

최 종
연구보고서

유용미생물의 분리, 동정과 표준화를 통한
고기능성 돌산갓김치의 제조

Identification and isolation of useful microorganism
and manufacture of Dolsan leaf mustard Kimchi
through standardization

연구 기관

전 남 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “유용미생물의 분리, 동정과 표준화를 통한 고기능성 돌산갓김치의 제조” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 7월 14일

주관연구기관명 : 전남대학교

총괄연구책임자 : 최 명 락

세부연구책임자 : 최 명 락

세부연구책임자 : 임 현 수

요 약 문

I. 제목

유용미생물의 분리, 동정과 표준화를 통한 고기능성 돌산갓김치의 제조

II. 연구개발의 목적 및 필요성

갓(mustard leaf, mustard greens)은 십자화과에 속하는 경엽 채소류로 줄기와 잎은 염장 발효시켜 김치로 식용되고, 씨(mustard seed)는 신미성 향신료로서 사용된다. 또한 식물성 2차 대사산물인 glucosinolate, flavonoid, polyphenol 류, 함황화합물 등이 풍부하며, 이러한 물질들은 생리활성 물질로서 체내에서 약리 작용을 나타내는데, 특히 면역계를 강화시킴으로써 건강유지에 기여하며 최근에는 암을 예방하는 대표적인 식품으로 여겨지고 있다. 갓은 많은 양의 thiosulfates와 organosulfur 화합물을 함유하고 있으며, 이 화합물은 화학적으로 유도되는 종양을 저해한다고 보고되고 있다. 또한 이러한 갓을 이용한 김치는 비타민과 무기질이 풍부하며, 숙성 동안에 glucosinolate로부터 생산되는 기능성 물질인 sinigrin 이외에도 주재료인 Brassica(cabbage, mustard, rapeseed 등)에는 β -carotene, chlorophyll, phenolic compounds 등의 기능성 물질이 함유되어 있으며, 이들에 의한 항산화성, 항돌연변이성, 항암성 등에 대해 보고된 바 있다. 또한 김치 숙성 중에 생산된 다양한 유산균의 생성은 독특한 맛 뿐 만 아니라 면역세포 증식효과, 항암효과 및 항균효과 등이 보고된 바 있다. 또한 근년에 들어 김치에 대한 연구가 활발해지고 있고 김치에서 분리된 신 종균들이 속속 보고되고 있다. 현재 *Lactobacillus kimchi*, *Leuconostoc kimchi* 등이 보고되었으며, Leuconostoc-like species인 *Weissella* 속 균주까지 8종이 보고되었으며, 우리나라 김치유래의 *Weissella kimchi* 가 2002년에 신종으로 보고되었다. *Weissella* 속 균주는 위암이나 위염을 일으키는 원인균 중의 하나인 *Helicobacter pylori* 균의 증식을 억제한다고 보고된 바 있다. 따라서 오랜 역사를 지닌 김치는 생육환경이 특이하고 또한 원재료와 부재료가 상

호보완적으로 반응하게 되어 기존에 알려진 유산균 외에도 신종들이 보고된다고 생각된다. 또한 돌산갓김치는 돌산이라는 독특한 자연환경과 갓이라는 원재료의 차이로 기존에 알려진 생육환경이 배추나 무김치와는 다르므로 다른 특성을 지닌 유산균이 존재할 가능성이 높다고 생각된다. 하지만 돌산갓김치에서 분리된 미생물군이나 주요 유산균의 경시적인 변화에 대한 보고는 매우 미흡한 실정이다. 또한 최근 국내는 물론 일본을 중심으로 갓 절임류의 소비량이 늘어나고 다양한 응용식품이 시판됨에 따라 갓김치의 우수성을 증명하고 또한 지역적인 특화사업을 함으로써 김치시장의 경쟁력을 높이는데 우선 점을 두어야 할 것이다. 따라서 그 우수성을 과학적으로 입증하여 그 결과를 바탕으로 설득력 있는 홍보와 품질이 균일한 갓김치를 대량생산하고 공급하는 것이 무엇보다도 중요하다. 그리고 최근 유산균을 starter로 첨가하여 저장성을 높이거나 품질을 높이는 노력 또한 많이 이루어지고 있다.

본 연구에서는 타지의 갓에 비해 섬유질과 매운맛이 적고 특이한 향이 존재하고, 돌산의 기후적 조건 때문에 년 중 재배가 가능하고 방충망사 재배로 농약을 사용하지 않는 등 전국에서 그 우수성을 인정받고 있는 돌산갓을 사용하여 갓김치를 제조하고 이 김치의 유용미생물을 분리 동정하여 갓김치의 starter로 사용하여 김치 표준화와 고급화 김치를 개발하고자 하였다. 그리고 근년에 들어 배추김치의 Codex 규격기준이 정해지는 등 세계적인 식품으로 인정받기에 이르렀다. 하지만 돌산갓김치는 아직 표준화와 규격화가 되지 못하였다. 앞으로 갓김치의 소비량이 증가됨에 따라 과학적인 갓김치의 발효 및 생리활성의 변화 검토가 필수적으로 수행되어야 하고, 공업화와 대량생산을 위해서는 갓김치의 품질 균일화가 이루어져야 한다. 따라서 본 연구의 목적은 갓김치의 국제규격화(Codex)를 위한 표준화와 갓김치의 생리활성에 관여하는 주요 미생물을 분리 및 동정하여 신종으로서의 가능성을 탐색하고 분리된 기능성 균주 및 최적 부재료를 첨가한 표준화된 고품성 돌산갓김치를 제조하는 것이다. 이러한 노력으로 추후 2012년 여수 해양엑스포 유치와도 관련하여 한국의 김치를 널리 알릴 수 있는 계기로 삼아 여수지역 식품문화에 이바지하고 홍보함으로써 국내 및 세계적인 소비시장을 확대 할 수 있고, 재배농민들 또한 안정적인 수익을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

III. 연구개발 내용 및 범위

돌산 및 타 지역 생산 갯김치의 맛과 부재료의 함량을 조사하기 위하여 돌산지역 갯김치 외에 전남 여수, 장성, 순천과 전북 전주, 남원, 경남 함양 등 총 6곳의 갯김치를 선정하였고, 산도와 pH, C/N ratio 평가, 관능검사를 실시하였다. 관능평가는 외관, 조직감, 탄산미, 짠맛, 신맛, 매운맛 등 종합적 기호도를 7점 평점제로 평가하였다.

돌산갯김치의 유산균을 분리 동정하기 위하여 제조된 돌산갯김치를 4, 10, 20, 30℃에서 각각 발효 시키면서 원하는 발효시간에 시료를 채취하여 분쇄기로 분쇄한 후 그 액을 다시 멸균된 거즈로 거르고, 멸균된 생리식염수에 단계별로 희석하여 각 온도별 유산균군의 경시적인 변화를 선택배지를 사용하여 관찰하였다. *Leuconostoc*속은 PES 배지로, *Lactobacillus*는 LBS 배지로, *Pediococcus*, *Streptococcus*는 m-Enterococcus agar로 선택 계수하고 우점 종을 분리하였다. 또한 분리된 미생물의 동정은 형성된 각각의 콜로니를 BUA agar에 옮기고 혐기성 jar(anaerobic gas pak system)에서 혐기 배양한 후 An-microplate에 옮겨 혐기 배양하였고 Biolog system으로 탄소원 이용 정도를 비교하여 확인하였다. 각 발효 조건별 생리기능성 평가는 DPPH에 의한 유리라디칼 소거능력 검사를 통한 항산화 효과와 폐암세포와 폐정상세포의 비교를 통한 선택적 독성실험을 통한 항암활성을 측정하였다.

돌산갯김치의 소금 농도와 부재료 농도의 표준화를 위해 발효시의 소금 농도 조건을 1, 2, 3% 소금농도에서 각각 발효시켰고 소금의 농도는 salt analyzer로 직접 측정하였다. 부재료는 일반적인 갯김치 제조방법으로 제조한 후 부재료인 고춧가루, 파, 마늘, 생강의 농도를 0.5~2% 범위내로 조절하여 최적 조건을 확립하였다. 그리고 표준화된 소금농도 부재료는 pH, 산도, C/N ratio, 관능평가를 실시하였다. 표준화된 부재료를 사용하여 갯김치를 제조하고 갯김치내의 유산균총을 분석하였다. 유산균총 변화 조사를 위해 *Leuconostoc*속은 PES 배지로, *Lactobacillus*는 LBS 배지로, *Pediococcus*, *Streptococcus*는 m-Enterococcus agar로 선택 계수하였다. 선택계수를 통해 우수 균종으로 선별된 미생물들의 유전적인 동정을 위해 16S rDNA sequencing을 이용하여 돌산갯김치에서 분리한 유용 미생물의 정확한 동정명의 확립과 신규성을 규명하였다. 또한 분리된 각각의 단일 유산균을 농도별로 starter로 사용하여 발효한 후

DPPH에 의한 유리라디칼 소거능력 검사를 통한 항산화 효과와 암세포에 대한 선택적인 독성 여부를 평가하였다. 또한 최적 표준화된 돌산갓김치를 시험생산하고, 검증절차를 거쳐 개선하고 우량 유산균을 이용한 돌산갓김치의 메탄올 추출물 및 각 분획추출물로 위암세포와 폐암세포를 이용하여 암세포 억제효과를 확인하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

1) 돌산갓김치 표준화를 위한 돌산 및 타 지역 생산 갓김치의 맛과 부재료 함량 평가

갓김치의 부재료 함량을 알아보기 위하여 돌산지역이외의 타 지역(장성, 순천, 남원, 전주, 함양)의 갓김치 생산 공장에서 부재료 함량과 담금 방법을 조사하였다. 그 결과 전체적인 순응도에서는 전남 장성 갓김치가 가장 우수한 것으로 나타났고, 가장 순응도가 좋았던 전남 장성 갓김치의 경우, 부재료 함량이 모두 평균이상으로 특히 고춧가루(16.7%)와 젓갈(멸치젓 5.3%와 새우젓 6.7%), 찹쌀풀(18.3%) 등의 함량이 모두 다른 지역 갓김치에 비해 높아서 부재료의 함량이 높을수록 갓김치의 관능평가 점수가 우수한 것으로 나타났다. 하지만 숙성된 이후의 결과에서는 돌산갓 영농조합의 갓김치가 가장 높은 점수를 받았다. 돌산갓 영농조합의 갓김치는 고춧가루 9%, 마늘, 생강 각각 3%, 젓갈 7%, 찹쌀풀 1%로서, 모든 부재료의 비율이 평균 또는 그 이하의 담백한 갓김치로 숙성이후에는 좋은 결과를 나타내었다. 부재료 함량에 있어 가장 큰 편차를 나타낸 재료는 찹쌀 풀로서 $\pm 7.40g$ 이었으며, 그 다음으로 고춧가루 $\pm 5.77g$ 이었다. 그리고 지역별 갓김치의 항산화성 평가를 확인한 결과 부재료가 적당히 들어가서 맛이 담백한 돌산갓 영농조합의 갓김치의 항산화성이 가장 우수한 것으로 나타났다.

2) 유산균균의 경시적 변화 관찰 및 생리기능성 평가

온도에 따른 돌산갓김치 즙액의 유산균 경시적 변화는 온도에 따라 약간의 차

이가 있었지만 대체적으로 비슷한 경향으로 온도가 높을수록 변화의 속도가 빨랐다. 초기에는 저온균인 *Leuconostoc* 속이 대부분 우세하였으며, 적숙기 이후에는 *Lactobacillus* 속과 비슷한 수를 나타내었다. 또한 10℃에서 발효시킨 돌산갓김치의 경우는 4℃에 비하여 유산균의 수가 매우 많았으며, 20일 경에 *Lactobacillus* 속이 최대의 균수를 나타내었고, 그 이후로 조금씩 감소하였다. 최적 성장온도가 25℃로 알려진 *Pediococcus* 속은 본 연구에서도 발효온도가 낮을수록 최고 균수에 이르는 시간도 느렸으며, 발효 4℃ 발효의 경우, 발효온도가 너무 낮아 주 발효균인 *Lactobacillus* 속과 *Leuconostoc* 속들의 증식도 억제되어 균수가 전반적으로 적었고, *Pediococcus* 속의 균수도 낮았다. 그러나 *Lactobacillus* 속 균주들이 활발히 증식하기 시작하므로 *Pediococcus* 속 균주는 4℃에 비해 1일에서 4일째까지 증가하기는 하나 아직 저온에 잘 적응하지 못하다가, 5일 이후 주 발효균이 4℃에 비해 수가 증가하여 배양환경을 지배하자, 증식속도가 주 발효균에 비해 크게 밀도는 수준이었다. 그리고 20℃에서 발효시킨 돌산갓김치의 경우에는 발효 12일째에 최대의 균수를 나타내어 적숙기임을 보여주었다. 또한 배추김치에 비해 *Leuconostoc* 속이라고 계수된 미생물이 우세하였는데, 후에 동정 결과 PES 배지에서 잘 생육할 수 있었던 것은 *Leuconostoc* 속 뿐 아니라 *Leuconostoc* 속과 유사한 미확인 미생물도 함께 계수되었기 때문에 *Lactobacillus* 속보다 높은 균수를 유지하였다고 생각된다. 그리고 *Streptococcus* 속과 *Pediococcus* 속은 상대적으로 낮은 수를 나타내었고, 30℃에서 발효시킨 돌산갓김치의 경우도 2일에서 4일째에 최대의 균수를 나타내었으며, 그 이후에 감소하였다. *Streptococcus* 속은 선택배지 내에서 나타나지 않았다.

돌산갓김치에서 분리된 미생물의 생리활성을 평가하기 위하여 갓 즙액을 제조하여 분리된 미생물을 접종하여 항산화, 항암, 항고혈압 활성을 확인하였다. 인체 간암세포인 HepG2에 대한 항암 활성을 확인한 결과 모두 20% 미만인 것으로 나타났으며, 이는 시료의 전처리 과정에서 돌산갓 즙액이나 돌산갓김치 즙액 성분 중 항암활성을 나타내는 glucosinolate류나, indole화합물, isothiocyanate류의 항암활성 물질들이 많이 제거되었기 때문으로 생각된다. 또한 항산화 활성을 확인한 결과 돌산갓 즙액이나 유산균 접종시료군 모두 20% 미만의 결과를 나타내었다. 항고혈압 활성은 ACE 저해활성을 통해 알아보았는데, ACE 저해활성에 있어서는 48시간 배양후의 strain Dolsan 접종액의 ACE 저해활성이 매우

우수한 것으로 나타났다.

3) Microlog system에 의한 유산균의 동정

95개의 탄소원을 사용하여 탄소원의 이용정도로서 돌산갓김치에서 분리한 우점종균들의 동정결과 D1(strain Dolsan이라 명칭함)은 가장 우점했던 균주로서 similarity가 0.88로서 *Weissella confusa*로 동정되었다. *Weissella* 속은 유산균과 계통발생학적으로 매우 유사한 관계이며, 8개의 *Leuconostoc*속과 비슷한 종을 포함하는데, *Weissella confusa*(전에는 *Lactobacillus confusus* 라고 불림), *Weissella minor*(전에는 *Lactobacillus minor*라고 불림), *Weissella kandleri*(전에는 *Lactobacillus kandleri*라고 불림), *Weissella halotolerance*(전에는 *Lactobacillus halotolerance* 라고 불림), *Weissella viridescens*(전에는 *Lactobacillus viridescens*라고 불림), *Weissella paramesenteroides*(전에는 *Lactobacillus paramesenteroides*라고 불림), *Weissella hellenica* 등이다. *Weissella* 속은 16S rDNA sequencing 연구에서 유산균내에 있는 *Leuconostoc* 속으로부터 독립되었다.

4) 돌산 갓김치 소금농도와 부재료의 표준화

많은 김치관련 보고들을 보면 김치의 염도가 3% 내외일 때 가장 저장 효과가 높고, 향암효과가 높다고 보고 되어있다. 돌산갓김치의 소금 농도에 따른 염도변화를 확인한 결과 절임 시 소금물 10%에 2시간 침지 시켰을 때의 염도 변화가 대체적으로 3%에 가까워 가장 최적상태로 판단하였고, 이러한 결과는 pH 변화와 산도변화를 확인함으로써 최적 소금농도의 표준화로 고정시켰다. 또한 부재료 농도의 경우 관능평가를 실시하여 액젓의 경우 멸치젓만 단독으로 넣은 것과 새우젓과 까나리 액젓을 5:5로 섞은 액젓에서의 변화는 그다지 없었으며 마늘의 경우 3.5%를 첨가한 실험군에서 좋은 평가를 받았다. 또한 생강의 경우 2%에서 좋은 평가를 받았고, 고춧가루의 경우 6%일 때, 찹쌀풀의 경우 12%로 첨가하였을 관능평가상 가장 높은 점수를 받았다. 그리고 이러한 결과는 대체적으로 발효일수가 높아질수록 더 좋은 맛을 내는 것으로 나타났다. 또한 부재료 농도에 따른 갓김치의 항산화효과를 확인 하여 관능평가와 항산화 효과의 결과를 바탕으로

로 최적 레시피 즉, 갓 1Kg에 고춧가루 6%, 마늘 3.5%, 생강 1.5%, 젓갈은 까나리 액젓: 새우젓(5:5), 찹쌀풀 12%, 설탕 1.4%, 통깨 0.5%로 맞추어 표준화된 부재료 레시피를 완성하여 실험에 적용하였다.

5) 표준화된 부재료의 최적 레시피

갓 1Kg에 고춧가루 6%, 마늘 3.5%, 생강 1.5%, 젓갈은 까나리젓 : 새우젓(5.25% : 5.25%), 찹쌀풀 12%, 설탕 1.4%, 통깨 0.5%로 맞추어 표준화된 부재료 레시피를 완성하였다.

6) 돌산 갓김치의 유산균총 변화 및 우수균종으로 선별된 미생물들의 유전적 동정

MRS 배지를 사용하여 유산균을 첨가한 갓김치를 10℃에서 발효시켜 갓김치내의 유산균의 경시적인 변화를 측정된 결과 실험에 사용된 유산균은 저온에서 성장이 활발한 균이어서 발효초기부터 높은 유산균수를 보였고, 발효 12일 후부터는 발효가 진행됨에 따라 생성되는 산의 영향으로 유산균의 활성이 저해되어 *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*, *Weissella kimchi*의 모든 유산균수가 감소함을 확인하였다. 우점종균들의 동정결과 가장 우점했던 균주는 D1(strain Dolsan이라 명칭함)이 similarity 0.88로서 *Weissella confusa*로 동정되었는데 이 균주의 정확한 동정명을 알기위하여 16S rDNA sequencing에 의한 유전적 동정을 행하였다. 그 결과 1,472bp의 염기서열이 결정되었고, 이를 근거로 reference 균주들과 비교 분석하여 % similarity를 구한 결과 2002년 신중 보고 된 *Weissella kimchi*와 가장 유사한 것으로 동정되었다.

7) 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 세포독성 효과

유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 세포독성 효과를 확인하기 위하여 간암세포주인 HepG2와 위암세포주인 Hs746T 세포를 이용 MTT assay를 통해 세포의 viability를 확인하였다. 그 결과 유산균을 처리한 모든 실험군에서 세포증식 억제 효과를 확인 하였는데. 그 중에서도 간암세포주인 HepG2의 경우

*Leuconostoc mesenteroides*와 *Weissella kimchi* 경우 50% 이상의 항암효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 위암세포주인 Hs 746T의 경우는 *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*과 *Weissella kimchi* 모두에서 50% 이상 항암효과를 보였고, 그 중 *Weissella kimchi*의 경우 거의 60% 이상으로 그 효과가 뛰어난 것을 확인할 수 있었다.

8) 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 분획별 추출물의 세포독성 효과

유산균종으로 선별된 유산균을 Starter로 첨가하여 갓 김치를 제조하고, 10℃의 온도에서 발효하였다. 적숙기(pH 4.2~4.5, 산도 0.5~0.8%)에 이르는 시간을 비교해 보면, starter 비첨가 갓김치는 발효 12일째, starter 첨가 갓김치는 발효 8일째로 starter를 첨가함으로써 숙성기간이 4일 정도 단축되었다. 산도 변화는 전반적으로 pH가 저하함에 따라 산도는 증가되는 것으로 나타났으며, pH에 의한 결과도 비슷한 경향을 보였다. 폐암세포주인 A549와 위암세포주인 SNU-601에 대한 starter 첨가 갓김치 메탄올 추출물의 세포독성 효과를 측정 한 결과, A549의 경우 250 μ g/ml의 농도에서 SNU-601은 다소 낮은 농도인 50 μ g/ml의 농도에서 세포독성효과를 나타냄을 확인하였다. A549에 *Leuconostoc mesenteroides* 갓김치, *Leuconostoc gelidum* 갓김치와 *Weissella kimchi* 갓김치 추출물을 250 μ g/ml 첨가시 각각 18%, 19, 26%의 성장 저해율을 보였다. SUN-601에 *Leuconostoc mesenteroides* 갓김치 추출물과 *Leuconostoc gelidum* 갓김치 메탄올 추출물 50 μ g/ml 첨가 시 각각 41.73%와 38.50%의 세포독성 효과를 보였다. 또한 분획추출을 통한 실험을 한 결과 A549에 *Weissella kimchi* 갓김치 250 μ g/ml 농도의 chloroform과 물 추출물을 첨가한 결과 각각 81.13%, 54.52%의 세포독성 효과를 보였으며, *Leuconostoc mesenteroides* 갓김치 250 μ g/ml 농도의 ethyl acetate 분획물 첨가시 53.16%의 세포독성 효과를 보였다. 위암세포인 SNU-601의 경우 *Leuconostoc gelidum* 갓김치 ethyl acetate와 물 추출물 첨가시 각각 38.74%와 45.61%의 세포독성 효과를 보였고, 다른 추출물의 경우 그 효과가 모두 미약하였다.

세포독성 결과를 통해 농도 250 μ g/ml의 *Leuconostoc mesenteroides*갓김치 ethyl acetate 분획물, *Weissella kimchi* 갓김치 chloroform 분획물과 물 분획

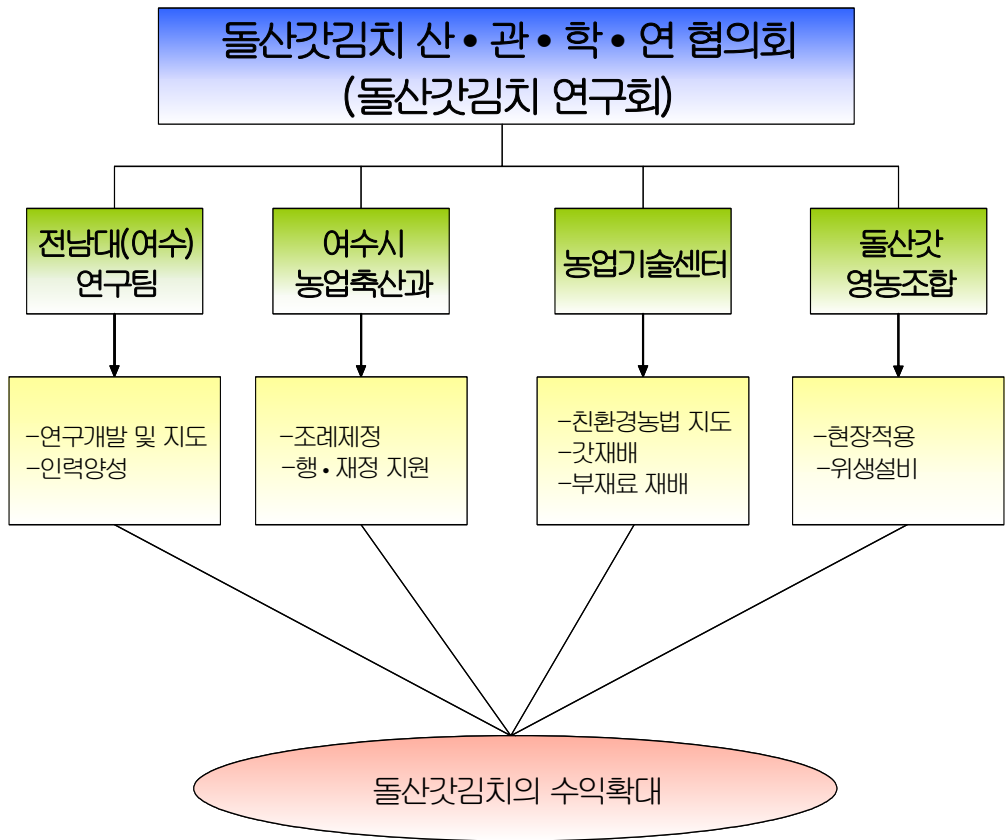
물을 결정하였고, 이들 분획물의 세포증식 억제 효과에 대한 결과, 각 분획물을 함유한 배지의 암세포 증식은 배양 2일까지 약간 증가하다가 배양 3일째부터 서서히 억제되기 시작하였고, 배양 5일째 모든 분획물에서 90% 정도의 암세포 성장 억제율을 보였다. 특히 *Weissella kimchi* 갓김치 chloroform 분획물 첨가시 가장 강한 세포성장 억제율을 보임을 확인 할 수 있었다.

2. 활용계획

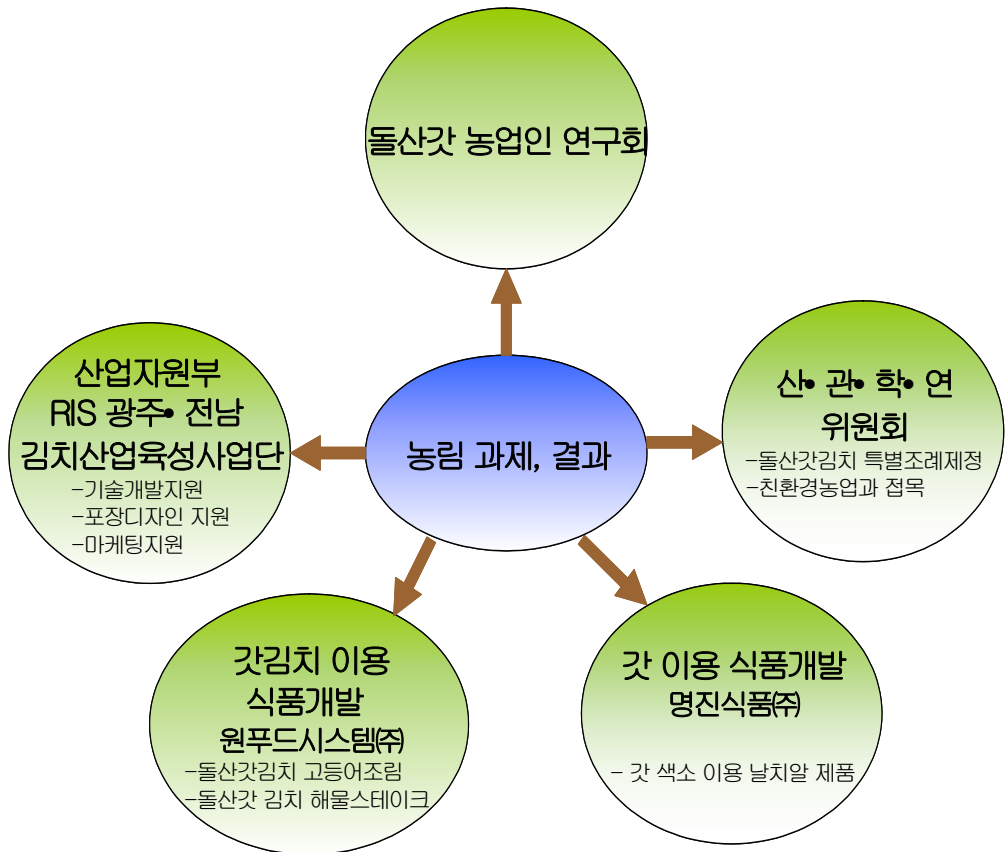
본 연구과제를 수행한 결과로서 얻어진 여러 결과들을 총괄책임자 최명락 교수와 세부책임자인 임현수 교수가 참여하는 산업자원부 지정 RIS 광주·전남 김치산업육성사업단에서 적극적으로 지원하고 있다. 이 사업은 원/부재료, 균주/발효, 제품화, 포장디자인, 마케팅 등 김치 사업에 관련하여 전반적으로 지역의 김치산업체에 지원하는 사업이기 때문에 농림부 과제 수료 후에도 활용할 수 있는 계기가 마련되어 있다. 2006년도에는 돌산갓영농조합에 지게차, 파레트, 대형 절임통, 물빠짐통 등의 설비를 지원하여 대량생산과 위생시설을 갖추었고, 본 연구개발 결과를 토대로 하여 돌산갓 영농조합에 최적화된 레시피를 전수하여 표준화된 돌산갓김치 제품을 만들어 판매하였고, 제 1 회(2004년 11월) 및 제 2 회(2005년 11월) 돌산갓김치 축제와 홈쇼핑 판매 지도를 통하여 2억 5천만원의 수익증가(전년대비 20%)를 가져왔다.

또한 추후 유산균은 starter로 첨가한 갓김치의 기술지도 및 상품화를 통하여 고기능성 갓김치를 제조하여 현재보다 더 높은 농가의 수익 증대를 유도할 수 있을 것이다. 갓과 갓김치를 응용한 다양한 상품개발을 시도하고 있어서 상품화에 연결될 예정이다. 지역의 수산물 가공업체인 원푸드시스템과 공동으로 개발하는 돌산갓김치 고등어 조림과, 돌산갓김치 해물스테이크는 곧 시장에 출시될 예정이다. 지역의 날치알 가공식품업체에 갓 색소 및 갓향을 이용한 제품 개발도 진행중이어서 갓과 갓김치의 판매증대 및 고부가 가치화에 기여할 것으로 보인다. 이에 따라 지속적인 다양한 상품의 개발과 기술 지도가 이루어 질 수 있도록 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 현재까지의 결과를 토대로 암세포의 증식을 억제시키는 물질을 규명하고 그 메카니즘을 밝히는 일이 요구되어진다.

- 활용화 체계



- 활용방안



SUMMARY

Identification and isolation of useful microorganism of Dolsan leaf mustard Kimchi was investigated. Also, manufacture of Dolsan leaf mustard Kimchi through standardization was done.

1. Estimation of ingredients ratio and taste of other area products and Dolsan leaf mustard Kimchi for standardization of Dolsan mustard Kimchi.

The ratio of ingredients and picking vegetables method with Dolsan leaf mustard Kimchi and other area products were studied(Jangseong, Suncheon, Namwon, Jeonju, Hamyang). Through sensory test results, we knew that Jangseong leaf mustard Kimchi was the best. However, we got estimation which Dolsan leaf mustard Kimchi is the best after being ripened. Based on antioxidative activity Dolsan leaf mustard Kimchi activity appeared higher than others.

2. Microfloral changes of lactic acid bacteria and physiological activity

The microfloral changes of lactic acid bacteria during Dolsan leaf mustard Kimchi fermentation at 4, 10, 20 and 30°C were compared by use of selective media. The patterns of microfloral changes in each bacterial group *Leuconostoc*, *Lactobacilli*, *Pediococci* and *Streptococci*, were similar at different fermentation temperature. Among them, *Leuconostoc* and *Lactobacilli* showed higher population at 4, 10, 20 and 30°C than those of others. They were maximum cell number in optimum ripening period and decreased slowly later. But *Pediococci* and *Streptococci* were low population during throughout fermentation period. Changes of antioxidation activity, ACE inhibitory activity and anticancer

effects in juice prepared from Dolsan leaf mustard Kimchi treated with lactic acid bacteria were investigated. By adding of microorganisms to leaf mustard juice, anticancer effect about HepG2 were shown below 20%. Antioxidation activity was similar with anticancer effects. Antihypertensive activity searched through ACE inhibitory activity. As a result, ACE inhibitory activity of strain Dolsan inoculation after 48hours incubation appeared by the most excellent result.

3. Identification of lactic acid bacteria by microlog system

Various microorganisms were isolated and identified from Dolsan leaf mustard Kimchi. Those strains of *Leuconostoc*, *Lactobacilli*, *Pediococci* and *Streptococci* were *Leuconostoc mesenteroides* sp. *mesenteroides*, *Leuconostoc gelidium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus raffinolactoc*, *Lactobacillus delbruekii* sp. lactic, *Lactococcus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, and *Pediococcus parvulus*. Especially, we isolated predominant strain from properly ripened Dolsan leaf mustard Kimchi. We called it strain Dolsan. The nearness phylogenetic relatives of isolated strain Dolsan was *Weissella confusa* with biochemical tests in the biolog AN microplate assay result similarity of 0.88.

4. Standardization of salt and ingredients for Dolsan leaf mustard Kimchi.

Kimchi is reported to get high householder storage effect and anticancer effect when salinity is 3%. When it soaked in 10% brine during the 2 hours, salinity appeared about 3% during fermentation. At the ratio of garlic 3.5%, ginger 2%, cayenne pepper 6%, glutinous rice gruel 12%, sensory test got best value. These results showed better taste by fermenting period. Also, by antioxidative activity of leaf mustard Kimchi according to ingredients

ratio, the optimization of recipe was completed. The optimized recipe was cayenne pepper 6%, garlic 3.5%, ginger 1.5%, fermented shrimps 5.25%: fermented anchovy 5.25%, glutinous rice gruel 12%, sugar 1.4%, sesame 0.5% for leaf mustard 1Kg.

5. Microfloral changes of lactic acid bacteria in Dolsan leaf mustard Kimchi and the differential sequences of strain Dolsan.

In order to identify the predominant lactic acid bacteria, Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence was performed by using the Genebank database. The *Weissella kimchi* is the nearest phylogenetic relative of predominant strain in Dolsan leaf mustard Kimchi with 16S rDNA similarly of 99%. The shape of *Weissella kimchi* Dolsan (predominant strain) was short-rod like a *Weissella kimchi* and the diameter was shorter(0.45~0.8um) than *Weissella kimchi*(1~2um).

6. Anticancer effects of Dolsan leaf mustard Kimchi by adding lactic acid bacteria.

The anticancer effects of Dolsan leaf mustard Kimchi by adding lactic acid bacteria against Hs 746T(human gastric carcinoma cell) and HepG2(human hepatic cancer cell) were investigated. *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum* and *Weissella kimchi* were isolated from properly ripened Dolsan leaf mustard Kimchi. They were inoculated as starter(1×10^8 CFU/ml) to Dolsan leaf mustard Kimchi. The anticancer effects were tested by MTT assay. By adding Dolsan leaf mustard Kimchi MeOH extracts, the anticancer effects against Hs 746T and HepG2 were enhanced than that of control. This result assumed that the anticancer effects of Dolsan leaf mustard Kimchi were induced by metabolites produced lactic acid bacteria during fermentation.

7. Cytotoxicity of various extracts from Dolsan leaf mustard Kimchi treated with Lactic acid bacteria on cancer cells.

The cytotoxicity of various extracts of Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK) treated with lactic acid bacteria on A 549(human lung cancer cell) and SNU 601(human gastric cancer cell) were investigated. *Leuconostoc mesenteroides*, *Leu. gelidum* and *Weissella kimchi* were isolated from properly ripened Dolsan leaf mustard Kimchi. They were inoculated as starter(1×10^8 CFU/ml) to Dolsan leaf mustard Kimchi. Dolsan leaf mustard Kimchi were fractionated by various extracting solvents. The cytotoxicity was increased in A 549 cells and SNU 601 by the addition of MeOH extracts from properly ripened Dolsan leaf mustard Kimchi. However, cytotoxicity was less than 20.0~40.0%. By adding the 250 μ g/ml of Chloroform soluble fraction and water soluble fraction of Dolsan leaf mustard Kimchi treated with *Weissella kimchi*, ethyl acetate soluble fraction of Dolsan leaf mustard Kimchi treated with *Leuconostoc mesenteroides*, the cytotoxicity were showed 81.13%, 54.52% and 53.16%, respectively. As for morphological changes shown by adding fractions of Dolsan leaf mustard Kimchi treated with lactic bacteria into A 549 culture and SNU 601, A 549 and SNU 601 were significantly disrupted. Also, the growth rate of A 549 and SNU 601 were decreased significantly by the extracts.

CONTENTS

Cover letter	1
Summary (Korean)	3
Summary (English)	15
Table of contents (English)	19
Table of contents (Korean)	25
Chapter I. The summary of research and development	33
Section 1. The purpose of research and development	33
Section 2. The need for research and development :	
Technical aspect	36
Section 3. The need for research and development : Economic and industrial aspect	37
Section 4. The need for research and development : Social and cultural aspect	38
Chapter II. The present situation of relational techniques in and of Korea	41

Chapter III. The results of research and development	45
Section 1. Materials and Methods	45
1. Estimation of ingredients ration and taste of other area products and Dolsan leaf mustard Kimchi for standardization of Dolsan leaf mustard Kimchi	45
A. Dolsan leaf mustard Kimchi	45
B. Other area products of leaf mustard Kimchi	45
C. pH and acidity	45
D. C/N ratio	45
E. Sensory-test	45
2. Microfloral changes of lactic acid bacteria and physiological activity	46
3. Mapping of strain through a Lactobacillus identification	46
4. Standardization of salt and ingredients for Dolsan leaf mustard Kimchi	47
A. Leaf mustard Kimchi manufacture by salt concentration	47
B. Leaf mustard Kimchi manufacture by ingredients ratio	47
C. pH and acidity	47
D. D/N ratio	47
E. Sensory-test	48
5. The optimum recipe & sensory-test of optimized Dolsan leaf mustard Kimchi	48

6. Microfloral changes of lactic acid bacteria in Dolsan leaf mustard Kimchi	48
7. The differential sequences of strain Dolsan in Dolsan leaf mustard Kimchi and physiological activity	48
A. Genomic DNA preparation	49
B. PCR amplification	49
C. 16S rDNA sequencing	49
D. Physiology activity	49
a) Test of antioxidative activity	49
b) Test of anticancer activity	50
8. Cytotoxicity of various extracts from Dolsan leaf mustard Kimchi treated with lactic acid bacteria on cancer cells	51
A. Materials	51
B. Reagents	51
C. Starter manufacture	51
D. Preparation and fermentation of Dolsan leaf mustard Kimchi by adding of starter	52
E. pH and acidity	52
F. Total lactic acid bacteria cell number	53
G. Extraction of Dolsan leaf mustard Kimchi by adding of starter	53
H. Cell culture	53
I. Cell cytotoxicity	53
J. Growth inhibition of cancer cell and cell morphology	54
Section 2. Results	55
1. Estimation of ingredients ratio and taste of other area products	

and Dolsan leaf mustard Kimchi for standardization of Dolsan mustard Kimchi	55
A. Ingredients ratio in other area production leaf mustard Kimchi	55
B. C/N ratio in other area products of leaf mustard Kimchi	59
C. Changes of TBA value in pork of other area production leaf mustard Kimchi	60
2. Microfloral changes of lactic acid bacteria and physiological activity	62
A. Microfloral changes of lactic acid bacteria	62
B. Physiology activity	68
a) Anticancer activity	68
b) Antioxidative activity	68
c) ACE inhibitory activity	68
C. Mapping of strain through Lactobacillus identification	69
3. Standardization of salt for Dolsan leaf mustard Kimchi	75
A. Salinity change of leaf mustard Kimchi by salt concentration	75
B. Changes of pH and acidity of leaf mustard Kimchi by salt concentration	76
4. Standardization of ingredients for Dolsan leaf mustard Kimchi	78
A. Salinity change of leaf mustard Kimchi by ingredients ratio	78
B. Changes of pH in leaf mustard Kimchi by ingredients ratio	80
C. Changes of acidity in leaf mustard Kimchi by ingredients ratio	82
D. C/N ratio in leaf mustard Kimchi by ingredients ratio	84
E. Sensory-test of leaf mustard Kimchi by ingredients ratio	84
F. Antioxidative activity of leaf mustard Kimchi by ingredients	

ratio	87
5. The optimum recipe & sensory-test of standardized Dolsan leaf mustard Kimchi	90
6. Microfloral changes of lactic acid bacteria in Dolsan leaf mustard Kimchi	92
7. The differential sequences of strain Dolsan in Dolsan leaf mustard Kimchi and physiological activity	94
A. Identification of lactic acid bacteria by Biolog system	94
B. 16S rDNA sequencing	95
C. Anticancer effect of Dolsan leaf mustard Kimchi by adding lactic acid bacteria	102
8. Cytotoxicity of various extracts from Dolsan mustard Kimchi treated with lactic acid bacteria on cancer cells	105
A. pH and acidity	105
B. Changes of total lactic acid bacteria number	108
C. Sensory-test of standardized Dolsan leaf mustard Kimchi with treated lactic acid bacteria	110
D. Extraction yields of Dolsan leaf mustard Kimchi treated with lactic acid bacteria	112
E. Cytotoxicity of the MeOH extracts of Dolsan leaf mustard Kimchi treated with lactic acid bacteria	114
F. Cytotoxicity of various extracts of Dolsan leaf mustard Kimchi treated with lactic acid bacteria	123
G. Effects of extracts from Dolsan leaf mustard Kimchi treated with	

lactic acid bacteria	132
H. Cell morphology	135
Chapter IV. The degree of achievement and contribution in relation area	141
Section 1. The degree of achievement	141
Section 2. The contribution in relational area	142
1. Technical aspect	142
2. Economic and industrial aspect	142
Chapter V. The plan of practical use of results	145
Chapter VI. Information of international and scientific techniques	151
Chapter VII. References	157
Appendix	165

목 차

제출문	1
요약문 (한글)	3
요약문 (영어)	15
목차(영어)	19
목차(한글)	25
제 1 장 연구개발 과정의 개요	33
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	33
제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성	36
제 3 절 경제·산업적 측면에서의 연구개발 필요성	37
제 4 절 사회·문화적인 측면에서의 연구개발 필요성	38
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	41
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	45
제 1 절 재료 및 방법	45

제 1 항 돌산갓김치 표준화를 위한 돌산 및 타지역 생산 갓김치의 맛과 부재료 함량평가	45
1. 돌산지역 생산 갓김치	45
2. 타지역 생산 갓김치	45
3. 산도와 pH 측정	45
4. C/N ratio 평가	45
5. 관능검사	45
제 2 항 유산균군의 경시적 변화 관찰 및 생리기능성 평가	46
제 3 항 유산균 동정을 통한 균주의 도표화	46
제 4 항 돌산갓김치의 소금 및 부재료 농도의 표준화	47
1. 소금농도에 따른 갓김치 제조	47
2. 부재료 농도에 따른 갓김치 제조	45
3. 산도와 pH 측정	47
4. C/N ratio 평가	47
5. 관능검사	48
제 5 항 표준화된 부재료의 최적 레시피와 표준화갓김치의 관능검사	48
제 6 항 표준화된 부재료 사용 갓김치의 유산균총 분석	48
제 7 항 우수 균종으로 선별된 미생물의 유전적 동정 및 유산균 접종한 갓김치의 기능성 평가	48
1. Genomic DNA 분리	49
2. PCR amplicaiton	49
3. 16S rDNA sequencing	49

4. 생리기능성 평가	49
가. 항산화 활성	49
나. 세포독성측정	50
제 8 항 각 유산균을 starter로 첨가한 돌산갓김치 추출물의 세포독성효과	51
1. 재료	51
2. 시약	51
3. Starter 제조	51
4. Starter 첨가 갓김치 담금과 발효	52
5. 산도와 pH 측정	52
6. 총 유산균수	53
7. Starter 첨가 갓김치 추출 및 분획	53
8. 세포배양	53
9. 세포독성실험	53
10. 암세포 증식억제 효과 및 조직 관찰	54
제 2 절 연구결과	55
제 1 항 돌산갓김치 표준화를 위한 돌산 및 타지역 생산 갓김치의 맛과 부재료 함량평가	55
1. 지역별 갓김치 부재료 함량	55
2. 지역별 갓김치 C/N ratio	59
3. 지역별 갓김치 항산화성 평가	60
제 2 항 유산균군의 경시적 변화 관찰 및 생리기능성 평가	62
1. 유산균군의 경시적 변화 관찰	62
2. 생리활성 평가	68

가. 향암활성	68
나. 향산화 활성	68
다. 항고혈압 활성	68
3. Microlog system에 의한 유산균 동정	69
제 3 항 돌산갓김치 소금농도의 표준화	75
1. 소금농도별 갓김치의 염도변화	75
2. 절임 소금농도에 따른 갓김치의 pH 변화 및 산도변화	76
제 4 항 돌산갓김치 부재료 농도의 표준화	78
1. 부재료 농도에 따른 갓김치의 염도변화	78
2. 부재료 농도에 따른 갓김치의 pH 변화	82
3. 부재료 농도에 따른 갓김치의 산도변화	82
4. 부재료 농도에 따른 갓김치의 C/N ratio	84
5. 부재료 농도에 따른 갓김치의 관능평가	84
6. 부재료 농도에 따른 갓김치의 향산화 효과	87
제 5 항 표준화된 부재료의 최적 레시피와 표준화 갓김치의 관능검사	90
1. 표준화된 부재료의 최적 레시피	90
2. 표준화 갓김치의 관능검사	91
제 6 항 갓김치의 유산균총 변화조사	92
제 7 항 우수 균종으로 선별된 미생물들의 유전적 동정	94
1. Microlog system에 의한 유산균 동정	94
2. 16S rDNA sequencing	95
3. 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 향암효과	102

제 8 항 유산균을 starter로 첨가한 돌산갓김치 추출물의 세포독성 효과	105
1. pH 및 산도	105
2. 유산균수의 변화	108
3. 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 관능검사	110
4. 갓김치의 methanol 추출물과 분획물의 수율	112
5. Starter 첨가 갓김치 methanol 추출물의 세포독성 효과	114
6. 유산균첨가 갓김치 각 용매 분획물의 세포독성 효과	123
7. 세포성장 저해효과	132
8. 세포의 형태학적 변화	135
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	141
제 1 절 연구개발 목표의 달성도	137
제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도	142
제 1 항 기술적 측면	142
제 2 항 경제·산업적 측면	142
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획	145
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보	151
제 7 장 참고문헌	157
부 록	165

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

갓(mustard leaf, mustard greens)은 십자화과에 속하는 경엽 채소류로 줄기와 잎은 염장 발효시켜 김치로 식용되고, 씨(mustard seed)는 신미성 향신료로서 사용된다. 또한 식물성 2차 대사산물인 glucosinolate, flavonoid, polyphenol 류, 함황화합물 등이 풍부하며, 이러한 물질들은 생리활성 물질로서 체내에서 약리 작용을 나타내는데, 특히 면역계를 강화시킴으로써 건강유지에 기여하며 최근에는 암을 예방하는 대표적인 식품으로 여겨지고 있다. 또한 이러한 갓을 이용한 김치는 비타민과 무기질이 풍부하며, 숙성 동안에 glucosinolate로부터 생산되는 기능성 물질인 sinigrin 이외에도 주재료인 Brassica(cabbage, mustard, rapeseed 등)에는 β -carotene, chlorophylls, phenolic compounds 등의 기능성 물질이 함유되어 있으며, 이들에 의한 항산화성, 항돌연변이성, 항암성 등에 대해 보고 된 바 있다. 또한 김치 숙성 중에 생산된 다양한 유산균의 생성은 독특한 맛 뿐 만 아니라 면역세포 증식효과, 항암효과 및 항균효과 등이 보고 된 바 있다. 그 중에서도 *Weissella* 속 균주는 위암이나 위염을 일으키는 원인균중의 하나인 *Helicobacter pylori* 균 증식을 억제한다고 보고 된 바 있다. 또한 돌산갓김치는 돌산이라는 독특한 자연환경과 갓이라는 원재료의 차이로 기존에 알려진 생육환경이 배추나 무김치와는 다르므로 다른 특성을 지닌 유산균이 존재할 가능성이 높다고 생각된다. 하지만 돌산갓김치에서 분리된 미생물 군이나 주요 유산균의 경시적인 변화에 대한보고는 매우 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 타지의 갓에 비해 섬유질과 매운맛이 적고 특이한 향이 존재하고, 돌산의 기후적 조건 때문에 년 중 재배가 가능하고 방충망사 재배로 농약을 사용하지 않는 등 전국에서 그 우수성을 인정받고 있는 돌산갓을 사용하여 갓김치를 제조하고 이 김치의 유용미생물을 분리 동정하여 갓김치의 starter로 사용하여 김치 표준화와 고급화 김치를 개발하고자 하였다. 또한 앞으로 갓김치의 소비 증가가 예상됨에 따라 과학적인 갓김치의 발효 및 생리활성의 변화 검토가 필수적으로 수행되어야 하고, 공업화와 대량생산을 위해서는 갓김치의 품

질 균일화가 이루어져야 한다. 따라서 본 연구의 목적은 갯김치의 국제규격화 (Codex)를 위한 표준화와 갯김치의 생리활성에 관여하는 주요 미생물을 분리 및 동정하여 신종으로서의 가능성을 탐색하고 분리된 기능성 균주 및 최적 부재료를 첨가한 표준화된 고기능성 돌산갯김치를 제조하는 것이다. 이러한 노력으로 추후 2012년 여수 해양엑스포 유치와도 관련하여 한국의 김치를 널리 알릴 수 있는 계기로 삼아 여수지역 식품문화에 이바지하고 홍보함으로써 국내 및 세계적인 소비시장을 확대 할 수 있고, 재배농민들 또한 안정적인 수익을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

돌산 및 타 지역 생산 갯김치의 맛과 부재료의 함량을 조사하기 위하여 돌산지역 갯김치 외에 전남 여수, 장성, 순천과 전북 전주 남원, 경남 함양 등 총 6곳의 갯김치를 선정하였고, 산도와 pH, C/N ratio 평가, 관능검사를 실시하였다. 관능평가는 외관, 조직감, 탄산미, 짠맛, 신맛, 매운맛 등 종합적 기호도를 7점 평점제로 평가하였다.

돌산갯김치의 유산균을 분리 동정하기 위하여 제조된 돌산갯김치를 4, 10, 20, 30℃에서 각각 발효 시키면서 원하는 발효시간에 시료를 채취하여 분쇄기로 분쇄한 후 그 액을 다시 멸균된 거즈로 거르고, 멸균된 생리식염수에 단계별로 희석하여 각 온도별 유산균군의 경시적인 변화를 선택배지를 사용하여 관찰하였고 Biolog system으로 탄소원 이용정도를 비교하여 확인하였다. 각 발효조건별 생리기능성 평가는 DPPH에 의한 유리라디칼 소거능력 검사를 통한 항산화 효과와 폐암세포와 폐정상세포의 비교를 통한 선택적 독성실험을 통한 항암활성을 측정하였다.

돌산갯김치의 소금 농도와 부재료 농도의 표준화를 하기 위하여 발효 소금 농도 조건을 1, 2, 3% 소금농도에서 각각 발효시켰고 소금의 농도는 salt analyzer로 측정하였다. 부재료는 일반적인 갯김치 제조방법으로 제조한 후 부재료인 고춧가루, 파, 마늘, 생강의 농도를 0.5~2% 범위내로 조절하여 최적조건을 확립하였다. 그리고 표준화된 소금농도 부재료는 pH, 산도, C/N ratio, 관능평가를 실시하였다. 표준화된 부재료를 사용하여 갯김치를 제조하고 갯김치내의 유산균총을 분석하였다. 유산균총 변화 조사를 위해 *Leuconostoc* 속은 PES배지로, *Lactobacillus*는 LBS 배지로, *Pediococcus*, *Streptococcus*는 m-Enterococcus agar로 선택 계수하였다. 선택계수를 통해 우수 균종으로 선별된 미생물들의 유전적인 동정을 위해 16S rDNA sequencing을 이용 돌산갯

김치에서 분리한 유용 미생물의 정확한 동정명의 확립과 신규성을 규명하였다. 또한 분리된 각각의 단일 유산균을 농도별로 starter로 사용하여 DPPH에 의한 유리라디칼 소거능력 검사를 통한 항산화 효과와 암세포에 대한 선택적인 독성 여부를 평가하였다. 또한 최적 표준화된 돌산갓김치를 시험생산하고, 검증절차를 거쳐 개선하고 우량 유산균을 이용한 돌산갓김치의 암세포 억제효과를 위암세포와 폐암세포를 이용하여 메탄올 추출물 및 각 분획추출물로 확인하였다.

제 2 절 기술적인 측면에서의 연구개발 필요성

갓김치의 주재료인 갓(Leaf Mustard : *Brassica juncea*)은 십자화과에 속하는 경엽 채소류로 줄기와 잎은 염장 발효시켜 김치로 식용되고 씨(Mustard seed)는 신미성 향신료로서 사용된다. 특히 돌산갓은 섬유질과 매운맛이 적어서 그 우수성을 인정받고 있다. 또한, 식물성 2차 대사산물인 glucosinolate, flavonoid, phenol, 함황화합물 등이 풍부하며 이러한 물질들은 생리활성 물질로서 체내에서 약리작용을 나타내는데, 특히 면역계를 강화시킴으로써 건강유지에 기여하며 최근에는 암을 예방하는 대표적인 식품으로 여겨지고 있다. 또한, 갓김치는 숙성 중에 갓 자체의 myrosinase 가 작용하여 여러 가지 함황성분과 그 관련물질이 생성되어 발효를 지연시키고 저장성을 증가시켜 준다. 따라서 배추김치에 비해 상품으로 유통시 이점을 가진다. 비타민과 무기질이 풍부한 갓김치는 유산균 발효로 인한 항생물질의 생산 및 식물성 2차 대사산물 등의 생성으로 건강상의 유익한 이점도 준다. 근년에 들어 김치에 관한 연구가 활발해짐에 따라 김치에서 분리된 신종균이 속속 보고 되고 있다. *Lactobacillus kimchi*, *Leuconostoc kimchi* 등이 보고되었으며, *Leuconostoc*-like species인 *Weissella*속 균주가 지금까지 8종 보고 되었으며 우리나라 김치유래의 *Weissella kimchi* 가 2002년에 신종으로서 보고되어졌다. *Weissella* 속 균주는 위암이나 위염을 일으키는 원인균중의 하나인 *Helicobacter pylori* 균 증식을 억제하는 기능성도 보고된 바 있다. 따라서 오랜 역사를 지닌 김치는 나름대로의 생육환경이 특이해서 관여하는 유산균 또한 외국과는 다른 신종이 보고된다고 생각된다. 그러므로 돌산갓김치 또한 돌산이라는 독특한 환경과 갓김치라는 생육환경이 배추김치와는 다르므로 다른 특성을 지닌 유산균이 존재할 가능성이 있다고 사료된다. 그러나 돌산갓김치에서 분리된 미생물 균이나 주요 유산균의 경시적 변화에 대한 보고가 매우 미비한 실정이다. 따라서 갓김치가 세계적으로 인정받기 위해서는 그 우수성을 과학적으로 입증해야하며 그 결과를 바탕으로 설득력 있는 홍보와 품질이 균일한 맛있는 갓김치의 대량생산 및 공급이 무엇보다도 중요하리라 생각된다. 앞으로 갓김치의 소비증가가 예상되므로 공업화와 대량생산을 위해서는 갓김치의 품질 균일화가 이루어져야 하며 이를 위해서는 갓김치내의 주요 미생물균의 분리 및 동정이 필수적이라고 사료된다.

제 3 절 경제·산업적 측면에서의 연구개발 필요성

김치는 최근 국제올림픽의 공식 메뉴로 지정되어 세계화를 앞두고 있으며, 그 종류도 다양하다. 4계절 다양한 재료에 따라 독특한 맛을 내며 그에 따른 다양한 생리활성을 기대하게 된다. 다양한 김치 가운데 갓김치는 갓이 주원료인데, 갓 (mustard leaf, mustard greens)은 십자화과에 속하는 경엽 채소류중의 하나로 겨자(*Brassica juncea*, Brown mustard, Indian mustard)의 잎을 말하며 특 쏘는 독특한 매운맛을 갖고 있어서 그 자체로서 김치를 담그거나 다른 김치의 부재료로서 널리 이용되고 있다. 특히 타지의 갓에 비해 전남 여수의 돌산 갓은 섬유질과 매운맛이 적으며 특이한 향이 존재하고 돌산의 기후적 조건 때문에 연 중 재배가 가능하고, 방충망사 재배로 농약을 사용하지 않는 등 그 우수성을 인정받고 있다. 판매량 또한 꾸준히 늘고 있고 국내 소비시장은 150~200만 톤에 이른다. 그러나 김치 제조업체들은 매우 영세한 실정이다. 따라서 갓김치의 우수성을 입증할 수 있는 과학적인 홍보 자료들이 매우 필요한 실정이며 이와 같은 과학적 자료들이 부가된다면 국내 및 세계적 소비시장은 더욱 더 확대될 것으로 예상된다.

제 4 절 사회·문화적 측면에서의 연구개발 필요성

근년에 들어 우리김치에 대한 연구가 활발해지고 있고, Codex 규격기준이 정해지는 등 세계 식품으로서 발돋움하고 있다. 그러나 아직도 과학적인 자료가 부족해서 설득력 있는 홍보를 하지 못하는 실정이며 이러한 홍보부족으로 외국인들이 일본의 쓰케모노를 우리나라 고유의 전통발효 식품인 김치로 오해하는 안타까운 일들이 가끔 일어난다. 또한 돌산갓김치는 전라남도 특산물로서 여수시민들에게 긍지와 자부심을 주기는 하나 실제로 제조업체들은 매우 영세한 실정으로, 자체적으로 과학적 연구를 하거나 고부가가치의 상품을 개발하기에는 역부족이다. 돌산갓김치 산업을 활성화하기 위해서는 돌산 갓 생산자, 가공업체, 농업기술센터 담당자, 시청의 농업축산과, 전라남도의 농정계와 전남대 돌산 갓김치 연구팀으로 구성된 연구회의 공유시스템을 구축해야 한다고 사료된다. 그리하여 돌산갓김치를 표준화하고 과학적으로 생리활성을 규명하여 세계인들에게 홍보함으로써 돌산갓김치는 건강식품으로서 인정받게 될 것이며 여수시민 뿐 아니라 우리국민들의 자부심도 높일 수 있다고 사료된다. 최근 우리국민들은 서구의 인스턴트식품을 매우 선호하는 경향인데 이러한 식습관 때문에 서구형의 각종 질병이 늘어나고 있는 추세이다. 따라서 갓김치의 과학적 규명을 통하여 국내 및 세계적 건강식품으로 인정받을 수 있으리라 사료되며 수출 길을 통한 갓 재배농업인의 안정적인 수익 확보 및 수익증대가 가능하리라 생각된다.

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

국내에서는 1950년 이래 현재까지 김치관련 자료로는 김치의 제조, 발효, 성분분석, 산패방지 및 보존, 위생, 산업화 관련 연구들이 수행되어 약 600여 편의 연구논문과 특허들이 보고되고 있으나 갓 김치 관련 연구논문은 미비한 실정이었다. 그러나 본 연구실은 1996년도부터 지역 특산물인 돌산갓에 대한 연구를 시작하였으며, 그 당시 외부의 지원과 관심이 거의 없는 상황에서 자체연구를 통한 다수의 결과를 바탕으로 2000년 8월부터 2002년 7월까지 농림부 산하 농림기술관리센터의 지원으로 돌산갓의 생리기능성 탐색 및 응용식품을 개발을 하였는데, 돌산갓김치 발효과정 중 추출물의 일반성분(조단백, 조지방, 순단백량, 환원당량)의 추이를 관찰하여 개략적인 기능성 물질의 성분을 추정하였으며 갓의 부위별 추출물을 일반김치에 적용하여 일반 김치의 항암성, 항산화성, 혈압강하, 저장성 등에 대해 평가하였다. 또한 갓을 응용한 기능성 제품으로서 갓차, 갓 음료, 갓 조미료, 해물전용 조미료도 개발하였다. 기능성 갓김치의 개발은 갓김치의 발효 중에 각 기능성이 최적일 때 생존하고 있는 균을 분리하여 갓김치의 제조시에 첨가하고, 발효과정에 따라 항암성(암세포와 정상세포의 비교를 통한 선택적 독성실험), 항균성, 항산화성, 혈압 강하활성을 평가하였다. 위의 연구를 바탕으로 갓김치는 발효과정에 따라 기능성이 변화되는 것을 알 수 있었으며 이는 갓김치의 미생물과 관련되므로 갓김치 미생물을 순수분리하고 정확한 동정명을 밝히는 것이 매우 중요한 과제라 사료된다. 또한 근년에 김치 유래의 신종 유산균이 속 속 보고되고 있으며, 미생물의 특허로 높은 부가가치가 예상된다. 그러나 돌산 갓김치 관련 미생물에 대한보고는 매우 미비한 실정이므로 2단계의 연구가 꼭 필요하리라 사료된다. 또한, 농업인 개발과제에 대하여 연구 지도를 하여 2002년 8월 27일 여수시 농업기술센터에서 돌산 갓김치와 유자즙을 이용한 유산균 건강음료개발 결과물인 시제품(씨플라이) 시음회를 가졌다. 본 연구실의 갓에 대한 연구결과를 토대로 2002년 1월 28일자 여수저널에서 위기의 돌산갓이란 제목으로, 2002년 2월 4일자 여수저널에서 돌산갓 물김치 유산균 건강음료란 제목으로 홍보되었으며, 기타 지방방송에 2회 홍보가 되었다. 그러나 국외의 기술개발 현황은 돌산갓이 여수 돌산지역에 한하여 재배되는 품종으로 국외와의 비교는 불가능하다고 사료된다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 재료 및 방법

제 1 항 돌산갓김치 표준화를 위한 돌산 및 타 지역 생산 갓김치의 맛과 부재료 함량평가

1. 돌산지역 생산 갓김치

돌산지역 돌산갓 영농조합에서 제조한 갓김치를 제조 직후 냉장 상태에서 실험실로 운반 제조시 부재료 함량을 조사하였다.

2. 타 지역 생산 갓김치

돌산지역 이외의 지역에서 생산되는 갓으로 제조한 갓김치를 제조 직후 구입하여 동일한 온도에서 발효하면서 실험에 임하였다. 돌산 이외의 지역으로는 전남 여수, 장성, 순천과 전북 전주, 남원과 경남 함양 총 6곳을 조사하였다.

3. 산도와 pH의 측정

발효 기간에 따른 지역별 갓김치의 산도는 갓김치를 20g 취하여 blender로 마쇄하고 여기에 180ml의 증류수를 가하여 Whatman no. 2로 여과하여 0.1N의 NaOH로 적정하였으며 lactic acid(%)로 나타내었다. pH는 산도와 같은 시료로 pH meter를 이용 실온에서 측정하였다.

4. C/N ratio 평가

건조된 시료를 원소 분석기에 적용 분석하였으며, 원소 분석기는 pure copper를 충전한 반응 관에 GC column과 TCD를 사용하였다.

5. 관능검사

관능검사법은 평점법(scoring test)을 실시하여 맛, 향 색, 전체적인 순응도에 대해서 7점법에 의거하여 설문지를 작성하였고 훈련된 전남대학교 학생을 상대로 평가하여 통계처리 하였다.

제 2 항 유산균군의 경시적 변화 관찰 및 생리기능성 평가

제조된 돌산갓김치를 4, 10, 20, 30℃에서 각 각 발효시키면서 원하는 발효 시간에 시료를 채취하여 분쇄기로 분쇄한 후 그 액을 다시 멸균 거즈로 거르고, 멸균된 생리식염수에 단계별로 희석하여 미생물의 경시적 변화를 선택배지를 사용하여 관찰하였다. *Leuconostoc*속과 *Weissella* 속은 gram 음성균의 생육을 억제하고 큰 colony를 얻기 위하여 PES(phenyl ethyl alcohol과 sucrose를 첨가한) 배지를 사용하여 20℃에서 5일간 평판 배양하였으며 *Lactobacillus* 속은 LBS(lactobacillus selection medium)배지를 사용하여 37℃에서 3일간 평판 배양하였으며, *Pediococcus* 속과 *Streptococcus*속은 m-Enterococcus agar를 사용하여, 32℃에서 48시간 배양하여 형성된 colony 중에서 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)로 처리하여 붉은 색을 나타내는 colony를 *Enterococcus*로, 흰색을 나타내는 콜로니는 *Pediococcus*로 계수하여 colony forming unit(CFU/ml)로 표시하여 미생물의 경시적 변화를 관찰하였다. 총균수의 계수는 TGY(Tryptone glucose yeast extract) 고체배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양한 수를 CFU/ml로 표시하였다.

제 3 항 유산균 동정을 통한 균주의 도표화

생리기능성이 우수한 발효시간의 우점 종균의 분리 및 동정하기 위하여 균주의 분리 및 Biolog system에 의한 동정을 위해 발효기간 중 일정 시점에서 김치즙액을 취하여 *Leuconostoc* 속은 PES 배지, 20℃에서, *Lactobacillus* 속은 LB배지, 37℃에서 *Pediococcus* 속과 *Streptococcus* 속은 m-Enterococcus agar, 32℃에서 48시간 배양하여 형성된 콜로니를 CFU/ml로 표시하여 미생물의 경시적 변화를 관찰하였다. 미생물의 동정은 형성된 각 각의 콜로니를 BUA agar에 옮기고 혐기성 jar(anaerobic gas pak system)에서 혐기 배양한 후 An-microplate에 옮겨 혐기 배양하였고, Biolog system으로 동정하였다.

제 4 항 돌산갓김치의 소금 및 부재료 농도의 표준화

1. 소금농도에 따른 갓김치 제조

갓을 흐르는 물로 깨끗이 씻은 후 물기를 완전히 제거하고 10% 소금용액에 2시간, 4시간 침지, 15% 소금물에 4시간, 20%의 소금물에 4시간 침지하고, 갓 무게의 1.5배의 증류수로 2회 세척한 후 30분간 물기를 제거하였다. 절임한 갓에 준비된 부재료를 배합하여 갓 김치를 제조 10℃에서 0일에서 15일 동안 발효하여 실험에 사용하였다.

2. 부재료 농도에 따른 갓김치 제조

갓을 흐르는 물로 깨끗이 씻은 후 물기를 완전히 제거하고 10% 소금용액에 뿌리 부분을 30분 침지시킨 후 전체적으로 30분 침지하였다. 후에 물기를 완전히 제거하고 갓 무게의 1.5배의 증류수로 2회 세척한 후 고농도의 소금물(15%)에 행군 후 1시간 동안 물기를 제거하였다. 절임한 갓에 준비된 부재료인 고춧가루, 마늘, 생강, 설탕, 멸치액젓, 찹쌀풀을 농도에 따라 배합하여 갓 김치를 제조 10℃에서 0일에서 15일 동안 발효하여 실험에 사용하였다.

3. 산도와 pH의 측정

발효 기간에 따른 소금농도별, 부재료 농도별 갓김치의 산도는 갓김치를 20g 취하여 blender로 마쇄 하고 여기에 180ml의 증류수를 가하여 Whatman no. 2로 여과하여 0.1N의 NaOH로 적정하였으며 이때 소요된 NaOH용액을 lactic acid(% , w/w)로 환산하여 나타내었다. pH는 산도와 같은 시료로 pH meter로 실온에서 측정하였다.

$$\text{Lactic acid(\%)} = \frac{\text{ml of 0.1N NaOH} \times 0.009}{\text{Weight of sample(g)}} \times 100$$

4. C/N ratio 평가

건조된 시료를 원소분석기(EA1110 model, Italy)에 적용 분석하였으며, 원소분석기는 pure copper를 충전한 반응관에 GC column과 TCD를 사용하였다.

5. 관능검사

관능검사법은 평점법(scoring test)을 실시하여 맛, 향, 색, 전체적인 순응도에 대해서 7점법에 의거하여 설문지를 작성하였고 훈련된 전남대학교 생명산업공학전공 학생을 상대로 평가하여 통계처리 하였다.

제 5 항 표준화된 부재료의 최적 레시피와 표준화 갓김치의 관능검사

제 6 항 표준화된 부재료 사용 갓김치의 유산균총 분석

제조된 돌산갓김치를 4, 10, 20, 30℃에서 각 각 발효시키면서 원하는 발효 시간에 시료를 채취하여 분쇄기(HMF-340, Hanil Co., Korea)로 분쇄한 후 그 액을 다시 멸균된 거르기로 거르고, 멸균된 생리식염수에 단계별로 희석하여 미생물의 경시적 변화를 선택배지를 사용하여 관찰하였다. *Leuconostoc* 속과 *weissella* 속은 gram 음성균의 생육을 억제하고 큰 colony를 얻기 위하여 PES(phenyl ethyl alcohol과 sucrose를 첨가한) 배지를 사용하여 20℃에서 5일간 평판 배양하였으며 *Lactobacillus* 속은 LBS(*Lactobacillus* selection medium)배지를 사용하여 37℃에서 3일간 평판 배양하였으며, *Pediococcus* 속과 *Streptococcus* 속은 m-Enterococcus agar를 사용하여, 32℃에서 48시간 배양하여 형성된 colony 중에서 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride)로 처리하여 붉은색을 나타내는 colony를 *Enterococcus*로, 흰색을 나타내는 콜로니는 *Pediococcus*로 계수하여 colony forming unit(CFU/mL)로 표시하여 미생물의 경시적 변화를 관찰하였다. 총균수의 계수는 TGY(tryptone glucose yeast extract) 고체배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양한 수를 CFU/mL로 표시하였다.

제 7 항 우수 균종으로 선별된 미생물의 유전적 동정 및 유산균 접종한 갓김치의 기능성 평가

분리된 유산균 중 가장 생리 기능성이 우수했던 유산균(strain Dolsan)의 단일 colony를 배양하여 16S rDNA sequencing을 실시하였다.

1. Genomic DNA 분리

균 배양액 5ml를 원심 분리하여 세포 침전물을 얻었다. 농축된 세포 침전물을 PBS로 washing 한 후 Lysozyme 25 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 6~8시간 반응시켰다. 여기에 50 μ l의 10% SDS용액을 넣어 cell을 lysis 시킨 후, protease를 50 μ l 넣고 55 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 동일 volume의 TE-saturated phenol을 넣고 1분간 격렬하게 vortexing한 후 원심 분리하여 상등 액을 취하였다. 상등액에 phenol/chloroform/isoamylalcohol(25:24:1)를 첨가하여 vortexing하고 원심분리 한 후 상등액을 수거하였다.

2. PCR amplification

분리된 16S ribosomal RNA를 PCR로 증폭하기 위해 universal 16S rDNA primer인 27F(5'-AGAGTTTGGATCATGGCCAG-3')1492(5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 denaturation, 60 $^{\circ}$ C에서 1분간 annealing, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 30초 동안 polymerization 시키는 조건에서 PCR machine으로 증폭하였다. PCR에 의해 증폭된 products는 agarose gel electrophoresis로 DNA band의 크기를 확인한 후, PCR purification kit을 사용하여 증폭된 DNA를 정제한 후 sequencing에 사용하였다.

3. 16S rDNA sequencing

정제한 PCR products(약 1400bp)를 분리 정제하여 cycle sequencing reaction의 template로 사용하고, 여기에 사용하는 1 \times reaction big dye와 primer의 농도는 제조사의 지시에 따르며, isopropanol 정제를 거친 DNA는 ABI PRISM 3700 DNA analyzer를 사용하여 염기서열을 분석하였다. BLAST DNA database search service를 사용하여 GENENBANK와 RDP(RNA database project)의 ribosomal DNA sequencing과 비교하여 동정하였다.

4. 생리 기능성 평가

가. 항산화활성

부재료의 농도를 달리하여 발효 하였을 때의 항산화 활성을 비교하기 위해

갓김치를 동결 건조하여 시료로 하고 Ferric thiocyanate의 원리로 항산화 효과를 측정하였다. Ferric thiocyanate의 원리는 유지 중에 존재하는 과산화물은 주로 hydroperoxide이며, hydroperoxide는 유지의 자동산화반응에서 생성되는 1차 생성물로서, 과산화물의 측정(peroxide value)하여 유지의 변질 정도를 통해 항산화 효과를 측정하는 방법이다. 따라서 부재료 농도에 따른 갓김치의 항산화 효과를 알아보기 위하여 대조군으로 Distilled Water(D.W.), Salt Water(S.W.), Ascorbic acid(A.A.), Linolenic acid(L.A.)를 사용하여 실험군과 비교하였다. 시료를 동결 건조하여 용매 추출하고 감압농축을 하여 실험에 사용하였다. 그 후 농축된 시료 2ml에 2.5%의 Linolenic acid 2ml를 첨가하여 0.01M phosphate buffer를 4ml 첨가하고, 여기에 DW를 2ml 넣고 빛을 차단한 상태로 37℃에서 배양하고, 2일 간격으로 3회 측정하였는데 측정시 위 혼합액 0.1ml을 취한 후 75% EtOH 4.7ml에 30% ammonium thiocyanate를 0.1ml 첨가하고, 0.02M ferrous chloride 0.1ml을 첨가하여 정확히 3분 후 500nm에서 흡광도를 측정하여 얻은 결과를 평균값으로 나타내었다. 모든 결과는 3회 반복 실험한 결과를 평균값으로 나타내었다.

나. 세포독성 측정

세포독성은 MTT assay를 항암활성 측정법의 하나로 사용하였다. MTT는 (3-[4,5-dimethyl thiazol]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)오직 살아있는 세포내의 mitochondria 내에 있는 dehydrogenase에 의해 불용성의 formazan이 생성되는 원리를 이용하여 생존 암세포의 효소활성을 측정하는 방법이다. 암 세포주로는 간암세포인 HepG2(Hepatocellular carcinoma, human, ATCC No. HB-8065) 세포를, 5% CO₂ Incubator에서 37℃에 배양하였다. 배양된 세포를 96well plate에 1×10^4 cells/well 이 되도록 분주하여 24시간 동안 부착시키고, 유산균을 stater로 첨가한 돌산갓김치 즙액 시료를 최종농도가 1, 3, 6%가 되도록 배지에 첨가한 후 72시간 배양하였다. 여기에 인산생리식염수에 5mg/ml의 농도로 조제한 MTT용액 20 μ l를 첨가해 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 4시간 후 isopropanol 150 μ l를 넣어 불용성 formazan을 녹이고 microplate reader(570nm)에서 흡광도를 측정하여 암 세포의 사멸성을 대조구(시료를 넣지 않은)와 비교하여 (대조구의 흡광도-시료처리 구의 흡광도/대조구의 흡광도)×100의 값을 구하고 cytotoxicity(%)로 나타내었으며 모든 실험은

3회 반복한 평균값으로 나타내었다.

제 8 항 각 유산균을 starter로 첨가한 돌산갓김치 추출물의 세포독성효과

1. 재료

실험에 사용한 갓(leaf mustard, *Brassica juncea*)은 전라남도 여수시 돌산읍에서 수확한 것을, 마늘, 파, 고춧가루, 생강, 소금, 까나리액젓(까나리 원액 100%, 식염 23 ± 1 %, 청정원), 새우젓은 전남 여수 지역 마트에서 갓김치 제조 당일 각각 구입하여 사용하였으며, 찹쌀가루와 물의 비율은 6.6:100(w/v)으로 하여 찹쌀 풀을 쭈어서 사용하였다.

2. 시약

유산균 첨가 갓김치 추출에 사용된, methanol, n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol은 Duksan pure chemical Co., LTD(Korea)제 GR급이었으며, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide], dimethyl-sulfoxide(DMSO), isopropanol, 전기영동 젤의 염색에 이용되는 ethidium bromide(EB), 세포배양을 위해 사용한 RPMI 1640 medium은 Sigma chemical Co.(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 유산균 배양용으로 사용한 Lactobacilli MRS broth는 Difco Co.(USA)로부터, G-DEX™ Genomic DNA Extraction kit는 Intron biotech.로부터 구입하여 사용하였으며, fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA 그리고 10000 units/ml penicillin-streptomycin은 Cambrex Bio. Science(USA)로부터 구입하여 사용하였다. 암세포주로는 A 549 (lung carcinoma, human, ATCC No. CCL-185)는 ATCC로부터, SNU 601(gastric carcinoma, human)은 한국세포주은행(서울의대)로부터 분양받아 배양하면서 실험에 사용하였다.

3. Starter 제조

유산균은 *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*, *Weissella kimchi*가 사용되었다. 이들은 모두 본 연구실에서 발효시킨 적숙기(pH 4.5, 산도 0.65%)의 갓김치로부터 분리한 유산균들

로, 모두 Difco lactobacillus MRS medium(MRS, pH 6.5)을 사용하여, 24℃에서 4일간 배양하였다. 배양된 균체들을 1500rpm에서 4 min간 원심 분리하여 균체를 회수하고, saline(0.85% NaCl 수용액)으로 3회 세척하여, 1×10^8 CFU/ml의 농도가 되도록 saline으로 희석하여 사용하였다.

4. Starter 첨가 갓김치 담금과 발효

갓을 흐르는 물에 깨끗이 씻은 다음 물기를 완전히 제거한 후 2×3 cm로 절하여 10% 소금 용액에 1시간 절인 다음 갓 무게의 1.5배의 증류수로 2회 씻은 후 30분간 물기를 제거하였다. 절임 한 갓에 준비된 부재료를 한데 모아 혼합한 후 항아리에 5kg씩 나누어 담고, 각 유산균의 스타터 희석액(1×10^8 CFU/ml) 1.5%를 접종하였다. 이 때 스타터는 각 균주별로 단독 접종하였다. 제조한 갓김치는 스타터를 접종하지 않는 것(Dolsan leaf mustard *Kimchi*) 1종류와, 스타터를 접종한 것은 스타터 종류에 따라 *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides*를 접종한 것(이하 *Leuconostoc mesenteroides* 갓김치라 함), *Leuconostoc gelidum*를 접종한 것(*Leuconostoc gelidum* 갓김치라 함) 및 *Weissella kimchi*를 접종한 것(이하 *Weissella kimchi* 갓김치라 함)의 3종류였다. 제조가 끝난 갓김치는 항아리에 담아 10℃의 항온기에서 32일간 발효시켰다. 모든 김치의 최종 소금 농도는 2.0%였다.

5. 산도와 pH의 측정

발효 기간에 따른 소금농도별, 부재료 농도별 갓김치의 산도는 갓김치를 20g 취하여 blender로 마쇄 하고 여기에 180ml의 증류수를 가하여 Whatman no. 2로 여과하여 0.1N의 NaOH로 적정하였으며 이때 소요된 NaOH용액을 lactic acid(% , w/w)로 환산하여 나타내었다. pH는 산도와 같은 시료로 pH meter(model 735P, istack, Korea)로 실온에서 측정하였다.

$$\text{Lactic acid(\%)} = \frac{\text{m}\ell \text{ of } 0.1\text{N NaOH} \times 0.009}{\text{Weight of sample(g)}} \times 100$$

6. 총 유산균수

마쇄한 갓김치는 멸균 거즈로 여과하여, 그 여과액 1ml을 취하여 saline으로 단계적으로 희석하여, 희석액 500 μ l를 취해 Lactobacillus MRS 고체배지에 도말하여, 24 $^{\circ}$ C에서 48시간 배양한 후 standard plate count 방법으로 균수를 측정하여 CFU/ml로 표시하였다.

7. Starter 첨가 갓김치 추출 및 분획

10 $^{\circ}$ C에서 32일간 발효시킨 갓김치는 각각 동결건조한 후 시료로 사용하였다. 분말시료에 20배(w/v)의 70% MeOH(methanol)을 첨가하여 8시간 교반하여 추출하였으며, 이를 3회분 모아 Whatman No.2로 여과한 후 rotary evaporator로 용매를 제거하여, 메탄올 추출물을 얻었다. 이 메탄올 추출물은 소량의 물에 현탁 시킨 후 n-hexane를 가하여 분획하고, 그 후 극성을 증가시키는 계통 분획법에 의해 CHCl₃(chloroform), EtOAc(ethyl acetate), n-BuOH(n-butyl alcohol)로 분획하여 여과하고, rotary evaporator로 용매를 제거하여 CHCl₃, EtOAc, n-BuOH 및 H₂O 분획물을 얻었다. 이들 분획물들은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 용해시킨 후, 50mg/ml의 농도로 추출물의 stock solution을 제조한 후 RPMI 1640 배지로 단계 희석하여 세포독성실험용 최종시료를 제작하여 사용하였다.

8. 세포배양

인체 폐암세포인 A 549와 인체 위암세포인 SNU 601은 10000units/ml의 penicilline-streptomycin과 10% FBS가 함유된 RPMI 1640을 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator(Model 3546, Forma Scientific, USA)에서 배양하였다. 배양된 각각의 암세포는 일주일에 2~3회 refeeding하고, 6~7일 만에 phosphate buffered saline(PBS)으로 세척한 후 trypsin-EDTA로 분리하여 원심분리한 후 집적된 암세포에 배지를 넣고, 피펫으로 암세포가 골고루 분산되도록 잘 혼합하여 6~7일 마다 계대 배양하면서 실험에 사용하였다.

9. 세포독성실험

3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma) 분석법은 살아있는 세포내 미토콘드리아의 dehydrogenase에

의해서 생성되는 formazan을 spectrophotometer를 이용하여 측정함으로써 세포에 대한 독성을 조사하는 방법으로서, 각종 항암제에 대한 *in vitro* 세포독성에 고안한 연구에서 사용되어온 dye exclusion test나 [³H]-thymidine uptake assay와 비교 시 실험 조작이 매우 간편하고, 재현성이 우수하여 세포독성여부 대량검색이나 초기 검색단계에서 적당한 방법으로 많이 이용되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 배양된 암세포를 1×10⁴ cells/well이 되도록 조절하여, 96well에 180μl씩 분주하여 24시간동안 부착시키고, 시료를 최종농도가 1, 5, 10, 50, 100, 250, 500, 750, 1000 μg/ml의 농도가 되도록 배지에 첨가하고 48시간 배양한 후, 분석당일 조제한 MTT 용액 20μl를 첨가하고, 동 배양조건에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 배양액은 버리고, 1M HCl -isopropanol 150μl 넣어 30분간 실온 방치 후, MTT formazan을 용해한 후 microplate reader (Benchmark, Biorad Co., Germany)을 이용하여 570nm에서 확인하였으며 각 시료의 농도 당 3개씩 측정하였다.

$$Cytotoxicity = \frac{\text{대조구의 흡광도} - \text{시료처리구의 흡광도}}{\text{대조구의 흡광도}} \times 100$$

10. 암세포 증식억제 효과 측정 및 조직학적 관찰

부착성 세포들은 trypsin-EDTA를 처리하여 1×10⁵cells/ml로 culture dish(100×20mm, Falcon Co., USA)에 배지 9ml과 함께 접종하였다. 24시간 후 250 μg/ml 농도로 제조한 시료와 신선한 배지를 첨가하였다. 7일 동안 배양한(3, 5, 6일째 배지교환) 각각의 실험군과 대조군의 세포는 automatic photomicrographic system(Nikon, TS-100, Japan)을 100배 배율로 암세포의 형태 변화를 관찰한 후 사진 촬영하였다. 그 후 세포는 PBS로 두 번 세척한 후, trypsin-EDTA 처리하여 세포를 수집한 후, 일부를 취하여 0.4% trypan blue를 가하여 염색되지 않는 살아있는 세포를 hemocytometer로 세포수를 측정하였다.

제 2 절 연구결과

제 1 항 돌산갓김치 표준화를 위한 돌산 및 타 지역 생산 갓김치의 맛과 부재료 함량평가

1. 지역별 갓김치의 부재료 함량

여수의 돌산갓 영농조합과 타 지역의 부재료 함량은 Fig. 1-1과 같다. 이와 같은 부재료의 함량은 여수와 여수 이외의 갓김치 가공공장에서 담금 방법과 재료 배합비를 조사하였다. 조사지역으로는 여수 돌산지역은 돌산갓 영농조합의 갓김치 재료 혼합비를 참조하였으며, 돌산지역 이외의 타 지역으로는 전남(장성, 순천)과 전북(전주, 남원), 경남(함양)의 갓김치 생산 공장에서 부재료 함량과 담금 방법을 조사하였다. 이들 지역 갓김치의 발효기간에 따른 관능평가 결과는 Table 1-1, 1-2와 같다. Table 1-1은 발효 4일째(덜 숙성된)의 관능평가 결과로서 전체적인 순응도에서는 전남 장성 갓김치가 가장 우수한 것으로 나타났다. 가장 순응도가 좋았던 전남장성 갓김치의 경우, 부재료 함량이 모두 평균 이상으로서 특히 고춧가루(16.7%)와 젓갈(멸치젓 5.3%과 새우젓 6.7%), 찹쌀풀(18.3%)등의 함량이 모두 다른 지역 갓김치에 비해서 가장 높아서 부재료의 함량이 높을수록 갓김치의 관능평가 점수가 우수한 것으로 나타났다. 그러나 Table 1-2는 숙성된 이후의 갓김치에 대한 관능평가 결과로서 돌산갓 영농조합의 갓김치가 가장 높은 점수를 받았다. 돌산갓 영농조합의 갓김치는 고춧가루 9%, 마늘, 생강 각 각 3%, 젓갈 7%, 찹쌀풀 1%로서, 모든 부재료의 비율이 평균 또는 그 이하로서 담백한 갓김치가 숙성이후에는 좋은 결과를 나타내었다. 사용빈도가 50% 이상인 부재료들 중에서 평균하여 아래의 그림과 같이 나타내었다. 부재료 함량에 있어서 가장 큰 편차를 나타낸 재료는 찹쌀 풀로서 $\pm 7.40g$ 이었으며, 그 다음으로는 고춧가루 $\pm 5.77g$ 이었다. 기타 재료로 특이한 것은 청각, 밤채, 마른 멸치 등이었다.

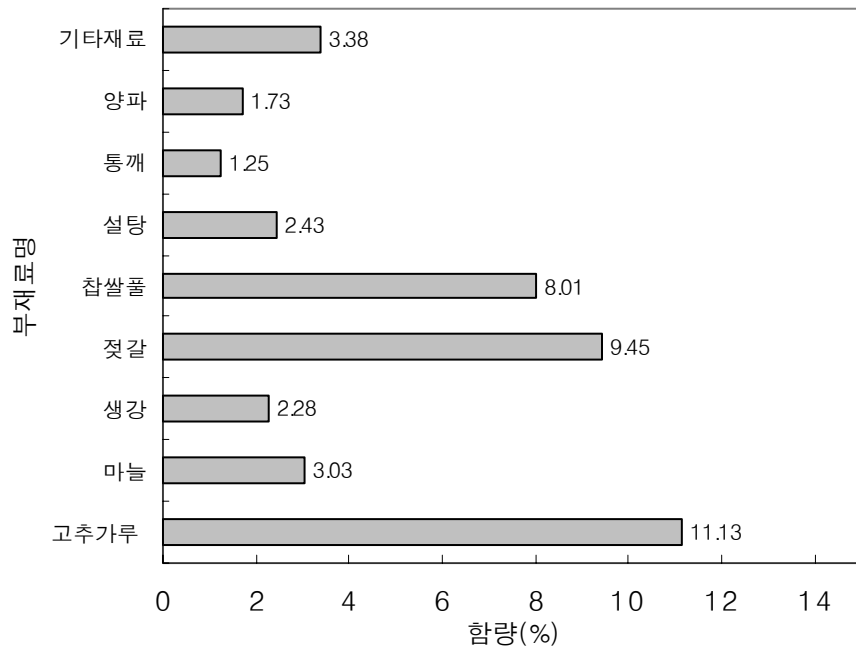


Fig. 1-1. Ingredients ratio of leaf mustard Kimchi

Table 1-1. 지역별 갓김치의 관능평가(4일)

	돌산갓 영농조합	전남장성	전북남원	순천농협	전북전주	경남함양
외관	5.86±1.07	5.00±1.15	3.20±1.01	5.00±1.15	2.85±1.06	3.53±1.13
냄새(향)	2.86±1.07	3.86±1.07	2.20±1.00	4.14±1.07	2.57±1.13	3.00±0.87
조식감	3.43±1.62	4.00±1.29	3.20±0.04	5.00±1.15	2.29±0.76	3.44±1.24
짠맛	3.43±1.14	3.14±1.35	2.35±0.45	3.00±1.41	2.14±0.69	2.33±1.00
매운맛	3.71±1.25	3.43±1.13	3.17±1.07	2.86±1.07	3.14±0.90	3.33±1.00
신맛	3.00±0.00	4.14±1.57	3.00±1.00	3.00±0.00	3.00±0.00	3.22±1.09
탄산미	2.14±1.07	3.29±1.38	2.30±0.03	3.29±1.38	3.29±1.38	3.00±0.00
전체적인 순응도	3.14±1.35	4.71±0.76	3.05±0.10	4.00±1.29	2.43±0.53	3.33±1.00

Table 1-2. 지역별 갓김치의 관능평가(20일)

	돌산갓 영농조합	전남장성	전북남원	전북전주	순천농협	전북전주	경남함양
외관	4.71±0.76	3.80±1.64	3.00±1.41	2.80±1.30	4.00±1.41	3.85±1.06	4.00±1.41
냄새(향)	3.86±1.07	4.00±1.41	2.20±1.00	2.80±1.30	3.60±1.34	2.47±1.13	4.20±1.10
조직감	5.00±0.00	4.20±1.79	3.50±0.34	3.20±1.64	4.00±1.41	2.31±0.76	3.60±1.34
짠맛	2.86±1.46	3.80±1.64	2.25±0.45	2.80±1.30	3.60±1.34	2.04±0.69	2.20±0.45
매운맛	3.29±1.60	2.60±0.55	3.25±2.07	3.00±0.00	3.40±1.52	3.24±0.90	3.40±2.07
신맛	3.29±0.76	4.60±0.90	4.00±2.00	3.00±0.00	3.80±1.64	3.01±0.00	4.60±2.19
탄산미	4.43±1.51	3.40±1.67	2.30±1.03	3.40±0.89	3.80±1.10	3.00±1.38	2.60±1.67
전체적인 순응도	4.71±0.76	4.20±1.10	3.25±1.10	2.80±1.30	4.00±1.41	4.43±0.53	4.20±1.10

2. 지역별 갓김치의 C/N ratio

다음 Table 1-3은 발효 20일된 지역별 갓김치의 C/N ratio이다. C/N ratio 값은 낮을수록 오히려 관능평가 결과는 좋은 것으로 나타났다. 전남장성 갓김치는 액젓의 함량이 높아 C/N ratio 가 낮을 것으로 사료되었으나, 액젓 이외에 C source, 즉, 찹쌀 풀과 나머지 부재료의 함량도 높아 오히려 다른 지역보다 높은 값을 나타내었다.

Table 1-3. The C/N ratio in various leaf mustard Kimchi

	돌산갓 영농조합	전남장성	전북전주
C/N ratio	8.5	11.5	9.31

3. 지역별 갓김치의 항산화성 평가

지역별 갓김치의 항산화성 평가 결과는 Fig 1-2와 같다. 그림에서 돼지고기의 malondialdehyde 함량의 생산량을 가장 억제한 갓김치는 돌산갓 영농조합의 갓김치가 가장 돼지고기의 산화를 억제한 것으로 나타났다. 이는 부재료가 적당히 들어가서 맛이 담백한 갓김치가 항산화성도 우수한 것으로 나타났으며 젓갈류나 참쌀풀 등이 많이 들어간 갓김치 들은 돼지고기의 malondialdehyde 함량의 생산량을 억제하지 못한 것으로 나타났다.

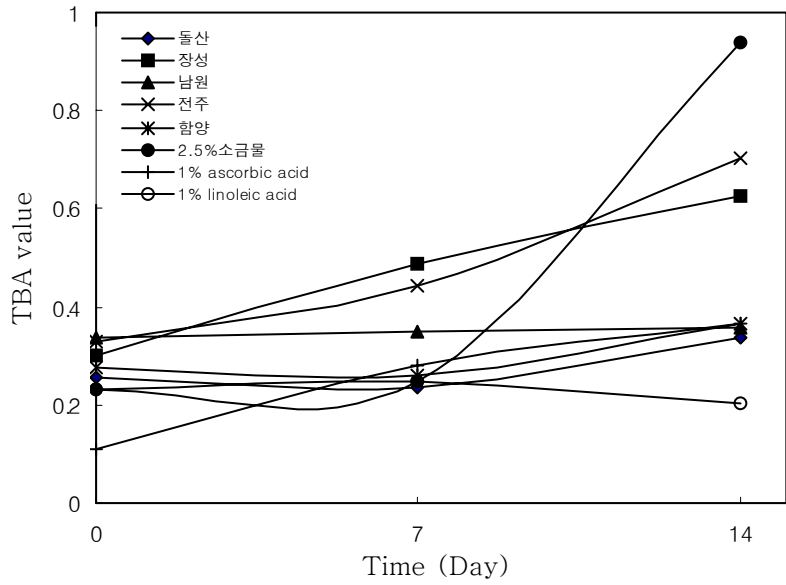


Fig. 1-2. Changes of TBA value in pork by adding various leaf mustard Kimchi

제 2 항 유산균군의 경시적 변화 관찰 및 생리기능성 평가

1. 유산균군의 경시적 변화 관찰

선택배지를 사용한 유산균의 온도별 경시적 변화는 Fig 2-1, 2-2, 2-3, 2-4와 같다. 온도에 따른 돌산갓김치 즙액에서의 유산균의 경시적 변화는 온도에 따라 약간의 차이가 있었지만 대체적으로 비슷한 경향으로서 배추김치와 유사하였으며 온도가 높을수록 변화의 속도가 빨랐다. 초기에는 저온균인 *Leuconostoc* 속이 대부분 우세하였으며, 적숙기 이후에는 *Lactobacillus* 속과 비슷한 수를 나타내었다. 4℃에서 발효시킨 경우에는 30일까지 PES 배지에서 *Leuconostoc* 속이라고 계수된 유산균의 수가 우세하였다. 배추김치의 경우는 5℃의 경우, *Leuconostoc* 속이 30일 이후에 빠르게 감소하는 경향이었으나, 돌산갓김치의 경우는 30일 이후에도 *Lactobacillus* 속과 비슷한 수를 유지하였다. 10℃에서 발효시킨 돌산갓김치의 경우는 4℃에 비하여 유산균의 수가 매우 많았으며, 20일경에 *Lactobacillus* 속이 최대의 균수를 나타내었고 그 이후로 조금씩 감소하였다. *Pediococcus*속 균주는 김치발효의 주 발효균은 아니나 산생성에 관여하는 것으로 알려져 있으며 적정성장온도는 25℃이다. 또한 배추김치에서 발효시 온도변화에 민감하여 저온에 잘 적응하지 못하며, 온도가 낮을수록 최고 균수가 적었으며, 초기에 증가하다가 빠르게 감소하는 경향이었다고 보고하였다. 본 연구에서도 *Pediococcus* 속은 발효온도가 낮을수록 최고 균수에 이르는 시간도 느렸으며, 발효 4℃의 경우는 발효온도가 너무 낮아 주 발효균인 *Lactobacillus* 속과 *Leuconostoc* 속들의 증식도 억제되어 균수가 전반적으로 적었고, *Pediococcus* 속의 균수도 낮았다. 그러나 10℃발효의 경우, 저온에서 잘 적응하는 *Leuconostoc* 속과 어느 온도에서나 잘 적응하는 *Lactobacillus* 속 균주들이 활발히 증식하기 시작하므로 *Pediococcus* 속 균주는 4℃에 비해 1일에서 4일째까지 증가하기는 하나 아직 저온에 잘 적응하지 못하다가, 5일 이후 주 발효균이 4℃에 비해 수가 증가하여 배양환경을 우점하자, 증식속도가 주 발효균에 비해 크게 밀도는 수준이었다. 20℃에서 발효시킨 돌산갓김치의 경우에는 발효 12일째에 최대의 균수를 나타내어 적숙기임을 보여주었다. 마찬가지로 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속에서의 균수의 차이는 크게 나타나지 않았으며, 배추김치에 비해 *Leuconostoc* 속이라고 계수된 미생물이 우세하였는데, 후에 동정결과 PES 배지에서 잘 생육할 수 있었던 것은 *Leuconostoc* 속 뿐

아니라 *Leuconostoc* 속과 유사한 미확인 미생물도 함께 계수되었기 때문에 *Lactobacillus* 속보다 높은 균수를 유지하였다고 사료된다. *Streptococcus* 속과 *Pediococcus* 속은 상대적으로 낮은 수를 나타내었다. 30℃에서 발효시킨 돌산 갓김치의 경우도 2일에서 4일째에 최대의 균수를 나타내었으며, 그 이후에 감소하였다. *Streptococcus* 속은 선택배지 내에서 나타나지 않았다.

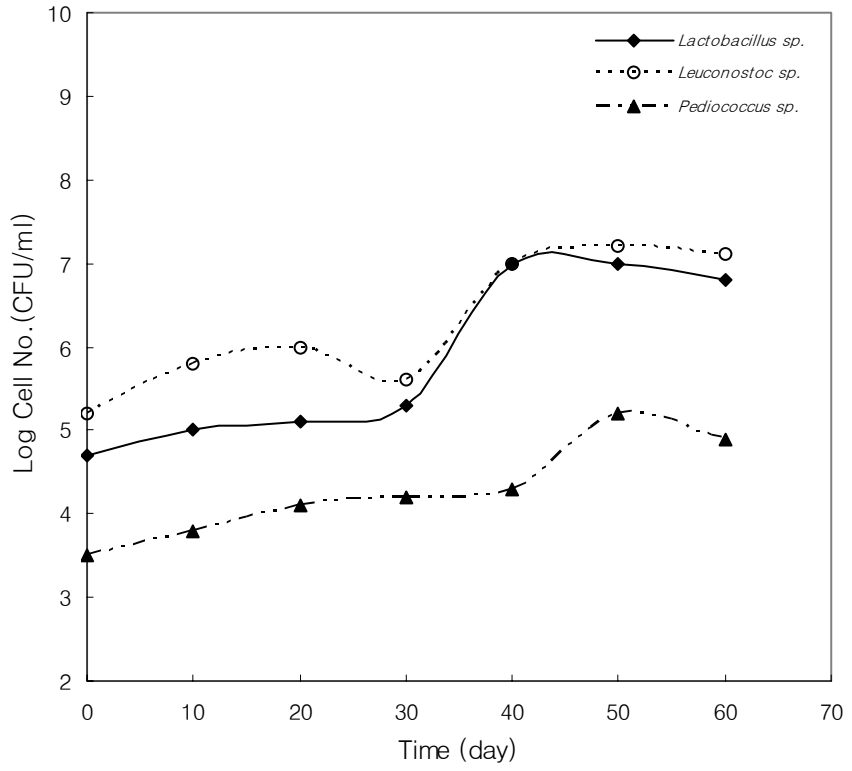


Fig. 2-1. Microfloral changes of lactic acid bacteria in DLMK at 4°C

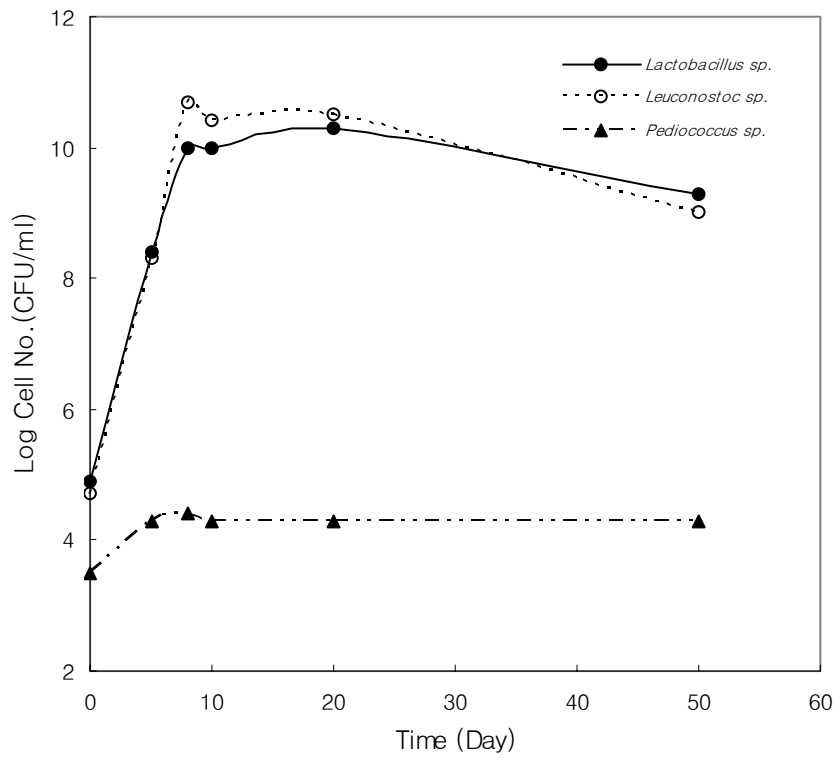


Fig. 2-2. Microfloral changes of lactic acid bacteria in DLMK at 10°C

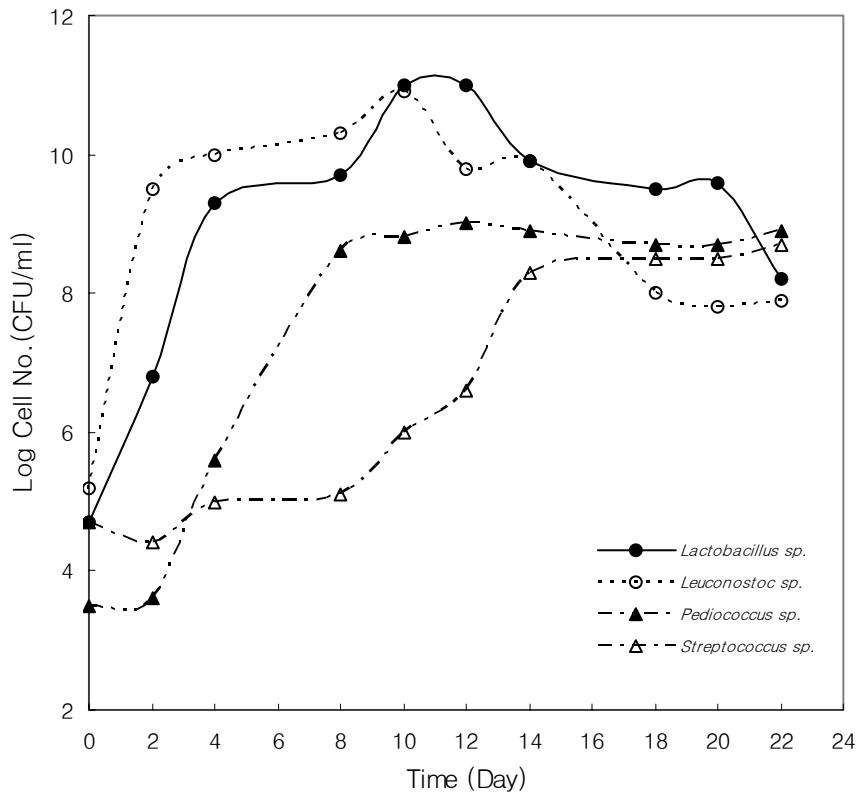


Fig. 2-3. Microfloral changes of lactic acid bacteria in DLMK at 20°C

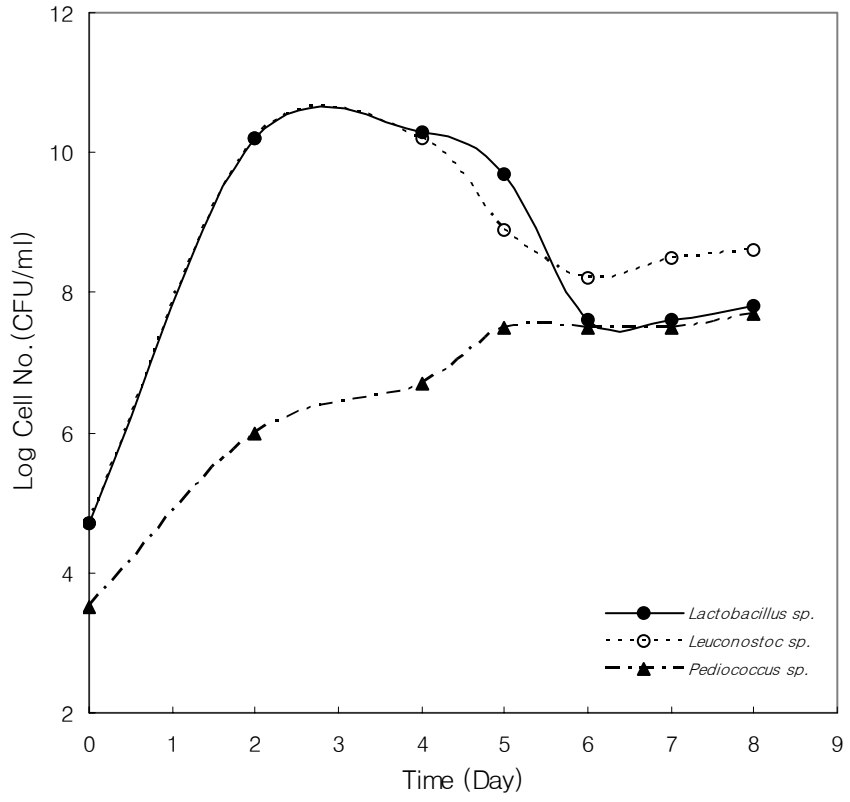


Fig. 2-4. Microfloral changes of lactic acid bacteria in DLMK at 30°C

2. 생리활성 평가

돌산갓김치에서 분리된 미생물의 생리활성을 평가하기 위하여 갓즙액을 제조하여 분리된 미생물을 접종하여서 항산화, 항암, 항고혈압활성을 관찰하였다. 유산균 자체의 생리활성이 많이 알려져 있으나 대부분 유제품에서 분리된 유산균의 생리활성에 대해 많이 알려져 있고 돌산갓김치에서 분리한 유산균의 생리활성에 대해서는 잘 알려져 있지 않으므로 돌산갓김치에서 분리한 7종(최우점종균은 strain Dolsan이라 명명하였음)의 bacteria를 1×10^8 CFU/mL로 접종하여 37°C에서 48시간 배양한 후 원심 분리하여 그 상등액을 시료로 하였다.

가. 항암활성

항암활성은 Table 2-1과 같다. HepG2에 대한 항암활성은 모두 20% 미만인 것으로 나타났으며, 시료의 전처리 과정에서 돌산갓 즙액이나 돌산갓김치 즙액 성분 중 항암활성을 나타내 주던 glucosinolate류나, indol 화합물, isothiocyanate 류의 항암활성 물질들이 많이 제거되었기 때문에 사료된다.

나. 항산화활성

Fig. 2-5는 돌산갓김치에서 분리한 유산균 접종에 따른 항산화 효과에 대한 결과로서, 돌산갓 즙액이나 유산균 접종시료나 모두 20% 미만을 나타내었다. 항산화 활성은 flavonoids 류와 carotenoids 류 또는 polyphenol계 물질에 의한 것으로 보고되고 있다. 따라서 앞의 연구에서는 돌산갓 즙액이나 돌산갓김치 즙액의 항산화 효과는 모두 우수한 것으로 나타났으나 시료의 전처리 과정에서 항산화 효과를 가질 것 이라고 예상되는 chlorophyll이나 carotinoid가 많이 제거되었기 때문에 사료되었다.

다. 항고혈압활성

Fig. 2-6은 ACE 저해활성을 나타내고 있다. ACE 저해활성에 있어서는 48시간 배양후의 strain Dolsan 접종액의 ACE 저해활성이 매우 우수한 것으로 나타났다. 김치관련 유산균이 생산하는 효소들의 연구에서 김치관련 유산균들이 다양한 효소를 세포 외로 분비함을 보고하였다. 따라서 갓 즙액 시료의 ACE 저해활성에 비하여 유산균 접종 시에 오히려 ACE 저해활성이 큰 것은 갓 즙액 시료를 미생물이 증식 중에 사용하여 생산된 대사산물에 의한 효과일 것으로 예상

되었다. 갓김치에서 분리한 유산균을 MRS 액체배지에서 배양한 배양액 자체의 ACE 저해활성은 모두 10% 미만이기 때문이다. 그러나 아직도 그 원인물질은 확실하지 않다. 특히나 염도가 높은 갓김치의 재료이므로 고혈압을 오히려 유발한다는 선입견을 갖기 쉽다. 그러나 아직까지 뚜렷한 과학적 규명은 없는 실정이며 오히려 항고혈압 활성이 높은 것으로 나타났다. 본태성고혈압(本態性高血壓)의 원인인 angiotensin converting enzyme(ACE)은 여러 식품중의 단백질에 의해 특히 억제되는데, 특히 옥수수 단백질인 zein과 casein의 가수 분해물, 어육단백질인 정어리와 고등어 근육단백질을 비롯하여 차(茶)의 polyphenol 성분 등이 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 일반적으로 peptide류의 inhibitor는 말단에 proline등을 함유하는 저 분자량의 것으로 경쟁적 저해를 하는 것으로 알려졌고, 기타 flavonoids-glycoside나 chitosan 올리고당 등은 ACE에 함유된 zinc에 대한 킬레이트 기능 등에 의해 저해를 하는 비경쟁적 저해를 하는 것으로 보고되고 있다. 십자화과 채소에 대한 ACE 저해 효과에 대한 보고는 많지 않으며, *Sinapis alba* L.에서 분리한 ACE inhibitor는 경쟁적 저해를 하고 640 kD의 분자량을 갖는 peptide류로 보고 된 바 있고, 양갓 냉이(watercress)에서는 adenosine이 저해 효과를 나타낸다고 하였다. 그런데, glucosinolate는 L-amino acids가 직접적인 전구체가 되며, 이들 중에는 alanine, valine, leucine, isoleucine, methionine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan등이 알려져 있으며, 이들 아미노산을 재료로 식물 내의 microsomal system에서 생합성 된다고 생각된다. 따라서 glucosinolate의 분해 산물 중 ACE를 억제하는 물질이 예상된다. 돌산 갓 즙액에 적숙기의 돌산갓김치에서 분리한 bacteria를 배양하면 세포외 enzyme을 통하여 그로 인해 isothiocyanate류와 같은 기능성 함유 분해산물들이 생성된다고 사료되며 또한 미생물들의 protease에 의해 ACE 억제 peptide의 전구물질들이 생성되리라 예상된다.

3. Microlog system에 의한 유산균의 동정

95개의 탄소원을 사용하여 탄소원의 이용정도로써 돌산갓김치에서 분리한 우점종균들의 동정결과는 Table 2-2와 같다. Table에서 D1은 가장 우점했던 균주로서(strain Dolsan이라 명칭함) similarity이 0.88로서 *Weissella confusa*로 동정되었다. *Weissella* 속은 유산균과 계통발생학적으로 매우 유사한 관계이며, 8개의 *Leuconostoc*속과 비슷한 종을 포함하는데, *Weissella confusa*(전에

는 *Lactobacillus confusus* 라고 불림), *Weissella minor*(전에는 *Lactobacillus minor* 라고 불림), *Weissella kandleri*(전에는 *Lactobacillus kandleri* 라고 불림), *Weissella halotolerance*(전에는 *Lactobacillus halotolerance* 라고 불림), *Weissella viridescens*(전에는 *Lactobacillus viridescens* 라고 불림), *Weissella paramesenteroides*(전에는 *Lactobacillus paramesenteroides* 라고 불림), *Weissella hellenica*등이다. *Weissella* 속은 16S rRNA sequencing 연구에서 유산균내에 있는 *Leuconostoc* 속으로부터 독립되었다.

그러나 *Weissella* 의 형태적이나 생리학적 면이 위와 같은 분류를 직접적으로 지지하지는 못하고 있는 실정으로서 DL-lactate와 D(-)를 생산하는 종끼리의 grouping을 직접적으로 지지하지는 못하는 실정이다. 최근에는 *Weissella thailandensis*가 타일랜드의 어류발효식품으로부터 분리 동정되었고, *Weissella kimchi* sp. nov.가 배추김치로부터 분리되었으며 새로운 유산균으로 보고되었다. *Weissella kimchi*는 SDS-PAGE protein pattern이 *Weissella confusa*와 유사하다고 보고되었으며, 16S rDNA의 similarity가 다른 *Weissella*속 보다 매우 유사하여 98.3%의 유사도를 보였다고 보고되었다. 그러나 SDS-PAGE protein pattern중 66-31 kDa 영역이 다른 것으로 보고되었고, 당의 이용에 있어서도 glucose로부터 *Weissella confusa*는 DL-lactate를 생산하고 *Weissella kimchi*는 D(-)를 생산하는 점과 *Weissella kimchi*는 ribose를 이용하지 못하는 반면에 *Weissella confusa*는 ribose를 이용하는 점이 다르다고 보고하였다. 그리하여 4일 숙성된 배추김치에서 분리된 *Weissella kimchi*의 기본적인 정보가 보고되었는데, 형태는 short-rod 형태이며, cell은 단독 혹은 쌍으로 존재하며 크기는 0.3-0.5 x 1-2 μ m이고, G+C 함량은 48.2 mol%로서 *Weissella* 속은 G+C 함량이 보통 37-47 mol%인 것 보다 약간 높은 것으로 보고되었다. 본 연구에서도 *Leuconostoc* 속으로 계수된 유산균 중 Biolog system에 의해 *Weissella confusa*로 동정되었으나 similarity가 0.88로서 좀더 깊이 있는 동정이 필요하였다. 그리고 *Leuconostoc* 속으로 분류된 우점종 균들의 동정결과는 *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides*, *Leuconostoc gelidium* 등이 분리되었으며, *Lactobacillus*속에는 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus raffinolactis*, *Lactobacillus delbruekii* ss. *lactis* 등이 분리 동정되었다. *Lactococcus* 속에는 *Lactococcus plantarum* 등이 동정되었고, *Pediococcus*속에는

Pediococcus pentosaceus, *Pediococcus parvulus*로 동정되었다.

Table 2-1. The cytotoxicity of DLMJ juice by adding lactic acid bacteria

Sample	Cytotoxicity(%)
A	10.98±4.21 ^{*b}
B	18.15±2.62 ^{a1)}
C	10.95±4.21 ^b
D	2.35±0.25 ^d
E	18.60±4.21 ^a
F	19.55±5.21 ^a
G	11.7±0.35 ^b

*Mean±S.D.(n=3)

¹⁾Means with the different letters beside data are significantly, different at the 0.01 level of significance as determined by Duncan's multiple range test

A : Dolsan leaf mustard juice(DLMJ)

B : DLMJ + *Leu. gelidium*

C : DLMJ + *Leuconostoc mesenteroidessp. mesenteroides*

D : DLMJ + *Lc. lactis*

E : DLMJ + *Lb. plantarum*

F : DLMJ + *Lb. raffinolactis*

G : DLMJ + strain Dolsan

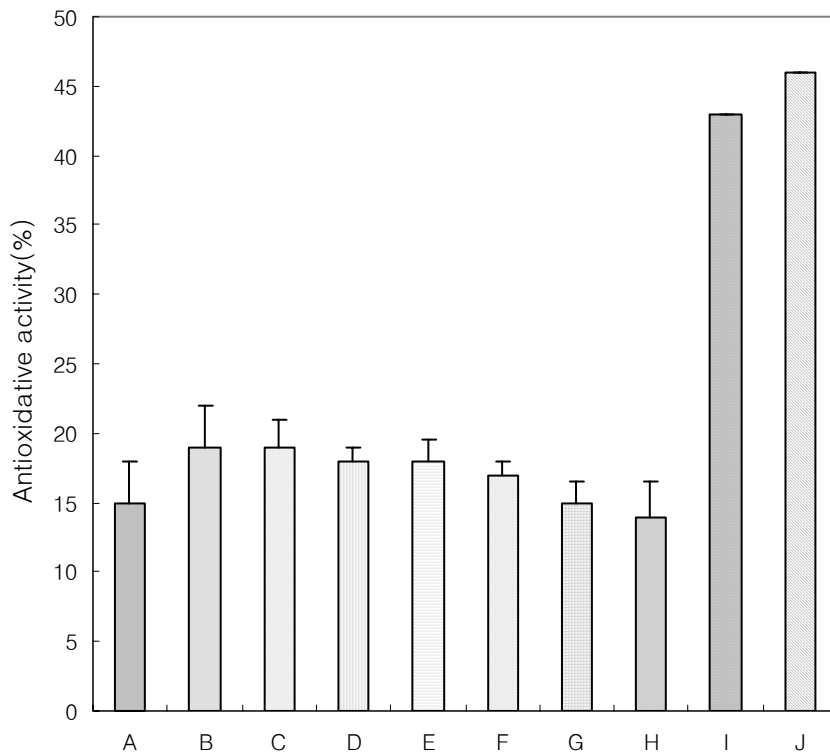


Fig. 2-5. Effect of lactic acid bacteria on antioxidative activity

A : *Lb. delbruekii lactis*, B : *Leu. gelidum*, C : *Lc. lactis*, D : *Lb. plantarum*, E : Strain Dolsan, F : *Leu. mesenteroides*, G : *Lb. raffinolactis*, H : DLMJ I : BHA(0.01%), J : α -tocopherol(0.01%)

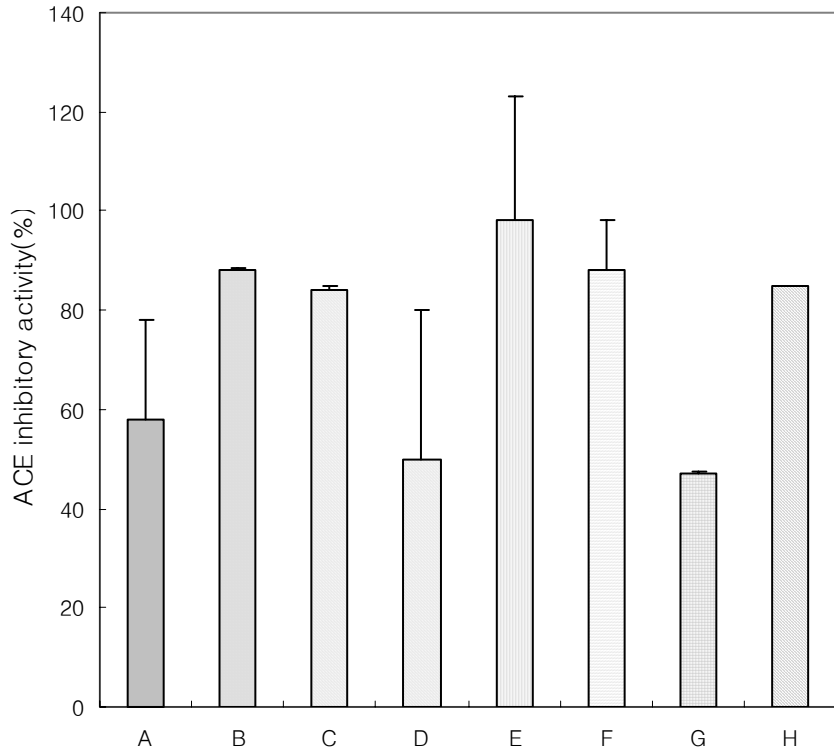


Fig. 2-6. Effect of lactic acid bacteria on ACE inhibitory activity

A : *Lb. delbruekii lactis*, B : *Leu. gelidum*, C : *Lc. lactis*, D : *Lb. plantarum*, E : Strain Dolsan, F : *Leu. mesenteroides*, G : *Lb. raffinolactis*, H : DLMJ

Table 2–2. The metabolic activities of strains of biochemical tests in the Biolog AN microplate assay

Carbone substrate	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Cellobiose	+*	+	+	+	+	+	+	+	b	+
Galactose	+	+	+	b	+	+	-	+	-	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	b	+
Glycerol	-	+	b	+	-	-	-	-	b	-
Maltose	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
Mellibose	-	+	-	-	+	-	-	b	-	+
Lactose	b	b	-	-	+	+	-	b	-	b
Raffinose	-	+	-	-	b	-	-	-	+	-
L-rhamnose	b	-	-	-	-	b	-	b	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	-	b	+	+
Trehalose	-	+	+	+	+	-	+	+	b	+
Similarity index(SIM)	0.88	0.60	0.87	0.61	0.53	0.75	0.80	0.81	0.91	0.66

*Visually assembling color density, usually colorless : -, noticeable color : +, extremely faint color : b, D1 : strain Dolsan, D2 : *Leu. mesenteroides* sp. *mesenteroides*, D3 : *Lb. plantarum*, D4 : *Lb. alimentarius*, D5 : *Lc. raffinolactis*, D6 : *Lb. delbruekii* sp. *lactis*, D7 : *Lc. plantarum*, D8 : *P. pentosaseus*, D9 : *P. parvulus*, D10 : *Leu. gelidum*

제 3 항 돌산갓김치 소금농도의 표준화

1. 소금농도별 갓김치의 염도변화

돌산갓김치의 소금 농도에 따른 발효기간 중 염도변화는 Table 3-1과 같다. 많은 김치관련 보고들을 보면 김치의 염도가 3% 내외일 때 저장 효과가 가장 높고, 항암효과가 높다고 보고 되어있다. 따라서 우리의 실험에서는 갓 절임시 소금물 10%에 2시간 침지, 소금물 10%에 4시간 침지, 소금물 15%에 4시간 침지, 소금물 20%에 4시간 침지시켜 발효과정중의 염도를 측정하였다. 그 결과 갓 절임시 소금물 10%에 2시간 침지 시켰을 때의 염도 변화가 대체적으로 3%에 가까워 가장 최적상태로 판단하여 다음 실험을 진행하였다.

Table 3-1. 절임소금농도에 따른 갓김치의 염도변화

발효날짜 침가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
갓절임시 염농도10% 침지2시간	3.824±0.032	2.637±0.018	2.423±0.005
갓절임시 염농도10% 침지4시간	4.453±0.007	3.647±0.033	3.616±0.021
갓절임시 염농도15% 침지4시간	5.651±0.001	3.895±0.016	3.625±0.020
갓절임시 염농도20% 침지4시간	5.825±0.035	4.828±0.050	4.616±0.025

2. 절임소금농도에 따른 갓김치의 pH변화 및 산도변화

갓 절임시 염 농도별 발효 진행에 따른 갓김치의 pH의 변화는 Table 3-2, 3-3과 같다. 적숙기에 대해 보고 된 바로는 염도 3%인 김치를 10℃에 발효시켜 pH 4.2~4.5, 산도 0.5~0.8%일 때라고 하였다. 본 실험에서는 발효초기의 pH와 산도가 갓 절임시 염 농도를 10%에 2시간 침지 시켰을 경우 pH 5.23, 산도 0.407이고, 갓 절임시 염 농도를 10%에 4시간 침지 시켰을 경우 pH 5.24, 산도 0.391이고, 갓 절임시 염 농도를 15%에 4시간 침지 시켰을 경우 pH 5.19, 산도 0.452이고, 갓 절임시 염 농도를 20%에 4시간 침지 시켰을 경우 pH 5.23, 산도 0.417로 모든 경우가 적숙기에 도달하지 못하였다. 그러나 발효가 진행 될수록 갓 절임시 염 농도를 10%에 2시간 침지시킨 실험군의 경우 발효 10일째에 pH 5.02, 산도 0.406으로 발효 15일째 pH 4.19, 산도 0.858로 적숙기에 가장 근접하고 있음을 확인하였다. 따라서 갓 절임시 염 농도를 10%에 2시간 침지시켰을 때를 가장 최적 상태로 판단하여 갓 절임시 소금농도의 표준화로 고정시킨 후 다음 실험을 진행하였다.

Table 3-2. 절임소금농도에 따른 갯김치의 pH변화

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
갯절임시 염농도10% 침지2시간	5.23	5.02	4.19
갯절임시 염농도10% 침지4시간	5.24	5.29	4.38
갯절임시 염농도15% 침지4시간	5.19	5.30	4.50
갯절임시 염농도20% 침지4시간	5.23	5.38	4.54

Table 3-3. 절임소금농도에 따른 갯김치의 산도변화

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
갯절임시 염농도10% 침지2시간	0.407	0.406	0.858
갯절임시 염농도10% 침지4시간	0.391	0.497	0.587
갯절임시 염농도15% 침지4시간	0.452	0.497	0.587
갯절임시 염농도20% 침지4시간	0.417	0.452	0.542

제 4 항 돌산갓김치 부재료 농도의 표준화

1. 부재료 농도에 따른 갓김치의 염도변화

부재료 농도에 따른 갓김치의 염도변화는 Table 4-1과 같다.

Table 4-1. 부재료 농도에 따른 갓김치의 염도변화

- 멸치젓

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
3.5%	2.727±0.006	2.013±0.004	1.908±0.005
10.5%	3.910±0.018	2.433±0.009	2.576±0.012
새우: 까나리=5:5 10.5%	4.612±0.021	2.497±0.008	3.050±0.005

-마늘

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
1.5%	2.364±0.005	1.629±0.004	2.007±0.008
3.5%	2.130±0.008	1.845±0.008	1.737±0.010
4.5%	2.366±0.006	1.909±0.001	1.862±0.007

– 생강

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
1.5%	2.314±0.005	1.583±0.003	1.616±0.012
2%	2.113±0.009	1.478±0.005	1.859±0.005
4.5%	1.943±0.006	1.284±0.009	1.493±0.007

– 고춧가루

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
3%	2.514±0.013	2.292±0.011	2.298±0.008
6%	2.805±0.004	2.249±0.007	2.081±0.009
9%	2.800±0.006	2.197±0.006	2.051±0.002
12%	2.551±0.008	1.975±0.006	2.005±0.004

– 참쌀풀

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
0.5%	2.074±0.008	1.508±0.004	1.927±0.006
5%	2.352±0.001	1.565±0.003	1.549±0.007
7%	2.701±0.007	1.471±0.015	1.067±0.002
12%	2.068±0.008	1.229±0.006	1.410±0.007

2. 부재료 농도에 따른 갯김치의 pH변화

부재료 농도에 따른 갯김치의 pH변화는 Table 4-2와 같다.

Table 4-2. 부재료 농도에 따른 갯김치의 pH 변화

-멸치젓

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
3.5%	4.98	5.15	5.87
10.5%	4.09	4.19	4.25
새우: 까나리=5:5 10.5%	4.06	4.08	4.15

-마늘

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
1.5%	5.16	4.93	4.06
3.5%	5.22	4.67	4.12
4.5%	5.17	4.79	4.30

-생강

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
1.5%	5.06	4.40	4.24
2%	5.10	4.31	4.15
4.5%	5.15	4.61	4.33

- 고춧가루

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
3%	5.26	4.81	4.01
6%	4.77	4.60	3.91
9%	4.71	4.40	3.98
12%	4.65	4.58	3.87

- 참쌀풀

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
0.5%	5.26	4.30	4.10
5%	4.91	4.29	4.29
7%	4.96	4.47	4.27
12%	5.02	4.27	4.12

3. 부재료 농도에 따른 갓김치의 산도변화

부재료 농도에 따른 갓김치의 산도변화는 Table 4-3과 같다.

Table 4-3. 부재료 농도에 따른 갓김치의 산도변화

-멸치젓

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
3.5%	0.452	1.147	1.221
10.5%	0.543	1.085	1.085
새우: 까나리=5:5 10.5%	0.452	0.995	1.221

-마늘

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
1.5%	0.362	0.472	0.814
3.5%	0.317	0.543	0.859
4.5%	0.335	0.497	0.950

-생강

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
1.5%	0.407	0.950	1.212
2%	0.317	0.905	1.040
4.5%	0.294	0.588	0.905

- 고춧가루

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
3%	0.543	0.520	0.769
6%	0.362	0.565	0.859
9%	0.633	0.769	0.905
12%	0.678	0.837	1.221

- 찹쌀풀

발효날짜 첨가농도%	발효0일	발효10일	발효15일
0.5%	0.362	0.995	1.357
5%	0.407	0.769	0.995
7%	0.588	0.769	0.814
12%	0.452	0.769	0.905

4. 부재료 농도에 따른 갓김치의 C/N ratio

부재료 농도에 따른 갓김치의 C/N ratio를 실시한 결과 관능평가 결과와 일치하지 않아 데이터화 하지 않았다.

5. 부재료 농도에 따른 갓김치의 관능평가

부재료 농도에 따른 갓김치의 관능평가 결과는 Table 4-4와 같다. 부재료를 농도별로 처리하여 관능평가를 실시한 결과 액젓의 경우 멸치젓만 단독으로 넣은 것과 새우젓과 까나리 액젓을 5:5로 섞은 액젓에서의 변화는 그다지 차이를 보이지는 않았다. 마늘의 경우 3.5%를 첨가한 실험군에서 좋은 점수를 받았다. 또한 생강의 경우 2%에서 좋은 점수를 받았다. 그리고 고춧가루의 경우 6%일 때, 찹쌀풀의 경우 12%로 첨가하였을 때 관능평가상 높은 점수를 받았다. 이러한 결과는 대체적으로 발효일수가 높아질수록 더 좋은 맛을 내는 것으로 관능평가 결과 나타났다.

Table 4-4. 부재료 농도에 따른 갓김치의 관능평가

-액젓

발효일(Days)	멸치젓3.5%	멸치젓10.5%	새우젓:까나리액젓(5:5)
0	3.29±0.76	3.14±0.90	3.29±0.76
10	3.00±1.15	3.00±1.15	3.14±1.35
15	3.43±1.13	3.43±1.13	3.00±1.00

-마늘

발효일(Days)	1.5%	3.5%	4%
0	4.14±1.57	3.14±0.90	3.71±1.25
10	3.00±1.00	3.29±1.25	2.57±0.53
15	2.71±0.49	3.43±1.13	3.14±0.90

-생강

발효일(Days)	1.5%	2%	4.5%
0	2.86±0.38	3.57±0.98	3.86±1.07
10	4.14±1.07	3.43±1.13	3.29±0.76
15	3.14±0.90	4.14±1.07	3.29±0.76

-고춧가루

발효일(Days)	3%	6%	9%	12%
0	3.29±1.38	2.86±0.38	2.86±1.07	2.57±1.27
10	2.71±0.49	3.14±0.90	3.00±1.00	2.71±0.49
15	2.86±0.38	3.57±0.98	2.86±0.38	2.71±0.49

-참쌀풀

발효일(Days)	0.5%	5%	7%	12%
0	4.14±1.07	3.57±0.98	4.14±1.07	4.43±0.98
10	3.57±0.98	3.71±1.25	3.86±1.07	4.14±1.07
15	3.14±0.90	3.00±1.63	3.14±3.09	3.14±0.90

6. 부재료 농도에 따른 갓김치의 항산화효과

부재료 농도에 따른 갓김치의 항산화 효과는 Table 4-5와 같다. 부재료의 농도를 달리하여 발효 하였을 때의 항산화 활성을 비교하기 위해 갓김치를 동결 건조하여 시료로 하고 Ferric thiocyanate의 원리로 항산화 효과를 측정하였다. Ferric thiocyanate의 원리는 유지 중에 존재하는 과산화물은 주로 hydro peroxide이며, hydroperoxide는 유지의 자동 산화반응에서 생성되는 1차 생성물로서, 과산화물의 측정(peroxide value)하여 유지의 변질정도를 통해 항산화 효과를 측정하는 방법이다. 따라서 부재료 농도에 따른 갓김치의 항산화 효과를 알아보기 위하여 대조군으로 Distilled Water(D.W.), Salt Water(S.W.), Ascorbic acid(A.A.), Linolenic acid(L.A.)를 사용하여 실험군과 비교하였다. 그 결과 항산화는 굵은 글씨의 농도가 좋으나 맛을 고려하지 않을 수 없기에 최적의 레시피는 관능평가 결과를 고려하여 작성하였다.

Table 4-5. 부재료 농도에 따른 갖김치의 항산화효과

-액젓

Days	3.5%	10.5%	10.5%(5:5)	D.W.	S.W.	A.A.	L.A.
0	0.281	0.354	0.276	0.234	0.216	0.161	0.169
7	0.741	0.79	0.978	0.822	0.918	0.356	0.198
14	0.91	0.99	1.152	1.092	1.048	0.416	0.19

-마늘

Days	1.5%	3.5%	D.W.	S.W.	A.A.	L.A.
0	0.203	0.244	0.234	0.216	0.161	0.169
7	0.5	0.777	0.822	0.918	0.356	0.198
14	1.074	1.321	1.092	1.048	0.416	0.19

-생강

Days	1.5%	2%	4.5%	D.W.	S.W.	A.A.	L.A.
0	0.218	0.263	0.265	0.234	0.216	0.161	0.169
7	0.624	0.632	0.442	0.822	0.918	0.356	0.198
14	0.499	0.556	0.432	1.092	1.048	0.416	0.190

- 소금

Days	10%, 2hr	10%, 4hr	15%, 4hr	20%, 4hr	D.W.	S.W.	A.A.	L.A.
0	0.283	0.208	0.25	0.179	0.234	0.216	0.161	0.169
7	0.364	0.367	0.39	0.32	0.822	0.918	0.356	0.198
14	0.416	0.463	0.408	0.296	1.092	1.048	0.416	0.19

- 고춧가루

Days	3%	6%	9%	12%	D.W.	S.W.	A.A.	L.A.
0	0.172	0.234	0.182	0.317	0.234	0.216	0.161	0.169
7	0.242	0.385	0.411	0.442	0.822	0.918	0.356	0.198
14	1.079	0.819	0.593	0.364	1.092	1.048	0.416	0.19

- 참쌀풀

Days	0.5%	5%	7%	12%	D.W.	S.W.	A.A.	L.A.
0	0.166	0.182	0.138	0.341	0.234	0.216	0.161	0.169
7	0.863	0.77	0.538	0.715	0.822	0.918	0.356	0.198
14	1.128	1.099	0.715	1.121	1.092	1.048	0.416	0.19

제 5 항 표준화된 부재료 최적 레시피에 의해 제조한 갓김치 관능검사결과

1. 표준화된 부재료 최적 레시피

위의 결과(관능검사 및 향산화)들을 종합하여 표준화된 부재료의 최적 레시피는 Table 5-1과 같다. 갓 1Kg에 고춧가루 6%, 마늘 3.5%, 생강 1.5%, 젓갈은 까나리젓 : 새우젓(5.25%:5.25%), 찹쌀풀 12%, 설탕 1.4%, 통깨 0.5%로 맞추어 표준화된 부재료 레시피를 작성하여 실험에 적용시켰다.

Table 5-1. 표준화된 부재료 최적 레시피

갓	고춧가루	마늘	생강	젓갈	찹쌀풀	설탕	통깨
1kg	6%	3.5%	1.5%	까나리5.25% 새우5.25%	12%	1.4%	0.5%

2. 표준화 갯김치의 관능검사결과

원재료로서 돌산읍에서 생산된 갯 1Kg에, 부재료는 고춧가루 6%, 마늘 3.5%, 생강 1.5%, 젓갈은 까나리젓 : 새우젓(5.25% : 5.25%), 찹쌀풀 12%, 설탕 1.4%, 통깨 0.5%로 하여 생산한 갯김치의 관능검사를 전술한 방법과 같이 실시하였다. 표준화된 레시피에 의해 발효한 갯김치 및 대조구로서 참여기업에서 생산한 갯김치는 각각 조건을 동일하게 제조하였다. 조건은 최종염도를 2%로 하고 위에서 결정한 표준화한 원/부재료 비율로 하여, 10℃에서 15일간 발효하였다.

그 결과는 표 5-2에 나타난 바와 같다. 외관, 맛, 그리고 전체적인 순응도에 서 참여기업의 갯김치 보다 약간 좋은 평가를 받았다. 또한 표준화를 함으로서 맛의 일관성을 유지할 수 있어서, 평가자의 품질에 대한 신뢰도를 높아졌다는 평가를 받았다.

Table 5-2. 표준화 갯김치의 관능평가 결과

	외관	냄새(향)	조직감	전체적인 순응도
돌산갯영농조합 갯김치	4.25±0.42	3.50±0.75	4.35±0.27	4.31±0.92
표준화 갯김치	4.72±0.63	3.70±0.88	4.32±0.46	4.63±0.71

제 6 항 갓김치의 유산균총 변화조사

MRS 배지를 사용하여 유산균을 첨가한 갓김치를 10℃에서 발효시켜 갓김치내의 유산균의 경시적인 변화를 측정한 결과는 Fig. 6-1과 같다. 실험에 사용한 유산균은 저온에서 생장이 활발한 균이어서 발효초기부터 높은 유산균수를 보였고, 발효 12일 후부터는 발효가 진행됨에 따라 생성되는 산의 영향으로 유산균의 활성이 저해되어 *Leuconostoc mesenterodies*, *Leuconostoc gelidum*, *Weissella kimchi* 의 모든 유산균수가 감소함을 확인 하였다.

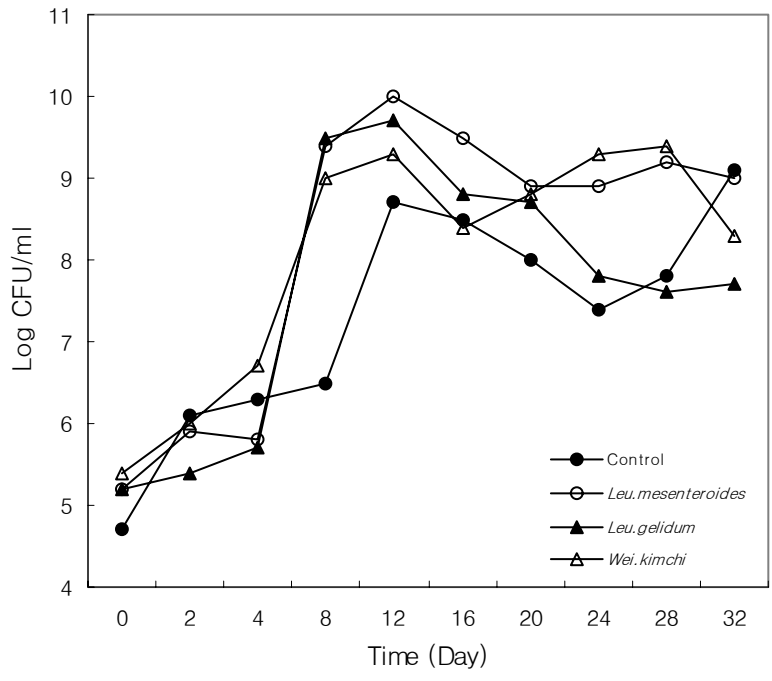


Fig. 6-1. Microfloral changes of in DLMK by adding lactic acid bacteria during fermentation at 10°C

제 7 항 우수 균종으로 선별된 미생물들의 유전적 동정

1. Microlog system에 의한 유산균의 동정

앞선 결과에서처럼 95개의 탄소원을 사용하여 탄소원의 이용정도로 돌산갓 김치에서 분리한 우점종균들을 동정한 결과 가장 우점했던 균주는 D1(strain Dolsan이라 명칭함)은 similarity가 0.88로서 *Weissella confusa*로 동정되었는데 그 균주는 Fig. 7-1과 같다.

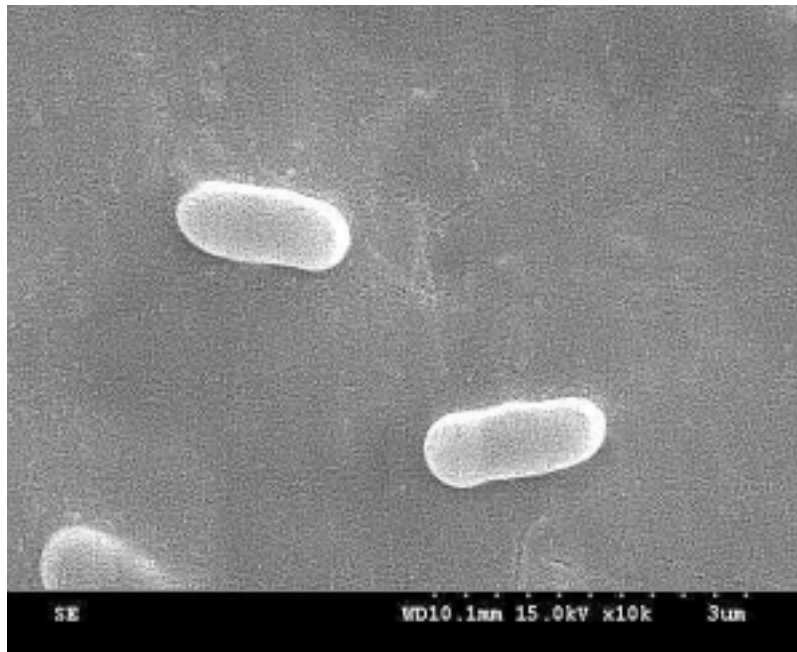


Fig. 7-1. SEM of strain Dolsan by Biolog system

2. 16S rDNA sequencing

앞선 결과에서 가장 우수한 ACE 저해 효과를 나타냈던 strain Dolsan 균주는 Microlog system에 의해 *Weissella confusa*로 동정되었다. 이를 정확하게 확인하기 위해 16S rDNA sequencing에 의한 유전적 동정을 실시하였다. Fig. 7-2는 16S rDNA 유전자 분석을 행한 결과로서 1,472bp의 염기서열이 결정되었다. 이를 근거로 reference 균주들과 비교 분석하여 % similarity를 구한 결과 본 균주는 2002년 신종 보고 된 *Weissella kimchi*와 가장 유사한 것으로 동정되었다. 또한 neighbor-joining method에 의하여 계통수(phylogenetic tree)를 작성하고 그 결과를 Fig. 7-4에 나타내었다. 이 때 tree의 scale bar는 0.1 substitution per site를 의미한다. Fig. 7-5는 dandrogram을 나타내고 있다. Reference 균주들과의 동정에서 GeneBank에서 등록된 *Weissella kimchi*의 염기수가 1,515bp 인데 비하여 돌산갓김치에서 분리한 유산균의 염기수는 1,472로서, 43개의 bp가 짧았음을 확인하였다. 본 균주의 형태는 short-rod 형태이며(Fig. 7-6), cell은 단독 혹은 쌍으로 존재하며 크기는 $0.3\sim 0.5\times 1\sim 2\mu\text{m}$ 였다. 따라서 *Weissella kimchi*와 99% 유전적으로 일치하지만, 약간의 차이가 있는 것으로 나타났다. 그 결과는 Table 7-1과 같다.

Table 7-1. Characteristics of *Weissella kimchi* and strain Dolsan

Characteristics	Strain	
	<i>Weissella kimchi</i>	Strain Dolsan ¹⁾
Base pair(bp)	1,515	1,472
Carbohydrate fermentation		
α-D-lactose	- ²⁾	b ³⁾
L-rhamnose	-	b
Shape	short-rod	short-rod
Diameter(μm)	1-2	0.45-0.8

¹⁾ Strain Dolsan was isolated from 4 day fermented Dolsan leaf mustard Kimchi

²⁾ - : not fermented

³⁾ b : faint fermented

GGCGGCGTGC CTAATACATG CAAGTCGAAC GCTTTGTGGT TCAACTGATT TGAAGAGCTT
GCTCAGATAT GACGATGGAC ATTGCAAAGA GTGGCGAACG GGTGAGTAAC ACGTGGGAAA
CCTACCTCTT AGCAGGGGAT AACATTTGGA AACAGATGCT AATACCGTAT AACAATAGCA
ACCGCATGGT TGCTACTTAA AAGATGGTTC TGCTATCACT AAGAGATGGT CCCGCGGTGC
ATTAGTTAGT TGGTGAGGTA ATGGCTCACC AAGACGATGA TGCATAGCCG AGTTGAGAGA
CTGATCGGCC ACAATGGGAC TGAGACACGG CCCATACTCC TACGGGAGGC AGCAGTAGGG
AATCTTCCAC AATGGGCGAA AGCCTGATGG AGCAACGCCG CGTGTGTGAT GAAGGGTTTC
GGCTCGTAAA ACACTGTTGT AAGAGAAGAA TGACATTGAG AGTAACTGTT CAATGTGTGA
CGGTATCTTA CCAGAAAAGGA ACGGCTAAAT ACGTGCCAGC AGCCGCGGTA ATACGTATGT
TCCAAGCGTT ATCCGGATTT ATTGGGCGTA AAGCGAGCGC AGACGGTTAT TTAAGTCTGA
AGTGAAAAGCC CTCAGCTCAA CTGAGGAATT GCTTTGGAAA CTGGATGACT TGAGTGCACT
AGAGGAAAAGT GGAACCTCCAT GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GATATATGGA AGAACACCAG
TGCGGAAGGC GGCTTTCTGG ACTGTAACTG ACGTTGAGGC TCGAAAGTGT GGGTAGCAAA
CAGGATTAGA TACCTGGTA GTCCACACCG TAAACGATGA GTGCTAGGTG TTTGAGGGTT
TCCGCCCTTA AGTGCCGCAG CTAACGCATT AAGCACTCCG CCTGGGGAGT ACGACCGCAA
GGTTGAAACT CAAAGGAATT GACGGGGACC CGCACAAGCG GTGGAGCATG TGTTTAAATT
CGAAGCAACG CGAAGAACCT TACCAGGTCT TGACATCCCT TGACAACTCC AGAGATGGAG
CGTTCCCTTC GGGGACAAGG TGACAGGTGG TGCATGGTTG TCGTCAGCTC GTGTCGTGAG
ATGTTGGGTT AAGTCCCGCA ACGAGCGCAA CCCTTATTAC TAGTTGCCAG CATTTAGTTG
GGCACTCTAG TGAGACTGCC GGTGACAAAC CGGAGGAAGG TGGGGATGAC GTCAAATCAT
CATGCCCTT ATGACCTGGG CTACACACGT GCTACAATGG CGTATACAAC GAGTTGCCAA
CCC CGAGGG TGAGCTAATC TCTTAAAGTA CGTCTCAGTT CGGATTGTAG GCTGCAACTC
GCCTACATGA AGTCGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC ACGCCGCGGT GAATACGTTC
CCGGGTCTTG TACACACCGC CCGTCACACC ATGAGAGTTT GTAACACCCA AAGCCGGTGG
GGTAACCTTC GGGAGCCAGC CGTCTAAGGT GG

Fig. 7-2. 16S rDNA sequencing of isolated strain Dolsan in DLMK

	1	28	50
<i>Weissella kimchi</i>	GAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGGGCGTGCTAATACATGC		
Strain Dolsan	————— GGCGGCGTGCTAATACATGC		
	51	78	100
<i>Weissella kimchi</i>	AAGTCGAACGCTTTGIGGTTCAACTGAATTGAAGAGCTTGCTCAGATATGU		
Strain Dolsan	AAGTCGAACGCTTTGIGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGCTCAGATATGU		
	551	596	600
<i>Weissella kimchi</i>	GCCGCGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTGTAA		
Strain Dolsan	GCCGCGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAA		
	1501	1515	
<i>Weissella kimchi</i>	GGACAGATGATTAGG		
Strain Dolsan	G—————		

Fig. 7-3. The differential sequences of *Weissella kimchi* and strain Dolsan

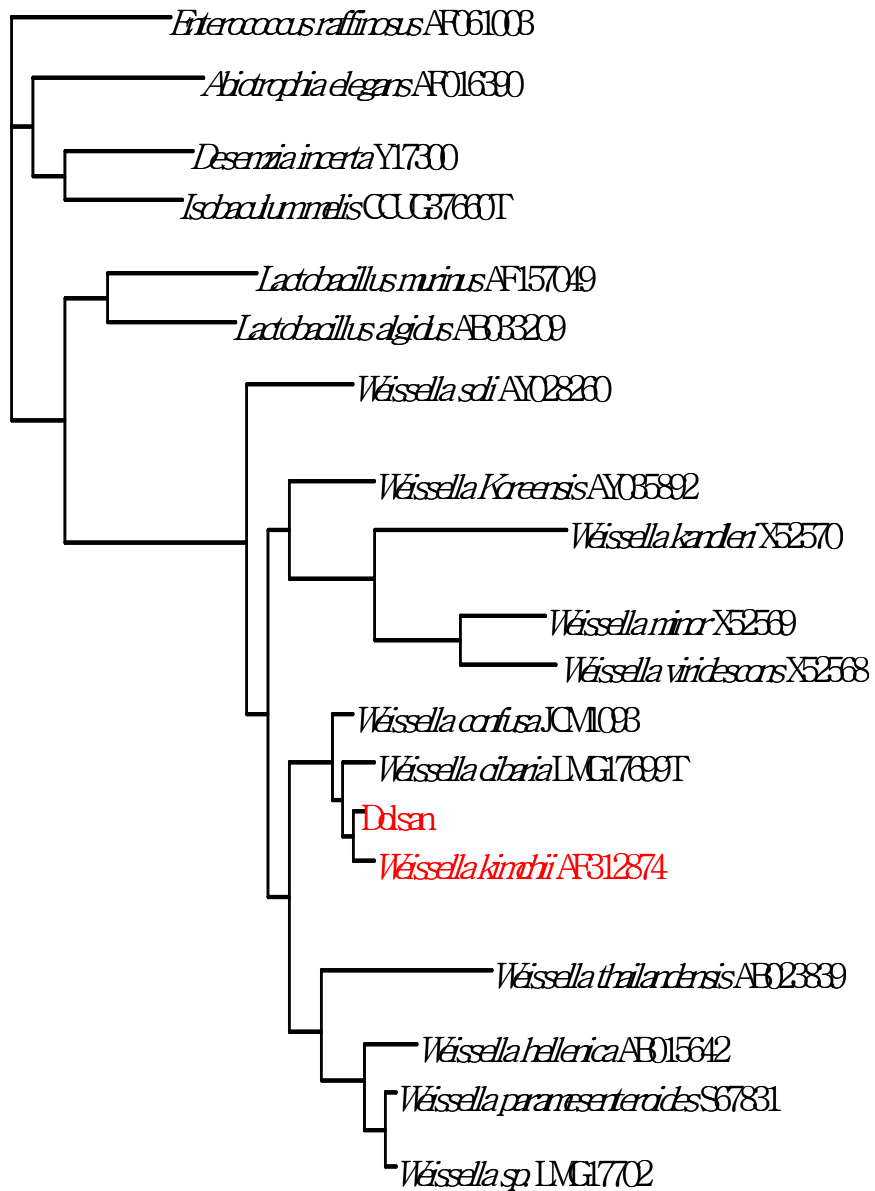


Fig. 7-4. Phylogenetic tree of isolated strain Dolsan in DLMK

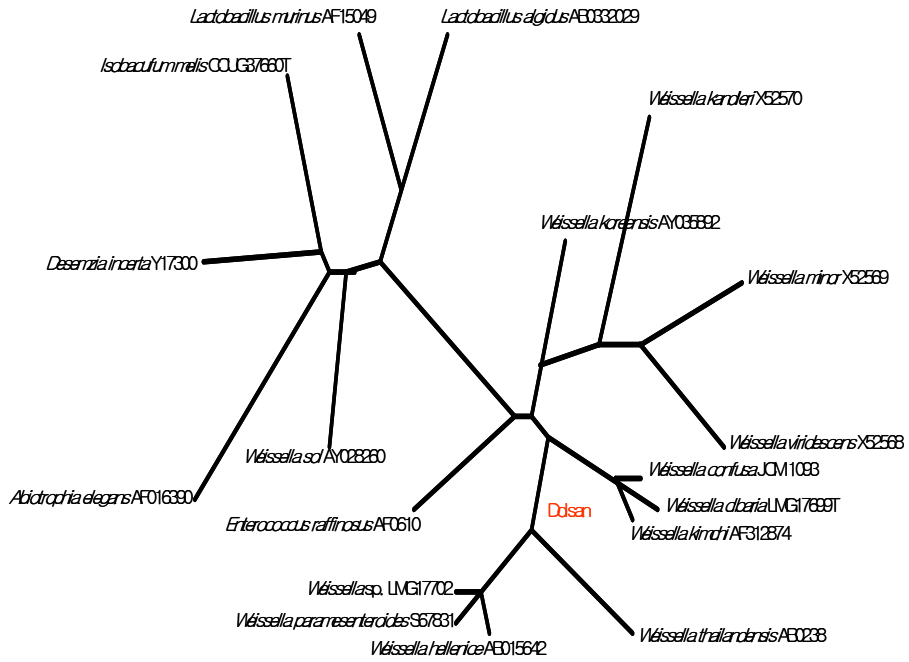


Fig. 7-5. The dendrogram of isolated strain Dolsan in DLMK

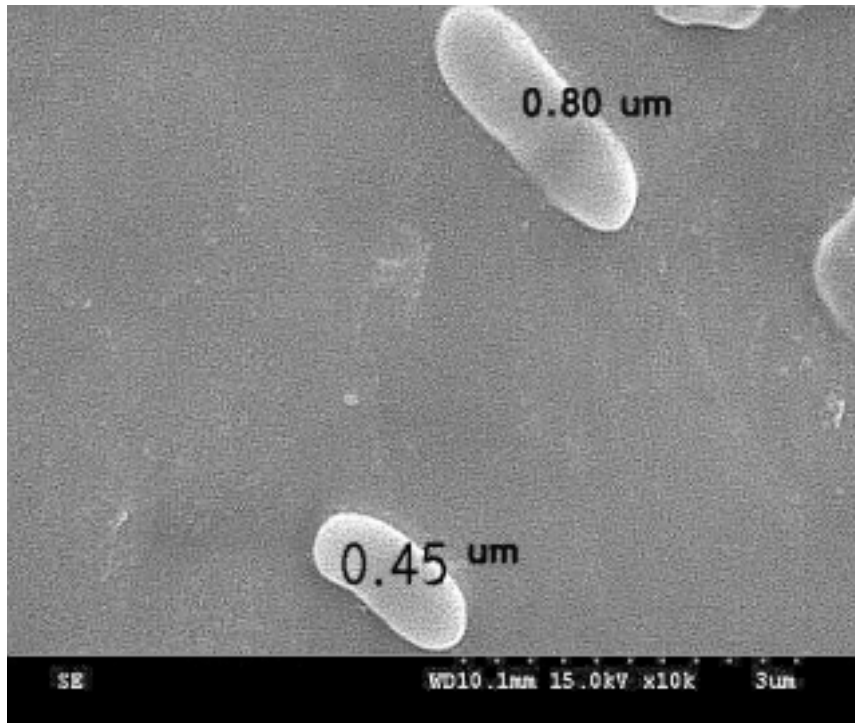


Fig. 7-6. Morphology of strain Dolsan

3. 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 항암효과

유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 항암효과는 Table 7-2와 Table 7-3과 같다. 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 항암효과를 확인하기 위하여 간암세포주인 HepG2와 위암세포주인 Hs 746T 세포를 이용하여 MTT assay를 통해 세포의 viability를 확인하였다. 그 결과 유산균을 처리한 모든 실험군에 항암효과를 보였는데 간암세포주인 HepG2의 경우 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Weissella kimchi* 경우 50%이상의 항암효과를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한 위암세포주인 Hs 746T의 경우는 *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*과 *Weissella kimchi* 모두에서 50%이상 항암효과를 보였고 그중 *Weissella kimchi*의 경우 거의 60% 이상으로 그 효과가 뛰어남을 확인할 수 있었다.

Table 7-2. The anticancer activity of MeOH extract of DLMK on HepG2 cells by MTT assay

	Control	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i>	<i>Weissella kimchi</i>
Anticancer activity(%)	34.90±1.26	49.78±7.92	36.45±3.15	51.64±2.90

Table 7-3. The anticancer activity of MeOH extract of DLMK on Hs 746T cells by MTT assay

	Control	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Leuconostoc gelidum</i>	<i>Weissella kimchi</i>
Anticancer activity(%)	40.90±4.25	48.45±0.75	48.45±1.15	59.0±11.0

제 8 항 각 유산균을 starter로 첨가한 돌산갓김치 추출물의 세포독성효과

1. pH 및 산도

Starter를 첨가하여 10℃에서 발효시킨 갓 김치의 pH 및 산도의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 8-1과 8-2와 같다. 김치 적숙기는 원료 구성과 여러 가지 환경 요인에 따라 다르지만, 일반적으로 pH 4.2-4.5, 산도는 0.5~0.8% 범위의 김치가 가장 맛이 좋은 적숙기로 알려져 있다. Fig. 8-1에서 pH 4.5에 이르는 시간을 비교해 보면, starter 비첨가 갓김치는 발효 4일째 부터 서서히 감소되기 시작하였다가 8일부터 급격히 감소하여, 12일째는 pH가 4.52로 적숙기에 도달하였다. 그러나 stater 첨가 갓김치는 발효 초기의 pH를 유지하였다가 발효 4일부터 급격히 감소하여, 8일째 적숙기에 도달하여서, starter를 첨가함으로써 숙성기간이 4일정도 단축되었다. Starter 첨가 갓김치들 간의 pH 감소 속도는 *Weissella kimchi*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum* 순이었다.

한편, 산도 변화는 Fig. 8-2에 나타낸 바와 같이 모든 김치들이 담금 직후는 0.27%였다. Starter 비첨가 갓김치는 발효 4일 이후에 급격히 증가하였으나, starter 첨가 갓김치들은 발효 2일째 점점 증가하였다. 적숙기에 도달하는데 소요되는 시간이 starter 비첨가 갓김치는 8일이었고, starter 첨가 갓김치들은 모두 4일이어서 starter 첨가 갓김치의 숙성 소요 시간을 4일정도 단축시키는 것으로 판단되었다. 전반적으로 pH가 저하함에 따라 산도는 증가되는 것으로 나타났다으며, pH에 의한 결과와 비슷한 경향을 보였으나 산도에 의한 적숙기는 pH 결과로 인한 적숙기보다 4일정도 단축되는 결과를 보였다.

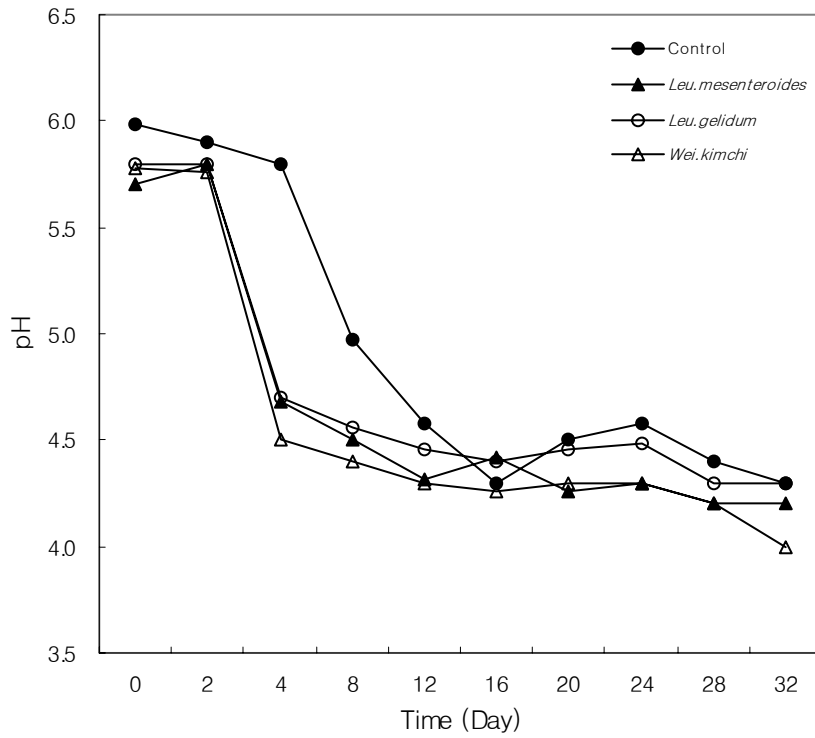


Fig. 8-1. Changes of in DLMK treated with lactic acid bacteria during fermentation at 10°C

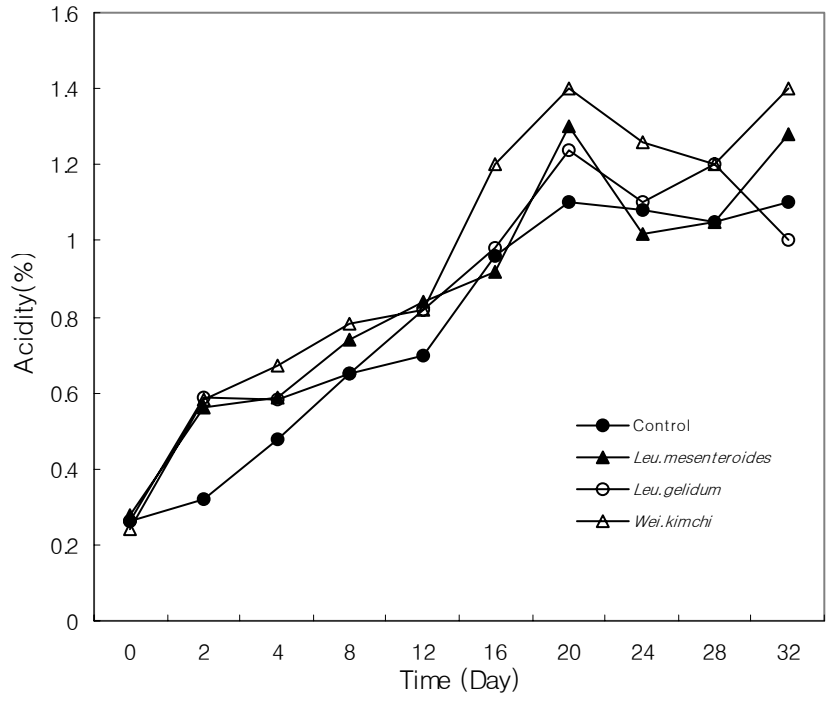


Fig. 8-2. Changes of acidity in DLMK treated with lactic acid bacteria during fermentation at 10°C

2. 유산균 수의 변화

Starter 첨가 갓김치 발효 과정 중의 유산균 수의 변화는 Fig. 8-3에 나타내었다. 총 유산균수는 갓김치 제조 시에 첨가한 starter의 종류에 따라 약간의 균수의 차이를 보였다. Starter 비첨가 갓김치 유산균 수는 정상기에 도달하는데 12일이 소요되는 반면, starter 첨가 갓김치의 유산균은 *Leuconostoc mesenteroides* 갓김치, *Leuconostoc gelidum* 갓김치 및 *Weissella kimchi* 갓김치의 경우 8일이 소요되었다. 따라서 starter의 첨가는 갓김치 유산균 수가 정상기에 도달하는데 소요되는 시간을 4일 정도 단축시키는 것으로 판단되었으며, 이는 산도와 pH 결과와 비슷한 경향을 보였다.

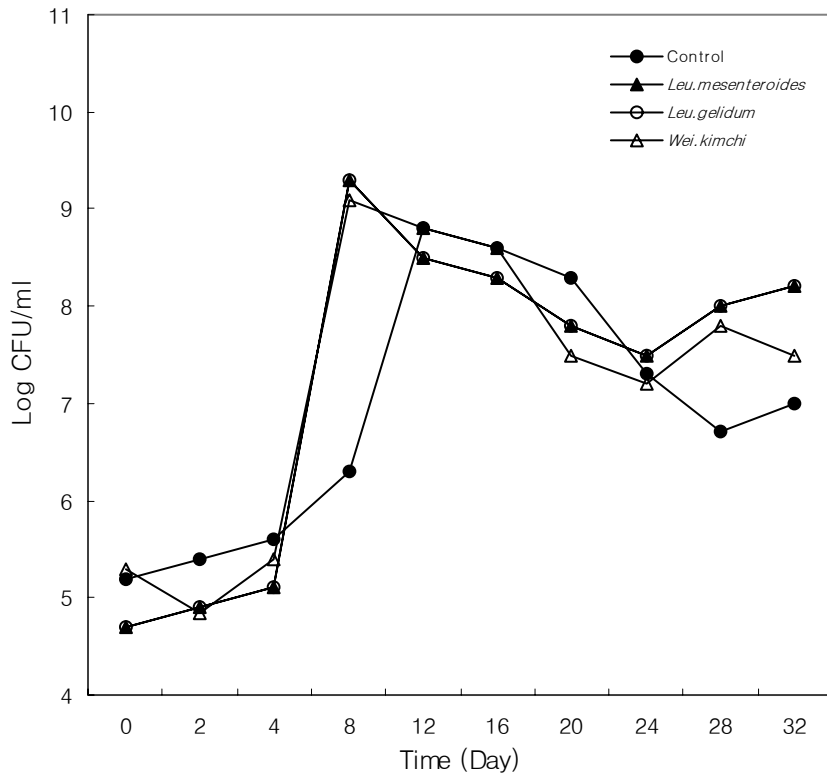


Fig. 8-3. Changes of total lactic acid bacteria number of DLMK treated with lactic acid bacteria during fermentation at 10°C

3. 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 관능검사

표준화된 원/부재료 비율로 하고 유산균을 첨가하여 갓김치를 10℃에서 15일간 발효하여 관능검사를 실시한 결과를 표 8-1에 나타내었다. 스타터를 접종하지 않는 것(Dolsan leaf mustard *Kimchi*)을 대조구로 하고, 스타터를 접종한 것은 스타터 종류에 따라 *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides*를 접종한 것(이하 *Leuconostoc mesenteroides* 갓김치라 함), *Leuconostoc gelidum*를 접종한 것(*Leuconostoc gelidum* 갓김치) 및 *Weissella kimchi*를 접종한 것(*Weissella kimchi* 갓김치)의 3종류와 비교하였다.

그 결과 스타터 첨가 갓김치는 대조구와 큰 차이는 없었으나, *Weissella kimchi* 를 첨가한 갓김치가 외관, 냄새와 전체적인 순응도에서 높았다. 이와 같은 결과들은 종래의 제조방법보다 제품의 일관성을 유지할 수 있어 소비자들로부터 신뢰성을 인정받을 수 있고, 맛의 관점에서도 일부 개선된 점, 또한 건강기능성을 개선하는 의미를 더 할 수 있어서 제품화하여 판매하는 경우 부가가치를 높일 수 있을 것으로 판단된다.

Table 8-1. 유산균을 첨가한 표준화된 갓김치의 관능검사 결과

	표준화갓김치	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 갓김치	<i>Leuconostoc gelidum</i> 갓김치	<i>Weissella kimchi</i> 갓김치
외관	4.00±1.15	3.95±1.00	3.88±1.25	54.76±0.52
냄새(향)	4.87±0.51	4.50±0.88	4.92±0.85	4.92±0.55
조식감	5.01±1.00	5.12±1.03	4.89±0.45	4.72±0.71
전체적인 순응도	4.00±1.15	3.79±0.50	3.92±1.23	4.15±1.10

4. 갓김치 methanol 추출물 및 분획물의 수율

Starter 비첨가 갓김치와 starter 첨가 갓김치의 methanol 추출물 및 분획물의 양은 Table 8-1에 나타내었다. 갓김치는 동결 건조 후 건조 된 시료 40g을 methanol 추출하여 추출물 10.71g을 얻었다. 이 메탄올 추출물을 n-hexane, chloroform 및 ethyl acetate의 각 용매별 계통 분획법에 의하여 n-hexane 분획층은 0.57g, chloroform 분획층은 0.13 g 및 ethyl acetate 분획층은 0.03 g 썩을 얻었고, 나머지 물 가용부에서는 1.14 g을 얻었으며, 유기 용매별로 추출 수율을 살펴보면 methanol 추출물의 수율이 다른 유기 용매 추출물에 비하여 더 높은 수율을 보였다. n-BuOH 분획층은 수율이 0.002g으로 매우 낮아 실험에 사용할 수 있는 충분한 양을 얻을 수 없어 차후의 실험에서 제외하였다.

Table 8-2. Extracting yields of DLMK treated with lactic acid bacteria

Solvent	Extracting yield % (wt/wt)
Methanol	26.78
Hexane	5.28
Chloroform	1.17
Ethyl acetate	0.30
n-BuOH	0.02
Water	10.61

5. Starter 첨가 갓김치 methanol 추출물의 세포독성 효과

pH 및 산도, 총 유산균수의 결과로 적속기로 판단된 갓김치 methanol 추출물이 인체 폐암세포 A 549와 인체 위암세포 SNU 601의 성장 저해 효과를 살펴 본 결과는 Fig. 8-4~8-11에 나타내었다. 갓김치 추출물은 농도 의존적으로 폐암세포와 위암세포에 대해 성장 저해 효과를 보이고, A 549의 경우 250 μ g/ml의 농도에서 가장 높은 세포독성효과를 보였으며, SNU 601은 다소 낮은 농도인 50 μ g/ml의 농도에서 세포독성효과를 나타냄을 확인하였다. A 549에 *Leuconostoc mesenteroides*갓김치 추출물 250 μ g/ml을 첨가한 경우는 18%의 성장 저해율을 보였으며 *Weissella kimchi* 갓김치 추출물 250 μ g/ml을 첨가한 경우 26%의 성장 저해율을 보였다. 그러나 500 μ g/ml 이상의 농도에서는 더 이상의 저해율을 보이지 않았다. 그에 비해 *Leuconostoc gelidum* 갓김치 메탄올 추출물의 경우 250 μ g/ml 첨가 했을 때 19%의 성장 저해율을 보였으며, 농도 의존적으로 폐암 세포주에 대해 성장 저해 효과를 보였다. SNU 601에 *Leuconostoc mesenteroides*갓김치 추출물과 *Leuconostoc gelidum* 갓김치 메탄올 추출물 50 μ g/ml 첨가 시 각각 41.73%와 38.50%의 세포독성효과를 보였다. 갓은 많은 양의 thiosulfates와 organosulfur 화합물을 함유하고 있으며, 이 화합물은 화학적으로 유도되는 종양을 저해한다고 보고되었다. *In vitro*에서 여러 생화학적 지표를 사용하여 암예방 후보물질을 검색한 결과 indole-3-carbinol(I3C) 성분이 암예방 효과가 있다는 가능성이 제기되었다. 또한 본 연구실에서 행해진 일련의 연구 결과들에 의하면, 적속기 갓김치의 열수 추출물의 첨가가 간암세포의 성장을 억제한다고 보고되었으며, 6%의 갓즙액 첨가 시 간암세포를 성장을 50% 정도 억제한다고 보고하였다. 그러나 본 실험에 사용된 암세포들에 대한 starter 첨가 갓김치 methanol 추출물은 폐암세포와 위암세포의 성장에 대해 각각 20%미만과 40%정도의 성장저해효과를 보였다.

이는 십자화과(*Brassica* or cruciferous) 채소들에서 독특하게 발견되어지는 glucobrassicin (indolylmethyl glucosinolate)의 자가 분해산물들인 indole-3-carbinol(I3C), indole-3-acetonitrile (IAN), 3,3'-diindolylmethane (I33') 등의 항암물질들은 암세포에 따라 나타나는 억제효과가 다르다고 보여지며, 실험에 사용된 폐암, 위암세포들에 대해 직접적인 세포독성 효과를 나타내지 못하는 것으로 판단된다.

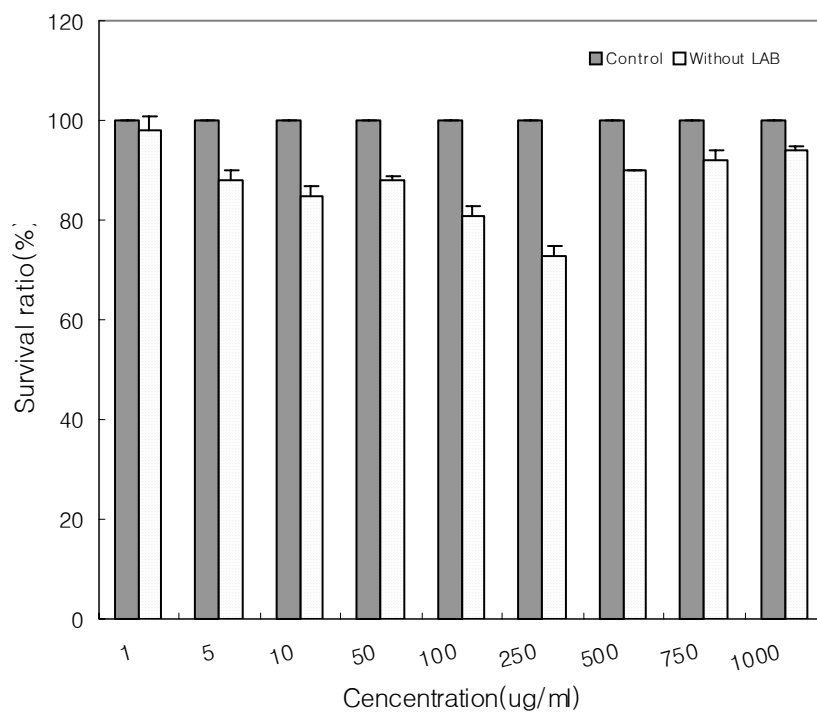


Fig. 8-4. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK without LAB on A549 cells by MTT assay

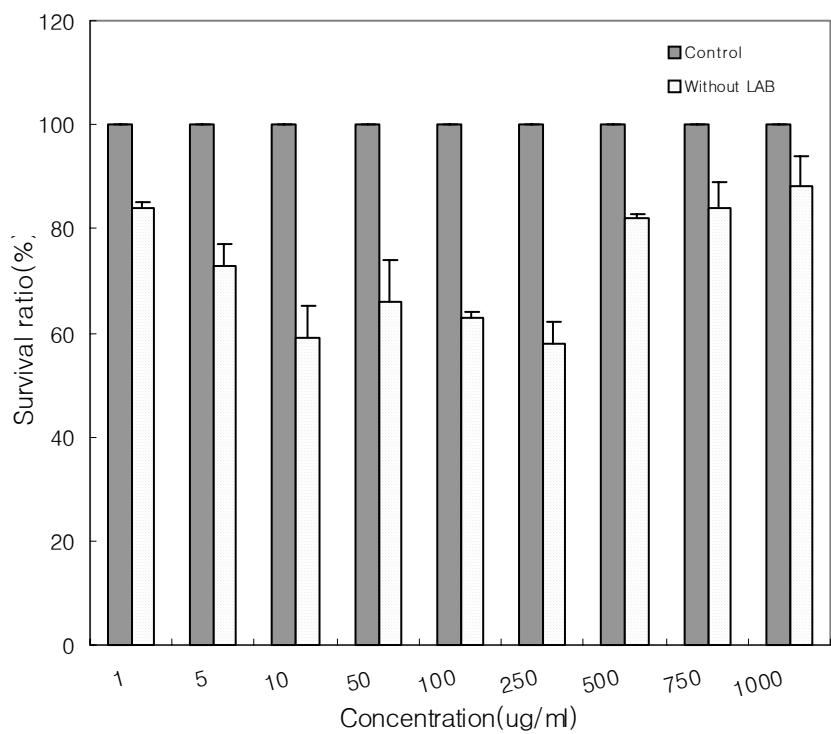


Fig. 8-5. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK without LAB on SNU-601 cells by MTT assay

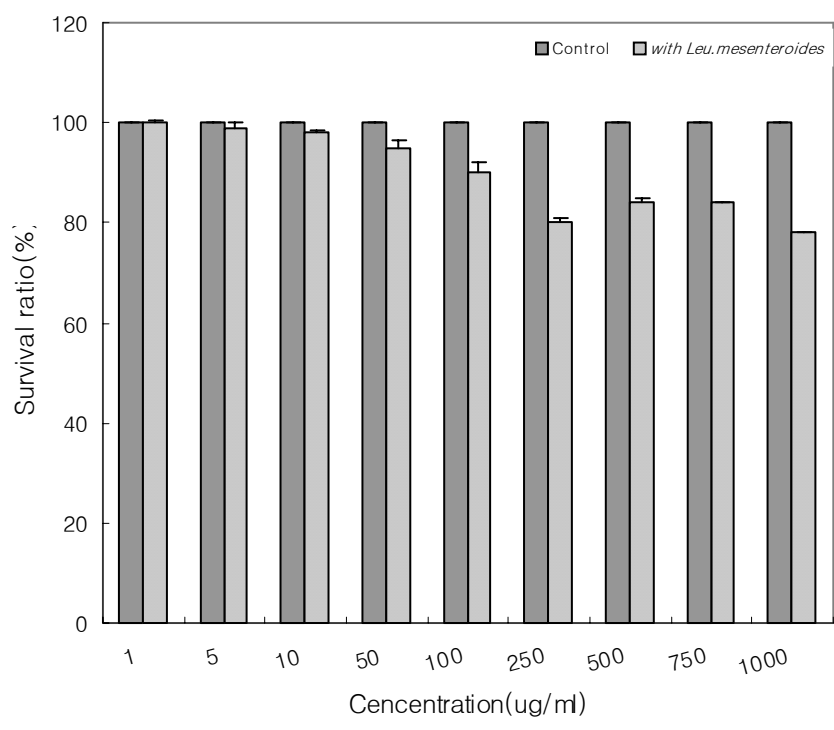


Fig. 8-6. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK with *Leuconostoc mesenteroides* on A549 cells by MTT assay

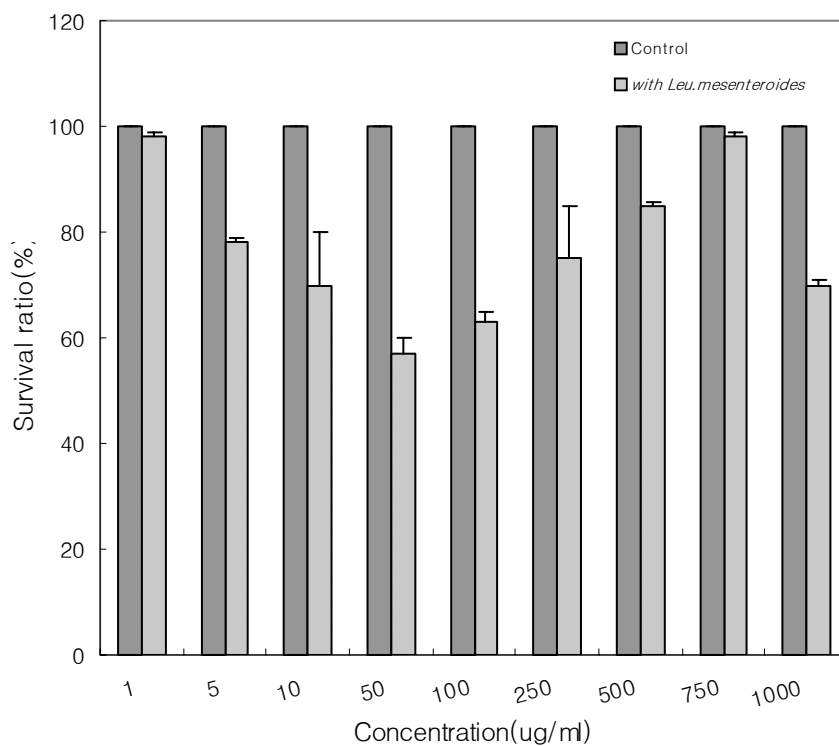


Fig. 8-7. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK with *Leuconostoc mesenteroides* on SNU-601 cells by MTT assay

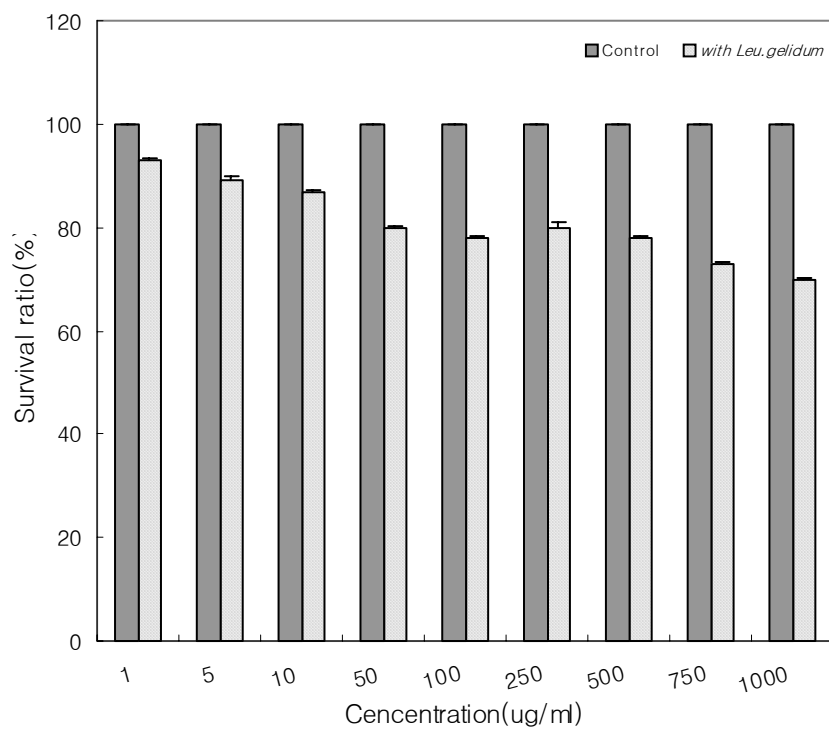


Fig. 8-8. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK with *Leu. gelidum* on A549 cells by MTT assay

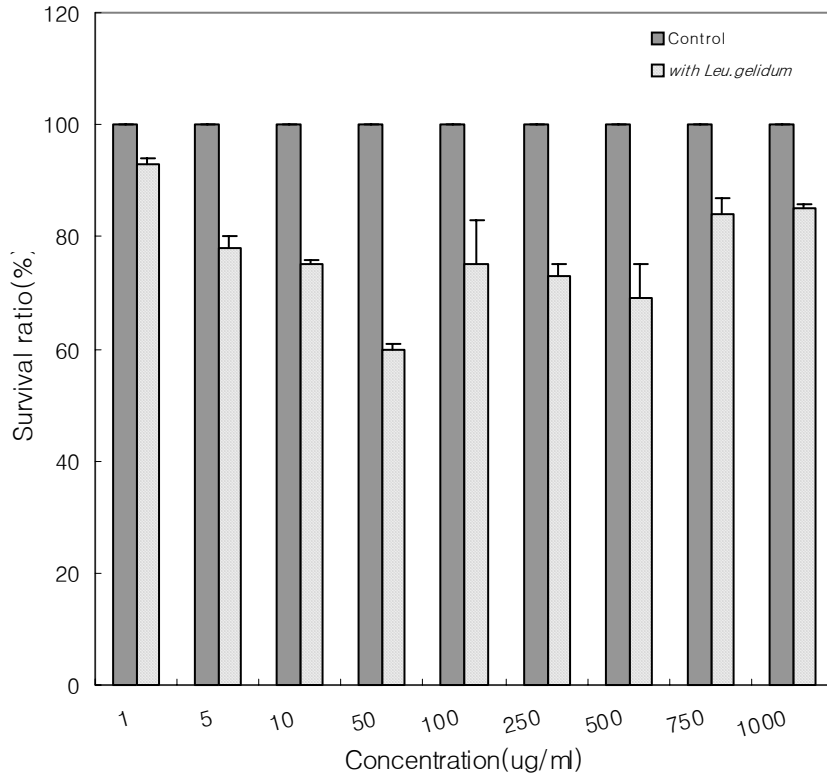


Fig. 8-9. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK with *Leu. gelidum* on SNU-601 cells by MTT assay

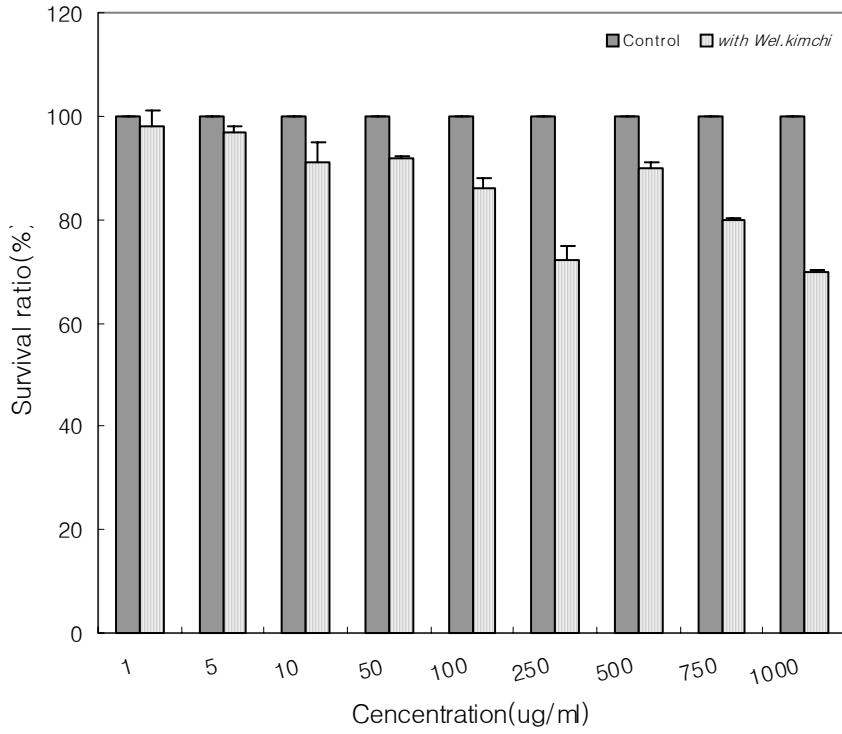


Fig. 8–10. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK with *Weisella kimchi* on A549 cells by MTT assay

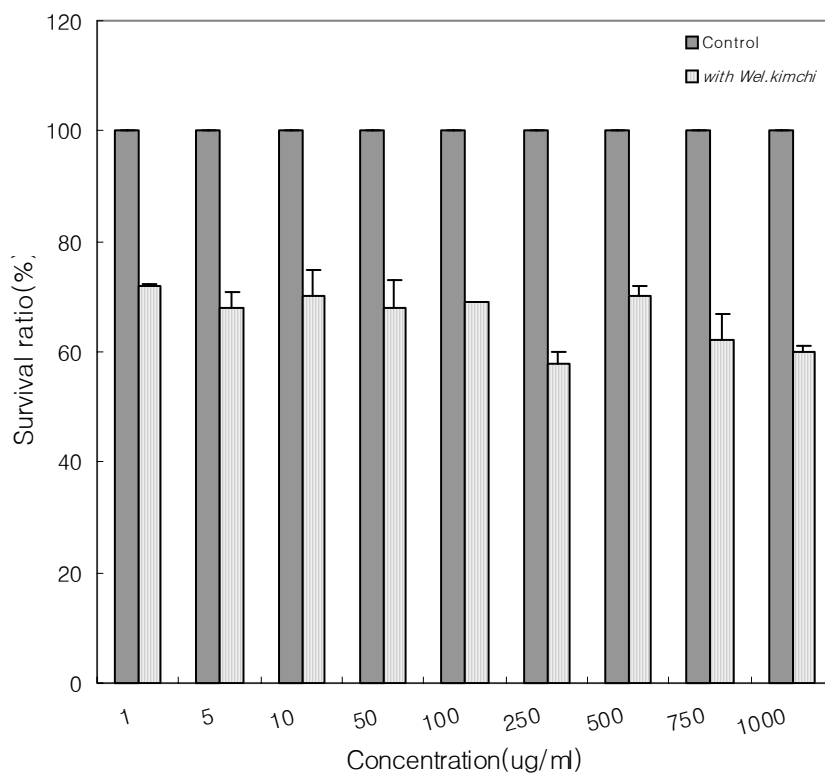


Fig. 8-11. Cytotoxicity of MeOH extracts of the DLMK with *Weisella kimchi* on SNU-601 cells by MTT assay

6. 유산균 첨가 갓김치 각 용매 분획물의 세포 독성 효과

Fig. 8-12~8-19는 A 549 인체 폐암세포와 SNU 601 인체 위암세포에 대한 유산균 첨가 갓김치 용매 분획물의 MTT assay에 의한 세포독성효과를 나타낸 것이다. 시료의 농도를 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 250 μ g/ml 및 500 μ g/ml씩 점차 증가시키면서 A 549에 첨가한 결과 *Weissella kimchi* 갓김치 250 μ g/ml 농도의 Chloroform 분획물과 물 가용부 첨가 시 각각 81.13%, 54.52%의 성장 저해율을 보였으며 *Leuconostoc mesenteroides*갓김치 250 μ g/ml 농도의 ethyl acetate 분획물 첨가 시 53.16%의 성장 저해율을 보였다. SNU 601에 *Leuconostoc gelidum* 갓김치 ethyl acetate 분획물과 물 가용부 첨가 시 각각 38.74%와 45.61%의 세포 성장 저해효과를 보였으나 다른 분획물들은 그 효과가 모두 미약하였다. 또한, 500 μ g/ml 농도의 분획물 첨가 시 세포 성장 저해 효과가 오히려 감소함을 보였다. 이는 분획물에 함유되어있는 어떠한 물질들이 MTT를 오히려 환원시켜 나타난 결과로 생각되어진다.

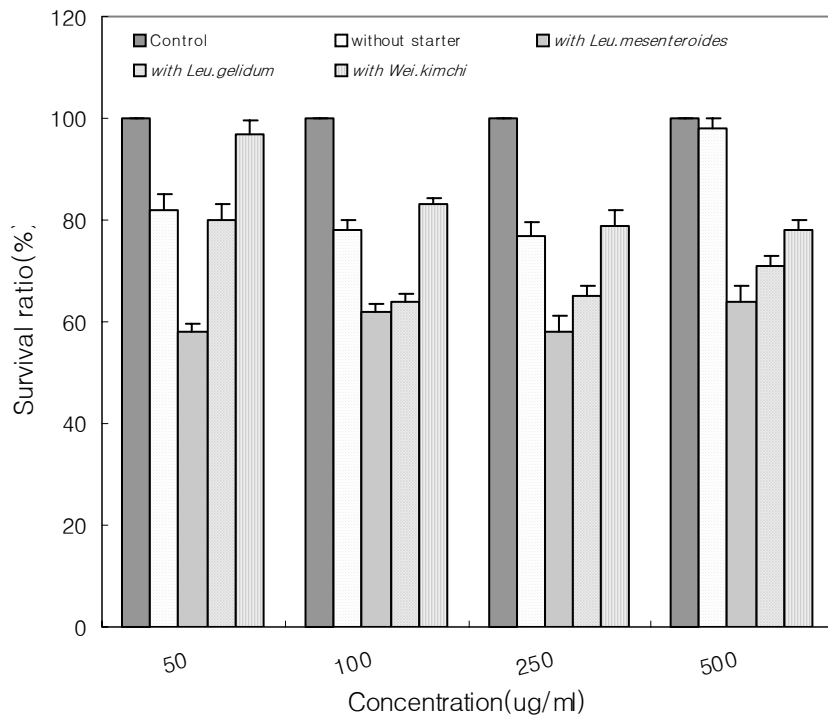


Fig. 8–12. Cytotoxicity of hexane soluble extracts of the DLMK on A549 cells by MTT assay

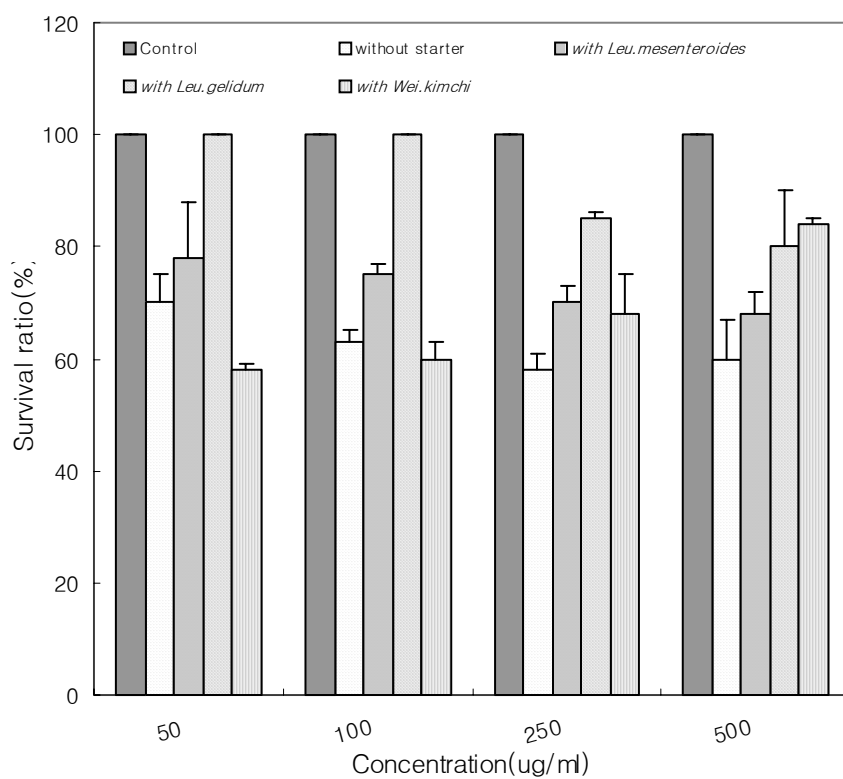


Fig. 8-13. Cytotoxicity of hexane soluble extracts of the DLMK on SNU-601 cells by MTT assay

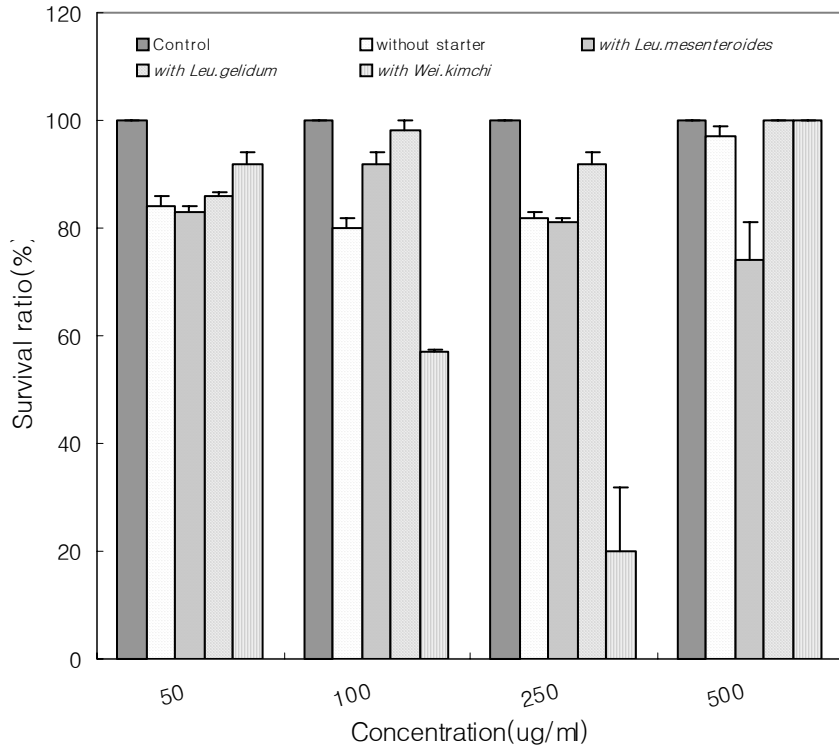


Fig. 8–14. Cytotoxicity of chloroform soluble extracts of the DLMK on A549 cells by MTT assay

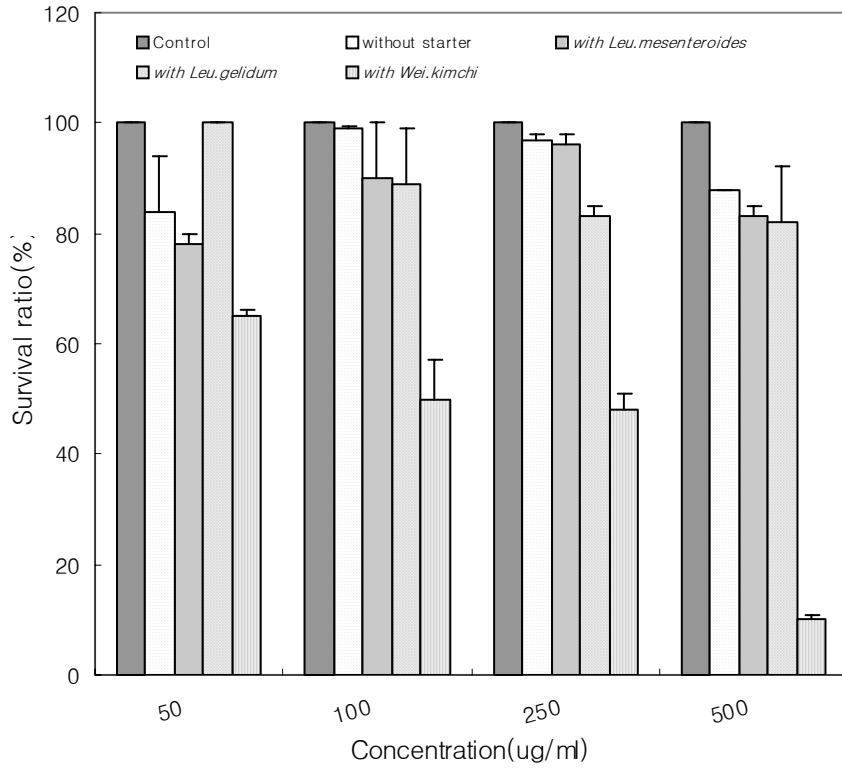


Fig. 8-15. Cytotoxicity of chloroform soluble extracts of the DLMK on SNU-601 cells by MTT assay

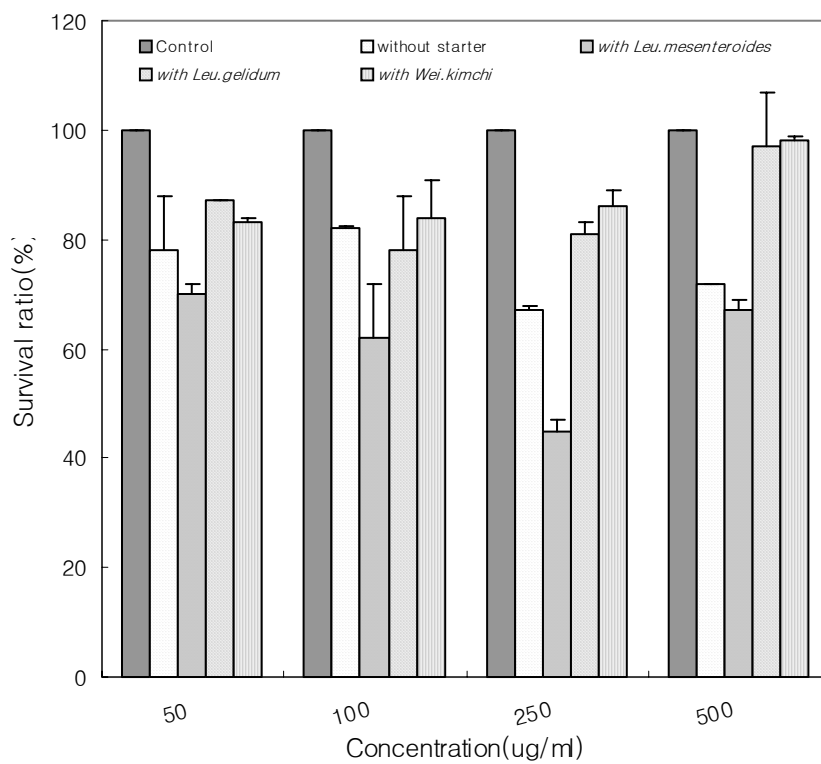


Fig. 8-16. Cytotoxicity of ethyl acetate soluble extracts of the DLMK on A549 cells by MTT assay

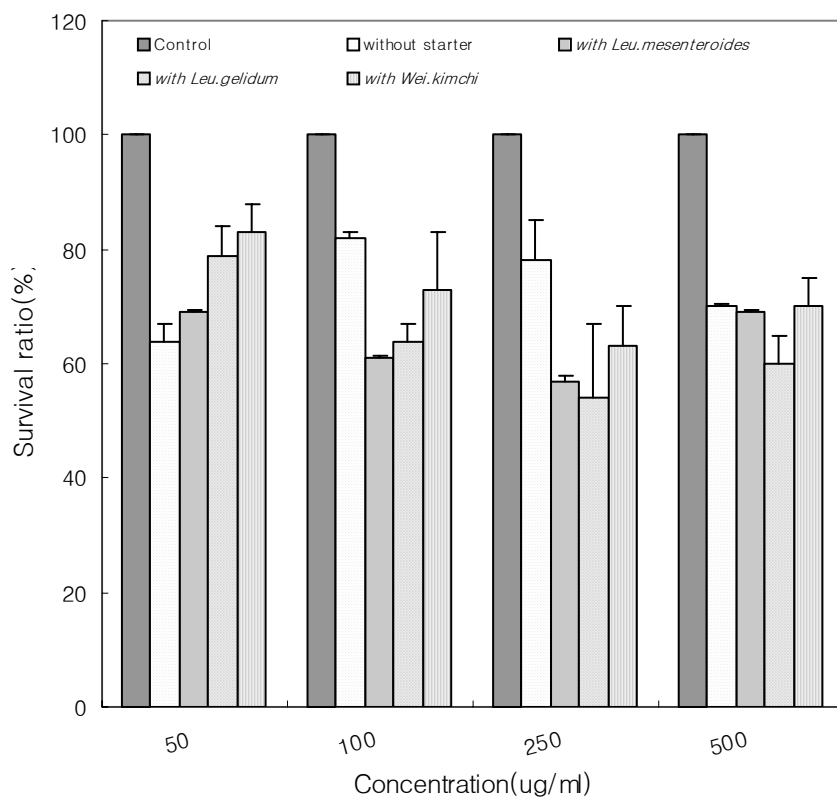


Fig. 8-17. Cytotoxicity of ethyl acetate soluble extracts of the DLMK on SNU-601 cells by MTT assay

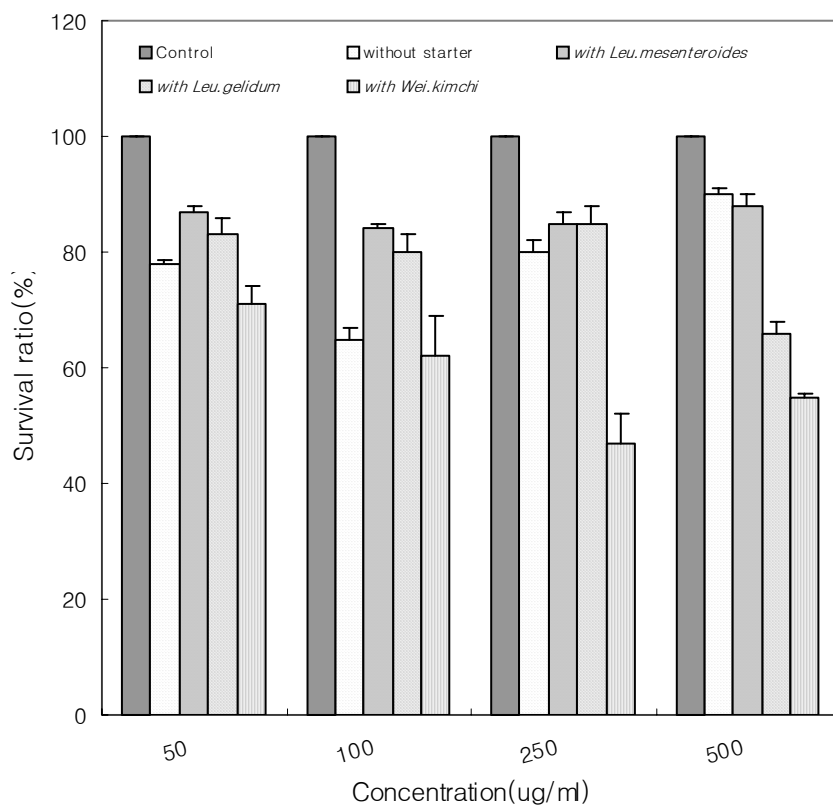


Fig. 8-18. Cytotoxicity of water soluble extracts of the DLMK on A549 cells by MTT assay

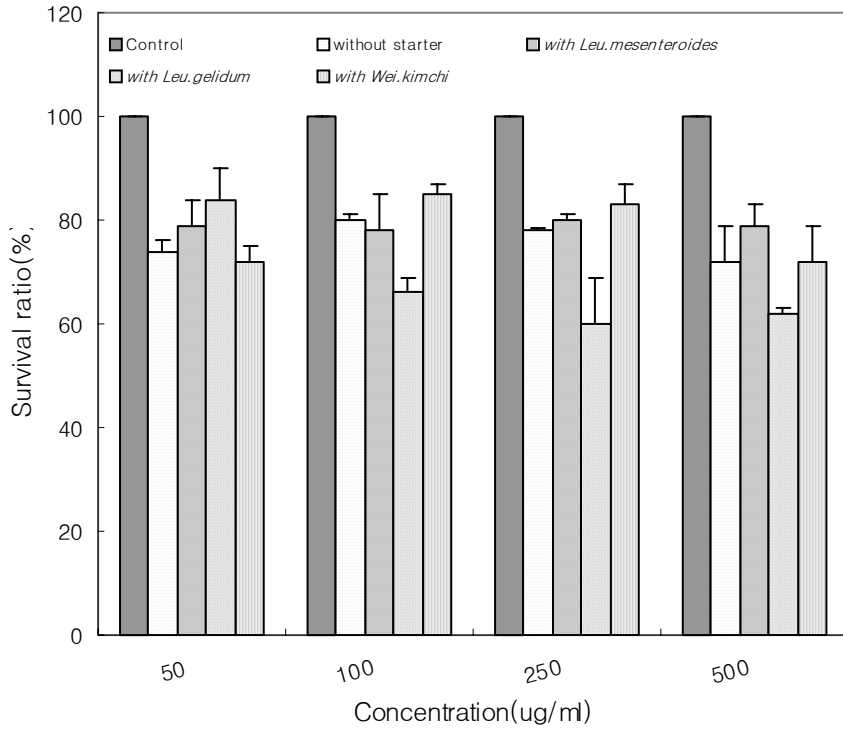


Fig. 8-19. Cytotoxicity of water soluble extracts of the DLMK on SNU-601 cells by MTT assay

7. 세포 성장 저해 효과

인체 폐암세포 A 549 와 인체 위암세포 SNU 601의 세포독성 결과를 통해, 유산균 첨가 갓김치 각 분획물들의 농도와 종류를 결정하였다. 농도 250 μ g/ml의 *Leuconostoc mesenteroides* 갓김치 ethyl acetate 분획물, *Weissella kimchi* 갓김치 chloroform 분획물과 물 가용부로 결정하였으며, 이들 분획물의 암세포 증식억제 효과에 대한 결과는 Fig. 8-20과 8-21에 나타내었다. Fig. 8-20에서 나타난 바와 같이 정상배지에서 자란 A 549의 성장곡선은 6일까지 증가하다가 배양 6일째 이후 세포의 성장이 억제되었으나, 각 분획물을 함유한 배지의 암세포의 증식은 배양 1일까지 약간 증가하다가 배양 2일째부터 서서히 억제되기 시작하였고, 배양 5일째 모든 분획물에서 90% 정도의 암세포 성장 억제율을 보였다. SNU 601의 성장 억제 효과는 Fig. 8-21에서 나타난 바와 같이 정상배지에서 자란 SNU 601의 성장곡선은 배양 6일째 이후 세포의 성장이 억제되었으나, 각 분획물을 함유한 배지의 암세포의 증식은 배양 1일째부터 서서히 억제되기 시작하였고, 배양 3일째 모든 분획물에서 90% 정도의 암세포 성장 억제율을 보였다. 특히, A 549 와 SNU 601 암세포 모두 *Weissella kimchi* 갓김치 chloroform 분획물 첨가 시 가장 강한 성장 억제율을 보였다. 이는 갓의 chloroform 분획물에 다량 함유되어 있는 4-decanol이 강한 항돌연변이 효과가 나타낸다는 보고와 관련이 있다고 사료되며, 그림에서 보여 주듯이 각 분획물 농도 250 μ g/ml은 A 549 세포에게 아주 강한 스트레스가 됨을 확인하였다.

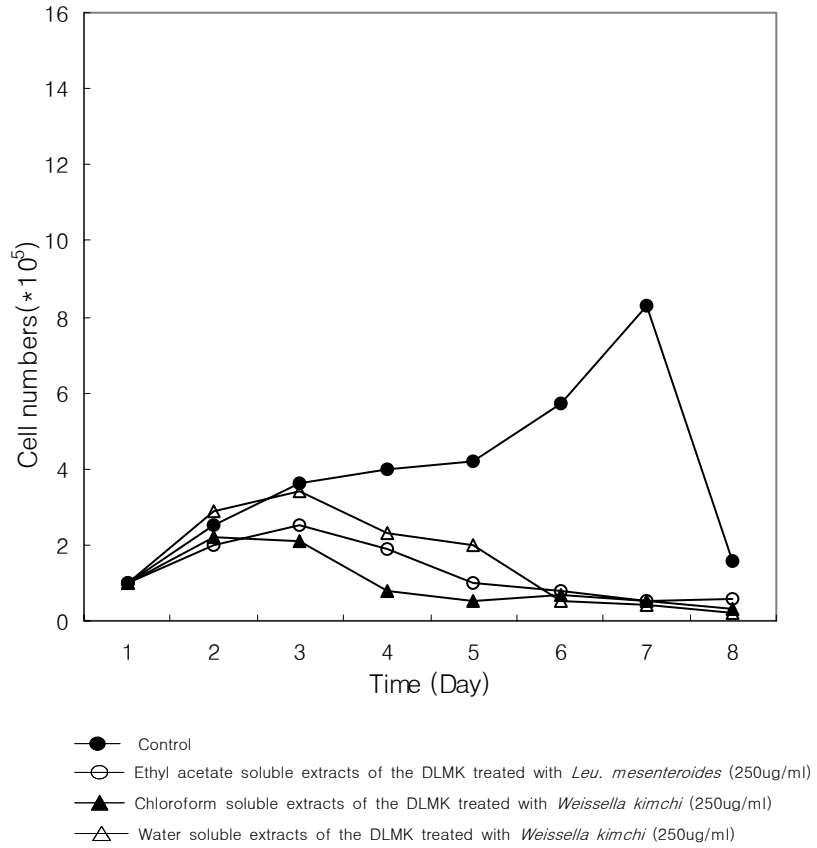


Fig. 8-20. Effects of extracts from DLMK treated with lactic acid bacteria on A549 cells

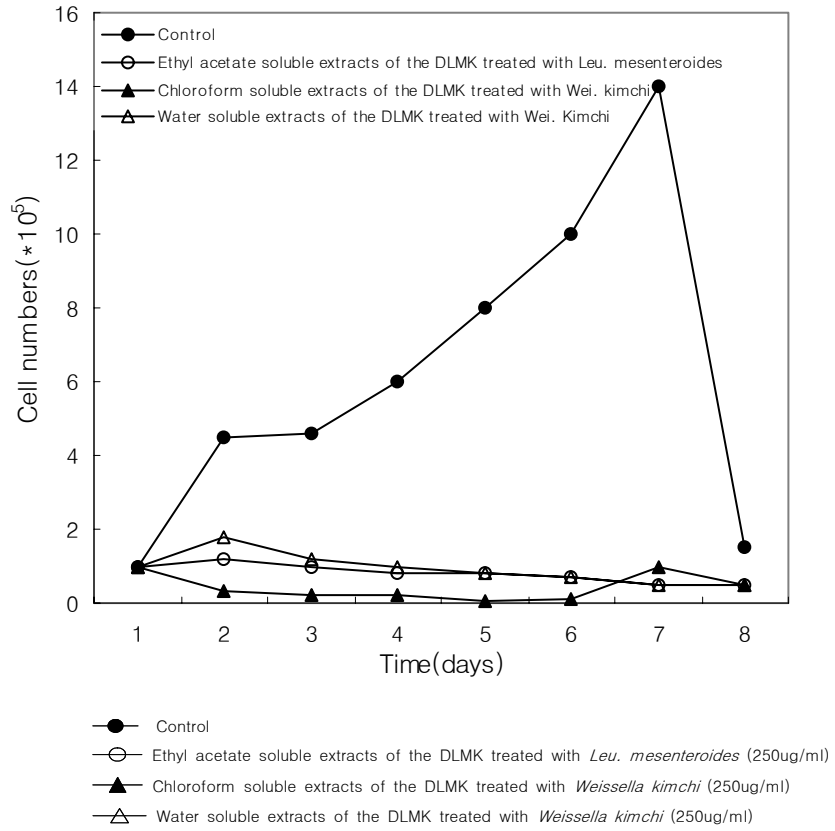


Fig. 8-21. Effects of extracts from DLMK treated with lactic acid bacteria on SNU-601 cells

8. 세포의 형태학적 변화

정상 배지와 starter 첨가 갓김치 추출물의 첨가에 따른 폐암세포인 A549와 위암세포인 SNU-601의 세포 조직의 형태변화를 알아보기 위하여 현미경을 통해 관찰하였다. Fig. 8-22~23에서 나타난 바와 같이 A549와 SNU-601에 *Leu. mesenteroides* 갓김치 ethyl acetate 분획물, *Wei. kimchi* 갓김치 Chloroform 분획물과 *Wei. kimchi* 갓김치 물 가용부를 첨가 했을 때는, A549와 SNU-601은 정상적으로 성장하지 못하고, 세포밀도의 감소현상을 관찰할 수 있었으며, 다형성이 심하여 원형이나 방추형등의 불규칙한 형태가 많이 나타났다. 세포막이 불규칙하게 변하고 세포돌기가 길어졌으며, 사멸된 세포의 잔유물이 자주 관찰되었다. 특히, 폐암세포인 A549에서는 *Wei. kimchi* 갓김치 물 가용부 첨가 시 세포막의 형태적인 변화와 기포현상도 관찰 되는 등 SNU-601에서는 *Wei. kimchi* 갓김치 chloroform 분획물에서 손상된 세포의 형태가 뚜렷이 관찰(C)되었다.

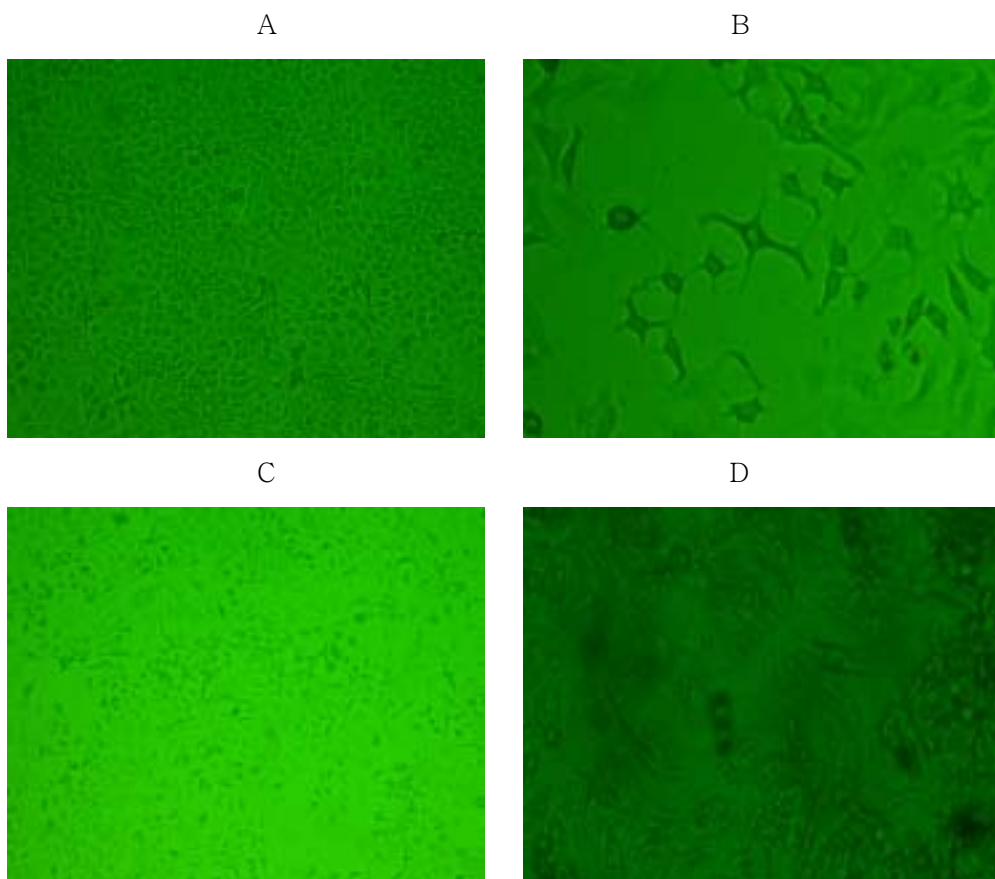


Fig. 8-22. Morphology of A 549 human lung cancer cells in medium containing the fractionation of DLMK treated with lactic acid bacteria. Exponentially growing cells were incubated for 24h. Cell morphology was visualized by microscopy ($\times 100$)

A : Normal medium(RPMI 1640 medium)

B : Ethyl acetate soluble extract($250 \mu\text{g/ml}$) of DLMK treated with *Leu. mesenteroides*

C : Chloroform soluble extract($250 \mu\text{g/ml}$) of DLMK treated with *Weissella kimchii*

D : Water soluble extract($250 \mu\text{g/ml}$) of DLMK treated with *Weissella kimchii*

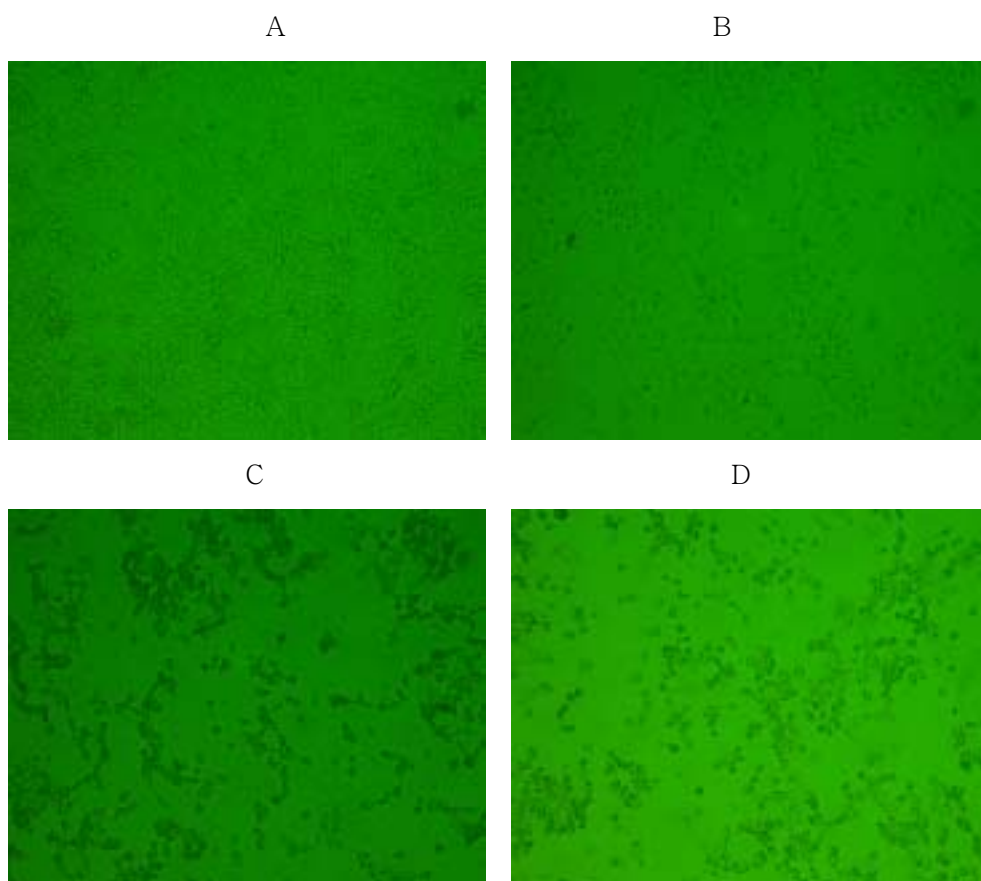


Fig. 8-23. Morphology of SNU 601 human gastric cancer cells in medium containing the fractionation of DLMK treated with lactic acid bacteria. Exponentially growing cells were incubated for 24h. Cell morphology was visualized by microscopy ($\times 100$)

A : Normal medium(RPMI 1640 medium)

B : Ethyl acetate soluble extract($250 \mu\text{g/ml}$) of DLMK treated with *Leu. mesenteroides*

C : Chloroform soluble extract($250 \mu\text{g/ml}$)of DLMK treated with *Weissella kimchi*

D : Water soluble extract($250 \mu\text{g/ml}$) of DLMK treated with *Weissella kimchi*

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

제 1 절 목표 달성도

구분	평가의 착안점 및 척도		달성도
	착안사항	척도 (점수)	척도 (%)
1차년도 (2004)	◎돌산 및 타지역 갓김치의 맛과 부재료 함량, 종류 평가	40	100
	◎발효관련 유산균의 경시적 변화 관찰	30	100
	◎유산균 동정을 통한 균주의 도표화	30	100
2차년도 (2005)	◎돌산갓김치의 표준화 (소금, 부재료, 발효온도에 따른)	25	100
	◎표준화된 부재료 사용 갓김치의 유산균총 분석	25	100
	◎분리된 우점종균들의 유전적 동정, 신규성 규명	25	100
	◎각각의 유산균을 접종한 갓김치의 기능성 평가	25	100
3차년도 (2006)	◎최적 표준화 돌산갓김치 시험생산, 검증, 개선	50	100
	◎우량 유산균을 이용한 돌산갓김치의 개발 및 검증 (생리활성, 관능검사로 확인)	50	100
최종평가	◎발효관련 유산균의 경시적 변화 및 동정을 통한 균주의 도표화	20	100
	◎돌산갓김치의 표준화	20	100
	◎분리된 유산균의 유전적 동정 및 유산균 접종 갓김치의 기능성 평가	20	100
	◎최적 표준화된 돌산갓김치 시험생산 및 검증, 개선	20	100
	◎우량 유산균을 이용한 돌산갓김치의 개발 및 검증	20	100

제 2 절 관련분야의 기여도

제 1 항 기술적 측면

현재 돌산갓김치에서 분리된 미생물 균이나 주요 유산균의 경시적 변화에 대한 보고는 매우 미비한 실정이다. 따라서 본 연구를 통해 돌산갓김치내의 우점종균을 분리하여 동정하였으며, 갓김치의 starter로 활용하여 김치의 숙성시기를 줄일 수 있고, 또한 기능성면에서도 우수함을 확인하였다. 또한 최적화된 레시피를 통해 연중 거의 비슷한 맛의 김치를 생산할 수 있는 기틀을 마련하였다.

갓김치의 특유한 맛, 향, 건강기능면에서 우수함을 과학적이고 체계적으로 규명함으로써 돌산갓과 갓김치, 갓김치 유산균의 용도를 더욱 넓힐수 있는 계기가 될 것으로 판단된다.

제 2 항 경제 · 산업적 측면

지역특산물인 돌산갓의 고부가 가치화 및 다양화, 특성화로 농업인의 경제적 이익을 증대시키며, 고기능성을 가진 여수의 관광 상품으로 경쟁력을 갖출 수 있고, 특히 2012년 여수해양엑스포 유치와 관련하여 점차로 늘어나고 있고 김치 수출에 있어서도 큰 이익을 창출할 것으로 기대된다. 또한 김치 종주국으로서 경쟁력도 갖출 수 있을 것으로 기대된다. 또한 본 연구과제를 수행한 결과로서 얻어진 여러 결과들을 활용하기 위하여 총괄책임자 최명락 교수와 세부책임자인 임현수 교수가 참여하는 산업자원부 지정 RIS 광주·전남 김치산업 육성사업단에 서 적극적으로 지원하고 있다. 이 사업은 원/부재료, 균주/발효, 제품화, 포장디자인, 마케팅 등 김치 사업에 관련하여 전반적으로 지역의 김치산업체에 지원하는 사업이기 때문에 농림부 과제 종료 후에도 활용할 수 있는 계기가 마련되어 있다. 2005년도에는 돌산갓영농조합에 지게차, 파레트, 대형 절임통, 물빠짐통 등의 설비를 지원하여 대량생산과 위생시설을 갖추었고, 홈쇼핑 판매 지도를 통하여 2억 5천만원의 수익증가(전년대비 20%)를 가져왔다.

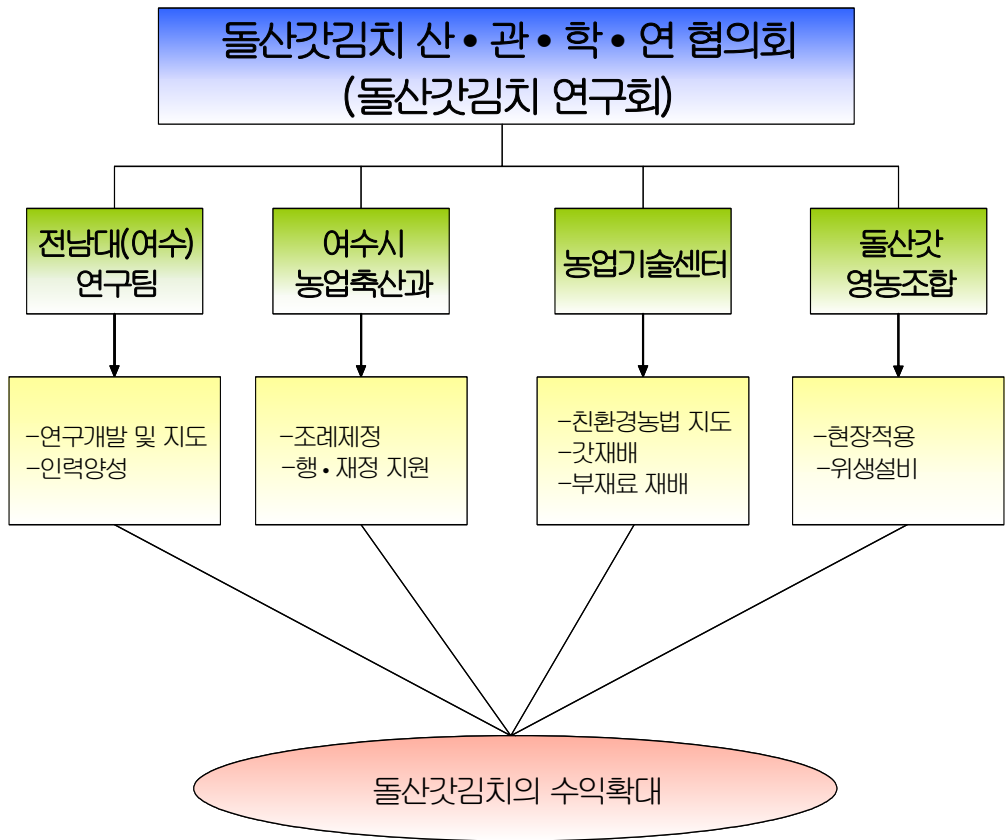
제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

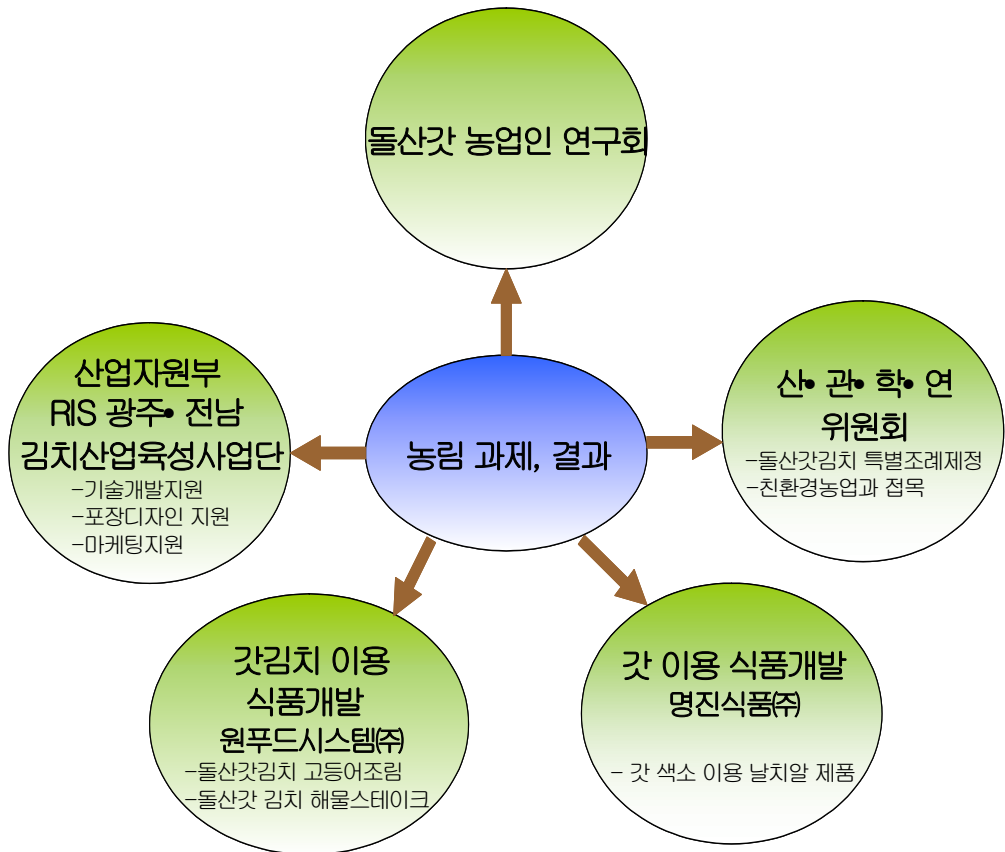
본 연구과제를 수행한 결과로서 얻어진 여러결과들을 총괄책임자 최명락 교수와 세부책임자인 임현수 교수가 참여하는 산업자원부 지정 RIS 광주·전남 김치산업 육성사업단에서 적극적으로 지원하고 있다. 이 사업은 원/부재료, 균주/발효, 제품화, 포장디자인, 마케팅 등 김치 사업에 관련하여 전반적으로 지역의 김치산업체에 지원하는 사업이기 때문에 농림부 과제 수료후에도 활용할 수 있는 계기가 마련되어 있다. 2005년도에는 돌산갓영농조합에 지게차, 파레트, 대형 절임통, 물빠짐통 등의 설비를 지원하여 대량생산과 위생시설을 갖추었고, 본 연구개발 결과를 토대로 하여 돌산갓 영농조합에 최적화된 레시피를 전수하여 표준화된 돌산갓김치 제품을 만들어 판매하였고, 제1회(2004년 11월) 및 제2회(2005년 11월) 돌산갓김치 축제와 홈쇼핑 판매 지도를 통하여 2억 5천만원의 수익증가(전년대비 20%)를 가져왔다.

또한 추후 유산균은 starter로 첨가한 갓김치의 기술지도 및 상품화를 통하여 고기능성 갓김치를 제조하여 현재보다 더 높은 농가의 수익 증대를 유도할 수 있을 것이다. 갓과 갓김치를 응용한 다양한 상품개발을 시도하고 있어서 상품화에 연결될 예정이다. 지역의 수산물 가공업체인 원푸드시스템(주)과 공동으로 개발하는 돌산갓김치 고등어조림과, 돌산갓김치 해물스테이크는 곧 시장에 출시될 예정이다. 지역의 날치알 가공식품업체에 갓 색소 및 갓향을 이용한 제품 개발도 진행 중이어서 갓과 갓김치의 판매증대 및 고부가 가치화에 기여할 것으로 보인다. 이에 따라 계속적인 다양한 상품의 개발과 기술 지도가 이루어 질 수 있도록 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다. 또한, 현재까지의 결과를 토대로 암세포의 증식을 억제시키는 물질을 규명하고 그 메카니즘을 밝히는 일이 요구되어진다.

- 활용화 체계



- 활용방안



제 6 장 연구개발 과정에서 수집한
해외 김치시장현황

제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외 김치시장 현황

갓(leaf mustard)은 전남 돌산지역이 특산지이며, 특유의 쏘는 맛과 쉽게 물러지지 않는 특성 때문에 김치의 주재료 또는 부재료로서 사용되고 있다. 갓의 쏘는 맛을 내는 물질인 glucosinolate와 그 부산물인 isothiocyanate는 오래전부터 세계적으로 연구되어 왔으며, 그에 대한 생리활성도 보고된 바 있다. 또한 갓은 십자화과에 속하는 경엽 채소류로 줄기와 잎은 염장 발효시켜 김치로 식용되고, 씨(mustard seed)는 신미성 향신료로서 사용된다. 또한 식물성 2차 대사산물인 glucosinolate, flavonoid, polyphenol류, 함유화물 등이 풍부하며, 이러한 물질들은 생리활성 물질로서 체내에서 약리 작용을 나타내는데, 특히 면역계를 강화시킴으로써 건강유지에 기여하며 최근에는 암을 예방하는 대표적인 식품으로 여겨지고 있다. 이런 갓이 속한 십자화과 채소, 특히 겨자는 예로부터 세계적으로 식품 뿐 아니라 향신료나 정유 등으로 많이 소비되어 왔고, 국내의 갓김치 역시 쉽게 물러지지 않는다 하였다. 이는 겨자에 들어있는 allyl isothiocyanate가 부패 미생물 성장을 저해하기 때문이며, 이러한 isothiocyanate류에 대한 항균 효과는 이미 널리 알려져 있어, 연구가 많이 진행되었다. Allyl isothiocyanate는 강력한 항균 활성을 갖고 있으며, 항균 peptide인 polymyxin B의 작용과 유사한 세포막 저해로서 항균 활성을 낸다는 것이 이미 밝혀져 있다. Polymyxin B는 helix형 peptide를 이루며 그람 음성 간균의 세포질막의 인지질과 결합하여 phospholipase를 활성화해서 인지질의 분해를 일으키는 것으로 알려져 있다. 이외에도 십자화과 채소는 항산화 활성, ACE 저해활성 등의 많은 생리기능성이 보고되어 있으며, 항산화 활성은 일반적인 식용식물에서 찾을 수 있는 flavonoids류와 carotenoids류 또는 phenol 계 물질에 의한 것으로 생각되나, ACE 저해활성에 대한 원인물질은 아직 확실하지 않다. ACE(angiotensin converting enzyme)는 혈관수축작용과 관련한 cascade 계인 renin-angiotensin-aldosterone system에서 decapeptide인 angiotensin I의 COOH 말단의 dipeptide를 끊어 냄으로써 octapeptide인 angiotensin II를 만드는 zinc를 함유한 metallic enzyme으로 angiotensin II는 직접 호르몬을 작용하여

혈관 수축작용에 관여하거나 부신피질을 자극하여 항이노호르몬인 aldosterone의 분비를 증가시켜 혈류량의 증가에 기여하므로 고혈압의 주요한 원인이 된다. 어떠한 원인으로 혈압이 떨어지게 되면 시장의 juxtalomerular cell과 cacula densa가 이를 인지하여 prorenin을 분비하고 이는 혈중의 kallikrein에 의해 renin으로 전환되며, α_2 -globulin인 angiotensinogen이 간에서 분비되면 이 renin에 의해 angiotensin I 으로 전환되고, 이는 폐의 내피세포에 존재하는 ACE에 의해 angiotensin II로 전환되는 것이다. 십자화과 채소에 대한 ACE 저해효과에 대한 보고는 많지 않으며, *Sinapis alba* L.에서 분리한 ACE inhibitor는 경쟁적 저해를 하고 640kD의 분자량을 갖는 peptide류로 보고된 바 있고, 양갓냉이(watercress)에서는 adenosine이 저해 효과를 나타낸다고 하였다. 또한 십자화과 채소를 섭취하면 암이 생기는 위험을 줄일 수 있다고 알려져 있다. Indole-3-carbinol(I3C)은 배추(Korean or Chinese cabbages), 양배추(cabbages), 모란채(broccoli), 콜리플라워(cauliflower), 싹눈 양배추(Brussels sprouts), 케일(kale), 콜라드(collards), 루터바가(rutabaga)와 같은 십자화과 채소의 절단, 분쇄 혹은 저작과 같은 분해과정 혹은 조리과정 및 생체 내 효소로 인해 I3C를 포함한 다양한 인돌류(indole compounds)가 생성된다. 이들 중 대표적인 것으로 3,3'-diindolylmethane(DIM), indole [3,2-b]carbazole(ICZ), 5,6,11,12,17,18-hexahydrocyclone [1,2-b:4,5-b':7,8-b''] triindole(CTr), 2-(indole-3-yl methyl)-3'-diindolylmethane(LTr-1)과 3-(methoxy methyl)indole등이 있다. 갖은 많은 양의 thiosulfates와 organosulfur 화합물들을 함유하고 있으며, 이 화합물은 화학적으로 유도되는 종양을 저해한다고 보고되고 있다. 이러한 갖을 이용한 김치는 비타민과 무기질이 풍부하며, 숙성 동안에 glucosinolate로부터 생산되는 기능성 물질인 sinigrin 이외에도 주재료인 *Brassica*(cabbage, mustard, rapeseed 등)에는 β -carotene, chlorophylls, phenolic compounds 등의 기능성 물질이 함유되어 있으며, 이들에 의한 항산화성, 항돌연변이성, 항암성 등에 대해 보고된 바 있다. 또한 김치 숙성 중에 생산되는 다양한 유산균의 생성은 독특한 맛 뿐만 아니라 면역세포 증식효과, 항암효과 및 항균효과 등이 보고된 바 있다. 따라서 본 연구에서는 위와 같은 해외 과학정보등을 토대로 탐구에 활용하였다. 그결과 돌산갓김치의 항산화, 항고혈압, 암세포 성장억제 등의 효과를 통해 갓김치가 적숙기에 도달할 때 까지 항산화 활성과 항고혈압 효과가 증가하였고, 암세포 성

장또한 억제하는것을 확인할 수 있었다.

일본에서는 갓을 高菜(Takana)라고 하여 절임류로 하여 큐슈지방에서 주로 섭취했다. 최근 well-being 식품의 영향으로 남쪽 지방의 카고시마에서 북부지방인 북해도의 아사히카와 지방에서도 다량 섭취할 정도로 전국 식품으로 소비되고 있다. 동경을 비롯한 대도시와 아소, 구마모토 등 큐슈지방에서는 갓 절임을 다양한 형태로 가공한 상품도 최근 눈에 띄게 늘고 있다. 이 중에는 참깨, 고춧가루, 마늘 등을 혼합한 상품도 선보이고 있다. 이와 같은 갓 절임류 소비증가 및 응용식품의 등장은 한국 김치에 대한 “건강식품”이라는 인식에 기인한 것으로 생각된다. 이와 같은 환경의 변화를 통해 “돌산갓 김치”의 브랜드 이미지를 국내에서 일본으로 넓힐 수 있을 것으로 판단된다. 이를 위해 본 연구과제를 통하여 얻어진 결과물을 국내는 물론 일본에서 열리는 국내외학회, 특별강연 등과 다양한 매체를 통하여 홍보하고 시식회를 통하여 노력하고 있다.(참고자료 1-1-1 ~ 3-3)

제 7 장 참 고 문 헌

제 7 장 참 고 문 헌

1. Annual report on the cause of death statistics. National Cancer Information Center, Republic of Korea, 2002.
2. Benson, A.M., Hunkeler, M.J., Talalay, P. Increase of NAD(P)H:quinone reductase by dietary antioxidants : possible role in protection against carcinogenesis and toxicity. 1980. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:5216-5220.
3. Cha, Y.N. and Heine, H.S., Comparative effects of dietary administration of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole and 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxy-toluene on several hepatic enzyme activities in mice and rats. 1982. *Cancer Res.* 42:2609-2615.
4. Benson, A.M., Cha, Y.N., Bueding, E., Heine, H., Talalay, P. Elevation of extrahepatic glutathione S-transferase and epoxide hydratase activities by 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole. 1979. *Cancer Res.* 39:2971-2977.
5. Primiano, T., Kensler, T.W., Kuppusamy, P., Zweier, J.L., Sutter, T. R. Induction of hepatic heme oxygenase-1 and ferritin in rats by cancer chemopreventive dithiolethiones. 1996. *Carcinogenesis.* 17: 22 91-2296.
6. Alam, J., Camhi, S., Choi, A.M. Identification of a second region of the mouse heme oxygenase-1 gene that functions as a basal level and inducer-dependent transcription enhancer. 1995. *J. Biol. Chem.* 270:11977-11984.
7. Kim, H.J., Wang, S.K. Dietary factors related with cancer. 1997. *Liv. Sci. of Tj Univ.* 3:99-130.
8. Lee, S.R. Food safety research Ehwa woman's University Press. 1993
9. Jacobs, M.M. Diet, Nutrition, and cancer research : an overview. 1993. *Nutr. Tod.* 28(3): 19-23.

10. Casarett, D. Toxicology : The basic science of poisons. 1996. *McGrawHill*.
11. Doll, R. The lessons of life : keynote address to the nutrition and cancer conference. 1992. *Cancer Res.* 52: 2024–2029.
12. Weiss, S.E., Tatter, P.I., Bratton, J. Ethnic differences in risk and prognostic factors for breast cancer. 1995. *Cancer.* 76(2): 268–274.
13. Zang, E.A., Cohen, L.A. Differences in nutritional risk factors for breast cancer among New York City white, Hispanic, and black college students. 1994. *Ethn. and Dis.* 4(1):28–40.
14. Aburada, M. Recent advances in the pharmacology of Kampo medicine. 1988. p. 275.
15. Kawamura, H., Takemoto, N., Maruyama, H., Komatsu, Y., Aburada, M. and Hosoya, E. Recent advances in the pharmacology of Kampo medicine. 1988. p. 291.
16. Takemoto, N., Maruyama, H., Kawamura, H., Komatsu, Y., Aburada, M., Hosoya, E., Yamada, H., Kiyohara, H. and Cyong, J. C. Recent advances in the pharmacology of Kampo medicine. 1988. p. 345.
17. Wattenberg, L.W. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. 1983. *Cancer Res.* 43: 2448–2453.
18. Nixon, J.E., Hendricks, J.D., Pawlowski, N.E., Pereira, C.B., Shinnhuber, R.O., Bailey, G.S. Inhibition of aflatoxin B1 carcinogenesis in rainbow trout by flavone and indole compounds. 1984. *Carcinogenes is.* 5: 615–619
19. Broadbebt, T.A., Broadbent, H.S. The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol (indole-3-methanol) and 3-(methoxymethyl) indole. [Part I]. 1998. *Curr. Med. Chem.* 5: 337–352.
20. Cho, Y.S., Ha. B.S., Park, S.K., and Chun, S.S. Contents of carotenoids and chlorophylls in Dolsan leaf mustard (*Brassica juncea*). 1993. *Korean J. Dietary Culture.* 8: 153–157.
21. Lee, S.M. and Rhee, S.H. Inhibitory effect of various cruciferous vegetables on the growth of human cancer cells. 1997. *Korean J.*

- Life Science*. 7: 234–240.
22. Park, S.K., Cho, Y.S., Park, J.R., Chun, S.S. and Moon, J.S. Non-volatile organic acids minerals, fatty acids and fiber compositions in Dolsan leaf mustard (*Brassica juncea*). 1993. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22: 53–57.
 23. Diplock, T.A. Antioxidants nutrient and disease prevention. 1991. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 189–193.
 24. Park, K.Y. The nutritional evaluation and antimutagenic a anticancer effects of Kimchi(in Korea). 1993. *J. Korean Agri. Chem. Soc.* 36: 424–427.
 25. Kim, J.O., Kim, M.N., Park, K.Y., Moon, S.H., Ha, Y.L. and Rhee, S.H. Antimutagenic effects of 4-decanol identified from mustard leaf. 1993. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24: 168–182.
 26. Choi, M.R., Yoo, E.J., Song, S.H., Kang, D.S., Park, J.C. and Lim, H.S. Comparison of physiological activity in different parts of Dolsan leaf mustard. 2001. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(4): 721–725.
 27. Choi, Y.Y., Yoo, E.J., Lim, H.S., Kang, D.S., Nishizawa, N. and Choi, M.R. The relationship between physiological activity and cell number in Dolsan leaf mustard Kimchi. 2001. *J. Food Sci. Nutr.*:117–121.
 28. Lim, H.S., Yoo, E.J. and Choi, M.R. Changes of physiological activity of mustard leaf during its fermentation period. 2000. *J. Microbiol. Biotechnol.* 10(1): 43–47.
 29. Yoo, E.J. The cytotoxic, antioxidative, and antihypertensive activities in Dolsan leaf mustard and its Kimchi. 2004. Ph. D. Thesis. Yosu Univ. Yeosu, Korea.
 30. Yoo, E.J., Lim, H.S., Park, K.O. and Choi, M.R. Cytotoxic, antioxidative, and ACE inhibition activities of Dolsan leaf mustard Kimchi (DLMK) treated with lactic acid bacteria. 2005. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 10: 60–66.
 31. 유은정, 임현수, 김진만, 송상호, 최명락. 김치의 숙성 및 보존 기간 연장을

- 위한 키토산 올리고당의 응용. 1998. 한국식품영양과학회지. 27(5), 869-874.
32. 임현수, 유은정, 김진만, 최명락. 효소적 방법으로 제조된 키토산 올리고당의 첨가에 따른 김치의 숙성 및 저장기간 연장에 관한 연구. 1998. 여수대학교 논문집. 13(2), 7-25-731.
 33. 김진만, 최명락. 키토산 올리고당의 항균효과. 1998. 여수대학교 논문집. 13(2), 751-757.
 34. 임현수, 유은정, 최명락, 송상호. 갓김치 ether 추출물의 발효과정상의 생리 기능성 변화. 1999. 여수대학교 논문집. 14(2), 395-400.
 35. 최명락, 유은정, 임현수. 유산균 농도가 돌산갓김치의 항산화효과 및 ACE 저해활성에 미치는 효과. 2003. 한국생명과학회지. 13(1), 59-66.
 36. Yoo. E.J., Choi. M.R., Lim. H.S., The relationship between ACE Inhibitory Activity and Degradations of Sulfur Containing Materials in Dolsan Leaf Mustard Juice. 2004. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 9(5), 400-404.
 37. Kang, T.B., Liang, N.C. Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. 1997. *Biochem Pharm.* 54(9) :1013-1018.
 38. Park, K.Y., Moon, S.H., Rhee, S.H., Baek, K.A., Lim, S.Y. and Yi, S. Y. Effects of tannin from persimmon leaves on the growth inhibition and the synthesis of mRNA of type IV collagen in AZ-521 human gastric cancer cells. 1995. *Environ. Mutat. and Carcinog.* 15(1): 32-37.
 39. Searle, J., Kerr, J.F.R., Bishop, C.J. Necrosis and apoptosis ; distinct modes of cell death with fundamentally different significance. 1982. *Pathol. Ann.* 17:229-259.
 40. Wyllie, A.H., Morris, R.G., Smith, A.L., Dunlop, D. Chromatin cleavage in apoptosis ; association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. 1984. *J.Pathol.* 142: 67-77.
 41. Cho, Y. S., Park, S.G. Changes in major taste components and

- microflora in mustard leaf Kimchi during fermentation. 1988. *In Bull etin of Korea Food Culture Center 2*: 183-208.
42. Park, S.S., Jang, M.S., Lee, H.H. Effect of fermentation temperature on the physicochemical properies of mustard leaf (*Brassica juncea*) kimchi during various storage days. 1995. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24:752-757.
43. Sharma, S., Stutzman, J.D., Kelloff, G.J., Steele, V.E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. 1994. *Cancer Res.* 54: 5848-5855.
44. 김정옥, 김무남, 박건영, 문숙희, 하영래, 이숙희. 갓으로부터 분리, 동정된 4-decanol의 향돌연변이 효과. 1993. *한국농화학회지.* 36(6): 424-427.

부 록

참고자료 목차

1. 논문 및 발표 업적총괄

- 1) 저서
- 2) 국내외 학술논문
- 3) 국내외 학술발표

2. 연구결과 홍보

- 1) 심포지움발표, 특강, 신문기사 등
- 2) 돌산갯김치축제에서 연구결과 홍보관 운영

3. 활용실적 및 계획

- 1) 활용실적
- 2) 활용계획

1. 논문 및 발표 업적 총괄

1) 저서

(1) 참고자료 1-1-1

- 최명락 외 공저, 김치산업의 현황과 발전방향, 도서출판 큰세상. ISBN 89-953864-2-3(2004.10.20)

(2) 참고자료 1-1-2

- Myeong Rak choi 외 공저, Applications of Kimchi Lactic Acid Bacteria, RIS Gwangju-Jeonnam Kimchi Industry Promotion Unit. 구덕 인쇄출판사, ISBN 89-878-9-45-5 93570(2005.11.25)

(3) 참고자료 1-1-3

- 최명락 외 공저, 김치의 효능, 도서출판 푸른세상, ISBN 89-87987-81-7(2006. 6. 1)

(4) 참고자료 1-1-4

- 최명락 외 공저, 김치의 효능, 어디에 좋은가?, 도서출판 푸른 세상, ISBN 89-87987-82-5(2006. 6. 1)

2) 국제 학술논문(SCIE급 2편)

(1) 참고자료 1-2-1

- Eun Jeong Yoo, Myeong Rak Choi and Hyun Soo Lim. The relationship between ACE Inhibitory Activity and Degradations of Sulfur Containing Materials in Dolsan Leaf Mustard Juice. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 9(5), 400-404(2004)

(2) 참고자료 1-2-2

- Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, Kyung Ok Park and Myeong Rak Choi. Cytotoxic, Antioxidative and ACE Inhibiting Activities of Dolsan Leaf Mustard Juice(DLMJ) Treated with Lactic Acid Bacteria. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 10(1), 60-66(2005)

3) 국내외 학술발표(6회)

(1) 참고자료 1-3-1

- Myeong Rak Choi, Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Naoyuki Nishizawa, Physiological activity changes of Dolsan leaf mustard juice treated with various enzyme and microbes, 일본 농예화학회 2004년도 학술대회3A15p07, 199(일본 히로시마대학, 2004. 3. 30)

(2) 참고자료 1-3-2

- Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Myeong Rak Choi, Effect of anticancer activity by lactic acid bacteria isolated from Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK), 전주 국제발효식품 심포지움 p2, 143(전북대학교, 2004.10.23)

(3) 참고자료 1-3-3

Jin Sun Uh, Eun Jeong Yoo, Kyung Ok Park, Hyun Soo Lim, and Myeong Rak Choi, Natural foodstuffs effect of Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK), 전주 국제발효식품 심포지움 p12, 147(전북대학교, 2004.10.23)

(4) 참고자료 1-3-4

- Myeong Rak Choi, Kyung Ok Park, Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Naoyuki Nishizawa, Anticancer effects of Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK) by adding lactic acid bacteria, 일본 농예화학회

2005년도 학술대회 29E178 β , 116(일본 삿포르컨벤션센터, 2005. 3. 29)

(5) 참고자료 1-3-5

- Kyung Ok Park, Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Myeong Rak Choi, Phylogenetic analysis of predominant lactic acid bacteria in Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK), 일본 농예화학회 2005년도 학술대회 29E180 β , 116(일본 삿포르컨벤션센터, 2005. 3. 29)

(6) 참고자료 1-3-6

- Myeong Rak Choi, Eun Jeong Yoo, and Hyun Soo Lim, The cytotoxic, antioxidative, and antihypertensive activities of Dolsan leaf mustard and its Kimchi, 2005 International Symposium and Annual Meeting of the Korean Society of Food Science and Nutrition, (용평리조트, 강원도, 2005. 10.19-21)

2. 연구결과 홍보

1) 심포지움발표, 특강, 신문기사 등

(1) 참고자료 2-1-1

- Myeong Rak Choi, Eun Jeong Yoo and Hyun Soo Lim, Dolsan leaf mustard Kimchi and its physiological activity, Korea-Japan Symposium on Functional Foods(Namdo Food Culture Society, Yosu National University, Korea, 2003. 10. 24)

(2) 참고자료 2-1-2

- 돌산갓김치의 건강기능성(연구개발 결과 발표 및 일본 시장개척을 위한 홍보), 일본 이와테대학 농업생명과학과 세미나실(2004. 12. 8.), 참석자 : 학과 교수 및 학생, 식품유통업체 벨마트 절임식품담당자 등

(3) 참고자료 2-1-3

- 돌산갓김치의 과학화 및 세계화, 경상대학교 최고 농업경영자과정 강의 (경상대학교 농업생명과학관 3층 강의실, 2006. 4. 21)

(4) 참고자료 2-1-4

- 2006년 김치심포지움, 김치효능 어디에 좋은가?, 산업자원부 지정 RIS 김치사업단 순천대학교 지원센터(순천대학교 70주년 기념관, 2006. 6. 1)

(5) 참고자료 2-1-5

- 식음료신문(2006. 6. 9)

2) 돌산갓김치 축제에서 연구결과 홍보관 운영

(1) 참고자료 2-2-1

- 제1회 여수돌산갓김치축제(여수시 진남체육관, 2004. 11. 19-21)
연구결과 홍보관 운영, 갓김치 및 응용식품 시식회

(2) 참고자료 2-2-2

- 제2회 여수돌산갓김치축제(여수시 돌산읍 무슬목, 2005. 11. 11-13)
연구결과 홍보관 운영, 갓김치 및 응용식품 시식회

(3) 참고자료 2-2-3

- 돌산갓김치 홍보관의 홍보영상물 제작지원

3. 활용 실적 및 계획

1) 활용실적

(1) 참고자료 3-1

-돌산갓영농조합에 기술이전 및 마케팅 지원(우리 홈쇼핑에 5회 판매로 2억5천만원의 판매고 증가를 달성했음)

이는 본 사업과 관련하여 축적된 연구개발 결과로 산업자원부에서 지원하는 RIS 광주·전남 김치산업육성사업단(전남대학교 여수지원센터장 : 본 사업의 총괄책임자 최명락 교수)에서 기업지원을 적극적으로 할 수 있었음.

(2) 참고자료 3-2

-돌산갓 연구회 결성을 통한 산관학연 Network 활성화

2) 활용계획

농림과제 개발사업을 수행 중에 형성된 돌산갓 김치 산관학연 협의회를 통하여 대학에서는 개발된 결과를 중소기업에 기술이전하고, 지자체에서는 관련 조례를 제정하거나 지원을 하고, 농업기술지원센터에서는 돌산갓 품종을 개량하고 연작 장애에 의한 피해를 최소화하기 위한 기술 지도를 실시한다. 구체적인 실시 방법은 다음과 같다.

- 타 사업과의 연계 : 산업자원부에서 지원하는 RIS 광주·전남 김치산업육성사업단의 김치육성시범사업은 기업지원이 주 목적이므로, 농림기술개발과제에서 얻어진 결과를 3차년도 사업에 적극 반영하여 계속 지원한다.

- 기업닥터제 실시 : 총괄책임자 및 세부책임자에 의한 기업닥터제를 실시할 예정이며, 다양한 상품의 개발과 지속적인 기술지도가 이루어 질 수 있도록 연구할 것임.

- 갓, 갓김치를 활용한 다양한 응용식품 개발

지역의 업체인 원푸드시스템(주)과 함께 돌산갓김치 고등어조림, 돌산갓김치 해물스테이크 등 수산물에 돌산갓김치의 기능을 이용한 응용식품을 개발하고 있는 중이고, 명진식품(주)과 함께 돌산갓 색소를 이용한 날치알 가공식품 개발을 농림과제 종료 후에도 지속적으로 할 것임.

- 돌산갓을 이용한 관광상품 개발

갓을 이용하여 갓비누, 갓탕 등 2012년 해양박람회를 목표로 한 관광 상품 개발을 하고 있음.

- 연구과제 수행을 통하여 형성된 산관학연 협의체 즉, 여수시 농업축산과, 원예특작계와 유통계, 친환경농업계, 여수시 농업기술센터, 돌산갓영농조합, 그리고 전남대학교(여수) 돌산갓 연구팀과의 네트워킹을 활용하여 정책과 연구, 산업화에 주력할 계획이다.

- 돌산갓김치 명품화를 위한 노력

- 돌산갓 산관학연 협의회 운영 활성화
- 여수 돌산갓 연구회 운영 활성화
- 전통 돌산갓김치 육성 및 특산단지 운영조례제정
- 지리적 표시제 등록을 통한 브랜드 가치의 상승
- 돌산갓 김치 연구소 설립

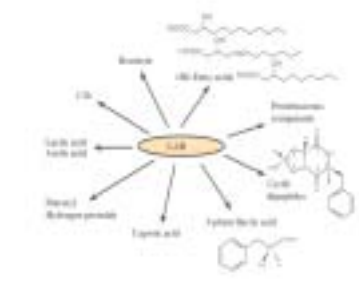
(2) 참고자료 1-1-2

-Myeong Rak Choi 외 공저, Applications of Kimchi Lactic Acid Bacteria, RIS Gwangju-Jeonnam Kimchi Industry Promotion Unit, ISBN 89-878-9-45-5 93570 (2005.11.25)



Contents

- 1. Transformation of Lactobacillus reuteri DSMZ 2971, a Strain Isolated from Kimchi
 - Jeong-Hyun Kim 1 - 20
- 2. Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria from Kimchi and its Application
 - Hee-Gwon Chang 21 - 31
- 3. Screening and Identification of Kimchi LAB Producing Functional Substances
 - In-Chul Kim 32 - 34
- 4. The Cytotoxic, Antioxidative, and Antihypertensive Activities in Debon Leaf Mustard and its Kimchi
 - Myeong Rak Choi and Hyun-Soo Lim 35-39



Many new valuable compounds from LAB await to be discovered!



(3) 참고자료 1-1-3

-최명락 외 공저, 김치의 효능, 도서출판 푸른세상, ISBN 89-87987-81-7 (2006. 6. 1)



목차

제 1장 김치의 효능

1-1 김치의 효능

1-2 김치의 효능

1-3 김치의 효능

1-4 김치의 효능

1-5 김치의 효능

1-6 김치의 효능

1-7 김치의 효능

1-8 김치의 효능

1-9 김치의 효능

1-10 김치의 효능

1-11 김치의 효능

1-12 김치의 효능

1-13 김치의 효능

1-14 김치의 효능

1-15 김치의 효능

1-16 김치의 효능

1-17 김치의 효능

1-18 김치의 효능

1-19 김치의 효능

1-20 김치의 효능

1-21 김치의 효능

1-22 김치의 효능

1-23 김치의 효능

1-24 김치의 효능

1-25 김치의 효능

1-26 김치의 효능

1-27 김치의 효능

1-28 김치의 효능

1-29 김치의 효능

1-30 김치의 효능

1-31 김치의 효능

1-32 김치의 효능

1-33 김치의 효능

1-34 김치의 효능

1-35 김치의 효능

1-36 김치의 효능

1-37 김치의 효능

1-38 김치의 효능

1-39 김치의 효능

1-40 김치의 효능

1-41 김치의 효능

1-42 김치의 효능

1-43 김치의 효능

1-44 김치의 효능

1-45 김치의 효능

1-46 김치의 효능

1-47 김치의 효능

1-48 김치의 효능

1-49 김치의 효능

1-50 김치의 효능

1-51 김치의 효능

1-52 김치의 효능

1-53 김치의 효능

1-54 김치의 효능

1-55 김치의 효능

1-56 김치의 효능

1-57 김치의 효능

1-58 김치의 효능

1-59 김치의 효능

1-60 김치의 효능

1-61 김치의 효능

1-62 김치의 효능

1-63 김치의 효능

1-64 김치의 효능

1-65 김치의 효능

1-66 김치의 효능

1-67 김치의 효능

1-68 김치의 효능

1-69 김치의 효능

1-70 김치의 효능

1-71 김치의 효능

1-72 김치의 효능

1-73 김치의 효능

1-74 김치의 효능

1-75 김치의 효능

1-76 김치의 효능

1-77 김치의 효능

1-78 김치의 효능

1-79 김치의 효능

1-80 김치의 효능

1-81 김치의 효능

1-82 김치의 효능

1-83 김치의 효능

1-84 김치의 효능

1-85 김치의 효능

1-86 김치의 효능

1-87 김치의 효능

1-88 김치의 효능

1-89 김치의 효능

1-90 김치의 효능

1-91 김치의 효능

1-92 김치의 효능

1-93 김치의 효능

1-94 김치의 효능

1-95 김치의 효능

1-96 김치의 효능

1-97 김치의 효능

1-98 김치의 효능

1-99 김치의 효능

1-100 김치의 효능

제 6 장 김치 효능의 향상 및 향고형상 효능

6-1 김치 효능의 향상

6-2 김치 효능의 향상

6-3 김치 효능의 향상

6-4 김치 효능의 향상

6-5 김치 효능의 향상

6-6 김치 효능의 향상

6-7 김치 효능의 향상

6-8 김치 효능의 향상

6-9 김치 효능의 향상

6-10 김치 효능의 향상

6-11 김치 효능의 향상

6-12 김치 효능의 향상

6-13 김치 효능의 향상

6-14 김치 효능의 향상

6-15 김치 효능의 향상

6-16 김치 효능의 향상

6-17 김치 효능의 향상

6-18 김치 효능의 향상

6-19 김치 효능의 향상

6-20 김치 효능의 향상

6-21 김치 효능의 향상

6-22 김치 효능의 향상

6-23 김치 효능의 향상

6-24 김치 효능의 향상

6-25 김치 효능의 향상

6-26 김치 효능의 향상

6-27 김치 효능의 향상

6-28 김치 효능의 향상

6-29 김치 효능의 향상

6-30 김치 효능의 향상

6-31 김치 효능의 향상

6-32 김치 효능의 향상

6-33 김치 효능의 향상

6-34 김치 효능의 향상

6-35 김치 효능의 향상

6-36 김치 효능의 향상

6-37 김치 효능의 향상

6-38 김치 효능의 향상

6-39 김치 효능의 향상

6-40 김치 효능의 향상

6-41 김치 효능의 향상

6-42 김치 효능의 향상

6-43 김치 효능의 향상

6-44 김치 효능의 향상

6-45 김치 효능의 향상

6-46 김치 효능의 향상

6-47 김치 효능의 향상

6-48 김치 효능의 향상

6-49 김치 효능의 향상

6-50 김치 효능의 향상

6-51 김치 효능의 향상

6-52 김치 효능의 향상

6-53 김치 효능의 향상

6-54 김치 효능의 향상

6-55 김치 효능의 향상

6-56 김치 효능의 향상

6-57 김치 효능의 향상

6-58 김치 효능의 향상

6-59 김치 효능의 향상

6-60 김치 효능의 향상

6-61 김치 효능의 향상

6-62 김치 효능의 향상

6-63 김치 효능의 향상

6-64 김치 효능의 향상

6-65 김치 효능의 향상

6-66 김치 효능의 향상

6-67 김치 효능의 향상

6-68 김치 효능의 향상

6-69 김치 효능의 향상

6-70 김치 효능의 향상

6-71 김치 효능의 향상

6-72 김치 효능의 향상

6-73 김치 효능의 향상

6-74 김치 효능의 향상

6-75 김치 효능의 향상

6-76 김치 효능의 향상

6-77 김치 효능의 향상

6-78 김치 효능의 향상

6-79 김치 효능의 향상

6-80 김치 효능의 향상

6-81 김치 효능의 향상

6-82 김치 효능의 향상

6-83 김치 효능의 향상

6-84 김치 효능의 향상

6-85 김치 효능의 향상

6-86 김치 효능의 향상

6-87 김치 효능의 향상

6-88 김치 효능의 향상

6-89 김치 효능의 향상

6-90 김치 효능의 향상

6-91 김치 효능의 향상

6-92 김치 효능의 향상

6-93 김치 효능의 향상

6-94 김치 효능의 향상

6-95 김치 효능의 향상

6-96 김치 효능의 향상

6-97 김치 효능의 향상

6-98 김치 효능의 향상

6-99 김치 효능의 향상

6-100 김치 효능의 향상

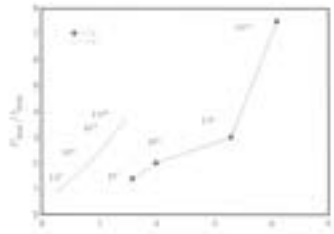


Fig. 7. Effect of kimchi on various parameters

(4) 참고자료 1-1-4

-최명락 외 공저, 김치효능, 어디에 좋은가?, 도서출판 푸른세상, ISBN 89-87987-82-5 (2006. 6. 1)



목차

장차	1
1장 김치 효능의 본질	11
1-1 김치 효능의 본질	11
1-2 김치 효능의 본질	11
2장 김치 효능의 본질	11
2-1 김치 효능의 본질	11
2-2 김치 효능의 본질	11
3장 김치 효능의 본질	11
3-1 김치 효능의 본질	11
3-2 김치 효능의 본질	11
4장 김치 효능의 본질	11
4-1 김치 효능의 본질	11
4-2 김치 효능의 본질	11
5장 김치 효능의 본질	11
5-1 김치 효능의 본질	11
5-2 김치 효능의 본질	11
6장 김치 효능의 본질	11
6-1 김치 효능의 본질	11
6-2 김치 효능의 본질	11
7장 김치 효능의 본질	11
7-1 김치 효능의 본질	11
7-2 김치 효능의 본질	11
8장 김치 효능의 본질	11
8-1 김치 효능의 본질	11
8-2 김치 효능의 본질	11
9장 김치 효능의 본질	11
9-1 김치 효능의 본질	11
9-2 김치 효능의 본질	11
10장 김치 효능의 본질	11
10-1 김치 효능의 본질	11
10-2 김치 효능의 본질	11

홍익대학교 출판부
홍익대학교 출판부
홍익대학교 출판부

홍익대학교 출판부
홍익대학교 출판부
홍익대학교 출판부

홍익대학교 출판부
홍익대학교 출판부
홍익대학교 출판부

2) 국제 학술논문 게재(SCIE급)

(1) 참고자료 1-2-1

-Eun Jeong Yoo, Myeong Rak Choi, and Hyun Soo Lim, The Relationship between ACE Inhibitory Activity and Degradations of Sulfur Containing Materials in Dolsan Leaf Mustard Juice, Biotechnology and Bioprocess Engineering, 9(5), 400-404(2004)

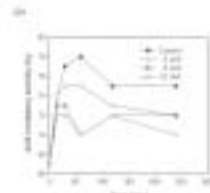


Fig. 1 Change of ACE Inhibitory activity in Dolsan mustard juice over time.

...with time (Table 1). The ACE-inhibitory activity of the juice increased rapidly in the first 10 min, and then gradually increased up to 30 min. After 30 min, the activity of the juice decreased slightly. These results suggest that sulfur-containing materials in Dolsan leaf mustard juice are degraded by the action of ACE. The degradation of sulfur-containing materials in Dolsan leaf mustard juice is related to the activity of ACE.

Acknowledgments—This research was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 30370041).

REFERENCES

1. G. G. G. (1991) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 110, 1-10.
 2. G. G. G. (1992) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 111, 1-10.
 3. G. G. G. (1993) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 112, 1-10.
 4. G. G. G. (1994) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 113, 1-10.
 5. G. G. G. (1995) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 114, 1-10.
 6. G. G. G. (1996) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 115, 1-10.
 7. G. G. G. (1997) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 116, 1-10.
 8. G. G. G. (1998) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 117, 1-10.
 9. G. G. G. (1999) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 118, 1-10.
 10. G. G. G. (2000) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 119, 1-10.

11. G. G. G. (2001) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 120, 1-10.
 12. G. G. G. (2002) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 121, 1-10.
 13. G. G. G. (2003) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 122, 1-10.
 14. G. G. G. (2004) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 123, 1-10.
 15. G. G. G. (2005) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 124, 1-10.
 16. G. G. G. (2006) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 125, 1-10.
 17. G. G. G. (2007) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 126, 1-10.
 18. G. G. G. (2008) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 127, 1-10.
 19. G. G. G. (2009) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 128, 1-10.
 20. G. G. G. (2010) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 129, 1-10.
 21. G. G. G. (2011) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 130, 1-10.
 22. G. G. G. (2012) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 131, 1-10.
 23. G. G. G. (2013) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 132, 1-10.
 24. G. G. G. (2014) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 133, 1-10.
 25. G. G. G. (2015) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 134, 1-10.
 26. G. G. G. (2016) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 135, 1-10.
 27. G. G. G. (2017) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 136, 1-10.
 28. G. G. G. (2018) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 137, 1-10.
 29. G. G. G. (2019) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 138, 1-10.
 30. G. G. G. (2020) Glutathione transferase (GSH transferase) in human liver. *Journal of Biochemistry*, 139, 1-10.

Received 04/11/2004, accepted September 10, 2004.

3) 국제 학술 발표

(1) 참고자료 1-3-1

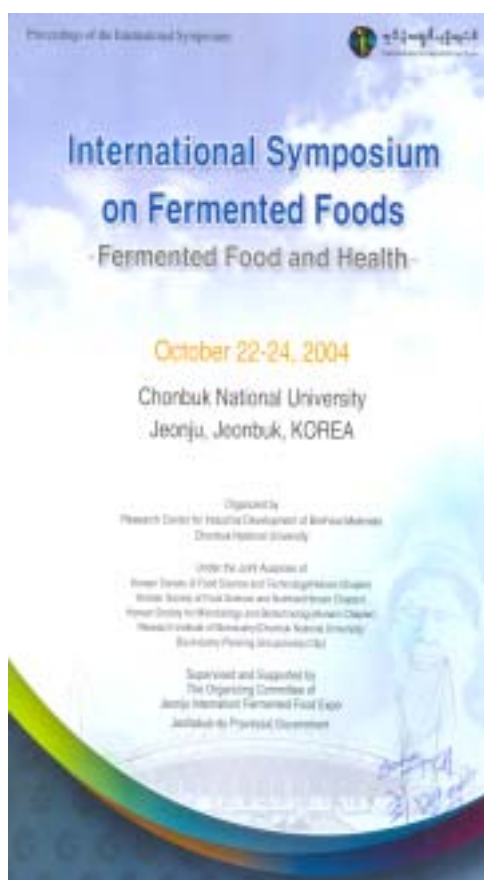
-Myeong Rak Choi, Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Naoyuki Nishizawa, Physiological activity changes of Dolsan leaf mustard juice treated with various enzyme and microbes, 일본농예화학회 2004년도 학술대회3A15p07, 199(일본 히로시마대학, 2004. 3. 30)



(2) 참고자료 1-3-2, 1-3-3

-Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Myeong Rak Choi, Effect of anticancer activity by lactic acid bacteria isolated from Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK), 전주 국제발효식품 심포지움 p2, 143(전북대학교, 2004.10.23)

-Jin Sun Uh, Eun Jeong Yoo, Kyung Ok Park, Hyun Soo Lim, and Kyung Ok Park, and Myeong Rak Choi, Natural foodstuffs effect of Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK), 전주 국제발효식품 심포지움 p12, 147(전북대학교, 2004.10.23)



P2

Effect of anticancer activity by lactic acid bacteria isolated from Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK)

Eunjeong Yoo, Hyunsoo Lim, and Myeongrak Choi
Dept. of Biotechnology, Yonsei National University, Yonsei, Korea

The bacterial strain was isolated from the 4th day's fermented Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK) at 25°C. It was inoculated to DLMK as starter, and anticancer activities of DLMK were investigated for 30 days at 4°C and 37°C. The maximal anticancer activity in the starter-inoculated DLMK(10⁷ CFU/ml) at 4 and 37°C were 81% and 50%, respectively. The cell concentration per day(10⁶ cell/ml) and anticancer activity per day(10⁶ cell/ml) had a linear relationship. Consequently, the anticancer activities of DLMK were significantly affected by the inoculative concentrations of starter. Accordingly, we isolated predominant strain from the 4th day's fermented DLMK at 25°C. The strain was preliminary classified as the genus of *Weizella* by Biolog system and phylogenetic analysis of 16S rDNA sequencing confirmed the strain as *Weizella kimchi* with similarity of 99%.

P12

Natural foodstuffs effects on DLMK fermentation

Jin-Sun Ŭh, Kyung-Ok Park, Eun-Jeong Yoo, Hyun-Soo Lim and Myeong-Rak* Choi
Dept. of Biotechnology, Yeosu National University Yeosu, Korea

The purposes of this study were investigated physiological activity and prolongation storage period in DLMK (Dolsan leaf mustard Kimchi), by adding natural foodstuffs, skate meat and stock, oligochitosan, hwang-geum (*Scutellaria radix*) and citron. They were added to DLMK, 5, 10, and 0.2%, respectively. DLMK was fermented during 24 days at 20°C. The pH and acidity in 8th days DLMK were reached optimum ripening pH and acidity 4.2~4.5 and 0.6~0.8%, respectively. And the pH in DLMK by adding skate meat was slowly increased. Because it was created ammonia in DLMK. The total cell number were increased until 8th days, and after that, it was slowly decreased. The antioxidative activity was measured with DPPH method. DLMK and DLMK by adding citron were shown more higher antioxidative activities than others. Antioxidative activities of DLMK by adding natural foodstuffs were all above 50% until 24th days. Sensory evaluation was performed by use of scoring test. Taste, flavour and overall eating quality were excellent in 8th days DLMK. And color was excellent in 0th day DMLK. The score of DLMK by adding skate meat was lower than others. But the score of DLMK by adding skate stock was the highest. Consequently, DLMK by adding natural foodstuffs were improved in evaluate scores. And storage period of DLMK were prolonged by adding natural foodstuffs.

(3) 참고자료 1-3-4, 1-3-5

-Myeong Rak Choi, Kyung Ok Park, Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Naoyuki Nishizawa, Anticancer effects of Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK) by adding lactic acid bacteria, 일본농예화학회 2005년도 학술대회 29E178 β, 116(일본 삿보로컨벤션센터, 2005. 3. 29)

-Kyung Ok Park, Eun Jeong Yoo, Hyun Soo Lim, and Myeong Rak Choi, Phylogenetic analysis of predominant lactic acid bacteria in Dolsan leaf mustard Kimchi(DLMK), 일본농예화학회 2005년도 학술대회 29E180 β, 116(일본 삿보로컨벤션센터, 2005. 3. 29)



29E178β Anticancer effects of Dolsan leaf mustard kimchi (DLMK) by adding lactic acid bacteria.

Chunghwi CHOI, Naoyuki NISHIZAWA, Eun Jeong YOO, Hyun Soo LIM, Naoyuki NISHIZAWA (Toho University, Toho University)

The anticancer effects of DLMK by adding lactic acid bacteria against HCT-15H human gastric carcinoma cell (1 and Hs57 human breast carcinoma cell) were investigated. *Lim. amurensis* strains, *Lim. plantarum* and *Rec. faecalis* were isolated from previously stored DLMK. They were inoculated as leaf mustard kimchi starter (1 or 2%) to DLMK. DLMK were fractionated by various extracting solvents. The anticancer effects were tested by MTT assay. By adding various DLMK extracts, the anticancer effects against HCT-15H and Hs57 cancer cells were enhanced than that of control. This result assumed that the anticancer effects of DLMK were induced by metabolite produced lactic acid bacteria during fermentation.

29E180β Phylogenetic analysis of predominant lactic acid bacteria in Dolsan leaf mustard kimchi.

Chunghwi CHOI, Eun Jeong YOO, Hyun Soo LIM, Chunghwi CHOI (Toho University)

In order to identify the predominant lactic acid bacteria in Dolsan leaf mustard kimchi (DLMK), analysis of 16S rDNA sequence was performed.

DNA was isolated by lysozyme and acetone. Restriction endonuclease treatment of 3 μg DNA was done and electrophoresis was carried out. The forward primer was 5'-CTCCAGAGGAGGAGG-3', corresponding to position 19-26. The reverse primer was 5'-AGAGAGCTGCTGATGGA-3', corresponding to position 150-157. Part of the rDNA genes, comprising the nearly complete 16S rDNA, was amplified by PCR. Phylogenetic analysis of 16S rDNA was performed by using the GenBank database. The *Weissella kimchii* is the nearest phylogenetic relative of predominant strains in Dolsan leaf mustard kimchi with 95 rDNA similarity of 95.9%. The strain of *P. kimchii* (Dolsan) (predominant strain) was identified for a *P. kimchii* and the diameter was shorter 10.46-10.64 μm than *P. kimchii* (11-12 μm).

2. 연구결과 홍보 및 사업화

1) 심포지움발표, 특강, 신문기사 등

(1) 참고자료 2-1-1

-Myeong Rak Choi, Eun Jeong Yoo and Hyun Soo Lim, Dolsan leaf mustard Kimchi and its physiological activity, Korea-Japan Symposium on Functional Foods(Namdo Food Culture Society, Yosu National University, Korea, 2003. 10. 24)



(2) 참고자료 2-1-2

제 목 : 돌산갓김치의 건강기능성 및 일본 시장개척을 위한 홍보

장 소 : 일본 이와테대학 농업생명과학과 세미나실

일 시 : 2004. 12. 8

참석자 : 학과 교수 및 학생, 식품유통수퍼 벨마트 식품담당자 등



(4) 참고자료 2-1-4

-2006 김치심포지움, 김치효능 어디에 좋은가?, 산업자원부 지정 RIS 김치사업단 순천대학교 지원센터(순천대학교 70주년 기념관, 2006. 6. 1)



(5) 참고자료 2-1-5

-신문기사, 식음료신문(2006. 6. 9)



2) 돌산갓김치 축제 홍보관 운영

(1) 참고자료 2-2-1

- 제1회 여수돌산갓김치축제(여수시 진남체육관, 2004. 11. 19-21)
연구결과 홍보관 운영 및 갓김치 및 응용식품 시식회



(2) 참고자료 2-2-2

-제2회 여수돌산갓김치축제(여수시 돌산읍 무슬목, 2005. 11. 11-13)
연구결과 홍보관 운영 및 갓김치 및 응용식품 시식회



(3) 참고자료 2-2-3

-돌산갯김치 홍보관의 홍보영상물 제작지원(2004. 2. 5)

장소 : 여수시 돌산읍 죽포리 돌산갯영농조합 2층, 돌산갯 홍보관



3) 활용실적 및 계획

(1) 참고자료 3-1

-관련 기업 기술이전 및 생산설비 지원

본 사업과 관련하여 축적된 연구개발 결과로 산업자원부에서 지원하는 RIS 광주전남 김치산업육성사업단에서 기업지원 활성화함

상 단 : 유산균강화 돌산갓김치 기술이전

하 단 : 대량생산 시설지원, 지게차, 파렛트, 대형절임통

-마케팅 지원 : 우리홈쇼핑 판매 5회 실시, 2억 5천만원 판매량 증대(2005년, 전년대비 20% 증가)



(2) 참고자료 3-2

-돌산갯연구회 결성을 통한 산관학연 Network 활성화

2015년 여수세계박람회 공식개회식

2015. 12. 27(목)

여수돌산갯농업인연구회창립총회



여수돌산갯농업인연구회창립총회

우리시 특산농업인 경제대농업인의 생산역량기술(거장,가공,유통,가치) 제고를 위한 이론과 실용연구로 여수돌산갯의 영농특성을 통한 글로벌 경쟁력 증대하고 회원 상호간의 정보교류 및 친목을 도모하고자 함.

- 일시 : 2015. 12. 27(목) 10:00~14:30
- 장소 : 농업기술센터 4층
- 참석인원 및 대상 : 60명(연구회 가맹 희망농업인)
유연기술(농업특성조사,여수대학,농협,영농조합)
- 내 용
 - 연구회 정립 총회 제정일련
 - 연구회 운영을 위한 회의(인)당첨
 - 연구회 임직선출
 - 지난 20년간 추진된 돌산갯중간 개발 및 증식사업 보고



(3) 참고자료 3-3

- 일본 갓김치 시장현황



(동경, 타케야)



(센다이시, 다이에이)



(삿보로시, 다이마루)



(아사히가와시, 세이부)



(큐슈지방의 갓절임류)



(큐슈지방의 갓절임류)



주 의

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