

발간등록번호

11-1543000-000770-01

전통발효식품(무발효제)의 개선을 위한  
미생물첨가제 개발 및 보급시스템 구축

(Development of microbial additives for improvement of  
traditional fermented foods and establishment of supply  
system for microbial additives)

세계김치연구소

농림축산식품부

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “전통발효식품(무발효제)의 품질개선을 위한 미생물첨가제 개발 및 보급시스템 구축” 과제의 보고서로 제출합니다.

2015년 01월 26일

주관연구기관명 : 세계김치연구소

주관연구책임자 : 김 태 운

세부연구책임자 : 박 해 응

협동연구기관명 : 경기대학교

협동연구책임자 : 이 종 훈

연	구	원	:	이	종	희
연	구	원	:	최	학	종
연	구	원	:	장	자	영
연	구	원	:	김	현	주
연	구	원	:	오	영	준
연	구	원	:	박	선	영
연	구	원	:	김	유	진
연	구	원	:	박	성	희
연	구	원	:	김	재	환
연	구	원	:	이	상	일
연	구	원	:	강	미	란
연	구	원	:	곽	현	정
연	구	원	:	김	경	희
연	구	원	:	신	홍	철
연	구	원	:	이	만	복
연	구	원	:	윤	형	석
연	구	원	:	윤	다	혜
연	구	원	:	김	혜	림
연	구	원	:	정	광	식
연	구	원	:	한	설	화

# 요 약 문

## I. 제 목

전통발효식품의 개선을 위한 미생물 첨가제 개발 및 보급시스템 구축

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

다양한 자연미생물에 의하여 제조되는 김치의 발효 속도 조절 및 위생학적 안전성 향상을 위하여 품목별 특성에 맞는 맞춤형 미생물 첨가제를 개발하고 미생물 첨가제를 효율적으로 중소기업 규모 전통발효식품 제조업체에 공급하기 위한 맞춤형 미생물 첨가제의 보급 시스템 구축하고자 함

- 발효 속도 조절용 미생물 첨가제
  - 김치 : 품질유지기한 2배 연장 (현행 30일 → 60일로 2배 연장, 냉장조건)
  - 고염 젓갈 : 숙성기간 2배 단축 (1년 → 6개월로 2배 단축)
- 저염화 제품의 위생학적 안전성 향상을 위한 미생물 첨가제
  - 저염 김치 : 일반김치 대비 대장균군 50% 이상 저감화
  - 저염 양념젓갈 : 기존 제품 대비 위생지표 미생물 및 식중독균 50% 이상 저감화
- 미생물 첨가제 보급 시스템 구축
  - 중소기업 규모 전통발효식품 제조업체를 지원하기 위한 맞춤형 미생물(artificial microflora) 첨가제의 보급 시스템 기반구축

## III. 연구개발 내용 및 범위

- 전통발효식품(무발효제) 품질 개선을 위한 우수 미생물 자원 확보
  - 김치, 젓갈류로부터 발효 속도 조절 및 위생지표 미생물 제어 우수 미생물 확보
  - 발효 단계별 미생물 군집 분석을 통한 발효 기작 규명 및 품질 특성 변화 분석
- 전통 발효식품 제조용 맞춤형 복합 미생물 첨가제 개발
  - 미생물 첨가제 제조 및 우수 미생물 조합에 의한 최적 배합비 확립
- 개발 미생물 첨가제를 이용한 발효 속도 조절 기술개발
  - 미생물 첨가제를 이용한 김치의 품질유지기한 연장
  - 미생물 첨가제를 이용한 고염 젓갈 숙성 발효 기술 개발
- 개발 미생물 첨가제를 이용한 위생학적 안전성 향상 기술 개발
  - 미생물 첨가제를 이용한 저염 김치의 대장균군 제어 기술 개발
  - 미생물 첨가제를 이용한 저염 양념젓갈의 위생지표 미생물 및 식중독균 제어 기술 개발

- 개발 미생물 첨가제를 이용한 전통발효식품의 최적 발효공정 개발
  - 계절별 원·부재료 미생물 분포 조사 및 초기 균수 저감화 기술 개발
  - 미생물 첨가제 제형별 활성화 기술 및 첨가량, 첨가방법 개발
- 우수 미생물 및 미생물 첨가제의 효율적 관리 및 보급 시스템 구축
  - 관련 미생물의 수집, 보존 및 관리시스템 구축
  - 미생물 첨가제 제제화 기술 및 포장 기술 개발
  - 맞춤형 미생물 첨가제 제조를 위한 기본 매뉴얼 제작
  - 관련 미생물 첨가제의 보급시스템 개발 및 구축
  - 미생물 첨가제 사용 관리지침(안) 및 미생물 첨가제 품질 인증제도 마련 (제품효능 검증)

#### IV. 연구개발결과

##### 1. 김치의 품질 개선을 위한 우수 미생물 자원 확보

- 발효 후기단계의 김치에서 분리한 균주 중 배양액의 pH가 낮은 균주들인 *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei*을 김치 산패 지시균으로 선정하였음
- 이들 균주에 대한 생육억제능이 우수한 *Lactococcus lactis* WK11, *Lactobacillus brevis* WK12를 항균활성 우수 균주로 선발하였음

##### 2. 김치용 미생물 첨가제 개발

- *Lc. lactis*를 MRS broth에 배양한 후 원심분리하여 균체를 농축하고 균액과 동량의 2% alginate를 첨가하여 최종적으로 1% alginate 용액을 제조하였음. 이러한 유산균과 alginate 1% 혼합용액을 2.0 mm의 비드로 코팅하여 10% 콩가루 수용액과 함께 48시간 동안 동결건조 하여 미생물 첨가제를 제조하였음

##### 3. 미생물 첨가제를 이용한 김치 발효 속도 조절 기술개발

- *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액을 첨가하여 처리한 김치균은 대조군에 비해 적숙기가 2배 이상 연장되었음
- Bead 형태로 제조한 미생물첨가제도 생균을 배양하여 첨가했을 때와 유사한 효과를 나타내어 *Lc. lactis*를 제제화 하여 이를 김치에 적용하여도 대조군과 비교하여 품질유지기한이 연장된 김치를 제조할 수 있을 것으로 사료되었음
- 양념을 65°C에서 30분 열처리하거나 젖산을 첨가시 또는 병행할 경우, 연장 효과가 조금 향상 되었음

##### 4. 저염김치의 위생학적 안전성 향상 기술 개발

- 종균 첨가 김치의 대장균군 균수 변화를 살펴본 결과 담금 당일에는 대조군과 유사한 균수를 나타내었지만 김치 발효가 진행됨에 따라 종균을 첨가한 실험군에서 대조군보다 그 감소 속도가 빠른 것으로 나타났음

## 5. 개발 미생물 첨가제를 이용한 전통발효식품의 최적 발효공정 개발

- 시판용 소독수(차아염소산나트륨액 100ppm)와 저온살균 처리 후 원부재료의 미생물 균수 변화를 살펴본 결과 소독수의 경우 2분 이상 처리시 저감 효과가 있었으며 5분 처리시 초기 균수가 더욱 저감되었음. 양념의 경우 65°C에서 30분간 처리시 저감효과가 있는 것으로 나타났음
- 초기 종균 접종량을 *Lc. lactis*  $1 \times 10^3$  CFU/g,  $1 \times 10^5$  CFU/g,  $1 \times 10^7$  CFU/g으로 각각 달리하여 접종한 결과  $1 \times 10^7$  CFU/g으로 접종한 김치에서 품질유지기한 연장 효과가 있었음. 또한 종균 첨가시기에 따른 차이를 알아본 결과 추가적인 숙성과정 없이 김치를 담글 때 양념에 종균과 함께 배양액을 잘 섞어 김치를 제조하는 것이 효율적이었음

## 6. 젓갈발효의 우점종 도출

- 멸치젓갈의 우점종: 멸치젓갈로부터 분리한 315 균주의 동정 결과, *Virgibacillus halodenitrificans*를 포함하는 내염성 *Bacillus* 근연종이 우점하는 것으로 확인
- 새우젓갈의 우점종: 새우젓갈로부터 분리한 295 균주의 동정 결과, *Staphylococcus equorum*을 포함하는 coagulase-negative staphylococci가 우점하는 것으로 확인
- 오징어젓갈의 우점종: 오징어젓갈로부터 분리한 121 균주의 동정 결과, 내염성 *Bacillus* 속이 가장 우점하고, coagulase-negative staphylococci가 우점하는 것으로 밝혀짐

## 7. 식중독균(황색포도당구균, 장염비브리오균) 생육저해활성 보유 오징어젓갈용 종균 확보

- 6% NaCl 농도에서 황색포도당구균 및 장염비브리오균의 생육저해가 가능한 오징어젓갈 발효용 종균 후보 6균주 확보: *Bacillus pumilus* ANR7, *Bacillus pumilus* RM010, *Bacillus siamensis* RM502, *Bacillus tequilensis* AM5R3, *Bacillus tequilensis* MA504, *Bacillus tequilensis* MS503

## 8. 안전한 젓갈발효용 종균 도출

- 본 연구에서 우점종으로 도출된 *Staphylococcus equorum* 균주들의 안전성 평가 수행
  - 본 연구에서 확보한 185 *S. equorum* 균주 중, ampicillin 내성을 나타낸 균주를 제외한 126 균주를 대상으로 항생물질 내성 평가, 혈청분해(hemolysis) 확인, 혈청분해 관련 유전자 존재 확인, biofilm 형성 확인, enterotoxin 생성 유전자 존재 확인
  - 39 *S. equorum* 균주가 위해성이 없는 것으로 평가됨
- 안전성이 검증된 *S. equorum* 39 균주들을 대상으로 한 기능성 평가: biogenic amines 생성 평가, protease, lipase, nitrate reductase 활성 평가
- 안전성과 기능성이 확보된 젓갈발효용 종균 후보 *S. equorum* 5 균주 확보(C4X11, C6037, KS1035, KS1039, KS2036)

- 선발된 균주들은 20% 이상의 NaCl이 첨가된 배지에서 생장이 가능하여 젓갈용 종균으로서의 안전성과 기능성을 모두 확보한 것으로 평가됨

### 9. 젓갈발효용 종균의 첨가법 개발

- 새우를 이용한 종균 첨가용 배지를 개발하고 그 효용성을 확인
- 동결건조에 의한 종균의 사멸률 및 회복률을 확인하여 종균 보급법으로써의 적용성 확인

### 10. 젓갈용 미생물 첨가제의 효과 분석

- 135일간의 새우젓갈 숙성과정 중의 bacteria 군집 천이 분석을 통하여 종균 후보 균주 *S. equorum*이 숙성과정 중에서의 우점화를 규명하였기에 젓갈용 종균으로의 유효성을 검증함
- 확보한 종균 후보균주들이 25% NaCl이 첨가된 액체배지에서 사멸하지 않고 증식함을 확인하여 젓갈 발효용 종균으로써의 효용성 규명
- 젓갈 유래 bacteria 분석용 최적 배지 도출: 기존의 연구에서 사용된 실험실용 배지대비 marine agar의 유용성 규명

### 11. 식품첨가용 미생물의 안전성 평가법의 확립

- 유산균과 같은 식품용 미생물은 최근까지 안전성에 대한 의문 없이 기능성에 근거하여 식품용으로 사용되었으나, 최근에 식품용 미생물에 대한 위해성이 제기되면서 안전성 평가의 필요성이 증가하고 있음
- 본 연구과제에서의 *S. equorum* 균주의 안전성 및 기능성 평가 결과, 이들 균주의 안전성 및 기능성 관련 특성이 균주 특이적으로 나타남을 확인하였기에 식품용 미생물에 대한 안전성 평가의 필요성이 확인되었음. 본 연구에서 확립된 안전성 평가 기준은 향후 식품용 미생물의 안전성 평가에 필요한 기초자료로 활용될 수 있음

### 12. 미생물 첨가제 제제화를 위한 배지 조성 개발

- 절임배추 착즙액을 기본배지 성분으로 활용하여 탄소원, 질소원, 미량성분을 조절
- Box-Behnken experimental design을 통하여 질소원들을 스크리닝하여 반응표면실험법을 실시함
- 미량성분들의 결핍이 유산균의 성장에 미치는 정도를 측정하여 필수 성분을 선발
- 질소원으로는 peptone 4%(w/v)첨가를 최적 배합으로 결정함

### 13. 미생물 첨가제의 제제기술 개발

- 김치 미생물 생존율이 보장된 단기형(액상형, 냉동형) 및 장기형(건조형) 제제기술 개발
- 미생물 첨가제 제형별 저장기간에 따른 생존율 검정

### 14. 미생물활성 및 생존율향상을 위한 보호제 선정

- 식품첨가등급의 소재를 사용하여 첨가제의 생존율을 높일 수 있는 동결보호제 선발함
- *Weissella cibaria* SW1-1, *Lactobacillus plantarum* A-1, *Lb. sakei* 2-12 24, *Leuconostoc citreum* 3526 균주를 soy powder를 사용한 처리구에서 생존율을 조사한 결과 90%이상의 생존율 나타내어 본 연구의 동결보호제로 선정함
- 동결보호제로 10% soy powder를 사용 시, *Lb. brevis* A101 균주의 경우 92.7% *Lc. lactis* CHJ10 균주의 경우 94.7%의 높은 생존율을 나타냄

### 15. 미생물 첨가제 대량 배양기술 개발

- 식품첨가 등급의 주요 영양원 탐색\_실험균주의 균체량 생성에 유리한 주요 영양원으로 포도당 및 효모추출물 선정\_MRS 배지 대비 경제성 확보
- 배양 중 산도와 미생물 생육특성에 관한 상관관계 구명

### 16. 모의 유통조건을 통한 미생물 첨가제 활성 유지조건 확립

- 유통조건에 따른 활성변화 분석
- 유산균 제제를 -20℃에서 28일 보관한 경우의 생존율이 가장 우수함
- 실온에서 유산균 제제를 보관할 경우 생존율은 급격히 감소하여 0~19.1%의 생존율을 나타냄
- 알지네이트 1%를 사용한 비드와 동결보호제로써 10% soy powder의 혼합은 저장기간 중 생존율을 향상시키는 것을 확인함

### 17. 온라인과 오프라인을 통한 보급 시스템 기반 구축(안) 및 사용 매뉴얼(안) 작성

- 미생물 첨가제 보급시스템 기반 구축 및 사용 매뉴얼 작성

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

### ○ 논문 게재 : 5 건

- 고염에서 성장하는 젓갈 유래 Bacteria의 분리 및 고염에서의 생육 특성, 한국미생물생명공학회지, 39(3) (2011)
- *Lactobacillus sakei* 생육저해활성 보유 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 Bacteriocin의 특성, 한국미생물생명공학회지, 39(4) (2011)
- 오징어젓갈 Bacteria 군집분석 및 식중독균 생육저해 *Bacillus* 균주 선발, 한국미생물생명공학회지, 41(4) (2013)
- 김치의 저장성 향상을 위한 항균활성 우수 유산균 선발, 한국식품영양과학회지, 43(2) (2014)
- 유산균 생존을 향상을 위한 식품첨가물 등급의 동결보호제 탐색. 한국식품과학회지, 46(5) (2014)

### ○ 논문 게재 예정 : 2 건

- Extending the shelf life of kimchi with *Lactococcus lactis* strain as a starter culture. *Food Sci. Biotechnol.* (2015)
- Starter cultures for kimchi fermentation, *J. Microbiol. Biotechnol.* (2015)

### ○ 학술발표 : 14건

- Isolation of antibacterial and mannitol producing lactic acid bacteria from kimchi, 한국미생물생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회, 2012.06.27.
- Selection of lactic acid bacteria with antibacterial activity for the extension of kimchi shelf-life, 한국식품과학회 정기학술대회, 2013.08.28.
- Distribution of the lactic acid bacteria in kimchi according to different isolation temperature using 16S rRNA gene sequencing analysis, 2013 International Meeting of FKMS, 2013.07.16
- Effect of the Rigidity and Size of Alginate Beads on Survival of Freeze-dried *Pediococcus pentosaceus*. 한국생물공학회 국제학술대회(2013. 10. 16-18)
- Screening of Cryoprotectants to Increase Survivability of Lactic Acid Bacteria during Freeze Drying Process. 한국식품과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회(2013. 8. 28-30)
- Effect of the Rigidity and Size of Alginate Beads on Survival of Freeze-dried *Lactobacillus plantarum*. 한국미생물·생명공학회 국제학술대회(2013. 7. 3-5)
- Improved Freeze-protecting Effect of Alginate Encapsulation on Survival Rate of

*Wissella kimchii* during Freeze Drying. 한국미생물·생명공학회 국제학술대회(2013. 7. 3-5)

- Effect of the Rigidity and Size of Alginate Beads on viability of freeze-dried Lactic acid bacteria during storage. 한국미생물·생명공학회 국제학술대회(2014. 6. 25-27)
- Synergistic Effect of Alginate and Soy Powder on the Viability of Lactic Acid Bacteria after Freeze-Drying. 한국식품과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회(2014. 8. 25-27)
- Selection of Acid-tolerant Kimchi Starter Candidates and the Characteristic of their anti-bacterial Substances. 2012 한국식품과학회 학술대회
- Bacterial Community Migration during the Ripening of *Saeu-jeotgal*, a Traditional Korean High-Salt-Fermented Seafood. 2012년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회
- Effects of the Acid-tolerant and *Lactobacillus sakei*-inhibiting Starter Candidates on Kimchi Fermentation. 2012년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회
- Antibiotic Susceptibility of Coagulase-negative Staphylococci Isolated from Korean High-salt-fermented Seafood, *Jeotgal*. 2013년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회
- Genetic Diversity of *Staphylococcus equorum* Isolates from *Saeu-jeotgal* Evaluated by Multilocus Sequence Typing. 2013년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회

○ 특허 출원 : 5건

- 마늘 파쇄물 및 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드를 포함하는, 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법(출원번호: 10-2013-0087969)
- 동결보호제로서 찹쌀풀을 이용하는 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법 (출원번호: 10-2013-0087981)
- 동결보호제로서 콩가루를 이용하는 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법 (출원번호: 10-2013-0087978)
- 폐절임배추를 이용한 미생물 배양용 식용 배지의 생산 방법(출원번호: 10-2013-0087974)
- 내염성 및 단백질 분해 활성을 갖는 균주 및 이의 용도 (출원번호: 10-2014-0143924)

○ 유전자원 등록 : 10건 (김치유산균 16S rDNA 염기서열 10건 등록)

- *Pediococcus pentosaceus* strain A-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GeneBank accession No. JX397933)
- *Pediococcus pentosaceus* strain A-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GeneBank accession No. JX397934)
- *Pediococcus inopinatus* strain 4-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (GeneBank accession No. JX397935)
- *Pediococcus inopinatus* strain 4-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

(GeneBank accession No. JX397936)

- *Pediococcus inopinatus* strain 4-33 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
(GeneBank accession No. JX397937)
- *Lactobacillus sakei* strain Wikim SH003 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
(GeneBank accession No. JX402124)
- *Weissella* sp. Wikim SH004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
(GeneBank accession No. JX402125)
- *Weissella* sp. Wikim SH005 16S ribosomal RNA gene, partial sequence  
(GeneBank accession No. JX402126)
- *Leuconostoc mesenteroides* strain Wikim SH006 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence (GeneBank accession No. JX402127)
- *Leuconostoc mesenteroides* strain Wikim SH007 16S ribosomal RNA gene, partial  
sequence (GeneBank accession No. JX402128)

○ 성과활용 계획

- 김치용 미생물 첨가제를 제품화하고 기술이전 실시
- 김치 종균에 대한 이해 및 특성 관련 교육 실시
- 미생물 첨가제 보급 시스템 구축으로 미생물 첨가제 산업의 활성화 및 우수 군주의  
경제적 활용성 증대
- 맞춤형 미생물 첨가제를 중소 규모의 전통발효식품 산업체에 제공함으로써 전통발효  
식품 산업 활성화에 기여하도록 추진함
- 도출된 연구 결과를 바탕으로 논문 투고 및 특허 출원 계획

# SUMMARY

## I. Title

Development of microbial additives for improvement of traditional fermented foods and establishment of supply system for microbial additives

## II. Objectives and Significance of Research

The development of microbial additives for fermented food(kimchi and *jeot-gal*) to control fermentation rate and to improve hygienic safety and establishment of supply system to effectively distribute microbial additives for small and medium-sized manufacturer of traditional fermented foods.

## III. Scope and Contents of Research

- Collecting the excellent microorganism resources for improving quality of traditional fermented foods (without fermenting agents)
- Collecting the excellent microorganism resources for control the fermentation rate and hygiene indicator microorganisms from kimchi and salt-fermented fishery products
- Analysis of the characteristic changes through microbial community analysis during fermentation
- The development of microbial additives for traditional fermented food
- Establishment of optimal ratio by microorganism combination
- Control of the fermentation rate using microbial additives
- Extending shelf life of kimchi using microbial additives
- Development of the rapid fermentation conditions of high-salted fermentation fishery products using microbial additives
- Improvement of the hygienic safety using microbial additives
- Control of the coliform bacteria in low-salted kimchi using microbial additives
- Control of the hygiene indicator microorganisms(such as food poisoning bacteria) from low-salt fermented fishery products using microbial additives

- Development of optimum fermentation process for traditional fermented foods using microbial additives
- Investigation into microbiological distribution of seasonal raw material and develop initial microbial reduction technology
- Development of the activation technology and amount of microbial additives to be added
- Establishment of the management and supply system with for microbial additives
- Collecting related microorganisms, building conservation and management system
- Development of the microbial additive formulation and packaging technology
- Basic manuals for customized microbial additives
- Development of the supply system of microbial additives
- Providing 'management guidelines (draft)' for microbial additives

#### **IV. Results of Research**

##### **1. Secure the microorganism resources for improving quality of kimchi**

- Among the isolates from kimchi, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus sakei* are selected as indicator bacteria in sour kimchi, which are lower the pH of culture medium
- *Lactococcus lactis* WK11, *Lactobacillus brevis* WK12 are selected, which exhibits inhibitory activity against the bacteria associated with acidification of kimchi

##### **2. The development of microbial additives for kimch**

- *Lc. lactis* cultured in MRS broth were mixed with an equal volume of 2% alginate solution, the final concentrations were 1% alginate. This lactic acid bacteria and alginate 1% mixed solution was coated with 0.2 mm beads, soaked with 10% bean flour and lyophilized to 48 hours

##### **3. Control of the fermentation rate using microbial additives**

- Kimchi treated with *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g and 10% *Lc. lactis* culture medium(% of kimchi) prolonged optimal fermentation period (pH 4.2, acidity 0.6 - 0.8%) up to more than 2 times
- Microbial additives prepared in the form of beads, exhibited a similar effect to that of the addition of viable cells, may facilitate the formulated manufacture of kimchi with a longer shelf life

- Heat treated at 65°C–30 minutes with kimchi sauce or addition of lactic acid, have a slightly effect on extending shelf life

#### 4. Improvement of hygienic safety for low-salted kimchi

- The initial counts of coliform bacteria in non-starter kimchi and starter kimchi were showed similar counts. However, depending on the fermentation progresses, it declined rapidly in starter kimchi due to the inoculated starter bacteria

#### 5. The development of optimal fermentation processes for traditional fermented food using microbial additives

- Considering commercial antiseptic solution (100 ppm sodium hypochlorite solution) and the case of pasteurized result, antiseptic solution has microbial reduction effect more than 2 minutes treatment and 5 minutes treatment was better. In case of pasteurization condition of kimchi sauce, at 65°C for 30 minutes showed microbial reduction effect
- The initial number of *Lc. lactis* inoculated differently,  $1 \times 10^3$  CFU/g,  $1 \times 10^5$  CFU/g,  $1 \times 10^7$  CFU/g each, the kimchi adapted  $1 \times 10^7$  CFU/g as initial inoculum level prolonged shelf life. Further, improve efficiency with inoculation method, mixed gently with culture medium, starter and kimchi sauce without additional aging periods at process for preparing kimchi

#### 6. Identification of the dominant bacteria in *jeotgal* fermentation

- Jeotgal or jeot, a traditional Korean salted and fermented food, is made by adding 20 - 30% (w/w) salt to various types of seafood. To develop a more complete overview of the bacterial community present in jeotgal, 610 pure colonies were isolated from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal*, the most commonly consumed varieties of jeotgal, which are made with anchovy (*Engraulis japonicas*) and tiny shrimp (*Acetes japonicas*), respectively. The bacterial isolates were identified by 16S rDNA sequence analysis. A total of 104 species comprising 47 genera and 31 previously unknown species were identified. Eleven genera were isolated from both jeotgal samples, including species in the genera *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Halomonas*, and *Kocuria*, with *Staphylococcus* spp. constituting the highest number. The most populous genus detected in *Myeolchi-jeotgal* was *Bacillus* and its relatives, while the most populous in *Saeu-jeotgal* was *Staphylococcus* mainly identified as *S. equorum*. They may be the major organisms involved in jeotgal fermentation and the future starter candidates.
- The bacterial community present in *Ojingeo-jeotgal*, which is made with squid. One hundred twenty one bacteria were isolated and identified by 16S rRNA gene sequence analysis. Among the 121 total isolates, the most populous genus was *Bacillus* and then

followed by coagulase-negative staphylococci.

#### **7. Selection of the starter candidates for *Ojingeo-jeotgal* fermentation which inhibit the growths of *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus***

- Six strains of *Bacillus* species inhibiting the growth of food pathogens, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*, were selected from the 121 isolates from *Ojingeo-jeotgal*. They inhibited the growths of both pathogens and showed proteolytic activities on the media containing 6% NaCl and 2% skim milk.

#### **8. Selection of the safe starter candidates for jeotgal fermentation**

- To select starters for jeotgal, the safety and technological properties of its predominant bacteria isolates, which were identified as *Staphylococcus equorum*, were assessed. As the result of safety assessments of *S. equorum* (antibiotic susceptibility test, hemolysis gene identification, biofilm formation test, and enterotoxin gene identification), 39 *S. equorum* strains cleared all of the tested safety hazards and were adopted for technological property assessments.
- Among the 39 strains, five strains (C4X11, C6037, KS1035, KS1039, KS2036) exhibited protease, lipase, nitrate reductase activities and they did not produce four kinds of biogenic amines.
- Most of the strains could grow on the agar with 20% NaCl, therefore the selected five strains covers the safety and technological requirements for jeotgal starters.

#### **9. Development of starter culture application methods**

- Development of food-grade medium made with shrimp for the culture of starters
- Evaluation of freeze-drying efficiency for the long-term storage of starter candidates

#### **10. Evaluation of starter culture effectiveness in jeotgal fermentation**

- Culturable bacterial community analysis of *Saeu-jeotgal* was performed during ripening for 135 days to prove that a wild-type strain can be used to accelerate and standardize jeotgal. Thirty nine species detected at the day 1 were decreased to 13 species at day 135. The order of dominance in genus level is *Staphylococcus*, *Salimicrobium*, *Kocuria*, and *Psychrobacter*. The proportions of *Staphylococcus* and *Salimicrobium* began 2% and then became 39% and 36% of all isolates at the day 135, respectively. Both strains may be the dominant of *Saeu-jeotgal* and were shown to grow at 24% salt condition. We confirmed the effectiveness of *Staphylococcus* species for *Saeu-jeotgal* fermentation.
- Proteolytic bacteria were isolated from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal* using high-salt-content media and their growths in high-salt-content media were checked to

draw the role of bacteria during the ripening of jeotgal. Among the isolates, *Virgibacillus halodenitrificans* from *Myeolchi-jeotgal* and *Halobacillus trueperi* from *Saeu-jeotgal* showed proteinase activities. *Vb. halodenitrificans* and *Staphylococcus equorum*, the dominant species from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal*, showed growths at the nutrient broth containing 25% NaCl. They may play a significant role in the ripening of jeotgal and have a high possibility to be used as the starter.

#### **11. Establishment of microbial safety assessment system**

- Through this research study, we reconfirmed the necessity of characterization in the functionality and safety of *S. equorum* for starter development because all of the tested phenotypic characteristics were expressed in strain-specific manners. The methods applied for the safety assessments of *S. equorum* will be a good example for the safety assessment of starter candidates.

#### **12. Development of Medium composition for microbial additive formulation**

- Pickled cabbage juice solution by utilizing basic medium components, carbon source and nitrogen source, adjust the trace elements
- Box-behken experimental design and screening of nitrogen through the reaction surface conducted experiments
- Nitrogen sources include peptone 4%(w/v) was added to determine the best formulation

#### **13. Formulation Development of microbiological additives**

- LAB starter can be liquid form, frozen form and powder form, liquid form is difficult to keep it and to maintain quality in the process of distribution but powder form is easy. Consequently in this study, in order to develop a formulation of the LAB starter,
- LAB starter(liquid form, freezed form, powder form) was evaluated during storage period

#### **14. Screening of cryoprotectants to increase survivability of lactic acid bacteria**

- Improvement of ciability of freeze-dried lactic acid bacteria using good-grade protective agents
- The viability of freeze-dried lactic acid bacteria (LAB), including *Weissella cibaria* SW1-1, *Lactobacillus plantarum* A-1, *Lb. sakei* 2-12 24 and *Leuconostoc citreum* 3526 was evaluated with food grade protective agents (e. g., skim milk, yeast extract, soy powder and trehalose)
- Soy powder showed a strong protective effect upon the viability of both LAB species, followed by skim milk and yeast extract.

- The viability of LAB species was not dose-dependent with soy powder, showing the highest rate of 92.7% for *Lb. brevis* A101 and 94.7% for *Lc. lactis* CHJ10 when 10% soy solution was used as a protective agent.
- Soy powder was best among protective agents, showing approximately 90%

#### **15. Development of microbial additive mass culture technology**

- Improvement of viability of freeze-dried lactic acid bacteria using food-grade protective agents
- Correlation on pH and microbial growth characteristics of the culture
- Glucose and yeast extract medium contrast selected \_MRS broth MRS medium compared to ensure afford ability

#### **16. Survivability of powder type starter during storage period**

- According to the study, in case of Keeping the lactobacillus in -20°C for 28 days, the survival rate was best. Results suggest the possibility of producing freeze dried powders of LAB starter with high viability for the food industry
- During storage of freeze-dried lactic acid bacteria, those survival rate decrease rapidly, reaching 0~19.1% in room temperature.
- There was synergetic effect of soy powder to improve viability of LAB when Ca-alginate beads were soaked in 10% of soy powder solution before freeze-drying. No significant -rate was observed for both LAB
- The highest survival rate was observed with 1% alginate solution, 10% soy powder solution showing 95.1%, 96.6% of survival rate right after freeze drying

#### **17. Distribution system construction and supply management manual written by the online and offline**

# CONTENTS

<b>Chapter 1. Outlines of the Research</b> .....	<b>18</b>
Section 1. Objective of the Research .....	18
Section 2. Significance of the Research .....	18
Section 3. Scope of the Research .....	23
<b>Chapter 2. Current Status of Technical Development</b> .....	<b>24</b>
Section 1. Domestic trends in the Research Fields .....	24
Section 2. International trends in the Research Fields .....	29
<b>Chapter 3. Contents and Results of the Research</b> .....	<b>33</b>
<b>Chapter 4. Goal Accomplishments and Contributions to the Related Fields</b> .....	<b>189</b>
<b>Chapter 5. Results Achievements and Application Plans of the Results</b> .....	<b>195</b>
<b>Chapter 6. Foreign Scientific Information Acquired</b> .....	<b>199</b>
<b>Chapter 7. References</b> .....	<b>202</b>

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....	18
제 1 절 연구개발의 목적 .....	18
제 2 절 연구개발의 필요성 .....	18
제 3 절 연구개발 범위 .....	23
제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....	24
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 .....	33
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	189
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	195
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	199
제 7 장 참고문헌 .....	202

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적

다양한 자연미생물에 의하여 제조되는 김치의 발효 속도 조절 및 위생학적 안전성 향상을 위하여 품목별 특성에 맞는 맞춤형 미생물 첨가제를 개발하고 미생물 첨가제를 효율적으로 중소규모 전통발효식품 제조업체에 공급하기 위한 맞춤형 미생물 첨가제의 보급 시스템 구축하고자 함

## 제 2 절 연구개발의 필요성

- 국내외 농림수산업 관련 환경이 시장개방 확대, 무한경쟁 가속화 등의 영향으로 급속히 바뀔에 따라 기술 경쟁력을 갖춘 농림수산물산업 육성의 필요성이 증가하고 있으나, 농림어업 GDP는 국가전체 GDP에서 차지하는 부분이 계속적으로 감소하고 있으며 OECD 회원국 중 최하위 수준에 있음. 이러한 문제점의 해결을 위해서 농림수산물산업의 일대 도약이 필요한 시점임
- 최근 전통발효식품이 웰빙식품으로 급부상하고 건강기능식품으로 각광 받고 있으나 국내 전통발효식품과 관련되어 실용화된 미생물 자원은 매우 부족한 실정이고 산업적으로 필요한 품목별 특성에 따른 발효속도 조절기술, 저염화에 따른 유해세균 제어 기술 등 미생물 응용기술은 매우 미흡한 실정임
- 유럽이나 일본 등의 선진국에서는 발효 제품에 이용할 미생물 첨가제 개발이 활발히 이루어지고 있으나 국내 전통발효식품 산업체의 경우 대부분 영세하여 독자적으로 미생물 첨가제를 연구·개발하는 회사는 일부 대기업을 제외하고 거의 없는 실정임
- 특히 발효제(메주, 누룩 등)를 사용하지 않는 전통발효식품(김치, 젓갈류 등)의 품질고급 및 위생성 향상을 위해서는 중소 규모의 전통식품 제조업체가 저렴하게 이용할 수 있는 맞춤형 미생물 첨가제의 개발 및 국가적인 보급시스템 구축이 절실히 필요함
- 김치는 절인 배추나 무, 오이 등의 주원료에 각종 양념을 혼합하여 일정기간 발효, 숙성시킨 채소 발효식품으로서 독특한 맛을 내는 한국의 중요한 전통식품으로 우리의 식생활에서 가장 큰 비중을 차지하는 부식임

- 김치는 배추와 마늘과 같은 원·부재료와 제조과정 중의 여러 가지 미생물원으로부터 주 발효균인 유산균과 기타 일반세균, 효모, 곰팡이 그리고 대장균군까지 유래되어 단계적으로 발효가 진행되는 microecosystem으로 알려져 있음
- 대장균군의 경우 발효가 진행될수록 감소되어 발효된 김치에서는 문제가 되지 않으나 일부 국가의 경우 초기 대장균군 균수를 제한하고 있어 수출에 어려움이 있음. 또한 최근 저염김치의 등장으로 인한 김치의 위생적인 문제가 발생할 소지가 있어 이를 해결하기 위한 방안이 필요함
- 김치의 경우 배추 품종, 절임방법, 양념 혼합, 숙성 방법 및 미생물 발효 패턴 등 품질 균일화를 위해서는 많은 변수가 조절되어야 함. 이 중에서 제조 공정 관리 부분은 현재까지 축적된 산업화 노하우와 연구 데이터로 인하여 산업현장에서 어느 정도 품질관리가 가능하지만 미생물 발효패턴 조절 기술은 아직 산업현장에서 현실화 된 것이 미비한 실정임
- 김치의 상품화에 있어 품질 균일화 및 저장성 연장이 대표적인 문제로 대두되고 있으나 이를 해결할 수 있는 방안이 아직 실용화 되지 못하고 있는 실정임
- 김치와 유사한 염지 및 야채발효식품인 일본의 쓰게모노(漬物), 서양의 sauerkraut와 pickles 등은 일찍부터 많은 연구가 진행되어 발효기작이 거의 밝혀져 있으며, 따라서 발효의 인위적 조절이 가능한 단계에 이르렀으나 김치는 아직 자연 발효 수준에 머물러 있음
- 따라서 김치 발효 기작의 정확한 규명을 통한 우수 균주 선발과 미생물 첨가제를 이용한 김치의 발효 조절 및 위생학적 안전성을 확보하는 것은 김치의 품질 및 저장성 향상, 위생향상에 있어 매우 중요한 의미를 갖고 있음
- 국내 김치시장의 시장 규모는 약 2조 4천억원, 1,204천톤으로 (2013년) 상품김치 시장 비율이 금액면에서 1조 2,295억원으로 50.9% 차지 (가정제조 : 1조 1,876억원, 49.1%). 생산량에서는 506천톤으로 42%를 차지 (가정제조 : 698천톤, 58%) 하는 것으로 나타났으며 그 수요가 더욱 더 증대 될 것으로 예상됨
- 김치 Codex 규격 채택(2001년), 세계 5대 건강식품 선정(2006년) 등 김치 종주국의 위상과는 달리 식생활의 서구화, 외식기회 확대 등으로 1인당 김치 소비량이 감소되고 있으며, 저가의 중국산 김치 수입 급증으로 김치산업이 대내외적으로 도전과 시련을 맞고 있음
- 발효 식품은 건강식품이라는 인식이 전 세계적으로 확산 되면서 향후 인구증가와 더불어 시장규모가 지속 확대 될 전망이어서 김치의 우수한 기능성을 홍보하여 내수 촉진을 도

모하고 해외 시장 경쟁력 강화에 대비할 필요가 있음

- 지구 온난화와 환경오염 심화로 농산물 생산성 저하 및 미생물 자원 고갈이 예상됨에 따라 김치의 미생물 자원 보존 유지 필요성이 증대되고 있음
- 따라서 김치의 세계화 및 김치 종주국의 수호를 위해서 김치 발효 미생물에 대한 연구가 주도적으로 이루어져야 할 것임
- 김치 미생물 첨가제 사용량은 점점 사용량이 증가될 것으로 예상됨. 고가의 미생물 첨가제를 사용할 수 없는 중소규모의 김치 제조업체에 본 연구과제에서 개발된 첨가제를 저렴하게 공급함으로써 김치 산업을 활성화 시킬 수 있을 것으로 사료됨
- 김치 수출량은 2005년 30,000톤을 상회하던 것이 기생충 알 파동으로 급감한 후 차츰 증가세를 보여 2009년 28,500톤으로 회복. 수출국은 다변화 ( '00:27개국 → '05:35 → '11:60)되고 있으나 여전히 일본에 편중( '13 : 74%)되어 있음. 수출액은 ( '09:89,386천불 → '11:104,577천불 → '13:89,277).
- 따라서 우수 종균 첨가로 품질이 향상된 다양한 김치를 산업적으로 대량생산 할 수 있게 되면 내수 시장뿐만 아니라 국제적으로 김치 수출을 촉진 시킬 수 있게 되어 경제·산업적 측면에서 매우 큰 의의가 있다 하겠음
- 젓갈은 어패류의 근육, 내장 또는 생식소 등에 10~20%의 식염을 첨가하여 부패 변질을 억제하면서 일정기간 숙성 발효시킨 전통 수산가공식품으로, 장류, 침채류와 더불어 우리나라 3대 발효식품 중 하나임. 원료로부터 유래된 자가소화효소 및 미생물의 효소작용에 의해 숙성과정 중 단백질이 분해되어 특유의 풍미와 조직감이 형성되고, 유리아미노산 및 정미성분이 풍부하여 단백질 공급원으로써 뿐만 아니라 김치의 부원료나 조미료로써 한국인의 식생활에서 빼놓을 수 없는 주요한 자리를 차지하고 있음
- 현재 국내에서 조사된 젓갈류는 침장원 및 원료의 종류, 제조방법 등에 따라 160종의 젓갈과 식해가 알려져 있지만, 산업화가 이루어진 것은 30여종이며 대부분은 지역특산물로 가내수공업 수준에서 제조되고 있고, 원료의 수급 사정으로 명맥만 유지하는 것도 있다. 1980년대부터는 오양수산, 한성기업, 하선정 종합식품 등이 젓갈의 대중화 및 산업화에 앞장서고 있지만, 영세한 제조업체가 다수를 차지하고 있음
- 젓갈산업이 1980년대 이후, 빠르게 성장하고 있음에도 불구하고 제조 및 유통은 다른 발효식품에 비해 취약한 상태에 있음. 그 이유는 1) 고염 식품이라는 점에서 과거에 비해 기호도 및 선호도가 떨어지고 있으며, 2) 발효숙성기간이 길며, 규격생산이 어렵다. 또한

3) 상품수명이 짧고, 4) 위생적 품질관리가 어려우며, 5) 수송 및 취급이 용이하지 못하기 때문임

- 이러한 문제점의 해결을 위해서는 1) 젓갈 품질의 표준화 및 품질 평가 방법의 확립, 2) 유통기한 연장 기술의 개발, 3) 소비자가 선호하는 새로운 제품의 출시, 4) 젓갈 위해요소의 규명 및 제거 등을 목표로 한 젓갈 제조기술의 과학화 및 현대화가 이루어져야 하며, 이를 위한 기초연구가 선행되어야 함
- 국민의 건강에 대한 관심이 증가함에 따라 전통식품에 대한 관심이 높아지고 있고, 정부의 전통식품의 과학화 및 상품화에 대한 관심이 높아지면서 젓갈연구에 대한 관심도 높아지고 있지만, 김치나 장류, 주류 등의 전통발효식품의 연구에 비해 양적, 질적인 면에서 뒤떨어져 있다. 한국과학기술정보원(KIST)을 이용하여 검색한 김치 관련 논문 및 특허는 각각 989건 및 4,767건으로 젓갈 관련 논문 212건 및 특허 287건을 크게 앞선 것으로 집계되어 젓갈 연구의 후진성을 보여주고 있음
- 신성장동력의 하나로 식품산업이 거론됨에 따라 한식의 세계화에 많은 관심이 집중되고 있음. 그 일환으로 김치의 세계화에는 많은 연구가 투자되고 있으나 젓갈의 세계화는 미진한 실정이다. 전통발효식품의 세계화를 위해서는 반드시 젓갈의 세계화 또한 동반하여 추진되어야 함
- 국가과학기술종합정보서비스(NTIS)에서 검색한 바에 따르면, 지금까지 진행된 젓갈 관련 국가과제는 18건으로 집계됨. 이들 중 디자인기술개발을 제외한 젓갈 제조기술의 과학화 및 현대화와 직접적으로 관련 있는 기초 및 산업화 연구는 8건 정도에 불과함. 한편 김치 관련 국가과제는 79건이 시행되어, 젓갈 연구의 낙후성을 단적으로 제시하고 있음. 또한 연구성과 면에서도 젓갈연구를 통하여 사업화된 예는 찾아보기 힘들
- 젓갈류 산업의 육성을 위한 연구개발은 저염화 및 속성발효법 개발을 중심으로 기초 및 응용연구가 진행되었지만, 속성발효와 관련해서는 산업적 성과를 거둔 예는 찾아보기 힘들
- 젓갈을 제조한 후, 상품화까지의 시간이 1년 이상 소요되는 멸치젓과 새우젓과 같은 고염 젓갈의 속성발효에 의한 생산기간 단축은 젓갈 생산비용의 감소로 연결되어 젓갈산업의 활성화에 기여할 수 있기 때문에 젓갈의 속성발효를 위한 연구가 기존에 다수 진행되었지만, 대부분 단백질 분해효소의 첨가에 의존하였고, 젓갈발효에 관여하는 내염성 단백질 분해 미생물을 첨가한 시도는 없었음

- 특히 젓갈발효 관련 미생물 연구의 경우 숙성기작의 대한 해석과 발효에 관여하는 주발효균 또는 우점종이 정확하게 도출되지 못했음. 이러한 이유는 침채류 및 장류에 비해 젓갈에 존재하는 미생물의 종류가 방대하고, 젓갈발효에 관여하는 미생물의 전체상을 이해하기 위한 체계적인 미생물 다양성 파악보다는 선택배지를 이용한 신규 미생물의 탐색이나 유용 미생물 분리의 방향으로 젓갈연구가 단편적으로 진행되었기 때문으로 사료됨
- 숙성발효에 의한 경제적 효과가 매우 크에도 불구하고 숙성발효가 산업적 성공을 거두지 못한 점은 계속적으로 효소를 첨가해야 하고, 초고압설비와 같은 추가적인 설비가 필요한 방향으로 진행되어 영세한 젓갈 생산자들에 경제적 효과가 전달되지 못하였기 때문으로 분석됨. 따라서 고염에서 단백질 분해효소를 생산하는 미생물 첨가제를 저가에 공급하여 숙성발효에 적용한다면 기존의 연구에서 달성하지 못했던 산업적 성공을 거둘 수 있을 것으로 사료됨
- 국민의 건강에 대한 관심이 높아지면서 젓갈의 저염화를 위한 다수의 연구가 진행되었고, 양념젓갈을 중심으로 저염화는 상당한 성과를 거두었음. 그러나 저염화의 결과, 저염제품의 발효 관련 미생물상이 바뀌게 되어 미생물학적 안전성에 대한 문제점이 대두되었음
- 젓갈의 저염화로 초래된 위해 미생물의 오염을 평가한 연구가 2000년 이후에 다수가 진행되었음. 유통 중인 다수의 젓갈류를 대상으로 위생지표 미생물 및 식중독균을 검출한 결과, 멸치젓과 새우젓과 같은 고염이 함유된 젓갈의 경우 식품 위해균에 의한 문제점이 발생할 가능성은 거의 없는 것으로 나타났음. 그러나 오징어젓, 명란젓, 창란젓과 같은 저염 양념젓갈로부터는 식품 위해 미생물이 검출되는 것으로 나타났고, 대장균군(coliforms), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 장염비브리오균을 포함하는 *Vibrio* spp.에 의한 오염 가능성이 있는 것으로 나타났음
- 젓갈의 저염화가 계속적으로 추진되고 있는 현 시점에서 식품위해 미생물에 의한 문제점 발생의 가능성이 제기되고 있기 때문에 저염 양념젓갈의 위생지표 미생물 및 식중독균의 제어는 시급히 해결되어야 함

### 제 3 절 연구개발의 범위

- 전통발효식품(무발효제) 품질 개선을 위한 우수 미생물 자원 확보
  - 김치, 젓갈류로부터 발효 속도 조절 및 위생지표 미생물 제어 우수 미생물 확보
  - 발효 단계별 미생물 군집 분석을 통한 발효 기작 규명 및 품질 특성 변화 분석
- 전통 발효식품 제조용 맞춤형 복합 미생물 첨가제 개발
  - 미생물 첨가제 제조 및 우수 미생물 조합에 의한 최적 배합비 확립
- 개발 미생물 첨가제를 이용한 발효 속도 조절 기술개발
  - 미생물 첨가제를 이용한 김치의 품질유지기한 연장
  - 미생물 첨가제를 이용한 고염 젓갈 속성 발효 기술 개발
- 개발 미생물 첨가제를 이용한 위생학적 안전성 향상 기술 개발
  - 미생물 첨가제를 이용한 저염 김치의 대장균군 제어 기술 개발
  - 미생물 첨가제를 이용한 저염 양념젓갈의 위생지표 미생물 및 식중독균 제어 기술 개발
- 개발 미생물 첨가제를 이용한 전통발효식품의 최적 발효공정 개발
  - 계절별 원·부재료 미생물 분포 조사 및 초기 균수 저감화 기술 개발
  - 미생물 첨가제 제형별 활성화 기술 및 첨가량, 첨가방법 개발
- 우수 미생물 및 미생물 첨가제의 효율적 관리 및 보급 시스템 구축
  - 관련 미생물의 수집, 보존 및 관리시스템 구축
  - 미생물 첨가제 제제화 기술 및 포장 기술 개발
  - 맞춤형 미생물 첨가제 제조를 위한 기본 매뉴얼 제작
  - 관련 미생물 첨가제의 보급시스템 개발 및 구축
  - 미생물 첨가제 사용 관리지침(안) 및 미생물 첨가제 품질 인증제도 마련 (제품효능 검증)

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### ○ 종균 김치 국내 업체 현황

- 품질균일화를 위한 종균첨가 김치는 일부기업을 중심으로 생산되고 있음
- 유제품은 종균 및 맛축형 발효 단계이나 김치는 대부분 자연발효단계 수준으로 종균 첨가 김치는 일부 업체에서만 생산하고 있음
- 1998년: 베지퀸에서 최초 시도하여 제품 출시 (*Leuconostoc citreum* IH-22)
- 2000년대 초반: 한울바이오김치(*Leuconostoc kimchii*), 종가집 김치 (*Leuconostoc* DRC 0211 함유)
- 2000년대 후반: CJ 하선정 김치, 동원양반김치, 풀무원 등에서 유산균 첨가 김치 출시



표 1. 종균을 첨가하여 판매중인 국내 상품 김치 예시

제조사	사용균주	제 품
A사	<i>Leuconostoc</i> 속 균주	
B사	<i>Leuconostoc citreum</i>	
C사	<i>Leuconostoc</i> DRC0211 ( <i>Leu. mesenteroides</i> )	
D사	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> & <i>Leuconostoc citreum</i>	종균회사로부터 균주를 구매하여 김치제조에 이용하고 있음

- 기존 논문의 경우 김치의 저장 기간 연장과 품질향상을 위해 bacteriocin을 생성하는 균주나 dextransucrase, mannitol 등을 생성하고 저온 적응성이 우수한 균주를 사용하여 종균 김치를 제조하여 여러 가지 이화학적 특성 및 점유율 분석을 통해서 종균의 김치 적용 가능성을 제시함
- 시장에 유통되고 있는 대부분의 김치 제품이 자연 미생물 community를 그대로 이용한 상품으로서 발효 조절이 어렵거나 품질이 균일하지 않는 등 여러 가지 문제점을 가지고 있음
- 유럽이나 미국 등의 선진국에서는 발효 제품에 이용할 종균 개발이 활발히 이루어지고 있으나 국내 김치 산업체의 경우 독자적으로 종균을 연구·개발하는 회사는 극소수에 불과함
- 현재 종균을 사용 또는 사용을 위한 연구단계인 김치 산업체로서는 대상(주)의 종가집 김치, CJ(주)의 하선정 김치, 동원양반김치, (주)풀무원 김치 등이 있으며 이들 업체는 독자적으로 개발한 균 또는 종균 회사로부터 균을 공급 받아 종균 김치를 제조하고 있으며 많은 중소기업에서 종균 김치의 필요성을 절감하고 있음
- 젓갈발효 관련 미생물 연구 및 젓갈의 발효에 따른 품질변화 등, 젓갈의 과학화 및 산업화와 관련된 연구가 진행되고 있지만, 양과 질적인 면에서 김치와 장류에 비해 명맥을 이어가는 수준으로 분석됨
- 젓갈연구의 기반은 1960년대와 1970년대에 걸쳐 이루어졌으며 주로 소재별 발효, 숙성기작 규명을 위한 미생물상 변화 연구[이, 1969; 이와 최, 1974], 정미성분 및 향기성분 분석[이와 성, 1977; 성, 1978], 그리고 숙성과정에 관한 효소학적 연구[서, 1973] 등의 젓갈에 대한 과학적 접근이 시도 되었음
- 1980년부터는 전통식품의 상품화와 산업화가 본격적으로 추진됨에 따라, 식염의 과잉섭취를 방지하면서도 저장성과 풍미에 손색이 없는 저식염 젓갈의 제조[차 등, 1983; 차와 이, 1985a, 1985b], 젓갈의 대량생산을 위한 숙성발효[차 등, 1988, 1990; 차와 이, 1989, 1990] 등의 산업화를 염두에 둔 기존 젓갈의 문제점 해결을 위한 실용연구가 시작되었음
- 1990년대 중반부터는 기존에 진행되었던 정미성분의 규명, 숙성발효, 저염젓갈의 제조, 미생물학적 및 효소학적 연구[차 등, 1988] 외에도 소비자를 의식한 품질 개선 및 안전과

관련된 연구가 진행되었음. 그 예로는 젓갈 품질평가방법의 표준화를 위한 미생물 연구 [허, 1996], 젓갈의 안전성 확보[함과 진, 2002; 김 등, 2006; 하 등, 2007], 품질유지기한의 연장[이 등, 2000; 조 등, 2002], 젓갈의 안전성 확보를 위한 HACCP 제도의 도입[Park et al., 2002b] 등의 연구를 들 수 있음

- 2000년대에 들어서면서 젓갈의 산업화와 관련된 연구 외에도 유용물질 탐색, 항암활성 보유 유용미생물 분리[박 등, 2004], lacticin [백 등, 2003], lipopeptide [윤 등, 2005] 등의 박테리오신 생산 미생물 분리를 비롯하여 신규자원의 활용과 관련된 다수의 유용미생물이 분리가 보고되었음. 또한 젓갈을 대상으로 한 신규 미생물 발굴이 집중적으로 진행되어, 형태 및 생리적 특성에 의존한 고전적 동정법으로 진행된 젓갈 미생물 연구에서 보고되지 않았던 신규 미생물 *Bacillus jeotgali* [Yoon et al., 2001] 외 약 20여 종이 신규 등록되었음
- 젓갈을 제조한 후, 상품화까지의 시간이 1년 이상 소요되기 때문에 속성발효젓갈의 제조를 위한 다수가 이미 기존의 연구에서 진행되었지만, 대부분 단백질 분해효소의 첨가에 의존하였고, 젓갈발효에 관여하는 내염성 단백질 분해 미생물을 첨가한 시도는 없었음[차 등, 1988, 1990; 차와 이, 1989, 1990].
- 국민의 건강에 대한 관심이 높아지면서 젓갈의 저염화를 위한 다수의 연구가 진행되었고, 양념젓갈을 중심으로 저염화는 상당한 성과를 거두었음. 그러나 저염화의 결과 제품의 젓갈발효 관련 미생물상이 바뀌게 되어 미생물학적 안전성에 대한 문제점이 대두되었음
- 젓갈의 저염화로 초래된 위해 미생물의 오염을 평가한 연구가 2000년 이후에 다수가 진행되었음[김 등, 2006; 오 등, 2004; 이 등, 2008; 하 등, 2007; 함 등 2002]. 유통 중인 다수의 젓갈류를 대상으로 위생지표 미생물 및 식중독균을 검출한 결과, 멸치젓과 새우젓과 같은 고염이 함유된 젓갈의 경우 식품 위해균에 의한 문제점이 발생할 가능성을 거의 없는 것으로 나타났음. 그러나 오징어젓, 명란젓, 창란젓과 같은 저염 양념젓갈로부터는 식품 위해 미생물이 검출되는 것으로 나타났고, 대장균군(coliforms), 황색포도상구균 (*Staphylococcus aureus*), 장염비브리오균을 포함하는 *Vibrio* spp.에 의한 오염 가능성이 있는 것으로 나타났음
- 2010년을 기점으로 전통발효식품을 대상으로 한 metagenome 분석이 활발하게 진행되면서 김치, 장류에 이어 젓갈의 bacteria 군집에 대한 metagenome 분석 결과가 보고되어

젓갈에 존재하는 미생물상이 규명되었음[Jung et al., 2013a, 2013b, 2014; Lee et al., 2014a, 2014b]. Pyrosequencing을 이용한 젓갈의 미생물 metagenome 군집 분석결과는 본 연구에서 배양법을 통하여 분석한 결과와 크게 다르지 않은 것으로 나타났음

- 김치 및 장류 대비 시장 규모가 작은 관계로 젓갈에 대한 연구는 전반적으로 빠르게 진전되지는 않지만, 최근의 미생물상에 대한 연구를 통하여 젓갈발효 관련 미생물에 대한 지식은 많이 진보하였고, 본 연구를 통하여 품질균일화 및 속성발효를 위한 종균이 도출된 상태임. 그러나 도출된 젓갈발효용 종균이 기존의 식품발효에서 많이 사용되었던 미생물과는 다르기 때문에 식품용도로의 사용을 위한 미생물 안전성 평가가 큰 숙제로 대두되었음
- 젓갈산업의 진흥을 위한 많은 지원이 필요함에도 불구하고 연구비 투자가 늘어나지 않고 있어 젓갈산업에서의 문제점 해결은 진전되지 못하고 있음. 젓갈발효 관련 미생물상에 대한 지식이 어느 정도 확보된 만큼 이를 바탕으로 산업적 문제점 해결을 위한 추가 연구의 진행이 필요한 시점에 도달했음

■ 해외 현황 분석

○ 세계 김치 생산 현황

- 총 146개 업체로 중국이 40개 업체로 가장 많으며, 미국이 32개 업체로 두 번째로 많음. 한국 식 김치 생산 업체가 존재하지 않는 국가도 3개국(영국, 네덜란드, 칠레)이 있음
- 주요 생산 품목은 생산 품목 중 가장 높은 비중을 차지한 것은 포기김치로서 83.33%(35개소)였고, 맛김치가 50.0%(21개소)로 두 번째로 높았으며, 깍두기 47.62%(20개소), 총각김치 33.33%(14개소), 열무김치 28.57%(12개소) 순임

<표> 해외 지역별 김치 생산현황

문화권	국가	업체수 (조사완료)	생산현황(kg/년)		증가율(%)
			2011	2012	
아시아	베트남	12(6)	54,000	80,140	48.4
	중국	40(8)	1,397,000	4,470,200	220.0
	일본	23(2)	160,449	956,000	495.8
	홍콩	3(1)	-	-	-
	태국	7(3)	16,640	99,140	495.8
유럽	러시아	6(3)	75,035	172,500	129.9
	영국	-	-	-	-
	프랑스	1(1)	6,240	6,240	0.0
	독일	2(2)	10,000	42,000	320.0
오세아니아	네덜란드	-	-	-	-
	호주	11(2)	608,400	608,400	0.0
북/남미	뉴질랜드	4(0)	-	-	-
	미국	32(12)	4,788,197	5,165,785	7.9
	캐나다	8(1)	4,896	4,320	-11.8
중동	칠레	-	-	-	-
	UAE	1(1)	-	-	-
합 계		146(42)	7,120,857	11,388,725	59.9

\*증가율 : 2011년 생산량을 대담한 업체만 계산함

자료 : 한국식품연구원 세계김치연구소 최종보고서, 2013, 김치 세계화 전략 개발 및 실행 인프라 구축

<표> 주요 생산 품목(복수응답)

구 분	포기 김치	맛김치	깍두기	열무 김치	총각 김치	응답 수 (개소)
합 계	35 (83.3)	21 (50.0)	20 (47.6)	12 (28.6)	14 (33.3)	42 -

○ 일본 김치시장 현황 및 유통현황

- 김치 생산량의 최고치를 달성했던 2002년 이후 2003년의 일본 김치 생산량은 전년도보다 1.71% 감소함. 2005년에는 갑작스런 수입산 김치의 기생충 사건으로 인하여 일본김치 시장은 큰 타격을 입었으나, 일본 김치 제조업체에게 자국산 김치 점유율을 증가시킬 수 있는 기회로 작용함
- 일본에서 김치를 생산하고 있는 대표적인 일본산 김치 제조업체로는 도카이쓰케모노(東海漬物), 빈고쓰케모노(備後漬物), 나카가와식품, 마르코시, 아키토 식품, 피클스 등이 있음
- 2002년 한일월드컵으로 인한 한식에 대한 관심이 증가로 인해 김치판매액은 대폭 증가하였으나, 2003년에는 주춤하여 2006년에 급격히 감소함
- 2007년부터는 김치시장이 회복되는 기미를 보여 계속적으로 성장하고 있는 것으로 보이며, (주)후지경제에서는 2012년에 2001년도의 시장규모를 회복할 것으로 추정함

○ 중국 김치시장 현황 및 유통현황

- 중국 현지에서 생산되는 한국식 전통 포장 김치 브랜드는 약 20개 이상이며, 5개 업체가 시장의 약 70%를 점유하고 있음
- 중국내 유통되는 포장 김치 중 70%는 현지인이 소비하고, 약 30%는 교민시장에서 소비하는 것으로 추정
- 한국산: 생산업체 → 중국 총 대리상 → 소매매장(대형유통업체, 한인마트 등)
- 현지생산품: 생산업체 → 소매매장(대형유통업체, 한인마트 등)
- 중국 주요지역(상하이, 베이징, 칭다오 등 서부해안지역) 전역에서 판매되는 김치 브랜드는 종가집(북경공장), 경북궁(칭다오공장) 등이며, 각 지역별로 현지에서 생산하여 지역에서만 판매되는 김치업체는 약 20여개업체 이상이 되는 것으로 파악됨

○ 베트남 김치시장 현황 및 유통현황

- 한국문화에 대한 우호적인 환경과 함께 절임식품에 대한 친밀도로 인해 현지 김치업체의 성장률이 높은 상황임
- 한국김치 시장은 매년 50% 수준의 급성장을 기록하고 있으며, 베트남 내 한인들 대상으로 하는 한인슈퍼에는 OngKim 김치 외에 한국산 수입김치인 “종가집”, 소규모 현지 브랜드, 자가 제조 김치 등이 혼재되어 판매되고 있음

○ 독일 김치시장 현황 및 유통현황

- 독일 푸랑크푸르트 내의 10개 정도의 한국식품점들이 김치를 생산하고 있으나, 대부분 영세한 제조시설을 갖추고 있음
- 현재 현지 생산김치는 브레멘(Bremen, Germany)의 KoreaKimchi 업체(한국인 대상)와 하

나우(Hanau, Germany)의 김치 제조업체(동남아식품가게 대상)가 존재함

- 한국산 수입 김치는 운송기간이 28~35일 정도 소요되어 김치의 신선도 문제가 발생할 가능성이 높음
- GABHI GmbH를 통해 항공으로 수입 후, 독일 루프트한자에 납품함(윈스톱, 윈나잇 시스템 구축, 특별시장으로 한 달 운송료 2천만 원 이상 소요)

○ 프랑스 김치시장 현황 및 유통현황

- 파리 내에 존재하는 한인마트에서 모두 자체 제조된 김치를 판매하고 있으며, 정부허가를 받은 김치공장은 이조김치가 유일함. 이조김치의 자체 브랜드 미보유로 인해 판로를 찾지 못해 직접 소비자에게 판매하는 방법을 취하고 있음
- 판매되고 있는 한국산 수입김치(종가집)의 경우, 맛김치 200g 제품이 1.80유로로 판매되고 있으며, 한인마트에서 자체 생산 중인 김치 제품의 경우 250g에 4.5유로에 판매되고 있음
- 한국에서 수입된 김치 제품의 경우, 유통기간의 문제로 신선한 상태의 공급이 불가능하여 현지 한인마트에서 신선한 김치를 제공하는 차별화 전략으로 2배 이상의 높은 가격을 받고 있음

○ 젓갈은 우리나라 고유의 전통발효식품이기 때문에 외국에서 연구된 예는 찾아보기 힘들. 그러나 곡물을 주성분으로 하는 동남아시아와 일본에서 젓갈과 유사한 수산발효식품이 제조되고 있어, fish sauce, fermented fish product 관련 다수의 논문이 보고되었고, 그 수준은 국내보다 우위에 있음

○ 젓갈과 마찬가지로 fish sauce의 제조에 있어서도 속성발효에 의한 경제적 효과가 직접적으로 나타날 수 있기 때문에 태국의 연구자들을 중심으로 효소와 미생물을 이용한 속성발효가 시도되었음[Yongsawatdigul et al. 2007]. 국내보다 연구의 수준이 높은 것으로 평가됨

○ 속성발효와 직접적인 관련이 있는 논문은 1건에 불과 하지만, 속성발효의 달성에 도달하기까지 진행한 효소 및 미생물에 대한 기초연구가 태국 및 일본에서 보고되었음[Fukami et al., 2004; Hiraga et al., 2005; Sinsuwan et al., 2007; Siringan et al., 2005]. 또한 태국의 젓갈류 *plaa-som*에 대한 외국 연구자들의 연구결과[Paludan-Müllera et al., 2002]도 보고되고 있어 태국 젓갈에 대한 국제적 연구가 진행되고 있는 것으로 추정됨

○ 종균을 첨가한 속성발효가 어느 정도 성공을 거두고 있지만, 종균을 첨가하여 위해 미생물을 제어한 결과는 보고되지 않았음. 미생물 첨가제의 첨가를 통한 저염젓갈의 식품 위

해미생물 제어에 성공한다면 세계적으로 저명한 학술지에 게재 가능할 것으로 사료됨

- 태국과 일본의 속성발효 및 품질 균일화 관련의 연구수준은 우리나라에 비해서 다소 높게 평가되지만, 최근 들어 metagenome 분석을 통한 젓갈 미생물 군총분석과 같은 수준 높은 연구가 해외 저명 학술지에 발표되면서 고염발효 식품미생물의 연구 수준은 우리나라가 앞선 것으로 평가됨[Guan et al., 2011; Jung et al., 2013a, 2013b, 2014; Lee et al., 2014a, 2014b].

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

[1세부: 김치발효용 미생물첨가제 개발 및 발효조절기술 개발]  
(세부연구책임자 : 세계김치연구소, 김태운)

### 제 1 절 항균활성 우수 균주의 선발

#### 1. 실험방법

##### 가. 유산균 분리

일반가정과 마트에서 시판되고 있는 적숙기 김치를 구입하여 젖산(lactic acid) 생성능이 과다하지 않고 항균활성이 우수한 균주를 분리하고자 거즈를 이용하여 김치국물에 있는 고형분을 제거 한 후, 희석하여 MRS배지에 0.2% BPB 지시약 1%를 넣어 제조한 MRS-BPB 배지에 도말하여 30℃에서 48시간 동안 혐기적으로 배양한 다음 colony를 분리하였다.

##### 나. 박테리오신 생산 균주 선발

상기에서 분리한 균주를 spot-on-the-lawn법을 이용하여 박테리오신 생산 여부를 확인하였다. 사용한 감수성 균주로는 과숙 김치에서 분리한 김치의 산패를 유도하는 *Lb. plantarum* 20-10, *Lb. plantarum* A-1, *Pediococcus pentosaceus* A-2, *P. pentosaceus* A-5, *Lb. plantarum* A-6, *P. pentosaceus* B-11, *Lb. sakei* CK0153, *Lb. sakei* CK0154를 이용하여 각각의 선택배지(agar 0.7% w/v)에 접종한 뒤 중층 후 저해환을 생성하는 단일 집락을 박테리오신 생산 균주로 선발하였다.

##### 다. 선발된 균주 동정

선발된 균주는 MRS broth에 배양 후 genomic DNA extraction kit(iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 1% agarose gel을 이용하여 확인하였으며, 16S rRNA gene을 증폭하기 위하여 추출된 genomic DNA를 template로하여 27F (5' - A G A G T T T G A T C C T G G C T C A G - 3' , forward), 1492R (5' -GGCTACCTTGTTACGACTT-3' , reverse) primer를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR 조건은 denaturation 95℃ 1min, annealing 45℃ 1min, extension 72℃ 1min 30sec로 30 cycle을 수행하였다. 얻어진 PCR product는 sequencing을 위해 purification Kit(iNtRON

Biotechnology, Korea)를 이용하여 정제하였다. DNA 염기서열은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Perkin Elmer, U.S.A.)를 사용하여 염기서열을 결정하였으며, National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)를 이용하여 분리균주를 동정하였다.

#### 라. 항균활성 측정

박테리오파지 항균활성 측정은 agar-well diffusion assay 방법을 사용하여 김치 과숙 지시균주에 대해서 분리균주들의 생육저해활성을 확인하였다. 지시균주들과 *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus brevis*를 MRS broth에 접종한 후 30°C에서 18시간 동안 전배양한 후 100mL MRS 액체배지에 전배양액 1% 접종하여 30°C에서 18시간 동안 2차 배양하였다. 분리균주의 항균 활성을 측정하기 위해 MRS 고체배지에 지시균 배양액 100  $\mu$ L를 0.7%(v/v) soft agar에 접종하여 중층 후 구멍을 뚫었다. 분리균주 배양액을 0.45  $\mu$ m membrane filter(Sartorius, Frankfurt, Germany)로 채운 뒤 균액을 100  $\mu$ L 씩 가하였다. 30°C에서 2일간 배양하여 생육저해활성의 생성을 확인하였다. 항균 활성의 정도는 배양 후 생성된 clear zone의 크기를 측정하여 나타내었다.

#### 마. 분리 균주의 내산성 확인

상기에서 분리된 유산균을 lactic acid로 pH 3.0, 3.5, 4.0으로 조정된 MRS broth 3ml에 접종한 후, 30°C에서 48시간 동안 배양하면서 생육유무를 관찰, 상기 pH 범위에서 내산성 정도를 측정하였다.

#### 바. 분리 균주의 내염성 확인

상기에서 분리된 유산균을 NaCl 1%, 3%, 5%를 첨가한 MRS broth 3ml에 접종한 후, 30°C에서 48시간 동안 배양하면서 생육유무를 관찰, 상기 1%, 3%, 5%의 염 범위에서 내염성 정도를 측정하였다.

#### 사. 분리 균주의 산생성능 확인

항균활성을 측정한 후 김치 과숙 지시균주에 대하여 항균 스펙트럼이 넓고 강한 항균활성을 보인 균주를 MRS broth 3ml에 각각 접종하여 30°C에서 24시간 동안 배양하면서 산생성능을 관찰하였다.

## 2. 실험결과 및 고찰

### 가. 박테리오신 생산 균주 선발 및 동정

준비한 균주를 선택배지에 접종한 뒤 spot-on-the-lawn법을 이용하여 박테리오신 생산 여부를 확인하였다. 저해환을 생성하는 집락을 박테리오신 생산 균주로 선발하여, 선발된 균주를 형태적 생리적 생화학적 실험을 한 결과, 그람 양성균주이며 간균과 구균형태를 갖고 있음을 확인할 수 있었다. 분리한 유산균의 16S rDNA의 염기서열을 분석하였고 그 결과, 두 균주가 *Lactococcus lactis*와 *Lactobacillus brevis* 염기서열과 99.9% 동일하여 *Lactococcus lactis*와 *Lactobacillus brevis*로 각각 동정이 되었다.

### 나. 분리균주의 항균활성

항균활성 측정은 agar-well diffusion assay 방법을 사용하여 김치 과숙 관련 지시균주에 대해서 분리균주들의 생육저해활성을 확인하였다. 30°C 에서 2일간 배양하여 생육저해환의 생성을 확인하였다. 항균 활성의 정도는 배양 후 생성된 clear zone의 크기를 측정하였다. 표와 Fig. 1-1에 나타낸 바와 같이 특히 *Lb. plantarum* A-1, *P. pentosaceus* A-2, *Lb. sakei* 0154에 대하여 강력한 항균활성을 나타내었다.

Table 1-1. 분리균주 항균활성 측정

Isolates	Indicator strains							
	A-1 ( <i>Lb. plantarum</i> )	A-2 ( <i>P. pentosaceus</i> )	A-5 ( <i>P. pentosaceus</i> )	A-6 ( <i>Lb. plantarum</i> )	B-11 ( <i>P. pentosaceus</i> )	20-10 ( <i>Lb. plantarum</i> )	<i>Lb. sakei</i> 0153	<i>Lb. sakei</i> 0154
<i>Lc. lactis</i>	++	++	+	+	+	+	+	++
<i>Lb. brevis</i>	++	++	+	+	+	+	+	+

+, <12mm; ++, 12mm ~ <19.3mm

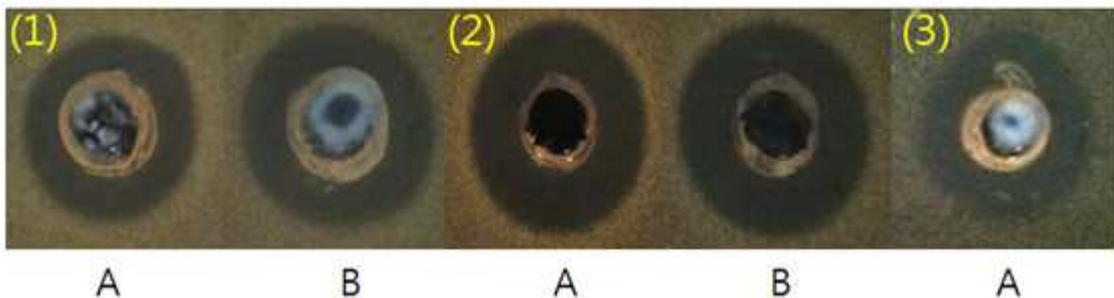


Fig 1-1. agar-well diffusion assay을 이용한 항균활성 측정. A : *Lc. lactis* B : *Lb. brevis*  
(1) *Lb. plantarum* A-1, (2) *P. pentosaceus* A-2, (3) *Lb. sakei* 0154

#### 다. 분리된 균주의 내산성 확인

김치가 제일 맛있다고 평가되는 적숙기의 pH는 4.2~4.5로, 내산성에 강한 균주를 선발하여 실제 김치에 적용 해야만 종균으로서의 기능이 계속 유지 될 수 있다. pH 3.0, 3.5, 4.0으로 조정된 MRS broth 3 ml에 30°C에서 48시간 동안 배양하면서 생육유무를 관찰한 결과 *Lc. lactis* 균주는 pH 3.5에서 70%와 pH 4에서 102%의 생존율을 보였고 *Lb. brevis* 균주는 pH 3에서 71%와 pH 3.5에서 91%, pH 4에서 95%의 생존율을 보였다. 이들 두 균주는 종균으로의 활용 가능성을 보였다.

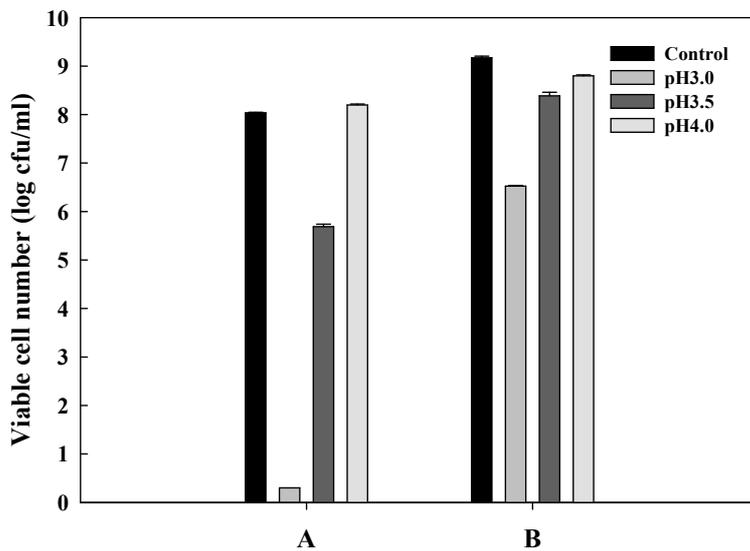


Fig. 1-2. 분리한 유산균의 내산성 확인

A : *Lc. lactis* B : *Lb. brevis*

#### 라. 분리된 균주의 내염성 확인

우리나라 일반김치의 염도는 2~3% 내외이다. 그러나 지역적 특성으로 인해 보다 높은 염도의 김치도 일부 만들어지고 있다. 분리된 균주가 실제 김치에 적용이 가능한지를 알아보려고 내염성을 측정하였다. NaCl 1%, 3%, 5%를 첨가한 MRS broth 3ml에 분리균주를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양하면서 생육유무를 관찰한 결과 분리균주 모두 5%까지 잘 생육하였다. 특히 염농도 3%에서 두 균주 모두 108%, 103%의 생존율을 보이며 종균으로의 활용 가능성을 나타내었다. 종균 후보 균주로 선발된 *Lc. lactis*와 *Lb. brevis* 두 균주의 형태학적 및 생화학적 분석 결과를 Table 1-2에 나타내었다.

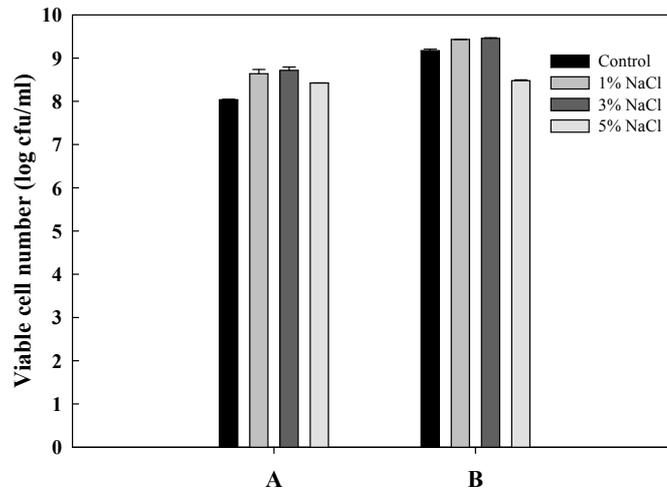


Fig. 1-3. 분리한 유산균의 내염성 확인

A : *Lc. lactis* B : *Lb. brevis*

Table 1-2. 분리 균주 형태학적 및 생화학적 분석 결과

Characteristics	Strains	
	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lb. brevis</i>
Cell form	cocci	Rod
Cell arrangement	chain	Single
Gram stain	+	+
Motility	-	-
Spore formation	-	-
Facultative anaerobic	+	+
Catalase	-	-
Growth at 4°C	+	+
Tolerance at pH 3.5	+	+
Tolerance at 3% NaCl	+	+

#### 마. 분리 균주의 산생성능 확인

*Lc. lactis* 와 *Lb. brevis*가 강력한 향균 활성을 보인 김치 과숙 관련 지시균인 *Lb. plantarum* A-1, *P.pentosaceus* A-2, *Lb.sakei* 0154를 MRS broth에 배양하면서 산생성능을 관찰하였다. 향균활성이 뛰어난 균주 *Lc. lactis* 와 *Lb. brevis*는 김치 과숙 지시균보다 산생

성능이 적은 것으로 나타나 김치에 첨가하더라도 김치의 pH를 저하시키지 않을 것으로 예상되었다.

Table 1-3. 분리균주 산생성능 확인

	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
pH	3.77	3.91	3.91	4.46	5.30

## 제 2 절 초기 접종균수에 따른 미생물 첨가제 첨가량 설정

### 1. 실험방법

#### 가. 김치 첨가용 배양액 제조

*Lc. lactis*를 MRS broth 5ml에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 1차 전배양을 하였다. 상기 1차 전배양액을 MRS에 0.5%(v/v) 접종하여 30°C에서 18시간 동안 2차 배양 하였다.

#### 나. 김치 제조

절임배추와 절임양념을 구매하였으며, 대조군 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^3$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^5$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료를 준비하였으며, 담근 중균김치는 PE 재질의 플라스틱 통에 담아 포장하여 8°C에 저장하면서 실험을 수행하였다.

#### 다. 이화학 분석

제조한 4군의 실험군 김치와 대조군 김치를 대상으로 산도와 pH를 측정 하였다. pH 및 산도를 측정하기 위하여 각 김치 300 g을 분쇄 후 거즈로 여과하여 김치액을 제조하였다. 분쇄한 김치 100g을 pH 미터(Thermo Orion 720A., USA)를 이용하여 pH를 측정하였다. 산도는 분쇄 후 거른 김치액 20 ml를 0.1N NaOH을 사용하여 pH 8.3이 되도록 중화적정 한 후, 소비된 NaOH량을 젯산 함량(%)으로 환산하여 나타내었다.

<p>총산(%)= a x f x F x 5 x 희석부피(ml) / 시료량(g)</p> <p>a : 0.1N NaoH 용액의 소비 ml수</p> <p>f : 0.1N NaoH 용액의 factor</p> <p>F : 0.1N NaoH 용액의 1mL에 상당하는 유기산 계수(젓산인 경우 0.009)</p>
---

**라. 균수 측정**

제조한 실험군 김치와 대조군 김치를 대상으로 총균, 유산균을 측정하고자 분쇄한 25 g의 김치를 스토마커 처리를 한 후 순차적으로 희석하고 희석액을 필름 배지에 도말하여 총균은 30°C에서 48시간 동안 호기배양, 유산균은 혐기배양한 후 계수하였다.

**2. 실험결과**

**가. pH 및 산도의 변화**

김치를 제조하여 8±0.5°C 저장고에 저장하면서 이들의 pH와 산도의 경시적인 변화를 관찰하였다(Table 1-1, 1-2). 담금 당일의 pH는 거의 유사하게 나타났으며, 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치균들의 pH가 첨가한 균수에 비례하여 낮아지는 경향을 보였다. 숙성 7일차에는 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치균들의 pH가 적숙기 상태의 pH의 범위를 유지하였으나, 대조군과 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치의 경우 이미 적숙기 상태의 pH 보다 낮게 나타났다. 숙성 14일차에는 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치균에서만 적숙기 상태의 pH를 유지하고 있었다. 산도 또한 pH와 동일한 경향을 나타내었다. 담금 당일은 동일한 산도를 나타냈으며, 숙성이 진행됨에 따라 대조군과 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 김치균의 경우 산도가 빠르게 높아지는 경향을 보였으며, 숙성 14일차에는 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치균에서의 산도가 가장 낮은 경향을 보였다. 따라서 본 실험을 통해서 미생물 첨가량을 달리한 김치를 제조함에 따라 적정한 균수 접종량을 결정하고자 하였는데, *Lc. lactis*를 1×10<sup>7</sup> CFU/g 첨가한 균의 결과가 발효 지연에 가장 효과가 있는 것으로 사료되어 본 실험군의 조건을 최종 농도로 선정하였다.

Table 1-1. 미생물 첨가량을 달리한 김치의 pH 변화

	Control	B	3	5	7
0일	5.72	5.71	5.40	5.45	5.20
7일	4.43	4.54	4.82	4.84	4.74
14일	4.16	4.18	4.14	4.22	4.36

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, 3: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^3$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 5: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^5$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 7: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-2. 미생물 첨가량을 달리한 김치의 산도 변화

	Control	B	3	5	7
0일	0.32	0.32	0.32	0.32	0.34
7일	0.55	0.46	0.39	0.36	0.39
14일	0.77	0.68	0.66	0.64	0.59

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, 3: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^3$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 5: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^5$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 7: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

#### 나. 총균 및 유산균수의 변화

대조군 김치와 실험처리한 4군의 총균수와 유산균수의 변화를 살펴본 결과는 다음의 Table 1-3, Table 1-4와 같다. 총균수의 경우, 담금 당일에는 대조군에 비해 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 군의 총균수가 높게 나타났으며, *Lc. lactis*를 접종량을 달리하여 처리한 군들의 총균수가 접종량에 비례하여 높게 나타났다. 숙성됨에 따라서도 대조군에 비해 실험처리군의 총균수가 높게 나타났으나, *Lc. lactis*를 접종량을 달리하여 처리한 군들의 총균수는 현저한 차이를 보이지 않았다. 유산균 수의 변화를 살펴본 결과, 담금 당일에 대조군에 비해 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 군의 유산균수가 다소 높은 경향을 보였으며, *Lc. lactis*를 접종량을 달리하여 처리한 군들의 유산균수가 접종량에 비례하여 높게 나타났다. 숙성됨에 따라서도 대조군에 비해 실험처리군의 유산균수가 높게 나타났으나, *Lc. lactis*를 접종량을 달리하여 처리한 군들의 유산균수의 차이는 보이지 않았다.

Table 1-3. 미생물 첨가량을 달리한 김치의 총균수 변화

	Control	B	3	5	7
0일	$7.4 \times 10^5$	$1.3 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$	$7.9 \times 10^6$
7일	$5.9 \times 10^7$	$5.9 \times 10^8$	$6.7 \times 10^8$	$7.8 \times 10^8$	$8.5 \times 10^8$
14일	$5.4 \times 10^7$	$1.5 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리한 김치, 3: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^3$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 5: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^5$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 7: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-4. 미생물 첨가량을 달리한 김치의 유산균수 변화

	Control	B	3	5	7
0일	$2.3 \times 10^6$	$6.8 \times 10^6$	$1.3 \times 10^7$	$2.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$
7일	$2.8 \times 10^8$	$6.7 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$	$1.1 \times 10^9$
14일	$1.9 \times 10^8$	$4.4 \times 10^8$	$8.3 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$	$3.6 \times 10^8$

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리한 김치, 3: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^3$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 5: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^5$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, 7: 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

### 3. 고 찰

미생물 첨가제 첨가량의 영향 분석을 통해 적절한 균수 접종량을 결정하고자 하였다. *Lc. lactis*의 접종량을 달리 첨가하여 제조한 김치를  $8 \pm 0.5^\circ\text{C}$  저장고에 저장하면서 이들의 pH, 산도, 총균수와 유산균수의 변화를 관찰하였다. 담금 당일의 총균수와 유산균수를 확인한 결과, *Lc. lactis*를 접종량을 달리하여 처리한 군들의 총균수와 유산균수가 접종량에 비례하여 높게 나타났다. 숙성됨에 따라 실험 처리군의 총균수 및 유산균수가 높게 나타났으며, 접종량에 따른 차이는 보이지 않았다. 또한 숙성됨에 따라(숙성 14일차), 절임양념을 65°C 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치 군에서만 적숙기 상태의 pH를 유지하고 있었으며, 산도가 가장 낮게 나타났다. 따라서 본 실험을 통해서 미생물 첨가량을 달리한 김치를 제조함에 따라 적절한 균수 접종량을 결정함에 있어 발효 지연에 가장 효과적인 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g 첨가한 군의 조건을 선정하였다.

### 제 3 절 *Lactococcus lactis*를 이용한 품질유지기한 연장기술 개발

#### 1. 실험방법

##### 가. 김치 첨가용 배양액 제조

*Lc. lactis*를 MRS broth 5ml에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 1차 전배양을 하였다. 상기 1차 전배양액을 MRS에 0.5%(v/v) 접종 하여 30°C에서 18시간 동안 2차 배양 하였다.

##### 나. 김치 제조

절임배추와 절임양념을 구매하였으며, 대조군 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 시료, 김치 중량의 0.02%의 젖산을 첨가한 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 후, 김치 중량의 0.02%의 젖산을 첨가한 시료, 분리한 우수종균 *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량의 2%의 lactose, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량의 0.02%의 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료, 절임양념을 65°C에서 30분 동안 열처리한 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량의 0.02%의 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 시료를 준비하였으며, 담근 중군김치는 PE 재질의 플라스틱 통에 담아 포장하여 8°C 저장하면서 실험을 수행하였다.

##### 다. 이화학 분석

제조한 8군의 실험군 김치와 대조군 김치를 대상으로 산도와 pH를 측정 하였다. pH 및 산도를 측정하기 위하여 각 김치 300 g을 분쇄 후 거즈로 여과하여 김치액을 제조하였다. 분쇄한 김치 100g을 pH 미터(Thermo Orion 720A., USA)를 이용하여 pH를 측정하였다. 산도는 분쇄 후 거른 김치액 20 ml를 0.1N NaOH을 사용하여 pH 8.3이 되도록 중화적정 한 후, 소비된 NaOH량을 젖산 함량(%)으로 환산하여 나타내었다.

$$\text{총산(\%)} = a \times f \times F \times 5 \times \text{회석부피(ml)} / \text{시료량(g)}$$

a : 0.1N NaOH 용액의 소비 ml수

f : 0.1N NaOH 용액의 factor

F : 0.1N NaOH 용액의 1mL에 상당하는 유기산 계수(젖산인 경우 0.009)

#### 라. 균수 측정

제조한 8군의 실험군 김치와 대조군 김치를 대상으로 총균, 유산균을 측정하고자 분쇄한 25g의 김치를 스토마커를 이용하여 10배 희석한 후, 희석한 액을 순차적으로 희석 한 후 필름 배지에 30℃ 에서 48시간 동안 총균은 호기배양, 유산균은 혐기배양하여 계수하였다.

#### 마. genomic DNA 추출 및 PCR 증폭

미생물 분리에 사용한 현탁액을 원심분리(13,000×g, 10 min)하여 균체를 취하고 멸균된 생리식염수에 균체를 2회 세척한 후, DNA Prep kit (Quiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 16S rRNA gene 증폭을 위하여 GC clamp가 부착된 338F(5' -CGCCC GCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 와 518R(5' -ATTACCGCGGCTGCTGG-3') primer를 이용하였다. PCR 반응시 Takara Perfect Premix () 10 µl에 DNA template (20 µg/ml) 1µl, forward와 reverse primer (1.0 µM)를 각각 1 µl씩 넣고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 20 µl가 되도록 제조하였다. PCR 증폭은 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)으로 수행하였다. PCR 반응은 95℃ 에서 5분 (initail denaturation), 94℃ 에서 45초 (denaturation), 52℃ 에서 45초 (annealing), 72℃ 에서 1분 (extension)을 30 cycles 실시하였고, 72℃ 에서 5분간 최종 extension을 실시하였다.

#### 바. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 분석

PCR을 이용하여 증폭된 DNA는 Bio-Rad DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 8% (w/v) polyacrylamide gel (urea 와 formamide의 첨가량을 달리한 30-60%의 gradient gel)을 만든 다음, loading 하여 60V, 60℃ 에서 16시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 EtBr로 염색하고 UV-transilluminator을 이용하여 DNA band를 확인하였다.

#### 사. 관능검사

종균첨가 김치의 기호도를 평가하기 위하여 저장기간 연장 효과를 나타내었던 *Lc.lactis* 10<sup>7</sup> CFU/g 에 *Lc.lactis*의 배양액을 10% 첨가해주었던 그룹을 선발하여 발효 적숙기 (pH 4.2~4.3)의 관능검사를 수행하였다. 관능검사 패널은 세계김치연구소 관능검사 요원 10명을 대상으로 양념냄새, 젓갈냄새, 이취, 군덕내, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 감칠맛, 단맛, 신맛, 이미, 붉은정도, 전체기호도, 항목에 대해서 7점 척도법으로 수행하였다.

## 2. 실험결과

### 가. pH 및 산도의 변화

김치를 제조하여  $8 \pm 0.5^\circ\text{C}$  저장고에 저장하면서 이들의 pH와 산도의 경시적인 변화를 관찰하였다. Table 1-1에서 보듯이 제조한 날부터 그룹간의 pH차가 크게 나타났으며, 특히나 김치 중량의 0.02%의 젖산을 첨가한 군 모두에서 대조군에 비해 pH가 현격히 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 숙성 14일 만에 대조군은 pH가 4.15로 낮아졌고, 절임양념을  $65^\circ\text{C}$ 에서 30분 열처리한 김치군 또한 4.24로 낮아졌으나, 나머지 처리군에서는 적숙기 pH인 4.3 보다 높은 수치를 나타냈다. 숙성 49일까지도 *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 2%의 lactose, 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, 절임양념을  $65^\circ\text{C}$ 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, 절임양념을  $65^\circ\text{C}$ 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군의 pH는 4.29에서 4.44 범위로 적숙기 김치 pH인 4.3 보다 높은 경향을 보였다. 이들 처리군의 발효가 지연됨을 알 수 있었고, 이 중 *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, 절임양념을  $65^\circ\text{C}$ 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군의 경우, 실험 종료일인 56일간의 발효에도 적숙기 상태를 유지함을 확인할 수 있었다. 또한 Table 1-2를 통해 산도의 변화를 살펴보면, pH와 유사한 경향을 보였다. 특히나, 김치를 제조한 당일의 산도를 살펴보면, 김치 중량의 0.02%의 젖산을 첨가한 군 모두에서 대조군에 비해 pH 결과와 유사한 결과로 산도가 높아지는 것을 확인하였다. 숙성 35일까지도 절임양념을  $65^\circ\text{C}$ 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, 절임양념을  $65^\circ\text{C}$ 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군의 산도는 0.77에서 0.87 범위로 적숙기 김치의 산도인 0.7~0.9 범위 내에 있는 경향을 보였다. 이들 처리군의 발효가 지연됨을 알 수 있었고, 이 중 *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군, 절임양념을  $65^\circ\text{C}$ 에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치군의 경우, 실험 종료일인 56일간의 발효에도 적숙기 상태의 산도를 유지함을 확인할 수 있었다.

Table 1-1. 종균을 첨가하여 담근 김치의 pH 변화

	Control	B	LA	B+LA	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> + lac	<i>Lc. lactis</i> + B	<i>Lc. lactis</i> + LA	<i>Lc. lactis</i> + B + LA
0일	5.55	5.54	4.58	4.64	5.18	5.21	5.18	4.57	4.58
14일	4.15	4.24	4.35	4.68	4.45	4.46	4.62	4.53	4.62
21일	3.99	4.09	4.20	4.23	4.24	4.20	4.55	4.29	4.46
28일	3.98	4.07	4.13	4.15	4.16	4.17	4.37	4.25	4.40
35일	4.08	4.12	4.24	4.12	4.25	4.23	4.32	4.42	4.39
42일	4.10	4.17	4.20	4.11	4.31	4.31	4.36	4.50	4.44
49일	4.11	4.14	4.23	4.07	4.29	4.29	4.3	4.44	4.39
56일	4.00	4.05	4.03	3.92	4.17	4.18	4.16	4.32	4.24

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, LA: 김치 중량의 0.02% 젖산 첨가 김치, B+LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 및 김치 중량 0.02% 젖산 첨가 김치, *Lc. lactis* : *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + lac: *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 2%의 lactose, 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + LA: *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B + LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-2. 종균을 첨가하여 담근 김치의 산도 변화

	Control	B	LA	B+LA	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> + lac	<i>Lc. lactis</i> + B	<i>Lc. lactis</i> + LA	<i>Lc. lactis</i> + B + LA
0일	0.18	0.18	0.30	0.27	0.23	0.23	0.18	0.27	0.32
14일	0.84	0.59	0.62	0.41	0.52	0.62	0.46	0.57	0.46
21일	0.77	0.77	0.82	0.55	0.59	0.73	0.55	0.73	0.59
28일	0.93	0.93	1.00	0.87	0.96	1.05	0.77	0.91	0.82
35일	1.14	1.00	0.96	0.91	1.00	1.05	0.82	0.87	0.77
56일	0.98	0.87	0.96	0.87	0.82	0.80	0.91	0.57	0.73

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, LA: 김치 중량의 0.02% 젖산 첨가 김치, B+LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 및 김치 중량 0.02% 젖산 첨가 김치, *Lc. lactis* : *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + lac: *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 2%의 lactose, 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + LA: *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B + LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

#### 나. 총균 및 유산균수의 변화

대조군 김치와 실험처리한 8군의 총균수와 유산균수의 변화를 살펴본 결과 총균수의 경우, 담금 당일에는 대조군에 비해 *Lc. lactis*를 첨가한 김치군의 총균수가 현저하게 높음을 알 수 있었다. 하지만 *Lc. lactis*와 함께 젖산이 첨가한 김치군의 경우 대조군과 유사한 균

수를 나타내었다. 이를 통해 젖산의 첨가로 인해 균의 일부가 저해 또는 사멸됨을 예측할 수 있었다. 숙성이 진행됨에 따른 총균수의 변화를 관찰한 결과, 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 균의 경우 총균수가 대조군에 비해 높게 나타나는 경향을 보였으며, 젖산을 첨가한 균의 경우 대조군에 비해 낮게 나타나는 경향을 통해 열처리와 젖산의 첨가가 균의 성장에 영향을 미침을 확인할 수 있었다. 이는 실험이 종료되는 56일 동안의 숙성기간 동안 동일한 경향을 보였으며, *Lc. lactis*만 첨가한 군과 대조군을 비교한 결과, *Lc. lactis* 첨가군의 경우 총균수가 지속적으로 높게 나타났으며, 이를 통해 첨가해준 균이 김치 내에 지속적으로 잘 유지되고 있음을 예측할 수 있었다. 유산균수의 변화를 살펴본 결과(Table 1-4), 총균수와 유사한 경향을 보였다. 담금 당일의 유산균수 비교 결과, 대조군에 비해 *Lc. lactis*를 첨가한 김치군의 유산균수가 현저하게 높게 나타났으며, 젖산을 첨가한 김치군의 경우 대조군과 유사하거나 현저하게 낮은 유산균수를 나타내었다. 이를 통해 총균수의 저해 또는 사멸 경향이 유산균수의 저해 또는 사멸을 통한 저감임을 예측할 수 있었다. 숙성이 진행됨에 따른 유산균수의 변화를 관찰한 결과, 총균수의 변화와 동일한 경향으로, 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 균의 경우 유산균수가 대조군에 비해 높게 나타나는 경향을 보였으며, 젖산을 첨가한 균의 경우 대조군에 비해 낮게 나타나는 경향을 통해 열처리와 젖산의 첨가가 유산균의 성장에도 영향을 미침을 확인할 수 있었다. 이는 실험이 종료되는 56일 동안의 숙성기간 동안 동일한 경향을 보였으며, *Lc. lactis*만 첨가한 군과 대조군을 비교한 결과, *Lc. lactis* 첨가군의 경우 유산균수가 지속적으로 높게 나타났다.

Table 1-3. 종균을 첨가하여 담근 김치의 총균수 변화

	Control	B	LA	B+LA	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> + lac	<i>Lc. lactis</i> + B	<i>Lc. lactis</i> + LA	<i>Lc. lactis</i> + B + LA
0일	8.1×10 <sup>5</sup>	8.5×10 <sup>5</sup>	3.4×10 <sup>5</sup>	4.2×10 <sup>5</sup>	2.6×10 <sup>7</sup>	3.8×10 <sup>7</sup>	2.9×10 <sup>7</sup>	3.5×10 <sup>5</sup>	3.3×10 <sup>5</sup>
14일	5.0×10 <sup>7</sup>	3.6×10 <sup>8</sup>	4.2×10 <sup>7</sup>	9.5×10 <sup>7</sup>	6.4×10 <sup>7</sup>	2.8×10 <sup>7</sup>	8.6×10 <sup>7</sup>	4.1×10 <sup>6</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>
21일	1.2×10 <sup>7</sup>	1.2×10 <sup>8</sup>	6.3×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>8</sup>	5.0×10 <sup>7</sup>	4.9×10 <sup>7</sup>	9.9×10 <sup>8</sup>	6.7×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>
28일	2.3×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>8</sup>	1.7×10 <sup>6</sup>	6.3×10 <sup>7</sup>	3.9×10 <sup>7</sup>	6.5×10 <sup>7</sup>	8.3×10 <sup>7</sup>	5.2×10 <sup>6</sup>	5.3×10 <sup>6</sup>
35일	3.8×10 <sup>6</sup>	3.0×10 <sup>7</sup>	1.8×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>7</sup>	5.8×10 <sup>7</sup>	4.2×10 <sup>7</sup>	3.9×10 <sup>7</sup>	2.5×10 <sup>6</sup>	2.9×10 <sup>6</sup>
56일	5.6×10 <sup>6</sup>	1.3×10 <sup>8</sup>	3.1×10 <sup>6</sup>	8.8×10 <sup>7</sup>	2.6×10 <sup>7</sup>	3.6×10 <sup>7</sup>	3.9×10 <sup>7</sup>	3.8×10 <sup>6</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, LA: 김치 중량의 0.02% 젖산 첨가 김치, B+LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 및 김치 중량 0.02% 젖산 첨가 김치, *Lc. lactis*: *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + lac: *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 2%의 lactose, 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + LA: *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B + LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis* 1×10<sup>7</sup> CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-4. 종균을 첨가하여 담근 김치의 유산균수 변화

	Control	B	LA	B+LA	<i>Lc. lactis</i>	<i>Lc. lactis</i> + lac	<i>Lc. lactis</i> + B	<i>Lc. lactis</i> + LA	<i>Lc. lactis</i> + B + LA
0일	$5.7 \times 10^5$	$1.4 \times 10^5$	$1.0 \times 10^5$	$3.9 \times 10^5$	$4.5 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$3.2 \times 10^7$	$3.5 \times 10^3$	$1.7 \times 10^4$
14일	$7.7 \times 10^7$	$5.8 \times 10^7$	$1.2 \times 10^7$	$1.9 \times 10^8$	$5.9 \times 10^7$	$6.4 \times 10^7$	$1.1 \times 10^8$	$9.5 \times 10^6$	$4.0 \times 10^6$
21일	$3.6 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$	$2.8 \times 10^8$	$5.1 \times 10^7$	$5.6 \times 10^7$	$9.1 \times 10^7$	$1.3 \times 10^7$	$5.3 \times 10^7$
28일	$1.8 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$1.1 \times 10^7$	$3.3 \times 10^8$	$5.0 \times 10^7$	$6.2 \times 10^7$	$8.1 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$	$1.4 \times 10^7$
35일	$1.1 \times 10^7$	$2.5 \times 10^8$	$6.1 \times 10^6$	$1.8 \times 10^8$	$6.1 \times 10^7$	$7.2 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$	$7.6 \times 10^6$	$2.6 \times 10^6$
56일	$7.5 \times 10^6$	$6.0 \times 10^7$	$3.6 \times 10^6$	$3.7 \times 10^7$	$1.2 \times 10^8$	$8.3 \times 10^7$	$7.7 \times 10^7$	$7.6 \times 10^6$	$5.7 \times 10^6$

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, LA: 김치 중량의 0.02% 젖산 첨가 김치, B+LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 및 김치 중량 0.02% 젖산 첨가 김치, *Lc. lactis*: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + lac: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 2%의 lactose, 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + LA: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B + LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

#### 다. DGGE법에 의한 미생물 군집 분석

대조군 김치와 실험처리한 8군의 미생물 군집을 분석하여 DGGE법을 통해 그 양상을 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 1-1., Fig. 1-2., Table 1-5와 같다. DGGE 분석을 통해 첨가한 *Lc. lactis*가 우점하고 있음을 확인하였고, 4주, 8주의 결과를 통해서도 첨가한 균이 발효기간이 지속됨에도 계속해서 유지되고 있을 뿐만 아니라 우점균으로 존재하고 있음도 확인할 수 있었다. 또한 김치 발효시 초기의 우점하는 균으로 알려진 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Weisella* sp. 이 *Lc. lactis* 첨가균에서 발현되지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 *Lc. lactis*를 첨가함에 따라 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Weisella* sp.의 발현을 억제함에 따른 효과를 보이고 있다는 것을 유추할 수 있다. Fig. 1-2에 thetacy calculator를 통해 분석한 결과를 phylogenetic tree로 나타냈으며, *Lc. lactis*를 첨가한 군간의 유의성의 높게 나타났으며, 젖산을 첨가한 군간의 유의성 또한 높게 나타났다. 이는 8주의 발효기간 동안에서 동일한 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

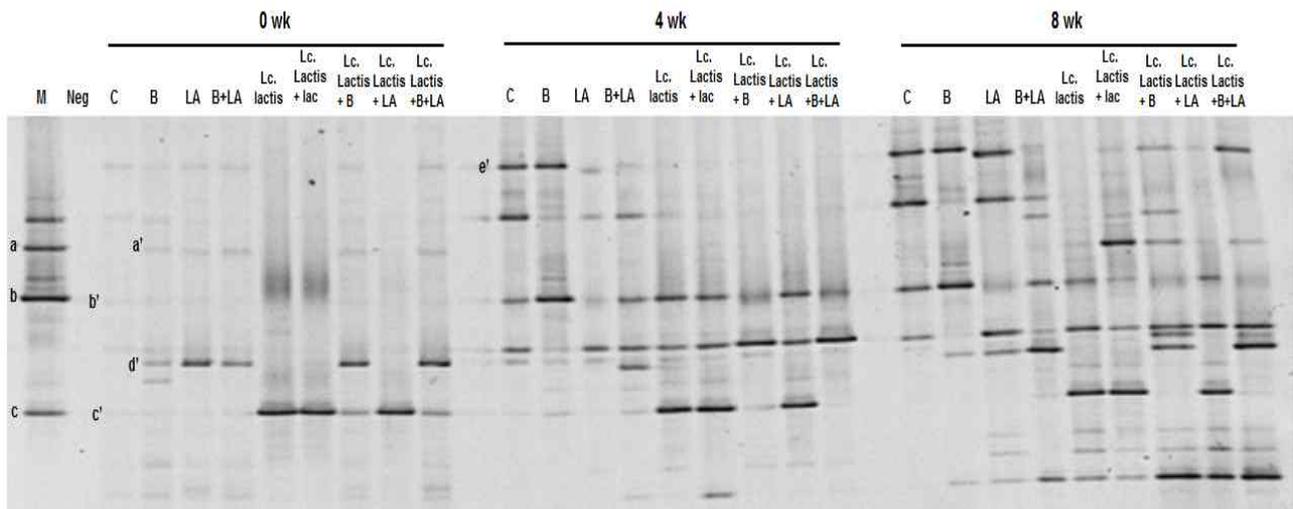


Fig. 1-1. DGGE법에 의한 미생물 군집 분석

Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, LA: 김치 중량의 0.02% 젖산 첨가 김치, B+LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 및 김치 중량 0.02% 젖산 첨가 김치, *Lc. lactis*: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + lac: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 2%의 lactose, 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + LA: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B + LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-5. DGGE법에 의한 미생물 분석

Band	Closet relatives	Accession No.	% Sequence similanty
a'	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KF673539.1	99
b'	<i>Lactobacillus sakei</i>	JN851763.1	92
c'	<i>Lactococcus lactis</i>	GU427920.1	98
d'	<i>Leuconostoc gelidum</i>	KF577567.1	96
e'	<i>Weissella</i> sp.	KF999720.1	99

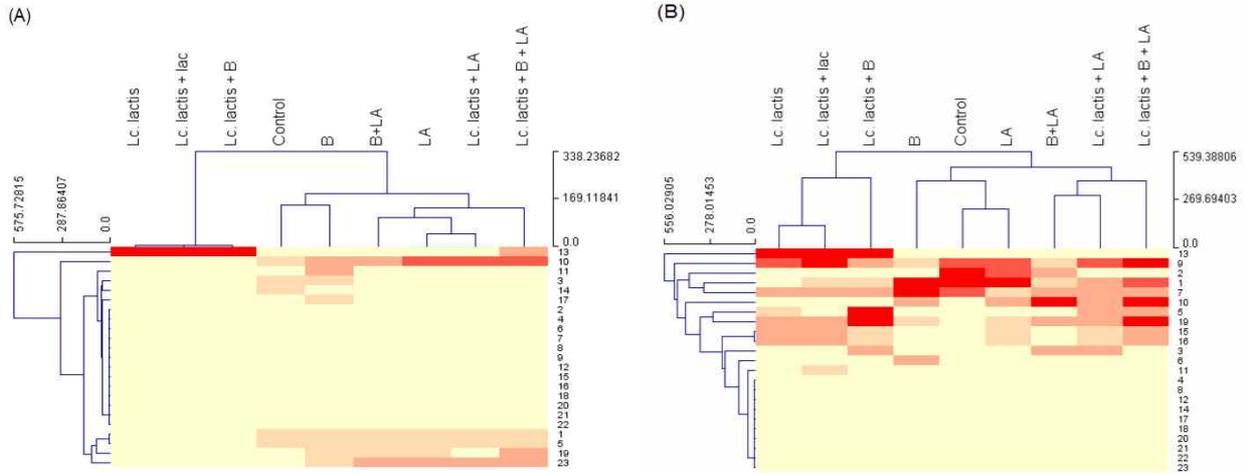


Fig. 1-2. Phylogenetic tree

(A) 0주, (B) 8주, Control: 대조군, B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리한 김치, LA: 김치 중량의 0.02% 젖산 첨가 김치, B+LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 및 김치 중량 0.02% 젖산 첨가 김치, *Lc. lactis* : *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + lac: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 2%의 lactose, 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + LA: *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, *Lc. lactis* + B + LA: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 0.02% 젖산, 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

#### 라. 관능평가

대조군 김치와 저장기간이 연장된 *Lc. lactis* 및 배양액을 첨가한 김치의 기호도를 평가하기 위하여 세계김치연구소 관능검사 요원 10명을 대상으로 양념냄새, 젓갈냄새, 이취, 군덕내, 짠맛, 매운맛, 쓴맛, 감칠맛, 단맛, 신맛, 이미, 붉은정도, 전체기호도 항목에 대해 7점 척도법으로 관능검사를 수행한 결과 중균첨가김치가 대체적으로 우수한 평가를 받았다.



Fig. 1-3. 관능평가

Control: 대조군, *Lc. lactis* : *Lc. lactis*  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치

## 제 4 절 미생물 첨가제 제형별에 따른 효과 분석

### 1. 실험방법

#### 가. 김치 첨가 배양액 제조

*Lc. lactis*를 MRS broth 5ml에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 1차 전배양을 하였다. 상기 1차 전배양액을 MRS 및 배추즙에 1.0%(v/v) 접종하여 30°C에서 18시간 동안 배양하였다. 실험에 사용한 배추즙은 배추를 블렌더로 분쇄, 착즙 후 재제염을 사용하여 식염 2%(v/v), 포도당 1.0%(w/v)를 첨가한 후, 멸균하여 배양액으로 이용하였다.

#### 나. Alginate beads 제조

위에서 설명한 바와 마찬가지로 *Lc. lactis*를 MRS broth에 배양한 후 8000rpm에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 농축하고 균액과 동량의 2% alginate를 첨가하여 최종적으로 1% alginate 용액을 제조하였다. 이러한 유산균과 alginate 1% 혼합용액을 2.0 mm의 비드로 코팅하여 10% 콩가루 수용액과 함께 48시간동안 동결건조 후 sodium citrate에 비드를 용해시켜 8000rpm, 10분 동안 원심분리를 통해 상등액을 제거하고 균체를  $1 \times 10^7$  CFU/g으로 균체 배양액과 함께 김치에 첨가하였다.

#### 다. 김치 제조

절임배추와 절임양념(배합비: 무 31.6%, 고춧가루 15.8%, 다시물 7.4%, 멸치액젓 7.5%, 새우젓 6.3%, 마늘 5.4%, 찹쌀죽 4.7%, 양파 3.2%, 대파 3.2%, 멸치젓 3.3%, 건고추 2.8%, 배 2.2%, 쪽파 1.6%, 생강 1.6%, 설탕 1.6%, 갓 0.9%, 황석어젓 0.9%)을 구매하였으며, 대조군, *Lc. lactis*를 MRS broth에 접종하여  $1 \times 10^7$  CFU/g과 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 그룹, *Lc. lactis*를 배추즙에 접종하여  $1 \times 10^7$  CFU/g과 김치 중량 10%의 *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 그룹, *Lc. lactis*를 MRS broth에 접종하여 alginate beads로 코팅하여 동결건조 후  $1 \times 10^7$  CFU/g과 김치 중량 10%의 배양액을 첨가한 그룹으로 구성하였다. 담근 중간김치는 PE 재질의 플라스틱 통에 담아 포장하여 8°C에서 저장하면서 실험을 수행하였다.

#### 라. 이화학 분석

제조한 3그룹의 실험군 김치와 대조군 김치를 대상으로 산도와 pH를 측정하였다. pH 및 산도를 측정하기 위하여 각 김치 300g을 분쇄 후 거즈로 여과하여 김치액을 제조하였다. 분쇄한 김치 100g을 pH 미터(Thermo Orion 720A., USA)를 이용하여 pH를 측정하였다. 산도는 분쇄 후 거른 김치액 20 ml를 0.1N NaOH을 사용하여 pH 8.3이 되도록 중

화학적 한 후, 소비된 NaOH량을 젖산 함량(%)으로 환산하여 나타내었다.

$$\text{총산(\%)} = a \times f \times F \times 5 \times \text{회석부피(ml)} / \text{시료량(g)}$$

a : 0.1N NaoH 용액의 소비 ml수

f : 0.1N NaoH 용액의 factor

F : 0.1N NaoH 용액의 1mL에 상당하는 유기산 계수(젖산인 경우 0.009)

#### 마. 유산균 분리 및 대장균군 계수

김치로부터 총균 첨가 방법에 따른 총균, 유산균 및 대장균군 분석을 수행하고자 300g의 김치 시료를 취한 후 살균된 blender에 곱게 갈아 25g을 225ml의 멸균 식염수와 함께 스토마커 백에 넣고 3분 동안 균질화 시켰다. 순차적으로 회석한 뒤, 총균은 3M사의 petrifilm 제품 aerobic count plate에 1ml씩 분주하여 30°C 에서 48시간 동안 배양하여 계수하였다. 유산균은 회석액을 다시 2X MRS broth에 1:1로 회석하여 3M사의 petrifilm 제품 aerobic count plate에 1ml씩 분주하여 30°C 에서 48시간 동안 혐기적으로 배양한 다음 계수 하였다. 대장균군 또한 3M사의 petrifilm 제품 petrifilm coliform count plate를 이용하여 1ml씩 떨어뜨려 30°C 에서 48시간 동안 배양한 뒤 계수하였다

#### 바. 미생물 첨가시기를 달리한 김치양념제조

절임양념(배합비: 무 31.6%, 고춧가루 15.8%, 다시물 7.4%, 멸치액젓 7.5%, 새우젓 6.3%, 마늘 5.4%, 찹쌀죽 4.7%, 양파 3.2%, 대파 3.2%, 멸치젓 3.3%, 건고추 2.8%, 배 2.2%, 쪽파 1.6%, 생강 1.6%, 설탕 1.6%, 갓 0.9%, 황석어젓 0.9%)을 구매하여 무처리 대조군, *Lc. lactis*를 MRS broth 5ml에 접종하여 30°C 에서 24시간 동안 1차 전배양시키고, 상기 1차 전배양액을 MRS 에 접종하여  $1 \times 10^5$  CFU/g을 절임양념에 처리하여 24시간 숙성시킨 그룹으로 구성하였다.

## 2. 실험결과

#### 가. *Lc. lactis*의 첨가방법을 달리한 김치의 pH 및 산도의 변화

김치를 제조하여 8°C 저장고에 저장하면서 이들의 pH와 산도의 경시적인 변화를 관찰하였다. Table 1-1에서 보듯이 대조군 김치와 배추즙에서 배양한 *Lc. lactis* 첨가 김치에서 숙성 14일 만에 적숙기의 pH인 pH 4.3 이하에 도달하였고, *Lc. lactis*를 MRS 배양액에 배양한 김치와 비드로 제조하여 첨가한 김치군은 대조군 김치보다 발효 진행을 늦춰, 적숙기 기간

을 연장시키는 경향을 보였다. 산도 역시 숙성 14일째 pH와 동일한 경향을 보여, *Lc. lactis*를 MRS 배양액에 배양한 김치와 비드로 제조하여 첨가한 김치균의 산도의 경우 대조군에 비해 천천히 증가함을 확인하였다.

#### 나. *Lc. lactis*의 첨가방법을 달리한 김치 균수의 변화

*Lc. lactis*를 첨가방법을 달리하여 첨가한 김치와 대조군 김치의 총균과 유산균수의 변화를 살펴본 결과 담금 당일에는 종균 *Lc. lactis*를 첨가한 김치와 대조군 사이에 현저한 차이가 있음을 알 수 있었으나, 대장균균을 측정된 결과에서는 균간의 차이를 보이지 않았다.

#### 다. *Lc. lactis*의 첨가시기를 달리한 김치 균수의 변화

*Lc. lactis*의 첨가시기를 달리한 절임양념의 균수변화를 확인하고자 한 결과 균을 첨가한 후 24시간동안 숙성시킨 후에도 대조군과 비슷한 수준으로 유지되는 것을 확인하였다.

Table 1-1. 미생물 첨가 방법에 따른 pH 변화(평균치)

(단위: CFU/g)

	Control	MRS	chinese cabbage juice	bead
0일	5.75	5.38	5.70	5.36
14일	4.27	4.89	4.35	4.66

Control: 대조군, MRS: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, MRS broth에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, chinese cabbage juice: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, 배추즙에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-2. 미생물 첨가 방법에 따른 산도 변화(평균치)

(단위: %)

	Control	MRS	chinese cabbage juice	bead
0일	0.23	0.23	0.18	2.51
14일	0.66	0.43	0.68	0.48

Control: 대조군, MRS: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, MRS broth에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, chinese cabbage juice: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, 배추즙에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-3. 미생물 첨가방법을 달리한 김치의 총균수 변화

(단위: CFU/g)

	Control	MRS	chinese cabbage juice	bead
0일	$4.70 \times 10^5$	$4.80 \times 10^8$	$1.16 \times 10^8$	$1.60 \times 10^8$

Control: 대조군, MRS: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, MRS broth에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, chinese cabbage juice: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, 배추즙에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-4. 미생물 첨가방법을 달리한 김치의 유산균수 변화

(단위: CFU/g)

	Control	MRS	chinese cabbage juice	bead
0일	$2.08 \times 10^6$	$5.70 \times 10^8$	$1.39 \times 10^8$	$9.70 \times 10^7$

Control: 대조군, MRS: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, MRS broth에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, chinese cabbage juice: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, 배추즙에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-5. 미생물 첨가방법을 달리한 김치의 대장균수 변화

(단위: CFU/g)

	Control	MRS	chinese cabbage juice	bead
0일	$1.15 \times 10^4$	$1.45 \times 10^4$	$2.05 \times 10^4$	$1.20 \times 10^4$

Control: 대조군, MRS: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, MRS broth에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치, chinese cabbage juice: 절임양념을 65°C에서 30분 열처리 후, 배추즙에 배양한 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^7$  CFU/g와 김치 중량 10% *Lc. lactis* 배양액 첨가 김치.

Table 1-6. 미생물 첨가시기를 달리한 절임양념의 총균수

(단위: CFU/g)

	Control	<i>Lc. lactis</i>
24시간	$6.10 \times 10^5$	$4.50 \times 10^4$

Control: 대조군, *Lc. lactis*: 절임양념에 *Lc. lactis*를  $1 \times 10^5$  CFU/g 첨가 김치

Table 1-7. 미생물 첨가시기를 달리한 절임양념의 유산균수

(단위: CFU/g)

	Control	<i>Lc. lactis</i>
24시간	1.41x10 <sup>6</sup>	7.45x10 <sup>6</sup>

Control: 대조군, *Lc. lactis*: 절임양념에 *Lc. lactis*를 1×10<sup>5</sup> CFU/g 첨가 김치

Table 1-8. 미생물 첨가시기를 달리한 절임양념의 대장균군수

(단위: CFU/g)

	Control	<i>Lc. lactis</i>
24시간	1.70x10 <sup>2</sup>	3.05x10 <sup>2</sup>

Control: 대조군, *Lc. lactis*: 절임양념에 *Lc. lactis*를 1×10<sup>5</sup> CFU/g 첨가 김치

### 3. 고찰

미생물 첨가제의 첨가시기와 첨가 방법에 따른 김치의 발효양상을 비교하고자 하였다. *Lc. lactis*를 첨가방법을 달리하여 제조한 김치를 8±0.5℃ 저장고에 저장하면서 이들의 pH, 산도, 총균수와 유산균수, 대장균군의 변화를 관찰하였다. 담금 당일의 총균수와 유산균수를 확인한 결과, 총균수와 유산균수는 대조군에 비해 큰 차이를 보였고 대장균군은 비슷한 수준으로 측정되었다. 7일째 숙성됨에 따라 실험 처리군의 총균수 및 유산균수가 높게 나타났으며, 균 첨가 방법에 따른 차이는 보이지 않았다. *Lc. lactis*와 김치 중량의 10% 배양액을 함께 첨가하여 잘 섞어준 후 김치를 담근 김치그룹들에서는 적숙기 상태의 pH를 대조군 대비 오랜 기간 동안 유지하고 있었으며, 산도가 가장 낮게 나타났다. 본 실험을 통해서 미생물 첨가방법을 달리한 김치를 제조함에 따라 미생물 활성의 차이가 나타나는지 확인하고자 하였지만 모두 비슷한 수준으로 발효지연 효과를 나타내었다. 따라서 *Lc. lactis*를 제제화 하여 이를 김치에 적용하여도 대조군과 비교하여 품질유지기한이 연장된 김치를 제조할 수 있을 것으로 사료되었다. 또한 미생물 첨가시기에 따른 미생물변화로 미루어 보았을 때 추가적인 숙성과정 없이 김치를 담글 때 절임양념에 중균과 함께 배양액을 잘 섞어 김치를 제조하는 것이 효과적으로 적용시킬 수 있는 방법으로 사료되었다.

## 제 5 절 미생물 첨가제를 이용한 저염김치 대장균군 제어 기술개발

통상적으로 김치 제조 시 김치의 주재료인 야채를 소금에 절여서 야채의 조직을 연하게 하여 김치의 식감을 향상시키고 양념의 침투를 용이하게 하며 보존성을 높여왔다. 이로 인해 김치에는 보통 2.5~3% 내외의 식염이 함유되어 있어 다량 섭취 시 염분으로 인해 여러 가지 순환기 질환의 발병 우려가 있으며, 뇌혈관 질환, 허혈성 심질환, 신장질환 등을 가진 40~70세 환자들은 김치를 선호하나, 염분 때문에 김치의 섭취를 제한해야 하는 어려움이 있었다. 최근에 건강에 대한 관심이 높아지면서 염도가 높은 김치에 대한 저염화에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 하지만 저염 김치의 등장으로 인한 김치의 위생적인 문제가 발생할 소지가 있다. 대장균군의 경우 발효가 진행될수록 감소되어 발효된 김치에서는 문제가 되지 않으나 일부 국가의 경우 초기 대장균군 균수를 제한하고 있어 수출에 어려움이 있다. 따라서 본 연구에서는 종균 첨가에 따른 저염 김치 대장균군 감소 효과를 알아보았다.

### 1. 실험방법

#### 가. 김치 첨가 배양액 제조

*Lc. lactis* 와 *Lb. brevis*를 MRS broth 5ml에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 1차 전배양을 하였다. 상기 1차 전배양을 배추즙에 1.0%(v/v) 접종 하여 30°C에서 18시간 동안 배양하였다. 실험에 사용한 배추즙은 배추를 블랜더로 분쇄, 착즙 후 재제염을 사용하여 식염 2%(v/v), 포도당 1.0%(w/v)를 첨가 한 후, 멸균하여 배양액으로 이용하였다.

#### 나. 김치 제조

염도 2% 이상 김치와 염도 1.4% 이하 저염김치 제조를 위하여 원료 배추를 잘 다듬은 후 천일염으로 제조한 10%(w/v)와 8%(w/v)의 소금용액에서 8~10시간 실내온도에서 절임하고 흐르는 물에 3회 세척하여 3~4시간 탈수하였다. 배합비는 탈수된 절임배추 100g에 대하여 파 1.241g, 마늘 0.6g, 생강 0.16g, 고춧가루 0.92g, 물 0.215g으로 하였고 제조된 김치의 염도는 약 2.0%와 1.4%를 나타내었다. 분리한 우수종균 *Lc. lactis*와 *Lb. brevis*는 김치 전체 중량에 대하여 배양액을 2.0%(w/v) 첨가하였다. 담은 종균김치는 나일론+PE용 포장지에 담아 포장하였다.

#### 다. 유산균 분리 및 대장균군 계수

적숙기 김치로부터 염도 2% 김치와 염도 1.4% 저염김치 간의 미생물 균집 비교 분석 및 대장균군 분석을 수행하고자 거즈를 이용하여 김치국물에 있는 고형분을 제거하고 순차적

으로 희석한 뒤, 유산균은 MRS Agar에 0.2% BPB 지시약 1%를 넣어 제조한 MRS-BPB 배지에 도말하여 30℃에서 48시간 동안 혐기적으로 배양한 다음 colony를 분리하였다. 대장균군은 3M사의 petrifilm 제품 petrifilm coliform count plate를 이용하여 1ml씩 떨어뜨려 37℃에서 24시간 동안 배양한 뒤 계수하였다.

## 2. 실험결과 및 고찰

### 가. 일반김치와 저염김치간의 미생물 군집 비교 분석

염도 2.0% 김치와 염도 1.4% 저염김치 간의 미생물 군집을 비교 분석해 본 결과 염도 2% 김치에서는 *Leu. mesenteroides*가 70%로 우점하고 있었으며 *W. cibaria*는 20%, *Leu. pseudomesenteroides*가 10%를 차지하고 있었다. 반면 1.4% 저염 김치에서는 *Leu. mesenteroides*가 84.22%, *Leu. lactis*가 5.26%, *Leu. pseudomesenteroides* 5.26%, *Leu. garlicum*이 5.26%로 우점하는 것으로 나타나 염도 차이에 따라 미생물 분포가 차이가 있음을 알 수 있었으며 이는 김치 발효 특성에 어느 정도 영향을 미칠 것으로 예상되었다.

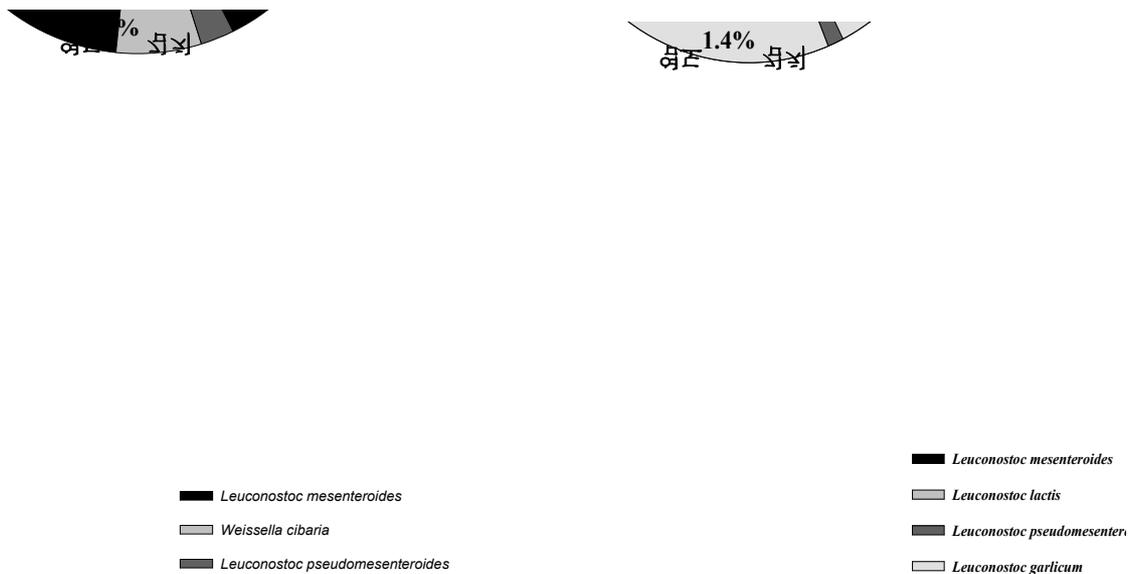


Fig. 1. 염도에 따른 미생물 군집 분포  
염도 1.4% 김치와 염도 2.0% 김치 비교

### 나. 미생물 첨가에 의한 대장균군 변화분석

대장균의 경우 발효가 진행될수록 감소되어 발효된 김치에서는 문제가 되지 않으나 일부 국가의 경우 초기 대장균군 군수를 제한하고 있어 수출에 어려움이 있다. 또한 최근에는 저염김치의 등장으로 위생적인 문제가 발생할 소지를 내포하고 있다.

종균 첨가 김치의 대장균군 군수 변화를 살펴본 결과 담금 당일에는 대조군과 유사한 군수를 나타내었지만 김치 발효가 진행됨에 따라 종균을 첨가한 실험군에서 대조군보다 그 감소속도가 훨씬 빠른 것으로 나타났다. 이는 첨가한 미생물들이 생산해내는 bacteriocin 등의 항균 물질이 이들 대장균군을 제어하는 것으로 사료되며 이들 항균물질의 특성 및 기작에 대해서는 향후 실험을 진행할 예정이다.

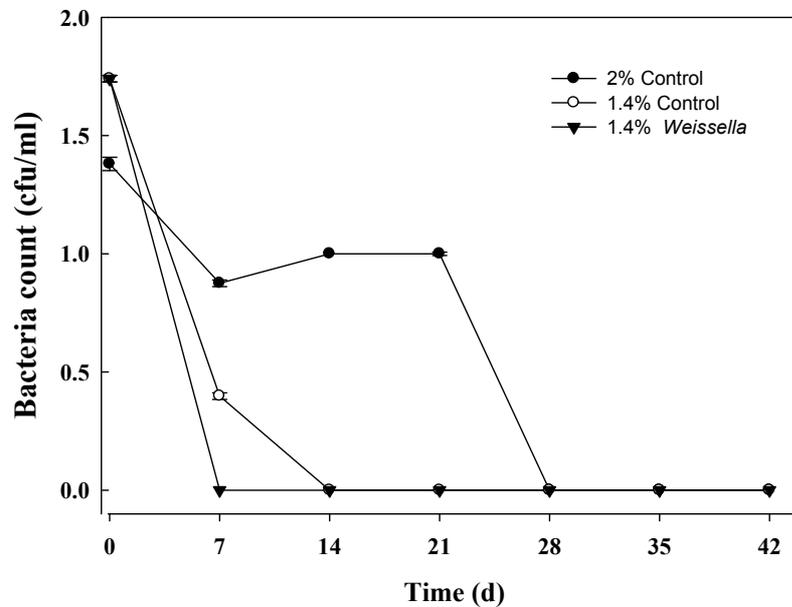


Fig. 2. 종균을 첨가하여 제조한 김치의 대장균군 변화 (4℃)

염도 2.0% Control: 일반김치 대조군, 염도 1.4% Control: 저염김치 대조군  
 염도 1.4% *W. cibaria* : *W. cibaria* 첨가 김치,

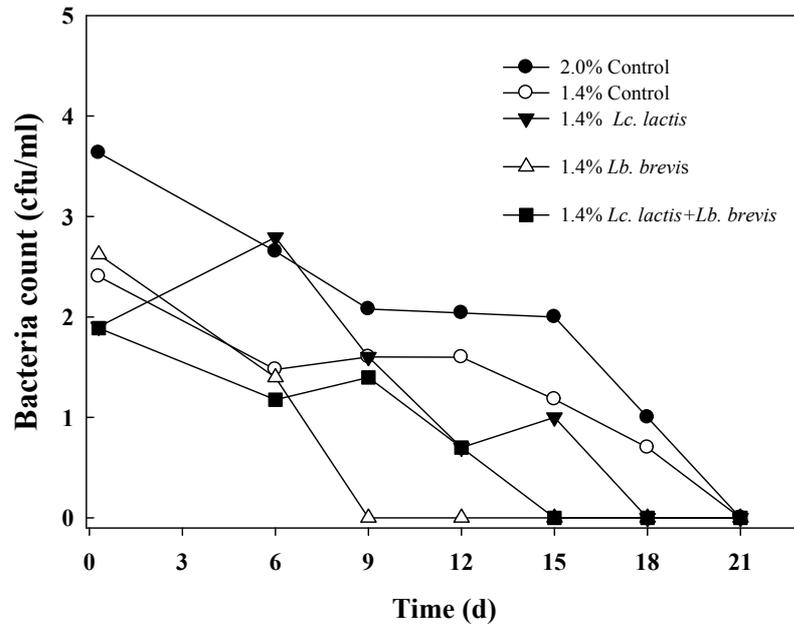


Fig. 3. 종균을 첨가하여 제조한 김치의 대장균군 변화 (10°C)

염도 2.0% Control: 일반김치 대조군, 염도 1.4% Control: 저염김치 대조군

1.4% *Lc. lactis*: *Lc. lactis* 2.0% 첨가 염도 1.4% 김치,

1.4% *Lb. brevis*: *Lb. brevis* 2.0% 첨가 염도 1.4% 김치,

1.4% *Lc. lactis* + *Lb. brevis*: *Lc. lactis* 1.0%, *Lb. brevis* 각각 1.0% 첨가 염도 1.4% 김치

## 제 6 절 계절별 원·부재료 미생물 분포 조사

미생물 조절에 의한 김치의 품질 균일화와 보존 기간 연장을 위해서는 우수한 김치발효 특성을 갖는 미생물 스타터의 개발이 필요하며, 이와 병행하여 김치제조용 원료의 청정화가 선행되어야 한다. 김치는 자연의 혼합 발효식품으로 초기에 원·부재료와 제조과정 중 여러 가지 미생물원으로 부터 주미생물인 유산균 외에 일반세균, 효모 및 곰팡이 그리고 오염지표균인 대장균까지 유래된다. 김치의 원부재료인 배추, 고춧가루, 파, 양파, 마늘, 생강 등에는 높은 수준의 대장균군이 존재하며, 김치 발효에 관여하는 80% 가량의 유산균이 절인 배추로부터 유래하는 등 김치의 발효양상 및 위생학적 측면에 있어 매우 중요한 영향을 미친다. 본 연구에서는 김치의 주원료인 배추를 포함한 시판 부재료의 초기균수를 조사하였다.

### 1. 실험방법

#### 가. 사용된 배추 및 기타 부재료

계절별 수확시기에 따른 원료배추는 겨울에는 영암, 해남에서 수확한 배추 2종과 대형마트에서 판매중인 국내산 배추 1종을 봄에는 해남과 국산배추를 실험에 사용하였다. 기타 실험에 사용한 김치제조용 부재료인 파, 고춧가루, 마늘, 생강, 무는 광주시내에 있는 대형마트들과 시장에서 구입하여 실험에 사용하였다.

#### 나. 사용 배지

총균수 측정을 위하여 plate count agar(PCA; Difco 제품), 유산균수는 *Lactobacilli* MRS agar와 broth(Difco 제품), 효모 및 곰팡이는 potato dextrose agar(PDA; Difco 제품), 대장균 수는 3M사의 petrifilm 제품인 petrifilm coliform count plate 배지를 사용하였다.

#### 다. 원·부재료의 전처리

원료배추의 경우, 겉잎을 떼어내고 절입하기 직전의 상태로 깨끗이 다듬은 후, 1/4 등분하여 겉잎과 속잎을 각각 100g 정도씩 고루 취하였다. 절입배추는 천일염으로 제조한 10%(w/v)의 소금용액에서 12~15시간 실내온도에서 절입하고 흐르는 물에 3회 세척하여 3~4시간 탈수시켰다. 시료는 곱게 다진 후에 25g을 취하여 100ml의 멸균 식염수와 함께 살균된 waring blender로 high speed에서 30초간 균질화 시켰다. 파, 마늘, 생강, 무 및 고춧가루는 김치 담그기 전의 상태로 다듬어 수돗물로 세척한 후, 위와 같은 방법으로 균질화시켰다. 균질화 시킨 각 시료는 필요에 따라 적당한 단계로 희석하여 spreading culture method 방법으로 총균수, 유산균수, 효모 및 곰팡이와 대장균군의 균수를 측정하였다.

## 2. 실험 결과

봄, 여름, 겨울철에 각기 다른 3 지역의 배추, 무, 마늘 생강, 파, 고춧가루를 구입하여 초기 균수를 측정하였다.

### 가. 배추

봄 배추의 총균수는  $1.68 \times 10^5$  cfu/g에서  $2.96 \times 10^5$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $2.3 \times 10^5$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $2.4 \times 10^3$  cfu/g 에서  $5 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $3.7 \times 10^3$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $2.17 \times 10^2$  cfu/g에서  $7.5 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $4.8 \times 10^2$  cfu/g이었다. 대장균군은  $2 \times 10^1$  cfu/g에서  $6.6 \times 10^3$  cfu/g의 범위에 있었으며 평균  $3.31 \times 10^3$  cfu/g이었다(Table 1-1, 1-4). 천일염에 절인 봄 배추의 총균수는  $4.9 \times 10^4$  cfu/g에서  $1.2 \times 10^5$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $8.5 \times 10^4$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $2 \times 10^2$  cfu/g에서  $4.33 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $3.17 \times 10^2$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $2.17 \times 10^2$  cfu/g에서  $7.5 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $4.8 \times 10^2$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않거나  $2.5 \times 10^3$  범위에 있었으며, 평균적으로  $1.25 \times 10^3$  cfu/g이었다. 여름 배추의 총균수는  $8.00 \times 10^5$  cfu/g에서  $8.15 \times 10^6$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $4.9 \times 10^6$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $1.39 \times 10^3$  cfu/g 에서  $4.20 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $9.26 \times 10^6$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $3.05 \times 10^2$  cfu/g에서  $1.16 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $8.33 \times 10^2$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않았다(Table 1-2, 1-4). 겨울철 영암, 해남, 국내산 배추의 총균수는  $1.60 \times 10^6$  cfu/g에서  $4.82 \times 10^6$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.02 \times 10^6$  cfu/g을 보였다. 유산균수는 평균  $1.43 \times 10^2$  cfu/g을 나타내었다. 효모 및 곰팡이는 검출되지 않거나  $3.6 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $8.2 \times 10^2$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않거나  $7.5 \times 10^1$  cfu/g의 범위에 있었으며 평균  $2.5 \times 10^1$  cfu/g을 나타내었다. 천일염에 절인 겨울 배추의 총균수는  $1.4 \times 10^5$  cfu/g에서  $1.73 \times 10^6$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $7.07 \times 10^5$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $1.4 \times 10^2$  cfu/g에서  $3.8 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $2.27 \times 10^2$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $1.6 \times 10^1$  cfu/g에서  $1.05 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $4.7 \times 10^2$  cfu/g 이었다. 대장균군은 검출되지 않았거나  $3 \times 10^1$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $1 \times 10^1$  cfu/g 이었다(Table 1-3, 1-5).

### 나. 무

봄 무의 경우 총균수는  $7.6 \times 10^2$  cfu/g에서  $3.5 \times 10^4$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로

로  $1.4 \times 10^4$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $5 \times 10^1$  cfu/g에서  $1.7 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $7.12 \times 10^2$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는 검출되지 않았다. 대장균군은 검출되지 않았거나  $7 \times 10^1$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $3.3 \times 10^1$  cfu/g 이었다(Table 1-1, 1-6). 여름 무의 경우 총균수는  $2.20 \times 10^4$  cfu/g에서  $4.40 \times 10^4$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $3.56 \times 10^4$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $1.70 \times 10^2$  cfu/g에서  $8.10 \times 10^4$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $2.77 \times 10^4$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $4.0 \times 10^1$  cfu/g에서  $3.30 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.47 \times 10^2$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않았다(Table 1-2, 1-6). 겨울 무의 경우 총균수는  $5.7 \times 10^3$  cfu/g에서  $1.02 \times 10^4$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $8.6 \times 10^3$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $5 \times 10^1$  cfu/g에서  $7.7 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $2.81 \times 10^3$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는 검출되지 않았거나  $1.5 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $6.7 \times 10^1$  cfu/g이었다. 대장균군은  $1.2 \times 10^1$  cfu/g에서  $1.52 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $6.6 \times 10^1$  cfu/g 이었다(Table 1-3, 1-6).

#### 다. 마늘

마늘의 경우 총균수는  $1.13 \times 10^6$  cfu/g에서  $1.37 \times 10^7$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $8.7 \times 10^6$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $1.34 \times 10^6$  cfu/g에서  $1.13 \times 10^7$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $7.4 \times 10^6$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는 검출되지 않았거나  $1.67 \times 10^4$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $5.6 \times 10^3$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않았다(Table 1-1, 1-7). 봄 마늘의 미생물 변화 양상은 껍질을 까지 않은 상태의 마늘의 경우와 많이 달랐다. 깎 마늘의 경우 수작업 및 기계작업에 의하여 이루어지므로 이러한 제조과정과 유통과정에서 많은 균이 오염될 수 있고, 껍질을 벗긴 상태에서 유통 중 균의 생육이 일어날 것으로 생각되었다. 여름에도 깎마늘을 구입하여 실험하였다. 그 결과, 총균수는  $1.80 \times 10^4$  cfu/g에서  $1.86 \times 10^7$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $9.93 \times 10^7$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $2.90 \times 10^6$  cfu/g에서  $1.37 \times 10^9$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $7.10 \times 10^8$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $7.0 \times 10^1$  cfu/g에서  $4.25 \times 10^4$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.45 \times 10^4$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않았거나  $1.10 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $3.67 \times 10^2$  cfu/g이었다(Table 1-2, 1-7). 겨울 마늘은 껍질을 까지 않은 상태의 마늘을 구입하여 실험 한 결과 총균수는  $3 \times 10^2$  cfu/g에서  $6.3 \times 10^2$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $5.2 \times 10^2$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $7.5 \times 10^1$  cfu/g에서  $1.3 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $1.02 \times 10^2$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이와 대장균군은 검출되지 않았다(Table 1-3, 1-7).

## 라. 생강

봄 생강의 경우 총균수는  $7.4 \times 10^3$  cfu/g에서  $2.01 \times 10^7$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $7 \times 10^6$  cfu/g을 보였다. 유산균수는 검출되지 않았거나  $8 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $8.9 \times 10^3$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $1.3 \times 10^3$  cfu/g에서  $1.14 \times 10^5$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $4.4 \times 10^4$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않거나  $2 \times 10^1$  cfu/g 범위에 있었으며 평균 6.6 cfu/g 이었다(Table 1-1, 1-8). 여름 생강의 경우 총균수는  $2.05 \times 10^5$  cfu/g에서  $5.20 \times 10^6$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.98 \times 10^6$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $6.05 \times 10^5$  cfu/g에서  $1.15 \times 10^7$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $6.05 \times 10^6$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $2.50 \times 10^2$  cfu/g에서  $1.07 \times 10^4$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $5.0 \times 10^2$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출되지 않거나  $4.35 \times 10^4$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $1.51 \times 10^4$  cfu/g 이었다(Table 1-2, 1-8). 겨울 생강의 경우 총균수는  $1.68 \times 10^6$  cfu/g에서  $4.6 \times 10^7$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $2.38 \times 10^7$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $3.67 \times 10^2$  cfu/g에서  $9 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $6.34 \times 10^2$  cfu/g이었다. 효모 및 곰팡이는  $2 \times 10^3$  cfu/g에서  $2.39 \times 10^4$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.3 \times 10^4$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출 되지 않았다(Table 1-3, 1-8).

## 마. 파

봄철 파의 총균수는  $5 \times 10^2$  cfu/g에서  $2.5 \times 10^3$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.4 \times 10^3$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $2.3 \times 10^2$  cfu/g에서  $4.7 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $3.43 \times 10^2$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이와 대장균군은 검출 되지 않았다(Table 1-1, 1-9). 여름철 파의 총균수는  $8.80 \times 10^5$  cfu/g에서  $2.78 \times 10^6$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.78 \times 10^6$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $7.20 \times 10^2$  cfu/g에서  $1.41 \times 10^4$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $5.11 \times 10^4$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는  $2.50 \times 10^2$  cfu/g에서  $9.50 \times 10^3$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $3.58 \times 10^3$  cfu/g 이었다. 대장균군은  $3.25 \times 10^4$  cfu/g에서  $5.95 \times 10^5$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $4.98 \times 10^4$  cfu/g 이었다(Table 1-2, 1-9). 겨울철 파의 경우 총균수는  $1.12 \times 10^4$  cfu/g에서  $1.47 \times 10^7$  cfu/g의 범위에 있었으며, 평균적으로  $4.9 \times 10^6$  cfu/g을 보였다. 유산균수는  $2.3 \times 10^2$  cfu/g에서  $4.7 \times 10^2$  cfu/g 범위에 있었으며 평균  $3.43 \times 10^2$  cfu/g 이었다. 효모 및 곰팡이는 검출되지 않거나  $5 \times 10^1$  cfu/g 범위에 있었으며, 평균적으로  $1.6 \times 10^1$  cfu/g이었다. 대장균군은 검출 되지 않았다(Table 1-3, 1-9).

## 바. 고추가루

김치제조용 시판 고춧가루의 경우 총균수는 최저  $3.4 \times 10^4$  cfu/g에서 최고  $6.78 \times 10^7$

cfu/g로 큰 차이를 보였고, 봄철, 여름철, 겨울철 큰 변화는 없었다. 효모와 곰팡이는 검출되지 않았거나  $3.45 \times 10^3$  cfu/g의 변화폭을 보였으며, 대장균군의 균수는 검출되지 않았거나  $6.6 \times 10^3$  cfu/g을 보였고 유산균수는  $1.40 \times 10^2$  cfu/g에서  $6.2 \times 10^6$  cfu/g 정도의 큰 차이를 보였다(Table 1-10). 이러한 결과로부터 시판용 고춧가루에서의 미생물 균수의 변화는 고추의 수확 후 고춧가루의 제조 및 저장 조건에 따라 크게 좌우될 것으로 판단되었다.

Table 1-1. 봄철 초기균수 결과(평균치)

(단위: CFU/g)

	무	배추	절임배추	마늘	생강	파	고춧가루
총균수	$1.40 \times 10^4$	$2.30 \times 10^5$	$8.50 \times 10^4$	$8.70 \times 10^6$	$7.00 \times 10^6$	$1.40 \times 10^3$	$2.34 \times 10^7$
유산균	$7.12 \times 10^2$	$3.70 \times 10^3$	$3.17 \times 10^2$	$7.40 \times 10^6$	$8.90 \times 10^3$	$1.72 \times 10^2$	$2.94 \times 10^4$
효모 및 곰팡이	ND	$4.80 \times 10^2$	$4.80 \times 10^2$	$5.60 \times 10^3$	$4.40 \times 10^4$	ND	$2.10 \times 10^2$
대장균군	$3.30 \times 10^1$	$3.31 \times 10^3$	$1.25 \times 10^3$	ND	6.6	ND	$1.80 \times 10^3$

ND : not detected

Table 1-2. 여름철 초기균수 결과(평균치)

(단위: CFU/g)

	무	배추	마늘	생강	파	고춧가루
총균수	$3.56 \times 10^4$	$4.90 \times 10^6$	$9.93 \times 10^7$	$1.98 \times 10^6$	$1.78 \times 10^6$	$4.15 \times 10^6$
유산균	$2.77 \times 10^4$	$9.26 \times 10^6$	$7.10 \times 10^8$	$6.05 \times 10^6$	$5.11 \times 10^4$	$1.02 \times 10^3$
효모 및 곰팡이	$1.47 \times 10^2$	$8.33 \times 10^2$	$1.45 \times 10^4$	$5.00 \times 10^2$	$3.58 \times 10^3$	$3.45 \times 10^3$
대장균군	ND	ND	$3.67 \times 10^2$	$1.51 \times 10^4$	$4.98 \times 10^4$	$2.00 \times 10^3$

ND : not detected

Table 1-3. 겨울철 초기균수 결과(평균치)

(단위: CFU/g)

	무	배추	절임배추	마늘	생강	파	고춧가루
총균수	$8.60 \times 10^3$	$1.02 \times 10^6$	$7.07 \times 10^5$	$5.20 \times 10^2$	$2.38 \times 10^7$	$4.90 \times 10^6$	$1.15 \times 10^7$
유산균	$2.81 \times 10^3$	$1.43 \times 10^2$	$2.27 \times 10^2$	$1.02 \times 10^2$	$6.34 \times 10^2$	$3.43 \times 10^2$	$2.20 \times 10^6$
효모 및 곰팡이	$6.70 \times 10^1$	$8.20 \times 10^2$	$4.70 \times 10^2$	ND	$1.30 \times 10^4$	$1.60 \times 10^1$	$6.40 \times 10^2$
대장균군	$6.60 \times 10^1$	$2.50 \times 10^1$	$1.00 \times 10^1$	ND	ND	ND	$2.40 \times 10^3$

ND : not detected

Table 1-4. 계절별 배추 초기균수 결과

(단위: CFU/g)

		총균수	유산균	효모 및 곰팡이	대장균군
봄철	해남 배추	$1.68 \times 10^5$	$5.00 \times 10^3$	$2.17 \times 10^2$	$2.00 \times 10^1$
	국산 배추	$2.96 \times 10^5$	$2.40 \times 10^3$	$7.50 \times 10^2$	$6.60 \times 10^3$
여름철	국산 배추	$8.00 \times 10^5$	$1.39 \times 10^3$	$1.03 \times 10^3$	ND
	국산 배추	$8.15 \times 10^6$	$4.20 \times 10^3$	$1.16 \times 10^3$	ND
	국산 배추	$5.75 \times 10^6$	$2.50 \times 10^3$	$3.05 \times 10^2$	ND
겨울철	영암 배추	$9.90 \times 10^5$	$1.80 \times 10^2$	$3.60 \times 10^2$	ND
	해남 배추	$1.60 \times 10^6$	$2.50 \times 10^2$	ND	ND
	국산 배추	$4.86 \times 10^4$	ND	$2.10 \times 10^3$	$7.50 \times 10^1$

ND : not detected

Table 1-5. 계절별 절임배추 초기균수 결과

(단위: CFU/g)

		총균수	유산균	효모 및 곰팡이	대장균군
봄철	해남 절임배추	$4.90 \times 10^4$	$2.00 \times 10^2$	$2.17 \times 10^2$	ND
	국산 절임배추	$1.20 \times 10^5$	$4.33 \times 10^2$	$7.50 \times 10^2$	$2.50 \times 10^3$
겨울철	영암 절임배추	$1.40 \times 10^5$	$3.80 \times 10^2$	$3.30 \times 10^2$	$3.00 \times 10^1$
	해남 절임배추	$2.50 \times 10^5$	$1.60 \times 10^2$	$1.60 \times 10^1$	ND
	국산 절임배추	$1.73 \times 10^6$	$1.40 \times 10^2$	$1.05 \times 10^3$	ND

ND : not detected

Table 1-6. 계절별 무 초기균수 결과

(단위: CFU/g)

		총균수	유산균	효모 및 곰팡이	대장균군
봄철	제주 무	$7.60 \times 10^2$	$5.00 \times 10^1$	ND	ND
	국산 무	$3.50 \times 10^4$	$1.70 \times 10^3$	ND	$7.00 \times 10^1$
	밀양 무	$7.30 \times 10^3$	$3.80 \times 10^2$	ND	$3.00 \times 10^1$
여름철	국산 무	$4.10 \times 10^4$	$8.10 \times 10^4$	$7.0 \times 10^1$	ND
	국산 무	$2.20 \times 10^4$	$1.70 \times 10^2$	$4.0 \times 10^1$	ND
	국산 무	$4.40 \times 10^4$	$2.08 \times 10^3$	$3.30 \times 10^2$	ND
겨울철	제주 무	$5.70 \times 10^3$	$6.70 \times 10^2$	$5.00 \times 10^1$	$3.50 \times 10^1$
	임실 무	$9.90 \times 10^3$	$7.70 \times 10^3$	$1.50 \times 10^2$	$1.20 \times 10^1$
	단양 무	$1.02 \times 10^4$	$5.00 \times 10^1$	ND	$1.52 \times 10^2$

ND : not detected

Table 1-7. 계절별 마늘 초기균수 결과

(단위: CFU/g)

		총균수	유산균	효모 및 곰팡이	대장균군
봄철	국산 마늘	$1.12 \times 10^7$	$1.13 \times 10^7$	$1.67 \times 10^4$	ND
	서산 마늘	$1.13 \times 10^6$	$1.34 \times 10^6$	ND	ND
	남해 마늘	$1.37 \times 10^7$	$9.6 \times 10^6$	$5 \times 10^1$	ND
여름철	국산 마늘	$1.80 \times 10^4$	$2.90 \times 10^6$	$4.25 \times 10^4$	$1.10 \times 10^3$
	국산 마늘	$1.12 \times 10^7$	$7.60 \times 10^8$	$1.00 \times 10^3$	ND
	국산 마늘	$1.86 \times 10^7$	$1.37 \times 10^9$	$7.0 \times 10^1$	ND
겨울철	나주 마늘	$6.3 \times 10^2$	$7.5 \times 10^1$	ND	ND
	함평 마늘	$6.3 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$	ND	ND
	해남 마늘	$3 \times 10^2$	$1 \times 10^2$	ND	ND

ND : not detected

Table 1-8. 계절별 생강 초기균수 결과

(단위: CFU/g)

		총균수	유산균	효모 및 곰팡이	대장균군
봄철	국산 생강	$2.01 \times 10^7$	$2.60 \times 10^4$	$1.14 \times 10^5$	ND
	서산 생강	$7.40 \times 10^3$	$8.00 \times 10^2$	$1.30 \times 10^3$	$2.00 \times 10^1$
	경남 생강	$8.70 \times 10^5$	ND	$1.54 \times 10^4$	ND
여름철	국산 생강	$5.45 \times 10^5$	$1.15 \times 10^7$	$1.07 \times 10^4$	ND
	국산 생강	$5.20 \times 10^6$	$6.50 \times 10^5$	$2.50 \times 10^2$	$4.35 \times 10^4$
	국산 생강	$2.05 \times 10^5$	$6.00 \times 10^6$	$4.05 \times 10^3$	$1.85 \times 10^3$
겨울철	국산 생강	$1.68 \times 10^6$	$3.67 \times 10^2$	$2.39 \times 10^4$	ND
	서산 생강	$4.60 \times 10^7$	$9.00 \times 10^2$	$2.00 \times 10^3$	ND

ND : not detected

Table 1-9. 계절별 과 초기균수 결과

(단위: CFU/g)

		총균수	유산균	효모 및 곰팡이	대장균군
봄철	국산 과	$1.30 \times 10^3$	$4.00 \times 10^2$	ND	ND
	밀양 과	$5.00 \times 10^2$	$5.00 \times 10^1$	ND	ND
	무안 과	$2.50 \times 10^3$	$6.70 \times 10^1$	ND	ND
여름철	국산 과	$2.78 \times 10^6$	$1.41 \times 10^5$	$2.50 \times 10^2$	$3.25 \times 10^4$
	국산 과	$1.68 \times 10^6$	$1.17 \times 10^4$	$1.00 \times 10^3$	$5.75 \times 10^4$
	국산 과	$8.80 \times 10^5$	$7.20 \times 10^2$	$9.50 \times 10^3$	$5.95 \times 10^4$
겨울철	신안 과	$1.12 \times 10^4$	$2.30 \times 10^2$	ND	ND
	정읍 과	$1.47 \times 10^7$	$4.70 \times 10^2$	ND	ND
	진도 과	$2.20 \times 10^4$	$3.30 \times 10^2$	$5.00 \times 10^1$	ND

ND : not detected

Table 1-10. 계절별 고춧가루 초기균수 결과

(단위: CFU/g)

		총균수	유산균	효모 및 곰팡이	대장균군
봄철	한남 고춧가루	$2.47 \times 10^6$	$5.80 \times 10^4$	$1.70 \times 10^2$	$5.00 \times 10^3$
	한성 고춧가루	$6.78 \times 10^7$	$3.01 \times 10^4$	$4.50 \times 10^2$	$4.90 \times 10^2$
	영광 고춧가루	$3.40 \times 10^4$	$2.00 \times 10^2$	$1.30 \times 10^1$	$6.70 \times 10^1$
여름철	경북영양 고춧가루	$3.90 \times 10^6$	$3.90 \times 10^2$	$3.45 \times 10^3$	$2.00 \times 10^3$
	국산	$7.35 \times 10^6$	$1.40 \times 10^2$	-	-
	국산	$1.15 \times 10^6$	$2.53 \times 10^3$	-	-
겨울철	안면도 고춧가루	$3.30 \times 10^7$	$6.20 \times 10^6$	$1.33 \times 10^3$	$6.60 \times 10^3$
	고창 고춧가루	$1.20 \times 10^6$	$2.00 \times 10^5$	$6.00 \times 10^2$	$6.70 \times 10^2$
	경북영양	$4.00 \times 10^5$	$9.30 \times 10^4$	ND	ND

ND : not detected

## 제 7 절 처리방법에 따른 원부재료 초기균수 저감화 조사

원·부재료 초기균수를 측정한 결과, 김치의 원부재료인 배추, 고춧가루, 파, 양파, 마늘, 생강 등에는 높은 수준의 대장균군이 존재함을 확인 하였다. 미생물첨가제 이용시 이들이 김치의 발효양상 및 위생학적 측면에 있어 매우 중요한 영향을 미칠 수 있기에, 본 연구에서는 김치의 주원료인 배추를 포함한 시판 부재료의 초기균수 저감화 방안을 조사하였다.

### 1. 실험방법

#### 가. 사용된 배추 및 기타 부재료

원료배추 및 김치제조용 부재료인 파, 고춧가루, 마늘, 생강, 무는 광주시내에 있는 대형 마트에서 판매중인 국내산 재료들을 구입하여 실험에 사용하였다.

#### 나. 사용 배지

총균수, 유산균수 측정을 위하여 petrifilm(aerobic count plate:3M 제품), 효모 및 곰팡이는 petrifilm(yeast and mold count plate:3M 제품), 대장균군 수 또한 3M사의 petrifilm 제품인 petrifilm coliform count plate 배지를 사용하였다.

#### 다. 공정별 미생물 균수 변화

##### (1) 원·부재료의 전처리

원료배추의 경우, 겉잎을 떼어내고 절임하기 직전의 상태로 깨끗이 다듬은 후, 1/4 등분하여 겉잎과 속잎을 각각 50g 정도씩 고루 취하였다. 절임배추는 천일염으로 제조한 10%(w/v)의 소금용액에서 8~10시간 실내온도에서 절임하고 흐르는 물에 3회 세척하여 3~4시간 탈수시켰다. 소독수 처리용 원료는 흐르는 물에 세척하여 준비하였고, 저온살균용 원료는 김치 담그기 직전의 상태로 손질하여 준비하였다. 준비된 시료는 소독한 blender공게 다진 후에 25g을 취하여 225ml의 멸균 식염수와 함께 살균된 waring blender로 high speed에서 30초간 균질화 시켰다. 파, 마늘, 생강, 무 및 고춧가루는 김치 담그기 전의 상태로 다듬어 수돗물로 세척한 후, 위와 같은 방법으로 균질화시켰다. 균질화 시킨 각 시료는 필요에 따라 적당한 단계로 희석하여 총균수, 유산균수, 효모 및 곰팡이와 대장균군의 균수를 측정하였다.

##### (2) 소독수에 의한 초기균수 저감화

원·부재료 세척용 소독수는 시중에 판매중인 4% 차아염소산나트륨액을 400배 희석하여 100ppm으로 제조하여 사용하였다. 각 재료들을 흐르는 물에 세척하여 제조한 소독

수에 각 0분, 2분, 5분동안 침지하여 초기균수를 측정하였다.

### (3) 저온살균에 의한 초기균수 저감화

각 재료들을 흐르는 물에 세척한 후 김치 담그기 전의 상태로 다듬은 후에 100g씩 취하여 65°C에 맞춰진 항온수조에서 30분간 침지시켜 살균처리 하였다.

### (4) 김치 양념의 제조

각 재료들을 전처리한 후 절임배추 83.8, 고춧가루 3, 무 3, 마늘 2.5, 생강 0.8, 파 2.5, 물 4.4 비율로 양념을 제조하고 실험구는 무처리구, 소독수 5분 처리구, 저온살균 처리구로 진행하였다.

## 2. 실험 결과 및 고찰

Table 1-1에서 김치 원·부재료들의 초기균수 저감화 방안을 탐색하기 위해 광주시내 대형마트에서 구입한 시료들을 소독수 침지 및 저온살균 방법을 사용하여 비교하였다. 배추의 총균수는 평균적으로  $3.70 \times 10^6$  CFU/g 범위에 있었으며, 유산균수는 평균  $1.75 \times 10^5$  CFU/g을 나타내었다. 효모 및 곰팡이는 평균적으로  $1.15 \times 10^3$  CFU/g 범위에 있었으며, 대장균군은 검출되지 않았다. 실험결과 소독수 5분 처리구에서 초기 효모 및 곰팡이 수가 34% 저감화 되었다.

천일염에 절인 배추의 총균수는 평균적으로  $4.65 \times 10^5$  CFU/g를 나타내었고 유산균수는 평균  $4.52 \times 10^4$  CFU/g를 나타내었다. 효모 및 곰팡이는 평균  $1.55 \times 10^3$  CFU/g 이었고 대장균군은  $1.35 \times 10^3$  CFU/g 범위에 있었다. 실험결과 소독수 5분 처리구에서 초기 대장균군, 효모 및 곰팡이수가 각각 31%, 100% 저감화 되었다.

무의 경우 총균수는 평균  $4.10 \times 10^4$  CFU/g을 보였다. 유산균수는 평균  $6.50 \times 10^4$  CFU/g 이었다. 효모 및 곰팡이는 평균적으로  $2.00 \times 10^1$  CFU/g이었다. 대장균군은 평균  $1.25 \times 10^3$  CFU/g 이었다. 실험결과 소독수 5분 처리구에서 초기 대장균군, 효모 및 곰팡이 수가 각각 22%, 60% 저감화 되었다.

마늘의 총균수는 평균적으로  $3.05 \times 10^7$  CFU/g을 보였다. 유산균수는 평균  $1.60 \times 10^9$  CFU/g 이었다. 효모 및 곰팡이는 평균  $1.35 \times 10^4$  이었고 대장균군은 검출되지 않았다. 실험결과 소독수 5분 처리구에서 초기 효모 및 곰팡이수가 22% 저감화 되었다.

생강의 경우 총균수는 평균적으로  $5.45 \times 10^5$  CFU/g를 나타내었다. 유산균수는 평균  $1.26 \times 10^6$  CFU/g이었고 효모 및 곰팡이는 평균적으로  $1.05 \times 10^3$  CFU/g를 나타내었다. 대장균군은 검출 되지 않았다. 실험결과 소독수 5분 처리구에서 초기 효모 및 곰팡이 수가 100% 저감화 되었다.

파의 경우 총균수는 평균적으로  $2.78 \times 10^6$  CFU/g을 보였다. 유산균수는 평균  $1.88 \times 10^7$  CFU/g이었다. 효모 및 곰팡이는  $1.75 \times 10^3$  CFU/g 범위에 있었으며, 대장균군은  $1.35 \times 10^4$

CFU/g을 보였다. 실험결과 소독수 5분 처리구에서 초기 대장균군 수는 44% 저감화되었으나, 효모 및 곰팡이 수는 감소되지 않았다.

김치제조용 시판 고춧가루의 경우 총균수는 평균  $1.00 \times 10^7$  CFU/g 였고, 유산균수는  $1.92 \times 10^5$  이었다. 효모와 곰팡이는  $3.45 \times 10^3$  CFU/g으로 측정되었으며, 대장균군의 균수는  $4.00 \times 10^2$  CFU/g을 보였다. 재료특성상, 소독수 처리에 의한 저감화 실험은 가능하지 않았다.

마지막으로 각 시료들을 배합하여 양념을 제조하여 소독수 5분 처리한 그룹과 무처리구 시료들을 이용해 만든 양념을 65°C에서 30분 저온살균하여 대조군과 초기균수를 비교해 보았을 때, 무처리구에서의 초기 총균수는 평균  $1.23 \times 10^7$  CFU/g 이었고, 유산균수는  $4.20 \times 10^6$ 이였다. 효모와 곰팡이는  $2.85 \times 10^3$  CFU/g으로 측정되었다. 이에 소독수를 5분 처리한 결과, 초기 효모 및 곰팡이 수가 7% 저감화 되었고 65°C, 30분 저온살균처리한 그룹에서 초기 효모 및 곰팡이 수가 각각 18% 저감화 되었으며 대장균군은 검출되지 않았다.

이러한 결과로부터 시판용 소독수와 저온살균 처리 후 미생물 균수의 변화로 미루어 보았을 때 소독수에 의한 살균 효과보다는 저온살균에 의한 저감화 효과가 클 것으로 판단되었다.

Table 1-1. 소독수 처리에 의한 초기균 저감화(평균치)

(단위: CFU/g)

	무			배추			절임배추			마늘			생강			파			고춧가루		
	0분	2분	5분	0분	2분	5분															
총균수	4.10 x10 <sup>4</sup>	2.60 x10 <sup>3</sup>	6.10 x10 <sup>3</sup>	3.70 x10 <sup>6</sup>	2.85 x10 <sup>5</sup>	1.80 x10 <sup>5</sup>	4.65 x10 <sup>5</sup>	4.55 x10 <sup>4</sup>	3.55 x10 <sup>4</sup>	3.05 x10 <sup>7</sup>	2.45 x10 <sup>7</sup>	1.70 x10 <sup>7</sup>	5.45 x10 <sup>5</sup>	1.70 x10 <sup>5</sup>	3.80 x10 <sup>6</sup>	2.78 x10 <sup>6</sup>	1.06 x10 <sup>5</sup>	1.20 x10 <sup>5</sup>	1.00 x10 <sup>7</sup>	-	-
유산균	6.50 x10 <sup>4</sup>	1.41 x10 <sup>5</sup>	1.47 x10 <sup>5</sup>	1.75 x10 <sup>5</sup>	1.16 x10 <sup>5</sup>	2.20 x10 <sup>2</sup>	4.52 x10 <sup>4</sup>	3.86 x10 <sup>4</sup>	2.30 x10 <sup>3</sup>	1.60 x10 <sup>9</sup>	4.10 x10 <sup>7</sup>	3.00 x10 <sup>7</sup>	1.26 x10 <sup>6</sup>	9.30 x10 <sup>5</sup>	2.84 x10 <sup>6</sup>	1.88 x10 <sup>7</sup>	2.60 x10 <sup>4</sup>	5.00 x10 <sup>2</sup>	1.92 x10 <sup>5</sup>	-	-
효모 및 곰팡이	2.00 x10 <sup>1</sup>	5.50 x10 <sup>1</sup>	3.50 x10 <sup>1</sup>	1.15 x10 <sup>3</sup>	9.50 x10 <sup>1</sup>	1.20 x10 <sup>2</sup>	1.55 x10 <sup>3</sup>	ND	ND	1.35 x10 <sup>4</sup>	1.50 x10 <sup>2</sup>	1.63 x10 <sup>3</sup>	5.05 x10 <sup>3</sup>	ND	ND	1.75 x10 <sup>3</sup>	4.30 x10 <sup>3</sup>	3.25 x10 <sup>3</sup>	3.45 x10 <sup>3</sup>	-	-
대장균군	3.25 x10 <sup>3</sup>	7.00 x10 <sup>1</sup>	2.50 x10 <sup>1</sup>	ND	ND	ND	1.35 x10 <sup>3</sup>	3.50 x10 <sup>2</sup>	4.50 x10 <sup>2</sup>	ND	ND	ND	8.00 x10 <sup>3</sup>	1.85 x10 <sup>3</sup>	ND	1.35 x10 <sup>4</sup>	2.80 x10 <sup>4</sup>	1.60 x10 <sup>2</sup>	4.00 x10 <sup>2</sup>	-	-

ND : not detected

0분: 재료를 소독수에 처리하지 않은 그룹, 2분: 재료를 소독수에 2분동안 침지시킨 그룹, 5분: 재료를 소독수에 5분동안 침지시킨 그룹

Table 1-2. 저온살균에 의한 초기균 저감화(평균치)

(단위: CFU/g)

	김치 양념		
	무처리	소독수	저온살균
총균수	$1.23 \times 10^7$	$3.55 \times 10^6$	$3.95 \times 10^6$
유산균	$4.20 \times 10^6$	$1.70 \times 10^6$	$1.70 \times 10^4$
효모 및 곰팡이	$2.85 \times 10^3$	$1.50 \times 10^3$	$6.65 \times 10^2$

ND : not detected

무처리: 대조군, 소독수: 김치양념 재료를 소독수에 5분동안 침지시켜 양념을 제조한 그룹, 저온살균: 김치양념 재료를 65℃ 항온수조에 30분간 열처리 후 양념을 제조한 그룹

## [2세부: 발효식품용 미생물첨가제 개발 및 보급시스템 구축]

(세부연구책임자 : 세계김치연구소, 박해웅)

### 제 1 절 전통식품으로부터 미생물 자원 확보

#### 1. 실험 목적

현재 유통되고 있는 김치를 지역별·종류별로 수거하여 숙성되어진 김치에서 미생물 자원을 확보하고 김치의 맛에 영향을 주는 mannitol을 많이 생성하는 균주를 선발하고자 하였다.

#### 2. 재료 및 방법

##### 가. 재료

##### (1) 미생물 선발을 위한 시료

인터넷으로 유통되는 김치류 중 생산지역이 다른 것을 선발하여 12개 김치시료를 확보하였다.

Table 2-1. 실험에 사용한 균주 리스트

	지역	김치종류	Sample no.
1	강원도 태백	묵은지	1-B-1~5 1-P-1~5
2	강원도 태백	배추김치	2-B-1~5 2-P-1~5
3	충북 충주	석박지	3-B-1~5 3-P-1~5
4	충북 충주	사과포도김치	4-B-1~5 4-P-1~5
5	전남 순천	깍두기	5-B-1~5 5-P-1~5
6	전남 순천	포기김치	6-B-1~5 6-P-1~5
7	전남 순천	열무	7-B-1~5 7-P-1~5
8	경북 성주	배추김치	8-B-1~5 8-P-1~5
9	제주도	열무김치	9-B-1~5 9-P-1~5
10	전북 무안	양파김치	10-B-1~5 10-P-1~5
11	제주도	파김치	11-B-1~5 11-P-1~5
12	제주도	배추김치	12-B-1~5 12-P-1~5

##### (2) 김치유산균 분리 및 배양

구매한 김치는 4℃의 저온에서 숙성시킨 후, pH 4.3 내외가 되었을 때, 상기 김치시료를 0.85% 식염수로 10배 희석하였고, 0.1 ml씩 PES agar(Penylethyl alcoholsucrose agar;

tryptone 5 g, yeast extract 0.5 g, sucrose 20 g, ammonium sulfate 2 g, dipotassium phosphate 1 g, magnesium sulfate 0.244 g, phenylethyl alcohol 2.5 ml, agar 15 g/D.W. 1 L)와 MRS agar 플레이트에 접종한 후, 유리막대로 도말하였다. 상기 김치시료가 도말된 아가 플레이트를 30°C의 항온배양기에서 1일 동안 양한 후, 생성된 각각의 콜로니를 PES agar와 MRS agar 플레이트에 획선 접종하였고, 25°C에서 1일 동안 배양하여 유산균 균주를 분리하여 MRS 액체배지(Difco, USA)를 사용하여 배양한 후 대수기에 있는 배양액에 글리세롤 25%(v/v)가 되게 첨가하여 -80°C에서 보관하였으며 실험에 사용할 경우 5 mL MRS 액체배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 MRS 액체배지에 1차 계대배양하고 다시 MRS 액체배지에 2차 계대하여 30°C에서 24시간 배양하였다.

## 나. MDH gene 보유 확인

### (1) Genomic DNA 추출

유산균의 genomic DNA는 G-spin genomic DNA extraction kit (iNtRon biotechnology, Korea)를 사용하여 김치 국물로부터 분리하였다. 먼저 채취한 김치 국물을 필터 후, 샘플을 원심분리(12,000 rpm, 2분)하여 상층액을 제거한 후, 제조사의 protocol에 따라 genomic DNA를 추출하였다.

### (2) Primer 제작 및 polymerase chain reaction(PCR)

PCR 반응에는 PCR machine(Eppendorf, Germany)를 사용하였으며, 각각의 primer 1  $\mu$ l (40 pmol), 10X buffer 2.5  $\mu$ l, dNTP 2  $\mu$ l (2.5 mM, Takara), Taq polymerase(5 unit/ $\mu$ l, Takara) 0.1  $\mu$ l이 포함된 25  $\mu$ l 혼합액에 1  $\mu$ l template DNA를 증폭시켰다. 사용된 primer는 Cosmo Co.(Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하였으며 MDH primer의 염기서열은 sense 5'-ATTAATCATGGAAGCACTTGTTCTAAC-3', antisense 5'-GTCAGTCTAGATTATG CCTCTTCGCCGCAA-3'였다. 각 반응은 95°C에서 5분간 predenaturation을 1회 실시한 후, 변성은 95°C에서 1분, annealing은 55°C에서 1분, extension은 72°C에서 1분간의 중합반응 과정을 30회 실시하였고 마지막으로 extension을 72°C에서 10분간 더 실시하였다. 반응 후 증폭된 PCR 산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 시행한 후, Gel Documentation System(Bio-rad, USA)으로 사진을 촬영하여 증폭유무를 확인하였다.

## 3. 실험결과

현재 유통 중인 김치 중 생산지역과 종류가 다른 김치를 *Leu. mesenteroides* 선발용 PES agar와 *Lactobacillus* 선발을 위한 MRS agar를 이용하여 colony의 크기, 모양, 색 등의 차이에 따라 각각 5개씩의 균주를 선발하여 총 120개의 colony를 선발하였다. 이들 균주의 특성 중 맛에 영향을 주는 mannitol 생성능이 우수한 균주를 확인하기 위하여 MDH (mannitol

dehydrogenase) 생성 gene의 보유 유무를 확인한 결과 120개의 균주 중 72개의 균주에서 MDH gene의 보유가 확인되었다.

sample	MDH										
1-B-1		1-P-1		5-B-1		5-P-1		9-B-1		9-P-1	
1-B-2		1-P-2		5-B-2		5-P-2		9-B-2		9-P-2	
1-B-3		1-P-3		5-B-3		5-P-3		9-B-3		9-P-3	
1-B-4		1-P-4		5-B-4		5-P-4		9-B-4		9-P-4	
1-B-5		1-P-5		5-B-5		5-P-5		9-B-5		9-P-5	
1-B-6		1-P-6		5-B-6		5-P-6		9-B-6		9-P-6	
2-B-1		2-P-1		6-B-1		6-P-1		10-B-1		10-P-1	
2-B-2		2-P-2		6-B-2		6-P-2		10-B-2		10-P-2	
2-B-3		2-P-3		6-B-3		6-P-3		10-B-3		10-P-3	
2-B-4		2-P-4		6-B-4		6-P-4		10-B-4		10-P-4	
2-B-5		2-P-5		6-B-5		6-P-5		10-B-5		10-P-5	
2-B-6		2-P-6		6-B-6		6-P-6		10-B-6		10-P-6	
3-B-1		3-P-1		7-B-1		7-P-1		11-B-1		11-P-1	
3-B-2		3-P-2		7-B-2		7-P-2		11-B-2		11-P-2	
3-B-3		3-P-3		7-B-3		7-P-3		11-B-3		11-P-3	
3-B-4		3-P-4		7-B-4		7-P-4		11-B-4		11-P-4	
3-B-5		3-P-5		7-B-5		7-P-5		11-B-5		11-P-5	
3-B-6		3-P-6		7-B-6		7-P-6		11-B-6		11-P-6	
4-B-1		4-P-1		8-B-1		8-P-1		12-B-1		12-P-1	
4-B-2		4-P-2		8-B-2		8-P-2		12-B-2		12-P-2	
4-B-3		4-P-3		8-B-3		8-P-3		12-B-3		12-P-3	
4-B-4		4-P-4		8-B-4		8-P-4		12-B-4		12-P-4	
4-B-5		4-P-5		8-B-5		8-P-5		12-B-5		12-P-5	
4-B-6	4	4-P-6	11	8-B-6	12	8-P-6	21	12-B-6	12	12-P-6	12

Fig. 2-1. MDH gene 보유 확인 결과.

## 제 2 절 미생물 첨가제 제제화를 위한 배지 조성 개발

### 1. 실험 목적

미생물 첨가제 대량 배양기술 개발을 위하여 저가형 배지개발을 위하여 김치공장에서 김치 절임공정 중 발생하는 절임배추로부터 맑은 액상 형태의 절임배추 착즙액을 수득하여 저가형 식용배지의 원료로 이용하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

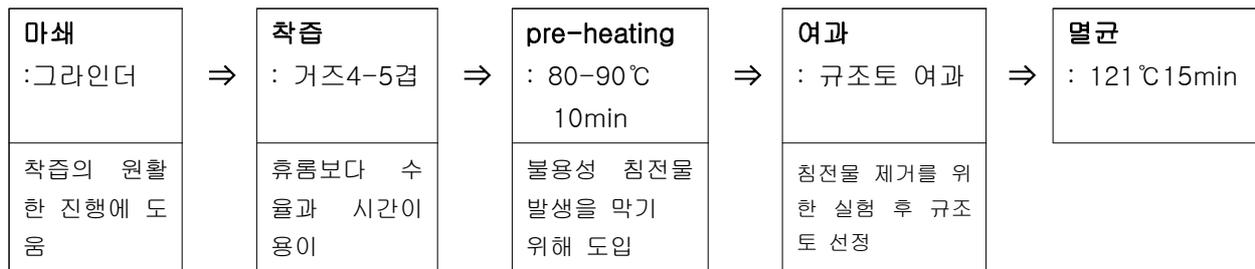
### 가. 방법

#### (1) 1차 절임배추 착즙액의 제조

김치공장으로부터 회수된 절임과정 중 발생하는 절임배추를 그라인더로 마쇄 후, 4-5겹의 거즈를 이용하여 여과하여 멸균하였다. 절임배추 착즙액은 멸균(121°C, 15분)시 미끌미끌한 불용성 물질 생성되었기에, 추후 활성탄, 규조토 여과를 시도하여 제거하였다. 하지만 2차 여과 추가 시 멸균 공정이 다시 이루어져야 하는 단점이 있어 향후 개선이 필요하다.



⇒ 미끌미끌하며 탄성이 있는 불용성 여과 물질



#### (2) 2차 절임배추 착즙액의 제조

절임배추 착즙액의 멸균 후, 미끌한 불용성 물질의 생성은 참고문헌에 따르면 배추에 있는 불활성화된 효소에 의한 작용으로 침전물은 열에 의한 단백질변성으로 생성된 물질임을 추측할 수 있었으며, 규조토 여과에 의하여 쉽게 제거할 수 있었다. 절임배추 착즙액을 멸균전 pre-heating처리를 통해 멸균전 불용성 물질의 생성을 유도하여 멸균후 침전물이 생기는 것을 방지하고자 하였다.



Fig. 2-2. 2차 절임배추 착즙액 멸균 후.

### (3) 절임배추 착즙액의 특성

상기 제조 방법으로 제조된 절임배추 배양액은 노란색의 맑은 액상 형태를 띠었으며, pH 6.0~6.2, 고형분 5~7 Brix%, NaCl 2~3%로 측정되었으며 초기 절임배추 사용량 대비 최종 배추배양액의 수득률은 약 75%였다. 하지만 초기 착즙 과정 중 미생물 오염 등을 고려하여 pre-heating을 착즙과정의 전 단계에서 실시하도록 수정하였다.

### (4) 절임배추배지의 개선

절임배추를 약 80~90℃의 온도에서 1차 증숙 후 마쇄, 착즙, 멸균의 과정을 거쳐 배추 배양액을 제조하였다. 불투명한 노란색의 액상으로서 탁도는 있지만 기타 침전물이 생성되는 현상은 발생하지 않았다.

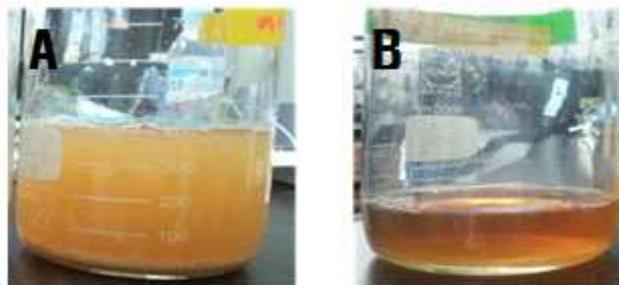
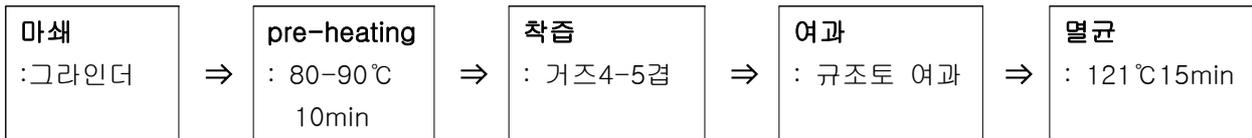


Fig. 2-3. 2차 절임배추 착즙액 멸균 후.

A : 1차 절임배추 착즙액 멸균후, B : 2차 절임배추 착즙액 멸균 후

### 3. 실험 결과

#### 가. 가열에 의해 생성된 배추 이취 제거를 위한 탈취 테스트

절임배추의 가열시 특유의 이취가 발생한다. 이취의 발생은 향후 식용배지로 활용에 제약을 주거나 배양액 활용에 문제를 야기할 수 있을 것으로 예상되기에 이취를 제거하고자 절임 배추의 경우 가열시 배추 특유의 이취가 발생하였기에 가열에 의한 배추 이취 제거를 하고자 활성탄을 활용하여 탈취를 실시하였다. 활성탄(Fintechno CP-2, Ajinimoto)을 배추배지 고형분 대비 5% 첨가 후 60℃에서 1시간 동안 반응 후 규조토 여과를 실시하였다. 활성탄 여과로 배추 가열취를 제거하는데 성공적으로 진행되었으며, 활성탄 여과후 색또한 옅어지는 효과를 나타내었다. 그러나 배추배양액 자체가 유산균 배양액으로 활용되어 김치에 첨가 시 그 첨가량이 매우 소량이라는 사유로 굳이 배추 가열취를 제거하는 공정이 불필요할 것으로 판단되어, 상기 공정은 최종 배추배양액 제조에서 활용하지 않기로 하였다.



Fig. 2-4. 탈취 전후 배지.

#### 나. 절임배추즙과 MRS의 당성분 분석

##### (1) 실험 목적

절임배추를 유산균성장 배지로 이용하기 위하여 기존 상업용 배지인 MRS와 당의 함량을 분석하여 배지 base로의 가능성과 배지 조성의 조합에 활용하고자 분석하였다.

##### (2) 실험방법

**절임배추 착즙액 제조:** 절임배추를 그라인더로 갈아 85℃ 내외에서 10분간 가열한 후, 거즈로 착즙하여 규조 토로 여과 후 121℃에서 15분간 살균하여 사용하였다.

##### (3) HPLC를 이용한 당 함량 분석 결과

절임배추 착즙액 배지와 MRS 배지를 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과한 다음 HPLC(JASCO, Japan)에 20  $\mu\text{L}$ 를 주입하였다. 이때 사용한 column은 Asahipak NH2P-50(Shodex) 였고, 용매는 아세토니트릴 : 물 = 75 : 15, flow rate는 1.0ml/min, detector는 시차굴절계(RI)를 이용하였다. 표준품으로 fructose, glucose, sucrose, mannitol,

maltose를 사용하였다. 시험용액 및 표준용액을 각각 20  $\mu$ L씩 주입하여 얻은 피크의 높이를 구하여 검량선을 작성한 후 시험용액의 유리당 함량을 계산하였다. 절임배추 착즙액과 MRS 배지의 당함량을 분석한 결과 fructose는 절임배추 착즙액이 MRS배지보다 2배 이상 높은 함량을 나타내었으며, glucose의 경우 MRS 배지가 월등히 높은 것으로 분석되었다. 향후 절임배추 착즙액을 base로 이용한 배지를 만들기 위한 배지 조성을 조절할 때, glucose 당원에 대한 보충량을 알 수 있었다. 절임배추 착즙액의 경우 배지제조에 낮은 당원을 함유하고 있음을 확인하였다.

Table 2-2. 절임배추배지와 MRS 배지의 당 함량 분석

(mg/ml)	Fructose	Glucose
MRS broth	2.1706	17.8365
Kimchi cabbage	5.4925	5.0514



Fig. 2-5. 절임배추 착즙액과 MRS 배지의 HPLC 분석 결과.

#### 다. 절임배추 착즙액과 일반배지와 의 균체 성장 비교

##### (1) 실험 목적

절임배추 착즙액과 MRS배지를 이용하여 김치 유산균 표준균주 2종에 대한 균체 성장을 비교함으로써 절임배추 착즙액의 식용배지로서의 가능성 탐색하고자 하였다.

##### (2) 실험방법

절임배추 착즙액과 MRS배지의 유산균 성장률을 비교해보기 위하여 표준균주 3종을 (KCCM 3505, *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* : KCCM 3769, *Lactococcus lactis* sub sp.)을 이용하여 접종량은 배양액 배비 2% (v/v)으로 하였으며, 30°C에서 24시간 배양하여 MRS agar plate를 이용하여 균수를 측정하였다.

##### (3) 실험결과

절임배추 착즙액과 MRS배지에서의 김치유산균 성장을 관찰하였다. 절임배추로 제조된 절임배추 착즙액 100%와 MRS배지에서의 김치 유산균 표준균주 3종을 배양하여 균체 성

장을 비교하고자 하였다. 유산균 개체 증식 수는 절임배추 착즙액( $10^8$  CFU/ml)보다 약 10배 정도 MRS배지( $10^9$  CFU/ml)에서 더 많이 증식하는 결과를 보였다. 아마도 절임배추 착즙액은 균주의 성장에 필요한 영양성분을 모두 포함하고 있는 MRS 배지보다는 성장률이 떨어질 것으로 예상되었으나 10정도 차이가 나는 것으로 나타났다. 10정도의 차이를 줄이기 위해서 절임배추 착즙액을 기본으로 당원과, 단백질원, 미량성분 등을 조절하면 MRS배지보다는 저렴하지만 성장률에 영향을 미치지 않는 저가용 배지를 제작할 수 있을 것이라 판단된다.

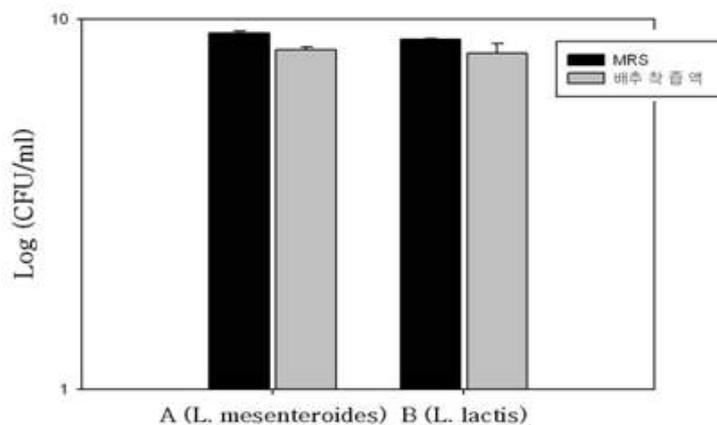


Fig. 2-6. 절임배추 착즙액과 MRS배지에서의 성장균수 측정 비교.

## 라. 절임배추 착즙액 성장 강화 성분의 조사

### (1) 실험 목적

절임배추 착즙액과 MRS배지를 이용하여 김치 유산균 표준균주 3종에 대한 균체 성장을 비교함으로써 절임배추 착즙액의 식용배지로서의 가능성 탐색하고자 인위적으로 당원과 질소원을 조절하여 균주 성장에 미치는 영향을 조사하였다.

### (2) 실험방법

#### - 이용 균주

절임배추 착즙액의 조성에 따른 성장율을 MRS배지의 유산균 성장률과 비교해보기 위하여 표준균주 3종을(KCCM 40265, *Lb. acidophilus* : KCCM 3505, *Leu. mesenteroides* sub sp. *mesenteroides* : KCCM 3769, *Lc. lactis* sub sp. *lactis*)을 이용하여 접종량은 배양액 대비 2%(v/v)으로 하였으며, 30℃에서 24시간 배양하여 MRS agar plate를 이용하여 균수를 측정하였다.

#### - 배지 성분

절임배추 착즙액의 질소원, 탄소원 강화를 위하여 대표적인 질소원, 탄소원으로 효모 엑기스와 글루코오스를 각각 고형분 대비 1%를 첨가하여 유산균 성장 강화에 영향을 미치는지 여부를 확인하기 위하여 첨가하였다.

### (3) 실험결과

절임배추 착즙액에 각 1%의 효모엑기스와 글루코오스의 첨가가 균주 성장에 영향을 미치는지에 대한 결과는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 첨가량을 배추배양액 고형분 대비 1%로 매우 소량을 첨가한 것이 성장에 영향을 미치지 못한 것으로 사료되었다. 따라서 추후에는 고형분 대비가 아닌, 배양액 대비 1~2% w/v수준으로 첨가가 필요할 것으로 판단되었다.

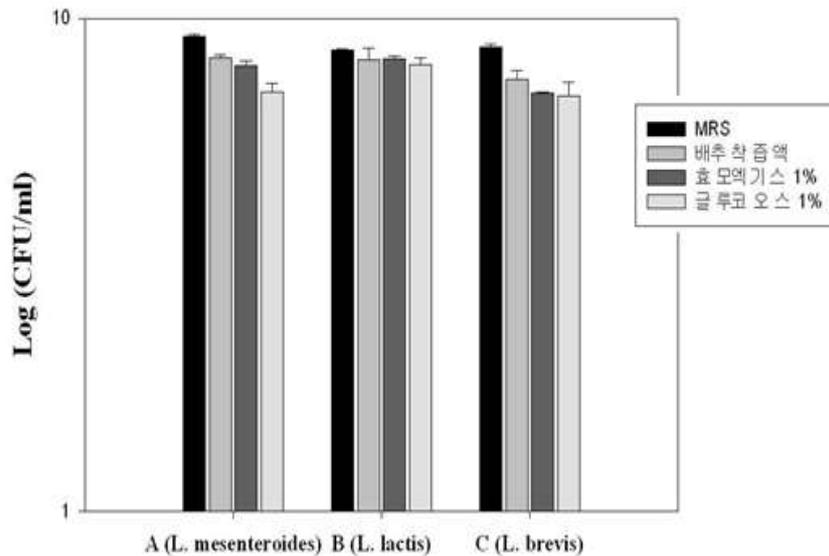


Fig. 2-7. 영양성분을 조절한 절임배추 착즙액 배지와 MRS배지의 성장균수 측정 비교.

결론적으로, 절임배추 착즙액으로부터 제조된 절임배추 배지가 상업적 유산균 배양액은 MRS broth와 비교하였을 때 충분히 활용 가능성을 확인 할 수 있었으며, 추후 작업으로 표준균주가 아닌 실제 김치로부터 분리하여 동정된 대표적인 김치 균주를 활용하여 상세한 성분조성에 변화를 주어 실험을 진행하여야겠다.

# 제 3 절 외부적 첨가물 추가를 통한 절임배추 배지의 김치유산균 생육 강화 테스트

## 1. 실험 목적

### 가. 탄소원

절임배추 착즙액으로부터 제조된 배추배지에 탄소원, 질소원 및 무기원을 농도와 종류별로 첨가하여 상업적 유산균 배양배지인 MRS broth 수준으로 균체 생육 정도를 강화하고자 한다. 절임배추 착즙액으로부터 제조된 절임배추 배지에 탄소원의 종류와 그 첨가량에 변화를 주어 상업적 유산균 배양배지인 MRS broth 수준으로 균체 생육 정도를 강화하고자 한다. 배추 유리당의 구성이 glucose와 fructose로 이루어져 있다는 점과 첨가 원료의 단가 및 식품첨가물로서의 사용 빈도 등을 고려하여 탄소원으로서 glucose와 fructose를 선정하였다.

### 나. 질소원

절임배추 착즙액으로부터 제조된 절임배추 배지에 질소원의 종류와 그 첨가량에 변화를 주어 상업적 유산균 배양배지인 MRS broth 수준으로 균체 생육 정도를 강화하고자 한다. 배추 질소원은 무기원( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ , Urea)과 유기원(peptone, beef extract, yeast extract, CSL(Corn Steep Liquor))을 절임배추 착즙액을 이용한 배지에 질소원으로 첨가하여 균주 성장에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

### 다. 미량원소

절임배추 착즙액으로부터 제조된 배추배지에 질소원의 종류와 그 첨가량에 변화를 주어 상업적 유산균 배양배지인 MRS broth 수준으로 균체 생육 정도를 강화하고자 한다. 배추 미량원소 (sodium succinate, ammonium citrate, sodium acetate, magnesium sulfate ( $\text{MgSO}_4$ ), manganese sulfate ( $\text{MnSO}_4$ ), dipotassium phosphate ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ))을 절임배추 착즙액을 이용한 배지에 미량원소로 첨가하여 균주 성장에 미치는 영향을 조사하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 방법

#### (1) 탄소원

##### - 사용균주

김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides*와 *Lb. plantarum*를 비교균주로 이용하였다.

### - glucose 농도 조절

상업용 배지인 MRS배지에 비해 절임배추 착즙액에서 부족했던 당원 glucose의 함량을 전체 액상 부피대비 질량으로 하여(g/ml, w/v) 각각 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%를 첨가하여 김치에서 분리한 두 균주의 성장률을 비교를 위하여 30℃에서 24시간 배양한 후, MRS agar plate를 이용하여 균수를 측정하였다.

### - fructose와 glucose 혼합 배지

상업용 배지인 MRS배지에 비해 절임배추 착즙액에서 부족했던 당원 glucose의 함량을 전체 액상 부피대비 질량으로 하여(g/ml, w/v) 각각 2.0%를 첨가하여 김치에서 분리한 두 균주의 성장률을 비교를 위하여 30℃에서 24시간 배양한 후, MRS agar plate를 이용하여 균수를 측정하였다.

## (2) 질소원

### - 사용균주

김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides*와 *Lb. plantarum*를 비교균주로 이용하였다.

### - 사용한 질소원

식용으로 가능한 질소원을 무기원 4종( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ , Urea)과 유기원(peptone, beef extract, yeast extract, CSL(Corn Steep Liquor))을 질소원으로 이용하였다.

### - 질소원의 선발

질소원은 선발한 8종을 각각 2%(w/v)의 농도로 절임배추 착즙액에 첨가하여 김치에서 분리한 두 균주의 성장률을 비교를 위하여 30℃에서 24시간 배양한 후, MRS agar plate를 이용하여 균수를 측정하였다.

### - Box-Behnken experimental design을 이용한 첨가량 조절

질소원 1차 screening단계에서 yeast extract, beef extract, peptone이 김치유산균 증식에 관여한 질소원의 중요인자로 선택되었으며, 상기 선택되어진 인자들이 김치유산균 증식에 미치는 개별적 영향뿐만 아니라 서로의 상관관계를 관찰하고 분석함으로서 이를 근거하여 각 인자들이 김치유산균 증식에 가장 좋은 영향을 미치는 수준을 선정하고자 하였다. 본 실험에서는 반응표면실험법으로서 Box-Behnken design을 사용하였으며, 첨가율 0%, 1%, 2%의 값을 “+”, “0”, “-”의 값으로 나누어 총 15개의 실험을 설계하여 수행하였다. 상업용 유산균 증식배지인 MRS broth(Difco)의 질소원 배합이 하나의 물질이 아닌 peptone 1%(w/v), beef extract 1%, yeast extract 0.5%(w/v)이 혼합되어 함유되어 있는 점을 착안하여 앞선 1차 질소원 테스트에서 선발된 3종의 질소원의 최적 배합비를 찾아보고자 하였다. 질소원에 대한 1차 screening단계에서 yeast extract, beef extract, peptone이 김치유산균 증식에 관여한 질소원의 중요인자로 선택되었으며, 상기 선택되어진 인자들이 김치유산균 증식에 미치는 개별적 영향뿐만 아니라 서로의 상관관계를 관찰하고 분석함으로서 이를 근거하여 각 인자들이 김치유산균 증식에 가장 좋은 영향을 미치는 수준을 선정하고자 하였다.

**(3) 미량원소**

- **사용균주**

김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides*와 *Lb. plantarum*를 비교균주로 이용하였다.

- **사용한 미량원소**

식용으로 가능한 미량원소 중 (sodium succinate, ammonium citrate, sodium acetate, magnesium sulfate (MgSO<sub>4</sub>), manganese sulfate (MnSO<sub>4</sub>), dipotassium phosphate (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>))를 이용하였다.

- **미량원소의 선발**

MRS broth에 포함되어 있는 질소원 수준으로 질소원을 동일하게 처리한 뒤(MRS broth의 질소원 함량 수준, peptone 1%, beef extract 1%, yeast 0.5%) 상기 표기 명시된 5종의 미량원소를 하나씩 제거하여, 유산균 증식에 영향을 주는 주요 인자를 선발하고자 하였다.

Table 2-3. 배지 조성에 이용할 탄소원, 질소원, 무기원

구분		종류				
탄소원		Glucose	Fructose			
질소원	Chmically defined media	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> Cl	(NH <sub>4</sub> )HPO <sub>4</sub>		
	Complex media	Urea	Peptone	Beef extract	Yeast extract	Corn Steep Liquor
무기원		Sodium succinate	Ammonium citrate	Sodium acetate	MgSO <sub>4</sub>	MnSO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

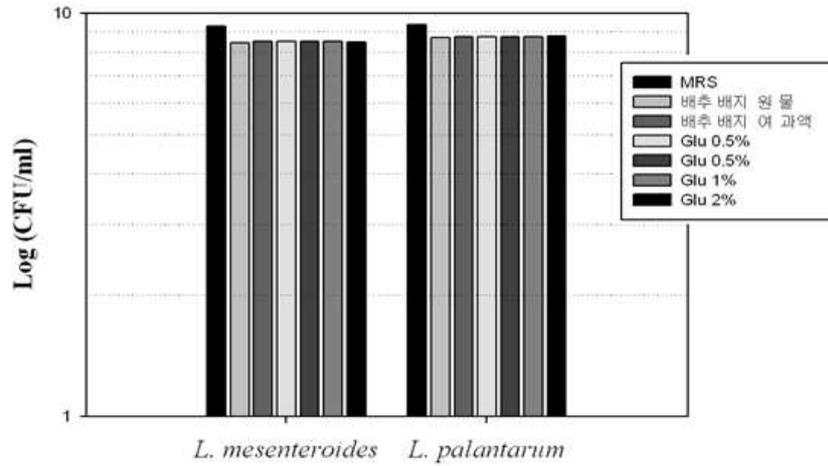


Fig. 2-8. 당원으로 glucose를 조절한 절임배추 착즙액 배지와 MRS배지의 성장균수 측정 비교

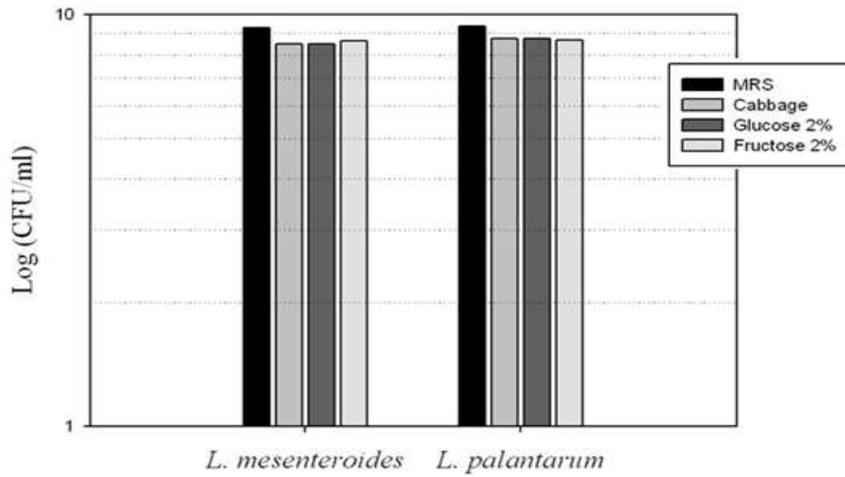


Fig. 2-9. Glucose와 fructose를 강화한 절임배추 착즙액 배지와 MRS배지의 성장균수 측정

Table 2-4. 질소원들의 농도 및 효과(% w/v)

	Peptone	Beef	Yeast
+	2%	2%	2%
0	1%	1%	1%
-	0%	0%	0%

Table 2-5. 3가지 질소원을 이용한 배지성분 표준화를 위한 Box-Behnken design

RUN	Peptone	Beef extract	Yeast extract
1	-1	-1	0
2	-1	1	0
3	1	-1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	-1	0	1
7	1	0	-1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	1
11	0	1	-1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

### 3. 실험결과

#### 가. 탄소원

앞선 실험에서에서 절임배추 배양액 고형분 대비 1% 글루코스의 첨가량이 미비한 것으로 판단되어 그 첨가량을 고형분대비 2%까지 첨가하여 유산균 생육정도를 관찰하였으나, 첨가 수준 증가에 따른 유의적인 차이도 나타나지 않았다. 그래서 첨가량을 전체 액상 부피대비 질량으로 하여(g/ml, w/v) 실험을 진행하였다. glucose와 fructose를 2%w/v(20g/ml)의 농도로 추가하여 이에 따른 김치유산균의 생육 정도를 관찰하였다. 첨가 농도 기준을 변경하여 그 함량을 2%(w/v)까지 증가시켜보았지만, 탄소원 첨가에 따른 유산균 증식에 긍정적인 효과는 보이지 않았다. 따라서, 절임배추 착즙액에 glucose를 탄소원으로 단독 추가하는 것을 배제하고 탄소원을 혼합하거나 다른 당원을 이용해야 할 것이라 판단된다. 절임배추 착즙액에서 더 많이 존재했던 fructose와 미생물의 당원으로 많이 공급되는 glucose의 함량을 증가시켜 미생물 성장을 측정한 결과 당원의 증가가 절임배추 착즙액에서 키운 미생물의 성장을 비교한 결과 차이가 크지 않은 것으로 확인되었다. 이로서 절임배추 착즙액에 당원의 추가는 의미가 없는 것으로 판단되어 향후 질소원과 무기원 추가 실험에서 당원의 추가를 하지 않는 것으로 결정하였다. 따라서, 절임배추 착즙액에 함유되어 있는 유리당원 만으로도 유산균 배지로서의 탄소원 함량을 충족하는 것으로 판단되었다.

### 나. 질소원의 선발

선발한 8종의 질소원을 2%(w/v)의 농도로 절임배추 착즙액 배지에 추가하여 이에 따른 김치유산균의 생육 정도를 관찰하였다. 김치의 대표적인 균주이자 김치 분리 균주인 *Leu. mesenteroides*와 *Lb. plantarum*의 생육에 공통적으로 긍정적인 효과를 준 물질로 yeast extract, beef extract, peptone을 선정하였다. 유기질소원과 무기질소원으로 구분해 보면, 유기질소원이 김치유산균 증식에 보다 긍정적인 경향을 보였으며, 그 중에서도 yeast extract, beef extract, peptone의 첨가가 보다 더 효과적으로 나타났다.

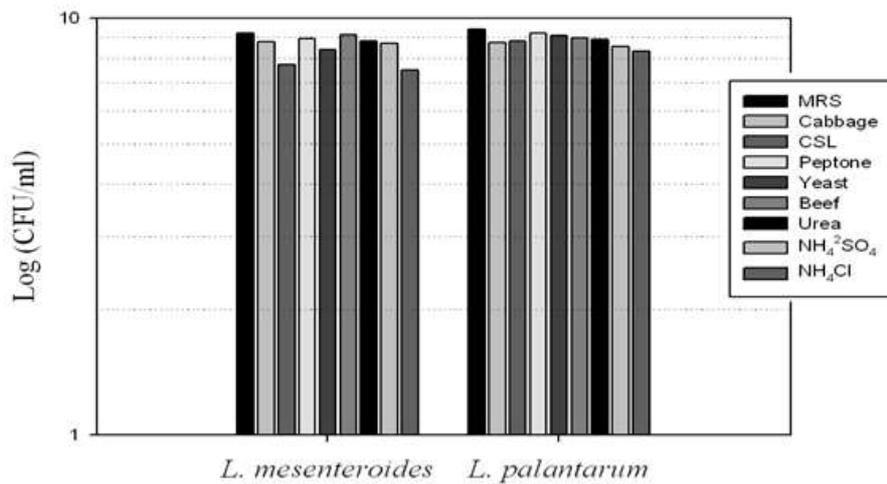


Fig. 2-10. 8가지 질소원을 강화한 절임배추 착즙액 배지와 MRS배지의 성장균수 측정 비교.

Table 2-6. 다양한 질소원을 이용한 표면분석의 Canonical Analysis

	Eigenvectors			
	Eigenvalues	Peptone	Beef	Yeast
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	-0.007878	-0.183802	0.877643	-0.442673
	-0.020626	-0.698346	0.200339	0.687152
	-0.078121	0.691759	0.435439	0.576076
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.024411	-0.586593	-0.194189	0.786256
	-0.006069	-0.492137	0.856494	-0.155627
	-0.075467	0.643202	0.478236	0.597981

Table 2-7. 질소원과 유산균의 최대 반응 예측 분석

	Critical Value			
	Factor	Coded	Uncoded	Label
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	a	0.551576	1.551576	Peptone
	b	0.480441	1.48044	Beef
	c	0.49722	1.49722	Yeast
	Predicted value at stationary point: 0.723915			
<i>Lactobacillus plantarum</i>	a	0.645078	1.645078	Peptone
	b	0.495	1.495	Beef
	c	0.764892	1.764892	Yeast
	Predicted value at stationary point: 1.604763			

상기 테이블은 3종의 질소원 첨가에 따른 김치유산균 생육에 미치는 효과의 반응표면분석 결과이다. *Leu. mesenteroides* 및 *Lb. plantarum* 모두 maximum point가 최고 함량치가 아닌 중간지점에서 발생하는 saddle point의 형태로 나타났다. 이와 같은 결과로 미루어 보았을 때 *Leu. mesenteroides*는 peptone 1.5%, beef 1.5%, yeast 1.5% 첨가시켰을 때, 최대 OD값(600nm)이 0.72으로, *Lb. plantarum*은 peptone 1.6%, beef 1.5%, yeast 1.8% 첨가하였을 때 OD값(600nm)이 1.60으로 최대값을 예측할 수 있었다. 위 통계 예측결과를 바탕으로 하였을 때, 총 질소원의 첨가수준이 무려 4.5%이상을 나타내며, 두가지 모두 3가지 질소원의 첨가 조합 함량에 따른 증가를 보이다가 중간지점에서 saddle point를 나타내기는 하지만 3가지 질소원의 조합을 1X1의 경우의 수로 각각 나누어 보았을 때(아래 3차원 그래프) 몇몇 조합에서는 saddle point이외에 첨가량 증가에 따른 지속적인 상승세를 나타내는 경우가 있다. 따라서 3종의 질소원 조합 테스트 이외에 단일 물질의 첨가량 증대에 따른 김치 유산균 생육정도를 테스트한 후에 가장 합리적인 질소원 첨가 수준을 판단하기로 하였다.

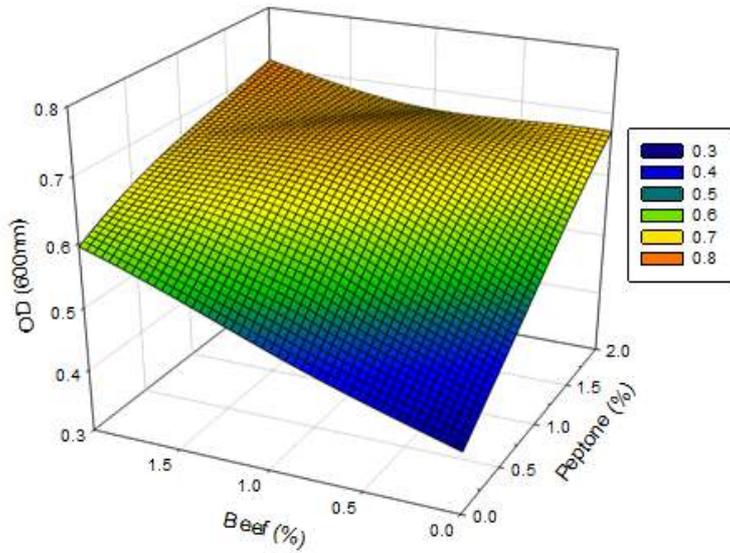


Fig. 2-11. Peptone and beef extract의 농도별 *Leu. mesenteroides*의 OD(600nm)에서의 3D\_표면반응분석

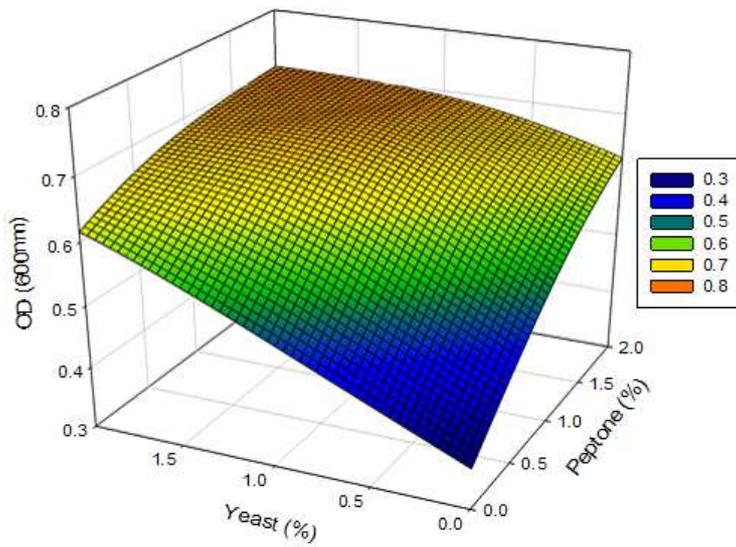


Fig. 2-12. Peptone and yeast extract의 농도별 *Leu. mesenteroides*의 OD(600nm)에서의 3D\_표면반응분석.

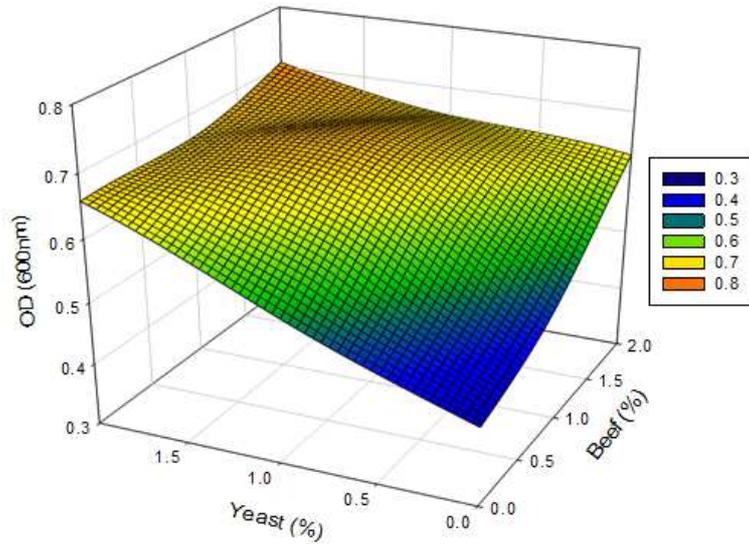


Fig. 2-13. Beef extract and yeast extract의 농도별 *Leu. mesenteroides*의 OD(600nm)에서의 3D\_표면반응분석

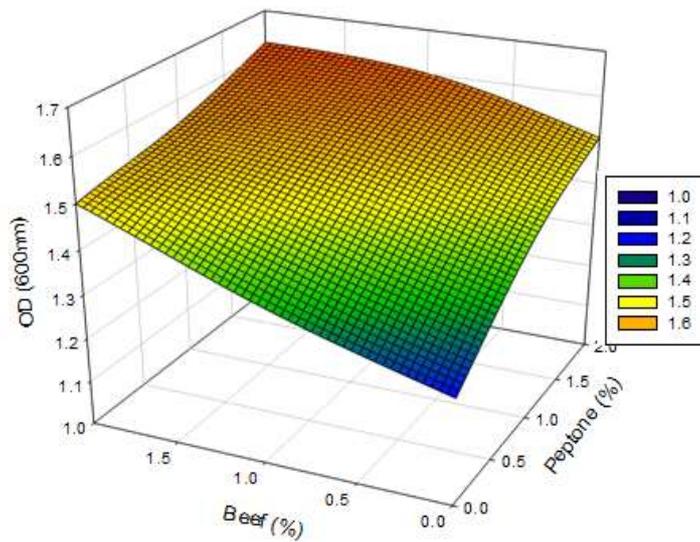


Fig. 2-14. Peptone and yeast extract의 농도별 *Leu. mesenteroides*의 OD(600nm)에서의 3D\_표면반응분석

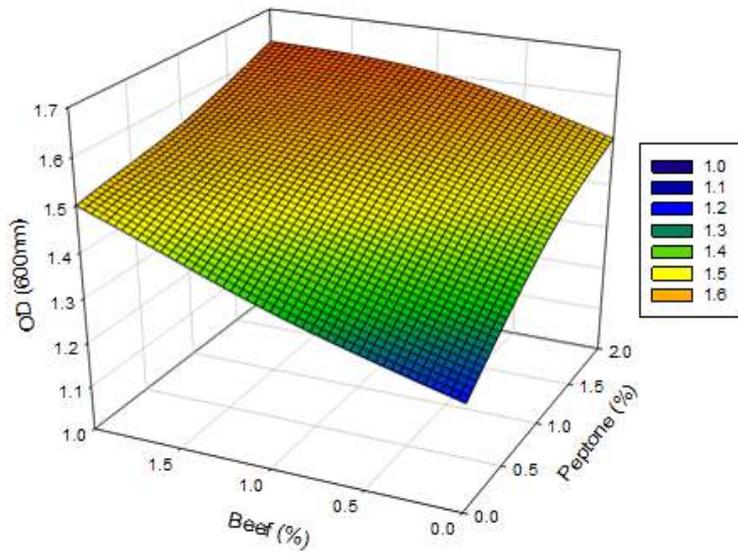


Fig. 2-15. Peptone and yeast extract의 농도별 *Lb. plantarum*의 OD(600nm)에서의 3D\_표면반응분석

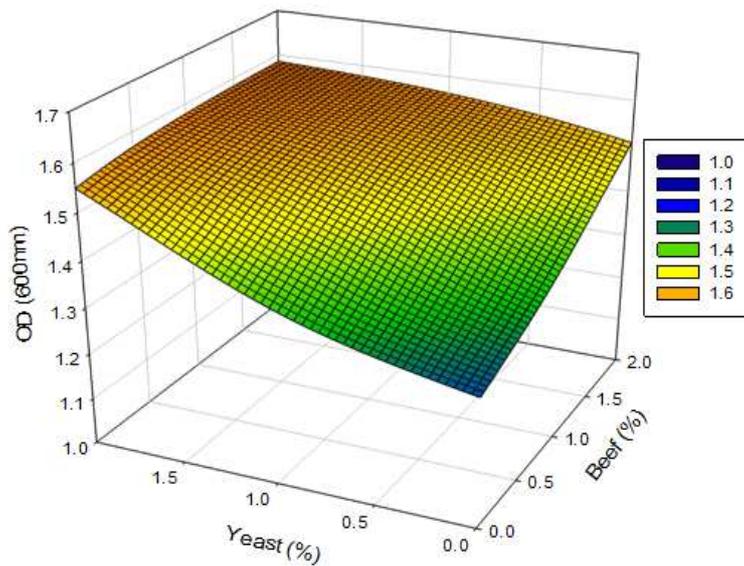


Fig. 2-16. Beef extract and yeast extract의 농도별 *Lb. plantarum*의 OD(600nm)에서의 3D\_표면반응분석

Peptone, yeast extract, beef extract를 각각 0, 1, 2, 4, 8%(w/v)의 비율로 첨가하여 유산균 생육 정도를 관찰하는 확인 실험을 진행한 결과, 질소원의 종류에 따른 유의적인 차이는 발견되지 않았다. 단일 질소원 처리시 첨가량 수준에 따라 비례하며 증가하는 경향을

나타내었지만, 비용적인 측면을 고려하였을 때 무조건 높은 농도의 질소원을 넣어주는 것은 합리적이 아닌 것으로 판단되었다. 따라서, 앞선 질소원 3종의 최적조합에서 나온 결과 (약 총 질소원 처리량 4.5%)와 질소원의 단가적인 측면을 고려하여 peptone 4%(w/v) 첨가를 최적 배합으로 결정하고, 추후 본 연구에서 개발된 절임배추 배지를 활용하여 fermenter를 이용한 대량 배양을 할 경우 fed-batch에 의한 간헐적인 추가 질소원 첨가가 이루어 질 것으로 판단되기에 질소원 첨가수준을 최대량이 아닌 적정 수준에서 설정하는 것은 충분히 보완 될 수 있을 것으로 판단된다.

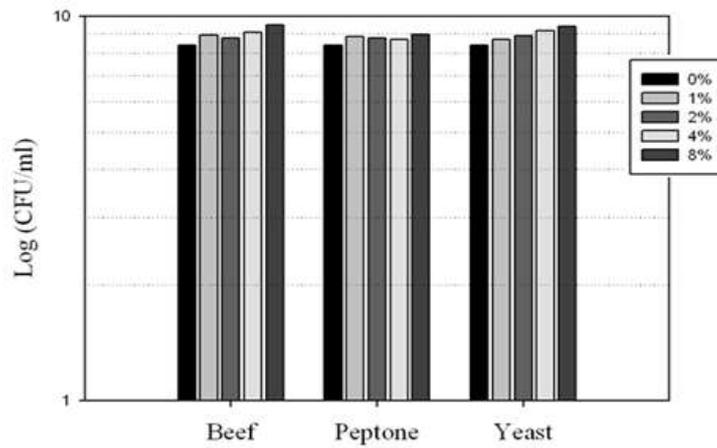


Fig. 2-17. 질소원 첨가에 따른 *Leu. mesenteroides*의 생균수 관찰

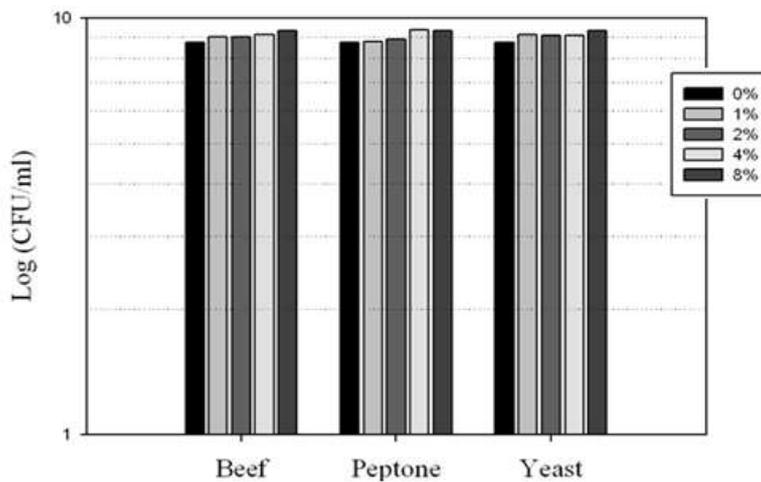


Fig. 2-18. 질소원 첨가에 따른 *Lb. plantarum*의 생균수 관찰

#### 다. 미량원소의 선발

III 실험군은 절임배추 배지에 MRS broth와 동일한 수준의 미량원소를 첨가한 것이다. III 실험군과 다른 실험군을 상대적으로 비교하여 특정 물질 제거를 통한 김치유산균 증식에 가장 큰 영향을 주는 것과 그렇지 않은 것을 분류하고자 하였다. 극 미량원소인 magnesium sulfate (0.01%, w/v)와 manganese sulfate (0.005%, w/v)은 1) 그 함량이 매우 미미하여 단가적인 측면에 큰 영향을 미치지 않았으며, 2) 미생물 증식에 따른 안정적인 균체내 효소 분비를 위해 Mn, Mg가 필수 요소인 것으로 알려져 있다. 3) *Lb. plantarum*의 경우 magnesium sulfate와 manganese sulfate 제거에 따른 균체 증식에 영향을 주는 것으로 나타났기 때문에 magnesium sulfate (0.01%, w/v)와 manganese sulfate (0.005%, w/v)은 MRS broth 수준의 첨가량을 유지하기로 결정하였다. 김치 유산균 증식에 민감한 영향을 보이는 미량원소로서 일반 무기질원 보다는 sodium acetate, sodium citrate 등의 유기산 물질로 확인되었다.

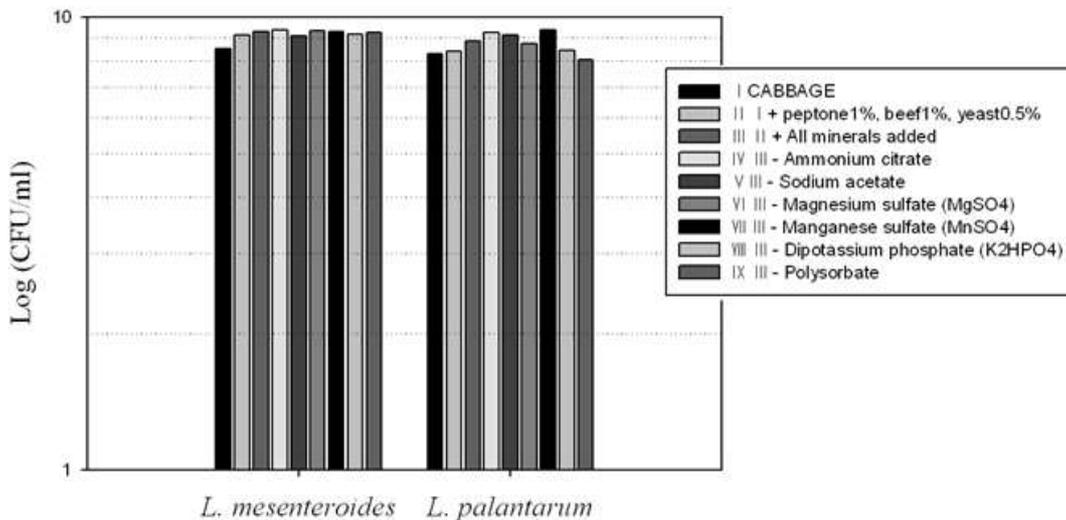


Fig. 2-19. 미량원소의 결핍이 유산균의 성장에 미치는 영향

절임배추배지에 peptone 4%, magnesium sulfate 0.01%, manganese sulfate 0.005%를 기본베이스로 한 뒤에 상기 미량원소 1차 테스트에서 김치유산균 증식에 영향을 주는 것으로 판단된 미량원소 2종 sodium acetate, sodium citrate가 김치발효에 따른 유기산 변화가 가장 컸던 succinate(작년 실험 결과, 김치 발효에 의해 배추 원물에 함유되어 있던 succinate가 발효기간이 경과함에 따라 80%이상 감소됨, 유리 유기산 중 이용률이 가장 높음)를 sodium succinate의 형태로 첨가하였으며 동시에 그 첨가량에 따른 테스트를 실시하였다. SAS통계 프로그램을 활용한 duncan's multiple range test결과 sodium succinate 1%첨가한 실험군에서 *Leu. mesenteroides*, *Lb. plantarum* 모두 가장 높은 수준으로 유산균 생육정도를 나타내었다. 따라서 sodium succinate 1%를 3번째 미량원소로 결정하였다.

Table 2-8. 배지 미량성분 첨가량에 따른 유산균의 성장에 미치는 영향

질소원		유산균 종류	미량성분 첨가량		미생물(cfu/ml)
Peptone 4%	Magnesium sulfate 0.01%, Manganese sulfate 0.005%	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Acetate	0.25%	$1.58 \times 10^9$ bb
			Acetate	0.50%	$1.87 \times 10^9$ ab
			Acetate	1.00%	$4.85 \times 10^9$ a
			Citrate	0.25%	$2.01 \times 10^9$ b
			Citrate	0.50%	$1.73 \times 10^9$ b
			Citrate	1.00%	$1.48 \times 10^9$ ab
			Succinate	0.25%	$2.28 \times 10^9$ b
			Succinate	0.50%	$9.80 \times 10^9$ a
			Succinate	1.00%	$7.75 \times 10^8$ a
		<i>Lactobacillus plantarum</i>	Acetate	0.25%	$1.01 \times 10^9$ bc
			Acetate	0.50%	$2.25 \times 10^8$ c
			Acetate	1.00%	$2.02 \times 10^9$ ab
			Citrate	0.25%	$1.32 \times 10^9$ abc
			Citrate	0.50%	$2.56 \times 10^9$ a
			Citrate	1.00%	$1.61 \times 10^9$ ab
			Succinate	0.25%	$1.51 \times 10^9$ ab
			Succinate	0.50%	$1.12 \times 10^9$ bc
			Succinate	1.00%	$2.45 \times 10^9$ a

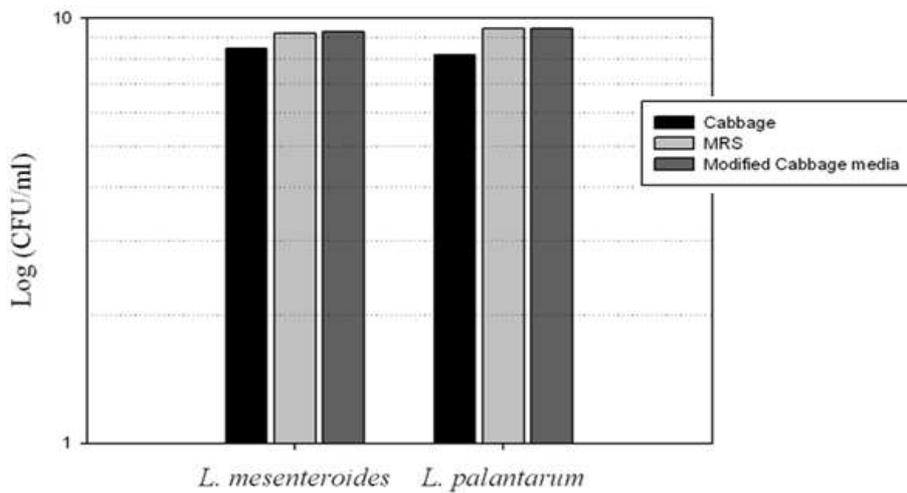


Fig. 2-20. 개발된 절임배추 착즙액 배지와 MRS의 유산균의 성장 비교

### 제 3 절 미생물 첨가제 제제화를 위한 배지 조성 개발

#### 1. 실험 목적

실제 김치로부터 분리된 김치 유산균 중 김치 숙성과정에 가장 큰 영향을 주는 2종의 균주를 이용하여, 그에 대한 생육곡선의 추이를 관찰함으로써 최적 배양시간을 탐색하고자 하였다.

#### 2. 실험 방법

MRS 및 절임배추배지에 김치로부터 분리하여 *Leu. mesenteroides*와 *Lb. plantarum*으로 동정된 2종의 김치유산균을 배양액 대비 2%(v/v)으로 접종하여 30°C 에서 2시간 간격으로 샘플을 채취하여 각각의 OD값(600nm)및 MRS agar 평판배양을 통하여 균수를 측정하였다.

#### 3. 실험 결과

배지별 균주의 성장곡선을 OD값과 실제 생균수를 측정하여 그려보았다. 실험 결과 배양 시간에 따라 비슷한 추이를 나타내었으며, 상기 결과를 바탕으로 실험에 사용된 김치유산균의 최적 배양시간을 16시간으로 결정하였다. 향후 특정 효소나 균주 특성에 대한 배양시간별 조사가 필요할 것으로 사료된다.

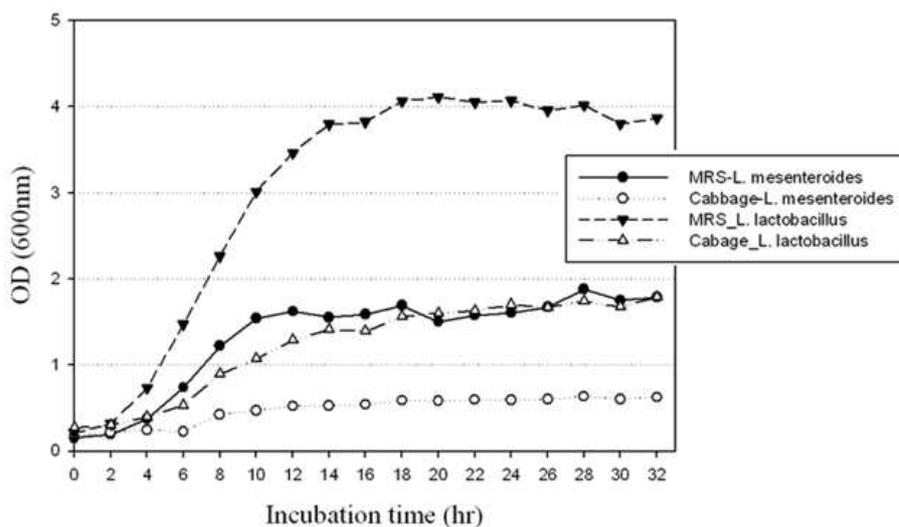


Fig. 2-21. 흡광도를 이용한 배지별 성장곡선

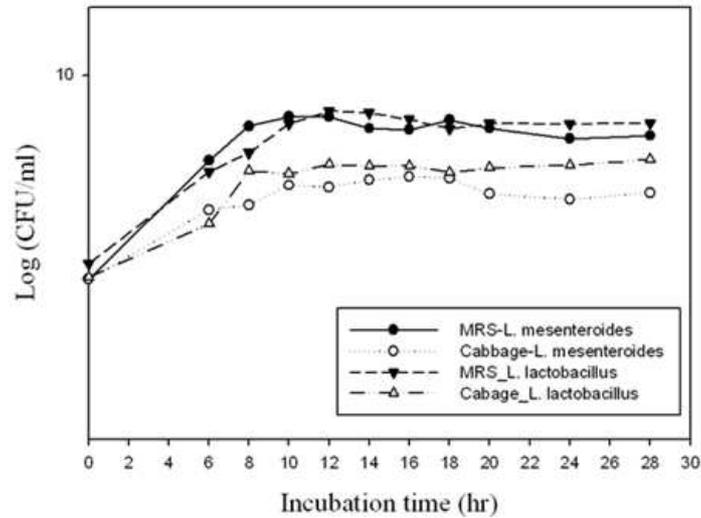


Fig. 2-22. 평판법을 이용한 균수측정을 통한 배지별 성장곡선

현재 김치의 원료를 이용한 미생물 보호제의 활용 가능성 실험을 진행하고 있다. 마늘을 이용한 경우 유산과 마늘을 섞어  $-70^{\circ}\text{C}$  냉동하여 보존제로서의 역할을 실험하였으며, 보충 실험을 통하여 미생물 유통을 위한 보호제로서의 가능성을 마늘 등 식품소재에서 확보하고자 연구하고 있다. 개발되어진 저가형 식용배지의 원가계산 결과 절임배추배지의 원부재료 첨가에 따른 단가는 액상 배지 1L당 기준으로 약 572원/L가 발생하였다. 이는 기존에 사용배지로 보급화되어있는 MRS broth와 비교하여 보았다. MRS broth powder 55g을 1L에 녹여 사용하는 일반적인 메뉴얼을 기준으로 삼았을 때 MRS broth solution의 단가는 약 9,681원/L이 발생함을 알 수 있다. 이로서 본 연구에서 개발한 배추배지가 보급형 유산균 배지인 MRS broth와 가격적인 면에서 충분히 경쟁적 우위를 차지함을 확인하였다.

## 제 4 절 활성화도 및 생존율이 높은 미생물 제제 개발

### 1. 실험 목적

김치제조가 자연발효에서 미생물첨가에 따른 발효조절로 페리다임이 변화함에 따라 김치에서 분리한 유용 미생물의 현장 편의형 제제화 기술을 개발하여 저장 및 유통기간 동안 미생물 첨가제의 활성화유지 및 제제공정 후 생존율을 높이고자 하였다. 미생물 제제의 제형별 및 저장기간별 생존율을 중심으로 평균으로서의 가능성을 시험하였다.

### 2. 재료 및 방법

#### 가. 재료

##### (1) 사용균주 및 보존

1차년도 과제수행 중 김치로부터 분리된 *Weissella cibaria* SW1-1, *Lb. plantarum* A-1, *Pediococcus pentosaceus* A-2균주를 사용하였다. 실험균주는 유산균 배양에 적합한 MRS broth(Lactobacilli MRS agar, Difco)에 접종하여 30°C 에서 24시간 배양하여 활성화 시킨 후, MRS agar plate에 접종하여 4°C 에서 4주 간격으로 계대 배양하면서 보관하였다. 실험균주의 장기보관법으로는 글리세롤 최종농도 20%로 미생물 현탁액을 제조하여 - 70°C 에서서 보존하였다.

##### (2) 김치 유래 미생물의 배양

- 70°C 에서 장기 보관된 실험균주를 10 mL MRS broth에 1 % (v/v)접종하여 30°C 에서 24시간 배양한 후, 다시 MRS broth에 2차 접종하여 미생물의 활성을 증대시킨 후 사용하였다.

##### (3) 시험균주의 계수

MRS broth에 0.2% Bromophenol blue(BPB) 지시약 1%를 첨가하여 MRS-BPB 배지를 제조하였다. 미생물 현탁액 100  $\mu$ l를 도말하여 30°C 에서 48시간 동안 배양한 다음 미생물 군집의 숫자를 계수하였다.

### 3. 실험 결과

#### 가. 액상형 유산균 제제 개발

유산균의 생존율을 보존할 수 있는 현장 편의형 액상제제를 개발하기 위하여 완충작용을 할 수 있는 Ringer's solution 및 buffer solution을 적용하였다. MRS broth에서 24시간 배양된 *W. cibaria* 균주를 3000 rpm 10분간 원심분리하여 균체를 회수하였다. 멸균수로 3회 세척한 후 10 ml 액상제에  $2.2 \times 10^{10}$  cfu/ml의 초기농도로 고정하고 5°C 에서 생존율을 시험하였다. *Lb. plantarum* A-1 및 *P. pentosaceus* A-2 균주도 동일한 과정으로 실험

험을 진행하였다. 생리식염수에 *W. cibaria*의 초기농도를  $2.2 \times 10^{10}$  cfu/mL로 고정하고 28일까지 생존율을 조사하였다. 저장 3일째 균주의 생존율은 80% 이상 유지되었지만 저장기간이 길어짐에 따라 급격히 감소하여 28일 경과 후  $2.8 \times 10^9$  cfu/mL 수준으로 감소하여 13%의 매우 저조한 생존율을 나타내었다.

Table 2-9. 액상형 제제 용액의 조성

Control		Ringer's solution		Buffer solution	
Component	Content (%)	Component	Content (%)	Component	Content (%)
NaCl	0.85	KCl	0.03	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.05
		CaCl <sub>2</sub>	0.033	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.005
		NaCl	1.72	Skim milk	0.3
				Glycerol	0.2

Ringer's solution 및 buffer solution의 경우 저장 3일째 80% 이상의 생존율을 나타내었으며 저장 7일차 각각 75% 및 81%의 우수한 생존율을 나타내어 단기형 제제화에 관한 가능성을 제시하였다. 유산균 농도  $1 \times 10^{10}$  cells/ml을 기준으로 1 L 제조하였을 때 Ringer's solution이나 buffer solution의 제조원가는 각각 50원 및 400원 수준으로 산업화를 위한 경제성을 확보하였다. 실제 유산균을 첨가할 때도 액상으로 양념과 섞이기 쉬워 사용편의성을 확보하였다. 그러나, 저장 14일까지 생존율이 급격하게 감소하면서 28일 경과 후 생존율은 각각 23% 및 29%로 현저히 감소하여 장기형 제제로는 적합하지 않다고 판단하였다.

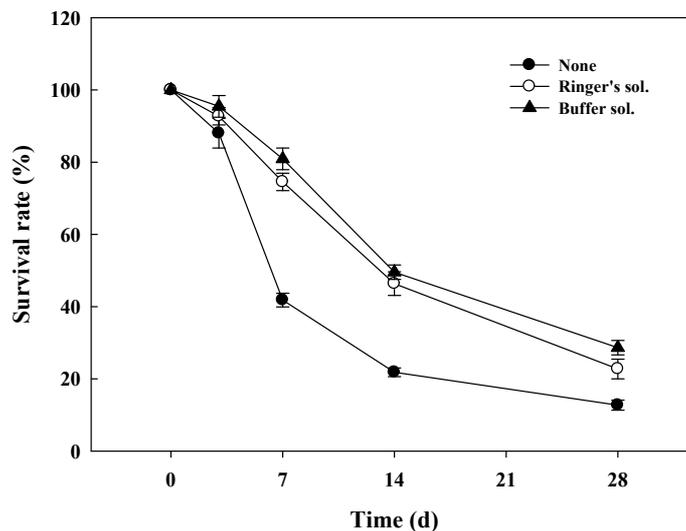


Fig. 2-23. 액상형 유산균 제제의 저장기간별 생존율\_ *W. cibaria*

## 나. 분말형 유산균 제제 개발

장기형 김치 미생물 첨가제를 개발하기 위하여 *W. cibaria*의 분말형 제제화를 실시하였다. 0.85% 생리식염수를 대조구로 사용하고 동결건조보호제로 탈지유 및 마늘 파쇄액을 단독 또는 조합하여 동결건조에 대한 보호효과를  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 조사하였다. 실험균주의 초기 농도를 각각  $1.2 \times 10^9$  cfu/ml로 고정하고 동결보호제 종류별/농도별 생존율을 저장기간 28일까지 조사하였다. 생리식염수에 실험균주를 현탁하여 동결건조를 실시한 직후 10% 미만의 저조한 생존율을 나타내었지만, 동결보호제로 마늘 파쇄액을 5 ~ 20%까지 첨가한 경우 20 ~ 44%까지 생존율이 증가하였다. 하지만, 저장기간이 증가할수록 생존율은 비례적으로 감소하여 저장기간 28일 후 마늘 파쇄액 5, 10, 20% 첨가구에서 각각 12, 29, 24%을 생존율을 나타내어 장기형 제제로는 적합하지 않다고 판단하였다.

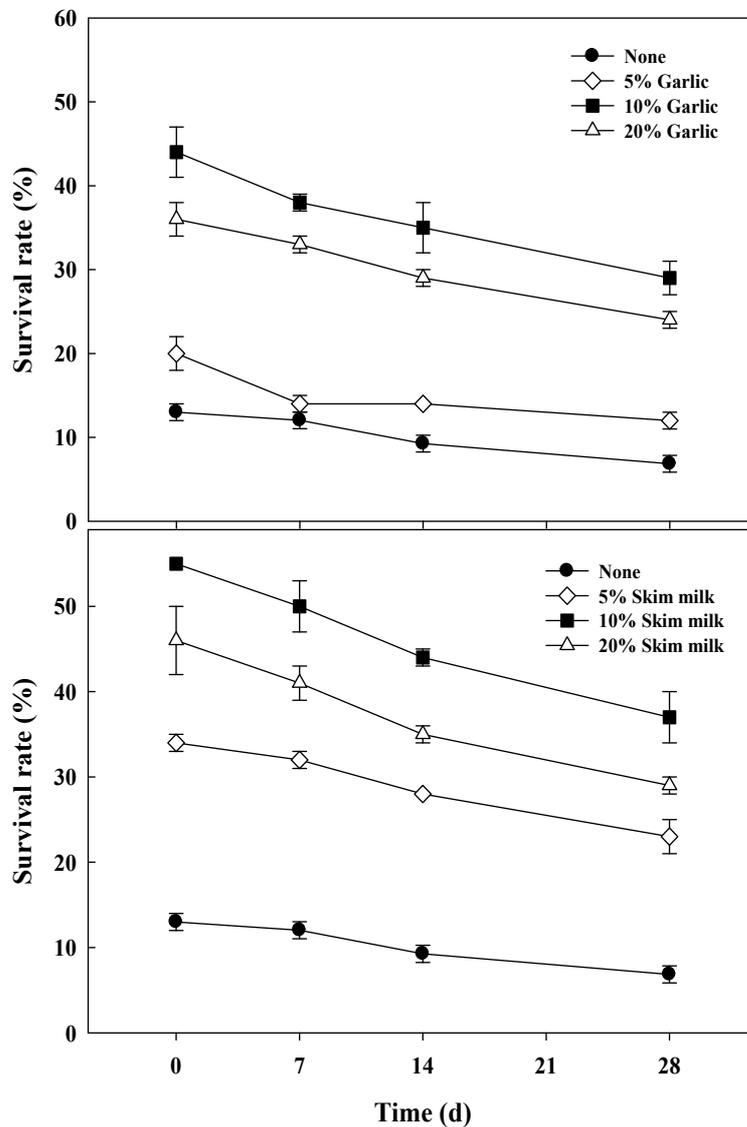


Fig. 2-24. 분말형 유산균 제제의 저장기간별 생존율\_ *W. cibaria*

동결보호제로 탈지유 5, 10, 20%를 사용한 경우 동결건조 직후 각각 34, 55, 46%의 생존율을 나타내었다. 저장기간 14일 경과 후 탈지유 10% 처리구에서 44%의 비교적 높은 생존율을 나타내어 마늘 파쇄액 처리구보다 현저히 높은 보호효과를 나타내었다. 저장기간 28일 후 탈지유 10% 처리구에서 37%의 생존율을 기록하여 중기형 제제의 가능성을 제시하였다.

#### 다. 냉동형 유산균 제제 제조

냉동형 보호제로 탈지유 10%, 마늘 파쇄액 10%, 탈지유 5% + 마늘 파쇄액 5%, 찹쌀과 멸균수 1:8의 비율로 제조된 찹쌀풀을 선정하여 보호제 종류에 따른 유산균의 생존율을 조사하였다. 0.85% 생리식염수를 대조구로 설정하고 - 20℃ 냉동고에 4주 동안 저장하면서 실험균주의 생존율을 비교하였다.

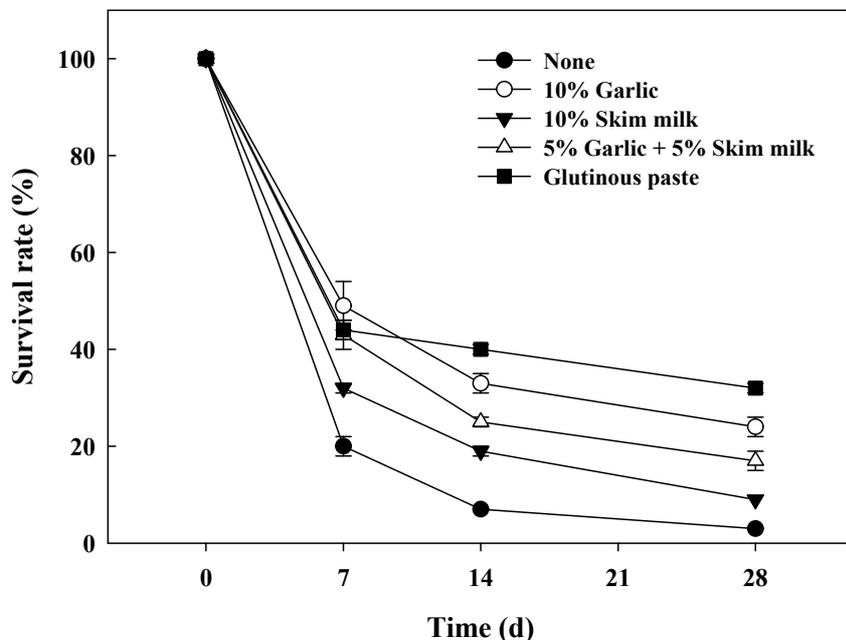


Fig. 2-25. 냉동형 유산균 제제의 저장기간별 생존율\_ *W. cibaria*

생리식염수에 현탁하여 냉동하였을 때 보존기간 7일 후 *W. cibaria*의 생존율은 3% 수준이었지만, 동결보호제 처리구에서는 30%이상의 생존율을 나타내었다. 특히, 10% 마늘 파쇄액 처리구와 찹쌀풀 처리구에서 각각 49% 및 44%의 비교적 높은 생존율을 나타내었다. 저장기간이 늘어날수록 *W. cibaria*의 생존율은 비례적으로 감소하였고, 저장 28일 후 모든 처리구에서 33% 이하의 생존율을 나타내어 장기형 제제로 적합하지 않다고 판단되었다.

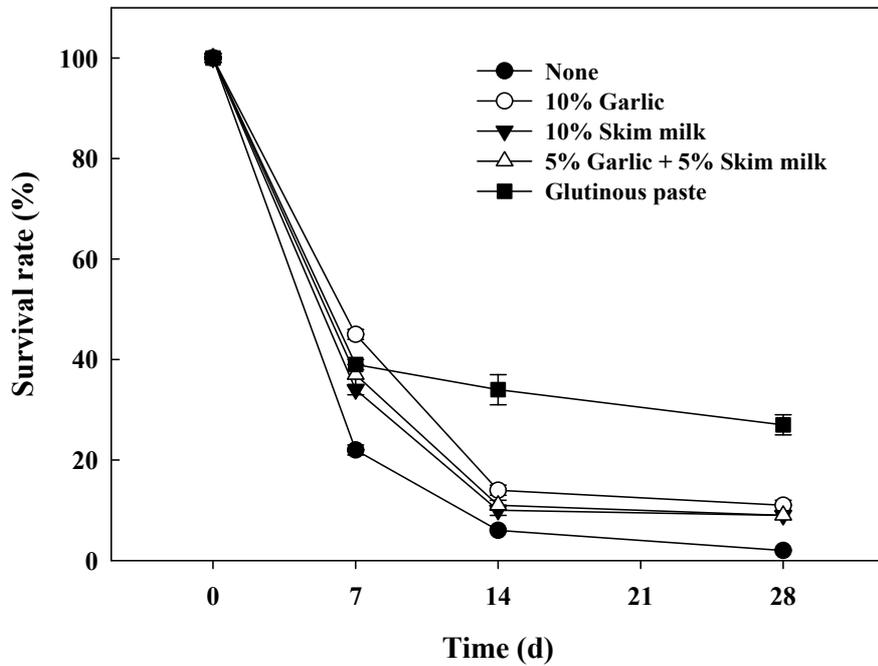


Fig. 2-26. 냉동형 유산균 제제의 저장기간별 생존율 *Lb. plantarum*

세 가지 실험군주 중 *Lb. plantarum*의 냉동형 제제는 모든 처리구에서 가장 낮은 생존율을 나타내었다. 저장기간 7일 후 10% 마늘 파쇄액 처리구에서 45%의 최고 생존율을 기록하였다. 찹쌀풀 처리구에서 저장기간 7일 후 39%의 생존율을 기록한 후 생존율이 완만하게 감소되어 저장 28일 후 27%의 생존율을 나타내었다. 탈지유 및 마늘 파쇄액 단독 또는 조합한 처리구는 *Lb. plantarum* 냉동형 제제를 위한 동결보호제로 적합하지 않다고 판단되어 실험군주의 생존율 증진을 위한 새로운 냉동형 동결보호제가 요구되었다.

모든 동결보호제 처리구에서 *P. pentosaceus*의 냉동형 제제는 가장 높은 생존활성을 나타내었으며, 특히 저장 7일 후 10% 마늘 파쇄액 및 찹쌀풀 처리구에서 각각 60%와 54%의 생존율을 나타내었다. 탈지유와 마늘 파쇄액의 조합에서 동결보호 상승효과는 관찰되지 않았다. 찹쌀풀 처리구에서 저장 14일 후와 28일 후 각각 49% 및 43%의 우수한 생존율을 기록하였다. 찹쌀풀이 김치제조 과정 중 고춧가루, 마늘, 생강 등의 부재료 혼합물에 접착력을 부여하여 절임배추에 양념하는 용도로 이미 사용되고 있음을 감안할 때, 김치 미생물 첨가제에 동결보호 안정성을 부여하는 본 실험의 결과는 향후 현장편의성 미생물 첨가제제로서의 가능성을 확인하였다.

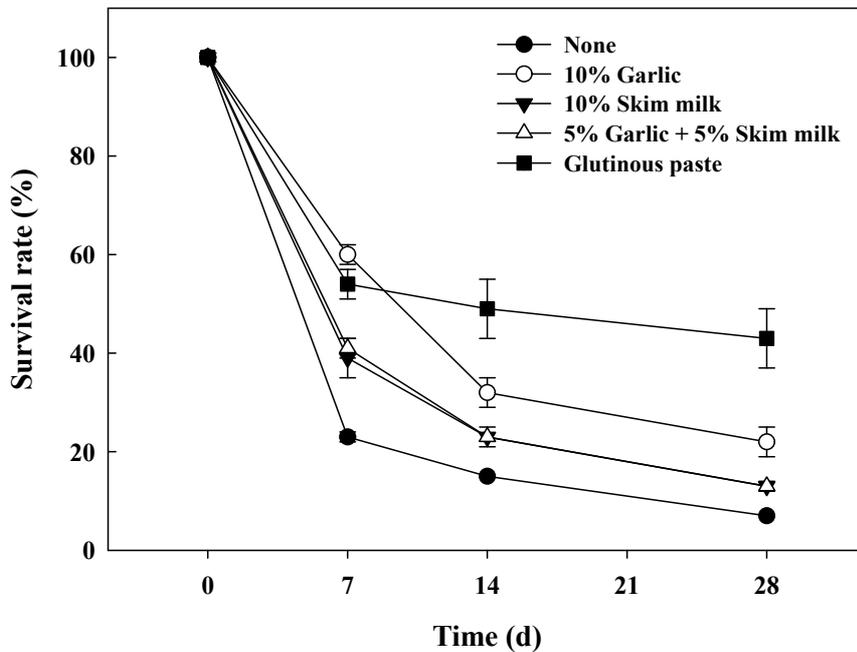


Fig. 2-27. 냉동형 유산균 제제의 저장기간별 생존율\_ *P. pentosaceus*

#### 라. 미생물 활성 및 생존율향상을 위한 보호제 선정

김치 미생물 첨가제의 장기보존을 위하여 본 연구에서는 동결건조 방법을 이용한 분말형 제제 개발을 시도하였다. 김치 미생물 제제의 생존율 향상을 위하여 우수한 동결보호제 선별 및 최적 농도 조건을 조사하였다. 또한 동결보호제와 알지네이트의 상승효과를 조사하기 위하여 동결보호제를 처리한 김치 미생물을 알지네이트 비드에 포집하여 동결건조 후 유산균의 생존율을 조사하였다.

#### 마. 보호제 종류별 유산균의 생존율 검정

분말형 제제를 위한 동결건조보호제로 식품첨가등급의 탈지유, 마늘 과쇄액, trehalose, 콩가루, 효모추출물 등을 선정하고 121°C에서 15분 동안 멸균하여 보호효과를 조사하였다. 유산균이 포집된 비드는 멸균된 생리식염수로 세척하여 5 ml의 0.3 M sodium citrate 용액에 넣고 완전히 용해시킨 후, MRS-BPB 배지에 도말하였다. 30°C에서 48시간 동안 배양한 다음 미생물 균집을 계수하였다.

Table 2-10. 알지네이트 비드크기 및 직경

Bead size	Bead diameter(mm)	Niddle size
1	0.8	30
2	1.5	24
3	2.0	18
4	2.5	16

식품첨가등급의 10% 탈지유, 10% 효모추출물, 10% 콩가루, 10% trehalose를 보호제로 선정하고 0.9% 생리식염수를 대조구로 사용하여 동결보호 효과를 조사하였다. 실험군주 모두에서 콩가루를 동결보호제로 사용하였을 경우 가장 높은 생존율을 나타내었다. 특히, *P. pentosaceus*의 경우 동결건조 직후 96.2%의 우수한 생존율을 나타내었으며, *W. cibaria* 및 *Lb. plantarum*의 경우에서도 각각 88%와 89%의 높은 보호효과를 나타내었다. 효모추출물 처리구의 경우 60% 수준의 생존활성으로 탈지유 처리구와 유사한 효과를 나타내었고, trehalose 처리구는 실험군주 모두에서 20% 미만의 가장 낮은 생존율을 기록하여 동결보호제로서 적합하지 않다고 판단되었다. 한편, 동결보호제를 처리하지 않았던 대조구의 경우 대부분의 김치 미생물이 사멸되어 10%이하의 생존율을 나타내었다.



Fig. 2-28. Photograph of different sizes of alginate beads

**바. 동결건조 보호제 조합에 따른 김치 미생물 생존율 검정**

두 가지 동결건조 보호제를 1:1의 비율로 조합하여 최종농도 10%가 되도록 첨가한 후, 단독으로 처리할 때 동결보호 효과가 우수한 10% 콩가루 처리구를 기준으로 설정하여 동결보호제 조합에 의한 유산균 생존율의 상승효과를 조사하였다. 실험군주 모두에서 10% 콩가루 단독 처리구와 비교하여 생존율에 관한 상승효과는 나타내지 않았지만, 실험군 모두에서 40% 이상의 생존율을 나타내어 무처리구 보다 보호효과가 월등하였다. 특히, *Lb. plantarum*의 경우 탈지유와 콩가루를 조합하여 동결보호제로 첨가하였을 때, 84.5%의 생존율을 나타내어 10% 콩가루 처리구와 유사한 생존율을 나타내었다. Trehalose 처리구의 경우 단독으로 사용하는 것 보다 탈지유와 콩가루 등의 다른 보호제와 조합하면 김치 미

생물의 생존율이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

#### 사. 동결건조 보호제 농도에 따른 김치 미생물 생존율 조사

보호제 활성이 가장 우수한 콩가루의 농도를 0 ~ 20% 수준으로 첨가하여 동결건조 후 김치 미생물의 생존율을 조사하였다. *W. cibaria*의 경우 무처리구보다 월등히 높은 생존율을 나타내었고, 10% 콩가루를 동결보호제로 첨가하였을 때 가장 높은 생존율(88%) 나타내었다. 콩가루의 농도가 15%나 20%로 증가하였을 때, 김치 미생물의 생존율은 각각 75%와 72%로 오히려 감소하였다. *Lb. plantarum*과 *P. pentosaceus*의 경우 콩가루 농도에 따른 보호효과는 *W. cibaria*와 유사한 경향이 관찰되어, 세 가지 실험균주 모두 10% 콩가루 처리구에서 생존율이 극대화 되었다.

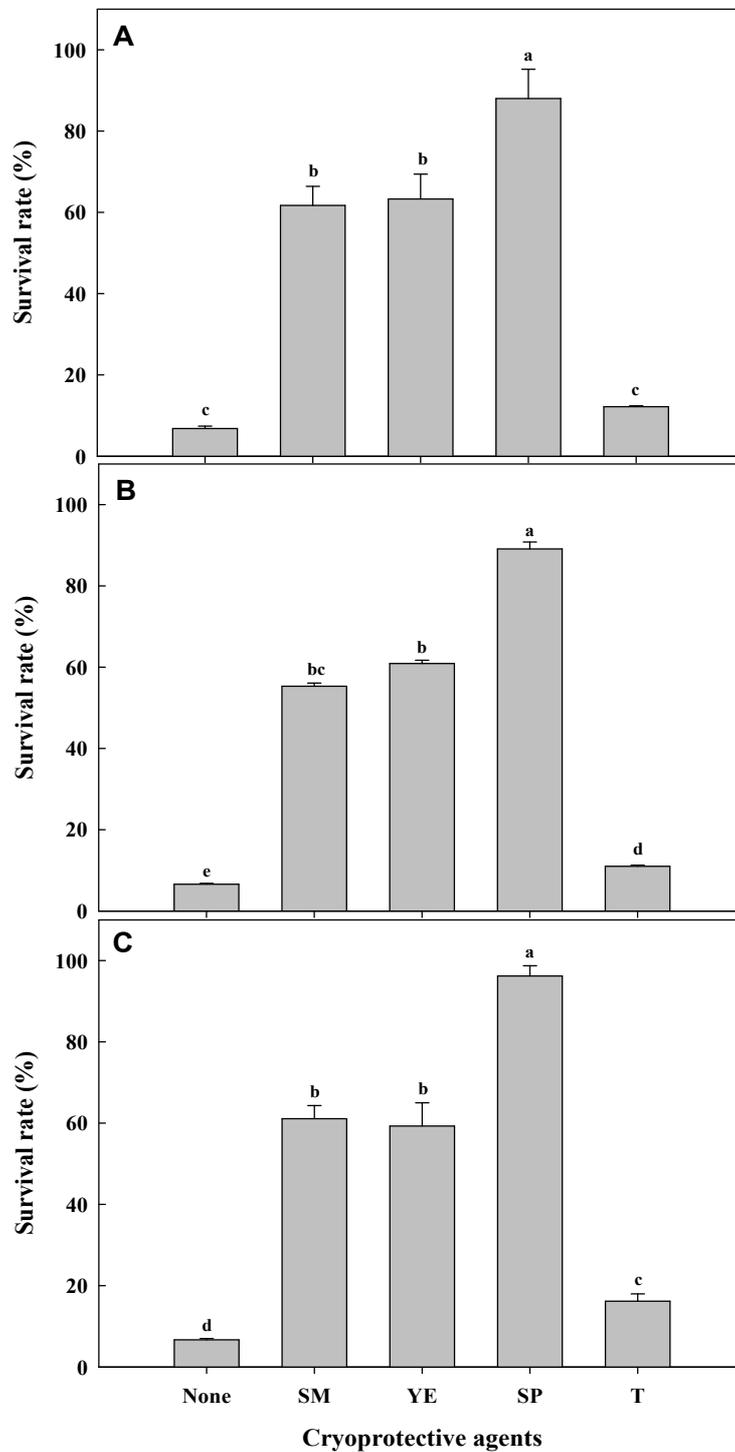


Fig. 2-29. Survival rate of lactic acid bacteria (e.g., *W. cibaria* (A), *Lb. plantanum* (B) and *P. pentosaceus* (C)) during freeze drying process, depending on cryoprotective agents. SM: Skim milk; YE: Yeast extract; SP: Soy powder; T: Trehalose

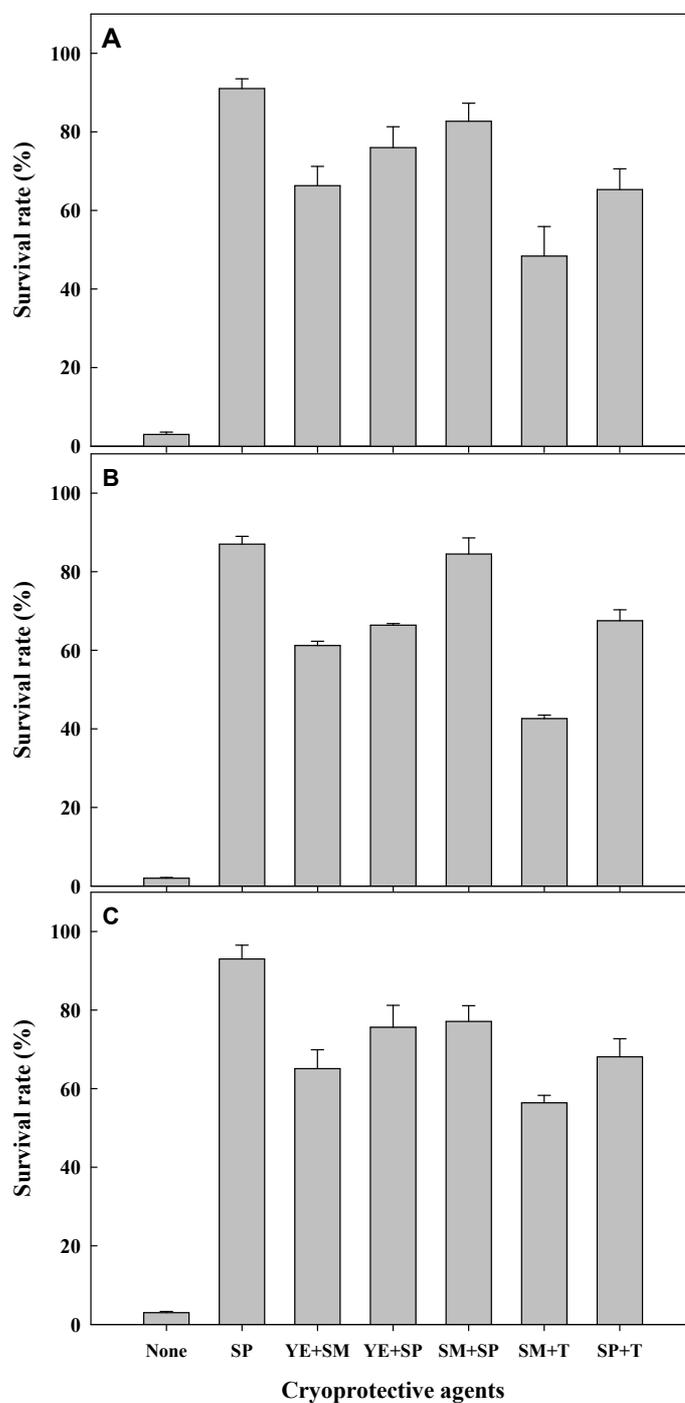


Fig. 2-30. Survival rate of lactic acid bacteria (e.g., *W. cibaria* (A), *Lb. plantarum* (B), and *P. pentosaceus* (C)) during freeze drying process, depending on the combination of cryoprotective agents. SM: Skim milk; YE: Yeast extract; SP: Soy powder; T: Trehalose

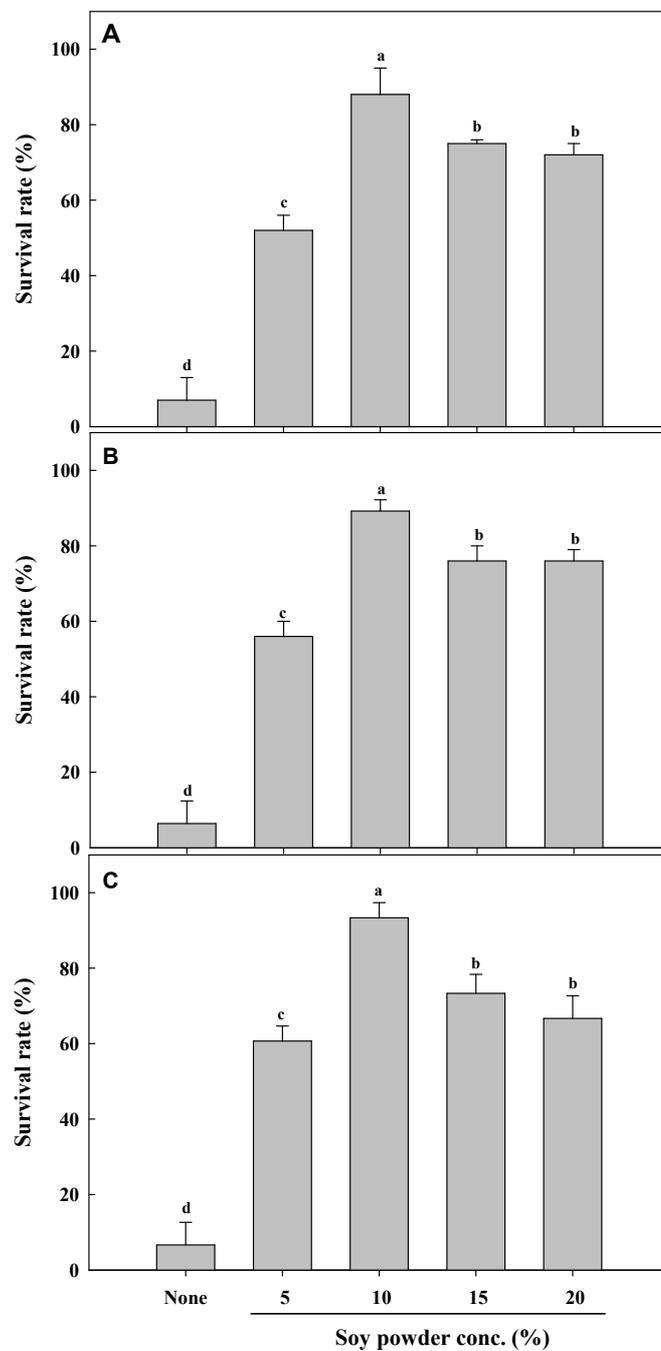


Fig. 2-31. Survival rate of lactic acid bacteria (e.g., *W. cibaria* (A), *Lb. plantarum* (B) , and *P. pentosaceus* (C)) during freeze drying process, depending on the concentration of soy powder.

## 제 5 절 활성화 및 생존율이 높은 미생물 제제 개발

### 1. 실험 목적

동결건조 후 미생물 생존율 증대를 위하여 알지네이트 비드를 제조하여 김치 미생물을 포집하였다.

### 2. 방법 및 결과

#### 가. 탈지유와 알지네이트 비드의 동결보호 상승효과 검증

알지네이트 농도 및 크기에 따른 보호효과를 검증하기 위하여 동결보호제로 10% 탈지유가 첨가된 미생물을 알지네이트에 포집하였다. 페리스탈틱 펌프의 유속과 바늘직경의 크기를 조절하여 직경이 0.8, 1.5, 2.0 mm인 비드를 제조하였으며 알지네이트의 농도를 0.5 - 3%로 조정하여 비드의 경도를 조절하였다. 알지네이트의 농도를 0.5%로 조절하여 비드를 제조하였을 때, *W. cibaria*의 생존율은 6% 미만 수준으로 비드의 사이즈에 상관없는 경향을 나타내었다. 알지네이트의 농도가 1% 이상일 때, 비드 직경 1.5 mm 이상에서 50% 이상의 생존율을 나타내었다. 비드의 직경이 0.8 mm로 제조되었을 때 알지네이트 농도와 상관없이 40% 미만의 낮은 생존율을 나타내어 김치 미생물의 동결건조 분말을 제조함에 있어 최소한의 알지네이트 농도와 비드 직경이 존재한다고 판단되었다. 알지네이트의 농도 2%로 직경 1.5 mm의 비드로 김치 미생물을 포집하였을 때, 동결건조 후 86% 이상의 가장 높은 생존율을 나타내었다. *Lb. plantarum*의 경우 *W. cibaria*의 경우와 유사한 경향을 나타내었다. 0.5% 알지네이트를 포집하였을 경우 *Lb. plantarum*은 비드의 사이즈와 상관없이 30% 미만의 가장 저조한 생존율을 나타내었다. 알지네이트 농도 1% 이상 및 비드 직경 1.5 mm 이상에서 70% 이상의 우수한 생존율을 나타내었으며, 3% 알지네이트 및 비드 직경 2.0 mm 처리구에서 87.8%의 가장 우수한 생존율을 나타내었다. *P. pentosaceus*의 경우 앞의 두 가지 실험균주 대비 상대적으로 더욱 높은 생존율을 기록하였다. 알지네이트 농도 0.5% 처리구에서 비드의 직경과 상관없이 30% 이상의 생존율을 기록하였고, 비드 직경 0.8 mm 처리구의 경우에서도 20%이상 유지하였다. 비드 직경이 2.0 mm에서 기타 사이즈에 비해 우수한 생존율을 기록하였고, 특히 알지네이트 2%, 비드 직경이 1.5 mm와 2.0 mm에서 각각 75.9% 및 89.9%의 높은 생존율을 나타내었다. 세 가지 실험균주 모두에서 알지네이트 및 비드 직경이 각각 0.5% 이상으로 비드 직경 0.8 mm 이상 제조되어 균체를 포집하였을 때, 동결건조 과정에서 발생하는 균체손상을 최소화하여 우수한 균체보호효과를 나타내었다.

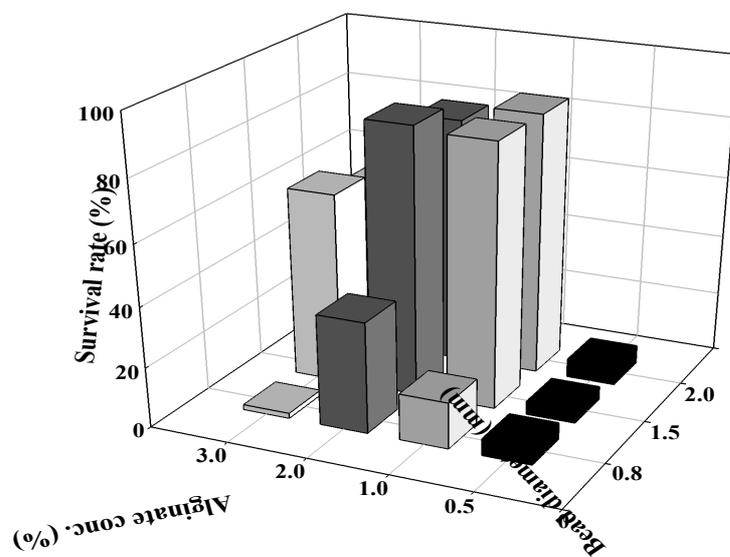


Fig. 2-32. Survival rate of *W. cibaria* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

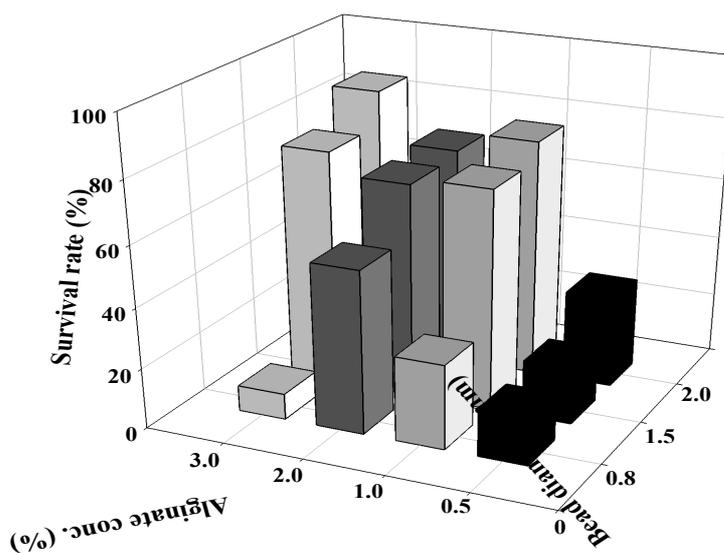


Fig. 2-33. Survival rate of *Lb. plantarum* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

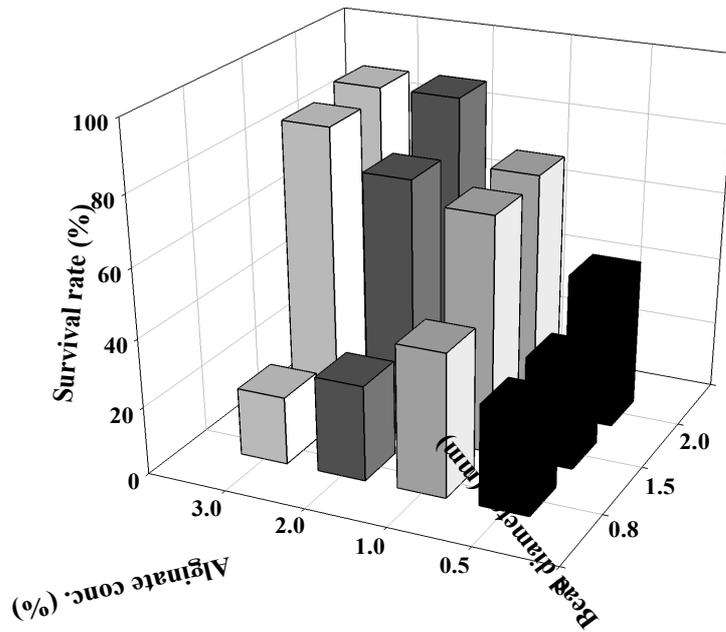


Fig. 2-34. Survival rate of *P. pentosaceus* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

**나. 마늘 파쇄액과 알지네이트 비드 포집의 동결보호 상승효과 검정**

마늘 파쇄액 10%를 동결보호제로 처리하고 알지네이트 비드에 김치 미생물을 포집하여 동결보호 효과를 검정하였다. 비드 직경 0.8 mm로 *W. cibaria*를 포집하였을 때, 알지네이트 농도와 상관없이 20% 미만의 저조한 생존율을 나타내었다. 1% 알지네이트로 직경 2.0 mm의 비드를 제조하여 김치미생물을 코팅하였을 때 53.9%의 가장 높은 생존율을 나타내어 탈지유 처리구에 비해 동결보호 효과라 저조하였다.

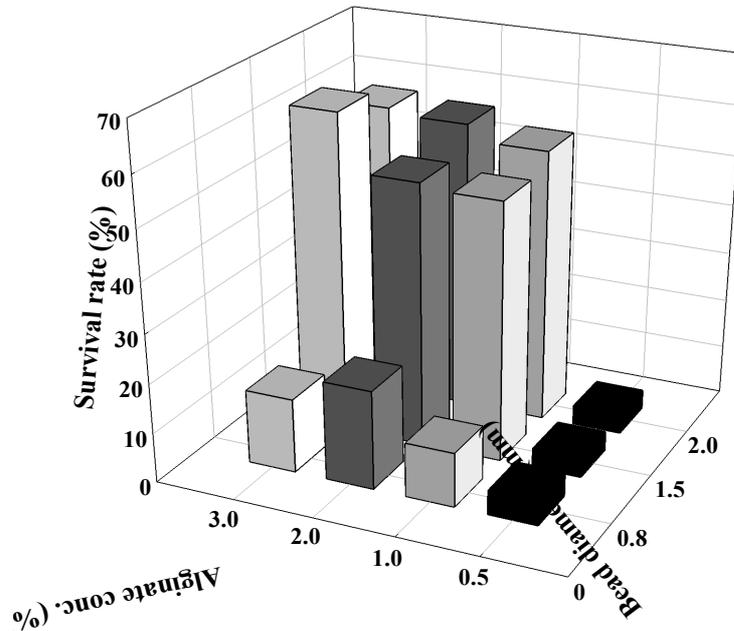


Fig. 2-35. Survival rate of *W. cibaria* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

비드 직경 0.8 mm 이상 및 알지네이트 농도 0.5% 이상 처리구에서 *Lb. plantarum* 생존율은 50~60 % 수준을 나타내었으며, 알지네이트 1%로 2.0 mm의 비드로 유산균을 코팅하였을 때 61.6%의 최고 생존율을 기록하였다. *P. pentosaceus*를 대상으로 진행한 실험결과에서도 *W. cibaria* 및 *Lb. plantarum*과 유사한 경향을 나타내어, 알지네이트 코팅을 이용한 동결건조법을 적용하여 김치 미생물 첨가제 개발을 위해서는 일정 수준 이상의 알지네이트 농도와 비드 크기가 필요하다고 판단되었다. 세 가지 실험균주를 대상으로 진행한 실험결과에서 알지네이트 농도와 김치 미생물 생존율의 비례적인 상관관계가 관찰되지 않았으며, 전반적으로 1% 알지네이트 농도와 비드 직경 1.5 mm에서 균체를 포집한 처리구에서 50% 이상의 우수한 보호효율을 나타내었다.

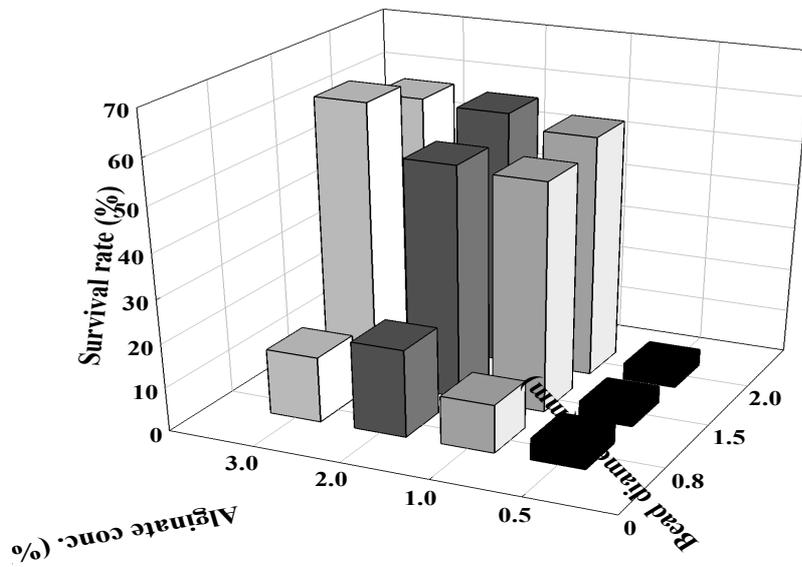


Fig. 2-36. Survival rate of *Lb. plantarum* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

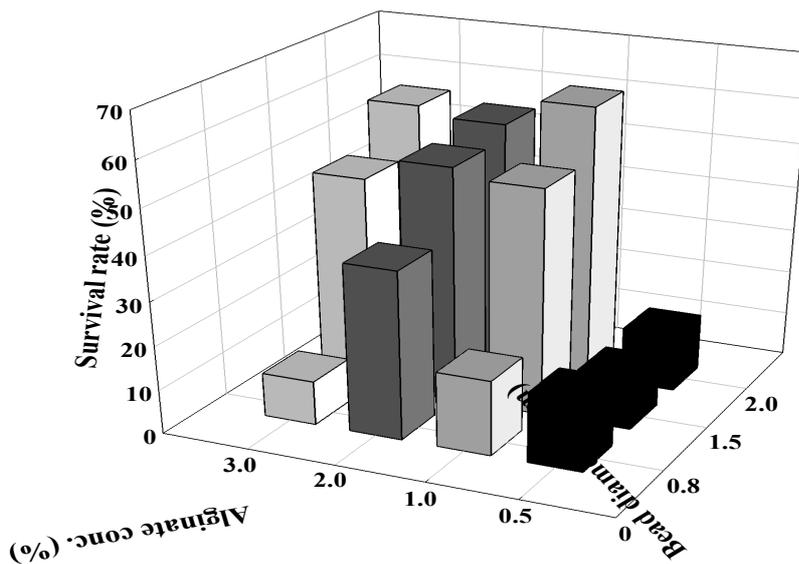


Fig. 2-37. Survival rate of *P. pentosaceus* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

**다. 동결보호제 탈지유와 마늘 파쇄액 조합 및 알지네이트 포집의 동결보호 상승효과 검증**

탈지유 5% 및 마늘 파쇄액 5%를 조합하여 보호제로 사용한 후 알지네이트로 포집하여 동결보호 상승효과를 검증하였다. 거의 모든 처리구에서 10% 마늘 파쇄액을 동결보호제로 사용한 처리구보다 우수한 생존율을 기록하였으며, *W. cibaria*의 경우 비드 직경 1.5 mm 및 1% 알지네이트로 균주를 포집한 처리구에서 65.2%의 최고 생존율을 나타내었다. 두 가지 보호제를 혼합하여 알지네이트 비드에 포집하였을 때 보호효과의 상승작용은 관찰되지 않아, 향후 김치 미생물 첨가제의 생존성 증진 및 저장기간 향상을 위해서는 보호제 종류 및 조합비율의 조정이 필요하다고 판단하였다. *Lb. plantarum* 및 *P. pentosaceus*를 실험균주로 사용하여 동결보호 상승효과를 조사한 경우에도 *W. cibaria*와 유사한 경향을 나타내었다. 세 가지 실험균주의 생존율은 처리구 별 커다란 차이를 나타내지 않았으며, 탈지유를 보호제로 사용하여 알지네이트 비드에 포집한 처리구에서 가장 우수한 보호효과를 나타내었다. 마늘 파쇄액을 단독으로 보호제로 사용한 처리구는 가장 낮은 생존율을 기록하여 알지네이트 비드를 이용한 동결건조법의 보호제로서 적합하지 않다고 판단되었다.

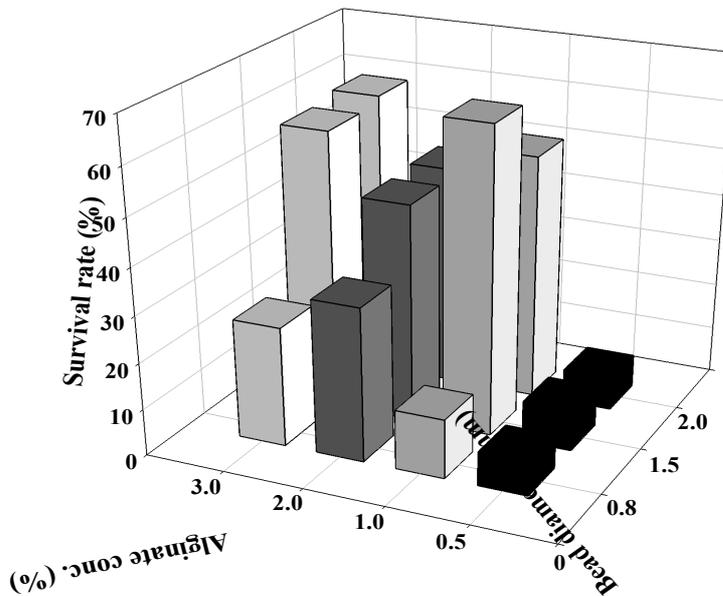


Fig. 2-38. Survival rate of *W. cibaria* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

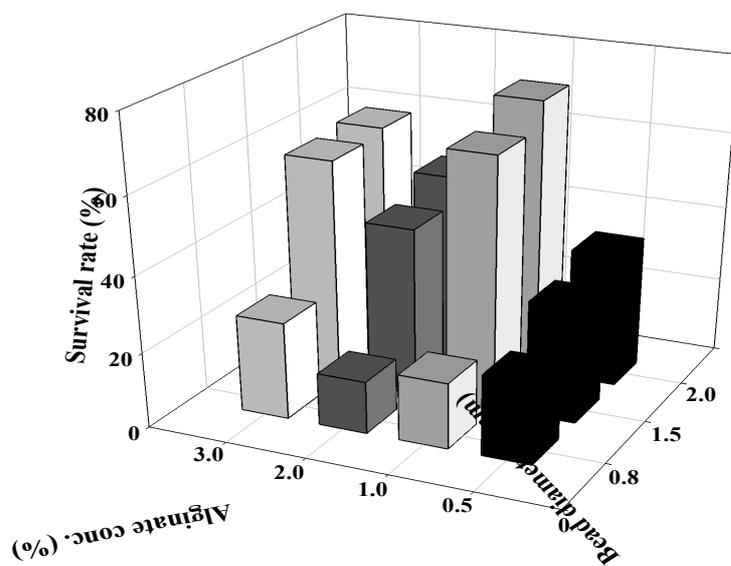


Fig. 2-39. Survival rate of *Lb. plantarum* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

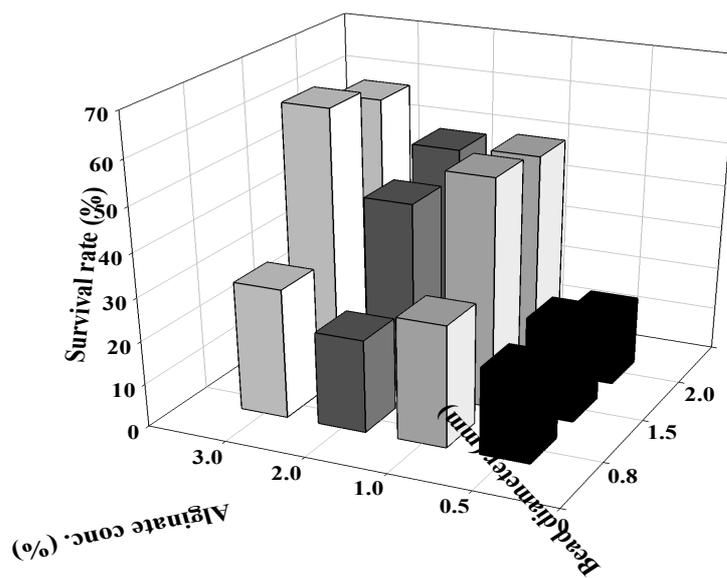


Fig. 2-40. Survival rate of *P. pentosaceus* after freeze drying process, depending on bead diameter and alginate concentration.

## 제 6 절 미생물 첨가제 제형에 따른 포장형태 및 기술개발

### 1. 실험 목적

유통 및 저장에 용이한 분말형제제와 찹쌀풀을 이용한 반죽형 제제에 대해 폴리에틸렌 재질의 스틱형 포장재와 튜브형 포장재를 적용하여 저장기간별 유산균의 생존율을 검정하였다.

### 2. 방법 및 결과

#### 가. 재료

##### (1) 김치 미생물 첨가제 제형에 따른 포장형태 개발



Fig. 2-41. 제형별 포장형태

##### (2) 스틱형 포장재를 이용한 유산균 제제 제조

10% 탈지유를 보호제로 선정하고 제조한 김치 미생물 첨가제 분말은 각 1g씩 스틱형 포장재에 충전하여  $4 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 에서 저장기간별로 유산균의 생존율을 검정하였다. 세 가지 실험군주 모두 저장 7일차에서 80% 이상의 우수한 생존율을 나타내었지만, 저장기간이 지날수록 감소하였다. *W. cibaria*의 경우 저장기간 28일 후 초기균수는  $4.9 \times 10^9$  cfu/mL에서  $2.5 \times 10^9$  cfu/mL로 감소하여 약 50%의 생존율을 나타내었다. *Lb. plantarum*과 *P. pentosaceus*의 경우도 저장 28일 경과 후 각각 49% 및 53%의 생존율이 관찰되었다.

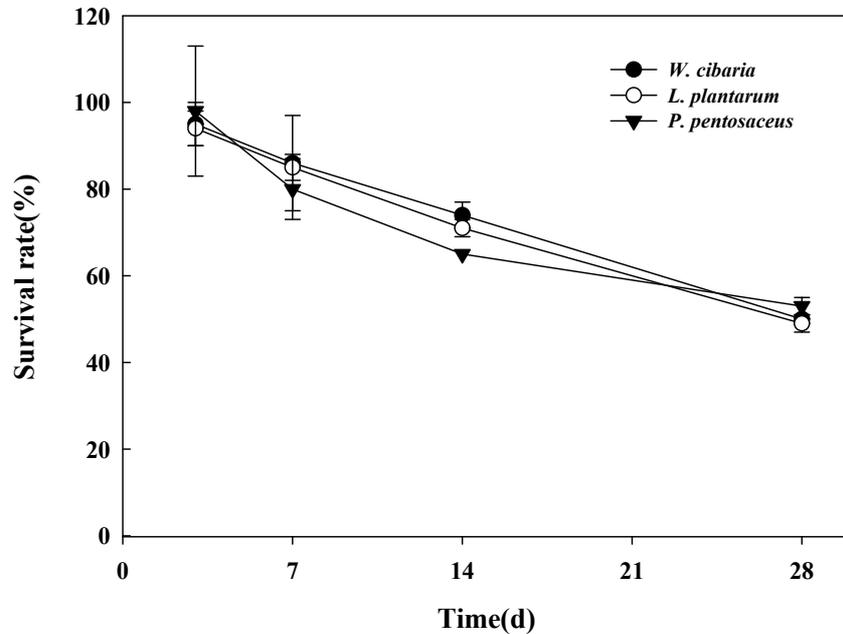


Fig. 2-42. Survival rate of three species of LAB

### (3) 튜브형 포장재를 적용한 반죽형 유산균 제제 개발

참쌀과 멸균수를 1:8비율로 혼합한 후 100°C에서 가열하여 반죽형태인 참쌀풀을 제조하고 냉동 보호제로 이용하였다. 참쌀풀과 균액은 2:1의 비율로 혼합 후 -20°C에서 냉동 저장하면서 저장기간별로 1, 2, 4주 동안 김치 미생물 제제를 MRS 고체배지에 도말하여 생균수를 검정하였다.

세 가지 실험균주 모두 식품등급의 참쌀풀을 동결보호제로 처리하여 무처리 대조구보다 월등히 높은 생존율을 나타내었다. 공통적으로 저장기간이 증가할수록 생존율이 감소하는 경향으로 나타났으며, *P. pentosaceus*의 경우 -20°C 냉동고에서 보존 7일째 세 균주 중 54%로 비교적 높은 생존율을 나타내었으며, 28일이 지나서도 43% 이상의 생존율을 나타냈다. *W. cibaria*의 경우 초기균수는  $3.1 \times 10^{10}$  cfu/ml에서 저장 28일 경과 후  $9.8 \times 10^9$  cfu/ml로 감소하여 32%의 수준이었고, *Lb. plantarum*의 경우 저장 28일째 27%의 생존율을 나타내어 세 균주 중 가장 낮은 생존율을 보였다.

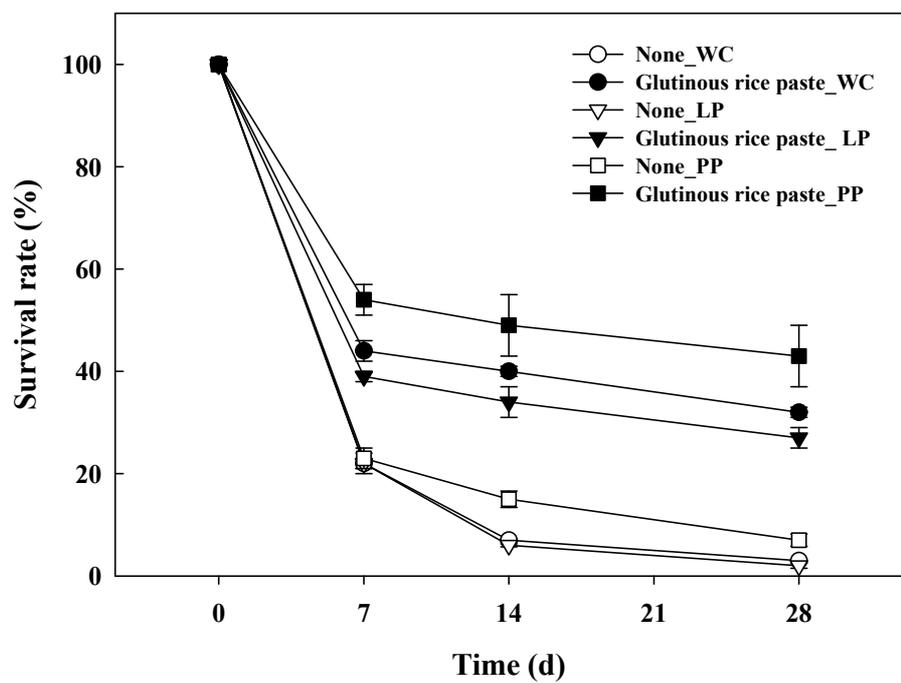


Fig. 2-43. Survival rate of lactic acid bacteria during freezing process at  $-20^{\circ}\text{C}$ , depending on storage life. WC: *Weissella cibaria*, LP: *Lactobacillus plantarum*, PP: *Pediococcus pentosaceus*

## 제 7 절 미생물 첨가제 대량 배양기술 개발

### 1. 실험 목적

김치 유래 우수 미생물 자원의 산업적 생산을 위하여 실험균주의 최적 영양원을 선발하였다. 실험균주의 발효생산 극대화를 위한 탄소원 및 질소원 선발하여 유산균 전용생산 배지인 MRS broth와 경제성을 비교하였다.

### 2. 방법 및 결과

#### 가. 최적 탄소원 탐색

MRS broth의 무기원 성분을 기초로 하여 질소원을 효모추출물 2.5%로 고정하고 탄소원에 따른 균체량을 측정하였다. 탄소원의 농도는 2%로 고정하고 대수증식기 후반기 점배양 1%를 15 ml conical tube에 접종하여 30°C에서 24시간동안 정치 배양하였다. *W. cibaria*의 경우 포도당을 비롯한 단당류에 의한 균체생육이 우수하였으며, 포도당을 주요 탄소원으로 사용하였을 경우 MRS broth보다 우수한 균체 생육( $8.5 \times 10^9$  cfu/ml)을 기록하였다. 과당 및 포도당이 결합된 이당인 맥아당에서도 우수한 균체 생육이 확인되었다. Erythritol 등의 당알콜의 경우 *W. cibaria*의 균체 생육이 낮게 나타내어 균체의 액체배양을 위해 적합하지 않은 기질이라 판단되었다.

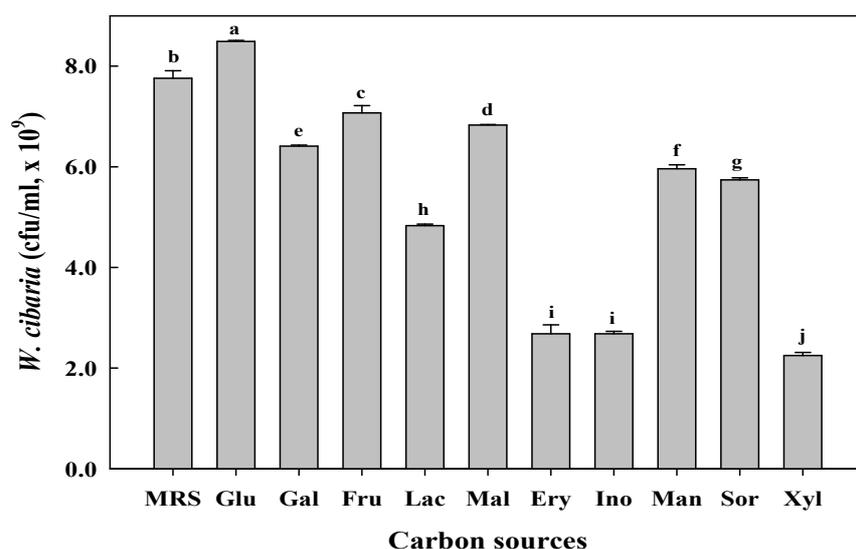


Fig. 2-44. 탄소원에 따른 *W. cibaria*의 균체량 형성. Glu: glucose; Gal: galactose; Fru: fructose; Lac: lactose; Mal: maltose; Ery: erythritol; Ino: inositol; Man: mannitol; Sor: sorbitol; Xyl: xylitol

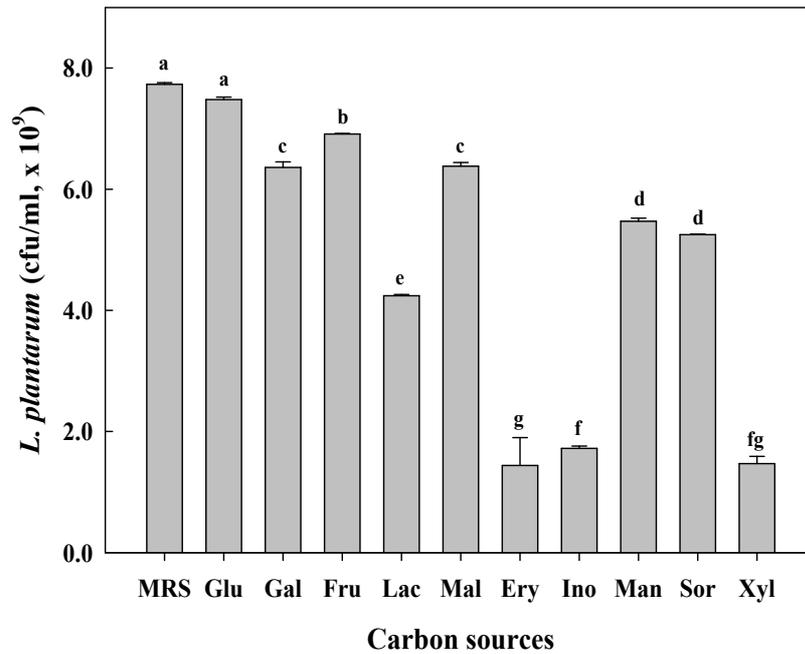


Fig. 2-45. 탄소원에 따른 *Lb. plantarum*의 균체량 형성. Glu: glucose; Gal: galactose; Fru: fructose; Lac: lactose; Mal: maltose; Ery: erythritol; Ino: inositol; Man: mannitol; Sor: sorbitol; Xyl: xylitol

*Lb. plantarum*의 경우 포도당을 비롯한 단당류에 의한 균체생육이 우수하였고, 전반적으로 *W. cibaria*와 유사한 경향을 나타내었다. MRS broth와 포도당을 사용했던 배지에서 총균체량은 가장 우수하여  $7.5 \sim 7.7 \times 10^9$  cfu/ml 수준이었다. 당알콜을 탄소원으로 사용했던 경우  $6.0 \times 10^9$  cfu/ml 미만의 저조한 균체 생육 경향을 나타내어 균체의 대량배양을 위해 적합하지 않은 기질이라 판단되었다. 실험균주 중 *P. pentosaceus*의 균체 생육이 가장 저조하였다. 포도당 및 포도당 중합체인 맥아당을 탄소원으로 사용하였을 경우 최고 수율인  $4.4 \times 10^9$  cfu/ml 수준의 균체를 생산하였다. Erythritol을 탄소원으로 사용했던 경우  $8.3 \times 10^8$  cfu/ml의 가장 낮은 균체생육을 나타내는 등 당알콜은 적합하지 않은 기질이라 판단되었다. 세 가지 실험균주 모두에서 당알콜에 의한 균체 생육보다는 당류 특히 포도당이나 포도당 중합체인 맥아당이 균체 생육에 유리한 탄소원으로 작용하였다. 배지원가 및 생산수율 등의 경제성을 고려하여 향후 질소원 선발을 위한 주요 탄소원으로 포도당을 사용하였다.

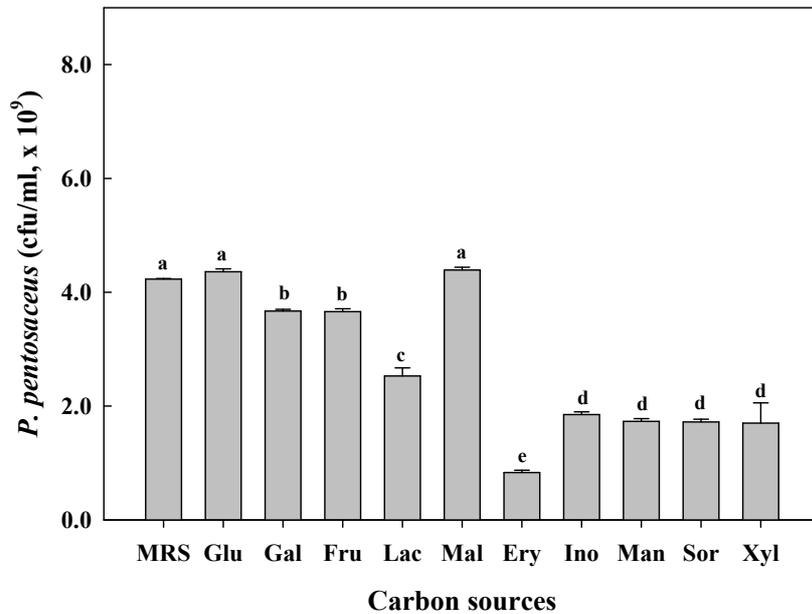


Fig. 2-46. 탄소원에 따른 *P. pentosaceus*의 균체량 형성. Glu: glucose; Gal: galactose; Fru: fructose; Lac: lactose; Mal: maltose; Ery: erythritol; Ino: inositol; Man: mannitol; Sor: sorbitol; Xyl: xylitol

#### 나. 최적 질소원 탐색

포도당 2%를 탄소원으로 고정하고 MRS broth의 무기원 조성을 기본으로 설정하여 질소원 선별을 실시하였다. 유산균 생육을 위한 질소원으로 화학배지(chemically defined media)와 복합배지(complex media)를 사용하여 실험균주의 균체량 생성을 비교하였다. 화학배지의 경우 실험균주 모두에서 ammonium phosphate이 가장 우수한 균체 생육을 유도하였다. *W. cibaria* 균주의 생육이 같은 조건에서 다른 두 균주보다 우수하였다 (*W. cibaria*  $4.7 \times 10^9$  cfu/ml, *Lb. plantarum*  $4.2 \times 10^9$  cfu/ml, *P. pentosaceus*  $3.2 \times 10^9$  cfu/ml). Ammonium chloride, ammonium sulfate, 그리고 sodium nitrate을 질소원으로 사용했을 때 전반적으로 낮은 균체생육을 나타내어 화학배지는 실험균주의 생육에 적합하지 않다고 판단하였다. 효모추출물을 비롯한 복합배지를 질소원으로 사용한 경우, 화학배지에서보다 우수한 유산균 생육을 나타내었다. *W. cibaria*의 경우 효모추출물에서  $7.6 \times 10^9$  cfu/ml 수준으로 MRS broth와 유사한 균체생육을 나타내었고, peptone, 콩가루, beef extract 등도 우수한 균체 생육을 유도하였다. *Lb. plantarum*과 *P. pentosaceus*의 경우에서도 효모추출물은 가장 우수한 균체 생육을 유도하여 향후 실험균주 액체배양을 위한 기본배지로 결정하였다.

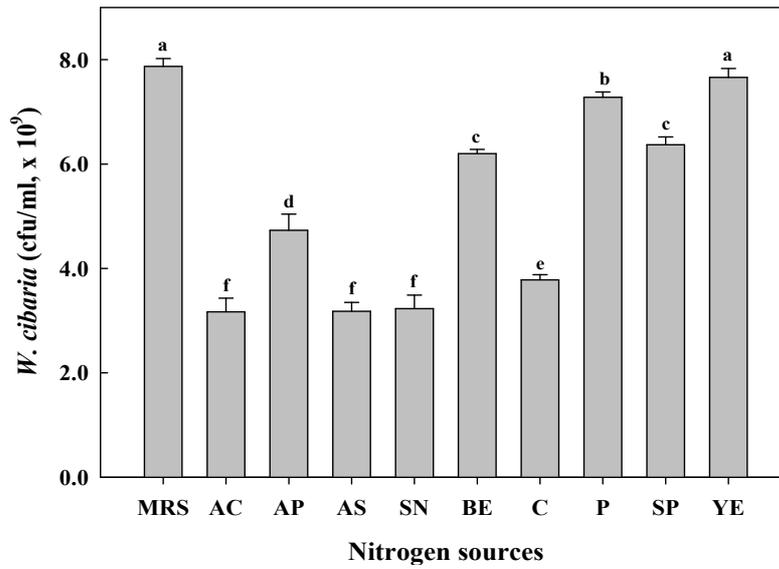


Fig. 2-47. 질소원에 따른 *W. cibaria*의 균체량 형성. MRS: MRS broth; AC: ammonium chloride; AP: ammonium phosphate; AS: ammonium sulfate; SN: sodium nitrate; BE: beef extract; C: casein acid hydrolysate; P: peptone; SP: soy powder; YE: yeast extract

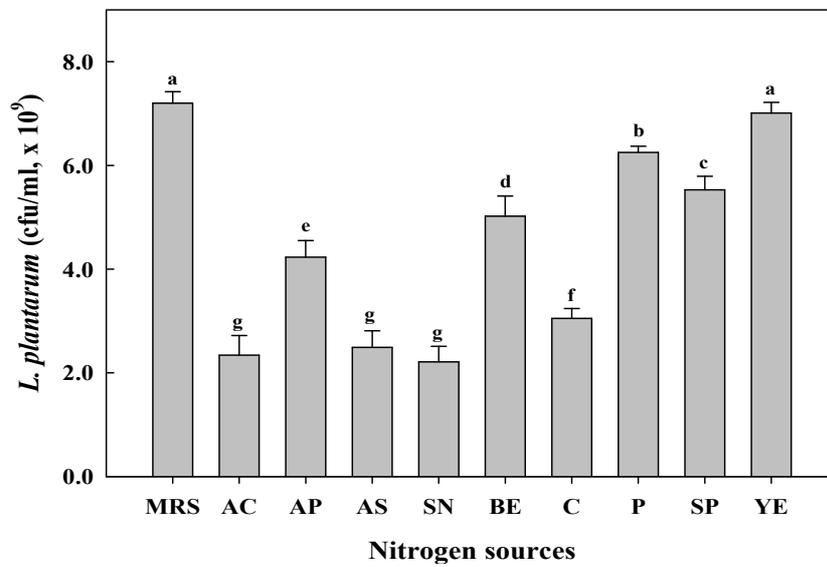


Fig. 2-48. 질소원에 따른 *Lb. plantarum*의 균체량 형성. MRS: MRS broth; AC: ammonium chloride; AP: ammonium phosphate; AS: ammonium sulfate; SN: sodium nitrate; BE: beef extract; C: casein acid hydrolysate; P: peptone; SP: soy powder; YE: yeast extract

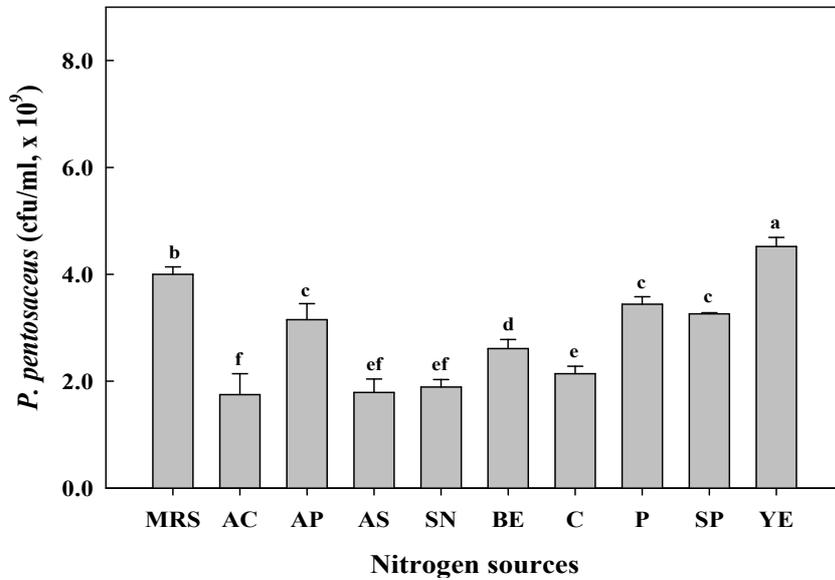


Fig. 2-49. 질소원에 따른 *P. pentosaceus*의 균체량 형성. MRS: MRS broth; AC: ammonium chloride; AP: ammonium phosphate; AS: ammonium sulfate; SN: sodium nitrate; BE: beef extract; C: casein acid hydrolysate; P: peptone; SP: soy powder; YE: yeast extract

#### 다. 대용량 발효 생산

배지성분을 포도당 2%, 효모추출물 2.5%, 초산나트륨 0.5%, 황산마그네슘 0.01%, 황산망간 0.005%, 인산나트륨 0.2%으로 구성하고 *W. cibaria*와 *Lb. plantarum* 균주를 사용하여 50 L 및 500 L 실험공장 수준에서 실험균주의 대량 생산을 시도하였다. MRS broth에서 김치 미생물의 점배양을 실시한 후 후기 대수증식기 단계의 실험균주 1%를 pilot 발효기에 접종하였다. 50 L 및 500 L 생물발효기의 교반속도를 각각 60과 40으로 고정한 후, 30°C에서 균체의 발효생산을 진행하였다. 배양온도 30°C에서 24시간 *W. cibaria*를 생산하였을 때, 50 L 생물발효기에서  $1.2 \times 10^9$  cfu/ml 수준의 균체를 생산하였다. 배양 14시간 이후 산생성이 급격히 증가하였고, pH는 시간에 따라 지속적으로 감소하여 배양 24시간 5.2 수준이었다. 500 L 생물발효기에서 초반 10시간까지 균체생육은  $8 \times 10^8$  cfu/ml 수준으로 비교적 빠르게 진행되었지만, 이후 8시간 동안 생육속도가 급격히 감소하여 균체량이 증가하지 않았다. 배양 24시간 최종 수율은  $1.04 \times 10^9$  cfu/ml을 기록하여 균체의 효율적인 대량 생산을 위해 새로운 배양 전략이 필요하다고 판단되었다. 500 L 배양의 산생성 경향은 50 L 배양과 유사하였지만, 배양 초기부터 더 높은 산도를 유지하였다.

*W. cibaria*의 균체 생육속도는 배양액 pH가 5.4 수준까지 빠르게 진행되었지만 pH가 더 낮아지면서 비례적으로 줄어들어 배양환경의 pH와 균체의 비증식속도는 음성적 상관관계를 나타내었다. *W. cibaria*는 내산성이 높지 않은 균주로 김치 발효 초기부터 중기까

지만 주도적으로 김치발효에 관여하는 균임을 고려할 때, 배양액의 pH를 주요한 발효조건인자로 설정하고 대량생산에 관한 배양전략이 수립되어야 한다고 판단하였다. *Lb. plantarum*의 경우 50 L 생물발효기에서 배양 20시간 산도 1%에서  $1.5 \times 10^9$  cfu/ml의 최고수율을 나타내었다. 배양 6시간부터 12시간까지 pH가 급격히 감소하고 균체생육속도는 비례적으로 증가하였다. 배양 12시간 이후 산생성속도가 느려지면서 균체의 비증식속도가 감소하여, *Lb. plantarum*의 증식과 산도의 비례적인 상관관계를 형성한다고 판단하였다. 500 L 생물발효기에서도 배양 12시간까지 배양액의 산도가 증가할수록 균체생육은 꾸준히 증가하였으나, 산생성이 주춤한 배양 14시간 이후  $9.0 \times 10^8$  cfu/ml 수준으로 균체농도는 증가하지 않았다.

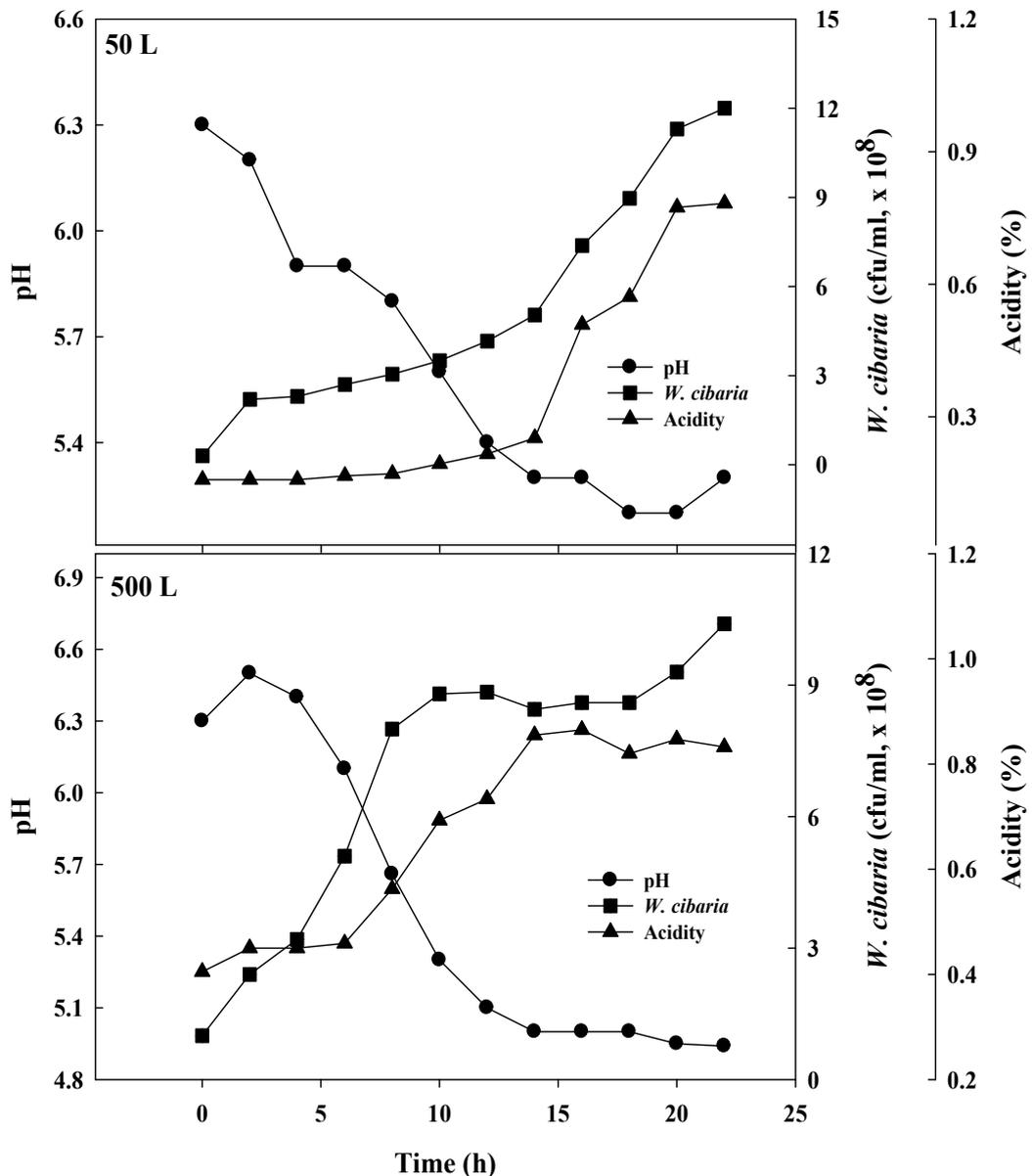


Fig. 2-50. Growth profile of *W. cibaria* in 50 L and 500 L pilot scale fermentation.

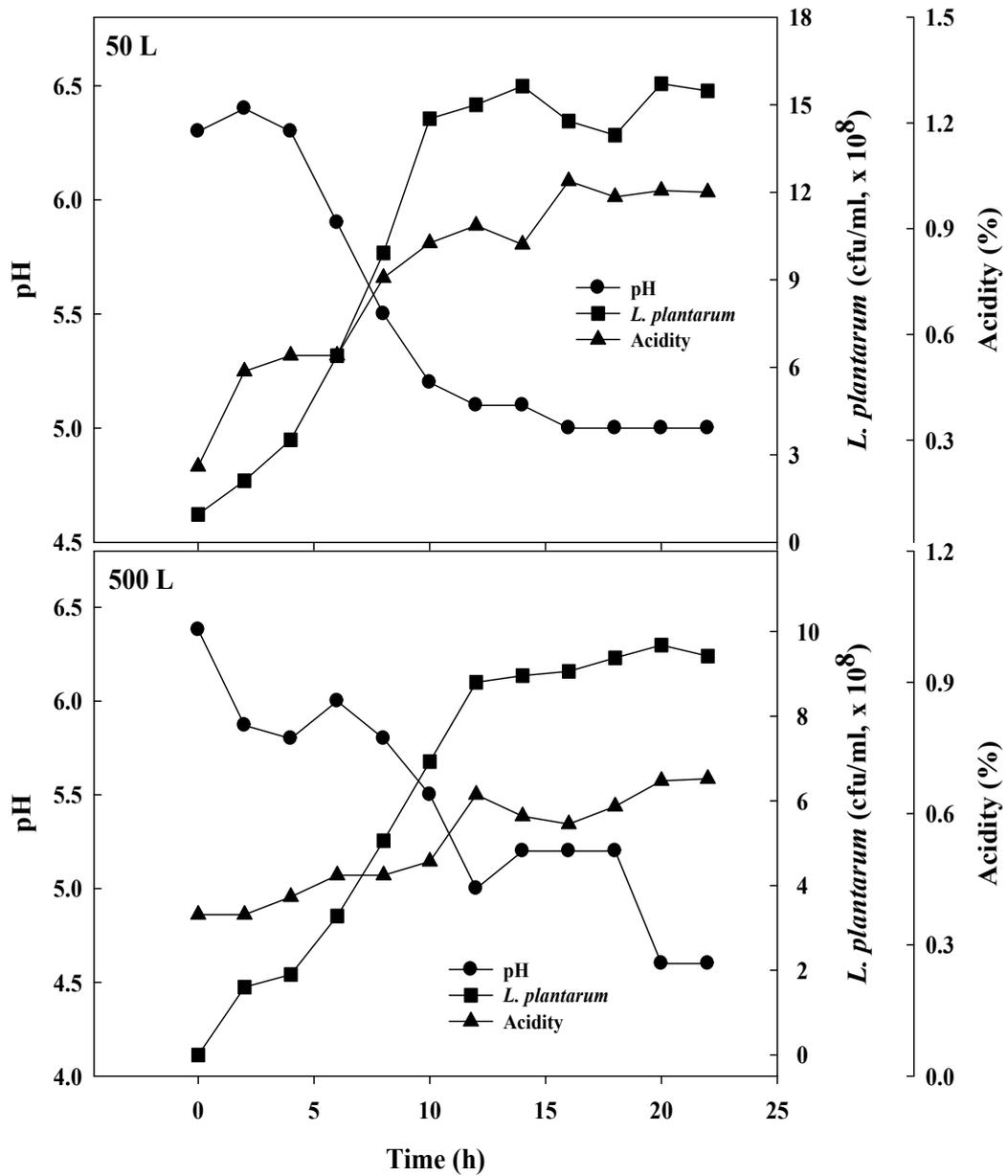


Fig. 2-51. Growth profile of *Lb. plantarum* in 50 L and 500 L pilot scale fermentation.

배양 20시간  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 수준의 최고 수율을 기록하였고 산도는 0.7%를 나타내었다. *Lb. plantarum*이 내산성이 강하여 각종 프로바이오틱 후보균주로 선발 및 제품화되고 김치 발효 중후반기 주도적인 산생성에 관여한다는 점을 고려할 때, 산도를 주요한 발효조절인자로 설정하고 대량생산에 관한 배양전략이 수립되어야 한다고 판단하였다.

## 제 8 절 모의유통조건을 통한 미생물 첨가제 활성 유지 조건 확립

### 1. 실험 목적

김치제조가 자연발효에서 미생물첨가에 따른 발효조절로 패러다임이 변화함에 따라 김치에서 분리한 유용 미생물의 현장편의형 제제화 기술을 개발하여 저장 및 유통기간 동안 미생물 첨가제의 활성유지 및 제제공정 후 생존율을 높이고자 하였다. 김치 미생물 첨가제의 장기보존을 위하여 본 연구에서는 동결건조 방법을 이용한 분말형 제제를 개발하여, 김치 미생물 제제의 생존율 향상을 위하여 우수한 동결보호제 선별 및 최적 조건을 조사하였다. 또한 동결보호제와 알지네이트의 동결보호 상승효과를 조사하기 위하여 김치 미생물을 알지네이트 비드에 포집하여 동결보호제를 처리하여 동결건조 후 유산균의 생존율을 조사하였다.

### 2. 방법 및 결과

#### 가. 미생물 활성 및 생존율향상을 위한 보호제 선정

##### (1) 사용균주 및 보존

1차년도 과제수행 중 김치로부터 분리된 *Lacobacillus brevis* A101, *Lactococcus lactis* CHJ10 균주를 사용하였다. 실험균주는 유산균 배양에 적합한 MRS broth(Lactobacilli MRS agar, Difco)에 접종하여 30℃에서 24±12시간 배양하여 활성화 시킨 후, MRS agar plate에 접종하여 4℃에서 4주 간격으로 계대 배양하면서 보관하였다. 실험균주의 장기보관법으로는 글리세롤 최종농도 20%로 미생물 현탁액을 제조하여 -80℃에서 보존하였다.

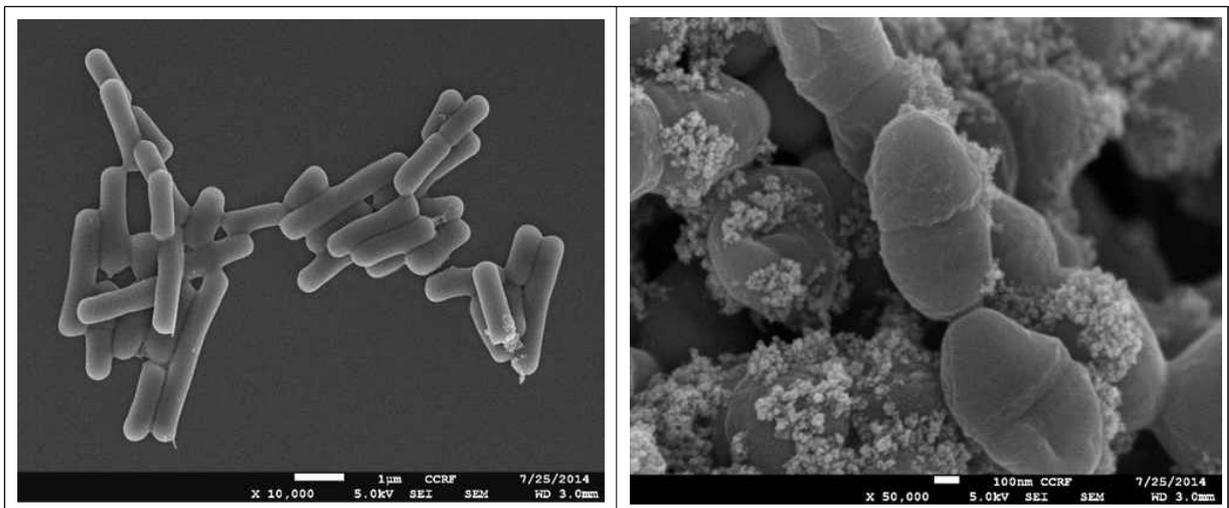


Fig. 2-52. Lactic acid bacteria, *Lacobacillus brevis* A101(left) and *Lactococcus lactis* CHJ10(right).

## (2) 김치 유래 미생물의 배양

-80℃에서 장기 보관된 실험균주를 10 mL MRS broth에 1 % (v/v)접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후, 다시 MRS broth에 2차 접종하여 미생물의 활성을 증대시킨 후 사용하였다.

## (3) 시험균주의 계수

MRS broth에 0.2% Bromophenol blue(BPB) 지시약 1%를 첨가하여 MRS-BPB 배지를 제조하였다. 미생물 현탁액 100 µl 도달하여 30℃에서 24±12시간 동안 배양한 다음 미생물 균집의 숫자를 계수하였다. 분말형 제제를 위한 동결건조보호제로 식품첨가등급의 콩가루, skim milk, yeasts extract, trehalose와 sodium alginate를 121℃에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다. 유산균이 포집된 비드는 멸균된 생리식염수로 세척하여 1 ml의 0.3 M sodium citrate 용액에 넣고 완전히 용해시킨 후, MRS-BPB 배지에 도달하였다. 30℃에서 36±12시간 동안 배양한 다음 미생물 균집을 계수하였다.

## (4) 모의유통 과정 조건에 따른 생존율 조사

가장 우수한 동결보호제를 선정하여 alginate bead에 유산균을 포집하여 sodium alginate와 동결보호제의 동결건조 직후 및 저장기간 동안의 생존율을 식품 및 축산물의 유통기한 설정 실험 가이드라인의 실측실험을 참고하여 저장온도 김치에서 분리한 유산균을 이용하여 모의유통조건에 따른 활성 유지조건을 탐색하고자 분말형으로 제조된 유산균 제제를 실온, 냉장, 냉동 온도(-18℃, 4℃, 10℃, 20℃, 30℃, 35℃ and room temperature)저장기간에 따른 생존율을 조사하여 미생물 첨가제의 활성이 유지되는 최적 조건을 탐색하고자 하였다. 또한 저장기간에 따라서 0, 7, 14, 28, 56일까지 생존율을 조사하였다.

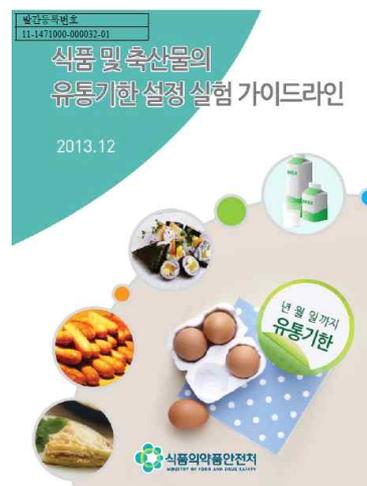


Fig. 2-53. 식품의약품안전처 식품 및 축산물의 유통기한 설정실험 가이드라인

**(5) 용어의 정의**

- 냉동저장: 식품의 수분을 얼려 효소나 산화에 의한 변질을 최소화하는 저장방법,  
온도 위는 -18℃ 이하
- 냉장저장: 식품의 어는점 이상의 낮은 온도에서 식품을 보관 및 저장,  
온도범위는 0~10℃
- 실온저장: 식품을 환기장치와 단열만으로 저장하는 방법 온도범위는 1~35℃
- 상온저장: 온도범위는 15~25℃
- 실측실험: 의도하는 유통기한 동안 실제 저장조건 또는 유통조건으로 저장하면서 선정  
한 품질지표에 대해 품질한계에 이를 때까지 일정간격으로 실험을 진행하  
면서 변화를 측정하는 실험
- 실측실험의 저장조건
- 저장온도는 제조 후 보관, 유통, 진열, 소비 전 보관 등 제조에서 소비에 이르기까지  
일어날 수 있는 조건들을 고려하여 최소 2개의 온도 즉, 유통 온도와 비교 온도를 설  
정함
- 유통온도: 제품의 대표적인 유통온도 조건을 선택함
- 비교온도: 극단의 환경, 여러 유통단계에서  
소비된 시간을 참조하여 적절한 비교온도를 결정함,
- \* 유통온도: 반드시 제품의 대표 유통온도를 포함하여 저장조건을 설정

Table. 2-11 유통 온도 및 저장온도 예

구분	유통온도	저장온도
상온유통제품	15~25℃	유통온도: 25℃ 비교온도: 15℃
실온유통제품	1~35℃	유통온도: 35℃ 비교온도: 25℃
냉장유통제품	0~10℃	유통온도: 10℃ 비교온도: 15℃
냉동유통제품	-18℃	유통온도: -18℃ 비교온도: -10℃

## 나. 동결보호제 종류에 따른 동결건조 전 후 생존율 검정

네 가지 식품첨가등급의 동결보호제를 첨가하여 김치미생물의 동결보호효과를 검정한 결과 두가지 균주의 경우에서 동결보호제를 사용하지 않은 처리구보다 생존율이 증가하였다. *Lb. brevis* A101균주의 경우 동결건조 직후 콩가루를 보호제로 사용하였을 경우 보호효과가 90% 이상의 높은 생존율을 나타내었다. *Lc. lactis* CHJ10의 경우에서도 콩가루를 보호제로 사용하였을 때 94%의 높은 생존율을 기록하였다. 본 연구에서 동결보호제로 선정한 콩가루는 식품첨가등급의 경제적인 소재이면서 단백질, 섬유질, 무기질, 지질, 각종 비타민 등과 lysine을 비롯한 다양한 아미노산류가 풍부한 식품소재로써 동결건조 중 실험균주를 보호해 주는 역할을 수행하여 동결건조 중 김치미생물의 생존율 향상에 크게 기여한 것으로 판단되었다. 일반적으로 동결보호제로 널리 사용되고 있는 탈지유는 식품에 첨가할 경우 풍미에 영향을 미칠 수 있으며 또한 섭취 시 유당소화 불량 및 유당불내증 환자의 경우 음용하는데 어려움이 있으나 콩가루를 사용할 경우 이러한 점을 개선할 수 있을 뿐만 아니라 식물성 단백질과 칼슘 및 철분이 풍부하여 단백질이 보강되고 풍미가 향상될 수 있을 것으로 여겨진다. 본 실험에 사용한 콩가루는 9.7%의 질소함량과 sodium, phosphorus, chloride, potassium, calcium 등의 무기염류가 함유되어 동결건조 과정 중 탈지유에 비해 높은 보호효과가 나타난 것으로 사료된다. 본 실험 결과에서 동결보호제로 탈지유를 사용한 처리구에서 실험균주의 생존율은 각각 70~76% 수준으로 나타내어 보호효과가 우수한 콩가루를 사용했을 경우의 생존율보다 비교적 낮은 수준으로 나타났다. 효모추출물 처리구에서도 두 가지 균주 모두에서 65%이상 보호효과를 기록하여 동결보호제로서의 가능성을 제시하였다. 천연 비환원성당인 trehalose는 단백질의 동결에 의한 보호작용 건조에 따른 세포 보호 작용 등을 수행하여 미생물의 생명 보전 및 건조에 의한 영향에 작용하는 보호물질로서, *Lc. lactis* CHJ10 균주의 경우 45%의 낮은 생존율을 기록하였으나, *Lb. brevis* A101 경우에는 각각 60%의 비교적 높은 생존율을 나타내었다. 따라서, 동결보호제 종류별 유산균의 생존율에 미치는 효과는 균의 차이, 보호제 농도의 차이에 따라서도 영향이 있는 것으로 판단된다. 이상 사용된 식품첨가등급의 네 가지 보호제는 유산균제제의 동결보호효과가 탁월하여 건조과정 중 미생물의 생존율을 극대화시키는 장점이 있다. 실제 미생물제제의 제조 시 동결보호효과가 높은 보호제를 사용하여 동결건조 중 발생하는 유산균의 손실을 최소화하여 초기비용을 줄일 수 있을 것으로 판단된다. 본 연구결과를 바탕으로 향후 내산성, 내담증성, 장내 부착능 향상을 고려한 보호제 조합이 연구된다면 김치미생물을 이용한 미생물첨가제 및 장내균총 조절용 프로바이오틱스 제품개발 등 다양한 산업적 이용방안에 사용될 수 있을 것이라 사료된다.

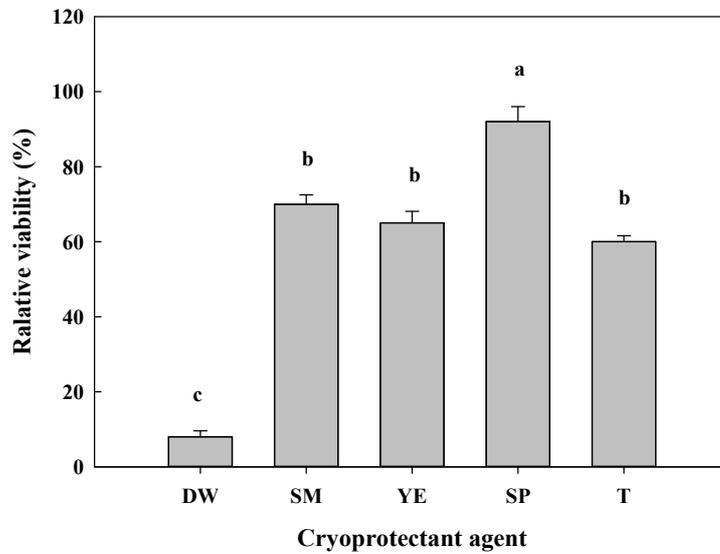


Fig. 2-54. Viability of lactic acid bacteria, *Lactobacillus brevis* A101 during freeze drying process, depending on different protective agents. SM: Skim milk; YE: Yeast extract; SP: Soy powder; T: Trehalose.

Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).  
 Different characters were significantly different (p < 0.05).

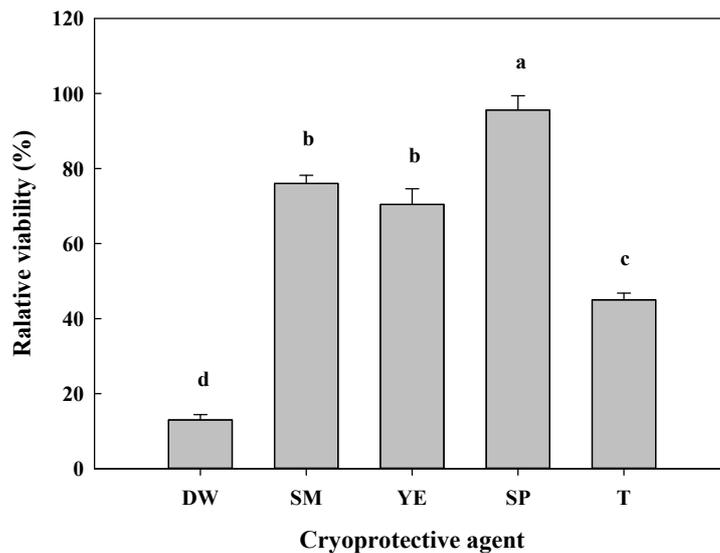


Fig. 2-55. Viability of lactic acid bacteria, *Lactococcus lactis* CHJ10 during freeze drying process, depending on different protective agents. SM: Skim milk; YE: Yeast extract; SP: Soy powder; T: Trehalose.

Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).  
 Different characters were significantly different (p < 0.05).

#### 다. 동결보호제 종류별 무기염류 함량

네 가지 식품첨가등급의 동결보호제를 첨가하여 김치미생물의 동결보호효과를 검정한 결과 모든 경우에서 동결보호제를 사용하지 않은 처리구보다 생존율이 증가되는 효과를 나타내었으며, 특히 콩가루에서 효과가 뛰어난 결과를 바탕으로, 콩가루의 주요 성분 중 질소원과 무기염류 성분이 동결보호효과 상승에 크게 작용한 것으로 판단되어 각 동결보호제 성분을 ICP를 이용하여 양이온의 함량을 조사하였다. 동결보호제 종류별 무기염류 함량으로는 soy powder의 경우 magnesium이온과 sodium이온의 함량이 2,495 mg/kg, 6,996 mg/kg으로 다른 동결보호제의 함량과 비교해 보았을 때 가장 높게 나타났다. 따라서 magnesium이온과 sodium이온이 동결보호 효과에 큰 영향을 미쳤을 것으로 판단되었다.

Table 2-12. 동결보호제 종류별 무기염류 함량 (mg/kg)

	sodium	phosphorus	potassium	calcium	Magnesium
skim milk	3,790	9,406	12,947	12,358	1,135
Yeast extract	5,256	10,219	32,759	980	986
<b>soy powder</b>	<b>6,996</b>	<b>3,172</b>	<b>23,145</b>	<b>831</b>	<b>2,495</b>
sodium alginate	5,232	0	517	2,161	97

#### 라. Powder 제제의 저장기간별 생존율 검정

김치에서 분리한 유산균을 이용하여 모의유통조건에 따른 활성 유지조건을 탐색하고자 분말형으로 제조된 유산균 제제를 실온, 냉장, 냉동 온도별로 (-18℃, 4℃, 10℃, 20℃, 30℃, 35℃, room temperature) 저장기간에 따른 생존율을 조사하여 미생물 첨가제의 활성이 유지되는 최적 조건을 탐색하고자 하였다. 멸균수를 대조구로 사용하고 동결보호효과가 가장 우수한 콩가루를 동결보호제로 사용하여 제조한 분말형 제제를 동결건조 직 후 및 저장기간별로 7, 14, 28, 56일까지 생존율을 조사하였다. *Lb. brevis* A101의 초기농도는  $1.2 \times 10^{10}$  cfu/ml로 대조구인 멸균수에 실험균주를 현탁하여 동결건조를 실시한 직후 10% 미만의 낮은 생존율을 나타내었지만, 동결보호제를 사용한 처리구에서는 동결건조 직 후 95.1%의 생존율을 나타내었다. -20℃에서 저장한 제제의 경우 저장기간 7일 경과 후의 생존율은 대조구와 처리구 각각 7.4%, 93.5%로 나타내었고, 14일 경과 후의 생존율은 대조구 및 처리구의 생존율은 7.3%, 92.4%, 28일 경과 후에는 각각 4.9%, 87.6%, 56일 경과 하였을 때는 각각 2.9%, 44.6%로 크게 감소하였다.

4℃에서 보관한 제제의 경우 대조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 4.3%, 68.9%로 나타났고 56일 경과 시에는 각각 1.9%, 34.1%로 나타났다. 10℃에서 보관한 제제의 경우 대

조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 4.1%, 65.7%로 나타났고, 저장 56일 경과 후에는 0.1%, 20.8%로 나타났다. 20℃에서 보관한 제제의 경우 대조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 3.7%, 55.1%로 나타났으며, 56일 경과후에는 각각 0.4%, 13.2%로 나타났다. 30℃에서 보관한 제제의 28일 경과 후의 생존율은 34%, 50.5%, 56일 경과 후에는 대조구의 경우에는 0.2%, 처리구에서는 9.7%로 저장 온도가 상승할수록 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인하였다.

35℃에서 보관한 제제의 경우 7일 경과 후 대조구의 생존율이 5.3%로 감소하였고 동결보호제를 처리한 실험군에서도 생존율이 76.5%로 감소한 것을 확인하였다. 저장기간 28일 및 56일이 경과하였때 처리구에서는 46.8%, 6.5%를 나타내어 35℃에서 제제를 보관한 경우 56일이 경과 시 생존율이 매우 낮아지는 것을 확인하였다. 따라서, 저장 온도가 낮을수록 특히, -18℃에서 저장하는 것이 저장기간에 따른 생존율의 변화가 적은 것을 알 수 있었다. 실험결과, 저장기간이 증가할수록 생존율은 비례적으로 감소하였으나 동결보호제를 사용한 제제의 경우에는 보호제의 효과로 인해 생존율이 비교적 상승함을 확인하였으며 제제의 저장 온도는 -20℃에서 저장한 경우의 생존율이 가장 높게 나타나 유통과정 온도로 가장 적합하다고 판단되었다. *L. lacis* CHJ10을 이용한 분말형 제제의 초기농도는  $1.6 \times 10^{10}$  cfu/ml로 동결건조 직후의 생존율은 대조구 및 처리구의 경우 8.9%, 96.6%로 동결보호제를 사용한 처리구의 생존율이 매우 높게 나타났다. 각 온도별 저장기간에 생존율을 조사한 결과, -18℃에서 저장한 대조구의 생존율은 동결건조 직후 및 저장 기간동안 10% 미만의 낮은 생존율을 나타낸 반면 동결보호제를 사용한 처리구의 경우에는 저장기간 7일 경과 후의 생존율은 96.0%, 14일차는 93.4%, 28일차에는 90.9%, 56일차의 생존율은 46.2%를 나타내었다. 4℃에서 보관한 제제의 경우 저장 28일 경과 후의 생존율은 73.0%로 감소하였으며, 저장 56일 경과 후의 생존율은 39.8%로 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 10℃에서 보관한 제제의 경우 저장 28일 경과 후의 생존율은 66.2%, 56일 경과 후에는 25.5%로 감소하였다. 20℃에서 보관한 제제의 경우 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 58.1%에서 56일 경과 후에는 15.7%로 감소하였고, 30℃에서 보관한 제제의 경우 28일 경과 후의 생존율은 50.6%, 56일 경과 후에는 8.5%로 생존율이 저하되었다. 35℃에서 보관한 제제의 경우 28일 경과 후의 생존율은 48.3%로 나타났으며 56일 경과 후에는 5.3%의 낮은 생존율을 보였다. 실온저장일 경우 7일차에서의 생존율은 81.7%로 나타났고, 28일차에는 31.9%, 56일차에는 0.1%로 56일차의 생존율은 극히 저조하게 나타났다.

#### 마. Alginate bead로 포집한 제제의 저장기간별 생존율 검정

동결건조 후 미생물 생존율 상승효과를 조사하기 위하여 동결건조 보호효과가 가장 뛰어난 콩가루와 sodium alginate를 이용하여 김치 유산균을 alginate bead포집하여 제조한 분말형 제제의 모의유통조건에 따른 활성 유지조건을 탐색하고자 0.85% 생리식염수를 대조구로 사용하고 콩가루를 동결보호제로 사용한 alginate bead를 이용한 제제를 동결건조 직 후 및 저장기간별로 7, 14, 28, 56일까지 생존율을 조사하였다. 유산균 제제를 실온, 냉장, 냉동 온도(-18°C, 4°C, 10°C, 20°C, 30°C, 35°C and room temperature)저장기간에 따른 생존율을 조사하여 미생물 첨가제의 활성이 유지되는 최적 조건을 탐색하고자 하였다. alginate bead의 농도 및 크기는 2차년도 연구결과에 따른 보호효과를 결과를 참고하여, 페리스탈틱 펌프의 유속과 바늘직경의 크기를 조절하여 직경이  $1.8 \pm 0.2$ mm의 비드를 제조하였으며 알지네이트의 농도를 1%로 조정하여 비드의 경도를 조절하였다. *Lb. brevis* A101의 초기농도는  $2.6 \times 10^{10}$  cfu/ml로 농축하여 alginate bead를 제조하였다. 대조구인 멸균수에 bead를 침지한 후 동결건조를 실시한 직후 88.8%의 생존율을 나타내어 bead에 포집하지 않은 대조구의 생존율보다 높은 생존율을 나타내었다. bead에 포집한 후 콩가루를 동결보호제로 사용하여 동결보호용액에 침지하여 동결건조 후의 처리구에서는 97.9%의 생존율을 나타내어 기존의 분말형 제제인 95.1%의 생존율보다 상승하는 것을 확인하였다. -20°C에서 저장한 제제의 경우 저장기간 7일 경과 후의 생존율은 대조구와 처리구 각각 86.2%, 96.5%로 나타내었고 4°C에서 보관한 제제의 경우 대조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 40.8%, 80.8%로 나타났고 56일 경과 시에는 각각 28.9%, 52.9%로 나타났다. 10°C에서 보관한 제제의 경우 대조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 36.6%, 72.8%로 나타났고, 저장 56일 경과 후에는 각각 25.2%, 40.0%로 나타났다. 20°C에서 보관한 제제의 경우 대조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 33.3%, 61.0%로 나타났으며, 56일 경과후에는 각각 21.2%, 30.5%로 나타났다. 30°C에서 보관한 제제의 처리구의 경우 28일 경과 후의 대조구와 처리구의 생존율은 각각 29.5%, 53.9%, 56일 경과 후에는 대조구의 경우에는 13.5%, 처리구에서는 20.9%로 bead에 포집하여 동결건조 보호제에 침지하여 제조한 분말형 제제의 경우에도 저장 온도가 상승할수록 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 35°C에서 보관한 제제의 경우 7일 경과 후 대조구의 생존율이 69.4%로 급격히 감소하였고 동결보호제를 처리한 실험군에서도 생존율이 79.5%로 감소한 것을 확인하였다. 실온에서 보관할 경우 28일 경과 후 대조구의 생존율은 36.9%, 처리구의 생존율은 58.1%로 나타났다. 이는 기존의 분말형 제제에 비하여 저장기간에 따라서도 전체적으로 생존율이 높은 것으로, 저장기간이 경과함에 따라서도 sodium alginate와 동결보호제의 상승효과가 있는 것으로 판단되어진다. *Lc. lactis* CHJ10의 초기농도는  $1.5 \times 10^{10}$  cfu/ml로 동결 직 후의 대조구의 생존율은 84.5%, 동결보호제 처리구의 생존율은 97.7%를 나타내었다. 이는 보호제만 사용할 경우의 생존율보다 높은 것을 *Lc. lactis* CHJ10의 경우에서도 나타나는 것을 확인하였다. -20°C에서 저장한 제제의 경우 저장기간 7일 경과 후의 생존율은 대조구와 처리구 각각 83.9%, 94.3%로 나타내었고, 28일 경과 후 각각의 생존율은 55.9%, 89.1%로 나타

났다. 56일 경과 후의 각각의 생존율은 29.1%, 43.4%의 생존율을 나타내어 28일 경과 후의 동결보호제를 이용한  $-20^{\circ}\text{C}$  에서 저장한 유산균 제제의 생존율이 매우 우수한 것을 확인할 수 있었다.  $10^{\circ}\text{C}$  에서 보관한 제제의 경우 대조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 49.1%, 75.7%로 나타났고, 저장 56일 경과 후에는 12.7%, 29.3%로 나타났다.  $20^{\circ}\text{C}$  에서 보관한 제제의 경우 대조구 및 처리구의 28일 경과 후의 생존율은 45.0%, 68.0%로 나타났으며, 56일 경과 후에는 각각 5.9%, 14.3%로 나타났다.  $30^{\circ}\text{C}$  에서 보관한 제제의 처리구의 경우 28일 경과 후의 대조구와 처리구의 생존율은 각각 41.6%, 60.5%, 56일 경과 후에는 대조구의 경우에는 0.7%, 처리구에서는 10.5%로 bead에 포집하여 동결건조 보호제에 침지하여 제조한 분말형 제제의 경우에도 저장 온도가 상승할수록 생존율이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. bead에 포집하여 동결건조한 제제의 경우 실온에 보관 할 경우의 생존율은 저장 28일 경과 후 대조구 및 처리구의 생존율이 각 45.9%, 59.3%를 나타내었고, 56일 경과 후에는 0.9%, 9.3%로 급격히 감소하는 것을 확인하였다. 모의 유통과정 온도 별로 28일까지의 저장 기간에서 보호제를 사용한 처리구의 경우 냉동, 냉장,  $10^{\circ}\text{C}$  에서의 생존율이 각각 93.2%, 86.4%, 83.4%로 확인되어 위 저장 온도와 저장 기간이 매우 우수한 생존율을 나타내는 조건인 것으로 나타났다.

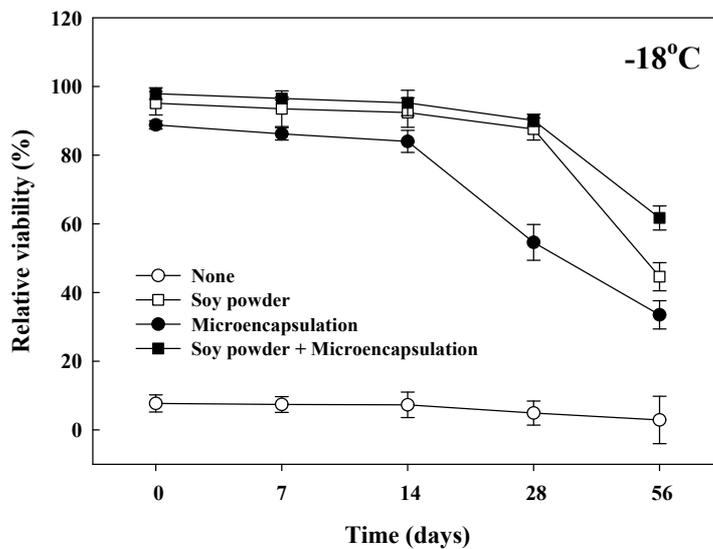


Fig. 2-56. Relative viability of *Lb. brevis* A101 at  $-18^{\circ}\text{C}$ . Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

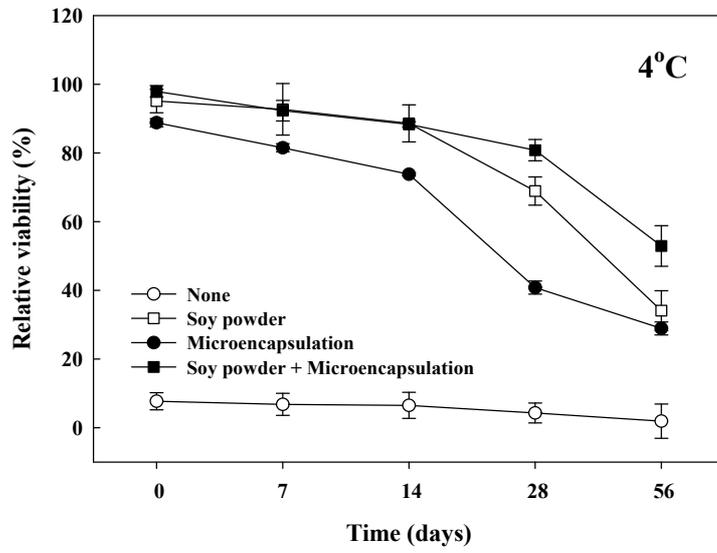


Fig. 2-57. Relative viability of *Lb. brevis* A101 at - 4°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

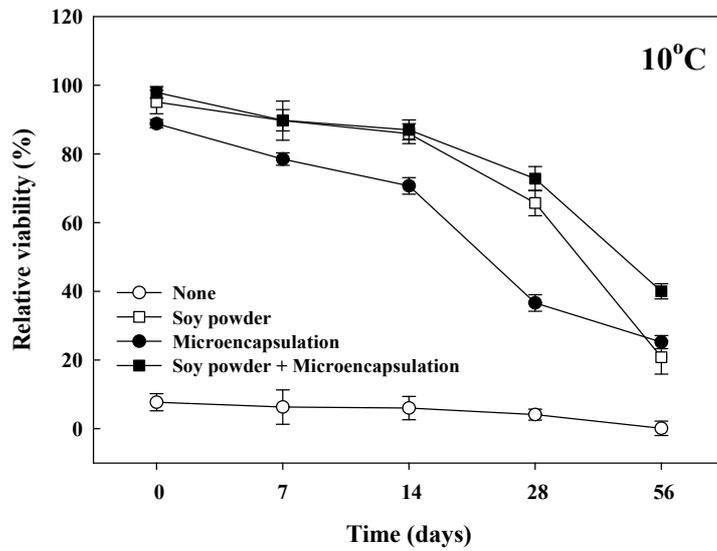


Fig. 2-58. Relative viability of *Lb. brevis* A101 at 10°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

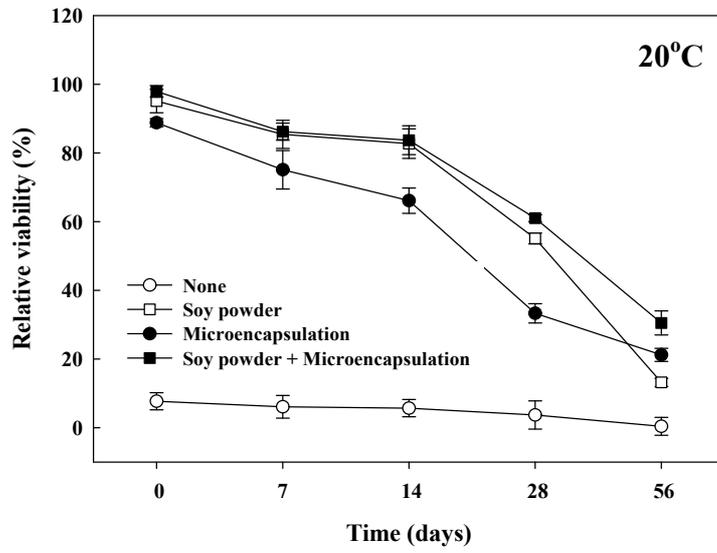


Fig. 2-59. Relative viability of *Lb. brevis* A101 at 20°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

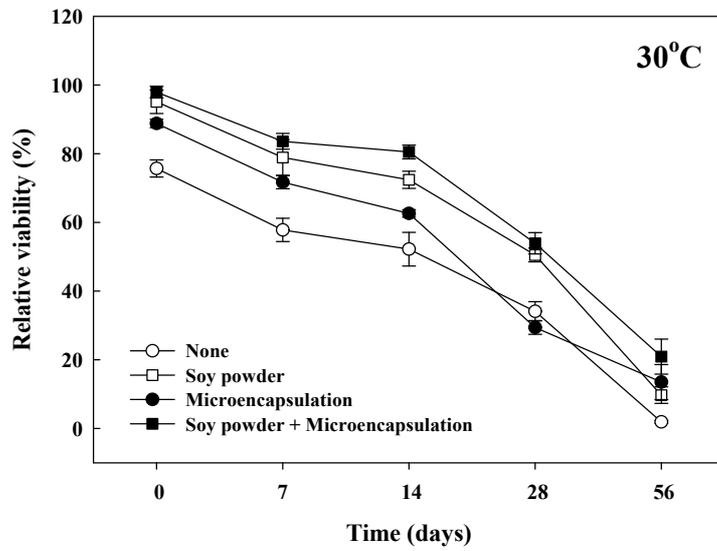


Fig. 2-60. Relative viability of *Lb. brevis* A101 at 30°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

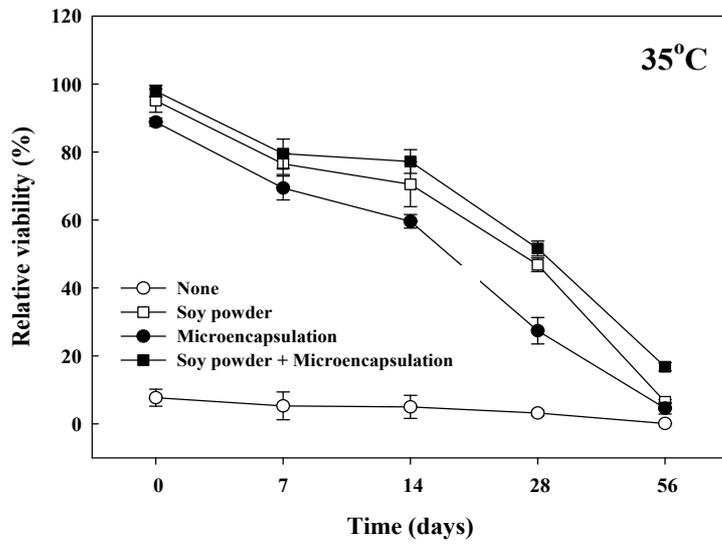


Fig. 2-61. Relative viability of *Lb. brevis* A101 at 35°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

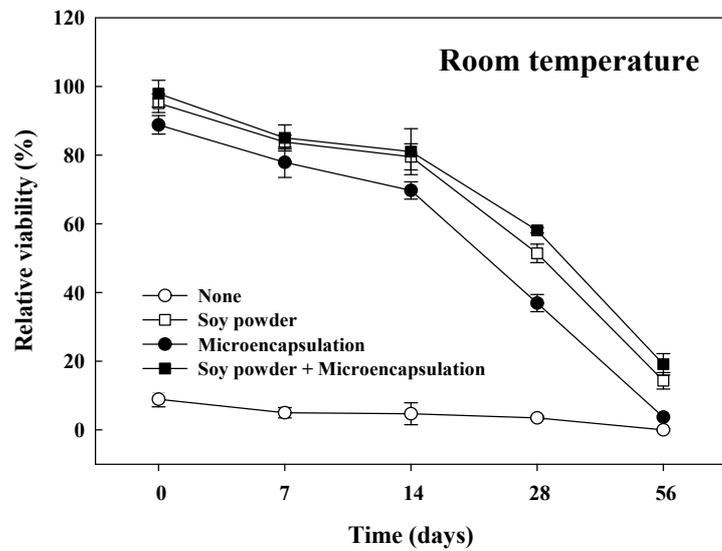


Fig. 2-62. Relative viability of *Lb. brevis* A101 at room temperature. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

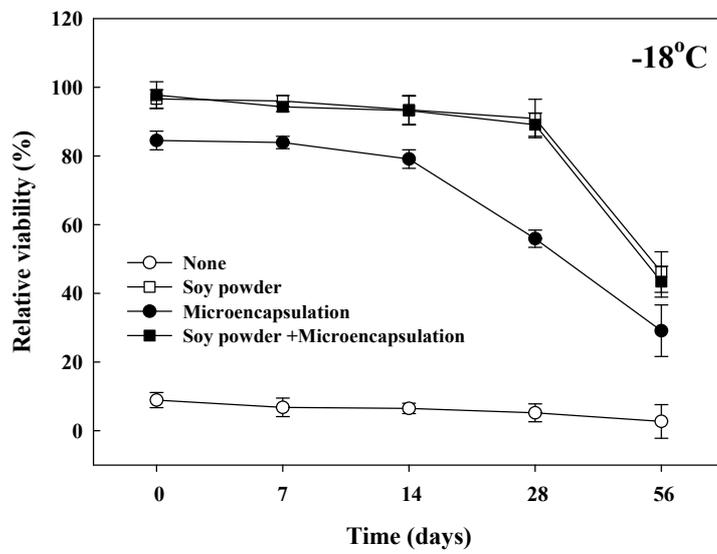


Fig. 2-63. Relative viability of *Lc. lactis* CHJ10 at  $-18^{\circ}\text{C}$ . Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

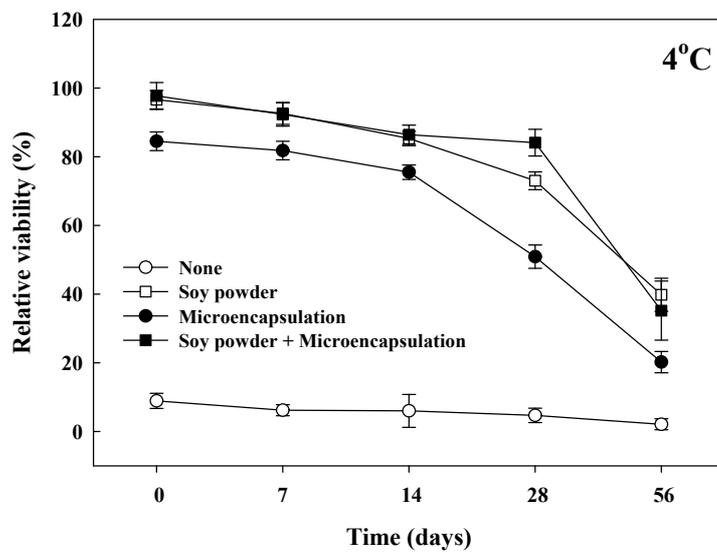


Fig. 2-64. Relative viability of *Lc. lactis* CHJ10 at  $-4^{\circ}\text{C}$ . Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

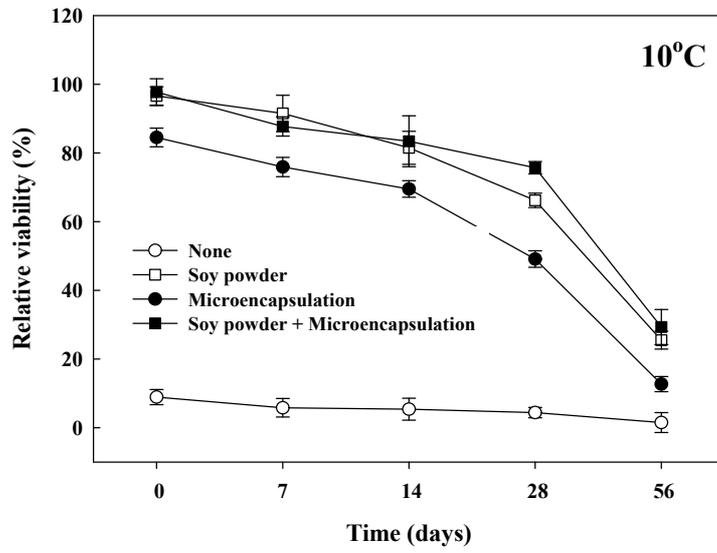


Fig. 2-65. Relative viability of *Lc. lactis* CHJ10 at 10°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

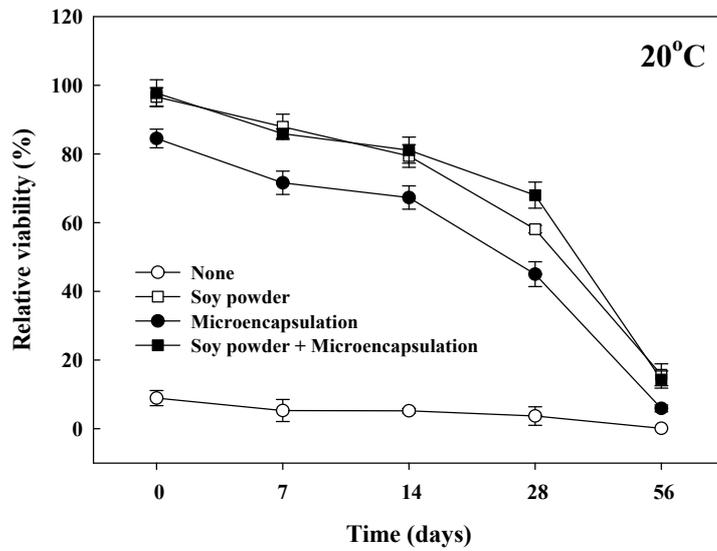


Fig. 2-66. Relative viability of *Lc. lactis* CHJ10 at 20°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

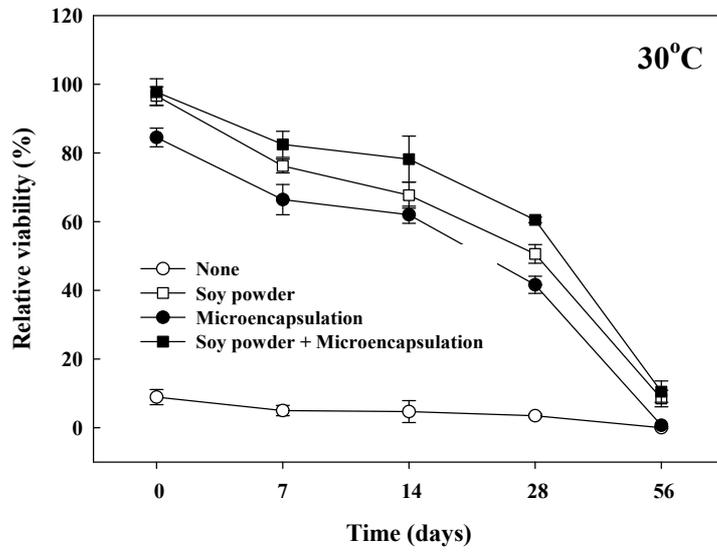


Fig. 2-67. Relative viability of *Lc. lactis* CHJ10 at 30°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

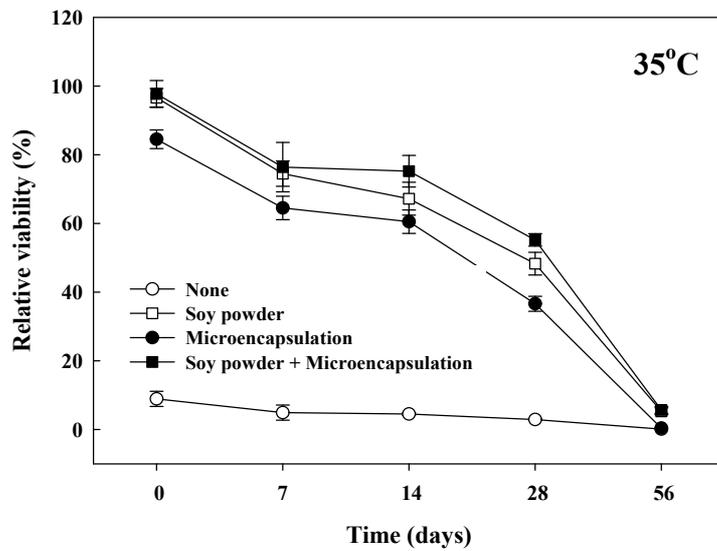


Fig. 2-68. Relative viability of *Lc. lactis* CHJ10 at 35°C. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

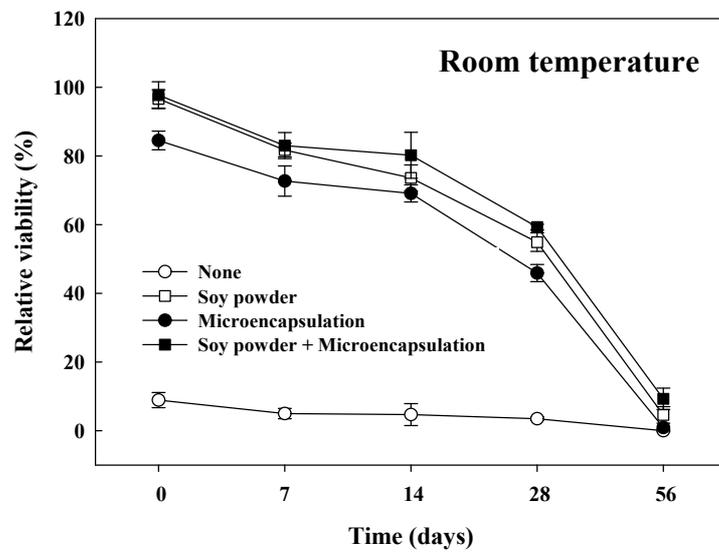


Fig. 2-69. Relative viability of *Lc. lactis* CHJ10 at room temperature. Data were expressed as mean  $\pm$  SD (n = 3).

## 제 9 절 미생물 첨가제 사용매뉴얼(안)

### 1. 개요

- 미생물 첨가제 사용 매뉴얼은 균종별 제형별 생존율에 대한 자료를 제시하고, 첨가제를 김치제조에 활용법을 알려줌으로서 효과적인 김치제품개발 및 생산에 도움이 되고자 함
- 미생물 첨가제 사용 매뉴얼은 균종별 제형별 생존율에 대한 보증기간을 제시함
- 실제 공급시 별도의 안내책자를 제공함

### 2. 제형별 생존율 및 효능

- 김치에서 분리한 유산균을 이용하여 김치 제조 현장에서 적용하기 편한 제형으로 미생물 첨가제를 제조하여 저장 및 유통기간 동안의 생존율을 조사함
- 각 미생물 제제의 균 종류에 따른 제형별 및 저장기간별 생존율을 중심으로 종균으로서의 가능성을 시험함
- 미생물 첨가제에 대한 생물학적 환경 안전성에 대한 보증은 별도로 제공하지 않으며, 용도는 김치제조 및 관련 시험 목적으로 한정함

### 3. 미생물 첨가제 사용법

- 미생물 첨가제는 3가지 형태별 종류가 있으며, 각 생산현장의 특성에 따라 적합한 형태를 활용할 수 있도록 제공됨

그림. 미생물 첨가제 형태별 종류



# 제 10절 미생물 첨가제 보급시스템구축(안)

< 미생물 첨가제 보급 시스템 메인 페이지(안) >

세계김치연구소  
World Institute of Kimchi

## 미생물 첨가제 보급시스템

Microbial Additive Supply System

---

**미생물 보급시스템**

개요 및 사례 >

보급시스템 체계 >

- 보급시스템 체계
- 보급 절차 및 안내
- 보급 신청 및 계약

**미생물 첨가제 사용 메뉴얼**

개요 >

생존율 및 효능에 대한 보충 >

- *Weissella cibaria*
- *Lactobacillus plantarum*
- *Pediococcus pentosaceus*
- *Lactobacillus brevis*
- *Lactococcus lactis*

미생물 첨가제 사용법 >

**온라인 보급시스템**

온라인용 신청 페이지 >

**서식 자료실**

관련서류를 편리하게 다운로드할 수 있습니다.

미생물 첨가제 보급신청서 >

미생물 첨가제 보급계약서 >

**보급 절차 및 안내**

보급관련 내용을 상세히 안내해 드립니다.

[자세히보기 >](#)

**온라인 간편 신청**

미생물 보급을 빠르게 신청하실 수 있습니다.

[자세히보기 >](#)

**문의전화**

궁금하신 것들이 즉시 답변이 가능해 드립니다.

062-610-XXXX

상업가능시간 : 09:00-18:00

휴일시간 : 12:00-13:00

주말 및 공휴일은 휴무입니다.

주소 : m 세계김치연구소

미생물 첨가제 보급시스템

세계김치연구소 [미생물첨가제 보급시스템] 주소 : 경기도 성남시 남구 김지도 86 문의 : 062-610-XXXX

Copyright © 2014 World Institute of Kimchi an Annex of Korea Food Research Institute. All Rights Reserved.

< 온라인용 신청 페이지(안) >



**미생물 보급시스템**

개요 및 사례 ▾  
 보급시스템 체계 ▾  
 - 보급시스템 체계  
 - 보급 절차 및 안내  
 - 보급 신청 및 계약

**미생물 첨가제 사용 메뉴얼**

개요 ▾  
 생존율 및 효능에 대한 보증 ▾  
 - Weissella cibaria  
 - Lactobacillus plantarum  
 - Pediococcus pentosaceus  
 - Lactobacillus brevis  
 - Lactococcus lactis

미생물 첨가제 사용법 ▾

**온라인 보급시스템**

온라인용 신청 페이지 ▾

**서식 자료실**

관련자료를 편리하게 다운로드 받으실 수 있습니다.

미생물 첨가제 보급신청서

미생물 첨가제 보급계약서

온라인용 신청 페이지

Home > 온라인 보급시스템 > 온라인용 신청 페이지

미생물 첨가제 보급신청서

\* 본인은 아래 첨가제의 보급을 의뢰 합니다.

미생물명	보급 형태
1. <i>Weissella cibaria</i>	<input checked="" type="radio"/> 액상 <input type="radio"/> 분말 <input type="radio"/> 냉동 <input type="radio"/> 반죽
2. <i>Lactobacillus plantarum</i>	<input type="radio"/> 액상 <input type="radio"/> 분말 <input type="radio"/> 냉동 <input type="radio"/> 반죽
3. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	<input checked="" type="radio"/> 액상 <input type="radio"/> 분말 <input type="radio"/> 냉동 <input type="radio"/> 반죽

\* 보급비용은 미생물, 보급형태, 제공량에 따라 달라질 수 있음.

\* 각 미생물 첨가제는 생존율에 대한 객관적인 자료 및 사용방법에 대한 메뉴얼을 함께 제공함.

소속기관

주소  우편번호

신청자명  전화

E-mail  FAX

근주우송 :  우편우송  분말

왼쪽의 글자를 입력하세요.

< 미생물 첨가제 보급 신청서(안)>



세계김치연구소, 503-360,  
광주광역시 남구 김치로 86번지(임암동 675-1번지)

미생물 첨가제 접수
접수번호 :
접수일자 :

## 미 생 물 첨 가 제 보 급 신 청 서

★ 본인은 아래 첨가제의 보급을 의뢰 합니다.

미 생 물 명	보 급 형 태 (√ 표시)
1. <i>Weissella cibaria</i>	액상 분말 냉동 반죽
2. <i>Lactococcus lactis</i>	액상 분말 냉동 반죽
3. <i>Lactobacillus brevis</i>	액상 분말 냉동 반죽

※ 보급비용은 미생물, 보급형태, 제공량에 따라 달라질 수 있음.  
 ※ 각 미생물 첨가제는 생존율에 대한 객관적인 자료 및 사용방법에 대한 매뉴얼을 함께 제공함.

소속기관			
주 소		우편번호	
신청자명		전 화	
E-mail		F A X	

★ 균주우송 : 우편우송 ( ) 직접수령 ( )

접 수 자	

[협동: 젓갈용 우수미생물 선발 및 미생물 첨가제를 이용한 젓갈발효 조절 기술 개발]  
(협동연구책임자 : 경기대학교, 이종훈)

## 제 1 절 젓갈용 우수 미생물 선발 및 미생물 첨가제를 이용한 젓갈발효 조절기술 개발

### 1. 고염젓갈(멸치젓, 새우젓) 및 저염젓갈(오징어젓)용 우수 미생물 선발

#### 가. 고염젓갈(멸치젓, 새우젓) 미생물 균집 분석을 통한 우점종 도출

##### (1) 젓갈 시료 및 고염에서 성장하는 bacteria 선발

Bacteria 분리를 위한 멸치젓과 새우젓은 수원시 소재 재래시장에서 2011년 9월에 구입하였고, 멸균한 거즈로 걸러 분리한 젓갈시료의 여액을 bacteria 선발 및 성분 분석에 사용하였다. 여액의 NaCl 농도는 식품공전에 따라 측정하였고, pH는 pH meter를 사용하여 측정하였다. 멸치젓과 새우젓 시료 각 1종을 여과하여 얻어진 여액의 pH는 5.6과 7.4로, 염도는 27% (w/v)와 22% (w/v)로 측정되었다. 멸치젓의 염도가 새우젓에 비해 높은 것으로 나타났고, 새우젓의 pH는 중성으로 기존에 보고된 다른 종류의 젓갈에 비해 다소 높은 것으로 나타났다. 새우젓의 pH가 중성을 나타내는 원인 중의 하나로 새우껍질에 포함된 calcium ion의 유리를 들 수 있다 [Evers and Carroll, 1998].

여액은 멸균한 생리식염수를 이용하여 bacteria의 분리가 가능한 농도로 희석한 다음, 고체배지에 도말하여 10°C, 20°C, 30°C 에서 48시간 이상 배양하며 관찰하였다. Bacteria 분리에 사용한 배지는 1.8% (w/v) 한천을 첨가한 nutrient medium (Difco, USA)과 marine medium (MBcell, Korea), MRS medium을 사용하였고, 필요에 따라서 NaCl을 15% (w/v)가 되도록 첨가하였다. 가능한 다양한 colony의 선발을 위하여 각 배지에서 성장한 colony들 중, 외관상 크기, 색, 모양 등의 형태학적 특성에 따라 각 배지 당 10~30개 정도의 colony를 선발하였고, colony 선발과정과 동일한 배지를 사용하여 순수 분리하였다.

##### (2) 선발 균주의 동정

순수 분리된 bacteria는 16S rRNA 유전자(rDNA) 염기서열 분석에 의해 계통발생학적으로 동정하였다. 분리된 bacteria의 16S rDNA 증폭은 DNeasy tissue kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 추출된 DNA를 PCR 하거나 colony PCR을 이용하여 수행하였다. PCR 증폭에 사용된 primer는 다양한 미생물의 증폭에 사용되는 eubacterial universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT AGG ACT T-3')을 사용하였다[Lane, 1991]. PCR 반응은 T3000 Thermocycler (Biometra,

Germany)를 사용하였고, 50 µl PCR 반응계에는 template DNA 또는 소량의 colony, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 20 pmol의 primer를 첨가하였다. PCR 반응은 95°C 에서 5분간 예비가열 후, 95°C 에서 1분간 변성, 57°C 에서 1분 annealing, 72°C 에서 1분 중합반응의 과정을 30회 반복하였고, 마지막에 72°C 에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit (SolGent, Korea)을 사용하여 정제한 후, 수탁업체(SolGent)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 EzTaxon server 2.1 [Chun et al., 2007]에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast search를 통해 계통발생학적 분석을 수행하였다. Database에 등록된 표준균주 (type strain)와 가장 높은 상동성을 나타내는 분류군을 해당 염기서열에 해당하는 bacteria로 동정하였다.

### (3) 멸치젓 발효 관련 bacteria의 다양성

멸치젓으로부터 총 315 균주를 순수분리하여 16S rDNA 염기서열 분석에 의해 동정한 결과, 31종은 기존의 분류단위 bacteria와 97% 이상의 16S rDNA 상동성을 갖지 않는 신종균으로 추정되고, 나머지 284 균주는 28속 67종의 bacteria가 존재하는 것으로 나타났다 (Fig. 3-1).

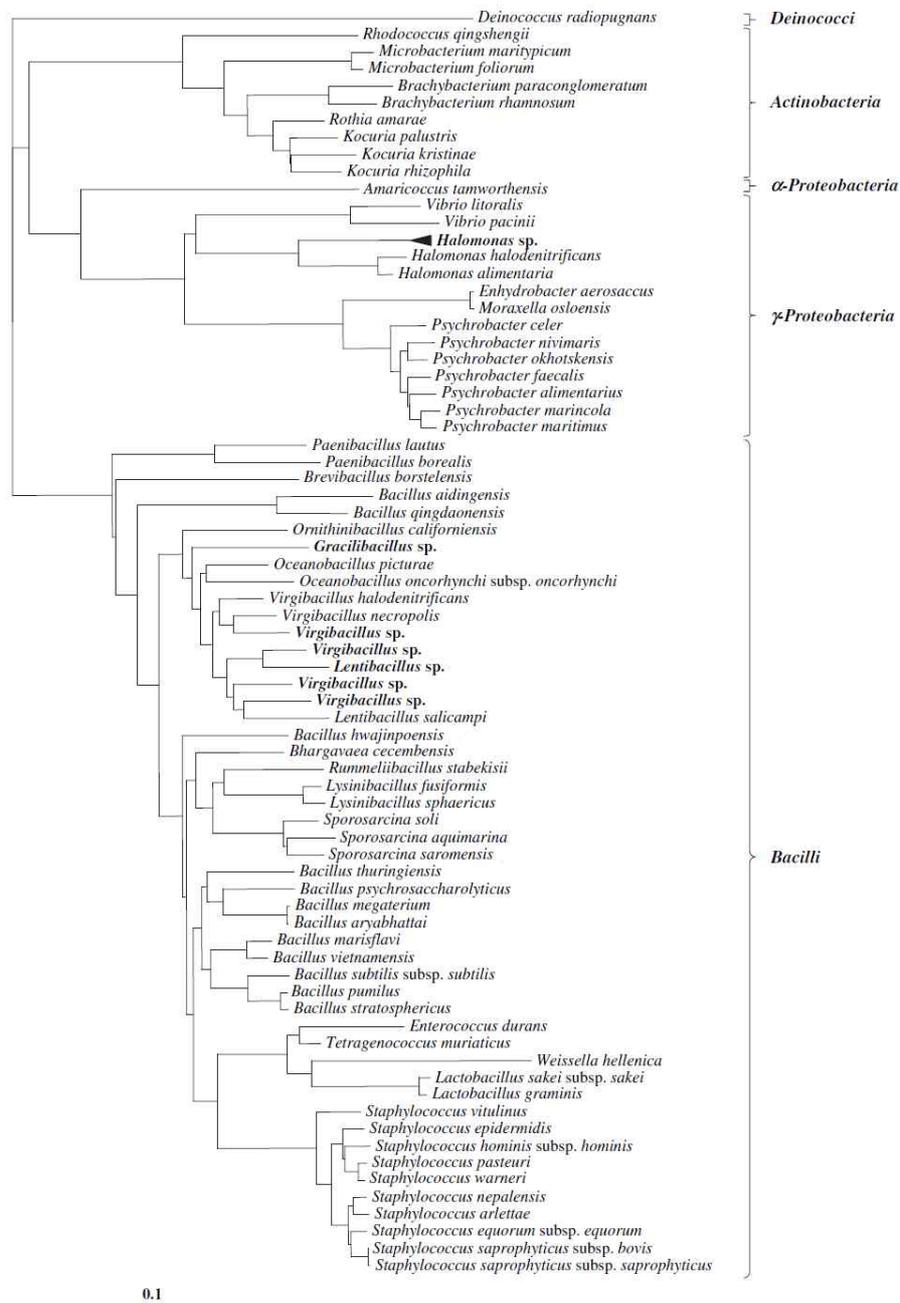


Fig. 3-1. Phylogenetic tree of the isolates from *Myeolchi-jeotgal*, showing the relationship based on the determination of the near-complete 16S rDNA sequences (1407 nt) of the isolates. DNA sequences were aligned with those of neighboring taxa based on secondary structure information using the PHYDIT program. Evolutionary distances were calculated according to Kimura's two-parameter model, and clustering was performed using the neighbor-joining method. The phylogenetic tree was generated by a treeing algorithm contained within the PHYDIT program. New, unidentified species showing similarities of less than 97% with the closest type strain are presented in bold letters. The bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.

분리 동정된 총 284 균주의 19%를 차지하는 *Sporosarcina* 속이 가장 높은 빈도로 검출되었고, *Virgibacillus* 속과 *Bacillus* 속이 각각 16%와 10% 분리되어 뒤를 이었다. *Staphylococcus*, *Halomonas*, *Kocuria* 속이 각각 9%, 8%, 5% 분리되었다. *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Tetragenococcus* 속의 유산균이 소수 분리되었지만, 큰 비중을 차지하지는 않았다.

#### (4) 새우젓 발효 관련 bacteria의 다양성

새우젓으로부터 총 295 균주를 순수분리하여 16S rDNA 염기서열 분석에 의해 동정한 결과, 30속 53종의 bacteria가 존재하는 것으로 나타났고, 멸치젓과는 다른 bacteria의 다양성을 나타내었다(Fig. 3-2). 가장 높은 빈도로 검출된 bacteria는 *Staphylococcus* 속으로 141 균주가 분리되어 전체의 48%를 차지했고, 그 중 135 균주는 *S. equorum*으로 동정되었다. *Staphylococcus* 속의 다음으로는 *Salinicoccus* 속 (10%), *Lactobacillus* 속 (7%), *Salinivibrio* 속 (4%), *Kocuria* 속 (4%), *Salimicrobium* 속 (4%)이 분리되었다.

#### (5) 멸치젓과 새우젓 발효 관련 우점종

6종의 배지를 이용한 멸치젓과 새우젓의 bacteria 군집 분석 결과, 47속 104종의 bacteria의 존재가 밝혀졌고, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Halomonas*, *Psychrobacter*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Weissella* 속이 공통적으로 검출되었다. 두 젓갈로부터 가장 높은 빈도로 검출된 속은 *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Halomonas*, *Kocuria* 순으로 나타났다. 멸치젓에서 우점으로 검출된 bacteria인 *Sporosarcina* 속은 2001년 *Bacillus* 속으로부터 분리된 속이고, *Virgibacillus*, *Paenibacillus*, *Brevibacillus* 등도 *Bacillus* 속으로부터 재분류된 속들이다. 따라서 멸치젓의 발효를 담당하는 우점종은 *Bacillus* 및 근연속의 bacteria로 추정된다. 새우젓에서 가장 많이 검출된 *Staphylococcus* 속은 새우젓 발효의 우점종으로 확실시 되고, 이들은 coagulase를 생산하지 않아 식품위해균 *Staphylococcus aureus*와 구분되는 coagulase-negative staphylococci (CNS)로 분류되고, 이들에 대한 위해성은 보고된 바 없다.

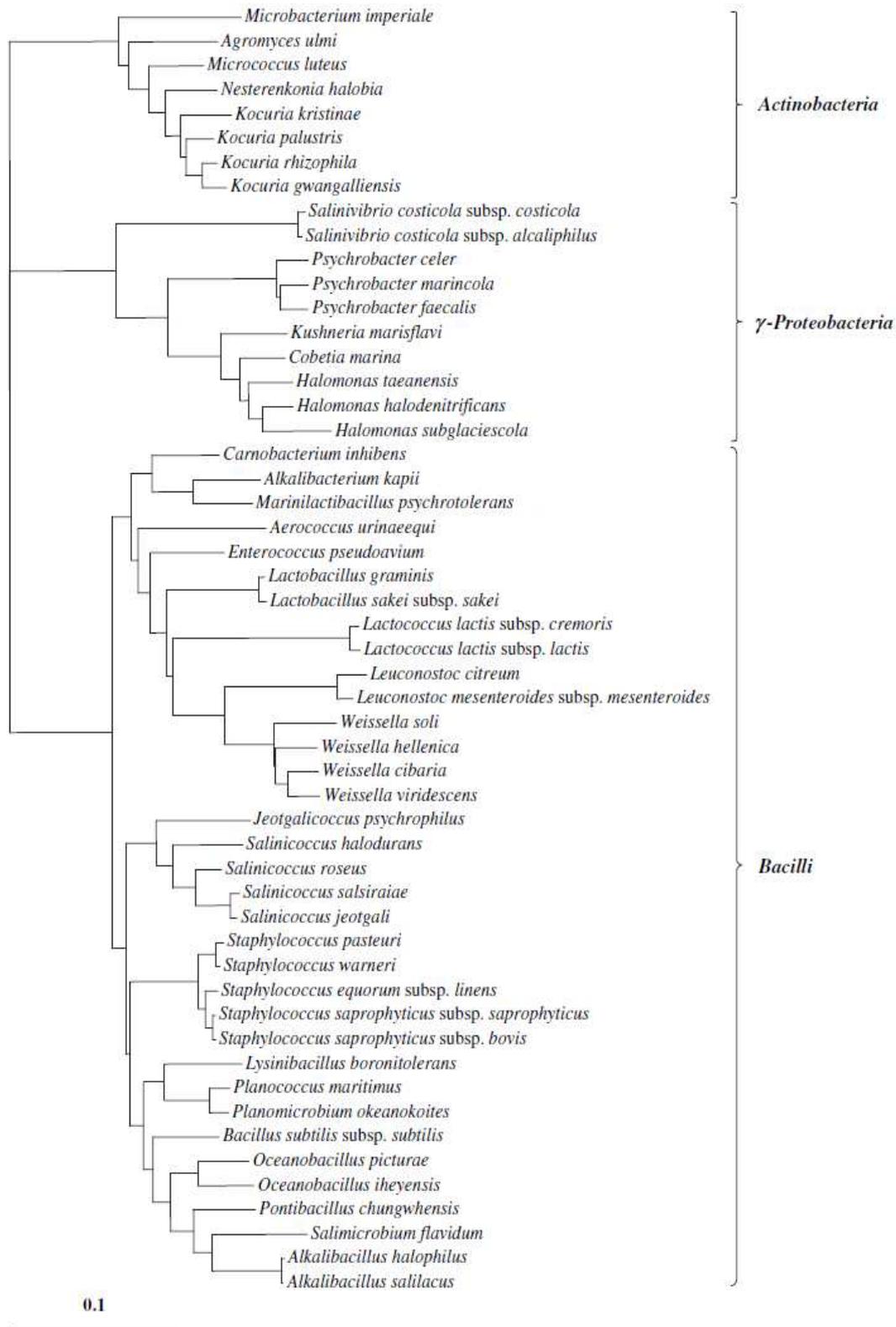


Fig. 3-2. Phylogenetic tree of the isolates from *Saeu-jeotgal*. The tree shows the relationship based on the determination of the near-complete 16S rDNA sequences (1407 nt) of the isolates. The bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.

나. 저염 양념젓갈(오징어젓갈) 미생물 균집 분석을 통한 우점종 도출 및 위생지표 미생물 및 식중독균 생육저해활성 보유 우수 균주 선발

(1) 오징어젓갈 시료

Bacteria 분리를 위한 오징어젓갈은 2011년 9월 수원시 소재 재래시장과 대형마트에서 각각 1종씩 구입하였다. 시료 60 g에 동량의 멸균수를 혼합하여 균질화 한 후, 멸균한 거즈로 걸러 분리한 여액을 bacteria 분리 및 NaCl 농도, pH, 당도 측정에 사용하였다. NaCl 농도는 식품공전에 따라 측정하였고, pH는 pH meter로, 당도는 refractometer (Atago, Japan)로 측정하였다. 두 시료의 pH, NaCl 농도, 당도에는 큰 차이가 없었고, NaCl 농도는 평균 6.7% 정도로 상당한 저염화가 달성된 것으로 보인다(Table 3-1).

Table 3-1. The pHs, NaCl concentrations, sugar concentrations of *Ojingeo-jeotgal* samples from a traditional market (A) and a super market (B) in Suwon, Korea.

Chemical index	Sample A	Sample B
pH	6.2	6.1
NaCl concentration (%)	6.6	6.7
Sugar concentration (Brix)	16.2	17.5

(2) 배양법에 의한 bacteria 선발, 분리

각 시료 여액을 생리식염수로 bacteria의 분리가 가능한 농도로 십진 희석한 다음, 고체배지에 도달하여 30°C 에서 48시간 이상 배양하면서 colony의 형성 및 다양성을 관찰하였다. 다양한 bacteria의 분리를 위하여 nutrient agar (Difco, USA), marine agar (MBcell, Korea), MRS agar (Difco)와 이들 배지에 NaCl의 최종 농도가 5% (w/v)가 되도록 첨가한 총 6종의 배지를 사용하였고, 단백질분해활성의 확인을 위하여 skim milk (Difco)를 2% (w/v) 첨가하였다. 각 배지에서 생육한 생균수는 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> CFU/ml 수준으로 기존의 젓갈에서 보고된 일반세균의 측정치와 크게 다르지 않았다. 각 배지에서 성장한 bacteria는 크기, 모양, 색깔 및 skim milk 분해에 따른 투명환(clear zone) 생성 여부에 따라 각 배지당 10개 정도의 colony를 선발한 다음, 동일한 배지를 이용하여 순수 분리하였다.

(3) 오징어젓갈 bacteria 균집 분석

순수 분리한 bacteria의 동정은 멸치젓 및 새우젓 유래 bacteria 균집 분석에서 사용한 방법을 동일하게 적용하였다. 순수 분리한 총 121 균주의 동정 결과, 각 배지로부터 분리된 bacteria의 다양성은 속 (genus) 수준에서는 큰 차이가 나타나지 않았지만, 종 (species) 수준에서는 시료 B의 다양성이 높은 것으로 나타났다 (Table 3-2). 유산균은 MRS agar 및 NaCl을 첨가한 MRS agar에서만 검출되었지만, *Bacillus* 속은 모든 배지에서 고르게 검출되었으며, 염 첨가에 따른 영향이 크게 나타나지 않았다. *Staphylococcus* 속의

검출은 nutrient agar와 marine agar에서 높게 나타났고, 염을 첨가한 배지가 검출에 유리한 것으로 나타났다.

Table 3-2. Numbers of isolates from *Ojingeo-jeotgal* summarized at the species level.

Species	Sample A						Total	Sample B						Total
	0% <sup>a</sup>			5% <sup>a</sup>				0% <sup>a</sup>			5% <sup>a</sup>			
	N	M	R	N	M	R		N	M	R	N	M	R	
<i>Aerococcus viridans</i>								1						1
<i>Bacillus aerius</i>								2	1					3
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>								1				1	2	4
<i>Bacillus clausii</i>											1			1
<i>Bacillus atrophaeus</i>				1	1		2							
<i>Bacillus licheniformis</i>				1			1		1				1	2
<i>Bacillus methylotrophicus</i>				2			2			3	1	4	2	10
<i>Bacillus pumilus</i>	1						1	1						1
<i>Bacillus safensis</i>	0	3					3	1		2	1			4
<i>Bacillus siamensis</i>													1	1
<i>Bacillus sonorensis</i>								1	1	1				3
<i>Bacillus subtilis</i>	2		1		1		4		2	2			1	5
<i>Bacillus tequilensis</i>	1	3	1				5	2			1	1	1	5
<i>Bacillus</i> sp.	5	2	3	3	4		17	1	3	2	3	2		11
<i>Brevibaacterium halotolerans</i>								1						1
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>										1				1
<i>Corynebacterium variabile</i>		1					1							
<i>Kocuria salsicia</i>									1					1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>			1			2	3							
<i>Pediococcus pentosaceus</i>						1	1							
<i>Staphylococcus equorum</i>												1		1
<i>Staphylococcus sciuri</i>											1			1
<i>Staphylococcus xylosus</i>												1		1
<i>Staphylococcus</i> sp.	1	2		3	3		9				2		1	3
<i>Weissella confusa</i>			3				3							
<i>Weissella hellenica</i>													1	1
<i>Weissella thailandensis</i>			1			7	8							
Total	10	11	10	10	9	10	60	10	10	11	10	10	10	61

Abbreviations: N, nutrient agar; M, marine agar; R, MRS agar.

<sup>a</sup>The final concentrations of NaCl are indicated and 0% means NaCl was not added to the medium.

*Bacillus* 속이 두 시료 모두에서 우점으로 검출되었고, 기존의 연구에서 보고되었던 *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* 속 중에서 *Staphylococcus* 속만이 본 연구에서 검출되었다[Kim et al., 1993]. Bacteria 분리에 사용한 배지, 배양 조건 및 시료의 차이에서 그 원인을 찾을 수 있지만, 고전적 동정법을 적용한 기존 연구에서 분리균주들을 비교한 특성이 제한적이었다는 점을 고려하면, 최근에 적용되고 있는 계통발생학적 동정 결과와는 차이가 나타날 가능성이 크다. 재래시장에서 구입한 시료 A에서는 *Weissella* 속이 *Bacillus* 속의 뒤를 이었지만, 대형마트에서 구입한 시료 B에 존재하는 bacteria의 우점은 *Staphylococcus* 속이 뒤를 이었다. 유산균은 *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* 속이 검출되었고, 시료에 따라 검출되는 종과 속이 다르게 나타났으며, 시료 B보다 A에서 높은 빈도로 검출되었다. 시료 A로부터 각각 11 균주와 4 균주가 분리된 *Weissella* 속과 *Leuconostoc* 속은 시료 B로부터는 *Weissella hellenica* 1 균주만이 분리되어, 시료에 따라 유산균과 *Staphylococcus* 속의 비중이 달라질 수 있는 가능성이 제시되었다. Probiotics 및 식품용 종균 개발을 목적으로 젓갈 유래 *Lactococcus*, *Lactobacillus* 속 유산균 분리가 보고되었고 [Kim et al., 1997; Lee et al., 2003; Paik et al., 2003], 유산균의 우점을 보고한 bacteria 균집분석 결과도 있지만 [Roh et al., 2010], 고염 조건에서 생육이 어렵다는 점을 고려하면 발효 속성에 적극적으로 관여하는 우점종으로 작용할 가능성은 크지 않다. 비교적 염도가 낮은 오징어젓갈에서도 *Bacillus* 속에 비하면 그 비중이 크지 않은 것으로 보아 오징어젓갈 뿐만 아니라 고염젓갈의 숙성에서는 큰 영향을 미치지 않고 생리적 활성이 거의 없는 상태로 존재하는 것으로 추정된다.

기존 연구 [Kim et al., 1993]에서 검출된 바 있는 *Staphylococcus* 속은 두 시료 모두로부터 분리되었고, NaCl이 5% 첨가된 배지에서 우세하게 검출된다는 점을 고려하면, *Bacillus* 속 다음을 차지하는 오징어젓갈 우점 bacteria로 추정된다. 각 배지로부터 순수 분리한 *Bacillus* 속 및 *Staphylococcus* 속의 일부 균주들은 16S rDNA 염기서열의 상동성이 높아 계통발생학적 분류위치를 정확히 결정할 수 없어 종 수준에서의 우점종을 결정하기 힘들지만, 종 수준에서의 동정이 결정된 균주들 중에서는 *B. methylotrophicus*, *B. subtilis*, *B. tequilensis*가 다수 분리되었다 (Table 3-2). *Bacillus* 속이 우점으로 검출되었지만, 식품 위해 가능성이 있는 *Bacillus cereus*는 검출되지 않았다. 분리된 *Staphylococcus* 속 중에서 *S. aureus*로 동정된 균주는 존재하지 않았고, 모두 coagulase-negative staphylococci (CNS)라는 범주에 속한다. CNS는 유럽의 육류 및 소시지 발효에서 높은 빈도로 검출되고, 종균으로도 식품 발효에 사용되고 있으며, 문헌상으로 식중독 관련성이 보고된 바는 없다[Marty et al., 2012; Rantsiou et al., 2005].

#### (4) 황색포도상구균 및 장염비브리오균 생육저해활성 보유 균주 선발

본 연구에서 분리 동정한 121 균주로부터 젓갈에서 발생 가능성이 있는 황색포도상구

균 및 장염비브리오균에 대한 생육저해활성 보유 균주의 선발을 시도하였다. 선발을 위한 지시균 *S. aureus* ATCC12692와 *V. parahaemolyticus* ATCC17802는 Korean Culture Center for Microorganisms (KCCM)로부터 구입하였고, 전배양한 지시균주를 약  $10^5$ – $10^6$  CFU/ml농도로 한천배지에 200  $\mu$ l 도말하여 건조시킨 다음, 약  $10^8$  CFU/ml농도의 실험균주를 백금이를 이용해 희석접종하여 30°C에서 24시간 배양 후 생육저지환의 생성 유무로 생육저해활성을 확인하였다. 활성측정을 위한 한천배지는 각각의 지시균 *S. aureus* ATCC12692와 *V. parahaemolyticus* ATCC17802의 생장이 우수하게 나타난 nutrient agar와 marine agar를 사용하였고, 젓갈의 염도를 고려하여 최종농도가 5%가 되도록 NaCl을 첨가하였다.

분리 균주 중, 55 균주가 *S. aureus*에 대하여 생육저해활성을 나타내었고, *Bacillus* 속 균주들이 대부분이었다(Table 3-3). 분리 빈도가 높지는 않지만, 분리된 모든 *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. siamensis*, *B. sonorensis*, *Weissella confusa* 균주는 활성을 나타냈다. *V. parahaemolyticus*에 대해서는 *Bacillus* 속 21 균주만이 생육저해활성을 나타내었고, *S. aureus* 대비 활성 보유 균주의 선발 확률이 높지 않았다(Table 3-4). 2 종류의 식중독균에 대하여 활성을 갖는 균주는 모두 *Bacillus* 속으로, 6 균주가 분리되었다. 이들 균주의 식중독균 생육저해는 NaCl이 6% 첨가된 배지에서도 활성이 나타나는 것으로 보아 오징어젓갈의 숙성과정에서 식중독균의 저해가 가능한 것으로 추정된다(Fig. 3-3). 총 3 균주가 분리된 *B. pumilus*와 *B. siamensis*는 모두 두 식중독균에 대하여 저해활성을 나타내었지만, 분리된 개체수가 낮아 종 수준의 저해활성으로 평가하기는 힘들고, 대부분의 저해활성은 균주 특이적으로 나타났다.

젓갈 발효용 종균의 가장 중요한 기능성으로 고려되고 있는 단백질분해활성을 skim milk를 2% 첨가한 nutrient agar에서 확인해 본 결과, 6 균주 모두 단백질분해활성을 가지고 있었지만, NaCl 첨가에 따라 활성이 감소했고, colony의 모양이 NaCl의 농도에 따라 변화함을 확인하였다(Fig. 3-4). *B. siamensis* RM502 균주가 NaCl이 6% 첨가된 배지에서 가장 높은 단백질분해활성을 나타내었다. 최종적으로 선발된 6 균주의 생육저해활성과 단백질분해활성을 정량적으로 비교하지는 못했지만, 6% 염농도에서 활성을 나타내고 있어 오징어젓갈의 제조 과정에서 식중독균 생육저해 및 단백질분해활성을 나타낼 수 있을 것으로 예상된다.

Table 3-3. Numbers of isolates from *Ojingeo-jeotgal* showed the growth inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC12692 on nutrient agar supplemented 5% NaCl.

Species	Sample A		Sample B	
	Isolates	Active strains	Isolates	Active strains
<i>Bacillus aerius</i>	0	0	3	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	1	1	2	1
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	1	1
<i>Bacillus safensis</i>	3	3	4	4
<i>Bacillus siamensis</i>	0	0	1	1
<i>Bacillus sonorensis</i>	0	0	3	3
<i>Bacillus subtilis</i>	4	3	5	3
<i>Bacillus tequilensis</i>	5	4	5	3
<i>Bacillus</i> sp.	17	10	11	10
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	3	1	0	0
<i>Staphylococcus equorum</i>	0	0	1	1
<i>Weissella confusa</i>	3	3	0	0
<i>Weissella thailandensis</i>	8	1	0	0
Total	45	27	36	28

Table 3-4. Numbers of isolates from *Ojingeo-jeotgal* showed the growth inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802 on marine agar added 3% NaCl.

Species	Sample A		Sample B	
	Isolates	Active strains	Isolates	Active strains
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	0	4	2
<i>Bacillus atrophaeus</i>	2	1	0	0
<i>Bacillus methylotrophicus</i>	2	1	10	5
<i>Bacillus pumilus</i>	1	1	1	1
<i>Bacillus siamensis</i>	0	0	1	1
<i>Bacillus tequilensis</i>	5	3	5	3
<i>Bacillus</i> sp.	17	2	11	1
Total	27	8	32	13

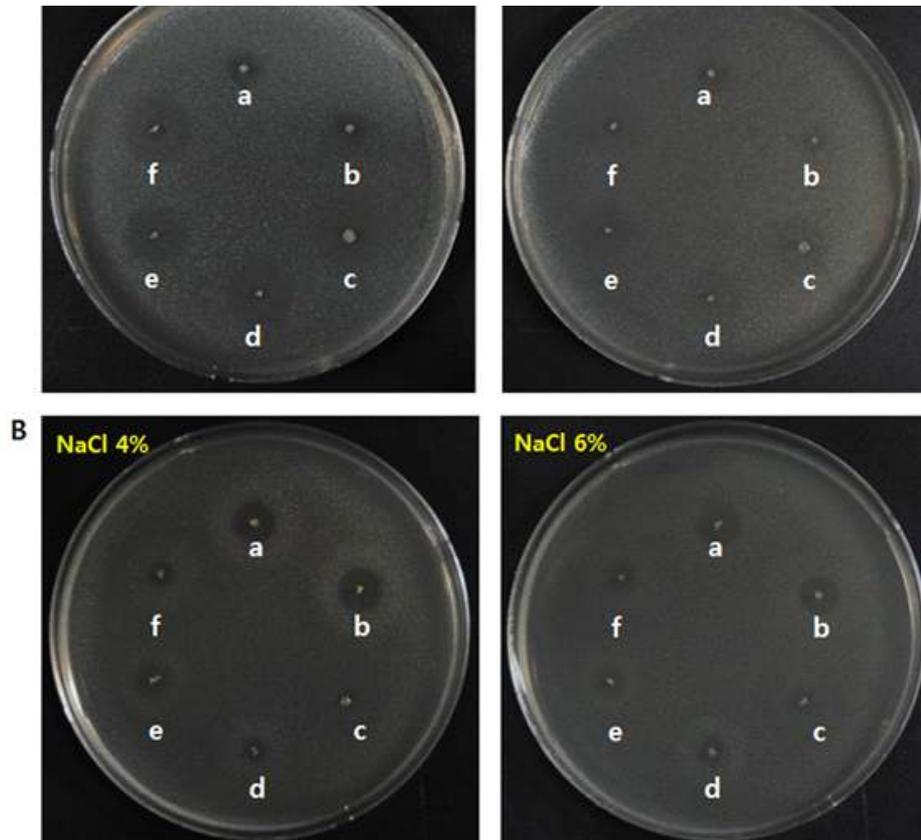


Fig. 3-3. Growth inhibition of *S. aureus* ATCC12692 (A) and *V. parahaemolyticus* ATCC17802 (B) by the isolates from *Ojingeo-jeotgal* at the NaCl added conditions.

Nutrient agar and marine agar were used for the growths of *S. aureus* (A) and *V. parahaemolyticus* (B), respectively. Isolates: a, *B. pumilus* ANR7; b, *B. pumilus* RM010; c, *B. siamensis* RM502; d, *B. tequilensis* AM5R3; e, *B. tequilensis* MA504; f, *B. tequilensis* MS503.

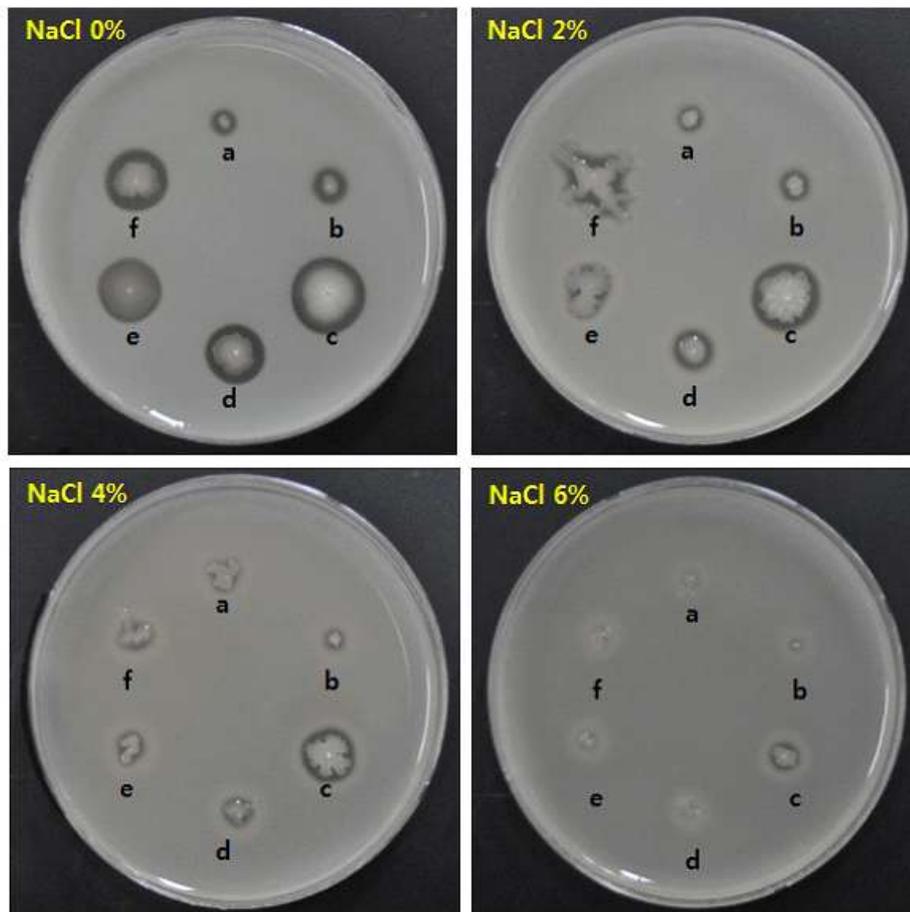


Fig. 3-4. Effect of NaCl on the growth and protease activity of isolates from *Ojingeo-jeotgal*. Nutrient agar containing 2% (w/v) skim milk was used for the detection of growth and protease activity. Isolates: a, *B. pumilus* ANR7; b, *B. pumilus* RM010; c, *B. siamensis* RM502; d, *B. tequilensis* AM5R3; e, *B. tequilensis* MA504; f, *B. tequilensis* MS503.

## 2. 선발된 우수 균주의 안전성 평가 및 미생물 첨가제 개발

### 가. 젓갈 발효의 우점종 *Staphylococcus equorum*의 안전성 평가

#### (1) 연구의 배경

멸치젓, 새우젓, 오징어젓갈에서 모두 검출되었고, 새우젓 발효의 우점종으로 검출된 *S. equorum*은 젓갈발효용 종균으로 적용될 높은 가능성을 가지고 있으나, 우리나라에서 식품용으로 사용된 예가 없어 안전성 평가에 대한 필요성이 제기되었다. 유럽에서는 소시지 및 육류의 발효에 *S. carnosus*, *S. equorum*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus* 등의 CNS bacteria를 종균으로 사용하고 있어 [Berdague et al., 1993; Sondergaard and Stahnke, 2002; Stahnke, 1994], 사용이력의 측면에서는 안전성이 확보되었다고 할 수 있으나, 식중독균인 *S. aureus*와 동인한 속 (genus)로 분류되고 있어, 우리나라에서 종균으로 사용하기 위해서는 *S. equorum*에 대한 안전성의 증명이 요구된다. 한편 우리나라 식품의약품안전처에서는 종균에 대한 기준이 없어, 본 연구에서는 종균의 안전성 평가에 대한 기준이 설정되어 있는 유럽과 미국의 기준을 참고하여 본 과제의 수행을 통하여 확보한 *S. equorum* 균주들에 대한 항생물질내성, 혈청분해능, 독소인자 보유 등의 안전성 평가 및 발효 관련 기능성 평가를 수행하였다.

#### (2) 항생물질 내성 평가

2012년 식품의약품안전처 자료에 의하면 국내에서 검출되는 항생물질내성 bacteria의 대다수는 ampicillin 내성 대장균으로 보고되었다. 따라서 우리나라에서 분리되는 bacteria에서 가장 높은 빈도로 나타날 수 있는 항생물질 내성은 ampicillin에 대한 내성으로 예상된다. Ampicillin이 32  $\mu\text{g/ml}$  첨가된 TSA를 이용하여 본 과제를 통하여 확보한 185 *S. equorum* 균주에 대한 생육저해 실험을 수행한 결과, 59 균주 (31.9%)가 ampicillin 내성을 나타내었다. Ampicillin 내성을 보유하고 있지 않은 126 *S. equorum* 균주의 14종 항생물질에 대한 내성을 평가한 결과는 Fig. 3-5과 같다. 항생물질 내성 평가는 Clinical and Laboratory Standards Institute (<http://www.clsi.org/>)와 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org>)의 기준에 의하여 disc agar diffusion 법으로 진행하였다. 실험에 사용한 항생물질 disc 14종, amikacin (30  $\mu\text{g}$ ), cefoxitin (30  $\mu\text{g}$ ), chloramphenicol (30  $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ), erythromycin (15  $\mu\text{g}$ ), gentamicin (10  $\mu\text{g}$ ), lincomycin (15  $\mu\text{g}$ ), linezolid (10  $\mu\text{g}$ ), ofloxacin (5  $\mu\text{g}$ ), oxacillin (1  $\mu\text{g}$ ), penicillin G (10 units), rifampicin (5  $\mu\text{g}$ ), tetracycline (30  $\mu\text{g}$ ), trimethoprim (5  $\mu\text{g}$ )은 Oxoid (Basingstoke, Hants, UK)로부터 구입하였다.

Penicillin G (34.1%)에 대한 내성을 보유한 균주가 가장 많이 검출되었고, erythromycin (9.5%), trimethoprim (9.5%), lincomycin (8.9%), chloramphenicol (4.8%)의 순

으로 내성을 보유한 균주들이 존재하는 것으로 나타났다. 최종적으로 126 균주 중, 66 균주가 적어도 한 종류의 항생물질에 대한 내성을 가지고 있었고, 24 균주는 2종류 이상의 항생물질에 대한 내성을 가지고 있었다(Table 3-5). *S. equorum* 균주들의 항생물질 내성은 균주 특이적(strain-specific)으로 여러 가지 양상으로 나타났고, 특이점은 본 연구를 통하여 우리나라에서 분리된 *S. equorum* 균주들의 항생물질 내성은 우리나라의 항생물질 판매량과 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 식품의약품안전처가 2009년에 발표한 국내의 항생물질 판매량은 oxytetracycline, penicillin, trimethoprim을 포함하는 sulfonamides, erythromycin을 포함하는 macrolides의 순으로 이들 항생물질에 대한 내성이 유럽에서 분리된 *S. equorum* 균주들에서보다 높은 빈도로 검출되었다.

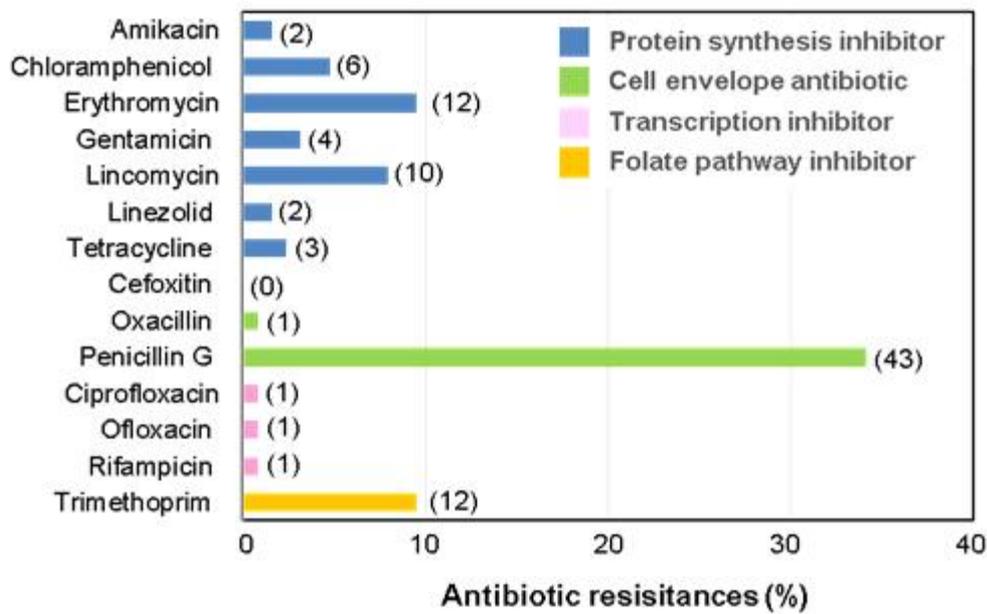


Fig. 3-5. Antibiotic resistance of the ampicillin-sensitive 126 *S. equorum* strains from jeotgal. The numbers in parentheses represent the numbers of resistant strains among the tested strains.

Table 3-5. Antibiotic resistance phenotypes of multidrug-resistant strains and resistance-gene-amplified strains.

Strain	Origin	Phenotype				Genotype	
		I		II	III		IV
C3x02	Saeu-jeotgal			P		T	
C4X41	Saeu-jeotgal	Te	Gm	P			T
C5054	Saeu-jeotgal	L					T
C6018	Saeu-jeotgal			P			T
KM2064	Myeolchi-jeotgal	E	L				
KS1025	Saeu-jeotgal	A				R	
KS1026	Saeu-jeotgal					O	T
KS1032	Saeu-jeotgal	E	L				
KS1051	Saeu-jeotgal			P			T
KS1054	Saeu-jeotgal	E	Gm				
KS1085	Saeu-jeotgal			P			T
KS2020	Saeu-jeotgal	Te		P			T
KS2030	Saeu-jeotgal	E	Gm				
KS2088	Saeu-jeotgal	Gm		P			
KS2097	Saeu-jeotgal			Ox	P		
KS3038	Saeu-jeotgal	E	C	P			
KS3040	Saeu-jeotgal	E	C	P			
KS3097	Saeu-jeotgal	L		P			
KM1031	Myeolchi-jeotgal	E	C	L	P		<i>InuA</i>
KS1022	Saeu-jeotgal	E	L	P			<i>InuA</i>
KS1030	Saeu-jeotgal	L		P			<i>InuA</i>
KS3044	Saeu-jeotgal	L	Lz	P			<i>InuA</i>
KS1086	Saeu-jeotgal			P			T
KS3022	Saeu-jeotgal			P		Cp	<i>pbp</i>
KS3083	Saeu-jeotgal			P			<i>pbp</i>

Classification categories based on reaction mechanisms: I, protein synthesis inhibitor; II, cell envelope antibiotic; III, transcription inhibitor; IV, folate pathway inhibitor.

Abbreviations: A, amikacin; C, chloramphenicol; Cp, ciprofloxacin; E, erythromycin; Gm, gentamicin; L, lincomycin; Lz, linezolid; O, ofloxacin; Ox, oxacillin; P, penicillin G; R, rifampicin; T, trimethoprim, Te, tetracycline.

### (3) 항생물질 내성 유전자의 존재 확인

Plasmid 또는 transposon의 형태로 외부로부터 획득한 항생물질 내성 유전자를 보유한 미생물을 식품용으로 사용할 경우, 항생물질 내성 유전자가 사람의 장내에서 위해미생물로 전이될 가능성을 가지고 있어, 궁극적으로 위해미생물에 의해 감염된 사람을 대상으로 한 항생물질 치료가 불가능한 상황에 도달할 수 있다. 따라서 사람에게서 인한 영향을 미칠 수 있는 획득형 항생물질 내성 유전자를 보유한 미생물은 식품용으로 사용 불가

한 것으로 평가되고 있다. 본 연구에서는 기존에 plasmid 또는 transposon에 존재하여 유전자 이동이 잘 일어나는 것으로 알려진 15개 유전자의 존재를 PCR로 확인해 보았다 [Colomer-Lluch et al., 2011; Lina et al., 1999; Luthje and Schwarz, 2006; Toh et al., 2007; Xi et al., 2009; Zhu et al., 2013]. 9종의 항생물질 내성과 관련이 있는 15개 유전자의 증폭을 위한 PCR primer에 대한 정보는 Table 3-6에 나타내었다. 15개 유전자 중, *lnuA*와 *pbp* 유전자가 7균주로부터 증폭되었다 (Table 3-5). 7 균주로부터 증폭된 두 유전자의 염기서열로부터의 추정 아미노산서열은 기존에 보고된 *Staphylococcus* 속 유래의 *lnuA* 및 *pbp* 유전자 산물의 아미노산 서열과 97% 이상의 상동성을 가지고 있었다. 이들 두 유전자는 기존에 유전체 정보가 공개된 *S. equorum* Mu2의 유전체에 존재하지 않고, 일부의 균주들만이 lincomycin 및 Penicillin G에 대한 내성을 나타내는 것으로 보아 획득형 내성 유전자가 증폭된 것으로 추정된다 (Table 3-5).

Table 3-6. Oligonucleotides for the identification of antibiotic resistance genes.

Class	Antibiotics	Gene	Oligonucleotide sequence (5'→3')		Size (bp)	Reference
			Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')		
I	Gentamicin	<i>aphA</i>	GCGCGGATCTTTAAATGGAGT	AAGCTGGTGGGAGAAAATGA	411	This study (NC_017331.1)
			GT	AAAC		
	Chloramphenicol	<i>cat</i>	CCAGCAAACACTACGTATAGCAT	GATGAAGCTGCAAGGCAACT	499	This study (X60827)
			TAC	GG		
	Linezolid	<i>cfr</i>	GCTACAGGCGACATTGGATT	CTGCCCTTCGTTTGCTTCT	570	This study (JN97096.1)
	Erythromycin	<i>ermA</i>	GTTCAAGAACAATCAATACAG	GGATCAGGAAAAGGACATTTT	421	(Lina et al., 1999)
			AG	AC		
		<i>ermB</i>	CCGTTTACGAAATTGGAACAG	GAATCGAGACTTGAGTGTC	359	(Lina et al., 1999)
			GTAAAGGGC			
		<i>ermC</i>	GCTAATATTGTTTAAATCGTC	GGATCAGGAAAAGGACATTTT	572	(Lina et al., 1999)
	AATTCC	AC				
Lincomycin	<i>lnuA</i>	GGTGGCTGGGGGGTAGATGT	GTTCTTTTGAAATACATGGTA	310	(Lina et al., 1999)	
		ATTAAACTGG	TTTTTCGATC			
		TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	GCAAACCTATTCCAGAAGCA			
Tetracycline	<i>tetK</i>	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	GCAAACCTATTCCAGAAGCA	718	(Aarestrup et al., 2000)	
		<i>tetM</i>	ACAGAAAGCTTATTATATAAC			TGGCGTGTCTATGATGTTTAC
II	Penicillin	<i>blaZ</i>	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	GCTTGACCACTTTTATCAGC	518	(Lina et al., 1999)
			<i>pbp</i>	GTTGCTATATCTGGCGGACGT		
III	Quinolone	<i>norA</i>	GGCAGAAGTTTCACATCGTAT	AGCCTTGCCTTTCTCCAGC	531	This study (NC_009782.1)
IV	Trimethoprim	<i>dfrA</i>	CGAAGCAATGATTGACCAGG	TTCCCTTTTCTACGCACTAAA	185	This study (NC_014369.1)
				TG		

Classification categories based on reaction mechanisms: I, protein synthesis inhibitor; II, cell envelope antibiotic; III, transcription inhibitor; IV, folate pathway inhibitor.

#### (4) Biofilm 형성, 혈청분해(hemolysis), Enterotoxin 생성 유전자의 존재 확인

유럽식품안전국 EFSA는 식품용으로 미생물을 사용하려는 경우, 항생물질 내성 및 위해인자가 존재하지 않음과 같은 안전성에 대한 근거를 요구하고 있지만, *Staphylococcus* 속에 대한 위해인자에 대한 정확한 정의가 없어, CNS의 안전성 평가에 있어 확실한 결론을 제시하지 못하고 있다. 본 연구에서는 CNS 구성원들 중, 기회감염균으로 알려진 *Staphylococcus epidermidis*의 안전성 평가에서 주로 사용되고 있는 biofilm 형성, 혈청분해, enterotoxin 유전자의 존재를 확인하였다 [Otto, 2012].

혈청분해(hemolysis)의 평가는 TSA에 horse blood 또는 sheep blood를 첨가하여 실시하였고, *Staphylococcus aureus* Newman 균주 및 USA300-P23 균주를 대조균으로 사용하였

다. 혈청분해능을 평가한 126균주 중,  $\alpha$ -hemolysis 활성을 나타낸 균주는 존재하지 않았고,  $\beta$ -hemolysis 활성은 3균주가 나타내었으며, 87 균주가  $\delta$ -hemolysis 활성을 나타내었다.  $\beta$ -hemolysis 활성을 나타낸 균주는 모두  $\delta$ -hemolysis 활성을 나타내었다 (Fig. 3-6).

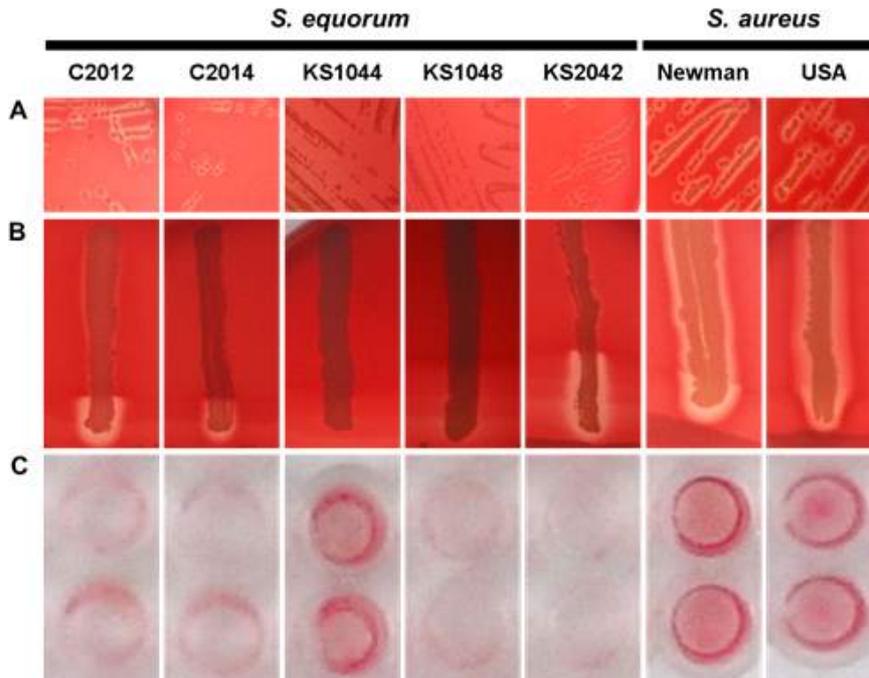


Fig. 3-6.  $\beta$ -Hemolytic activities (A),  $\delta$ -hemolytic activities (B) and biofilm formations (C) of *S. equorum* strains. *S. aureus* USA300-P23 (USA) and Newman were used as the positive controls for hemolytic activities and biofilm formation.

혈청분해 관련 유전자의 존재 확인을 위하여 *S. aureus*가 보유하고 있는  $\alpha$ -hemolysis,  $\beta$ -hemolysis,  $\delta$ -hemolysis 유전자 *hla*, *hly*, *hld*와 *S. epidermidis*가 보유하고 있는 SE\_0613, SE\_1760 유전자를 PCR로 증폭하였다. 혈청분해 관련 유전자 증폭에 사용한 PCR primer는 Table 3-7에 나타내었다. PCR 수행 결과,  $\beta$ -hemolysis 활성을 나타낸 *S. equorum* KS2042 균주로부터 SE\_0613 유전자가 증폭되었고, 증폭산물은 *S. equorum* ATCC 12228 균주의 hemolysin 유전자와 99% 상동성을 가지고 있었다. 126 균주 중, 단 1개의 균주로부터 SE\_0613 유전자가 증폭되어 *S. equorum* 균주들에서 나타나는 혈청분해의 원인은 알 수 없지만, KS2042 균주로부터 증폭된 SE\_0613 유전자는 *S. epidermidis* 균주로부터의 수평이동(horizontal transfer)에 의한 것으로 추정된다.

Table 3-7. Primer sets for the detection of virulence factors in *S. equorum* isolates from jeotgal.

Target gene	Oligonucleotide sequence (5'-3')		Size (bp)	Reference
	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')		
Hemolysin genes				
<i>hla</i>	CTGATTACTATCCAAGAAA TTCGATTG	CTTCCAGCCTACTTTTTTAT CAGT	209	(Jarraud et al., 2002)
<i>hlb</i>	GATGGTGGCGTAGCGATT GTAAG	CCCATGGCTTAGGTTTTTCA GTCAC	519	This study (KC242859.1)
<i>hld</i>	AAGAATTTTTATCTTAATT AAGGAAGGAGTG	TTAGTGAATTTGTTCACTGT GTCGA	111	(Jarraud et al., 2002)
SE_0613	AGCTAAAAAGGGTGATCG TAAGG	CCCACATTCCTCCAATATCA AT	156	(Even et al., 2010)
SE_1760	AATATTGTCACGAGCCAAC CTAA	AACAATGGTGGCACATTAGA GTC	227	(Even et al., 2010)
Enterotoxin genes				
<i>sea</i>	GGTTATCAATGTGCGGGT GG	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	102	(Mehrotra et al., 2000)
<i>seb</i>	TCGCATCAAACGACAAAC G	GCAGGTACTCTATAAGTGCC TGC	477	(Becker et al., 1998)
<i>sec</i>	AGATGAAGTAGTTGATGT GTATGG	CACACTTTTAGAATCAACCG	451	(Mehrotra et al., 2000)
<i>sed</i>	CCAATAATAGGAGAAAATA AAAG	ATTGGTATTTTTTTCGTTTC	278	(Mehrotra et al., 2000)
<i>see</i>	AGGTTTTTTCACAGGTCAT CC	CTTTTTTCTCTCGGTCAATC	209	(Mehrotra et al., 2000)

미생물이 생산하는 biofilm은 직접적인 위해성과는 관련이 없지만, 위해미생물이 식품이나 용기의 표면에 부착하여 성장하면서 위생상의 문제를 일으킬 가능성이 높다. 미생물이 microplate 상에 형성한 biofilm을 0.1% safranin 용액으로 염색하는 방법 [Heilmann et al., 1996]을 이용하여 126 균주의 biofilm 형성을 검토한 결과, 37 균주가 biofilm을 형성하는 것으로 나타났다.

*Staphylococcus* 속이 생산하는 enterotoxin (SE)는 소화효소 및 가열처리에 의해 불활성화 되지 않기 때문에 식품산업에 있어 위험한 요소로 인식되고 있으며 [Evenson et al., 1988], *S. aureus*가 대표적 생산균으로 알려져 있지만, 드물게 CNS 균주들에서의 생산도 보고되고 있으며 [Valle et al., 1990; Zell et al., 2008], 혈청학적으로 SEA, SEB, SEC, SED, SEE 5 종류가 알려져 있다 [Bergdoll et al., 1959]. 이들 5종의 SE를 증폭할 수 있는 PCR primer를 구축하여(Table 3-7), 126 균주를 대상으로 PCR 증폭을 수행한 결과 SE 유전자는 증폭되지 않았다.

본 연구에서의 Biofilm 형성, 혈청분해(hemolysis), Enterotoxin 생성 유전자의 존재 확인을 통하여 이들 특성은 모두 균주 특이적으로 나타남을 확인하였다. 최종적으로 항생물질 내성 평가, 혈청분해 검토, biofilm 형성 평가, enterotoxin 유전자의 존재확인 실험을 통하여, 위해성이 없는 것으로 나타난 39 균주가 선발되었다(Table 3-8).

Table 3-8. Technological properties of the 39 *S. equorum* strains selected by the safety assessments.

Strains	Proteas e	Lipase	Nitrate reductas e	Biogenic amine production (ppm)				Growth in NaCl		
				Cadaverine	Histamine	Putrescine	Tyramine	15%	20%	25%
C3024	+	+	-	23.3 ± 0.1	ND	ND	ND	+	+	-
C3038	-	+	+	21.8 ± 0.2	33.0 ± 5.3	ND	28.1 ± 1.9	+	+	+
C4005	+	+	+	29.6 ± 0.1	31.9 ± 6.0	22.6 ± 0.9	29.7 ± 0.8	+	+	-
C4040	+	-	-	ND	31.5 ± 6.3	ND	ND	+	+	+
C4X11	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	-
C5059	-	+	-	22.0 ± 0.1	35.0 ± 3.8	ND	28.8 ± 1.4	+	+	+
C6002	+	+	-	19.5 ± 0.2	22.3 ± 0.6	15.8 ± 0.1	25.1 ± 2.1	+	+	-
C6017	-	-	+	ND	ND	ND	ND	+	+	-
C6019	+	+	-	24.4 ± 0.6	31.9 ± 6.0	18.6 ± 0.9	28.0 ± 2.0	+	+	-
C6047	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	W
C7016	-	+	-	23.1 ± 2.1	ND	17.9 ± 0.8	29.0 ± 1.3	+	+	-
C7023	+	+	-	24.6 ± 0.9	34.0 ± 4.5	ND	28.0 ± 1.1	+	+	-
C8003	-	+	+	23.7 ± 1.9	34.5 ± 0.9	ND	ND	+	+	-
KMI007	-	+	+	23.7 ± 0.3	ND	18.3 ± 0.7	28.9 ± 1.4	+	+	-
KS1008	+	-	-	ND	ND	ND	ND	+	+	-
KS1015	+	+	-	18.7 ± 0.2	ND	ND	ND	+	+	-
KS1035	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	-	-
KS1039	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	+
KS1048	+	+	+	ND	38.0 ± 0.4	ND	ND	+	+	+
KS1052	+	-	+	21.5 ± 2.6	36.8 ± 1.2	ND	29.1 ± 0.8	+	+	+
KS1053	+	+	+	18.4 ± 0.5	22.3 ± 0.8	18.6 ± 1.5	ND	+	+	-
KS1090	+	+	+	20.7 ± 0.3	ND	ND	29.2 ± 1.1	+	+	-
KS1099	+	+	-	19.3 ± 0.2	36.0 ± 3.1	ND	ND	+	+	+
KS2002	-	+	+	19.2 ± 0.3	22.3 ± 0.1	ND	28.1 ± 3.1	+	+	+
KS2010	+	+	+	22.4 ± 0.2	34.2 ± 4.4	17.2 ± 0.3	28.2 ± 1.9	+	+	-
KS2015	+	+	+	21.6 ± 0.1	40.0 ± 0.3	ND	ND	+	+	-
KS2019	+	+	+	20.2 ± 0.1	38.5 ± 1.3	ND	ND	+	+	-
KS2036	+	+	+	ND	ND	ND	ND	+	+	-
KS2055	+	+	+	19.0 ± 0.1	37.2 ± 2.2	ND	ND	+	+	-
KS2059	-	+	-	19.3 ± 5.3	22.3 ± 3.1	ND	ND	+	+	-
KS2095	-	+	-	20.0 ± 0.4	32.7 ± 5.3	ND	ND	+	+	+
KS3006	+	+	+	20.2 ± 0.1	ND	ND	ND	+	+	+
KS3029	-	+	+	19.2 ± 0.5	ND	15.5 ± 0.1	ND	+	+	+
KS3031	+	+	-	18.5 ± 0.3	ND	ND	ND	+	+	-
KS3055	+	+	+	20.1 ± 0.3	33.8 ± 4.7	ND	ND	+	+	-
KS3057	-	+	+	19.9 ± 0.6	22.3 ± 0.8	15.9 ± 2.2	ND	+	-	-
KS3081	-	+	-	22.3 ± 0.2	ND	17.4 ± 2.6	ND	+	+	-
KS3084	-	+	-	21.5 ± 0.3	32.9 ± 2.1	16.3 ± 0.3	ND	+	+	+
KS3086	+	+	+	23.3 ± 1.3	32.0 ± 0.4	16.2 ± 0.5	ND	+	+	-

##### (5) *S. equorum*의 기능성 및 biogenic amines 생성 평가

발효용 종균으로 이용되기 위해서는 안전성과 함께 기능성 또한 중요한 요소이다. 따라서 안전성이 확보된 39 *S. equorum* 균주를 대상으로 발효용 종균으로써의 기능성을 평가하였다. 그러나 아직 젓갈을 대상으로 한 종균이 개발된 바 없어, 기능성 평가를 위한 기준이 보고된 바 없다. 따라서 유럽의 발효육류 종균개발의 척도인 protease, lipase, nitrate reductase 활성을 측정하였다 [Leroy et al., 2006]. Protease 및 lipase 활성 측정은 2% 탈지분유와 1% tributryn을 각각 첨가한 TSA를 이용하였고, nitrate reductase 활성측정은 Miralles et al. [1996]의 방법을 변형하여 사용하였다. Table 3-8에는 protease, lipase, nitrate reductase 활성 측정 결과를 제시하였다. 균주에 따라서 3가지 활성은 다양한 양상으로 균주 특이적으로 나타났고, 39 균주 중 16 균주가 3가지 활성을 모두 가지고 있는 것으로 나타났다.

단백질 함량이 높은 식품소재의 발효과정에서 다량으로 생성되는 biogenic amines에 대한 건강 위해성이 정확히 밝혀지지 않는 않지만, 세계적으로 규제의 수위가 높아지고 있어 우리나라 전통발효식품의 수출에 있어 걸림돌이 되고 있다[Shalaby, 1996; Sila Santos, 1996]. 모든 biogenic amine을 대상으로 한 기준규격이 만들어지진 않았지만, histamine과 tyramine에 대한 위해성이 밝혀지고 있어, 두 종류에 대한 기준이 만들어지고 있다. Biogenic amines의 생성은 식품의 종류와 발효에 관련하는 미생물의 종류에 따라 크게 차이가 있지만[Carelli et al., 2007], 아직 젓갈을 대상으로 한 주요 biogenic amines가 도출되어 있지 않아, 본 연구에서는 위해성이 논란의 대상이 되고 있는 cadaverine, histamine, putrescine, tyramine의 생성을 검토하였다. 분리 균주들에 대한 4종 biogenic amines의 생성은 이들의 전구체 histidine, lysine, ornithine, tyrosine을 TSB에 0.25% 첨가하여 30°C에서 48시간 배양한 후, 생성된 biogenic amines를 HPLC로 정량적으로 검출하였다. 각 균주가 생성한 4종의 biogenic amine의 양은 균주 특이적인 양상을 보였고, 4 균주는 4종류의 biogenic amines를 모두 생성하였고, 7 균주는 4종류의 biogenic amines를 모두 생성하지 않았다 (Table 3-8). Biogenic amines 비생성 균주 중 C4X11, C6037, KS1035, KS1039, KS2036 균주는 protease, lipase, nitrate reductase 활성을 보유하고 있었다.

새우젓과 멸치젓은 20% 이상의 고염 상태에서 숙성이 진행되기 때문에 선발된 균주들이 종균으로써의 기능을 발휘하기 위해서는 고염상태에서의 생장이 요구된다. 젓갈에서 분리된 39 *S. equorum* 균주들은 대부분 20% NaCl을 첨가한 배지에서는 생장을 나타내었고, 13 균주는 25% NaCl 농도에서도 생장이 가능하였다.

## 나. 미생물 첨가제의 첨가법 개발

### (1) 연구의 배경

본 과제의 수행을 통하여 bacteria가 젓갈의 발효에 관여한다는 근거를 확보하였고, 새우젓 및 멸치젓에서의 우점종을 확인할 수 있었으며, 이들 우점종이 고염에서 성장 가능함을 확인하였다. 향후 우점종으로 도출된 우점균들의 첨가를 위한 식품용 배지의 개발을 검토하였다. 젓갈의 주원료인 멸치나 새우는 식품용 배지를 개발하는데 필요한 충분한 영양소를 함유하고 있는 것으로 사료된다. 본 연구에서는 가장 많은 소비를 보이는 새우젓 발효용 종균의 첨가를 위한 배지의 제조를 검토하였다.

### (2) 새우를 이용한 식품용 배지의 개발

건조하지 않은 젓갈 제조용 새우에 동량의 물을 넣고 믹서로 잘게 갈아 원심분리(6,000 g, 20 min)하여 얻어진 상등액을 살균한 결과, 침전물이 생기는 것을 확인하였다. 따라서 침전물의 발생을 억제하기 위해 살균에 앞서 상등액을 100℃, 5분간의 가열처리로 침전물을 제거한 후에 얻어진 상등액을 살균하여 배지로 사용하였다. 살균 후, 침전물이 생기지 않아 젓갈의 종균 첨가용 배지로 사용가능한 수준으로 나타났고, 종균 후보균주인 *S. equorum*의 생육을 흡광도의 증가로 확인하였다.

새우를 이용한 식품용 배지에서의 가능한 높은 수준의 종균 증식을 확보할 목적으로 NaCl을 살균 전 단계에서 첨가하여 살균한 식품용 배지에 *S. euorum*을 접종하여 균주의 증식을 확인하였다. Tryptic soy broth (TSB)를 이용한 경우에는 *S. equorum*이 NaCl이 5% (w/v)에서 무첨가 배지보다 높은 생장을 나타내었지만, 새우를 이용하여 제조한 배지에서는 NaCl을 첨가하지 않은 상태에서 가장 높은 생육을 나타내었다 (Fig. 3-7). 이러한 현상은 새우의 채취과정에서 포함된 NaCl의 농도가 *S. equorum*의 생장에 충분한 것으로 보인다. NaCl의 첨가 없이 제조한 새우를 재료로 한 배지는 젓갈발효를 위한 종균의 첨가에 적용 가능한 것으로 나타났다.

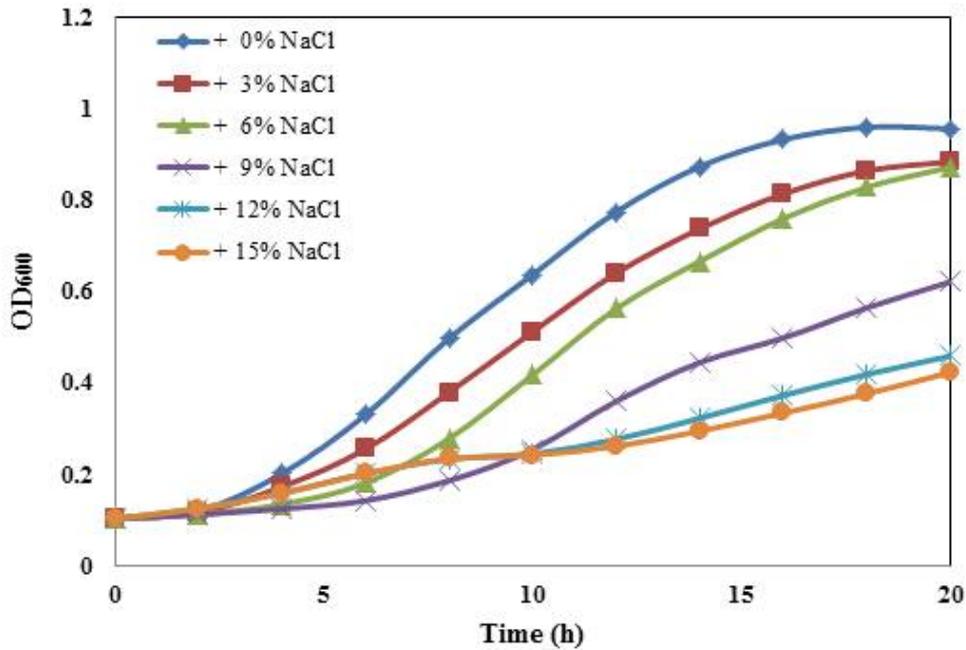


Fig. 3-7. Growth of a *Staphylococcus equorum* isolate at different concentrations of NaCl.

### (3) 동결건조에 의한 *S. equorum*의 생존율 측정

식품용 배지에서 배양한 종균배양액을 첨가하는 방법이 아닌 종균을 수요자에게 공급하는 경우를 고려하여 *S. equorum*의 생존에 미치는 동결건조의 영향을 검토해 보았다. NaCl을 5% 첨가한 TSB에서 배양한 균주를 회수한 다음, 생리식염수로 세척한 후, 동결건조 전과 후의 생균수를 측정하여 동결건조에 의한 영향을 검토하였다. 젓갈에서 분리한 2 균주와 표준균주를 이용하여 생존율을 검토한 결과, 분리균주들의 생존율이 표준균주에 비해 약간 높은 것으로 나타났고, 평균 40% 정도 생존하는 것으로 나타났다(Table 3-9). 동결건조를 통하여 40% 정도의 균주가 살아남는 것으로 나타났지만, 종균의 공급에는 큰 문제점이 없는 것으로 추정된다.

Table 3-9. Survival of *Staphylococcus equorum* strains after freeze-drying.

Strain	Cell count (cfu/ml)		Survival rate (%)
	Before freeze-drying	After freeze-drying	
<i>S. equorum</i> KS1048	$1.5 \times 10^{11}$	$6.2 \times 10^{10}$	41.3
<i>S. equorum</i> KS1051	$2.0 \times 10^{12}$	$9.2 \times 10^{11}$	46.8
<i>S. equorum</i> DSM20674 <sup>T</sup>	$1.8 \times 10^{12}$	$6.7 \times 10^{11}$	37.2

## 제 2 절 미생물 첨가제를 이용한 젓갈 발효조절 기술 개발

### 1. 젓갈용 미생물 첨가제에 의한 효과 분석

#### 가. 새우젓갈 숙성에 따른 bacteria 군집 천이 모니터링

##### (1) 연구의 배경

고염에 대한 내성 및 단백질 가수분해 활성 등의 생리학적 특징을 기준으로 분리한 bacteria 첨가로 동남아시아에서 생산되는 fish sauce의 숙성기간 단축에 성공한 몇건의 연구결과가 보고되었지만, 숙성기간 동안 미생물상 및 미생물 천이에 대한 연구는 미진한 실정이다 [Gildberg et al., 1984; Sinsuwan et al., 2007, 2008; Siringan et al., 2006; Udomsil et al., 2011; Yongsawatdigul et al., 2007]. 또한 발효식품에 첨가하는 종균의 개발은 특정 식품의 주발효를 담당하는 우점종을 사용하는 방향으로 진행되어 왔기 때문에 젓갈발효 관련 미생물의 생태학적 이해를 기반으로 젓갈발효의 종균화가 진행되어야 한다. 미생물 군집 분석의 결과는 우점종의 도출뿐만 아니라 숙성발효, 품질 표준화 달성에 필요한 미생물학적 기초자료를 제공할 수 있다. 따라서 젓갈발효의 종균화에 필요한 기초과학적 지식의 확보를 위하여 새우젓갈의 숙성에 따른 bacteria 군집의 천이를 모니터링하였다.

##### (2) 새우젓갈 시료

숙성기간별 bacteria 군집분석을 위한 새우젓갈은 서해안 소래포구에서 젓새우 (*Acetes japonicus*)를 구입 후, 소금물과 천일염을 첨가하여 최종 NaCl 농도가 24% (w/w)가 되도록 제조하였다. 제조된 새우젓갈은 3L 플라스틱 용기에 담아 15°C에 보관하면서 1, 5, 10, 15, 25, 35, 65, 135일에 시료를 채취하여 미생물 분석을 진행하였다.

##### (3) 시료의 전처리 및 배양법에 의한 bacteria 선발, 분리

멸균한 거즈로 걸러 분리한 젓갈시료의 여액은 pH meter로 pH를 측정하였고, Mohr법 [Che, 1998]을 이용하여 NaCl 농도를 측정하였으며, bacteria 분리에 사용하였다. Bacteria 분리를 위한 새우젓갈 여액은 single colony 분리가 가능한 농도로 생리식염수로 희석한 다음, 한천배지에 도말하여 30°C에서 24시간 이상 배양하며 관찰하였다. Bacteria 분리에는 1.8% (w/v) 한천을 첨가한 marine medium (MBcell, Korea), nutrient medium (Difco, USA), MRS medium (Difco, USA)과 이들 배지에 NaCl을 최종농도가 6% (w/v) 되도록 첨가한 배지를 이용하였다. 배양 및 균수 측정 후, 형성된 colony는 색, 모양, 크기 등의 형태학적 특성을 고려하여 각 배지 별로 약 10 colony를 선발하였고, 선발과정에서 사용한 동일 배지를 이용하여 순수분리 하였다.

#### (4) 분리 균주의 동정

분리된 균주의 동정은 멸치젓 및 새우젓 유래 bacteria 군집 분석에서 사용한 방법을 동일하게 적용하였다.

#### (5) 새우젓갈 숙성 중의 pH 변화

새우젓갈의 pH는 6.9~7.1로 숙성기간 동안 거의 일정하게 유지되었다 (Fig. 3-8). 젓갈 및 발효식품의 품질특성을 나타내는 지표 중 하나인 pH는 젓갈 숙성 중 미생물에 의해 생성되는 젖산 및 유기산 등으로 인하여 그 값이 떨어지는 것으로 알려져 있다 [Kang et al., 2001; Park et al., 2002a]. 대다수의 젓갈의 pH는 5.0~6.5 정도로 보고되었지만 새우젓갈의 pH는 중성으로 일정하게 유지되어 기존에 보고된 다른 종류의 젓갈에 비해 다소 높은 것으로 나타났다 [Lee et al., 1999, 2001]. 새우젓갈의 pH가 중성으로 유지되는 이유는 갑각류 젓갈의 숙성 중 생성되는 amine의 영향을 들 수 있으며 [Mok et al., 2000], 새우껍질에 포함된 calcium ion의 유리가 주된 원인으로 추정된다 [Um and Lee, 1996; Evers and Carroll, 1998].

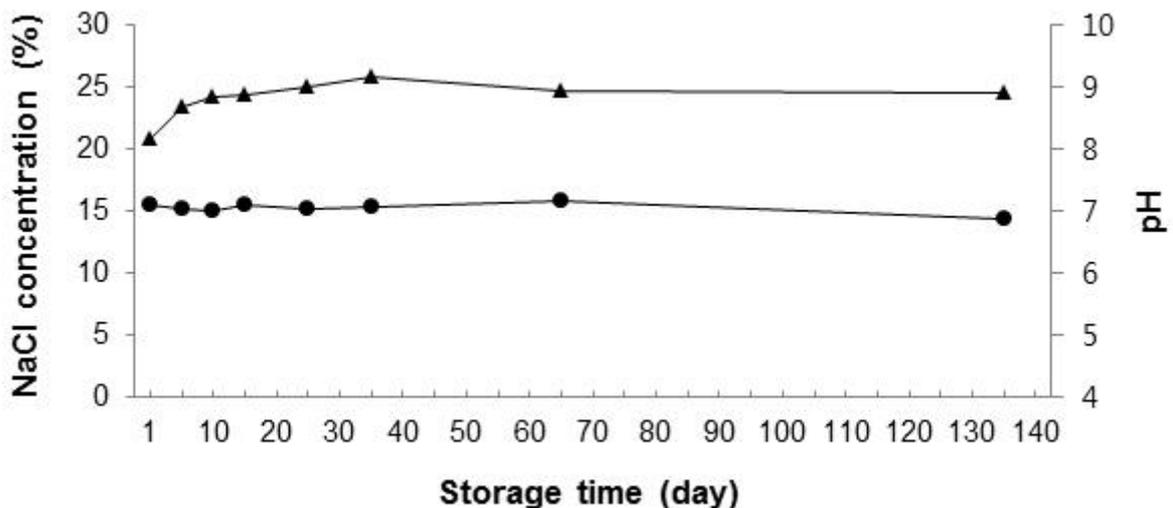


Fig. 3-8. The pHs and NaCl concentrations of *Saeu-jeotgal* during ripening. NaCl concentration (▲); pH (●).

#### (6) 배지에 따른 숙성 중의 생균수 변화

새우젓갈 숙성기간 동안 6종의 배지에서 검출된 bacteria의 수는 숙성 초기의 모든 배지에서 약  $10^5$  CFU/mL 수준으로 나타났지만, marine agar 및 NaCl이 첨가된 marine agar를 제외하고는 모두 숙성과정에서 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 3-9). Marine agar에서 성장한 bacteria는 65일까지  $10^7$ 에서  $10^8$  CFU/mL 수준까지 증가하다가, 이후 감소하여 135일차에는  $10^6$  CFU/mL 수준으로 검출되었다. 그 밖의 배지에서는 숙성 초기부터 감소

하는 양상을 보였고, 135일차의 생균수는  $10^3 \sim 10^4$  CFU/mL 수준으로 나타났다. 한편, 배지에 첨가한 6%의 NaCl은 bacteria의 성장에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 3-2). 기존에 보고된 새우젓갈의 생균수는  $10^2 \sim 10^4$  CFU/mL 수준으로 marine agar를 제외한 배지에서 나타난 결과와 크게 다르지 않다 [Lee et al., 1999; Ham and Jin, 2002]. 하지만 본 연구에서는 기존 연구에서 사용하지 않은 marine agar를 통하여  $10^7 \sim 10^8$  CFU/mL 수준의 생균수 검출이 가능하였다. 이 결과는 bacteria가 고농도의 NaCl이 존재하는 새우젓갈에서 성장 가능함을 제시하였고, 원재료 유래의 단백질분해효소에 의한 단순 숙성이 아닌 bacteria에 의한 발효가 새우젓갈의 숙성에 관여하고 있음을 제시한 것으로 사료된다.

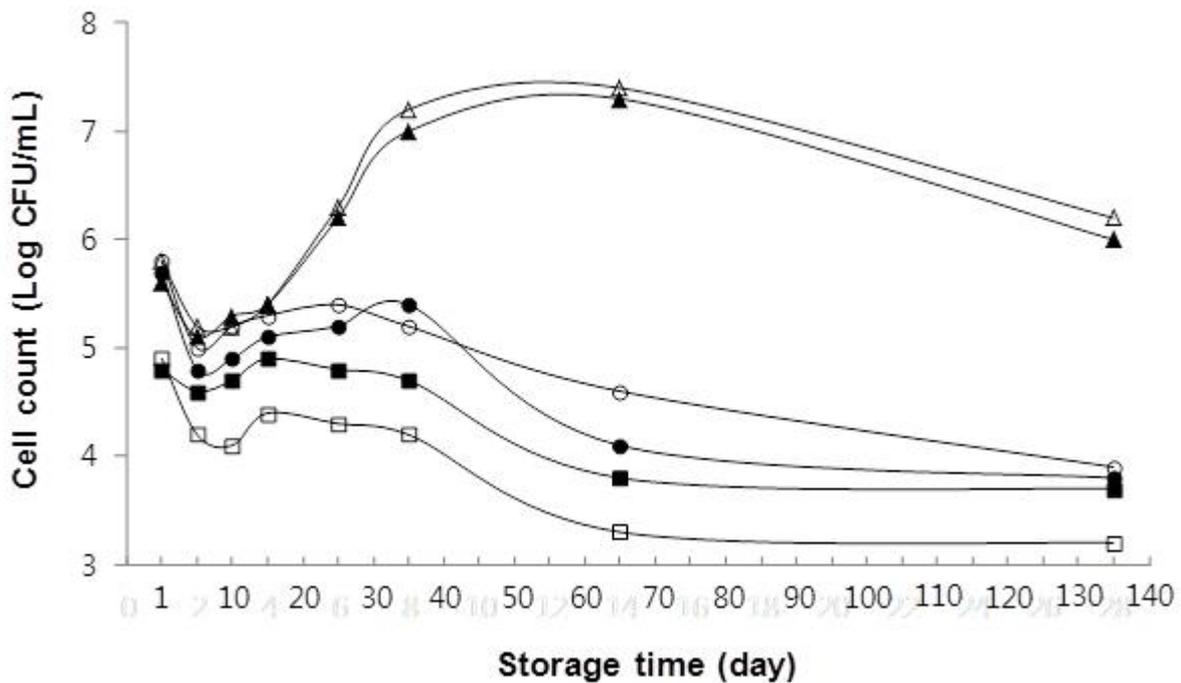


Fig. 3-9. Cell counts in *Saeu-jeotgal* during ripening on several media. Media: marine agar (△), marine agar containing 6% NaCl (▲), nutrient agar (○), nutrient agar containing 6% NaCl (●), MRS agar (□), and MRS agar containing 6% NaCl (■). The results are the average values of three replicates.

### (7) 새우젓갈에서 분리된 bacteria의 다양성

135일의 숙성기간 동안 8번의 시료 채취를 통하여 총 467 균주를 순수분리하였고, 16S DNA 염기서열 분석에 의해 동정한 결과, 기존의 분류단위 bacteria와 97% 미만의 16S rDNA 상동성을 나타내어 신종균으로 추정되는 16균주가 분리되었고, 나머지 451균주는 42속 87종으로 분류되었다 (Fig. 3-10).

분리 동정된 총 467균주의 26%를 차지하는 *Staphylococcus* 속이 가장 높은 빈도로 검

출되었고, *Salimicrobium*, *Kocuria* 속이 각각 17%, 13%로 분리되어 뒤를 이었다. 종 수준에서는 *Staphylococcus equorum*, *Salimicrobium salexigens*, *Kocuria palustris*가 각각 25%, 17%, 11% 순으로 우점하였다. 시중에 판매되는 새우젓갈의 bacteria의 다양성을 분석한 결과와 동일하게 *Staphylococcus* 속이 가장 높은 빈도로 검출되었고, *Salimicrobium*, *Kocuria* 속 또한 높은 빈도로 검출되어 제조시기, 제조방법, 제조환경에 따라 균의 다양성은 다소 차이는 있었지만 새우젓갈의 주요 bacteria는 동일하게 나타났다 [Guan et al., 2011].

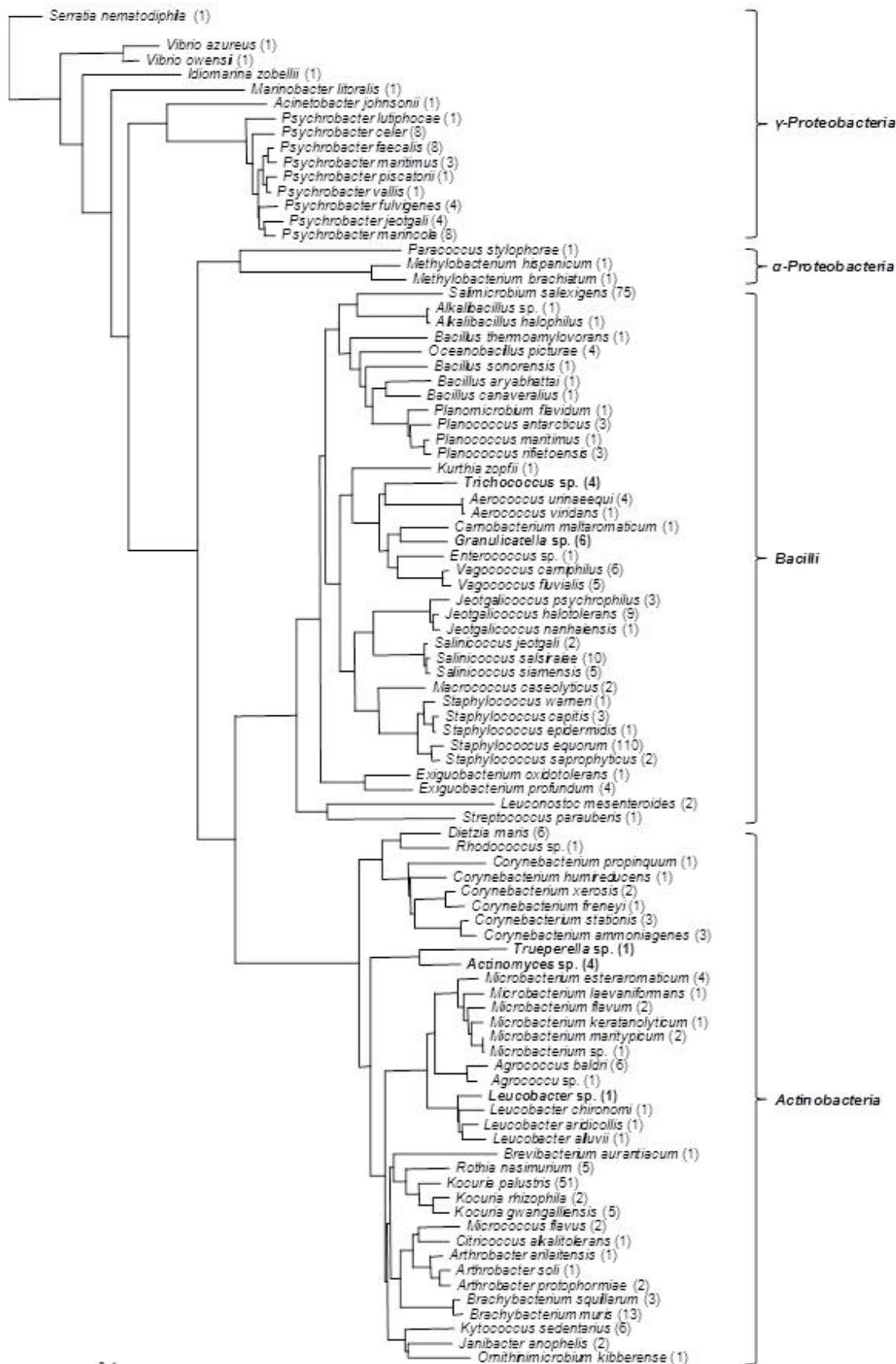


Fig. 3-10. Phylogenetic tree of the isolates from *Saeu-jeotgal*, showing the relationship based on the determination of the near-complete 16S rDNA sequences of the isolates. DNA sequences were aligned with those of neighboring taxa based on secondary structure information using the PHYDIT program. Evolutionary distances were calculated according to Kimura's two-parameter model, and clustering was performed using the neighbor-joining method. The Phylogenetic tree was generated by a treeing algorithm contained within the PHYDIT program. The numbers in parentheses indicate the numbers of isolates identified as the same species. New, unidentified species showing similarities of less than 97% with the closest type strain are presented in bold letters. The bar indicates the number of nucleotide substitutions per site.

### (8) 배지에 따른 분리 bacteria의 다양성

기존에 진행된 새우젓갈 미생물 분석 연구에서는 대부분 TSA, nutrient agar 및 plate count agar를 bacteria의 분리 및 계수에 사용하였다 [Ha et al., 2007; Lee et al., 1999; Oh et al., 2005]. 본 연구에서는 bacteria 다양성을 높이기 위하여 1.8% (w/v) 한천을 첨가한 marine medium, nutrient medium, MRS medium과 새우젓갈의 소금 농도를 고려하여 각 배지에 NaCl을 최종농도가 6% (w/v) 되도록 첨가한 배지를 이용하여 확인하였다.

Marine agar에서는 *Salimicrobium* 속이 NaCl의 첨가에 관계없이 우점하는 것으로 나타났다. NaCl 무첨가의 경우에는 *Psychrobacter*, *Staphylococcus* 속이, NaCl을 첨가한 경우에는 *Psychrobacter*, *Salinicoccus* 속이 그 뒤를 이어 검출되었다 (Table 3-10). 가장 많이 검출된 *Salimicrobium* 속의 경우, 25일 이후부터 검출이 증가하는 것으로 보아 고염 상태에도 증식이 가능한 것으로 추정된다. Marine agar에서 *Salimicrobium* 속이 우점종으로 41% 정도의 비중으로 검출된 것과는 달리, nutrient agar에서는 우점으로 검출된 bacteria 속들 간에 차이가 줄어들었다 (Table 3-11). Nutrient agar에서는 *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium* 속의 순으로, 6% NaCl을 첨가한 배지에서는 *Psychrobacter* 속이 우점하였고, *Kocuria*, *Staphylococcus* 속이 뒤를 이었다. MRS agar에서는 숙성 초기에 다양한 bacteria가 검출되었지만, 숙성의 진행에 따라 *Staphylococcus* 속이 가장 큰 비중으로 증가하였고, *Vagococcus*, *Kocuria*, *Granulicatella* 속이 뒤를 이었다 (Table 3-12). NaCl을 첨가한 MRS agar에서는 *Staphylococcus*, *Kocuria*, *Jeotgalicoccus* 속의 순으로 우점하였다.

3종류의 NaCl 무첨가 배지로부터 총 237 균주를 분리하여 동정한 결과 *Staphylococcus*, *Salimicrobium*, *Kocuria*, *Psychrobacter* 속이 차지하는 비중은 각각 30%, 14%, 8%, 4%로 순으로 나타났고, NaCl을 첨가한 배지로부터는 총 230 균주를 분리하여 동정한 결과 *Staphylococcus*, *Salimicrobium*, *Kocuria*, *Psychrobacter* 속이 차지하는 비중은 각각 20%, 18%, 17%, 12%로 순으로 나타났다. 배지에 첨가한 NaCl의 유무에 따라 우점종이 차지하는 비율은 달라졌으나 우점하는 순서는 동일하게 나타났다.

배지의 종류에 따라 검출된 bacteria의 다양성이 다르게 나타났지만, *Staphylococcus* 속만이 연구에 이용된 6종류의 모든 배지에서 높은 빈도로 검출되었다. nutrient agar에서 종의 다양성이 가장 높게 나타났고, MRS agar에서 가장 낮게 나타났다.

Table 3-10. Numbers of isolates from *Saeu-jeotgal* on marine agar and NaCl supplemented marine agar during ripening summarized at the genus level.

Genus	Marine agar (2% NaCl) <sup>a</sup>								Total	Marine agar (6% NaCl) <sup>a</sup>								Total
	Storage time (day)									Storage time (day)								
	1	5	10	15	25	35	65	135		1	5	10	15	25	35	65	135	
<i>Actinomyces</i>			2(2)	1(1)					3(3)		1(1)						1(1)	
<i>Agrococcus</i>	1			1					2	1		1					2	
<i>Alkalibacillus</i>															1	1	2	
<i>Bacillus</i>		1							1									
<i>Brachybacterium</i>	1		1						2	1	2	1					4	
<i>Citricoccus</i>										1							1	
<i>Corynebacterium</i>			3						3									
<i>Dietzia</i>	1	1		1					3		1						1	
<i>Exiguobacterium</i>						1			1									
<i>Idiomarina</i>											1						1	
<i>Janibacter</i>		2							2									
<i>Jeotgalicoccus</i>		1							1		2	1	1				4	
<i>Kocuria</i>										1	1	1	1		1		5	
<i>Trichococcus</i>	1(1)	1(1)							2(2)					1(1)			1(1)	
<i>Kytococcus</i>		1							1		1						1	
<i>Leucobacter</i>				1					1			1					1	
<i>Microbacterium</i>			1		1				2	1							1	
<i>Oceanobacillus</i>												1					1	
<i>Ornithinimicrobium</i>				1					1									
<i>Planococcus</i>	1	1							2		1	1					2	
<i>Planomicrobium</i>										1							1	
<i>Psychrobacter</i>	3		1	1	3				8	1	1	1	1				6	
<i>Salimicrobium</i>	1	1		1	3	8	11	8	33				1	6	11	11	9	
<i>Salinicoccus</i>	1	1	1	1					4	3	1	1	1				6	
<i>Staphylococcus</i>			2	2	1	1		2	8			2	1	1			4	
<i>Vibrio</i>										1							1	
Total	10(1)	10(1)	11(2)	10(1)	8	10	11	10	80(5)	11	10(1)	10	9	9(1)	12	12	11	84(2)

The numbers of likely new unidentified species are indicated in parentheses (with less than 97% 16S rDNA similarities to any known species).

<sup>a</sup>Final NaCl concentration in the medium was indicated in the parenthesis.

Table 3-11. Numbers of isolates from *Saeu-jeotgal* on nutrient agar and NaCl supplemented nutrient agar during ripening summarized at the genus level.

Genus	Nutrient agar								Total	Nutrient agar (6% NaCl) <sup>a</sup>								Total		
	Storage time (day)									Storage time (day)										
	1	5	10	15	25	35	65	135		1	5	10	15	25	35	65	135			
<i>Acinetobacter</i>	1								1											
<i>Agrococcus</i>		1	1						2			1								1
<i>Arthrobacter</i>		1							1											
<i>Bacillus</i>							1	1	2			1								1
<i>Brachy bacterium</i>					2	1		1	4		1	1	1	2						5
<i>Corynebacterium</i>		1						1	2	1						1				2
<i>Dietzia</i>											1	1								2
<i>Exiguobacterium</i>						1	1		2	1										1
<i>Jeotgali coccus</i>			1		1			1	3											
<i>Kocuria</i>		2	2	2	2	3	3	1	15				1	1	1	7				10
<i>Trichococcus</i>												1(1)								1(1)
<i>Trueperella</i>	1(1)								1(1)											
<i>Kytococcus</i>			1			2			3			1								1
<i>Leucobacter</i>	1(1)		1						2(1)											
<i>Marinobacter</i>													1							1
<i>Methylobacterium</i>				1			1		2											
<i>Microbacterium</i>		2	1	1	2	1	1		8											
<i>Micrococcus</i>	2								2											
<i>Oceanobacillus</i>											1					1				2
<i>Paracoccus</i>											1									1
<i>Planococcus</i>										1		1								2
<i>Psychrobacter</i>		1			1				2	2	4	3	4	2	1	1	4			21
<i>Rhodococcus</i>				1					1											
<i>Rothia</i>	1								1		1									1
<i>Salimicrobium</i>															1				3	4
<i>Salinicoccus</i>										1		1		1	1					4
<i>Staphylococcus</i>		2	3	3	4	3	2	3	20			2	3	2	3					10
<i>Vagococcus</i>	1			2					3											
<i>Vibrio</i>										1										1
Total	7(2)	10	10	10	12	11	10	7	77(2)	7	9	10(1)	12	9	8	9	7			71(1)

The numbers of likely new unidentified species are indicated in parentheses (with less than 97% 16S rDNA similarities to any known species).

<sup>a</sup>Final NaCl concentration in the medium was indicated in the parenthesis.

Table 3-12. Numbers of isolates from *Saeu-jeotgal* on MRS agar and NaCl supplemented MRS agar during ripening summarized at the genus level.

Genus	MRS agar								Total	MRS agar (6% NaCl) <sup>a</sup>								Total
	Storage time (day)									Storage time (day)								
	1	5	10	15	25	35	65	135		1	5	10	15	25	35	65	135	
<i>Aerococcus</i>			1	1	1				3		1	1						2
<i>Arthrobacter</i>	2								2	1								1
<i>Brachybacterium</i>														1				1
<i>Brevibacterium</i>										1								1
<i>Carnobacterium</i>	1								1									1
<i>Corynebacterium</i>	1	1	1						3	1								1
<i>Enterococcus</i>		1							1									1
<i>Exiguobacterium</i>	1								1									1
<i>Granulicatella</i>	1(1)		1(1)	1(1)	2(2)				5(5)			1(1)						1(1)
<i>Jeotgalicoccus</i>											4	1						5
<i>Kocuria</i>		1		1		2		1	5	2	1	5	3	1	4	6	1	23
<i>Kurthia</i>	1								1									1
<i>Leuconostoc</i>						2			2									2
<i>Macrocooccus</i>		1							1									1
<i>Micrococcus</i>											1							1
<i>Oceanobacillus</i>																	1	1
<i>Paracoccus</i>										1								1
<i>Psychrobacter</i>										1								1
<i>Rothia</i>			3						3									3
<i>Salinicoccus</i>										1	1						1	3
<i>Serratia</i>	1								1									1
<i>Staphylococcus</i>		2	2	4	8	4	11	12	43	1	2	3	2	11	5	3	5	32
<i>Streptococcus</i>		1							1									1
<i>Vagococcus</i>	2	3	2						7			1						1
Total	10(1)	10	10(1)	7(1)	11(2)	8	11	13	80(5)	9	10	9	8(1)	12	10	9	8	75(1)

The numbers of likely new unidentified species are indicated in parentheses (with less than 97% 16S rDNA similarities to any known species).

<sup>a</sup>Final NaCl concentration in the medium was indicated in the parenthesis.

### (9) 새우젓갈 숙성에 따른 bacteria 상의 변화

새우젓갈 숙성에 따른 bacteria 군집 변화의 이해를 위하여 각 배지로부터 분리 동정된 bacteria의 다양성을 숙성기간에 따라 정리하였다(Table 3-13). 새우젓갈 담금 후, 숙성 1 일차에는 39종, 135일차에는 13종이 확인되었고, 각 시료로부터 3균주 미만이 분리된 bacteria는 1일차에 37%를 차지하였지만, 135일차에는 5%로 나타나 숙성이 진행되면서 bacteria의 다양성이 단순화되는 것으로 나타났다(Fig. 3-11).

*Brachybacterium*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Psychrobacter*, *Salimicrobium*, *Salinicoccus*, *Staphylococcus* 속은 숙성 과정 중에 꾸준히 검출되었고, 이중 *Staphylococcus*, *Salimicrobium* 속은 숙성 1일차에 각각 2%의 낮은 비중으로 검출되었지만, 숙성에 따라 계속적으로 증가하여 135일차에는 각각 39%, 36%의 높은 비중으로 검출되었다. 따라서 이들 두 속은 새우젓갈의 발효를 담당하는 우점종으로 추정된다. 본 연구에서 분리된 467 균주 중, 가장 많이 검출된 *St. equorum*은 117 균주가 분리되었다. *St. equorum*은 소시지, 발효 육류 및 치즈에서 분리되어 유럽에서 식품 발효의 종균으로 이용되고 있으며 [Hoppe-Seyler et al., 2004; Place et al., 2003; Talon et al., 2008], coagulase를 생산하지 않아 식품위해균 *Staphylococcus aureus*와 구분되는 coagulase-negative staphylococci

(CNS)로 분류되고, 이들에 대한 위해성은 보고된 바 없다.

*Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Leucobacter*, *Oceanobacillus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* 속의 유산균이 소수 분리되었지만, 대부분 숙성 초기에 검출이 되었고 큰 비중을 차지하지 않아 젓갈발효에 크게 관여하지 않는 것으로 추정된다.

Table 3-13. Numbers of isolates from *Saeu-jeotgal* during ripening summarized at the genus level.

Class	Genus	Storage time (day)								Total	
		1	5	10	15	25	35	65	135		
<i>γ-Proteobacteria</i>	<i>Acinetobacter</i>	1								1	
	<i>Idiomarina</i>		1							1	
	<i>Marinobacter</i>					1				1	
	<i>Psychrobacter</i>	7	6	5	6	7	1	1	5	38	
	<i>Serratia</i>	1								1	
	<i>Vibrio</i>	2								2	
<i>α-Proteobacteria</i>	<i>Methylobacterium</i>				1			1		2	
	<i>Paracoccus</i>		1							1	
Bacilli	<i>Aerococcus</i>		1	1	2	1				5	
	<i>Alkalibacillus</i>							1	1	2	
	<i>Bacillus</i>		1	1				1	1	4	
	<i>Carnobacterium</i>	1								1	
	<i>Enterococcus</i>		1							1	
	<i>Exiguobacterium</i>	2					2	1		5	
	<i>Jeotgalicoccus</i>		7	3	1	1			1	13	
	<i>Granulicatella</i>	1(1)		1(1)	2(2)	2(2)				6(6)	
	<i>Kurthia</i>	1								1	
	<i>Leuconostoc</i>						2			2	
	<i>Macrococcus</i>		2							2	
	<i>Oceanobacillus</i>		1		1			1	1	4	
	<i>Planococcus</i>	3	2	1	1					7	
	<i>Planomicrobium</i>	1								1	
	<i>Salimicrobium</i>	1	1		2	9	20	22	20	75	
	<i>Salinicoccus</i>	6	3	3	2	1	1		1	17	
	<i>Staphylococcus</i>	1	6	14	15	27	16	16	22	117	
	<i>Streptococcus</i>		1							1	
	<i>Vagococcus</i>	3	3	2	3					11	
	<i>Trichococcus</i>	1(1)	1(1)	1(1)		1(1)				4(4)	
	Actinobacteria	<i>Actinomyces</i>		1(1)	2(2)	1(1)					4(4)
		<i>Agrococcus</i>	2	1	2	2					7
		<i>Arthrobacter</i>	3	1							4
<i>Brachybacterium</i>		2	1	4	2	4	2		1	16	
<i>Brevibacterium</i>		1								1	
<i>Citricoccus</i>		1								1	
<i>Corynebacterium</i>		3	2	4			1	1		11	
<i>Dietzia</i>		1	3	1	1					6	
<i>Janibacter</i>			2							2	
<i>Kocuria</i>		3	5	8	8	4	11	16	3	58	
<i>Trueperella</i>		1(1)								1(1)	
<i>Kytococcus</i>			2	1	1		2			6	
<i>Leucobacter</i>		1(1)		1	2					3(1)	
<i>Microbacterium</i>		1	2	2	1	3	1	1		11	
<i>Micrococcus</i>		2								2	
<i>Ornithinimicrobium</i>					1					1	
<i>Rhodococcus</i>					1					1	
<i>Rothia</i>	1	1	3						5		
Total		54	59	60	56	61	59	62	56	467	

The numbers of likely new unidentified species are indicated in parentheses (with less than 97% 16S rDNA similarities to any known species).

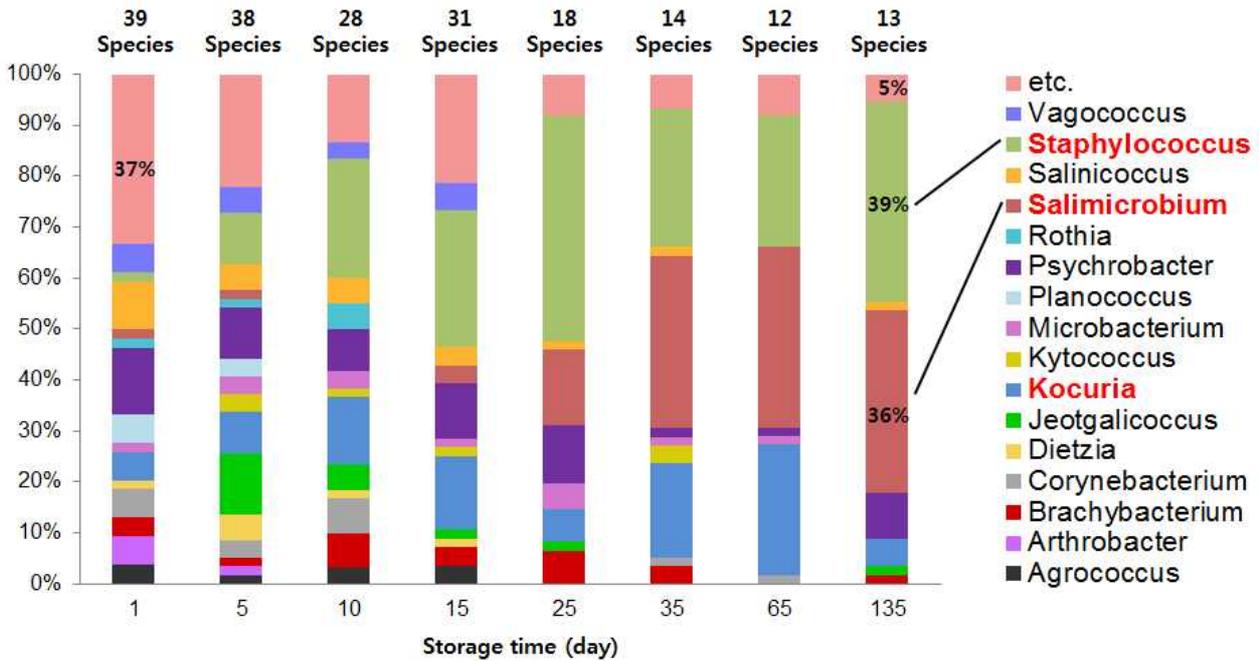


Fig. 3-11. Cultivable bacterial community migration during the ripening of *Saeu-jeotgal*.

#### (10) 분리균주의 NaCl 내성

분리 균주 중, 높은 빈도로 검출되었고, 숙성에 따라 그 비중이 증가하는 것으로 나타난 *St. equorum*, *Sm. salexigens* 그리고 *Ko. palustris*의 새우젓갈 숙성 중의 우점화에 대한 원인 규명 및 향후 새우젓갈의 종균으로써의 적용가능성을 검토하기 위하여 NaCl에 대한 내성을 측정하였다. 모든 균주들은 marine ager보다 nutrient agar에 NaCl을 첨가한 경우에 더 높은 생장을 보였으며, *St. equorum*, *Sm. salexigens*, *Ko. palustris*는 매우 느린 생장을 보였지만 각각 염농도 22%, 26%, 14%까지 생장하는 것을 확인하였다 (Fig. 3-12). 이러한 NaCl 20% 이상의 고염배지에서 *St. equorum*과 *Sm. salexigens*의 생장은 이들에 의한 새우젓갈의 발효 가능성에 대한 추가적 근거로 사료된다. 이들 균주의 생장을 고체배지에서 확인하기까지 15일 정도의 배양시간이 소요되는 점은 고염식품인 새우젓갈의 숙성에 오랜 시간이 걸리는 이유로 추정된다.

*St. equorum* 표준균주의 경우, NaCl 15% 이상의 환경에서는 생장이 나타나지 않았지만, 본 실험에서 분리한 균주들은 모두 높은 내염성을 보여, 같은 종으로 분류된 균주들 간에 내염성에 대한 차이가 큰 것으로 추정된다 (data not shown). *St. equorum*은 pH 5.1 이하의 산성 영역에서는 생장이 불가능하다고 보고된 바 있지만 (Place et al., 2003), 새우젓갈의 환경은 중성 pH가 계속적으로 유지되기 때문에 이들 균주가 생장하기에 좋은 조건을 제공한 것으로 사료된다. 본 실험을 통하여 새우젓갈 발효의 우점종으로 확인된 *St. equorum*과 *Sm. salexigens*는 국내에서 종균으로 사용된 바가 없어 향후 이들을 새우젓갈 발효의 종균으로 적용하고자 할 경우, 이들에 대한 안전성 평가가 요구된다.

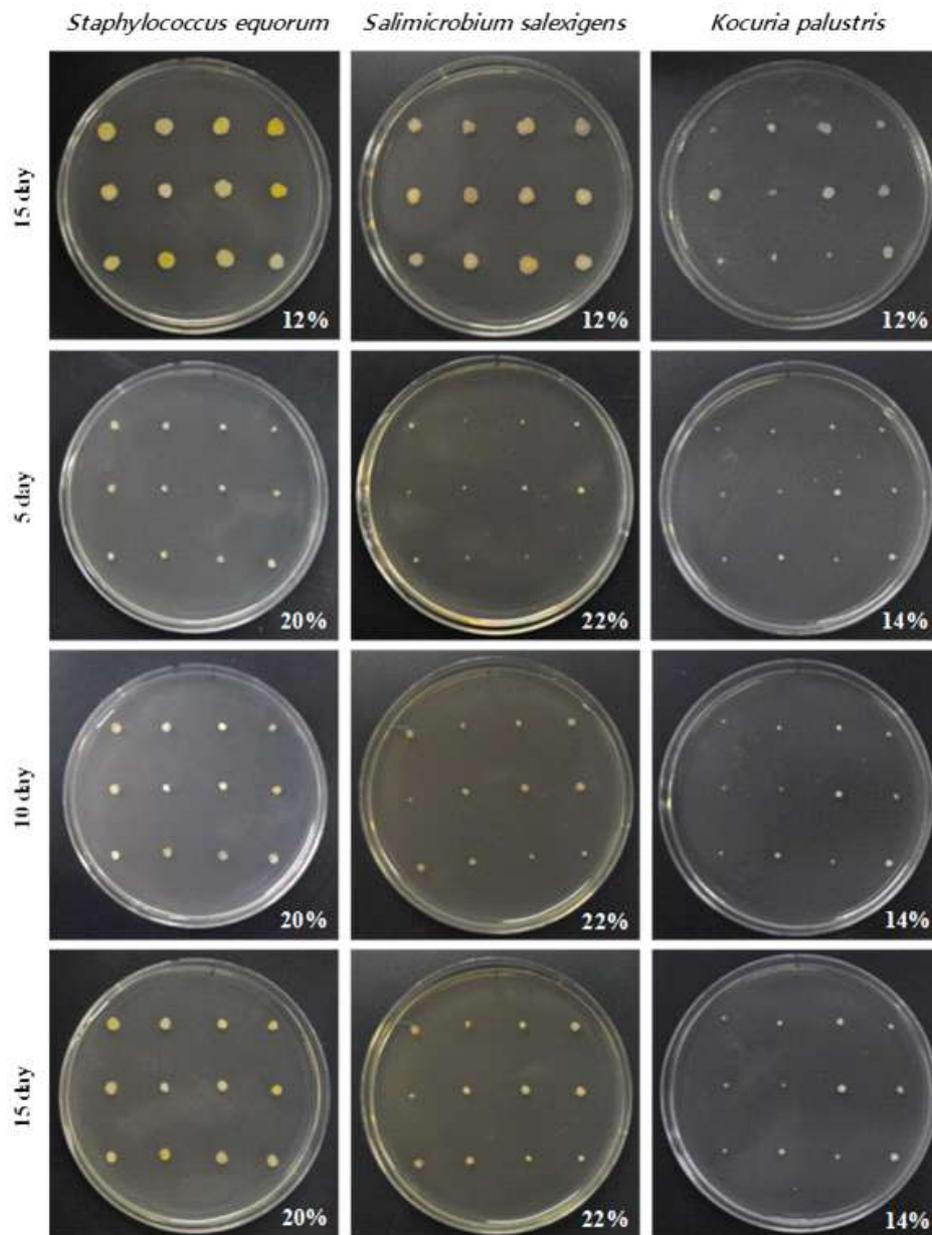


Fig. 3-12. Effect of NaCl on the growth of predominant species isolated from *Saeu-jeotgal*. Twelve strains in the species were cultured on the nutrient agar containing NaCl at 30°C for 15 days.

## 나. 젓갈 유래 bacteria의 고염 적응 평가

### (1) 고염에서 단백질 분해활성을 나타내는 균주들의 분리

본 연구에서는 멸치젓과 새우젓으로부터 분리한 총 610 균주의 계통발생학적 동정을 통해 두 젓갈에 존재하는 bacteria의 다양성을 평가하였다. 총 42속, 104종(species) bacteria의 존재가 밝혀졌고, 멸치젓에서는 *Bacillus* 근연 속이, 새우젓에서는 *Staphylococcus* 속이 우점하는 것으로 나타났다. 그러나 고농도의 단백질을 함유한 젓갈의 풍미 형성에 기여하기 위해서는 고염에서의 성장뿐만 아니라 단백질 분해활성이 요구된다. 따라서 종균으로써의 젓갈발효에서의 적용 가능성의 확인을 위하여 고염에서 단백질 분해활성을 나타내는 bacteria를 분리하여 고염에서의 적응평가를 수행하였다.

본 연구에서는 15% 이상의 NaCl 농도에서 단백질 분해활성을 나타내는 균주의 선발을 시도하였다. NaCl 15%와 skim milk 2%가 첨가된 nutrient agar와 marine agar에서 성장한 colony들 중, 멸치젓으로부터 총 30균주가 순수분리되었고, 그 중 3균주가 투명한을 형성하였다. 새우젓으로부터는 37균주가 분리되어, 1균주가 투명한을 형성하였다. 총 67균주의 동정 결과 12속, 18종의 bacteria가 분리된 것으로 나타났다 (Table 3-14).

배지에 따라 분리되는 bacteria의 종류에는 크게 차이가 나지 않았지만, NaCl 농도 15%에서 멸치젓과 새우젓으로부터 분리되는 bacteria의 종류는 차이가 있는 것으로 나타났다. 멸치젓으로부터는 *Bacillus* 속과 *Lentibacillus*, *Oceanobacillus*, *Virgibacillus* 속의 *Bacillus* 근연 속이 주로 분리되었다. 새우젓으로부터는 *Staphylococcus* 속이 주로 분리되었지만, *Salinicoccus*와 *Salimicrobium* 속도 다수 분리되었다. 계통발생학적으로 유산균으로 분류되는 *Tetragenococcus* 속 균주들은 멸치젓과 새우젓 모두로부터 분리되었고, 저염배지에서는 분리되지 않는 것으로 보아, 내염성 (halotolerant)이라기보다는 호염성 (halophilic) bacteria로 추정되고, 분리원에 관계없이 고염상태에서 널리 분포하는 것으로 추정된다.

멸치젓으로부터 *Virgibacillus halodenitrificans*는 총 6균주가 분리되었지만, 3균주만이 NaCl이 15% 첨가된 배지에서 단백질 분해활성을 나타내었다. 기존에 분리한 *Vb. halodenitrificans* 균주 KM2100의 경우, 12% NaCl이 첨가된 배지에서는 활성이 나타났지만, 15% 농도에서는 활성이 나타나지 않았다. 이러한 결과로 보아 단백질 분해활성을 나타내지 않은 3균주는 단백질 분해활성이 없는 균주 또는 아종 (subspecies)이라기보다는 15% 이하의 NaCl 농도에서 활성을 갖는 protease를 생성하거나 분비하는 균주로 추정된다. 따라서 *Vb. halodenitrificans*의 NaCl 농도에 따른 단백질 분해활성은 균주 특이적인 현상으로 해석된다. 단백질 분해활성을 나타낸 새우젓 유래 1균주는 *Halobacillus trueperi*로 동정되었다. *Hb. trueperi*의 검출빈도는 높지 않지만, *Virgibacillus*와 함께 같은 과 (family) *Bacillaceae*에 속한다는 점을 고려하면 젓갈발효와 관련성이 높은 종으로 추정된다.

각 배지로부터 분리되어 동정된 개체수가 고염에서의 우점종에 대한 결론을 내리기에

는 충분하지 않지만, 멸치젓에서는 *Virgibacillus* 속이 새우젓에서는 *Staphylococcus* 속이 우점하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 본 연구자들이 6종의 배지를 이용하여 bacteria를 분리한 연구와 일치하는 결과로, 고염에서 성장 가능한 bacteria가 젓갈발효의 우점종으로 추정된다.

Table 3-14. Numbers of the bacteria isolated from *Myeolchi-jeotgal* and *Saeu-jeotgal* using media containing 15% NaCl.

Genus	Species	<i>Myeolchi-jeotgal</i>		<i>Saeu-jeotgal</i>	
		Marine agar + 13% NaCl	Nutrient agar + 15% NaCl	Marine agar + 13% NaCl	Nutrient agar + 15% NaCl
<i>Bacillus</i>	<i>B. hwajinpoensis</i>	2	1		
<i>Halobacillus</i>	<i>Hb. trueperi</i>				1 (1)
<i>Kocuria</i>	<i>K. palustris</i>				1
<i>Lentibacillus</i>	<i>Lb. salicampi</i>	1	4		
<i>Nesterenkonia</i>	<i>N. halobia</i>				1
<i>Oceanobacillus</i>	<i>Ob. picturae</i>		3		
<i>Pontibacillus</i>	<i>Pb. chungwhensis</i>				1
<i>Salimicrobium</i>	<i>Sm. flavidum</i>			4	
<i>Salinicoccus</i>	<i>Sc. roseus</i>				4
	<i>Sc. salsiraiiae</i>			3	2
	<i>Sc. siamensis</i>			1	
<i>Staphylococcus</i>	<i>St. caprae</i>				1
	<i>St. equorum</i>			7	8
	<i>St. saprophyticus</i>				1
<i>Tetragenococcus</i>	<i>T. halophilus</i>	1		1	1
	<i>T. muriaticus</i>	5	2		
<i>Virgibacillus</i>	<i>Vb. halodenitrificans</i>	1	6 (3)		
	<i>Vb. necropolis</i>		4		
	Total	10	20 (3)	16	21 (1)

NaCl was added to each medium to become 15% (w/v) final concentration. Each medium was supplemented with 2% skim milk for protease activity confirmation. The numbers of proteolytic bacteria among the identified isolates are indicated in parenthesis.

## (2) 고염 조건에서의 생육

고염 조건에서 선발된 균주들의 젓갈 숙성과정에서의 변화 예측 및 종균으로써의 적용 가능성을 검토하기 위하여 높은 빈도로 선발된 균주들을 대상으로 25% NaCl이 함유된 액체배지에서의 생육을 50일간 모니터링하였다. 3% NaCl이 첨가된 nutrient medium에서 전배양한 균주들을 15% NaCl이 첨가된 nutrient medium에 접종하여 적응시킨 다음, NaCl이 25% 첨가된 본배양 배지에 1% (v/v) 접종한 후, 30°C에서 정치배양과 교반배양을 통하여 50일간 배양하면서 생균수의 변화를 측정하였다. 시료의 채취는 20일까지는 5일 간격으로 수행하였고, 그 후에는 10일 간격으로 수행하였다. 채취한 배양액은 적당한 농도로 희석하여 NaCl을 3% 첨가한 nutrient agar에 도말하고, 30°C 미호기적 조건에서 48시간 배양하여 배지에 형성된 colony를 계수하여 생육곡선을 작성하였다.

멸치젓의 경우 단백질 분해활성을 보유한 *Vb. halodenitrificans*와 본 실험에서의 검출 빈도를 고려하여 *Tetragenococcus muriaticus*, *Lentibacillus salicampi*, *Oceanobacillus*

*picturae*를 대상으로 하였고 (Fig. 3-13), 새우젓으로부터는 단백질 분해활성을 보유한 *Hb. trueperi*와 검출빈도가 높은 *St. equorum*, *Salinicoccus salsiraiiae*, *Salimicrobium flavidum*을 대상으로 하였다 (Fig. 3-14).

멸치젓 유래의 4균주 중, *Vb. halodenitrificans*는 접종 후, 약 10배가 증가하여 배양 10일 이후로 일정한 수준을 유지하였지만, 나머지 3균주는 배양 20일까지 서서히 감소하다가 일정 수준을 유지하였다. 배양 30일 이후의 *Vb. halodenitrificans*와 3균주와의 개체 수는 약 100배 정도의 차이가 있는 것으로 나타났다. 새우젓 유래의 균주들 중, *St. equorum*과 *Sm. flavidum*은 NaCl이 25% 첨가된 배지에서 활발히 증식하지는 않지만 초기의 균수를 유지하는 것으로 나타났고, *Sc. salsiraiiae*는 배양 10일까지 감소하다가 개체수를 유지하는 것으로 나타났다. 한편 NaCl 농도 15%에서 단백질 분해활성을 나타내는 *Hb. trueperi*는 초기에 증식하다가 급격히 감소하여 일정 수준을 유지하는 것으로 나타났다.

NaCl 농도 15% 고체배지에서 분리된 이들 8종 bacteria를 NaCl이 15% 첨가된 액체배지에서 5일간 전배양하여 NaCl이 25% 함유된 액체배지에 1% (v/v) 접종한 후, 측정된 0일 차의 생균수는  $10^3$ 에서  $10^4$  CFU/mL 정도로 계수되어 15% NaCl 농도에서의 증식이 활발하지 않은 것으로 나타났고, 25% NaCl 농도에서는 완전히 사멸하지는 않지만, 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 한편, 단백질 분해활성을 보유한 *Vb. halodenitrificans*와 *Hb. trueperi*는 생육이 가능한 것으로 나타났고, 증식이 정지하거나 감소하는 시점이 배양 10일 경이라는 점을 고려하면 이들 균주들의 고염에서의 생장은 단백질 분해활성과 관련이 있는 것으로 추정된다.

8종 bacteria의 생장이 교반배양과 정지배양 간의 차이가 나타나지 않는 것으로 나타났다. 8종 bacteria의 표준균주를 대상으로 산소 요구를 조사해 본 결과, 4종 (*Hb. trueperi*, *Lb. salicampi*, *Sm. flavidum*, *St. equorum*)은 호기성균으로 나머지 4종 (*Ob. picturae*, *Sc. salsiraiiae*, *T. muriaticus*, *Vb. halodenitrificans*)은 편성혐기성균으로 보고되어 산소 공급에 따른 생장의 차이가 예상되지만, 배양법에 따른 생육의 차이가 없는 것으로 보아 고염환경에서의 이들 bacteria의 생장은 산소에 의한 영향이 크지 않은 것으로는 추정된다.

고염배지에서 다수가 검출된 *Vb. halodenitrificans*와 *St. equorum*의 젓갈 숙성 중의 역할은 규명되지 않았지만, 고염에서 생장이 가능하고 가장 높은 내염성을 나타내었기 때문에 멸치젓과 새우젓의 우점종으로 자리잡은 것으로 추정된다. 한편 *Hb. trueperi*의 경우, 고염에서 단백질 분해활성을 나타내지만 내염성이 높지 않아 우점종으로 발전하지 못하는 것으로 추정된다. *Vb. halodenitrificans*와 *St. equorum*는 25% NaCl 농도에서 사멸하지 않는 내염성을 가지고 있는 것으로 규명되었기 때문에 젓갈발효의 종균으로 적용될 높은 가능성을 가지고 있으며, 향후 이들의 젓갈 숙성과정 중의 역할 규명이 필요하다.

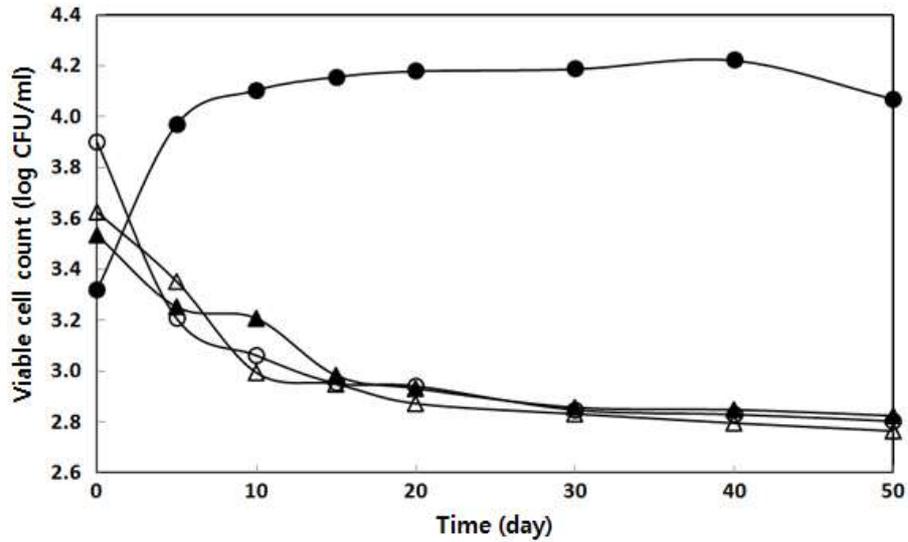


Fig. 3-13. Growth of the bacteria isolated from *Myeolchi-jeotgal* in high-salt (25% NaCl) environment.

Isolates: *Virgibacillus halodenitrificans* (●), *Tetragenococcus muriaticus* (○), *Oceanobacillus picturae* (▲), *Lentibacillus salicampi* (△).

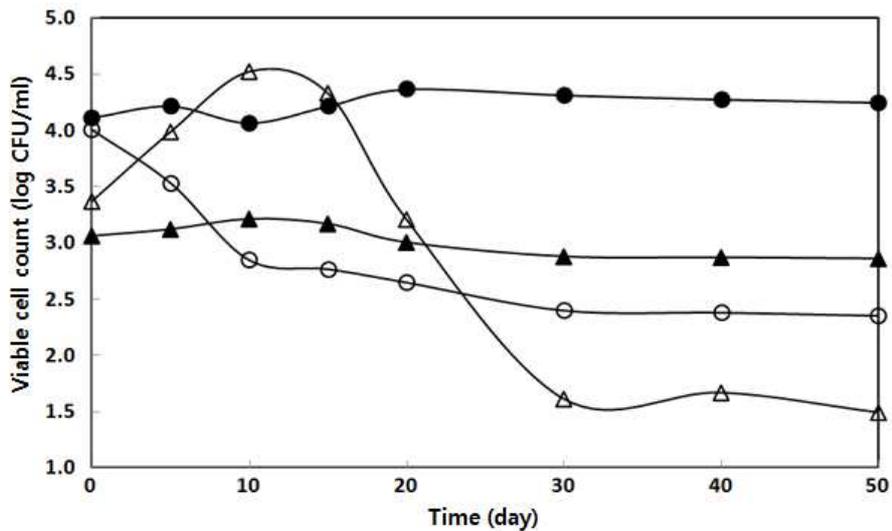


Fig. 3-14. Growth of the bacteria isolated from *Saeu-jeotgal* in high-salt (25% NaCl) environment. Isolates: *Staphylococcus equorum* (●), *Salinicoccus salsiraiae* (○), *Salimicrobium flavidum* (▲), *Halobacillus trueperi* (△).

#### 다. 고염젓갈 숙성발효용 미생물 첨가제를 첨가한 고염젓갈의 발효 단계별 미생물 군집 분석을 통한 발효속도 향상효과 분석

새우젓갈의 품질 및 발효특성을 비교하기 위해 화학적(pH, 아미노산성 질소, 휘발성 염기질소), 미생물학적(일반세균) 특성을 분석하여 확인하였다. 젓갈의 분리균을 새우젓갈에 접종하여 숙성 중 품질 특성을 확인하기 위하여 새우젓 (육젓)을 대량으로 구입 (신안수협

송도 어판장, 전남 신안)하여 3종류의 분리균 (KS2, 8, 10)을 무처리균 대비  $10^3$  (1,000배)으로 접종하고 15°C에 저장하면서 주기적으로 (1주-4주 간격) 시료를 채취하여 화학적, 미생물학적 품질 특성을 확인하였다.

### (1) 미생물 첨가에 따른 고염젓갈(새우젓)의 화학적 특성 변화

pH는 시료에 pH electrode를 직접 넣어 3회 반복 측정하였다. 아미노산성 질소는 formol 적정법으로 수행하였다. 분쇄된 시료 2 g을 취해 100 ml로 정용하여 여과한 후 여과액을 시험용액으로 하였다. 시험용액 20 ml에 중성 포르말린 용액 20 ml를 가하여 혼합한 후 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3이 될 때까지 적정하였다. 별도로 증류수에 대한 바탕 시험을 실시하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{아미노산성질소}(mg\%) = \frac{(A-B) \times 1.4 \times f \times D}{S} \times 100$$

여기에서 A : 본 시험에 소비된 0.1N NaOH 용액의 ml 수, B : 바탕시험에 소비된 0.1N NaOH 용액의 ml 수, f : 0.1N NaOH 용액의 역가, D : 희석배수, S : 시료채취량(g)이다.

젓갈의 휘발성 염기질소(VBN) 함량은 conway unit (확산기)를 이용한 미량확산법에 따라 측정하였다. 시료 1 g을 정밀히 달아 비커에 담고 이에 증류수 50 ml를 넣고 잘 저어 섞어 30분간 침출하고 여과하여, 여과액을 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 약산성으로 중화시킨 후 증류수를 넣어 일정량(100 ml)으로 하여 시험용액으로 사용하였다. 시험용액 1 ml, 탄산칼륨 포화용액 1 ml를 확산기의 외실에 넣고, 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액 1 ml를 확산기의 내실에 넣은 후 뚜껑을 덮고 25°C에서 1시간 정치하였다. 덮개를 열고 내실의 황산용액에 Brunswik시액 한 방울을 넣고 마이크로뷰렛을 사용하여 0.01 N NaOH용액으로 적정하였다. 별도로 증류수에 대한 바탕시험을 실시하여 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{휘발성염기질소}(mg\%) = \frac{(B-A) \times 0.14 \times f \times D}{S} \times 100$$

여기에서 A : 본 시험에 소비된 0.01N NaOH 용액의 ml 수, B : 바탕시험에 소비된 0.1N NaOH 용액의 ml 수, f : 0.1N NaOH 용액의 역가, D : 희석배수, S : 시료채취량(g)이다.

미생물 첨가에 따른 새우젓의 발효속도 향상 효과를 분석하고자 pH, 아미노산성 질소, 휘발성 염기질소 등의 화학적 특성 변화를 분석하였으며, 그 결과는 Table 3-15와 같다. 초기 pH는 6.68~6.88로 대조군과 미생물 첨가군간의 차이를 보이지 않았으며, 저장기간에 따른 pH 변화를 살펴본 결과, 저장 28일차에 6.60~6.78로 실험군간의 차이를 보이지 않고 초기 pH와도 큰 차이를 보이지 않고 유지되는 경향을 보였다.

젓갈 중의 아미노산성 질소 함량은 젓갈의 발효가 진행됨에 따라 증가하게 되는데, 이는 숙성도(단백질 분해)의 지표로 사용될 뿐만 아니라 향미와 깊은 관련이 있기 때문에 중요한 품질 지표로 인식되고 있다. 미생물 첨가에 따른 새우젓의 아미노산성 질소 함량을 살펴본 결과, 제조한 당일에 525.0~577.5 mg%로 나타났으며, 저장기간이 증가함에 따라 각 실험군 별로 증가하는 경향을 보였으며, 저장 28일째에는 대조군 (735.0 mg%)에 비

해 8 균주 (752.5 mg%)와 KS2 균주 (770.0 mg%)를 첨가한 군에서 높게 나타나는 경향을 보여 두 균주가 새우젓을 발효속도 증가에 영향을 주는 것으로 사료된다.

젓갈의 특유한 냄새는 대부분 어육 단백질이나 지질이 발효되면서 분해된 저급 화합물 중 휘발성 성분에 기인되는 것으로 사료되며, 이를 휘발성 염기 질소 (VBN, volatile base nitrogen)로 측정을 통해 살펴보았다. 제조한 당일에는 10.64~12.39 mg% 범위에서 유사하게 나타났으며, 저장기간 따라 10 균주를 첨가한 군에서는 유지되는 경향을 보였으며, 나머지 실험군에서는 감소하는 경향을 보였다. 저장 28일째에는 대조군 (7.21 mg%)에 비해 미생물 첨가제를 처리한 군 (KS2; 9.03 mg%, 8; 10.43 mg%, 10; 10.01 mg%)의 휘발성 염기질소가 높게 나타났다. 아미노산성 질소, 휘발성 염기질소 함량 측정을 통해 미생물 첨가제를 사용함에 따라, 특히, KS2와 8 균주를 첨가한 군에서 발효가 대조군에 비해 빠르게 진행되고 있음을 유추할 수 있다.

Table 3-15. 저장기간에 따른 새우젓의 화학적 특성 변화

저장 기간 (일)	pH				아미노산성 질소 (mg%)				휘발성 염기질소 (mg%)			
	대조군	KS2	8	10	대조군	KS2	8	10	대조군	KS2	8	10
0	6.68	6.68	6.88	6.82	525.0	577.5	542.5	542.5	11.56	11.69	12.39	10.64
7	6.76	6.83	6.71	6.70	612.5	560.0	595.0	612.5	11.62	10.57	10.57	10.64
14	6.75	6.66	6.76	6.70	717.5	647.5	630.0	700.0	11.2	10.57	10.08	9.87
21	6.70	6.71	6.62	6.75	717.5	770.0	735.0	735.0	7.56	8.47	10.85	12.81
28	6.60	6.69	6.68	6.78	735.0	770.0	752.5	717.5	7.21	9.03	10.43	10.01

Mean±SD (n=3).

## (2) 장기저장 중 젓갈의 미생물학적 특성 변화

일반세균수의 경우, 계수용 film(Aerobic Count plate, 3M Microbiology Products)에 단계별로 희석한 시료를 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하여 계수하였다. 시료의 세균의 생육증식을 확인하기 위해 5% NaCl를 첨가한 영양배지(Nutrient agar, BD Difco)에 단계별로 희석한 시료를 접종한 다음 spreading culture method로 30℃에서 48시간 배양 후 계수하였다.

고염젓갈(새우젓)의 속성발효용 미생물 첨가제 개발을 위하여 선발된 균주를 새우젓에 첨가한 후, NaCl이 첨가되지 않은 계수용 필름과 5% NaCl이 첨가된 Nutrient agar를 통해 미생물학적 특성 변화를 살펴보았다 (Table 3-16). 5% NaCl이 첨가된 Nutrient agar의 균수가 계수용 film 배지에 비해 10배 정도 균수가 적게 나타났으나, 실험군 간의 경향은 동일하게 나타났다. 제조한 당일에는 미생물 첨가제를 첨가한 군에서 대조군에 비해 1,000배의 균수가 높게 측정되어 첨가한 균주가 본 실험을 통해 첨가하고자 한 농도에 맞게 첨가되었음을 확인할 수 있었으며, 저장기간이 지남에 따라서는 대조군에 비해 미생물 첨가제를 첨가한 군의 균수가 100배 정도 높게 측정되어 일부의 균이 사멸되었으나, 저장기간이 지속됨에 따라서는도 균이 일정하게 유지되어 생존하고 있음을 확인할 수

있었다.

Table 3-16. 저장기간에 따른 새우젓의 미생물학적 특성 변화

(단위 : CFU/g)

저장 기간 (일)	일반 세균		Nutrient agar (5% NaCl)	
	대조군	KS2	대조군	KS2
0	$2.1 \times 10^4$	$1.4 \times 10^7$	$3.0 \times 10^3$	$1.3 \times 10^6$
7	$1.6 \times 10^4$	$7.0 \times 10^6$	$1.4 \times 10^3$	$7.5 \times 10^5$
14	$1.7 \times 10^4$	$3.9 \times 10^6$	$1.6 \times 10^3$	$3.0 \times 10^5$
21	$1.6 \times 10^4$	$3.5 \times 10^6$	$3.5 \times 10^3$	$1.6 \times 10^5$
28	$2.0 \times 10^4$	$3.1 \times 10^6$	$2.5 \times 10^3$	$1.0 \times 10^5$

#### 라. 저염 양념젓갈용 미생물 첨가제를 통한 위해 미생물 제어 효과 분석

##### (1) 장기저장 중 오징어젓갈의 미생물학적 특성 변화

오징어젓갈의 안전성 확보 및 품질 균일화를 목적으로 선발된 종균 후보 3종 (*Bacillus tequilensis* 503, *Bacillus tequilensis* 504, *Bacillus pumilus*)과 황색포도상구균을 접종하여 저장기간 동안 위해미생물의 생육저해활성을 측정하였다. 시료는 15℃의 저온냉장고에 저장하면서 0일, 3일, 5일 간격으로 시료를 채취하여 미생물학적 특성을 분석하여 확인하였다. 또한 앞서 규명된 항균활성 우수균주 *Lc. lactis*를 저염오징어젓갈에 접종하여 저장기간별로 위해미생물의 생육저해활성을 측정하였다. *Lc. lactis*의 배양액 첨가균은 시료의 5% 수준으로 첨가 하였다 (Table 3-17).

황색포도상구균은 계수용 전용 film (Staphylococcus aureus plate, 3M Microbiology Products)에 단계별로 희석한 시료를 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하여 계수하였다. 황색포도상구균을 정량시험법을 통해 확인한 결과, 선발한 위생지표 미생물 저해효능이 있는 *Bacillus* 후보 3종에서는 황색포도상구균을 감소시키는 경향을 보이지 않았다. 다만, *Lc. lactis* 배양액을 첨가한 군에서 황색포도상구균의 감소경향이 나타나 초기 위해미생물 제어에 어느 정도 효과가 있는 것으로 나타났다.

Table 3-17. 저장기간에 따른 저염오징어 젓갈의 미생물학적 특성 변화

시료	0일	3일	5일
Control	ND	ND	ND
<i>Staphylococcus aureus</i>	$2.58 \times 10^6$	$1.89 \times 10^6$	$1.6 \times 10^6$
<i>S. aureus</i> <i>Lc. lactis</i>	$2.50 \times 10^6$	$2.25 \times 10^6$	$1.1 \times 10^6$
<i>S. aureus</i> <i>Lc. lactis</i> 배양액	$1.13 \times 10^6$	$3.7 \times 10^4$	$2.4 \times 10^4$

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 목표달성도

- 1세부 -

연구개발의 목표	연구개발의 결과	달성도
항균활성 우수 균주의 선발	<ul style="list-style-type: none"> <li>발효 후기단계의 김치에서 분리한 균주 중 배양액의 pH가 낮은 균주들인 <i>Lb. plantarum</i>, <i>P. pentosaceus</i>, <i>Lb. sakei</i>을 김치 산패 지시균으로 선정하였음</li> <li>이들 균주에 대한 생육억제능이 우수한 <i>Lc. lactis</i> WK11, <i>Lb. brevis</i> WK12를 항균활성 우수 균주로 선발하였음</li> </ul>	100%
초기 접종균수에 따른 미생물 첨가제 첨가량 설정	<ul style="list-style-type: none"> <li>초기 종균 접종량을 달리하여 접종한 결과 <math>1 \times 10^7</math> CFU/g으로 접종한 김치에서 품질유지기한 연장 효과가 있었음</li> <li>종균 첨가시기에 따른 차이를 알아본 결과, 김치를 담글 때 양념에 종균과 배양액을 첨가한 김치가 가장 효과적이었음</li> </ul>	100%
<i>Lactococcus lactis</i> 를 이용한 품질유지기한 연장기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>Lc. lactis</i> <math>1 \times 10^7</math> CFU/g와 김치 중량 10% <i>Lc. lactis</i> 배양액 첨가하여 처리한 김치균들이 대조군에 비해 적숙기가 2배 이상 연장되었음</li> <li>양념을 65°C에서 30분 열처리하거나 젖산을 첨가시 또는 병행할 경우, 연장 효과가 조금 향상되었음</li> </ul>	100%
미생물 첨가제 제형별에 따른 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bead 형태로 제조한 미생물첨가제도 생균을 배양하여 첨가했을 때와 유사한 경향을 나타내었음</li> <li><i>Lc. lactis</i> 제제화에 의한 품질유지기한 연장 김치 제조의 가능성을 확인하였음</li> </ul>	100%
미생물 첨가제를 이용한 저염김치 대장균군 제어 기술개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>종균 첨가 저염김치의 대장균군 군수 변화를 살펴본 결과, 김치 발효가 진행됨에 따라 대조군보다 우수한 제어 효과를 보였음</li> </ul>	100%

계절별 원·부재료 미생물 분포 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>고춧가루를 제외한 원료의 미생물 분포는 원재료의 원산지, 계절에 따른 차이를 보였음</li> </ul>	100%
처리방법에 따른 원부재료 초기균수 저감화 조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>시판용 소독수와 저온살균 처리에 따른 초기 균수 저감 효과를 확인하였음</li> <li>시판용 소독수의 경우 시간의존적인 경향을 보였으며, 저온살균의 경우 양념에 65°C 에서 30분간 처리시 저감효과를 보였음</li> </ul>	100%

- 2세부 -

연구개발의 목표	연구개발의 결과	달성도
자체 선발 균주, 한국식품연구원 유전자은행 균주, 기탁 균주 등 다양한 전통식품 유래 미생물 자원 확보	<ul style="list-style-type: none"> <li>현재 유통되고 있는 김치를 지역별·종류별로 수거하여 숙성되어진 김치에서 미생물자원을 확보 (120종)</li> <li>김치의 맛에 영향을 주는 mannitol을 많이 생성하는 균주를 선발</li> </ul>	100%
활성도 및 생존율이 높은 미생물 보존 기술 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>김치 재료 중 냉동살균 후 종균의 전달 제제로서 가능한 소재를 선발</li> <li>김치선발균주를 접종하여 보존율 확인</li> </ul>	100%
미생물 첨가제 제제화를 위한 배지 조성 개발 (식용, 저가형)	<ul style="list-style-type: none"> <li>절임배추 착즙액을 기본배지 성분으로 활용하여 탄소원, 질소원, 미량성분을 조절</li> <li>Box-Behnken experimental design을 통하여 질소원들을 스크리닝하여 반응표면실험법을 실시함</li> <li>미량성분들의 결핍이 유산균의 성장에 미치는 정도를 측정하여 필수 성분을 선발 함</li> </ul>	100%
미생물 첨가제 제형별에 따른 효과 분석	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bead 형태로 제조한 미생물첨가제도 생균을 배양하여 첨가했을 때와 유사한 경향을 나타내었음</li> <li><i>Lc. lactis</i> 제제화에 의한 품질유지기한 연장 김치 제조의 가능성을 확인하였음</li> </ul>	100%

배양균주 최적 harvesting time 결정	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 김치선발균주를 다른 종류별 배지에 접종하여 성장곡선을 그려 최적의 배양시간을 결정함</li> </ul>	100%
미생물 첨가제의 제제기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 김치 미생물 생존율이 보장된 단기형(액상형, 냉동형) 및 장기형(건조형) 제제기술 개발</li> <li>• 미생물 첨가제 제형별 저장기간에 따른 생존율 검정</li> </ul>	100%
미생물활성 및 생존율향상을 위한 보호제 선정	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품첨가등급의 소재를 사용하여 첨가제의 생존율을 높일 수 있는 동결보호제 선발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 콩가루 및 효모추출물을 동결건조보호제로 선발하여 생존율 극대화_콩가루 처리구 96%</li> <li>- 마늘 및 알지네이트 비드 조합에 따른 동결보호 상승효과 구명</li> </ul> </li> <li>• 보호제 종류 및 조합에 따른 유산균 생존율 검정</li> </ul>	100%
미생물 첨가제 제형에 따른 포장 형태 및 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 현장 편의형 포장형태 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 액상형 및 반죽형 제제: 튜브형 포장</li> <li>· 건조형 제제: 스틱형 포장</li> </ul> </li> <li>• 미생물 제형별 포장형태별 저장기간에 따른 유산균의 생존율 조사</li> </ul>	100%
미생물 첨가제 대량 배양기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품첨가 등급의 주요 영양원 탐색_실험균주의 균체량 생성에 유리한 주요 영양원으로 포도당 및 효모추출물 선정_MRS 배지 대비 경제성 확보</li> <li>• 배양 중 산도와 미생물 생육특성에 관한 상관관계 구명</li> </ul>	100%
맞춤형 미생물 첨가제 제조를 위한 기본 매뉴얼 제작	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 액상형, 냉동형, 분말형 제형에 따른 현장 편의형 맞춤형 미생물 첨가제 별 종균 첨가 매뉴얼 작성완료</li> </ul>	100%
모의 유통조건을 통한 미생물 첨가제 활성 유지 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 모의 유통온도 조건별 저장기간 별로 미생물 첨가제의 생존율 조사 완료</li> <li>- 최적 활성 유지 온도는 -18℃에서 생존율이 가장 우수함</li> </ul>	100%

<p>온라인과 오프라인을 통한 보급시스템 구축 및 분양관리 매뉴얼 작성</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 온라인 가상 홈페이지를 통한 보급시스템 구축 마련</li> <li>• 미생물 첨가제 분양 시 관리 매뉴얼 작성 완료</li> </ul>	<p>100%</p>
<p>미생물 첨가제 관리지침안 마련 및 미생물 첨가제 품질 인증제도 마련</p> <p>- 제품효능검증 등</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 제조된 미생물 첨가제를 이용하여 실제 김치 제조 시 제품의 생존율 재현성 조사에 따른 효능 검증</li> </ul>	<p>100%</p>

- 협동 -

연구개발의 목표	연구개발의 결과	달성도
<p>고염젓갈(멸치젓, 새우젓) 및 저염젓갈(오징어젓)용 우수 미생물 선발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고염젓갈(멸치젓, 새우젓) 미생물 균집 분석을 통한 우점종 도출 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 멸치젓갈의 우점종 <i>Virgibacillus halodenitrificans</i>를 포함하는 내염성 <i>Bacillus</i> 근연종</li> <li>- 새우젓갈의 우점종 <i>Staphylococcus equorum</i>을 포함하는 coagulase-negative staphylococci</li> </ul> </li> <li>• 저염 양념젓갈(오징어젓갈) 미생물 균집 분석을 통한 우점종 도출 및 위생지표 미생물 및 식중독균 생육저해활성 보유 우수 균주 선발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 오징어젓갈의 우점종 <i>Bacillus</i> 속 균주들로부터 6% NaCl 농도에서 황색포도당구균 및 장염비브리오균의 생육저해가 가능한 오징어젓갈 발효용 종균 후보 6균주 확보</li> </ul> </li> </ul>	<p>100%</p>

<p>선발된 우수 균주의 안전성 평가 및 미생물 첨가제 개발</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 젓갈 발효의 우점종 <i>Staphylococcus equorum</i>의 안전성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 안전성 평가: 항생물질 내성 평가, 혈청분해(hemolysis) 확인, 혈청분해 관련 유전자 존재 확인, biofilm 형성 확인, enterotoxin 생성 유전자 존재 확인</li> <li>- 기능성 평가: protease, lipase, nitrate reductase, 내염성</li> <li>- 안전성과 기능성이 확보되고, 20% 이상의 NaCl 농도에서 생육이 가능한 젓갈발효용 종균 후보 <i>S. equorum</i> 5 균주 확보(C4X11, C6037, KS1035, KS1039, KS2036)</li> </ul> </li> <li>• 미생물 첨가제의 첨가법 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 새우를 이용한 종균 첨가용 배지 개발</li> </ul> </li> </ul>	<p>100%</p>
<p>젓갈용 미생물 첨가제에 의한 효과 분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 새우젓갈 숙성에 따른 bacteria 군집 천이 모니터링 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 135일간의 새우젓갈 숙성과정 중의 bacteria 군집 천이 분석을 통하여 종균 후보 균주 <i>S. equorum</i>의 숙성과정 중에서의 우점화 규명을 통한 젓갈용 종균으로의 유효성 검증</li> </ul> </li> <li>• 젓갈 유래 bacteria의 고염 적응 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 25% NaCl이 첨가된 액체배지에서의 종균 후보균주들이 증식을 확인하여 젓갈발효용 종균으로써의 효용성 규명</li> </ul> </li> </ul>	<p>90%</p>

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

- 미생물 첨가에 의한 김치의 품질 특성변화에 대한 과학적 기초자료를 마련하였음
- 김치 종균을 활용한 김치품질유지기한 연장 및 대장균군 저감 실험을 통해 저장성 및 위생성이 향상된 김치제조를 위한 기반을 마련하였음
- 유용 종균의 자원화 : 미생물 자원 확보 및 종균 이용기술 개발로 향후 관련 연구를 추가적으로 수행하거나 타 연구사업에 관련 정보를 제공하여 발효식품산업에 필요한 원천 기술 제공
- 미생물 제어를 통한 발효속도 조절 및 위생학적 안전성 향상으로 인한 젓갈의 품질 향상
- 본 연구를 통하여 구축된 젓갈발효 관련 미생물 다양성 평가법 및 특이적 검출법은 다양한 미생물의 영향을 받는 식품 및 농산물의 안전 확보 및 전통식품의 새로운 해석에 기여할 것으로 예상됨
- 종균의 제제 산업으로 응용
  - 미생물 자원의 특허 및 산업 재산권 확보로 경제적 활용성 증대
  - 타 산업으로 응용함으로써 고부가 신소재 자원으로 활용
  - 본 연구에서 도출된 종균후보의 안전성 평가법을 국내 미생물 첨가제의 안전성 평가를 위한 가이드라인 개발의 기초자료로 활용
- 수출 증대 및 세계화
  - 발효식품 미생물의 체계적 연구로 종균의 수출 및 제조 방식 표준화를 통한 전통 발효식품의 수출 증대 및 세계화에 기여
- 본 연구에서 도출된 우수균주는 김치, 젓갈의 품질 표준화 및 위생학적 안전성을 달성에 기여
- 미생물 첨가제를 이용한 품질의 표준화는 품질 평가시스템의 개발로 연결되어 김치, 젓갈의 상품성 향상을 통한 매출증대에 기여 가능
- 속성발효에 의한 생산기간 단축은 젓갈 생산비용의 감소로 연결되어 젓갈산업의 활성화에 기여 가능
- 속성발효법 및 종균 사용이 검증되면 품질 표준화가 가속적으로 실현될 수 있고, 이는 중소기업의 비위생적 제조로부터 탈피하여 HACCP 제도의 원활한 정착과 저변확대에 기여 가능

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

○ 연구개발 성과

- 특허 -

구분	출원일/ 등록일	출원번호	발명의 명칭	발명자	국내외 여부
출원	2013.07.25.	10-2013-0087969	마늘 파쇄물 및 유산균이 포집되어 있는 알지네이트 비드를 포함하는, 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법	박해웅, 김태운 이종희, 최학중, 박성희, 장자영, 곽현정, 이나라	국내
출원	2013.07.25.	10-2013-0087981	동결보호제로서 참쌀풀을 이용하는 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법	박해웅, 김태운 이종희, 최학중, 박성희, 장자영, 곽현정	국내
출원	2013.07.25.	10-2013-0087978	동결보호제로서 콩가루를 이용하는 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법	박해웅, 김태운 이종희, 최학중, 박성희, 장자영, 곽현정	국내
출원	2013.07.25.	10-2013-0087974	폐절임배추를 이용한 미생물 배양용 식용 배지의 생산 방법	박성희, 김태운 이종희, 최학중 박해웅, 김현주 장자영, 강미란	국내
출원	2014.10.23	10-2014-0143924	내염성 및 단백질 분해활성을 갖는 균주 및 이의 용도	장자영, 김태운 이종희, 최학중, 박해웅, 이모은	국내

구분	발표일	논문명	발표자	학술대회명	국내외 여부
비SCI	2011. 09.28	고염에서 성장하는 젓갈 유래 Bacteria의 분리 및 고염에서의 생육 특성	안두현, 이종훈	한국미생물생명공학회지 39(3)	국내
비SCI	2011. 12.28	<i>Lactobacillus sakei</i> 생육저해활성 보유 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 가 생산하는 Bacteriocin의 특성	이광희, 이종훈	한국미생물생명공학회지 39(4)	국내
비SCI	2013. 12.28	오징어젓갈 Bacteria 군집분석 및 식중독균 생육저해 Bacillus 균주 선발	김혜림, 한설화, 정도원, 이종훈 이빛나라	한국미생물생명공학회지 41(4)	국내
비SCI	2014	유산균 생존율 향상을 위한 식품첨가물 등급의 동결보호제 탐색	곽현정, 이나라 김태운, 이종희 최학중, 장자영 박해웅	한국식품과학회지 46(5)	국내
비SCI	2014	김치의 저장성 향상을 위한 항균활성 우수 유산균 선발	최학중, 김유진 김태운, 이종희 박해웅, 장자영 김태운 장자영	한국식품영양과학회지 43(2)	국내
SCIE	2015 예정	Starter cultures for kimchi fermentation	이모은, 최학중 이종희, 박해웅 김태운 장자영	J. Microbiol. Biotechnol.	국내
SCIE	2015 예정	Extending the shelf life of kimchi with <i>Lactococcus lactis</i> strain as a starter culture	이모은, 최학중 이종희, 박해웅 김태운	Food Sci. Biotechnol.	국내

- 학술발표 -

구분	발표일	논문명	발표자	학술대회명	국내외 여부
포스터	2012.06.27.	Isolation of antibacterial and mannitol producing lactic acid bacteria from kimchi	김유진, 이나라, 이종희, 장자영, 김현주, 강미란, 박해웅, 최학중, 박성희, 김태운	한국미생물생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.07.16	Distribution of the lactic acid bacteria in kimchi according to different isolation temperature using 16S rRNA gene sequencing analysis	김유진, 이나라, 이종희, 장자영, 김현주, 강미란, 박해웅, 최학중, 박성희, 김태운	International Meeting of FKMS	국외
포스터	2013.08.28	Selection of lactic acid bacteria with antibacterial activity for the extension of kimchi shelf-life	김유진, 이나라, 장자영, 김현주, 강미란, 박해웅, 최학중, 박성희, 이종희, 김태운	한국식품과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.07.03.	Effect of the Rigidity and Size of Alginate Beads on Survival of Freeze-dried <i>Lactobacillus plantarum</i>	박해웅, 곽현정, 이종희, 최학중, 박성희, 장자영, 강미란, 김현주, 김태운	한국미생물생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.07.03.	Improved Freeze-protecting Effect of Alginate Encapsulation on Survival Rate of <i>Wissella kimchii</i> during Freeze Drying	박해웅, 이종희, 최학중, 박성희, 장자영, 강미란, 김현주, 이나라	한국미생물생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.08.28	Screening of Cryoprotectants to Increase Survivability of Lactic Acid Bacteria during Freeze Drying Process	곽현정, 이나라, 김태운, 이종희, 최학중, 장자영, 박해웅	한국식품과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.10.17	Effect of the Rigidity and Size of Alginate Beads on Survival of Freeze-dried <i>Pediococcus pentosaceus</i>	곽현정, 이나라, 김태운, 이종희, 최학중, 박성희, 장자영, 강미란, 박해웅	한국생물공학회 국제학술대회	국내
포스터	2014.06.26.	Effect of the Rigidity and Size of Alginate Beads on Viability of Freeze-Dried Lactic Acid Bacteria during Storage	곽현정, 하상현, 김태운, 이종희, 최학중, 장자영, 강미란, 박해웅	한국미생물생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2014.08.26.	Synergistic Effect of Alginate and Soy Powder on the Viability of Lactic Acid Bacteria after Freeze-Drying	곽현정, 김정희, 하상현, 김태운, 이종희, 최학중, 장자영, 강미란, 박해웅	한국식품과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회	국내
포스터	2012.06.15	Selection of Acid-tolerant Kimchi Starter Candidates and the Characteristic of their anti-bacterial Substances	김혜림, 이종훈	2012년 제 79 차 한국식품과학회 학술대회	국내

포스터	2012.06.28	Bacterial Community Migration during the Ripening of <i>Saeu-jeotgal</i> , a Traditional Korean High-Salt-Fermented Seafood	정광식, 이종훈	2012 년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2012.06.28	Effects of the Acid-tolerant and <i>Lactobacillus sakei</i> -inhibiting Starter Candidates on Kimchi Fermentation	김혜림, 김태운, 박성희, 이종훈	2012 년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.07.04	Antibiotic Susceptibility of Coagulase-negative Staphylococci Isolated from Korean High-salt-fermented Seafood, <i>Jeotgal</i>	한설화, 정도원, 이종훈	2013 년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.07.04	Genetic Diversity of <i>Staphylococcus equorum</i> Isolates from <i>Saeu-jeotgal</i> Evaluated by Multilocus Sequence Typing	정도원, 김혜림, 한설화, 이종훈	2013 년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내
포스터	2013.07.04	Genetic Diversity of <i>Staphylococcus saprophyticus</i> Isolates from Fermented Foods and Human	이빛나라, 정도원, 이종훈	2013 년 한국미생물·생명공학회 국제학술대회 및 정기학술대회	국내

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 가. 식품발효용 미생물 첨가제의 안전성 평가의 필요성

- 본 과제에서 수행한 “젓갈의 미생물상의 분석” 및 “젓갈 발효과정 중의 미생물 균집 천이” 를 통하여 *Staphylococcus* 속이 주발효 미생물이라는 결과들이 도출됨에 따라, *Staphylococcus equorum*을 비롯한 Coagulase-negative staphylococci (CNS)를 젓갈 발효용 종균으로 적용할 경우, 종균 후보에 대한 안전성 평가의 필요성이 제기되었음
  - 국내에서 식품발효용 미생물 첨가제(종균)으로 적용된 예가 없음
- 전통발효식품의 세계화 및 산업적 생산에서 가장 큰 문제로 대두되고 있는 품질 균일화 및 속성발효를 위해 종균을 첨가하려는 시도가 계속적으로 증가하고 있고, 농림축산식품부를 중심으로 연구개발이 진행되고 있으나, 식품발효용 미생물 첨가제에 대한 기준 및 안전성에 대한 기준 그리고 안전성 평가를 위한 가이드라인이 국내에는 없음
- 우리나라에는 발효식품에 사용하는 종균, 미생물 첨가제 등에 대한 정확한 정의가 없음
  - 식품공전 식품별 기준 규격에서 개량메주를 [대두를 주원료로 하여 원료를 찌거나 삶은 후 선별된 종균을 이용하여 발효시키는 것]이라는 정의를 내리고 있으나, 종균에 대한 범위나 종균에 대한 안전성에 대한 언급은 없음
  - 식품첨가물공전에는 중국에 대하여 명시하고 있으나, 이는 곰팡이 중국에 대한 내용으로 이를 제외한 식품발효용 미생물에 대한 언급은 없음
- 본 연구에서는 젓갈로부터 분리된 CNS 균주뿐만 아니라 전통발효식품에서 분리한 미생물을 종균으로 사용할 경우, 균주 수준에서의 안전성 평가의 필요성을 확인하였음

### 나. 국외 기술개발 현황

- 대량생산에 의한 식품 제조 증가 및 메스미디어의 발달로 소비자와 생산자에게 식품안전의 중요성은 더욱 높아지고, 이러한 영향은 과거에 고려하지 않았던 식품용 미생물의 안전성을 제시해야 하는 상황으로 확대되고 있음
- EU에는 2000년 초반까지 식품에 첨가하는 미생물에 대한 안전성 기준이 존재하지 않아 미국 FDA가 사용하고 있는 GRAS (Generally Recognized As Safe)가 통용되고 있었으나, 2002년 유럽식품안전국(EFSA)는 GRAS 기준과 비슷한 개념과 목적을 위하여 미생물 안전성 평가 시스템인 Qualified Presumption of Safety (QPS) 시스템을 제안함
- 식품에 사용하는 미생물에 대한 세계적 안전기준은 주로 미국 FDA의 GRAS 규격과 EFSA의 QPS 규격이 사용되고 있음

## □ 미국의 안전성 평가시스템 : GRAS notification system

- FDA는 식품에 사용하는 미생물을 식품첨가물(Food additives)의 일종으로 분류하고 있으며, 신규물질의 경우 사전승인(premarket approval)을 받아야 식품에 사용가능하나, GRAS로 인정된 경우 사전승인을 면제하고 있음
- GRAS는 미국 FDA가 오랜 사용이력 및 전문가들의 심사를 통하여 안전하다고 판단되는 식품용 첨가물을 관리하는 규격(status)으로 1958년 이전부터 사용한 물질에 대해서는 사전승인(prior sanction)물질로 간주해 안전성 평가 없이 GRAS로 인정되었지만, 이후에 사용하고자 하는 물질은 안전성에 대한 과학적 근거자료에 대한 전문가들의 심사를 통과하여야 함
- GRAS notification system은 식품원료의 안전성을 증명하는 과정으로, GRAS로 인증된 식품원료는 GRAS notice inventory에 등재되어 FDA homepage (<http://www.fda.gov>)에 공개됨
- 지금까지 490건의 식품원료 심사가 FDA에 요청되었고, 그 중 329건이 GRAS 규격을 획득하였으며, 미생물의 경우는 22건만이 GRAS 규격을 획득하였음 (2014년 1월 기준)

## □ EU의 안전성 평가시스템 : QPS system

- 2004년부터 EFSA는 FDA의 GRAS와 비슷한 개념과 목적을 위하여 QPS 규격을 설정하여 식품에 첨가하는 미생물의 안전성을 검증
- QPS는 특정 용도로 식품에 첨가하는 미생물의 균주(strain) 수준에서의 안전성을 의미하는 미국의 GRAS와는 달리, 미생물 단위의 일반적인 안전성을 정의하는 것으로 QPS 시스템을 통하여 안전하다고 평가된 미생물 단위(종 또는 속)는 사용 용도를 제한하지 않음
- QPS에 의해 안전성이 확보된 미생물 단위는 QPS list에 등록되고, 이 목록은 EFSA homepage (<http://www.efsa.eu.int/>)에 매년 업데이트 됨
- QPS는 균주 수준이 아닌 미생물 단위(종 또는 속) 수준의 안전성 인증이기 때문에 정확한 분류(taxonomy)를 바탕으로 해당 미생물의 역사적 사용이력 및 질병 관련성, 안전성 등의 과학적 평가가 가능한 모든 정보(body of knowledge)를 제시하여야 함
- 그와 동시에 병원성(pathogenicity)이 없음을 과학적 근거 자료 및 사용이력을 토대로 제시하여야 하며, 이들 생물제제 사용이 미치는 결과(end use)에 대한 영향 또한 제시하여, 안전하다고 판단될 때 QPS 규격을 확보하게 됨
- EFSA에 의한 QPS 인증이 시작된 이후, 유산균을 중심으로 한 식품용 미생물에 대한 안

전성 평가가 QPS 기준에 따라 활발하게 진행되고 있음

- 치즈, 발효육제품, 발효소시지 등의 발효용 종균으로 사용하는 미생물의 항생제내성 및 내성 유전자의 존재가 보고되고 있어 유산균을 비롯한 식품용 미생물에 대한 안전성 연구가 빠르게 증가하고 있음
  
- 미생물의 항생제내성은 크게 특정 종(species)이 가지고 있는 고유 특성인 내재형 내성 (intrinsic resistance)과 주변 환경으로부터의 유전자 획득에 의해 나타나는 획득형 내성 (acquired resistance)로 나누어지며, 유전자의 미생물간 이동에 의한 획득형 내성이 항생제내성 미생물 증가의 주요 원인으로 규정하고, EFSA는 항생제내성 평가 관련 지침을 제시하였음
  
- 2011년 FAO/WHO는 probiotics 평가 가이드라인에 probiotics의 기능성 평가와 더불어 안전성 평가를 실시 할 것을 제시하였으며, 안전성 평가를 위한 항목으로는 독성물질 생성 여부, 용혈현상 확인, 부작용 평가를 포함하여 항생제내성 평가를 제시하였음

## 제 7 장 참고문헌

1. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB, 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 37: 127-137.
2. Abadias M, Benabarre A, Teixidó N, Usall J, Viñas I. 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 65: 173-182.
3. Adhikary S, Nakawo M, Seko K, Shakya B. 2000. Dust influence on the melting process of glacier ice: experimental results from Lirung Glacier, Nepal Himalayas. *Int. Assoc. Hydro. Sci.* 264: 43-52.
4. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI, 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 22-32.
5. An DH, Lee JH, 2011. Isolation of bacteria from *Jeotgal* using high-salt-content media and their growths in high-salt condition. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 39: 294-300.
6. Bang KH, Kim KJ, Oh DH, Rhee YH. 1999. High-density cultivation and cryopreservation of *Saccharomyces cerevisiae* Hansen CBS5926. *Kor. J. Microbiol.* 35: 302-306.
7. Becker K, Roth R, Peters G, 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes, and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2548-2553.
8. Bedu-Addo FK. 2004. Understanding lyophilization formulation development. *Pharm. Technol.* 28: 10-18.
9. Berdague JL, Monteil P, Montel MC, Talon R, 1993. Effects of starter cultures on the formation of flavour compounds in dry sausage. *Meat Sci.* 35: 275-287.
10. Bergdoll MS, Surgalla MJ, Dack GM, 1959. Staphylococcal enterotoxin. Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property. *J. Immunol.* 83: 334-338.
11. Carelli D, Centonze D, Palermo C, Quinto M, Rotunno T, 2007. An interference free amperometric biosensor for the detection of biogenic amines in food products. *Biosens. Bioelectron.* 23: 640-647.

12. Carvalho AS, Silva J, Ho P, Teixeira P, Malcata FX, Gibbs P. 2003. Protective effect of sorbitol and monosodium glutamate during storage of freeze-dried lactic acid bacteria. *Dairy Sci. Technol.* 83: 203-210.
13. Castro HP, Teixeira PM, Kirby R. 1995. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44: 172-176.
14. Champagne CP, Mondou F, Raymond Y, Roy D. 1996. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 29: 555-562.
15. Chang JY, Chang HC. 2010. Improvement in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *J. Food Sci.* 75: M103-M110.
16. Chang JY, Chang HC. 2011. Growth Inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *J. Food Sci.* 76: M72-M78.
17. Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán M. 2010. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 142: 185-189.
18. Che SK. 1998. Sodium chloride analysis. pp. 460-463. In Food analysis. Jigu Publishing Co., Seoul, Korea.
19. Cho SK, Eom HJ, Moon JS, Lim SB, Kim YK, Lee KW, Han NS. 2014. An improved process of isomaltooligosaccharide production in kimchi involving the addition of a *Leuconostoc* starter and sugars. *Int. J. Food Microbiol.* 170: 61-64.
20. Cho YR, JY Chang, and HC Chang. 2007. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 104-109
21. Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2259-2261.
22. Colomer-Lluch, M, Jofre J, Muniesa M, 2011. Antibiotic resistance genes in the bacteriophage DNA fraction of environmental samples. *PLoS One* 6, e17549.
23. Costa E, Usall J, Teixidó N, Garcia N, Viñas I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viability of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. *J. Appl. Microbiol.* 89: 793-800.
24. Das NK, Kilara A, Shahani KM. 1976. Effect of cryoprotectant on freeze-drying and storage of lactic cultures. *Cult. Dairy Prod. J.* 11: 8-11.

25. Dianawati D, Mishra V, Shah N. 2013. Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Res. Int.* 51: 503-509.
26. Evenson ML, Hinds MW, Bernstein RS, Bergdoll MS. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7: 311-316.
27. Evers DJ, Carroll DJ, 1998. Ensiling salt-preserved shrimp waste with grass straw and molasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71: 241-249.
28. Fonseca F, Béal C, Corrieu G. 2000. Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. *J. Dairy Res.* 67: 83-90.
29. Fukami K, Funatsu Y, Kawasaki K, Watanabe S, 2004. Improvement of fish-sauce odor by treatment with bacteria isolated from the fish-sauce mush (moromi) made from frigate mackerel. *J. Food Sci.* 69: FMS45-FMS49.
30. Gaudio PD, Colombo P, Colombo G, Russo P, Sonvico F. 2005. Mechanisms of formation and disintegration of alginate beads obtained by prilling. *Int. J. Pharm.* 302: 1-9.
31. Gildberg A, Espejo-Hermes J, Magno-Orejana F. 1984. Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. *J. Sci. Food Agric.* 35: 1363-1369.
32. Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163-171.
33. Giulio B, Orlando P, Barba G, Coppola R, Rosa M, Sada A, Prisco PP, Nazzaro F. 2005. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. *World J. Microb. Biot.* 21: 739-746.
34. Guan L, Cho KH, Lee JH, 2011. Analysis of the cultivable bacterial community in *jeotgal*, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol.* 28: 101-113.
35. Ha JH, Moon ES, Ha SD. 2007. Assessment of microbial contamination and safety of commercial Shrimp *Jeotgal* (salt fermented shrimp). *J. Food Hyg. Safety* 22: 105-109.
36. Ham HJ, Jin YH, 2002. Bacterial distribution of salt-fermented fishery products in Seoul Garak wholesale market. *J. Food Hyg. Safety* 17: 1773-1777.
37. Han JS, Kang J. 2004. Retardation of kimchi fermentation by addition of glucono- $\delta$ -lacton. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33: 553-559.
38. Heckly RJ. 1961. Preservation of bacteria by lyophilization. *Adv. Appl. Microbiol.* 3: 1-76.

39. Heilmann C, Schweitzer, O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F, 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* 20: 1083-1091.
40. Hiraga K, Nishikata Y, Namwong S, Tanasupawat S, Takada K, Oda K, 2005. Purification and characterization of serine proteinase from a halophilic bacterium, *Filobacillus* sp. RF2-5. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 38-44.
41. Holder IA, Boyce ST. 1994. Agar well diffusion assay testing of bacterial susceptibility to various antimicrobials in concentrations non-toxic for human cells in culture. *J. Burns.* 20: 426-429.
42. Hoppe-Seyler TS, Jaeger B, Bockelmann W, Noordman WH, Geis A, Heller KJ. 2004. Molecular identification and differentiation of *Staphylococcus* species and strains of cheese origin. *Syst. Appl. Microbiol.* 27: 211-218.
43. Hubalek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. 2003. *Cryobiology.* 46: 205-229.
44. Jalali M, Abedi D, Varshosaz J, Najjarzadeh M, Mirlohi M, Tavakoli N. 2012. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* sub sp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. *Res. Pharm. Sci.* 7: 31-36.
45. Jankowski T, Zielinska M, Wysakowska A. 1997. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. *Biotechnol. Tech.* 11: 31-34.
46. Jeong KH, Seo JH, Kim JH, Kim KS, Jeong YJ. 2006. Monitoring on characteristics of soybean flour hydrolyzed by various proteolytic conditions. *Korean J. Food Preserv.* 13: 71-76.
47. Jeong SH, Lee HJ, Jung JY, Lee SH, Seo HY, Park WS, Jeon CO. 2013. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 160: 252-259.
48. Jin HS, Kim JB, Yun YJ, Lee KJ. 2008. Selection of Kimchi starters based on the microbial composition of Kimchi and their effects. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 671-675.
49. Joung SE, Cho SH, Lee HG. 1997. A study on the effects of processing method on the quality of soybean da-sik. *Korean J. Soc. Food Sci.* 13: 356-363.
50. Ju BH, Youn LJ. 2013. Quality characteristics of kimchi with added stevioside containing sweetener. *J. Korean Soc. Food Cult.* 28: 99-106.
51. Jung J, Choi S, Jeon CO, Park W. 2013. Pyrosequencing-based analysis of the bacterial community in Korean traditional seafood, ojingeo jeotgal. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1428-1433.

52. Jung J, Lee SH, Jin HM, Jeon CO, Park W. 2014. Pyrosequencing-based analysis of bacterial community and metabolites profiles in Korean traditional seafood fermentation: a flatfish-fermented seafood. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78: 908-910.
53. Jung JY, Lee SH, Lee HJ, Jeon CO. 2013. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood. *Food Microbiol.* 34: 360-368.
54. Kang YM, Chung SK, Paik HD, Cho SH. 2001. Changes in physicochemical component of soy sauce during fermentation from anchovy sauce. *J. Korean Soc. Food Sci Nutr.* 30: 888-893.
55. Kearney L, Upton M, Loughlin A. 1990. Enhancing the viability of *Lactobacillus plantarum* inoculum by immobilizing the cells in calcium-alginate beads incorporating cryoprotectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3112-3116.
56. Kets EPW, Teunissen PJM, de Bont JAM. 1996. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 259-261.
57. Kim DH, Hahn YS. 2003. Effect of addition of ethanol and organic acids on the quality of Mul-kimchi. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 13: 305-312.
58. Kim HJ, Shin HK, Yang EJ. 2013. Production and fermentation characteristics of Mukeunji with a mixed starter. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1467-1474.
59. Kim J-H, Rhee Y-H, Na H-J, Lee Y-K, Shin S-Y. 1997. Physico-chemical characteristics of yogurt by *Lactobacillus* spp. from pickles. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* 40: 12-17.
60. Kim J, Bang J, Beuchat LR, Kim H, Ryu JH. 2012. Controlled fermentation of kimchi using naturally occurring antimicrobial agents. *Food Microbiol.* 32: 20-31.
61. Kim SY, Kim JD, Son JS, Lee SK, Park KJ, Park MS. 2011. Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 43: 446-452.
62. Kim YM, Jeong YM, Hong JH. 1993. Processing conditions for low-salted squid jeotkal. *Bull. Korean Fish. Soc.* 26: 312-320.
63. Kim YH, Kim HZ, Kim JY, Choi TB, Kang SM. 2005. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on kimchi fermentation as a starter. *Kor. J. Appl. Microbiol.* 33: 41-50.
64. Kim YS, Shin DH. 2008. Hygienic superiority of Kimchi. *J. Food Hyg. Saf.* 23: 91-97.
65. Ko JA, Kim WY, Park HJ. 2012. Effects of microencapsulated Allyl isothiocyanate (AITC) on the extension of the shelf-life of Kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 153: 92-98.

66. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* 13: 3-13.
67. Lane DJ. 1991. 16S-23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Stackebrandt E, Goodfellow M, eds. Wiley, New York, USA. p115-175.
68. Lane DJ. 1991. 16S-23S rRNA sequencing, pp. 115-175. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Wiley, New York.
69. Lee CW, Ko CY, Ha DM. 1992. Microbial changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 102-109.
70. Lee JS, Cha DS, Park HJ. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated calcium alginate microparticles. *J. Agric. Food Chem.* 52: 7300-7305.
71. Lee JY, Kim CJ, Kunz B. 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat sci.* 72: 437-445.
72. Lee KW, Park JY, Chun J, Han NS, Kim JH. 2010. Importance of *Weissella* species during kimchi fermentation and future works. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 38: 341-348.
73. Lee NK, Kim HW, Choi SY, Paik HD. 2003. Some probiotic properties of lactic acid bacteria and yeasts isolated from jeot-gal. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 297-300.
74. Lee SH, Jung JY, Jeon CO. 2014. Microbial successions and metabolite changes during fermentation of salted shrimp (saeu-jeot) with different salt concentrations. *PLoS One* 28, e90115. doi: 10.1371/journal.pone.0090115.
75. Lee SH, Jung JY, Jeon CO., 2014a. Effects of temperature on microbial succession and metabolite change during saeu-jeot fermentation. *Food Microbiol.* 38: 16-25.
76. Lee KH, Kim JH, Kim BS, Cha JO, Kim MW Byun. 1999. Quality evaluation of commercial salted and fermented seafoods. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 31: 1427-1433.
77. Lee, W.-D., J.-J. Lee, D.-S. Chang, J.-H. Yoon, and M.-S. Lee. 2001. Development of new manufacturing process for *Changran-Jeotgal* 2. Optimization of fermentation process. *J. Kor. Fish Soc.* 34: 114-118.
78. Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 270-285.
79. Leslie SB., Israeli E, Lighthart B, Crowe JH, Crowe LM. 1995. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl. Environ.*

- Microbiol.* 61: 3592-3597.
80. Lim CR, Park HK, Han HU. 1989. Reevaluation of isolation and identification of Gram-positive bacteria in Kimchi. *Kor. J. Microbiol.* 27: 404-414.
  81. Lim JH, Park SS, Jeong JW, Park KJ, Seo KH, Sung JM. 2013. Quality characteristics of Kimchi fermented with abalone or sea tangle extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 450-456.
  82. Lim YB, Paek NS, Kim YM. 2001. Screening of lactic acid bacteria for the development of probiotics and the effect of cryoprotectant agents. *Kor. J. Food & Nutr.* 14: 441-445.
  83. Lin TM, Durance TD, Scaman CH. 1998. Characterization of vacuum microwave, air and freeze-dried carrot slices. *Food Res. Int.* 31: 111-117.
  84. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 1062-1066.
  85. Luthje P, Schwarz S. 2006. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 966-969.
  86. Mheen TI, Kwon TW. 1984. Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 16: 443-450.
  87. Miralles MC, Flores J, Perez-Martinez G. 1996. Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiol.* 13: 227-236.
  88. Mitic S, Otenhajmer I. 1974. Predicting the stabilities of freeze-dried suspensions of *Lactobacillus acidophilus* by the accelerated storage test. *Cryobiology* 11: 116-120.
  89. Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. 2008. Survival of freeze dried bacteria. *J. General Appl. Microbiol.* 54: 9-24.
  90. Mok CK, J Y. Lee, K. T. Song, S. Y. Kim, S. B. Lim, and G. J. Woo. 2000. Change in physicochemical properties of salted and fermented shrimp at different salt levels. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 187-191.
  91. Moon GS, Kang CH, Pyun YR, Kim WJ. 2004. Isolation, identification, and characterization of a bacteriocin-producing *Enterococcus* sp. from kimchi and its application to kimchi fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 924-931.
  92. Moon SH, Chang HC, Kim IC. 2013. Development of a novel medium with Chinese cabbage extract and optimized fermentation conditions for the cultivation of *Leuconostoc citreum* GR1. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 42: 1125-1132.

93. Oh, S.-H., O.-S. Heo, H.-S. Shin, J.-W. Lee, D.-H. Kim, M.-W. Byun, and M.-R. Kim. 2005. Effect of salt concentration on the quality of *SaewooJeot*(salted shrimp) fermented at room temperature. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 15: 444-449.
94. Otero MC, Espeche MC, Nader-Macías ME. 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. *Process biochem.* 42: 1406-1411.
95. Otto M, 2012. Molecular basis of *Staphylococcus epidermidis* infections. *Semin. Immunopathol.* 34: 201-214.
96. Paik HD, Koo KM, Kim JG, Lee NK. 2003. Optimization for lacticin SA72 production by *Lactococcus lactis* SA72 isolated from jeot-gal. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 46-50.
97. Paludan-Müllera CM, Madsen, P. Sophanodora, L. Gram, and P. L. Møller. 2002. Fermentation and microflora of *plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. *Int. J. Food Microbiol.* 73: 61-70.
98. Park Hj and Khang Yh. 2010. Simple and rapid extraction of a bacteriocin produced by *Streptococcus parauberis* Z49 from fermented cultures. *Kor. J. Microbiol.* 46: 291-295.
99. Park JG, Kim JH, Park JN, Kim YD, Kim WG, Lee JW, Hwang HJ, Byun MW. 2008. The effect of irradiation temperature on the quality improvement of Kimchi, Korean fermented vegetables, for its shelf stability. *Radiat Physics Chem.* 77: 497-502.
100. Park MY, Choi ST, Chang DS. 2002. HACCP in *Changran Jeotgal*. *J. Fish. Sci. Technol.* 5: 48-53.
101. Park HJ, J. H. Shin, M. J. Kang, and N. J. Sung. 2002a. Formation of N-nitrosamine in salted and fermented anchovy. *J. Agric. Life Sci.* 36: 23-31.
102. Place RB, Hiestand D, Gallmann HR, Teuber M. 2003. *Staphylococcus equorum* subsp. *linens*, subsp. nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. *Syst. Appl. Microbiol.* 26: 30-37.
103. Ramakrishna SV, Prakasham RS. 1999. Microbial fermentations with immobilized cells. *Curr. Sci.* 77: 87-100.
104. Roh SW, Kim KH, Nam YD, Chang HW, Park EJ, Bae JW. 2010. Investigation of archaeal and bacterial diversity in fermented seafood using barcoded pyrosequencing. *ISME J.* 4: 1-16.
105. Santagapita PR, Mazzobre MF, Buera MP. 2012. Invertase stability in alginate beads: Effect of trehalose and chitosan inclusion and of drying methods. *Food Res. Int.* 47:

- 321-330.
106. Savini M, Cecchini C, Verdenelli MC, Silvi S, Orpianesi C, Cresci A. 2010. Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. *Nutrients* 2: 330-339.
  107. Seo JH, Lee H. 2007. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 39: 681-687.
  108. Seo MJ, Lee JY, Nam YD, Lee SY, Park SL, Yi SH, Lee MH, Roh SW, Choi HJ, Lim SI. 2013. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* 340G isolated from Kimchi and its application to skim milk. *Food Eng. Prog.* 17: 418-423.
  109. Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Res. Int.* 29: 675-690.
  110. Sheu TY, Marshall RT. 1993. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *J. Food Sci.* 58: 557-561.
  111. Shi P, He P, Teh TKH, Morsi YS, Goh JCH. 2011. Parametric analysis of shape changes of alginate beads. *Powder Technol.* 210: 60-66.
  112. Shon KH, Lee HJ. 1998. Effect of high pressure treatment on the quality and storage of kimchi. *Int J Food Sci Technol* 33: 359-365.
  113. Sila Santos MH. 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 29: 213-231.
  114. Sinsuwan S, Rodtong S, Yongsawatdigul J. 2008. Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *Process Biochem.* 43: 185-192.
  115. Sinsuwan S, Rodtong SJ, Yongsawatdigul. 2007. NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. *J. Food Sci.* 72: 264-269.
  116. Siringan P, Raksakulthai N, Yongsawatdigul J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *Food Chem.* 98: 678-684.
  117. So MH, Kim YB. 1995. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 495-505.
  118. Sondergaard AK, Stahnke LH. 2002. Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum*-a comparative study in model systems. *Int. J. Food Microbiol.* 75: 99-109.
  119. Stahnke LH. 1994. Aroma components from dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus*. *Meat Sci.* 38: 39-53.

120. Talon RS, Leroy I, Lebert P, Giammarinaro JP, Chacornac M, Latorre-Moratalla C, Vidal-Carou, E. Zanardi, M. Conter, and A. Lebecque. 2008. Safety improvement and preservation of typical sensory qualities of traditional dry fermented sausages using autochthonous starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 126: 227-234.
121. Taylor TM, PM Davidson, Zhong Q. 2007. Extraction of nisin from a 2.5% commercial nisin product using methanol and ethanol solutions. *J. Food Prot.* 70: 1272-1276.
122. Toh, S.M., Xiong, L., Arias, C.A., Villegas, M.V., Lolans, K., Quinn, J., Mankin, A.S., 2007. Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid. *Mol. Microbiol.* 64, 1506-1514.
123. Truelstrup-Hansen L, Allan-Wojtas PM, Jin YL, Paulson AT. 2002. Survival of free and Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.* 19: 35-45.
124. Udomsil, N., S. Rodtong, Y. J. Choi, Y. Hua, and J. Yongsawatdigul. 2011. Use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 59: 8401-8408.
125. Um, M.-A. and C.-H. Lee. 1996. Isolation and identification of *Staphylococcus* sp. from Korean fermented fish products. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 340-346.
126. Valdez GF, Giori GS, Ruiz Holgado AP, Oliver G. 1983. Protective effect of adonitol on lactic acid bacteria subjected to freeze-drying. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 302-304.
127. Valle, J., Gomez-Lucia, E., Piriz, S., Goyache, J., Orden, J.A., Vadillo, S., 1990. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1323-1326.
128. Wisselink HW, Weusthuis RA, Eggink G, Hugenholtz J, Grobben GJ. 2002. Mannitol production by lactic acid bacteria: a reievew. *Int. Dairy J.* 12: 151-161.
129. Xi, C., Zhang, Y., Marrs, C.F., Ye, W., Simon, C., Foxman, B., Nriagu, J., 2009. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5714-5718.
130. Yang EJ, Chang HC. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 36: 276-284
131. Yongsawatdigul, J., S. Rodtong, and N. Rakasakulthai. 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *J. Food Sci.* 72: 382-390.
132. Yongsawatdigul, J., Y.J. Choi, and S. Udomporn. 2004. Biogenic amines formation in

- fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J. Food Sci.* 69: FCT312-FCT319.
133. Yoon, J.-H., S.-S. Kang, K.-C. Lee, Y.-H. Kho, S. H. Choi, K. H. Kang and Y.-H. Park. 2001. *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1087-1092.
134. Zayed G, Roos YH. 2004. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. *Process biochem.* 39: 1081-1086.
135. Zell, C., Resch, M., Rosenstein, R., Albrecht, T., Hertel, C., Gotz, F., 2008. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures. *Int. J. Food Microbiol.* 127, 246-251.
136. Zhou ZD. Li GY, Li YJ. 2010. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. *Int. J. Biol. Macromol.* 47: 21-26..
137. Zhu, Y.G., Johnson, T.A., Su, J.Q., Qiao, M., Guo, G.X., Stedtfeld, R.D., Hashsham, S.A., Tiedje, J.M., 2013. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 3435-3440.
138. 김애정, 박신영, 최진원, 박상현, 하상도. 2006. 광천 토굴새우젓의 미생물 오염도 및 영양 평가. *한국식품과학회지* 38(1): 121-127.
139. 박종기, 조용운, 최영주, 정영기, 갈상완. 2004. 젓갈에서 분리한 *Bacillus subtilis* SW-1의 항암활성. *생명과학회지* 14(5): 815-820.
140. 백현동, 구경모, 김진곤, 이나경. 2003. 젓갈에서 분리한 *Lactococcus lactis* SA72에 의한 Lacticin SA72의 생산 최적화. *한국미생물생명공학회지* 31(1): 46-50.
141. 서명자. 1973. 젓갈 성숙과정에 있어 Protease 및 Formonitrogen의 변화에 관한 연구. *한국영양학회지* 6(2): 45-56.
142. 성낙주. 1978. 굴젓 숙성중 핵산 관련물질의 변화. *한국영양식량학회지* 7(2): 1-6.
143. 오상희, 허옥순, 방옥균, 장해춘, 신현수, 김미리. 2004. 새우젓 저장 중 위해 미생물학적인 안전성 연구. *한국 식품과학회지* 36(3): 507-513.
144. 윤상봉, 김정봉, 임용호, 홍성렬, 송재경, 김삼선, 권순우, 박인철, 김수진, 여윤수, 구본성. 2005. 한국 전통젓갈에서 분리한 *Bacillus subtilis* JKK238 균주 유래 세 종류 Lipopeptide의 분리 및 특성. *한국미생물생명공학회지* 33(4): 295-301.
145. 이계호. 1969. 젓갈등속의 정미성분에 관한 미생물학적 및 효소학적 연구. *한국농화학회지* 11: 1-27.
146. 이선미, 임종미, 김기현, 조수열, 박건상, 신영민, 정지연, 조준일, 유현정, 김규현, 조대현, 임철주, 김옥희. 2008. 젓갈류에서의 위생지표 미생물 및 식중독균 모니터링을 통한 미생물학적 연구. *한국식품위생안전성학회지* 23(3): 198-205.

147. 이원동. 2001. 한국젓갈의 현황과 현대화 과제. 식품산업과 영양 6(3): 23-27.
148. 이응호, 성낙주. 1977. 꿀뚜기젓의 정미성분. 한국식품과학회지 9(4): 255-263.
149. 이종갑, 최위경. 1974. 멸치 젓갈 숙성에 따른 미생물상의 변화에 대하여. 한국수산학회지 7(3): 105-114.
150. 이태식, 박정흠, 이명숙, 허성호. 1990. 미생물에 의한 불휘발성아민의 분해. 한국수산과학회지 23: 1-6.
151. 이현숙, 이원동, 고병호, 이명숙. 2000. 살균고춧가루를 이용한 오징어젓갈 제조 2. 양념오징어젓갈의 보존성 연장. 한국식품위생안전성학회지 15(1): 18-24.
152. 조학래, 박옥연, 장동석. 2002. 젓갈류의 유통기한 연장을 위한 연구. 한국식품과학회지 34(4): 652-660.
153. 차용준, 박향숙, 조순영. 1983. 저염수산발효식품의 가공에 관한 연구 4. 저염 멸치젓의 가공. 한국수산학회지 16(4): 363-367.
154. 차용준, 이강희, 이응호, 김진수, 주동식. 1990. 미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 숙성발효에 관한 연구 3. 단백질분해세균을 이용한 저식염 멸치젓의 제조 및 저장중의 품질 안정성. 한국농화학회지 33(4): 330-336.
155. 차용준, 이응호, 이강희, 장동석. 1988. 저식염멸치젓에서 분리한 단백질분해력이 강한 세균 및 생산된 단백질분해효소의 특성. 한국수산학회지 21(2): 71-79.
156. 차용준, 이응호. 1985a. 저식염 수산발효식품의 가공에 관한 연구5. 저식염 멸치젓 및 조기젓의 가공조건. 한국수산학회지 18(3): 206-213.
157. 차용준, 이응호. 1985b. 저식염 수산발효식품의 가공에 관한 연구 6. 저식염 멸치젓 및 조기젓의 정미성분. 한국수산학회지 18(4): 325-332.
158. 차용준, 이응호. 1989. 미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 숙성발효에 관한 연구 1. 젓갈에서 분리한 단백질분해균 및 단백질분해효소의 생화학적 특성. 한국수산학회지 22(5): 363-369.
159. 차용준, 이응호. 1990. 미생물을 이용한 저식염 멸치젓의 숙성발효에 관한 연구 2. 젓갈에서 분리한 단백질분해효소의 열역학적 특성. 한국수산학회지 33(4): 325-329.
160. 하지형, 문은숙, 하상도. 2007. 유통 중인 새우젓의 미생물학적 오염도 및 안전성 평가. 한국식품위생안전성학회지 22(2): 105-109.
161. 함희진, 진영희. 2002. 서울시내 수산시장에 유통 중인 젓갈류의 세균 분포. 한국식품위생안전성학회지 17(4): 173-177.
162. 허성호. 1996. 젓갈제품의 미생물학적 품질표준화에 대한 고찰. 한국식품영양과학회지 25(5): 885-891.
163. 만니톨 생성능이 우수한 내산성 루코노스톡 메센테로이드 및 이를 이용한 김치의 제조 방법 : 10-2008-0077390
164. 루코노스톡 시트리움 IH22 균주를 이용하여 제조한 채 김치 및 김치쥬스 :

1999-0083667

165. 미생물을 이용한 김치 개량제 제조방법 및 이를 이용한 개량김치 제조방법 :

1987-0012177

166. 미생물 대사공학을 이용한 첨단김치의 제조기술 개발 최종 보고서

167. 김치의 산업화를 위한 과학적 기반기술 개발 최종 보고서

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.