기간 내에 지속적으로 나타났다(Fig. 111). 한편, ascorbic acid의 경우에 비해 calcium

chloride 처리구는 전반적으로 저장 초기부터 대조구로 사용한 무처리구에 비해 색도 변화의 척도로 이용한 L value의 평균 ΔL 값이 5~10 수준 높은 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 calcium chloride가 색도에 미치는 영향이 크지 않을 것이라는 당초 예상과는 차이가 있는 것으로, slice 사과 시료의 저장 초기 색도 변화를 제어하는 데에 calcium chloride가 유용하게 사용될 수 있으며, 또한 미생물 생육 저해 측면에서도 그 효과가 다소 인정되며 최적농도는 0.75%로 판단되었다(Fig. 112).

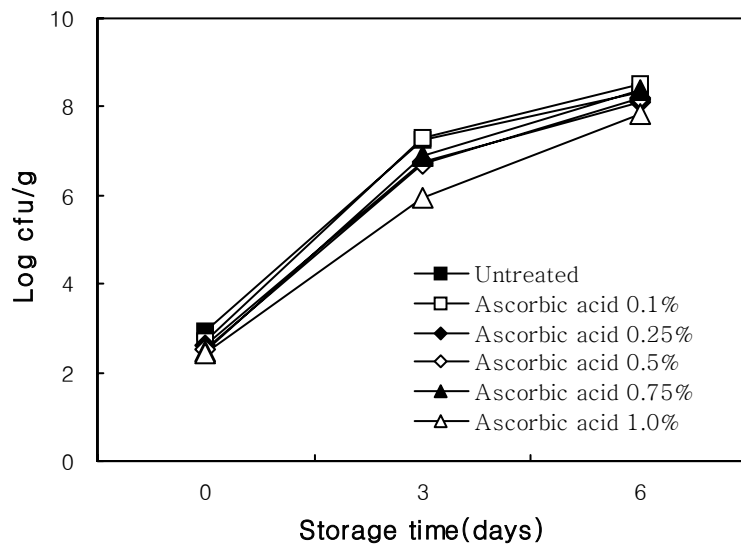


Fig. 109. Hurdle effect of 0.1~1.0% ascorbic acid on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

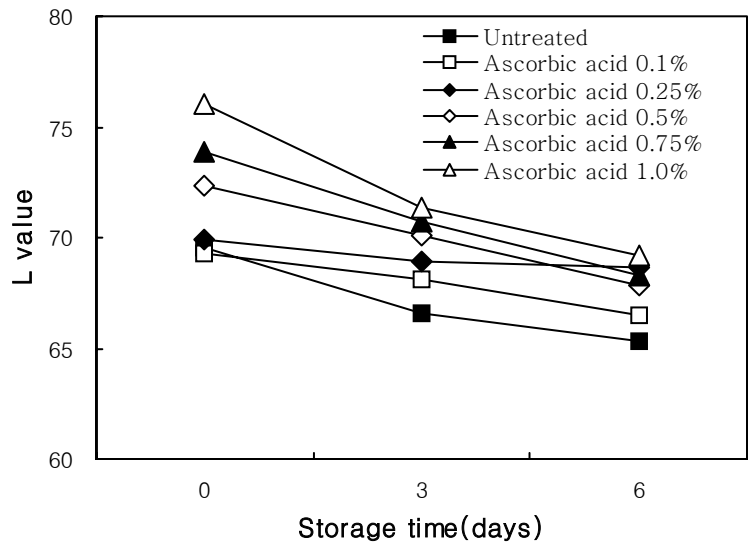


Fig. 110. Color changes of fresh-cut apples treated on 0.1~1.0% ascorbic acid during storage at 18°C.

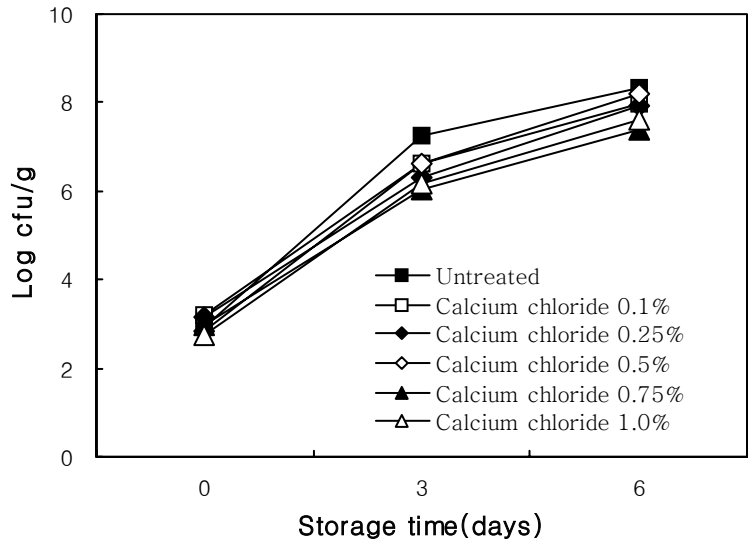


Fig. 111. Hurdle effect of 0.1~1.0% calcium chloride on microbial count of fresh-cut apples during storage at 18°C.

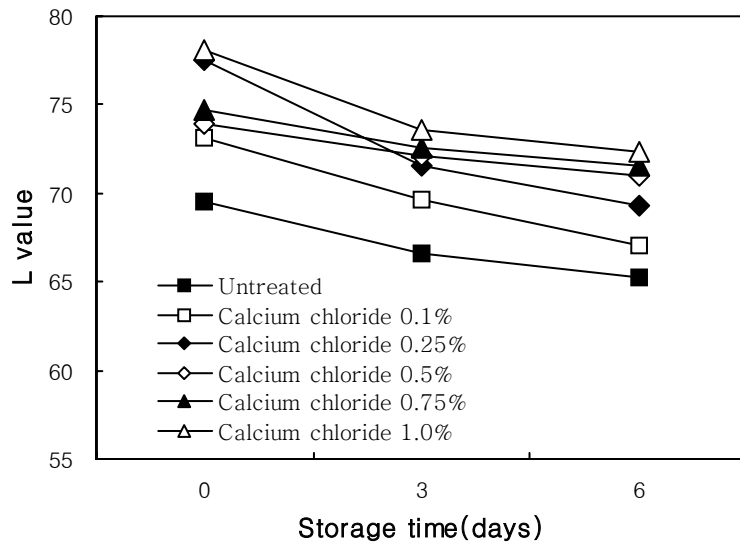


Fig. 112. Color changes of fresh-cut apples treated with 0.1~1.0% calcium chloride during storage at 18°C.

자) 처리조건별 저장중 품질변화 검토

(1) Fresh-cut 사과외 장기저장중 품질특성 변화

단일 hurdle의 적용 결과들을 토대로 하여, 미생물 측면에서의 hurdle을 다단계적으로 도입함과 동시에 품질 특성을 고려한 첨가제를 혼용함으로써 장기 저장에 따른 효과를 확인하였다. 즉, 미생물 증식저해와 관련한 hurdle effect를 우선적으로 고려한다는 기준에서 1차적 hurdle로는 침지에 이용할 PLMA(polylysine 0.6% : malic acid 1.0%) dips solution으로 선정하였으며, 2차적 hurdle로는 물리적 방법의 일환으로 4 0°C 1분간 mild heating을 순차적 처리방법이 아닌 40°C dips solution에 직접 침지하는 병행처리 방법으로 사용함과 동시에 외관상의 품질에 가장 크게 영향을 미치는 것으로 판단되는 과육의 갈변을 고려하여 ascorbic acid 1.0% 및 조직강화를 목적으로 한 calcium chloride 0.75%를 함께 혼용하였다. 또한 장기저장 시 필수요소인 저온저장(4°C)을 하나의 hurdle factor로 적용함으로써 초기에 목적으로 한 15일 이상 장기유통 가능성을 확인함과 동시에 저장 중 fresh-cut 사과의 미생물 생육 저해 효과 및 품질특성 변화를 확인하였다.

(가) 총균수 측정

Fresh-cut 사과와 저장기간에 따른 일반세균의 생육 상태는 Fig. 113과 같이 대조구와의 차이를 뚜렷하게 볼 수 있었다. 대조구의 경우 초기 2 log CFU/g의 수준을 나타내었으며 저장 15일차에서는 약 3 log cycle 증가한 5 log CFU/g 수준을 나타내었고, 처리구 II, III, IV에서는 저장 10일차까지 세균의 생육을 전혀 보이지 않았다. 반면 처리구 II에서는 저장 5일차까지 세균의 생육을 보이지 않았으나 저장 10일차 경에는 2 log CFU/g의 수준을 나타내어 40°C mild heating 병행 처리는 hurdle 효과를 더욱 강화한 것으로 볼 수 있었다.

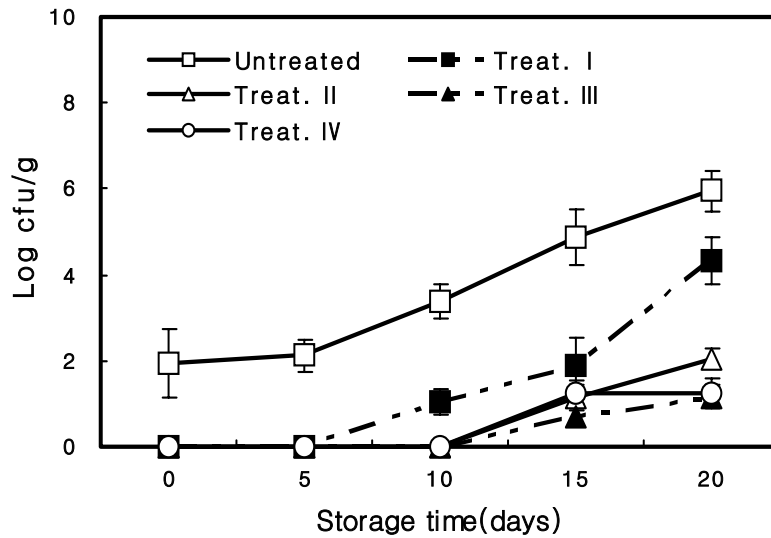


Fig. 113. Changes in microbial count of minimally processed apples during storage at 4°C.

[—□— : Untreated, --■-- : PLMA(polylysine 0.6% + malic acid 1.0%),
 —△— : 40°C PLMA, --▲-- : PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0% + calcium chloride 0.75%), —○— : 40°C PLMA+AACC]

(나) 색도 측정

장기 저장 중 처리구별 색도 변화는 hunter color system의 L value의 변화로 관찰하였으며 그 결과는 Fig. 114와 같이 나타났다. 대조구인 무처리구의 경우 초기부터 가장 낮은 L value를 나타내었으며 저장기간 내내 같은 양상을 나타내어 저장 15일차에는 68.29 수준의 L value를 나타내었다. Ascorbic acid를 첨가한 처리구 즉, 처리구 III, IV에서는 초기 약 84 수준의 L value를 나타내었으며 저장 20일차까지도 80 이상 수준의 L value를 나타내어 상품성을 잃지 않는 것으로 판단되었으며, 열처리구와 비열처리구 간의 L value 차는 확인하기 어려웠다. 반면 I, II 처리구에서는 mild heating이 색도 변화에 미치는 영향을 확연하게 확인할 수 있었으며, 그 결과 비열처리구인 처리구 I에서는 대조구보다 초기 약간 높은 수준을 나타내었으나, 열 처리구인 처리구 II에서는 대조구에 비해 비교적 높은 78 수준의 L value를 나타내었다. 그러나 저장기간의 경과함에 따라 처리구 I, II 사이의 L value 차는 감소하여 저장 15일경 이후로는 거의 같은 수준을 나타내었다.

(다) 조직감 측정

전처리 한 사과 시료의 4℃ 저장 중 처리구별 경도 변화는 Fig. 115와 같이 나타났다. 대조구인 무처리구의 경도는 4℃ 저장 초기 3.5 수준이었으며 저장 5일차에서는 타 처리구에 비해 급감하여 2.9 수준을 나타내어 저장 20일차까지 비슷한 수준을 유지하였다. 한편 그 외 처리구에서는 저장 10일차까지 경도의 증감을 반복하였으나 저장 15일차 경에는 모두 비슷한 수준으로 나타났으며, 같은 조건에서의 열처리구와 비열처리구간의 경도 차는 뚜렷하게 확인할 수 없었다. 또한 calcium chloride 처리구(처리구 III, IV)와 calcium chloride를 처리하지 않은 처리구(처리구 I, II) 사이에서의 경도 변화는 저장 5일차에서는 그 차이를 확인할 수 없었으나 저장 10일차 경에서는 그 차를 어느 정도 확인할 수 있었다. 그러나 이것은 시료간 편차내의 수준으로 0.75% calcium chloride 처리가 조직 연화를 억제한다는 것으로 보기는 다소 어려움이 있는 것으로 판단되었다.

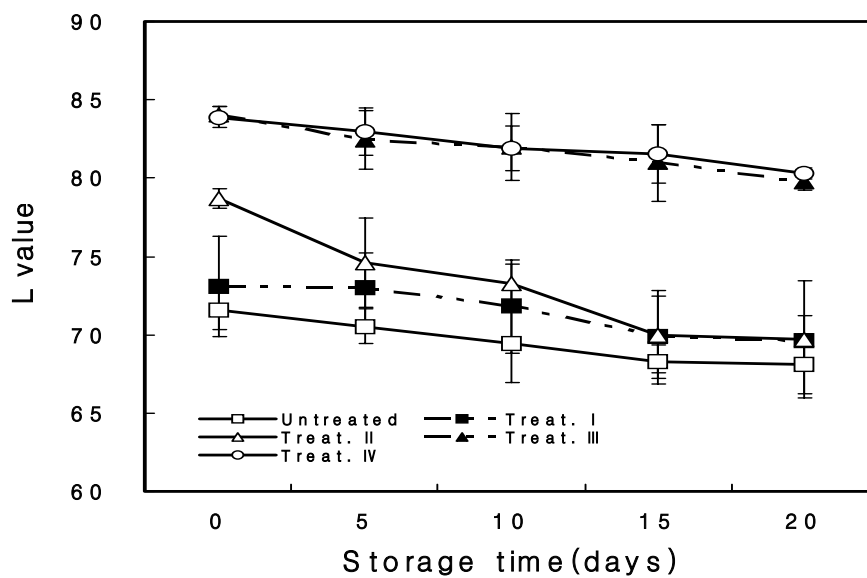


Fig. 114. Color changes of minimally processed apples during storage at 4°C.

[—□— : Untreated, --■-- : PLMA(polylysine 0.6% + malic acid 1.0%),
 —△— : 40°C PLMA, --▲-- : PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0% +
 calcium chloride 0.75%), —○— : 40°C PLMA+AACC]

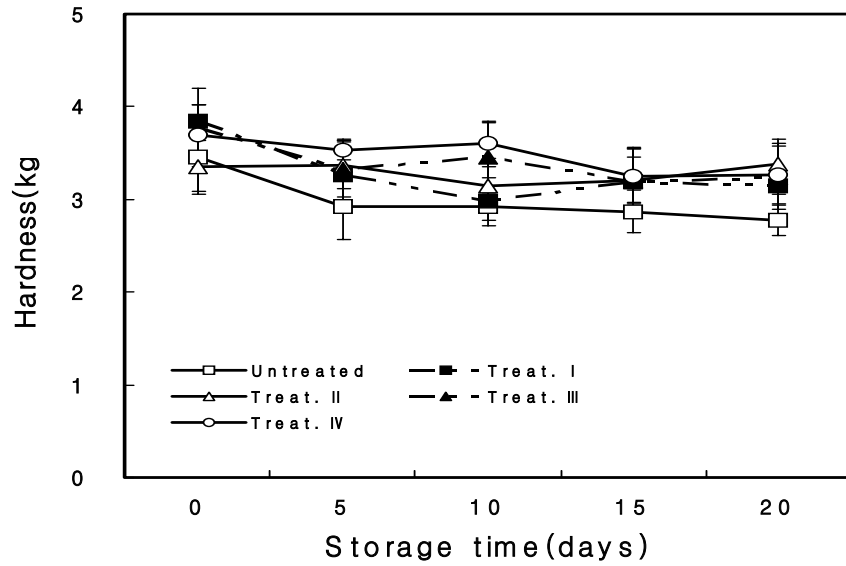


Fig. 115. Texture changes of minimally processed apples during storage at 4°C.

[—□— : Untreated, —■— : PLMA(polylysine 0.6% + malic acid 1.0%),
 —△— : 40°C PLMA, —▲— : PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0% +
 calcium chloride 0.75%), —○— : 40°C PLMA+AACC]

(라) Vitamin C 함량

Fresh-cut 사과 4°C 저장 중 vitamin C의 함량 변화는 Table 20에서 나타난 바와 같이, 전반적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 대조구를 포함한 처리구 I, II의 경우 저장기간 동안 모두 완만한 감소율을 보였으며, 40°C 열처리가 vitamin C 함량 변화에 부정적 영향은 미치지 않는 것으로 판단되었다. 반면, 처리구 III, IV의 경우 초기에 평균 110 mg/100g 수준의 높은 vitamin C 함량을 보였으나 저장 15일차에는 다른 처리구에 비해 급격히 감소하여 평균 18 mg/100g의 vitamin C 함량을 나타내었다. 그러나 이러한 현상은 최소가공 된 사과 자체의 vitamin C 산화가 아닌 dips solution에 용해되어 있던 수용액 상태의 ascorbic acid가 사과 표면에서 급격하게 산화된 것으로 추정되어진다.

(마) 유리당 함량

Fresh-cut 사과 4°C 저장 중 유리당 함량을 분석한 결과 Table 21과 같이 fructose, glucose, sucrose 3개의 당이 검출되었으며, 이 중 fructose의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 처리구 사이에 유리당 함량의 변화는 큰 차이를 보이지 않았으며, 저장 초기 총당 함량이 증가하는 양상을 보이다가 저장 후기에는 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 일반적으로 사과의 당 함량은 fructose > sucrose > glucose의 순으로 함량이 높은 것으로 알려져 있으나, 본 실험에서는 fructose > glucose > sucrose의 순으로 나타났으며, 이러한 당 농도와 조성 변화 양상은 품종 특이적인 요인이 중요하게 작용한 것으로 생각된다.

Table 20. Changes in vitamin C of minimally processed apples during storage at 4°C.

Treatment	Vitamin C contents(mg/100g)				
	0 days	5 days	10 days	15 days	20 days
Untreated	3.2	3.3	3.0	2.8	2.0
Treat. I	3.3	3.1	3.0	3.1	2.3
Treat. II	3.2	3.1	2.9	3.0	2.2
Treat. III	103.4	81.1	52.0	14.2	6.2
Treat. IV	113.7	89.8	75.4	20.9	10.5

[Treat. I : PLMA(polylysine 0.6%+malic acid 1.0%), Treat. II : 40°C PLMA, Treat. III : PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0%+calcium chloride 0.75%), Treat. IV : 40°C PLMA+AACC]

Table 21. Changes in free sugar of minimally processed apples during storage at 4°C.
(unit : g/100g)

Storage time (days)	Free suger	Treatment				
		Untreated	Treat. I	Treat. II	Treat. III	Treat. IV
0	Fructose	4.96	5.22	4.66	5.05	5.23
	Glucose	2.04	2.14	2.17	2.16	1.89
	Sucrose	1.68	2.00	1.68	1.75	1.76
	Total	8.68	9.36	8.51	8.96	8.88
5	Fructose	6.07	5.44	5.73	5.56	6.00
	Glucose	2.32	2.14	2.41	2.73	2.56
	Sucrose	2.12	1.93	1.65	1.50	1.60
	Total	10.51	9.51	9.79	9.79	10.16
10	Fructose	5.35	5.59	5.47	5.44	6.02
	Glucose	2.04	2.24	2.35	2.66	2.56
	Sucrose	1.84	1.75	1.59	1.64	1.66
	Total	9.23	9.58	9.41	9.74	10.24
15	Fructose	5.24	5.30	5.49	5.39	5.27
	Glucose	2.06	2.00	2.09	2.30	1.97
	Sucrose	1.84	1.87	1.78	1.80	1.71
	Total	9.14	9.17	9.36	9.49	8.95
20	Fructose	5.27	5.18	5.56	5.47	5.66
	Glucose	2.06	2.03	2.31	2.37	2.04
	Sucrose	1.71	1.78	1.40	1.44	1.80
	Total	9.04	8.99	9.27	9.28	9.50

[Treat. I : PLMA(polylysine 0.6%+malic acid 1.0%), Treat. II : 40°C PLMA,
Treat. III : PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0%+calcium chloride 0.75%),
Treat. IV : 40°C PLMA+AACC]

(바) 중량 감소율

최소가공 한 사과와 장기저장(4℃) 중 중량감소율은 Fig. 116과 같이 저장기간이 증가함에 따라 대조구를 포함한 모든 처리구에서 증가하는 경향을 나타내었다. 대조구의 경우 저장 15일경까지 유사한 수준의 비율로 중량이 감소하는 것으로 나타났으며, 처리구 I에서는 저장 5일차 타 처리구에 비해 가장 현저한 중량감소율을 보였으나 저장 기간이 경과함에 따라 처리구 II와 유사한 수준의 비로 감소하는 경향을 보여 저장 10일경 이후로는 대조구에 비해 중량감소율이 적은 것으로 나타났다. 또한 처리구 III, IV에서는 저장 10일차까지 가장 적은 중량감소율을 보였으나, 저장 15일차에는 처리구 IV에서 상대적으로 급격한 중량 감소율을 나타내었으며 처리구 III 또한 비교적 큰 감소율을 나타내었다. 그러나 모든 처리구가 저장 15일차까지는 대조구에 비해 중량 감소율이 적은 것으로 나타났으며, 저장 20일경을 전후로 해서는 모두 유사한 수준을 보였다. 이러한 중량의 감소는 조직내의 수분이 외부로 증산되어 손실됨으로써 일어나는 것으로 PLMA(polylysine 0.6% + malic acid 1.0%) 및 40℃ mild heating 처리가 fresh-cut 사과와 수분손실 저하에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단되어졌다.

(사) 산도 측정

전처리 한 fresh-cut 사과와 4℃ 저장 중 처리구별 산도 변화는 Fig. 117과 같이 나타났다. 저장 초기 대조구에서 가장 낮은 산도를 나타내었으나 저장 10일차 경에 처리구 I, II와 비슷한 값을 나타내어 대조구인 무처리구가 PLMA (polylysine 0.6% + malic acid 1.0%) 및 열처리를 행한 처리구 보다 산도 변화가 적은 것으로 확인되었다. 또한 전처리를 한 처리구 사이에서의 변화를 살펴보면, PLMA(polylysine 0.6% + malic acid 1.0%)에 AACc(ascorbic acid 1.0% + calcium chloride 0.75%)를 혼용한 처리구에서 더 높은 산도를 나타내었으며, 같은 조건 하에서는 열처리구보다 비열처리구에서의 산도 변화가 적은 것으로 확인되었다.

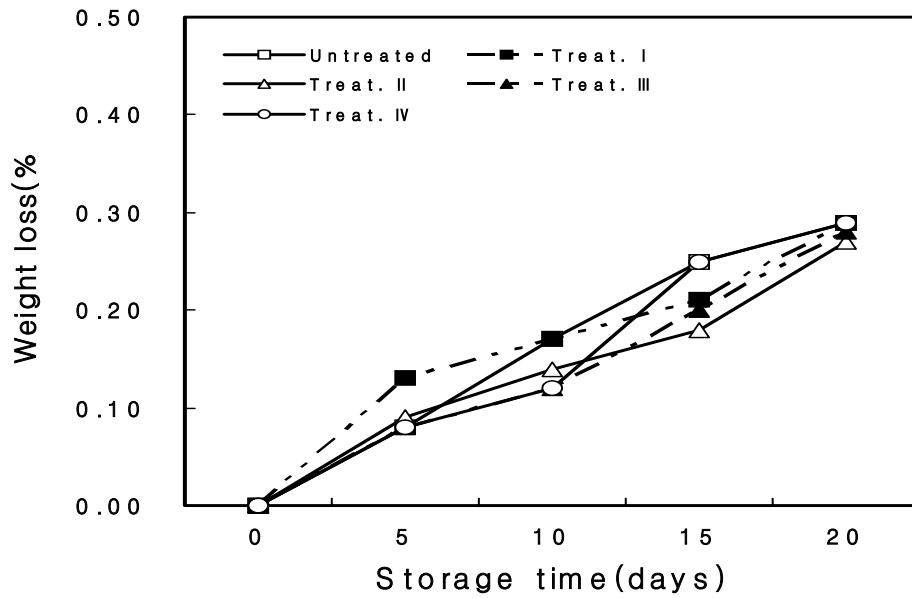


Fig. 109. Changes in weight loss of minimally processed apples during storage at 4°C.

[—□— : Untreated, --■-- : PLMA(polylysine 0.6% + malic acid 1.0%), —△— : 40°C PLMA, --▲-- : PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0% + calcium chloride 0.75%), —○— : 40°C PLMA+AACC]

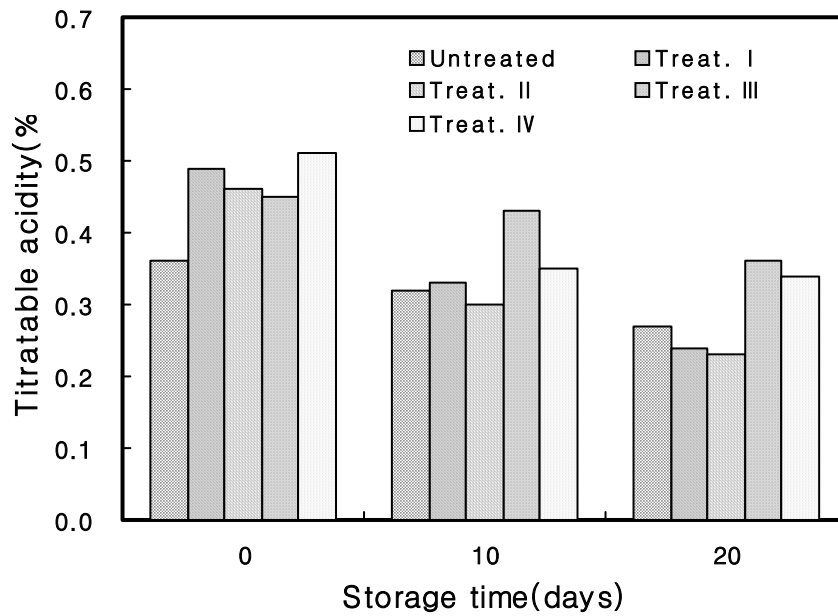


Fig. 110. Change in titratable acidity of minimally processed apples during storage at 4°C.

[Treat. I : PLMA(polylysine 0.6% + malic acid 1.0%), Treat. II : 40°C PLMA, Treat. III : PLMA+AACC(ascorbic acid 1.0% + calcium chloride 0.75%), Treat. IV : 40°C PLMA+AACC]

(아) 관능평가

처리구에 따른 시료의 색, 향, 맛 그리고 전반적인 기호도에 대하여 9점 채점법으로 관능검사를 실시한 결과 Table 22와 같다. 대조구인 무처리구에 비해 PLMA+AACC 및 40°C PLMA+AACC 처리구가 저장기간이 경과함에 따라 색, 향 및 전반적인 기호도에서 모두 월등히 우수하게 나타났으며, AACC를 처리하지 않은 처리구에서는 대조구와 비슷하거나 약간 우수한 결과를 보여, 외관상의 품질에 크게 영향을 미칠 것으로 판단되어 첨가한 AACC의 혼용은 필수적이라고 판단되었다.

(2) Pediocin, nisin 및 hinokitiol 혼용처리 사과와 저장중 품질변화

지금까지의 실험 결과를 근거로 하여, hurdle factor를 선정하여 도입함으로써 장기저장에 따른 fresh-cut 사과의 미생물 생육 저해 효과 및 품질특성 변화를 확인하고자 하였다. 즉, 갈변에 부정적 영향을 미치지 않으면서 미생물 생육 저해 측면을 가장 우선으로 고려하여 전처리에 이용할 침지액의 구성 및 농도는 150 ppm hinokitiol : 1,200 ppm nisin : 800 ppm pediocin 으로 선정하였으며, 또한 장기저장 시 필수요소인 저온저장(5°C)을 하나의 hurdle factor로 적용함으로써 장기유통 가능성을 확인하고자 하였다.

1) 일반세균수(총균수)

처리구별 사과의 5°C 저장에 따른 일반세균의 생육 상태는 Fig. 111과 같이 대조구로 사용한 무처리구와의 차를 확연히 확인할 수 있었다. 무처리구의 경우 초기 5.9×10^1 CFU/g에서 저장기간이 경과함에 따라 꾸준한 균의 증식을 보여 저장 10일 및 20일 경에 1.6×10^3 , 5.3×10^5 CFU/g 수준으로 나타났다. 반면 HNP(150 ppm hinokitiol + 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구의 경우에는 저장기간에 따른 총균수의 증감이 반복되었으나, 저장기간 내내 1.0×10^1 CFU/g 수준을 넘지 않는 우수한 정균효과를 나타내었다. 저장 5일경, H(150 ppm hinokitiol) 처리구와 NP(1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구는 비슷한 수준의 총균수를 나타내었으나, 저장 10일을 기점으로 하여 NP(1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구에서 상대적으로 많은 균의 증식을 보여 저장 20일경에는 무처리구와 유사한 수준인 5.0×10^4 CFU/g을 나타내었다. 이러한 결과는 장기저장에 따른 미생물학적 안전성을 고려할

때 150 ppm hinokitiol 병용 처리는 필수적이라 판단되었다.

Table 23. Sensory evaluation of minimally processed apples during storage at 4°C.

Treatment	Sensory evaluation ¹⁾ (0 day)			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
Untreated	4.57	6.71	6.00	5.86
PLMA ²⁾	4.43	6.29	5.43	5.57
40°C PLMA	6.29	5.86	6.29	6.00
PLMA+AACC ³⁾	8.29	7.57	6.57	8.29
40°C PLMA+AACC	8.43	7.43	6.43	8.00

Treatment	Sensory evaluation (10 days)			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
Untreated	4.00	4.14	5.86	4.57
PLMA	3.86	4.43	6.00	4.43
40°C PLMA	4.14	4.43	5.14	5.14
PLMA+AACC	8.14	7.00	5.86	7.86
40°C PLMA+AACC	8.29	7.57	6.57	8.14

Treatment	Sensory evaluation (20 days)			
	Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
Untreated	2.86	4.43	3.86	3.14
PLMA	3.29	3.86	4.86	4.43
40°C PLMA	3.14	4.14	4.43	4.14
PLMA+AACC	7.86	6.86	5.43	7.57
40°C PLMA+AACC	8.14	7.43	5.86	8.00

¹⁾ Sensory evaluation : 9 very good, 7 good, 5 fair(still marketable), 3 poor(not marketable), 1 very poor

²⁾ PLMA : polylysine 0.6% + malic acid 1.0%

³⁾ AACC : ascorbic acid 1.0% + calcium chloride 0.75%

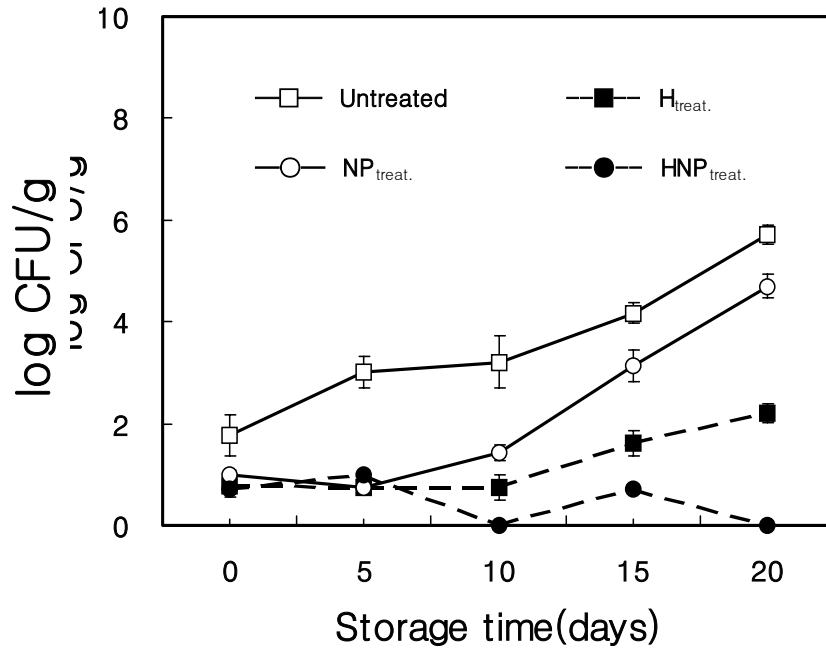


Fig. 111. Changes in microbial count of minimally processed apples during storage at 5°C.

[--■-- H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol, --○-- NP_{treat.} : 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- HNP_{treat.}: 150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin]

2) 표면 색도

4°C 저장에 따른 fresh-cut 사과 표면색도 변화는 Fig. 112에서 나타난 바와 같이 저장기간이 경과함에 따라 갈변도의 측도를 나타내는 L value가 감소하는 경향을 보이는데 특히 NP 처리구는 저장 5일부터 가장 낮은 L value를 보여 무처리구보다 높은 갈변도를 나타내었다. 반면, NP가 첨가된 HNP 처리구 및 H 처리구는 상대적으로 L value를 나타내었으며, 이러한 결과는 hinokitiol 첨가가 사과의 갈변을 다소 저해할 수 있는 것으로 판단되었다.

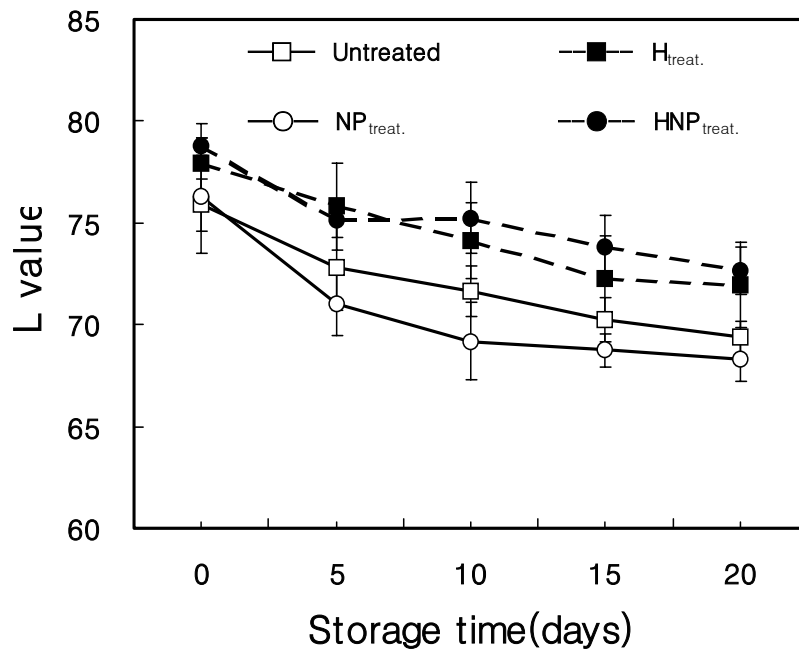


Fig. 112. Color changes of minimally processed apples during storage at 5°C.

[--■-- H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol, —○— NP_{treat.} : 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- HNP_{treat.}: 150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin]

3) 조직감

저장 중 과육의 연화 정도를 나타내는 경도 변화는 Fig. 113에서와 같이 저장 10일 이후로 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며, 대조구를 포함한 모든 처리구의 경도 변화는 오차범위 내의 유사한 수준인 것으로 확인되었다. 그 결과, 각 처리구별 침지액 처리 따른 과육의 연화 심화현상은 발생하지 않는 것으로 판단되었다.

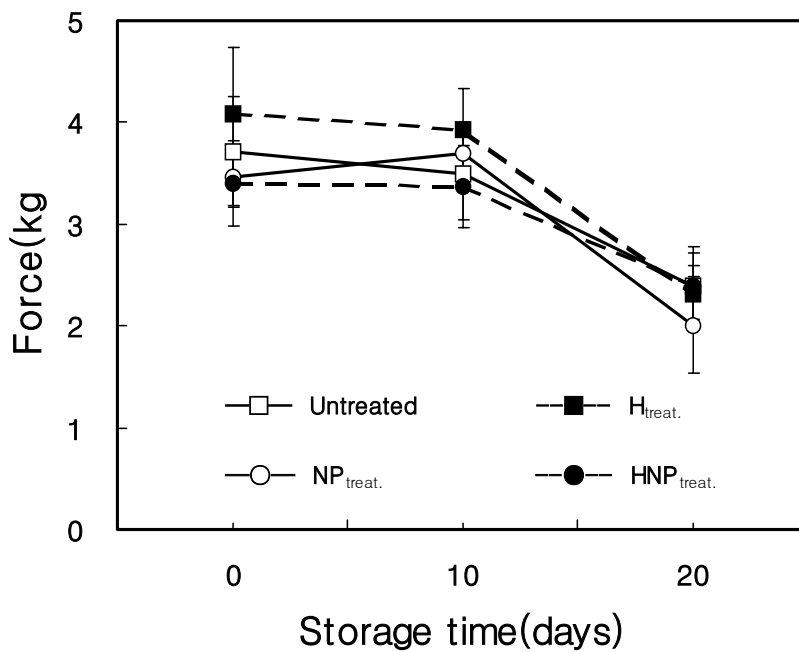


Fig. 113. Texture changes of minimally processed apples during storage at 5°C.

[--■-- H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol, --○-- NP_{treat.} : 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- HNP_{treat.} : 150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin]

4) 산도

Fig. 114는 저장기간 동안의 산도 변화를 보여 주는 것으로 사과에 분포하는 유기산 중 가장 함량이 많은 malic acid로 환산하였다. 저장 초기 평균 0.19-0.22% 수준의 산도를 나타내었으며, 저장기간의 경과에 따라 증감을 반복하였으나 저장 20일경에는 평균 0.18-0.23% 수준으로 나타나 전처리에 따른 산도 변화에 큰 영향은 없는 것으로 판단되었다.

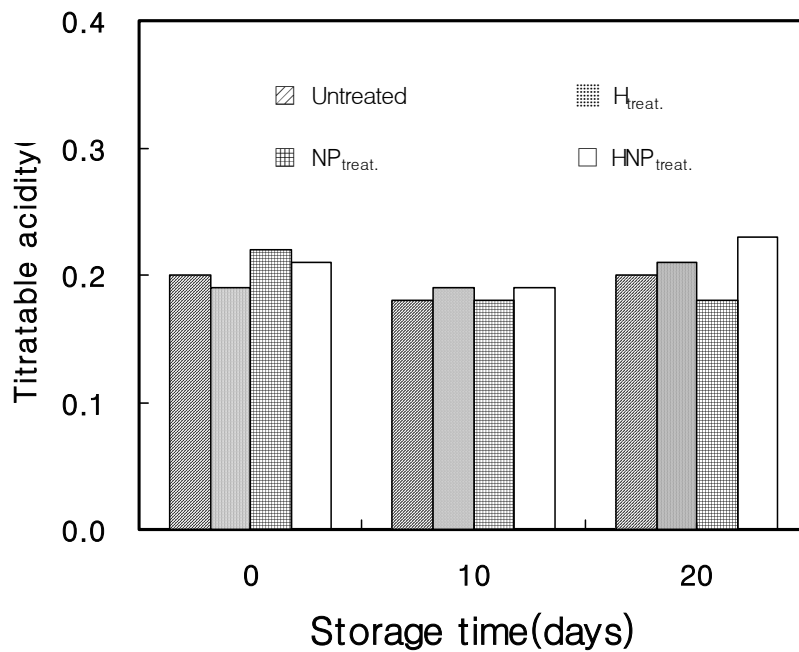


Fig. 114. Change in titrateable acidity of minimally processed apples during storage at 5°C.

[--■-- H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol, --○-- NP_{treat.} : 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- HNP_{treat.} : 150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin]

5) 관능검사

편절한 사과를 전처리하여 저장에 따른 과실의 색(color), 향(flavor), 맛(taste) 그리고 전체적인 기호도(overall acceptability) 항목에 대해 관능검사를 실시하고, 그 결과를 Table 23에 나타내었다. 초기 무처리구가 가장 높은 평가를 받은 반면, 150 ppm hinokitiol이 첨가된 처리구는 상대적으로 낮은 관능평점을 나타내었다. 그러나 저장기간이 경과함에 따라 HNP(150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구가 상대적으로 높은 점수를 유지하였으며, 저장 20일경에는 처리구간 유의적 차를 확인할 수 없었다. 색(color) 항목에서 hinokitiol이 첨가된 처리구가 상대적으로 높은 관능평점을 나타내어 표면색도(L value)를 측정된 결과와 동일한 양상을 보인 반면 hinokitiol만으로 구성된 H(150 ppm hinokitiol) 처리구에서는 맛(taste) 항목에서 저장기간 내내 가장 낮은 점수를 나타내어 150 ppm hinokitiol 단독처리가 관능적인 측면에서는 부정적이라 판단되었다.

Table 23. Sensory evaluation of minimally processed apples during storage at 5°C

Storage time (days)	Treatment	Sensory evaluation ¹⁾			
		Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
0	Untreated	5.17 ^{b2)}	7.33 ^a	6.83 ^a	6.50 ^a
	H _{treat.} ³⁾	7.67 ^a	5.67 ^a	4.17 ^c	4.83 ^b
	NP _{treat.} ⁴⁾	7.00 ^a	7.17 ^a	6.00 ^{ab}	6.83 ^a
	HNP _{treat.} ⁵⁾	8.17 ^a	5.67 ^a	5.33 ^{bc}	6.00 ^{ab}
10	Untreated	3.17 ^b	5.50 ^a	5.25 ^a	4.67 ^a
	H _{treat.}	5.83 ^a	5.00 ^a	4.75 ^a	4.83 ^a
	NP _{treat.}	3.83 ^b	5.33 ^a	5.00 ^a	4.58 ^a
	HNP _{treat.}	5.08 ^a	5.83 ^a	5.42 ^a	4.92 ^a
20	Untreated	3.00 ^a	4.50 ^a	3.17 ^a	3.33 ^a
	H _{treat.}	3.08 ^a	3.50 ^a	3.00 ^a	3.00 ^a
	NP _{treat.}	3.25 ^a	4.50 ^a	3.50 ^a	3.50 ^a
	HNP _{treat.}	4.33 ^a	4.50 ^a	3.67 ^a	3.83 ^a

¹⁾ Sensory evaluation : 9 very good, 7 good, 5 fair(still marketable), 3 poor(not marketable), 1 very poor

²⁾ Means with the same letter in column are not significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple test

³⁾ H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol

⁴⁾ NP_{treat.} : 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin

⁵⁾ HNP_{treat.}: 150 ppm hinokitiol + 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin

다. 김치 발효 조절을 위한 pediocin 및 pediocin-like bacteriocin의 적용기술개발

1) Pediocin 및 Pediocin-like bacteriocin 생산 균주의 탐색

김치 발효 제어를 위해 적용할 새로운 pediocin-like bacteriocin의 탐색을 위해 총 42종의 김치 완제품, 공정중간품 및 원재료로부터 LAB(Lactic acid bacteria)를 분리한 결과 총 3,315개의 LAB를 분리하였으며, 분리한 bacterial strain을 *E. faecalis*을 indicator strain으로 하여 항균활성을 측정하여 총 299개의 strain이 항균활성을 가지는 것으로 나타났다(Table 24). 이중 *E. faecalis*에 대한 항균활성이 비교적 큰 12개 균주를 1차 선발하여, Gram staining, Motility, Catalase test 등의 기초적인 시험과 더불어 API CHL로 생화학적 특성을 조사하였다(Table 25). 또한 김치 발효 미생물에 대한 항균 활성을 검색하기 위해 10여종의 *Lactobacillus plantarum*을 indicator strain으로 하여 항균활성을 검토하고 있으며 protease 처리 등을 통해 bacteriocin 확인 실험을 실시하였다. 이를 통해 상대적 활성이 가장 강했던 균주 193번을 최종 선발하였으며 morphology 관찰(Fig. 115), 세포벽의 fatty acid composition 및 16S rDNA sequencing을 통해 *Weisella* sp.로 확인하였다(Fig 116a 및 116b).

Table 24. Screening results for microorganisms producing antagonistic substances (presumed bacteriocin).

Group	Sources	No. of isolated strain	No. of screened strain
1	Company A, Kimchi I	143	51
2	Garlic	50	26
3	raddish	3	1
4	Chinese cabbage	10	0
5	Company B, Kimchi I	143	1
6	Company B, Kimchi II	144	10
7	Company B, Kimchi III	144	39
8	Company B, Kimchi IV	138	0
9	Company B, Kimchi V	144	14
10	Company B, Kimchi VI	135	0
11	Ginger	3	2
12	Company C, Kimchi I	21	0
13	Company C, Kimchi II	115	0
14	Company C, Kimchi III	21	4
15	Company C, Kimchi IV	143	17
16	Company C, Kimchi V	24	4
17	Company C, Kimchi VI	21	0
18	Company C, Kimchi VII	21	0
19	Company C, Kimchi VIII	86	15
20	Company C, Kimchi IX	21	0
21	Chopped garlic A	126	16
22	Company D, Kimchi I	63	37
23	Company E, Kimchi I	8	0
24	Company E, Kimchi II	17	2
25	Company F, Kimchi I	126	0
26	Company F, Kimchi II	140	0
27	Company F, Kimchi III	83	3
28	Company F, Kimchi IV	132	0
29	Company F, Kimchi V	144	15
30	Company F, Kimchi VI	144	1
31	Company G, Kimchi I	66	18
32	Company H, Kimchi I	72	5
33	Company H, Kimchi II	79	0
34	Company H, Kimchi III	93	0
35	Company H, Kimchi IV	21	0
36	Company H, Kimchi V	78	0
37	Company I, Kimchi I	69	14
38	Company I, Kimchi II	142	0
39	Company I, Kimchi III	67	3
40	Company I, Kimchi IV	110	1
41	Red pepper power	1	0
42	Chopped garlic B	4	0
			299
Total		3315	299

Table 25. API test results of screened strains.

Strain	Glycerol	Erythritol	<i>d</i> -Arabinose	<i>l</i> -Arabinose	<i>d</i> -Ribose	<i>d</i> -Xylose
16	-	-	-	-	+	-
193	-	-	-	+	-	+
2662	-	-	-	+	+	-
2664	-	-	-	+	+	-
2726	-	-	-	+	+	-
2742	-	-	-	-	+	+
2747	-	-	-	+	+	-
2759	-	-	-	+	+	-
2768	-	-	-	+	+	-
2774	-	-	-	+	+	-
2775	-	-	-	-	+	+
2777	-	-	-	+	+	-

+ : positive, - negative

Table 25. (continued)

Strain	<i>l</i> -Xylose	<i>d</i> -Adonitol	Methyl- β - <i>d</i> -xylopyranoside	<i>d</i> -Galactose	<i>d</i> -Glucose	<i>d</i> -Fructose
16	-	-	-	+	+	+
193	-	-	-	+	+	+
2662	-	-	-	+	+	+
2664	-	-	-	+	+	+
2726	-	-	-	+	+	+
2742	-	-	-	+	+	+
2747	-	-	-	+	+	+
2759	-	-	-	+	+	+
2768	-	-	-	+	+	+
2774	-	-	-	+	+	+
2775	-	-	-	+	+	+
2777	-	-	-	+	+	+

+ : positive, - negative

Table 25. (continued)

Strain	<i>d</i> -Manose	<i>l</i> -Sorbose	<i>l</i> -Rhamnose	Dulcitol	Inositol	<i>d</i> -Manitol
16	+	-	-	-	-	+
193	+	-	-	-	-	-
2662	+	-	-	-	-	+
2664	+	-	+	-	-	+
2726	+	-	-	-	-	+
2742	+	-	-	-	-	+
2747	+	-	-	-	-	+
2759	+	-	-	-	-	+
2768	+	-	-	-	-	+
2774	+	-	-	-	-	+
2775	+	-	-	-	-	+
2777	+	-	+	-	-	+

+ : positive, - negative

Table 25. (continued)

Strain	<i>d</i> -Sorbitol	Methyl- α -Mannopyranoside	Methyl- α -Galucopyranoside	N-Acetylglucosamine	Amygdalin	Arbutin
16	+	+	-	+	+	+
193	-	-	-	+	+	+
2662	+	-	-	+	+	+
2664	+	-	-	+	+	+
2726	+	-	-	+	+	+
2742	+	+	-	+	+	+
2747	+	+	-	+	+	+
2759	+	+	-	+	+	+
2768	+	-	-	+	+	+
2774	+	-	-	+	+	+
2775	+	-	-	+	+	+
2777	+	-	-	+	+	+

+ : positive, - negative

Table 25. (continued)

Strain	Esculin ferric citrate	Salicin	<i>d</i> -Celobiose	<i>d</i> -Maltose	<i>d</i> -Lactose	<i>d</i> -Melibiose
16	+	+	+	+	+	+
193	+	+	+	+-	-	+
2662	+	+	+	+	+	+
2664	+	+	+	+	+	+
2726	+	+	+	+	+	+
2742	+	+	+	+	+	+
2747	+	+	+	+	+	+
2759	+	+	+	+	+	+
2768	+	+	+	+	+	+
2774	+	+	+	+	+	+
2775	+	+	+	+	+	+
2777	+	+	+	+	+	+

+ : positive, - negative

Table 25. (continued)

Strain	<i>d</i> -Sucrose	<i>d</i> -Threhalose	Inulin	<i>d</i> -Melezitose	<i>d</i> -Rafinose	Amidone
16	+	+	+	+	+	-
193	+	+	-	+	+	-
2662	+	+	+	+	?	-
2664	+	+	+	+	?	-
2726	+	+	+	+	+	-
2742	+	+	+	+	+	-
2747	+	+	+	+	+	-
2759	+	+	+	+	+	-
2768	+	+	+	+	+	-
2774	+	+	-	+	+	-
2775	+	+	+	+	+	-
2777	+	+	+	+	+	-

+ : positive, - negative

Table 25. (continued)

Strain	Glycogen	Xylitol	Gentiobiose	<i>d</i> -Turanose	<i>d</i> -Lyoxse	<i>d</i> -Tagatose
16	-	-	+	-	-	-
193	-	-	+	-	-	-
2662	-	-	+	+	-	-
2664	-	-	+	+	-	-
2726	-	-	+	-	-	-
2742	-	-	+	+	-	-
2747	-	-	+	+	-	-
2759	-	-	+	+	-	-
2768	-	-	+	+	-	-
2774	-	-	+	+	-	-
2775	-	-	+	+	-	-
2777	-	-	+	+	-	-

+ : positive, - negative

Table 25. (continued)

Strain	<i>d</i> -Fucose	<i>l</i> -Fucose	<i>d</i> -Arabitol	<i>l</i> -Arabitol	Potassium gluconate	potassium 2-ketogluconate	potassium 5-ketogluconate
16	-	-	-	-	+	-	-
193	-	-	-	+	+	-	-
2662	-	-	-	-	+	-	-
2664	-	-	-	-	+	-	-
2726	-	-	-	-	+	-	-
2742	-	-	-	-	+	-	-
2747	-	-	-	-	+	-	-
2759	-	-	-	-	+	-	-
2768	-	-	+	-	+	-	-
2774	-	-	-	-	+	-	-
2775	-	-	-	-	+	-	-
2777	-	-	-	-	+	-	-

+ : positive, - negative



Fig. 115. Microscopic morphology of isolated bacteriocin producing strain 193(Magnitude X1,000).

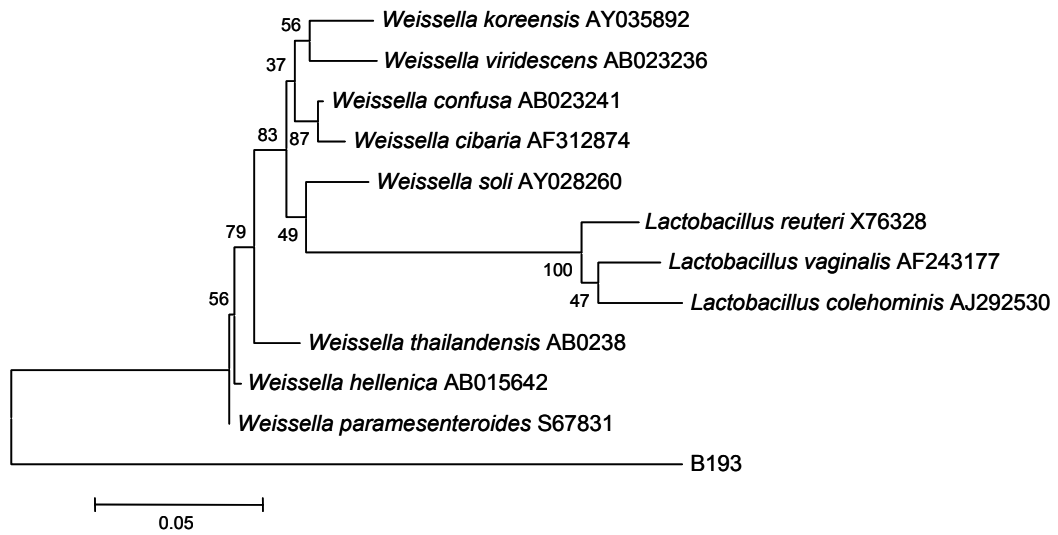


Fig. 116a. Phylogenetic tree based on homologies of 16S rDNA partial sequences of *Weissella* type strains.

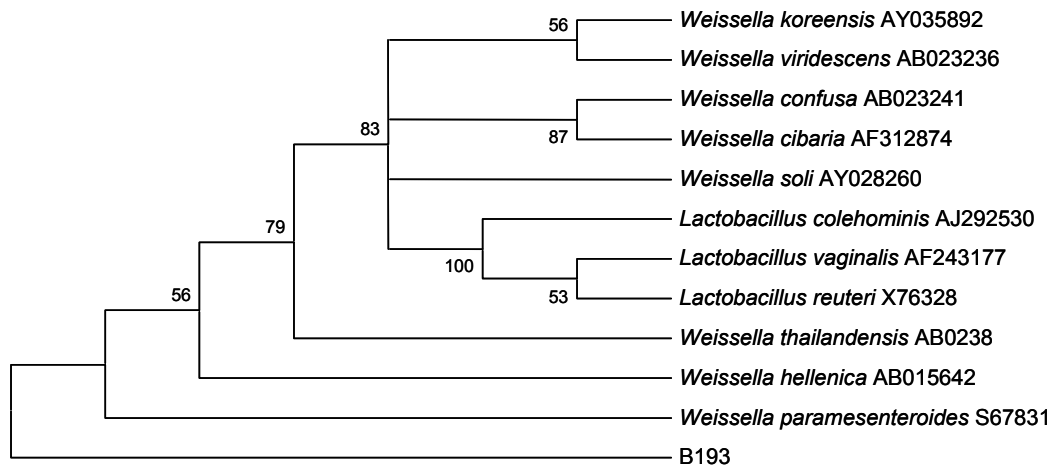


Fig. 116b. Phylogenetic tree based on homologies of 16S rDNA partial sequences of *Weissella* type strains.

김치 발효 제어를 위한 새로운 pediocin-like bacteriocin의 탐색을 통해 총 3,315개의 LAB를 분리하였으며, 분리한 bacterial strain을 *E. faecalis*을 indicator strain으로 하여 항균활성을 측정된 결과 총 299개의 strain이 항균활성을 가지는 것으로 나타났다. 이들 균주중 김치의 위생적 품질을 향상시키기 위한 bacteriocin 생산 균주로 비교적 상대적으로 활성이 높은 11개 균주를 최종 선정하였다. 이들 균주를 gram staining, catalase test, mobility test, API 50 CHL 동정 및 morphology 확인을 실시한 결과, 1종의 *Pediococcus* sp., 6종의 *Lactococcus* sp. 및 4종의 *Leconostoc* sp.로 추정되었다.

이들을 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한후 원심분리한 상등액으로 10종의 미생물을 대상으로 항균력을 시험한 결과(Table 30), *Lactobacillus* sp.를 제외한 *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* 등의 위해성 미생물에 대해 전반적으로 높은 항균력을 나타내었으며, *Pseudomonas aeruginosa*에도 높은 항균력을 가지고 있음을 확인하였다. 또한 젓갈류를 사용하는 김치에서 검토가 미진했던 병원성 *Vibrio*를 대상으로 항균력을 검토했던 결과, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* 등에도 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 11종의 균주중 상대적으로 활성이 높은 *Lactococcus* sp. 2774, 2775 및 2777 균주를 *E. coli* KFRI 1242 등 3종의 *E. coli*, *Salmonella typhimurium* KFRI 00251 등 5종의 *Samonella* sp.를 대상으로 생육저해능을 경시적으로 살펴본 결과 Fig. 140에서와 같이 뚜렷한 생육억제 효과를 확인할 수 있었다(*E. coli* KFRI 1242에 대한 결과만 제시).

김치의 위생성 향상을 위한 스타터로서의 활용 가능성을 검토하고자 막김치를 제조하여 *P. acidilactici* M, 2774, 2775 및 2777번 균주를 약 10⁶CFU/g의 균수로 스타터 첨가하여 함께 가한 *E. coli* KFRI 1242의 소장패턴을 관찰한 결과 Fig. 36 및 Fig. 37와 같았다. 총균수는 무처리구가 10⁶CFU/g 수준이었으며 *P. acidilactici*, 2774, 2775 및 2777 균주를 스타터 로 첨가한 균주는 107CFU/g 수준이었다. 총균수가 10⁶~10⁷CFU/g 수준으로 높았던 것은 담금시기가 하절기이며 스타터 첨가가 주 요인이었던 것으로 판단되었다. 젓산균수도 총균수와 유사한 패턴을 나타내었다. 10⁴CFU/g 수준으로 담금 초기에 첨가한 *E. coli* KFRI 1242 균주는 2775를 스타터로 첨가한 김치, 2777을 스타터로 첨가한 김치에서는 발효 3일후부터 급격한 감소를 나타내었으나 *P. acidilactici* 및 2774을 스타터로 첨가한 김치에서는 10⁴CFU/g 수준으로 유지되는 것으로 나타났다(Fig. 141). 일반적으로 대장균 및 대장균군은 김치의 담금 초기 자연발생

적으로 오염되며 김치의 발효와 더불어 산도 0.6~0.8 이상에서 소장되는 것으로 보고되어 있다. 발효과정중 pH와 산도변화를 살펴본 결과(Fig. 142~145), *P. acidilactici* 스타터 김치는 무처리 김치에 비해 발효 속도가 오히려 감소하는 것으로 나타났고, 2775 및 2777을 스타터 첨가한 김치가 가장 빨리 발효가 진행되었다. 동일한 산도에 서도 대장균 소장에 대한 영향이 다른 것으로 나타난 점을 고려할 때 2775 및 2777을 스타터 첨가한 김치에서의 대장균 소장은 발효 진행과 더불어 생성되는 유기산 및 bacteriocin의 상승효과에 의한 것으로 생각되었다.

Table 30. Antimicrobial spectrum of bacteriocins from selected microorganisms

Bacterial species	Gram staining	Strains											
		2742	2747	2759	2768	2774	2775	2777	2726	2664	2662	193	16
<i>Bacillus cereus</i> (7)	+	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	7
<i>Lactobacillus plantarum</i> (4)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (2)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus subtilis</i> (4)	+	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	2
<i>Lactobacillus brevis</i> (4)	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	+	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (12)	-	12	12	12	12	2	12	12	12	2	12	2	12
<i>Escherichia coli</i> (3)	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3
<i>Salmonella typhimurium</i> (5)	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (4)	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	0	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (3)	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Vibrio vulnificus</i> (7)	-	5	4	7	5	7	7	7	7	7	3	5	5
<i>Vibrio furnissi</i> (3)	-	1	3	3	1	3	3	3	3	3	1	2	2
<i>Vibrio fluvialis</i> (1)	-	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Vibrio cholerae</i> (2)	-	0	1	1	0	2	2	2	1	2	0	1	1

() : number of tested strains

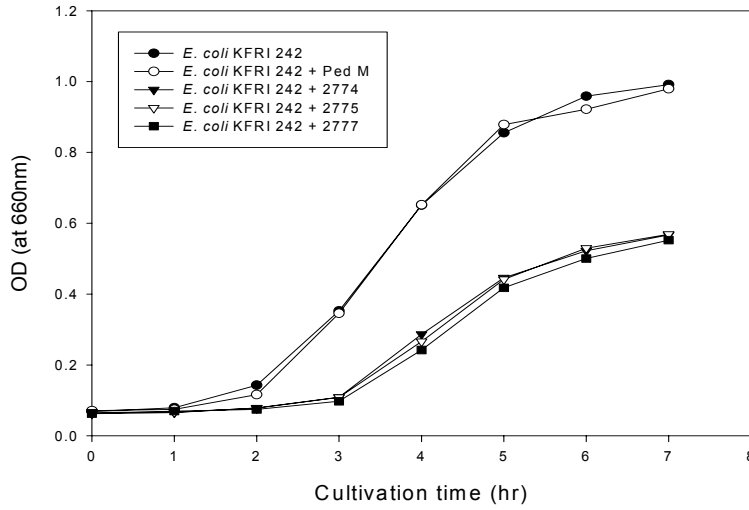


Fig. 140. Growth inhibition effect of crude bacteriocins from strain 2774, 2775 and 2777 on *E. coli* KFR1 242.

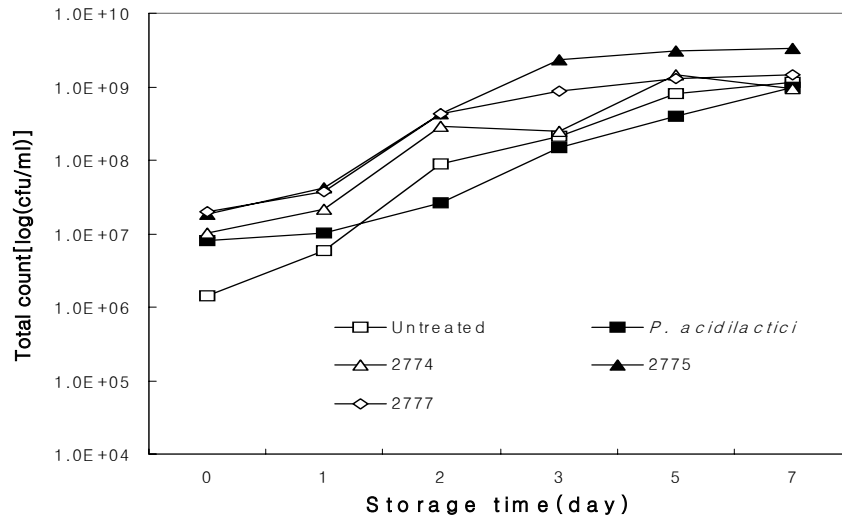


Fig. 141. Changes of total count in *kimchi* juice during fermentation at 10°C.

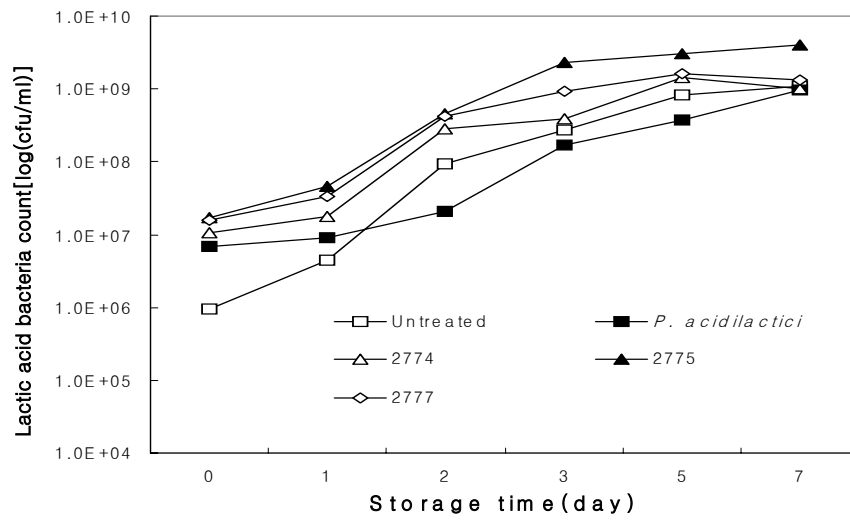


Fig. 142. Changes of lactic acid bacterial count in *kimchi* juice during fermentation at 10°C.

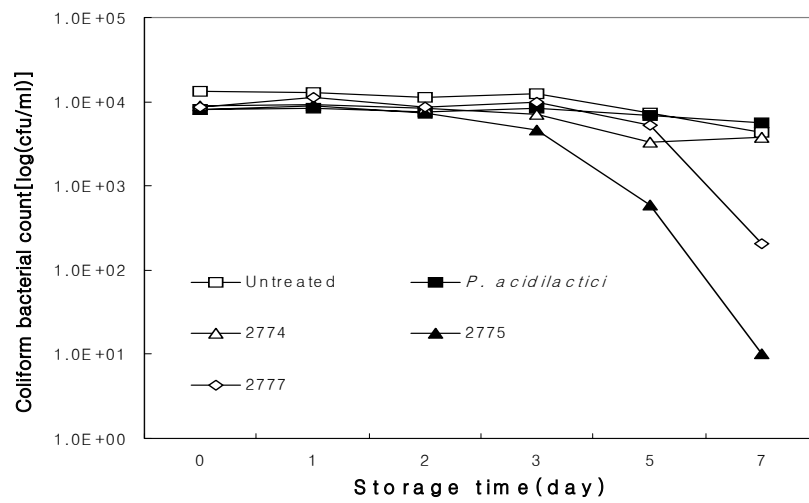


Fig. 143. Changes of coliform bacterial count in *kimchi* juice during fermentation at 10°C.

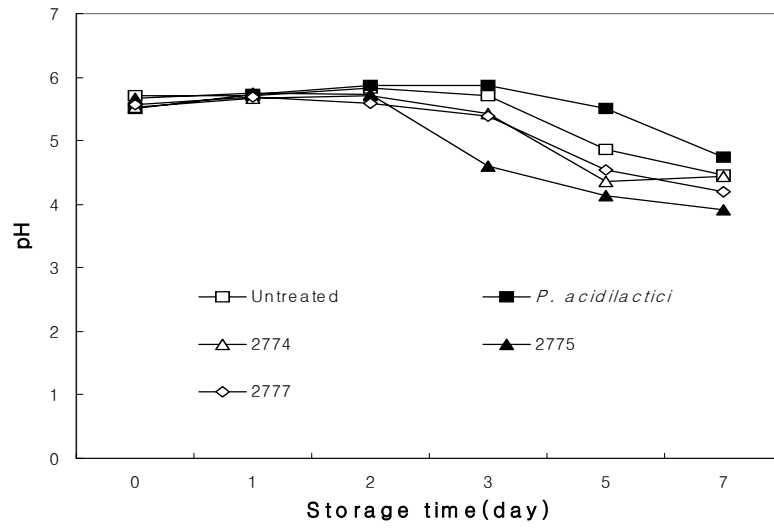


Fig. 144. Changes of pH in *kimchi* during fermentation at 10°C.

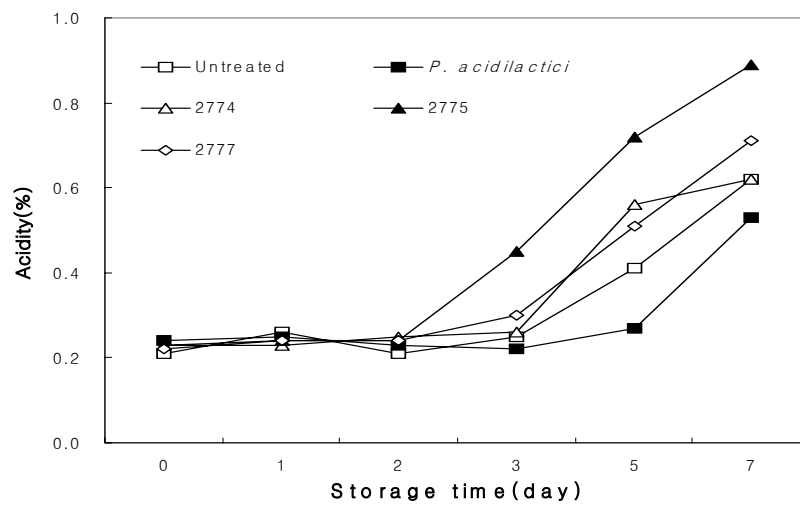


Fig. 145. Changes of acidity in *kimchi* during fermentation at 10°C.

라. 막걸리의 발효조절을 위한 적용기술 개발

막걸리에 대한 pediocin, polylysine 및 nisin의 적용 가능성을 검토하기 위해 막걸리 제조과정중 2단사입시에 각각 250ppm 첨가하여 발효과정중 미생물군의 변화를 살펴 보았다(Fig. 117~123). 총균수, 젖산균수 및 효모와 곰팡이수에는 2단사입후 12일까지 pediocin, polylysine 및 nisin이 뚜렷한 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났으며 pH, 총산 및 아미노산성 질소함량에서 큰 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 이미 막걸리의 제조과정상 2단사입시 높은 미생물수와 다양한 미생물군으로 인해 250ppm의 pediocin, polylysine 및 nisin이 첨가되었음에도 그 효과를 나타내기에 적절하지 않았기 때문인 것으로 판단되었다. 이를 토대로 pediocin의 작용 특이성을 감안하여 막걸리의 경우에는 미생물군 전체의 생육억제보다는 위해성 미생물의 증식억제를 목표로 실험을 진행하는 것이 바람직한 것으로 생각되었다.

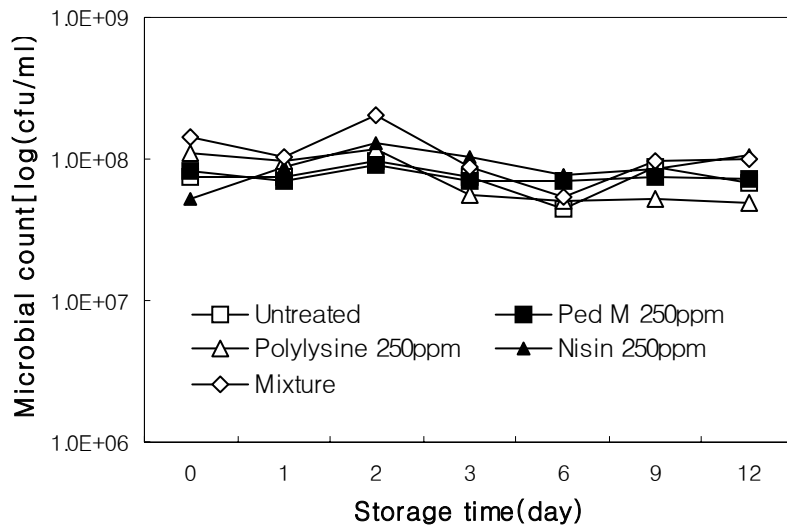


Fig. 117. Changes of total microbial count during *Takju* fermentation.

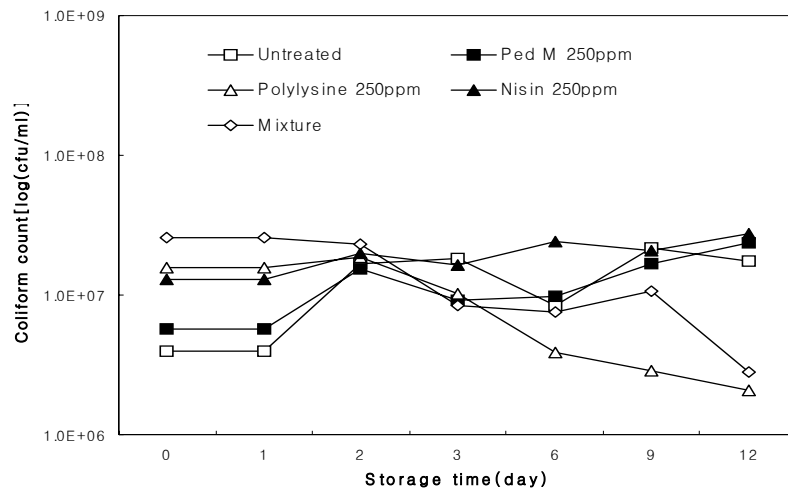


Fig. 118. Changes of coliform bacteria count during *Takju* fermentation.

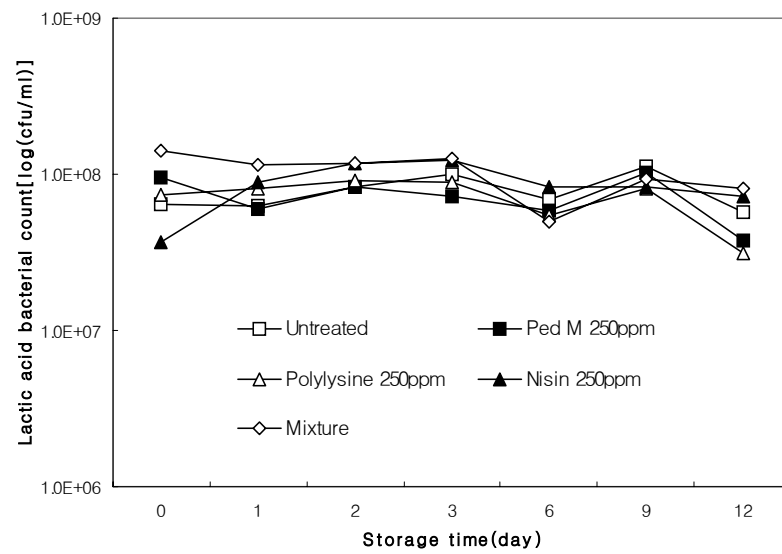


Fig. 119. Changes of lactic acid bacteria count during *Takju* fermentation.

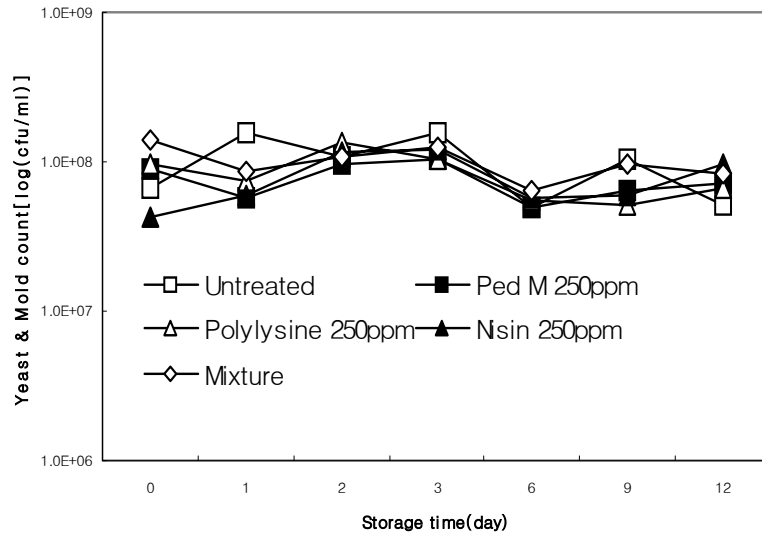


Fig. 120. Changes of yeast and mold count during *Takju* fermentation.

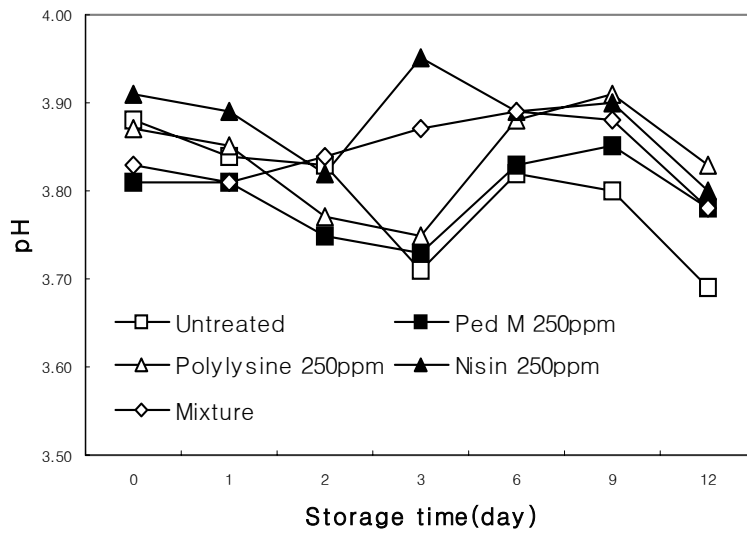


Fig. 121. Changes in pH of *Takju* during fermentation.

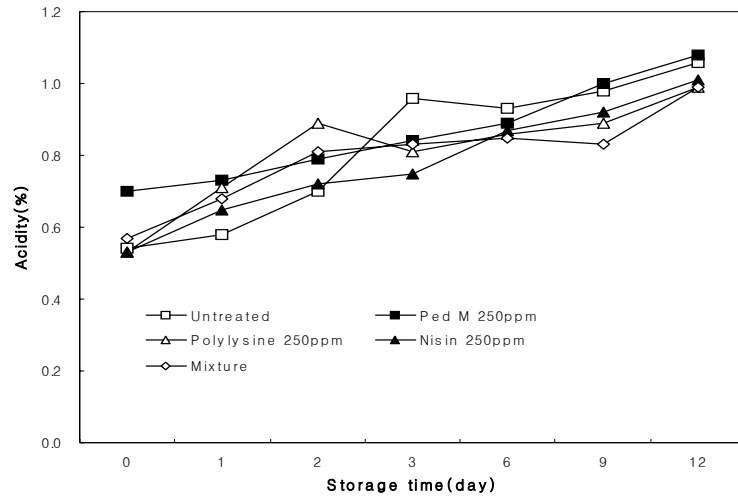


Fig. 122. Changes in acidity contents of *Takju* during fermentation.

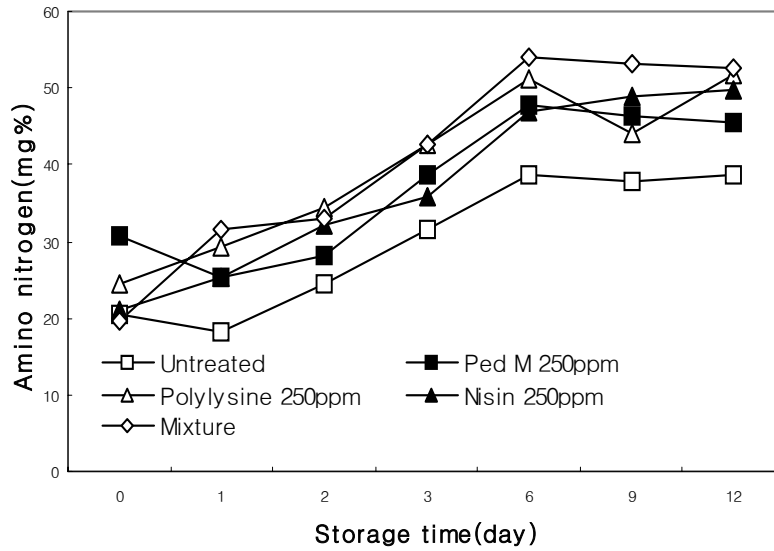


Fig. 123. Changes in amino nitrogen contents of *Takju* during fermentation.

마. 저수분식품에 대한 적용기술개발

저수분식품에 대한 적용성 검토를 위하여 pediocin, polylysine 및 nisin의 *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. 등의 품질열화 미생물과 *Salmonella* sp., *E. coli* 등의 병원성 미생물을 선정하였으며, 선정 미생물에 대해 pediocin 및 nisin의 감수성을 검토한 결과는 Table 26과 같이 species-specific한 경향을 나타내는 것으로 나타났다. 온도에 대한 영향을 90℃ 30분 가열에서도 활성을 유지하였으나 121℃, 15분 가열에서는 모든 활성이 실패하는 것으로 나타났다(Table 27). pH는 3~9사이의 범위에서 안정(Table 28)하였다.

1) 생면에 대한 저장성 연장 효과

경제수준의 향상과 고품질 식품에 대한 소비자의 기호도 증가로 식생활에 많은 변화를 가져와 면류의 경우에도 건면중심의 소비추세에서 생면 중심으로 바뀌고 있다. 생면의 기본 원료로는 소맥분, 식염, 간수 및 물 등이 필요하지만 품질개선 및 보존성을 위하여 식품첨가물을 사용하고 있다. 생면은 건면에 비해 탄력성이나 식감이 뛰어나지만, 생면으로 저장, 유통되는 경우 곰팡이뿐만 아니라 효모와 세균의 증식도 가능하게 되어 쉽게 변질되는 단점이 있다.

국수류의 품질 평가 지표로는 미생물학적 인자, 제품의 선택, 냄새, 맛, 조직감 등의 관능적 인자, 이화학적 인자와 조리 특성 등이 고려될 수 있다. 미생물학적 인자로는 주로 총세균수와 대장균군 또는 대장균이 고려되는데, 현행 우리나라의 식품 공전에 의하면 생면이나 숙면류 제품의 성분 규격은 주정 침지 제품의 경우 일반 세균수가 1.0×10^6 CFU/g 이하이고 대장균은 음성으로 되어있다. 특히 식품의 부패와 변질을 방지하고 식품의 저장과 유통기간을 연장하기 위하여 식품보존제의 사용도 늘고 있다. 그러나 대부분의 보존제는 인공합성품으로 그 안정성이 문제가 되고 있다. 따라서 인공합성 보존제 대신 천연물로부터 식품보존제를 개발하려는 연구가 이루어지고 있다. 최근 우리나라에서도 천연물로부터 특정성분을 얻고자 파래, 톳과 같은 해조류 및 계피, 산초 등의 향신료의 추출물에 대한 항균효과가 보고되었으며 또한 한약재료로 쓰이는 방기, 감초 및 단삼 등의 추출물들도 항균성이 있다고 보고되었다.

생면10g에 대하여 pediocin을 0.03%, 0.05%, 0.1%의 농도로 처리한 용액 2 mL을 분무하여 20℃에서 저장하면서 미생물의 변화와 pH의 변화를 알아보았다.

Table 26. Antimicrobial activity of pediocin on selected microorganisms

Bacterial species	Gram staining	Antimicrobial materials			
		Pediocin		Nisin	
		A ¹⁾	B ²⁾	A ¹⁾	B ²⁾
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 1012	+	-	-	-	-
" KCTC 1092	+	-	-	-	-
" KCTC 1094	+	-	-	-	-
" KCTC 1526	+	-	-	-	+
" KCTC 1093	+	+	+	-	-
" KCTC 3711	+	-	-	-	-
" KCTC 3674	+	+	+	-	-
" KCCM 40133	+	-	-	-	-
" KCCM 40138	+	-	-	-	-
" KCCM 11341	+	+++	+++	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 00466	+	-	-	+	+
" KFRI 00402	+	-	-	-	-
" KFRI 00402	+	-	-	-	-
" KFRI 00402	+	-	-	-	-
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KFRI 00340	+	-	-	-	-
" KFRI 00162	+	+	++	+	++
<i>Bacillus subtilis</i> KFRI 01120	+	+	+	-	-
" KFRI 01121	+	-	-	-	-
" KFRI 01125	+	-	-	+	++
" KFRI 00119	+	-	-	+	++
<i>Lactobacillus brevis</i> KFRI 00805	+	-	-	+	++
" KFRI 00806	+	+	+	+	+++
" KFRI 00353	+	-	-	+	++
" KFRI 00221	+	-	-	+	++
<i>Enterococcus faecalis</i> KFRI 00354	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 1726	-	-	-	-	-
" KCTC 2241	-	-	-	-	-
" KCTC 2242	-	-	-	-	-
" KCTC 2243	-	-	-	-	-
" KCTC 2244	-	+	+	-	-
" KCTC 2245	-	+	+	-	-
" KCTC 2246	-	-	-	-	-
" KCTC 2248	-	-	-	-	-

¹⁾ A : spot-on method, ²⁾ B : agar well diffusion method

Table 26. (continued)

Bacterial species		Gram staining	Antimicrobial materials			
			Pediocin		Nisin	
			A ¹⁾	B ²⁾	A ¹⁾	B ²⁾
"	<i>KCTC 2253</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KCTC 2491</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KCCM 41285</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KCCM 11788</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KCCM 11391</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KCCM 41293</i>	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	<i>KFRI 00836</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KFRI 00174</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KFRI 00242</i>	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>KFRI 00251</i>	-	+	+	-	-
"	<i>KFRI 00648</i>	-	+	+	+	+
"	<i>KFRI 00431</i>	-	+	+	-	-
"	<i>KFRI 00191</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KFRI 00250</i>	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>KFRI 00247</i>	-	+	+	+	++
"	<i>KFRI 00177</i>	-	+	+	-	-
"	<i>KFRI 00640</i>	-	-	-	+	++
"	<i>KFRI 00190</i>	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>KFRI 00194</i>	-	-	-	-	-
"	<i>KFRI 00253</i>	-	+	+	+	++

¹⁾ A : spot-on method, ²⁾ B : agar well diffusion method

Table 27. Thermal stability of pediocin

Temperature(°C)	Result
37 (30min)	+
50 (30min)	+
60 (30min)	+
70 (30min)	+
80 (30min)	+
90 (30min)	+
121 (15min)	-

Table 28. Stability of pediocin on pH

pH*	Result
3	+
4	+
5	+
6	+
7	+
8	+
9	+

* adjusted to pH 6.8 after treatment.

가) pH의 변화

저장기간에 따른 생면의 pH의 변화를 Fig. 124에 나타내었는데 본 실험에서 사용된 면의 초기 pH가 4.8 정도로 이 등의 보고한 생면의 초기 pH 6.24와 칼국수와 우동의 pH 6.01과는 큰 차이를 보이는데 이는 실험에 사용되는 밀가루나 반죽의 용수 그리고 제조회사와 제품종류의 차이에 따라 다른 것으로 생각할 수 있다. 저장기간에 따른 생면의 pH의 변화는 pediocin의 첨가 농도가 높을수록 낮은 경향을 보였으며 저장 48시간에서 약간 증가한 후 저장기간의 경과에 따라 다시 감소하는 경향을 보였다. 이 등의 매실착즙액을 첨가하여 생면의 저장성에 대하여 보고한 결과에 의하면 저장 8일 이후에 pH의 감소를 보인 반면 본 연구에서는 저장 48시간 이후부터 감소함을 보이는 이유는 저장 온도가 차이가 나는 것으로 생각할 수 있다. 첨가농도에 따라 낮은 값을 나타내는 이유는 pediocin의 초기 pH가 낮은 값을 보이기 때문이며 낮은 pH가 저장성 연장에 효과를 주기 때문에 첨가농도가 높을수록 저장효과가 있는 것으로 판단된다.

나) 미생물의 변화

저장기간이 경과함에 따른 일반세균수의 변화는 Fig. 125에 나타내었다. 저장시간이 지남에 따라 균수가 증가하는 경향이였으며 0.1%의 pediocin 첨가시 저장 24시간 후 일시적으로 균수가 감소하여 pediocin 처리가 살균능이 있음을 보였으나 이후 균수의 변화는 저장 96시간까지 서서히 증가하는 양상을 보였다. 이 등이 보고한 키토산 처리에 따른 생면의 저장성 연장 실험에서 4℃ 저장시 총균수는 7일 이후 기준치인 10^6 을 초과하지 않았으나 키토산 처리구는 저장 82일까지도 괜찮았다고 보고하였으며 본 실험결과와 차이가 나는 이유는 저장온도가 다르기 때문으로 생각된다. 또한 키토산 처리한 국수를 18℃에서 저장할 경우, 저장 6일에서 균수가 10^6 이상이었다는 이 등의 보고는 본 연구와 비슷한 결과를 보였다. 매실착즙액을 첨가한 생면의 저장에서는 매실즙의 낮은 pH가 균의 성장을 막아주어 저장 20일까지도 큰 변화가 없다고 보고하였다.

저장기간에 따른 대장균의 변화는 Fig. 126에 나타내었는데 pediocin을 0.1% 처리한 생면은 저장 96시간까지 대장균의 검출이 없었으며 0.03%와 0.05%처리시에는 72시간이후 대장균이 검출되었으며 저장 96시간에서 개체수가 차이를 보였다. 대조구에서는 저장 48시간에서 대장균이 검출되었다.

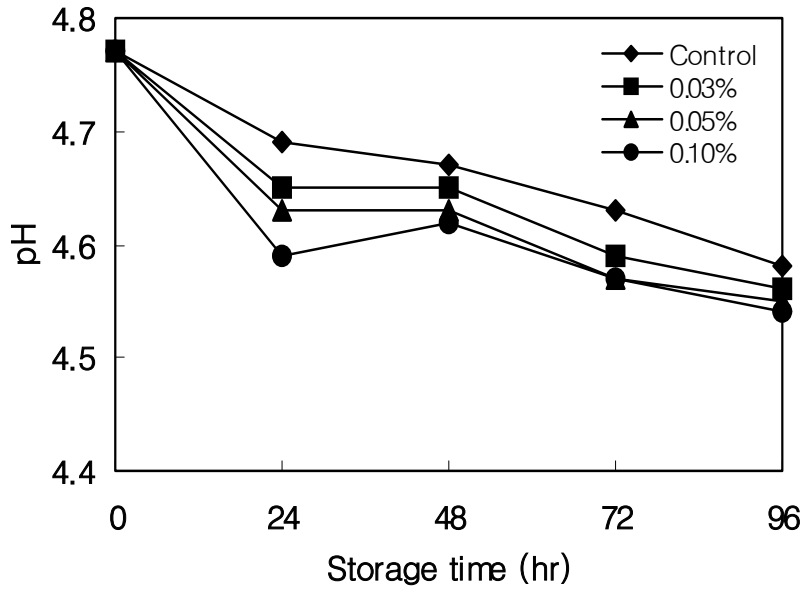


Fig. 125. Changes in pH of noodle during storage at 20°C.

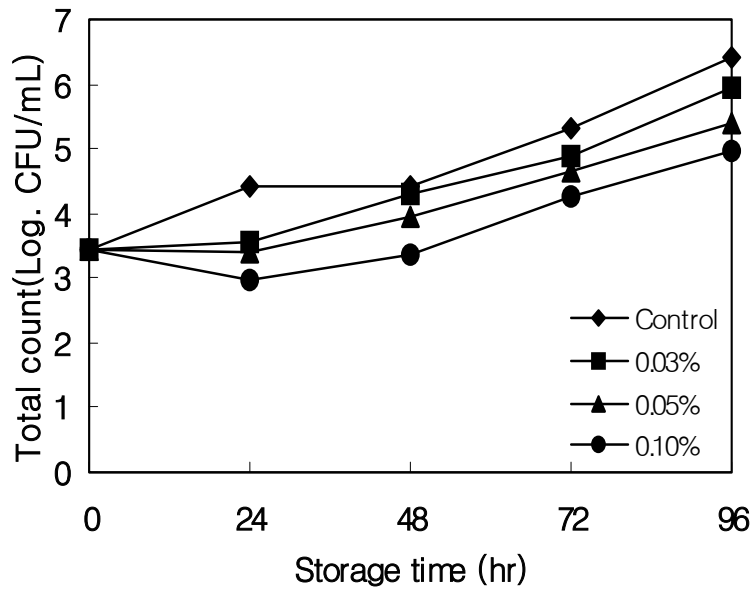


Fig. 126. Changes in aerobic bacterial counts of noodle during storage at 20°C.

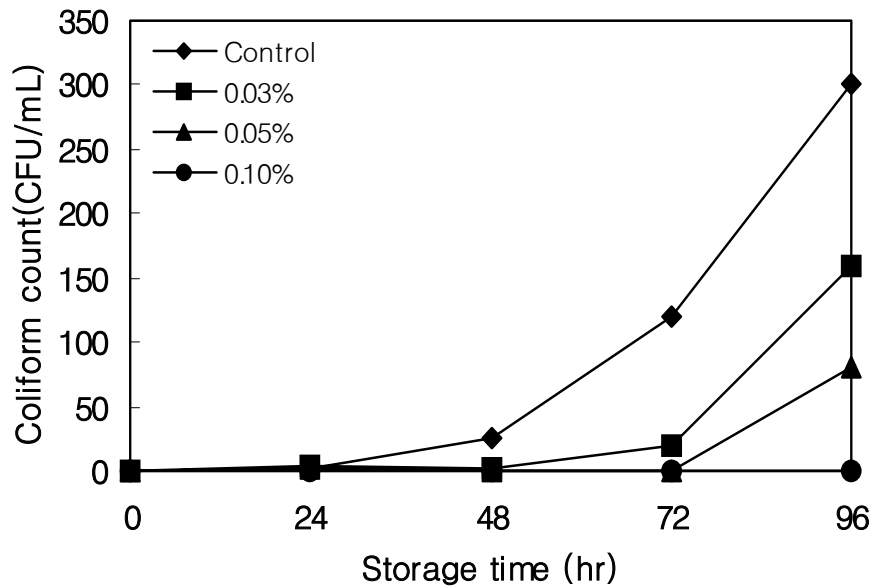


Fig. 127. Changes in coliform bacterial counts of noodle during storage at 20°C.

생면의 저장기간에 따른 효모와 곰팡이균의 변화에 대한 결과는 Fig. 128에 나타내었다. 초기균수가 2.3 log CFU/g으로 검출되었으며 저장 24시간까지는 균수의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 저장 24시간 이후 균수가 빠르게 증가함을 보였으며 pediocin의 첨가농도가 높을수록 균의 성장을 억제하였으며, 대조구의 경우 균수가 빠르게 증가하여 저장 4일에서는 5 log CFU/g 이상의 균수를 보였다. 목단피를 첨가한 국수를 18°C에서 저장할 때 대조구의 경우, 저장 96시간 이후 곰팡이가 발견되었다는 본 연구결과와 유사한 결과를 보였다.

2) 두부의 저장성연장에 미치는 효과

대두는 영양면에서 우수한 단백질자원일 뿐만 아니라 몸에 좋지 않은 혈중 콜레스테롤을 낮추는 것으로 알려져 있으며, 특히 대두에 함유된 isoflavones은 각종 심장질환과 암 등 성인병의 예방과 치료에 효과가 있다고 알려져 있다. 대두를 물과 함께 마쇄할 때 대두에 함유되어 있는 단백질과 각종 염류가 용액내로 녹아 들어가 교질 현탁액인 두유를 이룬다. 여기에 응고제를 첨가하면 교질상태로 현탁되었던 단백질이

침전되는데 이것이 응고되어 겔을 형성한 것이 두부이다. 두부는 특유의 질감으로 우리 민족의 주요 부식이 되어온 전통식품으로서 국제적으로도 잘 알려져 있는 고단백 식품이다.

두부는 수분함량이 높아 재래식 두부의 경우 유통과정에서 오염되기 쉬워 특히 기온이 높은 여름철에는 쉽게 변질되는 특성이 있어 12~15시간이 지나면 부패로 이어진다. 또한 포장, 유통상의 많은 애로점으로 주문생산 형태를 벗어나지 못하고 있는 실정이다. 따라서 두부의 저장성을 향상시키기 위하여 많은 연구가 수행되었는데 두부 침지액의 pH를 조정하는 법, 소금 및 보존료를 두부 침지액에 첨가하는 방법, 두유에 합성살균제를 이용하는 방법, 유기산으로 응고시키는 방법, 저온살균법, 가열처리법, microwave처리법 등이 다수 보고되어 있다.

본 연구에서는 천연의 항균성 물질인 pediocin을 두부의 침지액에 처리하여 저장 기간에 따른 두부의 침지액의 미생물의 변화와 탁도, 산도 등을 조사하여 저장성연장의 효과를 검토하고자 하였다.

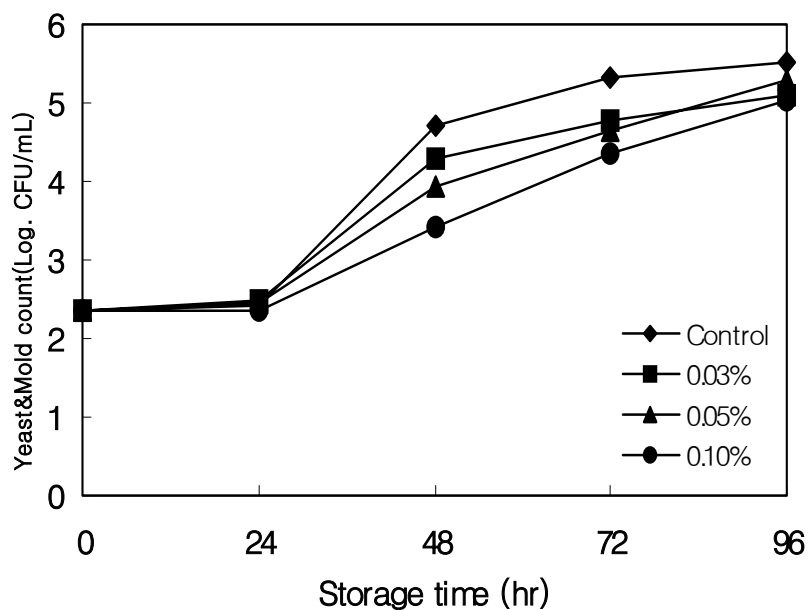


Fig. 128. Changes in yeast and mold counts of noodle during storage at 20°C.

가) pH와 산도의 변화

Pediocin을 각각 0.03%, 0.05%, 0.1%의 농도로 첨가한 침지액에 두부를 침지하여 10℃에서 저장하면서 침지액의 pH와 산도의 변화를 측정된 결과는 Fig. 129, 130에 나타내었다. 두부 침지액의 초기 pH는 6.6이었으며, pediocin을 첨가한 구의 pH는 첨가농도가 높을수록 더 낮은 pH를 보였는데 이는 pediocin의 초기 산도가 낮아 0.03% 농도의 침지액의 pH가 3.33, 0.05% 첨가 3.08, 0.1% 첨가액의 pH가 2.82를 나타내기 때문에 pediocin의 첨가량에 따라 기인 것으로 생각된다. 대조구의 경우 저장 5일 이후 pH가 감소하는 경향을 보였으나 첨가구의 pH 저하가 억제되었는데는 것으로 볼 때 pediocin 처리가 두부의 저장성 연장에 효과가 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 김 등의 클로렐라 첨가가 두부의 저장성이 연장되어 pH의 급격한 감소가 억제된다는 보고하였다. 또한 이 등은 일반두부를 20℃에서 저장하였을 때 초기 pH 6.30이 9시간이후 pH 5.85로 가장 낮았으며 부패가 완전히 진행된 18시간 이후 pH 5.50이었다고 보고하였다. 또한 5℃에서 저장한 경우 pH는 차츰 낮아져 초기 부패가 일어난 5일 이후 pH 6.10으로 처음과 큰 차이를 보이지는 않았다.

산도의 변화를 살펴보면 pH와 유사한 경향으로 pediocin의 첨가농도가 높을수록 산도가 높은 것으로 나타났는데 이는 pediocin 자체의 산도 때문인 것으로 생각되며, 저장 5일 이후 대조구의 산도는 급격한 증가를 보였다. 첨가농도에 따라서는 0.03% 첨가구는 저장 6일이후, 0.05% 처리구에서는 저장 7일 이후 빠른 증가를 보였으나 0.1% 처리구에서는 급격한 증가를 보이지 않았다. 두부의 저장기간이 길어짐에 따라 pediocin의 첨가농도가 높을수록 pH의 저하가 지연됨에 따라 두부의 저장성이 우수함을 확인할 수 있었다.

나) 탁도의 변화

두부의 저장 중 침지액의 탁도 변화를 Fig. 131에 나타내었다. 0.1%의 pediocin을 첨가한 침지액의 탁도는 저장기간내에 큰 증가를 보이지 않아 두부의 부패에 따른 분해물의 생성이 억제됨을 확인할 수 있었으나 대조구는 저장 6일 이후부터는 급격한 탁도의 증가를 보였다. 그 외의 pediocin의 처리농도에 따라서는 0.03%와 0.05%의 경우 6일 이후 약간 증가함을 보여 약간의 부패가 진행됨을 확인할 수 있었다. 이와 같은 탁도의 증가는 저장중 세균성장과 부패에 따른 점질물의 생성에 의해 탁도가 증가하는 것으로 정 등이 보고한 오미자와 매실을 이용한 두부의 저장에 따른 탁도의 변화와 유사한 경향을 나타내었다.

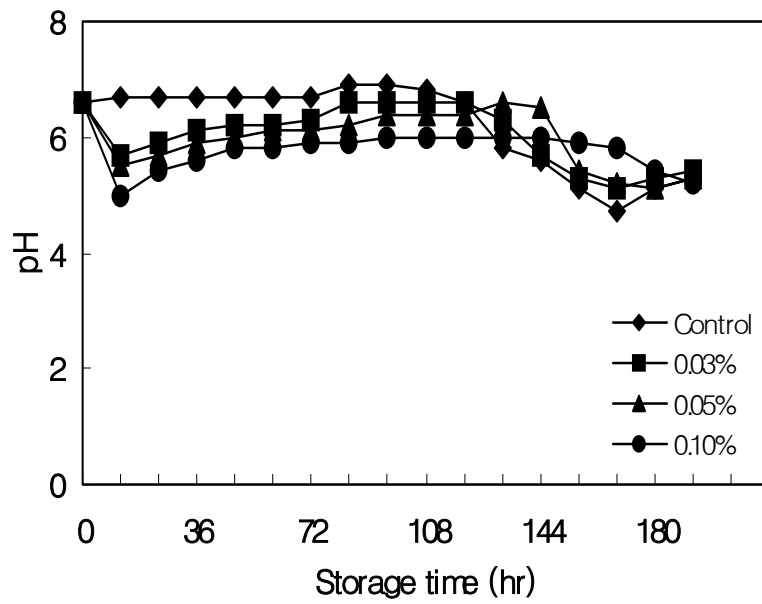


Fig. 129. Changes in pH of immersion solution in soybean curd during storage at 10°C.

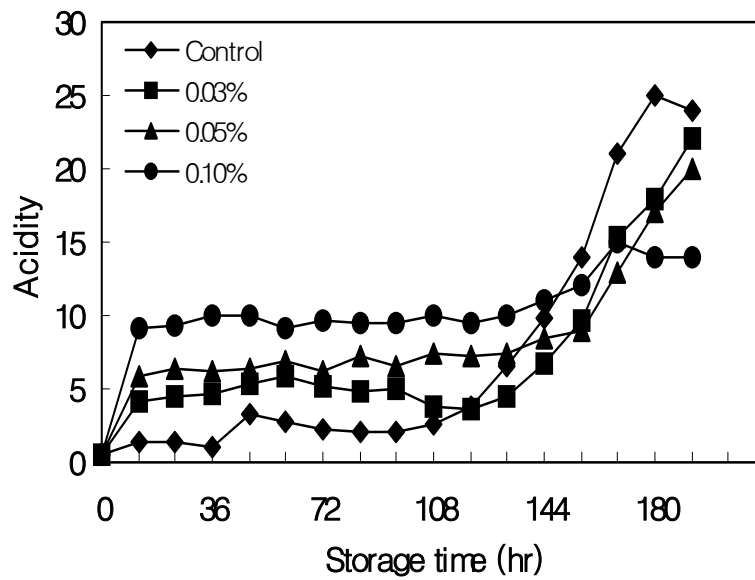


Fig. 130. Changes in acidity of immersion solution in soybean curd during storage at 10°C.

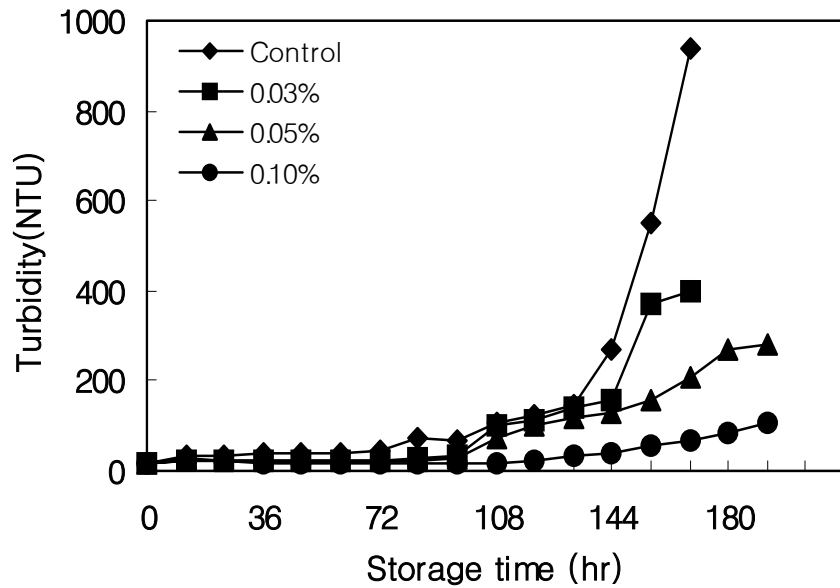


Fig. 131. Changes in turbidity of immersion solution in soybean curd during storage at 10°C.

다) 미생물의 변화

저장기간에 따른 일반세균수와 대장균수의 변화를 나타낸 결과는 Fig. 132과 133에 나타내었다. 두부 침지액의 초기 일반세균수는 2.50 log CFU/g으로 저장기간이 경과함에 따라 서서히 증가하는 경향을 보였으며 저장 5일 이후부터는 빠르게 증가하는 양상을 보였다. 그러나 0.1% 처리구의 경우 저장 48시간까지는 균수가 감소함을 보여 pediocin처리가 일반세균수의 감소에 영향이 있음을 확인할 수 있었으며 0.03%와 0.05% 처리구의 경우에는 저장 36시간에서 균수가 다시 증가함을 보여 pedion 처리에 따른 초기 균수의 감소효과를 확인할 수 있었다. 두부의 저장한계를 6.0 log CFU/g 균수가 검출되는 시점으로 볼때 0.1%처리구에서는 저장 8일까지도 안정한 것으로 나타났지만, 낮은 처리농도에서는 도달시간이 각각 6일과 7일로 나타났으며 대조구는 5일 이후로 판단할 수 있었다. 그러나 본 실험에서는 두부 침지액의 균수를 측정하는 것으로 저장 두부를 대상으로 한다면 저장성이 더 연장될것으로 판단된다. 자몽종자추출물을 두부저장의 천연항균소재로 활용한 결과에 의하면 총균수의 감소와

함께 대장균수도 현저히 낮은 값을 보였다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 결과를 얻었다.

대장균군의 검출을 확인해본 결과 대조구는 저장 60시간에서 검출을 확인하였으며, 0.03%와 0.05%처리구에서는 84시간과 120시간에서 검출되었으며 0.1% 처리구에서는 저장 168시간 이후 검출이 확인 되어 pediocin 처리에 따른 저장성 연장의 효과를 확인하였다. 서 등의 보고에 의하면 항균성이 있는 마린엑스를 두부의 저장시 침지액으로 활용하여 총균수와 대장균수의 억제능을 보여 본 연구와 유사한 결과를 얻었으며 첨가농도에 따라서도 차이를 확인하였다.

이와 같은 결과로 보아 pediocin 처리는 두부의 저장성 연장에 효과가 있음을 확인하였으며 처리농도가 높을수록 더 큰 연장효과를 확인할 수 있었다. 축육제품의 저장성연장을 위하여 복합 bacteriocin을 적용한 결과 일반세균수는 대조구에 비하여 유의적인 감소를 보인다고 보고한 결과로 볼 때 본 연구에서 사용되는 pediocin 처리도 두부제품 뿐만 아니라 다른 저수분 식품에도 활용가능성이 있을 것으로 생각된다.

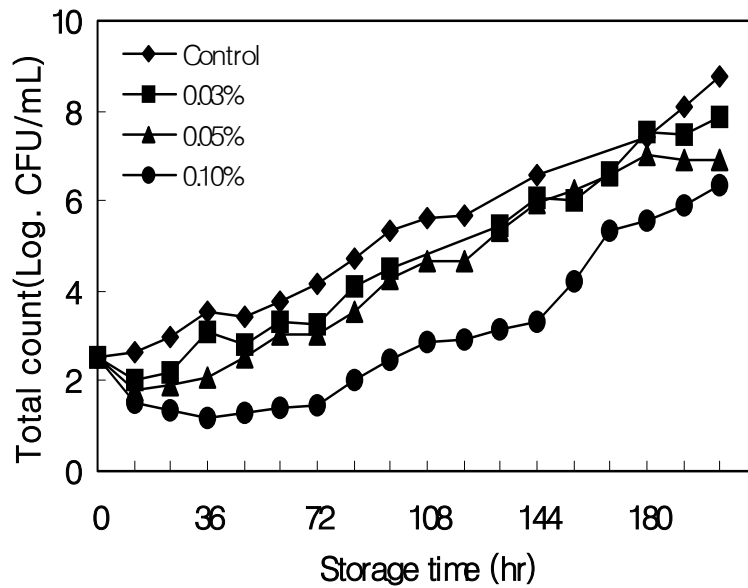


Fig. 132. Changes in aerobic bacterial counts of immersion solution in soybean curd during storage at 10°C.

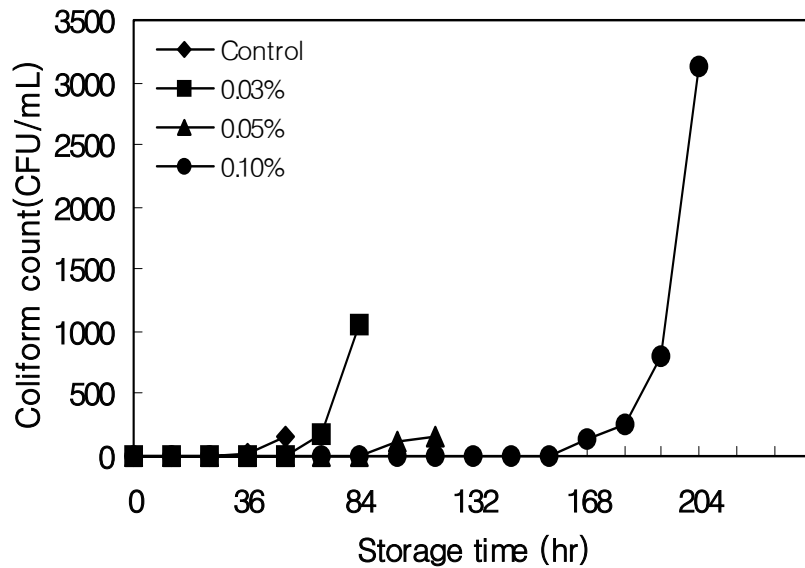


Fig. 133. Changes in coliform bacterial counts of immersion solution in soybean curd during storage at 10°C.

3) 깻잎에 대한 저장성 연장 효과

농산물 시장이 점차적으로 개방되어 수입이 크게 늘어나게 되었고 다양한 수입 농산물이 가격과 품질 메리트를 부각시키며 시장에서 경쟁하고 있다. 더욱이 소비자들의 소득이 증가하고 건강에 대한 관심이 증가하면서 식품에도 well being 열풍이 불고 있다. 이러한 소비자의 수요 변화에 부응한 고품질 · 친환경 · 안전 농산물 생산 요구가 증대되고 있는 현실에서 생산자와 소비자가 함께 신뢰할 수 있는 미생물 안전성이 확보된 안전 농산물 생산을 위한 기술 개발 및 연구가 절실하다.

최근 들어 유기농 채소의 보급과 최소가공기술을 활용한 신선 농산물 가공 연구가 활발히 진행되고 있어 농산물의 안전성 확보 문제는 더욱더 절실히 요구되고 있는 실정이다.

일반적으로 신선 채소류의 내부는 무균상태이지만 표면은 여러 가지 오염원에 의하여 다양한 미생물이 오염, 부착되어 있다. 이렇게 표면에 부착된 미생물이 증식하게 되면 식품의 변질을 일으키거나 섭취 시 질병을 야기하기도 한다. 따라서 부패 미생물이나 병원성 미생물의 살균 및 제균이 절대적으로 필요하다.

우리 농산물의 안전성 증진 및 고품질화를 위하여 신선 엽채류의 표면미생물의 제어에 많은 연구가 진행되고 있으며 특히, 살균·세척의 종류 및 방법에 의한 생식용 신선 엽채류의 잔존 미생물을 줄이는 방안에 대한 연구가 진행 중이다. 본 연구에서는 천연항균물질인 pediocin 희석액(0.03%, 0.05%, 0.1%)를 제조하여 깻잎을 5분간 침지한 후 물기를 제거하고, 10℃에서 저장하면서 pH 및 미생물의 변화를 알아보았다.

가) pH의 변화

깻잎을 pediocin 희석액에 침지하여 저장성 연장의 효과를 알아보기 위하여 Fig. 134에 저장기간에 따른 pH의 변화를 나타내었다. 저장일수에 따른 pH의 변화를 살펴보면 저장기간이 경과할수록 pH가 약간 증가하는 경향을 나타내었으며 대조구의 pH 증가가 가장 큰 것으로 나타났으며 pediocin의 처리 농도가 높을수록 pH의 감소가 줄어들어 저장기간 동안 pH의 증가를 억제하여 저장성 연장의 효과가 있음을 알 수 있었다.

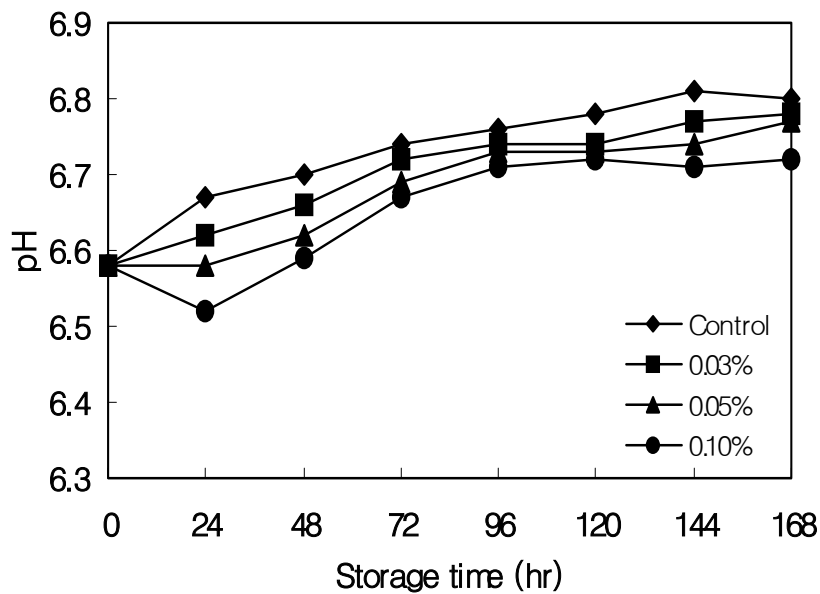


Fig. 134. Changes in pH of sesame leaf during storage at 10°C.

나) 미생물의 변화

엽채류는 살균이 불가능하여 대부분이 표면의 미생물을 제거할 수 있는 방법으로 살균제나 산화수 등을 처리하여 저장성연장의 효과를 얻고자 하고 있다. 깻잎의 저장기간에 따른 총균수의 변화를 알아본 결과는 Fig. 135에 나타내었으며 저장기간이 경과함에 따라 대조구와 pediocin 첨가구 모두 지속적인 증가를 보였으며, 첨가량이 증가할수록 총균수가 증가가 줄어들어 미생물의 성장을 억제하여 저장성 연장의 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 전해산화수를 처리한 상치의 저장성에 대한 정 등의 보고에서도 저장기간이 길어짐에 따라 세균이 증가하였으며 저장 9일에서도 10^7 정도의 균수를 보여 본 연구와 유사한 결과를 보였다.

대장균군의 변화는 Fig. 136에서 살펴보면 초기균수가 10^4 으로 상치의 경우 무처리구는 10^6 정도, 전해산화수 처리시 10^3 의 사이로 pediocin 처리에 따른 제균 효과가 있음을 알 수 있었다. 저장 24시간에서 대장균군 수는 pediocin의 처리농도는 0.1% 처리구에서는 감소함을 보여 살균효과가 있는 것으로 밝혀졌으나 저장기간이 길어짐에 따라 서서히 증가하는 양상을 보였다. 처리농도가 증가할수록 균수의 증가가 둔화되어 깻잎의 저장성 연장에 효과가 있음을 알 수 있었다.

이와 같은 결과는 엽채류의 미생물을 줄이고자 살균제로 과산화수소수나 차아염소산나트륨, 초산용액을 처리하여 살균효과를 얻은 박 등의 보고에서와 같이 천연항생물질을 사용함으로써 표면미생물의 제거와 저장성 연장에 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

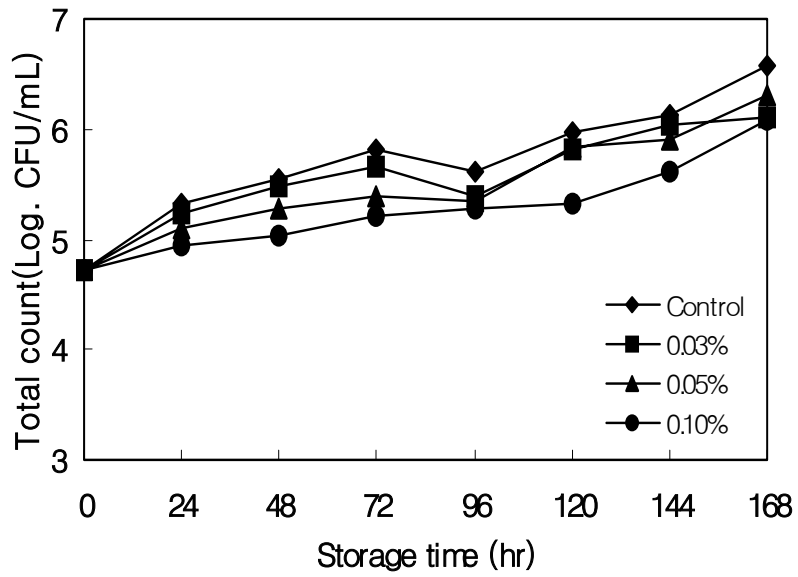


Fig. 135. Changes in aerobic bacterial counts of sesame leaf during storage at 10°C.

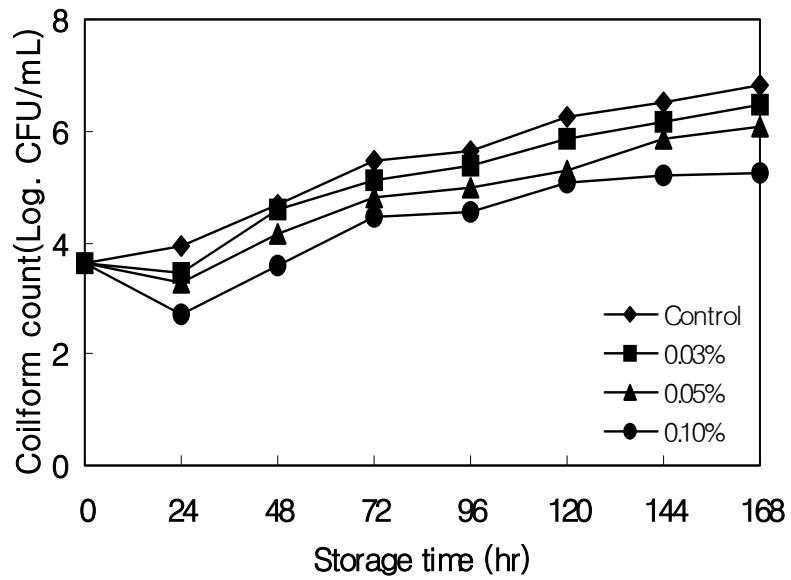


Fig. 136. Changes in yeast and mold counts of sesame leaf during storage at 10°C.

4) 약식에 대한 적용기술 개발

앞서 사과 장기저장 실험에 사용된 첨가물의 비를 약식에 도입하여 저장 기간에 따른 미생물 생육 특성 및 품질변화를 확인하고자 하였다. 약식은 떡류로서 전분질 식품인 곡류로부터 호화과정을 거쳐 제조하기 때문에 일정기간은 그대로 먹을 수 있지만 보존에 따른 많은 어려움을 가지고 있을 뿐 아니라 미생물 증식에 의한 안전성 확보에 많은 문제점을 가지고 있다. 이에 본 연구에서는 제조공정에 따른 천연첨가물 처리로 미생물학적 안전성을 확보하여 유통기한을 연장시켜보고자 하였다.

가) 총균수와 *Bacillus cereus* 수

20°C 저장에 따른 각 처리구별 세균의 생육 상태는 Fig. 137과 같이 무처리구의 경우 1.7×10^2 CFU/g 수준이었으며, NP(1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구의 경우에는 1.1×10^1 CFU/g을 나타내었다. 반면, H(150 ppm hinokitiol) 및 HNP(150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구에서는 세균의 생육을 전혀 보이지 않아 150 ppm hinokitiol 첨가에 의한 초기균 억제 효과는 매우 우수한 것으로 판단되었다. 그러나 저장기간의 경과에 따라 NP(1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 및 HNP(150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구가 H(150 ppm hinokitiol) 처리구보다 미생물 생육 저해 효과 측면에서 더 우수한 것으로 나타났으며, 저장 3일부터는 NP(1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구와 HNP(150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리구의 정균효과가 비슷한 수준으로 나타나, fresh-cut 사과의 처리 결과와는 달리 NP(1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin) 처리만으로도 미생물학적 안전성을 확보할 수 있을 것으로 판단되었다.

나) *Bacillus cereus*

Bacillus 속은 자연계에 널리 존재하여 식품에 혼입될 기회가 많으므로 식품 보존상 문제가 되는 내열성 아포를 형성하는 Gram 양성 간균이다. 이러한 *B. cereus*는 전분을 주체로 한 식품에서 많이 발생하므로 약식의 경우에도 저장에 따른 문제가 발생할 것으로 사료되었다.

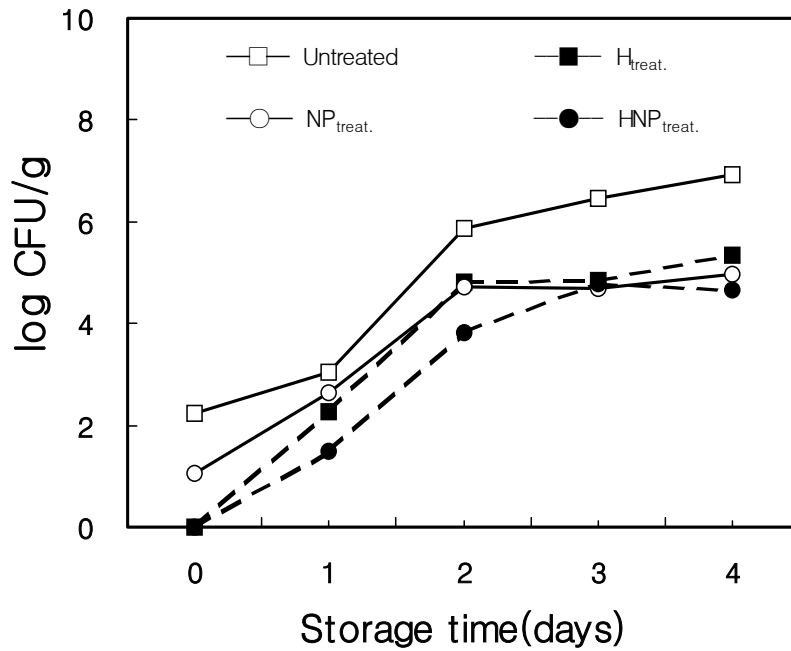


Fig. 137. Changes in microbial count of *yaksik* prepared by various condition during storage at 20°C.

[--■-- H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol, —○— NP_{treat.} : 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- HNP_{treat.}: 150 ppm hinokitiol + 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin]

따라서 본 실험에서는 약식의 미생물학적 안전성을 확보하기 위해 hinokitiol, nisin 및 pediocin을 혼용 처리하여 *B. cereus*의 생육 저해 효과를 확인하여 Fig. 138에 나타내었다. 그 결과 무처리를 포함한 모든 처리구에서 저장 1일까지는 *B. cereus*의 생육이 전혀 일어나지 않았으며, 저장 2일경 무처리구에서 2.8×10^3 CFU/g 수준이 검출되었다. 저장기간이 경과함에 따라 H(150 ppm hinokitiol) 처리구에서도 *B. cereus*의 생육이 일어나 저장 3일경 3.9×10^1 CFU/g 수준으로 나타났으나, NP(1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin)가 첨가된 처리구에서는 *B. cereus* 생육을 전혀 보이지 않았으며, 이러한 결과는 nisin 및 pediocin이 Gram 양성 세균에 대해 강한 항균작용을 나타낸다는 기존의 보고와 일치하는 것이었다.

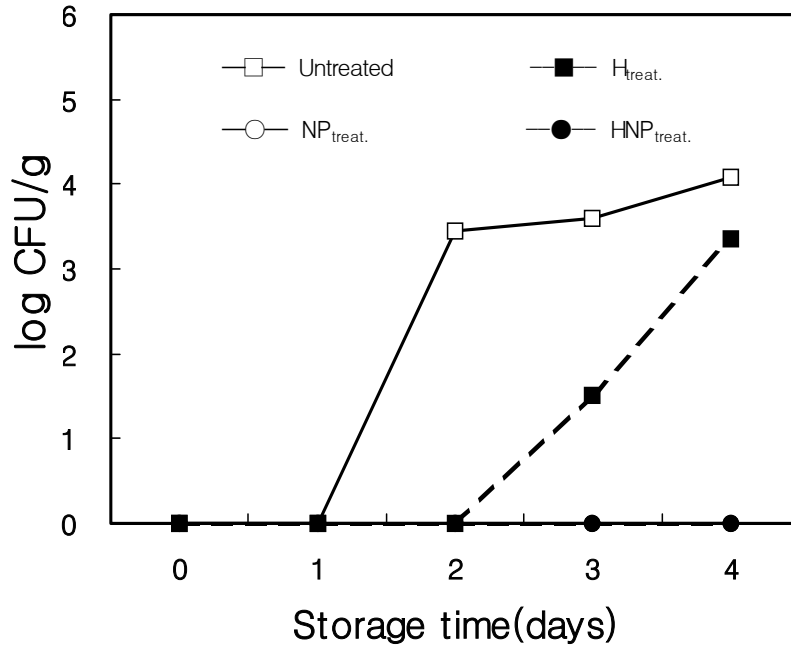


Fig. 138. Changes in *B. cereus* of *yaksik* prepared by various condition during storage at 20°C.

[--■-- H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol, --○-- NP_{treat.} : 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- HNP_{treat.}: 150 ppm hinokitiol + 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin]

다) 경도 변화

각 첨가제 처리에 따른 약식의 노화특성을 확인하고자 경도변화를 측정된 결과 Fig. 139과 같았다. 즉, 모든 처리구가 시간이 경과함에 따라 경도 값이 증가하는 것으로 나타났으며, 특히 저장 4일 경에는 급격히 증가하는 것으로 나타났다. 또한 저장 4일차에서 살펴보면 무처리구에 비해 150 ppm hinokitiol이 첨가된 처리구에서 매우 높은 force 값을 보여 hinokitiol 첨가가 노화 현상을 촉진시키는 것으로 판단되었다.

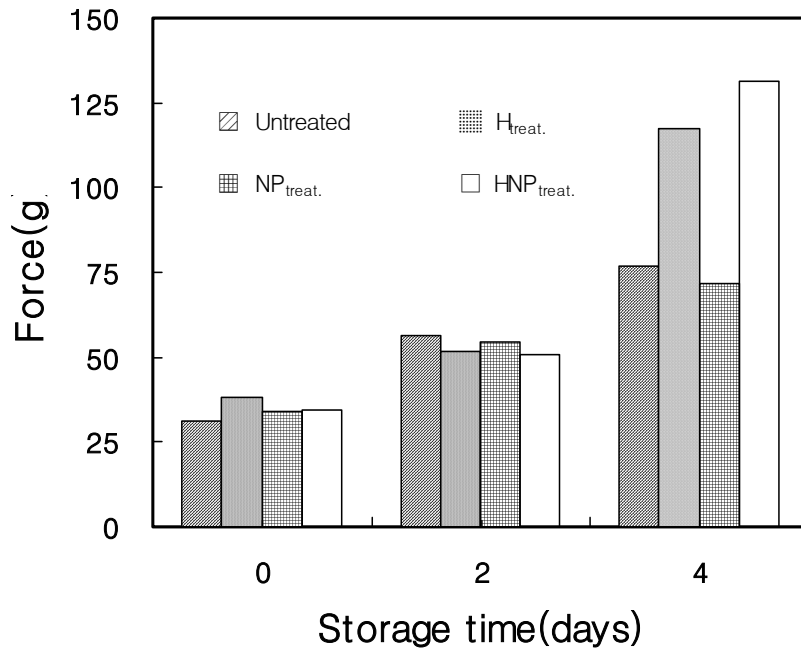


Fig. 139. Texture changes of *yaksik* prepared by various condition during storage at 20°C.

[--■-- H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol, --○-- NP_{treat.} : 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin, --●-- HNP_{treat.} : 150 ppm hinokitiol + 1,200 ppm nisin + 800 ppm pediocin]

라) 관능검사

각 첨가제 처리에 따른 관능검사를 실시한 결과 Table 29와 같이 색(color), 향(flavor), 맛(taste) 그리고 전체적인 기호도(overall acceptability) 항목에 대해 유의적 차이는 나타나지 않았으며, 저장 4일경에는 대조구에서 곰팡이가 일부 발생하여 관능평가가 불가하였다.

Table 29. Sensory evaluation of *yaksik* prepared by various condition during storage at 20°C

Storage time (days)	Treatment	Sensory evaluation ¹⁾			
		Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
0	Untreated	6.17 ^{a2)}	7.00 ^a	6.50 ^a	6.25 ^a
	H _{treat.} ³⁾	6.83 ^a	7.17 ^a	6.67 ^a	6.75 ^a
	NP _{treat.} ⁴⁾	6.00 ^a	7.08 ^a	6.50 ^a	6.08 ^a
	HNP _{treat.} ⁵⁾	6.33 ^a	6.92 ^a	7.00 ^a	6.91 ^a
2	Untreated	5.33 ^a	6.50 ^a	5.00 ^a	5.25 ^a
	H _{treat.}	6.50 ^a	6.50 ^a	5.83 ^a	6.25 ^a
	NP _{treat.}	5.33 ^a	6.33 ^a	5.17 ^a	5.58 ^a
	HNP _{treat.}	6.33 ^a	6.50 ^a	5.50 ^a	5.92 ^a

¹⁾ Sensory evaluation : 9 very good, 7 good, 5 fair(still marketable), 3 poor(not marketable), 1 very poor

²⁾ Means with the same letter in column are not significantly different at $p < 0.05$ level by Duncan's multiple test

³⁾ H_{treat.} : 150 ppm hinokitiol

⁴⁾ NP_{treat.} : 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin

⁵⁾ HNP_{treat.} : 150 ppm hinokitiol + 1200 ppm nisin + 800 ppm pediocin

바. 항균성 peptide를 활용한 포장재 개발

1) 박테리오신 항균활성 측정

Polylysine, nisin 및 pediocin 등 3종류의 박테리오신을 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 저농도로 병원성균 및 두부부패균을 대상으로 항균활성을 측정한 결과 Table 31과 같이 나타났다.

Polylysine은 *Bacillus cereus* ATCC 21768, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 등 그람 양성 병원성 미생물뿐 아니라 그람 음성균인 *Escherichia coli* ATCC 11775, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 21204, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 등에도 항균 활성을 나타내었다. 특히 내열성 아포균인 *Bacillus cereus*에 대한 항균활성이 크게 나타났다. 반면 nisin과 pediocin의 경우 비교적 그람 양성균에 대한 항균활성 효과만 확인할 수 있었다.

2) Polylysine의 최소저해농도

박테리오신의 최소저해농도는 microplate bioassay procedure로 stepwise 2-fold dilution은 Carl 등의 방법으로 측정하였고 필름에 코팅되기 전 박테리오신들의 농도를 결정하는데 사용하고 또한 코팅필름 제조 후 코팅필름으로부터 용출된 박테리오신의 항균활성을 평가하는데 사용함으로써 결과는 Table 32와 같다.

Polylysine은 그람 양성 및 음성 지시균주에 대해 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이하의 비교적 저농도로 증식을 억제하는 것으로 나타났고, 특히 내열성 아포균인 *Bacillus cereus*에 대해 높은 증식억제효과를 나타내었다. 이는 두부와 같은 가열처리식품에서도 생존할 수 있는 균으로 polylysine 코팅필름 제조 후 이 균주를 공시균주로 사용하여 필름의 항균 특성을 알아보았다.

3) Polylysine 코팅 필름의 제조 및 최적 조건 설정

Polylysine 코팅 필름의 항균활성을 최적화 하기 위하여 사용된 결합제, 항균제의 농도 및 필름의 두께를 변화시켜 항균활성이 뛰어난 *Bacillus cereus*균에 대한 생육도를 측정하여 최적의 필름 제조 조건으로 설정하였다.

Table 31. Antimicrobial activity spectrum of the bacteriocins used in this study

Bacterial species	Antimicrobial agents		
	polylysine	nisin	pediocin
Gram positive strain			
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 21768	++	+ ¹⁾	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 15313	-	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	- ²⁾	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	++	-	+
Gram negative stain			
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 21204	+	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	++	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	+	-	-

¹⁾ + : Inhibition, ²⁾ - : not inhibition.

Table 32. Minimal inhibitory concentration of polylysine used in this study

Bacterial species	MIC($\mu\text{g}/\text{mL}$)	
	Polylysine	Medium
Gram positive strain		
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 21768	20	Nutrient broth
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	50	MRS broth
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	20	BHI broth
Gram negative stain		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 21204	50	Nutrient broth
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	50	Nutrient broth
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	20	Nutrient broth

가) Polylysine 농도에 따른 항균활성

결착제인 polyamide의 농도는 propanol 용매에 대해 40%(w/v) 농도로 고정시키고 또한 필름의 두께는 50 μm 로 고정시킨 후 polylysine의 농도를 0.5, 1.0, 1.5 및 2.0 %(v/v)로 변화시켜 필름을 제조하여 *B. cereus* 지시균에 대한 생육도를 측정된 결과 Fig. 146과 같이 나타났다. polylysine 농도가 1.0 % 이상의 농도에서는 배양 9 시간 까지 지시균주에 대한 생육을 억제하는 것으로 나타났고, 무처리구인 OPP 필름과 polylysine을 넣지 않은 polyamide 코팅 필름은 지시균의 생육을 저해하지 못하는 것으로 나타났다. 또한 0.5 % polylysine 농도는 대조구와 비슷한 경향을 나타내어 생육 억제 효과는 볼 수 없었다. 한편, 1.0 % 이상의 농도에서 대조구와 비교해서 초기의 흡광도값이 높은 것은 천연항균제로 사용한 polylysine 자체의 흡광도 값으로 사료된다. 따라서 polylysine 코팅 필름 제조 시 천연항균제인 polylysine의 농도는 1.0%가 적절한 것으로 사료된다.

나) Polyamide 농도에 따른 항균활성

Polyamide의 적정농도를 결정하기 위하여 polylysine 농도를 1.0 % 로 고정하고, 필름의 두께는 50 μm 로 고정시킨 후 PA 농도를 propanol 용매에 대해 20, 30 및 40 %(w/v) 농도로 변화시켜 필름을 제조하여 *B. cereus* 공시균주에 대한 생육도를 측정된 결과는 Fig. 147과 같다.

결착제인 PA의 농도는 40 % 농도에서 *B. cereus* 생육억제 효과가 가장 높았으며 배양 18 시간까지 균주의 생육을 억제하는 것으로 나타났으며, 30 및 20 % 농도의 경우 배양 6시간까지 생육을 억제하는 것으로 나타났으나 이후 대조구와 같은 경향으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서 PA의 농도에 따른 항균제의 항균활성은 PA 함량이 증가할수록 항균활성 또한 증가하는 것으로 나타났다. 이는 Kim 등이 PA와 수분흡습의 관계에 있어서 PA 함량이 증가할수록 수분흡습은 증가하는 것으로 보아 본 코팅 필름 제조에 있어서도 PA 함량이 증가할수록 수분흡습이 높아 코팅필름 내부에 함유되어 있는 항균제인 polylysine이 외부로의 용출이 용이하게 된 것으로 판단된다.

40 % 이상의 PA 농도에서는 결착제의 점성이 높아져 OPP에 코팅이 어려웠고, 20 % 이하의 농도에서는 결착제의 점성이 낮아 필름 코팅이 형성되지 않았다. 따라서 polylysine 코팅 필름 제조시 결착제로 사용한 PA의 농도는 40%가 가장 적절한 것으로 판단된다.

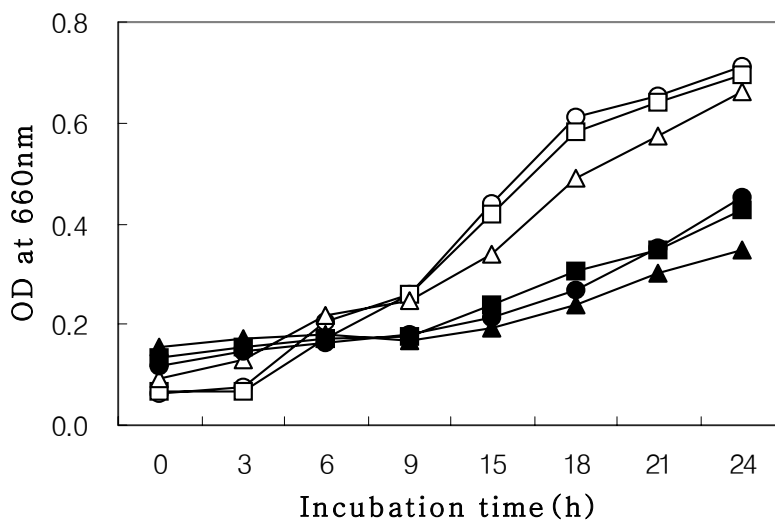


Fig. 146. Antimicrobial effect of change of polylysine concentration.
 -○- : Control film(Oriented polypropylene), -□- : Untreated polylysine,
 -△- : 0.5 % polylysine coating film, -●- : 1.0 % polylysine coating film,
 -■- : 1.5 % polylysine coating film, -▲- : 2.0 % polylysine film.

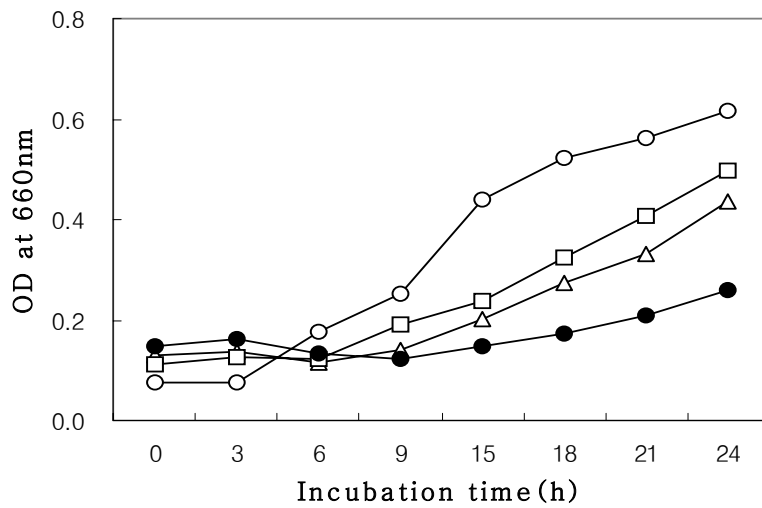


Fig. 147. Antimicrobial effect of change of polyamide concentration.
 -○- : Control film(Oriented polypropylene), -□- : 20 % polyamide film,
 -△- : 30 % polyamide film, -●- : 40 % polyamide film.

다) Polylysine 코팅 필름의 두께에 따른 항균활성

Polylysine 코팅 필름은 PA 농도 40%, polylysine의 농도 1.0%로 고정하여 필름의 코팅 두께를 30, 50, 100 및 120 μm 단위로 제조하였으며 이에 따른 *B. cereus*에 대한 생육도를 측정한 결과는 Fig. 148과 같다. polylysine 코팅 필름은 두께에 따라서 *B. cereus*의 생육도에 차이를 나타내어 50 μm 이상의 두께에서 균의 생육을 완전히 억제하는 것으로 나타났다. 배양시간에 따른 생육도의 경우, 대조구는 배양 3시간 이후부터 24시간 까지 급격하게 증가하는 경향을 나타내었으며 30 μm 두께의 코팅 필름은 배양 6시간까지는 지시균의 생육을 억제하였으나 이후 대조구와 마찬가지로 24시간까지 급격하게 증가하였다. 반면, 50 μm 이상의 코팅 필름에서는 배양 24시간 동안 지시균의 생육을 억제하는 것으로 나타났다. 또한 50, 100 및 120 μm 의 코팅 필름 간 지시균의 생육 억제에 대한 차이는 나타나지 않아 50 μm 코팅 필름의 제조가 적절한 것으로 판단된다.

라) Polylysine 코팅 필름의 항균제 용출

Polylysine 코팅 필름을 4 \times 4 cm²로 절단하여 10 $^{\circ}$ C의 멸균된 인산 완충액(pH 7.0) 20 mL에 침지시켜 7일 동안 polylysine의 용출량을 측정한 결과는 Fig. 149와 같다.

Polylysine은 침지 3일 이내에 거의 용출되었으며 이후에는 평형을 이루었다. 최대 용출량은 침지 3일차에 약 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 전체 코팅된 polylysine의 약 15%가 용출되는 것으로 나타났다.

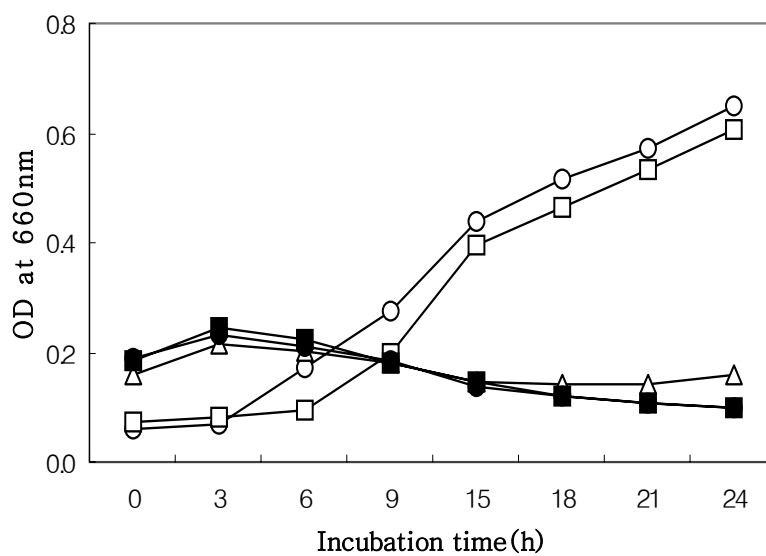


Fig. 148. Antimicrobial effect of change of polylysine coating film thickness.
 -○- : Control film(Oriented polypropylene), -□- : 30 μ m thickness,
 -△- : 50 μ m thickness, -●- : 100 μ m thickness, -■- : 120 μ m thickness.

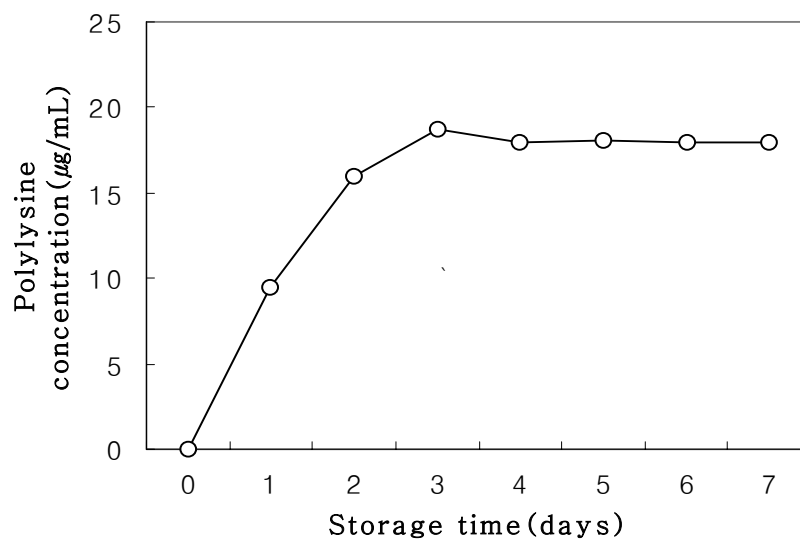


Fig. 149. Migration of polylysine from the antimicrobial film to water at 10 °C.
 -○- : polylysine coating film.

마) Polylysine 코팅 필름의 항균활성

Polylysine 코팅 필름의 항균활성은 $4 \times 4 \text{ cm}^2$ 로 절단하여 그람 양성균인 *B. cereus*와 그람 음성균인 *K. pneumoniae*에 대한 저해 효과를 알아보기 위해 초기 균수가 약 6.8×10^5 (CFU/mL) 농도로 접종된 멸균 펩톤수(pH 7.0)에 침지하여 10 °C에 배양하면서 생균수를 측정된 결과 Fig. 150 및 Fig. 151과 같다. 또한 polylysine의 생균수 감균효과를 nisin과 pediocin 코팅 필름을 대조구로 사용하여 비교하였다.

Polylysine 코팅 필름은 그람 양성 및 그람 음성균에 대해 생균수를 측정된 결과 공시균주에 대한 감균효과를 볼 수 있었으며 코팅된 필름으로부터 용출된 polylysine은 안정적으로 활성을 가지는 것을 볼 수 있었다.

그람 양성인 *B. cereus*에 대한 생균수를 측정된 결과 polylysine 코팅 필름은 균의 생육을 완전히 억제하는 것으로 나타났다. 배양시간에 따른 생균수를 측정된 결과, 대조구는 침지 7일차 까지 10^6 (CFU/mL) 단위로 일정하게 유지되었고, pediocin 및 nisin 코팅 필름의 경우 침지 2일차까지는 감균효과를 볼 수 없었으나 이후 7일차에는 10^1 (CFU/mL) 정도의 감균효과를 볼 수 있었다. 반면, polylysine 코팅 필름의 경우 침지 초기부터 급격하게 감소하여 침지 7일차에는 10^2 (CFU/mL) 이하로 생균수가 측정되어 대조구, pediocin 및 nisin 코팅 필름과 비교 시 $10^3 \sim 10^4$ (CFU/mL) 정도의 감균효과를 볼 수 있었다.

그람 음성인 *K. pneumoniae*에 대한 생균수를 측정된 결과 polylysine 코팅 필름은 10^2 (CFU/mL) 이하의 감균효과를 볼 수 있었다. 반면, 대조구인 OPP의 경우 생균수가 10^6 (CFU/mL) 정도로 침지 7일까지 일정하게 유지되었고, pediocin 및 nisin 코팅 필름의 경우 대조구와 비교 시 10^1 (CFU/mL) 이하로 비교적 적은 차이로 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 이는 앞서 실험한 nisin 및 pediocin의 그람 음성균에 대한 항균활성 측정과 일치하는 것으로 필름에 코팅한 후에도 그람음성 공시균주에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 나타났다. 반면, polylysine 코팅필름의 경우 polylysine 자체의 공시균주에 대한 항균활성이 필름에 코팅 된 후에도 유지하는 것을 확인 할 수 있었다.

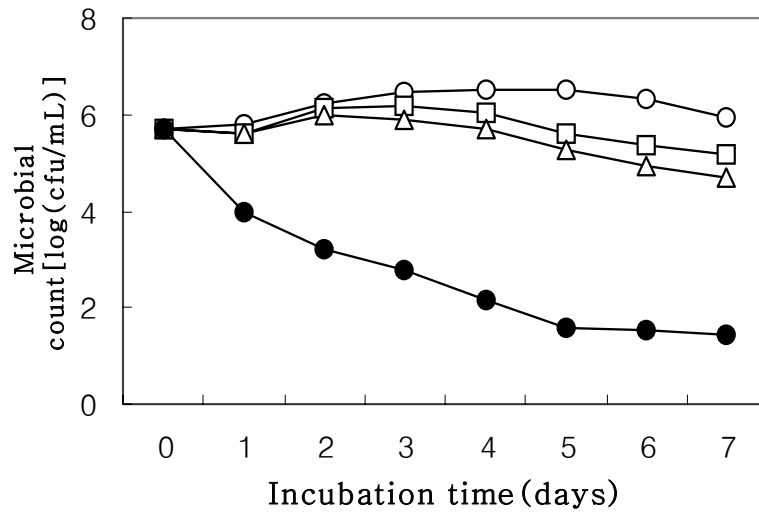


Fig. 150. *Bacillus cereus* viable cell numbers in the peptone water solution which is contact with polylysine coating film at 10 °C.

-○- : Control film(Oriented polypropylene), -□- : Pediocin coating film,
 -△- : Nisin coating film, -●- : Polylysine coating film.

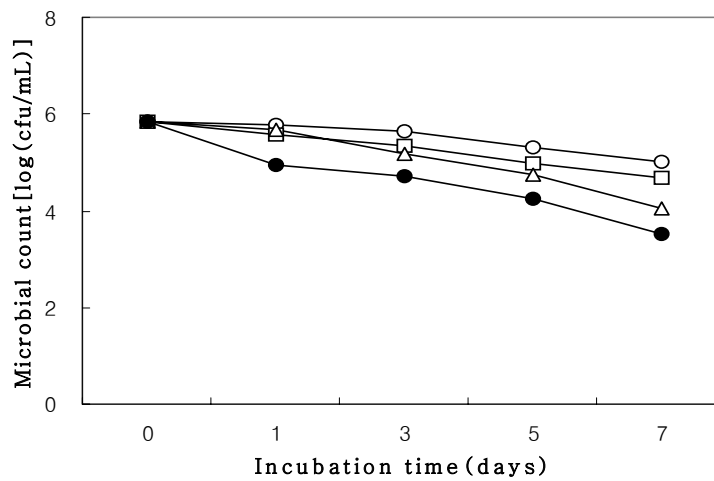


Fig. 151. *Klebsiella pneumoniae* viable cell numbers in the peptone water solution which is contact with polylysine coating film at 10 °C.

-○- : Control film(Oriented polypropylene), -□- : Pediocin coated film,
 -△- : Nisin coated film, -●- : Polylysine coated film.

4) Polylysine 코팅 필름의 물리적 특성 시험

가) 수분용해도(Water Solubility ; WS)

제조된 polylysine 코팅 필름 제조 시 수분식품에 적용 할 경우 수분에 대한 안정성을 평가하기 위해서 필름 결착제로 사용한 PA 시편을 $4 \times 4 \text{ cm}^2$ 절단하여 멸균수에 침지 시켜 수분용해도를 측정된 결과 Table 33과 같다. PA 코팅 필름의 수분에 대한 용해는 전혀 일어나지 않았으며 이는 수분식품에 적용 시 적절한 것으로 사료된다.

나) 필름의 형상(Morphology) 관찰

Polylysine 코팅 필름의 표면이 수분에 접촉되었을 때 필름 형상의 변화를 조사하고자 주사 현미경(S-2380N, HITACHI, Japan)을 사용하여 관찰한 결과 Fig. 152 및 Fig. 153과 같은 형상을 볼 수 있었다. 이는 Fig. 152의 B에서 보듯이 polylysine 코팅 필름을 수분에 접촉시켜 살펴본 결과 친수성 amide기를 가진 PA의 특성상 수분과 접촉했을 때 polylysine을 함유한 코팅필름의 경우 필름 표면의 수지 사이에 어떤 공간이 형성되어 있으며 이 공간을 통해 polylysine이 용출되는 것으로 사료된다. 또한, Fig. 153의 B에서 보듯이 polylysine을 넣지 않은 PA만 코팅 된 필름을 수분에 접촉시킨 결과 표면의 균열을 볼 수 있었다. 반면에, Fig. 152의 A와 Fig. 153의 A에서 보듯이 필름을 수분에 접촉시키지 않은 필름의 경우 polylysine의 첨가 유무에 상관없이 필름표면은 유사하게 관찰되었다.

Table 33. Solubility of coating medium in water

Coating medium	Weight gain by coating (g/cm^2)	Solubility of coating in water(%)
Polyamide	1.25×10^{-2}	0.0



A



B

Fig. 152. Morphology of polyamide coating film before and after contact with water.



A



B

Fig. 153. Morphology of polylysine coating film before and after contact with water.

5) Polylysine 코팅 필름의 온도, pH 및 식염농도에 따른 polylysine 용출 및 항균특성

가) 온도에 따른 polylysine 용출 및 항균활성

제조된 polylysine 코팅 필름의 온도에 따른 용출 및 항균활성은 4, 10 및 25 °C의 멸균수에서 측정하였으며, 항균활성은 *B. cereus*를 초기 균수 6.8×10^5 농도로 접종한 멸균 펩톤수에 침지시켜 균수의 변화를 측정하였다(Fig. 154~156).

Polylysine의 용출은 침지 3일 이후 25 °C에서 가장 많은 양의 polylysine이 용출 되었으나 그때의 지시균주에 대한 항균활성은 나타나지 않았다.

항균활성에 있어서 4 °C에서는 polylysine 코팅 필름이 침지 4일후에 지시균주를 완전히 저해하는 것을 볼 수 있었으나, nisin 및 pediocin 코팅 필름의 경우 대조구와 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 코팅필름을 10 °C에 침지 시켰을 경우 polylysine 코팅 필름은 침지 7일후에 약 4 log cycle 이상의 저해효과를 볼 수 있었다.

이는 지시균주가 용출된 polylysine에 의한 저해효과와 더불어 저온에 따른 병용효과로 사료된다.

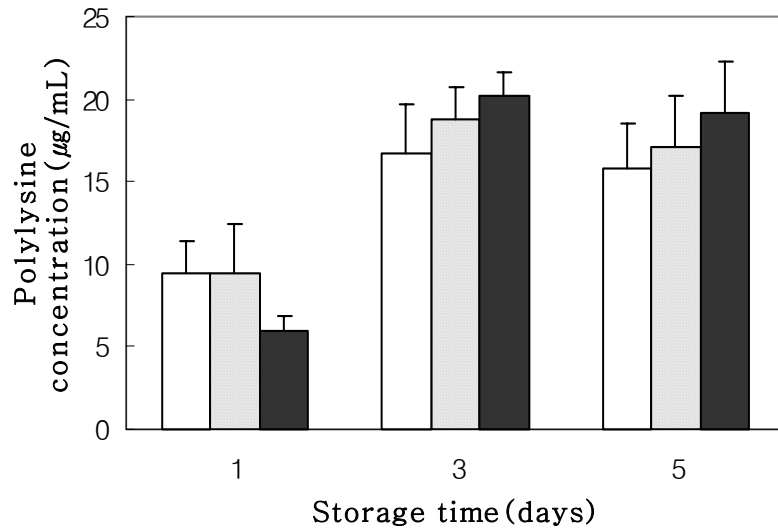


Fig. 154. Migration of polylysine from polylysine coated film during storage at different temperatures.

□ : 4 °C, □ : 10 °C, ■ : 25 °C.

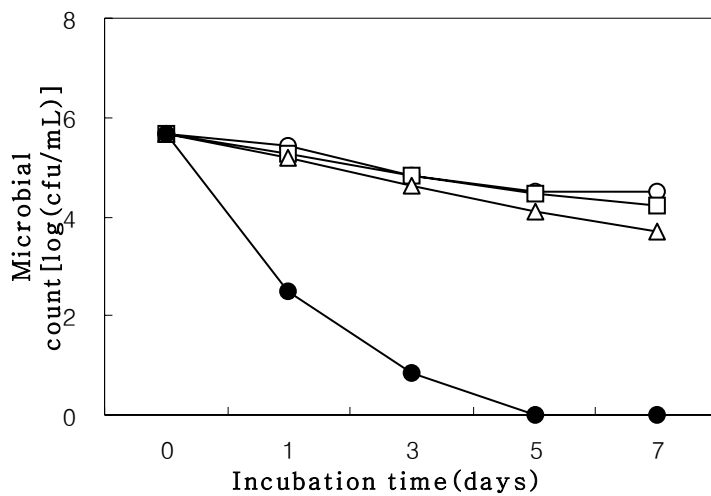


Fig. 155. The growth of *B. cereus* ATCC 21768 in additive-supplemented peptone waters which was contacted with polylysine coated film at 4 °C.
 -○- : Control film(Oriented polypropylene), -□- : Pediocin coated film,
 -△- : Nisin coated film, -●- : Polylysine coated film.

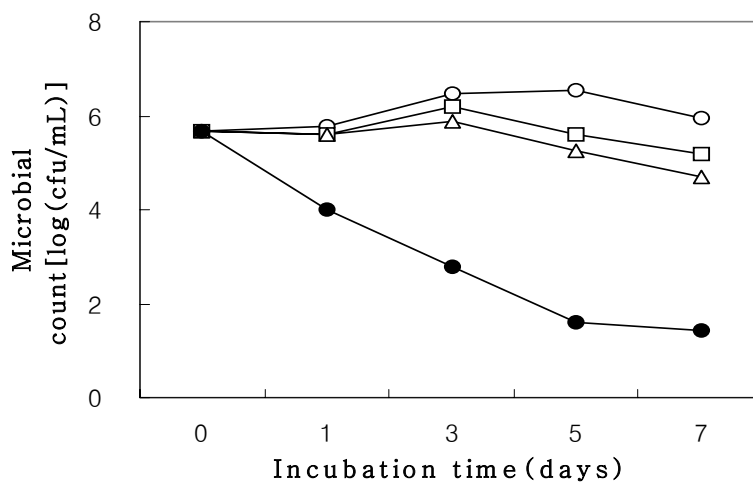


Fig. 156. The growth of *B. cereus* ATCC 21768 in additive-supplemented peptone waters which was contacted with polylysine coated film at 10 °C.
 -○- : Control film(Oriented polypropylene), -□- : Pediocin coated film,
 -△- : Nisin coated film, -●- : Polylysine coated film.

나) pH 변화에 따른 polylysine 용출 및 항균활성

제조된 polylysine 코팅 필름의 pH 변화에 따른 용출 및 항균활성을 측정하기 위해서 필름을 pH 3.0, 5.0 및 7.0으로 조절된 버퍼용액에서 측정하였으며, 항균활성 또한 제시된 pH에서 *B. cereus*를 초기 균수 6.8×10^5 농도로 접종한 멸균 펩톤수에 침지시켜 항균활성을 측정하였다(Fig. 157 ~ Fig. 159).

pH 변화에 따른 polylysine의 용출량은 전반적으로 pH 7.0 > pH 5.0 > pH 3.0 순으로 나타났으나, 지시균주에 대한 항균활성 측정 결과는 pH 3.0 > pH 7.0 > pH 5.0 순으로 나타났다. Fig. 137의 용출특성을 살펴보면 침지 3일차에 pH 7.0에서 약 17.8 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 용출이 용이 했으며, 낮은 pH에서는 어느정도 용출에 저해를 받는 것으로 나타났다. 특히 저장 초기에는 pH 3.0에서 3.17 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 큰 영향을 받는 것으로 나타났고, 이후 pH 3.0과 pH 5.0 처리구는 비슷하게 용출 되었다. 모든 처리구의 용출량에는 차이가 있지만 침지 3일차까지는 용출량이 증가하였고 이후 평형을 이루는 것을 볼 수 있었다. Kim 등에 따르면 nisin과 lacticin NK24를 이용한 코팅 필름을 1 및 5% 유기산 용액에 침지 시켰을 경우 유기산의 농도에 따른 항균제 용출 차이는 나지 않았으나 박테리오신의 종류에 따라서는 차이가 났으며 이는 박테리오신과 polyamide 결합제의 결합상태와 사용된 박테리오신의 분자량에 따라 용출특성에 차이가 있는 것으로 보고하였다. 한편, 항균활성에 있어서 Fig. 158를 보면 대조구와 비교해서 전반적으로 polylysine 코팅 필름은 pH 변화에 있어서도 항균활성이 안정적으로 나타나는 것을 볼 수 있었고 특히, 침지 초기에 pH 3.0 처리구에서 지시균의 생육을 완전히 억제할 정도로 항균활성이 가장 높은 것을 볼 수 있었다. 이는 침지 초기 용출특성과 비교해 볼 때 polylysine의 낮은 용출량에도 불구하고 높은 항균활성을 나타낸 것은 polylysine의 항균활성보다는 Fig. 159에서 보듯이 지시균주로 사용한 *B. cereus*가 pH 3.0에서 거의 생육이 억제되는 것으로 보아 pH에 의한 항균효과가 더 큰 것으로 사료된다. 이는 Daeschel이 유기산의 낮은 pH는 박테리오신이나 천연 항균제의 항균활성을 증대시킨다는 보고와 정은 pH 4.0 이하에서 대부분의 세균은 생육이 억제된다는 보고와 일치되는 것으로 낮은 pH는 polylysine의 항균활성에 도움이 되는 것으로 사료된다. 한편, 침지 3일차를 기준으로 pH 5.0과 pH 7.0 처리구는 pH 용출특성에 따라 대조구와 비교 시 2 log cycle 및 4 log cycle의 억제효과를 볼 수 있었으며, 침지 7일 까지 계속 유지 되었다.

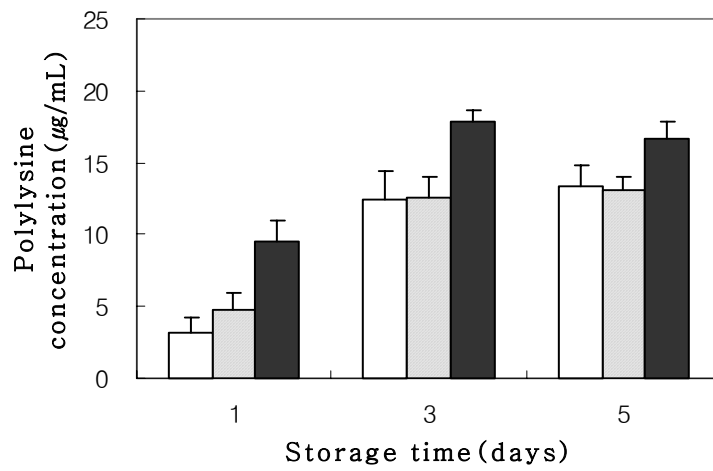


Fig. 157. Migration of polylysine from polylysine coated film during storage at different pH conditions.

□ : pH 3.0 + polylysine coating film, ▒ : pH 5.0 + polylysine coating film, ■ : pH 7.0 + polylysine coating film.

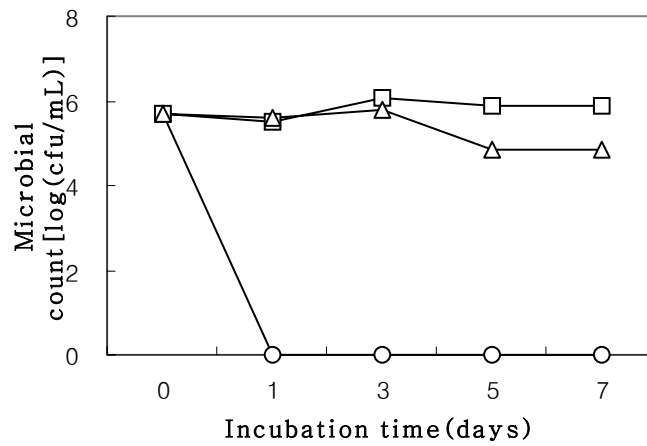


Fig. 158. The growth of *B. cereus* ATCC 21768 in different pH conditions during storage at 10 °C.

-○- : pH 3.0, -□- : pH 5.0, -△- : pH 7.0.

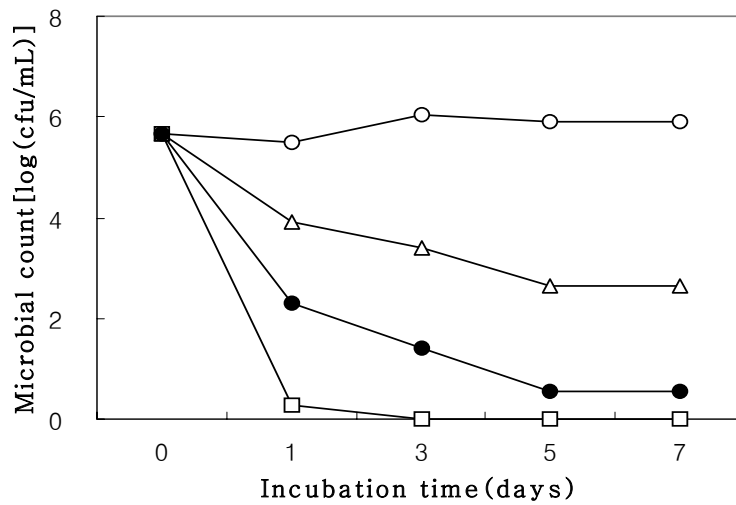


Fig. 159. The growth of *B. cereus* ATCC 21768 in different pH conditions additive-supplemented peptone waters which was contacted with polylysine coated film at 10 °C.

-○- : peptone water + OPP film, -□- : pH 3.0 + polylysine coating film, -△- : pH 5.0 + polylysine coating film, -●- : pH 7.0 + polylysine coating film.

다) 식염 농도에 따른 polylysine 용출 및 항균활성

제조된 polylysine 코팅 필름의 식염 농도 변화에 따른 용출특성 및 그 조건에서의 항균활성을 측정하기 위하여 필름을 1, 2, 3 및 5%의 식염농도 조건의 멸균수에서 측정하였으며, 항균활성 또한 제시된 식염 농도에서 *B. cereus*를 초기 균수 6.8×10^5 (CFU/mL) 농도로 접종한 멸균 펩톤수에 침지시켜 측정하였다(Fig. 160 및 Fig. 161).

각각의 식염농도는 polylysine 코팅 필름에서 polylysine의 용출에는 영향을 나타내지 않았으며(Data not shown), polylysine 코팅 필름을 식염과 함께 처리한 경우 식염의 농도가 높을수록 지시균에 대한 항균활성을 저해하는 것으로 나타났다. 식염의 농도에 따른 지시균주의 저해효과를 나타낸 Fig. 160에서 식염 3% 이상의 농도는 2 log cycle 정도의 저해효과를 볼 수 있었으며 이는 지시균이 식염농도에 의해 삼투압의 영향을 받은 것으로 사료되어 3% 이상의 식염농도에 polylysine 코팅 필름을 침지시켰을 경우(Fig. 161) 균수가 10^4 (CFU/mL) 이하로 나타나 식염 3% 처리시와 비

슷한 효과를 나타내었다.

2% 이하의 낮은 식염농도에서는 polylysine 코팅 필름의 침지 시 균수의 급격한 저하를 나타내었다. 특히 무처리구와 1% 식염농도 처리구의 경우 침지 1일 이후에는 *B. cereus*의 생육이 완전히 저해되는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 polylysine 이 양이온성 polymer로서 그 전하에 의해 항균효과를 가지는데 3% 이상의 식염농도에서는 음이온에 의해 일부가 ion-complex를 형성하여 그 전하가 소멸됨에 따라 항균효과가 저하되는 것을 예상할 수 있다. Jang 등은 식염 그 자체의 수분활성 저하작용으로 어느 정도 이상이 되면 미생물(*B. cereus*)의 작용은 저하되지만 ethanol이 첨가되면 보통 세균이 발육하는 농도의 식염에서도 발육을 저지할 수가 있다고 하여 본 실험과 상반된 결과를 나타내고 있으나 이는 필름이나 식품에 사용되는 항균제의 구조 및 특성 차이에 의한 것으로 사료된다.

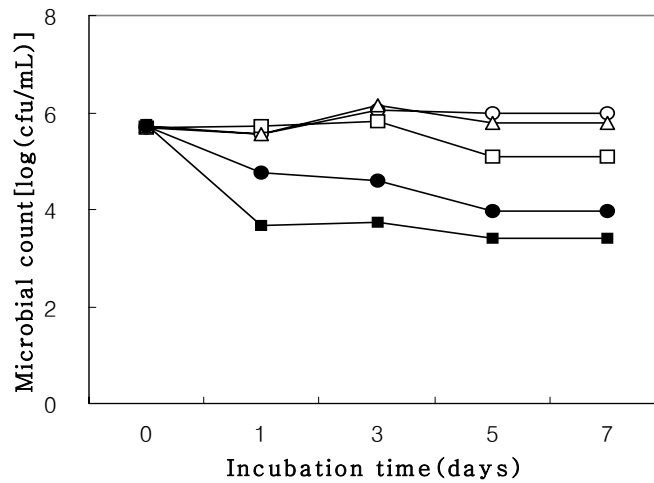


Fig. 160. The growth of *B. cereus* ATCC 21768 in different sodium chloride concentrations during storage at 10 °C.

-○- : Untreated, -□- : 1% NaCl, -△- : 2% NaCl, -●- : 3% NaCl,
-■- : 5% NaCl.

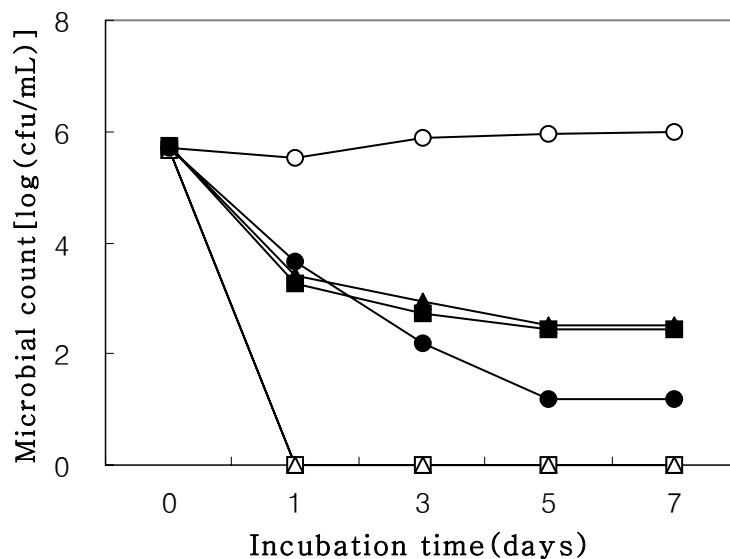


Fig. 161. The growth of *B. cereus* ATCC 21768 in different sodium chloride concentrations additive-supplemented peptone water which was contacted with polylysine coated film at 10 °C.

-○- : peptone water + OPP film, -□- : 0% NaCl + polylysine coating film, -△- : 1% NaCl + polylysine coating film, -●- : 2% NaCl + polylysine coating film, -■- : 3% NaCl + polylysine coating film, -▲- : 5% NaCl + polylysine coating film.

6) Polylysine 코팅 필름을 이용한 포장두부의 미생물 안정성

가) 총균수 및 대장균군

Polylysine 코팅 필름으로 포장한 두부의 저장 중 총균수 및 대장균군의 변화를 측정한 결과는 Fig. 162 및 Fig. 163와 같다.

총균수는 저장기간에 따라 지속적으로 증가하였으며 PCF(polylysine coating film)구가 OPP 및 NCF(nisin coating film)구보다 저장기간 중 낮은 총균수를 나타내었다 (Fig. 162). PCF구의 경우 저장 2일까지 미생물의 증식이 매우 효과적으로 지연되어, 저장 2일후 대조구가 3.2×10^4 CFU/g, NCF구가 1.3×10^4 CFU/g 이었으나 PCF구는 2.0×10^3 CFU/g으로 나타나 초기 균수와 비교할 때 균의 성장을 완전히 억제하는 것

으로 나타났다. 이는 필름으로부터 용출된 polylysine이 두부에 존재하는 미생물에 대해서 안정적으로 항균활성 가지는 것으로 사료된다. 또한, 두부의 초기부패를 $10^7 \sim 10^8$ CFU/g으로 볼 때, 저장 6일이 경과한 후 대조구의 경우 1.6×10^8 CFU/g이었으나, PCF구의 경우 7.9×10^6 CFU/g으로 나타나 대조구는 초기 부패에 도달한 반면 PCF구는 저장 8일후에야 초기부패에 도달하였다.

한편, 대장균군의 경우도 총균수와 비슷한 경향을 보여, PCF구가 두부의 미생물 제어에 가장 효과적인 것으로 나타났다(Fig. 163). 저장 2일이 경과한 후 대조구의 경우 6.9×10^3 CFU/g, NCF구는 1.5×10^3 CFU/g 이었으나 PCF구는 3.2×10^2 CFU/g으로 나타나 대조구와 1 log cycle 이상의 차이를 볼 수 있었고, 총균수와 마찬가지로 PCF 포장구는 초기 균수와 비교할 때 균의 성장을 완전히 억제하는 것으로 나타났다. 대장균은 저장기간 중 모든 처리구에서 발생하지 않았다.

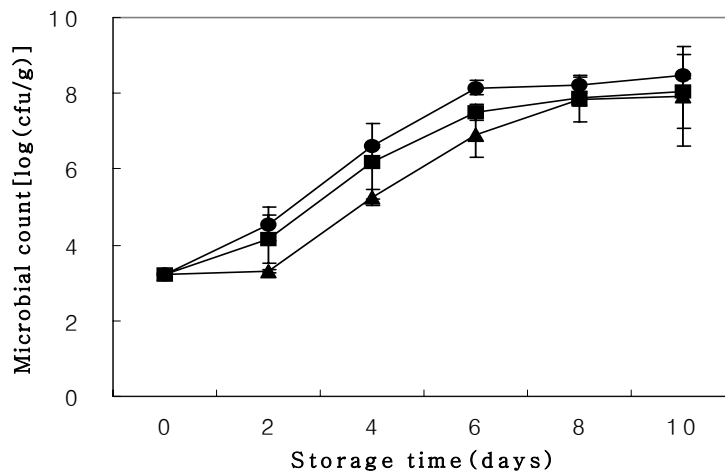


Fig. 162. Changes of total microbial counts in tofu packed with different antimicrobial coating films during storage at 10 °C.

—●— Control : packed with oriented polypropylene film, —■— NCF : packed with nisin coating film, —▲— PCF : packed with polylysine coating film.

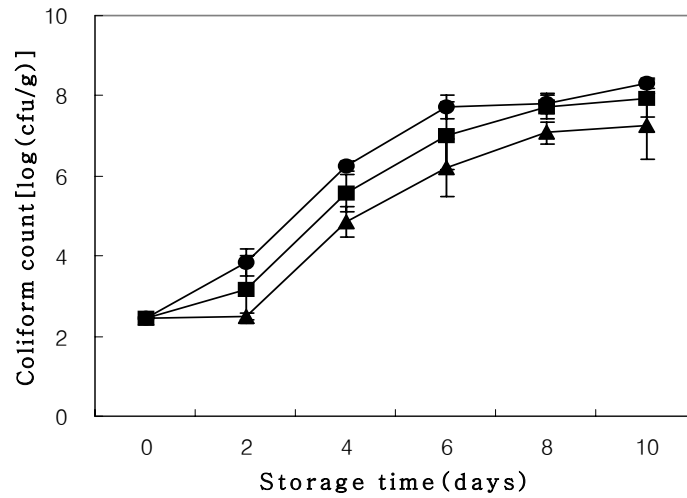


Fig. 163. Changes of coliform counts in tofu packed with different antimicrobial coating films during storage at 10 °C.

-●- Control : packed with oriented polypropylene film, -■- NCF : packed with nisin coating film, -▲- PCF : packed with polylysine coating film.

나) 색도 측정

Polylysine 코팅 필름으로 포장한 두부의 표면 색도에 대한 영향을 살펴보기 위하여 10 °C에서 10일 동안 저장하면서 표면색의 변화를 살펴본 결과는 Table 34와 같다.

저장기간 중 두부표면의 L값(Lightness), a값(Redness), b값(Yellowness) 및 ΔE값의 급격한 변화는 관찰되지 않았고 실험 기간내에 육안으로 저장 중 시료간의 차이를 나타내지 않았기 때문에 저장기간 중 필름으로부터 용출된 polylysine에 의한 표면색도의 변화는 없는 것으로 사료된다. 이러한 결과는 두부의 색깔에는 영향을 미치지 않고 항균활성이 인정되는 polylysine 코팅 필름을 이용한 두부의 포장에 유용한 것으로 사료된다.

다) 관능평가

관능검사원 10명이 시료의 맛, 색, 향 그리고 종합적 기호도에 대하여 5점 채점법으로 검사한 결과는 Fig. 164와 Table 35에 나타내었다.

관능검사는 먼저 저장기간 동안의 종합적인 기호도를 측정하였으며, 3점을 상품성

한계로 설정하였다. 저장기간에 따른 상품성 지수는 전반적으로 감소하는 경향을 나타내고 있으며, 대조구의 경우 저장 후부터 점차적으로 저하하여 저장 6일 후에는 상품성이 한계점인 3점 이하로 낮아 졌으며, PCF구의 경우 저장 4일 후까지 저장 초기와 유사한 관능 특성을 나타내었고 저장 8일까지 3점 이상을 유지하는 것으로 나타나 PCF구가 관능적으로 우수한 것으로 나타났다. 대조구가 상품성의 한계를 나타낸 6일째의 맛, 색, 향 및 종합적 기호도는 전반적으로 모든 항목에서 대조구보다 PCF구가 높은 점수를 받은 것으로 나타났다. 색 항목의 경우 전반적으로 높은 점수를 나타내었으며 시료간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 따라서 polylysine 코팅 필름은 포장두부의 관능적 품질에 영향을 미치지 않고, 유통기한 연장에도 효과가 있는 것으로 사료된다.

Table 34. Changes in color of tofu packed with different packaging film during storage at 10 °C

Storage time (days)	Film	Hunter values ¹⁾			
		L	a	b	ΔE
0	Control	88.15±0.27 ²⁾	-2.46±0.13	16.43±0.14	-
	NCF	88.14±0.27	-2.45±0.13	16.40±0.14	-
	PCF	88.16±0.27	-2.45±0.13	16.42±0.14	-
2	Control	88.45±0.43	-2.34±0.08	16.22±0.32	0.65±0.44
	NCF	88.52±0.30	-2.39±0.05	16.63±0.19	0.49±0.19
	PCF	88.43±0.23	-2.36±0.06	16.36±0.36	0.59±0.07
4	Control	88.13±0.23	-2.42±0.11	16.58±0.52	0.71±0.41
	NCF	88.16±0.38	-2.41±0.05	16.73±0.16	0.70±0.24
	PCF	88.48±0.20	-2.43±0.05	16.58±0.13	0.46±0.09
6	Control	87.79±0.37	-2.28±0.04	16.38±0.09	0.69±0.20
	NCF	88.29±0.87	-2.46±0.23	16.53±0.20	1.01±0.38
	PCF	88.17±0.13	-2.34±0.03	16.10±0.24	0.59±0.26
8	Control	88.23±0.27	-2.24±0.25	15.92±0.40	0.77±0.34
	NCF	88.25±1.35	-2.34±0.36	16.09±0.62	1.31±1.02
	PCF	87.83±0.22	-2.19±0.10	16.54±0.26	0.66±0.27
10	Control	87.95±0.38	-2.16±0.05	15.69±0.27	0.79±0.11
	NCF	87.42±0.24	-2.37±0.11	16.60±0.47	1.54±0.67
	PCF	88.22±0.44	-2.29±0.10	16.27±0.48	0.75±0.41

¹⁾ Hunter values : L ; Lightness, a ; Redness, b ; Yellowness.

²⁾ Values are mean±SD(n=8)

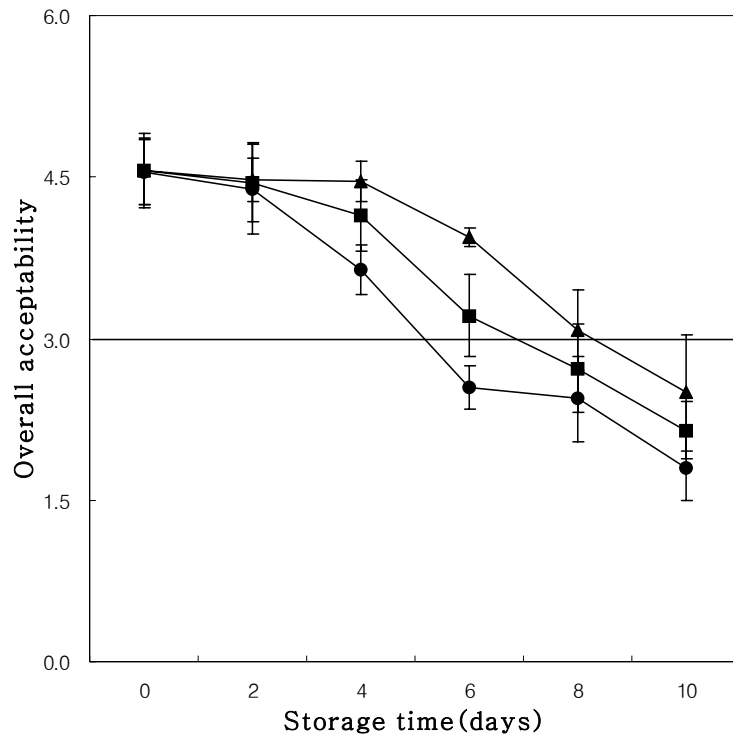


Fig. 164. Sensory property of overall acceptabilities in tofu packed with different antimicrobial coating films during storage at 10 °C.

-●- Control : packed with oriented polypropylene film, -■- NCF : packed with nisin coating film, -▲- PCF : packed with polylysine coating film.

Table 35. Sensory properties of tofu packed with different packaging film during storage at 10 °C

Film ¹⁾	Sensory properties ²⁾			
	Taste	Color	Flavor	Overall acceptability
Control	2.69±0.28 ^{a3)}	3.98±0.35 ^a	2.48±0.45 ^a	2.55±0.38 ^a
NCF	3.18±0.15 ^{b4)}	3.92±0.29 ^a	3.36±0.17 ^b	3.21±0.20 ^b
PCF	3.81±0.27 ^c	4.08±0.29 ^a	3.85±0.12 ^c	3.94±0.45 ^c

¹⁾ Control : OPP group, NCF : nisin coating film group, PCF : polylysine coating film group.

²⁾ Sensory score(5; very good, 4; good, 3; fair, 2; poor, 1; very poor).

³⁾ Values are mean±SD(n=10).

⁴⁾ Values with different superscripts within the same row are significantly different from the others at $p<0.05$ level by Duncan test.

3. 산업화를 위한 비가열 제품별 적정 가공표준의 설정

가. 최소가공 과채류의 가공표준

최근 들어 국민 생활 수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 날로 높아지고 있어 고품질의 신선 식품에 대한 수요가 늘고 있는 상태이다. 그 가운데에서 과일 및 채소류의 경우 농약을 사용하지 않고 유기농으로 재배한 식품의 선호도가 높아지고 있으나, 유기농의 경우 세정단계를 충분히 거치지 않았을 경우 분변에 의한 미생물 오염이 문제가 될 수 있다. 또한 여성의 사회진출로 인한 맞벌이 부부의 증가, 독신자의 증가에 따라 박피, 절단, 세척 등의 최소가공공정을 거친 편의식 채소나 과일의 간편성과 합리성에 대한 관심이 늘고 있다. 이러한 최소가공 과채류의 경우 신선한 상태의 고품질을 유지하여야만 소비자가 선택하기 때문에 가공 후 1~3일간은 눈으로 보기에 갈변 및 부패현상이 일어나서는 안된다. 또한 패스트푸드 및 패밀리 레스토랑의 급증으로 샐러드를 섭취하는 소비자가 급증하고 있어, 박피, 절단, 세척 및 세정이 모두 끝난 과채류의 소비는 더욱 더 늘어날 것으로 전망된다.

최소가공 과채류의 가공에 있어서는 다음의 공정별 관리와 위해요소(Table 36)의 관리가 요구된다.

1) 원료 반입

사용 원료의 품질은 최종제품에 지대한 영향을 미치는 바, 아래의 사항에 대한 관리·검사가 필수적이다.

- 원료 농산물의 급격한 온도 변화 여부
- 원료 농산물의 결함(멍, 흠집, 운송중의 냉해, 곤충피해 등) 발생률 및 발생여부
- 반입장구의 구획화(사방이 막혀있을 것 등), 조명관리, 온도관리(10℃ 수준)
- 기록
 - 원료수급 계획서와 명세서 비교
 - 결함내용
 - 반입날짜

2) 원료 저장

사용 원료의 저장은 교차오염(완제품과 분리 등), 상극원료 분리(사과와 양상추 등), 물리적 피해방지(수직하중 피해, 충격으로 인한 멍 등)과 선입선출의 개념이 필수적이

다.

- 원료의 특성에 따른 온도관리
- 기록: 저장 관리 대장 등

3) 예비세척 및 선별

- 차가운 세척수(필요시 염소수 사용)로 오염물(진흙, 먼지 등) 제거
- 부적절한 원료(부패된 원료 등) 제거

4) 박피 및 절단

- 원료 특성에 따른 박피(수작업이 가장 적절하나, 마찰식 박피기 등의 기계류 사용시에는 원료의 특성을 고려할 것)
- 박피에 따른 외피 제거(세척수 분사 방식 등)
- 원료 특성에 따른 절단
- 절단기구(칼, corer 등) 관리: 예리도, 위생상태

5) 선별 및 세척

- 생리학적 결점 조각 및 자투리 조각 등
- 선별 기계(색채 선별기, shaker screen sizer 등)의 관리 및 위생상태
- 차가운 세척수(일반적으로 0℃가 적절하며, 필요시 염소수 사용)로 세척
 - 절단 단면의 세포즙액 제거, 오물, 미생물 오염을 감안할 것
 - 세척액의 온도, 접촉시간, pH 및 염수함량 등
 - 침지식 세척시스템의 세척액 상태
 - 세척후 절단 원료의 표면온도
- 세척 기계(세척시스템의 이송 운반대, 침지식 세척시스템의 침지탱크, 분무식 세척시스템의 분무노즐 등)의 관리 및 위생상태
- 염소수 사용시: 염소함량 측정(BOD 검지기 등 염소측정용 기구)
 - ※ 염소는 기체 또는 액체 상태(sodium/calcium hypochlorite)로 주입되며, 현재 식품가공시에는 총 염소함량 200ppm까지 사용이 가능하나 일반적으로 50~100ppm이면 효과를 볼 수 있다. HOCL 형태의 염소는 중성 또는 약산성 pH에서 살균효과가 좋으나, pH 7.5를 훨씬 상회할 경우 염소성분이 비활성화되어 살균효력이 상실된다.

- ※ 염소성분은 일부의 갈변억제 기능이 있으나, 염소농도가 너무 높을 경우에는 제품손상, 유통기한 감소, 이미 및 이취의 우려가 있다.

6) 박피, 절단

- 박피, 절단 기계의 관리 및 위생상태
 - ※ 박피 및 절단기의 경우 조각, 자투리 및 잔류하는 원료에 의한 미생물 등의 오염에 주의하여야 한다.

7) Dipping solution의 제조

- 사용하는 첨가물의 배합비, 배합순서 및 사용기준의 관리에 주의하여야 한다.

8) 탈수 및 포장

- 탈수 기계(강제송풍기, 원심분리기 등)의 관리 및 위생상태
 - ※ 강제송풍기의 경우 제품의 표면물기 제거나 표면의 구석진 곳 혹은 틈의 탈수에 효과적이나, 미생물 등의 오염에 주의하여야 한다.
 - ※ 원심분리기의 경우에는 작업효율이 좋으나, 세포 및 조직손상 등에 주의하여야 하며, 원심분리 시간과 속도관리를 철저히 하여야 한다.
- 포장 기계(밀봉기, 금속탐지기 등)의 관리 및 위생상태
- 계량 기록
- 포장 및 포장상태
 - 포장상태
 - ※ 불완전 내포장의 경우 산소농도가 높아져 갈변을 유발할 수 있다.
 - 표시 사항 기록: 제조일, 로트번호, 생산코드 등

나. 약식의 가공표준

1) 원료 반입

사용 원료에 대한 아래 사항에 대한 관리·검사가 필수적이다.

- 원료 농산물의 급격한 온도 변화 여부
- 원료 농산물의 결함 발생률 및 발생여부
- 반입장구의 구획화(사방이 막혀있을 것 등), 조명관리, 온도관리(10℃ 수준)
- 기록

- 원료수급 계획서와 명세서 비교
- 결합내용
- 반입날짜

2) 원료 저장

사용 원료의 저장은 교차오염(완제품과 분리 등), 물리적 피해방지(수직하중 피해, 충격으로 인한 손상 등)과 선입선출의 개념이 필수적이다.

- 원료의 특성에 따른 온도관리
- 기록: 저장 관리 대장 등

3) 침지

- 침지액의 배합비 및 사용량
- 침지액의 온도 및 침지시간
- 이물 등의 검사 등

4) 자숙(전숙 및 후숙)

- 자숙시간 및 자숙온도 관리

5) 부재료 혼합

- 견과류 등 부재료의 배합비 관리

6) 부재료 혼합 및 배합

- 견과류, 참기름 등 부재료의 배합비 관리

7) 성형

- 성형 모양, 무게 등의 관리

8) 포장

- 포장 기계(밀봉기, 금속탐지기 등)의 관리 및 위생상태
- 계량 기록
- 포장 및 포장상태

- 포장상태
 - ※ 불완전 내포장의 경우 산소농도가 높아져 갈변을 유발할 수 있다.
- 표시 사항 기록: 제조일, 로트번호, 생산코드 등

Table 36. Identified hazard, preventive measures and determined CCPs in each step of the production of minimally processed vegetables

Process step	Hazard	Preventive measure	CCP
1 Chilling	pathogene growth	vacuum or cold water cooling, moisturing	CCP 1
2 Storage	growth contamination	temperature control, stock rotation cleaning and disinfection of storage room	CCP 2 CCP 3
3 Preparation	growth contamination	time/temperature control regular waste removal hygiene preparation area good personal hygiene and training	CCP 4 CCP 5
4 Cutting	contamination	cleaning in-place and disinfection	CCP 6
5 Washing	growth	temperature control of wash water chlorination of wash water, no reuse	CCP 7
6 Rinsing	growth	drinking water, no reuse	CCP 8
7 Centrifugation	contamination	cleaning in-place and disinfection control of centrifugation speed and time	CCP 9
8 Packaging	contamination	hygiene of packaging machine integrity test	CCP 10
9 Labelling			
10 Packaging			
11 Storage	growth	temperature control, stock rotation	CCP 11

제 4 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 결과

- 본 연구는 경제성장과 더불어 신선식품 등 비가열식품의 소비가 증가함에 따라 기존의 가혹한 조건에서의 살균이 어려운 식품군에 대한 천연항균제의 개발 필요성이 대두됨에 따라 Nisin으로 대표되는 미생물 유래의 천연 peptide인 *Pediococcus acidilactici* M이 생산하는 pediocin의 활용도 증진을 위해 대량생산을 위한 기반기술 및 적용기술을 개발하고자 하는데 일차적인 목적을 두었다.
- 대량생산 체계의 개발을 위해 고발현 vector의 개발은 pediocin의 gene의 PCR과 pGEX-4T-1과의 ligation을 통해 *E. coli* BL21(DE3)로의 transformation을 통해 GST-fused pediocin을 GST-bind resin으로 분리하여 활성을 가지는 GST 절단 pediocin을 분리하여 pediocin의 대량 생산을 위한 시스템을 개발하였다.
- Pediocin의 최적 대량생산 조건 확립은 *Pediococcus acidilactici* M 원균주의 native pediocin의 생산조건 최적화를 위해 정치배양, 진탕배양 및 stirred cell에서의 배양 등 배양방법별, 그리고 초기 pH와 peptone, typtone, yeast extract 등의 질소원 및 MgSO₄와 MnSO₄의 영향을 검토하여 whey를 기반으로 하는 YTG 배지의 조성을 확립하였다.
- 상업적으로 활용가능한 대량정제법의 개발을 위해 흡착-탈착법을 이용한 pediocin의 대량정제법과 Amerlite XAD 6 resin을 활용하는 방법과 xylene을 이용한 추출법을 검토하여 pH 2 extract후 dialysis 이전단계에 적용하는 정제법을 확립함으로써 전체적인 정제도를 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다.
- 비가열식품별 최적 pediocin 활성 농도의 결정 및 최적처리방법의 확립을 위해 분리한 pediocin의 비가열식품에의 적용성 검토를 위한 protease 등의 각종효소, 30~90℃, 및 121℃의 열처리, pH 3~9에서의 항균활성을 검토하여 적용성을 확인하였다. 한편, 최소가공 과채류, 저수분식품, 막걸리에 대한 적용성 검토를 위하여 *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. 등의 품질열화 미생물과 *Salmonella* sp., *E. coli.*, *Listeria monocytogens*등의 병원성 미생물에 대해 pediocin의 감수성을 검토하였다.

- Pediocin 및 nisin, polypeptide 계통의 polylysine의 단독처리에 의한 과채류 hurdle로서의 적용 가능성을 검토해 보고자 샐러드용 재료로 사용량이 많은 당근, 양배추, 사과, 상치 및 오이의 표면 미생물에 대한 생육 저해 효과를 검토한 결과, total microflora에 대해서는 전반적으로 pediocin은 당근, 오이 등에서 일정한 억제효과를 보였다.
- 아오리 사과를 대상으로 직접 dipping solution 처리를 실시하여 18℃에서 저장중 미생물학적 품질 변화를 관찰한 결과, pediocin 처리구는 저장 초기 처리구 간별로 1 log cycle 정도의 차를 나타내었으며 저장 3일에는 최대 3 log cycle의 차를 나타내었고 저장 6일까지 최소 2 log cycle 정도의 지속적인 차이를 나타내었다. 색도의 변화를 측정한 결과에서도 pediocin은 25~500ppm 처리구가 무처리구에 비해 높은 L값을 유지하였다. Polylysine 및 nisin도 4,000ppm 및 8,000ppm, 그리고 500ppm 이상에서만 무처리과와 뚜렷한 차이를 보였고 저장 6일까지 지속적인 생육억제 효과를 가지는 것으로 나타났으나 polylysine은 25ppm 이상 처리구 모두에서 무처리구에 비해 낮은 L값을 나타내어 polylysine 첨가가 색택을 저하시키는 요인으로 작용하는 것으로 나타났으며, 이러한 경향을 nisin에서도 유사하였다.
- 생식재료 및 떡류 등 저수분식품에 대한 적용성 검토를 위하여 pediocin과 nisin의 *Lactobacillus* spp., *Pseudomonas* spp. 등의 품질열화 미생물과 *Salmonella* sp., *E. coli* 등의 병원성 미생물을 선정하였으며, 선정 미생물에 대해 pediocin 및 nisin의 감수성을 검토하였으며 온도 및 pH에 따른 활성 변화를 검토하였다. 또한 약식을 대상식품으로 하여 복합 hurdle 처리를 검토한 결과, pediocin과 nisin 및 hinokitiol을 복합처리한 경우 저장중 2 log cycle의 미생물 생육억제와 색도, 관능적 특성 모두에서 우수한 결과를 얻을 수 있었다.
- Pediocin과 복합처리가 가능한 hurdle factor를 검토한 결과 40℃ PLMA, PLMA+AACC 및 40℃ PLMA+AACC 처리구에서는 10일차까지 세균의 생육을 전혀 보이지 않아 갈변 억제 및 과육의 연화 방지 측면에서도 AACC가 첨가된 처리구에서 뛰어난 효과를 확인할 수 있었다. 더불어 pediocin과 nisin 및 hinokitiol을 복합처리한 경우 저장중 미생물 생육억제 및 색도, 관능적 특성에서 우수한 결과를 얻을 수 있었다.
- *P. acidilactici*로부터 유래한 pediocin의 *Leuconostoc mesenteroides*에서 유래한 *ped M* gene의 발현을 위해 shuttle vector인 pUB9을 construction하였으며,

형질전환된 *E. coli* DH5α에서의 pediocin gene의 발현 패턴을 조사, pediocin gene의 발현이 확인된 transformant *E. coli*로부터 pUBP13 vector를 다량 분리하여 electroporation을 통해 *L. mesenteroides*로의 transformation을 통해 발현됨을 확인하였다.

- 김치의 위생적 품질 향상을 위해 신규로 탐색한 3,315 LAB로부터 상대적으로 활성이 높은 11개 균주를 최종 선정하였다. 이들 균주를 gram staining, catalase test, mobility test, API 50 CHL 동정 및 morphology 확인을 실시한 결과, 1종의 *Pediococcus* sp., 6종의 *Lactococcus* sp. 및 4종의 *Leconostoc* sp.로 추정되었으며 현재 정확한 균주 동정을 위해 16S RNA 부석을 진행하고 있다. 이들 11종 균주의 배양액을 분리하여 항균력을 시험한 결과, *Lactobacillus* sp.를 제외한 *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumonia*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium* 등의 위해성 미생물과 병원성 *Vibrio*에 대해서도 높은 활성을 나타내는 것으로 나타났다. 11종의 균주중 상대적으로 활성이 높은 *Lactococcus* sp. 2774, 2775 및 2777 균주를 *E. coli* KFRI 1242 등 3종의 *E. coli*, *Salmonella typhimurium* KFRI 00251 등 5종의 *Samonella* sp.를 대상으로 생육 저해능을 경시적으로 확인하였으며 막김치를 제조하여 *P. acidilactici* M, 2774, 2775 및 2777번 균주를 약 10⁶CFU/g의 균수로 스타터 첨가하여 함께 가한 *E. coli* KFRI 1242의 소장패턴을 관찰한 결과 *Lactococcus* sp. 계통으로 추정되는 2775를 스타터로 첨가한 김치, 2777을 스타터로 첨가한 김치에서는 발효 3일 후부터 급격한 대장균 소장이 일어남을 확인하였다.
- Polyamide 수지 용액과 미생물 유래의 천연 항균 peptide를 혼합하여 OPP(Oriented polypropylene) 플라스틱 필름층에 코팅하여 polypeptide 코팅 필름을 제조하고, 항균물질의 지속적인 용출 정도와 여러 종류의 지시균주에 대한 항균활성을 확인하였다.

제 2 절 활용에 대한 건의

- 고품질 비가열 식품의 효율적인 천연항균제의 활용과 hurdle technology 개발의 일환으로 포장후 유통중의 총균수 증식, 갈변화 및 조직 약화 등의 품질 저하 요인을 최소화시키기 위한 최적의 처리방법을 모색하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

- 본 연구과제를 통해 개발된 연구결과와 특허출원을 추진하고 있는 기술은 관련 산업체의 요구가 있을 경우 기술 이전을 통해 산업현장에서 활용할 수 있도록 할 계획이며 세미나, 학회발표 및 심포지움 등을 통해 천연항균제를 활용한 안전하고 위생적인 비가열 식품의 전처리 기술의 확립을 추진할 것이다.
- 특히 새로운 균주로 선발된 *Weissella* sp.를 활용한 김치의 산패에 대한 연구나 스타터 개발, hinokitiol을 hurdle factor로 활용한 약식 등 저수분식품에 대한 선도유지 활용기술은 관련 산업계에 실용화가 가능한 기술로 활용도 측면에서 산업체의 요구에 따라 실용화가 가능한 것으로 판단된다.
- 또한 본 연구의 결과는 국내산 주요 과채류의 신선 편의식품 생산시 공정관리 지침과 공정의 표준화 및 매뉴얼화로 소포장 센터의 자동화 공정을 유도하기 위한 기초자료로 활용 가능하다.

제 5 장 참고문헌

1. Exama A, Arul J, Lencki RW, Lee LZ, Toupin C. Suitability of plastic films for modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. *J. Food Sci.* 58: 1365-1370 (1993)
2. Jagannath A, Ramesh A, Ramesh MN, Chandrashekar A, Varadaraj MC. Predictive model for the behavior of *Listeria monocytogenes* Scott A in shrikand, prepared with a biopreservative, pediocin K7. *Food Microbiology* 18: 335-343 (2001)
3. Monsalve-González A, Barbosa-Cánovas GV, McEvily AJ, Iyvegar R. Inhibition of enzymatic browning in apple products by 4-hexylresorcinol. *Food Technol.* 49: 110-118 (1995)
4. Alexander IVR, Mansel WG, Gauri SM, Hilton CD. Combining nonthermal technologies to control food borne microorganisms, *International Journal of Food Microbiology* 89: 125-138 (2003)
5. Alzamora SM, Tapia MS, Argaiz A, Welti J. Application of combined methods technology in minimally processed fruits. *Food Res. Internat.* 26: 125-130(1993)
6. An DS, Hwang YI, Cho SH, Lee DS. Packaging of fresh curled *Lettuce* and *Cucumber* by using low density polyethylene films impregnated with antimicrobial agents. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 675-691 (1998)
7. Budde BB, Rasch M. A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. *International J. of Food Microbiol.* 63: 65-72 (2000)
8. Nurliza B, Kok J, Luchansky JB. Use of a genetically enhanced, pediocin-producing starter culture, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MM217, to control *Listeria monocytogenes* in Cheddar cheese. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64: 4842-4845 (1998)
9. Day BPF, Gorris LGM. Modified atmosphere packaging of fresh produce on the

- west-european market, ZFL-Int. Z. Lebensm.-Tech. Mark. Verpack. Anal. 44: 32-37 (1993)
10. Day BPF. Modified atmosphere packaging active packaging of fruits and vegetables. VTT Symposium Series 142, pp. 173-207. In: Minimal Processing of Foods. Ahvenainen R, Mattila-Sandholm T, Ohlsson T (eds). Technical Research Centre of Finland(VTT), Espoo, Finland (1994)
 11. Berry ED, Hutkins RW. The use of bacteriocin-producing *Pediococcus acidilactici* to control post processing *Listeria monocytogenes* contamination of frank fruters. J. Food Prot. 54: 681-686 (1991)
 12. Brackett RE. Growth and survival of *Y. enterocolitica* at acidic pH. International Journal of food Microbiology 3: 243-251 (1986)
 13. Huxsoll CC, Bolin HR. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. Food Technol. 43: 124-128 (1989)
 14. Carl T, Christophe L, Ehab K, Louis G, Ismail F. A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. International Journal of Food Microbiology 90: 283-293 (2004)
 15. Cha HS, Kim SI, Kim BS, Kim SH, Park SJ, Cho HS, Choi HY. Effect of inhibition on browning and microbial growth of minimally processed lettuce. Korean J. Food Preservation 11: 331-335 (2004)
 16. Chawla SP, Chander R. Microbiological safety of shelf-stable meat products prepared by employing hurdle technology. Food Control 15: 559-563 (2004)
 17. Cho SH, Joo IS, Seo IW, Kim ZW. Preservative effect of grapefruit seed extract on fish meat product. The Korean Society of Food Hygiene and Safety 6: 67-72 (1991)
 18. Cho SH, Lee HC, Seo IW, Kim ZU, Chang YS, Shin YS. Efficacy of grapefruit seed extract in the preservation of *Satsuma mandarin*. Korean J. Food Sci. Technol. 23: 614-618 (1991)
 19. Cho SH, Seo IW, Chio JD, Joo IS. Antimicrobial and antioxidant activity of grapefruit and seed extract on fishery products. J. Fish. Sci. Tech. 23:

289–296 (1990)

20. Choi OK, Noh YC, Hwang SY. Antimicrobial activity of grapefruit seed extracts and polylysine mixture against food-borne pathogens. *Korean J. Dietary Culture* 15: (2000)
21. Daba H, Lacroix C, Huang J, Simard RE, Lemieux L. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *pediococcus acidilactici* UL5. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 682–688 (1994)
22. Daeschel MA. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. pp. 63–91. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic press, Inc. San Diego, California, USA (1993)
23. Daniel MB, Stuart JE, WILEY-LISS. Protein methods. pp.60–62. Department of Biochemistry University of Geneva, Geneva, Switzerland (1991)
24. Dawson PL, Hirt DE, Rieck JR, Acton JC, Sotthibandhu A. Nisin release from films is affected by both protein type and film-forming method. *Food Research International.* 36: 959–968 (2003)
25. De Vuyst L. Microbiology, Genetics and Applications. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Vandamme EJ(ed). Blackie Academic & Professional, London, UK (1994)
26. Delves-Broughton J. Nisin and its uses as a preservative. *Food Technol.* 44: 100–117 (1990)
27. Donard VS. Marketing lightly processed fruits and vegetables. *Hortsci.* 30: 15–17 (1995)
28. Garret E. Challenges and opportunities in marketing fresh-cut produce. pp. 31–34. In: *Modified Atmosphere Food Packaging*. Brody AL (ed). Institute of Packaging Professionals, Herndon, VA, USA (1994)
29. Parente E, Ricciardi A. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 52: 628–638 (1999)
30. Elegado FB, Kim WJ, Kwon DY. Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus*

- acidilactici* M. International Journal of Food Microbiology 37: 1-11 (1997)
31. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K, Ishizaki A. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews 24: 85-106 (2000)
 32. Goulhen F, Meghrou J, Lacroix C. Production of a nisin Z/pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeate, J. of Appl. Microbiol. 86: 399-406 (1999)
 33. Willocx F, Hendrickx M, Tobback P. The influence of temperature and gas composition on the evolution of microbial and visual quality of minimally processed endive. pp. 475-492. In: Minimal Processing of Foods and Process Optimization. Singh RP, Oliveira FAR (eds). CRC Press (1994)
 34. Sapers GM, Miller RL. Heated ascorbic/citric acid solution as browning inhibitor for pre-peeled potatoes. J. Food Sci. 60: 762-766 (1995)
 35. Gorny JR, Hess-Pierce B, Cifuentes RA, Kader AA. Quality changes in fresh-cut pear slices as affected by controlled atmospheres and chemical preservatives. Postharv. Biol. Technol. 24: 271-278 (2002)
 36. Guerrero S, Alzamora SM, Gerschenson LN. Development of a shelf-stable banana puree by combined factors: microbial stability. J. Food Prot. 57: 902-907 (1994)
 37. Heimdal H, Kühn B, Poll BL, Melchior L. Biochemical changes and sensory quality of shredded and ma-packaged iceberg lettuce. J. Food Sci. 60: 1265-1268 (1995)
 38. Nel H, Bauer R, Vandamme EJ, Dicks LMT. Growth optimization of *Pediococcus damnosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. J. of Appl. Microbiol. 91: 1131-1138 (2001)
 39. Bolin HR, Huxsoll CC. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad-cut lettuce: J. Food Sci. 56: 60-67 (1991)
 40. Schoeman H, Vivier MA, Toit M, Dicks LMT, Pretorius IS. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin

- gene(pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*. 15: 647-656 (1999)
41. Harris LJ, Fleming HP, Klaenhammer TR. Developments in nisin research. *Food Research International* 25: 57-66 (1992)
 42. Haynie SL, Crum GA, Doele BA. Antimicrobial activities of amphiphilic peptides covalently bonded to a water-insoluble resin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39: 301-307 (1995)
 43. Heinz V, Alvarez I, Angersbach A, Knorr D. Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields-basic concepts for process design. *Trends in Food Science and Technology* 12: 103-111 (2002)
 44. Heo CY, Cho SH. Antimicrobial activity of polylysine produced by *Streptomyces* sp. *J. Agriculture & Life Sciences* 36: 47-52 (2002)
 45. Hill C, Cotter PD, Sleator RD, Gahan CGM. Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*; jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal* 12: 273-283 (2002)
 46. Howard LR, Yoo KS, Pike LM, Miller GH. Quality changes in diced onions stored in film packages. *J. Food Sci.* 59: 110-117 (1994)
 47. Hurst A. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* 27: 85-123 (1981)
 48. Huxoll CC, Bolin HR. Processing and distribution alternatives for minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* 43: 124-128 (1989)
 49. Nes IF, Holo H. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* 55: 50-61 (2000)
 50. Ihl M, Aravena L, Scheuermann E, Uquiche E, Vifani V. Effect of immersion solutions on shelf-life of minimally processed lettuce. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 36: 591-599 (2003)
 51. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International J. of Food Microbiol.* 71: 1-20 (2001)
 52. Martinez JM, Kok J, Sanders IW, Hernandez PE. Heterologous coproduction of

- enterocin A and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: detection by specific peptide-directed antibodies. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3543-3549 (2000)
53. Martinez JM, Martinez MI, Herranz C, Suarez AM, Cintas LM, Fernandez MF, Rodriguez JM, Hernandez PE. Use of genetic and immunological probes for pediocin PA-1 gene detection and quantification of bacteriocin production in *Pediococcus acidilactici* strains of meat origin. *Food and Agricultural Immunology* 12: 299-310 (2000)
 54. Jang JH, Jang JS, Lee SY, Kim HS, Kang SM, Park JH. Growth inhibition effects of ethanol and sodium chloride on *Bacillus cereus*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 998-1002 (2003)
 55. Jeong JW, Park KJ, Jeong SW. Effect of ethanol and polylysine addition on storage stability of *Kimchi*. *Korean Journal of Food Preservation* 10: 278-283 (2003)
 56. Miller KW, Schamber R, Chen Y, Ray B. Production of active chimeric pediocin AcH in *Escherichia coli* in the absence of processing and secretion genes from the *Pediococcus* pap operon, *Appl. and Environ. Microbiol.*, 64: 14-20 (1998)
 57. Kader AA. Biochemical and physical basis for effects of controlled and modified atmosphere on fruits and vegetables. *Food Technol.* 40: 99-107 (1986)
 58. Kim DJ, Kim SW. Barrier property and morphology of polypropylene/polyamide blend film. *Korean J. Chem. Eng.* 20: 776-782 (2003)
 59. Kim KT, Im JS, Kim SS. A study of the physical and sensory characteristics of ginseng curd prepared with various coagulants. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 965-969 (1996)
 60. Kim YB, Lee SK, Kim KH, Yoo IJ. Effect of the addition of lysozyme and sodium ultraphosphate on the shelf-life of press ham. *Korean Society of Animal Sciences and Technology* 33: 176-184 (1991)
 61. Kim YM, Lee DS. Migration of bacteriocin from bacteriocin-coated film and its

- antimicrobial activity. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 325-329 (2000)
62. King ADJ, Bolin HR. Physiological and microbiological storage stability of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technol.* 43: 132-135 (1989)
 64. Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39-86 (1993)
 65. Ku JY, Choi SJ, Kim SY, Noh BS. Inactivation of ascorbate oxidase by hurdle technology with heat, pH and ultrasound. *Food Sci. Biotechnol.* 9: 372-377 (2000)
 66. Axelsson L, Katla T, Bjornslett M, Eijsink VGH, Holck A. A system for heterologous expression of bacteriocins in *Lactobacillus sake*. *FEMS Microbiol. Letters* 168: 137-143 (1998)
 67. Johnsen L, Fimland G, Eijsink V, Meyer JN. Engineering increased stability in the antimicrobial peptide pediocin PA-1. *Applied and Environ. Microbiol.* 66: 4798-4802 (2000)
 68. Burlanek LL, Yousef AE. Solvent extraction of bacteriocins from liquid cultures. *Letters in Applied Microbiol.* 31: 193-197 (2000)
 69. Howard LR, Yoo KS, Pike LM, Miller GHJ. Quality changes in diced onions stored in film packages. *J. Food Sci.* 59: 110-112, 117 (1994)
 70. Lanciotti R, Gianotti A, Patrignani F, Belletti N, Guerzoni ME, Gardini F. Use of natural aroma compounds to improve shelf-life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Science & Technology* 15: 201-208 (2004)
 71. Lee DS, Hwang YI, Cho SH. Developing antimicrobial packaging film for curled lettuce and soybean sprouts. *Food Science and Biotechnology* 7: 117-121 (1998)
 72. Lee SK, Kim KH, Kim KS, Kim YB, Yoo IJ. Effect of lysozyme and sodium ultraphosphate on the shelf-life of vienna sausage. *Korean Society of Animal Sciences and Technology* 33: 78-84 (1991)
 73. Leistner L. Theory and applications to food. pp. 295. In: *Water Activity*. Rockland LB, Beuchat LR (eds). Marcel Dekker, New York, USA (1987)

74. Leistner L, Gorris LGM. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 41-46 (1993)
75. Choi MH, Park YH. Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin. *Lett. Appl. Environ. Microbiol.* 30: 173-177 (2000)
76. Hägg M, Häkkinen U, Kumpulainen J, Hurme E, Ahvenainen R. Effects of preparation procedures and packaging on nutrient retention in different vegetables. In: *Proceedings of the Sixth International Symposium of the European Concerted Action Program COST 94 Post-harvest Treatment of Fruit and Vegetables. Current Status and Future Prospects*, Commission of the European Community, Brussels, Belgium (1995)
77. Martinez-Magro MI, Martinez-Corbacho JM, Horn H, Dodd H, Rodriguez-Gomez JMT. I. Pediocin PA-1: a bacteriocin with biopreservative potential. II. Structure-function relationships, immunological properties. *Biosynthesis and Application in the Food Industry Alimentaria* 314: 85-93 (2000)
78. Manzano M, Citterio B, Maifreni M, Paganessi M, Comi G. Microbial and sensory quality of vegetables for soup packaged in different atmospheres. *J. Sci. Food Agric.* 67: 521-529 (1995)
79. Mattick AT, Hirsch A. Further observations on an inhibitory substance(nisin) from lactic *streptococci*. *Lancet.* 2: 5-7 (1947)
80. Ming X, Weber GH, Ayres JW, Sandine WE. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meat. *J. Food Sci.* 62: 413-415 (1997)
81. Moore ME, Han IY, Acton JC, Ogale AA, Barmore CR, Dawson PL. Effect of antioxidants in polyethylene film on fresh beef color. *Journal of Food Science* 68: 99-104 (2003)
82. Garg N, Churey JJ, Splittstoesser DF. Effect of processing conditions on the microflora of fresh-cut vegetables. *J. Food Protect.* 53: 701-703 (1990)
83. Horn N, Martinez MI, Martinez JM, Hernandez PE, Gasson MJ, Rodriguez JM,

- Dodd HM. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. Appl. and Environ. Microbiol. 65: 4443-4450 (1999)
84. Kalchayanand N, Sikes A, Dunne CP, Ray B. Interaction of hydrostatic pressure, time and temperature of pressurization and pediocin AcH on inactivation of foodborne bacteria. J. of Food Protect. 61: 425-431 (1998)
85. Nattress FM, Baker LP. Effects of treatment with lysozyme and nisin on the microflora and sensory properties of commercial pork. International Journal of Food Microbiology 85: 259-267 (2003)
86. Oh HR, Bae KH. The antibacterial activities of lysozyme isolated from the egg white of Ogol-fowl. J. Korean Soc. Food Nutr. 16: 4364-4370 (1987)
87. Coderre PE, Somkuti GA. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. Current Microbiol. 39: 295-301 (1999)
88. Padgett T, Han IY, Dawson PL. Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. J. Food Prot. 61: 1330-1335 (1998)
89. Park IK, Kim SU, Kim SD. Storage of soybean curd prepared with ozone treated soybean. Journal of the East Asian Society of Dietary Life 4: 51-56 (1994)
90. Park JC, You YB, Lee JH, Kim NJ. Anti-inflammatory and analgesic effects of the components from some edible plants. J. Korean Soc. Food Nutr. 23: 671-677 (1994)
91. Park JD, Hong SI, Park HW, Kim DM. Modified atmosphere packaging of Tsugaru apple (*Malus domestica* Borkh) for distribution. Korean J. Postharvest Sci. Technol. 6: 357-364 (1999)
92. Park JY, Hwang TY, Kim JH, Moon KD. Quality changes of minimally processed lotus root (*Nelumbo nucifera*) with browning inhibitors. Korean J. Food preservation, 8: 164-168 (2001)

93. Park SJ, Cho KS, Kim SH. Surface and adhesion characteristics of polyimide film treated by corona discharge. *Hwahak Konghak* 40: 613-617 (2002)
94. Park UP, Jang DG. *Kimchi* quality affected by the addition of grapefruit seed extract powder. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 10: 288-292 (2003)
95. Park WP, Cho SH, Lee DS. Screening of antibrowning agents for minimally processed vegetables. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 278-282 (1998)
96. Marchetti R, Casadei MA, Guerzoni ME. Microbial population dynamics in ready-to-use vegetable salads. *Ital. J. Food Sci.* 2: 97-108 (1992)
97. Rogers LA. The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Bacteriol.* 16: 321-325 (1982)
98. Ryu JM, Park YJ, Choi SY, Hwang TY, Oh DH, Moon KD. Browning inhibition and quality characteristics of minimally processed mushroom (*Agaricus bisporus* Sing) using extracts from natural materials during storage. *Korean J. Food preservation* 10: 11-15 (2003)
99. Guilbert S, Gontard N, Cuq B. Technology and applications of edible protective films. *Packag. Technol. Sci.* 8: 339-346 (1995)
100. Shima S, Matsuoka H, Iwamoto T, Sakai H. Antimicrobial action of epsilon-poly-L-lysine. *J. Antibiot.* 37: 1449-1455 (1984)
101. Siragusa GR, Cutter CN, Willett JL. Incorporation of bacteriocin in plastic retains activity and inhibits surface growth of bacteria on meat. *Food Microbiol.* 16: 229-235 (1999)
102. Stewart CM, Dunne CP, Sikes A, Hoover DG. Sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium sporogenes* PA3679 to combinations of high hydrostatic pressure and other processing parameters. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 1: 49-56 (2000)
103. Montville TJ, Chen Y. Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 50: 511-519 (1998)

104. Thomas O. Minimal processing preservation methods of the future, an overview. *Trends in Food Sci. & Tech.* 5: 341-344 (1994)
105. Tomas LF, Iniesta SE, Tomas BA, Trowitzsch KW, Wary V. Antifungal phloroglucinol derivatives and lipophilic flavonoids from *Helichrysum decumbens*. *Phytochemistry* 28: 1613-1618 (1989)
106. Ukuku DO. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella spp.* *International Journal of Food Microbiology* 95: 137-146 (2000)
107. Eijsink VGH, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB, Nes IF. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* 64: 3275-3281 (1998)
108. Varoquaux P, Wiley RC. Biological and biochemical changes in minimally processed refrigerated fruits and vegetables. Chapman & Hall, pp. 226-268 (1994)
109. Powrie WD, Skura BJ. Modified atmosphere packaging of fruits and vegetables. pp. 169-245. In: *Modified Atmosphere Packaging of Food*. Oraikul B, Stiles ME (eds). Ellis Horwood (1991)
110. Watada AE. Quality maintenance of fresh-cut fruits and vegetable. *Food and Biotechnology* 6: 229-233 (1997)
111. Wiley RC. Minimally processed refrigerated fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology* 6: 67 (1995)
112. Wuytack EY, Michiels CW. A study on the effects of high pressure and heat on *Bacillus subtilis* spores at low pH. *International Journal of Food Microbiology* 64: 333-341 (2001)
113. Yang BG, Lee JH, Kim SH, Jeon YJ. Antimicrobial effect of chitosan and chitooligosaccharides against bacterial diseases of cultured flounder. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 33: 236-234 (2004)
114. Zhang S, Farber JM. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiol.* 13: 311-321 (1996)

115. Lee YB, Kim TS, Yeo IH. Study on the change of quality index of packed Tofu. 12: 56-60 (1995)
116. 홍상필, 황재관. 키틴/키티산의 기능성과 올리고당의 생산기술, 식품과학과 산업 30: 44-52 (1997)

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.