

인체 모델 시스템을 이용한 식중독 제어  
김치 개발

Development of Kimchi Inhibiting Food-borne  
Pathogens Using an Upper Intestinal Model System

연구기관  
한국식품연구원

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “인체 모델 시스템을 이용한 식중독 제어 김치 개발” 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 5월 24일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 오세욱

세부연구책임자 : 차성관

세부연구책임자 : 이명기

연 구 원 : 안병학

연 구 원 : 김윤지

연 구 원 : 이종경

연 구 원 : 정다와

연 구 원 : 엄소연

# 요 약 문

## I. 제목

인체 모델 시스템을 이용한 식중독 제어 김치 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

인체의 생화학적 조건의 소화 모델 시스템을 이용하여 발효 김치가 식중독 균을 제어하는 특성이 있으며 이를 구성하는 요소를 규명하여 식중독 균을 효과적으로 제어하는 김치를 개발한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 김치 제조 방법 수립 및 식중독균 제어 능력 평가

- 발효 김치의 식중독균 제어 능력 평가
- 김치의 발효 상태 이화학적 분석

### 2. 발효 김치의 식중독균 제어 능력 인자 특성 연구

- 발효 온도에 따른 항미생물 효과
- 김치 재료에 따른 항미생물 효과
- 김치의 항미생물 효과 영향 인자 고찰
- 김치의 식중독 제어 인자 정량화
- 김치 발효 중 미생물 분석

### 3. 장환경 시스템의 제작 및 활용

- 장 환경 항온 발효 시스템 모델 제작
- 장 환경 조건 분석
- 장내 환경에 적합한 젖산균 확인 및 식품 적용
- 장내 조건에서 병원성 미생물 활성분석

### 4. 식중독균 억제 김치 제작 및 인체모델 시스템을 활용한 검증

- 김치의 병원성 미생물 제어의 최적 조건 설정
- 식중독 제어 김치 제작 및 일반 김치와 식중독 제어 김치의 효과 비교

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

살모넬라, 병원성 대장균 *E. coli* O157:H7, 비브리오균이 먹기 좋은 정도로 발효된 pH 4.3 정도의 김치를 만났을 때 4시간만에 99% (2 log cfu/ml) 이상이 사멸하였고 활발히 증식하고 있는 비브리오균은 김치에 닿은지 10분 이내에 사멸하였다.

김치의 부재료에서 병원성 미생물을 억제하는 재료를 찾고자 부재료를 각각 마쇄하여 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*에 반응시켰을 때 배추, 무, 마늘, 생강, 고추, 파를 적용한 결과 마늘에서 가장 강력한 항균활성이 모든 균에서 확인되었고 파는 *Bacillus cereus*와 *Staphylococcus aureus*에서 미미하게 확인되어 발효 전 김치에서 미생물을 억제하기 위해서 조절할 수 있는 부재료는 마늘과 파로 선정하였다.

제조된 김치를 0, 4, 10, 20℃에서 발효시켜 pH 4.3에 이르러 때까지 pH와 산도를 모니터링하여 pH 4.3에 이르렀을 때 높은 온도에서 발효된 20℃에서 발효된 김치에서 적정산도가 높고 0℃에서 발효된 김치로 낮은 온도에서 발효된 김치일수록 적정산도가 낮게 나타나 발효 온도가 김치의 산도에 영향을 주어 고온에서 발효를 시킬수록 산도가 높게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

0, 4, 10, 20℃에서 발효된 김치가 pH 4.3에 이르렀을 때 각각의 김치를 blender에 갈아 살균 거즈로 즙을 짜서  $10^8$  cells/ml의 *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*를 발효 김치에 접종한 후에 37℃에서 2시간 4시간 후에 억제정도를 확인하였다. *Salmolla typhimurium*을 억제하기 위해서는 고온인 20℃에서 발효시킨 김치가, *Listeria monocytogenes*를 억제하기 위해서는 저온인 0℃에서 발효시킨 김치가 효과적임을 보여주었다.

마늘과 파는 다른 부재료에 비해 식중독균을 제어하는 작용이 커서 마늘과 파의 부재료를 달리하여 김치를 제조한 후에 pH 4.3에 이르른 상태에서 김치가 *Salmonella typhimurium* 억제 효과를 비교하였다. 마늘과 파가 전혀 없는 경

우 뿐 아니라 마늘과 파가 보통의 김치보다 강화된 김치에서는 오히려 식중독균 제어 능력이 떨어지는 것을 확인하였다. 따라서 식중독균을 억제하는 김치를 제조하기 위해서는 발효를 촉진시키는 정도로서 마늘은 1-10% 이내, 파는 1-20% 이내 수준이 적합함을 확인하였다.

pH 4.3 정도의 적숙 발효 김치에서 식중독균을 억제하는 요소들을 살펴보았다. 이 실험에서 사용된 김치에서는 검출 수준에서 박테리옌 활성은 나타나지 않았다. 젖산균은  $10^{9-10}$  cells/g 정도 존재하였는데 이들 균을 제거하고 난 후와 비교하였을 때 *Salmonella typhimurium*과 *Listeria monocytogenes*는 젖산균을 제거하지 않은 김치에서 억제가 더 많이 되어서 젖산균의 존재 자체가 이들 균에 영양분 경쟁 및 대사 산물을 생성하여 식중독균에 스트레스를 주어 억제가 됨을 확인하였다. 한편 pH가 4.3인 PBS buffer 상태에서 *Salmonella typhimurium*과 *Listeria monocytogenes*는 4시간 배양해도 억제가 거의 되지 않는 반면에 *Vibrio parahaemolyticus*는 50분 이내에  $10^6$  cells/ml이 사멸하는 것을 확인하여 *Vibrio parahaemolyticus*는 pH가 낮아짐에 따라 민감함을 알 수 있었다.

한편 인체 장모델 시스템을 활용하여 김치를 섭취하였을 때 어떤 효과가 있는지 살펴보았다. 이상적인 인체 시스템인 위의 조건인 pH 2와 소장인 2, 4%의 bile salt가 주입되는 pH 6.5인 시스템을 활용하여 검증한 결과 pH 2인 조건에서 2시간이면 증식하고 있는 상태인 exponential phase의 *Salmonella typhimurium*  $10^{7-8}$  cells/g는 살아남지 못한다는 사실을 확인하였다. 그러나 식품이 같이 주입이 됨에 따라 pH가 낮아지는데 소요되는 시간이 많아지고 식품의 부피에 따른 균의 보호효과가 커져서 실제 인체의 시스템에 적용하는 경우에는 식중독 제어의 효과에 고려해야 할 부분들을 살펴보았으며 김치의 섬유소 성분의 효과는 추가적으로 김치의 식중독 예방 효과에서 살펴보아야 할 부분으로 판단되었다.

김치에서 분리한 균주중에서 pH 4 이하와 bile salt 1.5%에서 생육이 가능한 균주를 분리하고 이를 김치대비 균의 농도를 0.02-0.2% (v/w)로 접종 한 후에 pH 4.3까지 발효시켰다. *Listeria monocytogenes*를 이 스타터 접종 김치에 3

7°C에서 incubation 시킨 후에 기존의 김치와 비교하였을 때 기존의 김치에 적용된 *Listeria monocytogenes*가 인체 소화 장모델을 통과하여서도 소량 살아있었으나 균을 접종한 김치에서는 4시간 반응후에 살아남은 균이 없어 기존의 김치보다 식중독균 억제에 미미하지만 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 한편 이 스타터균 접종된 김치는 기존의 김치보다 관능 검사후에 전체적 기호도와 조직감에서 우수함을 확인하였다. 특히 0.02%를 접종한 경우보다 0.2%를 접종하고 최종 제품인 pH 4.3까지 발효시켰을 때 발효를 촉진하고 아삭아삭한 조직감이 기존 김치보다 유의적인 차이를 나타내면서 우수하게 나타났다.

*Salmonella typhimurium*을 억제하기 위해서는 유기산이 많아 산도가 낮은 김치가 억제하는데 효과적임을 확인하고 김치를 세척하고 유기산 강화를 위해 다양한 식초 (사과식초, 와인식초, 오미자초) 를 적용하여 관능에 영향을 주지 않거나 저해하지 않는 식초로서 사과식초를 적용할 수 있음을 확인하였으며 적정 농도를 확정하고 식중독 제어 효과를 확인하였다.

이 연구는 발효 김치의 식중독균 억제 효과를 여러 균주에 적용하여 확인하였으며 김치의 발효 조건 특히 일정 pH에서 산도를 조절하여 효과적으로 *Salmonella typhimurium*을 억제하고 발효 온도를 낮추어 *Listeria monocytogenes*를 억제하며 부재료 조성을 달리하여 발효시간 및 김치 환경에 영향을 주어 식중독균을 효과적으로 억제할 수 있음을 보여주었다. 아울러 스타터를 이용하여 김치를 제조하여 관능적으로도 우수하면서도 *Listeria monocytogenes*를 기존 김치보다 효과적으로 억제할 수 있는 방법이 있음을 확인하였다. 마지막으로 이미 발효가 완료된 김치에 대해서도 다양한 유기산을 첨가하여 더욱 식중독균 억제 효과를 나타내는 김치를 제조할 수 있음을 보여주었다.

본 연구를 통하여 김치의 재료 성분이나 발효 온도를 조절하여 식중독균을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다. 김치는 주식과 같이 먹는 식품으로서 식중독균이 번식하기 쉬운 고기, 생선 등과 함께 섭취하면 식중독 사고를 예방하는 효과가 있을 것으로 기대된다.

이 연구를 통하여 발효 김치 자체가 식중독균을 억제하는 효과가 크며 특히 비브리오균과 살모넬라균을 억제하는데 탁월하다는 사실을 입증하였다. 발효의 온도, 발효의 진행 상태, 김치 재료의 변화, 스타터 첨가, 유기산 첨가와 같은 방법을 통하여 더욱 효과적인 식중독 억제 효과를 얻을 수 있다는 점을 확인하였다. pH, 젖산균의 존재, 유기산과 같은 젖산균의 대사 향균 물질, 김치 재료의 향균 성분 및 발효 촉진 효과와 같은 부분이 발효 김치가 식중독균을 억제하도록 돕는 역할을 한다는 사실과 무엇보다도 식중독균을 억제하기 위해서는 발효를 최적화 시키는 일이 중요함을 보여주었다. 무엇보다도 식품은 사람이 평생 직접 섭취하는 것인 만큼 인체의 소화 시스템에서 식품의 분해 및 역할을 보여주는 일이 필요함을 인체 모델 시스템을 이용하면서 확인하였고 모델 시스템의 보강을 통하여 다양하고 세밀한 식품 적용 시나리오가 적용될 필요성이 대두되었다.

수행된 연구 결과는 한국 전통 발효 식품의 안전성 및 건강 기여를 위한 과학적 홍보 자료로 사용하며 다양한 음식에 같이 섭취하여 식중독균을 억제할 수 있도록 김치를 활용한 식품을 개발하며, 발효를 효과적으로 제어하여 소비 시점에 최적의 발효 상태를 유지할 수 있는 시스템 및 제품 개발에 이 연구가 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

# SUMMARY

## I. Title of Research

Development of kimchi inactivating food-borne pathogens using an upper intestinal digestion model system

## II. The Objectives

The objectives of research are to prove that fermented kimchi can inhibit the growth of various food-borne pathogens to characterize the component of fermented kimchi inactivating food-borne pathogens and to develop kimchi capable of controlling the pathogens effectively by using an upper intestinal digestion model system having the biochemical environment of human gut.

## III. Contents of Research

1. Kimchi manufacturing method and evaluation of kimchi fermentation process
  - Proving the effect of fermented kimchi on inactivating various food-borne pathogens
  - Physicochemical analysis of kimchi fermentation
2. Studying the factors of fermented kimchi inactivating food-borne pathogens
  - The effect of fermentation temperature of kimchi on inactivating food-borne pathogens
  - The effect of raw materials of kimchi on inactivating food-borne pathogens
  - Potential factors in kimchi inactivating food-borne pathogens
  - Quantification of the kimchi factors inactivating food-borne pathogens
3. Manufacturing and the use of human intestinal digestion model

- Manufacturing a human intestinal digestion model
  - Evaluation of the human intestinal digestion model
  - Selection of lactic acid bacteria in kimchi surviving the condition of human digestion track
  - The effect of human gut microorganism on food-borne pathogens
  - The effect of food-borne pathogens under the biochemical condition of human gut
4. Development of kimchi inactivating food-borne pathogens
- The optimized condition of kimchi on inhibiting food-borne pathogens
  - Comparison of developed kimchi inactivating food-borne pathogens and normal kimchi

#### **IV. Conclusion and Recommendation**

Four brands of cabbage kimchi on sale in Korea were tested in this study. This study found that kimchi had the highest pH and titratable acidity, resulted in the greatest inhibitory effect on *S. typhimurium* ATCC 14028. The pH of kimchi used in this study was between 4.4 and 5.0. Generally, the rate at which the kimchi inhibited *S. typhimurium* ATCC 14028 was higher than the rate at which it inhibited *S. aureus* ATCC 12600, *L. monocytogenes* ATCC 19111 and *E. coli* O157:H7 ATCC 43895. At least 6 log CFU/g of *V. parahaemolyticus* was inactivated in 10 min after incubation in fermented kimchi having less than pH 4.3.

After confirming that fermented kimchi can inactivate food-borne pathogens, the characteristics of the kimchi that affected its antimicrobial activity were investigated. The antimicrobial activity of kimchi was compared at different fermentation temperatures. The pH of the kimchi was measured during fermentation to monitor the fermentation process. kimchi fermentation took longer at low temperatures than at high temperatures, for example, kimchi fermentation at 0°C took up to 2 months while it took only 3 days to reach pH 4.3 when fermentation was conducted at 20°C. There was a long lag time before the pH began to decrease at 0°C and 4°C. Titratable acidity in

kimchi fermented at different temperatures was also measured to find out the relationship between fermentation temperature and titratable acidity. Interestingly, although the final pH of the kimchi (4.3) was the same regardless of fermentation temperature, the titratable acidity of the kimchi was dependent on fermentation temperature. kimchi fermented at high temperatures (20°C) showed higher titratable acidity than kimchi fermented at low temperatures (0°C). The titratable acidity was in the range of 0.55 - 0.77 between fermentation temperatures of 0 and 20°C at pH 4.3.

The total number of microorganisms in the kimchi was counted during the fermentation process. The cell numbers and growth response of total cells in kimchi was similar to that seen in the genus *Lactobacillus*. This shows that the dominant microflora in kimchi were members of the genus *Lactobacillus*. The cell numbers and growth response of *Leuconostoc* strains in kimchi was different from that of the lactobacilli. This reflects an effect of fermentation temperature since cell numbers of *Leuconostoc* strains started to decrease before pH reached 4.3 when fermentation was conducted at 4°C and 0°C, while *Leuconostoc* and *Lactobacillus* strains both increased during fermentation at 20°C. The cell numbers and growth response in *Streptococcus* strains were also different in kimchi fermented at different temperatures.

In this study, *S. typhimurium* ATCC 14028 was the most sensitive to kimchi of the pathogens tested and *S. aureus* ATCC 12600 was the most resistant to kimchi. More *S. typhimurium* ATCC 14028 cells were inactivated in kimchi fermented at high temperature (20°C) at pH 4.3 than at lower temperatures, while *L. monocytogenes* ATCC 19111 cells were inactivated more effectively in kimchi fermented at low temperature (0°C). However, the inactivation of *E. coli* O157:H7 ATCC 43895 and *S. aureus* ATCC 12600 was not affected by the kimchi fermentation temperature. This shows that fermentation temperature affects the antimicrobial activity of kimchi against *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*.

To monitor the activity of any bacteriocins that may be produced by LAB present in the Kimchi, a crude bacteriocin was extracted and applied to a lawn of *L. monocytogenes*. However, no bacteriocin activity was shown in the kimchi used in this study. As bacteriocins produced by LAB are mostly produced during nutrient depletion, the point at which the fermenting kimchi reached pH 4.3 may not have been the most suitable point at which to isolate bacteriocins. Alternatively, the activity of bacteriocins may have been present in the kimchi at a level that was too low to be detected.

Finally, the effect of the raw ingredients of kimchi on food-borne pathogens was investigated. Extracts of the raw ingredients were applied to a lawn of *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* and *E. coli* O157:H7. The raw ingredient with the greatest antimicrobial activity was garlic, followed by spring onion. However, most of the raw ingredients of kimchi did not show any antimicrobial activity against the food-borne pathogens. These ingredients could play a role in inactivating food-borne pathogens if there was a significant amount of them present in the kimchi at the beginning of fermentation. The amount of raw materials of kimchi is for increasing kimchi fermentation is suitable to produce kimchi inactivating food-borne pathogens in this study.

This study showed that pH 4.3 of kimchi is an important factor inactivating *V. parahaemolyticus* whileas that was not applied to *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*. Meanwhile, the being of LAB in Kimchi is also an important factor inactivating *S. typhimurium* and *L. monocytogenes*.

*Leuconostoc mesenteroides* was selected after screening microorganisms in fermented kimchi onto low pH 2 and 1.5% bile salt in this study. When this strain was added to kimchi (0.02-0.2% (v/w)), the kimchi fermented at pH 4.3 showed better texture hardness and overall acceptability. And also this kimchi could inactivate *L. monocytogenes* slightly better than untreated

kimchi.

To control food-borne pathogens, to increase the content of organic acid in kimchi, various vinegars were added and kimchi was soaked in. Some vinegar (apple and wine) was effective inactivating *Listeria monocytogenes*. Apple vinegar did not affect any negative effect of kimchi produced in sensory evaluation result.

This research showed that fermented kimchi can inactivate specially *V. parahaemolyticus* and *S. typhimurium*. By changing kimchi fermentation temperature, changing the raw material of kimchi, adding lactic acid bacteria starter, adding organic acids, more food-borne pathogens were inactivated in this study according to the fermentation stage. pH, lactic acid bacteria, the antimicrobial materials produced by lactic acid bacteria such as organic acids, and the raw materials of kimchi having effect of antimicrobials were the factors contributing to the inhibitory effect of kimchi on food-borne pathogens. Moreover, optimization of fermentation is really important to get kimchi which can inactivate various food-borne pathogens. In addition, it is necessary to show the process of digestion of food by using a model system such as the upper intestinal digestion system of human in this study. More various and specific food scenario needs to be applied further.

This reports showed that fermented kimchi can inactivate various food-borne pathogens, therefore, when fermented kimchi is consumed with meat or fish, food poisoning can prevented. And this study provides the methods which can apply to manufacturing kimchi, which can inactivate food-borne pathogens effectively. Finally, this study can be used for developing kimchi product and system maintaining the condition of optimized kimchi fermentation.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	15
Chapter 2. Materials and Methods .....	18
1. Kimchi manufacturing .....	18
2. Salt content measurement .....	18
3. pH .....	18
4. Titratable acidity .....	18
5. Quantification of lactic acid bacteria in kimchi .....	19
6. Culture of food-borne pathogens .....	19
7. Bacteriocin activity .....	20
8. Antimicrobial activity in raw material in kimchi .....	20
9. Gut bacteria culture .....	21
10. Identification of microorganism .....	21
11. Sensory evaluation and customer preference .....	21
Chapter 3. Results and Discussion .....	22
1. Inhibitory effect of fermented kimchi on sale .....	22
2. Physicochemical changes during kimchi fermentation .....	30
3. The effect of kimchi fermentation temperature on inactivation of food-borne pathogens .....	33
4. Studying of the factors in kimchi inactivating food-borne pathogens ..	38
1) pH .....	38
2) Lactic acid bacteria in kimchi .....	40
3) Fermentation temperature, the titratable acidity and organic acids ..	43
4) Bacteriocin activity .....	43
5) Etc .....	44
5. Effect of kimchi having different raw materials on inhibiting food-borne pathogens .....	45
1) Antimicrobial activity of kimchi raw materials .....	45
2) Contents of raw materials of kimchi .....	46

3) Fermentation at 20°C .....	47
4) Lactic acid bacteria .....	53
5) Fermentation at 0°C .....	54
6. Quantification of the factors of kimchi inhibiting food-borne pathogens	62
7. The bacteria in kimchi during fermentation .....	63
1) Total plate count number and the number of lactic acid bacteria in kimchi .....	63
2) Analysis of lactic acid bacteria .....	63
8. Gut microorganism and food-borne pathogens .....	66
9. Selection of lactic acid bacteria suitable for application in an upper intestinal model system .....	68
10. Upper intestinal model system .....	69
1) Factor selection for flow system design .....	69
2) Gut microorganism selection .....	70
3) Flow system manufacturing .....	70
4) Amount of nutrition and speed of input .....	72
5) Comparison of model system and the environment of gut .....	73
6) Kimchi and food application for setting up the model system .....	74
7) Survival of microorganism after the model system application .....	75
11. Optimised condition of kimchi inactivating food-borne pathogens .....	78
12. Manufacturing kimchi inactivating food-borne pathogens .....	80
1) Kimchi at different fermentation temperature .....	80
2) Kimchi having different raw materials .....	80
3) Starter kimchi .....	80
4) Organic acid added kimchi .....	84
13. Recommendation remark .....	86
Chapter 4. Achievements and Contributions .....	87
Chapter 5. Application plans of the results .....	88
Chapter 6. References .....	91

# 목 차

제 1 장 서 론 .....	15
제 2 장 재료 및 방법 .....	18
1. 김치의 제조 .....	18
2. 염함량 .....	18
3. pH .....	18
4. 적정산도 .....	18
5. 김치균 정량 .....	19
6. 식중독 균 배양 .....	19
7. 박테리오신 activity 측정 .....	20
8. 김치의 원,부재료에서 항미생물 성분 측정 .....	20
9. 소장에 존재하는 균 적용 .....	21
10. 미생물의 동정 .....	21
11. 관능검사 및 소비자 검사 .....	21
제 3장 결과 및 고찰 .....	22
제 1절 시판김치의 식중독 제어 효과 .....	22
제 2절 김치 발효과정의 이화학적 변화 .....	30
제 3절 발효 온도에 따른 김치의 식중독 제어 효과 .....	33
제 4절 식중독균을 억제하는 발효 김치의 인자에 관한 연구 .....	38
1. pH .....	38
2. 젖산균의 효과 .....	40
3. 김치 발효 온도 및 산도 유기산 .....	43
4. 박테리오신 함량 .....	43
5. 기타 .....	44
제 5절 김치의 부재료 효과 및 부재료 조성을 달리한 김치 특성 .....	45
1. 김치 부재료의 항균 효과 .....	45
2. 부재료를 달리하여 제조한 김치 조성 .....	46
3. 부재료를 달리한 김치가 20도 발효되었을 때의 효과 .....	47
4. 젖산균의 변화 .....	53
5. 부재료를 달리하여 제조한 김치를 0도 발효시켰을 때의 효과 .....	54

제 6절 식중독 억제 인자 중 pH-산도-젖산균의 정량화 .....	62
제 7절 발효 김치에 존재하는 미생물의 특성 .....	63
1. 김치 발효시의 총균수 및 젖산균 수 .....	63
2. 김치 균의 경시적 변화를 통한 균총 분석 및 미생물 동정 .....	63
제 8절 장내 미생물, 김치 미생물에 대한 병원성 미생물 활성 분석 .....	66
제 9절 인체 시스템에 적합한 젖산균 선별 .....	68
제 10절 인체 모델 시스템의 설계 .....	69
1. Flow system 설계를 위한 인체의 소화 장 환경 영향 인자 선택 .....	69
2. 장내 미생물 선정 .....	70
3. 장모델 flow system 설계 및 제작 .....	70
4. 영양분 배합조건설정 및 영양분의 양과 공급 속도 .....	72
5. 인체 모델 시스템과 장환경 비교 .....	73
6. 장모델 조건 설정을 위한 김치 및 식품 적용 .....	74
7. 장모델 식중독균 접종시 생육 .....	75
제 11절 김치의 병원성 미생물 제어의 최적 조건 설정 .....	78
제 12절 식중독 제어 김치 제조 .....	80
1. 발효 온도 조절 김치 제조 방법 .....	80
2. 부재료 조성 조절 김치 제조 방법 .....	80
3. 스타터 김치 제조 .....	80
4. 유기산 강화 김치 제조 .....	84
제 13절 제언 .....	86
제 4 장 목표 달성도 및 관련 분야의 기여도 .....	87
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획 .....	88
1. 연구 개발 결과의 활용 .....	88
가. 학술 논문 게재 및 발표 .....	88
1) 학술 논문 게재 .....	88
2) 학술 발표 .....	88
나. 산업재산권 .....	89
다. 홍보 .....	89
2. 연구개발 결과의 활용 계획 .....	90
제 6 장 참고문헌 .....	91

# 제 1 장 서 론

해마다 대량 식중독 사고가 빈번하여 2002년 한 해 동안에만 보고된 식중독 사건이 78건에 2,980명의 환자가 발생하였다. 주된 식중독 미생물은 대장균, 살모넬라, 리스테리아, 포도상 구균, 비브리오 등이며 비열 신선 식품에 대한 요구가 증가하면서 비가공된 식품 등에서 식중독 발생 가능성은 더욱 커져가고 있다. 대량 식중독 사고가 빈번하여 지난 98년부터 2000년까지 식중독 원인균(살모넬라, 비브리오, 황색포도상구균, 병원성대장균 등)에 대한 모니터링 자료를 바탕으로 미생물학적 위해성평가(MRA)기법을 적용해 추정된 식중독 환자수는 연간 1천185만명에 이르는 것으로 나타났다. 이는 우리나라 전체인구의 25.1%에 해당되는 숫자이나, 식중독 사고로 입원하는 환자는 연간 15만4천명으로 전체인구의 0.3% 정도다. 또 식중독으로 인한 의료비용과 일반생산성 손실비용, 조기사망에 따른 생산성 손실비용, 역학조사비용, 여가손실비용 등을 포함한 사회·경제적 손실비용은 1조3천107억원으로 추산된다. 이는 2000년 국민총생산(GNP)의 0.28%, 2002년 정부 예산의 1.16%에 해당되는 등 막대한 경제적, 건강 비용 손실을 초래하고 있다. 더불어 단체급식이나 대중식당 등에서 식중독 발생 가능성은 대규모 식중독 사태를 잠재하고 있다. 식중독 사고의 대형화와 더불어 봄과 여름에 주로 발생하던 것이 요즘은 연중 발생하는 양상으로 변하고 있어 소비자들의 우려는 점점 더 커지고 이를 예방하기 위한 연구가 요망되고 있다.

병원성 미생물을 제어 하는 분야로는 주로 의약품에서 항생물질 개발 등의 방법이 치료의 용도로 주로 사용되었다. 그러나 항생물질은 병원성 미생물의 저항성을 높이는 등 부작용을 낳아 항생물질의 남용을 가져왔고 항생물질에도 죽지 않는 신종 내성 세균의 출현이 줄이어 나타나는 등 항생제 오남용에 의한 피해 사례가 증가하고 있다. 따라서 효과적으로 병원성 미생물을 식품으로 제어하는 등의 건강 친화적인 방법이 요구되었다.

사람의 장내에서의 병원성 미생물의 활동이 식중독 발생의 결정요소라는 인식하에 식품 섭취를 통하여 장내 유용 세균으로 장내 미생물 조성을 바꾸는 probiotics therapy가 선진국에서는 시도되고 있다. Probiotics는 식품이나 보조제로서 섭취된 건강에 유익함을 제공하는 박테리아를 말하며 prebiotics는 숙주의 결장에서 제한된 숫자의 박테리아의 성장이나 활성 혹은 두가지 모두를 선별적으로 자극하여 유익함을 주는 소화되지 않는 식품 성분이다. 제공되는 식품에 따

라 장내 미생물의 분포는 달라지며 이런 probiotics나 prebiotics의 조합은 항생제 (antibiotics)를 대체할 수 있는 치료법이 될 수 있다. 그러나 이를 식품에 직접 적용한 예가 서양에서는 치즈나 요쿠르트 등 제한적이었고 한국에서는 전통 발효 식품에서 확인한 과학적인 데이터가 부족하였다. 국내에서도 요쿠르트에 균을 넣어서 장까지 도달하게 하거나 헬리코박터를 위에서 제어하는 연구가 시행되고 있다. 반면, 김치는 여러 균이 섞여있고 발효의 단계별로 우세한 균이 다르고 원, 부재료의 구성에 따라 항미생물 성분이 달라지기에 정확한 요인을 추정해 내기 어렵고 추정에 의거할 뿐 김치의 식중독 제어 효과를 과학적으로 입증할 필요가 있다.

식품의 세계화가 진행되고 각국의 고유한 식문화에 대한 세계인들의 관심이 증가함에 따라 한국의 대표 식품인 김치에 대한 관심이 날로 커져가고 있다. 김치는 한국 고유의 전통 발효 식품으로서 발효 진행시 여러 미생물이 공존하며 발효 단계에 따라 주 미생물이 바뀐다. 김치 발효의 주요 미생물인 젖산균은 통성 혐기성 균으로서 장내에서 생육하기 좋은 조건이며 낮은 pH에서도 생존율이 높아 소화 시 위를 지나 장에 이를 확률이 높기에 probiotics로서 그리고 식중독 유발 병원성균과 영양분 경쟁 그리고 주위 환경을 산성화 시키는 등 환경 적응에 우수하여 식중독을 예방할 가능성이 높다. 김치는 한국 고유의 전통 발효 식품으로서 관능적, 영양적, 기능적 우수성이 널리 알려져 있다. 국내 생산량이 연 240만 톤에 이르는 배추는 거대한 김치시장이 판로이다. 국내 김치시장만 1조원, 해외수출은 1,000만 달러 규모다. 또 최근 10년간 일본을 비롯해 미국의 김치시장이 2배로 늘었을 만큼 증가추세에 있다. 2002년 말 기준으로 대한민국에서 생산, 유통되는 김치의 생산량 합계는 155만t(톤), 4조 100억원의 규모로서 이 중 상품김치는 30% 수준이 47만t의 생산, 판매량을 보이고 있다. 여성의 지속적인 사회 참여 및 해외 마케팅을 통한 해외 수요의 증가, 단체 급식의 증가로 인해 김치 산업의 성장 전망은 높으며 국제 기준의 위생 설비 (ISO, HACCP), 보관의 편리, 저렴한 가격 등의 장점으로 인해 김치 시장에서 상품 김치의 규모는 확대 될 것이 기대되고 있다.

지금까지 연구는 젖산균에 관한 항미생물 성분 (pH, organic acidbacteriocins, CO<sub>2</sub>, hydrogen peroxide, ethanol, diacetyl, low redox potential, nutrient depletion, crowding 등)에 대해 이루어져왔다. 또한 마늘 등의 부재료의 알리신 성분과 고추의 캡사이신 성분이 알려져 있다. 실제로 김치에 대한 항미생

물 효과는 추정일뿐 과학적 규명은 미흡하였다. 게다가 김치는 원, 부재료의 성분과 발효 숙성 조건에 따라 상기 조건들이 달라지기에 이에 대한 연구가 필요하다. 일본의 기무치는 주로 발효에 의존하지 않고 절임 야채에 김치 소스를 첨가하여 먹는 형태로 제조에 하루밖에 안걸리는데 이러한 환경에서는 *E. coli* O157:H7 등이 오염되어 있는 야채를 이용할 경우에 식중독으로 의심되는 사례가 2001년 일본에서 보고 된 바 있어 발효 공법을 이용하여 안전을 담보할 수 있는 수준의 김치 발효 조건의 확립이 시급하며 김치의 식중독 예방 효과를 단순 추정이 아닌 과학적으로 입증해야 할 필요성이 있다.

날로 늘어나는 식중독의 위협으로부터 국민을 전통식품 자체로서 예방하고 전통식품의 식품 안전성에 대한 연구를 통해 우수성을 규명할 필요가 있다. 이를 위하여 김치의 식중독 예방 효과를 규명하고 인체 모델 시스템에 적용하여 건강 지향성 김치를 개발하고자 한다. 그리고 인체의 소화 시스템에서 다른 병원성 미생물에 대해 우위를 가지는 최적 미생물 활성을 나타내는 환경을 적용하여 김치를 개발하고 김치의 원, 부재료 성분에서 항 미생물 성분을 찾아내어 성분들을 보강하여 식중독 제어 김치를 개발하도록 한다.

## 제 2 장 재료 및 방법

### 1. 김치의 제조

김치는 한국식품연구원의 포기 김치의 절임 공정 개선 연구의 보고서에 있는 방법을 사용하여 제조하였다. 원료 배추의 품종은 추광으로 고랭이 배추로서 2-4 등분하여 절임수에 잠기도록 하였다. 이때 사용한 기본 절임수는 배추 1 kg 당 0.25 kg의 천일염과 물 1.25 kg을 혼합하여 무게 비율을 4 : 1 : 5로 하여 제조하였고 이때 수돗물의 온도는 한국식품연구원의 실험실 수돗물 온도 (18℃ 기준)에서 4 시간 절여 최종 김치의 염함량이 약 2.5%가 되도록 하였다. 절임후 세척 및 탈수된 절임 배추에서 추대를 포함한 고갱이 부분을 제거한 후 김치 제조에 사용하였다. 김치 제조시 부재료는 절임배추 100 g 당 파 3.1 g, 고춧가루 2.3 g, 마늘 1.5 g, 생강 0.4 g에 최종 염농도가 김치에서 2.8%가 되도록 제재염을 추가하여 버무려 제조하였다. 염농도는 무어의 방법을 이용하였다. 제조된 김치는 100 g 단위로 Turbovac 진공 포장기로 2분의 진공시간을 주어 진공 포장하여 발효를 진행시켰다.

### 2. 염함량

김치 시료를 blender로 갈아 반죽 상태의 시료 1 g을 취해 100배 희석하여 여과한 (Toyo No. 1) 여과액 10 ml를 취한 후 2% potassium chromate 1 ml를 넣어 0.02 N AgNO<sub>3</sub>로 적정하여 아래의 식을 이용하여 계산하였으며 이때 단위는 % (w/v)로 나타내었다. blank로는 증류수를 이용하여 용액이 색깔이 변하는 시점을 잡아 색깔을 비교하여 적정 시점을 정하였다.

염분 함량 (%) = (시료에 적정된 AgNO<sub>3</sub>양 - blank에 소요된 AgNO<sub>3</sub>양) × 1.17

### 3. pH

김치를 blender로 갈아 3점의 거즈로 걸러 즙을 짜낸 후, 즙 20 ml를 취해 pH meter (Corning incorporated, USA)로 측정하였다.

### 4. 적정산도

김치를 blender로 갈아 3점의 거즈로 걸러 즙을 짜낸 후 0.1 N NaOH 용

액으로 pH가 8.3 이 될 때까지 적정하여 소비된 0.1 N NaOH 용액의 양을 산출하여 적정 산도는 젖산의 %로 아래의 식으로 계산하였다.

$$\text{Acidity (\%)} = (0.009008 \times F \times V / S) \times 100$$

F: 0.1 N NaOH 의 역가

V: The volume of consumed 0.1 N NaOH

S: The weight of sample

## 5. 김치균 정량

*Leuconostoc* spp.는 phenyl ethyl alcohol sucrose agar medium (PES)(5 g tryptone(Difco), 0.5 g yeast extract (Difco), 20 g sucrose, 2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 15 g agar, 2.5 ml phenylethyl alcohol in 1 l distilled water)을 이용하여 혐기 jar (Oxoid)를 이용하여 호기성균을 억제하고 30°C에서 3일간 배양하였다. *Streptococcus* and *Pediococcus*는 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC)를 첨가한 KF streptococcus agar (Difco)를 이용하여 37°C 4일간 배양하여 붉은 colonies는 *Streptococcus*로 흰 colonies는 *Pediococcus*로 세었다. *Lactobacillus* 선별을 위해서 *Lactobacilli* MRS agar에 acetic acid를 섞어(74.5 g Rogosa agar (Difco), 0.3 ml acetic acid, 15 g sodium acetate in 1 L distilled water)서 30°C에서 3일간 배양하였다. 총균수는 plate count agar (PCA)에 30°C에서 3일간 배양하였다. 식품공전에서 요구하는 방법인 BCP agar에 37°C에서 2일간 배양한후 노란색 colony를 세었다.

## 6. 식중독 균 배양

Gram-negative 식중독 균으로 *E. coli* O157:H7 ATCC 43896, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 (KFRI 00251)를 선정하고 Gram-positive 식중독 균으로 *B. cereus* ATCC 11778 (KFRI 00430), *Staphylococcus aureus* ATCC 12600 (KFRI 00240), *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 (KFRI 00799)를 선정하였다. Stock culture로서 *B. cereus*는 30°C에서 nutrient broth에, *E. coli* O157:H7는 37°C에서 trypticase soy agar에, *Listeria monocytogenes*는 37°C에서 Brain heart infusion broth에서, *Vibrio parahaemolyticus*는 37°C에서 3% NaCl을 첨가한 nutrient broth에서,

*Salmonella typhimurium*과 *Staphylococcus aureus*는 37°C에서 nutrient broth에서 배양하여 middle of exponential phase의 상태에서 glycerol을 첨가하여 -80°C에서 얼려 보관하였다.

*E. coli* O157:H7을 선별하기 위해 MacConkey solbitol agar (MSA) (Difco)에서 붉은 색깔의 점액 colony를, *Salmonella typhimurium*에는 SS agar (Difco)를 사용하여 무색이나 pink 혹은 붉은 색의 균을, *Vibrio parahaemolyticus*는 TCBS agar (Difco)를 사용하여 37°C에서 1일 배양한 후 녹색의 균수를 세었다. *Staphylococcus aureus*에는 Baird-Parker Agar (BPA) (Merck)를 사용하여 회색-검정색으로 광택이 있는 불록한 흰색의 투명존을 가진 colony를, *Listeria monocytogenes*에는 Oxford agar (Merck)를 사용하여 colony 주위에 검은색 침전물이 있는 colony를, *Bacillus cereus*에는 Mannitol egg yolk polymyxin agar (MYP) (Oxoid)를 이용하여 37°C에서 2일간 배양한 후 egg yolk 침전물에 의해 둘러싸인 자줏빛 분홍색 배경을 가지고 있으며 거칠고 건조한 균을 세었다.

## 7. 박테리오신 activity 측정

김치액을 2분간 Waring blender에 갈아 3겹의 거즈로 거른다. 30 ml의 액을 분간 끓인후에 12,000 g에서 30분간 원심분리한다. 상등액을 pH 7로 적정한 다음 Whatman No. 1 filter로 거른다. 걸러진 용액은 ammonium sulfate를 첨가하여 최종 농도가 75% (w/v)에 이르렀을때까지 침전시킨다. 액체는 제거하고 침전물은 희석하여 미생물의 억제정도를 disc법을 이용하여 *Listeria monocytogenes* lawn에 적용하여 억제환 크기를 측정하였다.

## 8. 김치의 원,부재료에서 항미생물 성분 측정

김치의 재료인 배추, 무, 파, 마늘, 생강, 고춧가루를 씻어 껍질을 벗기고 Waring blender(Model 31BL9, Waring Commercial®, New Hartford, USA)에 90초가 갈아서 3겹 살균 거즈에 filtering하였다. 걸러진 용액을 10분간 1,000 xg에서 원심분리한 후에 0.45 0.45  $\mu$ m membrane filter에 걸렸다. 각각의 영양배지에  $10^7$  cells/ml 100  $\mu$ l의 lawn을 깔은 후 30분 후에 20  $\mu$ l의 각각의 추출액을 loading하였다. 24시간 37°C에서 배양후에 저해 zone의 직경을 자로 잰다.

## 9. 소장에 존재하는 균 적용

김치미생물로 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus plantarum*을 배양하고 장내 미생물로 *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus facium* 그리고 *Lactobacillus acidophilus*를 배양한 후 원심분리하여 배양 상등액을 버리고 각각  $10^9$  CFU/ml로 맞춘 후 1:1로 *S. typhimurium*과 *L. monocytogenes*에 반응시켜 각각의 균수의 변화를 측정하였다.

## 10. 미생물의 동정

pH 4.3로 발효된 김치를 PES와 MRS agar에 키운 후 50개의 colony를 선정하여 purification을 한 후 colonies를 oxidase, catalase, Gram staining을 이용하여 일차적으로 동정한 후 API CHL kit를 이용하여 최종 동정하였다.

## 11. 관능검사 및 소비자 검사

관능검사는 잘 훈련된 패널 15인에게 김치 고유의 냄새, 상큼한 냄새, 풋내, 이취, 상큼한 맛, 신맛, 군내, 짠맛, 쓴맛, 매운맛, 단맛, 감칠맛, 이미, 조직감, 전체적 기호도에 대해서 9점 척도를 이용하여 평가하였다. 통계 분석은 SAS (version 6.2)를 이용하여 유의적인 차이를 표시하였고 ANOVA 분석을 사용하였다. 소비자 검사는 같은 항목으로 30인으로 패널을 확대하여 발효 단계별로 나눠 초기와 발효 진행 상태에 따라 간격을 두어 실시하였고 통계 분석은 같은 방법을 이용하였다.

## 제 3장 결과 및 고찰

### 제 1 절 시판김치의 식중독 제어 효과

시판 김치를 통해 일반 김치가 식중독균을 억제하는 능력을 평가하였다. 우선 선택배지의 선택성을 알아보기 위해서 김치로부터 각 배지에 plating을 한 후에 증식여부를 확인하였다. 또한 선택배지의 선택 미생물의 증식에 영향을 주는 지 알아보려고 선택배지와 일반 총균수 배지에서 각각 키워본 결과 사용한 표준 균주들은 선택배지에서도 잘 자랐음을 확인할 수 있었다. SS, MacConkey sorbitol agar, TCBS agar에서는 전혀 미생물이 검출되지 않았고 Baird-Parker agar, Oxford-Listeria selective agar에서는 10 cfu/ml 미만으로 나왔다. 접종한 미생물의 균수의 수준이  $10^9$  cfu/ml 에 비하면 그 수는 아주 미약하여 균수별 김치에 의한 사멸의 효과에 영향을 주지는 않을 것으로 사료되었다.

할인 마트에서 냉장 보관되어 있는 시판 김치 4가지를 구입하여 pH, 산도, 식중독 균 억제 효과를 살펴보았다. 네가지 김치의 pH값은 4-5 사이였다(표 1) pH와 김치에 생성된 유기산의 양과의 관계를 알아보기 위해 산도를 측정하였다(표 2). 0.7에서 1.0까지 다양하였으며 C 김치가 4가지 김치 중에 pH는 가장 낮고 산도는 가장 높았다.

표 1 시판 김치의 pH

	A	B	C	D
pH	4.45 ± 0.03	4.70 ± 0.13	4.40 ± 0.02	4.93 ± 0.08

표 2. 시판 김치의 적정산도

	A	B	C	D(갓김치)
산도	0.99 ± 0.06	0.77 ± 0.13	1.10 ± 0.10	0.95 ± 0.32

pH의 순서는 C<A<B<D, 적정 산도의 순서는 C>A>D>B 순서로 나타나서 대체적으로 pH가 낮은 김치에서 적정산도가 높게 나타났다. 이들 김치를 마쇄하고 걸러서 식중독균을 배양한 액체에 적용하여 식중독균의 억제능력이 얼마나 되는지를 파악하고 pH와 산도가 이에 관계가 있는지 살펴보았다. 식중독균을 억제하는 능력은 대체적으로 C>A>B>D로 나타났다으며 이를 통하여 pH가 낮을수록 식중독균을 억제하는 능력이 크게 나타난 것을 알 수 있었다. 일반적으로 발효가 더 많이 진행된 김치일수록 식중독균이 생육하기 어려움을 확인할 수 있었다. 균별로 살펴보면 *Salmonella typhimurium*의 경우에는 김치 C>A>B>D의 순서로 저해의 정도가 크게 나타났다. 증식하고 있는 상태의 exponential phase 상태인 *S. typhimurium*은 상대적으로 다른 균에 비하여 억제되는 정도가 크게 나타났다.

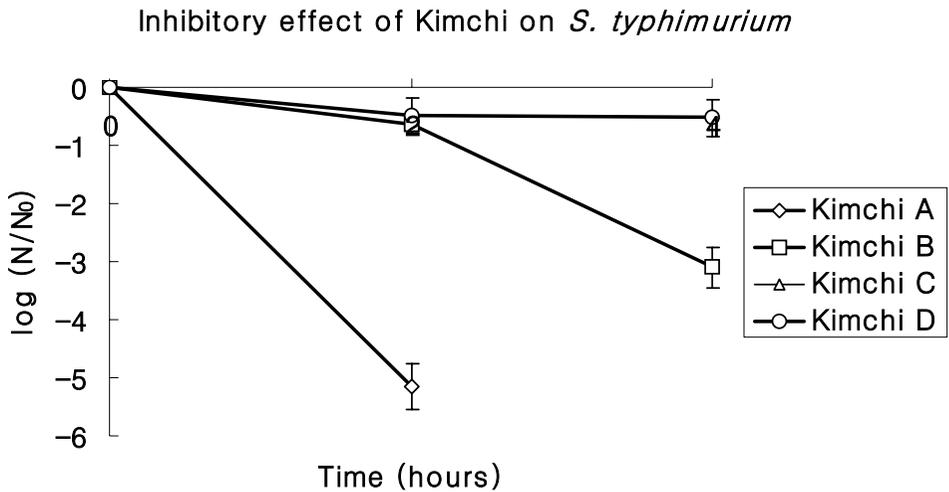


그림 1. 시판 김치의 *Salmonella typhimurium*의 저해 효과

*Staphylococcus aureus*의 경우에는 C>A>B=D의 순서로 김치에서 저해되는 정도가 나타났다.

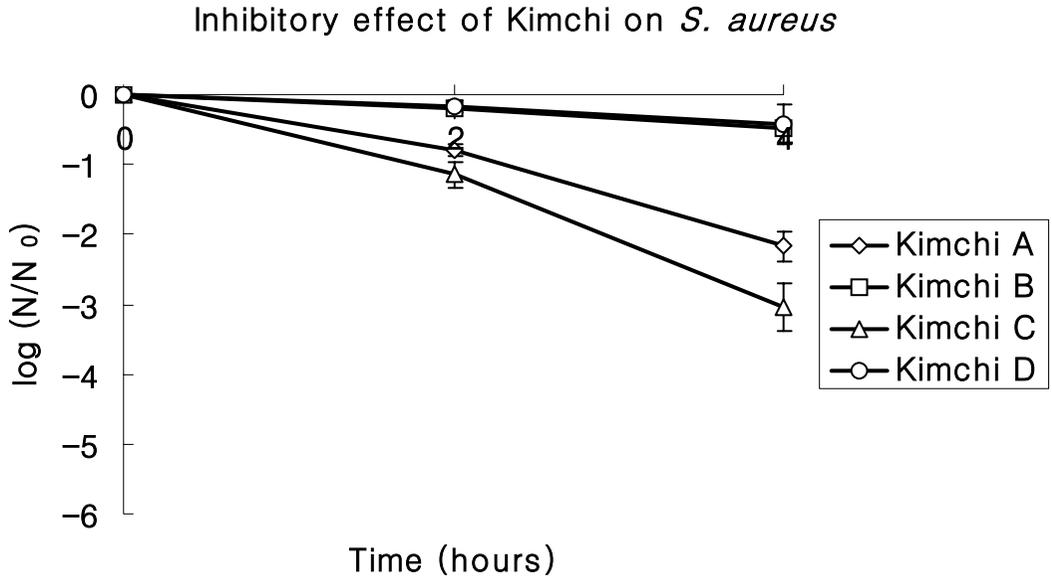


그림 2. 시판 김치의 *Staphylococcus aureus* 저해 효과

*E. coli* O157:H7의 경우에는 김치 C>B>A>D의 순서로 저해를 크게 시켰다. 그러나 저해되는 정도는 1 log CFU/g 수준으로 아주 미미하였다.

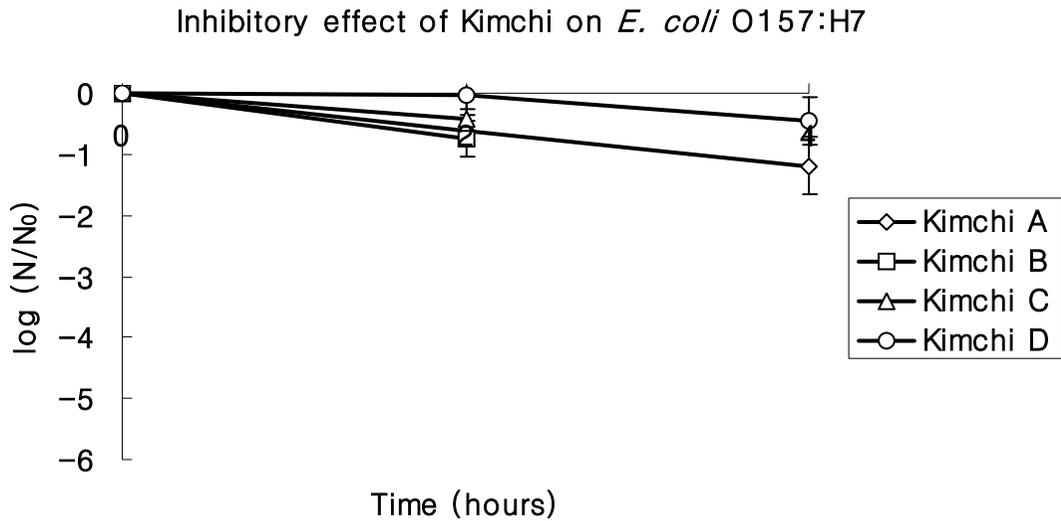


그림 3. 시판 김치의 *E. coli* O157:H7의 저해 효과

시판 김치가 *L. monocytogenes*를 저해하는 정도를 비교한 결과는 아래와 같다. 역시 1 log CFU/g 정도로 저해 수준은 낮았으나 D>C=A>B 정도로 나타났다. 김치 D가 특이하게 다른 군들에 비하여 *L. monocytogenes*를 억제하는 능력이 비교적 우수하게 보인점이 특징이었다.

### Inhibitory effect of Kimchi on *L. monocytogenes*

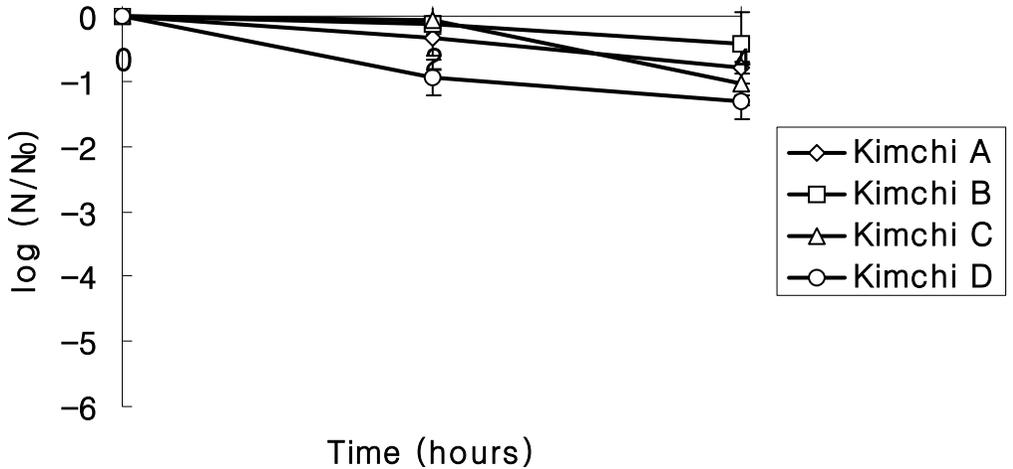


그림 4. 시판 김치의 *Listeria monocytogenes*의 저해효과

한편 시판 김치의 *V. parahaemolyticus*에 대한 저해효과는 놀랍게도 김치에 적용하고 10분 이내에 selective agar인 TCBS agar에 plating 한 결과  $10^6$  cells/g 범위에서 모두 사멸하여 배지에서 확인되지 않았다. 이를 확인하기 위하여 *V. parahaemolyticus* 순수 배양액, 김치, 그리고 *V. parahaemolyticus* 배양액과 김치 혼합액을 TCBS 비브리오 선택배지에 plating한 결과 김치 및 *V. parahaemolyticus* 배양액과 김치 혼합액에서는 전혀 미생물이 자라지 않았으나 *V. parahaemolyticus* 배양액에서는 잘 자랐다. 비브리오는 호염성 균으로서 3% NaCl에서 잘 자라는데 김치의 일반적인 염 농도는 2.5%~3% 정도로서 염농도의 차이는 크지 않은 것으로 간주할 수 있다. 이 연구를 통하여 김치의 비브리오균 저해 효과를 확인할 수 있었으며 김치의 어떤 상분이 비브리오균을 억제하는지 심층적인 연구가 요망되었다.

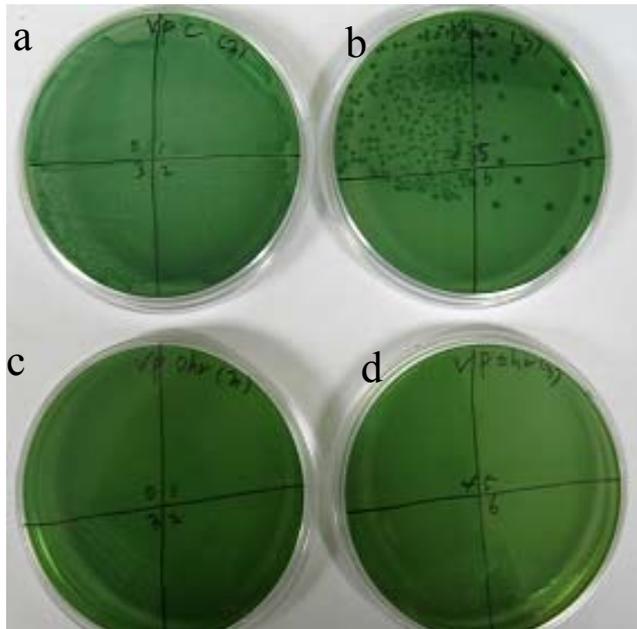
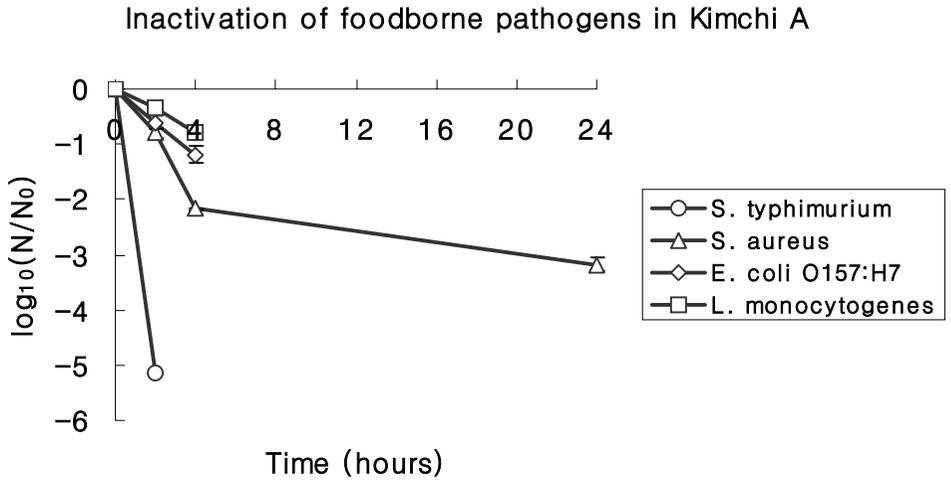


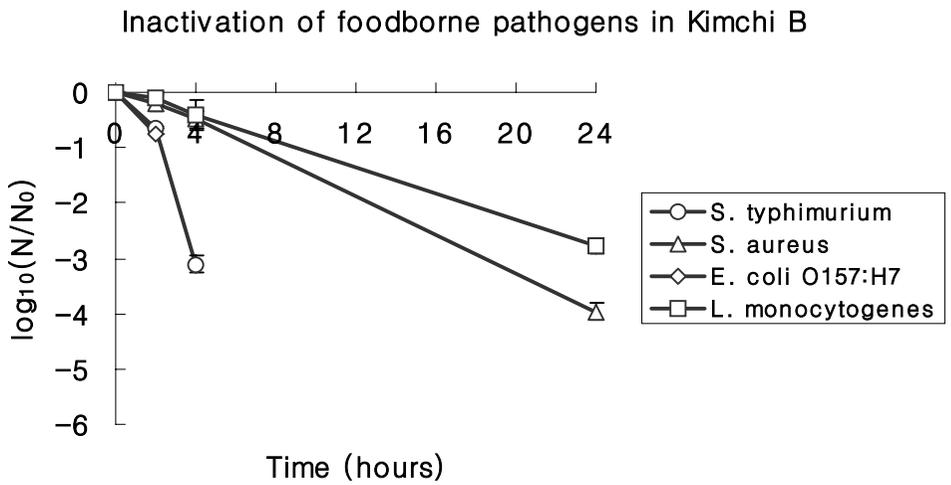
그림 5. *V. parahaemolyticus*의 희석배수별 콜로니. 순수 *V. parahaemolyticus* 배양액 a) b), 김치에 incubation하고난 직후의 *V. parahaemolyticus* c), d). 0-6: 희석배수

동일 김치 조건에서는 *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* 의 순서로 민감하였다. 특히 *E. coli* O157:H7 는 2-4시간 배양조건까지는 *S. aureus* 보다 저항성이 강하였으나 24시간 반응후에는 *S. aureus*보다 저항성이 낮았다. *B. cereus*의 경우는 거의 저해가 되지 않았고 그림에서는 생략하였다. 대체로 Gram-positive bacteria가 김치에서는 생존률이 높았음을 알 수 있다.

a)

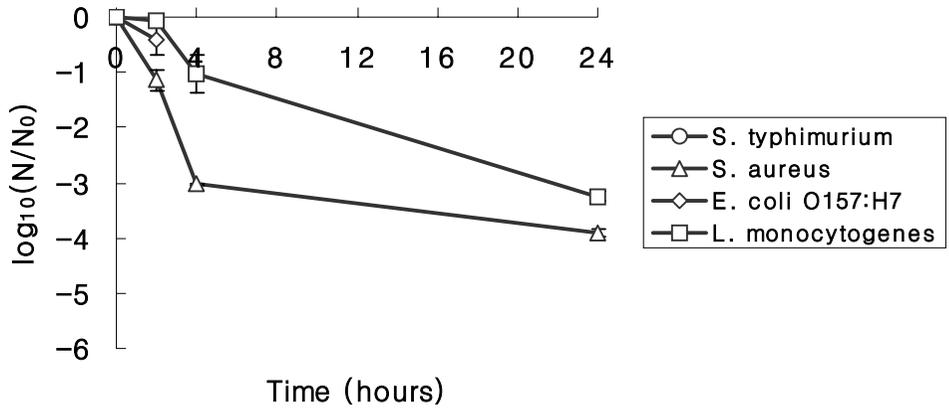


b)



c)

Inactivation of foodborne pathogens in Kimchi C



d)

Inactivation of foodborne pathogens in Kimchi D

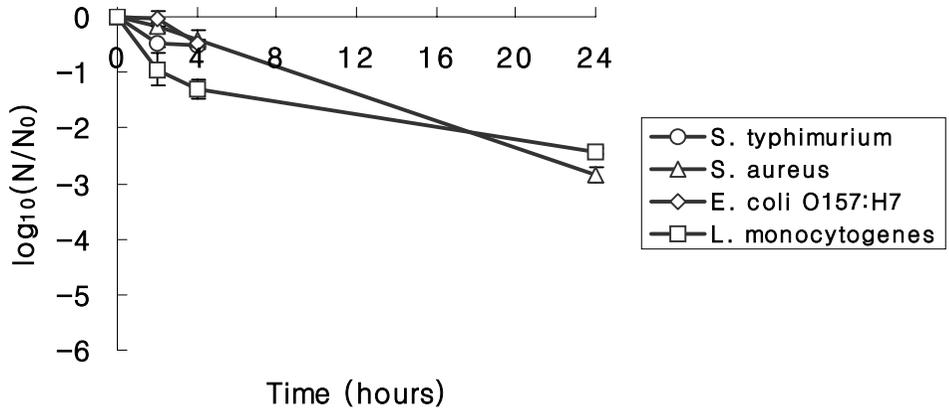


그림 6. 시판 김치의 다양한 식중독균의 억제 작용 (Kimchi A, a), Kimchi B, b), Kimchi C, c) and Kimchi D, d)). 0, 2, 4, 24시간 배양후의 각 균의 억제 효과는 로그 스케일로 표현되었음.  $N/N_0$  where  $N$  is the number of viable cells at time  $t$  and  $N_0$  is the number of the cells at  $t_0$ .

## 제 2 절 김치 발효과정의 이화학적 변화

본 연구에 사용된 김치는 한국식품연구원의 포기 김치의 절임 공정 개선 연구의 보고서에 있는 방법을 사용하여 제조하였다. 발효 방법을 다양화 하기 위하여 배추 김치의 발효 조건을 0, 4, 10, 20℃에서 진행시키면서 pH와 적정산도를 모니터링하면서 발효 시간을 확인하고 진행 상태가 pH 4.3이 되면 완료하고 식중독균 억제 능력을 평가하였다. 발효온도가 낮을수록 발효에 이르는데 오랜 시간이 걸렸으며 (3일-두달) (그림 7) 흥미롭게도 같은 pH 4.3에 이르렀을때에도 발효 온도에 따라서 최종 적정 산도의 값이 다르게 나왔다. 즉, 발효 온도가 높을 때 산도의 값이 더 높았다 (그림 8). 이는 발효의 온도에 따라 젖산균에 의해 생성되는 유기산의 종류나 양이 달라 산도에 영향을 준 것으로 사료되었다.

20℃에서 발효시킨 김치는 3일이 걸려서 pH 4.3에 이르렀으며 적정산도는 0.77, 10℃에서 발효시킨 김치는 11일이 걸려서 pH 4.3에 이르렀으며 적정산도는 0.74, 4℃에서 발효시킨 김치는 32일이 걸려서 pH 4.3에 이르렀으며 적정산도는 0.65, 0℃에서 발효시킨 김치는 56일이 걸려서 pH 4.3에 이르렀으며 적정산도는 0.56 이었다.

The pH changes in Kimchi fermented at different temperature

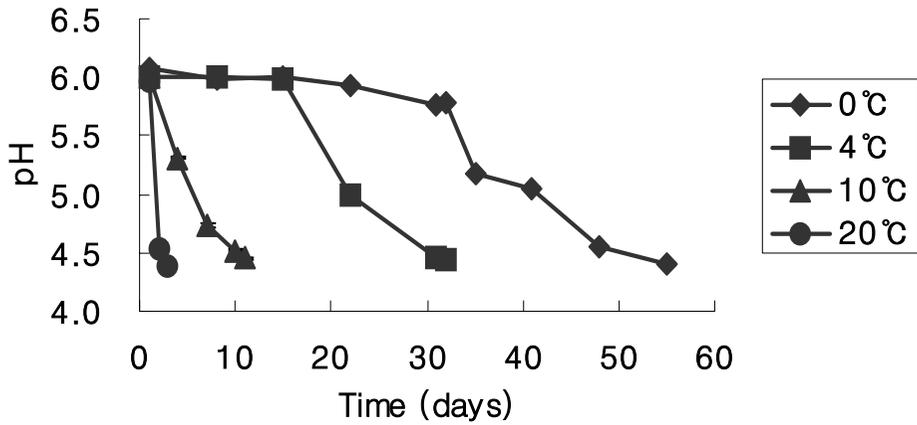


그림 7. 발효 온도에 따른 김치의 pH 변화 (pH 4.3에서 종료)

The acidity of Kimchi fermented at different temperature

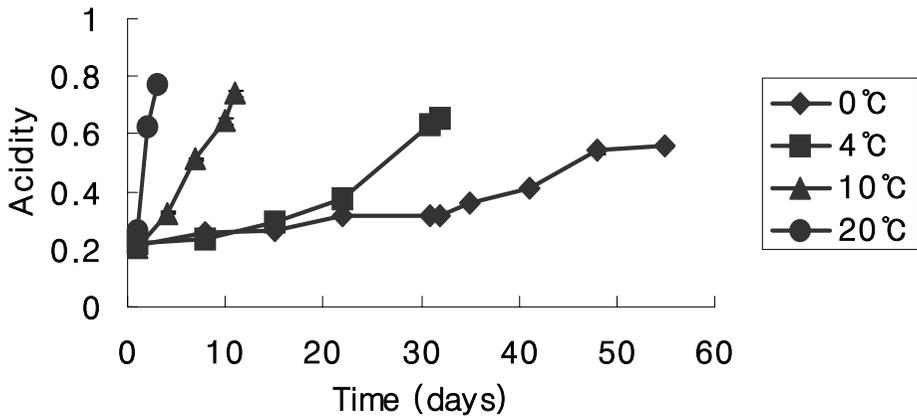


그림 8. 발효 온도에 따른 김치의 산도 변화. (pH 4.3에서 종료)

일반적으로 김치의 유기산으로는 비휘발성유기산으로는 주로 lactic, succinic, fumaric, malic acid가 분리되고, 휘발성 유기산으로는 acetic, formic, propionic, butyric, valeric, n-heptanoic acid 등이 분리된다고 보고되어있다 (유재연 등 1984). 고춧가루, 마늘, 파가 함유된 김치에서 lactic acid가 증가한다고 하였으며 acetic acid도 마늘이 많이 함유된 김치에서 증가하였다고 보고하였다. 박용식 등 (1993)은 김치 발효 온도에 따른 유기산을 분석한 결과 발효 적기에서는 주로 malic, citric, tartaric, pyroglutamic, oxalic, lactic, succinic, alpha-ketoglutaric acid가 주로 작용을 하고 온도가 낮아짐에 따라 lactic, succinic, oxalic, pyroglutamic, fumaric acid는 증가하고 malic과 tartaric acid는 감소한다고 보고하였다. 특히 발효 중에 acetic acid가 많이 증가하고 저온 발효 김치에서 더 많은 acetic acid가 생산된다고 보고하였다. 박덕천 등 (2003)이 보고한 바에 따르면 제조 초기에는 acetic acid 와 lactic acid가 높은 함량을 보였고, 20℃에서 발효된 김치는 malic acid가, 10℃에서 발효된 김치에는 succinic acid 함량이 높았다. 김치의 발효 온도에 따라 생성되는 유기산의 종류 외에도 이 실험의 결과로서 생성되는 유기산의 양이 다름을 확인할 수 있었다.

### 제 3 절 발효 온도에 따른 김치의 식중독 제어 효과

김치를 각각 0, 4, 10, 20℃에서 저장을 하고 각각의 김치 100g (고형분+김치액)을 멸균 blender에 1분간 갈아 멸균 거즈로 거른 액에 middle of exponential phase의 6가지의 식중독 균을 각각 1 ml씩 취한후 원심분리하여 상등액을 버리고 0.85% physiological saline solution 1ml 로 세척한 후 0.9 ml의 김치 용액에 0.1 ml의 각각의 식중독 균을 접종하고 37℃에 0, 2, 4h 정치하여 김치가 식중독 균의 inactivation에 미치는 정도를 각 균의 선택배지에 갈아 김치에 식중독 균을 투입하기 전의 식중독 숫자( $N_0$ )에 비교하여 각 시간별 미생물의 수 ( $N$ )를 얻어 미생물의 사멸도를 측정하였다.

김치는 각각 20℃, 10℃, 4℃, 0℃에서 발효하고 최적 발효 조건인 pH 4.3 ± 0.1을 기준으로 각각의 산도를 측정하고 김치에 존재하는 젖산균의 수를 배지에 갈아 측정하였으며 이때의 김치에 적용한 결과는 아래 그림에 나타나 있다. 20℃에서 발효된 김치에서는 *S. typhimurium*이 가장 많이 저해되었고, *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, 그리고 *L. monocytogenes*의 순서로 저해 정도가 감소하였다. (*S. typhimurium* > *E.coli* O157:H7 > *S. aureus* > *L. monocytogenes*)

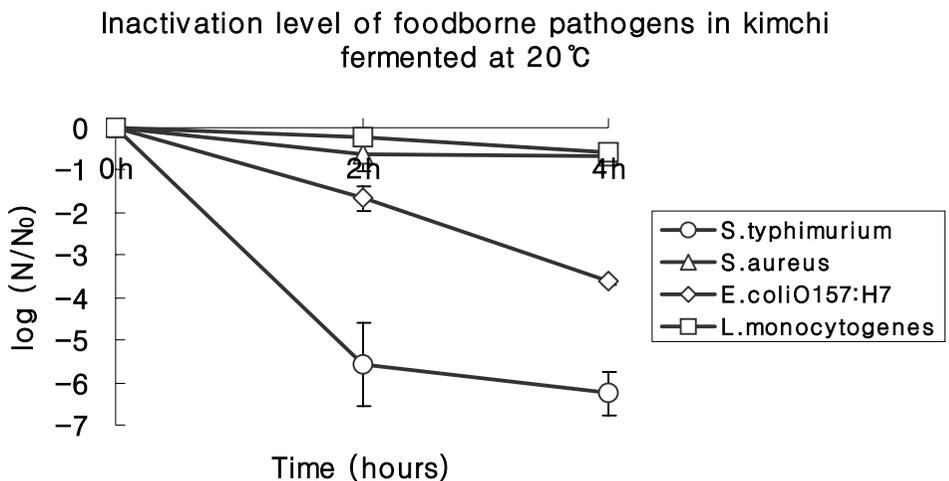


그림 9. 20℃ 김치 발효 온도가 식중독균의 억제에 미치는 효과

10°C 발효 김치에서도 패턴은 거의 20°C에서 발효된 김치와 비슷하였다.  
 (*S. typhimurium* > *E.coli O157:H7* > *S. aureus* > *L. monocytogenes*)

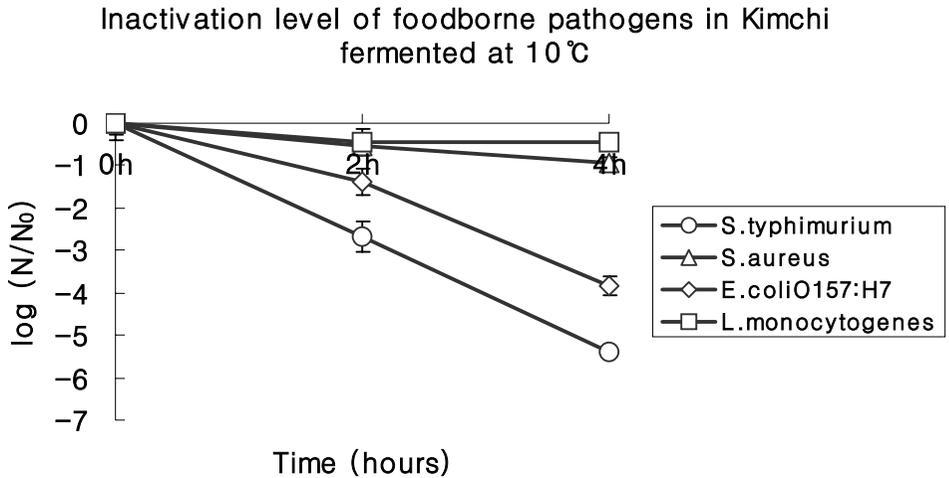


그림 10. 10°C 김치 발효 온도가 식중독균의 억제에 미치는 효과

그러나 4°C에서 발효된 김치에서는 오히려 *L. monocytogenes*가 초기 2시간 배양동안에 가장 많이 저해되었고 4시간이 지나서는 다른 김치와 마찬가지로 *S. typhimurium*의 저해되는 정도가 크게 나타났다. 이는 37°C에서 배양되는 동안 급속한 산의 형성에 의한 *S. typhimurium*이 저해된 것으로 사료된다. *S. aureus*와 *E. coli O157:H7*은 상대적으로 저해가 덜 되어 김치의 발효 온도에 상대적으로 덜 민감한 식중독균임이 나타났다. (*L. monocytogenes* > *S. typhimurium* > *E. coli O157:H7* > *S. aureus*)

균주에 대해 각각 살펴본 그림은 아래에 나타나있다. 특이한 점은 살모넬라균은 높은 온도에서 발효된 김치와 접촉하였을 때 많이 저해되었고 (그림 13) 리스테리아균은 낮은 온도에서 발효된 김치와 반응하였을 때 많이 저해되었다 (그림 16). *S. aureus* (그림 14)와 *E. coli O157:H7* (그림 15)은 상대적으로 발효 온도에 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.

Inactivation level of foodborne pathogens in Kimchi fermented at 4 °C

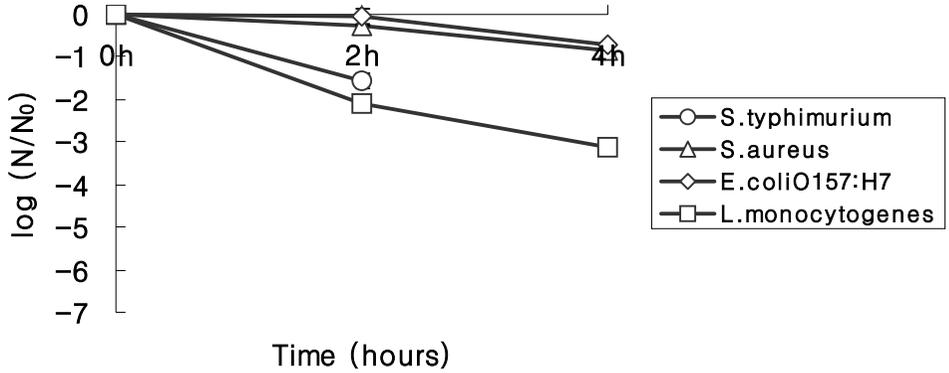


그림 11. 4°C 김치 발효 온도가 식중독균의 억제에 미치는 효과

마지막으로 0°C에서 발효된 김치에서는 4°C에서 발효된 김치의 식중독균에 대한 억제효과와 비슷하게 나왔으며 상대적으로 *S. typhimurium*의 저해되는 정도가 가장 낮게 나타났다. (*L. monocytogenes* > *E. coli* O157:H7 > *S. typhimurium* > *S. aureus*)

Inactivation level of foodborne pathogens in Kimchi fermented at 0 °C

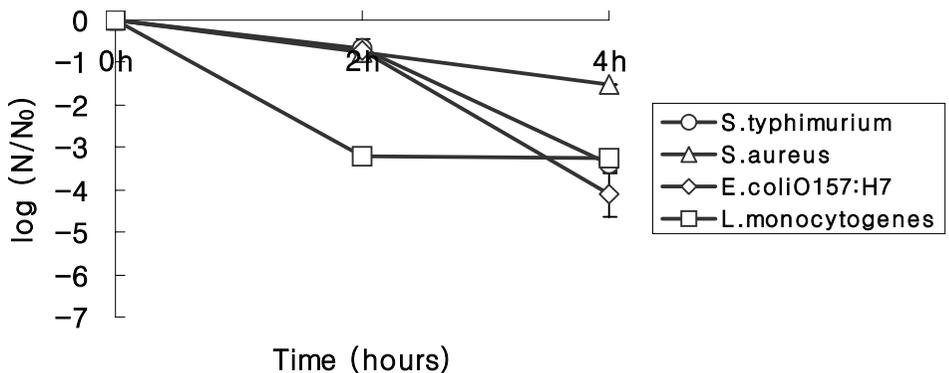


그림 12. 0°C 김치 발효 온도가 식중독균의 억제에 미치는 효과

Antimicrobial effect of fermentation temperature of Kimchi on *S. typhimurium*

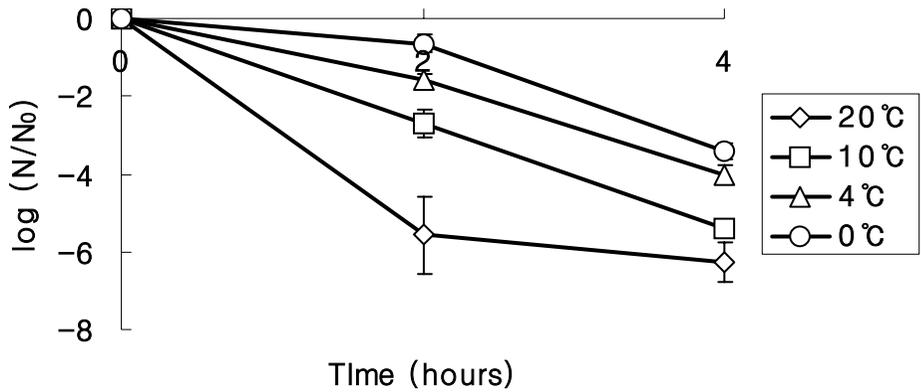


그림 13 김치의 발효 온도가 *S. typhimurium*의 억제에 미치는 영향

Antimicrobial effect of fermentation temperature of Kimchi on *E. coli* O157:H7

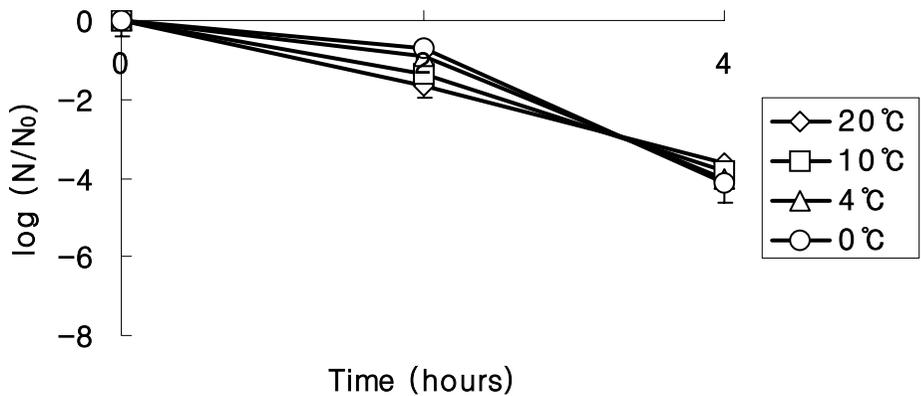


그림 14 김치의 발효 온도가 *E. coli* O157:H7의 억제에 미치는 영향

Antimicrobial effect of fermentation temperature of Kimchi on *S. aureus*

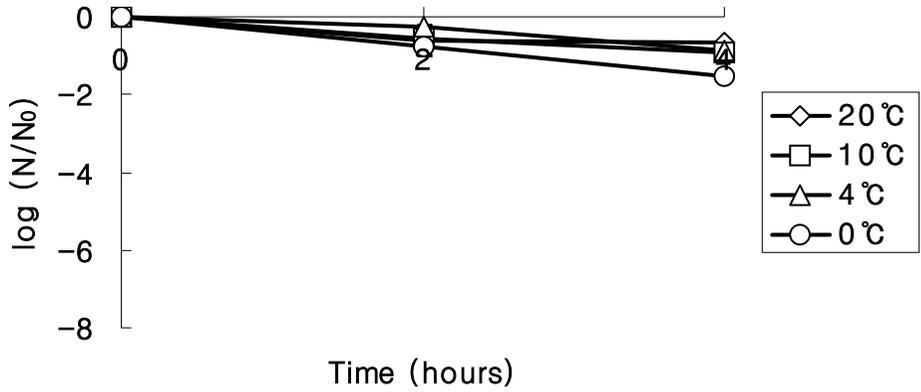


그림 15 김치의 발효 온도가 *S. aureus*의 억제에 미치는 영향

Antimicrobial effect of fermentation temperature of Kimchi on *L. monocytogenes*

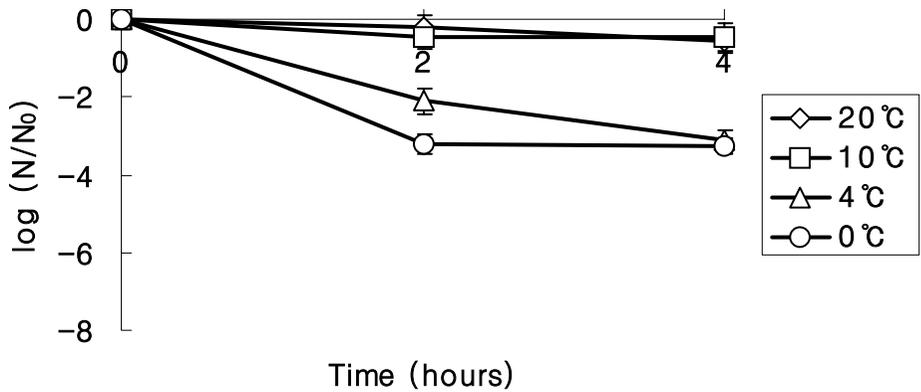


그림 16 김치의 발효 온도가 *L. monocytogenes*의 억제에 미치는 영향

## 제 4 절 식중독균을 억제하는 발효 김치의 인자에 관한 연구

### 1. pH

*V. parahaemolyticus*의 경우 김치에 넣은 직후의 미생물 수를 세어본 결과  $10^6$  CFU/ml 범위에서 나타나지 않았다 (그림 5). 그림 5.a과 그림 5.b는 김치가 없는 *V. parahaemolyticus* plate이며 김치에 배양하자마자 10분 이내 plating 한 그림은 그림 5.c와 그림 5.d에 희석배수별로 나타나 있다. *V. parahaemolyticus* 배양액과 김치를 혼합액에서는 전혀 미생물이 자라지 않았기에 실험에서 사용한 식중독 균중에서 가장 민감한 식중독균으로 보고 김치의 영향 인자를 선별하고자 하였다. 이에 반하여 pH 4.3 정도의 pH 용액에서는 *V. parahaemolyticus*가 1시간 이내로 6 log 이상이 사멸하여 plate에서 자란 cell을 찾아볼 수 없었다. 김치에 의해서 사멸한 비브리오균은 낮은 pH의 영향을 상당히 받았음을 확인할 수 있는 부분이다. 그러나 김치에서는 10분 이내, 즉 넣자마자 counting을 한 경우는 detection이 안되었으나 pH 4.3의 buffer에서는 6 log 이상의 cells이 감소하면서도 1시간 정도 살아있음을 확인하여 김치에서는 pH 이외에도 사멸에 영향을 주는 다른 인자가 있음을 확인할 수 있었다. 김치의 pH에서 10분이 지나자 장염 비브리오균은 생육을 하지 못하는 것 (그림 17)으로 나타나 산에 매우 민감한 식중독 균임을 알 수 있었고 김치와 같이 섭취하는 경우에 장염 비브리오균에 의한 식중독을 예방할 가능성이 높은 것으로 사료되었다.

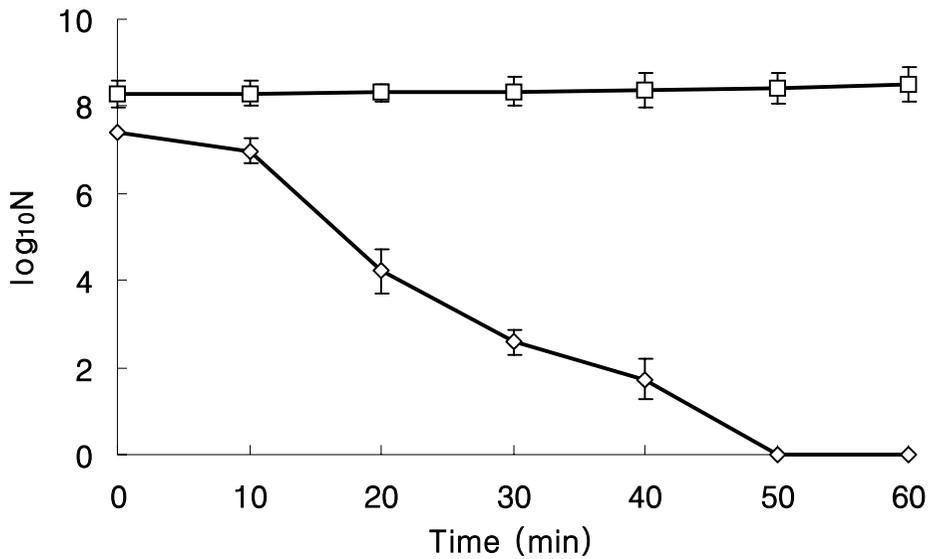


그림 17. pH에 따른 *V. parahaemolyticus*의 생균수 변화, □; pH 6.6 ◇; pH 4.3

그러나 다른 식중독균, 살모넬라, 리스테리아, 병원성 대장균은 같은 염 농도가 0.76%인 일반적인 PBS 버퍼에 적용되었을 때는 저해 효과를 거의 찾아볼 수 없었다 (그림 18). 따라서 상대적으로 환경 스트레스에 예민한 비브리오균인 경우에는 작은 pH 변화에도 민감하게 반응하지만 다른 일반적인 식중독균의 경우 pH 노출에는 상대적으로 낮은 변화를 보여서 김치가 이들 식중독균을 억제하는데 pH 이외의 다른 인자들이 간여하고 있음을 확인할 수 있었다.

Effect of pH 4.3 on survival of foodborne pathogens

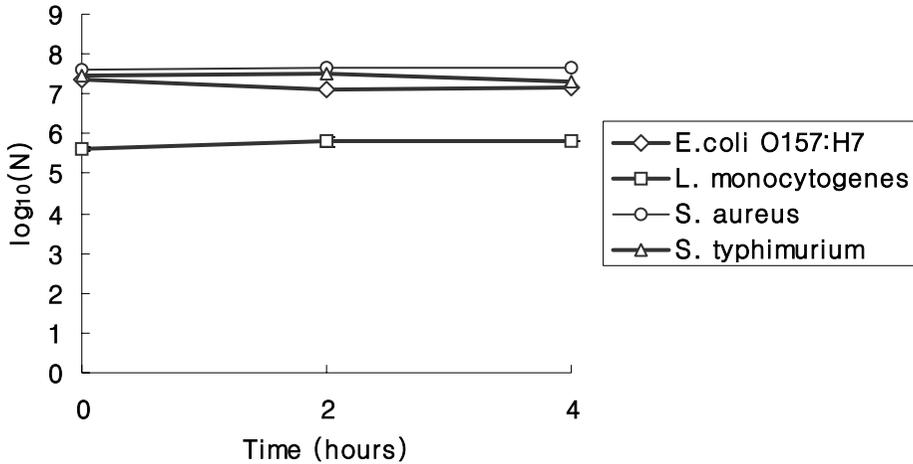


그림 18. pH 4.3에서 여러 식중독균의 생육 변화

## 2. 젯산균의 효과

김치 미생물의 존재 효과를 살펴보기 위해 발효 김치에 젯산균이 존재할 경우와 그렇지 않은 경우에 식중독균이 억제되는 정도의 차이를 비교하였다. 살모넬라균과 비브리오균을 overnight culture한 후에 계대배양하여 4시간을 키운 후에 원심분리를 하고 PBS에 washing하여 준비하였다. 그리고 고형물을 제거한 김치즙을 준비하였다. 대조군으로서 김치균을 제거하기 위하여 준비된 김치즙을 0.45 $\mu$ m로 filtering하여 김치에 있는 미생물을 모두 제거하고 여기에 식중독균을 접종하여 억제 효과를 비교하였다. pH 4.8의 산도 0.58의 김치를 사용한 경우에 각각 *V. parahaemolyticus*와 *S. typhimurium*에 적용하여 젯산균이 존재하는 김치와 그렇지 않은 김치가 이들 균을 억제하는 정도의 차이를 비교하였다. pH가 비교적 높은 경우인 pH가 4.8 정도의 김치에서는 젯산균의 존재 유무가 *V. parahaemolyticus*의 억제에 미치는 영향이 실험이 실시된 20분 이내에서는 그리 크지 않았다 (그림 19). 이에 반하여 4시간 가량 비교적 장시간이 적용된 *S. typhimurium*의 경우에는 젯산균이 존재하지 않는 김치액에서는 거의 사멸되는 정도가 없었으나 상대적으로 젯산균이 존재하는 김치액에서는 큰 차이를 보이면서 90%가량이 억제되는 정도의 차이를 보였다 (그림 20). 이를 통하여 살모넬라와 같은 균은 젯산균이 존재하는 경우에 김치에서 억제되는 정도가 큼을 알 수 있었다.

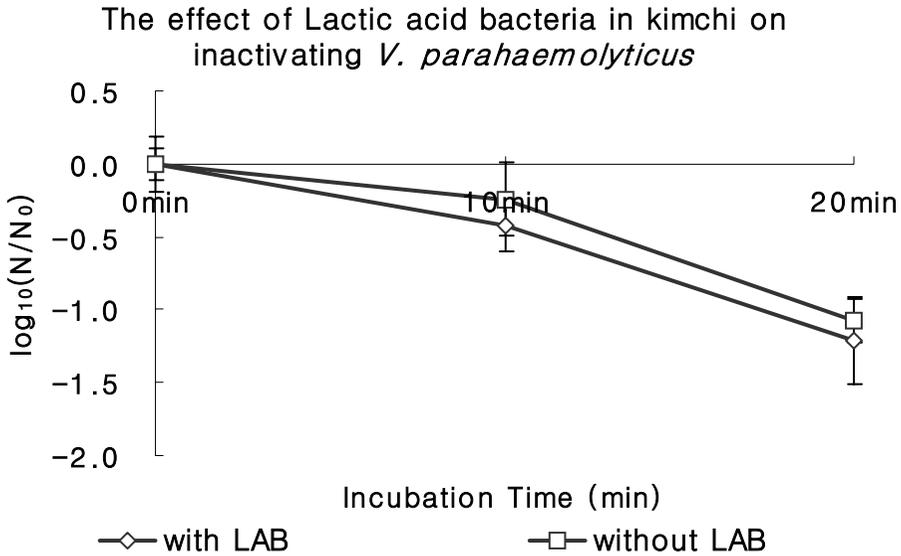


그림 19. 김치의 젖산균의 존재 유무에 따른 *V. parahaemolyticus*의 억제 정도 비교 (pH 4.8, 산도 5.8 김치 이용시)

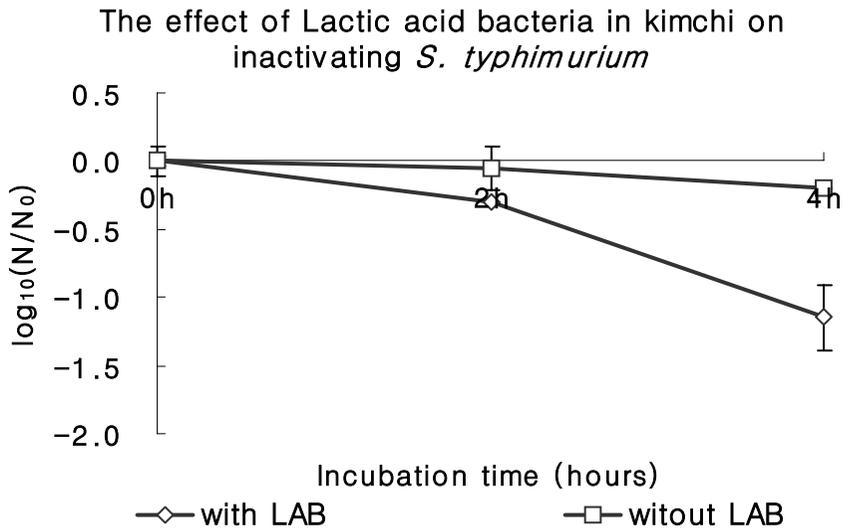


그림 20. 김치의 젖산균의 존재 유무에 따른 *S. typhimurium*의 억제 정도 비교 (pH 4.8, 산도 5.8 김치 이용시)

이번에는 김치 pH 4.2, 그리고 적정산도 9.7 정도로 같은 김치를 발효시켜 같은 실험방법을 통하여 젖산균의 유무가 식중독균에 미치는 영향을 살펴보았다. 비브리오균인 경우에는 10분 배양한 이후부터 젖산균의 유무에 상관없이 6 log cells/ml이상의 균이 사멸하여 비교를 할 수 없었다. 그러나 이들 용액을 살모넬라와 리스테리아균에 적용하여 살펴본 결과 살모넬라에서는 4시간 배양후에 1 log 이상의 차이를 보였고 (그림 21), 리스테리아균의 경우에도 균의 유무에 따라 2시간 4시간 배양시에 각각 1 log 이상의 생균수에 차이를 보여서 살모넬라 및 리스테리아균은 젖산균의 유무가 이들 균의 억제에 큰 영향을 준다는 것을 확인할 수 있었다.

The effect of lactic acid bacteria in kimchi on inactivating *S. typhimurium*

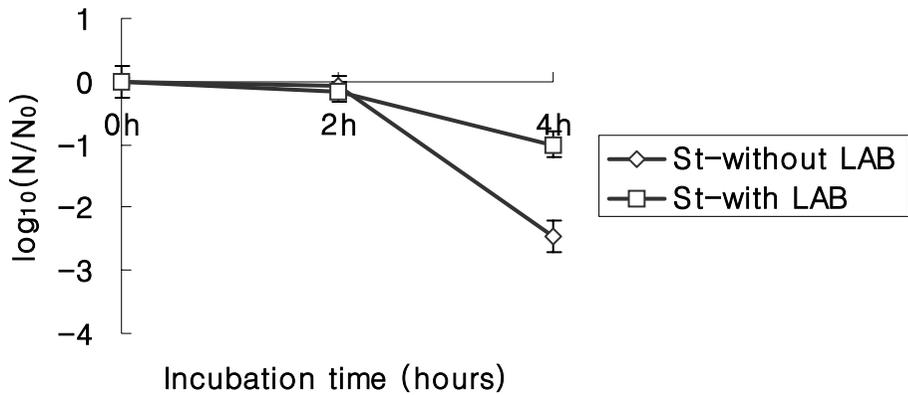


그림 21. 김치의 젖산균의 존재 유무에 따른 *S. typhimurium*의 억제 정도 비교 (pH 4.2, 산도 9.7 김치 이용시)

The effect of lactic acid bacteria in kimchi on inactivating *L. monocytogenes*

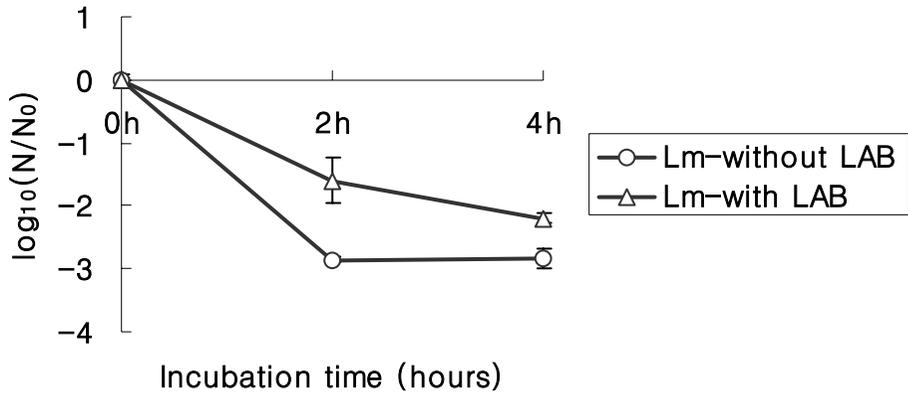


그림 22. 김치의 젖산균의 존재 유무에 따른 *L. monocytogenes*의 억제 정도 비교 (pH 4.2, 산도 9.7 김치 이용시)

### 3. 김치 발효 온도 및 산도

*S. aureus*나 *E. coli* O157:H7는 김치 발효 온도에 따라 김치에서 억제 능력에 차이가 상대적으로 적음을 확인하였다. *E. coli* O157:H7은 2시간, 4시간 배양에서 각각 2 log reduction과 4 log reduction의 결과를 통해 김치에 의해서 사멸효과가 큰 것으로 나타났다. *Salmonella typhimurium*은 산도가 큰 김치인 상대적으로 높은 온도에서 발효한 김치일수록 억제되는 정도가 크게 나타났다. 반면 *Listeria monocytogenes*는 낮은 온도에서 발효된 김치에서 사멸하는 정도가 크게 나타나 *Salmonella typhimurium*에 대해 나타난 결과와 반대 결과를 나타내었다 (그림 13-16).

### 4. 박테리오신 함량

발효 온도별로 각각의 김치에 박테리오신 함량이 있는지를 확인하기 위하여 박테리오신을 추출하여 *Listeria monocytogenes*에 가하여 확인을 하여 보았다. 그러나 김치에서는 disc법을 이용하였을때와 plate counting 방법을 사용하였을때도 박테리오신의 활성을 확인할 수 없었다 (Data not shown). 사용한 김치 용액 자체에 녹아 있는 농도가 낮아 활성을 나타낼 만큼 박테리오신을 얻지 못한 것으로 사료되었다.

## 5. 기타

낮은 온도에서 발효된 김치일수록 탄산이 많이 형성이 되고 (천 등, 1976) 탄산은 *Listeria monocytogenes*의 억제에 효과가 있으므로 탄산이 작용을 하여 낮은 온도에서 발효된 김치에서 *Listeria monocytogenes*가 효과적으로 억제된 것으로 추정되었다. 이외에도 섬유질의 풍부하여 장까지 도달하는 동안 식중독균이 장내에 부착할 가능성을 줄이는 것도 김치가 가진 식중독균의 억제 작용으로 예측되고 추후 연구로서 요망되는 부분이다.

## 제 5 절 김치의 부재료 효과 및 부재료 조성을 달리한 김치 특성

### 1. 김치 부재료의 항균 효과

김치 부재료인 마늘, 파, 생강, 배추, 홍고추, 무의 껍질을 벗기고 세척하여 물기를 제거한후 blender로 각 시료를 마쇄한 후 거즈로 짜서 즙을 얻었다. 얻은액은 1000rpm, 10분, 4℃로 원심분리하고, 상등액을 0.45 $\mu$ m membrane filter로 제균하여 시료로 사용하였다. *S. aureus*의 경우 마늘에서 가장 큰 항균력을 보였고 파에 대해서도 항균력을 다소 확인할 수 있었다. 다른 식중독 균에 대해 항균 활성을 측정된 결과 마늘은 전체 식중독 균에 항균활성을 보이고 있고 파는 *B. cereus*에 대해서도 약간의 항균활성을 가졌음을 확인할 수 있었다. 마늘과 파를 김치 제조시 식중독을 제어할 수 있는 부재료로 선정하였다.



그림 23. *S. aureus*에 대한 각 김치 부재료의 억제환 (1 마늘, 2 파, 3 생강, 4 배추, 5 고추, 6 무)

표 4. 각 식중독 균에 대한 김치의 부재료 저해 활성

Strains	garlic	spring onion	ginger	cabbage	red pepper	radish
<i>B. cereus</i>	7.0±1.4 <sup>1)</sup>	1.5±0.7	N <sup>2)</sup>	N	N	N
<i>S. aureus</i>	6	1.0±0.2	N	N	N	N
<i>S. typhimurium</i>	6	N	N	N	N	N
<i>L. monocytogenes</i>	6	N	N	N	N	N
<i>E. coli</i> O157:H7	4	N	N	N	N	N
<i>V. parahaemolyticus</i>	7.0±1.4	N	N	N	N	N
<i>V. parahaemolyticus</i> (0.75% PBS)	5	N	N	-	N	N
<i>V. parahaemolyticus</i> (3% PBS)	5	N	N	-	N	N
<i>S. cerevisiae</i>	12	N	N	-	N	N

<sup>1)</sup>diameter of clear zone(mm)

<sup>2)</sup>No inhibition

## 2. 부재료를 달리하여 제조한 김치 조성

부재료중에서 마늘과 파가 중요한 항균 인자임을 확인하고 마늘과 파의 조성을 달리한 김치를 표 5과 같이 제조하였다.

표 5. 동일 김치 재료에 파와 마늘의 함량을 달리한 김치의 조성 (배추 100 에 대한 상대적 농도를 표시)

파함량 \ 마늘함량	없음	1.5%	15%
없음	A	B	C
3.1%	D	F	
31%	E		G

### 3. 부재료를 달리한 김치가 20도 발효되었을 때의 효과

김치의 부재료중 가시적인 항균 활성을 나타낸 마늘과 파의 함량을 조절하여 이들 성분이 김치의 발효에 어떤 영향을 주는지 살펴보고 최적 발효된 김치에서 식중독균 중에서 김치의 발효 온도에 따라 김치에 대한 민감성이 다른 *Salmonella typhimurium*과 *Listeria monocytogenes*를 이용하여 김치의 부재료가 이들 균의 억제에 효과를 나타내는지 발효의 변화를 모니터링하며 살펴보았다.

파를 넣지 않고 마늘의 함량을 변화시켜 마늘의 함량이 김치의 발효에 어떤 영향을 주는지 살펴본 그림은 아래에 있다. 우선 마늘이 전혀 없는 김치와 일반 김치보다 마늘의 함량을 10배 늘인 김치는 마늘이 적당히 들어있는 김치에 비해 발효의 속도가 느렸다. 일반적 실험조건인 대조군인 마늘이 1.5% 들어간 김치에 비해 같은 pH까지 떨어지는데 3일 걸린데 반해 이틀 정도가 더 소요되었다.

마늘함량에 따른 20도에서 발효된 파 없는 김치의 pH 변화

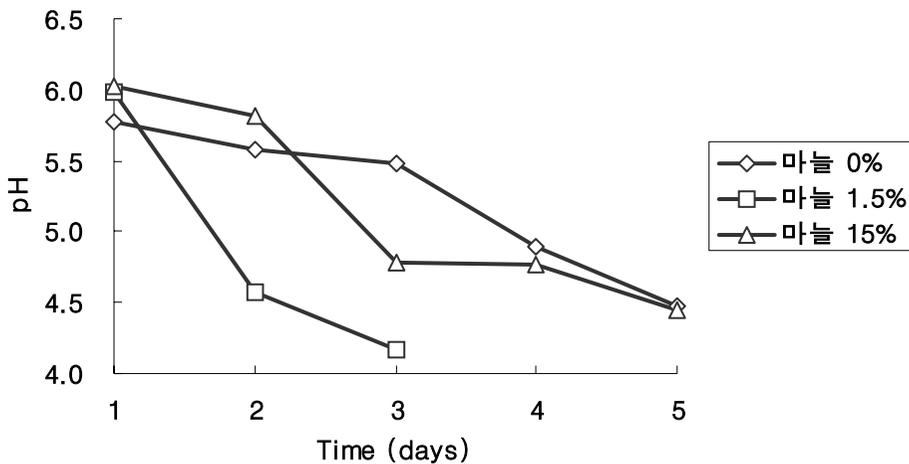


그림 24. 마늘함량에 따른 20도에서 발효된 파 없는 김치의 pH 변화

이번엔 마늘을 넣지 않고 파의 함량을 달리한 김치의 20도에서 발효되는 정도를 모니터링하였다. 마늘이 없을 때 파가 없는 김치는 전반적으로 발효되는 데 시간이 오래 소요되었다. 반면 3.1%의 일반적 조건의 파가 들어간 경우와 그

의 10배 되는 양이 들어간 김치의 경우는 발효의 정도와 속도에 거의 차이가 없었다. 그러나 마늘이 없을때는 발효되는데 4-5일이 소요되었다.

파 함량에 따른 20도에서 발효된 마늘 없는 김치의 pH 변화

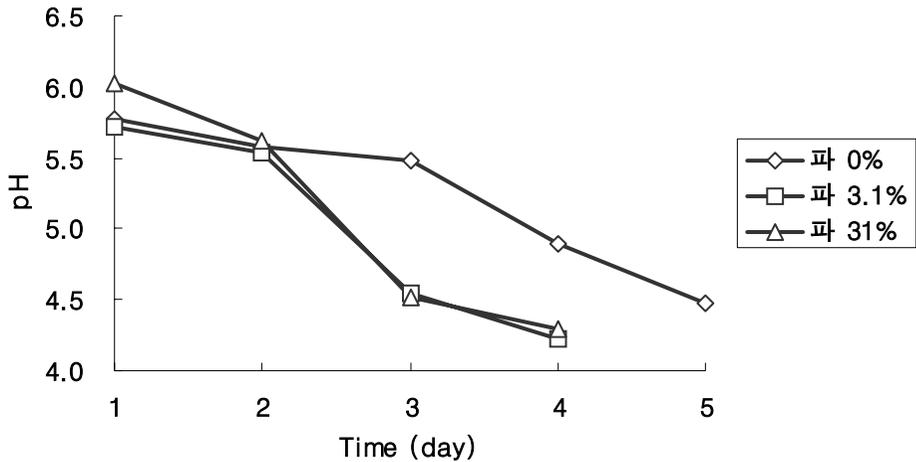


그림 25. 마늘 없는 김치의 파함량에 따른 20도에서 발효시킨 김치에서의 발효 기간 동안의 pH변화

위의 경우로 보아 마늘이 전혀 없는 경우보다는 적당한 마늘의 양이 있어야 하고 지나친 마늘의 양은 발효의 속도를 저하시키는 점을 발견하였다. 파의 경우는 발효에 큰 차이는 없었으나 파가 전혀 없으면 발효의 속도가 좀 저하된다는 점을 발견하였다.

이번에는 파와 마늘의 함량을 동시에 증가시키면서 발효의 패턴을 확인하였다. 같은 20도에서 발효시키면서 발효의 정도를 pH의 변화를 모니터링하였다. 파와 마늘이 전혀 없는 경우보다 적당한 파와 마늘이 들어간 경우 발효가 가장 빨랐으며 10배의 파와 마늘을 넣은 경우는 약간 더디었으나 큰 차이는 없었다.

마늘, 파 함량에 따른 20도에서 발효된 김치의 pH변화

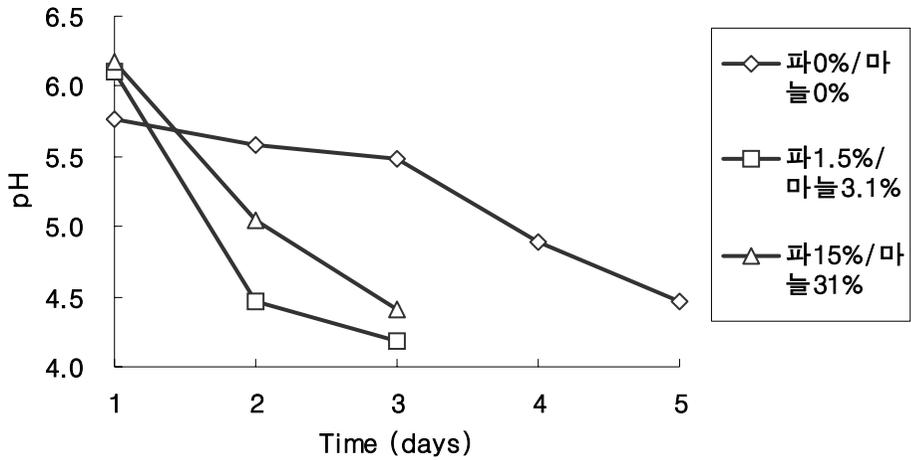


그림 26. 파와 마늘의 함량 변화에 따른 20도에서 발효시킨 김치의 pH변화

위 실험의 pH와 산도의 변화 관계를 살펴본 그림은 아래와 같다

Correlation between pH and acidity of Kimchi

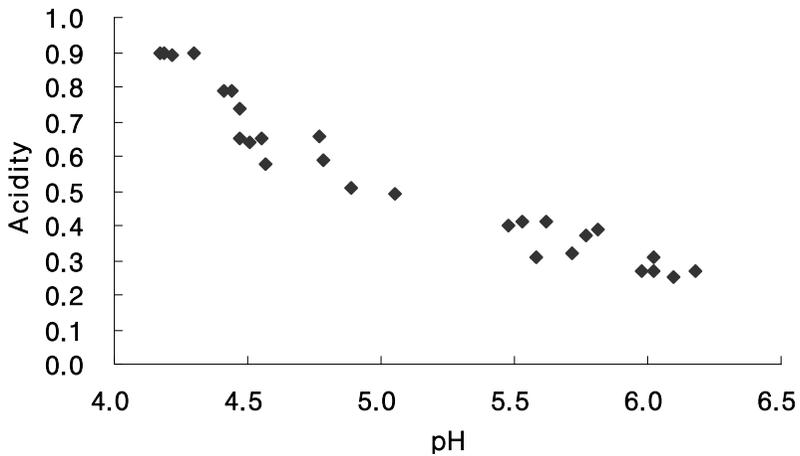


그림 27. 김치의 발효 과정 중 pH와 산도의 변화의 상관관계

부재료를 달리한 김치에서 pH의 변화와 산도의 관계가 20도에서 발효된 김치는 비교적 일정한 패턴을 나타내었다. 이를 통해 짧은 기간에 발효되는 김치에서는 부재료의 변화가 발효에 큰 영향을 주지는 않고 발효 속도에만 1-2일의 시간의 차이를 나타내었다. 그러나 전반적으로 부재료가 들어가지 않은 김치는 발효에 오랜 시간이 걸린다는 점을 확인하였고 이를 통하여 적당한 양의 부재료는 발효를 촉진시킨다는 점을 확인하였다. 여기서 산도가 마늘15%/파31%, 마늘15%/파0% 그리고 마늘0%/파0%는 낮았고 그 외는 0.9 정도로 나타났다. 이에 비례하여 살모넬라의 억제율도 다른 김치에 비해 상대적으로 낮았다 (Data not shown). 즉 부재료가 첨가된 영향 보다는 발효를 촉진한 상태에서 같은 pH에서도 상대적으로 산도가 높아졌고 살모넬라 균이 억제가 잘 된 점으로 보아 살모넬라균은 유기산이 많이 생성된 산도가 높은 김치에서 억제가 잘 된다는 점을 파악할 수 있었다 (그림 28-그림 30).

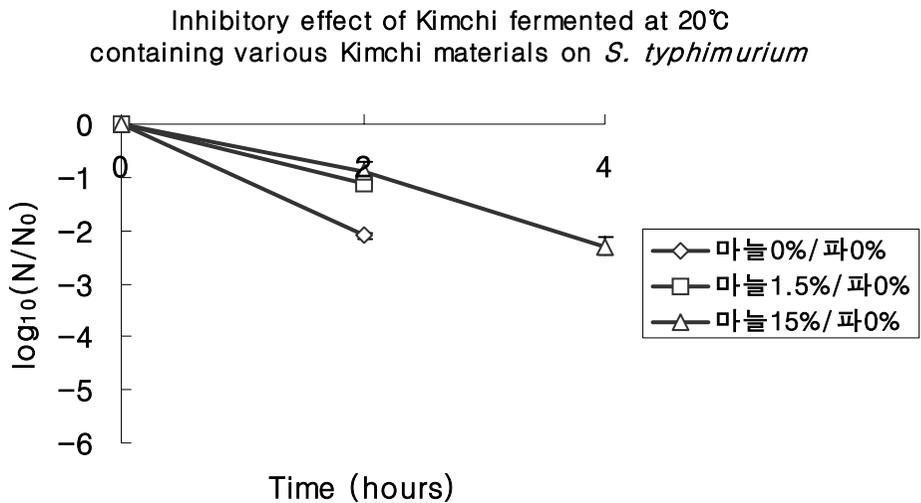


그림 28. 20도에서 발효시킨 김치에서 마늘 함량에 따라 pH 4.3까지 발효된 김치의 살모넬라 억제 결과

Inhibitory effect of Kimchi fermented at 20°C containing various Kimchi materials on *S. typhimurium*

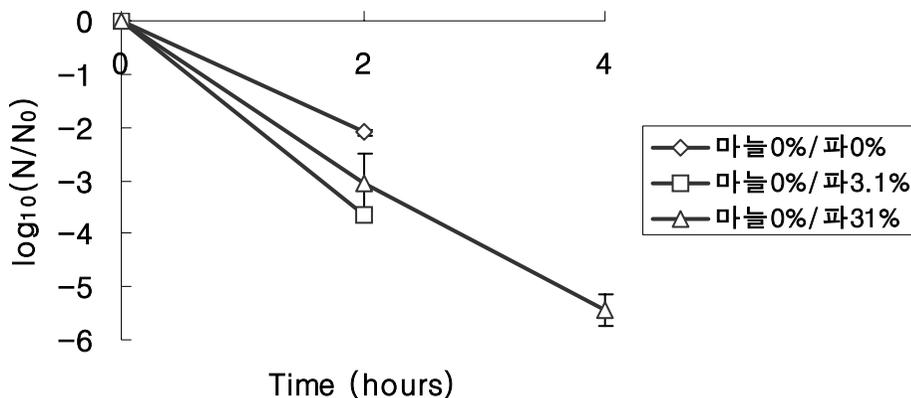


그림 29. 마늘 없는 김치의 파의 조성에 따라 발효된 김치가 pH 4.3에 이르렀을 때 살모넬라 균 억제 특성

Inhibitory effect of Kimchi fermented at 20°C containing various Kimchi materials on *S. typhimurium*

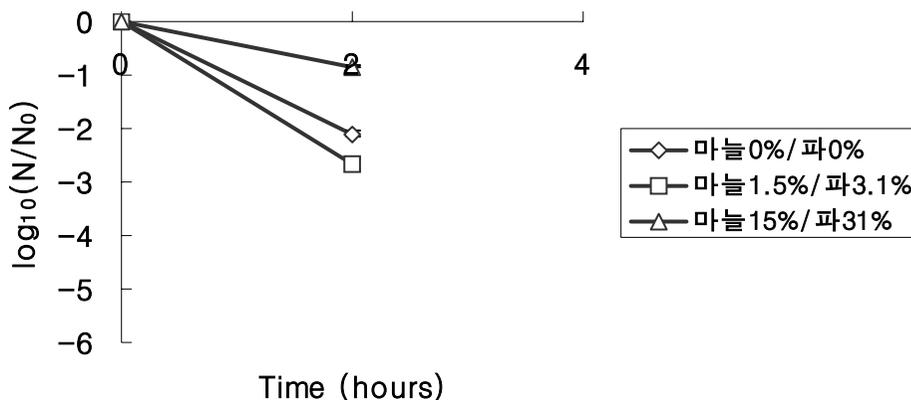


그림 30. 마늘과 파의 조성 변화에 따라 20도에서 발효된 김치가 pH 4.3에 이르렀을 때의 살모넬라 억제 특성

이번에는 부재료를 달리한 김치를 20도에서 발효시켰을 때 *S. aureus*에 대한 억제 활성을 살펴보았다. 억제 정도가 살모넬라보다는 약간 낮았으나 패턴은 거의 비슷하였다 (그림 31-33).

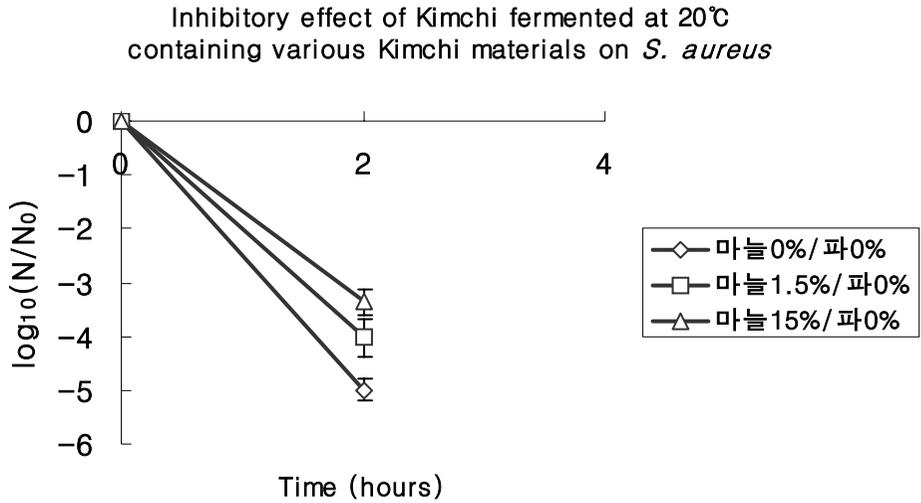


그림 31. 마늘 조성을 달리하고 파 없이 제조된 김치가 20도에서 발효된 후 pH 4.3에 이르렀을 때 *S. aureus* 억제 특성

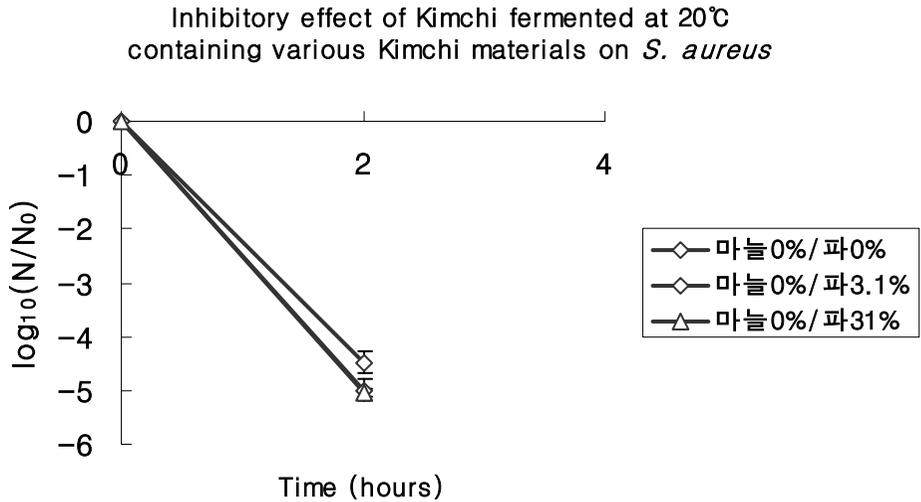


그림 32. 마늘 없이 파의 조성을 달리하여 제조된 김치가 20도에서 발효된 후 pH 4.3에 이르렀을 때 *S. aureus* 억제 특성

Inhibitory effect of Kimchi fermented at 20°C containing various Kimchi materials on *S. aureus*

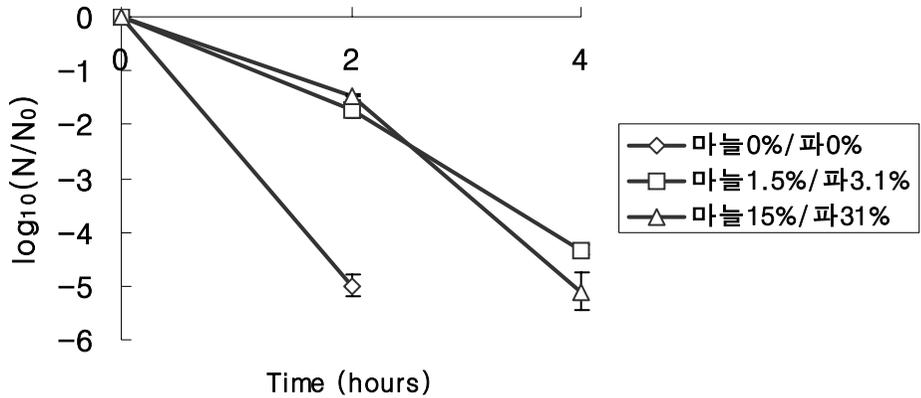


그림 33. 파와 마늘의 조성을 달리하여 제조된 김치가 20도에서 발효된 후 pH 4.3에 이르렀을 때 *S. aureus* 억제 특성

#### 4. 젖산균의 변화

다음은 20°C에서 발효되는 김치에서 젖산균의 변화를 모니터링하였다. MRS agar에 counting한 결과도 이전의 실험결과처럼 대동소이하였다. 아래 그림에서 살펴보면 마늘과 파가 들어가지 않은 김치는 발효가 가장 느렸으며 젖산균의 증가에 가장 많은 시간이 소요되었다. 발효속도의 정도는 마늘0%파0% < 마늘0%파3.1% = 마늘0%파31% < 마늘1.5%/파0% = 마늘1.5%파31% = 마늘15% 파0% = 마늘 1.5%파0% 김치로 나타났다. 즉 파와 마늘이 없는 것보다 파와 마늘이 소량 있으면 발효에 도움이 된다는 사실을 나타내고 있다.

Leuconostoc spp. in Kimchi during fermentation at 20°C

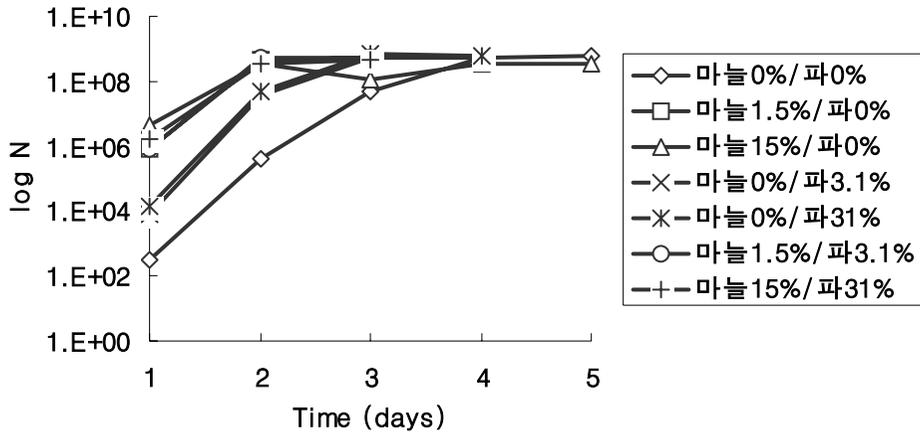


그림 34. 부재료의 조성을 달리한 김치가 20도에서 발효될 때 젖산균 수의 변화

### 5. 부재료를 달리하여 제조한 김치를 0도 발효시켰을 때의 효과

이번에는 위와 같이 부재료의 함량을 달리한 김치를 제조하고 0도에서 김치를 발효시키면서 pH와 산도의 변화를 모니터링 하였다. 마늘이 많이 들어있는 김치는 0도 발효시 김치가 발효가 지연되어 다른 김치들은 적숙기에 이른지 한 달이 지난 후에도 발효 과정이 지연되었다. 마늘이 전혀 들어있지 않은 김치보다는 마늘이 1.5% 정도 함유된 김치에서 10일가량 발효가 촉진되는 효과를 확인할 수 있었다.

파 없는 김치에서 마늘 함량에 따른 0도 발효 김치에서 산도 변화

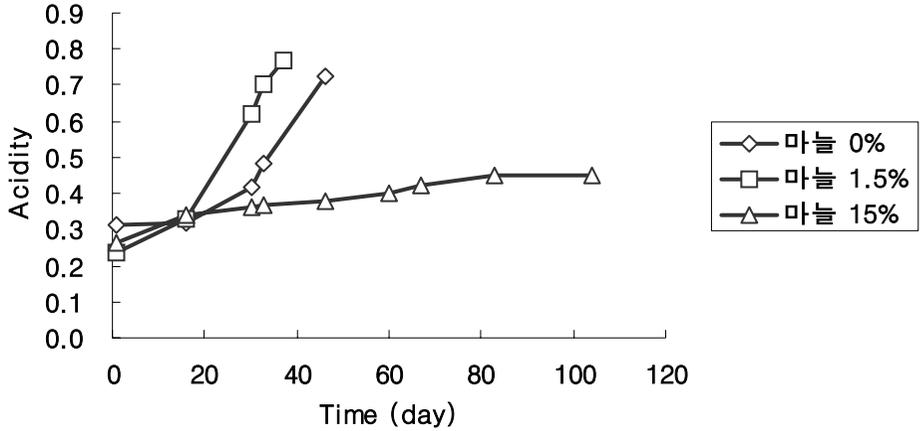


그림 35. 파 없이 마늘의 조성을 달리한 김치가 0도에서 발효될 때 산도의 변화

반면 마늘은 없고 파의 조성만 달리한 김치에서는 발효 시간의 차이가 크지 않았다. 그러나 파가 3.1% 함유된 김치의 발효가 가장 빨랐고 파가 전혀 없는 김치보다는 파가 31% 함유된 김치에서 발효가 촉진되어 낮은 온도에서 발효되는 김치에서는 파 역시 발효를 촉진하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

마늘 없는 김치에서 파의 함량에 따른 0도 발효 김치의 산도 변화

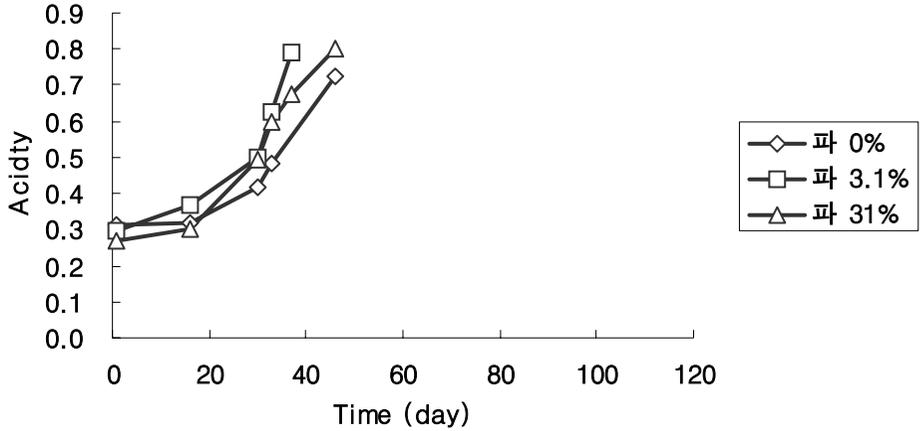


그림 36. 마늘 없이 파의 조성을 달리하여 0도에서 발효시킨 김치의 발효 과정동안 산도의 변화

마지막으로 파와 마늘의 조성을 비례해서 제조한 김치를 0도에서 발효시켰을 경우의 발효 시간을 살펴보았다. 파와 마늘이 적정 함량이 포함되었을 때 발효가 가장 빨랐으며 파와 마늘이 없는 경우보다도 파와 마늘이 보통 김치의 10배 함유된 김치에서 발효가 지연되는 결과를 확인할 수 있었다. 이는 파는 첨가되지 않고 마늘만 10배 함유된 김치보다는 파와 마늘이 10배씩 첨가된 경우가 파가 첨가됨으로서 발효는 촉진하는 결과를 얻었으나 마늘 자체 함량이 너무 많아지면 결과적으로 발효가 지연되는 점을 공통적으로 확인할 수 있었다.

마늘과 파의 함량에 따른 김치의 0도 발효에서 산도 변화

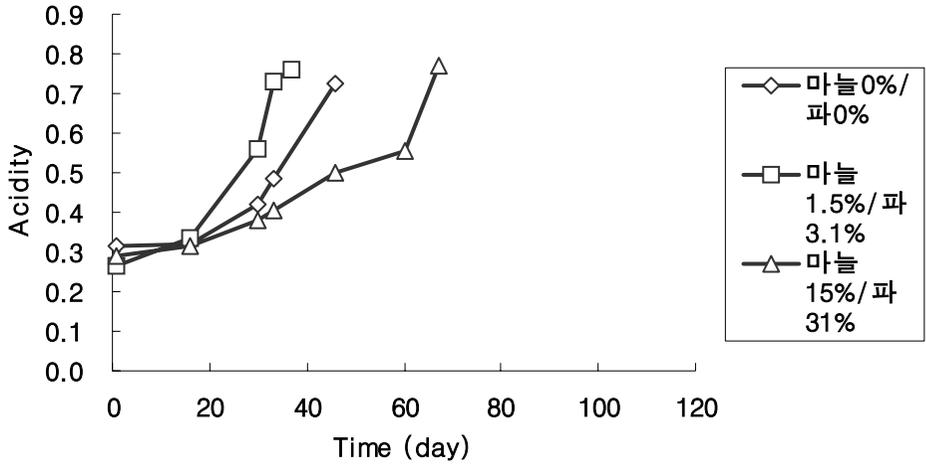


그림 37. 마늘과 파의 조성을 달리하여 0도에서 발효시킨 김치의 발효과정 동안 산도의 변화

0도에서 김치가 발효될 때 마늘과 파가 없는 것보다는 적당한 양의 파와 마늘이 발효를 촉진하는 효과를 가지고 있음을 아래 그림에서 나타내고 있다. 특히 마늘이 없으면 발효가 지연되었으며 마늘만 15% 존재할 경우, 0도에서 발효될 때는 20도 발효 김치와 달리 김치 발효가 이루어지지 않음을 확인하였다. 파 3.1%는 존재하나 마늘이 15% 존재할 경우에도 다른 김치에 비해서 젖산균의 수가 낮음을 확인할 수 있었다.

Leuconostoc spp. in Kimchi during fermentation at 0°C

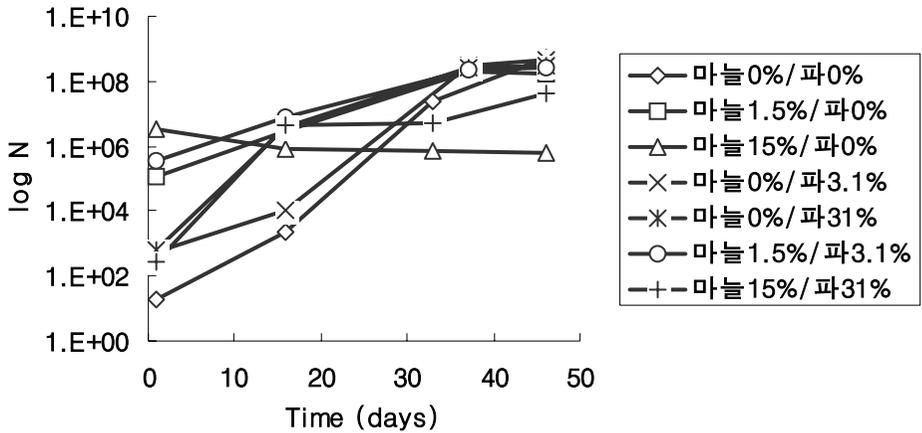


그림 38. 부재료로서 마늘과 파의 조성을 달리하여 0도에서 발효시킨 김치의 *Leuconostoc* spp.의 균수의 변화

마늘15%/파0% 김치는 0도에서 발효가 이루어지지 않았기 때문에 식중독균을 억제하는 효과를 살펴보는 연구에서는 샘플에서 제외하였다. pH 4.3에 도달한 김치를 대상으로 최적 발효된 상태로 간주하고 이때 각각의 식중독균에 대해서 억제되는 효과를 확인하였다. 마늘과 파의 함량을 다르게 하여 제조한 김치를 0도에서 발효를 진행시킨 후 pH가 4.3에 이르렀을 때 *Listeria monocytogenes*를 억제하는 효과를 살펴보면 김치간에 큰 차이는 없었다. 이는 김치의 부재료 함량이 리스테리아를 억제하는 효과가 있을 것으로 예상했던 것과 차이가 있음을 확인하였다. 낮은 온도에서 발효된 김치에서 리스테리아균의 억제가 더 많이 된 결과 (그림 16)를 통해 낮은 온도의 발효 과정동안 높은 온도에서 발효된 경우보다 마늘이나 파의 성분이 유지되는 것이 아닌가 하는 추측을 하였으나 김치의 발효 과정을 통해 마늘의 성분 자체가 식중독균을 억제한다고 결론짓기 보다는 발효를 촉진하고 최적의 발효 상태를 만드는 것이 식중독균 억제에 더욱 효과적이라는 결론을 얻게 되었다. 특히 마늘이 파와 함께 보통의 김치보다 10배 많은 김치도 다른 김치와 큰 차이가 없는 것으로 살펴 보건데 부재료의 영향은 미미한 것으로 결론지었다. 한편 낮은 온도에서 박테리오신과 같은 물질이 더 많이 생성되는 것이 아닌가 하는 가정은 낮은 온도에서 발효시킨 발효 김치에서 박테리오신 활성이 나타나지 않은 것을 통해 박테리오신이 김치에서 직접 작용을 한다고 보기는 어려웠다. 마지막으로 0°C 발효가 리스테리아균 억제에 효과적인 것은 김치

의 발효 온도에 따른 탄산의 용해도와 연관 지을 수 있지 않을까 추정하였다. Erkmn (2000)은 탄산은 리스테리아균의 억제에 효과적이라는 연구결과를 발표하였다. 홍석인 등은 (1994) 낮은 온도에서 발효된 김치는 탄산을 많이 함유하고 있다고 하였다.

부재료를 달리한 0도 발효 김치에서 *L. monocytogenes*의 억제 효과

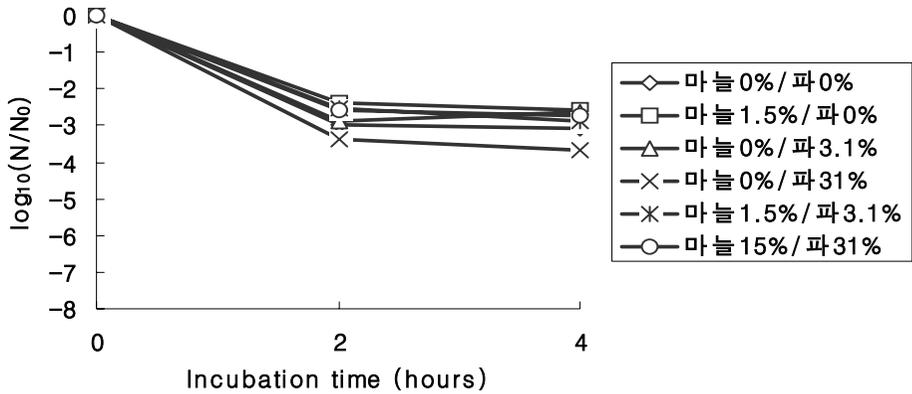


그림 39. 부재료를 달리하여 제조한 김치를 0도에서 발효 시킨후 *L. monocytogenes*의 억제 효과

부재료를 달리한 0도 발효 김치에서 *E. coli* O157:H7의 억제 효과

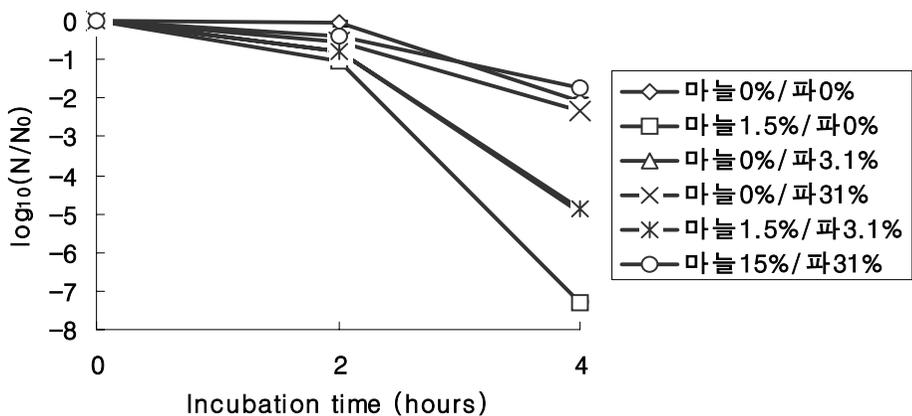


그림 40. 부재료를 달리하여 제조한 김치를 0도에서 발효시킨 후 *E. coli* O157:H7의 억제 효과

그러나 다른 식중독 균에서는 리스테리아균과 달리 약간의 억제되는 정도가 부재료의 조성에 따라 차이가 있었으나 패턴은 일정한 경향을 나타내지는 않았다. 단지 마늘과 파가 전혀 없거나 둘의 성분이 너무 많은 경우보다는 적절한 분량이 첨가되었을 경우에 억제 효과가 더 뛰어나다는 패턴을 20℃의 발효의 경우와 마찬가지로 확인되었다.

부재료를 달리한 0도 발효 김치의 *S. aureus*의 억제 효과

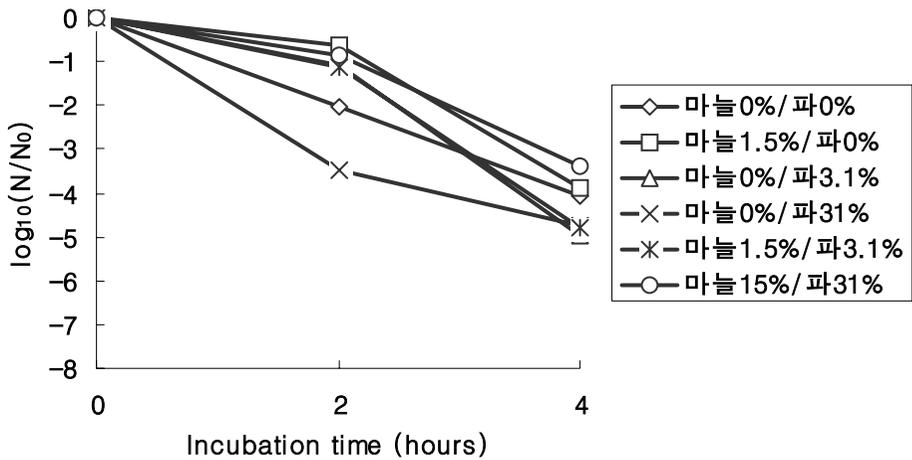


그림 41. 부재료를 달리하여 제조한 김치를 0도에서 pH 4.3까지 발효 시킨 후 *S. aureus*와 반응시킨 후의 억제 특성

부재료를 달리한 0도 발효 김치에서 *S. typhimurium*의 억제 효과

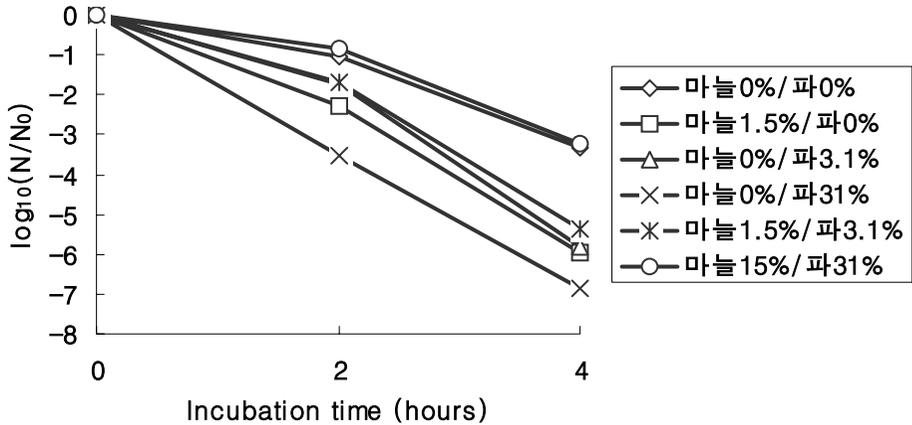


그림 42. 부재료를 달리하여 제조한 김치를 0도에서 pH 4.3까지 발효 시킨 후 *S. typhimurium*과 반응시킨 후의 억제 특성

나름대로 결론을 내려보면 일정한 패턴을 발견하기보다 *S. typhimurium*은 산도가 높은 김치에서 억제효과가 큰 것으로 판단된다. 따라서 부재료를 달리한 김치 자체의 효과보다는 발효를 돕는 방향에서 부재료가 역할을 하는 것으로 잠정 결론지을 수 있었다. 따라서 상기 실험을 통하여 부재료에 따른 효과를 통하여 차후에 마늘과 파와 같은 재료의 조성을 달리한 김치보다는 발효를 촉진하고 균의 활성을 높이는 방향으로 발효를 유도할 필요성이 있었다.

## 제 6 절 식중독 억제 인자 중 pH-산도-젖산균의 정량화

김치가 식중독균을 억제한다는 결과를 살모넬라균에 적용하여 보면 4시간 동안 김치와 반응이 된 경우를 기준으로 살펴보고자 한다. pH 4.3에서 살모넬라균에 거의 영향을 주지 않는다는 버퍼상의 실험결과 (그림 18)는 김치의 pH는 PBS 버퍼의 보호효과가 존재하기는 하지만 살모넬라균을 억제하는 데 큰 영향을 주는것은 아닌 것으로 판단된다. 산도는 0.4정도의 차이가 날 때 1 log 정도 차이가 난다는 것을 확인할 수 있다 (표 6). 또한 균의 유무에 따라서 1 log 정도의 차이가 존재한다는 위의 결과를 활용하면 김치는 젖산균을 함유하고 있고 적정산도가 일반적인 발효상태에서 pH 4.3 정도에 다다르면 이상태가 살모넬라균에 대해서는 4시간 적용시에 99% 정도를 억제한다는 사실을 확인할 수 있었다. 따라서 살모넬라 억제 기작은 pH보다는 산도에 초점을 맞추어 적용할 필요가 있으며 젖산균이 존재하는 발효 김치가 억제 효과를 낸다는 결론을 내렸다. 젖산균이 존재할 때 억제를 한다는 사실은 4시간 배양이 되면서 이들 젖산균이 계속 유기산과 같은 대사산물을 형성하지만 젖산균이 제거된 김치액은 대사물질 생산이 중단됨으로써 발생하는 것으로 사료되었다.

표 6. 발효 정도 및 젖산균의 유무에 따른 발효 김치에서 *S. typhimurium*의 억제정도

pH	산도	젖산균 존재	4시간후 김치 반응후 살모넬라균의 ( $\log_{10}(N/N_0)$ )값
4.8	0.58	W/O LAB	-1.50
		W LAB	-2.00
4.2	0.97	W/O LAB	-2.45
		W LAB	-1.00

## 제 7 절 발효 김치에 존재하는 미생물의 특성

### 1. 김치 발효시의 총균수 및 젖산균 수

다른 미생물이 존재할 때 식중독 균은 영양분에 대해 경쟁을 하므로 생육의 가능성이 낮아진다. 이를 확인하기 위해 김치의 발효중에 균수를 측정하였다. 총균수는 PCA 배지 (Difco)에서 젖산균 수는 식품공전의 BCP 배지를 이용하여 균수를 세었다. pH 4.3정도로 발효된 김치 4가지 모두에서 총균수 및 젖산균은  $10^9$ - $10^{10}$  CFU/ml 정도였다.

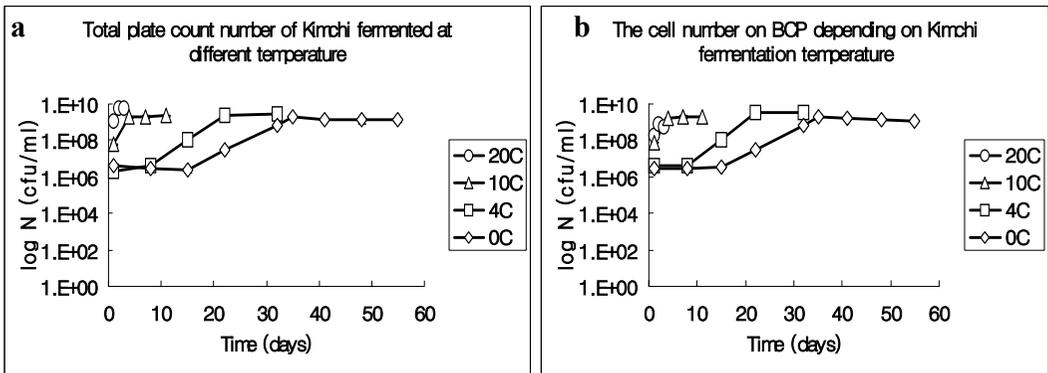


그림 43. 0, 4, 10, 20°C에서 발효진행중의 총균수 a) 및 젖산균 수 b)

### 2. 김치 균의 경시적 변화를 통한 균총 분석 및 미생물 동정

*Leuconostoc* spp., *Lactobacillus* spp., 그리고 *Streptococcus* spp.의 경시적 변화를 김치의 발효 온도별로 살펴보았다 (그림 44). *Pediococcus* spp.는 상대적으로 숫자가 미미하였다. 각 선택 배지별로 균의 경시적 변화를 발효 시간이 경과함에 따라 살펴본 결과 20°C에서 발효된 김치에서는 위 세가지 젖산균류가 모두 단시간에 한꺼번에 증식하였고 발효 온도가 낮은 0°C 발효 김치로 갈수록 젖산균류의 증식이 천천히 일어났으며 *Leuconostoc* spp.이 감소한 후에도 *Lactobacillus* spp.는 pH 4.3까지 적정숫자를 유지하였다. *Streptococcus* spp.는 다른 *Leuconostoc* spp.나 *Lactobacillus* spp.에 비해서 발효 온도에 따라 균의 숫자에 변화가 컸는데 저온에서 발효된 김치에서 높은 온도에서 발효된 김치보다 대체적으로 숫자가 낮았다.

발효 온도가 낮을수록 균의 증식이 천천히 일어났으며 PES agar에서 자란 균으로 0°C와 4°C에서 발효된 김치의 경우는 *Leuconostoc* spp.는 김치 pH 5 부근에서 최대치를 이루었고 그 이후에는 감소하는 경향을 보였다. MRS에서 자란 미생물은 총균수와 비슷한 수준으로 *Leuconostoc* spp와 *Streptococcus* spp.는 그보다는 낮은 분포를 이루었다.

이중에 20°C에서 발효된 김치에서 *S. typhimurium*의 저해에 효과적인 측면을 고려하여 20°C와 0°C에서 발효된 김치에 존재하는 젖산균을 동정하고자 생화학적 테스트를 거쳐 API CHL을 이용한 동정을 실시하였다.

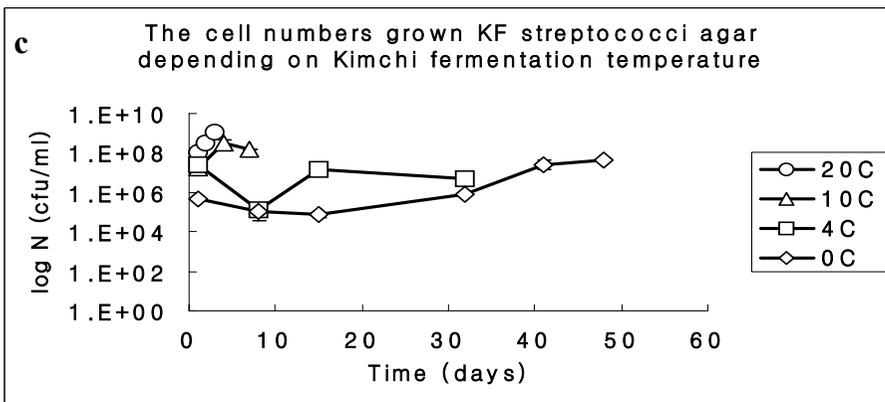
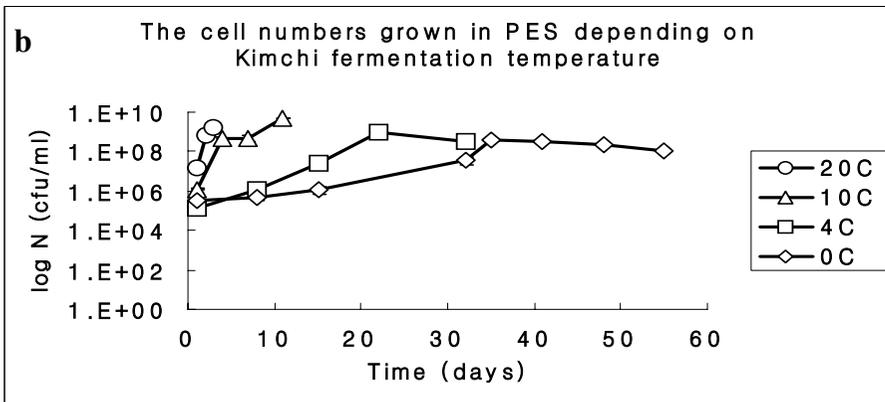
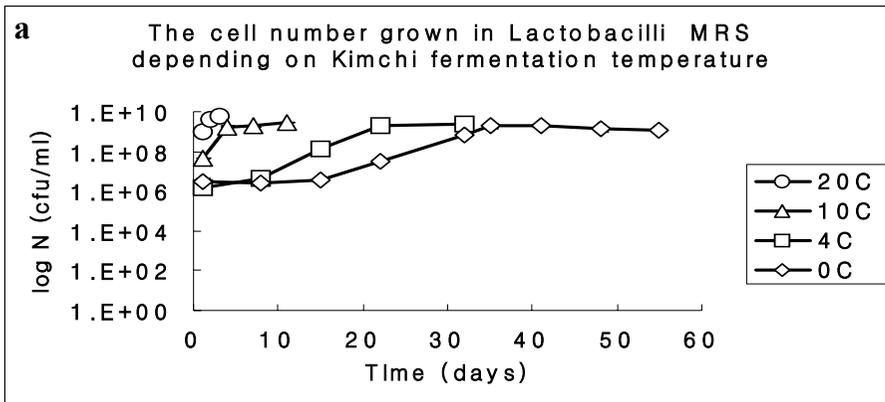


그림 44 김치의 발효 온도에 따른 발효중 *Lactobacillus* spp. a), *Leuconostoc* spp. b), *Streptococcus* spp. c)의 경시적 변화

## 제 8 절 장내 미생물, 김치 미생물에 대한 병원성 미생물 활성 분석

김치미생물로 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus plantarum*을 배양하고 장내 미생물로 *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus facium* 그리고 *Lactobacillus acidophilus*를 배양한 후 원심분리하여 배양 상등액을 버리고 각각  $10^9$  CFU/ml로 맞춘후 1:1로 *S. typhimurium*과 *L. monocytogenes*에 반응시킨 결과 미생물 자체만으로는 저해 효과가 거의 없음을 확인하였다 (Data not shown). 이는 배양 상등액을 버리지 않은 상태에서 식중독균과 반응하면 억제 효과가 있다는 결과와 차이가 있는 것으로서, 김치가 발효되면서 나오는 대사물질이나 생성되는 산 등 발효 산물에서 경쟁 미생물 자체보다 큰 것으로 판단되었다.

OD and pH of *L. mesenteroides* and *L. plantarum*

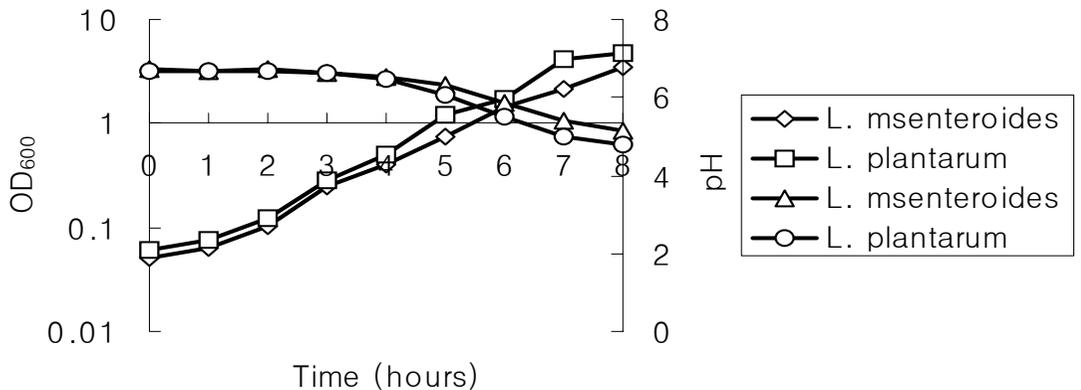


그림 45. 젖산균의 생육 상태에 따른 pH 변화

김치 주요 젖산균의 growth medium에서 증식 및 pH의 변화를 모니터링 하여 김치의 젖산균의 증식이 김치 환경에 어떤 영향을 주는지 살펴보았다. 김치 젖산균 균주 두가지의 생육을 MRS 배지 (pH 6.7) 에서 키운 상태에서 stationary phase에 이르렀을 때 pH를 측정하였다. *L. mesenteroides*는 8시간, *L. plantarum*은 7시간 후에 stationary phase에 이르렀으며 그때의 pH는 각각 5.15,

와 4.99 정도였다. 균이 exponential phase를 지나면서 pH가 낮아지기 시작하였다. 김치의 pH를 감소시키는 인자로는 젖산균이 생산해내는 유기산에 의한 pH의 감소를 들 수 있는데 stationary 초기의 pH가 pH 5 내외인 점은 김치의 적정 발효 pH 4.4에 비해 높은 편임을 알 수 있었다.

## 제 9 절 인체 시스템에 적합한 젖산균 선별

인체의 소화 시스템의 대표적인 위와 소장의 스트레스를 견딜수 있는 미생물을 발효 김치에서 선별하고자 본 실험에서 제조하고 발효시킨 김치에서 pH 2에서 생육하며 bile salt 1.5%에서 생육특성이 우수한 균주를 분리하였다. 산도에 강한 특성을 지닌 균주를 찾고자 20℃에서 pH 4.3까지 발효 시킨 김치에서 젖산균을 plating 한 후 이들 중 97 sample에서 MRS agar에 lawn을 만든후에 pH 2인 HCl solution을 20  $\mu$ l를 disc에 분주하고 살아남은 균주를 일차로 선별하였다. 이후에 이들 균주 lawn에 1.5% bile salt를 분주하여 살아남은 균주를 확보하고 동정하였다. API kit를 이용하여 확인한 결과 *Leuconostoc mesenteroides* 로 동정되었다.

## 제 10 절 인체 모델 시스템의 설계

### 1. Flow system 설계를 위한 인체의 소화 장 환경 영향 인자 선택

소화관은 입에서 항문에 이르는 거리가 약 9m의 관으로, 입 - 인두 - 식도 - 위 - 소장 - 대장 - 직장 등으로 되어 있으며 소화관은 각각 특별한 형태를 가졌지만, 소화관벽의 구조 점막, 차점막, 근육층, 장막층의 4층으로 되어있다. 소화관의 부속 소화기관으로는 침샘, 간, 이자(췌장) 등이 있으며, 각각의 도관을 통해 분비물이 소화를 돕는다.

구강에서는 저작, 연하의 과정을 통해서 음식물이 분쇄되어 침과 섞이고 연하과정에서 식도를 통해 위로 들어간다. 침은 하루에 1-2리터 분비되며 식사때에 주로 분비되나 식사와 관계 없이도 15 ml의 일정량이 분비된다. 침(saliva)에는 ptyalin이라고하는 아밀라제가 있어 가용성녹말을 포도당과 엿당으로 가수분해한다.

위액은 염산과 점액 효소의 혼합액이다. 위액의 하루 분비량은 1-2리터이며 pH는 1-2 정도이나 음식물이 들어오면 pH가 상승한다. 주세포에서 분비되는 pepsinogen은 위액(염산)에 의해 활성화되어 pepsin으로 된다. Pepsin은 단백질을 protease와 peptone으로 가수분해하여 소화한다. 뮤신은 기관의 보호 및 소화운동의 윤활제 역할을 하고, 위점막뮤신은 위산과다와 위궤양 치료에 사용된다.

소장에서는 수축과 이완을 반복하여 일어나는 분절운동에 의해 소화액과 잘 혼합하도록 하고 연동운동에 의해 음식물을 아래쪽으로 운반한다. 소장은 배의 오른쪽에서 대장과 연결된 5~6m의 기관으로, 상부에는 십이지장(약 25cm),공장(소장의 약 2/5를 차지)으로 나누어지고, 회장이 이어져있다. 탄수화물은 췌장에서 분비되는 아밀라제에 의해 이당류까지 소화된다. 단백질은 췌장액중의 단백질 분해효소인 trypsin, chymotrypsin, carboxypeptidase등은 모든 단백질을 peptone 및 protease로 분해, 이들은 dipeptide로 분해하며 dipeptide를 각각의 아미노산으로 분해한다. 지방은 십이지장에서 담즙산염이 지방분자의 큰 집합체를 유화하여 지방분자를 분리하며 췌장에서 분비된 리파아제는 각각 지방분자를 지방산과 glycerol 및 glyceride로 분해된다.

한편 췌장(pancreatic secretion)에서의 소화를 살펴보면 췌액은 고농도의 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>을 함유함으로써 위에서 넘어온 음식물의 산도를 중화시켜 염산이나 펩신에 의한 십이지장 점막의 손상을 방지하고, 알파-아밀라제, 리파아제, 트립신과 같은 주요 소화효소를 다량 포함하고 있기 때문에 타액이나 위액속의 효소와는

달리 정상적인 소화 및 흡수에 결정적인 역할을 한다. 담즙은 담즙색소 및 담즙산염, 콜레스테롤, lecithin 및 무기염 등을 포함하는 알칼리성 액체로 하루 0.5-0.8 L를 분비한다. 인체의 실제 장환경을 simulation하고자 각 소화 장기에서 대표적 특징을 표 과 같이 선별하였다.

표 7. 인체의 소화 시스템의 특징

소화기관	소화액	pH	하루 분비 양	식사한끼의 통과시간
구강	아밀라아제, 침, lysozyme	7	1-2 L	10-30 min
위	위산, pepsin	1-2	1-2 L	2-4 h
췌장분비물	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , 담즙, 색소, 무기물질, 아밀라제, trypsin, lipase		0.5-0.8 L	
소장	invertase, maltase, lactase dipeptidase, aminopeptidase, phosphatase	6.5	1.5 L	4-9 h

이중에서 소화효소는 위에서는 pepsin을 선정하고 pH는 위산의 주성분인 HCl로 맞추도록 하였다. 소장에서는 trypsin과 pancreatin을 소화효소로 하고 pH를 중화시키는 NaHCO<sub>3</sub>와 장내 미생물이 생육에 살아남을 수 있는지를 가늠하는 bile salt를 주요 factor로 선정하였다. 미생물의 생육 영향인자를 주요 factor로 선정하여 인체 소화 장 모델을 설계하였고 소장까지 도달한 식중독 균이 식중독을 일으키므로 소장 이하 조건의 시스템은 생략하였으며 소장의 분비물인 장액은 고려하지 않았다. 시뮬레이션 설계 조건은 다음과 같이 수립하였다.

## 2. 장내 미생물 선정

장내 미생물을 조사한 결과 사람의 위에는 건강한 사람의 경우 미생물이 거의 없으며 소장의 경우는 10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup> CFU/ml 정도의 Streptococcus spp.와 Lactobacillus spp. 가 주종을 이루고 있다고 보고되어 있으며 한국식품연구원에서 분양받은 균주를 사용하였다.

## 3. 장모델 flow system 설계 및 제작

인체 모델 시스템은 인체의 소화기관의 특징을 조사하였으며 대표적 특징

을 선별하여 네델란드 TNO Nutrition and Food Research에 있는 stomach and intestinal model과 벨기에의 SHIME, 그리고 미국의 DePaola의 소화 시스템의 조건을 이용하여 설계하였다.

식중독 균은 소장에서 문제를 일으키므로 사람의 입, 위, 소장의 조건을 설정하고 이를 재현하는 시스템을 설계하고 제작하였다. 인체의 소화액은 모두 Sigma 제품을 사용하였고 Peristaltic pump를 통하여 유속을 조절하고 식품 및 소화액, 산, 알칼리를 주입하였고 pH는 pH controller를 이용하여 모니터링 할 수 있도록 설계하였다. 소화효소액은 주로 균을 대상으로 하였기 때문에 지방분해 효소와 전분분해 효소를 배제하고 단백질 분해 효소를 중심으로 구성하였다.

Flow system으로 인체의 입, 위장, 소장의 조건을 제작하고 장 미생물의 생육 조건에 맞는 환경 시스템을 아래 그림과 같이 제작하였다. 기체의 조성은 조건에 따라 호기성, 혐기성, 혹은 microaerophilic 기체 조성을 가진 소켓을 이용하여 유지할 수 있도록 설계하였다. 그러나 위와 소장의 초기 부분은 소량의 공기가 함유되어 있으며 대부분의 실험에 사용한 균주가 호기성 혹은 통성혐기성임을 고려하여 공기조성을 조절하지는 않았다. 5개의 펌프와 각각 소화장치에서 분비하는 소화효소, pH 조절 시약, 그리고 소화시 분비되는 액을 같이 공급할 수 있도록 시스템을 설계하였고 음식물과 잘 섞일수 있도록 magnetic stirrer를 이용하여 교반하고 온도 유지는 water bath를 통해 이중 vessel 사이로 공급되어 온도가 유지되도록 하였다.

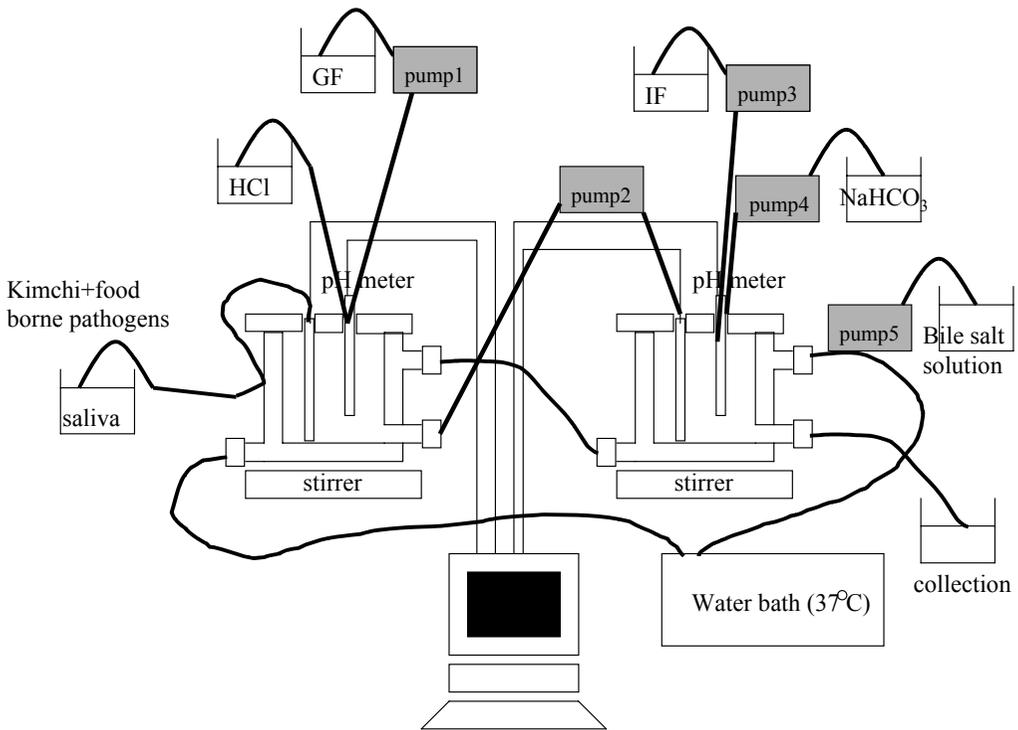


그림 46. 장 모델 시스템의 모식도

#### 4. 영양분 배합 조건 설정 및 미생물 분포 유지를 위한 영양분의 양과 공급 속도

온도는 37°C water bath로 이중 유리 vessel을 향한 유지 시키고 마그네틱 stirrer를 이용하여 150 rpm의 속도로 계속 교반하였다. pH 변화는 컴퓨터를 통하여 모니터링을 하였으며 입에서 침과 교반된 식품 샘플과 미생물을 위와 소장의 조건을 나타내는 vessel을 통과시켜 반응된 샘플액을 얻어서 미생물을 분석하였다. 구체적인 조성, 공급량과 유속 및 반응 시간 설정은 아래의 표와 같다.

표 8. 인체 모델 시스템의 구성, 공급량, 반응시간, 펌프 유속

공급 펌프	샘플명	조성	부피	시간	공급 유속
	Kimchi solution	Kimchi juice	50 ml		
	Food borne pathogens	1 ml of 10 <sup>9</sup> CFU/ml	1 ml		
	Saliva	6.2g NaCl, 2.2g KCl, 0.22g CaCl <sub>2</sub> , 1.2g NaHCO <sub>3</sub> , 1L DW	50 ml		
	HCl	1 N (pH 2)		10분마다 측정	
Pump 1	GF(gastric fluid)	0.1g pepsin, 3.5g mucin, 8.5g NaCl, 1L DW pH 2.0	39.6 ml	for 2 hours at 150 rpm	0.33 ml/min
Pump 2	GC-IC	empty-transfer	144 ml	for 2 hours	1.2 ml/min
Pump 3	IF(intestinal fluid)	0.1g trypsin, 3.5g pancreatin, 1L DW	79.2 ml	for 4 hours	0.33 ml/min
Pump 4	0.3 M NaHCO <sub>3</sub>	(pH 6.5)	19.8 ml	초기 1시간	0.33 ml/min
	0.1 M NaHCO <sub>3</sub>		59.4 ml	나머지 3시간	0.33 ml/min
Pump 5	4% bile salt	7ml 실험전혼합	15 ml	처음 30분	0.5 ml/min
	2% bile salt		105 ml	나머지 3.5시간	0.5 ml/min
	IC	10 <sup>9</sup> CFU/ml Streptococcus spp. Lactobacillus spp. (MRS broth)	2 ml	4 hours at 150 rpm	

### 5. 인체 모델 시스템과 장환경 비교

생화학적 환경은 탄수화물 분해 효소와 지방 분해 효소를 제외하고 분비물의 조건은 상당 일치한다. 분절운동과 연동운동의 조건은 맞추지 못하였으나 마그네틱 stirrer를 이용하여 음식물과 효소 및 분비액과 섞어주도록 하였다. 소화관벽은 이중벽 유리 반응기를 이용하여 water bath를 연결하여 온도를 37°C로 유지하여 인체의 온도 환경을 맞추었다.

특히 미생물의 생육에 가장 중요한 인자로 온도, pH, 소화액중 단백질 분해 효소, 미생물이 장까지 도달하는데 받는 큰 스트레스 인자인 위산과 담즙산의 조건을 실제와 거의 같도록 설계 하였으며 유속을 실제 식품의 섭취, 소화 시간에 맞도록 설정하였다.

이번에는 이상적인 경우 인체의 위장에는 균이 존재하지 않으며 소장에는  $10^2$  cells/g 정도가 존재한다는 가정하에서 식중독균이 생육하여 소장에까지 이르렀을 때 젖산균의 존재가 이들 균의 억제에 어떤 영향을 주는지 살펴보고자 2시간까지 반응시킨후에 식중독균이 감소되는지 여부를 살펴보았다. 살모넬라와 리스테리아의 경우 모두에서 이들 균의 dose와 반응하였을때는 균의 생육 증가 및 감소에 영향을 주지 않는 것으로 파악되었다 (표 9). 이 결과를 토대로 인체 장 모델 시스템에 젖산균은 공급하지 않고 실험을 실시하였다.

표 9. 젖산균이  $10^2$  cells/g이 존재할 경우에 살모넬라와 리스테리아균의 생육에 미치는 영향

	존재하는 장내균	0h	1h	2h
<i>S. typhimurium</i> 균수 변화	Streptococcus spp	6.27 ± 0.02	5.95 ± 0.07	6.15 ± 0.21
	Lactobacillus spp	6.12 ± 0.35	6.31 ± 0.06	6.31 ± 0.08
<i>L. monocytogenes</i> 균수 변화	Streptococcus spp	5.31 ± 0.10	5.27 ± 0.09	5.20 ± 0.14
	Lactobacillus spp	5.38 ± 0.07	5.25 ± 0.10	5.23 ± 0.02

## 6. 장모델 조건 설정을 위한 김치 및 식품 적용

Vessel 1과 vessel 2의 각각의 모든 소화액 주입 관을 연결 한 후 고압멸균(121℃, 15분)하여 충분히 건조시켜 물기를 제거한 다음 pH controller 기기와 연결되어 변화를 모니터링하였다. 인체 모형 가동시 vessel 1을 입속 조건으로 맞추기 위하여 Saliva(NaCl 6.2g, KCl 2.2g, CaCl<sub>2</sub> 0.22g, NaHCO<sub>3</sub> 1.2g/L)와 시료를 1:1로 섞어준 후 약 2분 정도 교반하여 침과 음식물이 섞이도록 하였다. 입을 지난 후 위장의 조건으로 맞추어 주기 위하여 vessel 1에 0.1N HCl과 GF(gastric fluid, pepsin 0.1g, mucin 3.5g, NaCl 8.5g/L, pH 2로 조정)를 주입하였다. 0.1N HCl은 위장의 조건을 가급적 신속하게 맞추어 주기 위하여 투입되며, 이는 10분안에 약 pH 2에 도달하도록 하였으며, 정해진 pH로 내려간 시점에서는

0.1N HCl pump가 자동으로 멈추게 된다. GF는 39.6mL을 제조하여 2시간 동안 주입되도록 하였으며, 2시간 동안의 위장의 소화를 끝낸 후 시료를 1mL 취하여 plating 하도록 한다.

Vessel 1의 2시간 과정이 끝난 후 시료는 자동으로 vessel 2로 이동하며 이동시간은 10분 이내로 신속하게 이동하도록 하였다. 소장에서는 IF(trypsin 0.1g, pancreatin 3.5g/L), 4% bile salt, 0.1M NaHCO<sub>3</sub>이 주입된다. 이때 4% bile salt은 실험 전에 미리 IC에 7mL 주입해 놓으며, 각각의 주입량은 IF 39.6mL, 4% bile salt는 37.5mL이다. 0.1M NaHCO<sub>3</sub>은 소장의 pH 조건을 신속하게 맞추어 주는 것으로 10분 이내에 약 pH 6.5에 도달하도록 하였다. IC를 통해 소화된 시료는 2시간 후 1mL 취하여 plating함으로써 균수를 확인하였다.

## 7. 장모델 식중독균 접종시 생육

우선 김치를 적용하는 시스템의 조건을 맞추고 적합성 테스트를 위하여 김치액을 주입하여 pH의 변화를 모니터링하였다. 발효 적속기인 pH 4.3인 김치를 대상으로 실시한 결과 20분 만에 pH가 2에 도달하고 vessel 2인 소장의 시스템으로 들어간지 10분만에 pH는 소장의 pH에 도달하였다 (표 10).

장모델의 pH 변화에 대한 식중독균의 생육 정도를 알아보기 위하여 시료 대신 PBS(pH 4.3)를 사용하여 PBS와 saliva를 1:1 섞은 후 여기에 overnight culture한 *Salmonella typhimurium* 1mL를 centerifuge하여 배지를 제거하고 0.85% 생리식염수로 washing하여 장모델에 1% 접종하도록 하였다. 살모넬라균을 주입하여 실험을 실시한 결과 pH 변화는 주입 20분 이내에 pH 2를 유지하였고 소장 환경에서는 30분 정도 소요되자 pH 6.5에 도달하였다. 접종하기 전 0시간, 장모델 소화 과정 개시 후 2시간, IC 후 4시간의 생균수를 조사하도록 알아보았다.

pH 변화 추이는 다음과 같이 예상 pH에서 크게 벗어나지 않았다. 리스테리아균의 생육을 알아본 결과 0시간의 7.88 log cycle의 균수가 2시간 후에 사멸되었고, 재실험으로 10분 단위로 생균수 측정한 결과 0시간의 7.90 log cycle의 균수가 10분 안에 사멸하였다. 이는 살모넬라균에서도 같은 결과를 보여 pH 2의 위장에서의 식중독 균이 사멸하였다 (Data not shown)..

표 10. 발효 김치 적용시 장모델의 pH 변화

Vessel1(위)		Vessel 2(소장)	
시간(min)	pH	시간(min)	pH
0	4.19	120	2.18
10	3.03	130	5.07
20	2.18	140	6.30
30	1.99	150	6.44
40	1.99	160	6.53
50	1.99	170	6.53
60	1.99	180	6.53
70	1.99	190	6.53
80	1.99	200	6.53
90	1.99	210	6.53
100	1.99	220	6.53
110	1.99	230	6.53
120	1.99	240	6.53

표 11. 김치와 살모넬라를 적용한 후의 장모델 pH 변화

Vessel1(위)		Vessel 2(소장)	
시간(min)	pH	시간(min)	pH
0	4.93	120	2.19
10	3.39	130	5.95
20	2.28	140	6.17
30	2.03	150	6.28
40	2.02	160	6.40
50	2.02	170	6.49
60	2.02	180	6.55
70	2.02	190	6.56
80	2.02	200	6.55
90	2.02	210	6.57
100	2.02	220	6.58
110	2.02	230	6.58
120	2.02	240	6.58

HCl 주입량이 많아 균이 추가되어도 pH가 감소하는데 큰 영향을 주지 않았다. 여기에 식품의 효과를 보기 위하여 햄버거용 패티를 적용하였을 경우에는 적용 초기에는 김치 혹은 김치와 균을 같이 투입한 경우보다 pH의 감소되는 정도는 완화되었으나 20분이 지나자 pH는 2에 가까이 도달하였다 (표 12). 식품의 적용량이 많지 않고 튜브의 두께로 인하여 마쇄하여 들어가서 식품의 보호효과를 확인하기 어려웠다.

표 12. 고기 패티 적용 후 장 모델 pH 측정

Vessel 1(위)		Vessel 2(소장)	
시간(min)	pH	시간(min)	pH
0	7.20	120	2.24
10	4.20	130	6.16
20	2.20	140	6.48
30	2.15	150	6.61
40	2.13	160	6.69
50	2.12	170	6.72
60	2.11	180	6.75
70	2.10	190	6.76
80	2.09	200	6.77
90	2.09	210	6.77
100	2.08	220	6.78
110	2.07	230	6.78
120	2.06	240	6.78

그러나 이 실험 조건에서는 인체 장 모델 시스템의 pump 주입 시스템의 소화액 주입 속도를 맞추고자 설정한 tube의 직경이 작아 고형물을 주입할 수 없어서 실제 같이 섭취하는 식품의 효과를 완전히 반영할 수가 없어서 실제 식품 부피에 의한 식품 내부에 존재하는 균의 보호효과 및 김치의 섬유질을 같이 섭취하여 인체의 소장까지 도달할 때에 병원성균이 장에 부착하는 것을 막는 김치의 성질 등을 규명하기 어려운 문제점이 있었다.

## 제 11 절 김치의 병원성 미생물 제어의 최적 조건 설정

김치의 발효중 pH가 낮고 산도가 높을수록 대체적으로 위의 실험한 식중독 균에 대해 저해도가 큼을 알 수 있었다. 그러나 김치의 특성상 발효가 과도하게 진행되면 관능적인 문제가 발생하여 상품성이 떨어지므로 적절한 발효의 진행이 요구된다. 그러나 인체의 온도와 동일 조건인 37°C에서 위장에서 최소 반응되는 두시간 그리고 소장중 상단 부분에 도달하는데 중간 시간을 설정하여 4시간까지 반응시킨 결과 인체내 병원성 미생물이 맞는 가장 큰 스트레스 인자인 위산과 담즙산의 조건이 없이도 대부분 2 log reduction 이상 (99% 사멸) 의 큰 저해를 *S. typhimurium*에 대해서 확인할 수 있었다. 무엇보다도 *V. parahaemolyticus*에 대해서는 적숙 발효로 설정하는 pH 4.3 정도의 김치에서 바로 김치와 반응하자마자 6 log 이상 (99.9999%)의 저감화가 이루어짐을 최초로 확인하였다. 식품에 식중독 균이 존재할 때 특정 dose 이상일때 식중독이 발생한다는 사실을 고려하면 6 log reduction은 이미 김치를 섭취하면서 대단한 식중독 제어 능력을 보여준다는 것을 알 수 있다.

게다가 발효 온도별로 확인한 바에 따르면 같은 발효 pH라 할지라도 높은 온도인 20°C에서 발효된 김치와 김치 냉장고의 보관 온도인 낮은 0°C에서 발효된 김치의 경우 산도가 다르고 이는 산도에 민감한 *S. typhimurium*의 경우 고온의 발효된 김치가 제어에 효과적임을 확인하였다. 한편 낮은 온도에서 발효된 김치는 상대적으로 낮은 유기산 함량을 보임에도 불구하고 저온 식품에서 식중독을 야기하는 *Listeria monocytogenes*의 제어에 효과적이어서 발효 온도에 따라서 김치가 효과적으로 제어할 수 있는 균이 다름을 확인하였다. 한편 *S. aureus*와 *E. coli* O157:H7의 경우 발효 온도에 따라 특징적인 변화는 없었으나 장시간 김치와 반응하였을 때 사멸정도가 증가하여 발효된 김치 자체가 이들 식중독균의 제어에 효과적임을 아울러 확인하였으나 Gram +균인 *S. aureus*와 *B. cereus*에 대해 저해 효과가 상대적으로 Gram -균에 비해 낮았다.

한편 김치의 부재료를 crude extract로 만들어 식중독 병원성 균에 적용하였을 때 재료 자체에서 가장 큰 항균 활성을 나타내는 재료는 마늘이었다. 마늘은 적용한 모든 식중독 균에 대해서 항균 활성을 나타냈으며 예상외로 생강은 항균 활성을 확인하지 못하였다. 그러나 파는 일부 Gram + 균 (*S. aureus*와 *B. cereus*)에 대해 약간의 항균 활성을 나타내어 김치가 발효되기전 김치 제조 초기에는 김치 자체에서 저항력이 높은 Gram + 식중독균의 제어에 부재료 파의 보강은 이들 식중독 제어에 효과를 줄 수 있을것으로 기대되었다. 그러나 발효가 진행된 상태에서 측정된 김치의 항균력은 부재료의 조성보다는 젖산균의 증식, 젖산균이 생산하는 유기산, 그리고 탄산이 함유되는 적절한 발효 조건이 얼마만큼

빨리 진행되느냐가 관건으로 파악되었다.

표 4는 상기 실험 조건에서 식중독 균별로 제어 정도를 나타내었고 제어 능력을 극대화 시킬 수 있는 인자를 정리하였다.

표 13. 식중독균 제어 김치의 조건 확립

식중독 균	발효김치 제어정도	제어의 조건
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++++	발효 김치, 낮은 pH
<i>S. typhimurium</i>	++++	높은 온도에서 발효된 김치 산도(유기산)가 높은 김치 젖산균 함량이 많은 김치
<i>L. monocytogenes</i>	++	낮은 온도에서 발효된 김치 탄산 함유량이 높은 김치 젖산균 함량이 많은 김치
<i>E. coli</i> O157:H7	+++	마늘의 성분이 유지된 김치 발효 김치
<i>S. aureus</i>	++	마늘, 파의 성분이 유지된 김치 발효 김치
<i>B. cereus</i>	+	마늘, 파의 성분이 유지된 김치

## 제 12 절 식중독 제어 김치 제조

### 1. 발효 온도 조절 김치 제조 방법

발효 온도를 0도에서 20도 사이로 조절하면서 살모넬라를 제어하기에 적합한 김치는 20도에서 발효를 시킨후에 낮은 온도에서 보관하면 생성된 높은 산도를 이용하여 살모넬라 균이 제어되고 리스테리아균을 제어하기에 적합한 김치를 제조하기 위해서는 오랜 시간이 소요되더라도 낮은 온도에서 발효 시킨 김치가 적합하다.

### 2. 부재료 조성 조절 김치 제조 방법

살모넬라와 리스테리아 제어를 위해서는 전반적으로 마늘과 파의 조성을 마늘은 전체 김치 무게 대비 1-10% 이내, 파의 조성은 1-20% 이내로 하여 발효를 촉진하고 이를 통하여 발효 김치에서 억제되는 능력을 증대시킬 수 있다.

### 3. 스타터 김치 제조

다음과 같이 4가지 김치를 제조하였다. 부재료로서 1%의 참쌀풀 첨가 김치와, 20도에서 발효를 완료 시킨후 4도에서 저장한 김치와 마지막으로 실험에서 분리한 젓산균 *Leuconostoc* spp.를 0.02% (w/w) 첨가한 김치를 제조하고 4도에서 발효를 시키면서 발효를 진행시키고 식중독 제어능을 인체 소화 모델 시스템을 이용하여 검증하였다.

아래는 pH와 산도의 변화를 모니터링한 결과이다. 20도에서 발효 시킨 김치는 9일만에 발효가 완료되었고 다른 김치는 36일 정도 시간이 지난후 적숙기에 이르렀다. 실험시 적정 산도는 대략 0.6-1.0 사이였다.

표 14. 스타터 김치의 pH 변화 (1% 찹쌀풀 첨가 김치 및 20도 발효 후 4도 저장 김치와 비교)

	A	B	C	D
pH	control	1% 찹쌀풀	20도 발효	젖산균
1일	5.64	5.79	5.78	5.85
9일	5.70	5.78	4.24	5.86
16일	5.77	5.81	4.03	5.75
22일	4.87	5.52	4.09	4.85
29일	4.34	4.69	4.08	4.25
36일	4.26	4.29	4.09	4.21

표 15. 스타터 김치의 산도 변화 (1% 찹쌀풀 첨가 김치 및 20도 발효 후 4도 저장 김치와 비교)

	A	B	C	D
Acidity	control	1% 찹쌀풀	20도 발효	젖산균
1일	0.30	0.30	0.32	0.29
9일	0.38	0.34	0.87	0.33
16일	0.33	0.31	0.93	0.33
22일	0.51	0.38	1.09	0.49
29일	0.74	0.65	1.08	0.77
36일	1.35	1.10	1.74	1.30

발효가 완료되었을 때의 젖산균수를 측정 한 결과는 B인 경우가 가장 많았고 그 다음엔 D, C, A의 순서였다. B는 최종 순간에 발효가 지속된 시간이 많아서 증식에 유리하였으며 D는 젖산균을 starter로 넣은 경우로서 젖산균 수에서 우위를 보였다. D는 A에 비하여 10배 가량의 젖산균 수가 많았다. 한편 균을 접종한 김치의 경우는 조직감이 뛰어나고 아삭아삭하는 특성이 커서 연화를 막는 방법의 하나로서 활용될 수 있을것으로 기대되었다(Data not shown).

이상의 실험결과에서 장모델에 적용하여 식중독균 억제 능력을 살펴본 결과는 다음과 같다. 일단 *Salmonella typhimurium*은 김치에 적용되어 장모델을 통과하면 2시간 지난 vessel 1에서 전혀 균이 나타나지 않아 장모델의 위 환경에서는 7 log CFU/g 범위에서 살아남는 균이 없음 확인하였다 (표 16). 한편 *Listeria monocytogenes*의 경우는 control 김치에서는 4시간 반응 후에 <10

CFU/g이 나타남에 반하여 젖산균 starter를 첨가한 김치에서는 4시간 반응 후에 살아남은 colony가 나타나지 않아 *Listeria monocytogenes*가 억제가 더 많이 됨을 확인하였다.

살모넬라균은 장 모델에서 4시간 반응 한 이후 모든 샘플에서  $10^7$  CFU/g 이상이 모두 사멸하여 효과를 비교할 수 없었다. 발효 김치의 살모넬라 억제능을 보여주었다. 대조군인 김치와 0.02% *Leuconostoc* spp.가 접종된 김치의 발효 시간은 같았으며 동시에 발효된 김치의 pH 와 산도도 차이가 거의 없었다.

표 16. 인체 모델 시스템을 이용하여 평가한 김치 대조군 (Kimchi A)와 스타터 0.02%를 첨가하여 제조한 김치(Kimchi D)의 식중독균 제어 능력

		0h	2h	4h
		log <sub>10</sub> (N/N <sub>0</sub> )		
Kimchi A (control)	<i>S. typhimurium</i> (4.55/0.650) <i>L.</i>	0	N. D. (-7이상)	N. D. (-7이상)
	<i>monocytogenes</i> (4.22/0.833)	0	-3.70	-4.54
Kimchi D (0.02% starter)	<i>S. typhimurium</i> (4. 39/0.738) <i>L.</i>	0	N. D. (-7이상)	N. D. (-7이상)
	<i>monocytogenes</i> (4.21/0,845)	0	-4.32	-5.2

이번에는 젖산균 농도를 10배로 올려서 접종하고 김치에 미치는 영향을 살펴보았다. 김치에서 분리한 균주가 김치의 관능적 특성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대조구와 김치에 starter 0.2% 첨가한 김치를 숙성시킨 다음 관능평가 한 결과는 표 17에 나타나 있다. 김치가 발효되어 pH 4.2-4.4, 산도 0.6-0.8의 적정김치로 숙성되는데 김치 A (대조구)는 8일, 김치 B(처리구)는 4일의 시간이 걸렸다. 김치 A, B는 숙성 전후로 김치 고유의 냄새, 상큼한 냄새, 풋내, 상큼한 맛, 신맛에서 유의적인 차이를 나타내었으며, 군내, 짠맛, 쓴맛, 이미는 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 김치 A는 숙성 후 김치 고유의 냄새, 상큼한 냄새, 매운맛에서 가장 높은 수치를 나타내어 김치의 전형적인 항목에서 좋은 평가를 받

은 반면에 짠맛, 쓴맛, 이미, 조직감에서 가장 저조하게 나타났으며, 전반적인 기호도에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 김치 B는 숙성 후 A에 비해 김치 고유의 냄새, 상큼한 냄새, 풋내, 매운맛, 짠맛, 상큼한 맛, 신맛에서 낮은 수치를 나타내었다. 그러나 이취, 단맛, 감칠맛, 이미, 조직감, 전반적인 기호도에서 높은 평가를 받았으며, 특히 A는 숙성 후 이취가 유의적으로 증가한 반면에 B는 숙성 전후 큰 차이를 보이지 않았다. 이를 통해 김치 B는 starter의 첨가로 인해 연부 현상을 일으키지 않아 조직감은 A에 비해 나은 결과를 나타내었다. 결과적으로 김치에 starter를 적절히 첨가하면 김치의 산패억제와 연부현상을 억제하여 김치의 가식기간을 연장할 것으로 사료된다.

표 17. 0.2%스타터 첨가 김치와 대조구의 발효 상태에 따라 실시된 관능평가 결과 (10°C 발효 A: control 발효 초기, RA: control 발효 적숙기, B: 스타터 첨가 발효 초기, RB: 스타터 첨가 발효 적숙기)

	kimchi flavor	fresh flavor	green flavor	moldy flavor	off flavor	hot taste	salty taste	fresh taste
A	6.167 <sup>b1)</sup>	7.103 <sup>ab</sup>	8.267 <sup>a</sup>	2.333 <sup>a</sup>	2.500 <sup>b</sup>	6.233 <sup>b</sup>	6.667 <sup>a</sup>	4.433 <sup>b</sup>
RA	9.733 <sup>a</sup>	8.700 <sup>a</sup>	4.633 <sup>b</sup>	3.900 <sup>a</sup>	4.200 <sup>a</sup>	7.667 <sup>a</sup>	7.900 <sup>a</sup>	6.500 <sup>a</sup>
B	6.333 <sup>b</sup>	6.400 <sup>b</sup>	8.233 <sup>a</sup>	2.533 <sup>a</sup>	3.033 <sup>ab</sup>	6.033 <sup>b</sup>	7.033 <sup>a</sup>	4.433 <sup>b</sup>
RB	8.800 <sup>a</sup>	7.767 <sup>ab</sup>	5.300 <sup>b</sup>	3.533 <sup>a</sup>	3.800 <sup>ab</sup>	6.833 <sup>ab</sup>	6.567 <sup>a</sup>	7.633 <sup>a</sup>

	sour taste	sweet taste	savory taste	bitter taste	off taste	texture	overall acceptability
A	2.267 <sup>b</sup>	3.767 <sup>b</sup>	4.966 <sup>b</sup>	3.067 <sup>a</sup>	2.931 <sup>a</sup>	8.333 <sup>a</sup>	4.767 <sup>ab</sup>
RA	8.567 <sup>a</sup>	4.433 <sup>ab</sup>	6.000 <sup>ab</sup>	4.500 <sup>a</sup>	4.300 <sup>a</sup>	6.367 <sup>b</sup>	4.833 <sup>ab</sup>
B	2.400 <sup>b</sup>	4.300 <sup>ab</sup>	4.867 <sup>b</sup>	3.400 <sup>a</sup>	3.138 <sup>a</sup>	8.100 <sup>a</sup>	4.500 <sup>b</sup>
RB	7.933 <sup>a</sup>	5.467 <sup>a</sup>	6.833 <sup>a</sup>	3.933 <sup>a</sup>	3.700 <sup>a</sup>	8.567 <sup>a</sup>	5.433 <sup>a</sup>

A: control Kimchi, RA: ripened control Kimchi(A), B: Kimchi added in *Leu. mesenteroides*, RB: ripened Kimchi(B)

<sup>1)</sup> Means with the same letter in each column are not significantly different(P<0.05)

#### 4. 유기산 강화 김치 제조

*Salmonella typhimurium*을 억제하기 위해서는 유기산이 많아 산도가 낮은 김치가 억제하는데 효과적인 결과를 적용하여 유기산 강화를 위해 다양한 식초를 적용하여 관능에 영향을 주지 않거나 저해하지 않는 범위의 농도를 확정하고 식초 원재료를 선별하여 김치를 제조하고 식중독균 제어 효과를 비교하였다. 발효가 된 김치에 유기산에 침지하여 담근 김치의 항균능력을 측정하였다. 적숙기 이전의 김치 (pH 4.4-5.0)를 세척한 후에 3가지의 식초를 이용하여 중량을 1(김치):2(식초)가 되도록 하였다. 와인식초와 사과식초는 산도가 세어서 10배 희석하여 사용하였다. 식초에 2시간 침지한 후 잉여 유기산을 제거하여 김치를 준비하였다. 30분간 살모넬라균을 김치를 같은 액에 적용한 후에 제어되는 정도를 표 18에 나타내었다. 10배 희석을 하였음에도 와인 식초와 사과 식초에서 높은 산도 값을 나타냈으며 30분간 각 식초에 적용되었을 때 *Salmonella typhimurium* 수는 사과식초에서 가장 높게 나타나 와인식초와 사과식초는 5 log CFU/g 가까이 감소 효과를 보였고 사과식초는 5.85 log CFU/g이 나타나 균수를 억제하는데 탁월하였다. 비브리오균은 이 모든 실험에서 김치에 닿자마자 사멸하여 처리군간의 비교를 할 수 없었다.

표 18. 발효김치 세척후 다양한 식초에 적용된 후의 pH, 산도 및 30분 적용후의 초기 균수에 대한 *Salmonella typhimurium* 수의 변화

sample	pH	Acidity	30분 후의 log <sub>10</sub> (N/N <sub>0</sub> ) 변화
Control	4.73	0.51	0.12
10배 희석 와인식초	4.16	2.34	-4.94
오미자음료	4.54	0.48	0.03
10배 희석 사과식초	3.73	2.36	-5.85

관능검사 결과에서 pH와 산도가 높아졌음에도 불구하고 사과식초를 적용하면 단맛이 강화되어 기호도 면에서는 세척된 김치보다 관능적으로 우수하게 나타나는 것으로 사료되었다. 사과식초에 담근 김치가 전체적 기호도에서 높은 점수를 얻어서 식중독균인 *Salmonella typhimurium*도 효과적으로 제어하면서 관능특성을 좋게 하는 김치로서 적합함을 알 수 있었다. 생선회나 수산물을 섭취할 때 매운맛을 없애면서 식중독균 제어하는 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

표 19. 식초를 첨가한 발효 김치의 관능 특성

	control	와인식초	오미자초	사과식초
상큼한 냄새	5.6	5.9	7.3	8.3
신내	11.9	10.7	6.3	6.4
푹내	3.2	3.5	4.9	3.8
군내	4.8	5.8	4.5	3.7
이취	7.9	8.3	3.9	4.5
짠맛	4.5	6.5	4.4	3.5
상큼한 맛	5.3	7.3	4.2	4.4
신맛	8.4	12.9	3.8	3.1
단맛	5.9	5.2	5.0	7.4
쓴맛	3.1	4.7	3.6	3.1
이미	7.0	8.5	3.9	5.2
조직감	6.8	7.7	8.5	8.9
전체적인 기호도	3.7	2.7	4.7	5.1

## 제 13 절 제언

이 연구를 통하여 발효 김치 자체가 식중독균을 억제하는 효과가 크다는 확인할 수 있었다. 특히 비브리오균과 살모넬라균을 억제하는데 탁월하다는 사실에 집중할 필요가 있다. 소비자들의 육류와 수산물 소비는 날로 늘어가고 있으며 대량 급식 및 외식의 증가로 인해 식중독 우려는 커지고 있다. 이 연구를 통하여 발효 김치가 쉽게 억제할 수 있는 식중독균을 찾았으며 어떤 발효 조건이 이들 균을 억제하는데 효과를 증진할 수 있는지 살펴보았다. 발효의 온도, 발효의 진행 상태, 김치 재료의 변화, 스타터 첨가, 유기산 첨가와 같은 방법을 통하여 더욱 효과적인 식중독 억제 효과를 얻을 수 있다는 점을 확인하였다. 아울러 김치의 어떤 요소들이 식중독균 억제에 기여를 하는지 고찰하였다. pH, 젖산균의 존재, 유기산과 같은 젖산균의 대사 항균 물질, 김치 재료의 항균 성분 및 발효 촉진 효과 등을 확인하였고 구체적인 항균 성분의 역할이 심층적으로 규명되어야 할 것이다. 인체 장 모델 시스템의 적용 한계로 인하여 밝히지 못한 식중독균이 장에 부착하는 특성을 억제할 것으로 예상되는 섬유질의 효과도 추가 규명이 요구되는 부분이다. 김치의 성분의 역할 뿐 아니라 식중독균의 병독성 인자에 미치는 영향도 앞으로 연구되어야 할 부분이며 무엇보다도 발효를 최적화 시키는 일이 중요함을 확인할 수 있었다. 김치의 영양적, 관능적 우수성 뿐 아니라 발효 과정을 통하여 식중독균 억제와 같이 식품안전성 확보와 건강 증진에 효과를 준다는 측면에서 면역적으로 취약하여 식중독에 걸리기 쉬운 노인 및 어린이들에게 김치를 홍보하고 다양한 음식에 적용될 수 있는 김치를 개발하며, 발효를 효과적으로 제어하여 소비 시점에 최적의 발효 상태를 유지할 수 있는 시스템 및 제품 개발이 요망된다.

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야의 기여도

○ 본 연구과제는 우리나라의 발효 김치가 다양한 식중독균을 억제한다는 사실을 정량적으로 밝혀내고 억제에 기여하는 발효 김치의 인자를 찾아내어 과학적으로 규명하고자 실시하였다. 이를 입증하기 위하여 인체 소화 모델 시스템을 제작하고 활용하여 인체의 소화 조건에서 식중독균이 김치와 같이 섭취될 때 얼마나 억제가 되는지를 보여주고 실제 식중독균 억제 효과를 증진해 낼 수 있는 다양한 방법을 김치 제품 개발에 이용하였다. 따라서 연구 계획 대비 최종 목표는 100% 달성한 것으로 판단된다.

○ 본 연구 개발에 따른 경제적 효과, 예상 수익, 농가 소득 증대에 관한 정확한 산출 내역은 현재 정확한 통계적 예측이 어려우나 현재보다는 김치의 우수성 홍보로 인한 소비 확대가 기대된다. 한편 소비자에게 식품을 통한 안전성 향상을 위한 정보 제공, 한국 발효 식품의 우수성 입증과 같은 홍보 효과에 대해서 관련 산업에 미치는 긍정적 정보를 제공한 측면에서는 단기적으로보다는 장기적 측면에서 산출해야 할 필요성이 있다.

○ 특히 상품 김치의 소비의 증가와 함께 중국, 일본, 미국으로 수출이 확대되고 있는 수출 김치 산업에서 과학적 자료를 제공하여 국내 발효 식품 업계 발전에 영향을 줄 수 있을 것으로 생각되며, 조류 독감, 사스와 같은 질병이 지구에 늘어나면서, 소비자가 안전하고 질병 예방 효과가 있는 식품을 선호하는 만큼 발효 김치의 식중독 억제 효과는 여러 나라로 한국 발효 김치의 이미지 향상 및 수출에 기여할 것으로 예상된다. 특히 가능하다면 추후 심층 연구를 통해서 집단 식중독의 발생 우려가 큰 대형 급식소나 면역이 취약한 노인 및 어린이들은 평소 발효 김치를 충분히 섭취하여 식중독 발생에 따른 건강, 경제, 사회적 비용을 절감할 수 있는 방안으로 기대된다.

○ 동시에 식중독균이 자라기 쉬운 생선회나 고기에 적용할 수 있도록 관능적으로 우수하면서 최적 발효 상태를 유지한 상태로 공급할 수 있는 시스템의 개발에 활용하여 새로운 신제품과 품질 개선을 통해 국내 소비 수요를 증가시키고 이를 통해 해외 수출에 이용한다면 전통 식품의 세계화에도 큰 몫을 할 것으로 기대된다.

## 제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

### 1. 연구 개발 결과의 활용

#### 가. 학술 논문 게재 및 발표

##### 1) 학술논문게재

###### 가) Applied and Environmental Microbiology

-Inhibitory effect of fermented kimchi on food-borne pathogens.  
(submitted)

###### 나) 게재예정 (2편)

-The effect of small, acid-soluble proteins (SASP) on spore resistance and germination under combination of pressure and heat treatment (to be submitted to International Journal of Food Microbiology)

-비브리오균 억제에 김치가 미치는 영향

##### 2) 학술 발표

###### 가) 식품과학회

-Effect of kimchi fermentation temperature on inactivating food-borne pathogens (2005년 6월)

###### 나) 식품영양과학회

-Inhibitory effect of kimchi on food-borne pathogens (2004년 11월)  
-Effect of diluent on survival of *V. parahaemolyticus* (2004년 11월)

## 나. 산업 재산권

- 1) 식중독균 제어 배추김치 및 그 제조방법  
(Baechu Kimchi Inhibiting Food-borne Pathogens and Manufacturing Methods There-of 출원번호: 제 2006-0046250호)

## 다. 홍보

김치의 식중독 예방 효과 입증에 관한 보도 내용 1건 36 곳 보도  
(방송 3사, 신문 33곳)

- 1). SBS 8시 뉴스 “김치, 식중독 예방에 ‘특효’” (2005/11/21)
- 2). KBS 9시 30분 뉴스 “김치, 식중독도 예방 효과” (11/21)
- 3). 청주 MBC 전화 인터뷰 “전화 초대석/한국식품연구원 이종경 박사”  
(11/23)
- 4). 연합뉴스 “김치 식중독도 예방 효과” (11/21)
- 5). 조선일보 “ 김치, 식중독 예방에 효과” (11/21)
- 6). 동아일보 “김치 식중독도 예방 효과” (11/21)
- 7). 한국일보 “식중독 예방에도 김치가 효과적” (11/21)
- 8). 파이낸셜뉴스 “김치 식중독 예방효과 탁월” (11/21)
- 9). 제일경제 “김치, 식중독 예방도 OK” (11/21)
- 10). 매일경제신문 “‘김치, 식중독에 효과’ 한국식품연구원발표” (11/21)
- 11). 대한일보 “한국산 김치 식중독 억제에 ‘탁월’” (11/22)
- 12). 수도권일보 “한국산 김치, 식중독 억제에 ‘탁월’” (11/21)
- 13). 경기신문 “김치 식중독도 예방 효과” (11/21)
- 14). 강원일보 “김치, 식중독 예방 효과” (11/21)
- 15). 브레이크뉴스 “자연발효 김치가 식중독을 예방한다” (11/21)
- 16). 뉴시스 “한국산 김치, 식중독 억제에 ‘탁월’” (11/21)
- 17). 식품음료신문 “국내산 김치 식중독 예방 효과 탁월” (11/21)
- 18). 기능식품신문 “김치가 식중독 균 죽인다” (11/28)
- 19). 보건신문 “김치, 식중독 예방 효과도 뛰어나-비브리오균 김치에 닿은지

- 10분 내 사멸” (11/23)
20. 농어민신문 “발효 김치, 식중독균 생육 억제 효과” (11/24)
  21. 데일리메디 “한국산 김치, 식중독 억제에 ‘탁월’” (11/21)
  22. 팜스투데이 “김치가 식중독 예방한다” (11/21)
  23. 메디팜뉴스 “김치, 주요 식중독균 생육 억제 기능 탁월” (11/21)
  24. 약사공론 “김치, 식중독 예방에도 ‘효과’” (11/22)
  25. 시민일보 “국산 김치, 식중독 막는다” (11/21)
  26. 농민신문 “김치, 살모넬라 등 생육 억제해 식중독 예방에 효과” (11/23)
  27. 농축수산신문 “식중독 예방에도 ‘역시 김치가 효과적’” (11/23)
  28. 에코저널 “식중독 예방에도 김치가 효과적”
  29. 월간식품산업 12월호 “김치는 식중독에 강해”
  30. 산업기술연구회 소식지 225호 “국내산 김치 식중독 예방 효과 입증”
  31. 농업기반공사 “식중독 예방 김치가 효과적”
  32. 농축환경신문 “식중독 예방에 김치가 효과적” (11/24)
  33. 식약신문 “김치, 식중독 예방에도 효과” (12/5)
  34. 식품경제신문 “김치, 식중독도 예방” (12/5)
  35. 식품외식경제 “김치, 식중독 예방에도 효과입증” (11/28)
  36. 식품환경신문 “김치에 식중독 예방 기능” (11/28)

## 2. 연구개발 결과의 활용 계획

### 가. 산업체 기술 이전 및 적용

- 추후 산업체 기술이전을 통해 현재 생산되고 있는 김치 제품에 기술적용에 따른 품질 개선 및 이를 통한 부가 가치의 창출

### 나. 한국 발효 식품의 안전성 입증에 위한 기초 자료로 활용

- 연구 결과의 각종 학술지 투고 및 관련 기술의 특허 출원 등으로 기존의 김치 발효 기술에 적용하여 개선할 수 있는 방안 마련을 통해 김치업체에 부가 가치를 창출할 수 있도록 산업적 생산 확대 마련을 위한 기초 기술 자료 및 발효 메카니즘을 규명할 수 있는 학술적 자료로 활용이 가능함

## 제 6 장 참고문헌

Adams, M. R., and L. Nicolaidis. 1997. Review of the sensitivity of different food-borne pathogens to fermentation. *Food Control* 8:227 - 239.

Ashenafi, M., and M. Busse. 1989. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* on *Salmonella infantis*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* during Tempeh fermentation. *J. Food Prot.* 52:169 - 172.

Ankri, S., and D. Mirelman. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes Infect.* 2:125 - 129.

Arora, D. S., and J. Kaur. 1999. Antimicrobial activity of spices. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 12:257 - 262.

Chyun, J. H. and Rhee, H. S. 1976. Studies on the volatile fatty acids and carbon dioxide produced in different kimchis. *Korean. J. Food Sci. Technol.* 8, 90-94

Diez-Gonzalez, F., and J. B. Russell. 1999. Factors affecting the extreme acid resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* 16: 367 - 374.

Erkmen, O. 2000. Effect of carbon dioxide pressure on *Listeria monocytogenes* in physiological saline and foods. *Food Microbiol.* 17:589 - 596.

Farkas J., É. Andrásy, J. Beczner, I. Vidács, and L. Mészáro. 2002. Utilizing luminometry for monitoring growth of *Listeria monocytogenes* in its liquid or gelified monocultures and cocultures with "acid-only" *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.* 73:159 - 170.

Gibson, G. R., and Roberfroid, M. B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition*, 125, 1401-1412.

Gibson, G. R., Cummings, J. H. and Macfarlane, G. T. (1988) Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by mixed populations of human gut bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 2750-2755.

Guarner, F. and Schaafsma, G. (1998) Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 237-238..

Guarner, F. and Malagelada, J. (2003) Gut flora in health and disease. *THE LANCET*, 360, 512-519.

Hansen, E. B. (2002) Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119-131.

Havenaar, R. (2000) Application of a dynamic *in vitro* gastrointestinal track model to study the availability of food mutagens, using heterocyclic aromatic amines as model compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 783-792.

Hong, S. I., J. S. Park, and N. H. Park.1994. Relationship between fermentative gas pressure and quality changes of packaged Kimchi at different temperatures. *Korean J. Food Sci. Technol.* 26:770 - 775.

Hong, S. I., and W. S. Park.2000. Use of color indicators as an active packaging system for evaluating Kimchi fermentation. *J. Food Engineer.* 46:67 - 72.

Inatsu, Y., M. L. Bari, S. Kawasaki, and K. Isshiki. 1997. Survival of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella Enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Kimchi. *J. Food Prot.* 67:1497 - 1500.

Kang, C. H., K. O. Chung, and D. M. Ha. 2002. Inhibitory effect on the growth of intestinal pathogenic bacteria by Kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34:480 - 486.

Kim, J. W., J. E. Huh, S. H. Kyung, and K. H. Kyung. 2003. Antimicrobial activity of alk(en)yl sulfides found in essential oils of garlic and onion. *Food Sci. Biotechnol.* 13:235 - 239.

Krul, C. Luiten-Schuite, A., Baan, R., Verhagen, H. Mohn, G. Feron, V. and Kullisaar, T., Zilmer, M., Mikelsaar, M., Vihalemm, T., Annumk, H., Kairane, C., Kilk, A. (2002) Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 215-224.

Kuipers, O. P., Buist, G., and Kok, J. (2000) Current strategies for improving food bacteria. *Research in Microbiology*, 151, 815-822.

Lee, C. H. 1997. Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. *Food Control* 8:259 - 269.

Lee, C. W., C. Y. Kop, and D. M. Ha. 1992. Microfloral changes of the Lactic Acid Bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20:102 - 109.

Leroy, F. and De Vuyst, L. (1999) Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial Bacteriocin Sakacin K. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 974-981.

Leuschner, R. G. K., and J. Zamparini, 2002. Effects of spices on growth and survival of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella entericaserovar* Enteritidis in broth model systems and mayonnaise. *Food Control* 13:399 - 404.

Macfarlane, G. G., Macfarlane, S. and Gibson, G. R. (1998) Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microbial Ecology*, 35, 180-187.

Macfarlane, G. T. and Englyst, H. N. (1986) Starch utilization by the human large intestinal microflora, *Journal of Applied Bacteriology*, 60, 195-201.

Minekus, M., Smeets-Peeters, M., Bernalier, A., Marol-Bonnin, S., Havenaar, R., Marteau, P., Alric, M., Fonty, G. and Huis in't Veld, J. H. J. (1999) A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 108-114.

Moon, G. S., Y. R. Pyun, M. S. Park, G. E. Ji, and W. J. Kim.2005. Secretion of recombinant Pediocin PA-1 by *Bifidobacterium longum*, using the signal sequence for Bifidobacterial alpha-Amylase. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5630 - 5632.

Oomen, A. G., Rompelberg, C. J., Van de Kamp, E., Pereboom, D. P., De Zwart, L. L., and Sips, A. J. (2004) Effect of bile type on the bioaccessibility of soil contaminants in an *in vitro* digestion model. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, 183-188.

Park. D. C., Kim, E. M., Kim, E. J., Kim, Y. M. and Kim S. B. (2003) the contents of organic acids, nucleotides and their related compounds in kimchi prepared with salted-fermented fish products and their alternatives. *Korean J. Food Sci. and Technol.* 35, 769-776.

Park, Y. S., C. Y. Ko, and D. M. Ha.1993. Effect of temperature on the production of free organic acids during Kimchi fermentation. J. Microbiol. Biotechnol. 3:266 - 269.

Rye, J. Y. Lee, H. S. and Rhee, H. S. (1984) Changes of organic acids and volatile flavour compounds in Kimchis fermented with different ingredients. Korean. J. food Sci. Technol. 16, 169-174

Saito, M., K. Ootsuka, T. Kurasono, Y. Ozeki, M. Yamaguchi, G. Kishimoto, and S. Aoba. 2001. An outbreak of *Escherichia coli* O157 caused by "Japanese styled"Kimchi in Saitama. Infect. Agent Surveillance Rep. 22:291.

Yang, R., and B. Ray.1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11:281 - 291.

대한민국 김치 시장 현황, <http://www.kimchi.co.kr/event/store/kimchimarket.asp>

식중독 발생 현황 및 예방대책 (2003) 식품 공업 3월호, 한국 식품 공업 학회.

한국보건산업진흥원 (2002) 식품원인질병의 사회적, 경제적 손실비용의 측정모델 개발과 식중독사고에 의한 손실평가.