

821001-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
기술사업화지원사업 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004359-01

김치
종균
활성
극대화
및
종균
김치
최적
제조
공정법
개발

2022

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

김치 종균 활성 극대화 및 종균 김치 최적 제조 공정법 개발

2023.06.01.

주관연구기관 / 세계김치연구소
공동연구기관 / (주)뜨레찬

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “김치 종균 활성 극대화 및 종균 김치 최적 제조 공정법 개발”(개발기간 : 2021.4.1.
~ 2022.12.31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2023. 06. 01.

주관연구기관명 : 세계김치연구소 (대표자) 장해춘



(인)

공동연구기관명 : (주)프레찬 (대표자) 윤경미



주관연구책임자 : 세계김치연구소 김태운

공동연구책임자 : (주)프레찬 김광호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서							보안등급					
							일반[√], 보안[]					
중앙행정기관명	농림축산식품부			사업명	사업명	기술사업화지원사업						
전문기관명 (해당 시 작성)	농림식품기술기획평가원				내역사업명 (해당 시 작성)	[공공기술 사업화 촉진] 지원분야 식품						
공고번호	농축2021-41호			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	-							
				연구개발과제번호	821001-2							
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1702	50%	LB1703	30%	LB1705	20%					
	농림식품과학기술 분류	PA0102	70%	PA0104	30%							
총괄연구개발명 (해당 시 작성)	국문	-										
	영문	-										
연구개발과제명	국문	김치 종균 활성 극대화 및 종균 김치 최적 제조 공정법 개발										
	영문	Development of methods for improvement of kimchi starter activity and optimal addition process to kimchi										
주관연구개발기관	기관명	한국식품연구원부설 세계김치연구소		사업자등록번호	129-82-10881							
	주소	(우61755)광주광역시 남구 김치로 86		법인등록번호	130122-0001269							
연구책임자	성명		김태운		직위		책임연구원					
	연락처	직장전화			휴대전화							
		전자우편			국가연구자번호							
연구개발기간	전체		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)									
	단계 (해당 시 작성)	1단계	1년차	2021. 04. 01 - 2021. 12. 31(9개월)								
			2년차	2022. 01. 01 - 2022. 12. 31(1년)								
연구개발비 (단위: 천원)	정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계			연구개발 비외 지원금	
		지방자치단체	기타()									
	현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계		
	총계	261,000	1,470	22,630	-	-	-	-	262,470	22,630	285,100	-
1단계	1년차	112,000	-	9,400	-	-	-	-	112,000	9,400	121,400	-
	2년차	149,000	1,470	13,230	-	-	-	-	150,470	13,230	163,700	-
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고						
	역할	기관유형										
공동연구개발기관	(주)뜨레찬	김광호	소장			공동	중소기업					
연구개발담당자 실무담당자	성명		김재환		직위		선임연구원					
	연락처	직장전화			휴대전화							
		전자우편			국가연구자번호							

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2023년 06월 1일

연구책임자: 김 태 운



주관연구개발기관의 장: 한국식품연구원부설 세계김치연구소 장해춘



공동연구개발기관의 장: (주)뜨레찬 윤경미



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 요약 문 >

사업명	2021년도 기술사업화지원사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)	[공공기술 사업화 촉진] 지원분야 식품			연구개발과제번호		821001-2	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1702	50%	LB1703	30%	LB1705	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0102	70%	PA0104	30%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		김치 종균 활성 극대화 및 종균 김치 최적 제조 공정법 개발					
전체 연구개발기간		2021. 04. 01 - 2022. 12. 31(1년 9개월)					
총 연구개발비		총 285,100 천원 (정부지원연구개발비: 261,000천원, 기관부담연구개발비 : 24,100천원, 지방자치단체지원연구개발비: 천원, 그 외 지원연구개발비: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준 (시작품단계:6단계) 종료시점 목표 (사업화단계:9단계)	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	수출용 김치의 품질유지기한 연장 및 품질 향상을 위해 중소/중견 김치제조업체가 항균 활성 우수 김치 종균을 효율적으로 활용 할 수 있도록 현장 맞춤형 종균 김치 최적 제조 공정법을 개발하고자 함					
	전체 내용	1)현장 맞춤형 종균 최적 배양 기술 개발 - 김치 종균 항균 활성 증진 배양 기술 개발 - 합성 첨가물 대체 천연 소재를 이용한 식용 배지 조성 개발 - 김치 종균 기술 적용 김치제조업체 현장 애로사항 조사 2)Hurdle technology를 활용한 종균 김치 최적 제조 공정법 개발 - 항균 활성 우수 종균 적용 양념을 이용한 김치 발효 최적화 - 수출용 김치 품질유지기한 증대를 위한 최적 염도 설정 - 미생물 발효를 제어하는 비발효당(당알코올 등) 선발 및 적용 - 상품김치 품질균일화를 위한 김치 종균 최적 첨가량 설정 3)종균 첨가 김치 발효 특성 분석을 통한 품질유지기한 연장 효과 검증 - 이화학적 특성, 관능적 특성 분석을 통한 김치 품질 특성 분석 - 미생물 군집 분석을 통한 김치 종균 우점을 검증 - 김치 종균 최적 제조 공정법 적용에 따른 비용 분석 4)개발 기술 김치업체 현장 적용 및 상품김치 유통 환경에서의 현장 실증 실험 - 최적 종균 배양 기술 현장 적용 및 종균 활성 평가 - 종균 김치 최적 제조 공정법을 적용한 시제품 생산 및 품질평가					

연구개발성과	<p>1. 김치 종균 향균 활성 증진 배양 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - <i>Lactococcus lactis</i> 균주의 향균 활성을 증진하기 위해 식용배지의 탄소원, 질소원, pH 완충제의 조성과 첨가 농도를 반응 표면 분석법을 이용하여 최적화하였고, 또한 배양 온도 및 시간도 반응 표면 분석법을 이용하여 최적화하였음. 결과적으로 lactose 2.5%, yeast extract 2%, whey protein concentrate 0.5%, potassium citrate 3%, ascorbic acid 0.05%의 배지 조성 25℃에서 18시간 배양이라는 최적화 조건을 산출하였음. 기존 대비 김치 과숙균으로 알려진 <i>Latilactobacillus sakei</i> KCKM 0026에 대해 약 16% 증가한 향균 활성(Inhibition zone)을 나타냈으며, nisin 표준품 희석 농도에 따른 향균 활성과 비교한 결과 1,200µg/mL 농도 이상의 nisin 함량을 가지고 있는 것으로 나타났음 <p>2. 양념의 초기 미생물 수 저감</p> <ul style="list-style-type: none"> - 향균 활성을 갖는 종균 배양액과 젖산을 이용하여 김치 양념 내의 초기 유산균수를 저감화 시키고자 하였음. 각 처리액을 김치 양념에 처리한 후 4℃에서 16시간 보관한 후 양념 내 유산균수를 측정하였음. 대조군에 비하여 기존 배양액의 경우 약 3%, 개선 배양액의 경우 약 21%, 개선 배양액과 젖산 병용의 경우 약 74%의 김치 양념 내 유산균 수를 저감화시키는 효과를 나타내었음 <p>3. 김치 숙성 지연 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개선 배양액 및 젖산의 처리에 따른 김치 숙성 지연 효과를 분석하였음. 10℃에서 2주간 저장하며 2일 간격으로 pH, 산도, 총 유산균수, 미생물 군집, 대산산물의 변화를 측정한 결과 개선 배양액은 10℃에서 기존 배양액에 비해 2일 지연 효과가 증가되었음. 또한 개선 배양액과 젖산을 병용 처리한 경우에는 기존 배양액 대비 4일의 숙성 지연 효과를 보였음 <p>4. 정량 성과 : 특허 출원 1건, 논문 1건, 기술이전 1건, 상품화 1건</p> <ul style="list-style-type: none"> - 특허: 향균활성이 증진된 락토코커스 락티스 배양액을 이용한 숙성이 지연된 김치의 제조방법, 출원일 2022.05.06., 출원번호 10-2022-0056027 - 논문: 김치 종균 배양용 식용배지 개발 및 이를 이용한 김치숙성도 제어 방법, 한국유산균프로바이오틱스학회지, 2021, 7(2), 53-59. - 기술이전: 향균활성이 증진된 락토코커스 락티스 배양액을 이용한 숙성이 지연된 김치의 제조방법, 정액 11백만원, 통상실시 - 상품화 : 품질유지기한이 연장된 수출용 김치 1건, (주)뜨레찬 											
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 김치 수출업체로의 종균 활용 기술이전을 통한 제품화 및 사업화 추진 ○ 수출용 상품김치의 품질유지기한 연장으로 인한 제품 가치 제고 ○ 수출용 김치의 장거리 수송 및 유통 가능에 따른 수출국 다변화 및 수출량 증대 											
연구개발성과의 비공개여부 및 사유												
연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허 (출원)	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	1	1	1									
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)		ZEUS 등록번호		
국문핵심어 (5개 이내)	김치		종균		품질유지기한		제조 공정		김치 수출			
영문핵심어 (5개 이내)	kimchi		Starter		shelf-life		Manufacturing process		Kimchi Export			

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	5
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	7
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	10
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	30
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	31
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	31
별첨 자료 (참고 문헌 등)	32

1. 연구개발과제의 개요

- 상품김치의 품질유지기한은 국내의 경우 냉장 보존에서 통상 30일 정도로 정해져서 유통되고 있으나, 발효말기에는 과도하게 시어지거나 포장이 팽창하여 상품가치를 상실하는 경우도 발생되고 있음. 수출 김치의 경우는 제품출하 → 선적 → 수입통관 → 해외 시장 소비자까지 일본, 대만 등과 같이 가까운 지역은 보통 7-10일정도 소요되지만 미국, 호주 등의 국가까지는 한달 정도가 소요되고 이라크 등 중동지역까지는 두달 정도가 소요되고 있음. 중국 등은 지리적으로 가까운 편이나 통관에 1-2주가 소요되고 있는 실정임. 따라서 수출용 김치의 경우 국내 판매 상품보다 더 긴 품질유지기한이 요구되고 있으나 이를 현실적으로 충족할 수 있는 실용화된 현장 적용 기술이 없어 실제 김치 수출을 하고 있는 김치 제조업체가 큰 애로를 겪고 있음

조사년도	분야	주요 내용	업체명
2017 김치제조업체 현장 방문 애로 사항	수출 품질	-수출 시 발효 억제 방안	해탈종합식품
		-수출 김치제품에 대한 숙성 지연 연구 필요	예소담
		-수출 시 배(컨테이너)로 60여일이 소요되는 기간 동안 품질 유지에 어려움이 있음	왕인식품
		-수출제품 유통기한 연장 방법 문의	보성일억조코리아
		-수출을 위한 품질 향상(품질 유지기한 연장, 차별화 등)이 필요	성진
		-수출 시, 산미 및 미생물 품질관리	이킴
2018 김치제조업체 현장 방문 애로 사항	수출 제품	-수출용 제품 부패음, 품질유지기한 연장 기술 필요	다모, 보성일억조코리아, 담채원
	발효 지연	-발효/숙성 지연 가능한 기술 필요	푸름, 대일
	종균 활용	-김치 품질유지기한 연장 및 숙성 지연을 위한 종균 적용실험 지원 요청	성진, 도미솔김치, 한울, 부귀농협 마이산김치, 참평안협동조합, 한일식품 등

- 김치 발효 기작의 정확한 규명을 통해 발효능이 우수한 균주를 선발한 후, 이를 김치 종균으로 첨가하여 김치의 품질균일화 및 품질유지기한 연장 기술을 확보하는 것은 수출용 김치의 품질 향상, 차별화 및 세계화에 있어 매우 중요한 의미를 갖고 있음
- 김치 종균을 이용하여 품질유지기한 연장 등 김치 품질을 개선하려는 연구가 많이 수행되었으나 대부분 건조된 균체를 양념 등에 단순 첨가함으로써 활성이 많이 저하되어 종균으로서 제 기능을 발휘하지 못하고 있음. 또한, 김치는 다른 발효식품과는 달리 원·부재료의 살균 공정 없이 제조가 됨으로 첨가된 종균이 원·부재료로부터 기인하는 미생물들과 경쟁을 해야 함으로써 우점종이 되기에는 더욱 어려움이 있음
- 이러한 문제점을 해결하고자 근래 향균 활성이 우수한 김치 종균을 식용 액체 배지에 배양한 후 액상형태로 김치에 첨가하여 김치의 품질유지기한을 연장시키고자 한 연구를 수행하여 어느 정도 성과를 달성하고 이들 종균을 활용한 김치제조법에 대해 특허 등록을 하였음

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)	(45) 공고일자 2019년07월08일 (11) 등록번호 10-1997468 (24) 등록일자 2019년07월02일	 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 등록특허공보(B1)	(45) 공고일자 2019년07월08일 (11) 등록번호 10-1997468 (24) 등록일자 2019년07월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) A23B 7/10 (2006.01) A23B 7/155 (2017.01) C12R 1/01 (2006.01) (52) C12특허분류 C12N 1/20 (2013.01) A23B 7/105 (2013.01) (21) 출원번호 10-2019-0014787 (22) 출원일자 2019년02월08일 심사청구일자 2019년02월08일 (56) 선행기술조사문헌 KR101099924 B1 (잇면예 계속) (73) 특허권자 한국식품연구원 전라북도 완주군 이서면 농생명로 245 (72) 발명자 김태운 광주광역시 남구 호사망길 14, 103동 1608호 (봉선동, 포스코더샵아파트) 김미주 경기도 수원시 영통구 정명북로 33, 438동 1601호 (영통동, 정명마을삼성아파트) (잇면예 계속) (74) 대리인 특허법인다나	(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) A23B 7/10 (2006.01) A23B 7/155 (2017.01) C12R 1/01 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01) (52) C12특허분류 C12N 1/20 (2013.01) A23B 7/105 (2013.01) (21) 출원번호 10-2019-0014788 (22) 출원일자 2019년02월08일 심사청구일자 2019년02월08일 (56) 선행기술조사문헌 KR101099924 B1 (잇면예 계속) (73) 특허권자 한국식품연구원 전라북도 완주군 이서면 농생명로 245 (72) 발명자 김태운 광주광역시 남구 호사망길 14, 103동 1608호 (봉선동, 포스코더샵아파트) 김미주 경기도 수원시 영통구 정명북로 33, 438동 1601호 (영통동, 정명마을삼성아파트) (잇면예 계속) (74) 대리인 특허법인다나		
전체 청구항 수 : 총 7 항 (54) 발명의 명칭 신규한 락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움 균주, 및 이들을 이용한 김치 숙성도 제어 방법 (57) 요약 본 발명은 신규한 락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움 균주, 및 이들을 이용한 김치 숙성도 제어방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 김치 종균으로 락토코커스 락티스 균주 및 이의 내성균인 류코노스톡 시트리움 균주의 혼합균주배양액을 사용함으로써 종래의 유산균들의 생육을 억제함과 동시에 이들 균주에 의한 발효가 주도적으로 일어나 김치의 숙성도를 지연시키며, 균체 대신 공균배양액을 사용함으로써 공균의 활성을 극대화하여 락티스 및 류코노스톡 시트리움의 혼합배양액 사용배지 조성물	전체 청구항 수 : 총 8 항 (54) 발명의 명칭 락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움의 혼합배양액 사용배지 조성물 (57) 요약 본 발명은 락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움의 혼합배양액 사용배지 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 본 발명은 락토코커스 락티스(Lactococcus lactis)의 항균 활성을 극대화하고, 류코노스톡 시트리움(Leuconostoc citreum)과 혼합배양할 수 있는 식용억제제를 제공하는 효과가 있다. 또한, 상기의 혼합균주배양액을 김치 종균으로 사용하여 김치의 발효 속도를 조절함으로써 숙성도를 제어할 수 있는 숙성도 맞춤형 김치를 제조할 수 있다.		

- 현재 개발된 액상 김치 종균은 김치의 과숙에 관여하는 균주를 제어하는 효과가 있지만, 현실적인 김치 유통기한을 고려했을 때 김치 발효 지연 효과가 다소 부분이 있음. 따라서 김치종균의 항균활성을 더욱 높이는 배양 공정 개발이 필수적임. 또한 pH 조절제 등 배지의 일부 성분이 합성 첨가물로 되어 있어 이를 대체할 수 있는 천연 소재를 이용한 배지 조성 개발이 필요함
- 김치의 원부재료는 별도의 살균처리 없이 김치 제조에 사용되기 때문에 김치에의 종균 적용 효과는 담금 초기 김치 속에 함유되어 있는 초기 미생물수에 의해 많은 영향을 받음. 현재 개발된 김치 종균의 효과를 극대화하기 위해서는 원부재료의 초기 미생물수를 저감시키는 공정을 추가해야함으로 이를 개선하기 위한 공정개발이 필요한 실정임. 양념은 김치 발효에 관여하는 많은 수의 미생물을 함유하고 있고 절임배추 보다 부피가 작아 상대적으로 취급하기에 용이한 점이 있음. 항균 활성이 우수한 김치 종균을 이용하여 양념의 초기 미생물수를 효율적으로 저감시켜 김치 제조 공정을 단순화 시킬 수 있는 제조공정법 개발이 필요함
- 따라서, 수출용 김치의 품질유지기한 연장 및 발효특성 향상을 위한 김치 종균의 최적 활성화 기술 및 첨가 방법 등을 개선한 종균 김치 최적 제조 공정법 개발에 대한 연구를 수행하고자 하였음

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 현장 맞춤형 종균 최적 배양 기술 개발

○ 항균 활성 우수 종균의 균수 증대 및 항균 활성 물질 생산 증진을 위한 배지 조성 개발

- 이전 연구 결과 및 문헌 조사를 통해 *Lactococcus lactis* 배양 및 항균 활성 증진을 위한 배지 조성 성분 선정
- 탄소원으로는 lactose, glucose, 질소원으로는 yeast extract, peptone, whey protein concentrate, pH 완충제로는 potassium citrate, 성장 촉진제로 ascorbic acid를 선정
- 각각의 성분들의 최적 첨가 농도 및 혼합 비율을 도출하기 위하여 반응표면분석법을 적용
- 반응표면분석법 적용에 앞서 각각의 성분들의 최소 첨가량 및 최대 첨가량을 구하기 위하여 배지 조성을 달리하여 *Lactococcus lactis*를 배양한 후 균수와 항균 활성을 측정
- 균수는 *Lactococcus lactis*를 식용 배지에 접종하고 30℃에서 15시간 배양한 후 유산균용 petrifilm에 도말하여 측정
- 항균 활성은 *Lactococcus lactis* 배양액의 상등액을 취하여 0.2µm syringe filter로 필터링 한 후 대표적인 김치 과숙균인 *Latilactobacillus sake*에 대한 항균력을 well diffusion assay 방법으로 측정
- 반응표면분석법을 적용하여 *Lactococcus lactis*의 항균 활성 증진을 위한 최적 배지 조성 도출

○ 항균 활성 극대화를 위한 최적 배양 온도 및 시간 탐색

- 배양 온도 조건은 20, 25, 30, 35, 40℃로 설정하였으며, 배양 시간 조건은 10, 12, 14, 16, 18시간으로 두 시간 간격으로 설정
- 각각의 조건으로 *Lactococcus lactis*를 배양 후 상등액을 취하여 0.2 µm syringe filter로 필터링 한 후 대표적인 김치 과숙균인 *Latilactobacillus sake*에 대한 항균력을 well diffusion assay 방법으로 측정
- 배지 성분 조성 및 마찬가지로 반응 표면분석법을 적용하여 최적의 배양 온도 및 시간 도출

○ 합성 첨가물 대체 천연 소재를 이용한 식용 배지 조성 개발

- *Lactococcus lactis* 배양 용 식용 배지 성분 중 pH 완충제로 사용하는 potassium citrate를 천연 소재로 대체하기 위해 실험을 진행
- pH 완충 효과가 있다고 알려진 해조류 육수를 배지 제조 시 물 대신 각각 50, 25, 10% 사용하여 균 배양 전 후 pH를 측정
- 또한, 각 다시마 육수 농도별 배양액의 *Lactococcus lactis* 균수와 항균 활성을 위의 배지 조성 및 배양 조건 실험과 동일하게 측정

○ 김치 종균 활용 기술 김치제조업체 현장 애로사항 조사

- 전국의 김치제조업체 252개 업소를 대상으로 종균 이용 실태를 조사
- 김치업체 가운데 김치 종균이 정부 지원을 통해 개발·보급되거나 일부 김치업체에서 자체적으로 개발하여 사용하고 있다는 사실을 인지하고 있지 못하며, 사용해 본 경험도 없는 업체 비중이 53.2%로 과반 이상을 차지함

- 김치 종균은 인지하고 있으나 사용해 본 경험은 없다는 업체 비중은 35.3%, 인지하고 있으며 사용해 본 경험이 있는 업체는 11.5%로 조사됨
- 조사 대상 김치업체 중에서 사용 여부를 떠나 김치 종균에 대해 인지하고 있는 업체 비중은 절반에 가까운 46.3%로 나타나 2업체 중 1업체는 인지하고 있었음
- 김치업체의 종균 사용 경험은 평균 11.5%이며, 판매액 규모별로는 5억 미만의 업체가 2.2%에 불과한 반면, 50억 이상인 업체는 25%로 나타나 규모가 클수록 사용 경험이 높았음
- 김치 종균의 개발 사실을 인지하고 있음에도 불구하고 사용해 보지 않은 김치업체의 경우 43.8%가 김치종균 투입이 전통적인 제조방식과 맞지 않아서 사용하지 않는 것으로 조사됨. 다음으로는 김치 종균 구입 비용을 부담할 여력이 없기 때문이라는 응답 비중이 19.1%, 김치 종균을 사용해도 김치의 맛이나 품질 균일, 품질기한연장 등에 그다지 효과가 없을 것 같아서라는 비농은 15.7%, 김치 종균을 인위적으로 투입하면 소비자가 꺼려할 것 같아서 사용하지 않는다는 응답도 15.7%로 나타남

(인용문헌 ; 김치 종균의 이용실태와 가치 진단 연구, 한국농촌경제연구원, 2021, 세계김치연구소)

2-2. 종균 첨가 김치 발효 특성 분석을 통한 품질유지기한 연장 효과 검증

○ 종균 첨가 김치의 저장 기간에 따른 품질 특성 변화 평가

- 당일 제조한 맛김치를 구매하여 대조군(no treatment), 기존 배지, 신규 최적화 배지, 기존 배양액(균 + 배지), 신규 배양액(균 + 배지) 그룹으로 나누어 접종
- 종균을 첨가한 김치를 10℃에서 2주간 저장하며 2일 간격으로 pH, 산도, 총 유산균수의 변화를 측정
- 김치 100g을 핸드 믹서로 갈고 거즈로 거른 후 실험에 사용

○ 종균 첨가 김치의 저장 기간에 따른 미생물 군집 변화 분석

- 종균을 첨가한 김치 내 종균의 우점률을 검증하기 위하여 군집 분석을 진행
- 위의 실험에서 제조된 종균 첨가 김치 중 대조군(no treatment), 기존 배양액(균 + 배지), 신규 배양액(균 + 배지) 그룹의 미생물 군집 변화 분석
- 각 그룹의 김치 100g을 핸드 믹서로 갈고 거즈로 거른 후 김치국물을 취하여 미생물 군집 분석 샘플 준비 완료 (-80℃에 보관 중)
- 종균 적용 김치의 저장 기간별(0, 4, 8일) 미생물 군집 변화 분석

○ 김치 종균 최적 제조 공정법 적용에 따른 비용 분석

- 기존 공정법과 김치 종균 최적 제조공정법간에 투입비용과 기대효용을 도출하고 이를 통해 개선된 경제성이 얼마나 되는지를 일반적인 유통/판매환경에 도입하여 개선수준을 측정

2-3. Hurdle technology를 활용한 종균 김치 최적 제조 공정법 개발

- **항균 활성 우수 종균을 적용한 양념을 이용하여 김치 발효 지연 효과 최적화**
 - 양념 내 김치 발효 유산균수를 저감화 시키기 위하여 김치 제조 하루 전 양념에 미리 항균 활성 우수 종균을 적용한 후 4℃에 저장
 - 더욱 효과적으로 김치 발효 주도균의 성장을 억제하기 위하여 유기산(젖산)과 병용 처리하여 효과 분석
 - 대조군(no treatment), 기존 배양액(균 + 배지), 신규 배양액(균 + 배지), 신규 배양액(균 + 배지 + 젖산) 그룹의 유산균수 측정

- **수출용 김치의 품질유지기한 증대를 위한 최적 염도 및 당류 탐색**
 - 김치 발효지연 효과를 위해 CODEX 국제기준과 관능적 특성을 고려하여 염도(약 2.7%)를 설정하고 비발효당(솔비톨, 당도 약 11.5%)을 선별
 - 김치에 적용 후 저장 기간별(2일 간격 2주간) pH, 적정산도, 유산균수를 측정
 - 대조군(염도 1.7%, 당도10.8%), 염도 증가군(염도 2.6%, 당도 11.4%), 당 대체(염도 1.78%, 당도 11.3%), 염도 증가, 당 대체, 종균 배양액(염도 2.68%, 당도 11.6%, 종균 배양액 첨가) 그룹으로 나누어 진행

- **Hurdle technology 활용 최적 김치 제조법을 적용한 김치의 품질유지기한 연장 효과 검증**
 - 항균 활성 우수 종균과 젖산을 병용 처리한 후 저장기간별 김치의 이화학적 및 미생물학적 변화 분석
 - 김치의 pH, 적정산도, 유산균수 변화를 측정하고 미생물 군집, 대사체 분석 및 관능적 특성을 분석하여 품질유지기한 연장 효과 검증
 - 대조군(no treatment), 증류수, 젖산 0.5%, 젖산 1%, 종균 처리군, 젖산 0.5% + 종균, 젖산 1% + 종균 처리 그룹으로 나누어 진행

2-4. 개발 기술의 김치제조업체 현장 적용 및 상품김치 유통 환경에서의 현장 실증 실험

- **종균 김치 최적 제조 공정법 적용 시제품 생산 및 품질평가**
 - 최적 종균 배양 기술을 적용하여 500L fermenter에서 종균 대량 배양
 - 대량 배양된 종균을 이용하여 품질유지기한 연장 극대화 종균 김치 시제품 생산
 - 대조군(일반김치), 기존 종균 배양액 적용 김치, 신규 종균 배양액 적용 김치의 저장 기간별 염도, 당도, pH 변화를 측정하여 실증

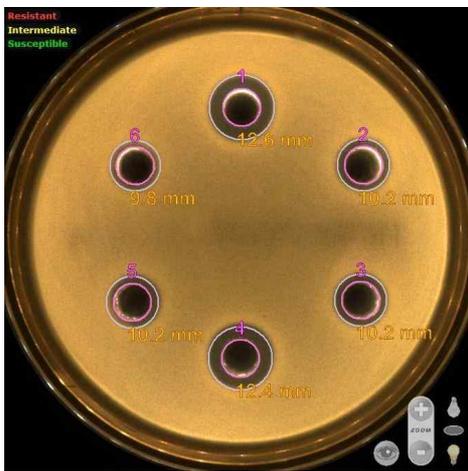
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 항균 활성 우수 종균의 균수 증대 및 항균 활성 물질 생산 증진을 위한 배지 조성 개발

- 배지에 첨가할 탄소원 조성을 위하여 lactose와 glucose를 각각 1: lactose 3%, 2: lactose 1.5% + glucose 1.5%, 3: glucose 3%, 4: lactose 5%, 5: lactose 2.5% + glucose 2.5%, 6: glucose 5%를 첨가한 후 항균 활성과 *Lactococcus lactis* 균수를 측정하였다. 그 결과 lactose 3%를 첨가한 배양액의 항균 활성이 가장 높았으며, 균수도 lactose 5%와 함께 가장 많이 나와(결과 1) 당 조성은 lactose 단일 사용으로 결정하였다.

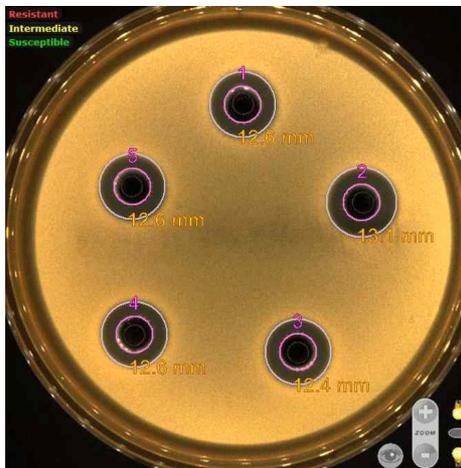


Sample	Inhibition zone (mm)				Average	STDEV
1	12.6	12.4	12.8	12.4	12.55	0.14832397
2	10.2	9.8	10.2	10.6	10.2	0.252982213
3	10.2	10.2	9.8	10.4	10.15	0.194935887
4	12.4	12	12.2	12.2	12.2	0.126491106
5	10.2	10.4	10.4	10.6	10.4	0.126491106
6	9.8	9.6	9.8	9.6	9.7	0.089442719

Sample	Log (CFU/mL)			Average	STDEV
1	9.390935	9.367356	9.409933	9.389408	0.017416
2	9.158362	9.181844	9.161368	9.167191	0.010433
3	9.012837	9.120574	9.167317	9.100243	0.064684
4	9.367356	9.423246	9.419956	9.403519	0.025607
5	9.11059	9.10721	9.093422	9.10374	0.007426
6	9.11059	9.037426	9.161368	9.103128	0.050873

<결과 1. 탄소원 조성에 따른 항균 활성 및 *Lactococcus lactis* 균수>

- Lactose 농도에 따른 *Lactococcus lactis* 배양액의 항균 활성과 균수를 측정하였으며, 처리군은 각각 1: lactose 2.5%, 2: lactose 3%, 3: lactose 3.5%, 4: lactose 4%, 5: lactose 4.5%를 첨가하였다. 항균 활성 및 균수에 있어서 전체적으로 큰 차이를 보이지 않았으나, lactose 2.5%, 3% 첨가 시 항균 활성이 가장 높게 나타났다(결과 2).

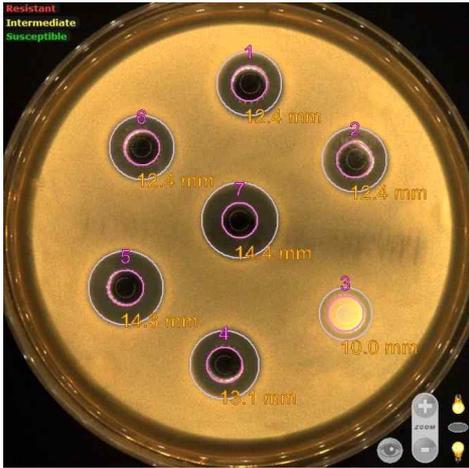


Sample	Inhibition zone (mm)				Average	STDEV
1	12.6	13	13.3	13	12.975	0.222485955
2	13.1	13.1	13	12.8	13	0.109544512
3	12.4	13	12.8	12.4	12.65	0.232379001
4	12.6	12	12.4	12.2	12.3	0.2
5	12.6	12.2	12.6	12.4	12.45	0.14832397

Sample	Log (CFU/mL)			Average	STDEV
1	9.378398	9.383815	9.390935	9.384383	0.005134
2	9.372912	9.332438	9.31597	9.34044	0.023925
3	9.380211	9.363612	9.374748	9.372857	0.006907
4	9.352183	9.374748	9.313867	9.346933	0.02513
5	9.245513	9.313867	9.326336	9.295239	0.035528

<결과 2. 탄소원 농도에 따른 항균 활성 및 *Lactococcus lactis* 균수>

- 배지에 첨가할 질소원 조성 설정을 위하여 yeast extract(YE), peptone(P), whey protein concentrate(WPC)를 각각 **총 3%의 농도로** 1: YE 3%, 2: P 3%, 3: WPC 3%, 4: YE 1.5% + P 1.5%, 5: YE 1.5% + WPC 1.5%, 6: P 1.5% + WPC 1.5%, 7: YE 1% + P 1% + WPC 1%를 첨가한 후 항균 활성과 *Lactococcus lactis* 균수를 측정하였다. 그 결과 YE 1.5% + WPC 1.5%와 YE 1% + P 1% + WPC 1% 첨가한 배양액의 항균 활성 이 가장 높았으며 균수도 많게 나타났다(결과 3).

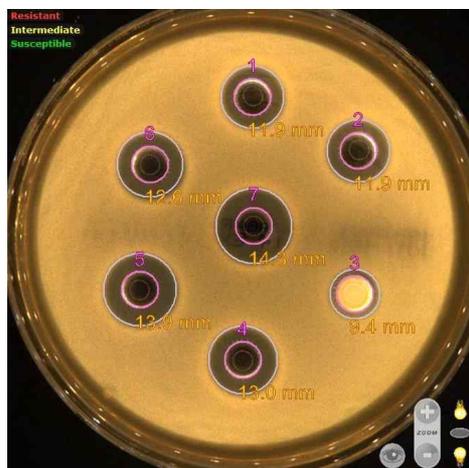


Sample	Inhibition zone (mm)				Average	STDEV
1	12.8	12.4	12.4	12	12.4	0.252982213
2	12.6	12.4	12.2	12.2	12.35	0.14832397
3	9.8	10	9.6	9.6	9.75	0.14832397
4	12.8	13.1	12.4	12.6	12.725	0.23130067
5	14.1	14.3	14.1	13.9	14.1	0.126491106
6	12.8	12.4	12.6	12.4	12.55	0.14832397
7	14.3	14.4	14.4	13.9	14.25	0.184390889

Sample	Log (CFU/mL)			Average	STDEV
1	9.487138	9.454845	9.474216	9.472066	0.013271
2	9.103804	9.161368	9.10721	9.124127	0.02637
3	8.919078	8.819544	8.919078	8.8859	0.046921
4	9.472756	9.423246	9.456366	9.450789	0.020594
5	9.502427	9.502427	9.523746	9.509534	0.01005
6	9.385606	9.382017	9.361728	9.37645	0.010513
7	9.510545	9.495544	9.506505	9.504198	0.006338

<결과 3. 질소원 조성(3%)에 따른 항균 활성 및 *Lactococcus lactis* 균수>

- 배지에 첨가할 질소원 조성 설정을 위하여 yeast extract(YE), peptone(P), whey protein concentrate(WPC)를 각각 **총 5%의 농도로** 1: YE 5%, 2: P 5%, 3: WPC 5%, 4: YE 2.5% + P 2.5%, 5: YE 2.5% + WPC 2.5%, 6: P 2.5% + WPC 2.5%, 7: YE 1.7% + P 1.7% + WPC 1.7%를 첨가한 후 항균 활성과 *Lactococcus lactis* 균수를 측정하였다. 그 결과 YE 2.5% + WPC 2.5%와 YE 1.7% + P 1.7% + WPC 1.7% 첨가한 배양액의 항균 활성 이 가장 높았으며 균수도 많게 나타났다(결과 4). 질소원 농도 3, 5%간의 항균 활성 및 균수에 차이를 보이지 않아 질소원 농도는 3%로 결정하였으며, 조성 또한 YE, WPC 두 가지를 혼합한 것과 YE, P, WPC 세 가지를 혼합한 것 간에 별다른 차이를 보이지 않아 제조 편의성을 위해 YE, WPC 두 가지 혼합으로 선정하였다.

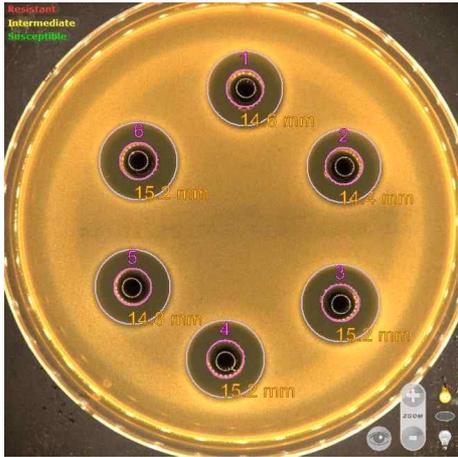


Sample	Inhibition zone (mm)				Average	STDEV
1	11.7	11.5	11.3	11.9	11.6	0.2
2	11.9	11.9	12	11.9	11.925	0.038729833
3	9.4	9.4	9.4	9.4	9.4	0
4	13.1	12.4	13	13	12.875	0.247991935
5	13.9	13.7	13.9	13.9	13.85	0.077459667
6	12.8	12.6	13	12.6	12.75	0.14832397
7	14.4	14.3	14.4	14.3	14.35	0.04472136

Sample	Log (CFU/mL)			Average	STDEV
1	9.33646	9.350248	9.436163	9.37429	0.044111
2	9.082785	9.075547	9.161368	9.106567	0.038863
3	9.167317	9.193125	9.164353	9.174932	0.012921
4	9.482874	9.489958	9.4843	9.485711	0.00306
5	9.534026	9.561101	9.525045	9.540057	0.015325
6	9.477121	9.485721	9.468347	9.477063	0.007093
7	9.594393	9.577492	9.561101	9.577662	0.013592

<결과 4. 질소원 조성(5%)에 따른 항균 활성 및 *Lactococcus lactis* 균수>

- 배지에 첨가할 질소원인 yeast extract(YE)와 whey protein concentrate(WPC)의 첨가 비율을 결정하기 위하여 각각 1,4: (YE : WPC = 1 : 1), 2,5: (YE : WPC = 1 : 4), 3,6: (YE : WPC = 4 : 1)로 첨가 한 후 항균 활성과 *Lactococcus lactis* 균수를 측정하였다. 그 결과 YE : WPC = 1 : 4로 첨가한 배양액의 항균 활성이 가장 높게 나타났으며, 균수는 별다른 차이를 보이지 않았다(결과 5).

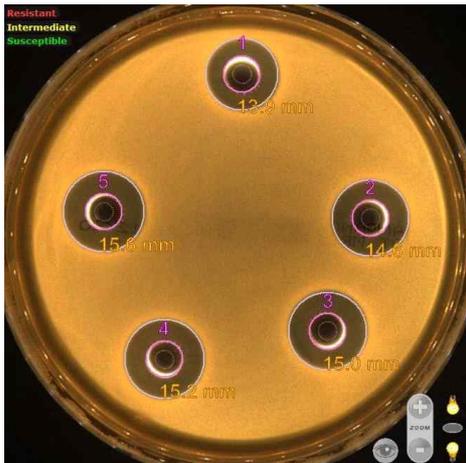


Sample	Inhibition zone (mm)				Average	STDEV
1	14.6	14.8	14.6	14.6	14.65	0.077459667
2	14.4	14.6	14.4	14.6	14.5	0.089442719
3	15.2	14.8	15	15.2	15.05	0.14832397

Sample	Log (CFU/mL)			Average	STDEV
1	9.561101	9.541579	9.583199	9.56196	0.017002
2	9.444045	9.472756	9.457882	9.458228	0.011724
3	9.539076	9.544068	9.580925	9.55469	0.018663

<결과 5. 질소원 혼합 비율에 따른 항균 활성 및 *Lactococcus lactis* 균수>

- 배지에 첨가할 pH 완충제인 구연산 칼륨의 농도를 결정하기 위하여 각각 1: 1%, 2: 1.5%, 3: 2%, 4: 2.5%, 5: 3%로 배지에 첨가한 후 항균 활성과 *Lactococcus lactis* 균수를 측정하였다. 그 결과 3% 구연산 칼륨을 첨가한 배양액의 항균 활성이 가장 높게 나타났으며, 한편 균수는 항균 활성과는 다르게 2% 첨가 시 가장 많이 나왔다(결과 6).



Sample	Inhibition zone (mm)				Average	STDEV
1	13.9	14.3	13.9	14.1	14.05	0.14832397
2	14.6	14.6	14.6	14.6	14.6	0
3	15	14.8	14.8	15.2	14.95	0.14832397
4	15.2	15.2	15	15.4	15.2	0.126491106
5	15.6	15.9	15.7	15.7	15.725	0.097467943

Sample	Log (CFU/mL)			Average	STDEV
1	9.511883	9.4843	9.478566	9.491583	0.014544
2	9.550228	9.559907	9.542825	9.550987	0.006994
3	9.572872	9.597695	9.547775	9.57278	0.02038
4	9.501059	9.535294	9.459392	9.498582	0.031036
5	9.472756	9.513218	9.363612	9.449862	0.063185

<결과 6. 구연산 칼륨 농도에 따른 항균 활성 및 *Lactococcus lactis* 균수>

- 이상의 결과들을 종합하면 아래의 결과와 같다.

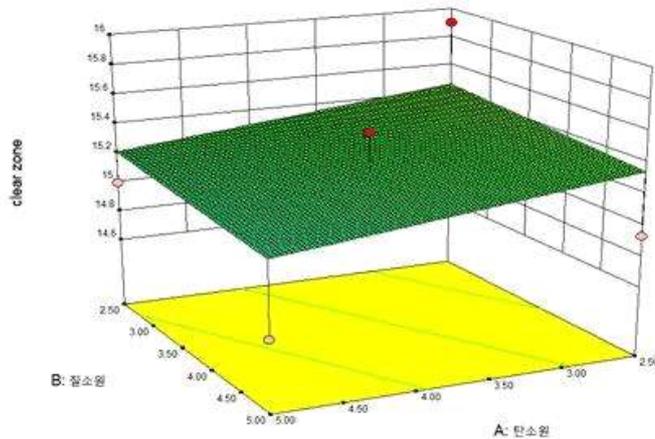
Group (%, w/v)	Inhibition zone (mm)	<i>L. lactis</i> (log CFU/mL)
Carbon source		
Lactose 3%	12.55 ± 0.15a	9.39 ± 0.02a
Glucose 3%	10.15 ± 0.20c	9.01 ± 0.07b
Lactose 1.5% + Glucose 1.5%	10.2 ± 0.25c	9.17 ± 0.01b
Lactose 5%	12.2 ± 0.13b	9.40 ± 0.03a
Glucose 5%	9.7 ± 0.09d	9.10 ± 0.05b
Lactose 2.5% + Glucose 2.5%	10.4 ± 0.13c	9.10 ± 0.01b
Nitrogen source		
YE 3%	12.4 ± 0.25e	9.47 ± 0.01cd
Peptone 3%	12.35 ± 0.15e	9.12 ± 0.03g
WPC 3%	9.75 ± 0.15h	8.89 ± 0.05h
YE 1.5% + Peptone 1.5%	12.73 ± 0.23cd	9.45 ± 0.02d
YE 1.5% + WPC 1.5%	14.1 ± 0.13a	9.51 ± 0.01bc
Peptone 1.5% + WPC 1.5%	12.55 ± 0.15de	9.38 ± 0.01e
YE 1% + Peptone 1% + WPC 1%	14.25 ± 0.18a	9.50 ± 0.01bc
YE 5%	11.6 ± 0.20g	9.37 ± 0.04e
Peptone 5%	11.93 ± 0.04f	9.11 ± 0.04g
WPC 5%	9.4i	9.17 ± 0.01f
YE 2.5% + Peptone 2.5%	12.88 ± 0.25c	9.49cd
YE 2.5% + WPC 2.5%	13.82 ± 0.08b	9.54 ± 0.02ab
Peptone 2.5% + WPC 2.5%	12.75 ± 0.15cd	9.48 ± 0.01cd
YE 1.7% + Peptone 1.7% + WPC 1.7%	14.35 ± 0.05a	9.58 ± 0.01a
pH buffer		
PC 1%	14.05 ± 0.15d	9.49 ± 0.01ab
PC 1.5%	14.6c	9.55 ± 0.01a
PC 2%	14.95 ± 0.15bc	9.57 ± 0.02a
PC 2.5%	15.2 ± 0.13b	9.50 ± 0.03ab
PC 3%	15.73 ± 0.10a	9.45 ± 0.06bc
PC 3.5%	15 ± 0.14bc	9.10 ± 0.06d
PC 4%	14.7 ± 0.26c	9.40 ± 0.03c
PC 4.5%	14.83 ± 0.48bc	9.10 ± 0.01d
PC 5%	13.6 ± 0.50d	9.10 ± 0.05d

Note: YE, yeast extract; WPC, whey protein concentrate; PC, potassium citrate

- 위의 결과들을 토대로 배지에 첨가할 탄소원, 질소원, pH 완충제 각각의 최소, 최대 범위값을 설정하였으며, 세 가지 요인에 대한 최적 혼합비를 구하기 위하여 반응표면분석법을 적용하였다. 그 결과 lactose 2.5%, 질소원(YE + WPC) 2.5%, 구연산칼륨 3% 첨가가 *Lactococcus lactis* 배양액의 항균 활성을 최대화 시킬 수 있는 혼합비로 도출되었다(결과 7).

경우	Lactose (%)	Yeast extract + Whey protein concentrate (%)	구연산칼륨 (%)	항균 활성 (Inhibition zone (mm))
1	3.75	3.75	2	15.47
2	2.5	2.5	2	15.90
3	3.75	3.75	2	15.47
4	3.75	5	3	15.67
5	3.75	5	1	15.27
6	5	3.75	3	16.17
7	2.5	3.75	3	15.53
8	3.75	2.5	1	14.47
9	3.75	3.75	2	15.47
10	5	3.75	1	14.47
11	2.5	3.75	1	14.87
12	2.5	5	2	14.93
13	5	2.5	2	15.00
14	3.75	3.75	2	15.47
15	3.75	2.5	3	15.57
16	3.75	3.75	2	15.47
17	5	5	2	14.60

Design-Expert? Software
 Factor Coding: Actual
 clear zone
 ● Design points above predicted value
 ○ Design points below predicted value
 16.1667
 14.4667
 X1 = A: 탄소원
 X2 = B: 질소원
 Actual Factor
 C: 완충제 = 2.00



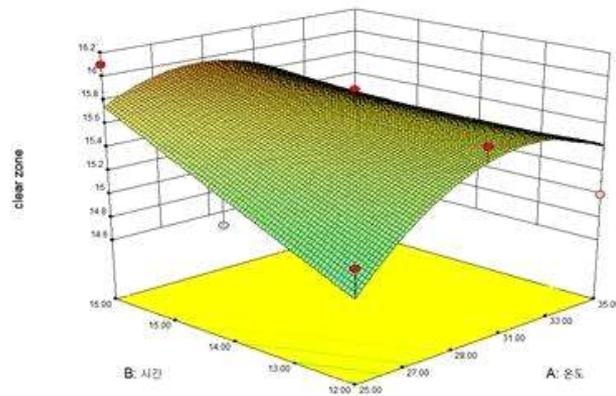
<결과 7. 반응표면분석법 적용 배지 혼합비 최적화>

○ 항균 활성 극대화를 위한 최적 배양 온도 및 시간 탐색

- *Lactococcus lactis*의 배양 온도 조건은 20, 25, 30, 35, 40°C로 배양 시간 조건은 10, 12, 14, 16, 18시간으로 두 시간 간격으로 설정하고 반응표면분석법을 적용하여 최적의 배양 조건을 탐색하였다. 그 결과 배양 온도 25°C에서 18시간 배양 조건이 항균 활성을 극대화 할 수 있는 최적의 조건으로 도출되었다(결과 8).

경우	온도 (°C)	시간 (hour)	항균 활성 (Inhibition zone (mm))
1	30	14	15.9
2	25	18	16.37
3	30	18	15.97
4	30	12	15.67
5	35	16	15.13
6	35	12	15
7	30	10	15.4
8	25	12	15
9	30	16	15.8
10	25	14	15.03
11	25	16	16.1
12	20	14	13.63
13	40	14	14.27

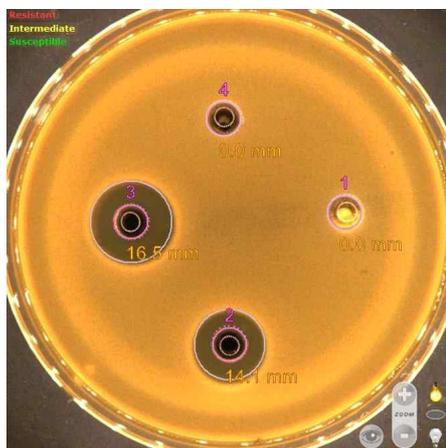
Design-Expert® Software
Factor Coding: Actual
clear zone
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value
16.37
13.63
X1 = A: 온도
X2 = B: 시간



<결과 8. 반응표면분석법 적용 배양 조건 최적화>

○ 최적 배지 조성 및 배양 조건 적용 *Lactococcus lactis* 배양액과 기존 특허 반영 배양액의 항균 활성 비교

- Lactose 2.5%, YE + WPC 2.5%, 구연산칼륨 3%, ascorbic acid 0.05% 첨가한 식용배지에 *Lactococcus lactis*를 25°C, 18시간 배양 후 취한 배양액과, 기존 특허 배지인 Lactose 3%, YE 3%, 구연산칼륨 1%, ascorbic acid 0.05% 첨가된 배지에 *Lactococcus lactis*를 30°C, 15시간 배양 후 취한 배양액의 *Latilactobacillus sakei* 항균 활성을 측정하였다. 그 결과 항균 활성은 약 16%정도 상승하였으며, 균수에는 큰 차이를 보이지 않았다(결과 9).



Sample	Inhibition zone (mm)				Average	STDEV
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	14.1	14.1	14.4	14.4	14.25	0.134164079
4	16.3	16.5	16.7	16.7	16.55	0.14832397

Sample	Log (CFU/mL)			Average	STDEV
3	9.468347	9.49693	9.456366	9.473881	0.017016
4	9.535294	9.599883	9.536558	9.557245	0.030154

<결과 9. 항균 활성 극대화 배양액과 기존 배양액의 항균 활성 및 *Lactococcus lactis* 균수>

- 항균 활성 차이의 원인을 구명하기 위하여 각 종균 배양액의 Nisin 함량을 측정하였다. 그 결과 최적 배지 조성 및 배양 조건을 적용한 신규 배양액의 Nisin 함량이 약 2배 높게 측정되었다(결과10).

Group	Medium composition				Culture condition		Nisin Z ($\mu\text{g/mL}$)
	C-source	N-source	pH buffer	Antioxidant	Temperature	Time	
	(%)	(%)	(%)	(%)	($^{\circ}\text{C}$)	(h)	
기존	3	3	1	0.05	30	15	1.23 ± 0.05^b
신규	2.5	2.5	3	0.05	25	18	2.58 ± 0.11^a

<결과 10. 기존 및 신규 종균 배양액의 Nisin 함량>

○ 합성 첨가물 대체 천연 소재를 이용한 식용 배지 조성 개발

- *Lactococcus lactis* 배양 용 식용 배지 성분 중 pH 완충제로 사용하는 구연산칼륨을 천연 소재로 대체하기 위해 실험을 진행하였다. 다시마 육수를 사용하여 배지 제조 시 물 대신 각각 50, 25, 10% 사용하여 균 배양 전 후 pH를 측정한 결과 구연산칼륨을 첨가한 배지에 비해 pH 완충 효과가 떨어지고 최소 농도인 10% 대체 시에도 *Lactococcus lactis* 균의 생장이 저하되고 항균 활성이 낮아졌다.

○ 종균 첨가 김치의 저장 기간에 따른 품질 특성 변화 평가

- 당일 제조된 맛김치를 1: 대조군(no treatment), 2: 기존 배지, 3: 신규 최적화 배지, 4: 기존 배양액(균 + 배지), 5: 신규 배양액(균 + 배지) 접종 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다. 10 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2주간 저장하며 2일 간격으로 pH, 산도, 총 유산균수의 변화를 측정한 결과 pH는 대조군의 경우 저장 6일차에, 기존 배양액 처리군의 경우 12일차에 4.2까지 떨어졌으나 반면에 신규 배양액의 경우 14일차까지 4.3 정도를 유지하였다(결과 11). 산도의 경우 0.9를 기준으로 대조군은 저장 8일차, 기존 배양액은 12일차에 도달하였으며, 신규 배양액의 경우 12일차까지는 도달하지 않았지만 14일차에는 평균 0.95정도로 측정되었다(결과 12). 총 유산균 수는 초기 *Lactococcus lactis*의 접종으로 인하여 기존 배양액과 신규 배양액의 균수가 대조군에 비해 2 log CFU/mL 이상 많게 나왔지만 저장 4일차부터 균수가 비슷하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다(결과 13).

처리군	pH							
	0 (day)	2	4	6	8	10	12	14
1	5.72	5.84	4.85	4.2	4.16	4.07	4.02	4
	5.74	5.8	4.79	4.24	4.11	4.05	4	3.99
	5.75	5.87	4.87	4.22	4.15	4.06	3.99	3.99
2	5.87	5.94	4.75	4.25	4.1	4.05	4	3.98
	5.83	5.93	4.7	4.2	4.1	4.05	4.02	3.97
	5.85	5.95	4.65	4.25	4.1	4.03	4.02	3.96
3	5.88	5.92	4.93	4.26	4.14	4.05	4.07	4
	5.87	5.93	4.73	4.23	4.16	4.09	4.03	3.95
	5.89	5.85	4.8	4.19	4.13	4.04	4.04	4
4	5.68	5.69	4.88	4.53	4.35	4.25	4.23	4.14
	5.62	5.61	5.07	4.54	4.36	4.25	4.2	4.19
	5.68	5.67	4.87	4.5	4.38	4.26	4.22	4.15
5	5.6	5.48	5.05	4.72	4.56	4.38	4.35	4.28
	5.54	5.58	5.04	4.62	4.56	4.51	4.33	4.3
	5.54	5.53	5.05	4.7	4.55	4.4	4.31	4.3

<결과 11. 저장 기간에 따른 김치의 pH 변화>

산도								
처리군	0 (day)	2	4	6	8	10	12	14
1	0.42	0.37	0.59	0.82	0.94	1.08	1.04	1.17
	0.38	0.34	0.57	0.81	0.89	0.99	1.06	1.10
	0.41	0.31	0.54	0.81	0.93	1.01	1.06	1.10
2	0.34	0.29	0.56	0.77	0.86	0.90	1.04	1.09
	0.41	0.32	0.54	0.78	0.87	0.92	1.01	1.05
	0.35	0.29	0.52	0.77	0.89	0.94	0.99	1.00
3	0.35	0.32	0.57	0.82	0.95	1.03	1.09	1.13
	0.31	0.32	0.53	0.84	0.87	1.06	1.04	1.15
	0.30	0.33	0.56	0.85	0.95	0.96	1.08	1.15
4	0.34	0.36	0.48	0.65	0.74	0.87	0.93	0.99
	0.37	0.37	0.50	0.66	0.79	0.87	0.87	0.97
	0.34	0.35	0.48	0.64	0.78	0.84	0.92	1.03
5	0.40	0.37	0.46	0.59	0.69	0.78	0.90	0.98
	0.39	0.39	0.48	0.59	0.69	0.84	0.84	0.95
	0.34	0.37	0.45	0.61	0.69	0.79	0.83	0.94

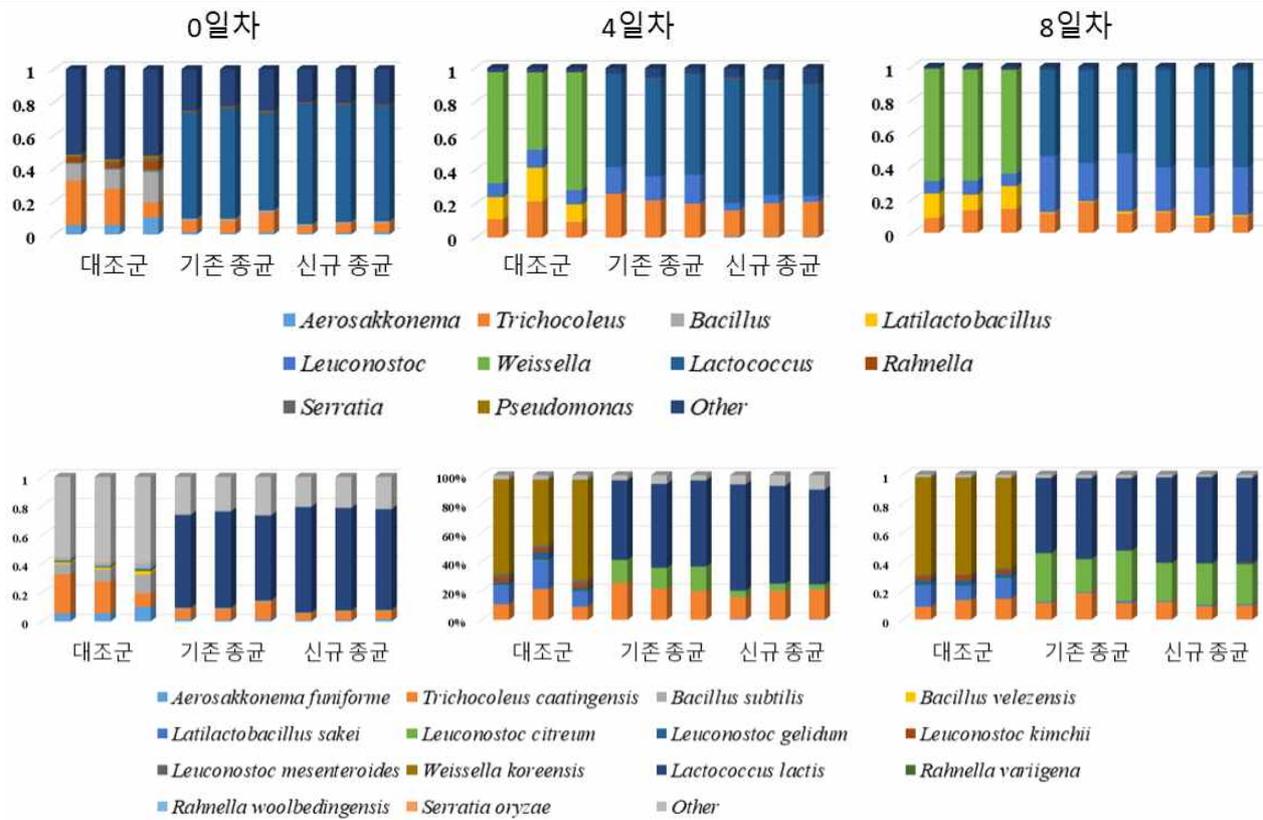
<결과 12. 저장 기간에 따른 김치의 산도 변화>

균수 (log CFU/mL)								
처리군	0 (day)	2	4	6	8	10	12	14
1	6.02	7.10	8.70	8.94	8.99	8.87	8.84	8.58
	6.00	7.10	8.71	8.89	8.92	8.88	8.85	8.60
	6.02	7.16	8.65	8.93	8.90	8.90	8.90	8.51
2	5.92	7.23	8.67	8.86	8.88	8.76	8.92	8.57
	5.97	7.26	8.73	8.90	8.86	8.90	8.84	8.57
	5.93	7.23	8.67	8.88	8.90	8.84	8.73	8.56
3	5.99	7.15	8.61	8.97	8.88	8.97	8.94	8.75
	5.91	7.16	8.68	8.89	8.85	9.00	8.90	8.71
	5.95	7.13	8.76	8.88	8.91	8.92	8.86	8.69
4	8.27	8.39	8.81	8.99	8.97	8.94	8.86	8.79
	8.28	8.40	8.75	9.00	9.00	9.02	8.85	8.81
	8.26	8.39	8.79	9.02	9.01	8.99	8.89	8.75
5	8.39	8.45	8.76	8.92	8.96	8.98	8.92	8.76
	8.30	8.47	8.72	8.90	8.89	9.05	8.83	8.82
	8.36	8.45	8.76	8.94	8.92	8.98	8.89	8.81

<결과 13. 저장 기간에 따른 김치의 총 유산균수 변화>

○ 종균 첨가 김치의 저장 기간에 따른 미생물 군집 변화 분석

- *Lactococcus lactis*를 종균으로 첨가한 김치 내 종균의 우점률을 검증하기 위하여 대조군 김치와, 기존 배양액(균 + 배지)을 첨가한 김치, 신규 배양액(균 + 배지)을 첨가한 김치 샘플을 채취하여 분석하였다. Species 수준에서 분석한 결과 대조군은 저장 기간이 지남에 따라 *Weissella koreensis*와 *Lactilactobacillus sakei*가 크게 증가하였다. 그에 반해 종균 적용 김치의 경우 종균으로 적용한 *Lactococcus lactis*와 *Leuconosotoc citreum* 군주가 우점균을 차지하였다(결과 14). 이러한 결과는 항균 활성 우수 군주인 *L. lactis* 군주가 효과적으로 김치 발효 유산균들의 생장을 억제하였으며, 만니톨을 생산하여 김치의 관능적 특성에 긍정적인 영향을 주는 *Leu. citreum*은 *L. lactis*의 항균 활성에 영향을 받지 않고 잘 성장한다는 것을 보여주었다.



<결과 14. 저장 기간에 따른 김치의 미생물 군집 변화>

○ 항균 활성 우수 종균을 적용한 양념을 이용하여 김치 발효 지연 효과 최적화

- 김치 양념 내 초기 유산균수를 효과적으로 저감화하기 위하여 김치 제조 하루 전 양념에 미리 종균을 접종하고 15시간 후 양념 내 유산균 수를 측정하였다. 그 결과 대조군과 기존 종균, 신규 종균 처리군은 초기 균수에 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 신규 종균과 젓산 1% 병용 처리는 유의적으로 초기 김치 유산균수를 감소시키는 것을 확인하였다(결과 15).

	콜로니수	균수	log CFU/mL
대조군	169	1690000	6.23
	170	1700000	6.23
	173	1730000	6.24
기존 종균	164	1640000	6.21
	169	1690000	6.23
	171	1710000	6.23
신규 종균	133	1330000	6.12
	130	1300000	6.11
	143	1430000	6.16
신규 종균 + 젓산 1%	43	430000	5.63
	56	560000	5.75
	37	370000	5.57

<결과 15. 종균 및 젓산 적용 김치 양념의 유산균 수 변화>

○ 수출용 김치의 품질유지기한 증대를 위한 최적 염도 및 당류 탐색

- 종균 적용 김치의 품질유지기한 연장 극대화를 위해 염도를 증가시키고 비발효당인 솔비톨로 당을 대체하여 2주간 2일 간격으로 김치의 pH, 적정산도, 유산균수를 측정하였다. 그 결과 염도 1% 증가군의 경우 대조군 김치에 비해 2일 정도 발효를 지연시켰으며, 솔비톨로 당 대체는 별다른 효과를 보이지 않았다(결과 16). 수출용 김치는 품질유지기한 연장을 위해 어느 정도 염도 조절도 필요해 보였다.

Day	Sample	대조군			Average	SD	염도 1% 증가군			Average	SD	당 대체군			Average	SD	염도 증가, 당 대체, 종균			Average	SD
0		5.77	5.78	5.77	5.77	0.00	5.80	5.81	5.85	5.82	0.02	5.81	5.74	5.74	5.76	0.03	5.47	5.45	5.54	5.49	0.04
2		5.67	5.55	5.67	5.63	0.06	5.64	5.55	5.57	5.59	0.04	5.66	5.62	5.67	5.65	0.02	5.43	5.40	5.37	5.40	0.02
4		5.03	5.03	5.09	5.05	0.03	5.09	5.26	5.14	5.16	0.07	5.16	5.07	5.07	5.10	0.04	5.20	5.26	5.27	5.24	0.03
6		4.34	4.41	4.37	4.37	0.03	4.37	4.41	4.35	4.38	0.02	4.36	4.40	4.38	4.38	0.02	5.16	5.14	5.06	5.12	0.04
8		4.28	4.30	4.25	4.28	0.02	4.34	4.36	4.44	4.38	0.04	4.30	4.23	4.29	4.27	0.03	5.13	4.93	4.83	4.96	0.12
10		4.17	4.11	4.18	4.15	0.03	4.17	4.25	4.22	4.21	0.03	4.14	4.17	4.15	4.15	0.01	4.93	4.70	4.83	4.82	0.09
12		4.07	4.07	4.11	4.08	0.02	4.10	4.11	4.14	4.12	0.02	4.10	4.12	4.13	4.12	0.01	4.48	4.66	4.78	4.64	0.12
14		4.03	4.12	4.10	4.08	0.04	4.12	4.14	4.09	4.12	0.02	4.07	4.06	4.10	4.08	0.02	4.56	4.49	4.52	4.52	0.03

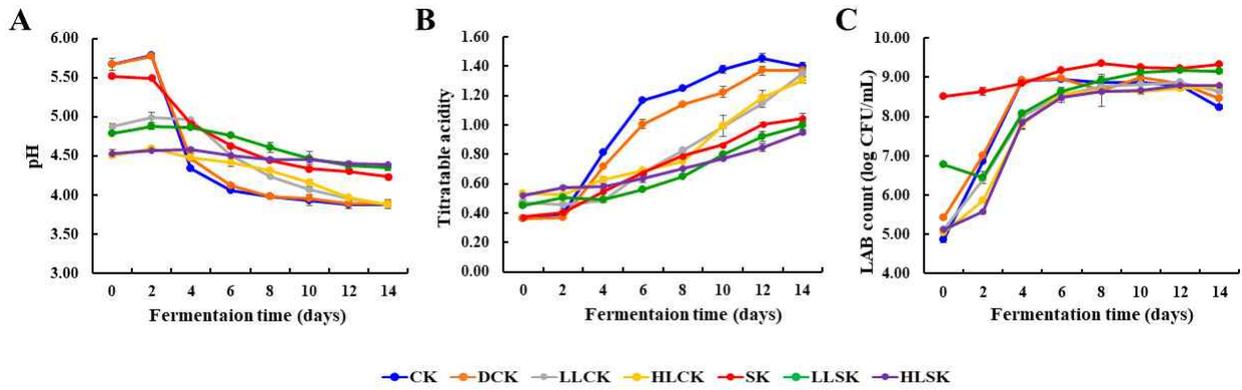
Day	Sample	대조군			Average	SD	염도 1% 증가군			Average	SD	당 대체군			Average	SD	염도 증가, 당 대체, 종균			Average	SD
0		0.38	0.36	0.35	0.36	0.01	0.34	0.34	0.33	0.34	0.00	0.33	0.33	0.33	0.33	0.00	0.36	0.40	0.36	0.37	0.02
2		0.36	0.36	0.34	0.35	0.01	0.35	0.37	0.35	0.36	0.00	0.35	0.35	0.34	0.35	0.00	0.39	0.40	0.38	0.39	0.01
4		0.44	0.46	0.44	0.45	0.01	0.46	0.43	0.43	0.44	0.01	0.42	0.44	0.43	0.43	0.01	0.41	0.41	0.42	0.41	0.00
6		0.73	0.73	0.74	0.73	0.00	0.67	0.67	0.72	0.69	0.02	0.73	0.72	0.72	0.72	0.00	0.45	0.46	0.45	0.45	0.00
8		0.97	0.89	0.90	0.92	0.04	0.82	0.81	0.79	0.81	0.01	0.86	0.88	0.85	0.86	0.01	0.47	0.79	0.50	0.59	0.14
10		1.01	0.98	1.06	1.02	0.03	0.94	0.94	0.97	0.95	0.01	1.03	1.00	1.03	1.02	0.01	0.56	0.59	0.60	0.58	0.02
12		1.12	1.13	1.13	1.13	0.00	1.00	1.06	1.01	1.02	0.03	1.05	1.09	1.07	1.07	0.02	0.68	0.64	0.60	0.64	0.03
14		1.21	1.19	1.15	1.18	0.02	1.09	1.10	1.08	1.09	0.01	1.13	1.14	1.14	1.14	0.00	0.73	0.74	0.73	0.73	0.00

Day	Sample	대조군			Average	SD	염도 1% 증가군			Average	SD	당 대체군			Average	SD	염도 증가, 당 대체, 종균			Average	SD
0		5.81	5.93	5.85	5.86	0.05	5.68	5.70	5.67	5.68	0.01	5.88	5.67	5.68	5.74	0.09	7.43	7.62	7.53	7.53	0.08
2		6.61	6.41	6.56	6.53	0.08	5.89	5.95	6.02	5.95	0.05	6.67	6.23	6.32	6.41	0.19	7.61	7.83	7.62	7.69	0.10
4		8.62	8.72	8.63	8.66	0.04	8.72	8.11	8.76	8.53	0.30	8.54	8.70	8.54	8.59	0.08	8.05	7.97	8.10	8.04	0.05
6		8.98	9.02	8.98	8.99	0.02	8.92	8.54	8.87	8.78	0.17	8.97	9.00	9.05	9.01	0.03	8.41	8.18	8.36	8.32	0.10
8		8.85	8.88	8.90	8.88	0.02	8.83	8.87	8.86	8.85	0.02	8.81	8.70	8.86	8.79	0.07	8.54	8.59	8.54	8.56	0.02
10		8.85	8.89	8.84	8.86	0.02	8.91	8.83	8.83	8.86	0.04	8.96	8.97	8.85	8.93	0.05	8.79	8.86	8.76	8.80	0.04
12		8.79	8.81	8.77	8.79	0.02	8.79	8.73	8.81	8.78	0.03	8.83	8.8	8.85	8.83	0.02	8.94	8.83	8.79	8.85	0.06
14		8.74	8.67	8.61	8.67	0.05	8.80	8.79	8.63	8.74	0.08	8.79	8.92	8.81	8.84	0.06	8.99	8.93	8.98	8.97	0.03

<결과 16. 염도 및 당 변화에 따른 김치 발효 특성 변화>

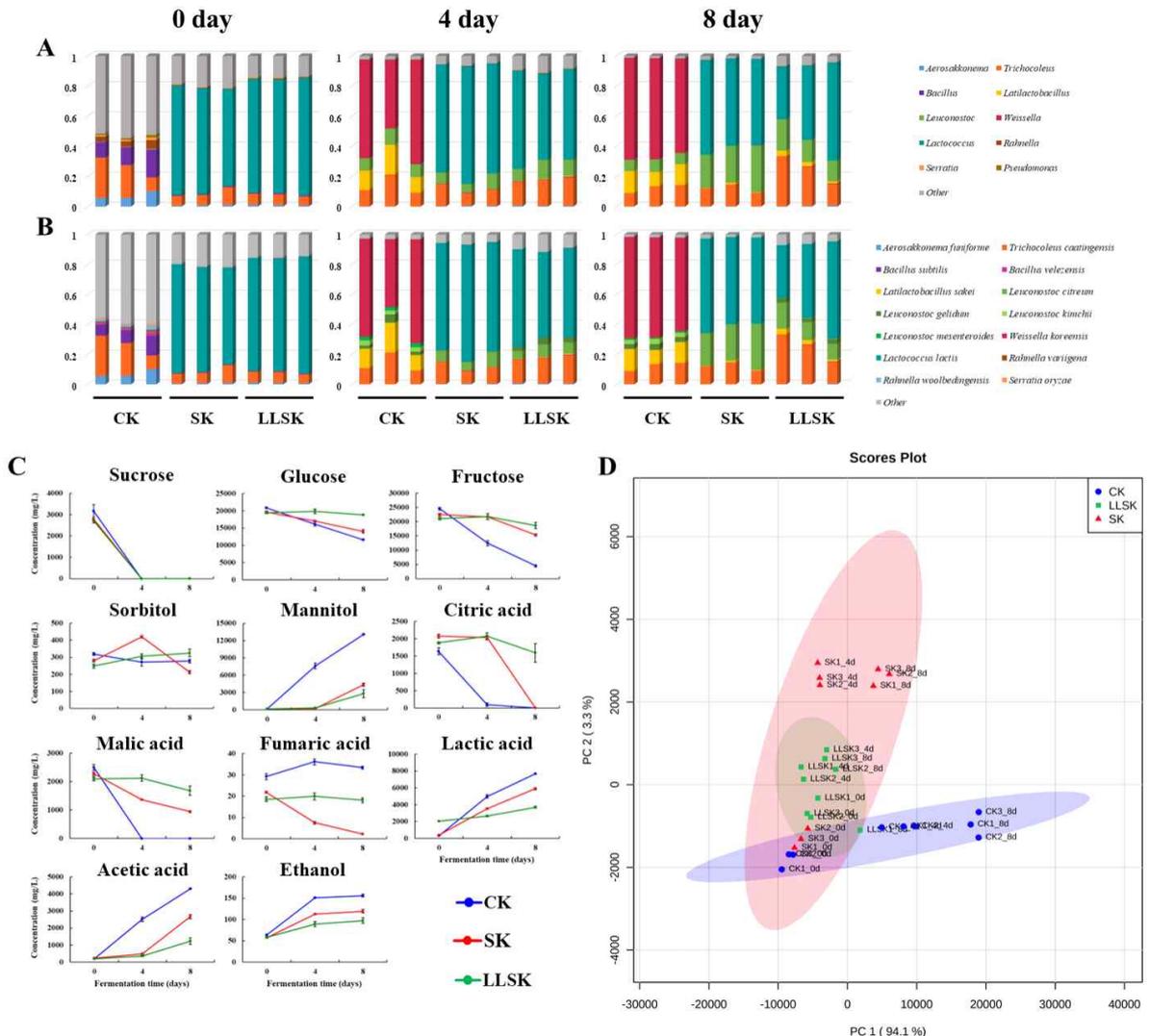
○ Hurdle technology 활용 최적 김치 제조법을 적용한 김치의 품질유지기한 연장 효과 검증

- 기존 일반김치와 종균 첨가 김치간의 품질유지기한 연장에 대한 명확한 비교를 위한 기준 지표로서 pH, 산도, 젖산 함량, 관능검사를 실시하였다. 이전 실험 결과들을 토대로 항균 활성 우수 종균과 젖산의 병용 처리가 가장 효과적으로 김치의 품질유지기한을 유지시킬 수 있다고 판단하였다. 이를 실증하기 위하여 대조군(CK: no treatment), 증류수(DK), 젖산 0.5%(LLCK), 젖산 1%(HLCK), 종균 처리군(SK), 젖산 0.5% + 종균(LLSK), 젖산 1% + 종균(HLSK) 그룹의 저장 기간별 pH, 적정산도, 유산균수 변화를 측정하였다. 그 결과 CK와 DK의 경우 별다른 차이 없이 저장 6일차 경에 적정산도 1.0 이상으로 측정되었다. 반면 젖산 처리군(LLCK, HLCK)의 경우 저장 8일차까지는 종균 처리군들과 비슷한 수준의 발효 지연 효과를 보였지만 그 이후로 급격히 발효가 진행되었다(결과 17). 종균 처리군(SK, LLSK, HLSK)의 경우 효과적으로 김치의 발효가 지연되었으며, 특히 젖산 0.5, 1.0% 모두 종균과 병용 처리 시 유의적으로 김치의 발효를 더욱 지연시키는 것으로 보여졌다(결과 17). 이에 따라 김치의 관능적 특성의 변화를 고려하여 젖산의 농도는 0.5%를 첨가하는 것이 좋을 것으로 판단하였다.



<결과 17. 종균과 젖산 처리에 따른 김치 발효 특성 변화>

이어서 김치 발효 지연 효과의 미생물학적 메커니즘 구명을 위하여 대조군(CK: no treatment), 종균 처리군(SK), 젖산 0.5% + 종균 처리군(LLSK) 김치 샘플의 미생물 군집 변화, 대사체 변화를 측정하고, 통계적으로 각 처리군 간의 발효 차이를 분석하였다. 결과적으로 CK에 비해 SK, LLSK 김치 샘플은 유기산의 함량이 적고 김치 발효 주도균의 생장이 억제된 것을 볼 수 있었다(결과 18). 특히 젖산의 병용 처리는 종균 단독 처리군에 비해 저장 온도 10°C, 적정산도 1.0(김치가 완전히 익은 정도) 기준으로 2일 정도 숙성을 지연시키는 것을 확인하였다. 통계적 분석 결과에서도 각 처리군 간의 유의적인 차이가 존재함을 확인할 수 있었다(결과 18).



<결과 18. 종균 및 젖산 처리 김치의 미생물 군집, 대사체 분석>

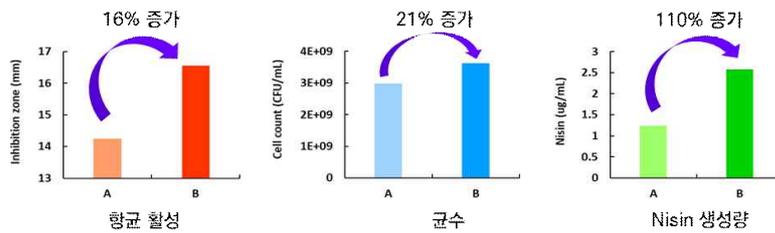
- 최종적으로 종균과 젖산의 처리가 김치의 관능적 특성에 영향을 주는지 판단하기 위하여 각 처리군 김치를 저장하며 저장 기간별 관능검사를 진행하였다. 그 결과 종균과 젖산의 병용처리하는 김치의 관능적 특성에 유의적으로 부정적인 영향을 주지 않음을 확인하였다(결과 19). 다만, 향후에는 객관적인 관능평가 도출을 위해 공인기관의 전문패널을 활용할 필요가 있어 보인다.



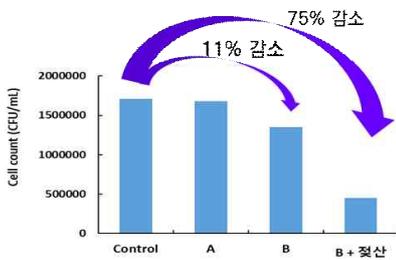
<결과 19. 종균 및 젖산 처리 김치의 관능적 특성 분석>

- 주요 결과를 정리하면 다음과 같다.

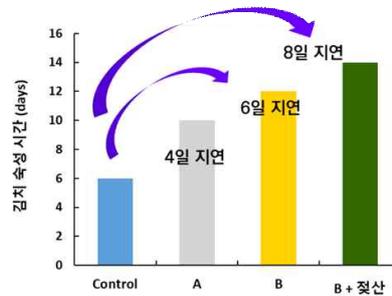
1. 김치 종균 향균 활성 증진 배양 기술



2. 김치 양념 초기 미생물 수 감소



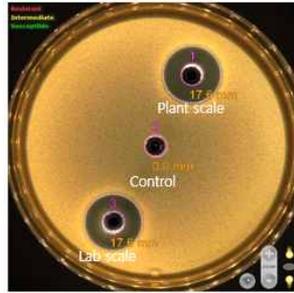
3. 김치 숙성 지연 효과



(A: 기존 발명 배양액, B: 개선 배양액)

○ 종균 대량 배양 및 항균 활성 측정

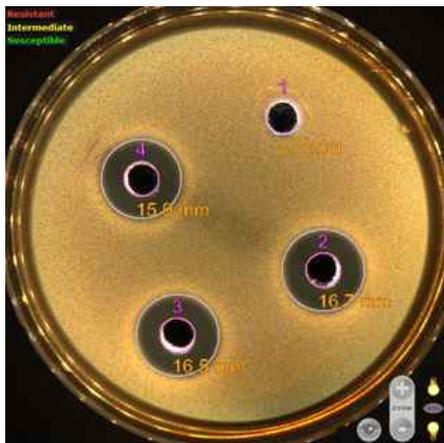
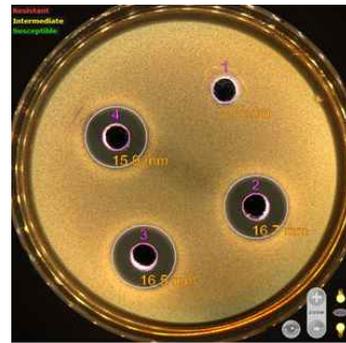
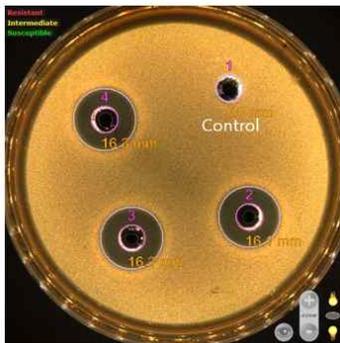
- 500리터 배양기를 이용하여 배양한 종균의 항균 활성을 확인하기 위해 실험실 규모에서 배양한 종균과 항균 활성을 비교하였다. 그 결과 대량 배양한 종균과 실험실 규모에서 배양한 종균의 항균활성은 거의 차이를 보이지 않았다(결과 20).



Scale	Inhibition zone (mm)			Average	STDEV
Plant	18.3	17.6	17.8	17.9	0.36
Lab	17.6	17.6	17	17.4	0.35

<결과 20> 대량 배양한 배양액과 소량 배양한 배양액의 항균 활성 비교

- 대량 배양한 배양액의 항균활성 유지기간을 확인하기 위해 일주일 동안 4 °C에 보관하며 2일 간격으로 항균활성을 테스트하였다. 그 결과, 일주일 보관기간 동안 항균력의 큰 변화는 보이지 않았다(결과 21). 다만, 향후 액상 종균에 대한 품질 관리 기준과 규격에 대한 검증 및 공인 기관과의 연계를 통해 종균의 안정성과 품질의 신뢰성을 확보할 필요가 있을 것으로 생각된다.



Scale	Inhibition zone (mm)			Average	STDEV
Plant 0 day	18.3	17.6	17.8	17.90	0.36
Plant 2 day	16.1	16.3	16.3	16.23	0.12
Plant 4 day	16.7	16.5	15.9	16.37	0.42
Plant 6 day	15.7	16.7	15.7	16.03	0.58

<결과 21> 대량 배양한 배양액의 보관기간에 따른 항균활성 변화

○ 종균 김치 최적 제조 공정법 적용 시제품 생산 및 품질평가

- 수출용 김치의 품질유지기한 연장을 위한 최적의 공정을 현장에 적용하여 시제품을 생산하고 그 효과를 평가하였다. 500L fermenter에서도 종균은 잘 배양되었으며, 대량 배양된 종균을 적용하여 김치 시제품을 생산하고 품질을 평가한 결과 대조군 김치에 비해 16일, 기존 종균 적용 김치에 비해 6일 정도 더 숙성을 지연시키는 것이 확인되었다(결과 22).

	배추김치A (종균 X)			배추김치B (기존 종균)			배추김치C (신규 종균)		
	염도(%)	당도(%)	산도(PH)	염도(%)	당도(%)	산도(PH)	염도(%)	당도(%)	산도(PH)
0일차	1.82	6	5.8	1.83	6	5.7	1.83	5.9	5.8
2일차	1.8	5.9	5.9	1.81	6.1	5.7	1.83	6	5.8
4일차	1.85	5.8	5.8	1.82	6.2	5.7	1.84	5.8	5.8
6일차	1.9	5.8	5.6	1.85	6	5.6	1.83	5.8	5.7
8일차	1.92	5.9	5.2	1.88	5.8	5.5	1.85	5.7	5.6
10일차	1.99	5.8	5	1.87	5.9	5.4	1.85	5.5	5.7
12일차	2.01	5.7	5	1.88	6	5.3	1.88	5.5	5.5
14일차	2.18	5.6	4.9	1.89	5.8	5.2	1.9	5.6	5.4
16일차	2.39	5.3	4.6	1.9	5.6	5.3	1.91	5.4	5.2
18일차	2.51	5.2	4.3	2	5.3	5	1.91	5.4	5.3
20일차	2.59	5.1	4.3	2.01	5.4	5	1.9	5.4	5.2
22일차	2.61	5.1	4.2	2.08	5.4	4.9	1.93	5.3	5.2
24일차	2.72	5	4.1	2.09	5.1	4.4	1.98	5.1	5
26일차	2.72	5	3.9	2.11	5.1	4.3	1.98	4.9	5
28일차	2.8	4.9	3.7	2.14	5	4.2	1.99	4.9	4.9
30일차	2.79	4.9	3.6	2.21	4.9	4.3	2	5	4.7

<결과 22. 종균 적용 시제품 김치의 염도, 당도, 및 pH 변화>



<김치 제조 현장>

<500L 생물발효기>

○ 종균 김치의 경제성 분석

- 본 연구는 기존 방식에서 *Lactococcus lactis* WiKim0098 균주에 대한 배지 조성 및 배양 조건을 개선함으로써 김치 과숙균에 대한 항균 활성을 증가시키고, *Lactococcus lactis* WiKim0098 균주의 배양액 및 젖산을 양념에 전처리 함으로써 양념의 초기 균수를 감소시키는 것임. 이를 통해 숙성 지연효과를 증대시킴으로서 김치 종균 최적 제조 공정법 적용시에 경제성이 높아지는 것을 목표로 하고 있음. 따라서 본 경제성 분석은 기존 공정법과 『김치 종균 최적 제조공정법』 간에 투입비용과 기대효용을 도출하고 이를 통해 개선된 경제성이 얼마나 되는지를 일반적인 유통/판매 환경에 도입하여 개선수준을 측정하였다.

- 경제성 정성분석 : 김치 종균 최적 제조공정법이 미첨가 제조김치, 건조균체 방식, 기존 공정 방식 모두에 비해 경제성을 큰 것으로 확인되었다(결과 23).

< 결과 23. 공정법별 경제성 정성 비교 >

(단위 : 미흡(-1), 보통(0), 우수(1))

지표별 가중치		방식				
		미첨가	타 건조균체	기존 공정법	최적 제조공정법	
비용	제조단가	15	우수	미흡	우수	보통
	부대비용	15	우수	미흡	보통	보통
	첨가량	20	우수	미흡	보통	우수
효용	항균 활성도	15	미흡	보통	보통	우수
	초기 균수	15	미흡	보통	보통	우수
	숙성지연 효과	20	미흡	보통	보통	우수
누계		100	0	-50	15	70

- 경제성 정량분석 : 기존 공정법의 첨가량은 김치중량대비 5% 첨가 방식으로 비용을 산출할 경우 김치 1kg 제조를 위해 종균 배양액 50ml이 필요함. 종균 배양액 50ml 생산을 위해 투입되는 각 식용배지별 단가와 총 투입량 등은 다음의 표와 같고, 이에 따른 단가는 63.45원임(결과 24).

< 결과 24. 기존 공정법 제조단가 >

(단위 : 항목별 단위)

식용배지 단가(규격 당 단가)		방식				
		단가	배합비	무게	비용	
품명	단가(원)	규격(kg)	g당 원	%	g	원
L-Ascorbic acid	50,000	1	50	0.05	0.025	1.25
Potassium citrate	300,000	25	12	1	0.5	6
Lactose	100,000	25	4	3	1.5	6
Fructose	80,000	25	3.2	0.1	0.05	0.2
Yeast extract	200,000	10	20	3	1.5	30
종균1	200,000	1	200	0.1	0.05	10
종균2	200,000	1	200	0.1	0.05	10
합계					3.675	63.45

- 김치 종균 최적 제조공정법의 첨가량은 김치중량대비 5% 수준으로 비용을 산출할 경우 김치 1kg 제조를 위해 종균 배양액 50ml이 필요함. 종균 배양액 50ml 생산을 위해 투입되는 각 식용배지별 단가와 총 투입량 등은 다음의 표와 같고, 이에 따른 단가는 68.25원임. 이는 기존 공정법보다 7.5% 높은 수준임(결과 25). 향후 원료 공급에 대한 안정성 확보를 위해 구입처를 보다 다각화 하여 원료 조달에 문제점이 발생하지 않도록 해야 할 것으로 보인다.

< 결과 25. 최적 제조공정법 제조단가 >

(단위 : 항목별 단위)

식용배치 단가(규격 당 단가)		방식	단가	배합비	무게	비용
품명	단가(원)	규격(kg)	g당 원	%	g	원
L-Ascorbic acid	50,000	1	50	0.05	0.025	1.25
Potassium citrate	300,000	25	12	3	1.5	18
Lactose	100,000	25	4	2.5	1.25	5
Fructose	-	-	-	-	-	-
Yeast extract	200,000	10	20	2	1	20
Whey protein concentrate	16,000	1	16	0.5	0.25	4
종균1	200,000	1	200	0.1	0.05	10
종균2	200,000	1	200	0.1	0.05	10
합계						68.25

- 부대시설 도입 비용 : 기존 공정법과 김치 종균 최적 제조공정법 간의 부대설비의 차이는 없기 때문에 김치 kg당 제조단가 역시 두 공정법간의 차이는 없음. 설비 도입 이후 일 5톤 내외를 생산하는 것을 기준으로 5년간 연 1,000톤씩 총 5,000톤을 제조하는 내구성으로 비용을 산출함. 발효기, 오토클레이브 등 부대 장비관련 도입비용은 약 1억원 내외이므로 kg당 20원 수준의 비용이 발생하였다.
- 효용 분석 : 기존 공정법 대비 *Lactococcus lactis* WiKim0098 균주에 대한 배지 조성 및 배양 조건을 개선함으로써 김치 종균 최적 제조공정법은 김치 과숙균에 대한 향균 활성을 생산을 약 16% 증가시켰음. 또한 *Lactococcus lactis* WiKim0098 균주의 배양액 및 젖산을 양념에 전처리 함으로써 양념의 초기 균수를 약 75% 정도 감소시킬 수 있었음. 이와 같은 결과를 바탕으로 김치에 *Lactococcus lactis* WiKim0098 배양액을 5% 첨가하여 숙성 지연 효과를 살펴본 결과 대조군 대비 100% 지연 효과를 나타내었고, 70% 지연 효과를 나타낸 기존 공정법에 비해서도 20% 지연 효과가 증가된 것으로 나타났음. 또한 *Lactococcus lactis* WiKim0098 배양액과 젖산을 병용 처리했을 경우에는 기존 공정법 대비 40% 이상의 숙성 지연효과가 나타나 수출용 김치의 품질유지기한 연장에 본 김치 종균 최적 제조공정법이 효율적으로 적용될 수 있을 것으로 기대되었다(결과 26).

< 결과 26. 최적 제조공정법 효용 비교 >

(단위 : %)

지표별 효용		방식	기존 공정법 대비 최적 제조공정법
숙성지연	향균 활성화도		16% ▲
	초기 균수		75% ▼
	숙성지연 효과		20% ▲
	숙성지연 효과(젖산 병용 처리)		40% ▲

- 비용-수익분석 : 기존 공정법과 김치 종균 최적 제조공정법 간의 비용-수익분석은 종균 투입에 따른 kg당 비용과 유통기간 증가에 따른 kg당 수익을 기초로 원가 분석을 실시함. kg당 비용 증가는 다음과 같았다(결과 27).

< 결과 27. 최적 제조공정법 비용 비교 >

(단위 : 원/kg)

지표별 효용		방식	비교 대상	
			기존 공정법	최적 제조공정법
비용	종균제조 비용		63.45	68.25
	부대설비 비용		20.00	20.00
	합계		83.45	88.25

- kg당 수익 증가는 다음과 같음. 단, 수익산정을 위한 숙성지연 효과는 젖산 병용 처리를 기준으로 유통기한이 40% 증가하는 상황을 고려해서 산출함. 기존 공정법의 경우, 김치 kg단가를 5,000원(원가 4,000원, 마진률 20%)으로 한 100% 국내산 원부재료 김치를 산정하여 1) 유통기한 20일까지 정가 판매 및 재고율 30%, 2) 유통기한 21-30일은 마진 없는 재고율 10%로 산정함. 그러나 김치 종균 최적 제조공정법의 경우, 김치 kg단가를 5,000원(원가 4,000원, 마진률 20%)으로 한 100% 국내산 원부재료 김치를 산정하여 1) 유통기한 30일까지 정가 판매 및 재고율 10%, 2) 유통기한 31-42일은 마진 없는 재고율 0%로 산정하였다(결과 28).

< 결과 28. 최적 제조공정법 수익 비교 >

(단위 : 원/kg)

지표별 효용		방식	비교 대상	
			기존 공정법	최적 제조공정법
수익	유통기한 20일		700	900
	유통기한 30일		0	
	유통기한 42일			0
	합계		700	900

- 김치 종균 최적 제조공정법 경제성 : 기존 공정법과 김치 종균 최적 제조공정법 간의 비용-수익분석을 통해 산출된 경제성 평가 결과 김치 종균 최적 제조공정법의 경제성이 31.6% 이상 높은 것으로 산출되었다(결과 29).

< 결과 29. 최적 제조공정법 경제성 비교 >

(단위 : 원/kg)

지표별 효용		방식	기존 공정법			최적 제조공정법		
			비용	수익	순이익	비용	수익	순이익
수익	유통기한 20일		58.415	700	641.585	79.425	900	820.575
	유통기한 30일		25.035	0	-25.035			
	유통기한 42일					8.825	0	-8.825
	합계		-	-	616.55	-	-	811.75

○ **종균 김치 산업화를 위한 경제성 분석**

- 기존 비용-수익 분석 외에 산업화를 위한 다각적인 분석을 위해 5년 간의 추정손익을 기초로 순현재가치, 비용/편익비율, 내부수익률 3가지 경제성 분석을 실시하였다.
- 순현재가치, 비용/편익비율, 내부수익률을 도출하기 위해 고정자산 투자를 1년차에 1억원을 산정하고, 각 연도별 생산량은 최초 5년간 200톤(업무일 기준 1일 생산 1톤 내외)을 기초로 매년 증가하는 없는 것으로 하여 보수적 시뮬레이션을 실시하였다. 할인율은 각종 예비타당성 조사에서 한국개발연구원(KDI)의 적용할인률인 5.5%로 가정하였다.
- 상기 비용-수익분석에서 가정한 kg당 수입은 4,900원, 비용은 4,063.45원으로 산정하여 산출하였다.

< 결과 30. 산업화를 위한 경제성 분석을 위한 추정수익 >

구분 \ 연차		연차별 손익 산출					합계
		1년차	2년차	3년차	4년차	5년차	
손익	수입	980,000	980,000	980,000	980,000	980,000	4,900,000
	유동비용	812,690	812,690	812,690	812,690	812,690	4,063,450
	고정비용	100,000	0	0	0	0	100,000
	손익	67,310	167,310	167,310	167,310	167,310	736,550

- 상기 추정수익을 기초로 순현재가치, 비용/편익비율, 내부수익률은 다음과 같으며, 순현재가치는 0원보다 크고, 비용/편익비율이 1보다 크며, 내부수익률이 가정된 할인율 5.5% 보다 높기 때문에 경제성이 있는 것으로 판단되었다.

< 결과 30. 경제성 분석 결과 >

구분 \ 연차	연차별 손익 산출					평균 (단위)
	1년차	2년차	3년차	4년차	5년차	
순현재가치	63,801	158,588	158,588	158,588	158,588	698,152천원
비용/편익비율	1.07	1.21	1.21	1.21	1.21	1.18
내부수익률	7.4	20.6	20.6	20.6	20.6	17.9%

(2) 정량적 연구개발성과

1) 성과지표 및 목표치

성과지표명		단계	1차년도(21)	2차년도(22)	계	가중치(%)
전담기관 등록·기탁지표	특허출원 (건)	목표	1	1	2	20
		실적	1		1	
	특허등록 (건)	목표		1	1	20
		실적				
연구개발과제 특성 반영 지표	기술이전 (건)	목표		1	1	20
		실적		1	1	
	기술이전료 (백만원)	목표		10	10	10
		실적		10	10	
	제품화(건)	목표		1	1	30
		실적		1	1	
계		목표	1건	4건, 10백만원	5건, 10백만원	100(목표)
		실적	1건	2건, 10백만원	3건, 10백만원	70(달성)

2) 성능지표

(1) 결과물의 성능지표

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고수준 보유국/보유기관	연구개발 전 국내 수준	연구개발 달성치		목표 달성 근거
			성능수준	성능수준	1차년도(21)	2차년도(22)	
김치 pH, 산도	%	80	-	10℃ 저장, 산도 1% 이하 기준 대조군 대비 4일 연장	-	10℃ 저장, 산도 1% 이하 기준 대조군 대비 6일 연장	특허출원 자료
항균물질 활성	%	20		<i>Lc. lactis</i> 균주의 현재 배양조건에서 생산되는 항균물질 활성		현재 조건대비 16% 향상	특허출원 자료

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	김치 배양용 식용 배지 개발 및 이를 이용한 김치 숙성도 제어 방법	한국유산균 프로바이오틱스 학회지	정창희 (1저자), 김태운 (교신)	7(2)	한국	한국유산균 프로바이오틱스 학회	비SCIE	2021.12	2287-853X	80

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	항균활성이 증진된 락토 코커스 락티스 배양액을 이용한 숙성이 지연된 김 치의 제조방법	한국	정창희 고혜인 김태운	2022. 05.06	10-2022- 0056027					80	활용

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√			√						

[경제적 성과]

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시	항균활성이 증진된 락토 코커스 락티스 배양액을 이용한 숙성이 지연된 김 치의 제조방법	(주)뜨레찬	2022.12	10백만원	10백만원

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 김치 종균 향균 활성 증진 배양 기술 개발	○ <i>Lactococcus lactis</i> 균주의 향균 활성을 증진하기 위해 식용배지의 조성 및 배양 조건을 반응 표면 분석법을 이용하여 최적화하였음. 결과적으로 lactose 2.5%, yeast extract 2%, whey protein concentrate 0.5%, potassium citrate 3%, ascorbic acid 0.05%의 배지 조성으로 25℃에서 18시간 배양이라는 최적화 조건을 산출하였음. 기존 대비 김치 과숙균으로 알려진 <i>Lactobacillus sakei</i> KCKM 0026에 대해 약 16% 증가한 향균 활성 (Inhibition zone)을 나타냈으며, nisin 표준품 희석 농도에 따른 향균 활성과 비교한 결과 1,200µg/mL 농도 이상의 nisin 함량을 가지고 있는 것으로 나타났음. 다만 pH 완충제의 경우 합성 첨가물을 대체 할 수 있는 적절한 천연 대체제를 개발할 수 없었음	95
○ 김치 양념의 초기 미생물 수 저감	○ 향균 활성을 갖는 종균 배양액과 젖산을 이용하여 김치 양념 내의 초기 유산균수를 저감화 시키고자 각 처리액을 김치 양념에 처리한 후 4℃에서 16시간 보관한 후 양념 내 유산균수를 측정하였음. 대조군에 비하여 기존 배양액의 경우 약 3%, 개선 배양액의 경우 약 21%, 개선 배양액과 젖산 병용의 경우 약 74%의 김치 양념 내 유산균 수를 저감화시키는 효과를 나타내었음	100
○ 김치 숙성 지연 효과	○ 개선 배양액 및 젖산의 처리에 따른 김치 숙성 지연 효과를 분석하였음. 10℃에서 2주간 저장하며 2일 간격으로 pH, 산도, 총 유산균수, 미생물 군집, 대사산물의 변화를 측정한 결과 개선 배양액은 10℃에서 기존 배양액에 비해 2일 지연 효과가 증가되었음. 또한 개선 배양액과 젖산을 병용 처리한 경우에는 기존 배양액 대비 4일의 숙성 지연 효과를 보였음	100

4. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 합성 첨가물 대체 천연 소재를 이용한 식용 배지 조성 개발
 - 합성 첨가물 대체 천연 소재를 이용한 식용 배지 조성 개발과 관련하여 합성 첨가물인 pH 완충제를(구연산 칼륨) 대체 할 수 있는 적절한 천연 대체제를 개발하고자 하였으나 합성 첨가물에 비해 실험에 사용한 천연제의 경우 그 효과가 미비하여 추후 후속 연구를 통하여 지속적으로 개발하고자 함. 이는 향후 특허 출원과 등록을 염두에 두고 수행할 계획임
- 특허 출원 1건 및 등록 1건 미달성
 - 향균활성이 증진된 락토코커스 락티스 배양액을 이용한 숙성이 지연된 김치의 제조방법에 대한 특허를 출원하고 (2022년 5월) 우선심사를 받고 등록을 추진하였으나 거절 결정이 난 상태임. 추가 보완 자료를 준비하여 재심사를 요청할 계획임. 또한 합성 첨가물 대체 천연 소재를 활용한 pH 완충제 개발 후속 연구를 통해 새로운 특허를 출원할 계획임

2) 자체 보완활동

- 후속 연구를 통해 미진했던 부분을 보완하고 새로운 결과를 바탕으로 특허 출원 및 등록을 진행하겠음

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

○ 기술적 측면

- 상품김치의 품질유지기한 연장으로 인한 제품 가치 제고
- 김치종균을 이용한 품질 균일화 및 품질유지기한을 연장시킨 고품질의 상품김치 제조 공정 확립과 더불어 김치제조에 필요한 김치종균산업도 새로운 김치산업의 한 축으로 부상할 것으로 기대됨
- 현재 종균 김치를 제조하여 시판하는 업체는 일부 대기업을 중심으로 이루어지고 있으나, 향후에는 보다 많은 업체에서 우수한 종균을 활용한 특성화 상품김치의 출시가 기대됨

○ 경제적·산업적 측면

- 수출용 김치의 장거리 수송 및 유통 가능에 따른 수출국 다변화 및 수출량 증대가 기대됨

○ 연구개발 성과에 대한 기술기여도 및 산정 근거

(단위 : 백만원, %)

총괄과제명	세부과제명	기관명	유형	총 연구개발비 (A)	정부지원 연구개발비 (B)	정부지원 연구개발비 비율 (C=B/A)	성과 유형	기술기여도	
								산정 근거	비율
김치 종균 활성 극대화 및 종균 김치 최적 제조 공정법 개발	종균 활성 증대 및 최적 제조 공정법 개발	세계김치 연구소	출연연 (비영리)	189	189	1.0	신규 기술개발	해당 없음	-
	김치종균 산업체 현장 적용 및 실증 연구	뜨레찬	중소기업 (영리)	96.1	72	74.9	기존 공정개선	①-① ×10%	7.49
계				285.1	261	-	-	-	-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내				
		2023	2024	2025	2026	2027
국외논문	SCIE	1				
	비SCIE					
국내논문	SCIE					
	비SCIE					
특허출원	국내		1			
	국외					
특허등록	국내			1		
	국외					
인력양성	학사					
	석사					
	박사					
사업화	시제품개발					
	상품출시		1		1	
	기술이전					
	공정개발					
	매출액(단위 : 천원)	70,000	90,000	110,000	130,000	160,000
기술료(단위 : 천원)	5,000	5,000	10,000	10,000	15,000	
비임상시험 실시						
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상				
		2상				
		3상				
	의료기기					
진료지침개발						
신의료기술개발						
성과홍보						
포상 및 수상실적						
정성적 성과 주요 내용						

붙임. 참고문헌

- Chang, J.Y. and Chang, H. C. 2010. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *The Society for Food Science & Technology*, 75, 103-110.
- Choi, H.J., Kim, Y.J., Lee, N.R., Park, H.W., Jang, J.Y., Park, S.H., Kang, M., Kim, H.J., Lee, J.H., Lee, J.H., Pyun, Y.R., and Kim, T. W. 2014. Selection of lactic acid bacteria with antibacterial activity for extension of kimchi shelf-life. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 43, 328-332.
- Chong, J.O., Soufan, C., Li, I., Caraus, S., Li, G., Bourque, D.S., Wishart, and J. Xia. 2018. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research* 46 (W1), W486-W494. doi: 10.1093/nar/gky310.
- Gan-Erdene, O., Eom, H.J., Kim, B.S., Ko, J.H., and Han N.S. 2011. Mannitol production by *Leuconostoc citreum* KACC 91348P isolated from kimchi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 968-971.
- Jang, J.Y., Lee, M.E., Lee, H.W., Pakr, H.W., Choi, H.J., Pyun, Y.R., and Kim, T.W. 2015. Extending the shelf life of kimchi with *Lactococcus lactis* strain as a starter culture. *Food Science and Biotechnology*, 24, 1049-1053.
- Jeong, S.H., Lee, S.H., Jung, J.Y., Choi, E.J., and Jeon, C.O. 2013. Microbial succession and metabolite changes during long-term storage of kimchi. *Journal of Food Science*, 78, 763-769.
- Jo, S.Y., Choi, E.A., Lee, J.J., and Chang, H.C. 2015. Characterization of starter kimchi fermented with *Lactococcus kimchii* GJ2 and its cholesterol-lowering effects in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *Journal of the science of food and agriculture*, 95, 2750-2756.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., and Jeon, C.O. 2014. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98, 2385-2393.
- Jung, J.Y., Lee, S.H. Seo, H.Y., Park, W.S, and Jeon, C.O. 2012. Effects of *Lactococcus mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 153, 378-387.
- Jung, M.Y., Kim, T.W., Lee, C., Kim, J.Y., Song, H.S., Kim, Y.B., Ahn, S.W., Kim, J.S., Roh, S.W., and Lee, S.H. 2018. Role of jeotgal, a Korean traditional fermented fish sauce, in microbial dynamics and metabolite profiles during kimchi fermentation. *Food Chemistry*, 265, 135-143.

- Kang, B.K., Cho, M.S., Ahn, T.Y., Lee, E.S., and Park, D. S. 2015. The influence of red pepper powder on the density of *Weissilla koreensis* during kimchi fermentation. *Scientific Reports*, 5, 15445.
- Kim, D.W., Kim, B.M., Lee, H.J., Jang, G.J., Song, S.H., Lee, J.I., Lee, S.B., Shim, J.M., Lee, K.W., Kim, J.H., Ham, K.S., Chen, F., and Kim, H.J. 2017. Effects of different salt treatments on the fermentation metabolites and bacterial profiles of kimchi. *Journal of Food Science*, 82, 1124-1131.
- Kim, H.J., Shin, H.K., and Yang, E.J. 2013. Production and fermentation characteristics of mukeunji with a mixed starter. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42, 1467-1474.
- Lane, D.J. 1991. 16S-23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.
- Lee, K., Kim, H.J., and Lee, E.J. 2013. Mixed cultures of kimchi lactic acid bacteria show increased cell density and lactate productivity. *African Journal of Biotechnology*, 12, 4000-4005.
- Lee, M.E., Jang, J.Y., Lee, J.H., Park, H.W., Choi, H.J., and Kim, T.W. 2015. Starter cultures for kimchi fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 559-568.
- Moon, S.H., Chang, M., Kim, H.Y., and Chang, H.C. 2014. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23, 489-497.
- Park, S.E., Seo, S.H., Kim, E.J., Byun, S., Na, C.S., and Son, H.S. 2019. Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters. *Food Chemistry*, 274, 558-565.
- Sadiq, S., Imran, M., Hassan, M.N., Iqbal, M., Zafar, Y., and Hafeez, F.Y. 2014. Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 204-210.
- Suzuki, A., Muraoka, N., Nakamura, M., Yangagisawa, Y., and Amachi, S. 2018. Identification of undesirable white-colony-forming yeasts appeared on the surface of Japanese kimchi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82, 334-342.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.