

120024-2

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(o)발간등록번호(O)
맞춤형혁신식품및천연안심소재기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003868-01

글로벌 소비 트렌드 변화에 따른
수출용 비건 김치 개발

글로벌 소비 트렌드 변화에 따른 수출용 비건김치 개발

2022. 04.

2021

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

주관연구기관 / 세계김치연구소
공동연구기관 / 샘표식품주식회사
(주)풀무원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “글로벌 소비 트렌드 변화에 따른 수출용 비건 김치 개발”(개발기간 : 2021.04. ~ 2022.12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 03.

주관연구기관명 : 세계김치연구소 (대표자) 장 해 춘



공동연구기관명 : 샘표식품주식회사 (대표자) 박 진 선



공동연구기관명 : ㈜폴무원 (대표자) 이 효 율



주관연구책임자 : 세계김치연구소 박성희

공동연구책임자 : 샘표식품주식회사 최용호

공동연구책임자 : ㈜폴무원 이진주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업			총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)					연구개발과제번호		20024-02
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1704	100%	LB1706	50%	LB1703	50%
	농림식품 과학기술분류	PA0103	100%	PA0102	100%		
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		글로벌 소비 트렌드 변화에 따른 수출용 비건 김치 개발					
전체 연구개발기간		2020. 04. 20. - 2021. 12. 31. (21개월)					
총 연구개발비		총 1,083,400 천원 (정부지원연구개발비: 650,000천원, 기관부담연구개발비 : 433,400 천원, 지방자치단체: 천원, 그 외 지원금: 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[○] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(3) 종료시점 목표(8)
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	·최종 목표 : 식물성 발효향미모듈을 활용한 비건 김치 개발 및 수출 ·세부 목표 : - 비건김치 레시피 4종 개발 - 식물성 발효향미모듈 3종 개발 및 제품화 - 수출용 비건김치 4종 제품화 및 수출					
	전체 내용	1. 비건 김치 레시피 개발 및 제조공정 최적화(주관: 세계김치연구소) - 비건 김치 레시피 개발 - 식물성 발효향미모듈 1, 2 적용 김치 제조 및 발효특성 분석 - 품질향상을 위한 종균 선발 - 비건 김치 제조 공정 확립 2. 식물성 발효향미모듈 3종 개발 및 제품화(협동: 샘표식품 주식회사) - Meta-omics를 활용한 복합효소 생물전환 식물성 발효향미 모듈 개발 · 식물성 발효향미 모듈 1-1 : 대두 발효물 · 식물성 발효향미 모듈 1-2 : 완두 발효물 · 식물성 발효향미 모듈 2 : 쌀 발효물 3. 비건 김치 대량생산 공정 확립 및 상품화(협동: (주)풀무원) - 일반 김치/ 비건 김치 첨가제 대한 컨셉 조사 - 발효 향미 모듈별 최적 제조 공정 및 강화 공정 설계 - 비건 김치 대량생산 제조공정 확립 및 상품화(수출제품 적용) - 유통경로별 품질 검증 및 수출국 현지 소비자 조사					
연구개발성과	- 식물성 발효향미 모듈 2종 활용 최적 레시피 개발 - 마늘향 저감 레시피 개발 - 숙성지연 소재 및 이를 적용한 비건김치 레시피 개발 - 식물성 발효향미 모듈 1-1 : 대두 발효물 개발 - 식물성 발효향미 모듈 1-2 : 완두 발효물 개발 - 식물성 발효향미 모듈 2 : 쌀 발효물 개발						

	<ul style="list-style-type: none"> - 수출국 현지 소비자 조사 3건 진행을 통한 김치인식, 소비패턴, 컨셉(vegan, worry free) 선호 정보 파악 - 발효 향미 소재별 적용화 검토 및 최적 공정 설계 완료 - 발효 향미 소재별 적용 제품 특성 검증 및 보완 - 수출 김치 제조 공정 및 유통 안정성 검증을 통한 수출 리스크 파악/ 보완 검토 - 비건김치 Pilot 생산 및 대량 생산화 설계 완료 - 비건 김치 및 유통별(국내/수출)적합 상품 설계 개발(포장/특성) - 비건김치 유통 경로별 품질 검증
연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> - 현재 공동연구기업에서 사용중인 젓갈대체소재는 수입소재로 본 과제에서 개발한 식물성 발효향미 모듈을 제품에 적용하여 수입제품 대체 효과 기대됨 - 코로나 이슈로 수출선적 기간이 30일 이상 연장된 현재 상황에서 수출김치의 골마지 문제, 과숙으로 인한 균덕내 등 품질특성이 나빠지는 것을 해소하기에, 상미기간 연장 이슈를 해소효과가 기대됨 - 발효 향미 소재 적용 및 동물성 소재 대체화 검토 및 대량 생산 체계 구축을 통한 수출화 기반 확보 및 출시화에 기여함. - 수출김치 제조~유통까지 품질 모니터링으로 장기 유통과 수출 환경에 따른 품질 리스크 최소화 및 관리 고도화 방안 설계로 수출 김치 품질 안정화 확보 - 현지 소비자 니즈 및 글로벌 소비 트렌드 정보 확보 및 DB화 통한 글로벌 상품 김치 개발에 활용 및 김치 글로벌화를 위한 정보 제공 기여 - 김치 특성 및 유효적 기능 분석으로 김치 우수성 검증 및 김치 인지도 제고에 도움이 되는 과학적 DATA 확보를 통한 수요 확대 유도, 홍보 자료, 소비자 정보 제공 등의 정보 활용으로 기대함.

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
	1	4	1					생명 정보	생물 자원		정보	실물
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)	비건 김치		젓갈 대체제		식물성 발효향미모듈		김치 종균	수출				
영문핵심어 (5개 이내)	vegan kimchi		jeotgal substitute		plant based fermented flavor module		kimchi starter	export				

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	19
2.1. 비건 김치 레시피 개발 및 제조공정 최적화	19
2.1.1. 비건 김치 레시피 개발 및 비건 김치 최적 종균 선발	19
2.1.2. 비건 김치 개발 및 제조 공정 확립	48
2.2. Meta-omics를 활용한 복합효소 생물전환 식물성 발효향미모듈 개발	108
2.2.1. 식물성 발효향미모듈-1,2 개발	108
2.2.2. 식물성 발효향미모듈-1,2 개발완료 및 공정 표준화	145
2.3. 식물성 발효 향미소재 최적 비건 김치 상품화 및 생산 체계 확립	183
2.3.1. 식물성 발효 향미소재 최적 SPEC/ 공정 설계 및 현지 김치 컨셉 정보화	183
2.3.2. 비건김치 대량 생산화 및 최적 상품 설계/품질 검증	200
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	219
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	227
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여정도	228
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	228
<별첨 1> 자체평가의견서	230
<별첨 2> 연구성과 활용계획서	230

1. 연구개발과제의 개요

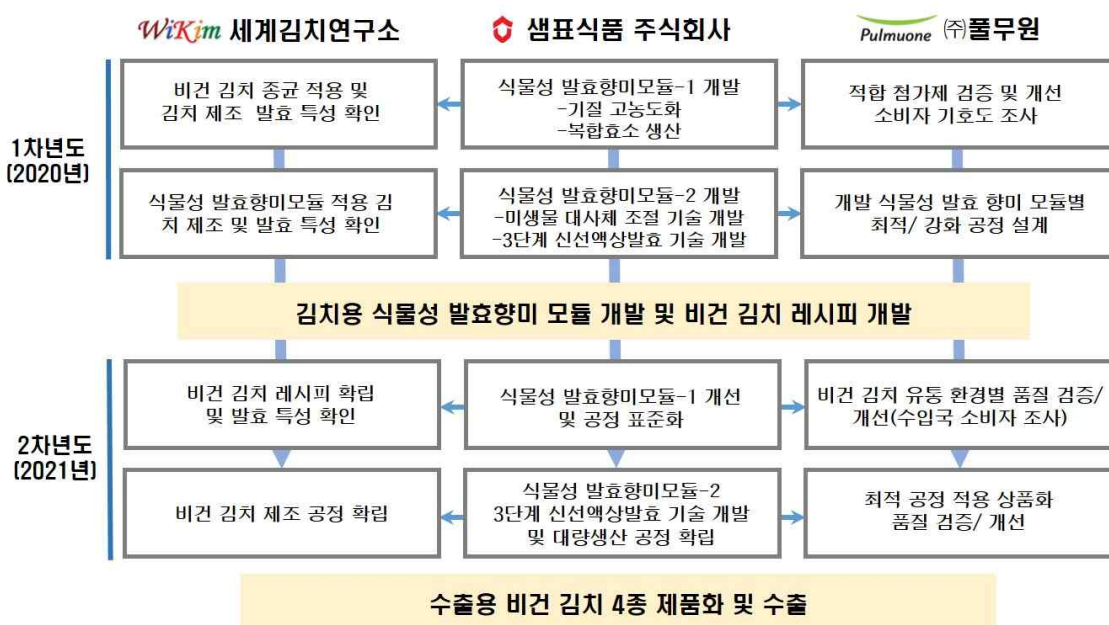
<연구개발 대상 및 기술 제품의 개요>

- 연구개발 개요 : 김치에 최적화된 식물성 발효향미모듈을 이용한 all worry free 맛있는 비건 김치 개발 및 수출



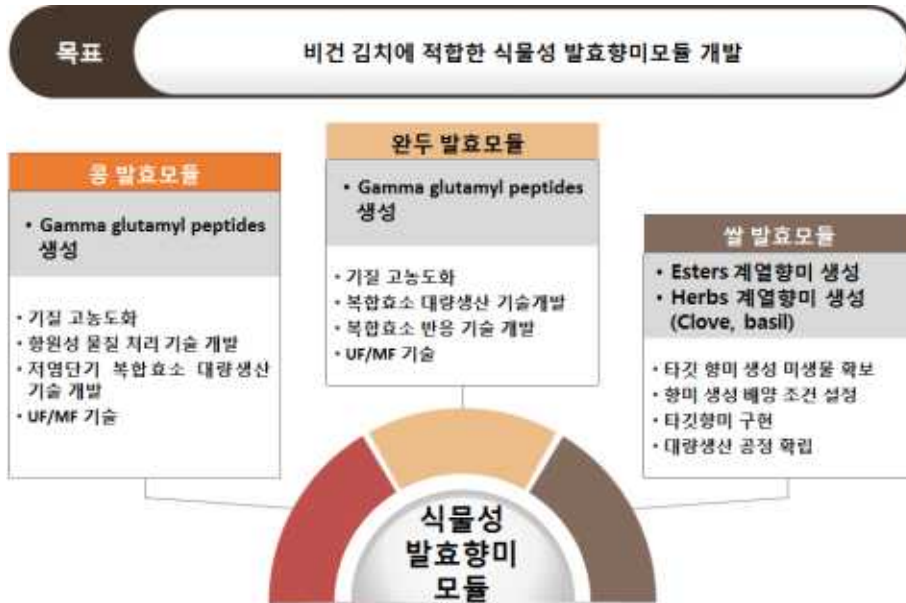
- 한국인의 식생활에서 김치는 주요한 채소 요리로 국민영양통계에 따르면 한국인의 김치류 섭취량은 1일 약 107.33g으로 채소류 섭취량의 36%를 차지하며 배추김치는 섬유소, 무기질, 비타민류가 풍부한 식품임
- 그러나 국내 김치 시장은 중국산 김치에 계속 밀리고 있어 2017년 무역적자가 500억원을 돌파함. 이와는 반대로 김치의 영양학적 우수성과 vegan 열풍, 식물성 단백질 등의 식품 소비 트렌드와 부합하여 미국을 중심으로 한 서구 시장에서 김치에 대한 관심과 소비가 늘어나고 있음
- 교민 시장을 중심으로 미국에서 제조하여 판매되는 김치가 있지만 리스테리아(Listeria)감염 등의 미생물 문제와, 액젓에서 비롯되는 게, 새우 등 갑각류 성분의 표기사항 누락으로 리콜되는 경우가 발생하여 현지 주류 사회로 유입되기에는 품질에 한계가 있음
- 김치의 맛과 향을 내는 성분을 GC/MS로 분석하면 디메틸-설퍼이드, 디메틸-트리 설퍼이드, 디프로필-디설퍼이드, 1-부탄1-이소티오시아네이트, 디 알릴-디설퍼이드 등의 주요 황화합물과 테르펜과 에스테르 화합물, 유리 아미노산, 젖산 및 구연산 같은 일부 유기산 등으로 특히 설퍼이드 계열의 향기성분과 에스테르 화합물이 외국인의 김치 기호도에 영향을 주는 인자로 밝혀졌음
- 서구를 중심으로 한 세계적인 식품산업의 트렌드인 “All worry free” 를 선도할 수 있는 맛내기 소재와 이를 활용한 완전한 비건 김치 개발이 필요함
- 영양학적으로 우수하며 맛과 향이 외국인 기호도에 적합한 수출용 김치를 개발하기 위해서는 김치의 감칠맛과 깊은 맛은 유지하면서 외국인이 선호하는 신선한향, 허브향, 꽃향 등의 향기를 낼 수 있는 향미모듈의 개발이 필요함

- 특히, 비건인들을 타겟으로 한 콩류를 이용한 젓갈 대체 부재료에 대한 연구 결과를 통해서 비건 김치 제품들이 출시되어 국내에서 판매될 뿐 아니라 해외로도 수출되고 있는 상황임.
- 그러나, 콩류를 활용한 젓갈 대체 부재료를 활용하여 김치를 제조하였어도 품질 표준화에 있어 어려움이 있는 실정이라 김치의 품질 표준화를 위한 김치 종균을 활용하여 김치를 제조하는 연구들이 활발하게 이루어지고 있고, 관련 제품 또한 출시되고 있음.
- 김치 내 미생물군집은 계절별 원료 상태, 발효 및 유통환경에 따라 달라지고, 김치의 맛과 향기가 달라져 품질이 일정하지 않게 되는데 종균의 첨가로 인해서 김치의 미생물군집 변화를 조절할 수 있어 김치의 품질을 균일화 할 수 있는 큰 장점이 있음.
- 따라서, 본 과제에서 대두와 완두콩을 활용하여 젓갈의 감칠맛을 대체할 수 있는 식물성 발효향미 모듈을 개발하고, 김치 종균과 함께 활용한 비건 김치를 개발하여 실제로 수출 제품으로 적용하여 수출하고자 함.
- 제품 개발 및 수출의 목적을 달성하기 위해 연구개발팀은 비건김치 개발의 핵심인 식물성 발효향미 모듈 개발과 상품화를 위해 발효식품 대표기업인 (주)샘표가 젓갈대체 향미모듈을 개발하고, 개발한 향미모듈을 활용한 비건김치 개발과 제조공정 확립은 세계김치연구소가, 비건김치 대량생산과 수출국 현지 조사를 위해 김치수출 기업인 (주)풀무원이 공동연구기관으로 참여하였음.
- 주관기관과 공동연구기관은 개발한 향미모듈의 김치적용과 최적화 연구를 각 기관의 연구 역량과 노하우를 활용하여 자체 연구를 수행하고, 그 결과들을 공동 활용하여 비건김치 레시피 확립, 저장특성 및 관능적 저장특성, 현지 소비자 조사를 통한 수용도 검토 등 수행하고자 함.



○ 핵심 기술

- Meta-omics를 활용한 복합효소 생물전환 식물성 발효향미 모듈 개발 기술
: 기존 자사의 밀 분해 추출물보다 콩, 완두, 쌀을 이용한 알러지 프리 식물성 발효조미 소재 개발



- 동물성 소재 대체로 식물성 발효향미모듈과 종균 적용 맛있는 비건 김치 개발 기술
: 미국 시장에서 식물소재 천연 추출물 사용과 알러지 화학원료 사용 제안을 극복하기 위해 식물성 발효향미모듈과 김치 종균으로 제품의 만족도와 안정성 확보



1-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 젓갈을 대체하는 부재료로 콩을 활용한 연구들이 주를 이루고 있음. 젓갈과 유사한 아미노산 조성을 보이고 제한 아미노산 lysine 또한 함유하고 있는 것으로 알려진 콩을 활용하여 감칠맛을 부여하는 연구들이 보고되고 있음. 젓갈 대신 첨가해서 활용되거나, 젓갈에 더해서 감칠맛을 주는 연구들이 보고됨.
- 콩을 젓갈 대신 첨가하여 감칠맛을 향상시킨 연구로 샘표 주식회사는 특허 “고추유산균 발효물 및 콩발효물을 함유하는 김치 소스 조성물 및 그 제조방법”에서 젓갈 대신 아미노산 및 펩타이드 등이 함유되어있는 콩을 락토바실러스 파라카제이 (*Lactobacillus paracasei*) 및 락토바실러스 파라부크네리 (*Lactobacillus parabuchneri*) 균주로 발효시킨 콩발효물을 첨가하여 감칠맛을 부여하고, 유기산이 풍부한 김치 추출물을 첨가하여 감칠맛을 향상시킨 김치 소스 조성물을 보고하였음 (샘표 주식회사, 1020160018994, 2016).



그림. 고추유산균 발효물 (A) 및 콩발효물을 함유하는 김치 소스 조성물 (B)

- 이처럼 콩을 활용한 연구들은 균주를 접종한 연구들이 많은데, 그 외에 단백질 가수분해 효소를 이용한 가수분해 과정을 통해 감칠맛을 증진하는 연구 또한 지속적으로 보고되고 있음.
- 주식회사 농심은 검은 콩을 엔도펩티다아제 및 엑소펩티다아제 효소로 순차적으로 가수분해시킨 가수분해물의 mGluR4 발현, cAMP 농도, PKA 활성 측정 결과를 통해서 우마미가 증진된 검은콩 펩타이드를 보고하였음 (주식회사농심, 2009).

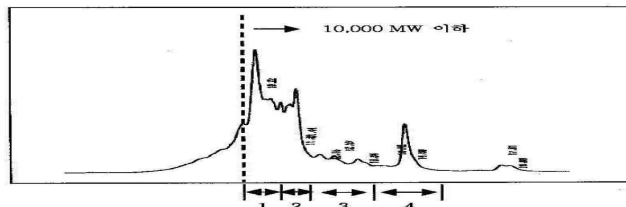


그림. 검은 콩 기능성 펩타이드

- 콩 단백질을 분해하여 제조한 일본식 식물성 발효향미모듈에서 저분자의 펩타이드가 짠맛과 umami를 가지고 있다고 보고하였음 (Lioe 외, 2007).

- 분리대두단백 효소가수분해물을 동일한 소금 농도의 model broth에 농도별로 첨가하였을 때, 2 ~ 39%의 짠맛 증진 효과가 있었으며, 소금 농도에 상관없이 모두 짠맛의 증진효과를 보였다고 보고하였음 (Kim & Shin, 2017). 따라서 분리대두단백 효소가수분해물을 김치에 첨가함으로써 소금의 첨가를 줄여 나트륨 저감화를 도출할 수 있음.

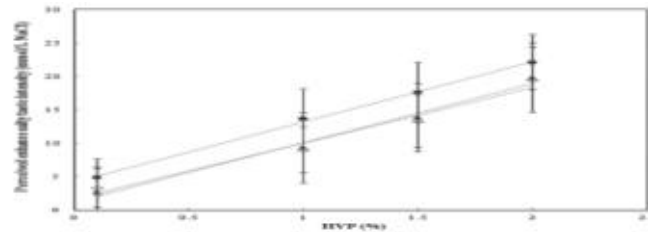


그림. 대두분리단백질의 효소가수분해물 첨가에 따른 짠맛 증진효과

- 2018년 미국에서 진행된 연구에서, 미소 페이스트와 피쉬 소스를 각각 넣은 vegan 김치와 비vegan 김치의 미생물을 분석했을 때 젓갈을 첨가하거나 첨가하지 않았을 때 김치의 발효에 영향을 미치는 유산균의 차이를 보이지는 않았다고 보고하였음. 세균 군락은 초기에 달랐지만 발효 도중의 세균 군락은 유사한 수준인 것으로 확인되었고, 발효가 완료시에는 두 김치의 세균 군락이 동일해졌음 (Zabat 외, 2018).

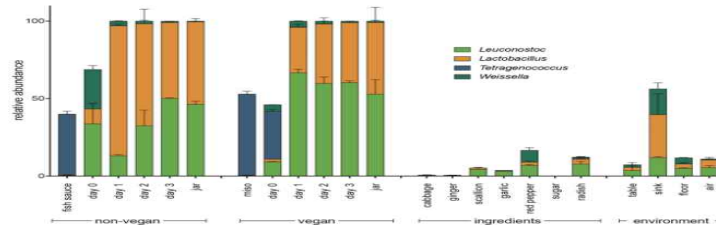


그림. Vegan과 비 vegan 김치의 유산균 조성

- ‘김치종균’은 김치의 품질향상 및 품질유지기한 연장, 품질균일화 등을 목적으로 발효를 조절하기 위한 미생물로 김치의 발효와 직접적으로 연관된 유산균을 주로 종균으로 이용하고 있음.
- 현재 시판되고 있는 김치 중 종균을 적용한 김치로는 대상(주)의 증가집김치, CJ제일제당(주)의 하선정김치, 풀무원김치, 동원 양반김치, 위니아의 건강담은 김치, 김혜자의 생생 김치, 배추주식회사의 해남참김치 등이 있음 (장지훈, 2019).

표. 시판 김치에 사용되고 있는 종균 현황

업체명	종균					
	균주명	자체배양/ 위탁생산	가격 (천원/kg)	공급 형태	보관 방법	첨가 방법
대상FNF	Leu. mesenteroides DRC0211 Lb. sakei 프로바이오 65	자체배양	-	액상	-	양념
CJ제일제당	Leu. citreum	자체배양	-	-	-	-
옥종합식품(주)	유산균 혼합배양 (Leuconostoc 속 + Lactobacillus 속)	위탁생산 (프로바이오닉)	450	액상	냉장/ 30일 보관	양념
이화종합식품			430	분말	냉장/ 7일 보관	
풀무원	유산균 혼합배양: 김치유산균 믹스 P-1 (Leu. mesenteroides + Leu. citreum + Lb. plantarum)	위탁생산 (프로바이오닉)	450	분말	냉장/ 30일 보관	양념
동원F&B	Leu. mesenteroides	위탁생산 (CTC바이오)	300			
위니아만도	특허 김치유산균	위탁생산	420			
김해자김치	Leu. citreum-2		400			
배추주식회사	유산균 혼합배양 (Leuconostoc 속 + Lactobacillus 속)	위탁생산 (프로바이오닉)	475			

(출처 : 2019 김치산업론, 세계김치연구소)

- 세계김치연구소에서는 우수 김치종균 개발을 위해 전국의 각종 김치를 수집하고 이로부터 김치미생물 35,000종을 확보하였고, 김치종균으로서 가능성 균주를 개발함.

표. 세계김치연구소 김치종균 목록

김치발효특성	보유 종균 목록
품질유지기한 연장 : 10종 (냉장, 60일, 산도 1% 미만)	Leu. mesenteroides LM20, Wei. cibaria WC433, Lb. sakei LS100, Lb. sakei LS102, Lb. sakei LS206, Lb. sakei LS260, Lb. curvatus LC16, Leu. mesenteroides WiKim32, Leu. mesenteroides WiKim33, Lb. curvatus WiKim 38
품질균일화 : 12종 (냉장, 60일, 종균우점율 7% 이상)	Leu. mesenteroides LM12, Leu. mesenteroides LM276, Lb. sakei LS97, Lb. sakei LS100, Lb. plantarum LP8, Lb. sakei LS102, Lb. sakei LS206, Lb. sakei LS260, Lb. curvatus LC16, Leu. mesenteroides WiKim32, Leu. mesenteroides WiKim33, Lb. curvatus WiKim 38
관능적 특성 우수 : 11종	Leu. mesenteroides LM12, Leu. mesenteroides LM20, Leu. mesenteroides LM276, Wei. koreensis WK195, Lb. sakei LS102, Lb. sakei LS206, Lb. curvatus LC16, Leu. mesenteroides WiKim32, Leu. mesenteroides WiKim33, Kazachstania servazzi (효모)
기능성 보유 : 12종 (대장 염증 개선 효과)	Lb. curvatus WiKim 38

(출처 : 2019 김치산업론, 세계김치연구소)

- 2020년 농촌진흥청은 김치 유산균의 생태적 변화에 대한 연구로써 유전체 정보를 바탕으로

로 김치 유산균의 생태적 특성을 종합 분석한 후 세계 최초로 김치 유산균 생태지도를 개발하여 보고하였음 (농촌진흥청, 2020).

- 콩류를 활용한 비건 김치와 김치 종균을 활용한 김치 개발은 각각 진행되고 있지만, 젓갈 대체용 식물성 발효향미모듈을 개발하여 김치 종균과 혼합하여 수출을 위한 비건 김치 개발 연구는 전무하므로 본 과제를 통해 진행하고자 함.

○ 시장현황

- 국내 김치시장 규모는 2019년 1조 4,473억 원으로 2018년도 1조 3,220억 원에 비해 9.5% 증가하고, 포장형태가 다양해지면서 1인 가구, 캠핑족도 ‘편리하게 취식할 수 있는 김치’에 대한 수요가 증가하고 있는 것으로 나타남.
- 기존 포장김치 판매는 1인 가구 위주로 소용량 제품의 수요가 높았으나, 최근에는 김장을 포기하고 기존 김장으로 충당했던 김치 소비량을 대용량 구매로 대체하는 기성세대 및 가구가 늘어나면서 대용량 제품에 대한 수요 또한 발생하고 있음.
- 최근에는 갓김치와 총각김치와 같은 별미 김치의 수요가 증가하여 취향에 따라 다양한 종류의 김치를 섭취하고 있는 것으로 나타남 (aT한국농수산물유통공사, 2019).
- 또한 맵지도 않고, 짜지도 않고, 자극적이지 않으면서 채소 본래의 향미를 느낄 수 있는 사찰식 김치가 건강을 중요시하는 현대인들에게도 부각되어 인기가 높아지고 있으며, 사찰김치 담기 체험행사도 열리고 있음. 더불어, 김치 업체에서 다양한 비건 김치들이 출시되고 있는 실정임.

○ 경쟁기관현황

- 본 과제 협동연구기관인 풀무원은 2015년 나트륨 함량을 줄이고, 젓갈을 넣지 않아 맛이 가볍고 상큼한 ‘상큼아삭 백김치’, ‘상큼아삭비트 백김치’, ‘상큼아삭 양배추김치’, ‘깎끔아삭 채식김치) 출시하였음.
- 나베에스앤에프는 심영순 명인과 젓갈이나 해산물 육수를 넣지 않고 식물성 재료로만 제조하여 비건 인증을 받은 ‘심영순 비건맛김치’, ‘심영순 비건섞박지’를 출시하였음. 소금과 국간장으로 간을 맞추고, 채소국물을 사용하였으며, 새우젓 대신 마늘로 대체하여 김치를 제조하였음.



그림. 심영순 비건김치 2종

- 하늘농산 또한 절임배추 야채수 추출액, 한식간장 밀분해추출물, 유산균배양액 등 사용하고 소금과 간장으로만 맛을 내어 담백, 깔끔한 맛의 비건 마크를 획득한 비건 김치를 출시하였음.



그림. 하늘농산 비건 김치

- 일품김치는 동물성재료를 전혀 사용하지 않고 순 국산 채식재료를 사용하여 만든 ‘채식 배추김치’ 를 출시하였음
- 김치명인 이하연의 봉우리김치는 소금으로 맛을 내 시원하고 깔끔한 배추 김치인 ‘소금 지(비건 김치)’ 를 출시하였음

○ 지식재산권현황

- 무, 건조표고 및 건조 다시마를 혼합한 농축액으로 육수를 제조하여 사용하고 천년초, 민들레 및 유카를 혼합한 농축액과 채썬 무, 고춧가루, 식염, 채 썬 당근, 참쌀풀, 식초, 다진생강, L-글루타민산나트륨, 백설탕, 캡사이신씨즈닝분말, 젖산을 육수와 혼합한 김치 양념으로 채식주의자용 배추 김치를 제조하여 감칠맛과 깊은 맛을 증진하였음 (농업회사법인 (주) 다모, 10-2031081).
- 페놀 화합물과 항산화 효능을 가지는 된장 추출물을 젓갈을 대신해서 김치에 첨가하여 발효시켰을 때, 5.0%의 된장 추출물을 사용시 관능검사 결과에서 높은 기호도를 나타내어 김치의 맛과 향을 향상시키는 것으로 보고하였음 (Chuob, 2017).

표. 된장 추출물 첨가량에 따른 관능검사

Fermentation time (Day)	Control	2.5% DE	5.0% DE	10% DE
Saltiness	3.45 ± 1.71 ^b	3.68 ± 1.52 ^{ab}	4.63 ± 1.64 ^a	4.41 ± 1.73 ^b
Sourness	3.36 ± 1.94 ^b	4.18 ± 1.33 ^{ab}	4.86 ± 1.72 ^a	3.59 ± 1.65 ^b
Carbonated taste	3.09 ± 1.15 ^a	3.86 ± 1.55 ^a	4.05 ± 2.08 ^a	3.50 ± 1.97 ^a
Savory taste	4.09 ± 1.44 ^b	4.82 ± 1.43 ^{ab}	5.45 ± 1.43 ^a	4.86 ± 1.80 ^{ab}
Crispiness	4.64 ± 1.76 ^b	4.95 ± 1.43 ^{ab}	5.73 ± 1.20 ^a	5.32 ± 1.78 ^{ab}
Overall acceptability	4.77 ± 1.84 ^a	5.18 ± 1.53 ^a	5.68 ± 1.24 ^a	5.41 ± 2.08 ^a

Values represent means ± standard deviations.

DE: Doenjang extract, Control: addition of fish sauce

2.5%, 5.0%, and 10%: quantity of addition doenjang extract

^{a,b} Means followed by the different letters in each row are significantly different ($p < 0.05$) by ANOVA with Duncan's multiple tests.

- 초피나무, 옥수수 수염 등의 천연물 추출액에 볶은 콩가루, 소맥배아를 넣어 만든 천연물 추출물 혼합액을 김치 양념장에 활용하여 김치를 제조시 감칠맛이 증가된다고 보고하였음 (정창용, 10-1483610, 2015).

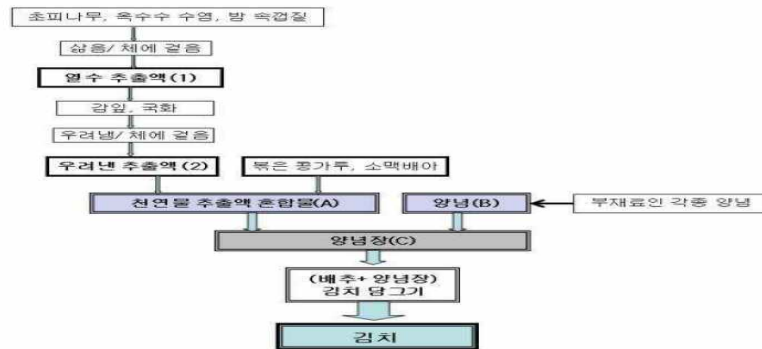


그림. 천연물 추출물 혼합액을 활용한 김치 제조 방법

○ 표준화현황

- 비건 김치를 제조하기 위한 것갈을 대체하는 소재의 개발이 다양하게 진행되고 있는 상황이지만, 수출을 위해서는 품질이 일정해야 하므로 김치 종균을 적용하는 방법이 적합할 것으로 사료됨. 콩류 제품 제조 기술의 노하우를 갖고 있는 협동연구기관인 샘표식품 주식회사에서 콩류인 대두와 완두콩을 이용해서 감칠맛이 좋은 식물성 발효향미모듈을 제조하고 세계김치연구소에서 이를 활용한 비건 김치를 개발하고, 해외로 김치를 수출하고 있는 협동연구기관인 풀무원의 수출 제품의 적용으로 표준화가 가능할 것으로 사료됨.

○ 기타현황

- 것갈 대체 소재를 활용한 비건 김치를 개발하여 수출하는 사례는 보고되고 있지만, 김치 종균을 함께 적용한 비건 김치의 수출 사례는 보고된 바 없음.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 1995년 미국에서 진행된 연구에서 탈수화된 버섯을 활용하여 버섯향이 강한 연갈색 성분, 고기향과 버터향의 황갈색 성분, 소고기향, 육향, 초콜릿향의 진갈색 성분을 제조하였고, 이들을 우마미 또는 MSG를 나타내었고, 이들을 활용하여 영양 첨가제 등으로 생산할 것으로 보고하였음 (Holtz RB, 1995).
- 그 이후에, 채소류를 가공 과정을 달리하여 처리했을 때의 우마미 조성 결과를 분석하여 보고되었고 (Silke S 외, 2012), 또 다른 연구에서도 우마미 풍미제를 제조하는 방법에 대한 연구가 보고되었음 (Sharon W, 2015).

- 국외 연구에서 일본의 경우, 이케다 키투나에 박사에게 의해 우마미에 대한 연구가 본격적

으로 진행되었고, 그에 따라 우마미에 대한 연구들이 현재까지 다양하게 보고되고 있음.

- 천연 조미료를 제조하기 위해서 단백질 가수분해 효소를 활용해서 식물성 단백질과 동물성 단백질을 가수분해하여 이들을 혼합시켜 감칠맛이 향상된 진한 맛의 천연 조미료를 제조하는 방법을 보고하였음 (毎日食品 株式会社, 2011). 식재료가 다르고, 가공 방법이 다른 유사한 연구들이 지속적으로 보고되고 있음.
- 김치 종균에 대한 연구는 한국에서 활발하게 진행되고 있고, 그에 따라서 국내 산학연의 김치 종균 관련 기술 수준이 높음.

○ 시장현황

- 일본

: 일본 식품신문에서 추정한 2018년 일본의 김치 시장규모는 700억 엔으로 일본 절임 식품 시장 전체의 20%를 점유하고 있으며, ‘맵지 않은 김치’ 라는 문구로 일본인의 입맛에 맞춘 맛을 강조하는 상품이 대부분임. 또한, 김치 홍보 문구에는 ‘발효’ 라는 단어를 강조한 제품들이 판매되고 있음.

- 미국

: 김치의 건강한 발효식이라는 인식과 매운맛 트렌드에 따라 미국 전역에서 김치의 인기가 상승 중임. 종갓집, 대상 등의 브랜드 등이 아시안 슈퍼마켓에서 쉽게 찾아볼 수 있음.

: 미주지역에서 현지 생산하면서 기업화를 이룬 김치브랜드인 장모김치(Morher-in-Law), 마마오김치(Mama O's) 등은 온·오프라인마켓에서 판매고를 올리고 있음.

: 최근에는 Williams Sonoma 등의 상점에서 가정용 김치 제조 키트인 ‘Mama O's Kimchi Making Kit’ 도 판매되고 있음.

: 미국 김치의 경우에는 ‘비건’ 을 강조하여 액젓을 넣지 않는 상품도 있으며, 미국 소비자들은 식품을 선택하는 기준으로 유기농과 Non-GMO 재료 사용여부를 중요하게 여김.



그림. 미주지역에서 현지 생산되고 있는 김치
(출처 : Global report, aT한국농수산물유통공사)

- 홍콩

: 홍콩의 유명 언론 ‘사우스차이나모닝포스트(SCMP)’ 가 추천하는 장 건강에 좋은 음식으로 김치를 가장 먼저 소개하며, 자체 제작한 김치 만드는 방법 동영상을 함께 게시하

였음(SCMP, 2019).

: 김치의 경우 홍콩 내 자체 공장에서 생산되는 물량은 거의 미비해 대부분 수입에 의존하고 있음.

: 한국산 음식이 ‘건강 보양식’ 또는 ‘미용 음식’으로 인식되고 있고 최근 증가집에서 개발된 ‘미인김치’에 대한 관심이 증가되고 있음(aT한국농수산물유통공사, 2018).

- 대만

: 한류의 영향으로 K-food에 대한 관심도가 높아지고 있으며, 한국의 대표 음식인 김치의 소비 역시 늘어나고 있으며 주된 소비층은 20 ~ 30대의 젊은 소비자층임.

: 대만 전통김치는 고춧가루를 첨가하지 않은 것으로, 한국의 백김치와 비슷하나 배추를 이용한 발효식품은 아님. 맛은 비교적 덜 짜고 신맛과 단맛이 강한 편임.

: 대만 내에서 생산하는 김치는 한국산 김치에 비해 대만 현지인의 입맛에 맞추어 덜 맵게 만드는 경향이 있으며 액젓이나 젓갈을 사용하지 않고, 포기김치보다는 맛김치 형태로 생산하는 경우가 많음(aT한국농수산물유통공사, 2016).

- 호주

: 호주의 몇몇 대형 마트에서 아시아 제품 취급량을 늘리고 있으며, 호주 대표 대형마트인 Woolworths에서 한국산 김치가 판매되고 있음.

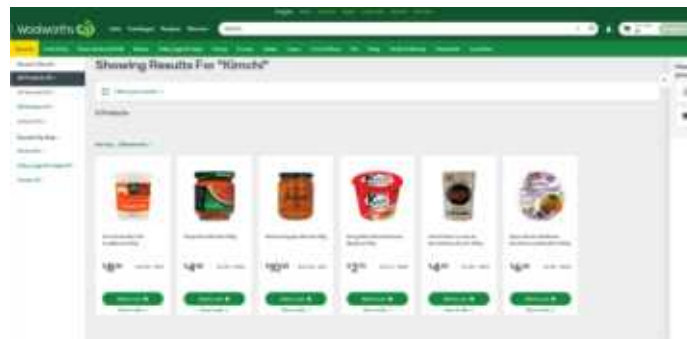


그림. 호주 대표 대형마트에서 판매되고 있는 김치
(출처 : Woolworths online)

: 호주의 한국 식품점과 아시안 식품점에서 판매중인 한국산 김치는 ‘종가집 김치’, 제일제당 ‘하선정 김치’, 삼진글로벌넷 ‘수라상 김치’와 같은 대기업 제품과 현지 교포 기업들이 생산하는 ‘코리아 김치’, ‘별미김치’, ‘팔도김치’ 등으로 분류됨(aT한국농수산물유통공사, 2018).

: 2017년 10월부터 호주 빅토리아주, 뉴사우스웨일즈주, 퀸즈랜드주에 위치한 대형 유통채널 Coles, IGA 냉장 코너에 ‘Keep it Cleaner’ 김치 판매. 해당 제품은 호주 멜버른에 본사를 둔 Korea Foods에서 생산하여 Metro Food Co사의 주문자상표제작(OEM) 방식으로 생산 유통됨(aT한국농수산물유통공사, 2018).

: Park’s Kimchi는 호주 현지의 김치 제조회사로 ‘별미김치’를 판매하고 있으며, 호주 내 아시아 및 한국 식료품점과 온라인 쇼핑몰, 오프라인매장(IGA, OK Supermarket, New yen yen Supermarket) 등에서 판매가 되고 있음(KATI 농식품수출정보, 2017).

○ 경쟁기관현황

- 영국 ‘MR. KIMCHI’ (www.mrkimchi.co.uk)

: 김치를 이용한 요리의 레시피를 같이 제공하고 있고, 오리지널 김치뿐만 아니라 베지테리언을 위해 젓갈을 뺀 vegan 김치도 함께 판매중임.

: Vegan 김치 250g, 포기김치 2kg의 가격은 4.60유로, 20.90유로임.



그림. 유럽에서 판매되고 있는 MR. KIMCHI
(출처 : MR. KIMCHI 온라인 홈페이지)

- 미국 풀무원 김치

: 협동연구기관인 풀무원이 미국 월마트 전 매장에서 ‘나소야’ 브랜드로 판매 중으로 젓갈 빼고 냄새 잡은 김치로 전북 익산에 있는 글로벌김치공장에서 생산해 수출하는 방식임.

: 비건 김치 품목은 썬 김치 매운맛, 썬 김치 순한맛, 깍두기 순한맛, 백김치 등 4종임.



그림. 미국에서 판매되고 있는 풀무원의 vegan 김치

- 뉴욕 ‘MATT’ S KIMCHI’ (www.mattskimchi.com)

: 액젓, 새우, 육수를 사용하지 않고 생강과 현지에서 수확한 유기농 배추를 사용하여 저염으로 만든 ‘All Natural Vegan Kimchi’ 임.

: 다양한 김치 요리 레시피를 제공하고 맨해튼과 브루클린 등 41개의 식료품 매장과 마켓, 온라인 몰에서 구입할 수 있음.

: 김치 16oz(약 450g)의 가격은 12달러임.



그림. 뉴욕에서 판매되고 있는 MATT’ S KIMCHI

○ 표준화현황

- 김치 개발 연구는 한국인들에 의해 대부분 진행되었고, 본 과제에서 젓갈 대체용 젓갈을 개발하여 비건 김치를 개발하여 표준화가 되면 김치 수출에 도움이 될 것으로 사료됨.

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

2-1. 비건 김치 레시피 개발 및 제조공정 최적화

2-1-1. 비건 김치 레시피 개발 및 비건 김치 최적 종균 선발 (김치연구소, 1차년도)

1) 젓갈을 사용하지 않는 김치 레시피 문헌조사

가) 조사방법

젓갈을 사용하지 않는 김치의 제조방법과 레시피를 확보하고자 사찰김치, 젓갈 안 넣은 김치, 소금으로 담은 김치, 소금지 등의 키워드로 조리서, 고문헌 등 김치 관련 자료를 수집하였다.

나) 조사결과

조리서, 고문헌 등을 통해 수집한 젓갈을 사용하지 않는 김치의 대표 레시피를 표에 정리하였다. 젓갈의 사용하지 않는 김치들은 공통적으로 젓갈의 감칠맛 대체를 위한 소재를 사용한 것이 특징으로, 맛의 개선을 위해 감칠맛 성분이 높은 것으로 알려진, 버섯류와 조선간장(국간장), 다시마, 홍시 등을 사용한 것으로 조사되었다. 젓갈을 사용하지 않는 대신 표고, 다시마, 무 등을 많이 넣고 육수를 끓여 주로 사용하였으며, 시원한 맛을 내기 위해 지역에 상관없이 청각을 다져서 넣어 이용하였다. 마른 표고와 다시마를 우려낸 물에 늙은 호박이나 찹쌀을 넣고 끓여 죽을 쭉거나, 양념의 재료로 단맛이 나는 지역 특산물 홍시, 사과 등 넣은 기록도 있었다.

2) 상품 비건김치 특성분석

가) 연구방법

(1) 시료 수집

상품 비건김치의 특성분석을 위해 시중에 유통중인 구매 가능한 비건 상품김치를 수집하였다. 광고하는 곳은 많았으나 실제 구매가 가능한 곳은 3개사 뿐이었다.

(2) 실험방법

① pH, 산도

pH는 시료를 적절한 농도로 희석한 후, pH meter (pH Electrode blue line 12, SCHORR Instruments, Germany)를 사용하여 3회 반복 측정된 다음 평균값을 구하였다. 총산도는 시료액 10 mL을 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여, 소비된 NaOH용액의 소비량을 측정하여 다음의 식을 통해 계산하였다.

$$\text{산도}(\%) = \frac{\text{소비된 } 0.1N \text{ NaOH}(mL) \times 0.009 \times \text{NaOH factor}}{\text{적정에 사용된 시료액의 양}(mL)} \times 100$$

② 염도

염도는 희석한 시료액 10 mL를 취하고, 2% potassium chromate 1 mL를 넣어 0.02 N AgNO₃ 용액으로 적정하여 아래 식을 이용하여 계산하였다.

표 2-1-1-1. 젓갈을 사용하지 않은 김치 레시피

1		2			3			4			5	6		7		8		
절 임	배추	절 임	배추	4포기	절 임	배추	2포기	절 임	배추	5kg	배추	절 임	배추	절 임	배추	절 임	배추	3포기
	소금		소금	2컵		소금	1컵		소금	100g	무		소금		소금		소금	소금
	생강		무	2개		무	1/2개		무	750g	고춧가루		고춧가루		고춧가루		무(채썰기)	1개
	마늘		당근	1개		쪽파			홍시	300g	양파		채소육수		찹쌀풀		갓	
	고춧가루		홍고추	3개	찹 쌀 풀	찹 쌀 가 루	2큰술		갓	250g	마늘		사과즙		무		쪽파	한줌
육 수	표고버섯		쪽파	7-8뿌리			물	2컵		생강	25g	파		찹쌀풀		마늘		고춧가루
	다시마		찹쌀풀			양파	1개	청각	50g	부추		마늘		생강		국간장	150ml	
	간장		양파	1개		마늘	10-15개	고춧가루	120g	당근		생강		소금		마늘		
	찹쌀가루		마늘	5큰술		생강즙	2작은술	찹쌀풀	100g	사과		국간장		쪽파		생강		
			생강	2큰술		조선간장	1/2-2/3컵	다시마	10g	생강						설탕		
			고춧가루	1+1/2컵		고춧가루	1+1/2-2컵			소금						무(즙)	반개	
			매실청	1/2컵														
			조선간장	2/3컵														
			소금	선택														

$$\text{염도}(\%) = \frac{\text{소비된 } AgNO_3(mL) \times 0.00117 \times AgNO_3 \text{ factor} \times \text{희석배수}}{\text{시료 채취량}(g)} \times 100$$

③ 미생물

시료의 총균수를 측정하기 위해 시료액을 $10^1 \sim 10^7$ 까지 희석하였다. 선택된 시료액의 희석균을 PCA agar plate (Kisanbio)에 100 uL씩 분주한 후 주입평판법을 이용하여 골고루 분산시킨 뒤 37°C에서 2일간 배양하였다. 배양된 PCA agar plate 속의 균을 카운터하여 총 균수를 측정하였다.

시료의 젖산균수를 측정하기 위해 시료액을 $10^1 \sim 10^7$ 까지 희석하였다. 선택된 시료액의 희석균을 MRS agar plate (Kisanbio)에 100 uL씩 분주한 후, 주입평판법을 이용하여 골고루 분산시킨 뒤 37°C에서 2일간 혐기적으로 배양하였다. 배양된 MRS agar plate 속의 균을 카운터하여 젖산균수를 측정하였다.

④ 관능검사

관능검사는 훈련된 김치 관능요원 12명을 선발하여 0, 1, 2주에 실시하였으며 9점 척도법에 따라 평가하였다. 시료는 젓갈 대체 김치 3종을 약 20 g씩 용기에 담아 제공하였다. 외관(색), 냄새, 조직감, 맛, 전반적인 기호도 항목으로 김치의 기호도를 평가하였는데 ‘매우 좋다’는 9점, ‘아주 좋다’는 8점, ‘좋다’는 7점, ‘약간 좋다’는 6점, ‘보통이다’는 5점, ‘약간 나쁘다’는 4점, ‘나쁘다’는 3점, ‘아주 나쁘다’는 2점, ‘매우 나쁘다’는 1점으로 하여 김치에 대한 기호도를 평가하였다. 또한, 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛, 이미 등 5가지 항목으로 ‘매우 강하다’는 9점, ‘아주 강하다’는 8점, ‘강하다’는 7점, ‘약간 강하다’는 6점, ‘보통이다’는 5점, ‘약간 약하다’는 4점, ‘약하다’는 3점, ‘아주 약하다’는 2점, ‘매우 약하다’는 1점으로 하여 김치의 선호도를 평가하였다.

나) 연구결과

(1) 조사 결과

시중에서 구매 가능한 상품 비건김치를 수집한 후, 김치의 레시피를 조사한 결과 젓갈의 감칠맛을 대체하기 위해 한식간장, 채소육수, 밀분해추출물, 기타소금, 다시마액 등 사용하는 것으로 확인되었다. 이는 사찰김치의 레시피와 큰 차이가 없었다. 그러나 업체마다 채수를 만드는 재료와 밀분해추출물, 유산균 배양액 등 상품화를 위한 소재를 사용한 곳도 있었으며, 태움용융소금, 기타 소금 등 감칠맛이 있다고 알려진 소금을 다양하게 활용하고 있는 것이 특징이었다. 유통 중인 비건김치는 일반 배추김치처럼 매일 제조하여 갓담은 상태로 제공받기는 어려운 상황이었으며, 갓 담은 김치를 제공받기 위해서는 제조사의 일정에 따라 기다려야 했다.

(2) 분석 결과

① 이화학 분석 결과

유통중인 비건김치는 pH 5.59의 갓담은 상태의 김치도, pH 4.05로 과숙된 상태의 김치로 구

매되어 김치의 숙성도 차이는 비교하기 어려웠다. 염도는 1.23의 저염김치에서 1.8내외의 일반 김치로 분석되었다.

표 2-1-1-2. 유통 중인 비건김치의 이화학적 특성 분석 결과

업체명	pH	산도(%)	염도(%)
A	4.05±0.01	0.92±0.01	1.89±0.02
B	4.18±0.01	0.71±0.01	1.80±0.03
C	5.59±0.01	0.32±0.01	1.23±0.02

표 2-1-1-3. 유통 중인 비건김치의 이화학적 특성 분석 결과

A		B		C
절임배추 (87.5%)	배추(98%) 소금(2%)	절임배추 (84%)	배추(98%) 소금(2%)	배추 무
고춧가루		고춧가루(1.2%)		고춧가루
무즙		무즙		마늘
양파즙		마늘(1.6%)		생강
한식간장		정제소금(0.3%)		찹쌀풀
채소육수 (물, 양배추, 감자, 무, 양파, 다시마)		야채수 추출액 물98.53,감자0.5,무0.5,양파0.2,다 시마0.1,대파0.1,건고추씨0.05,말 린표고버섯0.02		다시마액
마늘		찹쌀풀(찹쌀가루1:정제수29)		갓
설탕		파(대파)		쪽파
쪽파		양파		미나리
찹쌀풀		미나리		기타소금
생강		설탕		
사과		생강		
태움용용소금		한식간장		
		사과		
		잔탄검		
		밀분해추출물		
		유산균배양액		

② 미생물 분석 결과

상품 비건김치의 미생물 분석 결과는 상품 김치간의 미생물 수와 일반 김치와 차이가 없는 것 분석되었다.

③ 관능검사 결과

연구소 전문패널을 활용한 상품 비건김치의 관능검사 결과, 김치의 숙성 정도가 다르기에 각 개별 김치의 절대평가를 수행하였다. 그 결과 pH 4.0의 A사는 이미 과숙의 상태이나 조직감 아삭한 정도에서는 숙성도보다 높게 평가되었으며, pH 4.18인 B사의 김치는 감칠맛에서 보통 이상으로 평가되었다. B사는 밀분해추출물과 한식간장을 혼합하여 사용한 김치로 감칠맛에서 높게 평가된 듯 하다. 갓 담은 C 사의 김치는 소금으로만 만든 김치로 감칠맛에서는 한식간장을 사용한 김치보다는 다소 낮게 평가되었다.

표 2-1-1-4. 유통 중인 비건김치의 이화학적 특성 분석 결과

		A	B	C
외관 기호도		4.33±0.78	4.92±1.44	6.42±1.24
냄새 기호도		4.17±1.85	3.67±0.89	6.17±1.27
맛	짠맛	5.50±1.31	5.83±1.11	4.17±1.03
	단맛	3.83±1.11	4.42±1.44	4.92±1.38
	쓴맛	4.33±1.50	4.25±1.42	3.50±1.17
	감칠맛	4.42±1.73	5.17±1.19	3.92±1.24
	매운맛	4.50±1.24	5.00±1.28	4.58±1.24
	전반적인 맛	4.17±1.47	4.50±1.62	4.83±1.70
조직감 아삭한 정도		4.83±1.03	4.58±1.08	5.58±1.08
종합적 기호도		4.00±1.41	4.42±1.62	4.75±1.76

3) 풀무원 수출용 비건김치 저장품질특성 분석

가) 연구방법

(1) 시료 수집

풀무원의 수출용 김치 마일드와 스파이시 2종 제품의 레시피 개선안과 유통 중 품질변화를 파악하기 위해 익산 풀무원 김치제조공장에서 제공받았다.

(2) 실험 방법

저장품질특성 분석을 위해 김치 저장온도를 4℃와 10℃에서 6주 저장실험을 수행 계획하여 각 400g 15개로 소분 포장하여 수행하였다.

나) 분석 결과

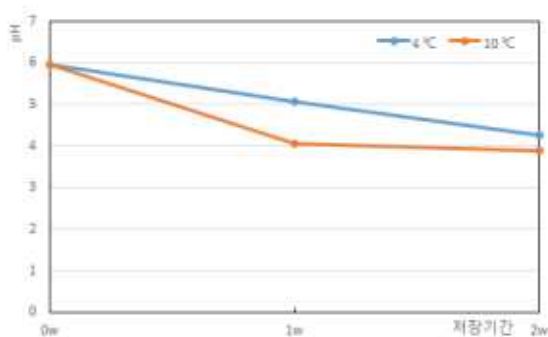
풀무원 익산 공장에서 생산하는 수출용 김치 2종을 공급받아 수출용 용기와 파우치 포장으로 포장 종류를 달리하여 저장실험을 수행한 결과, 택배 수령으로 인해 김치의 품온 조절에 되지 않아 이로 인해 예상했던 실험기간보다 짧은 시간에 완숙되어 저장온도 4℃와 10℃에서 모두 2주 후 실험을 종료하였다. 마일드와 스파이시 김치 종류, 레시피에 의한 저장특성 차이는 확인되었다.

① 이화학 분석 결과

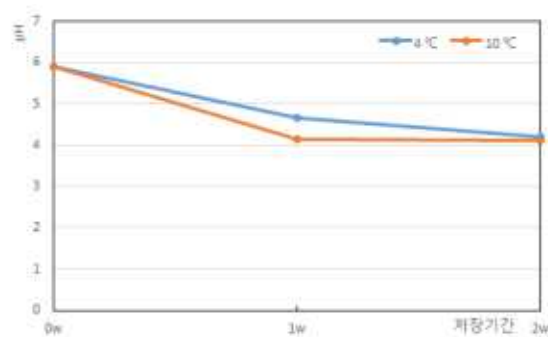
풀무원 수출용 김치 2종은 염도가 2.0내외로 유사하였으며, 초기 pH는 5.8 내외였다. 4℃에서 7일간 저장 후 마일드의 산도는 0.37%, 스파이스의 산도는 0.64%로 그 변화가 컸으며, 저장 14일 후에는 이미 산도가 1%를 넘기는 과숙의 상태에 이르렀다. 이는 택배 수송 중 장시간의 기온도에 노출되어 숙성이 빨리 진행된 것으로 추정되며, 이는 수출 현장에서 자주 발생하는 조건으로 현지 도착 후 따뜻한 외기에 노출시 김치가 바쁘기 과숙되어 상미기간이 짧아 상품성이 낮아지는 현상과 같은 것으로 보였다. 이로인해 김치의 레시피 개선과 함께 숙성지연에 대한 이슈가 있는 것으로 논의 되었다.

표 2-1-1-5. 파우치 포장 김치의 저장 중 염도와 산도

풀무원 비건 김치		염도(%)	산도(%)
0주	마일드	1.96±0.03	0.29±0.0
	스파이시	2.06±0.01	0.33±0.0
1주	마일드 4℃		0.37±0.01
	마일드 10℃		0.86±0.01
	스파이시 4℃		0.64±0.01
	스파이시 10℃		1.00±0.01
2주	마일드 4℃		1.77±0.24
	마일드 10℃		3.07±0.01
	스파이시 4℃		2.86±0.01
	스파이시 10℃		3.31±0.03



A. 파우치포장 마일드 김치



B. 파우치포장 스파이시 김치

그림 2-1-1-1. 파우치 포장 김치의 저장 중 pH 변화

② 미생물 분석 결과

풀무원 수출용 김치의 미생물 분석 결과 초기 유산균 수는 1×10^4 이었으나 숙성되면서 1×10^7 까지 상승하는 것으로 확인되었다. 이는 마일드 김치와 스파이시 김치 모두 동일함을 확인하였다.

표 2-1-1-6. 파우치 포장 김치의 저장 중 미생물 측정 결과

풀무원 비건 김치		log CFU/g	
		PCA	MRS
0주	마일드	4.51±0.05	4.65±0.02
	스파이시	4.93±0.07	4.86±0.08
1주	마일드 4℃	7.25±0.03	7.25±0.03
	마일드 10℃	7.52±0.08	7.57±0.01
	스파이시 4℃	7.50±0.03	7.77±0.03
	스파이시 10℃	7.42±0.06	7.68±0.05
2주	마일드 4℃	7.54±0.03	7.56±0.10
	마일드 10℃	7.08±0.04	7.12±0.03
	스파이시 4℃	7.59±0.09	7.21±0.02
	스파이시 10℃	6.55±0.72	7.09±0.02

4) 비건김치 감칠맛 개선 소재 선발

가) 유리 글루탐산 함량이 높은 향미증진 소재 조사

김치에 감칠맛을 부여하는 젓갈의 주요 성분으로 유리 아미노산 중에서 글루탐산 함량이 높고, 또한, 핵산 관련 물질인 아데노신 3인산 (ATP), 아데노산 2인산 (ADP), 아데노신 1인산 (AMP), 이노신 1인산 (IMP), 이노신 (Hx), 하이포산틴 (HxR) 함량 또한 높은 것으로 확인되었다. [박덕천 외, 2003].

젓갈의 감칠맛 대체 부재료에 대한 연구를 진행하기 위해서 식품 속의 감칠맛 성분 함량을 살펴보았을 때, 유리 글루탐산의 경우, 채소류인 옥수수, 토마토, 완두콩에서 함유량이 높은 것으로 보고되었다. 식품 속 글루탐산 함량을 표로 정리하였다.

표 2-1-6. 식품 속 글루탐산 함량

(단위: ppm)

유제품	알/육류	어류	채소류
우유 20	달걀 230	대구 90	양파 180
모유 220	돼지고기 230	연어 200	비트 300
파마산치즈 12,000	쇠고기 330	고등어 360	피망 320
	닭고기 440		당근 330
	오리고기 690		시금치 390
			옥수수 1,300
			토마토 1,400
			완두콩 2,000

핵산 관련 성분 함량에서 이노신 1인산은 생선류와 고기류에 많이 함유되어 있고, 구아닐 1인산은 채소류인 건조 표고버섯에서 함량이 가장 높은 것으로 보고되어으며, 이들 감칠맛 성분 함량 데이터를 바탕으로, 젓갈처럼 아미노산이 풍부한 것으로 알려져 있는 콩류, 글루탐산은 다소 적지만, 핵산 관련 물질 함량이 높은 육류, 단백질 함량은 적지만 유리 글루탐산이 많아서 본 연구에서는 단백질 급원 식품 중 콩류, 육류와 단백질 함량은 적지만 유리 글루탐산 함량이 높아 감칠맛을 내기에 적합한 채소류를 단독 또는 혼합하여 젓갈 대체 부재료로 활용하는 것이 적합할 것으로 생각된다.

젓갈을 대신하여 굴 가수분해물, 명태육 가수분해물 및 청각 추출물을 첨가한 김치의 유기산 및 핵산관련 물질 함량을 분석했을 때, 유기산 함량이 증가하였고, 핵산관련 물질 또한 청각추출물 첨가 김치를 제외하고는 높은 것으로 확인되어 이들 젓갈 대용물이 김치의 맛 뿐 아니라 숙성에도 영향을 미칠 것으로 보고된 바 있으며, 젓갈과 유사한 아미노산 조성을 보이고 제한 아미노산 lysine 또한 함유하고 있는 것으로 알려진 콩을 활용하여 감칠맛을 부여하는 연구들이 보고되고 있음. 젓갈 대신 첨가해서 활용되거나, 젓갈에 더해서 감칠맛을 주는 연구들이 보고되었다.

페놀 화합물과 항산화 효능을 가지는 된장 추출물을 젓갈을 대신해서 김치에 첨가하여 발효시켰을 때, 5.0%의 된장 추출물을 사용시 관능검사 결과에서 높은 기호도를 나타내어 김치의 맛과 향을 향상시키는 것으로 보고하였으며[Chuob, 2017], 2018년 미국에서 진행된 연구에서, 미소 페이스트와 피쉬 소스를 각각 넣은 vegan 김치와 비vegan 김치의 미생물을 분석했을 때 젓갈을 첨가하거나 첨가하지 않았을 때 김치의 발효에 영향을 미치는 유산균의 차이를 보이지는 않았다고 Zabat의 연구진에 의해 발표되었다.

토마토는 과채류 중에서 글루탐산이 가장 많은 작물로 잘 익은 토마토 100 g에 300 mg 정도의 글루탐산이 들어 있다고 알려져 있음. 감칠맛 성분인 글루탐산이 많이 함유되어 있어서 해외에서는 육수의 감칠맛을 내기 위해 요리에서의 활용도가 높은 편이다. 또한, 토마토는 구연산, 사과산, 주석산 등의 유기산들을 함유하고 있는데, 일반적으로 유기산들이 육수 제조시 뼈 조직까지 침투하여 무기질을 가용화하고 관능검사에서도 높은 기호도를 나타내는 것으로 보고되었다. 국내에서도 토마토를 이용한 육수의 품질을 향상시키기 위한 연구들이 보고되었는데, 닭뼈 육수, 산천어 육수, 대구뼈 육수, 냉면 육수에 활용된 연구들이 있다[우현모 외, 2010; 김기쁨 외, 2012; 윤학봉 외, 2013; 김자민 외, 2018].

토마토 첨가량을 달리해서 닭뼈 육수 품질에 미치는 효과를 살펴보았을 때, 7.4%의 토마토를 첨가했을 때 총 유리 아미노산의 함량 뿐 아니라 종합적인 기호도가 높았음을 보고되지만 있기에 토마토 등 감칠맛이 풍부한 소재를 김치에 적용해 활용해 보고자 한다.

나) 멸치젓갈, 새우젓갈 아미노산 함량

(1) 젓갈 유리 아미노산 조성 조사 결과

전라남도에서 주로 생산되는 젓갈류의 유리아미노산 조성을 분석한 문헌을 통해 시판되는 멸치 젓갈 8종, 봄, 가을 등 계절에 따른 멸치액젓 등 멸치 젓갈의 유리 아미노산 조성을 살펴보았을 때, glutamic acid 함량은 적게는 40.1에서 많게는 2921 mg%로 큰 차이를 나타내었음. 특별히 낮은 함량을 나타내는 젓갈을 제외하고는 대략 1000에서 3000 mg% 범위로 조사되었으며, glycine 함량 또한 큰 차이를 나타냈으나 대략 200-600 mg% 범위를 엮음. 마지막으로 alanine 함량은 900-1700 mg% 수준이었으며[허남철, 1998, 오광수, 1995, 조영제, 2001], 시중에 유통 중인 멸치젓갈을 수집하여 유리 아미노산 함량을 분석한 결과 시판 멸치젓갈간의 차이는 매우 컸으며, 감칠맛에 영향이 있는 대표 성분인 glutamic acid 함량 적게는 8410 mg%에서 최대 10202 mg%로 약 17% 이상 차이가 있게 조사되었다.

문헌 조사 결과 멸치 젓갈과 새우 젓갈 모두 제조 업체나 생산 계절, 지역에 따라 젓갈의 품질에 큰 차이가 있었기에 젓갈대체 소재 선정시 glutamic acid 함량 비교 기준 선정이 필요하다.

표 2-1-1-7. 시판중인 멸치젓갈의 유리 아미노산 함량

(mg%)

	M-1	M-2	M-2	M-4
Aspartic acid	5740.09±141.67	4179.35±17.11	5949.95±38.13	6772.36±16.55
Glutamic acid	9700.59±230.07	8410.28±11.20	8962.98±45.63	10202.20±14.33
Asparagine	26.77±1.11	20.92±0.90	26.62±0.96	19.71±1.07
Serine	3437.70±68.26	1828.68±3.16	3307.88±8.67	3715.31±9.32
Glutamine	433.29±14.70	1032.91±4.08	736.48±3.25	552.59±1.81
Histidine	4197.83±203.91	2869.94±38.25	3439.57±34.50	4125.30±14.52
Glycine	1980.50±48.42	2101.53±10.52	2305.96±11.24	2241.40±3.51
Threonine	3977.07±80.01	2125.11±34.84	3824.76±14.18	4234.09±13.20
Arginine	3344.79±61.15	2453.71±8.31	4024.89±1837	5235.83±30.67
Alanine	5085.77±99.30	7725.52±25.93	5602.25±18.88	5329.58±1.37
Taurine	1447.03±40.21	1919.25±14.14	1756.20±13.32	1605.87±4.75
Tyrosine	1747.79±47.97	1423.18±2.65	2254.85±13.76	1650.12±25.31
Valine	3985.43±65.02	4270.06±4.20	4304.61±18.59	4465.46±1.13
Methionine	2291.28±45.98	1897.22±2.98	2041.05±6.04	2174.78±4.09
Tryptophane	1086.82±46.62	646.31±37.07	962.34±19.21	1084.53±16.60
Phenylalanine	2933.22±72.42	2509.43±28.72	3055.06±25.65	3002.06±8.74
Isoleucine	3930.15±61.80	3227.70±23.30	3455.26±14.22	4059.66±6.29
Leucine	6830.56±101.76	5471.37±5.14	5718.13±24.01	6843.47±7.50
Lysine	3735.31±75.00	2593.51±6.57	386.99±1.46	1938.86±6.98
Proline	1152.21±71.82	1416.77±1.70	1538.56±20.38	1629.03±8.30

새우 젓의 유리 아미노산 함량도 멸치 젓갈과 유사하게 큰 차이를 보였는데 멸치 젓갈보다 새

우 젓의 glutamic acid, glycine, 그리고 alanine 함량이 다소 높은 것으로 보고되었다[이용호, 1986, 정승용, 1976, Peralta EM, 2008].

시중에 유통 중인 새우젓을 수집하여 유리 아미노산 함량을 분석한 결과 생산지에 따라 새우젓의 유리 아미노산 함량의 차이가 두드러졌으며, 이는 멸치젓갈보다 그 격차가 컸음. 감칠맛에 영향이 있는 대표 성분인 glutamic acid 함량 적게는 5722 mg%에서 최대 10627 mg%로 약 50% 가량 차이가 있게 조사되었음. Glutamine, histidine의 함량도 2배 이상 차이나는 것으로 조사되었다.

표 2-1-1-8. 시판중인 새우젓 유리 아미노산 함량

(mg%)

	S-1	S-2	S-3	S-4
Aspartic acid	5252.01±110.88	4217.44±54.52	5112.14±54.30	4518.68±10.12
Glutamic acid	10627.82±247.33	5722.53±29.52	9718.15±45.68	8770.21±61.02
Asparagine	2874.08±45.49	1678.69±5.22	2563.41±17.15	2461.13±16.38
Serine	3478.69±50.46	2032.59±5.70	3411.66±28.05	2995.85±2.87
Glutamine	2237.59±39.44	1018.27±14.60	1986.71±8.20	2178.82±11.67
Histidine	1950.02±30.97	856.00±10.89	1858.86±5.36	1624.35±12.10
Glycine	4994.66±71.24	3271.52±39.28	4419.80±55.75	3844.87±56.55
Threonine	3887.00±61.80	2826.94±1.86	3747.76±13.27	3139.91±13.37
Arginine	7863.19±112.31	4910.85±20.79	6856.46±31.60	6998.93±28.71
Alanine	5581.52±64.20	3881.55±8.52	5054.71±33.17	4695.45±9.37
Taurine	2939.75±28.32	2979.01±24.53	3995.70±67.60	3873.42±68.55
Tyrosine	2847.49±64.37	2947.52±25.42	2788.28±8.69	2965.96±2.53
Valine	4208.00±51.91	3154.19±4.55	4145.35±25.88	3597.00±6.43
Methionine	2231.25±24.42	1540.77±6.51	2212.93±21.35	2090.59±3.78
Tryptophane	1059.02±20.86	718.88±14.71	1123.25±5.31	987.96±9.77
Phenylalanine	3370.17±32.37	2333.37±5.18	2970.76±7.35	3058.66±15.48
Isoleucine	3880.89±42.76	2953.45±13.39	3941.77±16.15	3381.82±0.35
Leucine	6426.77±58.83	4508.63±14.44	6063.65±44.82	5102.04±11.00
Lysine	6154.98±118.92	3741.07±121.81	5757.56±75.29	5393.20±137.72
Proline	3982.26±35.39	850.33±4.97	3294.25±7.59	3180.78±305.26

다) 향미 증진 소재 선발

(1) 토마토

(가) 연구방법

완숙 토마토를 구입하여 구성 아미노산과 유리 아미노산 함량을 분석한 후 짓갈함량과 비교 활용범위를 정하고자 하였다.

① 시료 수집

시중에 유통중인 완숙토마토를 구입하여 분석에 활용하였다.

② 분석방법

구성, 유리 아미노산 분석을 위해서 토마토 시료를 적당히 희석하고 균질화하여 15시간 동안 냉장 보관한 후 0.45 μm membrane filter로 여과한 다음 아미노산 분석을 위한 시료용액으로 사용하였다. 분석항목은 약 20종이며, 시험용액 및 표준용액을 각각 0.5 uL씩 주입하여 얻은 피크의 면적을 구하여 검량선을 작성한 후 아미노산 함량을 계산하였다. 아미노산 분석을 위한 HPLC 조건은 아래 표와 같음.

표 2-1-1-9. 아미노산 분석을 위한 HPLC 조건

Parameters	Conditions
HPLC System	Ultimate 3000
Column	VDSpher 100 C18-E (4.6x150 mm, 3.5um/VDS optilab, Germany)
Mobile phase	A: 40mM Sodium phosphate dibasic, pH 7.8 B: Water/Acetonitrile/Methanol (10:45:45 v/v%)
Flow rate	1.5 mL/min
Detector	FL Detector 1260 FLD(Agilent, USA) : Emission 450 nm, Excitation 340 nm(OPA) : Emission 305 nm, Excitation 266 nm(FMOC) UV Detector(Thermo dionex, USA) : 338 nm
Oven Temp.	40°C

표 2-1-1-10. 아미노산 분석을 위한 이동상 조건

Time(min)	Mobile phase A	Mobile phase B
0	100	0
24	45	55
24.5	0	80
26	0	80
26.5	100	0
30	100	0

(나) 연구결과

토마토의 구성 및 유리 아미노산을 분석한 결과, 토마토의 구성 아미노산은 대체적으로 낮은 수준을 나타냈고, glutamic acid가 3.25 mg/kg으로 가장 높은 함량을 보였다. 이렇듯 구성 아미노산 함량이 낮은 것은 알려진 것처럼 토마토의 아미노산의 경우 유리 상태로 존재하기 때문인 것으로 사료되었다.

구성 아미노산 함량과 달리 토마토의 유리 아미노산 함량은 상당히 높은 수준을 나타냈는데, glutamine 함량이 두드러지게 높음을 확인할 수 있었다. 그 외에 glutamic acid, aspartic acid, GABA, asparagine 함량이 가장 높은 것을 확인하였다. 특히, glutamine 함량 또한 11626 mg/kg으로 상당히 높은 것으로 나타났음. 젓갈을 대신하여 김치에 감칠맛을 주는 소재로써의 활용 가능성이 있다고 판단되었다.

표 2-1-1-11. 토마토의 구성 아미노산 조성

(mg/kg)

구성 아미노산	
Aspartic acid (Asp)	0.89
Threonine (Thr)	0.25
Serine (Ser)	0.21
Glutamic acid (Glu)	3.25
Glycine (Gly)	0.18
Alanine (Ala)	0.21
Cystine (Cys)	-
Valine (Val)	0.18
Methionine (Met)	0.07
Isoleucine (Ile)	0.18
Leucine (Leu)	0.30
Tyrosine (Tyr)	0.15
Phenylalanine (Phe)	0.24
Lysine (Lys)	0.32
NH3	-
Histidine (His)	0.16
Arginine (Arg)	0.26
Proline (Pro)	0.16
Total	7.00

표 2-1-1-12. 토마토의 유리 아미노산 조성

(mg/kg)

유리 아미노산	
Phosphoserine (P-Ser)	68.9
Taurine (Tau)	11.7
Phospho ethanol amine (PEA)	-
Urea (Urea)	-
Aspartic acid (Asp)	2,195.7
Threonine (Thr)	494.1
Serine (Ser)	257.6
Asparagine (AspNH ₂)	1,148.0
Glutamic acid (Glu)	8,661.3
Glutamine (GluNH ₂)	11,626.8
Sarcosine (Sar)	-
α -Aminoadipic acid (α -AAA)	-
Glycine (Gly)	58.3
Alanine (Ala)	154.2
Citrulline (Cit)	60.4
α -Amino-n-butyric acid (α -ABA)	-
Valine (Val)	107.6
Cystine (Cys)	-
Methionine (Met)	61.3
Cystathionine (Cysthi)	-
Isoleucine (Ile)	131.3
Leucine (Leu)	145.9
Tyrosine (Tyr)	167.3
Phenylalanine (Phe)	497.6
β -Alanine (β -Ala)	35.8
β -Aminoisobutyric acid (β -ABA)	-
γ -Amino-n-butyric acid (γ -ABA)	2,299.4
Ethanol amine (EOHNH ₂)	38.6
Hydroxylysine (Hylys)	-
Ornithine (Orn)	9.7
Lysine (Lys)	240.4
1-Methylhistidine (1Mehis)	-
Histidine (His)	189.1
3-Methylhistidine (3Mehis)	-
Anserine (Ans)	-
Carnosine (Car)	-
Arginine (Arg)	297.2
Hydroxy proline (Hypro)	-
Proline (Pro)	-
Total	28,958

(2) 향미 증진 소재 적용 김치 평가

(가) 실험방법

① 김치 제조

젓갈대체 소재 검토를 위해 현재 풀무원에서 사용중인 소재와 샘표 향미발효액, 젓갈, 야채 농축액, 조선간장 등을 첨가하고 염도를 조절하여 김치를 제조하였다. 각 김치는 500g씩 소포장하여 6℃에서 0, 4, 7, 11일 간격 분석하였다.

표 2-1-1-13. 김치 레시피

원료	con	nor	샘표	액젓	야채	간장
절임배추	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
무즙						
고춧가루						
마늘						
양파						
생강						
당근						
경백당						
배푸레						
정제수						
정제염	0.6	0.4	0.2	0.1	0.4	0.4
풀무원소재	0.3					
샘표소재		2.2	4.4			
젓갈(멸치액젓)				2.2		
야채농축액					2.2	
조선간장						2.2
계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	

con : 풀무원 소재 첨가
nor : 젓갈 및 대체제 무첨가군

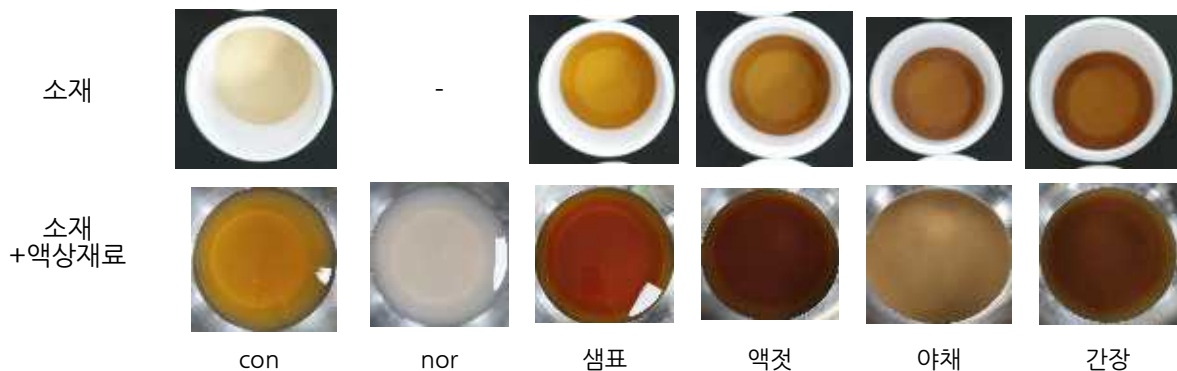


그림 2-1-1-2. 젓갈대체 소재 외관 및 육수 혼합시 외관 비교

② 분석 방법

pH는 시료를 적절한 농도로 희석한 후, pH meter (pH Electrode blue line 12, SCHORR Instruments, Germany)를 사용하여 3회 반복 측정된 다음 평균값을 구하였다. 총산도는 시료액 10 mL을 0.1 N NaOH 용액으로 pH가 8.3이 될 때까지 적정하여, 소비된 NaOH용액의 소비량을 측정하여 다음의 식을 통해 계산하였다.

$$\text{산도}(\%) = \frac{\text{소비된 } 0.1N \text{ NaOH}(mL) \times 0.009 \times \text{NaOH factor}}{\text{적정에 사용된 시료액의 양}(mL)} \times 100$$

염도는 희석한 시료액 10 mL를 취하고, 2% potassium chromate 1 mL를 넣어 0.02 N AgNO₃ 용액으로 적정하여 아래 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{염도}(\%) = \frac{\text{소비된 } AgNO_3(mL) \times 0.00117 \times AgNO_3 \text{ factor} \times \text{희석배수}}{\text{시료 채취량}(g)} \times 100$$

시료의 총균수를 측정하기 위해 시료액을 10¹~10⁷까지 희석하였다. 선택된 시료액의 희석균을 PCA agar plate (Kisanbio)에 100 uL씩 분주한 후 주입평판법을 이용하여 골고루 분산시킨 뒤 37°C에서 2일간 배양하였다. 배양된 PCA agar plate 속의 균을 카운터하여 총 균수를 측정하였다.

시료의 젖산균수를 측정하기 위해 시료액을 10¹~10⁷까지 희석하였다. 선택된 시료액의 희석균을 MRS agar plate (Kisanbio)에 100 uL씩 분주한 후, 주입평판법을 이용하여 골고루 분산시킨 뒤 37°C에서 2일간 혐기적으로 배양하였다. 배양된 MRS agar plate 속의 균을 카운터하여 젖산균수를 측정하였다.

휘발성 향기 성분 측정은 향기성분 분석을 위한 향기 성분의 추출 및 포집방법은 solid phase-micro extraction (SPME)을 이용한 headspace분석 방법을 사용하였다. 향기성분 분석에서 시료는 10 mL vial (Supelco Inc., Bellefonte, PA, USA)에 넣은 후 알루미늄 캡으로 밀봉한 다음 100 um polydimethylsiloxane (PDMS) fiber에 100 rpm, 50°C에서 30분 동안 흡착하였다. 흡착이 완료되면 fiber를 GC/MS주입구에 삽입하여 향기성분을 250°C에서 3분간 열탈착시켜 GC/MS를 사용하여 분석하여 비교 분석하였는데 결과중에 나오는 siloxane은 추출도구인 fiber에서 나오는 것이므로 제거한 후 결과를 정리하였다.

관능검사는 훈련된 김치 관능요원 12명을 선발하여 0, 1, 2주에 실시하였으며 9점 척도법에 따라 평가하였다. 시료는 젓갈 대체 김치 3종을 약 20 g씩 용기에 담아 제공하였다. 외관 (색), 냄새, 조직감, 맛, 전반적인 기호도 항목으로 김치의 기호도를 평가하였는데 ‘매우 좋다’는 9점, ‘아주 좋다’는 8점, ‘좋다’는 7점, ‘약간 좋다’는 6점, ‘보통이다’는 5점, ‘약간 나쁘다’는 4점, ‘나쁘다’는 3점, ‘아주 나쁘다’는 2점, ‘매우 나쁘다’는 1점으로 하여 김치에 대한 기호도를 평가하였다. 또한, 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛, 이미 등 5가지 항목으로 ‘매우 강하다’는 9점, ‘아주 강하다’는 8점, ‘강하다’는 7점, ‘약간 강하다’는 6점, ‘보통이다’는 5점, ‘약간 약하다’는 4점, ‘약하다’는 3점, ‘아주 약하다’는 2점, ‘매우 약하다’는 1점으로 하여 김

치의 선호도를 평가하였다.

대사체 분석으로 규명된 대사산물은 HMDB (Human Metabolome Database), NCBI (National Center for Biotechnology Information)와 KEGC (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) library 및 database를 이용하여 검증하였다.

(나) 실험결과

① 이화학적 분석 결과

비건 김치 제조를 위한 액젓 대체 소재를 첨가하여 제조한 김치 양념 및 양념을 적용한 김치를 제조하였다. 완성된 김치의 외관 기호도 평가에서 대조구 및 선표 소재가 가장 높은 평가를 받았으며 기존의 관행적으로 사용되는 액젓 사용 김치가 가장 외관적 기호도가 낮게 평가되었다. 선표 김치에서 가장 낮은 1.58 ± 0.01 (%)로 가장 낮았고, 다른 김치와의 염도 비교에서도 액젓 및 간장 김치보다 낮은 염도로 측정되었다. 액젓을 대체를 위한 비건 김치 제조에서 선표 소재를 이용하였을 때 기존 김치보다 외관상 결함이 없으며, 낮은 염도의 김치의 제조가 가능하였다.



그림 2-1-1-3. 김치 양념 및 김치 외관

표 2-1-1-14. 김치 외관 기호도와 염도

	con	nor	선표	액젓	야채	간장
외관 기호도	5.73±1.03	5.33±1.40	5.73±1.16	4.87±1.06	5.67±1.18	5.53±1.06
염도(%)	1.69±0.01	1.58±0.0	1.58±0.01	1.82±0.01	1.75±0.0	1.78±0.0

표 2-1-1-15. 저장 중 pH 변화

day	con	nor	선표	액젓	야채	간장
0	5.69±0.0b	5.73±0.01a	5.62±0.01c	5.48±0.01e	5.45±0.0f	5.54±0.01d
4	4.15±0.01e	4.06±0.01f	4.17±0.01d	4.54±0.01a	4.44±0.0b	4.33±0.01c
7	3.94±0.0e	3.90±0.01f	3.96±0.0d	4.17±0.0a	4.14±0.01b	4.11±0.01c
11	3.85±0.01e	3.85±0.01e	3.96±0.0d	4.00±0.01c	4.09±0.01a	4.07±0.02b

표 2-1-1-16. 저장 중 산도 변화

day	con	nor	샘표	액젓	야채	간장
0	0.27±0.02c	0.26±0.34c	0.34±0.01a	0.35±0.0a	0.32±0.0b	0.32±0.01b
4	0.87±0.01b	0.88±0.0b	0.98±0.01a	0.61±0.02d	0.60±0.0d	0.71±0.01c
7	1.01±0.01b	1.03±0.01b	1.15±0.04a	0.79±0.01d	0.75±0.0e	0.85±0.01c
11	1.10±0.01b	1.05±0.01c	1.15±0.0a	0.88±0.0d	0.75±0.02f	0.83±0.02e

비건 김치 제조를 위한 액젓 및 액젓 대체소재를 첨가한 김치의 발효 저장에서의 pH/산도의 변화를 관찰한 결과 최적 적숙기 pH 및 산도는 Con, Nor, 샘표 첨가 김치는 발효 4일 차에 나타났으며 액젓, 야채, 간장 처리군에서는 pH는 발효 7일, 산도는 발효 11일에 각각 나타났다.

② 미생물학적 분석 결과

김치의 숙성은 저장온도, 염도, 첨가된 부재료등의 다양한 변화요인과 미생물의 작용에 의하여 다양한 발효 특성이 변화된다. 본 연구에서는 첨가된 시료에 의한 미생물 변화를 측정된 결과 발효기간에 따라 총균수 및 젖산균의 수가 증가하였고, 발효 11일에 간장 처리 김치에서 총 균수 및 젖산균의 성장이 가장 높았으며, 발효 4일에는 샘표에서 총 균 및 젖산균의 생육이 가장 높았다. 이러한 결과는 con, nor, 샘표에서 동일한 패턴의 생육을 보였다.

표 2-1-1-17. 저장 중 총균수 변화

(단위: log CFU/g)

day	con	nor	샘표	액젓	야채	간장
0	5.82±0.01b	5.58±0.0c	5.75±0.06b	5.97±0.07a	5.84±0.03b	5.83±0.08b
4	7.75±0.05b	7.77±0.09b	7.93±0.01a	7.10±0.01d	7.35±0.07c	7.48±0.04c
7	7.62±0.01a	7.67±0.03a	7.68±0.05a	7.55±0.14a	7.58±0.06a	7.63±0.04a
11	7.45±0.02cd	7.30±0.14d	7.75±0.03b	7.47±0.06c	7.64±0.01b	9.37±0.01a

표 2-1-1-18. 저장 중 젖산균수 변화

(단위: log CFU/g)

day	con	nor	샘표	액젓	야채	간장
0	5.98±0.03c	6.20±0.08a	6.17±0.12ab	6.16±0.06ab	6.15±0.01ab	6.01±0.02bc
4	7.86±0.02a	7.80±0.09ab	7.87±0.03a	7.14±0.01d	7.47±0.08c	7.66±0.07b
7	7.65±0.05cd	7.74±0.01bc	7.81±0.02b	7.80±0.03b	7.60±0.08d	8.71±0.09a
11	7.46±0.12c	7.46±0.02c	7.61±0.08b	7.72±0.01b	7.65±0.03b	9.35±0.04a

③ 향미성분 분석 결과

GC/MS를 이용하여 6종 첨가물 적용 김치의 발효에 따른 휘발성 물질을 분석한 결과 김치 제조 초기에는 40.98 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 측정되었으며, 모든 처리군에서 발효 초기에 가장 휘발성 성분 함량이 높았고, 발효 시간에 따라 함량이 감소하였다. 발효 11일 차에는 선표 (25.76 $\mu\text{g/g}$) > 야채 (25.25 $\mu\text{g/g}$) > 간장 (24.90 $\mu\text{g/g}$) > 액젓 (24.43 $\mu\text{g/g}$), Nor (24.43 $\mu\text{g/g}$) > Con (24.38)으로 나타났다.

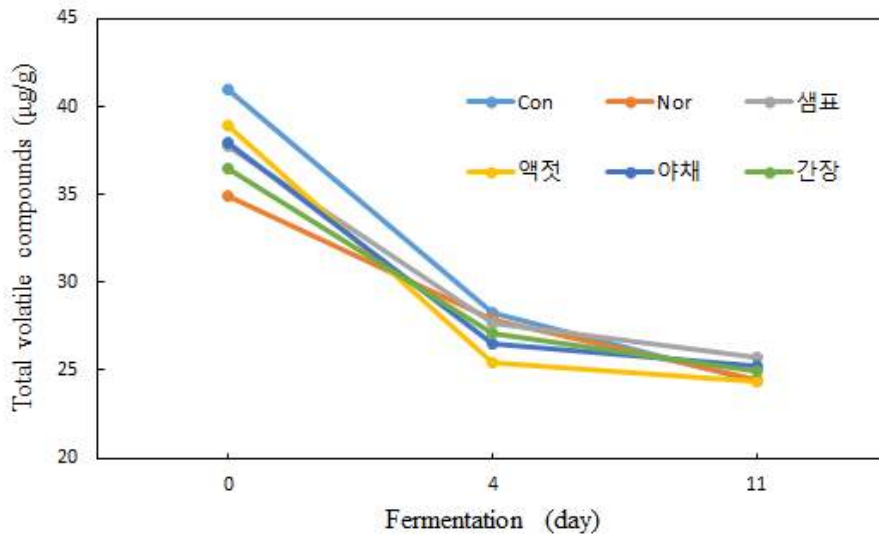


그림 2-1-1-4. 총 휘발성 성분 함량 변화

김치의 휘발성 성분 중 가장 높은 함량을 차지하는 성분은 sulfide, ester 계열의 성분이 양념에 함유된 양파, 생강, 마늘과 더불어 각 첨가물에서 많이 차지하였고, ester 휘발성 성분의 경우도 대부분이 isothiocyanates 성분이 검출된 ester 계열의 휘발성분 중 50% 이상 높게 나타났다. 이러한 sulfide 계열의 경우 강한 향미로 인하여 김치의 이취발생의 악영향이 있지만 선표의 경우 sulfide, ester 계열의 휘발성 성분이 다른 제품에 비하여 월등의 낮기 때문에 관능적인 이미가 적었다.

④ 관능검사 결과

관능검사 분석 결과 제조 당일 김치는 풀무원 소재 첨가 김치 con의 냄새 기호도가 제일 높게 평가되었으며, con > nor > 한식간장 순이었다. 감칠맛에 대한 평가는 선표 > 액젓 > con, 한식간장 순으로 평가되어 선표에서 개발한 향미모듈의 감칠맛의 강도가 제일 높은 것으로 평가되었다. 전체적 기호도는 한식간장 > nor > 선표 > con 순으로 평가되었다.

그러나, 이러한 평가 순서는 김치가 숙성되어 짐에 따라 냄새기호도에서는 nor, 간장이 제일 높게 평가되었으며, 감칠맛의 강도는 con > 선표 > 야채 > 간장 순으로 평가되었다. 전체적인 기호도 평가에서는 선표 > con > 간장의 순으로 평가되어 선표에서 개발한 향미모듈의 평가가 현재 풀무원에서 사용중인 소재보다 높게 평가되는 것으로 확인되었다.

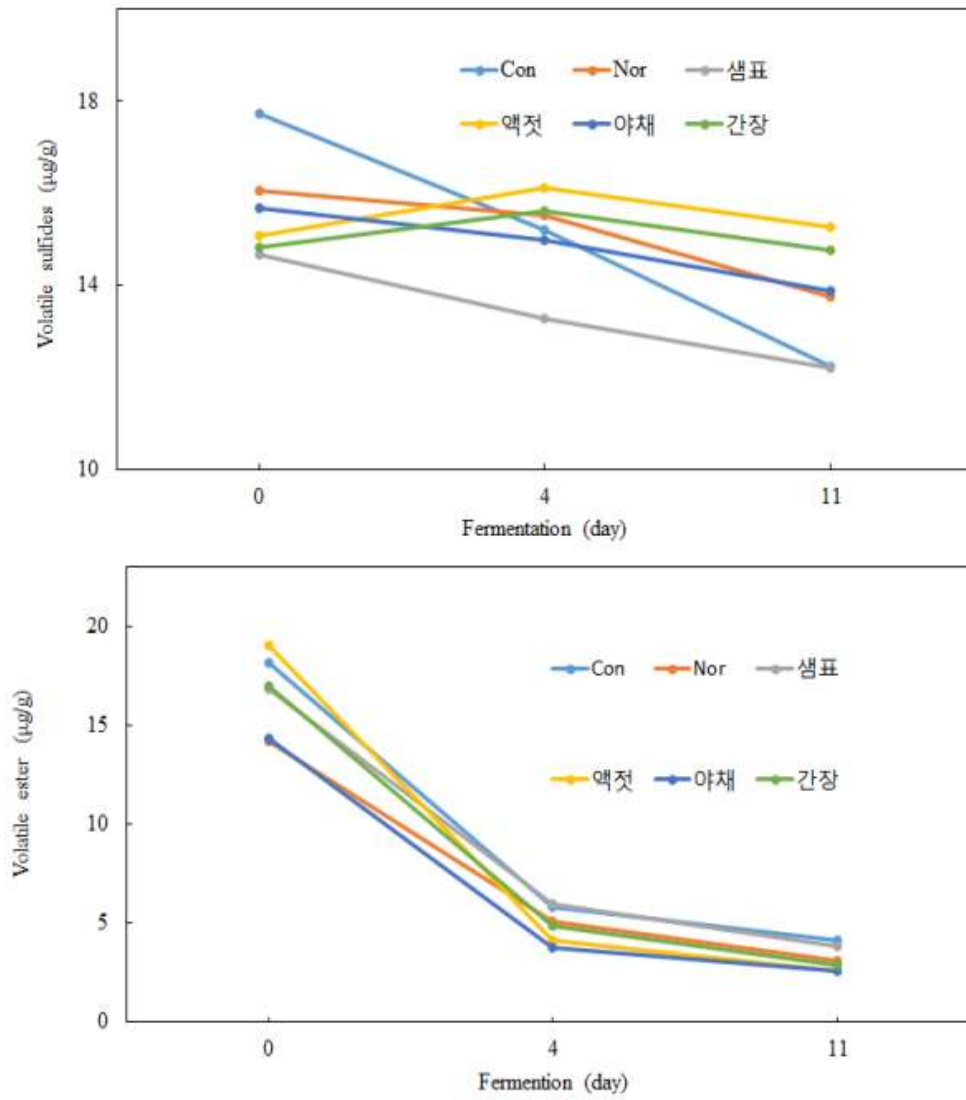


그림 2-1-1-5. 총 휘발성 sulfide/ester 성분 함량 변화

표 2-1-1-19. 향미성분 분석 결과

Class	Data File Name	0_con	0_nor	0_샘표	0_액젓	0_야채	0_간장	4_con	4_nor	4_샘표	4_액젓	4_야채	4_간장	11_con	11_nor	11_샘표	11_액젓	11_야채	11_간장
acids	Acetic_acid	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.284	1.332	1.236	0.42	0.448	0.736	1.732	1.564	1.776	1.144	0.992	1.208
acids	Hexanoic_acid	0.028	0.028	0.028	0.04	0.04	0.032	0.084	0.096	0.096	0.06	0.064	0.084	0.096	0.104	0.124	0.1	0.124	0.108
acids	Octanoic_acid	0.036	0.032	0.04	0.04	0.04	0.036	0.28	0.296	0.336	0.048	0.068	0.088	0.248	0.22	0.352	0.324	0.324	0.284
alcohols	(2E)-2-Octen-1-ol	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.088	0.1	0.08	NA	0.008	0.012	0.076	0.072	0.12	0.04	0.04	0.064
alcohols	1-Hexanol	0.088	0.08	0.076	0.076	0.088	0.084	0.264	0.276	0.236	0.128	0.136	0.148	0.176	0.172	0.26	0.16	0.172	0.18
alcohols	2,4-Decadien-1-ol	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.048	0.044	0.04	NA	NA	0.008	0.016	0.016	0.048	0.012	0.012	0.024
alcohols	3-Methyl-1-butanol	0.008	0.012	0.128	0.012	0.012	0.012	0.016	0.02	0.148	0.02	0.016	0.02	0.016	0.016	0.168	0.02	0.016	0.02
alcohols	6-Methyl-5-hepten-2-ol	0.008	0.008	0.004	0.008	0.008	0.008	0.048	0.048	0.04	0.032	0.072	0.036	0.048	0.048	0.048	0.044	0.088	0.044
alcohols	Benzeneethanol	0.176	0.148	0.248	0.28	0.208	0.192	0.296	0.264	0.336	0.528	0.456	0.464	0.34	0.328	0.392	0.452	0.46	0.412
alcohols	cis-3-Hexene-1-ol	0.032	0.024	0.02	0.04	0.028	0.028	0.04	0.036	0.032	0.052	0.048	0.044	0.044	0.036	0.036	0.048	0.052	0.052
alcohols	endo-Borneol	0.084	0.088	0.084	0.084	0.252	0.084	0.092	0.084	0.076	0.092	0.236	0.092	0.096	0.084	0.092	0.084	0.244	0.088
alcohols	Ethanol	2.576	2.256	3.728	2.288	3.316	2.46	2.6	2.472	3.824	1.952	3	2.824	2.724	2.6	4.376	2.148	3.3	2.872
alcohols	Eucalyptol	0.024	0.024	0.02	0.024	0.052	0.02	0.02	0.02	0.016	0.016	0.044	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.044	0.02
alcohols	Geraniol	0.116	0.1	0.116	0.14	0.124	0.124	0.404	0.384	0.344	0.336	0.372	0.516	0.388	0.472	0.356	0.352	0.32	0.368
alcohols	Linalool	0.016	0.016	0.02	0.02	0.032	0.02	0.06	0.064	0.048	0.052	0.072	0.068	0.08	0.084	0.076	0.076	0.084	0.072
alcohols	Methanethiol	0.02	0.016	0.016	0.02	0.02	0.012	0.044	0.056	0.052	0.04	0.044	0.044	0.06	0.072	0.056	0.06	0.048	0.048
aldehydes	2-(E)-Octenal	0.044	0.048	0.044	0.04	0.036	0.04	0.012	0.008	0.02	0.016	0.02	0.024	0.012	0.012	0.012	0.02	0.036	0.024
aldehydes	2,5-Dimethylbenzaldehyde	0.036	0.036	0.032	0.08	0.072	0.052	0.028	0.032	0.028	0.072	0.06	0.032	0.044	0.04	0.036	0.036	0.036	0.032
aldehydes	Benzaldehyde	0.08	0.076	0.072	0.092	0.076	0.076	0.048	0.06	0.044	0.052	0.044	0.044	0.064	0.056	0.06	0.056	0.06	0.064
esters	2,3-Dihydrofuran	0.088	0.088	0.112	0.064	0.048	0.072	0.004	0.004	0.004	0.004	0.008	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
esters	3-Butenyl_isothiocyanate	7.232	4.916	6.288	7.676	6.06	6.86	1.712	1.628	1.86	0.968	0.788	1.144	1.196	0.888	1.128	0.476	0.388	0.556
esters	Ethyl_Acetate	0.024	0.02	0.028	0.024	0.024	0.02	0.064	0.056	0.112	0.064	0.112	0.104	0.068	0.064	0.124	0.048	0.088	0.08
esters	Linalyl_propionate	0.02	0.02	0.024	0.024	0.068	0.02	0.04	0.044	0.036	0.028	0.076	0.04	0.052	0.052	0.056	0.044	0.1	0.044
esters	Methyl_salicylate	0.064	0.064	0.056	0.072	0.076	0.064	0.036	0.036	0.032	0.052	0.044	0.048	0.032	0.036	0.044	0.052	0.052	0.048
esters	β-Phenethyl_isothiocyanate	10.736	9.088	10.364	11.16	8.072	9.932	3.968	3.288	3.944	3	2.764	3.548	2.76	2.036	2.48	1.952	1.988	2.116

표 2-1-1-19. 향미성분 분석 결과(계속)

Class	Data File Name	0_con	0_nor	0_샘표	0_액젓	0_야채	0_간장	4_con	4_nor	4_샘표	4_액젓	4_야채	4_간장	11_con	11_nor	11_샘표	11_액젓	11_야채	11_간장
hydrocarbons	2,4,5-Trithiahexane	0.404	0.42	0.4	0.328	0.348	0.384	0.448	0.44	0.464	0.608	0.624	0.592	0.376	0.46	0.348	0.54	0.544	0.532
hydrocarbons	5-Cyano-1-pentene	0.42	0.352	0.404	0.368	0.24	0.316	0.372	0.34	0.336	0.264	0.184	0.252	0.392	0.352	0.312	0.288	0.232	0.272
hydrocarbons	Cyclopropane	0.08	0.064	0.052	0.088	0.092	0.072	0.048	0.052	0.04	0.044	0.048	0.04	0.04	0.036	0.036	0.04	0.036	0.036
hydrocarbons	Zingiberene	0.224	0.28	0.248	0.188	0.692	0.168	0.348	0.404	0.292	0.136	0.508	0.168	0.484	0.364	0.328	0.144	0.46	0.184
hydrocarbons	α -Curcumene	0.2	0.192	0.144	0.224	0.932	0.16	0.1	0.104	0.092	0.092	0.492	0.08	0.136	0.12	0.1	0.1	0.468	0.104
hydrocarbons	α -Farnesene	0.112	0.088	0.076	0.108	0.284	0.08	0.06	0.064	0.052	0.048	0.156	0.044	0.092	0.072	0.056	0.052	0.124	0.052
hydrocarbons	β -Bisabolene	0.132	0.108	0.08	0.136	0.452	0.096	0.056	0.068	0.052	0.056	0.236	0.048	0.096	0.076	0.06	0.06	0.208	0.064
hydrocarbons	β -Sesquiphellandrene	0.152	0.136	0.112	0.144	0.524	0.112	0.088	0.096	0.08	0.068	0.292	0.068	0.128	0.1	0.088	0.064	0.224	0.068
others	3-Pentenenitrile	0.232	0.2	0.228	0.184	0.128	0.18	0.196	0.192	0.184	0.128	0.092	0.128	0.204	0.184	0.164	0.136	0.104	0.128
others	4,5-EPITHIOVALERONITRILE	1.08	0.932	1.056	0.76	0.452	0.68	0.644	0.532	0.492	0.492	0.308	0.448	0.556	0.5	0.468	0.432	0.312	0.404
others	Benzenepropanenitrile	4.16	3.16	3.692	3.24	1.844	2.716	3.36	2.956	2.816	2.544	1.604	2.368	3.224	3.1	2.58	2.52	1.76	2.104
pyrazine	Tetramethylpyrazine	0.712	0.684	0.644	0.728	0.728	0.692	0.496	0.46	0.464	0.636	0.568	0.608	0.364	0.36	0.456	0.452	0.516	0.476
sulfides	Allyl_trisulfide	0.328	0.236	0.232	0.336	0.328	0.264	0.216	0.232	0.212	0.212	0.224	0.208	0.212	0.184	0.196	0.196	0.188	0.204
sulfides	Diallyl_disulfide	6.728	5.748	4.996	5.736	6.432	5.552	6.136	6.132	5.352	5.008	5.188	5.512	5.144	5.18	5.236	5.052	4.624	5.256
sulfides	Diallyl_sulfide	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.02	0.02	0.02	0.016	0.016	0.016	0.024	0.028	0.028	0.02	0.016	0.02
sulfides	Dimethyl_trisulfide	3.464	3.188	3.528	3.872	3.036	2.972	2.568	2.336	2.22	4.048	2.816	3.124	1.92	2.528	1.784	3.848	3.004	2.692
sulfides	Dimethyl_trisulfide(2)	0.26	0.212	0.22	0.144	0.048	0.144	0.32	0.316	0.276	0.4	0.296	0.384	0.24	0.288	0.204	0.512	0.312	0.268
sulfides	Methyl_allyl_disulfide	4.508	4.172	3.392	3.164	3.828	3.72	3.996	4.24	3.26	3.612	3.652	3.856	2.688	2.98	2.84	2.988	3.052	3.428
sulfides	Methyl_allyl_sulfide	0.044	0.044	0.044	0.04	0.04	0.044	0.092	0.1	0.096	0.08	0.072	0.088	0.12	0.14	0.128	0.104	0.096	0.108
sulfides	Methyl_disulfide	2.38	2.452	2.248	1.764	1.944	2.116	1.848	2.144	1.852	2.752	2.712	2.424	1.892	2.428	1.776	2.56	2.588	2.784
Unknown	UN_143	0.456	0.364	0.484	0.368	0.176	0.316	0.852	0.748	0.708	0.5	0.288	0.568	0.876	0.86	0.632	0.584	0.352	0.516
Unknown	uN_175	0.092	0.084	0.116	0.148	0.088	0.116	0.308	0.244	0.272	0.112	0.072	0.216	0.244	0.184	0.168	0.104	0.072	0.12
Unknown	UN_126	4.928	4.004	4.616	4.996	4.244	4.86	1.368	1.152	1.4	0.776	0.78	1.008	0.968	0.7	0.884	0.424	0.416	0.56
Unknown	UN_61	0.148	0.124	0.136	0.148	0.08	0.12	0.232	0.196	0.18	0.18	0.116	0.188	0.212	0.228	0.168	0.196	0.148	0.168
Unknown	UN_67	0.384	0.308	0.376	0.252	0.168	0.256	0.316	0.244	0.232	0.22	0.14	0.204	0.272	0.236	0.2	0.192	0.148	0.18
Unknown	UN_87	2.176	1.696	1.64	2.184	1.876	1.572	1.812	1.756	1.568	2.14	1.676	1.796	1.724	1.744	1.56	2.152	1.784	1.552

표 2-1-1-19. 관능검사 분석 결과

day	sample	외관	냄새		맛					조직감	전체적인 기호도
		기호도	이취	기호도	짠맛	단맛	쓴맛	감칠맛	전반적인맛	아삭한정도	
0	con	5.73±1.03	4.27±2.02	5.27±1.49	5.13±1.51	5.20±1.61	4.20±1.78	4.67±1.40	4.53±1.13	5.47±0.92	4.53±0.99
	nor	5.33±1.40	3.73±1.33	5.33±1.18	3.93±1.03	5.53±1.36	3.40±1.64	4.53±1.55	4.73±1.33	5.20±1.08	4.93±1.39
	샘표	5.73±1.16	4.13±1.77	5.07±1.03	4.93±1.16	5.53±0.99	3.47±1.64	5.07±1.33	4.67±1.35	5.40±1.06	4.87±1.36
	액젓	4.87±1.06	5.07±1.62	4.53±1.13	4.73±1.28	4.73±1.58	3.93±1.71	4.87±1.68	4.40±1.84	5.33±1.23	4.13±1.68
	야채	5.67±1.18	5.47±2.03	4.33±1.45	4.60±1.24	5.00±1.65	3.67±1.88	4.27±1.79	3.73±1.79	5.53±0.99	3.87±1.85
	간장	5.53±1.06	4.73±1.75	5.00±0.93	4.67±1.35	4.80±1.26	3.53±1.46	4.67±1.40	5.07±0.70	5.40±0.74	5.00±0.76
4	con	5.25±1.42	4.25±1.82	5.08±1.44	5.08±1.31	4.50±1.17	4.00±1.81	4.67±1.07	5.08±1.38	4.92±1.16	5.08±1.38
	nor	5.50±1.17	5.25±1.54	4.67±1.23	4.75±1.60	4.83±1.27	4.42±1.44	4.42±1.83	4.42±1.62	4.92±1.08	4.58±1.51
	샘표	5.42±1.51	4.92±2.19	4.58±1.68	5.17±1.59	5.33±1.07	4.33±2.02	4.83±1.53	4.33±1.67	4.83±1.27	4.42±1.78
	액젓	5.75±1.42	4.92±2.02	4.50±1.62	4.75±1.48	4.83±1.27	4.33±1.67	4.58±1.44	4.83±1.64	4.92±0.79	4.92±1.56
	야채	5.58±1.62	5.42±1.93	4.08±1.56	4.42±1.51	3.92±1.38	4.92±1.78	3.83±1.59	3.75±1.60	4.67±0.89	4.00±1.71
	간장	6.08±1.24	4.33±1.50	5.08±0.79	4.92±1.24	4.83±1.11	4.08±1.62	4.58±1.08	4.67±1.15	5.00±1.28	4.42±1.08
7	con	5.53±1.25	4.00±1.65	5.20±1.61	5.47±1.73	4.67±0.98	3.40±1.59	5.20±1.52	4.80±2.04	5.20±0.94	4.87±2.07
	nor	5.33±0.90	4.00±1.46	5.47±1.60	5.07±1.33	4.93±1.03	3.93±1.75	4.53±1.64	4.40±1.55	5.07±1.10	4.60±1.59
	샘표	5.13±1.06	4.20±1.66	4.93±1.10	5.13±1.36	5.00±1.41	3.13±1.30	4.93±1.79	5.00±1.56	4.80±1.21	5.07±1.58
	액젓	5.53±0.83	4.60±1.68	5.07±1.44	4.93±1.49	5.07±1.39	4.47±1.51	4.60±1.55	4.60±1.30	4.80±0.94	4.47±1.25
	야채	5.47±1.06	5.07±1.83	4.67±1.63	4.87±1.25	5.33±1.40	4.47±1.60	4.87±1.55	4.33±1.45	5.27±0.88	4.47±1.46
	간장	5.40±1.18	4.07±1.67	5.33±1.72	5.20±1.21	4.93±1.03	3.33±1.45	4.80±1.57	4.87±1.36	4.53±1.13	4.80±1.52

⑤ 향미증진 소재 5종으로 6종의 김치 제조 발효단계별 대사체 분석

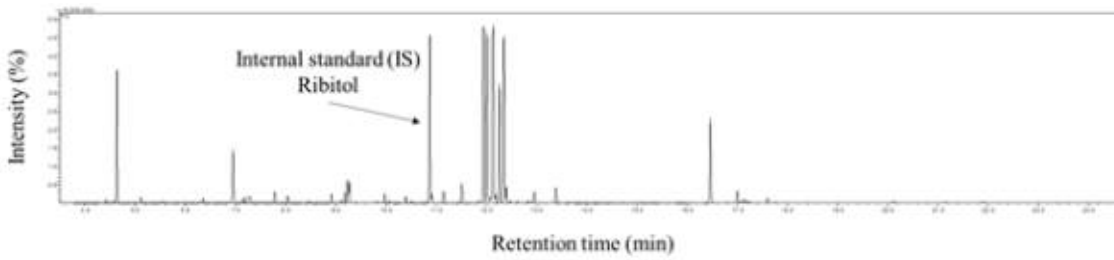
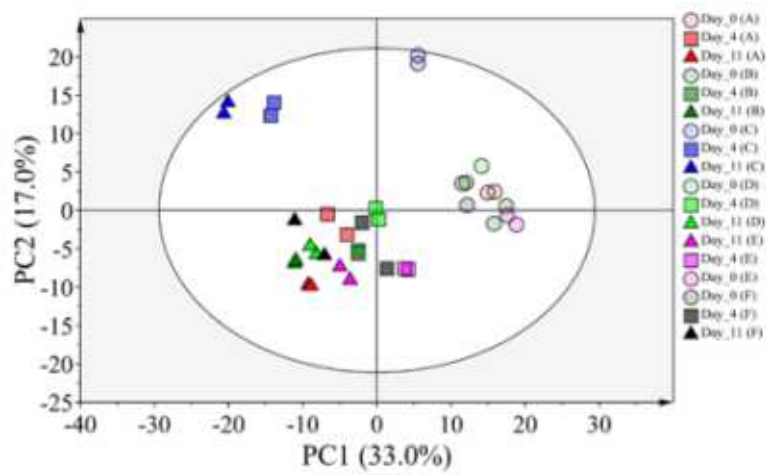


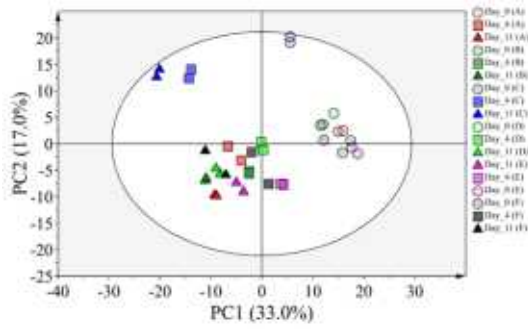
그림 2-1-1-6. Total ion current (TIC) chromatogram of quality control sample



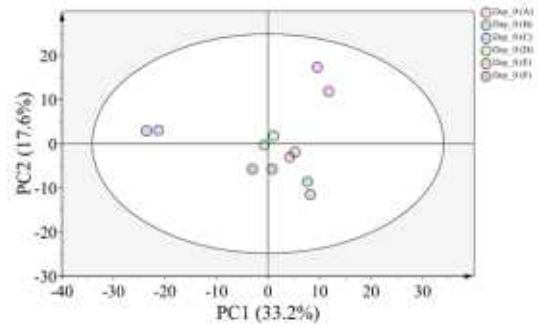
PCA ($R^2X = 0.641$, $Q^2 = 0.542$)

Relative standard deviation (RSD) of quality control group = 5.91%

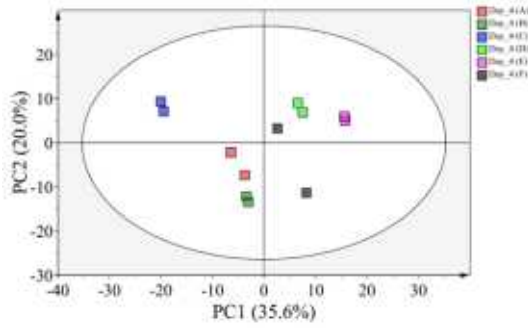
그림 2-1-1-7. Quality control of GC-MS analysis



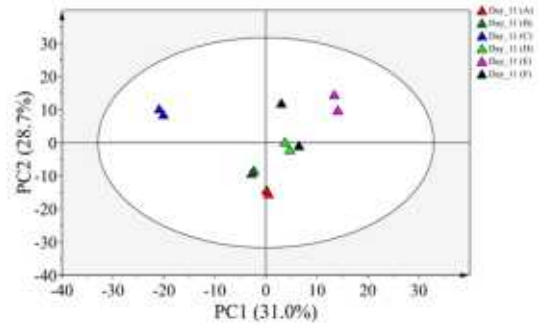
All data(PCA ($R^2X = 0.500$, $Q^2 = 0.412$))



Day 0(PCA ($R^2X = 0.508$, $Q^2 = 0.254$))

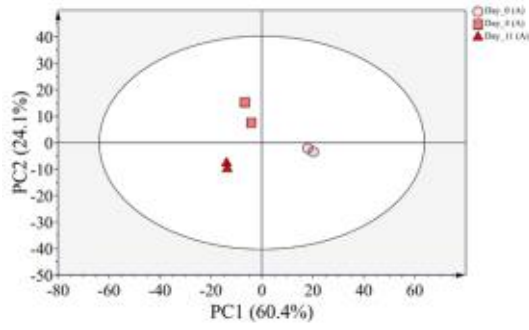


Day 4(PCA ($R^2X = 0.555$, $Q^2 = 0.291$))

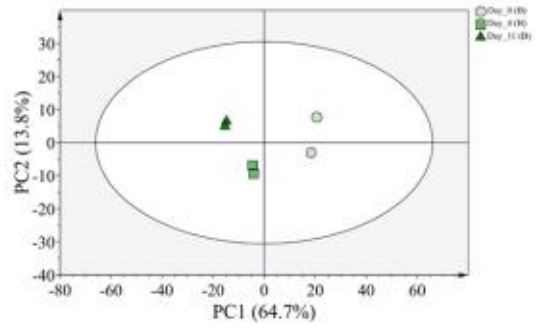


Day 4(PCA (PCA ($R^2X = 0.597$, $Q^2 = 0.239$))

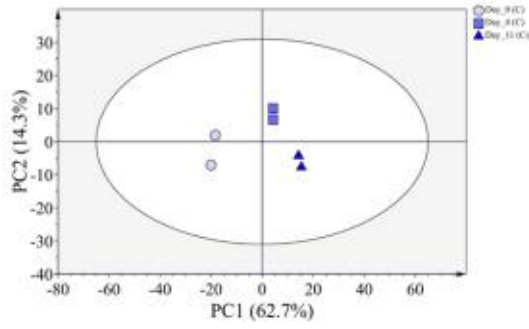
그림 2-1-1-8. 전체와 발효 기간별 PCA 분석 결과



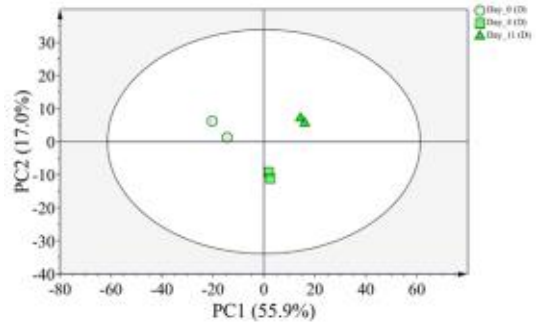
Group 1 (A) _ Fermentation time
(PCA ($R^2X = 0.845$, $Q^2 = 0.649$))



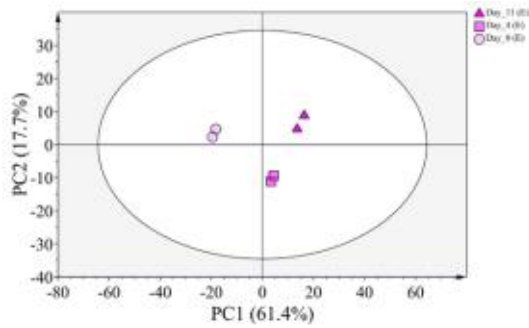
Group 2 (B) _ Fermentation time
(PCA ($R^2X = 0.785$, $Q^2 = 0.463$))



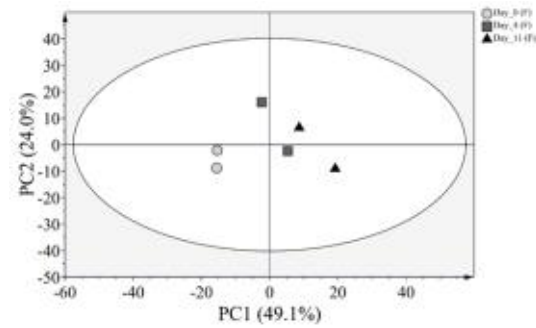
Group 3 (C) _ Fermentation time
(PCA ($R^2X = 0.770$, $Q^2 = 0.448$))



Group 4 (D) _ Fermentation time
(PCA ($R^2X = 0.729$, $Q^2 = 0.318$))



Group 5 (E) _ Fermentation time
(PCA ($R^2X = 0.791$, $Q^2 = 0.510$))



Group 6 (F) _ Fermentation time
(PCA ($R^2X = 0.731$, $Q^2 = 0.296$))

그림 2-1-1-9. 첨가 시료 종류에 따른 발효기간별 PCA 분석 결과

(참고)

Metabolites	Retention time (min)	Target Mass	HMDB ¹⁾	PubChem ²⁾	KEGG ³⁾
Propylene glycol	3.935	117	HMDB0001881	1030	C00583
Lactic acid	4.635	117	HMDB0000190	61503	C00256
Glycolic acid	4.795	147	HMDB0000115	757	C03547
n-Butylamine	6.055	174	HMDB0031321	8007	-
Oxalate	6.215	147	HMDB0002329	971	C00209
Valine	6.350	144	HMDB0000883	6287	C00183
Malonic acid	6.535	147	HMDB0000691	867	C04025
2-Aminoethanol	6.870	174	HMDB0000149	700	C00189
Leucine	6.920	158	HMDB0000687	6106	C00123
Glycerol	6.940	205	HMDB0000131	753	C00116
Ethylmalonic acid	6.945	147	HMDB0000622	11756	-
Phosphate	6.950	299	HMDB0001429	57424078	C00009
Isoleucine	7.140	158	HMDB0000172	6306	C00407
Nicotinic acid	7.165	180	HMDB0001488	938	C00253
Proline	7.185	142	HMDB0000162	145742	C00148
Glycine	7.275	174	HMDB0000123	750	C00037
Succinic acid	7.290	147	HMDB0000254	1110	C00042
Glyceric acid	7.500	147	HMDB0000139	439194	C00258
Uracil	7.580	99	HMDB0000300	1174	C00106
Methylsuccinic acid	7.585	147	HMDB0001844	10349	C08645
Fumaric acid	7.590	245	HMDB0000134	444972	C00122
Serine	7.780	204	HMDB0000187	5951	C00065
Alanine	7.785	100	HMDB0000161	5950	C00041
Pipecolic acid	7.835	156	HMDB0000070	849	C00408
Threonine	8.035	117	HMDB0000167	6288	C00188
Thymine	8.170	255	HMDB0000262	1135	C00178
homoserine	8.350	218	HMDB0000719	12647	C00263
3-Methylglutarate	8.370	147	HMDB0000752	12284	-
b-Alanine	8.375	174	HMDB0000056	239	C00099
N-Acetyl-L-Leucine	8.380	86	HMDB0011756	70912	C02710
Malic acid	8.910	147	HMDB0000744	525	C03668
trans-4-Hydroxy-L-proline	9.075	230	HMDB0000725	5810	C01157
meso-erythritol	9.110	147	HMDB0002994	222285	C16884
Aspartic acid	9.185	232	HMDB0000191	5960	C00049
Methionine	9.190	176	HMDB0000696	6137	C00073
Pyroglutamic acid	9.235	156	HMDB0000267	7405	C01879
Cytosine	9.245	254	HMDB0000630	597	C00380
4-Aminobutyric acid	9.265	174	HMDB0000112	223130	C00334
Threonic acid	9.410	147	HMDB0000943	151152	C01620
Creatinine	9.695	115	HMDB0000562	588	C00791
Glutamic acid	9.970	246	HMDB0000148	33032	C00025
Phenylalanine	10.080	218	HMDB0000159	6140	C00079
Arabinose	10.390	103	HMDB0000646	439195	C00259
Asparagine	10.395	116	HMDB0000168	6267	C00152
Ribose	10.505	103	HMDB0000283	5779	C00121
Xylitol	10.725	217	HMDB0002917	6912	C00379
Putrescine	10.910	174	HMDB0001414	1045	C02896
Shikimic acid	11.380	204	HMDB0003070	8742	C00493
Hypoxanthine	11.420	265	HMDB0000157	790	C00262
Ornithine	11.480	142	HMDB0000214	6262	C00077

Metabolites	Retention time (min)	Target Mass	HMDB ¹⁾	PubChem ²⁾	KEGG ³⁾
Citric acid	11.505	273	HMDB0000094	311	C00158
Cadaverine	11.605	174	HMDB0002322	273	C01672
Tagatose	11.835	103	HMDB0003418	92092	C02336
Quinic acid	11.845	345	HMDB0003072	6508	C00296
Adenine	11.860	264	HMDB0000034	190	C00147
Fructose	11.940	103	HMDB0000660	439709	C02336
Galactose	12.135	147	HMDB0000143	439357	C00984
Lysine	12.185	156	HMDB0000182	5962	C00047
Glucose	12.260	319	HMDB0000122	5793	C00031
Pyridoxine	12.335	280	HMDB0000239	1054	C00314
Gallic acid	12.340	281	HMDB0005807	370	C01424
Mannitol	12.345	147	HMDB0000765	6251	C00392
Glucosamine	12.435	203	HMDB0001514	439213	C00329
Galactitol	12.490	217	HMDB0000107	11850	C01697
Galacturonic acid	12.580	333	HMDB0002545	84740	C08348
Glucarate	13.105	333	HMDB0000663	33037	C00818
Inositol	13.385	217	HMDB0000211	-	C00137
Guanine	13.530	352	HMDB0000132	764	C00242
Cystathionine	13.965	218	HMDB0000099	439258	C02291
Tryptophan	14.120	202	HMDB0000929	6305	C00078
Spermidine	14.285	144	HMDB0001257	1102	C00315
Uridine	15.570	217	HMDB0000296	6029	C00299
Behenic acid	16.135	117	HMDB0000944	8215	C08281
Adenosine	16.345	230	HMDB0000050	60961	C00212
Maltose	17.000	361	HMDB0000163	10991489	C00208
Melibiose	17.135	204	HMDB0000048	440658	C05400
Melezitose	20.105	217	HMDB0011730	92817	C08243

(다) 결론

샘표에서 개발한 향미모듈과 현재 풀무원에서 이용 중인 소재의 숙성속도는 비슷하나 간장대비 적숙기 도달 시기 1주이상 빠른 것으로 분석되었다.

김치 적용 소재에 따라 적숙기 젖산균 수와 $1\log$ 이상 차이나는 것으로 확인되었으며 이는 적숙기 도달 속도에 영향을 미칠 것으로 판단된다.

관능분석결과, 개발 향미모듈의 감칠맛과 현재 사용 중인 소재와 유의적 차이 없으나, 냄새 기호도는 숙성될수록 낮게 평가되어 향기에 대한 보완이 필요할 것으로 판단된다.

발효단계별 대사체분석 결과로 PCA한 결과 향미모듈은 국간장, 액젓, 야채 농축액 첨가 김치들과 다른 양상을 보이는데, Pyroglutamic acid, Glutamic acid 함량 등 2배 이상 차이가 나는 것으로 확인되었다.

소재를 달리 첨가한 김치들의 아미노산 함량이 차이가 크게 분석되었으며, 특히 소재 첨가김치의 glutamic acid 함량 향미모듈 875mg/L, 간장 486mg/L, 풀무원 현재 소재 440mg/L으로 향미모듈을 첨가한 김치의 glutamic acid 함량이 제일 높은 것으로 분석되었다.

또한, 소재 첨가김치의 glutamine 함량은 향미모듈첨가 김치 2219mg/L, 간장첨가김치 2167mg/L, 풀무원 소재 첨가 김치 1802mg/L로 풀무원 소재 첨가 김치계 제일 낮게 분석되었다.

현재 풀무원 이용 소재 아미노산 총 함량은 한식간장보다 유리아미노산 총합량이 낮은 것으로 분석되었다.

5) 품질향상을 위한 종균 선발

가) 실험방법

다양한 김치 유산균을 확보하기 위하여 젓갈을 사용하지 않은 김치(반지, 장김치, 사찰배추김치, 가지김치, 무채김치, 당귀김치 등)과 동물성 소재를 첨가한 김치(일반 배추김치, 갓김치, 민어썩박지, 가자미 식해, 명태 깍두기, 궁중 젓국지, 꿩김치, 서거리지(명태아가미김치), 고들빼기김치 등)을 수집하여 엮다.

연구에서 사용한 *Lactobacillus sakei*는 전라남도 김치전문가에 의해 제조된 배추김치에서, *Leuconostoc mesenteroides*는 광주 김치전문가가 제조한 배추김치에서 각각 분리하였다. 각 배추김치를 5° C에서 숙성시키며 pH 4.3인 적숙기에 도달했을 때 착즙하여 멸균한 증류수로 단계별로 희석한 후, 이를 MRS(Difco, Sparks, MD, USA) 평판배지에 접종, 도달한 다음 37° C에서 2~3일간 혐기 배양하여 생성된 유산균 colony를 순수 분리하였다. 분리한 균주의 16S rDNA 유전자 염기서열은 universal primer(27F, AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; forward, 1492R, GGCTACCTTGTTACG ACTT;reverse)를 이용하여 증폭시킨 후, Bellogen Corp.(Gwangju, Korea)에 염기서열의 상동성 분석을 의뢰하였다. 16S rDNA 염기서열을 NCBI의 database와 비교하여 동정하였다.

나) 실험결과

김치 16종으로부터 분리한 78개의 콜로니들의 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석한 결과, *Lesconostoc*과 *Lactobacillus*속이 각 21종, 5종 분리되었다. *Lactobacillus*속에는 *Lactobacillus sakei* 와 *Lactobacillus paracasei*가 분리되었으며, *Lesconostoc*속에서는 *Leuconostoc mesenteroides* 21종이 분리되었다.

표 2-1-1-20. 김치 레시피

Genus	Species	Isolation strains
<i>Lesconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	21
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	3
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	2

본 실험에서 분리한 균주와 보유 균주를 대상으로 김치숙성 지연효과 균주 분리를 위해 *Lactobacillus sakei*의 생육저해 효과를 검토할 것이며, 항산화 기능을 보유한 유산균을 선별할 계획이다.

2-1-2. 비건 김치 개발 및 제조 공정 확립 (김치연구소, 2차년도)

1) 식물성 발효향미모듈 김치 적합성 검증

가) 콩발효물 첨가 농도 검증 실험

(1) 실험방법

(가) 김치제조

첫갈대체 소재 검토를 위해 현재 풀무원에서 사용중인 소재(con) 샘플에서 개발중인 향미발효모듈을 농도별로 첨가하여 김치를 제조하였다. 각 김치는 500g씩 소포장하여 6°C 에서 0, 4, 8, 12일 간격 분석하였다.

표 2-1-2-1. 김치 레시피

원료	풀무원	액젓	샘표1(2.4%)	샘표2(3.4)	샘표3(4.4%)
절임배추	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
무즙					
고춧가루					
마늘					
양파					
생강					
당근					
정백당					
배푸레					
정제수					
정제염	0.6	0.1	0.4	0.3	0.2
풀무원소재	0.3				
액젓		2.2			
샘표 1			2.4		
샘표 2				3.4	
샘표 3					4.4
계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

(나) 분석방법

상기 실험방법과 동일하게 수행하였다.

(2) 실험결과

(가) 이화학 분석 결과

① 이화학 분석 결과

샘표에서 개발 중인 향미모듈의 첨가량을 달리하여 김치를 제조하기 위해 양념을 제조하여 염도와 당도, 색의 차이를 측정하였다. 그 결과 샘플 소재 첨가량에 따라 염도와 당도가 상승

하였으며, 첨가량이 많아질수록 L, b 값이 모두 유의적으로 낮아졌다. 적색도를 나타내는 a 값은 샘플 소재를 4.4% 첨가했을 때만 풀무원 소재보다 a값이 낮았으며, 샘플 소재 첨가가 양념의 붉은 색을 높게 하는 것으로 나타났다.

숙성중 김치 pH의 변화는 숙성이 진행됨에 따라 샘플 향미모듈의 첨가량이 많을수록 유의적으로 pH가 높게 나타났다. 이는 산도 분석 결과에서도 동일함을 확인하였다.

표 2-1-2-2. 김치 양념 외관 및 품질 특성






	풀무원	액젓	샘플1(2.4%)	샘플2(3.4)	샘플3(4.4%)
사진					
염도(%)	1.69±0.01	1.98±0.0	1.95±0.01	2.05±0.0	1.99±0.01
당도(brix)	20.70%	21.60%	23.70%	26.10%	25.50%

표 2-1-2-3. 김치 양념 L, a, b 값

	L*	a*	b*
풀무원	24.78±0.54	19.9±1.18	12.05±0.56
액젓	24.27±0.06	20.61±0.18	12.29±0.12
샘플1	24.29±0.11	20.39±0.18	12.34±0.08
샘플2	24.31±0.10	20.30±0.58	12.18±0.18
샘플3	23.22±0.08	19.13±0.41	11.21±0.33

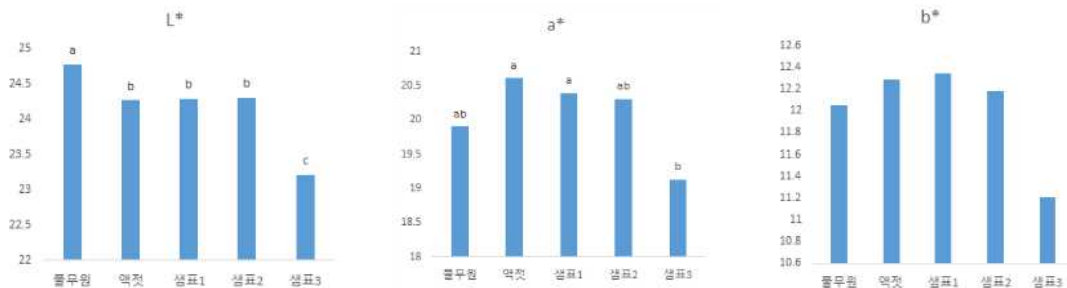


그림 2-1-2-1. 김치 양념 L, a, b 값

표 2-1-2-4. 김치 숙성 중 pH 변화

	0일차	4일차	8일차	12일차
풀무원	5.85±0.03	5.42±0.1	4.15±0.01	3.91±0.00
액젓	5.85±0.03	5.51±0.06	4.29±0.01	4.00±0.01
샘표1	5.78±0.02	5.77±0.02	4.31±0.02	3.97±0.02
샘표2	5.66±0.01	5.65±0.04	4.56±0.01	4.05±0.02
샘표3	5.64±0.01	5.62±0.02	4.38±0.01	4.09±0.02

표 2-1-2-5. 김치 숙성 중 산도 변화

	0일차	4일차	8일차	12일차
풀무원	0.22±0	0.29±0.01	0.83±0.02	1.06±0.00
액젓	0.27±0	0.28±0.01	0.84±0.01	1.08±0.00
샘표1	0.31±0	0.3±0.01	0.82±0.02	1.10±0.01
샘표2	0.34±0	0.36±0	0.71±0.02	1.03±0.01
샘표3	0.36±0	0.36±0	0.79±0.03	1.01±0.01

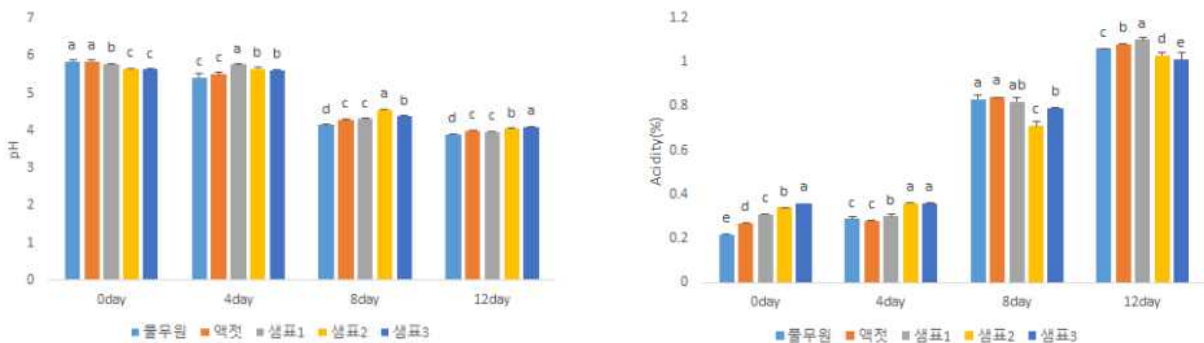


그림 2-1-2-2. 김치 숙성 중 pH, 산도 변화

② 미생물 분석 결과

감칠맛 소재를 달리 첨가한 김치의 초기 젖산균 수는 차이가 없는 것으로 분석되었으나, 발효 4일차 이후에 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다. 액젓과 풀무원 소재를 첨가한 김치는 4일차에 유의적으로 높게 증가하였으나 샘표 향미모듈을 첨가한 김치들은 저장 8일차까지도 차이가 있는 것으로 분석되었다. 이는 pH와 산도 분석결과에서 볼 수 있듯이 샘표 향미모듈을 첨가한 김치의 숙성도가 늦어지는 것과 연관된 것으로 보인다. 저장 8일까지는 샘표 향미모듈을 첨가한 군에서 pH가 낮게 유지며 젖산균의 수도 1log정도 낮게 나타났으나, 저장 12일에는 유사한 젖산균 수와 pH가 4.0이내에 도달한 것으로 확인되었다.

표 2-1-2-6. 김치 숙성 중 젖산균 변화

log cfu/g	0일차	4일차	8일차	12일차
풀무원	5.75±0.09	6.79±0.11	7.24±0.05	6.99±0.05
액젓	5.69±0.12	6.82±0.04	7.11±0.01	6.77±0.09
샘표1	5.65±0.01	6.37±0.04	7.01±0.01	7.06±0.02
샘표2	5.67±0.12	6.01±0.02	6.89±0.04	6.79±0.01
샘표3	5.74±0.03	6.07±0.06	6.88±0.07	6.99±0.06

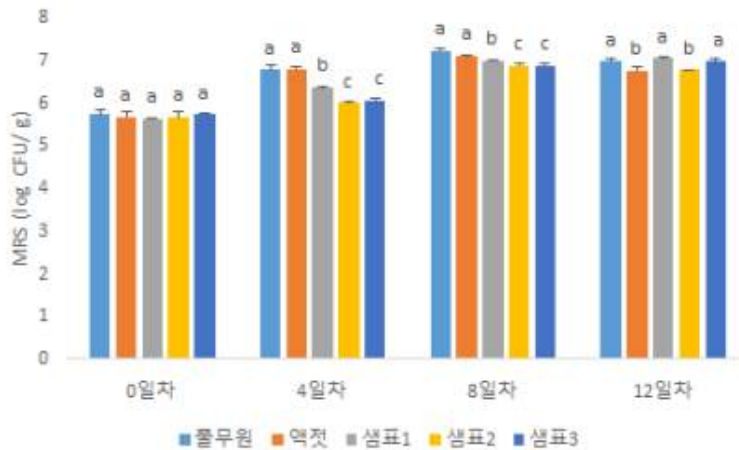


그림 2-1-2-3. 김치 숙성 중 젖산균 변화

③ 관능검사 결과

관능검사결과 제조 당일의 냄새 기호도는 샘표2 > 샘표3 > 샘표 1 > 풀무원 > 액젓의 순으로 평가되었으며, 샘표 시료2는 6.0점으로 평가될 만큼 기호도가 높았다. 감칠맛의 강도 평가에서도 냄새 기호도와 동일한 순으로 평가되어졌으며, 맛 기호도에서도 냄새 기호도, 감칠맛 강도와 같은 순서인 샘표2 > 샘표3 > 샘표 1 > 풀무원 > 액젓의 순으로 평가되었다. 종합적인 기호도에서는 샘표 1 > 샘표3 > 샘표2 > 풀무원 > 액젓 순으로 평가되었다. 저장 4일차의 맛기호도 결과는 샘표2 > 샘표3 > 샘표1, 풀무원 > 액젓 순이었으며, 종합적 기호도 평가에서는 샘표2 > 샘표3 > 풀무원 > 샘표1 > 액젓의 순으로 평가되었다. 이는 감칠맛 강도와 맛 기호도 평가 결과와 연관된 것이라 판단되며, 샘표 소재 첨가 김치들이 단맛에서도 높게평가된 것을 확인할 수 있었다. 저장 12일차 pH가 4.0대에 이른 과숙시기의 관능평가에서는 신냄새의 강도는 샘표1 > 풀무원 > 액젓, 샘표2 > 샘표3의 순으로 평가되었으며, 냄새기호도는 샘표3 > 샘표1 >액젓, 풀무원 > 샘표2의 순으로 평가되어 신냄새의 강도가 냄새기호도에 미치는 영향보다는 이취에 의한 기호도 평가에 영향이 큼을 확인하였다. 감칠맛의 강도는 샘표3 > 샘표2 > 액젓 > 샘표1 > 풀무원의 순서로, 현재 풀무원에서 사용중이 소재보다는 샘표의 소재가 감칠맛 보존성이 좋은 것으로 평가되었다. 그러나 맛기호도에서는 샘표1 > 액젓 > 샘표2, 샘표 3 > 풀무원 순으로 평가되었다. 이를 모두 고려한 종합적 기호도에서는 샘표1 > 액젓 > 풀무원, 샘표,2 > 샘표3의 순으로 평가되었다. 김치 제조 당일부터 pH4에 이르는 과숙기까지 감칠맛 소재를 농도별로 적용한 김치 관능검사에허는 샘표 소재2 만큼의 농도가 김치 숙성시기에 관계없이 맛이 유지되고 기호도가 높게 평가됨을 확인할 수 있었으며, 이 농도가 김치에 적합한 것으로 확인하였다.

표 2-1-2-7. 관능검사 결과

0일차		플무원	액젓	샘표1	샘표2	샘표3
냄새	신냄새	2.94±1.53	2.31±1.66	2.56±1.79	2.13±1.15	2.44±1.41
	이취	3.88±1.71	4.44±3.08	3.00±1.03	2.69±1.25	3.19±1.56
	냄새 기호도	4.63±1.50	4.31±2.41	5.75±1.06	6.00±1.32	5.59±1.30
외관기호도		5.94±1.12	6.00±0.15	5.81±1.05	6.00±1.15	5.75±1.34
맛	짠맛	4.63±1.26	5.06±1.34	4.88±1.63	5.06±1.39	5.38±1.02
	단맛	5.38±1.15	5.75±1.06	6.06±1.24	5.81±0.83	5.75±1.24
	신맛	2.06±0.85	2.19±1.11	1.94±0.85	2.25±1.34	2.13±0.89
	감칠맛	4.56±1.26	4.88±1.59	5.19±1.60	5.56±1.31	5.25±1.57
	이미	3.81±1.83	4.06±2.17	2.94±1.57	3.56±1.59	3.19±1.47
	맛 기호도	4.94±1.06	4.75±1.73	5.38±1.75	5.63±1.26	5.38±1.26
조직감 (아삭한 정도)		6.56±0.73	6.63±1.15	6.31±0.95	6.56±1.03	6.44±1.21
종합적 기호도		5.13±1.09	4.69±1.89	5.75±1.48	5.50±1.37	5.56±1.26

4일차		플무원	액젓	샘표1	샘표2	샘표3
냄새	신냄새	4.67±1.84	5.00±1.69	4.07±1.49	3.20±1.08	3.80±1.78
	이취	3.73±1.67	4.60±1.84	4.13±1.60	3.80±1.57	3.53±0.92
	냄새 기호도	5.53±1.13	4.67±1.18	5.53±1.13	4.80±1.32	5.20±1.37
외관기호도		6.13±0.99	5.67±1.45	5.67±1.05	5.60±0.91	5.47±1.13
맛	짠맛	4.40±1.24	5.13±0.83	5.20±1.26	5.20±1.15	5.13±1.55
	단맛	5.73±1.03	4.93±0.88	6.00±1.31	6.07±0.88	5.80±1.08
	신맛	3.93±1.62	3.80±1.26	3.27±1.39	3.07±1.10	3.20±1.26
	감칠맛	4.60±0.99	4.53±1.13	4.93±1.33	5.60±0.74	5.67±0.98
	이미	4.20±1.47	4.60±1.72	4.33±1.76	4.40±1.30	4.00±1.56
	맛 기호도	4.80±1.26	4.67±1.40	4.80±1.66	5.33±0.90	5.20±1.15
조직감 (아삭한 정도)		6.07±1.49	5.80±1.15	5.93±1.39	6.00±0.93	5.80±1.21
종합적 기호도		5.00±1.36	4.73±1.44	4.93±1.79	5.60±0.99	5.33±0.82

8일차		플무원	액젓	샘표1	샘표2	샘표3
냄새	신냄새	6.44±1.26	6.19±1.60	6.06±1.18	5.38±1.67	5.94±1.34
	이취	4.44±1.97	4.63±2.28	4.31±1.78	4.00±1.46	4.31±1.82
	냄새 기호도	4.25±1.44	4.50±1.83	4.44±1.41	5.06±1.12	5.00±1.41
외관기호도		5.31±1.14	5.50±1.32	5.88±1.09	5.69±0.79	5.69±1.14
맛	짠맛	4.38±1.59	4.88±1.41	4.81±1.11	4.63±0.96	4.69±1.30
	단맛	5.13±1.09	4.94±1.44	4.94±1.48	5.69±1.35	6.00±1.26
	신맛	5.81±1.80	5.56±1.59	5.81±1.52	4.81±1.80	5.44±1.71
	감칠맛	4.69±1.54	4.94±1.34	4.88±1.31	5.19±1.17	4.88±1.26
	이미	4.50±1.79	4.06±1.73	4.00±1.41	4.38±1.63	4.75±2.05
	맛 기호도	4.44±1.59	5.19±1.33	5.44±1.26	5.06±1.57	4.50±1.83
조직감 (아삭한 정도)		4.81±1.33	5.31±1.01	5.56±1.21	5.81±1.05	5.06±1.39
종합적 기호도		4.31±1.49	5.00±1.37	5.19±1.42	5.19±1.52	4.38±1.86

12일차		플무원	액젓	샘표1	샘표2	샘표3
냄새	신냄새	6.27±1.22	6.00±1.46	6.33±1.59	6.00±1.31	5.80±1.32
	이취	4.13±1.68	4.33±2.09	3.80±1.93	5.00±1.93	3.73±1.87
	냄새 기호도	5.00±1.46	5.07±1.75	5.20±1.52	4.87±1.41	5.53±1.73
외관기호도		5.60±1.35	6.27±0.80	5.67±1.35	5.93±1.22	5.93±1.03
맛	짠맛	5.47±0.92	5.73±1.22	5.40±1.30	5.73±1.16	5.67±0.98
	단맛	4.67±1.18	4.87±1.25	4.80±1.32	5.20±1.26	5.80±1.15
	신맛	6.87±0.83	6.80±0.94	6.53±1.19	6.73±1.28	6.27±1.16
	감칠맛	4.60±1.35	5.13±1.30	5.00±1.36	5.20±1.32	5.40±1.45
	이미	3.93±1.79	4.07±1.94	4.07±1.98	4.13±2.17	4.53±2.20
	맛 기호도	4.87±1.51	5.13±1.77	5.33±1.59	5.00±1.56	4.93±1.79
조직감 (아삭한 정도)		5.87±1.25	5.80±1.26	5.93±1.33	5.93±1.16	6.00±1.25
종합적 기호도		4.93±1.44	5.13±1.46	5.33±1.59	4.93±1.49	4.87±2.00

나) 콩 발효물 김치 적용 실험

식물성 발효향모듈의 김치 적용평가를 위해 기존 젓갈대체 소재로 이용되고 있는 밀분해추출물과 콩분해추출물, 그리고 그 혼합물과 비교 실험을 하였다.

(1) 실험방법

(가) 김치제조방법

김치제조 레시피는 표와 같으며, 소재의 아미노산 함량에 따른 소재 권장량을 기준으로 혼합비를 결정하였으며 각 소재 함량에 따라 정제염으로 염도를 보정하였다. 제조한 김치는 각 1/4 포기씩 파우치 포장하였으며, 저장주기별로 관능검사용과 이화학분석용으로 사용하였다. 각 김치는 4℃에서 7일 간격으로 4주간 저장 분석하였다.

표 2-1-2-8. 김치 레시피

원료	멸치액젓	밀분해추출물	밀:콩=3:1	콩분해추출물	발효향미모듈
절임배추	80.0	80.0	80.0	80.0	80.0
무즙					
고춧가루					
마늘					
양파					
생강					
당근					
정백당					
배푸레					
경제수					
정제염	0.1	0.6	0.4	0.4	0.6
멸치액젓	2.2				
밀분해추출물		0.3			
밀:콩=3:1			2.2		
콩분해추출물				2.2	
발효향미모듈					3.3
계	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

식물성 발효향기모듈과 비교하기 위해 기존의 젓갈대체 소재들을 혼합해 평가한 결과 밀분해추출물과 콩분해추출물을 각 3 : 1과 1 : 1로 혼합해 관능평가한 결과, 밀분해추출물과 콩분해추출물을 1 : 1로 혼합한 것은 후미가 다른 소재와 비교할 때 기호도가 낮아 김치제조시 시료에서 제외하였다.

(나) 분석방법

상기 실험방법과 동일하게 수행하였다.

(2) 실험결과

① 이화학 분석 결과

식물성 발효향미모듈의 김치 적용 평가를 위해 선발한 멸치액젓(con), 밀분해추출물과 콩분해추출물들의 염도를 측정 비교한 결과, 멸치액젓의 염도는 24%, 밀분해추출물은 8.6%, 콩분해추출물은 9.6%, 식물성 발효향미모듈은 3.5%로 측정되었다.

각 첨가 소재로 제조한 김치 양념의 Lab 색차를 비교한 결과, 발효향미모듈을 첨가한 것이 L값이 29.15로 가장 밝은 것으로 나타났으며, 밀분해추출물과 콩분해추출물 첨가 양념은 멸치액젓으로 제조한 양념과 밝기가 비슷하였다. 붉은 정도는 나타내는 a값은 발효향미모듈이 13.73으로 가장 낮았으며 밀분해추출물이 멸치액젓과 콩분해추출물보다 높았다. b값에서도 발효향미모듈이 가장 낮게 측정되었다.

각 소재를 첨가 제조한 김치들의 당도를 측정한 결과 멸치액젓을 첨가한 김치는 8.30 brix%로 측정되었으며, 밀분해추출물첨가 김치는 9.20 brix%, 콩분해추출물은 9.90 brix%, 발효향미모듈을 첨가한 김치는 9.10b brix%으로 측정되었다. 콩분해추출물의 당도가 상대적으로 높았으며 발효향미모듈은 밀분해추출물과 유사하였다.

각 소재로 제조한 김치들의 저장기간 중 숙성도 지표인 pH와 산도를 측정 비교한 결과 젓갈대체 소재를 첨가한 김치는 멸치액젓으로 제조한 대조군 김치와 차이가 없는 것으로 확인되었다

② 미생물 분석 결과

젓갈대체 소재를 첨가한 김치 숙성기간 중 1주 간격으로 젓산균의 수를 측정 비교한 결과 처리군 모두가 유사한 경향으로 젓산균이 증가 유지됨을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 멸치액젓을 이용한 김치와 젓갈대체 소재를 첨가한 김치의 발효특성은 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다. 개발한 식물성 향미모듈도 기존의 제품들과 발효특성에 미치는 영향이 없음을 확인하였다.

③ 관능검사 결과

김치 제조 당일 관능검사를 수행한 결과 이취에서는 멸치액젓과 젓갈대체 소재간의 차이가 없었으며 이는 저장기간 중 1주차를 제외하고는 비슷했다. 냄새 기호도는 모든 소재첨가 김치가 5.0점 이상으로 보통의 기호도를 보였으며, 저장 3주 내 모두 유지되었다. 외관 기호도는 개발한 식물성 발효향미모듈이 순서상으로는 낮게 평가되었는데 이는 발효향미모듈의 색이 다른 소재보다 밝고 적색도가 차이가 있어 김치의 외관에서 패널들이 차이를 식별하는 것으로 판단된다. 외관기호도는 멸치액젓 첨가 김치와 콩분해추출물 첨가 김치가 유사하게 평가되고 있었다. 단맛의 강도는 제조당일과 저장1주차까지는 발효향미모듈 첨가 김치가 당이 낮은 것으로 평가되었으며, 저장 2주차와 3주차에는 다른 처리군과 비슷하게 평가되었다. 발효향미모듈의 당도가 제일 높은 것으로 측정되었으나 발효초기 당분해 속도가 빠른 것으로 판단되어 이는 보정할 필요가 있을 것으로 판단되었다. 신맛의 강도에 대한 평가에서는 발효향미모듈 첨가 김치가 패널들에게 신맛의 강도가 제일 낮게 평가되었으며, 이는 김치 숙성 지연 효과가 있는 것으로 판단된다. 젓갈대체 소재의 가장 중요한 감칠맛에 대한 강도평가는 액젓 첨가 김치가 제일 높게 평가되었으며, 콩분해추출물과 향미발효모듈이 제조 당일부터 3주차까지 낮게 평가되었다. 이는 소재의 첨가량 조절과 발효중 아미노산 함량 변화를 측정해 검토가 필요함을 제조업체 전달하였다. 김치 전반에 대해 평가하는 종합적 기호도는 액젓으로 제조함 김치는 제조당일부터 3주차까지 모두 5.5이상의 점수로 보통이상으로 평가되었으나 발효향미모듈을 첨가한

김치는 저장 3주차에는 조금 낮게 평가되었으나 액젓첨가김치보다는 순위상 낮게 평가되었어도 5점 보통 점수대로 평가되어 소재 첨가량 조정 후 재평가가 필요할 것으로 판단되었다.

표 2-1-2-9. 젓갈대체 소재들 염도

	멸치액젓	밀분해추출물	밀:콩=3:1	밀:콩=1:1	콩분해추출물	발효항미모듈
염도(%)	24	8.6	9.3	9.4	9.6	3.5

표 2-1-2-10. 양념 Lab 값

	멸치액젓	밀분해추출물	밀:콩=3:1	콩분해추출물	발효항미모듈
L	24.68±0.19	24.50±0.19	24.92±0.35	24.52±0.24	29.15±0.35
a	20.17±0.46	21.14±0.14	21.13±1.73	20.68±0.62	13.73±0.72
b	12.81±0.20	12.78±0.03	12.92±0.57	12.84±0.21	9.85±0.48

표 2-1-2-11. 제조 김치 염도, 당도

	멸치액젓	밀분해추출물	밀:콩=3:1	콩분해추출물	발효항미모듈
염도(%)	1.70	1.65	1.78	1.58	1.63
당도(Brix%)	8.30	9.20	9.90	9.90	9.10

표 2-1-2-12. 저장기간별 김치 외관

	멸치액젓	밀분해추출물	밀:콩=3:1	콩분해추출물	발효항미모듈
김치					
2주차					
3주차					

표 2-1-2-13. 저장기간 중 pH와 산도 측정 결과

		pH	산도 (%)
멸치액젓	0주	5.30±0.03	0.32±0.01
	1주	4.73±0.02	0.50±0.00
	2주	4.12±0.00	0.83±0.02
밀분해추출물	0주	5.30±0.01	0.35±0.00
	1주	4.81±0.04	0.48±0.02
	2주	4.13±0.02	0.81±0.01
밀:콩=3:1	0주	5.27±0.04	0.33±0.00
	1주	4.86±0.03	0.50±0.02
	2주	4.10±0.03	0.86±0.01
콩분해추출물	0주	5.25±0.02	0.35±0.00
	1주	4.66±0.01	0.54±0.02
	2주	4.20±0.02	0.85±0.00
발효항미모듈	0주	5.27±0.02	0.34±0.00
	1주	4.78±0.02	0.53±0.02
	2주	4.11±0.03	0.84±0.00

표 2-1-2-14. 저장기간 중 젖산균 측정 결과

		젖산균 수 (log cfu/g)
멸치액젓	0주	6.76±0.01
	1주	8.12±0.02
	2주	8.84±0.03
밀분해추출물	0주	6.82±0.03
	1주	8.03±0.00
	2주	8.60±0.11
밀:콩=3:1	0주	6.85±0.06
	1주	8.24±0.02
	2주	8.82±0.00
콩분해추출물	0주	6.67±0.03
	1주	8.30±0.09
	2주	8.91±0.00
발효항미모듈	0주	6.63±0.07
	1주	8.08±0.01
	2주	8.89±0.02

표 2-1-2-15. 저장기간 중 관능특성

			멸치액젓	밀분해 추출물	밀:콩=3:1	콩분해 추출물	발효향미 모듈
냄새	신냄새	0주	2.60±1.50	2.40±1.68	2.33±1.59	2.60±1.55	2.67±1.59
		1주	4.73±1.75	4.60±1.72	3.47±1.41	4.60±1.84	4.27±1.58
		2주	6.33±0.90	6.00±1.41	5.93±1.10	5.87±0.99	6.07±0.96
		3주	6.47±0.92	6.40±0.91	6.20±0.86	6.40±1.06	6.47±1.06
	이취	0주	4.00±1.65	3.47±1.68	3.27±1.58	3.73±1.28	3.87±1.77
		1주	4.13±1.81	3.27±1.33	3.80±1.78	3.20±1.42	3.27±1.67
		2주	3.53±1.51	3.40±1.84	3.93±1.49	3.20±1.26	4.93±1.71
		3주	3.93±1.67	3.73±1.83	4.20±1.86	3.73±1.75	3.93±1.67
	냄새 기호도	0주	5.27±1.03	5.87±1.41	5.80±1.08	5.27±0.88	5.07±1.10
		1주	5.07±1.62	5.93±1.22	5.20±1.15	5.87±1.36	5.40±1.18
		2주	5.67±1.35	5.67±1.23	5.33±1.05	5.87±1.19	4.47±1.51
		3주	5.67±1.54	5.40±1.50	5.00±1.56	5.73±1.49	5.40±1.30
외관	외관 기호도	0주	5.93±1.16	6.07±1.22	6.00±1.00	5.53±1.60	5.07±1.10
		1주	6.13±1.06	4.67±1.45	5.93±1.16	5.47±1.06	5.40±0.91
		2주	6.20±0.77	6.27±0.80	5.33±0.98	5.80±0.86	6.07±1.03
		3주	5.80±1.15	5.53±1.30	5.60±1.40	5.93±1.16	5.47±0.99
맛	짠맛	0주	4.80±1.21	4.47±1.06	5.07±1.33	4.87±1.55	4.53±1.19
		1주	5.20±1.32	4.47±1.19	5.00±1.36	4.73±1.10	5.27±1.33
		2주	5.53±1.30	5.40±1.45	4.60±1.12	5.20±1.37	4.93±1.75
		3주	5.40±1.50	5.53±1.60	5.13±1.19	5.33±1.35	5.27±1.44
	단맛	0주	5.47±1.25	5.13±1.30	5.33±1.35	5.00±1.25	4.60±1.06
		1주	5.07±1.22	4.80±1.08	5.20±1.01	5.00±1.41	4.93±1.49
		2주	5.20±1.08	4.73±1.39	4.73±1.49	5.07±1.44	5.47±1.06
		3주	4.87±1.55	4.80±1.26	5.20±1.47	5.20±1.26	5.00±1.36
	신맛	0주	2.53±1.41	2.13±1.19	2.33±1.40	2.33±1.45	2.33±1.29
		1주	3.33±1.54	3.73±1.67	3.27±1.58	3.27±1.33	3.47±1.81
		2주	6.33±0.82	6.00±0.76	5.60±0.83	6.27±1.16	5.33±1.50
		3주	6.40±1.40	6.27±1.10	6.07±0.96	6.67±1.23	5.87±1.51
	감칠맛	0주	5.00±1.36	5.13±1.55	5.33±1.40	4.80±1.52	4.87±1.64
		1주	5.13±1.25	4.27±1.33	5.47±1.46	4.60±1.45	4.47±1.68
		2주	5.20±1.57	5.33±1.84	4.73±1.75	5.07±1.67	4.40±1.84
		3주	5.20±1.74	5.07±1.53	4.80±1.47	5.07±1.62	5.00±1.41
	이미	0주	3.73±1.62	4.00±1.69	3.47±1.51	4.13±1.73	4.07±1.67
		1주	3.67±1.68	4.00±1.73	3.47±1.25	3.60±1.76	3.60±1.50
		2주	3.20±1.66	3.73±1.75	4.93±1.62	4.20±1.61	6.67±1.35
		3주	4.00±1.89	4.07±2.34	5.27±1.71	3.73±1.71	4.60±2.50
	맛 기호도	0주	5.53±1.36	5.47±1.81	5.80±1.26	4.93±1.16	5.20±1.37
		1주	5.47±1.25	4.80±1.26	6.07±0.88	5.33±1.29	5.33±1.45
		2주	5.80±1.01	5.80±1.15	5.07±1.33	5.60±1.24	3.73±1.39
		3주	5.53±1.41	5.67±1.88	4.73±1.83	5.80±1.47	5.27±1.62
조식감	아삭한 정도	0주	6.20±1.26	6.20±1.37	6.73±1.16	6.60±0.99	6.67±1.23
		1주	5.53±1.19	5.47±1.25	5.87±0.99	5.87±0.92	6.07±0.88
		2주	5.60±1.12	5.67±1.11	5.73±1.22	5.60±0.99	5.93±0.96
		3주	5.47±1.36	5.33±1.35	5.40±1.12	5.80±1.21	5.67±1.35
종합적 기호도	종합적 기호도	0주	5.53±1.36	5.60±1.68	6.00±1.25	4.93±1.23	5.33±1.40
		1주	5.60±0.99	4.73±1.16	6.27±0.70	5.20±1.21	5.40±1.12
		2주	5.73±1.10	5.93±0.88	5.00±1.41	5.73±1.22	3.67±1.35
		3주	5.47±1.30	5.73±1.67	4.67±1.76	5.87±1.60	5.00±1.41

다) 완두콩 발효물 김치 적용 실험

식물성 발효향미모듈중 완두콩 발효물의 김치 적용평가를 위해 대조군으로 멸치액젓을, 무침가군, 완두콩발효물 농도별 3종으로 김치를 제조하여 비교 실험을 하였다.

(1) 실험방법

(가) 김치제조방법

김치제조 레시피는 기존 실험과 동일하게 제조하였으며, 소재의 아미노산 함량에 따른 샘플의 사용 권장량에 따라 혼합비를 조정하였다. 각 소재 함량에 따라 정제염으로 염도를 보정하였다. 제조한 김치는 각 500g씩 파우치 포장하였으며, 각 김치는 4℃에서 7일 간격으로 2주간 저장주기별로 관능검사용과 이화학분석용으로 사용하였다.

(나) 분석방법

상기 실험방법과 동일하게 수행하였다.

(2) 실험결과

① 이화학 분석결과

완두콩 향미모듈의 첨가 김치 제조시, 절임배추의 염도가 편차가 커 전체적으로 김치의 염도가 1.4 내외로 제조되었다. 실험시기의 배추의 당도 또한 낮아 김치제조 후 당도는 7.4Brix 내외로 기존의 김치보다 1.5Brix정도 낮게 제조되었다.

완두콩 향미모듈의 첨가 김치는 발효당일과 일주일 후 pH가 5대를 유지했으며, 2주차 부터는 4대로 측정되었다. 이는 액젓으로 제조한 김치와 젓갈을 첨가하지 않은 김치의 같은 발효 패턴을 보였다.

표 2-1-2-16. 소재 첨가 김치 염도

	액젓	Non	완두 1.5	완두 2	완두 2.5
염도(%)	1.38±0.01	1.46±0.00	1.48±0.00	1.59±0.00	1.43±0.00
당도(Brix%)	7.43±0.06	8.30±0.00	8.00±0.00	7.83±0.06	7.70±0.00

② 미생물 분석 결과

액젓을 첨가한 김치는 초기 젖산균이 6log에서 저장기간이 1주일 늘어날 때마가 2log 증가하였으며 이는 젓갈을 첨가하지 않은 김치도 동일한 패턴을 보였다. 그러나 완두콩 발효물을 1.5% 첨가한 김치는 젖산균 증가속도가 조금 낮게 측정되었으며, 완두콩 발효모듈 2.5%를 첨가한 김치는 대조군인 액젓과 같은 증가 속도를 보였다.

③ 관능검사 결과

연구소 전문 패널을 대상으로 김치 5종의 관능검사를 수행한 결과 김치의 냄새기호도에서는 젓갈을 첨가하지 않은 김치만큼 완두콩 발효향미모듈의 첨가김치들 모두 좋게 평가되었으며, 외관기호도는 제조 당일 완두콩 발효향미모듈 2.5% 첨가군이 가장 낮게 평가되었다. 외관기호도

평가의 순의는 바뀌지 않았다. 향미모듈 첨가량이 증가하면 김치 색에 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

감칠맛 강도 평가에서는 액젓과 유사한 점수를 평가받았으나, 완두콩 발효향미모듈의 첨가량에 따른 유의적 증가는 없는 것으로 평가되었으며, 이 결과는 개발 향미모듈의 첨가량이 낮은 1.5% 첨가로도 감칠맛은 유지되나, 저장기간 중 모듈의 강도가 유지 되지 않아 개선이 필요한 강도를 찾았다. 김치 전반적 기호도 평가에서는 액젓 첨가김치와 무첨가 김치, 완두콩 발효향미모듈 2.5% 첨가군이 비슷하게 평가되었으나, 완두콩 발효향미모듈 2% 첨가 김치가 제일 높게 평가되었다. 감칠맛의 강도에서는 1.5%와 차이가 없었으나 2% 첨가 김치군이 전반적으로 제일 높게 평가되었다.

③ 향미성분 분석 결과

GC/MS를 이용하여 3종 첨가물 적용 김치 즉, 액젓 첨가김치, 액젓 무첨가김치, 완두 발효향미모듈 2.5% 첨가김치의 발효에 따른 휘발성 물질을 분석한 결과 김치 제조 초기에는 $34.75 \mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 측정되었으며, 모든 처리군에서 발효 초기에 가장 휘발성 성분 함량이 높았고, 발효 시간에 따라 함량이 감소하였다. 발효 15일 차에는 샘플 완두 발효향기모듈 ($24.55 \mu\text{g/g}$) > 액젓 첨가 김치 ($23.20 \mu\text{g/g}$) > 무첨가 김치 ($19.50 \mu\text{g/g}$)으로 나타났다.

김치의 휘발성 성분 중 가장 높은 함량을 차지하는 성분은 sulfide, ester 계열의 성분이 양념에 함유된 양파, 생강, 마늘과 더불어 각 첨가물에서 많이 차지하였고, ester 휘발성 성분의 경우도 대부분이 isothiocyanates 성분이 검출된 ester 계열의 휘발성분 중 50% 이상 높게 나타났다. 1-Hexanol의 함량이 처리군별에서 제조 당일 큰 차이가 있는 것으로 나타났는데, 그 함량은 액젓 첨가 김치 ($13.95 \mu\text{g/g}$) > 샘플 완두 발효향기모듈 ($12.75 \mu\text{g/g}$) > 무첨가 김치 ($12.10 \mu\text{g/g}$) 순으로 나타났다. 그러나, 15일 저장 후에는 그 함량이 액젓 첨가 김치 ($10.6 \mu\text{g/g}$) > 샘플 완두 발효향기모듈 ($8.25 \mu\text{g/g}$) > 무첨가 김치 ($7.85 \mu\text{g/g}$) 순으로 나타나 순위에는 변동은 없었으나 함량의 큰 변화가 있음을 알 수 있다.

김치 제조 초기에는 젓갈 첨가군과 무첨가군보다 향미모듈의 향이 강하였으며, 이는 숙성 15일 후에도 유지되어 김치의 전반적 기호도에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단되었다.

표 2-1-2-17. 샘플 시료 이용 김치 pH와 산도

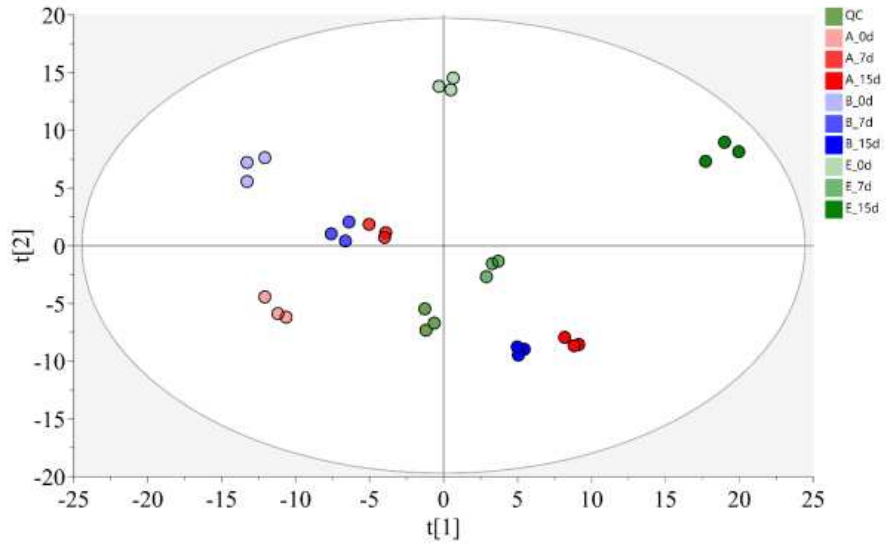
		pH	산도 (%)
액젓	0day	5.45±0.01	0.30±0.01
	7day	5.47±0.01	0.35±0.00
	15day	4.45±0.03	0.61±0.01
Non	0day	5.34±0.01	0.38±0.06
	7day	5.46±0.00	0.35±0.00
	15day	4.53±0.02	0.56±0.01
완두 1.5	0day	5.46±0.17	0.35±0.04
	7day	5.43±0.01	0.38±0.01
	15day	4.65±0.03	0.55±0.01
완두 2	0day	5.39±0.00	0.38±0.03
	7day	5.56±0.01	0.37±0.00
	15day	4.65±0.02	0.59±0.02
완두 2.5	0day	5.46±0.01	0.36±0.02
	7day	5.50±0.02	0.41±0.00
	15day	4.70±0.02	0.58±0.01

표 2-1-2-18. 샘플 시료 이용 김치 저장 중 젖산균 변화

		젖산균 (log cfu/g)
액젓	0day	6.25±0.05
	7day	7.25±0.04
	15day	9.15±0.03
Non	0day	6.29±0.03
	7day	7.08±0.06
	15day	9.43±0.03
완두 1.5	0day	6.34±0.04
	7day	7.21±0.01
	15day	8.98±0.01
완두 2	0day	6.15±0.03
	7day	6.98±0.04
	15day	9.34±0.03
완두 2.5	0day	6.24±0.06
	7day	6.97±0.03
	15day	9.23±0.14

표 2-1-2-19. 완두콩 발효향미모듈을 이용한 김치 5종 관능특성

			액젓	Non	완두 1.5%	완두 2%	완두 2.5%
냄새	신냄새	0d	3.3±1.5	3.4±2.2	3.2±1.8	2.9±1.4	3.3±1.5
		7d	3.5±1.3	3.9±1.3	3.9±1.3	3.8±1.1	3.6±1.4
		15d	5.9±1.0	6.1±1.0	5.5±1.1	5.8±1.0	5.9±0.9
	이취	0d	4.1±1.3	3.4±1.5	3.6±1.7	3.4±1.5	3.6±1.6
		7d	4.0±2.1	4.1±1.4	3.7±1.3	4.5±1.8	4.4±1.9
		15d	4.6±2.0	3.5±1.5	4.5±2.2	4.3±1.8	4.1±1.8
	냄새 기호도	0d	4.9±1.4	5.9±1.0	5.8±1.0	5.8±1.2	5.5±1.3
		7d	4.9±1.4	5.4±1.1	5.6±1.1	5.1±1.2	5.1±0.9
		15d	5.4±1.5	6.1±1.0	5.4±2.0	5.6±1.2	5.6±1.3
외관	외관 기호도	0d	5.7±1.6	6.1±0.9	5.7±1.0	6.1±1.1	5.3±1.2
		7d	5.1±1.1	6.1±1.1	5.5±1.3	5.4±1.1	5.3±1.0
		15d	6.2±1.5	6.0±1.0	5.9±1.0	6.0±0.9	5.8±1.3
맛	이미	0d	4.5±1.3	4.1±1.1	4.1±1.2	5.1±1.5	4.1±1.7
		7d	4.4±1.4	4.1±1.5	3.5±1.6	4.7±1.4	4.3±1.8
		15d	5.0±0.7	4.9±0.6	5.1±0.6	5.3±0.9	4.8±0.9
	짠맛	0d	5.0±1.6	4.6±1.4	4.5±1.5	4.9±1.6	4.3±1.4
		7d	4.3±1.2	4.5±1.1	4.1±1.4	4.6±1.2	4.6±1.2
		15d	4.8±1.1	4.3±1.2	4.5±1.0	4.4±1.0	4.8±1.1
	단맛	0d	2.4±1.2	2.9±1.3	2.7±1.2	2.5±1.3	2.6±1.3
		7d	3.4±1.6	3.3±1.2	3.1±1.3	3.4±1.2	3.3±1.4
		15d	5.9±0.8	5.6±1.2	4.6±1.4	5.4±1.3	5.1±1.1
	신맛	0d	4.8±1.7	4.4±1.3	4.6±1.5	5.0±1.3	4.3±1.4
		7d	4.1±1.6	3.9±1.5	3.9±1.5	4.5±1.3	4.2±1.6
		15d	4.7±1.1	4.7±1.3	4.4±1.0	4.8±1.3	5.1±1.0
	감칠맛	0d	3.5±1.5	3.6±1.4	3.6±1.8	3.7±1.8	3.6±1.3
		7d	4.8±2.0	4.2±1.6	4.9±1.9	4.5±1.8	4.8±2.1
		15d	5.3±1.7	4.6±1.4	5.1±1.6	4.9±1.7	4.9±1.3
	맛 기호도	0d	5.1±1.5	5.1±1.3	5.1±1.2	5.4±1.3	4.6±1.3
		7d	4.6±1.5	4.5±0.9	3.9±1.5	4.7±1.6	4.4±1.7
		15d	4.6±1.5	4.6±1.2	4.2±1.6	5.3±1.4	4.5±1.9
조직감	아삭한정 도	0d	6.1±0.9	6.3±1.2	6.3±0.9	6.1±0.9	6.1±1.2
		7d	5.1±1.0	4.9±0.7	4.8±1.1	4.6±1.3	4.4±1.7
		15d	5.3±1.2	4.9±1.1	5.1±1.0	5.1±1.0	5.1±1.1
종합적인 기호도	종합적인 기호도	0d	5.0±1.5	5.1±1.5	5.1±1.1	5.6±1.2	4.8±1.7
		7d	4.5±1.8	4.5±0.9	4.0±1.5	4.9±1.6	4.4±1.8
		15d	4.8±1.5	4.6±1.1	4.3±1.7	5.4±1.4	4.6±1.0



PCA ($R^2X = 0.542$, $Q^2 = 0.471$)

Relative standard deviation (RSD%) of quality control group = 1.48%

그림 2-1-2-4. Quality control of GC-MS analysis

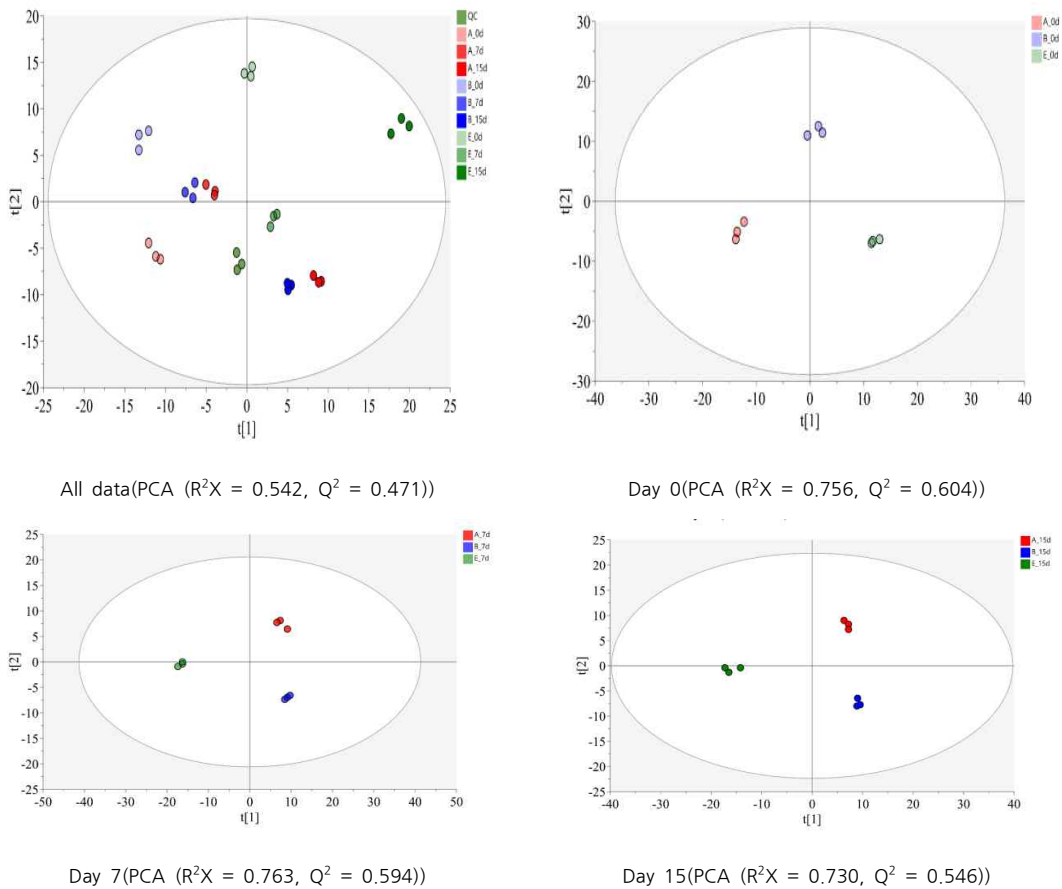


그림 2-1-2-5. 전체와 발효 기간별 PCA 분석 결과

○ Identified metabolites

No.	Metabolites	Retention time (min)	Target Mass	HMDB1)	PubChem2)	KEGG3)
1	Lactic acid	4.57	147	HMDB0000190	61503	C00186
2	Glycolic acid	4.735	147	HMDB0000115	757	C03547
3	Oxalate	5.685	147	HMDB0002329	971	C00209
4	2-Aminoisobutyrate	5.825	130	HMDB0001906	6119	C03665
5	3-Hydroxybutyrate	5.84	147	HMDB0000357	441	C01089
6	Malonic acid	6.16	147	HMDB0000691	867	C04025
7	Valine	6.29	144	HMDB0000883	6287	C00183
8	2-Aminoethanol	6.81	174	HMDB0000149	700	C00189
9	Leucine	6.855	158	HMDB0000687	6106	C00123
10	Phosphate	6.89	299	HMDB0001429	57424078	C00009
11	Ethylmalonate	7.12	147	HMDB0000622	11756	-
12	Proline	7.125	142	HMDB0000162	145742	C00148
13	Glycine	7.21	174	HMDB0000123	750	C00037
14	Maleic acid	7.235	147	HMDB0000176	444972	C01384
15	Glyceric acid	7.44	147	HMDB0000139	439194	C00258
16	Uracil	7.525	241	HMDB0000300	1174	C00106
17	Methylsuccinic acid	7.53	147	HMDB0001844	10349	C08645
18	Serine	7.72	204	HMDB0062263	5951	C00716
19	Alanine	7.725	188	HMDB0000161	5950	C00041
20	Pipecolic acid	7.77	156	HMDB0000070	849	C00408
21	Threonine	7.975	218	HMDB0000167	6288	C00188
22	Glutaric acid	8.305	147	HMDB0000661	743	C00489
23	Malic acid	8.855	147	HMDB0000744	525	C03668
24	Threitol	9.05	217	HMDB00004136	222285	C16884
25	Aspartic acid	9.125	232	HMDB0000191	5960	C00049
26	Pyroglutamic acid	9.175	156	HMDB0000267	7405	C01879
27	4-Aminobutyric acid	9.205	174	HMDB0000112	223130	C00334
28	2-Isopropylmalic acid	9.775	147	HMDB0000402	5280523	C02504
29	Glutamic acid	9.915	246	HMDB0000148	33032	C00025
30	Phenylalanine	10.015	218	HMDB0000159	6140	C00079
31	Hypotaurine	10.02	100	HMDB0000965	107812	C00519
32	Lyxose	10.33	103	HMDB0003402	65550	C08348
33	Asparagine	10.335	116	HMDB0000168	6267	C00152
34	Ribose	10.445	103	HMDB0000283	5779	C00121
35	Putrescine	10.845	174	HMDB0001414	1045	C00134
36	Glutamine	11.085	156	HMDB0000641	5961	C00064
37	Quinolinic acid	11.18	147	HMDB0000232	1066	C03722
38	Shikimic acid	11.32	204	HMDB0003070	8742	C00493
39	Ornithine	11.42	142	HMDB0000214	6262	C00077
40	Citric acid	11.45	273	HMDB0000094	311	C00158
41	Glycyl-Glycine	11.545	174	HMDB0011733	11163	C02037
42	Cadaverine	11.65	174	HMDB0002322	273	C01672
43	Quinic acid	11.78	345	HMDB0003072	6508	C00296
44	Adenine	11.8	188	HMDB0000034	190	C00147
45	2-Dehydro-D-gluconate	11.88	103	HMDB0011732	50	C03342
46	Allose	12.065	319	HMDB0001151	12285879	C01487
47	Glucose	12.195	319	HMDB0000122	5793	C00221
48	Mannitol	12.275	319	HMDB0000765	6251	C00392
49	5-Keto-D-Gluconate	12.28	147	HMDB0011731	3838	C01062
50	Galacturonic acid	12.385	333	HMDB0002545	84740	C08348
51	Glucarate	12.76	292	HMDB0000663	33037	C00818
52	Gluconic acid	12.765	147	HMDB0000625	10690	C00257
53	Inositol	13.32	217	HMDB0000211	-	C00137
54	Heptadecanoate	13.88	117	HMDB0002259	10465	-
55	Spermidine	14.22	144	HMDB0001257	1102	C00315
56	Uridine	15.55	217	HMDB0000296	6029	C00299
58	Sucrose	16.395	361	HMDB0000258	5988	C00089
59	Trehalose	16.725	217	HMDB0000975	7427	C01083
60	Maltose	16.935	361	HMDB0037138	439341	C00897
61	Turanose	17.18	217	HMDB0011740	5460935	C19636
62	Melibiose	17.54	361	HMDB0000048	440658	C05400
63	Melezitose	20.025	361	HMDB0011730	92817	C08243
64	Maltotriose	20.41	361	HMDB0001262	439586	C01835

○ Day 0 vs Day 15 of B (VIP > 1.0, *p* value < 0.05)

No.	Metabolites	Day 15/Day 0 (↑/↓)	VIP value	<i>P</i> value	*
1	Lactic acid	↑	1.18	<0.001	***
2	Malic acid	↓	1.18	<0.001	***
3	Mannitol	↓	1.18	0.009	**
4	Gluconic acid	↓	1.18	0.022	*
5	Glucarate	↓	1.18	0.039	*
6	Uracil	↑	1.18	0.041	*
7	Galacturonic acid	↑	1.18	<0.001	***
8	Ornithine	↓	1.18	0.027	*
9	4-Aminobutyric acid	↑	1.18	0.005	**
10	Alanine	↑	1.18	<0.001	***
11	Citric acid	↓	1.18	<0.001	***
12	2-Dehydro-D-gluconate	↓	1.18	0.041	*
13	Glycine	↑	1.18	0.001	**
14	Melibiose	↑	1.18	0.001	**
15	Sucrose	↓	1.18	<0.001	***
16	Melezitose	↓	1.18	<0.001	***
17	Phosphate	↑	1.17	<0.001	***
18	Trehalose	↓	1.17	0.014	*
19	Leucine	↑	1.17	0.008	**
20	2-Aminoethanol	↑	1.17	<0.001	***
21	Phenylalanine	↑	1.17	0.002	**
22	Quinic acid	↓	1.17	0.002	**
23	Inositol	↑	1.17	<0.001	***
24	Quinic acid	↓	1.17	<0.001	***
25	Glutamic acid	↓	1.17	<0.001	***
26	Cadaverine	↑	1.16	0.015	*
27	Glutamine	↓	1.16	<0.001	***
28	Maltotriose	↓	1.16	<0.001	***
29	Ribose	↑	1.16	<0.001	***
30	Hypotaurine	↑	1.14	0.029	*
31	Turanose	↑	1.18	0.030	*
32	Asparagine	↓	1.18	0.004	**
33	Glycolic acid	↓	1.18	0.013	*

○ Day 0 vs Day 15 of E (VIP > 1.0, *p* value < 0.05)

No.	Metabolites	Day 15/Day 0 (↑/↓)	VIP value	<i>P</i> value	*
1	Lactic acid	↑	1.23	<0.001	***
2	Maltose	↓	1.23	<0.001	***
3	Malic acid	↓	1.23	<0.001	***
4	Mannitol	↑	1.23	<0.001	***
5	4-Aminobutyric acid	↑	1.23	<0.001	***
6	Guanine	↑	1.23	<0.001	***
7	Gluconic acid	↓	1.23	<0.001	***
8	Uracil	↑	1.23	<0.001	***
9	Glucarate	↓	1.23	<0.001	***
10	Pyroglutamic acid	↓	1.23	<0.001	***
11	5-Keto-D-Gluconate	↑	1.23	<0.001	***
12	Alanine	↑	1.23	<0.001	***
13	Inositol	↑	1.23	<0.001	***
14	Oxamic acid	↑	1.22	<0.001	***
15	Ornithine	↑	1.22	<0.001	***
16	2-Aminoethanol	↑	1.22	0.001	**
17	Sucrose	↓	1.22	<0.001	***
18	Melezitose	↓	1.22	<0.001	***
19	Threitol	↑	1.22	<0.001	***
20	Glycine	↑	1.22	<0.001	***
21	Galacturonic acid	↑	1.22	<0.001	***
22	Phosphate	↑	1.22	0.002	**
23	Glucose	↓	1.22	<0.001	***
24	Melibiose	↑	1.22	<0.001	***
25	Aspartic acid	↑	1.22	<0.001	***
26	2-Dehydro-D-gluconate	↓	1.22	<0.001	***
27	Serine	↑	1.22	<0.001	***
28	Maltotriose	↓	1.22	<0.001	***
29	Hypotaurine	↑	1.22	<0.001	***
30	Leucine	↑	1.21	<0.001	***
31	Threonine	↑	1.21	<0.001	***
32	Citric acid	↓	1.21	<0.001	***
33	Phenylalanine	↑	1.21	0.007	**
34	Allose	↓	1.20	<0.001	***
35	Methylsuccinic acid	↑	1.20	<0.001	***
36	Turanose	↑	1.20	<0.001	***
37	Adenosine	↓	1.19	0.001	**
38	Maleic acid	↑	1.19	0.001	**
39	Glutamine	↑	1.18	0.003	**
40	Glutamic acid	↓	1.17	0.003	**
41	Valine	↑	1.17	0.003	**
42	Glyceric acid	↑	1.17	0.003	**
43	Trehalose	↓	1.16	0.005	**
44	Ethylmalonate	↑	1.16	0.005	**
45	Proline	↑	1.15	0.007	**
46	Spermidine	↑	1.14	0.008	**
47	Heptadecanoate	↓	1.14	0.008	**

2) 김치중균 특성 실험

김치 16종으로부터 분리한 78개의 콜로니들의 16S rDNA 유전자 염기서열을 분석한 결과, Lesconostoc과 Lactobacillus속이 각 21종, 5종 분리되었다. Lactobacillus속에는 *Lactobacillus sakei* 와 *Lactobacillus paracasei*가 분리되었으며, Lesconostoc속에서는 *Leuconostoc mesenteroides* 21종이 분리되었다. 본 연구에서 분리된 균주와 보유 균주를 대상으로 균주 특성을 파악하고자 하였다.

가) 김치에서 분리한 항산화능 보유 *Lactobacillus sakei*

(1) 실험방법

① 항산화 활성 측정

DPPH radical 소거 활성 측정: 김치 유산균의 DPPH radical 소거 활성은 Blois(18)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각 균주를 5.0×10^5 CFU/mL와 1.0×10^7 CFU/mL의 농도로 희석하여 15 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH, Sigma-Aldrich Co.)액과 1:1의 비율로 혼합하여 빛이 차단된 상태에서 30분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 흡광도 차이를 다음과 같이 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} \\ = (1 - (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

② Hydroxyl radical 소거 활성 측정

Hydroxyl radical 소거 활성의 측정은 Halliwell 등(19)의 방법에 따라 5.0×10^6 CFU/mL와 1.0×10^7 CFU/mL의 농도로 희석한 균주 50 μ L에 2.5 mM 2-deoxy-D-ribose를 함유한 10 mM PBS 용액 345 μ L를 혼합하였다. 그리고 1 mM FeCl₃ 및 1.04 mM EDTA 용액 50 μ L, 1 mM ascorbate 50 μ L, 0.1M H₂O₂ 5 μ L를 각각 첨가하고 37° C에서 10분간 반응시킨 후, 2.8% trichloroacetic acid 500 μ L와 1% 2-thiobarbituric acid 250 μ L를 첨가하고 95° C에서 8분간 가열하였다. 반응물을 냉각한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 다음과 같이 hydroxyl radical 소거 활성을 산출하였다.

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity (\%)} \\ = (1 - (\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}) \times 100$$

(2) 실험결과

젓갈을 사용하지 않은 김치 유래 유산균 중 DPPH radical 소거 효과가 있는 유산균들의 활성을 측정한 결과, 이들 모두 처리 농도가 증가할수록 DPPH radical 소거 활성이 증가하였다. 또한 5.0×10^5 CFU/mL 처리군과 1.0×10^7 CFU/mL 처리군 모두에서 Wikim 0158이 DPPH radical 소거 효과가 각각 $53.2 \pm 2.8\%$ 와 $70.8 \pm 1.9\%$ 로 가장 높게 나타났다. 따라서 젓갈을 사용하지 않은 김치에서 분리한 균주 중 Wikim 0158이 가장 큰 DPPH radical 소거능을 가짐으로써 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. Hydroxyl radical 소거 효과 측정 결과, DPPH radical 소거 활성 결과와 마찬가지로

지로 유산균 처리 농도가 높을수록 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 보였다. 특히 1.0×10^7 CFU/mL 처리군에서는 Wikim 0158이 $35.2 \pm 1.5\%$ 로 유의적으로 가장 높은 소거능을 나타냈다. DPPH radical 소거능 결과와 같은 경향으로 Wikim 0158이 가장 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 가지며, 항산화 활성에서 가장 우수한 효능을 나타낸 것을 확인하였다.

유산균은 활성산소로부터 자신을 보호할 수 있는 항산화 활성을 가지고 있다고 보고되고 있는데, 이러한 유산균의 항산화 효과는 주로 금속 이온 chelating, free radical의 소거, 그리고 환원 작용 등이 복합적으로 관여하여 나타나므로, 유산균은 활성산소에 의한 각종 질병을 예방하는데 활성을 나타낼 수 있다고 하겠다. 김치에서 분리한 *Lab. sakei*는 높은 항산화 효과를 나타내는 것을 알 수 있다. 본 연구를 통해 항산화 효과가 뛰어난 Wikim 0158의 섭취는 체내 산화적 스트레스에 대하여 활성산소의 축적을 막는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

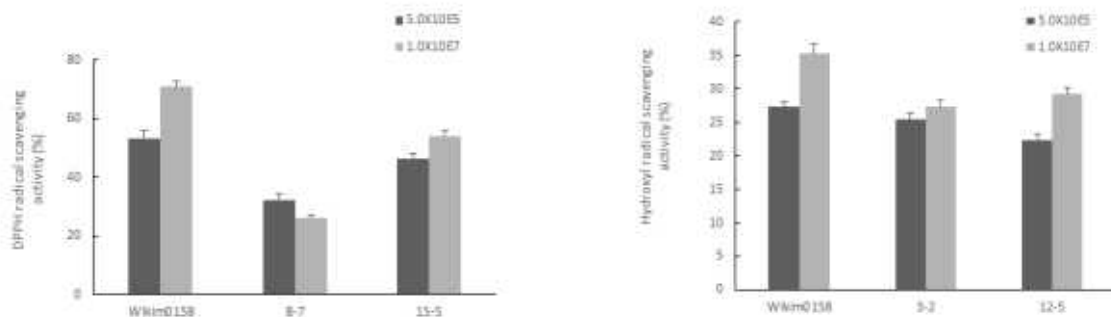


그림 2-1-2-6. 젓산균 활성산소 측정 결과

나) 김치로부터 *Lactobacillus sakei* 생육저해 *Lc. mesenteroides* 균주의 분리

(1) 실험방법

지시균주를 김치로부터 분리하여 계통발생학적으로 *Lb. sakei*로 동정한 균주를 지시균으로 사용하여 *Leuconostoc* 속으로 동정된 균주들의 지시균 생육저해활성을 검토하였다. 전배양한 지시균주를 약 10^5 CFU/mL 농도로 희석하여 MRS 한천배지에 $200 \mu\text{L}$ 도말하여 건조시킨 다음, 약 10^8 CFU/mL 농도의 실험균주를 백금이를 이용해 희석 접종하여 30°C 에서 24시간 배양 후 생육저해환의 생성 유무로 생육저해활성을 확인하였다. 생육저해 환 생성이 확인된 균주는 agar disk diffusion method를 이용하여 지시균 생육저해활성을 재확인하였다.

(2) 실험결과

김치로부터 가장 높은 빈도로 분리된 *Leuconostoc* 속 균주는 *Lc. mesenteroides*로 제일 많이 분리되었지만 5%의 균주만 저해활성을 나타내었다.

발효 후기에 성장하는 대표적 유산균 *Lb. sakei*의 생육을 저해하여 가식기간을 연장하려는 방법적 시도가 가능할 것으로 판단되며 *Leuconostoc mesenteroides* Wikim0159로 명명하였다.

표 2-1-2-20. 김치에서 분리한 균주의 생육저해 검토 결과

Identification	Strain	Indicator strainb
		<i>Lb. sakei</i> spp. <i>sakei</i>
<i>Lc. mesenteroides</i>	Wikim0159	+
	3-2**	+
	9-5	-
	11-2	w

* 생육환의 선명도 표시: +, 생육저지 환 생성; -, 환 생성하지 않음, w, 약한 환 생성

** 김치에서 분리한 균주 고유 번호

본 연구결과로 효과가 확인된 2개 균주 *Lactobacillus sakei* Wikim0158과 *Leuconostoc mesenteroides* Wikim0159는 공동연구기관에 기술이전하여 김치 품질 향상을 위해 활용 검토하고자 한다.

3) 비건 막김치와 비건 김치소스 개발

가) 비건 막김치와 비건 김치소스 개발 (1차)

비건 막김치와 비건 김치소스를 개발하기 위하여 제조공정을 그림과 같이 연구하였다.

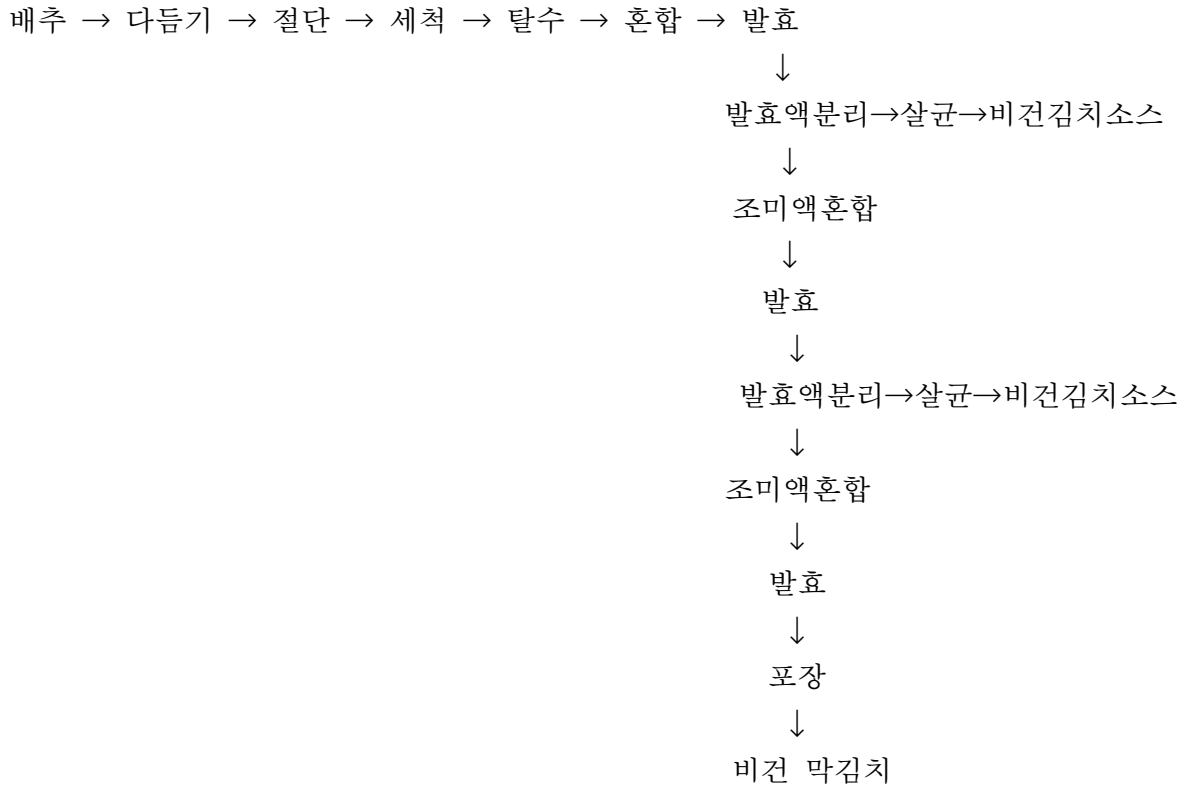


그림 2-1-2-7 비건 막김치와 비건 김치소스 제조공정 도

(1) 시험방법

(가) 비건 김치 제조 공정 개발

김치소스 제조 공정은 막김치 제조 공정을 적용하여 김치소스용 발효액을 제조하고, 발효액을 조미하여 살균하고 포장하는 것을 기본공정으로 개발하였다.

(나) 비건 김치 제조 배합비 개발

막김치 제조 배합비는 짓갈을 빼고 식물단백가수분해물(hydrolyzed vegetable protein, HVP)과 MSG(mono sodium glutamate)를 첨가하였다. 그리고 최소한의 재료로 기본 배합비를 설정하고, 수차례 시험을 거쳐 배합비를 개선하였으며, 최종적으로 김치풍미를 낼 수 있는 경제적인 비건김치와 비건김치소스의 배합비를 결정하였다.

(다) 비건 김치 발효액 개발

김치 발효액은 막김치 제조 배합비에 따라 제조한 막김치를 발효하여 1차 발효액을 얻고, 1차 발효액을 뺀 막김치에 조미액을 추가로 첨가하고 발효하여 2차 발효액을 얻었으며, 2차 발효액을 뺀 막김치에 조미액을 추가로 첨가하고 발효하여 3차 발효액을 얻은 다음, 1차 발효액, 2차 발효액, 3차 발효액을 혼합하여 최종 발효액을 제조하였다.

(라) 비건 김치소스 조성물 개발

최종 발효액에 김치 풍미를 강화하기 위하여 단미료(소금, 사카린)와 복합조미물질(고춧가루, 매실즙)을 첨가하고, 증점재(잔탄검)를 첨가하여 김치소스 조성물을 개발하였다.

(마) 비건 김치소스 살균조건 개발

김치소스 조성물을 살균하기 위하여 연속식 가열살균장치를 설치하고, 살균조건을 시험하여 최적조건으로 살균하여 포장하였으며, 살균된 김치소스의 품질을 관능적, 이화학적, 미생물학적으로 평가하였다.

(바) 비건 김치소스 품질유지기한 설정

최종 선정된 김치소스 배합비로 김치소스를 생산하여 살균 포장하고, 상온과 저온에서 보관하면서 품질유지기한 설정시험을 하였다.

(2) 시험결과

(가) 비건 막김치 제조 배합비

비건 막김치의 제조 배합비는 표 1과 같다.

표 2-1-2-21. 막김치 제조 배합비

재료	무게(g)	비율(%)	비고
배추	1500	16.67	씻고 세척하여 탈수
적채	1500	16.67	씻고 세척하여 탈수
무마쇄물	600	6.67	
마늘마쇄물	180	2.00	양파 토마토향 제거 목적
정제염	180	2.00	
포도당	180	2.00	
HVP	180	2.00	샘표 완두베이스
고춧가루	180	2.00	매운맛증강 새길푸드
MSG	9	0.10	
사카린	4.5	0.05	단맛증강
중균	9	0.10	신우 WiKim32
물	4482	49.80	수도수
계	9000	100.00	
			초기 pH : 6.50

김치 제조과정은 다음 순서에 따라 제조하였다.

1. 배추와 적채를 다듬고 씻어서 세척하고 탈수하였다.
2. 분말(정제염, 포도당, 고춧가루, MSG, 사카린, 중균)을 먼저 혼합하고, 이어서, 마쇄물과 HVP, 물을 넣고 녹여 조미액을 제조하였다.
3. 조미액에 배추와 적채를 넣고 눌러 뚜껑을 닫고 20℃에서 발효하였다.
4. 발효 1일차와 3일차에 발효액을 여과하여 얻고 신규 조미액(정제염, MSG, 사카린, 물 혼합액)을

5 L씩 채우고 20℃에서 발효하였다.

6. 발효액을 혼합하여(pH) 잔탄검을 0.2% 녹이고 90℃에서 10분 간 살균하여 냉각하여 김치소스를 제조하고 포장하였다.
7. 잔탄검을 녹인 김치 발효액 1 L에 매즙 1 L를 혼합하여 살균 포장하였다.

제조한 김치 발효액(살균김치소스, 살균김치매즙소스)를 표 2와 같이 관능 특성을 7점 척도법으로 조사하였다. 매즙을 첨가하지 않은 김치소스의 외관, 향미 전체적인 기호도가 각각 5.7, 4.7, 5.0으로 김치매즙소스보다 좋았고 두 소스 모두 매운맛, 짠맛은 적당하였으나 단맛은 강했고 김치매즙소스는 신맛이 강하고 소스로서 점도가 약했다.

표 2-1-2-22. 김치 발효액(2차 시험)의 관능 특성

시료	기호도			강도				
	외관	향미	전체	신맛	매운맛	짠맛	단맛	점도
살균김치소스	5.7	4.7	5.0	4.0	4.0	3.7	5.3	4.3
살균김치매즙소스	5.0	4.3	4.3	6.0	3.7	3.3	5.0	2.3

그리고 살균한 김치 소스 2종을 1주 간 상온에 보관하면서 품질을 평가하였다. 저장 1일차에는 표 3과 같이 pH가 살균김치소스에서는 4.27, 살균김치매즙소스에서는 2.67로 나타났고, 염도도 각각 2.85와 1.92로 측정되었다. Brix는 살균김치소스 6.9, 살균김치매즙소스 7.7로 매즙 첨가 시 증가하는 것으로 나타났다. L값은 살균김치소스에서 46.69이었으나 매즙 첨가 시 52.61로 높게 나타났고, a값은 두 소스 모두 38.45와 32.95로 유사하게 나타났으나 살균 시 감소하는 것으로 나타났으며, b값은 살균김치소스 55.90, 살균김치매즙소스 37.76로 측정되었다. 점도는 살균김치소스 51.00, 살균김치매즙소스 11.50로 나타났다.

표 2-1-2-23. 김치 발효액(2차 시험)의 이화학적 특성(저장 1일차)

시료	pH	염도(%)	점도	Brix%
살균김치소스	4.27	2.85	51.00	6.9
김치매즙소스 (살균 전)	2.60	1.92	11.50	7.7
살균김치매즙소스	2.67	1.92	11.50	7.7

표 2-1-2-24. 김치 발효액(2차 시험)의 Lab 색차(저장 1일차)

시료	L	a	b
살균김치소스	46.69	38.45	55.90
김치매즙소스 (살균 전)	59.52	51.81	50.60
살균김치매즙소스	52.61	32.95	37.76

저장 7일차에는 표 4와 같이 저장 1일차와 pH, 염도, L값, 점도 Brix가 유사하였다. 이는 살균이 충분히 진행되어 미생물 번식으로 인한 변질이 없었던 것으로 판단된다. 반면, 살균김치매즙소스의 경우 a값, b값이 증가하였다.

표 2-1-2-25. 김치 발효액(2차 시험)의 이화학적 특성(저장 7일차)

시료	pH	염도	점도	Brix
살균김치소스	4.25	2.89	53	6.8
살균김치매즙소스	2.79	1.87	10	7.7

표 2-1-2-26. 김치 발효액(2차 시험)의 Lab (저장 7일차)

시료	L	a	b
살균김치소스	46.18	36.91	51.06
살균김치매즙소스	55.68	50.93	53.73

김치 발효액의 살균 조건 별 미생물 수를 조사하였다(표 5). 총균 수에서 살균김치소스는 1 log CFU/mL로 나타났고 살균김치매즙소스에서는 검출되지 않았으며 유산균은 두 소스 모두 검출되지 않았다. 살균 7일차에는 두 시료 모두 총균, 유산균이 검출되지 않았다. 살균조건 선정이 우수하였다고 판단된다.

표 2-1-2-27. 김치 발효액(2차 시험)의 미생물 특성

시료	총균 수(log CFU/mL)		유산균 수(log CFU/mL)	
	살균 1일차	살균 7일차	살균 1일차	살균 7일차
살균김치소스	1	0	0	0
김치매즙소스	3		0	
살균김치매즙소스	0	0	0	0

표 2-1-2-28. 1차 개선방안

문제점	개선 방안
살균김치소스는 신맛이 약하고 단맛이 강했음	매즙투입량을 소스대비 50%→10~20%로 변경하는 것으로 개선 사카린 투입량을 1/2로 줄이는 것으로 개선
살균김치매즙소스는 신맛이 강했음	



비건 김치소스 균질화



비건 김치소스 연속살균

그림 2-1-2-8 비건 김치소스 제조 공정 모습

나) 비건 막김치와 비건 김치소스 개발 (1차)

1차 시험의 관능검사 결과를 반영하여 배합비를 조정하였다. 즉 발효액 여과 수율을 높이기 위해 무와 마늘을 미세하게 마쇄하고 고춧가루를 여과하여 표 6와 같은 배합비로 막김치를 제조하였고 발효액에 매즙을 10-20% 추가하여 신맛을 조절하였으며 잔탄검을 0.4%로 높여서 점도를 증가시켰다.

(1) 실험방법

1. 배추와 적채를 다듬고 썰어서 세척하고 탈수하였다.
2. 분말(정제염, 포도당, 미세고춧가루, MSG, 사카린, 종균)을 먼저 혼합하고, 미세마쇄물과 HVP, 물을 넣고 저어 녹여 조미액을 제조하였다.
3. 조미액에 배추와 적채를 넣고 눌러 뚜껑을 닫고 20℃에서 발효하였다.
4. 발효 1, 2, 3, 4일차의 발효액을 여과하여 얻고 조미액을 채워서 계속 발효하였다.
5. 발효 혼합액에 매즙을 5%와 10% 혼합하고 잔탄검 0.4%를 포도당 5배를 섞어 녹인 다음 연속식 가열살균기로 90℃에서 10분 간 살균하였다.
6. 살균한 김치소스를 상온에 보관하면서 품질을 평가하였다.

표 2-1-2-29. 막김치 제조 개선 배합비

재료	무게(g)	비율(%)	조정	비고
배추	1500	16.67		썰고 세척하여 탈수
적채	1500	16.67		썰고 세척하여 탈수
무마쇄물	600	6.67		
마늘마쇄물	180	2.00		양파 토마토향 제거 목적
정제염	180	2.00		
포도당	180	2.00		
HVP	180	2.00		샘표 완두베이스
고춧가루	180	2.00		매운맛증강 새길푸드
MSG	9	0.10		
사카린	2.25	0.025		단맛증강, 설탕으로 5%
종균	9	0.10		신우 WiKim32
물	4484	49.80		수도수
계	9000	100.00		

(2) 실험결과

제조한 김치 소스(BJ, YJ, BJM, YJM)를 저장 1일차에 관능 특성을 표 8와 같이 7점 척도법으로 조사하였다. 전체적 기호도는 4소스 모두 유사하였으며 외관은 매실을 첨가하지 않은 소스가 약간 우수하였다. 신맛 강도는 매즙을 첨가한 소스가 높게 나타났으며 점도는 낮았다.

표 2-1-2-30.. 비건 김치 소스의 관능 특성(저장 1일차)

시료	기호도			강도				
	외관	향미	전체	신맛	매운맛	짠맛	단맛	점도
BJ	5.5	5.0	5.0	4.0	5.0	4.5	4.5	4.0
YJ	5.5	5.0	5.0	3.5	5.5	4.5	4.5	5.5
BJM	4.0	4.0	5.0	5.5	4.5	5.0	4.5	3.5
YJM	4.0	4.0	5.0	6.0	3.5	4.5	5.0	3.5

* BJ : 배추/적채를 이용한 김치소스

* YJ : 양배추/적채를 이용한 김치소스

* BJM : 배추/적채/매실을 이용한 김치소스

* YJM : 양배추/적채/매실을 이용한 김치소스

제조한 김치 소스(BJ, YJ)를 저장 7일차에 매실 첨가량을 다르게 하여 표 9와 같이 관능 특성을 7점 척도법으로 조사하였다. 전체적인 관능특성 네가지의 소스 모두 유사하였으나 매실 5%첨가는 신맛이 부족하고 10% 첨가는 신맛이 과하다는 평이 있었다.

표 2-1-2-31. 비건 김치 소스의 관능 특성(저장 7일차)

시료	기호도			강도				
	외관	향미	전체	신맛	매운맛	짠맛	단맛	점도
BJ5%	5.5	5.5	5.8	4.3	4.8	4.3	5.0	6.0
BJ10%	6.0	5.0	5.8	5.0	4.3	3.8	4.5	6.3
YJ5%	5.8	5.3	5.5	5.0	4.8	4.3	4.5	6.0
YJ10%	5.5	5.0	6.0	5.0	4.8	4.3	4.3	6.0

*BJ 5% : BJ + 매실 5% 추가

*BJ 10% : BJ + 매실 10% 추가

*YJ 5% : YJ + 매실 5% 추가

*YJ 10% : YJ + 매실 10% 추가

그리고 살균한 김치 소스 8종의 이화학적 특성을 측정하고 이 중 90℃, 600초 살균한 김치소스 4종을 1주 간 상온에 보관하면서 품질을 평가하였다(표 10). 저장 1일차에는 pH가 4.15 ~ 4.25였으며 매실 첨가 균은 3.30~3.40으로 나타났다, 염도는 2.45 ~ 2.55이었고 매실 첨가 균은 2.08~2.17 수준이었다. Brix는 8.0에서 8.5로 나타났고 L값은 30.55 ~ 33.53으로 매실 첨가 균이 더 높았다(43.01 ~ 47.28). a값은 모든 소스에서 유사하게 나타났으며 BJ, YJ의 b값은 52.24 ~ 56.36으로 나타났으나 배즙 첨가 균에서 37.19까지 감소하였다. 점도는 BJ90, YJ90 균의 158 ~ 164에서 배즙 첨가 균의 경우 살균 시(BJM90, YJM90) 147로 비교적 낮게 나타났다.

저장 7일차에는 표 11와 같이 저장 1일차와 L값을 제외한 모든 이화학적 특성에서 유사한 결과를 나타내었다. L값은 저장 7일차에 소폭 감소하였다.

표 2-1-2-32.. 김치 소스(3차 시험)의 이화학적 특성(저장 1일차)

시료	pH	염도	점도	Brix
BJ	4.20	2.53	154	8.0
YJ	4.18	2.48	150	8.3
BJM	3.39	2.17	100	8.0
YJM	3.31	2.12	136	8.5
BJ90	4.18	2.52	158	8.0
YJ90	4.13	2.47	164	8.2
BJM90	3.34	2.19	147	8.1
YJM90	3.23	2.10	147	8.5
BJ60	4.21	2.27	126	7.1
YJ60	4.15	2.45	163	8.3
BJM60	3.27	2.18	112	8.0
YJM60	3.28	2.08	136	8.5

* x90 : 해당 x를 90℃, 600초 간 살균

* x60 : 해당 x를 60℃, 600초 간 살균

표 2-1-2-33. 김치 발효액(3차 시험)의 Lab(저장 1일차)

시료	L	a	b
BJ	33.53	45.78	56.36
YJ	30.55	45.44	52.24
BJM	47.28	50.78	37.19
YJM	43.01	48.73	42.59
BJ90	30.67	42.84	52.35
YJ90	28.70	42.94	49.34
BJM90	46.32	47.45	41.82
YJM90	42.83	46.16	46.70
BJ60	31.18	41.82	52.90
YJ60	28.00	43.16	47.97
BJM60	45.54	49.25	40.02
YJM60	43.04	48.17	43.44

표 2-1-2-34. 비건 김치 소스(3차 시험)의 이화학적 특성(저장 7일차)

시료	pH	염도	점도	Brix
BJ90	4.20	2.65	158	7.9
YJ90	4.23	2.61	164	8.2
BJM90	3.41	2.33	147	8.0
YJM90	3.38	2.26	147	8.5

표 2-1-2-35. 비건 김치 소스(3차 시험)의 Lab(저장 7일차)

시료	L	a	b
BJ90	27.91	39.41	47.66
YJ90	26.17	39.92	45.12
BJM90	43.40	45.23	45.05
YJM90	39.67	43.62	49.11

김치 소스의 첨가 및 살균 조건 별 미생물 수를 조사하였다(표 12). 총균 수에서 살균 전 BJ, YJ는 8 log CFU/mL로 나타났고 BJM과 YJM은 5 log CFU/mL 이하로 추정되었다. 살균 후에 60°C에서 살균한 소스는 3~4 log CFU/mL로 나타났으며 90°C에서 살균한 소스는 총균이 검출되지 않았다. 7일 저장 후에도 BJM90, YJM90은 총균이 검출되지 않았으나 BJ90과 YJ90 소스에서 3~4 log CFU/mL이 검출되었다. 유산균의 경우 살균 전 BJ, YJ는 8 log CFU/mL로 나타났고 BJM과 YJM은 5 log CFU/mL 이하로 추정되었다. 살균 후에 BJ60과 YJ60는 1 log CFU/mL이 검출되었으며 이를 제외한 소스에서는 유산균이 검출되지 않았다. 하지만 7일 저장 후에 BJ90과 YJ90에서 4 log CFU/mL의 유산균이 검출되었다.

표 2-1-2-36. 비건 김치 소스의 미생물 특성

시료	총균수(log CFU/mL)		유산균수(log CFU/mL)	
	살균 0일차	살균 7일차	살균 0일차	살균 7일차
BJ	8		8	
YJ	8		8	
BJM	5 이하 추정		5 이하 추정	
YJM	5 이하 추정		5 이하 추정	
BJ60	4		1	
YJ60	4		1	
BJM60	3		0	
YJM60	3		0	
BJ90	0	4	0	4
YJ90	0	3	0	4
BJM90	0	0	0	0
YJM90	0	0	0	0

표 2-1-2-37. 차후 개선방향

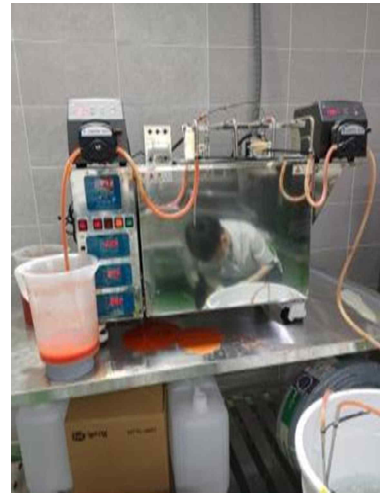
문제 도출	개선 방안
맛과 점도는 양호하나 신맛이 매실5% 추가하였을 시 약하고 10%는 강함	매실을 7.5% 추가하는 것으로 개선
매실을 첨가하지 않았을 시 세균 번식 우려	매실 7.5% 추가하여 항균 효과 기대



막김치 제조 과정



점도 조절 과정



연속 살균 공정

그림 2-1-2-9 막김치 및 비건김치소스 제조 공정 모습

4) 비건 김치 레시피 확립

가) 마늘 향과 맛이 감소된 김치 제조방법 확립(마늘 전처리 방법에 따라)

김치의 향 개선을 위해 마늘의 전처리 방법에 따라 마늘의 특성 및 각 마늘 첨가 김치의 품질특성과 저장특성을 비교 분석하였다.

(1) 연구방법

김치제조 조건은 상기 실험과 동일한 레시피에 마늘의 전처리 조건이 다른 마늘을 첨가하여 김치를 제조하여, 수출용 비건김치의 향기 저감을 위해 검토하였다. 냉동마늘은 마늘은 통으로 냉동하여 일주일 이상 보관하였다 녹여 분쇄하였으며, 익힌 마늘은 전자레인지 1분 가열 처리하였다. 제조한 김치는 각 500g씩 파우치 포장하였으며, 각 김치는 6°C 에서 4일 간격으로 12일간 저장하며 저장주기별로 관능검사용과 이화학분석용으로 사용하였다.



그림 2-1-2-10. 전처리한 마늘의 외관

(나) 분석방법

상기 실험방법과 동일하게 수행하였다.

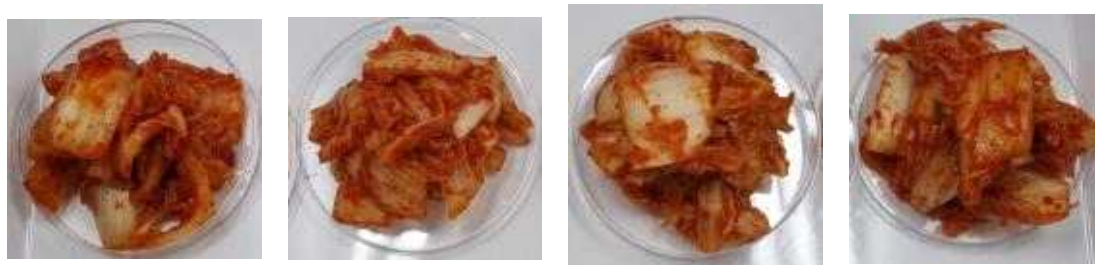
(2) 연구결과

① 이화학 분석결과

마늘 전처리 방법을 달리하여 제조한 김치의 이화학적 특성을 분석한 결과 마늘 첨가 여부, 전처리 여부에 따라 큰 변화는 보이지 않았다. 그러나 동일한 량의 냉동마늘을 첨가한 김치의 경우 당도가 다르게 측정되었음을 확인할 수 있었다. 마늘 전처리 조건을 달리하여 제조한 김치들의 숙성 단계별 pH를 측정 비교한 결과 마늘의 전처리가 김치의 숙성에 미치는 영향은 없는 것으로 판단되었다. 이는 산도 측정 결과에서도 동일하게 측정되었다.

② 미생물 분석 결과

마늘 전처리 조건을 달리하여 제조한 김치의 젖산균 변화를 측정한 결과, 생마늘을 첨가한 김치의 젖산균이 숙성 이후 1log정도 많은 것으로 측정되었으며, 이는 12일 저장기간 동안 유지되었다. 이는 마늘 무첨가군과 동일한 패턴으로 마늘의 익힘과 냉동 처리한 경우 젖산균의 수가 생마늘을 첨가한 것보다 적다는 것으로, 마늘이 김치 젖산균과 관계 있음을 확인하였다. 그러나 김치의 발효를 억제시키는 것은 아닌 것으로 판단된다. 이는 미생물 균집분석을 통해 단순한 수의 차이인지 균총의 차이가 있는지 분석해 보고자 한다.



생마늘 (Con)

마늘 무 첨가

익힌 마늘

냉동 마늘

그림 2-1-2-11. 전처리한 마늘의 외관

표 2-1-2-38. 마늘 처리군별 제조 김치의 염도 당도

	염도(%)	당도 (Brix)
생마늘	1.60±0.05	11.27±0.15b
마늘무첨가	1.78±0.02	11.70±0.00a
익힌마늘	1.71±0.04	11.70±0.00a
냉동마늘	1.76±0.02	10.90±0.00c

표 2-1-2-39. 마늘 처리군별 제조 김치의 pH

	0일차	4일차	8일차	12일차
생마늘	5.54±0.08	5.61±0.02	4.47±0.02	4.12±0.03
마늘무첨가	5.44±0.01	5.47±0.01	4.45±0.03	4.12±0.01
익힌마늘	5.50±0.01	5.47±0.02	4.41±0.01	4.24±0.01
냉동마늘	5.59±0.01	5.63±0.03	4.54±0.03	4.20±0.01

표 2-1-2-40. 마늘 처리군별 제조 김치의 산도

(%)	0일차	4일차	8일차	12일차
생마늘	0.31±0.00	0.34±0.01	0.76±0.00	1.11±0.00
마늘무첨가	0.34±0.01	0.35±0.00	0.74±0.00	1.06±0.00
익힌마늘	0.34±0.03	0.35±0.01	0.79±0.02	1.06±0.03
냉동마늘	0.3±0.02	0.33±0.01	0.64±0.01	1.02±0.00

표 2-1-2-41. 마늘 처리군별 제조 김치의 젖산균

(log/cfu)	0일차	4일차	8일차	12일차
생마늘	4.43±0.06	6.37±0.05	8.33±0.03	8.17±0.03
마늘무첨가	4.03±0.14	5.36±0.08	7.35±0.07	7.43±0.05
익힌마늘	3.97±0.04	5.67±0.02	7.40±0.13	7.48±0.01
냉동마늘	3.76±0.08	5.18±0.04	7.66±0.04	7.65±0.08

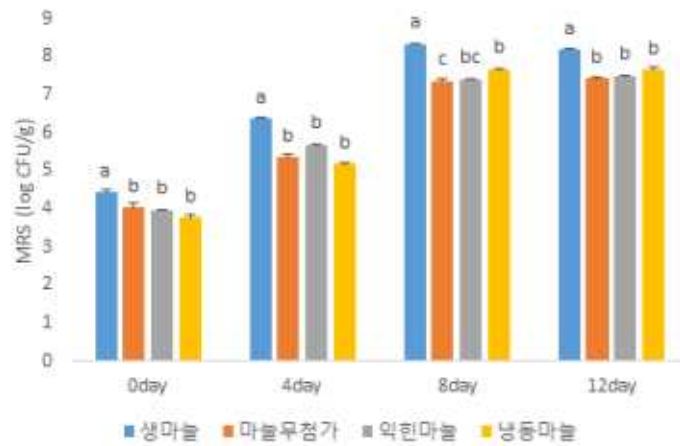


그림 2-1-2-12. 마늘 처리군별 제조 김치의 젖산균

③ 관능검사 결과

관능검사 결과, 김치 제조당일 마늘향에 대한 강도는 냉동마늘 > 생마늘 > 익힌마늘 > 마늘무첨가로 순으로 나타났으며, 이취는 냉동마늘이 가장 높은 5.4점으로 평가되었다. 냄새기호도에서는 생마늘 > 익힌마늘 > 마늘무첨가 > 냉동마늘 순으로 평가되었다. 외관은 냉동 마늘 첨가김치를 제외하고는 모두 6점 이상으로 평가되었다. 알싸한 맛의 강도는 생마늘이 5.87점, 냉동마늘 5.5점, 익힌마늘 4점, 마늘 무첨가는 3.4점으로 평가되었다. 냉동마늘의 경우 이취에는 영향이 있으나 알싸한 맛에는 영향이 없는 것으로 분석되었다. 단맛의 강도는 익힌마늘이 가장 높게, 생마늘 첨가군이 가장 낮게 평가되었다. 감칠맛은 익힌 마늘에서 가장 높은 4.87점으로 평가되었다. 맛 기호도는 냉동마늘만 4.53점으로 낮게 평가되었으며 모두 5점 이상으로 평가되었다. 종합적 기호도 또한, 냉동마늘을 제외하고는 모두 5점 이상으로 평가되었다. 전반적 기호도는 4일차에 마늘무첨가, 익힌마늘이 유사하게 평가되었으며, 마늘향의 강도는 냉동마늘, 생마늘이 높게 평가되었다. 알싸한 맛의 강도는 생마늘 6.27, 냉동마늘 5.93, 익힌 마늘은 5.07점으로 평가되었다. 맛기호도는 익힌마늘이 가장 높게 평가되었다.

저장 8일차에서는 마늘향에서는 유의적 차이가 없었으나, 알싸한 맛에서는 생마늘 > 냉동 마늘 > 마늘무첨가 > 익힌 마늘의 순으로 평가되었다. 맛 기호도는 익힌마늘이 가장 높게 평가되었으며, 마늘무첨가, 냉동마늘, 생마늘 순으로 평가되었다. 저장 12일차에서도 생마늘 김치는 마늘향은 5.4점으로 줄었으나 생마늘보다 냉동마늘의 마늘향이 5.8로 평가되어 잔재함을 할 수 있었다. 그 반면 익힌 마늘 첨가 김치는 마늘 무첨가군과 유의적으로 같았다. 냄새기호도는 익힌마늘

첨가 김치가 제일 높게 평가되었다. 알싸한 맛도 냉동마늘 > 생마늘 > 마늘무첨가 > 익힌마늘 순으로 평가되었다.

④ 향미성분 분석 결과

GC/MS를 이용하여 마늘의 전처리방법을 달리한 4종 적용 김치 즉, 생마늘 김치, 마늘무첨가 김치, 익힌마늘 김치, 냉동마늘 김치의 발효에 따른 휘발성 물질을 분석한 결과, 제조 당일에는 냉동마늘과 생마늘이 유사군으로, 익힌마늘 첨가군은 두 개 시료와 분리되었다. 숙성되어 지면서 마늘관련향은 생마늘은 감소하였으나 냉동마늘 첨가 김치는 그 마늘향이 강하여 측정되었다. 생마늘은 숙성 12일차에 익힌마늘과 유사하게 향미패턴이 변한 것을 확인할 수 있었다.

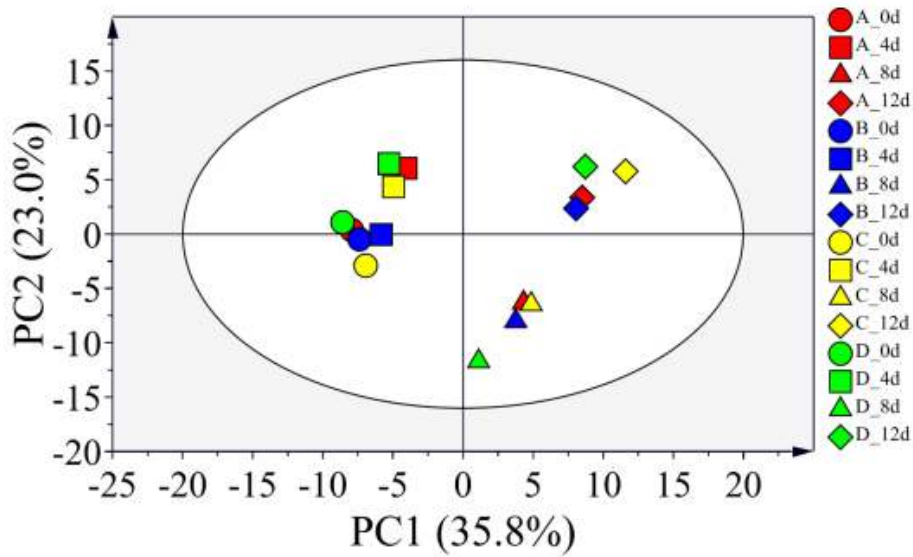
표 2-1-2-42. 관능검사 결과

0일차		생마늘	마늘무침가	익힌 마늘	냉동 마늘
냄새	마늘향	6.20±1.01	3.60±1.64	4.33±1.54	6.53±1.88
	이취	3.13±1.64	3.67±2.16	3.73±1.87	5.40±2.13
	냄새기호도	5.93±1.28	4.93±1.39	5.40±1.35	4.27±1.49
외관 기호도		6.40±0.99	6.20±0.94	6.07±1.16	5.80±1.26
맛	알싸한맛	5.87±1.51	3.40±1.18	4.00±1.81	5.53±1.81
	매운맛	4.60±1.06	4.27±1.53	4.60±1.40	4.47±1.46
	단맛	4.87±1.41	5.67±1.29	5.80±1.42	5.73±1.33
	신맛	2.13±1.55	1.67±0.82	1.73±0.88	2.00±1.13
	감칠맛	4.67±1.18	4.53±1.13	4.87±1.51	4.73±1.44
	이미	3.07±1.94	3.53±1.68	3.27±1.33	4.80±1.70
	맛기호도	5.13±1.55	5.13±1.55	5.20±1.37	4.53±1.51
조직감(아삭한정도)		5.93±1.33	5.60±1.18	5.53±1.30	5.93±1.10
종합적 기호도		5.33±1.59	5.27±1.62	5.07±1.16	4.33±1.54

4일차		생마늘	마늘무침가	익힌 마늘	냉동 마늘
냄새	마늘향	5.47±1.73	3.53±1.55	3.67±1.05	5.67±1.72
	이취	3.87±1.77	4.27±1.94	3.73±1.44	4.53±1.68
	냄새기호도	5.00±1.60	4.87±1.36	5.13±1.25	5.07±1.33
외관 기호도		5.87±1.25	5.53±0.99	5.53±1.06	6.00±1.00
맛	알싸한맛	6.27±1.10	4.60±1.72	5.07±1.75	5.93±1.58
	매운맛	4.40±1.64	3.93±1.67	4.13±1.60	4.67±1.50
	단맛	4.73±1.75	4.20±1.26	4.80±1.42	4.47±1.19
	신맛	2.93±1.16	2.80±1.01	2.93±0.96	2.87±0.99
	감칠맛	4.13±1.51	4.40±1.18	4.00±1.77	4.07±1.33
	이미	5.27±1.75	4.47±1.19	5.13±1.73	5.27±1.62
	맛기호도	3.73±1.22	4.33±1.05	4.40±1.72	3.87±1.36
조직감(아삭한정도)		5.20±1.37	5.53±1.19	5.13±1.06	5.00±1.00
종합적 기호도		3.73±0.88	4.27±1.16	4.20±1.66	4.13±1.25

8일차		생마늘	마늘무침가	익힌 마늘	냉동 마늘
냄새	마늘향	4.80±1.61	4.67±1.63	5.07±1.75	4.73±1.71
	이취	4.67±1.40	5.40±1.50	4.60±1.12	4.53±2.03
	냄새기호도	5.87±1.30	6.40±1.06	5.93±1.03	6.40±0.83
외관 기호도		5.87±1.30	6.40±1.06	5.93±1.03	6.40±0.83
맛	알싸한맛	5.67±1.23	5.20±1.57	5.00±1.73	5.33±1.50
	매운맛	4.20±1.15	4.27±1.58	4.07±0.96	4.33±1.40
	단맛	4.87±1.30	4.87±1.25	4.93±1.39	5.40±1.59
	신맛	5.07±1.87	5.40±1.50	4.80±1.82	4.60±1.59
	감칠맛	4.40±1.12	4.67±1.23	4.47±1.25	4.53±1.64
	이미	6.00±1.73	5.47±1.30	5.60±1.59	5.13±1.92
	맛기호도	3.73±1.53	4.47±1.25	4.53±1.36	4.20±1.97
조직감(아삭한정도)		5.00±1.07	5.40±1.12	5.20±1.15	5.40±1.12
종합적 기호도		3.73±1.53	4.60±1.30	4.47±1.13	4.20±1.90

12일차		생마늘	마늘무침가	익힌 마늘	냉동 마늘
냄새	마늘향	5.40±1.30	4.33±1.50	4.87±1.46	5.87±1.60
	이취	4.73±1.67	4.73±2.02	4.40±1.35	4.47±1.77
	냄새기호도	4.60±1.50	4.67±1.63	5.00±1.36	4.60±2.06
외관 기호도		6.00±1.13	6.13±0.99	5.67±1.11	5.47±1.36
맛	알싸한맛	5.27±1.22	4.87±1.73	4.80±1.42	5.93±1.87
	매운맛	4.67±1.23	4.00±1.56	4.20±1.26	4.53±1.60
	단맛	4.40±1.18	4.33±1.05	4.73±1.33	4.40±1.40
	신맛	5.73±1.62	5.87±1.13	6.20±1.32	6.27±1.62
	감칠맛	4.80±1.52	4.47±1.30	4.80±1.47	4.67±1.45
	이미	4.60±2.03	5.53±1.73	4.73±1.49	4.73±1.75
	맛기호도	4.87±2.13	4.33±1.76	4.60±1.55	4.27±1.62
조직감(아삭한정도)		5.20±1.32	5.07±1.22	5.07±1.10	4.93±1.22
종합적 기호도		5.07±1.67	4.20±1.57	4.47±1.68	4.20±1.61



PCA ($R^2X = 0.589$, $Q^2 = 0.395$)

그림 2-1-2-13. 전체와 발효 기간별 PCA 분석 결과

⑤ 유리당 유기산 분석 결과

전처리 방법을 달리한 마늘의 유리당 성분을 분석한 결과 Sucrose 량은 냉동마늘이 8432mg/L로 가장 낮게 측정되었으며, 열처리마늘은 16200mg/L로 가장 높게 측정되었다. 반면, Glucose 함량은 열처리마늘이 가장 낮았으며, Fructose 함량은 냉동마늘이 가장 높게 분석되었다. 유기산 gkafidd은 malic acid는 생마늘 > 냉동마늘 > 익힌마늘 순으로 나타났으며, 이는 김치에서도 유사한 결과가 나타났다. Acetic acid 함량은 익힌마늘이 생마늘과 냉동마늘의 50% 정도만 존재하는 것으로 나타났으며, 열처리마늘이 Lactic acid가 제일 높게 측정되었다.

전처리를 달리한 마늘을 첨가한 김치의 유리당 유기산을 분석한 결과를 표에 나타내었다. Sucrose의 함량은 제조당일 마늘 무첨가, 생마늘, 냉동마늘 기미 순이었으나, 열처리마늘은 8일차까지 Sucrose 함량과 glucose 함량의 변화가 크지 않아 발효가 지연된 것으로 판단된다. 또한 mannitol 함량도 8일차까지는 증가하지 않고 12일이차에서 그 함량이 증가됨을 확인하였다. 이는 마늘이 김치 발효와 관련된 유산균과 관계 있다는 보고와 일치하였으며, 숙성 지연의 효과도 있는 것으로 확인된다. 유기산 분석 결과, 유리당에서 보였던 발효지표물질의 변화처럼 lactic acid와 acetic acid의 함량이 극명히 차이를 보였으며, 12일 차에나 다른 처리군과 유사한 함량으로 회복되었다. 발효초기에만 존재하던 malic acid의 함량은 생마늘과 마늘 무첨가군에서는 8일차에 거의 소멸한 것으로 측정되었으나, 익힌마늘과 냉동마늘 첨가군은 그 함량이 높았으며, 12일차에 함량이 측정되지 않았다.

마늘의 전처리가 김치의 발효에 미치는 영향을 확인할 수 있었으며, 이 특성을 잘 활용한다면 숙성지연의 효과도 있을 것으로 기대된다.

표 2-1-2-43. 마늘 김치 유리당 분석 결과

(mg/L)		Sucrose	Glucose	Fructose	Mannitol	Sorbitol
0일차	생마늘	8545.10	21449.76	21836.36	244.94	107.08
	마늘 무첨가	8692.42	19859.62	21313.02	319.99	180.79
	열처리마늘	7387.50	16928.62	17829.81	218.21	108.44
	냉동마늘	7886.96	18136.04	19142.59	272.64	204.54
8일차	생마늘	775.94	17250.61	15435.18	9480.00	127.78
	마늘 무첨가	673.21	16133.01	14857.06	8892.81	145.89
	열처리마늘	7614.03	17106.98	18691.48	239.90	160.42
	냉동마늘	397.28	13401.81	13996.46	5652.28	114.09
12일차	생마늘	731.21	11816.82	3352.05	19410.57	155.10
	마늘 무첨가	693.47	11816.66	2778.58	18424.70	187.55
	열처리마늘	546.66	10469.48	2445.05	17346.85	164.69
	냉동마늘	530.27	10232.39	2789.07	15748.56	149.72

표 2-1-2-44. 마늘 김치 유기산 분석 결과

(mg/L)		Citric acid	Malic acid	Fumaric acid	Lactic acid	Acetic acid
0일차	생마늘	1254.78	2587.51	23.71	130.73	79.31
	마늘 무첨가	1227.15	2510.97	23.59	174.97	105.83
	열처리마늘	1224.36	2506.30	23.35	132.76	83.18
	냉동마늘	1358.95	2790.63	24.71	138.85	89.08
8일차	생마늘	32.49	911.55	24.06	3491.94	2228.02
	마늘 무첨가	39.27	995.34	19.99	3171.43	2145.72
	열처리마늘	1268.27	2513.63	23.51	129.12	84.90
	냉동마늘	134.51	1114.88	23.77	2952.14	1768.73
12일차	생마늘	ND	ND	21.10	4575.29	3728.16
	마늘 무첨가	ND	ND	18.12	4269.42	3676.78
	열처리마늘	ND	ND	20.15	4580.12	3827.77
	냉동마늘	ND	ND	22.54	4293.33	2812.33

표 2-1-2-44. 마늘 김치 유리당 분석 결과

(mg/L)	Sucrose	Glucose	Fructose	Mannitol	Sorbitol
생마늘	12000.61	14459.54	19917.09	ND	ND
열처리마늘	16200.72	8707.43	18156.11	ND	ND
냉동마늘	8432.57	10561.55	24697.68	ND	ND

표 2-1-2-45. 마늘 김치 유기산 분석 결과

(mg/L)	Citric acid	Malic acid	Fumaric acid	Lactic acid	Acetic acid
생마늘	685.18	62.43	10451.24	1656.34	36.60
열처리마늘	846.65	35.25	10557.14	2158.90	16.12
냉동마늘	197.90	52.39	8740.45	1905.02	38.59

나) 비건김치 감칠맛 개선을 위한 절임방법 개선

비건김치의 아쉬운 점인 감칠맛을 개선하기 위해 절임수에 NaCl과 MSG 혼합용액에 절인 배추에 젓갈을 빼고 HVP를 포함한 양념을 혼합하여 제조한 비건김치 조성물을 배합하여 절임수로 활용하고자 검토하였다.

(1) 연구방법

(가) 김치제조방법

감칠맛 개선을 위한 절임 처리군은 NaCl 25%(w/w), NaCl 25%+MSG 1%, NaCl 25%+MSG 5%, NaCl 25%+MSG 10%로 구성하여 절임시간을 10분과 15분으로 구분하여 실험하였다. 상기 조건으로 제조한 절임배추에 젓갈첨가 김치와 젓갈 무첨가김치를 제조하여 숙성중 맛의 변화를 관능검사와 분석을 통해 비교 평가하였다. 김치제조 레시피는 기존 실험과 동일하게 제조하였으며, 제조한 김치는 각 500g씩 파우치 포장하였으며, 각 김치는 6°C에서 4일 간격으로 2주간 저장주기별로 관능검사용과 이화학분석용으로 사용하였다.

(나) 분석방법

상기 실험방법과 동일하게 수행하였다.

(2) 연구결과

① 이화학 분석결과

절임염수에 MSG의 첨가는 절임배추의 염도에는 영향을 주지 않는 것으로 평가되었으며, 상기 조건에 따라 절여진 절임배추로 김치를 제조한 결과 염도는 2.3 이상이었으며 당도는 젓갈 첨가 김치와 HVP 첨가 김치가 높게 측정되었다. 고염 단시간 절임방법으로 절임한 절임배추의 경우도 일반 절임으로 제조한 절임배추로 제조한 김치와 숙성 속도가 유사하였으며, 이는 pH와 산도 측정결과로 확인할 수 있었다.



NaCl 25% + 15분 절임 배추



NaCl 25% + MSG0.75% + 15분 절임 배추

그림 2-1-2-14. 절임배추 외관

표 2-1-2-46. 절임배추의 염도

	NaCl 25% + 15분 절인 배추	NaCl 25% + MSG0.75%+ 15분 절인 배추
염도	2.52%	2.63%

표 2-1-2-47. 절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치 특성

	일반젓갈김치 (대조구)	무젓갈김치 (부대조구)	NaCl 25% +MSG(0.75,15분)+ 젓갈 뺀 양념	NaCl 25% +MSG(0.75,15분)+ 젓갈 빼고 HVP
염도(%)	2.30±0.04	2.36±0.03	2.52±0.02	2.47±0.01
당도(Brix %)	8.70±0.0	9.10±0.0	10.00±0.20	9.77±0.06

표 2-1-2-48. 절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치 pH

	일반젓갈김치	무젓갈김치	NaCl 25%+MSG (0.75% 15분)+젓갈뺀 양념	NaCl 25%+MSG (0.75% 15분)+젓갈 빼고 HVP
0day	5.58±0.04	5.55±0.03	5.51±0.01	5.52±0.01
4day	5.68±0.0	5.61±0.04	5.66±0.03	5.7±0.01
8day	4.42±0.02	4.56±0.02	4.53±0.02	4.58±0.01
12day	4.06±0.01	4.07±0.02	4.09±0.02	4.12±0.02

표 2-1-2-49. 절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치 산도

	일반젓갈김치	무젓갈김치	NaCl 25%+MSG (0.75% 15분)+젓갈뺀 양념	NaCl 25%+MSG (0.75% 15분)+젓갈 빼고 HVP
0day	0.24±0.01	0.24±0.0	0.22±0.0	0.24±0.0
4day	0.27±0.0	0.27±0.01	0.26±0.0	0.27±0.01
8day	0.62±0.02	0.55±0.01	0.53±0.02	0.55±0.01
12day	0.91±0.02	0.86±0.01	0.81±0.01	0.82±0.01

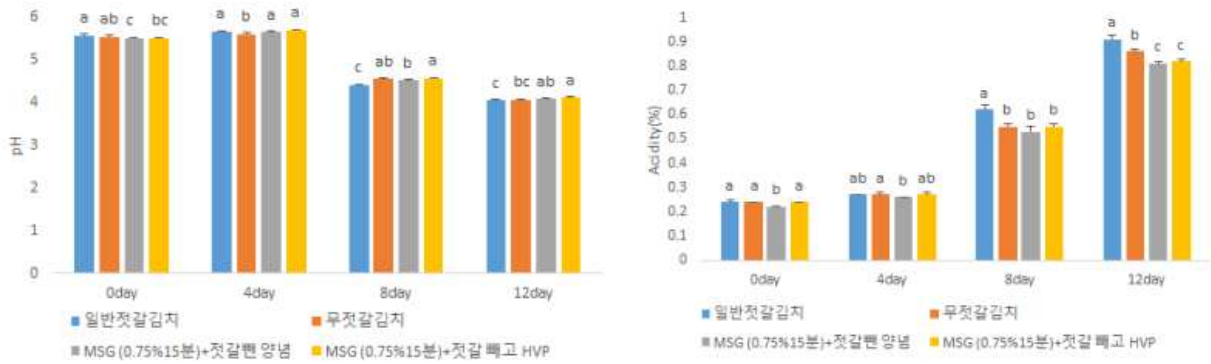


그림 2-1-2-15. 절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치 저장중 젖산균

② 미생물 분석 결과

절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치의 저장중 젖산균의 변화는 절임조건을 달리한 김치는 젓갈 무첨가군과 젖산균 변화가 유사하였으며, 일반 젖산균이 저장 4일차에 1log정도 젖산균이 높게 확인되었다.

표 2-1-2-50. 절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치 젖산균

	일반젓갈김치	무젓갈김치	NaCl 25%+MSG (0.75% 15분)+젓갈뺀 양념	NaCl 25%+MSG (0.75% 15분)+젓갈 빼고 HVP
0day	5.97±0.05	5.91±0.06	5.98±0.07	6.01±0.08
4day	7.2±0.03	6.71±0.01	6.71±0.18	6.59±0.13
8day	8.62±0.14	8.69±0.03	8.58±0.18	8.88±0.13
12day	8.68±0.04	8.9±0.01	8.91±0.03	9.07±0.04

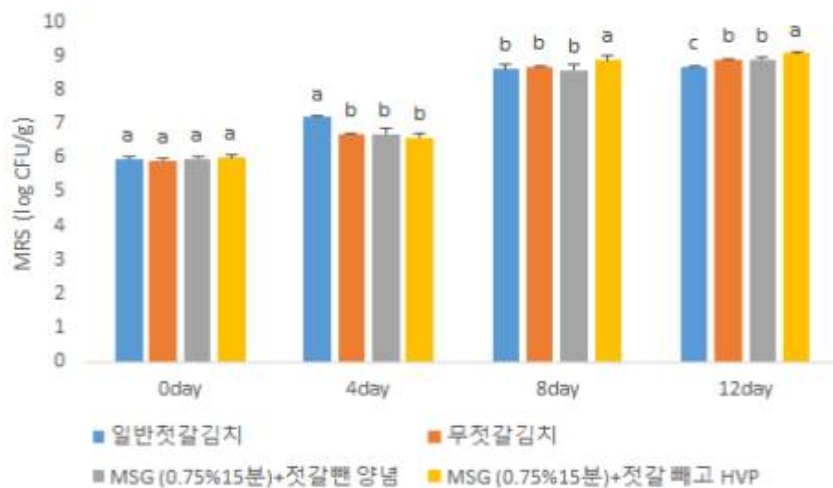


그림 2-1-2-16. 절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치 저장중 젖산균

③ 관능검사 결과

절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치의 관능검사 결과 제조 당일에는 냄새기호도 평가

결과 일반 절임 방식으로 제조한 김치가 제일 낮게 평가되었으며, Nacl25%+MSG0.75%+젓갈 뺀 양념으로 제조한 김치가 기호도가 제일 높게 평가되었다. 맛 조화도에서도 냄새 기호도가 좋게 평가된 것이 맛 조화도도 높게 평가되었다. 이는 맛 기호도에서도 동일하였다. 저장 4일차에는 냄새기호도에서 Nacl25% +MSG0.75%+무젓갈HVP양념 > Nacl25%+MSG0.75%+젓갈 뺀 양념 > 젓갈무첨가 김치 > 일반절임 김치 순으로 평가되었다. 맛조화도 평가에서는 젓갈무첨가김치 > Nacl25%+MSG0.75%+무젓갈HVP양념 > 일반절임 김치 > Nacl25%+MSG0.75%+젓갈 뺀 양념 김치 순으로 평가되었다. 상기 순서는 종합적 기호도와 맛 기호도에서도 동일한 순으로 평가됨은 확인하였다. 저장 8일차에 진행한 관능검사에서는 종합적 기호도에서 젓갈무첨가김치 > Nacl25% +MSG0.75%+무젓갈HVP양념 > Nacl25%+MSG 0.75%+젓갈 뺀 양념 김치 > 일반절임 김치 순으로 평가되어 일반절임김치의 기호도가 제일 낮게 평가되었다. 저장 12일차에는 냄새 기호도, 맛 조화도, 맛기호도, 종합적 기호도 모두 일반절임 젓갈김치가 제일 낮게 평가되었으며, 냄새기호도는 Nacl25%+MSG0.75%+무젓갈HVP양념과 Nacl25%+MSG 0.75%+젓갈 뺀 양념으로 제조한 김치가 제일 높게 평가되었다.

표 2-1-2-51. 절임조건을 달리한 절임배추로 제조한 김치 관능검사 결과

0일차		일반젓갈김치	무젓갈김치	NaCl25% +MSG0.75% +젓갈 뺀 양념	NaCl25% +MSG0.75% +무젓갈HVP양념
냄새 기호도		3.53±1.55	4.73±1.16	4.8±0.94	4.4±1.12
외관 기호도		3.87±1.25	4.2±1.15	4.0±1.2	3.93±1.28
맛	짠맛	3.53±1.36	3.6±1.18	3.8±1.61	2.8±1.08
	감칠맛	3.47±1.19	3.47±0.83	3.8±1.01	3.8±1.15
	단맛	3.87±1.13	4.07±0.7	3.87±1.19	3.73±1.1
	이미	3.33±0.82	4.07±0.88	4.0±1.36	3.73±1.03
	맛 조화도	3.47±1.06	3.87±0.99	4.0±1.31	3.47±0.99
	맛 기호도	3.47±0.99	3.67±1.11	3.8±1.37	3.33±1.18
조직감 아삭한 정도		4.93±0.96	4.6±0.91	4.87±0.99	4.47±0.99
종합적 기호도		3.4±0.99	3.87±0.92	3.87±1.19	3.27±1.22

4일차		일반젓갈김치	무젓갈김치	NaCl25% +MSG0.75% +젓갈 뺀 양념	NaCl25% +MSG0.75% +무젓갈HVP양념
냄새 기호도		3.67±1.18	4.07±1.16	4.33±1.05	4.8±0.94
외관 기호도		4.0±0.76	4.0±0.85	4.2±0.86	4.2±1.01
맛	짠맛	3.53±1.19	3.67±1.05	2.73±0.88	3.2±1.32
	감칠맛	3.8±0.86	4.0±0.93	3.53±0.99	3.92±0.12
	단맛	3.87±0.99	4.13±0.99	3.67±1.11	3.87±0.83
	이미	3.47±1.13	3.67±1.29	3.2±1.01	3.93±1.22
	맛 조화도	3.4±1.35	3.8±1.08	3.07±1.44	3.73±1.53
	맛 기호도	3.07±1.16	3.8±0.86	2.93±1.16	3.53±1.41
조직감 아삭한 정도		4.4±0.99	4.27±1.03	4.33±1.11	4.2±0.94
종합적 기호도		3.2±1.21	4.07±1.16	3.07±1.28	3.6±1.55

8일차		일반젓갈김치	무젓갈김치	NaCl25% +MSG0.75% +젓갈 뺀 양념	NaCl25% +MSG0.75% +무젓갈HVP양념
냄새 기호도		2.8±1.01	4.8±1.08	4.4±1.18	4.4±1.12
외관 기호도		4.33±1.18	5.07±0.8	4.33±1.23	4.53±1.13
맛	짠맛	3.07±0.96	3.47±1.13	3.2±1.32	3.6±1.18
	감칠맛	3.47±1.13	3.87±0.83	4.33±1.29	4.27±0.88
	단맛	3.73±0.8	3.93±0.8	4.13±1.25	4.2±1.21
	이미	3.0±1.13	3.67±1.11	3.93±1.16	4.07±1.22
	맛 조화도	3.07±1.03	3.87±1.06	3.8±1.42	4.0±1.69
	맛 기호도	2.8±1.01	3.73±1.16	3.67±1.35	3.73±1.49
조직감 아삭한 정도		4.4±0.91	4.73±0.8	4.27±1.16	4.33±1.23
종합적 기호도		2.8±0.94	4.0±1.2	3.53±1.25	3.73±1.49

12일차		일반젓갈김치	무젓갈김치	NaCl25% +MSG0.75% +젓갈 뺀 양념	NaCl25% +MSG0.75% +무젓갈HVP양념
냄새 기호도		3.69±1.45	4.44±1.31	4.81±1.17	4.81±1.17
외관 기호도		4.31±1.08	4.63±1.2	4.56±1.03	4.44±1.26
맛	짠맛	3.69±1.54	3.44±1.09	3.13±1.41	3.25±1.24
	감칠맛	3.75±1.06	4.06±1.18	3.88±1.26	3.81±0.98
	단맛	3.94±0.93	4.0±0.89	3.81±1.05	4.0±0.82
	이미	2.94±1.29	3.5±0.97	3.94±1.24	3.63±1.02
	맛 조화도	3.31±1.35	3.81±1.05	3.81±1.52	3.69±1.45
	맛 기호도	3.25±1.24	3.81±1.05	3.56±1.46	3.5±1.41
조직감 아삭한 정도		4.25±1.06	4.63±1.15	4.81±0.98	4.69±0.79
종합적 기호도		3.13±1.41	3.81±1.05	3.56±1.41	3.5±1.32

다) 비건 수출용 김치 숙성기한 연장 소재 선발

(1) 연구방법

(가) 실험방법

① 추출물 제조 :

실험에 사용한 천연소재는 흐르는 물에 세척 한 다음 자연 건조를 한 후, 천연소재를 각각 증류수와 1:10의 중량 %비로 혼합하여 121°C에서 15분 1차 추출한 후, 100°C 4시간 2차 추출하였고, 얻어진 용액을 여과 후 열수 추출물을 제조하였다. 에탄올 추출물은 열수 추출물과 동일 비율로 70% 주정으로 24시간 진탕 추출하여 여과 후 에탄올 추출물을 제조하였다. 소재 HW의 추출 조건은 추출물 7 brix가 되도록 하였다.

② 항균성 실험

천연소재들의 항균성 실험은 disc method를 이용하였다. 김치 발효단계별 대표균주를 *Leuconostoc mesenteroides* (MGB0002), *Lactobacillus sakei* (MGB0008), *Weissella koreensis* (MGB0009)와 골마지 원인균으로 알려진 *Kazachstania servazzii* (MGB0660), *Kazachstania servazzii* (MGB0659), *Candida sake* (MGB1001)를 MRS 배지 등에 접종하여 균힌 후, 각 10% 추출물을 희석하여 추출물을 포화시킨 멸균액 6mm paper disk를 평판배지에 놓고 35°C에서 24시간 배양시킨 다음 disk 주변의 clear zone의 직경을 측정하여 항균력을 시험하였다. 대조군으로 자몽종자추출물 200ppm을 사용하여 비교하였다.

③ 천연소재 추출물 처리에 의한 김치 발효 억제 효과

절임 배추와 양념을 7.5:2.5의 중량 %비로 혼합하여 김치를 제조시, 김치 양념에 육수 대체로 10% 열수 추출물을 김치 총량의 2.5%, 5.0%, 10.0% 첨가하여 6°C에서 3일 간격으로 이화학적 평가와 미생물학적 평가, 관능적 평가를 수행하였다.

④ 천연소재 추출물 분사 표면처리에 의한 김치 골마지 억제 효과

절임 배추와 양념을 7.5 : 2.5의 중량 %비로 혼합하여 제조한 김치를 플라스틱 용기에 100g씩 소분 후, 용기 김치 표면에 2회, 3회 분사하였다. 혼합 처리군과 비교하기 위해 절임 배추와 양념을 7.5:2.5의 중량 %비로 혼합하여 김치를 제조시, 김치 양념에 육수 대체로 10% 열수 추출물을 김치 총량의 5.0%, 7.0% 첨가 제조하였다. 실온에서 24시간 방치한 후, 20°C에서 보관하며 골마지 생성 여부를 확인하였다.

표. HW 7가지 처리군

	김치에 혼합	표면 분사
con	N	N
HW 7	김치무게 7%	분사 3회
HW 5	김치무게 5%	분사 2회

(2) 연구결과

① 항균성 실험 결과 HW

HW추출물 제조조건은 추출시간과 추출온도에 따른 보고를 참고로 추출시간을 선정하였으며, 80℃에서 추출하는 것보다 100℃, 121℃ 추출시 HW의 유효성분인 0000의 함량이 높은 것으로 보고되었기에, 121℃에서 15분 추출 후 100℃에서 2차 4시간 추출하는 조건을 확립하였다. 그러나 100℃에서 6시간 추출한 시료의 경우도 동일한 항균성을 갖는 것으로 확인되었다. HW의 주요 유효 성분은 플라보노이드류인 000,000000,00000,0000와 000000으로 알려져 있으며, HW의 생약재로서의 규격은 전조물에 대하여 0000, 0000 및 0000의 합이 10 이상을 함유해야 한다. 그러나 식물체에 함유된 일정 성분의 정량하는 방법은 시료를 목적하는 물질별 추출조건과 전처리 과정 중 손실의 우려가 높기에 생산을 위한 추출물에 대한 기준을 7 brix로 정하고 추출물을 제조하였다.

② 항균성 실험 결과

천연소재들의 항균성 실험은 disc method로 수행한 결과 천연소재 15종 중 HW 추정 추출물과 열수 추출물이 김치 발표단계별 대표 유산균들과 골마지 균주들에 대해 항균력을 보였다. 자몽종 자추출물을 대조군으로 비교한 결과, 김치 골마지 유래 균에 대해 모두 저해능을 보이지 못한 대조군에 비해 HW추출물은 열수와 에탄올추출물에서 모두 저해능을 확인할 수 있었다.

표 2-1-2-52. 항균성 실험 결과

	자몽종자추출물 2000ppm	HW열수추출물	HW에탄올추출물
<i>Latilactobacillus sakei</i>	10	10	12
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	12	10	10
<i>Weissella koreensis</i>	12	11	12
<i>Kazachstania servazzii</i>	×	18	12
<i>Pichia kudriavzevii</i>	12	11	12
<i>Candida sake</i>	×	15	10

표 2-1-2-53.. HW열수추출물 항균성 실험 결과

	HW열수추출물			
	10% 추출물 원액	1/2희석	1/4 희석	1/8 희석
<i>Latilactobacillus sakei</i>	+++	++	+	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+++	++	+	-
<i>Weissella koreensis</i>	++	+	+	-
<i>Kazachstania servazzii</i>	+++++	++	-	-
<i>Pichia kudriavzevii</i>	+++	++	+	-
<i>Candida sake</i>	+++++	++++	+++	-

HW열수추출물 희석액 항균성 실험결과 10% 추출물을 1/4희석액에서도 항균력을 확인할 수 있었으나, 골마지균 *Kazachstania servazzii*에 대한 억제능은 1/2 희석액에서 확인되었다.

③ 천연소재 추출물 처리에 의한 김치 발효 억제 효과

김치발효 단계별 대표 균주와 골마지 원인 균주 3종에 대한 항균력이 검증된 HW추출물의 김치에 대한 숙성지연 효과를 검증하기 위하여 김치의 숙성 지표인 pH와 산도의 변화를 측정 한 결과 무처리군과 차이가 확인되었다.

HW열수추출물을 육수 대체로 첨가 제조한 김치(김치 제조 당일 pH는 5.8)를 6°C에서 30일간 저장 실험한 결과, 10% 첨가 김치는 pH 5.38, 5% 첨가 김치는 pH 4.88, 2.5% 첨가 김치는 pH 4.18로 무처리군 김치의 pH 4.02보다 높게 유지됨을 확인하였다.

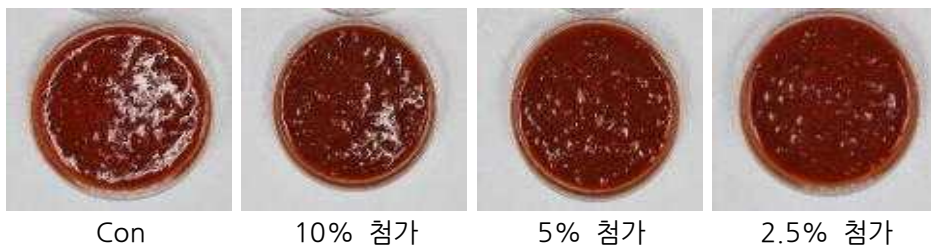


그림 2-1-2-17. HW 첨가 양념 외관

표 2-1-2-54. 열수추출물 첨가 양념 색도 결과

Sample	Con	10% 첨가	5% 첨가	2.5% 첨가
L	25.76±0.10	24.41±0.16	24.62±0.04	24.68±0.21
a	19.65±0.08	16.10±0.17	16.68±0.25	17.40±0.24
b	13.47±0.11	12.13±0.07	12.36±0.05	12.55±0.11

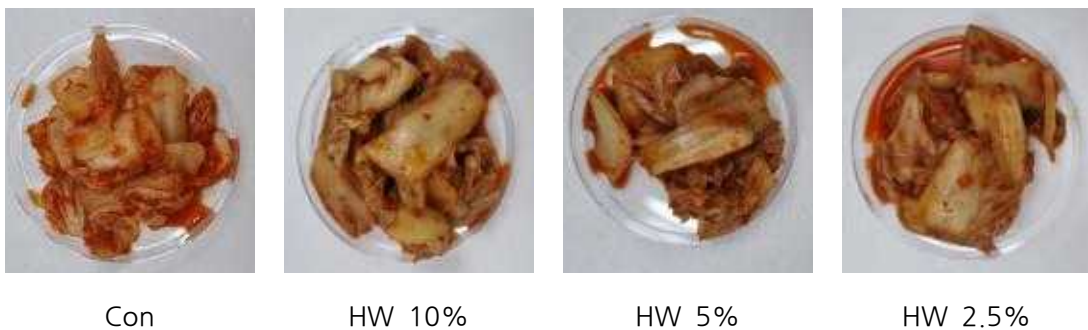


그림 2-1-2-18. HW 첨가 양념 외관

표 2-1-2-55. HW 첨가 김치 염도와 당도

	Con	HW 10%	HW 5%	HW 2.5%
염도 (%)	1.53±0.03	1.61±0.01	1.51±0.01	1.49±0.01
Brix (%)	6.93±0.12	7.23±0.06	7.20±0.00	6.53±0.12

표 2-1-2-56. HW 첨가 김치 pH, 산도 결과

Sample		A	B	C	D
		Con	HW 10%	HW 5%	HW 2.5%
pH	0day	5.80±0.00	5.80±0.00	5.83±0.06	5.80±0.00
	4day	6.03±0.02	5.91±0.01	5.94±0.02	5.97±0.01
	8day	4.65±0.03	6.12±0.14	5.85±0.04	5.83±0.02
	15day	4.14±0.01	5.77±0.01	5.19±0.01	4.65±0.01
	22day	4.02±0.01	5.38±0.43	4.88±0.02	4.18±0.01
	30day	4.06±0.01	5.48±0.02	4.50±0.01	4.10±0.01
산도 (%)	0day	0.22±0.03	0.28±0.01	0.26±0.01	0.24±0.01
	4day	0.23±0.01	0.28±0.01	0.28±0.04	0.25±0.00
	8day	0.51±0.01	0.31±0.01	0.32±0.01	0.31±0.02
	15day	0.74±0.01	0.31±0.00	0.40±0.01	0.50±0.01
	22day	0.85±0.01	0.36±0.00	0.49±0.01	0.77±0.01
	30day	0.93±0.02	0.38±0.01	0.59±0.01	0.84±0.05

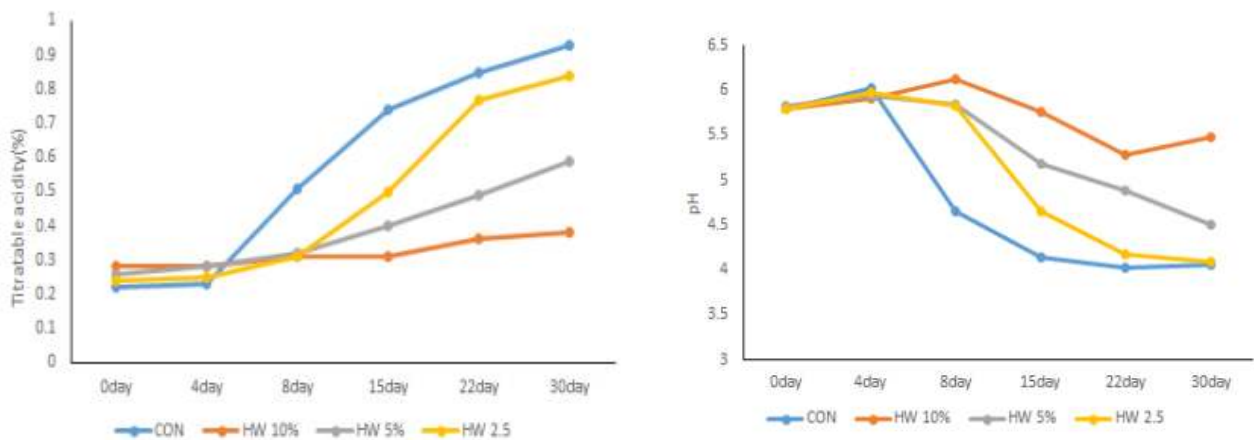


그림 2-1-2-19. HW 첨가 김치 저장 중 pH와 산도 변화 (저장온도 6°C)

표 2-1-2-57. HP 김치 유리당 분석 결과

(mg/L)		Sucrose	Glucose	Fructose	Mannitol	Sorbitol
0일차	무첨가	1119.05	8720.13	8342.31	94.40	177.09
	2.5% 첨가	1261.18	10491.57	10015.60	99.35	194.68
	5.0% 첨가	1684.99	12860.44	12133.32	115.77	234.86
	10%첨가	1536.69	10900.03	10383.16	104.45	191.41
8일차	무첨가	611.84	9401.21	6171.63	2910.76	179.70
	2.5% 첨가	1630.24	13270.49	11760.56	236.00	313.77
	5.0% 첨가	1461.97	11224.60	10029.13	127.50	243.49
	10%첨가	1943.05	14204.27	12718.97	160.24	258.33
14일차	무첨가	286.15	7928.94	1845.73	3755.10	215.76
	2.5% 첨가	677.20	10940.20	7147.31	3523.56	288.06
	5.0% 첨가	1652.96	12875.00	11023.51	674.25	285.41
	10%첨가	1692.95	14098.83	12399.91	450.29	247.08

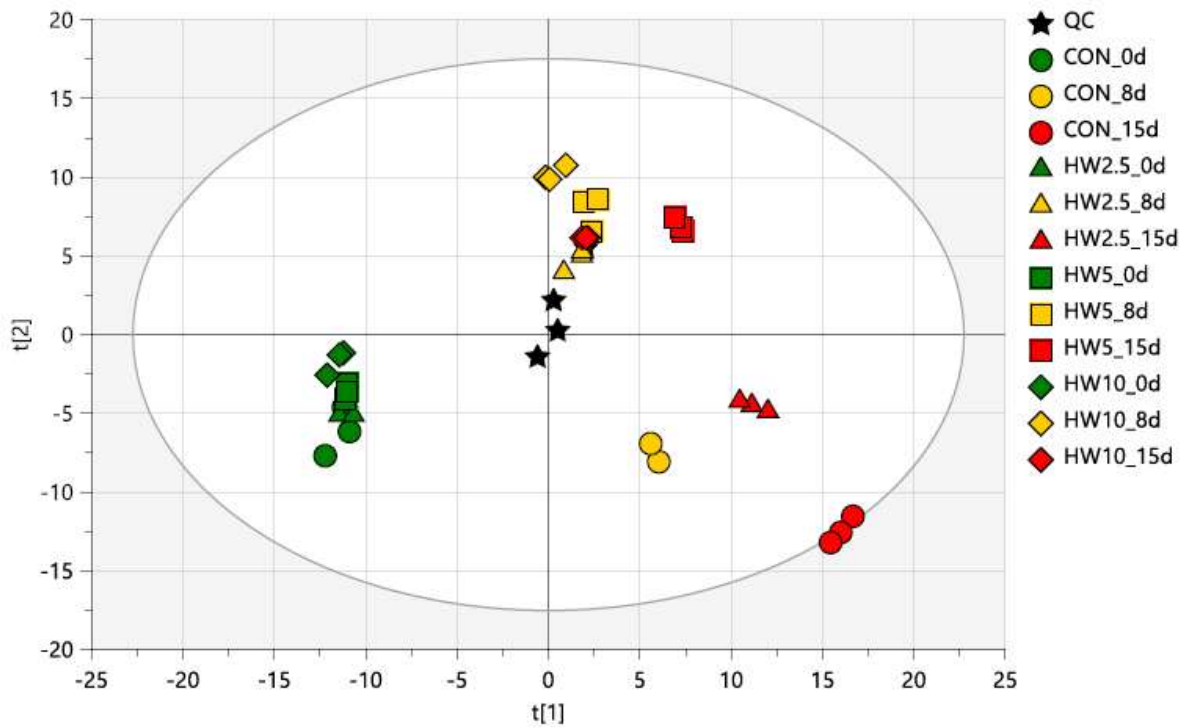
표 2-1-2-56. HP 김치 유기산 분석 결과

(mg/L)		Citric acid	Malic acid	Fumaric acid	Lactic acid	Acetic acid
0일차	무첨가	644.63	1407.67	25.56	135.63	89.42
	2.5% 첨가	595.47	1283.41	23.26	113.28	72.10
	5.0% 첨가	794.5	1552.34	26.58	151.40	93.26
	10%첨가	694.94	1294.60	20.66	114.51	77.26
8일차	무첨가	553.11	644.56	22.31	1693.99	729.72
	2.5% 첨가	803.04	1259.08	26.53	530.34	186.56
	5.0% 첨가	675.92	1257.45	21.11	193.57	106.59
	10%첨가	876.18	1666.18	26.94	216.36	130.46
14일차	무첨가	248.36	ND	20.29	3789.99	1569.40
	2.5% 첨가	643.60	540.70	26.83	2488.9	931.71
	5.0% 첨가	789.51	1064.27	27.31	942.89	333.71
	10%첨가	783.99	1522.41	28.43	525.06	221.32

표 2-1-2-59. HW 농도별 첨가 김치 저장기간 중 유산균 변화

(단위:log CFU/g)

	Con	10% 첨가	5% 첨가	2.5% 첨가
0day	5.77±0.02	5.65±0.03	5.72±0.02	5.83±0.04
4day	6.86±0.05	5.50±0.08	5.70±0.01	5.72±0.01
8day	8.87±0.01	7.84±0.00	8.45±0.00	8.02±0.02
15day	9.45±0.00	8.67±0.01	9.04±0.06	9.34±0.02
22day	8.61±0.04	8.53±0.05	8.76±0.03	9.26±0.03



PCA ($R^2X = 0.548, Q^2 = 0.481$)

Relative standard deviation (RSD%) of quality control group = 3.57%

그림 2-1-2-20. 전체와 발효 기간별 PCA 분석 결과

○ Identified metabolites

No.	Metabolites	Retention time (min)	Target Mass	HMDB1)	PubChem2)	KEGG3)
1	Pyruvate	4.465	174	HMDB0000243	1060	C00022
2	Lactic acid	4.57	147	HMDB0000190	61503	C00186
3	Glycolic acid	5.055	147	HMDB0000115	757	C03547
4	Oxalate	5.485	147	HMDB0002329	971	C00209
5	2-Aminoisobutyrate	5.825	130	HMDB0001906	6119	C03665
6	Valine	6.29	144	HMDB0000883	6287	C00183
7	Malonic acid	6.47	147	HMDB0000691	867	C04025
8	Serine	6.72	132	HMDB0062263	5951	C00716
9	2-Aminoethanol	6.81	174	HMDB0000149	700	C00189
10	Leucine	6.86	158	HMDB0000687	6106	C00123
11	Glycerol	6.885	147	HMDB0000131	753	C00116
12	Phosphate	6.89	299	HMDB0001429	57424078	C00009
13	Proline	7.125	142	HMDB0000162	145742	C00148
14	Glycine	7.215	174	HMDB0000123	750	C00037
15	Ethylmalonate	7.235	147	HMDB0000622	11756	-
16	Pipecolic acid	7.775	156	HMDB0000070	849	C00408
17	Threonine	7.98	218	HMDB0000167	6288	C00188
18	Glutaric acid	8.305	147	HMDB0000661	743	C00489
19	Alanine	8.32	174	HMDB0000161	5950	C00041
20	Malic acid	8.855	147	HMDB0000744	525	C03668
21	Threitol	9.055	217	HMDB0004136	222285	C16884
22	Aspartic acid	9.125	232	HMDB0000191	5960	C00049
23	Methionine	9.13	176	HMDB0000696	6137	C00073
24	Pyroglutamic acid	9.175	156	HMDB0000267	7405	C01879
25	4-Aminobutyric acid	9.205	174	HMDB0000112	223130	C00334
26	Acetoacetic acid	9.555	129	HMDB0000060	96	C00164
27	Glutamic acid	9.915	246	HMDB0000148	33032	C00025
28	5-Aminovaleric acid	9.99	174	HMDB0003355	138	C00431
29	Anthranilic acid	10.015	266	HMDB0001123	227	C00108
30	Phenylalanine	10.02	218	HMDB0000159	6140	C00079
31	Arabinose	10.33	103	HMDB0000646	439195	C02479
32	Asparagine	10.34	116	HMDB0000168	6267	C00152
33	Xylitol	10.67	217	HMDB0002917	6912	C00379
34	Putrescine	10.845	174	HMDB0001414	1045	C00134
35	Glutamine	11.09	156	HMDB0000641	5961	C00064
36	Fucose	11.095	117	HMDB0000174	25310	C01019
37	Quinolinic acid	11.18	147	HMDB0000232	1066	C03722
38	Shikimic acid	11.325	204	HMDB0003070	8742	C00493
39	Hypoxanthine	11.37	265	HMDB0000157	790	C00262
40	Ornithine	11.42	142	HMDB0000214	6262	C00077
41	Citric acid	11.45	273	HMDB0000094	311	C00158
42	Glycyl-Glycine	11.545	174	HMDB0011733	11163	C02037
43	Cadaverine	11.655	174	HMDB0002322	273	C01672
44	Quinic acid	11.785	345	HMDB0003072	6508	C00296
45	Allose	12.065	319	HMDB0001151	12285879	C01487
46	5-Keto-D-Gluconate	12.2	147	HMDB0011731	3838	C01062
47	Tyrosine	12.275	218	HMDB0000158	6057	C00082
48	Mannitol	12.28	319	HMDB0000765	6251	C00392
49	Galactitol	12.43	217	HMDB0000107	11850	C01697
50	Glucarate	12.865	333	HMDB0000663	33037	C00818
51	Inositol	13.32	217	HMDB0000211	-	C00137
52	Guanine	13.475	352	HMDB0000132	764	C00242
53	Heptadecanoate	13.88	117	HMDB0002259	10465	-
54	Spermidine	14.225	144	HMDB0001257	1102	C00315
55	Tryptamine	14.27	174	HMDB0000303	1150	C00398
56	2'-Deoxyuridine	14.985	103	HMDB0000012	13712	C00526
57	Uridine	15.515	217	HMDB0000296	6029	C00299
58	Sucrose	16.4	217	HMDB0000258	5988	C00089
59	Maltose	16.935	361	HMDB0037138	439341	C00897
60	Melibiose	17.54	361	HMDB0000048	440658	C05400
61	Melezitose	20.025	217	HMDB0011730	92817	C08243
62	Maltotriose	20.415	204	HMDB0001262	439586	C01835

1) HMDB, Human Metabolome Database. HMDB is a comprehensive, high-quality, freely accessible, online database of small molecule metabolites found in the human body.

2) PubChem, PubChem is a database of chemical molecules and their activities against biological assays. The system is maintained by the National Center for Biotechnology Information (NCBI), a component of the National Library of Medicine, which is part of the United States National Institutes of Health (NIH).

3) KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. KEGG is a collection of databases dealing with genomes, biological pathways, diseases, drugs, and chemical substances.

○ Day 0 vs Day 15 of control (VIP > 1.0, *p* value < 0.05)

No.	Metabolites	Day 15/Day 0 (↑/↓)	VIP value	<i>P</i> value	*
1	Mannitol	↑	1.17	<0.001	***
2	Malic acid	↓	1.17	<0.001	***
3	Lactic acid	↑	1.17	<0.001	***
4	Threitol	↑	1.17	<0.001	***
5	Tyrosine	↑	1.17	<0.001	***
6	Ethylmalonate	↑	1.17	<0.001	***
7	Maltose	↓	1.17	<0.001	***
8	Citric acid	↓	1.17	<0.001	***
9	Ornithine	↑	1.17	<0.001	***
10	Sucrose	↓	1.17	<0.001	***
11	Phosphate	↑	1.17	<0.001	***
12	Glycerol	↑	1.17	<0.001	***
13	Heptadecanoate	↑	1.17	<0.001	***
14	Malonic acid	↑	1.17	<0.001	***
15	Pyroglutamic acid	↑	1.17	<0.001	***
16	Melezitose	↓	1.16	<0.001	***
17	4-Aminobutyric acid	↑	1.16	<0.001	***
18	Glycine	↑	1.16	<0.001	***
19	Hypoxanthine	↑	1.16	0.003	**
20	Maltotriose	↓	1.16	<0.001	***
21	Guanine	↑	1.16	<0.001	***
22	Aspartic acid	↑	1.16	0.003	**
23	Glutaric acid	↑	1.16	<0.001	***
24	Phenylalanine	↑	1.16	<0.001	***
25	Inositol	↑	1.16	<0.001	***
26	Glutamic acid	↑	1.16	<0.001	***
27	Allose	↓	1.16	<0.001	***
28	Anthranilic acid	↑	1.15	<0.001	***
29	Galactitol	↓	1.15	<0.001	***
30	Methionine	↑	1.15	<0.001	***
31	Threonine	↑	1.15	<0.001	***
32	Acetoacetic acid	↑	1.15	<0.001	***
33	Cadaverine	↑	1.15	<0.001	***
34	Oxalate	↑	1.14	<0.001	***
35	Tryptamine	↑	1.14	<0.001	***
36	Putrescine	↑	1.14	0.001	**
37	Shikimic acid	↓	1.13	0.001	**
38	Quinic acid	↓	1.13	0.002	**
39	Spermidine	↑	1.06	0.013	*
40	Arabinose	↓	1.04	0.018	*
41	Alanine	↑	1.01	0.026	*

○ Day 0 vs Day 15 of HW 2.5 (VIP > 1.0, *p* value < 0.05)

No.	Metabolites	Day 15/Day 0 (↑/↓)	VIP value	<i>P</i> value	*
1	Ornithine	↑	1.22	0.000	***
2	Mannitol	↑	1.22	0.000	***
3	Lactic acid	↑	1.22	0.000	***
4	Hypoxanthine	↑	1.22	0.000	***
5	Aspartic acid	↑	1.22	0.000	***
6	Malic acid	↓	1.21	0.000	***
7	Tyrosine	↑	1.21	0.000	***
8	Threitol	↑	1.21	0.000	***
9	4-Aminobutyric acid	↑	1.21	0.000	***
10	Sucrose	↓	1.21	0.000	***
11	Phenylalanine	↑	1.21	0.000	***
12	Phosphate	↑	1.21	0.000	***
13	Glycine	↑	1.21	0.000	***
14	Glycerol	↑	1.21	0.000	***
15	5-Keto-D-Gluconate	↓	1.21	0.000	***
16	Inositol	↑	1.21	0.000	***
17	Glutamic acid	↑	1.21	0.000	***
18	Methionine	↑	1.21	0.000	***
19	Melezitose	↓	1.21	0.000	***
20	Cadaverine	↑	1.20	0.000	***
21	Threonine	↑	1.20	0.000	***
22	Galactitol	↓	1.20	0.000	***
23	Acetoacetic acid	↑	1.20	0.000	***
24	Guanine	↑	1.20	0.000	***
25	Valine	↑	1.19	0.000	***
26	2-Aminoethanol	↑	1.19	0.000	***
27	Glutaric acid	↑	1.19	0.000	***
28	Glycolic acid	↑	1.19	0.001	***
29	Arabinose	↓	1.19	0.001	***
30	Ethylmalonate	↑	1.19	0.001	***
31	Citric acid	↓	1.19	0.001	***
32	Melibiose	↓	1.19	0.012	*
33	Malonic acid	↑	1.19	0.001	***
34	Maltotriose	↓	1.18	0.001	***
35	Pyroglutamic acid	↑	1.17	0.002	**
36	Alanine	↑	1.17	0.002	**
37	Glucarate	↑	1.16	0.003	**
38	Glycyl-Glycine	↑	1.16	0.003	**
39	Spermidine	↑	1.16	0.024	*
40	Leucine	↑	1.15	0.004	**
41	Allose	↓	1.15	0.005	**
42	Anthranilic acid	↑	1.14	0.006	**
43	Pyruvate	↓	1.08	0.017	*
44	Oxalate	↑	1.06	0.024	*
45	Shikimic acid	↑	1.01	0.040	*

○ Day 0 vs Day 15 of HW5 (VIP > 1.0, *p* value < 0.05)

No.	Metabolites	Day 15/Day 0 (↑/↓)	VIP value	<i>P</i> value	*
1	Ornithine	↑	1.21	<0.001	***
2	Malic acid	↓	1.21	<0.001	***
3	Sucrose	↓	1.21	<0.001	***
4	4-Aminobutyric acid	↑	1.21	<0.001	***
5	Lactic acid	↑	1.21	<0.001	***
6	Mannitol	↑	1.21	<0.001	***
7	Phenylalanine	↑	1.21	<0.001	***
8	Aspartic acid	↑	1.21	<0.001	***
9	Glycerol	↑	1.21	<0.001	***
10	Threonine	↑	1.21	<0.001	***
11	Maltose	↓	1.21	<0.001	***
12	2-Aminoethanol	↑	1.21	<0.001	***
13	Arabinose	↑	1.20	<0.001	***
14	Phosphate	↑	1.20	<0.001	***
15	Methionine	↑	1.20	<0.001	***
16	Guanine	↑	1.20	<0.001	***
17	Inositol	↑	1.20	<0.001	***
18	Pyroglutamic acid	↑	1.20	<0.001	***
19	Threitol	↑	1.20	<0.001	***
20	Tryptamine	↑	1.20	<0.001	***
21	Glycine	↑	1.20	<0.001	***
22	Leucine	↑	1.20	<0.001	***
23	Putrescine	↑	1.20	<0.001	***
24	Hypoxanthine	↑	1.19	<0.001	***
25	Melezitose	↓	1.19	<0.001	***
26	Maltotriose	↓	1.19	<0.001	***
27	Acetoacetic acid	↑	1.19	<0.001	***
28	Malonic acid	↑	1.19	<0.001	***
29	Heptadecanoate	↑	1.18	<0.001	***
30	Citric acid	↓	1.18	<0.001	***
31	Valine	↑	1.18	<0.001	***
32	Melibiose	↑	1.18	<0.001	***
33	Glutaric acid	↑	1.17	0.001	**
34	Ethylmalonate	↑	1.17	0.013	*
35	Spermidine	↑	1.17	0.002	**
36	Glutamic acid	↓	1.16	0.002	**
37	Shikimic acid	↑	1.15	0.003	**
38	Glucarate	↑	1.15	0.003	**
39	Alanine	↑	1.15	0.004	**
40	Anthranilic acid	↑	1.14	0.004	**
41	Pyruvate	↑	1.14	0.004	**
42	2'-Deoxyuridine	↑	1.13	0.006	**
43	Xylitol	↑	1.12	0.007	**
44	5-Keto-D-Gluconate	↑	1.12	0.008	**
45	Cadaverine	↑	1.09	0.013	*
46	Glutamine	↓	1.08	0.016	*
47	Galactitol	↓	1.03	0.031	*
48	Oxalate	↑	1.02	0.036	*

○ Day 0 vs Day 15 of HW10 (VIP > 1.0, *p* value < 0.05)

No.	Metabolites	Day 15/Day 0 (↑/↓)	VIP value	<i>P</i> value	*
1	Lactic acid	↑	1.25	<0.001	***
2	Sucrose	↓	1.25	<0.001	***
3	Maltose	↓	1.24	<0.001	***
4	Phosphate	↑	1.24	<0.001	***
5	Phenylalanine	↑	1.24	<0.001	***
6	Arabinose	↑	1.24	<0.001	***
7	2-Aminoethanol	↑	1.24	<0.001	***
8	Ethylmalonate	↑	1.24	<0.001	***
9	Methionine	↑	1.24	<0.001	***
10	Glycerol	↑	1.24	<0.001	***
11	Mannitol	↑	1.24	<0.001	***
12	Melezitose	↓	1.24	<0.001	***
13	4-Aminobutyric acid	↑	1.24	<0.001	***
14	5-Keto-D-Gluconate	↑	1.24	<0.001	***
15	Aspartic acid	↑	1.24	<0.001	***
16	Maltotriose	↓	1.24	<0.001	***
17	Inositol	↑	1.24	<0.001	***
18	Malic acid	↓	1.24	<0.001	***
19	Quinic acid	↓	1.23	<0.001	***
20	Threonine	↑	1.23	<0.001	***
21	Glycine	↑	1.23	<0.001	***
22	Glutaric acid	↑	1.23	<0.001	***
23	Citric acid	↓	1.22	<0.001	***
24	Glutamic acid	↓	1.22	<0.001	***
25	Guanine	↑	1.22	0.009	**
26	Cadaverine	↑	1.21	<0.001	***
27	Pyroglutamic acid	↑	1.21	<0.001	***
28	Glucarate	↑	1.21	0.001	**
29	Valine	↑	1.20	0.002	**
30	Leucine	↑	1.20	0.002	**
31	Hypoxanthine	↑	1.19	0.003	**
32	Asparagine	↓	1.18	0.004	**
33	Melibiose	↑	1.18	0.004	**
34	Acetoacetic acid	↑	1.17	0.005	**
35	Shikimic acid	↑	1.16	0.006	**
36	2'-Deoxyuridine	↓	1.16	0.007	**
37	Putrescine	↑	1.13	0.013	*
38	Anthranilic acid	↑	1.11	0.017	*
39	Allose	↑	1.10	0.020	*
40	Pipecolic acid	↑	1.08	0.025	*
41	5-Aminovaleric acid	↓	1.05	0.036	*
42	Ornithine	↑	1.03	0.041	*
43	Spermidine	↑	1.03	0.042	*

라) 김치 숙성기한 연장 소재 적용조건 최적화

천연소재 추출물 분사 표면처리에 의한 김치 골마지 억제 효과를 확인하기 위하여 농도별 혼합제조한 김치와 무첨가 표면처리 김치를 제조하여 실온에서 60일간 관찰하였다.

(1) 실험방법

상기 조건으로 제조한 HW 추출액을 김치무게 % 대비 7%, 5% 첨가한 김치와 표면에 분사하여 처리한 김치를 실온에서 60일간 관찰하여 표면 고마지균 생성 여부를 확인하였다.

(2) 실험결과

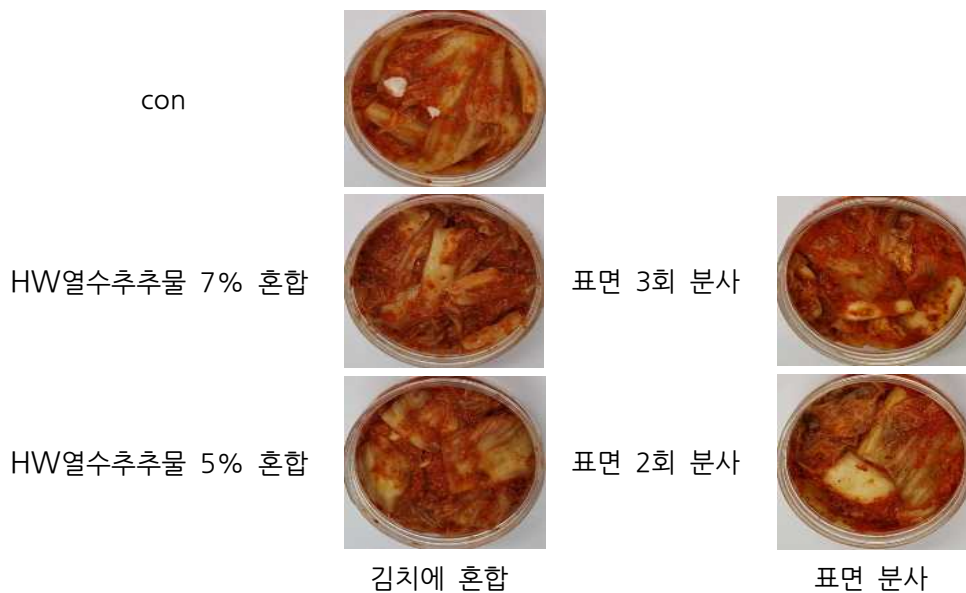


그림 2-1-2-21. HW열수추출물 혼합과 표면분사 처리군 3주 저장 후 외관

당일 제조한 김치에 HW열수추출물을 무게대비 7%나 5% 혼합하거나 표면에 2회, 3회 분사하였다. 실온에서 24시간 방치한 다음 20℃에서 3주간 저장 후 골마지 생성 여부를 확인한 결과, HW열수추출물을 혼합하거나 표면에 분사한 김치에서는 골마지가 발생하지 않았으나 무처리군 김치에서는 골마지가 발생한 것을 확인하였다. 20℃에서 저장 60일 후 관찰한 용기내 김치중 무처리 대조군은 균덕내가 심하였으나, HW열수추출물 분사한 군에서는 골마지가 생성되지 않았으나 혼합군에서는 표면에 골마지가 작은 점으로 관찰되었다.

2-2. Meta-omics를 활용한 복합효소 생물전환 식물성 발효향미모듈 개발

2-2-1. 식물성 발효향미모듈-1,2 개발 (샘표, 1차년도)

표 2-2-1-1. 1차년도 연구 단계별 연구수행 목표

구분	연구단계	연구수행목표
식물성 발효향미모듈-1	기질 고농도화 및 항원성 물질 처리 기술 개발	○ 기질 고농도화 - 조단백질 68% 이상(건물 기준) ○ 항원성 물질 및 효소 활성 저해인자 제거 - trypsin inhibitor 제거율 95% 이상
	복합효소 대량생산 기술 개발	○ 복합효소 대량생산 - LAP 7,000 mU/g 이상(건물 기준) - GGT 5,000 mU/mL 이상
식물성 발효향미모듈-2	미생물 대사체 조절 기술 개발	○ 우수 미생물 1종 확보
	3단계 신선액상발효 기술 개발	○ 쌀발효물 모듈 개발(lab scale) - Acidity 1.0% 이상 - 향미 성능 목표 : Sulfide 향미 마스크링 능력 : 신선한 과일 향미 생성(ethyl caproate, ethyl butylate) : 달콤한 향미 생성(Vanillin 1.5mg/kg 이상, eugenol 1.0mg/kg 이상)

1) 식물성 발효향미모듈-1 개발

가) 기질 고농도화 및 항원성 물질 처리 기술

(1) 연구방법

(가) 기질 고농도화 조건 및 항원성 물질 저감 조건 최적화

① 기질 고농도화 조건 최적화 실험

알코올 처리로 원료의 비전분성 다당류를 효과적으로 제거하여 기질인 조단백 함량을 증대시키기 위해 대두에서 조지질 성분을 제거한 탈지대두(SMB)를 원료로 사용하였다. 식용 에탄올과 증류수를 혼합하여 알코올 농도별 알코올 수용액을 제조하였다. 탈지대두 원료에 원료 무게 대비 3배의 알코올 수용액을 가하여 기질 고농도화 처리를 수행하였다. 알코올 농도, 온도, 처리 시간, 처리 횟수에 따른 기질 고농도화 처리 후 조단백 함량을 비교하였다.

② 항원성 물질 및 효소활성 저해인자 저감 조건 최적화 실험

가수 및 열처리 기술을 활용하여 항원성 물질 및 효소활성 저해인자인 대두 단백질의 구조를 변형시켜 그 활성을 제어하고자 하였다. 수분 조건 최적화를 위해 기질 고농도화 기술 처리로 제조한 농축대두단백 원료에 정제수를 가하여 실온 조건에서 1시간 동안 침지하였다. 수분 함량에 따른 trypsin inhibitor 활성 저감 효과를 확인하였다. 열처리 온도 및 시간 조건 최적화를 위해 농축대두단백 원료에 정제수를 가한 후 autoclave를 활용하여 60~120℃의 온도 조건으로 0.5, 1시간

동안 열처리 후 trypsin inhibitor 활성과 protease 반응속도를 확인하였다.

Protease 반응속도는 열처리한 원료를 상업효소 Alcalase®, Flavourzyme®(Novozymes사)로 처리하여 수용액으로 용출되는 아미노산 함량을 분석하여 확인하였다. 열처리한 원료에 20%(w/v) NaCl 용액과 정제수를 가하여 NaCl 농도를 8%(w/w)로 조절하고, 상업효소를 첨가하여 온도 45°C 조건에서 24시간 동안 효소반응 후 Whatman No.2 filter paper로 여과하여 여과액의 아미노산 분석을 수행하였다. 원료의 총 단백질 함량 대비 수용액으로 용출된 구성 아미노산 함량의 비율을 계산하여 단백질 용출율로 나타내었다.

$$\text{단백질 용출율(\%)} = \frac{\text{수용액으로 용출된 구성아미노산 함량(g)}}{\text{원료의 총 단백질 함량(g)}} \times 100$$

(나) 실험방법

① 총질소(조단백)

시료의 총질소 함량은 AOAC에 등재된 DUMAS법에 따라 분석하였다. 도가니에 시료의 무게를 정밀히 달아 기기에 장착시킨 후 800~1,000°C의 열을 가하여 시료 내 질소를 산화질소로 연소시킨다. 구리나 텅스텐을 통해 환원된 N₂를 열전도도 검출기로 정량한다. 총질소 함량에 질소계수(6.25)를 곱하여 조단백 함량을 산출하였다.

② Trypsin inhibitor

Trypsin inhibitor 활성은 AACC 22-40.01 method에 따라 분석하였다. 분쇄한 시료에 0.01M NaOH를 가하고 20°C에서 3시간 동안 추출한다. Trypsin solution(15mg/L)에 DL-BAPA solution(400mg/L)을 가하여 온도 37°C에서 10분 간 효소반응 후 30%(w/v) acetic acid solution을 가하여 반응을 정지시키고, 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 30% acetic acid solution을 trypsin solution에 먼저 첨가하여 효소반응한 것을 blank로 하고, blank의 흡광도를 제한 값을 sample free enzymatic reaction의 흡광도로 한다(*Astd*). Trypsin solution에 시료 추출액을 넣고, 위와 마찬가지로 DL-BAPA solution(400mg/L)을 가하여 효소반응 후 30%(w/v) acetic acid solution을 가하여 반응을 정지시키고, 410nm에서 흡광도를 측정하였다. 30% acetic acid solution을 trypsin solution에 먼저 첨가하여 효소반응한 것을 blank로 하고, blank의 흡광도를 제한 값을 sample free enzymatic reaction의 흡광도로 한다(*A_{sample}*). 흡광도를 계산식에 대입하여 trypsin inhibitor의 활성을 산출하였다(순수한 trypsin 1μg = 0.019 absorbance units)

$$\text{Trypsin inhibitor (mg/g)} = \frac{(A_{std} - A_{sample})}{19} \times \text{dilution factor}$$

③ 구성 아미노산

구성 아미노산 분석을 위해 시료에 6N HCl을 가하고 105°C에서 24시간 동안 반응시켜 단백질의 펩타이드 결합을 분해하는 과정을 거쳤다. pH 2.2 Lithium loading buffer로 희석하여 0.22 μm syringe filter로 여과한 후 기기분석을 수행하였다. 아미노산을 ion exchange column으로 분리한 후 130°C에서 ninhydrin과 반응시켜 UV/VIS 검출기로 검출하였다.

표 2-2-1-2. 아미노산 분석 용매

분석용매	pH
Lithium buffer 1	2.80
Lithium buffer 2	3.00
Lithium buffer 3	3.15
Lithium buffer 4	3.50
Lithium buffer 5	3.55
Lithium regeneration buffer 6	-
Ninhydrin reagent	-

표 2-2-1-3. 아미노산 분석을 위한 기기분석 조건

분석기기	Amino Acids Analyzer 30+(Biochrom)
Column	Lithium Accelerated analytical Column (cation-exchange resin)
Injection volume	20 μ L
Flow rate	30mL/h (Ninhydrin reagent 25mL/h)
Detection wavelength	570nm(proline 440nm)

④ 통계적 분석

모든 성분 분석은 3회 반복하여 MiniTab(MiniTab 17, Minitab Inc., USA)을 이용하여 통계적 유의성 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 분석을 수행하였다.

(2) 연구결과

(가) 기질 고농도화 조건 최적화 결과

① 알코올 농도 조건 최적화

알코올 농도 조건 최적화 실험을 위해 식용 에탄올과 증류수를 혼합하여 알코올 농도 60, 70, 80%(w/v)의 알코올 수용액을 준비하였다. 탈지대두 원료에 원료 무게 대비 3배의 알코올 수용액을 가한 후 온도, 시간, 처리 횟수 조건은 25°C(실온), 2시간, 3회로 하여 기질 고농도화 처리 후 조단백 함량을 비교하였다. 그 결과 알코올 농도 60%(w/v) 대비 70%(w/v)의 알코올 수용액으로 처리 시 조단백 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 알코올 농도 70, 80%(w/v)의 알코올 수용액으로 처리 시 조단백 함량이 각각 $65.42 \pm 0.61\%$, $65.14 \pm 0.70\%$ 로 유의적 차이가 없는 것으로 확인되어 알코올 농도를 70%(w/v)로 설정하였다.

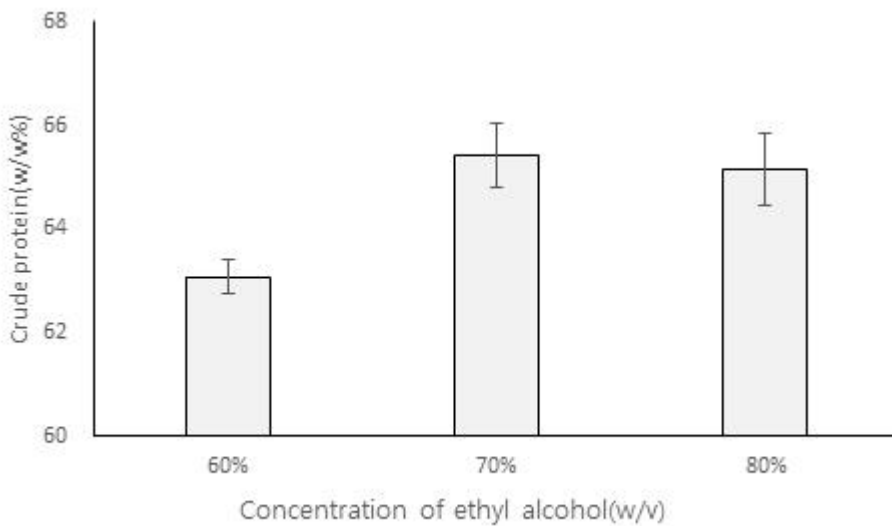


그림 2-2-1-1. 알코올 수용액의 농도에 따른 조단백 함량

② 온도 조건 최적화 결과

기질 고농도화 온도 조건을 최적화하기 위해 25, 55, 65, 75°C의 온도 조건에서의 조단백 함량을 확인하였다. 알코올 수용액을 이용한 탈지대두의 당류 및 기능성 성분 추출 시 온도 조건이 높을수록 추출 수율이 증가하는 것으로 보고되어 있으나, 대량생산 공정에서는 알코올이 증발하여 원가 상승에 영향을 미칠 수 있고, 이로 인해 기질 고농도화 효과가 낮아질 수 있기에 알코올의 끓는점인 78°C 미만 조건에서 온도를 설정하고자 하였다. 탈지대두 원료에 원료 무게 대비 3배의 70%(w/v) 알코올 수용액을 가한 후 처리 시간 및 횟수는 2시간, 3회로 하여 기질 고농도화 처리를 수행하였다. 그 결과 65°C에서 기질 고농도화 처리 시 조단백 함량이 $68.83 \pm 0.44\%$ 로 가장 높은 것으로 나타나 온도 조건을 65°C로 설정하였다.

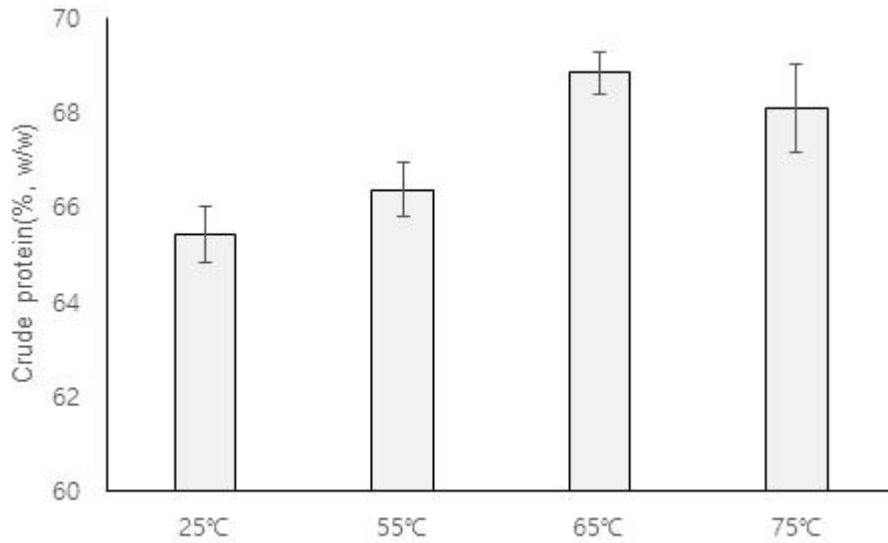


그림 2-2-1-2. 알코올 수용액 처리 온도에 따른 조단백 함량

③ 처리 시간 및 횟수 조건 최적화 결과

알코올 수용액의 처리 시간 및 처리 횟수 조건을 최적화하기 위해 위와 동일한 실험 방법으로 0.5~4시간, 2~5회 조건에서 기질 고농도화 처리 후 조단백 함량을 확인하여 처리 시간을 1시간, 처리 횟수는 4회로 설정하였다.

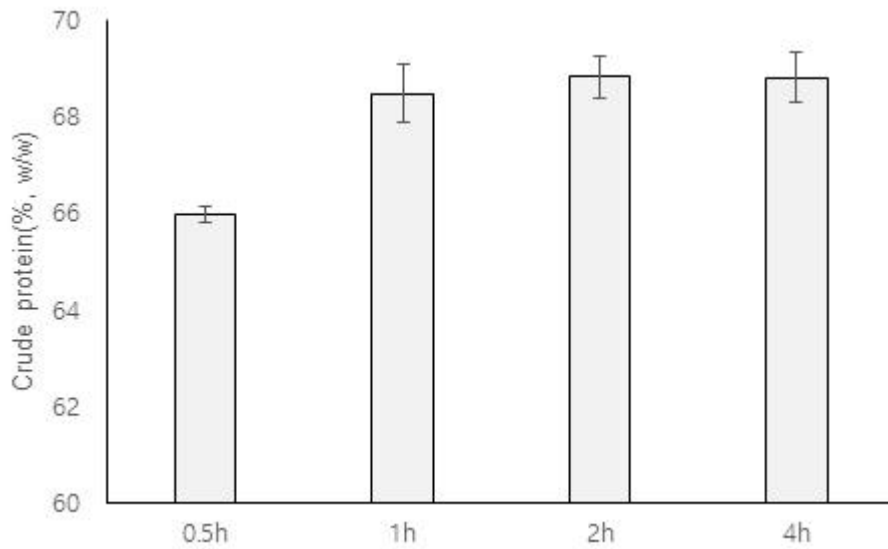


그림 2-2-1-3. 알코올 수용액 처리 시간에 따른 조단백 함량

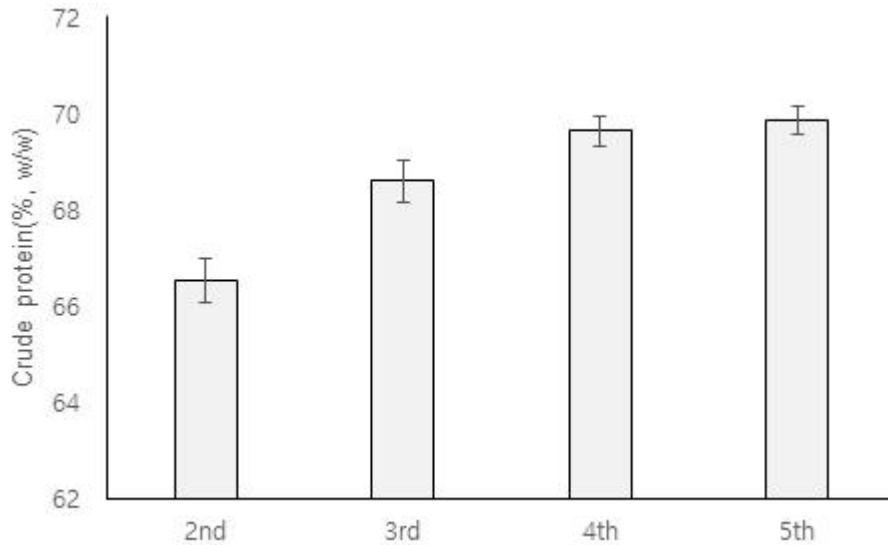


그림 2-2-1-4. 알코올 수용액 처리 횟수에 따른 조단백 함량



그림 2-2-1-5. 탈지대두(좌)와 기질 고농도화 처리를 완료한 농축대두단백(우)

(나) 항원성 물질 및 효소활성 저해인자 저감 조건 최적화 결과

다양한 종류의 대두 단백질이 알러지를 유발하는 것으로 보고되어 있으며, 대두는 국내를 비롯한 유럽, 미국, 일본 등 세계 주요 국가에서 지정한 알러지 유발식품에 해당된다. 이 중 trypsin inhibitor는 알러지를 유발하는 항원성 물질이자 trypsin, chymotrypsin과 같은 단백질 소화효소의 활성을 저해하는 대두 단백질로 알려져 있다. Trypsin inhibitor는 위에서 만들어져 소장으로 운반되는 trypsinogen에 비가역적으로 결합하여 enteropeptidase에 의한 trypsin으로의 활성화를 억제하며, 이로 인해 chymotrypsinogen이 chymotrypsin으로 활성화되는 것 역시 억제된다. 가수 및 열처리 기술을 활용하여 항원성 물질 및 효소활성 저해인자인 대두 단백질의 구조를 변형시켜 그 활성을 제어하고자 하였다.

① 수분 조건 최적화 결과

기질 고농도화 기술 처리로 제조한 농축대두단백(SPC) 원료에 원료 무게 대비 40~110%의 정제수를 가하여 수분 함량을 조절하고, 실온 조건에서 1시간 동안 침지 후 trypsin inhibitor 활성을 확인하였다. 그 결과 수분 함량을 50% 이상으로 조절하여 1시간 동안 침지 시 trypsin inhibitor 활성이 0.4~0.5mg/g(건물 기준) 낮아졌다.

표 2-2-1-4. 가수량에 따른 수분 함량 및 trypsin inhibitor 활성

가수량 (원료 대비)	수분 함량 (%)	Trypsin inhibitor (mg/g)
0%	8.64±0.37	6.18±0.30
40%	36.13±0.86	6.47±0.16
50%	41.11±1.13	6.22±0.36
70%	45.33±0.71	6.16±0.28
90%	51.35±0.80	5.72±0.13
110%	55.15±2.26	5.54±0.14

② 열처리 온도 및 시간 조건 최적화 결과

열처리 온도 및 시간 조건 최적화를 위해 농축대두단백 원료에 원료 무게 대비 110%의 정제수를 가한 후 autoclave를 활용하여 60~120°C의 온도 조건으로 0.5, 1시간 동안 열처리 후 trypsin inhibitor 활성을 확인하였다. 그 결과 열처리 온도 및 시간이 증가할수록 trypsin inhibitor 활성이 감소하였고, 120°C, 1시간 열처리 시 0.74mg/g으로 나타났다.

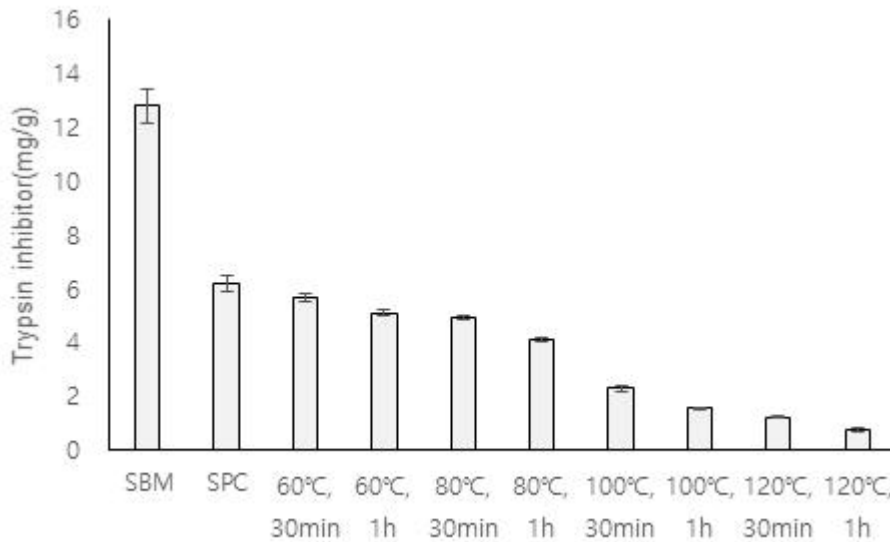


그림 2-2-1-6. 열처리 조건에 따른 trypsin inhibitor 활성(mg/g)

Protease 반응속도를 확인한 결과 80°C 이상의 온도 조건에서는 온도 및 열처리 시간이 증가할수록 효소반응 후 여과액의 구성 아미노산 함량이 증가하여 단백질 용출율이 최대 90%까지 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 120°C로 열처리 시 효소반응 후 여과액의 아미노산 함량이 감소하여 단백질 용출율이 85% 미만으로 나타났다. 항원성 물질의 효과적인 제거를 위해 열처리 온도 및 시간을 120°C, 1시간으로 설정하였다.

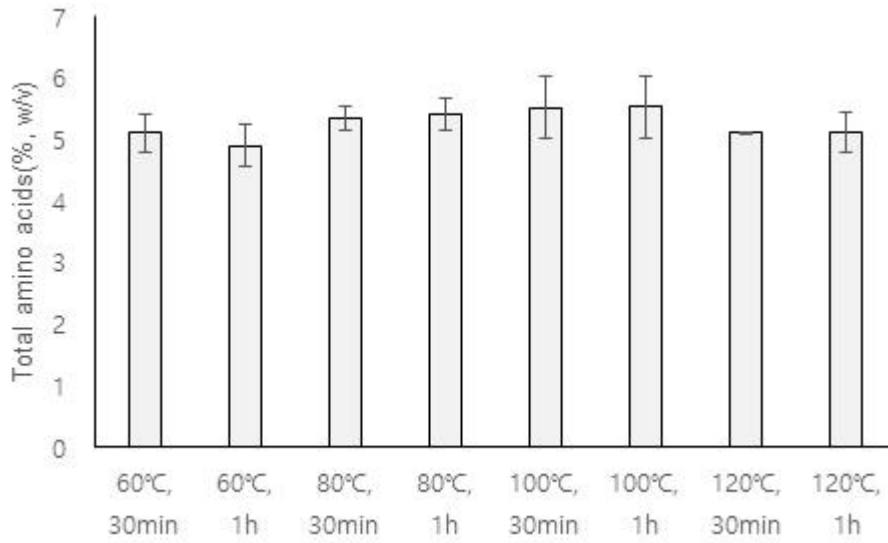


그림 2-2-1-7. 열처리 조건에 따른 구성 아미노산 함량

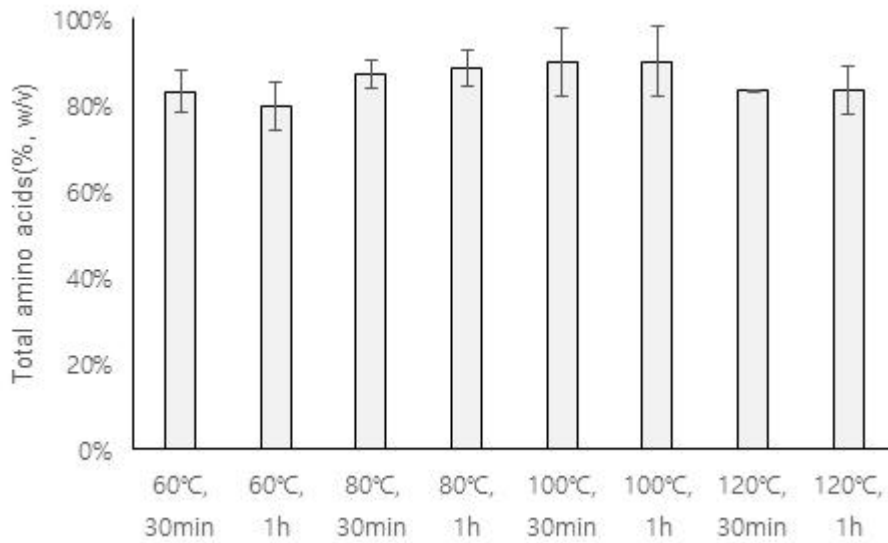


그림 2-2-1-8. 열처리 조건에 따른 단백질 용출율

(3) 결론

(가) 기질 고농도화 기술

알코올 처리로 원료의 비전분성 다당류를 효과적으로 제거하여 기질인 조단백 함량을 증대시켰다. 알코올 농도, 온도, 시간, 처리 횟수에 따른 조단백 함량을 확인하여 기질 고농도화 조건을 알코올 농도 70%(w/v), 65℃, 1시간, 4회 처리로 최적화 하였고, 조단백 함량을 68% 이상 ($70.25 \pm 0.88\%$)으로 고농도화 하였다.

(나) 항원성 물질 및 효소활성 저해인자 저감 기술

가수 및 열처리 기술을 활용하여 대두 단백질의 구조를 변형시켜 항원성 물질 및 효소활성 저해인자를 저감시켰다. 수분 함량 및 열처리 온도, 시간 조건에 따른 trypsin inhibitor 활성과 protease 반응속도를 확인하여 항원성 물질 및 효소활성 저해인자 저감 조건을 수분 55%, 열처리 온도 120℃, 1시간으로 최적화 하였으며, trypsin inhibitor 활성을 0.74mg/g으로 저감시켰다.

나) 복합효소 대량생산 기술

(1) 연구방법

(가) SSF 조건 및 SmF 조건 최적화

① LAP 고활성 미생물 활용한 protease, GLS 대량생산 SSF 조건 최적화

단백질의 분해와 관련된 protease가 매우 다양하게 존재하나 대부분의 효소는 좁은 범위의 기질 특이성을 가져 특정 기질에만 작용이 가능하다. Leucine aminopeptidase(LAP)는 기질 특이성이 넓은 protease로 단백질, 펩티드의 N 말단에 위치한 다양한 종류의 아미노산 결합을 분해하는 것이 가능하기에 저분자 펩티드, 아미노산 생산에 가장 효과적인 효소 중 하나이다. 이에 기 확보된 전통메주 유래 LAP 고활성 미생물 *Aspergillus oryzae* SMF119(KCTC12947BP, 특허등록 제 10-1829338호) 균주를 복합효소 대량생산 기술 연구에 활용하였다. Protease, glutaminase(GLS) 대량생산 solid state fermentation(SSF) 조건 확립을 위해 SMF119 생육에 필요한 탄소 영양원 농도 및 미네랄 영양원 종류, 농도 최적화 실험을 수행하였다.

㉞ 탄소 영양원 최적화 실험

기질 고농도화 처리를 거친 농축대두단백의 탄수화물은 대부분 비전분성 다당류로 곰팡이 생육에 활용되기 어려워 글루텐 프리 탄수화물 원료인 쌀(미분)을 탄소 영양원으로 활용하였다. 탄소 영양원의 혼합으로 저분자 펩티드, 아미노산의 기질인 조단백 함량이 감소하기에 적절한 비율로 혼합하는 것이 필요하다. 이에 쌀(미분) 혼합비율에 따른 고상발효 후 효소 활성 및 조단백 함량을 확인하였다. 농축대두단백 원료에 쌀(미분)을 혼합하고 원료 무게 대비 110%의 정제수를 가하여 수분 함량을 약 55%로 조절하였다. 이를 삼각 flask에 20g씩 넣고 autoclave를 이용하여 120°C 조건에서 1시간 동안 열처리를 진행한 뒤 30°C로 냉각하고 *Aspergillus oryzae* SMF119 균주를 접종하여 30°C 조건으로 40시간 동안 고상발효를 진행하였다. 고상발효 후 효소 활성으로 neutral protease, LAP, carboxypeptidase(CAP), glutaminase(GLS) 활성을 확인하였다.

㉟ Metalloenzyme 조절 미네랄 영양원 최적화 실험

LAP 효소는 metalloenzyme으로 zinc-binding motif sequence HEXXH가 존재하여 효소에 아연 이온을 포함하며, 효소 활성에 미네랄이 요구된다. 이에 미네랄 영양원을 활용하여 고상발효 시 효소 활성을 높일 수 있을 것으로 기대하여 미네랄 영양원의 종류 및 농도에 따른 효소 활성을 확인하였다. 농축대두단백 원료에 미네랄 영양원(Zn, Mn, K)의 농도가 100~1,800 ppm 수준이 되도록 원료 무게 대비 110%의 미네랄 용액을 가하였고, 이 때의 수분 함량은 약 55%였다. 이를 삼각 flask에 20g씩 넣고 autoclave를 이용하여 120°C 조건에서 1시간 동안 열처리를 진행한 뒤 30°C로 냉각하고 *Aspergillus oryzae* SMF119 균주를 접종하여 30°C 조건으로 40시간 동안 고상발효를 진행하였다. 고상발효 후 효소 활성으로 neutral protease, LAP, carboxypeptidase(CAP), glutaminase(GLS) 활성을 확인하였다. 미네랄 영양원에 의한 복합효소 생산 및 효소 활성의 종합적인 효과를 파악하기 위해 고상발효 후 NaCl 8%, 온도 45°C 조건에서 72시간 동안 효소반응을 진행하였다. 효소반응 후 whatman No.2 filter paper로 여과하여 여과액의 glutamic acid 함량을 확인하여 미네랄 영양원의 종류를 선정하였다.

마지막으로 최종 선정된 미네랄 영양원의 농도를 최적화하기 위해 pilot 고상발효기(YAEGAKI

Food & System, Inc)를 이용하여 고상발효 후 효소 활성을 확인하고, 효소반응 후 glutamic acid 함량을 확인하였다.



그림 2-2-1-9. Pilot 고상발효기(YAEGAKI Food & System, Inc)

㉔ GGT 고활성 미생물 활용한 GGT 대량생산 SmF 조건 최적화

코쿠미 성분인 gamma-glutamylpeptides(G-peptide)는 유리 아미노산과 디펩티드(dipeptide)가 공여체, 수용체 기질에 gamma-glutamyltransferase(GGT) 효소가 작용하는 생물전환 반응으로 제조된다. 기 확보한 전통메주 유래 GGT 고활성 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* SMB469(KCTC12822BP, 특허등록 제10-1749991호) 균주를 GGT 대량생산 기술 연구에 활용하였다. 또한 GGT 고활성 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* SMB469 선행연구 결과로 도출된 최적 배지 조성(soypeptone 5.3%, sucrose 2.3%, KH₂PO₄ 0.1%, NaCl 0.05%, MgSO₄ 2 mM, CaCl₂ 0.1mM)을 기본 배지로 활용하였다.

㉕ 질소 영양원 선정 실험

질소 영양원의 펩티드 분자량에 따른 SMB469 생육 및 GGT 활성을 확인하고자 기본 배지 내 질소 영양원인 soypeptone(분자량 10kDa 미만의 펩티드, 유리 아미노산 비율 70% 이상)을 soypeptide 10K(분자량 10kDa 미만의 펩티드, 유리 아미노산 비율 50% 이상), soypeptide 5K(분자량 5kDa 미만 펩티드, 유리 아미노산 비율 50% 이상), soypeptide 3K(분자량 3kDa 미만 펩티드, 유리 아미노산 비율 60% 이상)로 대체하여 액상발효 실험을 진행하였다. 멸균한 배지에 SMB469 균주를 10⁶ CFU/g 수준으로 접종하고 37°C, 72시간 동안 액상발효 후 생육(OD, 600nm) 및 GGT 활성을 확인하였다.

㉖ 탄소 영양원 선정 실험

탄소 영양원의 저분자 탄수화물의 비율에 따른 SMB469의 생육 및 GGT 활성을 확인하고자 기본 배지 내 탄소 영양원인 sucrose를 쌀(전분 70% 이상), 쌀발효액(glucose:maltose 비율=60:40), maltose, glucose로 대체하여 액상발효 실험을 진행하였다. 멸균한 배지에 SMB469 균주를 10⁶ CFU/g 수준으로 접종하고 37°C, 72시간 동안 액상발효 후 생육(OD, 600nm) 및 GGT 활성을 확인

하였다.

㉔ 반응표면분석을 이용한 배지조성 최적화 실험

변경된 질소 영양원(soy free 식물성 단백질 원료인 완두단백으로 제조한 peapeptide 3K)과 기본 배지 조성 중 선행연구에서 GGT 활성에 양의 상관관계를 나타낸 sucrose, yeast extract, Na₂HPO₄를 포함한 4개의 조절인자를 최적화하는 연구를 진행하였다. MiniTab 16 (Minitab Inc., State College, Pa, USA)을 이용하여 반응표면법 중 중심합성법(Central Composite Design)으로 4개의 인자에 대해 중심점 7개를 포함한 31개의 실험구를 설계하였으며, 각 실험구에 대해 3반복 실험하였다. 멸균한 배지에 SMB469 균주를 10⁶ CFU/g 수준으로 접종하고 37°C, 72시간 동안 액상 발효 후 생육(OD, 600nm) 및 GGT 활성을 확인하였다.

표 2-2-1-5. SMB469 배지조성 최적화를 위한 반응표면분석 실험의 조절인자

조절인자	(-1) 농도	(+1) 농도
Sucrose (%)	0.75	2.00
Peapeptide 3K (%)	2.00	5.00
Na ₂ HPO ₄ (%)	1.00	2.50
Yeast extract (%)	1.00	3.00

㉕ SBM269 배양조건 최적화 실험

최적화된 배지 조성을 활용하여 SMB469의 최적 생육온도인 37°C 조건에서 96시간 동안 액상 발효를 진행하면서 발효 시간대별 생육(OD, 600nm) 및 GGT 활성을 확인하였다.

(나) 실험방법

① 효소 추출

고상발효물의 효소 활성 분석을 위해 분쇄 후 2%(w/v) NaCl 용액을 가하여 25°C 에서 200rpm으로 30분간 교반 후 Whatman filter paper no.2로 여과한 여과액을 효소추출액으로 사용하였다.

② Neutral protease 활성

Protease 활성 분석을 위해 2% Casein을 기질로 하고 반응버퍼로 100 mM Phosphate Buffer (pH 7.0)를 사용하여 30°C 에서 20분간 반응하였다. Trichloroacetic acid를 첨가하여 반응을 정지시킨 뒤, 반응액을 No.4 (Whatman) 여과지로 여과하고, 여과액에 Na₂CO₃와 Folin 용액을 첨가하여 30°C 에서 20분간 반응한 뒤 660nm에서 흡광도를 측정하고 L-Tyrosine의 표준곡선을 이용하여 반응에 의해 생성된 유리물의 양과 효소의 활성을 계산하였다. 1 Unit은 분당 1 μ g의 tyrosine에 상당하는 단백질 분해물을 생성하는 효소의 양을 의미한다.

③ Leucine aminopeptidase(LAP) 활성

Leucine aminopeptidase 활성 분석을 위해 L-Leucine-p-Nitroanilide를 기질로 하고 반응버퍼로 50 mM Sodium Phosphate Buffer (pH 7.0)를 사용하여 50°C에서 10분간 반응한다. 얼음에 방치하여 반응을 정지시킨 뒤 405nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 반응에 의해 생성된 p-Nitroaniline의 양과 효소의 활성을 계산한다. 1 Unit은 분당 1 μ mole의 L-Leucine-nitroanilide을 분해하여 p-Nitroaniline을 생성하는 효소의 양을 의미한다.

④ Carboxypeptidase(CAP) 활성

Carboxypeptidase 활성 분석을 위해 기질로 0.5 mM Cbz-Glu-Tyr과 반응버퍼로 0.5 M Acetate buffer(pH3.0)를 사용하여 30°C에서 20분간 반응한다. Ninhydrin용액을 가하여 반응을 정지시키고 끓는 물에서 15분간 가열한 후에 급랭하여 상온에서 방치시킨다. 60% Ethanol을 첨가하고 교반한 후 5분간 정지한 후, 570 nm에서 흡광도를 측정한다. 1Unit의 Carboxypeptidase는 분당 1 μ mole의 Tyrosine을 생성하는 효소의 양을 의미한다.

⑤ Glutaminase(GLS) 활성

Glutaminase 활성 분석을 위해 기질로 100mM L-glutamine과 반응버퍼로 100mM Tris-HCl buffer (pH 7)를 사용하여 50°C에서 30분간 반응한다. 반응을 종료시키기 위해, 3N HCl을 가하여 교반한 후, 얼음에 5분간 방치한다. 이후, Cedex Bio - Bioprocess analyzer(Roche 社)를 이용하여 반응액내 생성된 L-glutamic acid 의 함량을 분석한다. 1Unit의 Glutaminase는 L-Glutamine을 분당 1.0 μ mole의 L-glutamic acid로 분해하는 효소의 양을 의미한다.

⑥ Gamma glutamyltransferase(GGT) 활성

Gamma glutamyltransferase 활성 분석을 위해 γ -glutamyl-p-Nitroanilide를 기질로 하고 반응버퍼로 50mM sodium phosphate Buffer (pH 8.0)를 사용하여 37°C에서 60분간 반응한다. 얼음에 방치하여 반응을 정지시킨 뒤 418nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 이용하여 반응에 의해 생성된 p-Nitroaniline의 양과 효소의 활성을 계산하였다. 1 Unit은 분당 1 μ mole의 기질을 분해하여 p-Nitroaniline을 생성하는 효소의 양을 의미한다.

⑦ 통계적 분석

모든 성분 분석은 3회 반복하여 MiniTab(MiniTab 17, Minitab Inc., USA)을 이용하여 통계적 유의성 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 분석을 수행하였다.

(2) 연구결과

(가) SSF 조건 및 SmF 조건 최적화

① LAP 고활성 미생물 활용한 protease, GLS 대량생산 SSF 조건 최적화

㉞ 탄소 영양원 최적화 실험 결과

단백질의 분해와 관련된 protease가 매우 다양하게 존재하나 대부분의 효소는 좁은 범위의 기질 특이성을 가져 특정 기질에만 작용이 가능하다. Leucine aminopeptidase(LAP)는 기질 특이성이 넓은 protease로 단백질, 펩티드의 N 말단에 위치한 다양한 종류의 아미노산 결합을 분해하는 것이 가능하기에 저분자 펩티드, 아미노산 생산에 가장 효과적인 효소 중 하나이다. 복합효소 대량생산 기술 연구에 활용한 *Aspergillus oryzae* SMF119(KCTC12947BP, 특허등록 제10-1829338호) 균주는 전통메주에서 발굴한 LAP 고활성 미생물이다.

농축대두단백 원료에 쌀(미분)을 비율 별로 혼합하여 고상발효 후 효소 활성 및 조단백 함량을 확인한 결과 쌀 혼합 비율이 증가할수록 효소 활성이 증가하다가 혼합 비율 40% 이상에서는 감소하는 경향으로 나타났다. 쌀 혼합 비율이 30% 이상 증가 시 고상발효 후 조단백 함량이 65% 미만으로 감소하는 것으로 확인되어 탄소 영양원인 쌀 혼합 비율을 20%로 설정하였다. 이 때의 효소 활성은 neutral protease 149U/g, LAP 7,484mU/g, CAP 1,585mU/g, GLS 1,785mU/g, 조단백 함량은 68.5%로 나타났다.

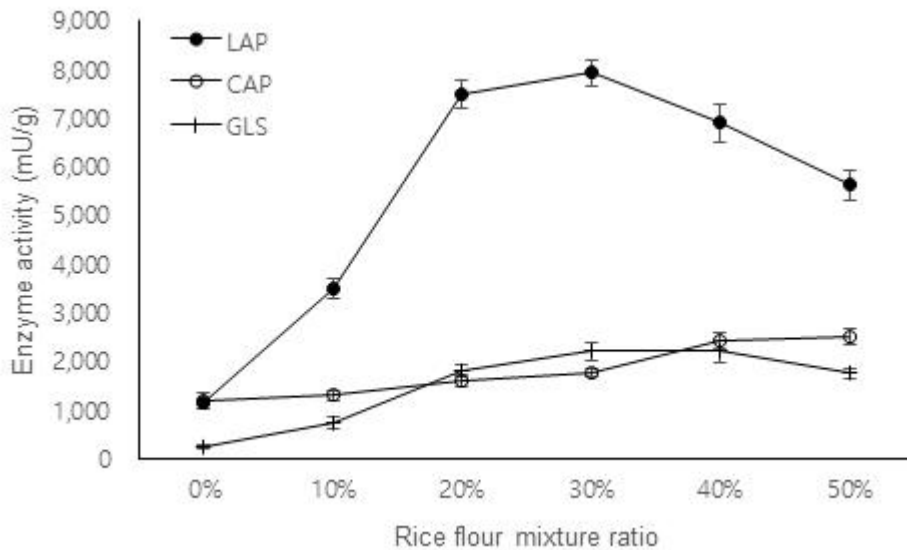


그림 2-2-1-10. 쌀 혼합비율에 따른 고상발효 후 효소 활성

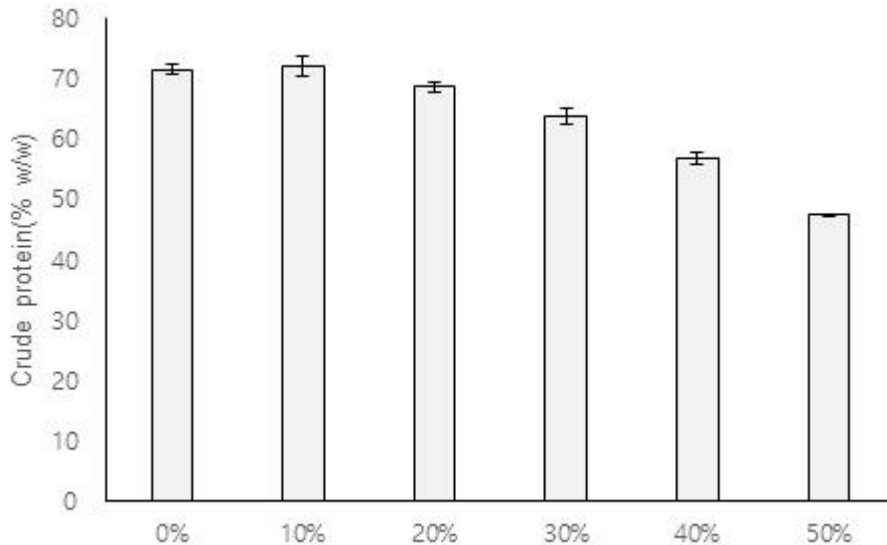


그림 2-2-1-11. 쌀 혼합비율에 따른 고상발효 후 조단백 함량

㊤ Metalloenzyme 조절 미네랄 영양원 최적화 실험

LAP 효소는 metalloenzyme으로 zinc-binding motif sequence HEXXH가 존재하여 효소에 아연 이온을 포함하며, 효소 활성화에 미네랄이 요구된다. 이에 미네랄 영양원을 활용하여 고상발효 시 효소 활성을 높일 수 있을 것으로 기대하여 미네랄 영양원의 종류 및 농도에 따른 효소 활성을 확인하였다. 농축대두단백에 미네랄 영양원(Zn, Mn, K)을 100~1,800 ppm 농도로 첨가하여 flask scale로 고상발효를 수행한 결과 아연 이온은 LAP, 망간 이온은 CAP, 칼륨 이온은 GLS 활성화 증가에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 미네랄 영양원에 의한 복합효소 생산 및 효소 활성의 종합적인 효과를 파악하기 위해 고상발효 후 NaCl 8%, 온도 45°C 조건에서 72시간 동안 효소반응을 진행하였다. 효소반응 후 whatman No.2 filter paper로 여과하여 여과액의 glutamic acid 함량을 확인한 결과 아연 이온을 첨가한 실험구의 glutamic acid 함량이 1.5~1.7%(w/v) 수준으로 가장 높게 나타났다.

아연 이온의 첨가 농도 범위를 100~1,200 ppm으로 좁히고, 그 간격을 세분화하여 pilot 고상발효기(YAEGAKI Food & System, Inc)로 고상발효와 효소반응을 진행하였다. 그 결과 아연 이온의 첨가 농도가 증가할수록 LAP, CAP, GLS 활성이 증가하여, 925 ppm 처리 시 LAP 12,225 mU/g, CAP 1,676 mU/g으로 가장 높은 활성을 나타냈다. 아연 이온 375 ppm 처리 시 GLA 활성이 1,968 mU/g으로 가장 높았고, 효소반응 후 여과액의 glutamic acid 역시 1.45%(w/v)로 가장 높은 함량으로 나타나 미네랄 영양원으로 아연 이온을 선정하였고, 처리 농도는 375 ppm으로 설정하였다.

미네랄 영양원의 처리에 따른 고상발효 후 효소 활성과 효소반응 후 glutamic acid 함량을 확인하여 미네랄 영양원의 종류 및 농도를 최적화(아연 이온, 375 ppm) 하였으며, 이 때의 효소 활성은 LAP 8,482 mU/g, CAP 1,595 mU/g, GLS 1,968 mU/g으로 나타났다.

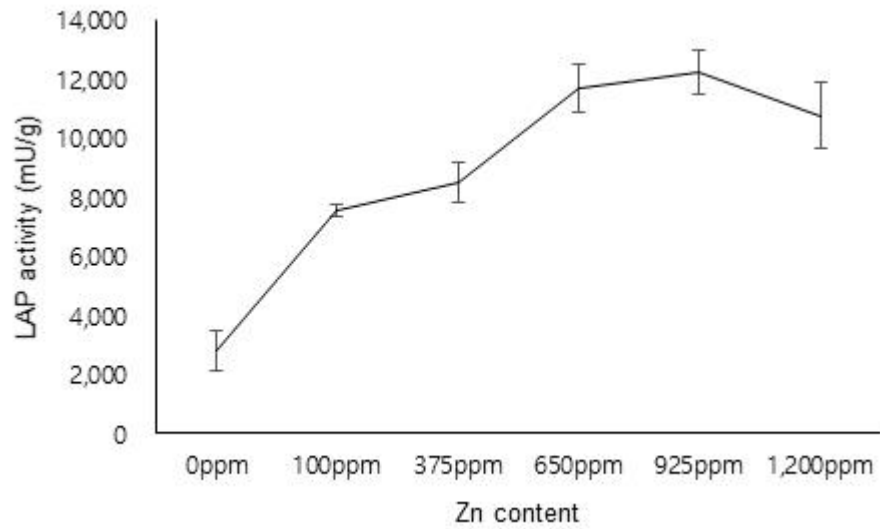


그림 2-2-1-12. 아연 이온의 처리 농도에 따른 고상발효 후 LAP 활성

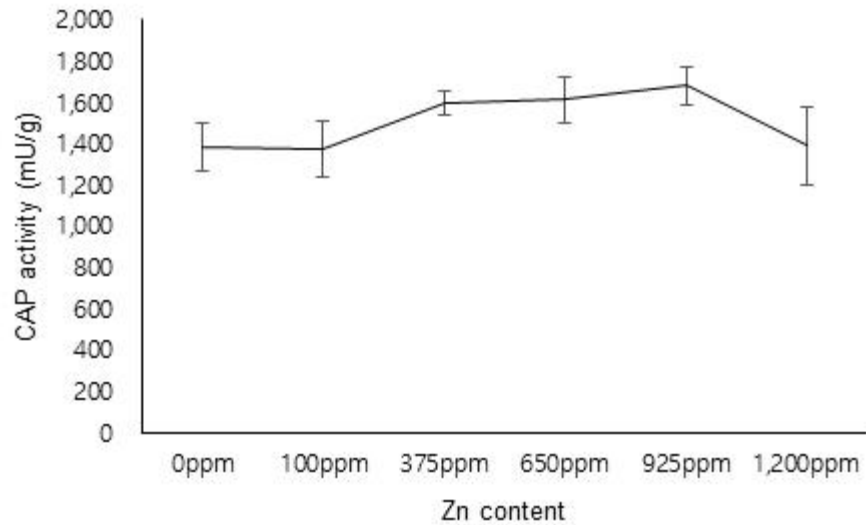


그림 2-2-1-13. 아연 이온의 처리 농도에 따른 고상발효 후 CAP 활성

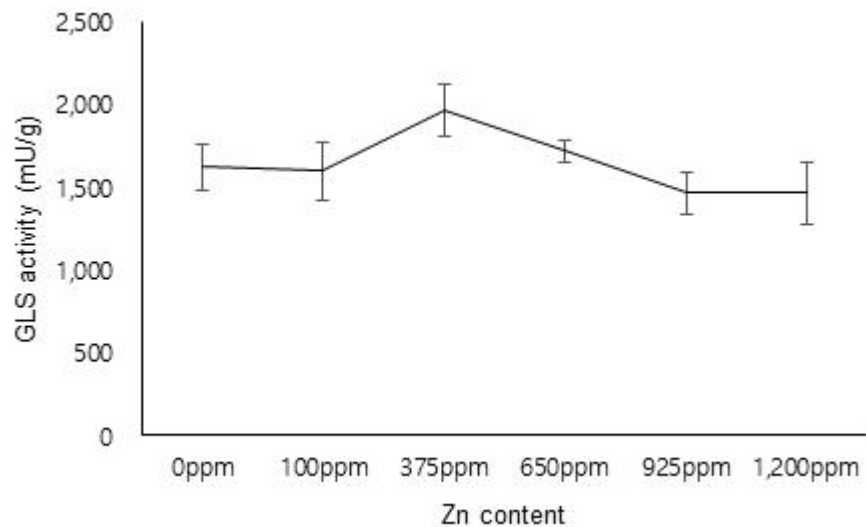


그림 2-2-1-14. 아연 이온의 처리 농도에 따른 고상발효 후 GLS 활성

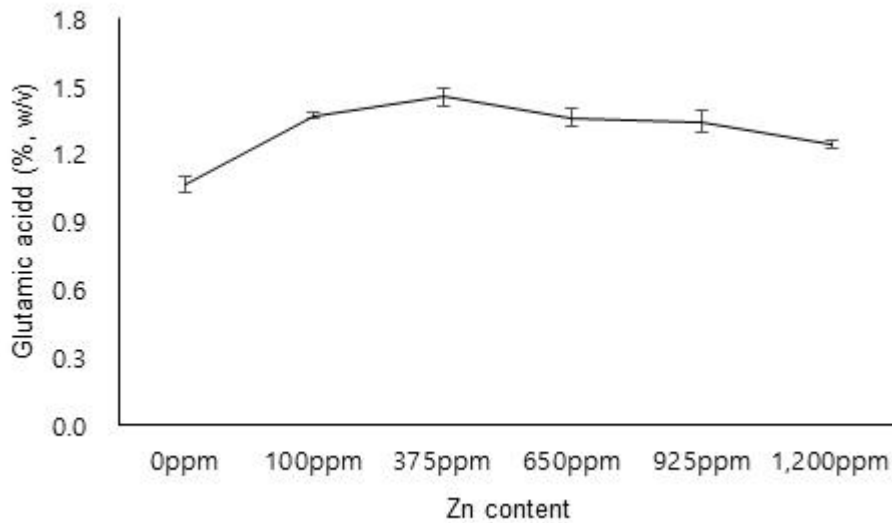


그림 2-2-1-15. 아연 이온의 처리 농도에 따른 효소반응 후 glutamic acid 함량

② GGT 고활성 미생물 활용한 GGT 대량생산 SmF 조건 최적화

다섯 가지 기본 맛(짠맛, 단맛, 신맛, 쓴맛, 감칠맛) 이외에 코쿠미(KOKUMI)가 하나의 맛으로 인정받고 있다. 코쿠미는 식품의 기호성을 향상시키는 중요한 요소로서 다양한 맛, 향, 식감 자극을 유발하는 독특한 감각으로서 복합성(complexity), 농후함(mouthfulness), 지속성(continuity)으로 표현한다. 코쿠미 특성을 지니는 물질 중 낮은 농도로도 효과가 있는 glutathione이나 gamma-EVG와 같은 gamma-glutamylpeptides(G-peptide)가 잘 알려져 있다. 이 물질은 미각세포에 존재하는 CaSR(calcium-sensing receptor)에 agonist로 작용하여 단맛, 짠맛, 감칠맛과 함께 kokumi를 향상시키는 것으로 보고되어 있다. G-peptide는 자연계에 널리 존재하며, 식품에서는 특히 간장, 치즈, 젓갈과 같은 발효식품에 존재하는 것으로 밝혀져 있다. *Penicillium roquefortii*, *Bacillus* spp., 유산균과 같은 발효 미생물은 gamma-glutamyltransferase(GGT)를 생산 가능하다. GGT 활성화에 의해 유리 아미노산과 디펩티드(dipeptide)가 공여체, 수용체 기질로 활용되어 G-peptide로 생물전환 된다.

기 확보한 전통메주 유래 GGT 고활성 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* SMB469(KCTC12822BP, 특허등록 제10-1749991호) 균주를 GGT 대량생산 기술 연구에 활용하였다. 또한 GGT 고활성 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* SMB469 선행연구 결과로 도출된 최적 배지 조성(soyptone 5.3%, sucrose 2.3%, KH_2PO_4 0.1%, NaCl 0.05%, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 0.1mM)을 기본 배지로 활용하였다.

㉞ 질소 영양원 선정 실험 결과

기본 배지 내 질소 영양원인 soyptone(분자량 10kDa 미만의 펩티드, 유리 아미노산 비율 70% 이상)을 soyptone 10K(분자량 10kDa 미만의 펩티드, 유리 아미노산 비율 50% 이상), soyptone 5K(분자량 5kDa 미만의 펩티드, 유리 아미노산 비율 50% 이상), soyptone 3K(분자량 3kDa 미만의 펩티드, 유리 아미노산 비율 60% 이상)로 대체하여 액상발효 실험을 진행하였다.

SMB469의 생육(OD, 600nm) 및 GGT 활성을 확인한 결과 soyptone 3K를 질소 영양원으로 사용 시 GGT 활성이 6,900 mU/g으로 가장 높게 나타났다. 질소 영양원의 펩티드 분자량에 따른 바실러스 생육 변화는 나타나지는 않았다. 따라서 GGT 대량생산 액상발효 조건 최적화를 위한 질소

영양원을 soypeptide 3K로 선정하였다. 이후 배지조성 최적화 연구에서는 완두단백을 원료로 제조한 peapeptide 3K(3kDa 미만 펩티드, 유리 아미노산 비율 50% 이상으로 soypeptide 3K와 유사)를 질소 영양원으로 하여 실험을 진행하였다.

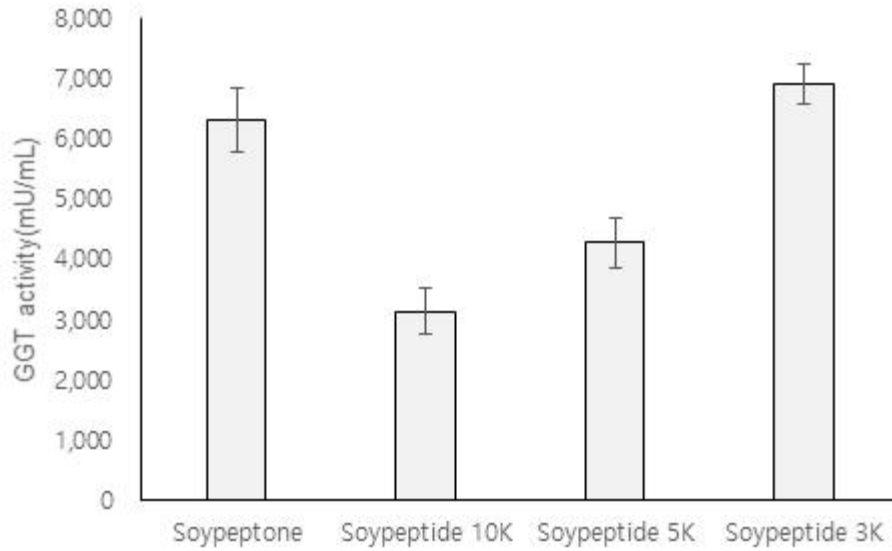


그림 2-2-1-16. 질소 영양원 종류에 따른 SMB469 액상발효 후 GGT 활성

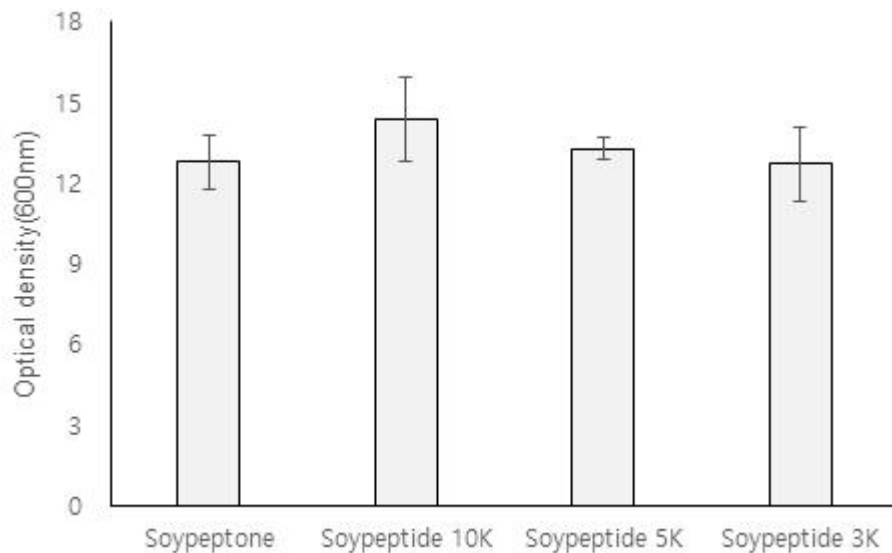


그림 2-2-1-17. 질소 영양원 종류에 따른 SMB469 액상발효 후 생육(OD)

㉔ 탄소 영양원 선정 실험

탄소 영양원의 저분자 탄수화물의 비율에 따른 SMB469의 생육 및 GGT 활성을 확인하고자 기본 배지 내 탄소 영양원인 sucrose를 쌀(전분 70% 이상), 쌀발효액(glucose:maltose 비율=60:40), maltose, glucose로 대체하여 액상발효 실험을 진행하였다. 액상발효 후 SMB469 생육(OD, 600nm) 및 GGT 활성을 확인한 결과 대체 원료 사용 시 기본 배지 대비 바실러스 생육(OD) 수준은 유사하였으나 GGT 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 GGT 대량생산 액상발효 조건 최적화를 위한 탄소 영양원을 sucrose로 선정하였다.

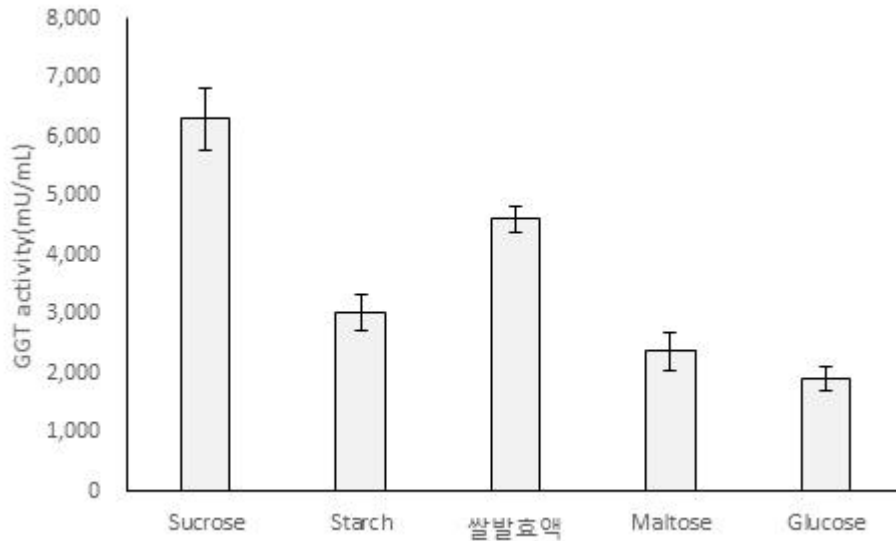


그림 2-2-1-18. 탄소 영양원 종류에 따른 SMB469 액상발효 후 GGT 활성

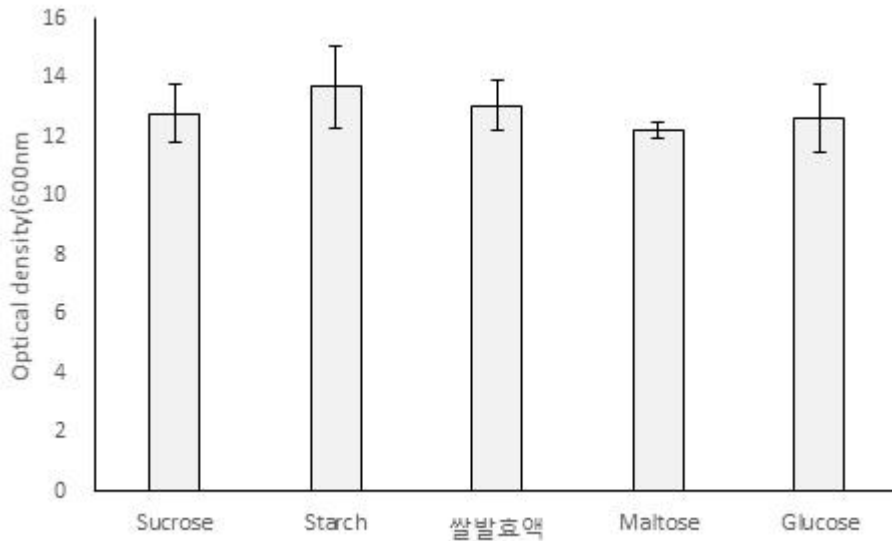


그림 2-2-1-19. 탄소 영양원 종류에 따른 SMB469 액상발효 후 생육(OD)

㊤ 반응표면분석을 이용한 배지조성 최적화 실험

SMB469 액상발효 배지조성 최적화를 위해 변경된 질소 영양원(soy free 식물성 단백질 원료인 완두단백으로 제조한 peapeptide 3K)과 sucrose, yeast extract, Na_2HPO_4 를 포함한 4개의 조절인자로 하여 반응표면법 중 중심합성법(Central Composite Design)으로 4개의 인자에 대해 중심점 7개를 포함한 31개의 실험구를 설계하여 실험을 진행하였다.

표 2-2-1-6. SMB469 배지조성 최적화를 위한 반응표면분석 실험계획 및 결과

Run Order	조절 인자				반응값	
	Sucrose	Peapeptide 3K	Na ₂ HPO ₄	Yeast extract	GGT (mU/ml)	OD
1	-1	1	-1	1	3,399±123	4.10±0.06
2	2	0	0	0	4,816±52	9.02±0.10
3	-1	-1	1	-1	2,296±77	11.07±0.22
4	0	-2	0	0	2,370±10	11.45±0.42
5	-1	1	1	1	3,150±37	4.90±0.10
6	1	1	-1	-1	4,705±52	4.47±0.27
7	1	1	1	-1	4,893±100	8.79±0.26
8	0	0	0	0	4,583±60	5.52±0.30
9	1	-1	-1	1	4,370±56	9.29±0.15
10	0	0	0	2	4,766±110	5.43±0.03
11	1	-1	1	1	4,551±10	15.39±0.06
12	0	0	0	-2	4,799±41	17.37±0.06
13	1	-1	-1	-1	4,197±134	19.63±0.12
14	-1	-1	1	1	3,669±65	4.63±0.01
15	-1	-1	-1	1	3,208±5	3.44±0.01
16	0	0	0	0	3,712±24	4.58±0.04
17	1	1	-1	1	4,247±40	4.59±0.02
18	0	0	-2	0	3,881±27	2.81±0.00
19	-1	-1	-1	-1	2,547±30	7.53±0.03
20	1	1	1	1	3,759±93	3.73±0.02
21	0	0	0	0	4,030±282	5.05±0.17
22	1	-1	1	-1	3,341±64	20.11±0.10
23	-1	1	1	-1	3,362±50	5.16±0.05
24	-2	0	0	0	1,890±23	3.60±0.02
25	-1	1	-1	-1	3,306±37	3.73±0.11
26	0	0	0	0	4,316±4	4.18±0.02
27	0	2	0	0	3,146±19	4.24±0.01
28	0	0	0	0	4,266±50	4.85±0.03
29	0	0	0	0	4,522±44	5.13±0.02
30	0	0	2	0	4,147±42	5.09±0.01
31	0	0	0	0	4,038±87	4.77±0.04

각 조절인자에 따른 반응값인 GGT 활성, 바실러스 생육(OD) 결과에 대해 회귀분석을 진행하여 반응표면 회귀식과 유의성을 검토하였다. 회귀분석 결과 sucrose, peapeptide 3K, yeast extract

함량은 GGT 활성과 생육(OD)에 영향을 나타내었으며, Na₂HPO₄의 함량은 영향이 없었다. 반응표면분석 모델에서 최대 GGT 활성은 5,994 mU/mL로 예측되었고, 이 때의 최적 조건은 sucrose 2.6%, peapeptide 3K 5.2%, yeast extract 0%, Na₂HPO₄ 0%로 나타났다. 반응표면분석 모델에서 예측된 최적 조건의 적합성을 확인하기 위해 최대 GGT 활성으로 예측된 배지조성으로 액상발효 실험을 진행한 결과 GGT 활성이 6,217 mU/mL로 나타났다.

표 2-2-1-7. GGT 활성에 대한 중심합성법의 회귀분석 결과

Term	Coef	P-Value
Constant	4.1527	0.000
Sucrose (A)	0.6241	0.000
Peapeptide 3K (B)	0.1748	0.000
Yeast extract (D)	0.0620	0.044
Sucrose*Sucrose (AA)	-0.2148	0.000
Peapeptide 3K*Peapeptide 3K (BB)	-0.3635	0.000
Yeast extract*Yeast extract (DD)	0.1426	0.000
Sucrose*Yeast extract (AD)	-0.1426	0.000
Peapeptide 3K*Yeast extract (BD)	-0.3109	0.000
$\text{GGT} = -2.278 + 2.966A + 1.662B + 0.530D - 0.5498AA$ $- 0.1616BB + 0.1426DD - 0.2277AD - 0.2073BD$		
R-sq = 90.64% R-sq(pred) = 88.83% R-sq(adj) = 89.75%		

표 2-2-1-8. SMB469 생육(OD)에 대한 중심합성법의 회귀분석 결과

Term	Coef	P-Value
Constant	4.767	0.000
Sucrose (A)	2.178	0.000
Peapeptide 3K (B)	0.898	0.000
Na ₂ HPO ₄ (C)	-2.752	0.000
Yeast extract (D)	-1.977	0.000
Sucrose*Sucrose (AA)	0.502	0.014
Peapeptide 3K*Peapeptide 3K (BB)	0.885	0.000
Yeast extract*Yeast extract (DD)	1.774	0.000
Sucrose*Peapeptide 3K (AB)	-2.128	0.000
Peapeptide 3K*Yeast extract (BD)	0.871	0.002
Na ₂ HPO ₄ *Yeast extract (CD)	-0.586	0.032
$\text{GGT} = 13.01 + 7.90A - 2.629B + 2.760C - 9.74D + 1.285AA$ $+ 0.3934BB + 1.774DD - 2.270AB + 0.581BD - 0.781CD$		
R-sq = 86.55% R-sq(pred) = 81.64% R-sq(adj) = 84.91%		

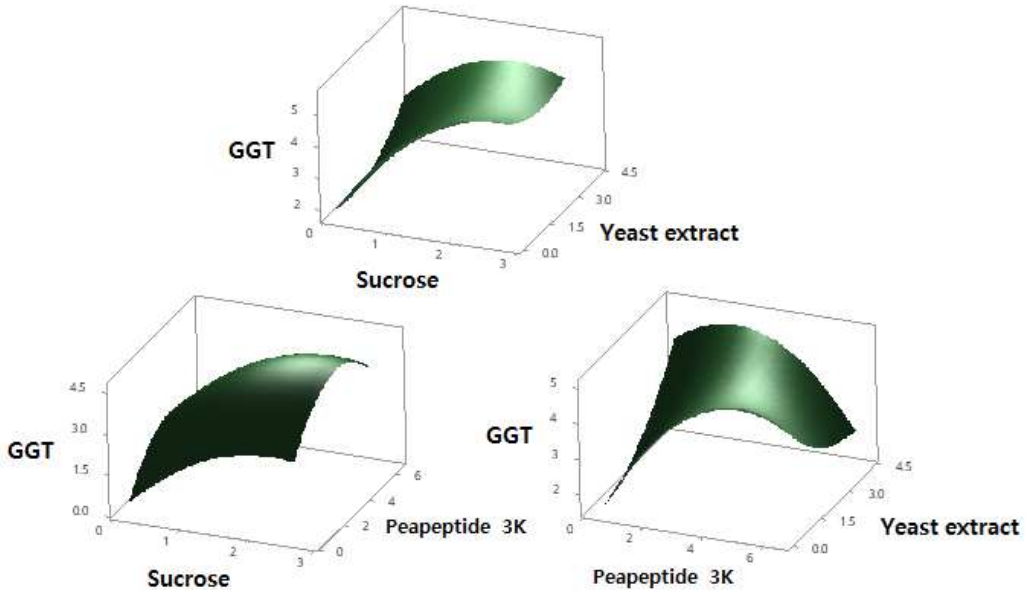


그림 2-2-1-20. GGT 활성에 대한 배지조성 최적화 plot

㉔ SBM269 배양조건 최적화 실험

SMB469 배양조건을 최적화하기 위해 최적화한 배지 조성을 활용하여 최적 생육온도인 37°C 조건에서 96시간 동안 액상발효를 진행하였다. 그 결과 배양 12시간부터 GGT 활성이 나타나기 시작하였고, 이후 지속적으로 증가하여 액상발효 84시간에 6,088 mU/mL을 나타내었다. 바실러스 생육(OD)은 배양 24시간까지 급격히 증가하다 이후 정체기가 시작되어 배양 60시간부터 감소하는 경향을 나타내었다. GGT 생산 프로세스의 간소화를 위해 액상발효 시간을 72시간으로 설정하였다(5,765 mU/mL).

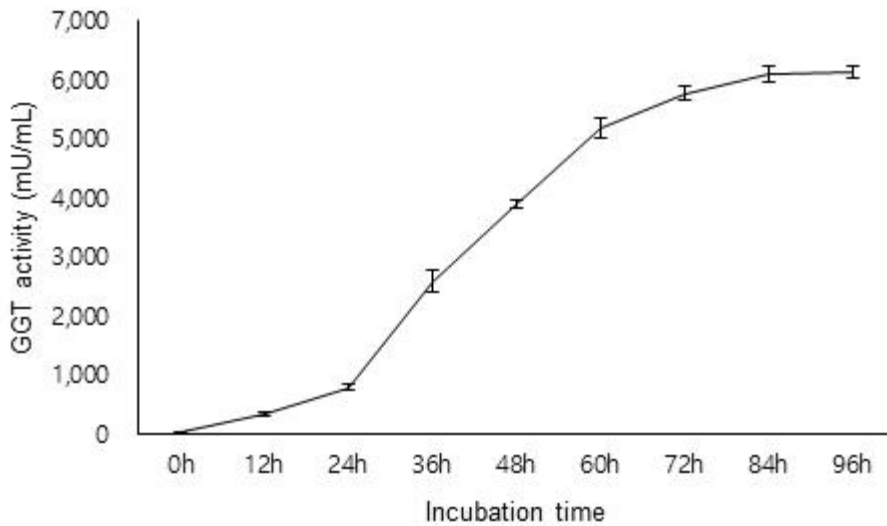


그림 2-2-1-21. SMB469 액상발효 시간에 따른 GGT 활성

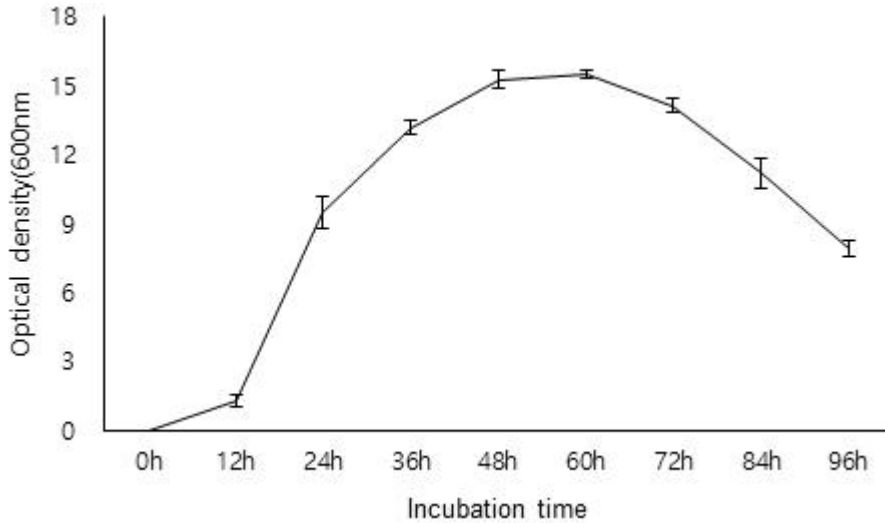


그림 2-2-1-22. SMB469 액상발효 시간에 따른 생육(OD)

(3) 결론

(가) LAP 고활성 미생물 활용한 protease, GLS 대량생산 SSF 조건 최적화

전통메주 유래 LAP 고활성 미생물 *Aspergillus oryzae* SMF119(KCTC12947BP, 특허등록 제 10-1829338호) 균주를 활용하여 복합효소 대량생산 기술 연구를 수행하였다. 글루텐 프리 탄수화물 원료인 쌀을 활용하여 곰팡이 생육을 위한 탄소 영양원 혼합비율을 최적화 하였다. Metalloenzyme인 LAP 활성을 높이기 위해 필요한 미네랄 영양원 종류 및 혼합비율을 최적화 하였다. 그 결과 쌀 혼합 비율 20%, 아연 이온 375ppm으로 SSF 조건을 최적화 하였고, 이 때 효소 활성은 LAP 8,482 mU/g, CAP 1,595 mU/g, GLS 1,968 mU/g으로 나타났다.

(나) GGT 고활성 미생물 활용한 GGT 대량생산 SmF 조건 최적화

전통메주 유래 GGT 고활성 미생물 *Bacillus amyloliquefaciens* SMB469(KCTC12822BP, 특허등록 제10-1749991호) 균주를 활용하여 GGT 대량생산 기술 연구를 수행하였다. 펩티드 분자량 및 저분자 탄수화물 비율에 따른 SMB 469 생육 및 GGT 활성을 확인하여 질소 영양원, 탄소 영양원 종류를 peapeptide 3K, sucrose로 선정하였다. GGT 대량생산을 위해 반응표면분석을 이용하여 배지조성을 최적화 하였고, 액상발효 시간을 설정하였다. 그 결과 배지조성은 peapeptide 3K 5.2%, sucrose 2.6%, KH_2PO_4 0.1%, NaCl 0.05%, MgSO_4 2 mM, CaCl_2 0.1mM, 액상발효 72시간으로 SmF 조건을 최적화 하였고, 이 때 GGT 활성은 5,765 mU/mL로 나타났다.

2) 식물성 발효향미모듈-2 개발

가) 미생물 대사체 조절 기술 개발

(1) 실험방법

(가) 미생물 분리

시료 10g 채취하여 멸균수에 10배 희석법으로 희석한 후 stomacher(Interscience, France)로 2분간 균질화하고 10진법에 따라 멸균 생리식염수로 희석 평판배양법을 이용하여 PDA medium(DB Difco, USA)에 도말한 후, 25°C 에서 72~96시간 aerobic 조건으로 배양, 획득된 단일 콜로니를 추가 순수분리 하였음.

(나) 미생물 동정

선별된 미생물은 28S rDNA 결정법으로 동정하였으며 균주의 28S rRNA를 universal primer 를 사용하여 증폭시켰다. PCR purification KIT를 이용하여 정제된 PCR product의 염기서열을 제노텍(주)에 의뢰하여 유전 정보를 확보하고, 그 정보를 EzTaxon server 2.1(Jongsik Chun)에서 identify 하였음.

(다) 알코올 생성력 분석

순수 분리된 미생물은 알코올 생성력을 확인하기 위해 유리당 20% 쌀당화 배지에 접종 배양 (25~30°C, 72~120시간)하여 알코올 함량을 분석하였음

알코올 분석 방법은 정확한 값을 확인하기 위해 Density meter(DMA-4500M, Anton Paar) 장비를 사용하였음. 분석 시료를 수기에 담아 용량을 맞춘 후 알코올 분석 장치에 연결하여 가열하면서 증류를 진행하였음. 증류가 완료된 시료를 15°C 조건에서 mass-up하여 최종 분석 시료를 제조하였고 Density meter에 주입하여 분석 결과를 확인하였음.

(라) 향 생성력 분석

순수 분리된 미생물은 향 생성력을 확인하기 위해 유리당 20% 쌀당화 배지에 접종, 배양 (10~20 °C, 15~18일간)하여 GC분석을 진행하였음.

GC분석 방법은 배양액 5종의 휘발성 향기성분 추출은 SPME(Solid Phase Microextraction)을 이용하였고, 향기성분 동정은 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry)를 통해 얻은 mass spectral data와 retraction index(RI) value를 이용함. 향기성분의 정량은 SPME 추출 시에 내부표준 물질로 1000 mg/L 3-heptanol를 이용하여 최종 농도 1000 μ g/L로 첨가하여 internal standard 법으로 진행함. 모든 분석은 1반복으로 진행됨. Mass spectral data는 NIST MS Search 2.2 Library와 manual interpretation를 통해 비교 분석하였고, 검출된 Peak detection은 Xcalibur 프로그램 내의 ICIS 알고리즘에 의해 detection하여 계산함. RI는 외부표준물질로 사용된 alkanes(C8-C20)의 머무름 시간과 비교하여 계산함.

표 2-2-1-9. 휘발성 향기성분 분석 조건

SPME 조건	
Fiber	DVB/CAR/PDMS(Supelco)
Adsorption	40 °C, 250 rpm, 20 min
Incubation	40 °C, 250 rpm, 30 min
Desorption	220 °C, 1 min
Sample	5 g sample in 20 ml vial*
GC-MS 조건	
GC-MS	TRACE 1310 gas chromatograph, ISQ LT mass spectrometer (ThermoFisher)
Column	DB-WAX (30 m length x 0.25 mm I.D x 0.25 μ m film thickness)
Carrier gas	He (flow rate 1.0 ml/min)
Oven temp.	40°C(hold 5min) →5°C/min →220°C(hold 5min)
Injector temp.	220 °C
MS transfer line temp.	220 °C
Ion source temp.	250 °C
Split ratio	Splitless
Mass spectra ionization energy	70eV
Mass scan range	40-550 a.m.u
Total runtime	48 min

(2) 연구결과

(가) 분리 효모의 28S rDNA 분석을 통한 동정 결과

분리 효모에 대한 동정 결과, 동일한 균주를 제외하여, 최종적으로 5종의 효모 동정을 완료하였음.

표 2-2-1-10. 선별 균주의 동정결과

시료	고유번호	Identify Analysis	Similarity(%)
전통누룩, 전통주	SMY 63	<i>S. cerevisiae</i>	100.00
	SMY 71	<i>S. cerevisiae</i>	99.85
	SMY 72	<i>S. cerevisiae</i>	99.93
	SMY 74	<i>S. cerevisiae</i>	100
	SMY 75	<i>S. cerevisiae</i>	100

(나) 알코올 생성력 비교 결과

전통누룩, 전통주로부터 분리한 5종의 효모로부터 알코올 생성 능력을 분석한 결과 10.9 % ~ 13.7%로 나타났으며, 알코올 생성력은 SMY 63, SMY 71, SMY 72, SMY 74 4종은 양호한 수준이었음.

표 2-2-1-11. 분리 균주에 대한 알코올 생성력 분석 결과

고유번호	균주명	알코올(v/v%)	pH
SMY 63	<i>S. cerevisiae</i>	13.7	4.50
SMY 71	<i>S. cerevisiae</i>	12.8	4.53
SMY 72	<i>S. cerevisiae</i>	12.5	4.37
SMY 74	<i>S. cerevisiae</i>	12.3	4.10
SMY 75	<i>S. cerevisiae</i>	10.9	4.50

(다) 향 생성력 비교 결과

분리, 동정 균주에 대해 향 생성력을 비교 분석한 결과 SMY 72 균주가 신선한 과일향 계열의 향(ethyl butyrate, ethyl caproate, ethyl lactate 등)을 생성하는 것으로 나타남.

표 2-2-1-12. 분리 효모에 대한 주요 향 성분 비교 결과

고유번호	균주명	향 성분
SMY-63	<i>S. cerevisiae</i>	Ethyl caproate, Isoamyl acetate
SMY-71	<i>S. cerevisiae</i>	Ethyl alcohol, Ethyl acetate
SMY-72	<i>S. cerevisiae</i>	Ethyle caproate, Ethyl butyrate, Ethyl lactate
SMY-74	<i>S. cerevisiae</i>	Ethyl butyrate, Ethyl alcohol, Ethyl acetate
SMY-75	<i>S. cerevisiae</i>	Ethyl alcohol, Ethyl acetate

(라) 향미 생성력이 우수한 미생물 균주 선발 결과

쌀(미분)을 효소 처리하여 액당화시킨 당화액에 발효식품으로부터 분리 동정한 효모 5종을 1% 접종하여 알코올 발효를 통한 향미, 이화학성분을 분석 비교하여 균주를 선발하였음. 이 때 알코올 발효는 10~20℃에서 10~15일간 진행하였음.

알코올 발효 결과에 따라 과실향, 단향과 고소한향의 향미특성을 갖는 *S.cerevisiae* SMY72 균주를 최종 균주로 선정하였음. 복합 발효를 위한 유산균은 자사에서 보유 중인 SMB092(*L.paracasei*) 균주를 사용함.

표 2-2-1-13. 효모 균주별 이화학 성분 및 향미특성 비교

고유번호	균주명	알코올(v/v%)	pH	향미특성
SMY-63	<i>S. cerevisiae</i>	13.7	4.50	약한 과실향, 알콜취 깨끗한 맛
SMY-71	<i>S. cerevisiae</i>	12.8	4.53	과실향, 짙은맛, 신맛, 쓴맛
SMY-72	<i>S. cerevisiae</i>	12.5	4.37	과실향, 단향, 고소한향, 신맛
SMY-74	<i>S. cerevisiae</i>	12.3	4.10	쿰쿰한 향, 느끼한 맛, 단밤향
SMY-75	<i>S. cerevisiae</i>	10.9	4.50	과일신향, 짙은 맛, 발효취

(마) Multi-metaomics

알코올 발효를 통해 얻고자 하는 향 성분은 신선한 과실향 계열인 ethyl caproate, ethyl butyrate, ethyl lactae 성분이며, 또한 계열은 스위트 허브계열인 vanillin, 4-vinylguaiacol(4-VG) 성분임. 효모로부터 vanillin, 4-VG 생성을 위한 관련 pathway, 관여 효소를 구명 하고자 함.

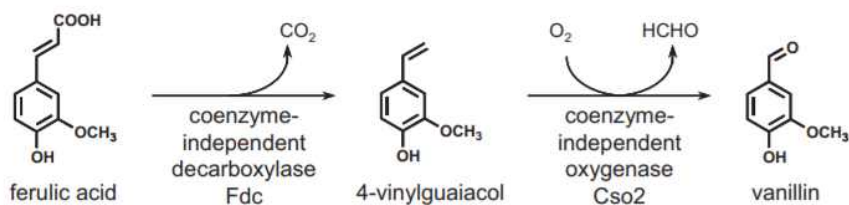
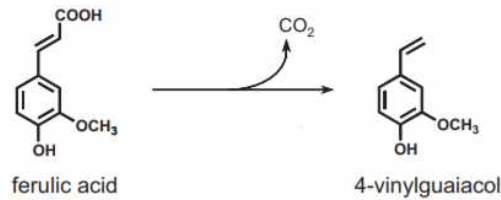


그림 2-2-1-23. 향기성분 vanillin 생성 기질, pathway 및 관련 enzyme

(출처: New Biotechnology volume 32, number3, May 2015)

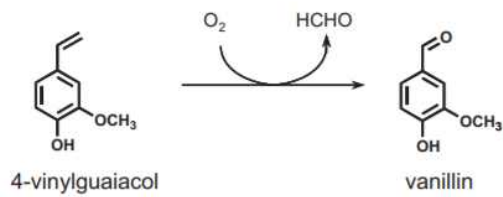
① Coenzyme-independent decarboxylase(fdc)의 작용

- Reaction



② Coenzyme-independent oxygenase(Cso2)의 작용

- Reaction



나) 3단계 신선액상발효 기술 개발

(1) 실험방법

(가) Glucose 분석 방법

시료 1mL을 채취하여 원심분리(4°C, 14,000rpm)를 통해 상등액을 획득하여 멸균수에 10배 희석법으로 희석한 후 glucose 분석 장비(Cedex bio, Roche)를 이용하여 분석하였음.

(나) 산도 분석 방법

시료 10g을 EasyPlus™ 자동 적정기(METTLER TOLEDO)를 사용하여 0.1N NaOH 용액으로 pH 7.2에 도달할 때까지의 적정량인 산도(mL)를 확인하였고 총산 함량은 유산균 발효를 통해 생성된 젖산 유기산 상당량(0.009)을 적용하여 계산하였음.

(다) 효모수 분석 방법

시료 100 μ L를 채취하여 멸균수에 10배 희석법으로 10⁵까지 희석하고 효모 배양용 고체 배지(Potato Dextrose Agar)에 100 μ L를 분주하고 실험용 멸균 spreader를 이용하여 도말한 후 30°C 인큐베이터에서 48~72hr 배양한 후 cell counting 방법으로 효모 균수를 확인함.

(라) 유산균수 분석 방법

시료 100 μ L를 채취하여 멸균수에 10배 희석법으로 10⁵까지 희석하고 유산균 배양용 고체 배지(Lactobacilli MRS)에 100 μ L를 분주하고 실험용 멸균 spreader를 이용하여 도말한 후 37°C 인큐베이터에서 48~72hr 배양한 후 cell counting 방법으로 유산균 균수를 확인함.

(마) 향기성분 분석 방법

휘발성 향기성분 추출은 SPME(Solid Phase Microextraction)을 이용하였고, 향기성분 동정은 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry)를 통해 얻은 mass spectral data와 retraction

index(RI) value를 이용함. 향기성분의 정량은 SPME 추출 시에 내부표준물질로 1000 mg/L 3-heptanol를 이용하여 최종 농도 1000 $\mu\text{g/L}$ 로 첨가하여 internal standard법으로 진행함.

(2) 연구결과

(가) 종, 전배양 조건 확립

① 종배양 조건

종배양 배지는 알코올 발효를 위해 쌀을 액당화하여 만든 쌀당화액(20%)를 10% 희석 제조하여 멸균하여 사용하였고 쌀당화액 배지 5mL에 유산균과 효모 균주를 각각 접종하여 37°C, 30°C에서 24시간 정치배양하여 전배양 배지에 5% 접종하여 사용함.

② 전배양 조건

전배양 배지는 종배양 배지와 동일한 10% 쌀당화액 배지를 사용함. 유산균과 효모 균주를 종배양액을 각각 5% 접종하여 37°C, 25°C에서 1~2일 정치배양하여 본 배양에 1% 접종하여 사용함.

(나) 발효 조건 확립

① 액당화

아래 표와 같은 비율로 담금을 한 후 알코올 발효에 필요한 포도당을 생성하기 위해 액화(70°C, 2hr)공정과 당화(60°C, 16~20hr)공정을 진행하였음. 20시간 당화공정을 거쳐 포도당 함량이 20%에 도달하여 당화공정을 종료하였음.

표 2-2-1-14. 액당화 담금 비율

원재료명	첨가량(w/w %)
쌀(미분)	23.27
액화효소(BAN 480L)	0.06
당화효소(AMG 300L)	0.06
단백분해효소(SUMIZYME LP50)	0.005
정제수	76.6
합계	100

② 알코올 발효

발효 조건은 정치배양으로 초기 37°C에서 25°C, 13°C로 배양온도를 단계적으로 낮추어 조절하였고 발효 추적분석(알코올, 포도당, pH, 산도, 미생물)을 통해 알코올발효 진행상황을 확인하였음

산도는 3일차부터 점차 증가하기 시작하였으며 포도당함량은 발효 3일차까지 큰 변화는 없었으며 3일차 이후 포도당함량이 감소하면서 알코올이 생성되었음. 미생물 균수는 유산균과 효모 균주 모두 발효 6일차까지 서서히 증가하여 각각 9.2×10^8 cfu/mL, 1.9×10^8 cfu/mL를 나타내었고 이후 감소하는 경향을 보임

표 2-2-1-15. 발효기간에 의한 이화학 성분 및 미생물 분석 결과

일차	알코올 (v/v%)	포도당 (w/v%)	pH	산도 (mL)	효모 (CFU/mL)	유산균 (CFU/mL)
1일차	-	21.0	6.2	1.4	-	1.5E+07
3일차	0.2	20.2	3.8	8.2	1.1.E+06	3.0E+08
6일차	5.6	4.6	3.2	12.8	1.9.E+08	9.2E+08
7일차	9.3	2.5	3.2	11.2	1.5.E+08	3.5E+08

③ 알코올 발효 최종 결과

알코올 발효는 8일차에 종료하였고 최종 분석결과는 아래 표와 같음. 알코올 함량은 분석kit를 이용하였고 포도당, pH, 산도는 분석장비를 사용하였음.

산도 함량은 유산균 발효에 따른 젖산(lactic acid)의 상당량 0.009을 적용하여 계산함.

표 2-2-1-16. 발효액 최종 분석

알코올(v/v%)	포도당(w/v%)	pH	산도(mL)	산도(%)
10.3	0.6	3.4	11.2	1.0

④ 살균(제균) 공정

알코올 발효액은 원심분리(12,000rpm, 30분)하여 상등액을 취하고 1차 여과(5 μm), 최종 여과(0.45 μm)를 통해 살균(제균) 처리함.

여과 전, 후에 따른 이화학적 성분 비교를 위해 알코올 함량, 포도당 함량, pH, 산도를 비교 분석한 결과, 유의적 변화는 나타나지 않았음.

표 2-2-1-17. 여과 전/후의 이화학적 성분 비교

구분	알코올(v/v%)	포도당(w/v%)	pH	산도(mL)
여과 전	10.3	0.6	3.4	11.2
여과 후	10.5	0.5	3.4	12.2

⑤ 주요 향미성분 분석

발효액 모듈의 향미 특성을 분석한 결과, 검출된 향기성분은 총 45종으로 ester류 20종, alcohol류 10종, aldehyde류 2종, ketone류 2종, acid류 6종, 기타류 5종이 검출되었으며 fruity, sweet한 향미를 나타내는 ester류가 가장 많이 검출되었음.

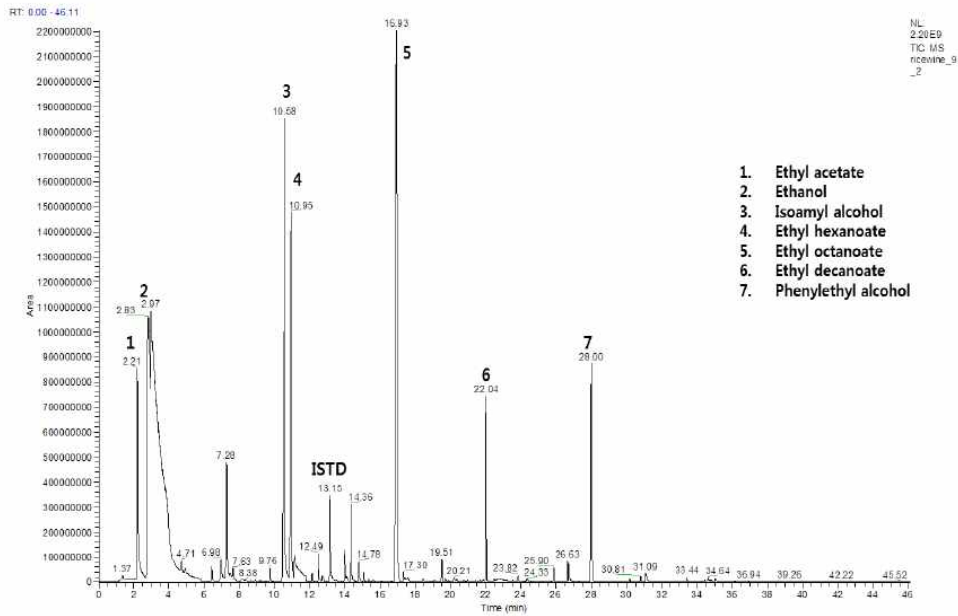


그림 2-2-1-24. 발효액 모듈의 GC-MS TIC

No.	Compound	Relative peak area	No.	Compound	Relative peak area	No.	Compound	Relative peak area
Esters			18	Ethyl dodecanoate	198.1	Ketones		
1	Ethyl acetate	2513.9	19	Ethyl tetradecanoate	63.4	33	2-Heptanone	16.8
2	Ethyl butanoate	145.2	20	Ethyl hexadecanoate	48.1	34	Acetoin	301.7
3	Isoamyl acetate	1559.3	Alcohols			Acids		
4	Ethyl pentanoate	116.5	21	Ethanol	12583.1	35	Acetic acid	127.5
5	Isopentyl propionate	12.5	22	2-Methyl-1-propanol	439.5	36	Butanoic acid	17.1
6	Ethyl hexanoate	6106.5	23	Isoamyl alcohol	9031.5	37	3-Methylbutanoic acid	60.5
7	Hexyl acetate	102.0	24	1-Hexanol	282.7	38	Hexanoic acid	264.5
8	Ethyl heptanoate	406.9	25	3-Ethoxy-1-propanol	44.6	39	Octanoic acid	150.2
9	Ethyl lactate	878.5	26	1-Octen-3-ol	49.2	40	Lactic acid	n.d
10	Ethyl octanoate	9590.9	27	1-Heptanol	60.5	41	Decanoic acid	38.1
11	Ethyl nonanoate	263.1	28	1-Octanol	69.9	Others		
12	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate	48.4	29	3-(Methylthio)-1-propanol	90.6	42	Undecane	179.6
13	Isoamyl lactate	31.8	30	Phenylethyl alcohol	2933.1	43	1,3-Dimethylbenzene	30.8
14	Ethyl (3E)-3-nonenoate	15.9	Aldehydes			44	1-Nitrohexane	58.9
15	Methyl decanoate	18.3	31	Nonanal	34.7	45	γ-Nonalactone	28.9
16	Ethyl decanoate	2053.0	32	Benzaldehyde	9.6	46	2-Methoxy-4-vinylphenol	43.7
17	2-Phenylethyl acetate	138.9						

그림 2-2-1-25. 발효액 모듈 향기성분 분석결과

No.	Compound	Odor description	No.	Compound	Odor description
Esters			Ketones		
1	Ethyl acetate	ethereal fruity sweet weedy green	33	2-Heptanone	spicy herbal coconut woody
2	Ethyl butanoate	juicy fruit fruity pineapple	34	Acetoin	buttery creamy dairy milky
3	Isoamyl acetate	sweet fruity banana solvent	Acids		
4	Ethyl pentanoate	fruity apple pineapple tropical	35	Acetic acid	sharp pungent sour vinegar
5	Isopentyl propionate	banana pineapple ripe tropical	36	Butanoic acid	sharp acetic cheesy buttery fruity
6	Ethyl hexanoate	pineapple waxy green banana	37	3-Methylbutanoic acid	sour sweaty cheesy tropical
7	Hexyl acetate	fruity green apple banana sweet	38	Hexanoic acid	sour fatty sweat cheese
8	Ethyl heptanoate	pineapple cognac rum wine	39	Octanoic acid	rancid oily vegetable cheesy
9	Ethyl lactate	fruity buttery butterscotch	40	Lactic acid	odorless
10	Ethyl octanoate	apricot banana brandy pear	41	Decanoic acid	unpleasant rancid sour fatty citrus
11	Ethyl nonanoate	rose waxy rum wine	Others		
12	Ethyl 2-hydroxy-4-methylpentanoate	fresh blackberry	42	Undecane	—
13	Isoamyl lactate	fruity creamy nutty	43	1,3-Dimethylbenzene	plastic
14	Ethyl (3E)-3-nonenolate	—	44	1-Nitrohexane	—
15	Methyl decanoate	oily wine fruity floral	45	γ-Nonalactone	fatty moldy coconut
16	Ethyl decanoate	fruity apple grape oily brandy	46	2-Methoxy-4-vinylphenol	woody amber cedar peanut roasted
17	2-Phenylethyl acetate	rose honey fruity tropical			
18	Ethyl dodecanoate	soapy rummy creamy floral			
19	Ethyl tetradecanoate	sweet waxy violet orris			
20	Ethyl hexadecanoate	creamy milky balsamic			
Alcohols					
21	Ethanol	alcoholic ethereal medical			
22	2-Methyl-1-propanol	ethereal winey			
23	Isoamyl alcohol	whiskey fruity banana			
24	1-Hexanol	fusel oily fruity alcoholic			
25	3-Ethoxy-1-propanol	fruit			
26	1-Octen-3-ol	mushroom earthy fungal chicken			
27	1-Heptanol	musty leafy herbal woody peony			
28	1-Octanol	orange aldehydic rose			
29	3-(Methylthio)-1-propanol	sulfurous onion soup vegetable			
30	Phenylethyl alcohol	floral rose rose dried rose			
Aldehydes					
31	Nonanal	rose fresh orris orange			
32	Benzaldehyde	sharp sweet bitter almond cherry			

그림 2-2-1-26. 각 성분별 Odor description

⑥ Lab scale 시작품 제작

- 담금비율

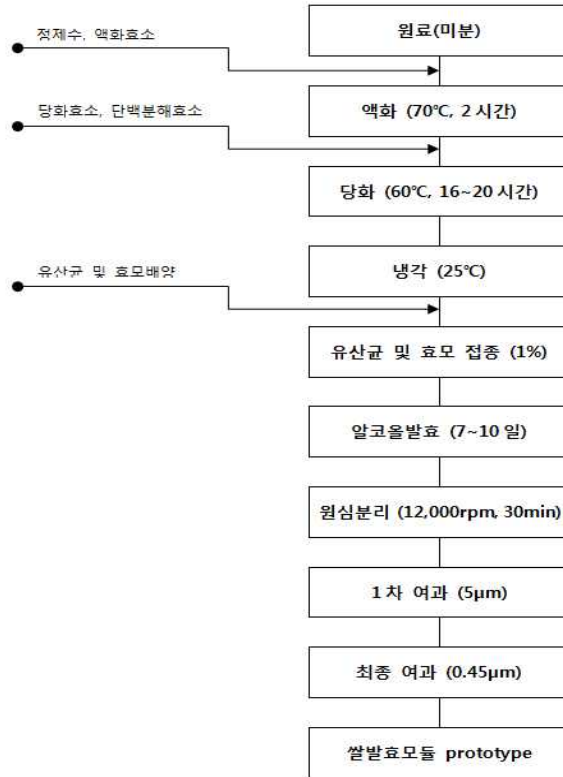
아래 표와 같은 비율로 담금을 한 후 액화(70°C, 2hr)공정과 당화(60°C, 20hr)공정을 거쳐 포도당 함량이 20%에 도달하여 당화공정을 종료하였음.

표 2-2-1-18. 원재료명 및 담금비율

원재료명	담금비(w/w %)	배합량(g)
쌀(미분)	23.27	823
액화효소(BAN 480L)	0.06	2.06
당화효소(AMG 300L)	0.06	2.06
단백분해효소(SUMIZYME LP50)	0.005	0.16
정제수	76.6	2,673
합계	100	3,500

- 쌀발효 모듈 prototype

유산균 및 효모를 접종하여 9일동안 알코올 발효를 하고 살균(제균)공정을 거쳐 최종 쌀발효물 prototype을 제조하였음.



* 유산균 : SMB092(*L.paracasei*)

* 효모 : SMY072(*S. cerevisiae*)

그림 2-2-1-27. 쌀발효모들 제조공정도

- 이화학성분 품질 규격

Lab scale로 제조한 쌀발효물 모듈 prototype의 이화학 성분분석을 통해 품질 규격을 설정 완료하였음.

표 2-2-1-19. 쌀발효물 모듈 품질 규격

구분	알코올(v/v%)	포도당(w/v%)	pH	산도(%)
품질 규격	10.0 ~ 11.0	1.0 이하	2.8 ~3.6	1.0 ~2.0
분석 결과	10.3	0.6	3.4	1.0

- 주요 향미 성분 분석

발효액 모듈의 향미 특성을 분석한 결과, 검출된 향기성분은 총 45종으로 ester류 20종, alcohol류 10종, aldehyde류 2종, ketone류 2종, acid류 6종, 기타류 5종이 검출되었으며 특히, 신선한 과실향미의 특성을 나타내는 ethyl butanoate, ethyl hexanoate, ethyl lactate 검출 peak값을 확인함.

표 2-2-1-20. 쌀발효물 모듈 향기 분석 결과

향기 성분	peak area값	향미 특성
Ethyl butanoate*	145.2	파인애플향, 오렌지 주스향
Ethyl hexanoate**	6106.5	향긋한 파인애플향
Ethyl lactate	878.5	부드러운 버터크림, 코코넛향

* Ethyl butanoate = Ethyl butyrate

** Ethyl hexanoate = Ethyl caproate

다) 달콤한 허브 향미 생성 기술 개발

(1) 실험방법

(가) Eugenol 정량 분석법 셋팅

① 전처리

- 시료 1 mL을 50 mL 용량플라스크에 취함
- 70% ethanol로 정용
- 0.22 μ m filter로 여과

② HPLC 분석

- 컬럼 : C18 MG (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m)
- 검출기 : HPLC PDA detector(검출파장 : 280 nm)
- LOQ : 5 mg/kg

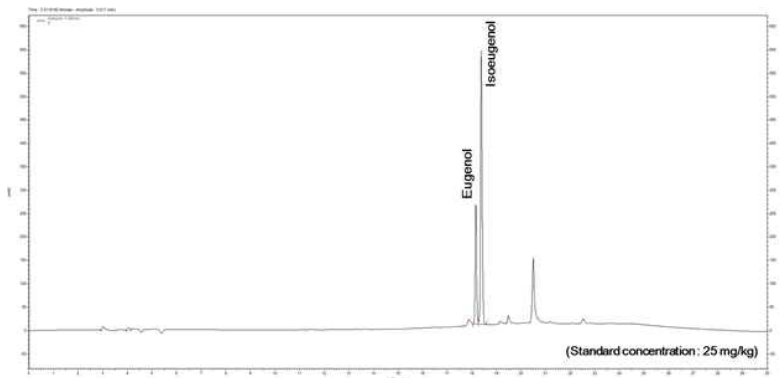


그림 2-2-1-28. 허브향미(eugenol) 성분의 크로마토그램

(2) 연구결과

(가) 세포벽 분해 효소 첨가, 무첨가에 의한 허브향미의 eugenol 함량 비교

식물체 세포벽 분해 효소는 Novozymes사의 Viscozyme L, Ceremix 6X MG 등의 효소 역가를 조사하고 최적온도, pH, dosage를 확인하였음. Cellulase, hemicellulase, xylanase, β -glucanase의 효소 활성을 가진 viscozyme L을 일정량 사용하고자 함(표).

세포벽 분해 효소 무첨가는 모든 효소를 첨가하지 않고 진행 하였고, 효소 첨가구1은 세포벽 분해효소의 액화효소, 단백분해효소를 첨가 하였고, 효소 첨가구2는 세포벽분해효소의 액화효소, 단백분해효소, 배당체분해효소(β -glucosidase)를 첨가하여 진행하였음.

표 2-2-1-21. 식물 세포벽 분해 효소의 activity 및 효소 사용량

제조사	Novozymes		
	Thermamyl 120L	Viscozyme L	Ceremix 6X MG
Typical activities			
α-amylase	O		O
Protease			O
Pectinase	O		
Cellulase		O	O
Hemicellulase		O	
Xylanase	O	O	O
β-glucanase		O	O
Feruloyl esterase			
Temperature(℃)	85~95	25~55	55
Working pH	5.0~6.0	3.3~5.5	4.0~6.0
Dosage range	0.075~0.1	0.5~0.7	0.2~0.4

표 2-2-1-22. 정향(Clove)의 효소분해 담금비율

원재료명	효소 무첨가(w/w%)	효소 첨가구1(w/w%)	효소 첨가구2(w/w%)
Clove 분말	4.9861	4.9861	4.9861
정제수	95.0139	94.8606	94.7359
액화효소(liquzyme supra 2.2X)	0	0.0187	0.0187
Viscozyme L	0	0.1247	0.1247
Flavourzyme 1000L(exo)	0	0.0050	0.0050
Neutrase 0.8L(endo)	0	0.0050	0.0050
β-glucosidase	0	0	0.1247
합계	100	100	100

정향(Clove)를 효소분해 한 결과 무첨가구는 eugenol이 1,500mg/kg, 첨가구1은 1,600 mg/kg, 첨가구2는 1,600mg/kg으로 나타남. 첨가구1과 2의 eugenol 함량에 큰 차이가 없어서 배당체 분해 효소를 첨가하지 않아도 될 것으로 사료됨.

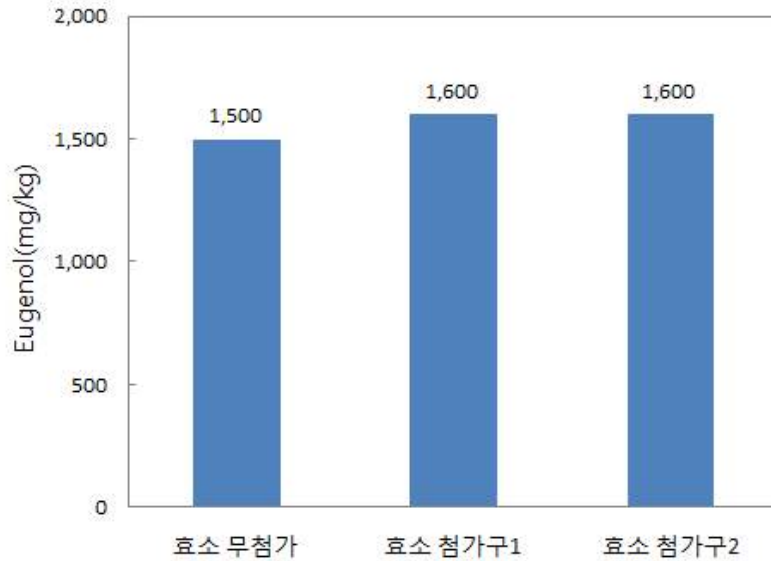


그림 2-2-1-29. 효소 무첨가, 무첨가에 의한 eugenol 함량 비교

(나) 세포벽 분해효소 첨가 농도에 의한 eugenol 함량 비교

세포벽 분해효소의 첨가농도에 의한 eugenol 생성량을 비교한 결과 viscozyme L 0.625%(원료 대비), 1.25%, 2.5% 첨가구 모두 eugenol $1,550 \pm 50$ mg/kg으로 나타남. 이것으로 viscozyme L 첨가량은 원료대비 0.625%로 첨가량을 설정하고자 함.

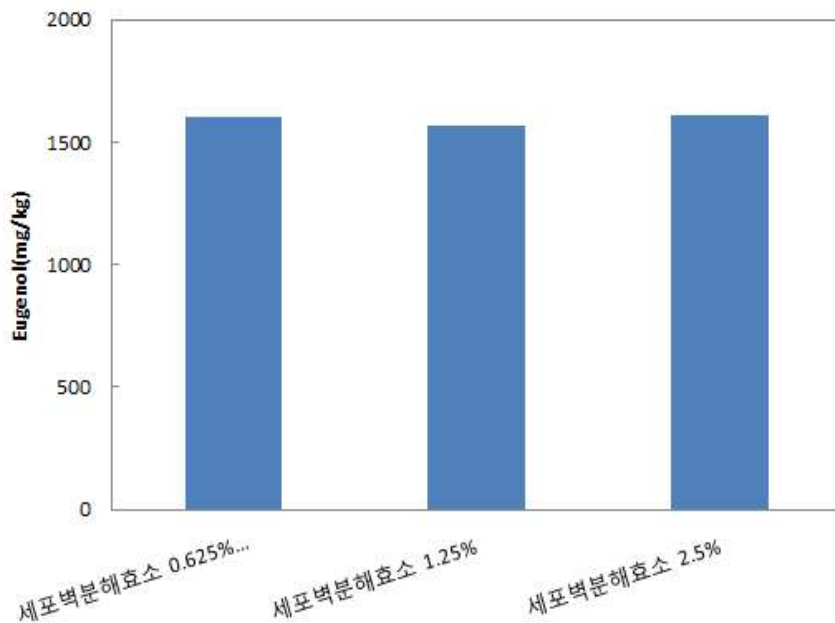


그림 2-2-1-30. 세포벽분해 효소(Viscozyme L) 첨가 농도에 의한 eugenol 함량 비교

(다) 효소분해 시간에 의한 eugenol 함량 비교

아래 그림은 효소분해 2시간 시점부터 eugenol 성분은 증가하기 시작하여 분해 7시간까지 유지하는 경향을 보였으며, 분해 2시간 시점에 eugenol 함량은 1,569 mg/kg으로 나타남.

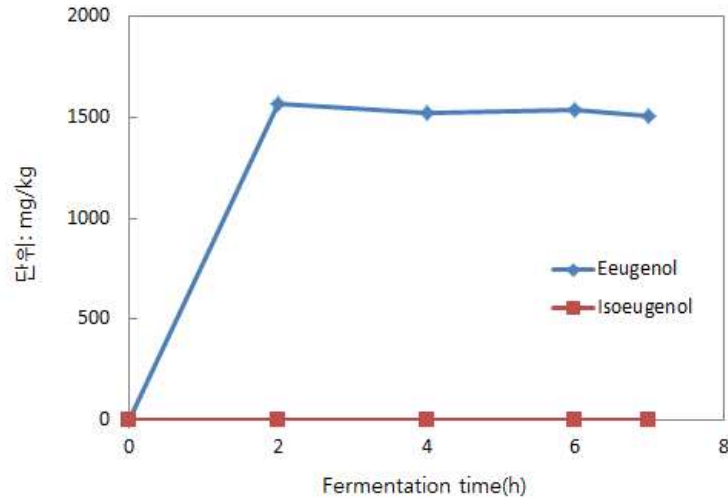


그림 2-2-1-31. 정향(clove)의 효소분해 시간에 의한 eugenol, isoeugenol 함량 비교

(라) 허브향미 모듈의 이화학 성분 및 주요향기 성분 정량

아래 표16은 허브향미 모듈의 이화학 성분 및 주요 향미성분을 나타내었음. pH는 4.16, Brix는 2.4, 산도는 0.23 %로 분석되었으며, 주요 향미성분인 eugenol은 1,550 mg으로 분석되었으며 식물성 발효 향미모듈-2의 주요 향미로 사용할 예정임.

표 2-2-1-23. 허브향미 모듈의 이화학 성분 및 주요 향기성분

구분	분석항목	분석결과
이화학성분	pH	4.16 ± 0.01
	Brix	2.4
	Acidity(%)	0.24 ± 0.01
	NaCl(%)	7.0~8.0 이상
	Alcohol(%)	3.0~4.0
주요 향미성분	Eugenol(mg/kg)	1,550 ± 50

2-2-2. 식물성 발효향미모듈-1,2 개발완료 및 공정 표준화 (샘표, 2차년도)

표 2-2-2-1. 2차년도 연구 단계별 연구수행목표

구분	연구단계	연구수행목표
식물성 발효향미모듈-1	저염단기 복합효소 반응 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기질 저분자화 및 맛성분 생산 <ul style="list-style-type: none"> - TAA 14% 이상 - 저분자 펩티드, Free Amino Acid(<1kDa) 12.6% 이상 - GA 1.5% 이상 - G-peptide 500ppm 이상 ○ 저염단기 반응 기술의 안전성 확보 <ul style="list-style-type: none"> - 바이오제닉 아민 50mg/kg 이하 - 염분 10% 이하 - 총 생산 lead time 1개월 이내
	UF/MF 기술	<ul style="list-style-type: none"> ○ Soy allergen 100% 제거 <ul style="list-style-type: none"> - SDS-PAGE 결과 7kDa 이상 0% - Soy allergen ELISA 결과 검출한계 미만
식물성 발효향미모듈-2	3단계 신선액상발효 기술 개발	<ul style="list-style-type: none"> ○ 쌀발효물 모듈 1종 개발(pilot scale) <ul style="list-style-type: none"> - Acidity 1.0% 이상 - 향미 성능 목표 <ul style="list-style-type: none"> : Sulfide 향미 마스킹 능력 : 신선한 과일 향미 생성(ethyl caproate, ethyl butylate) : 달콤한 향미 생성(Vanillin 1.5mg/kg이상, eugenol 1.0mg/kg 이상) - 대량생산 공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> : 공정도, 중간제품 규격 - 시생산 및 품질규격 검증 <ul style="list-style-type: none"> : 법적 규격 준수

1) 식물성 발효향미모듈-1 개발완료 및 공정 표준화

표 2-2-2-2. 식물성 발효향미모듈-1의 품질 목표

품질지표	액젓의 품질기준 ¹⁾	식물성 발효향미모듈-1
맛	TN: 1.0% 이상 (1.1~1.5%) ²⁾ GA ³⁾ : 0.38~1.32% G-peptide ⁴⁾ : 12.6ppm(EVG)	TN: 2.2% 이상 TAA: 14.0% 이상 저분자 펩타이드(<1kDa): 12.6% 이상 FAA: 10.0% 이상 GA: 1.5% 이상 G-peptide: 500ppm 이상
향기	Trimethylamine(TMA) FD factor 128 ⁴⁾	FD factor 128 이하
안전성	바이오제닉 아민 ⁴⁾ : 수산물 히스타민 200mg/kg 이하	바이오제닉 아민: 50mg/kg 이하 Soy allergen: SDS-PAGE 7,000Da 이상 0%, soy allergen ELISA kit 검출한계 미만
나트륨	염분: 23.0% 이하 저분자 펩티드, 아미노산/NaCl ratio ⁵⁾ : 30~40	염분: 10.0% 이하 저분자 펩티드, 아미노산/NaCl ratio: 120 이상(액젓 대비 3~4배)
색상 ²⁾	명도(L): 38.44~75.15 황색도(a): 3.82~25.79 적색도(b): 59.80~93.83	명도(L): 75 이상 황색도(a): 25 이하 적색도(b): 70 이하
일반	수분: 70.0% 이하 pH ²⁾ : 5.14~6.28	수분: 75.0% 이하 pH: 5~6

1) 수산전통식품 품목별 표준규격

2) 국내산 시판 멸치액젓의 품질 평가(2018)

3) 젓갈류 산업의 현황과 전망 (2008)

4) *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 50, No. 19, 2002

5) 식품공전 수산물의 잔류물질 허용기준

6) 저분자 펩티드, 아미노산/ NaCl ratio = 저분자 펩티드,아미노산(g/100ml)÷염분(g/100ml)×100

가) 저염단기 복합효소 반응 기술 개발

(1) 연구방법

(가) 저분자 펩티드, 아미노산 생산반응 조건 최적화

① 수분 조건 최적화

저분자 펩티드, 아미노산 생산반응의 수분 조건을 최적화하기 위해 수분 함량에 따른 단백질 용출율 및 아미노산 유리율을 확인하였다. SMF119 균주로 발효한 대두 고상발효물에 정제수를 가하여 수분 함량을 60~80%로 조절 후 45°C, 초기 pH 7, NaCl 10%(w/w) 조건으로 72시간 동안 효소반응 실험을 진행하였다. 효소반응 종료 후 whatman No.2 filter paper로 여과하여 여과액의 구성 아미노산(TAA), 유리 아미노산(FAA) 함량을 분석하였다. 원료의 총 단백질 함량 대비 수용액으로 용출된 구성 아미노산 함량의 비율을 계산하여 단백질 용출율로 나타내었다. 아미노산 유리율은 여과액의 구성 아미노산 함량 대비 유리 아미노산 함량의 비율을 계산하여 나타내었다.

$$\text{아미노산 유리율(\%)} = \frac{\text{여과액의 유리 아미노산 함량(g/100mL)}}{\text{여과액의 구성 아미노산 함량(g/100mL)}} \times 100$$

② 반응환경 조건(온도, 초기 pH, NaCl 농도, 시간)에 따른 잔존효소 활성 확인

맛 성분 생성 효소 중 protease, LAP, CAP는 단백질, 펩타이드를 저분자로 분해하는 역할을 하며, GLS는 생성된 glutamine을 GA로 전환하는 역할을 한다. 반응환경 조건이 효소 활성에 미치는 영향을 파악하기 위해 복합효소 반응환경에서의 잔존효소 활성을 확인하였다. MiniTab 16 (Minitab Inc., State College, Pa, USA)을 이용하여 2-수준 완전 요인배치법으로 16개의 반응환경 조건 실험구를 설계하였다. SMF119 균주로 발효한 대두 고상발효물에 정제수를 가하여 수분 함량을 70%로 조절하고 16개의 반응환경 조건으로 3반복 실험을 진행한 후 잔존효소 활성을 확인하였다.

표 2-2-2-3. 2-수준 완전 요인배치 실험의 조절인자

조절인자	(-1) 농도	(+1) 농도
온도 (°C)	40	60
초기 pH	5	9
NaCl (%)	4	10
시간	48	120

③ 반응표면분석을 이용한 맛성분 최대 생산 반응환경 구간 도출

반응표면분석을 이용하여 반응환경 조건(온도, 초기 pH, NaCl 농도, 시간)을 최적화하는 연구를 진행하였다. 각 조절인자의 실험범위는 맛성분 생성 효소인 protease, LAP, CAP, GLS의 최적 활성 및 실험 조건을 참고하여 설정하였다. MiniTab 16 (Minitab Inc., State College, Pa, USA)을 이용하여 반응표면법 중 중심합성법(Central Composite Design)으로 4개의 인자에 대해 중심점 7개를 포함한 31개의 반응환경 조건 실험구를 설계하였다. 각 실험구에 대해 3반복 실험을 수행하여 미생물 안전성(lactic acid 및 acetic acid 생산량, 종료 pH) 및 맛성분(TAA, FAA, GA) 생산량을 확인하였다.

표 2-2-2-4. 복합효소 반응환경 조건 최적화를 위한 반응표면분석 실험의 조절인자

조절인자	(-1) 농도	(+1) 농도
온도 (°C)	40	60
초기 pH	5	9
NaCl (%)	4	10
시간	48	120

(나) Glutamic acid 전환반응 조건 최적화

Glutamic acid의 전구체 아미노산인 glutamine은 온도, pH 등과 같은 비효소적 원리로 N 말단이 고리화되어 pyroglutamic acid로 전환될 수 있다. 따라서 효소반응 과정 중에 exopeptidase의 작용으로 펩타이드 말단에서 glutamine이 유리된 즉시 glutaminase가 작용하여 빠르게 GA로 전환될 수 있도록 조건을 최적화하는 것이 필요하다.

저분자 펩티드, 아미노산 생산반응 조건 최적화 실험을 통해 lactic acid 생산량 0.5% 미만, GA 생산량 1% 이상으로 예측된 구간의 온도, NaCl 농도 조건으로 효소반응 실험을 수행하였다(초기 pH 7, 반응시간 96시간). 효소반응 후 여과액의 GA, FAA, TAA 함량을 확인하여 온도, NaCl 농도 조건을 최적화 하였다.

최적 glutamic acid 전환반응 조건에서 반응시간에 따른 GA, glutamine, pyroglutamic acid 변화를 확인하여 반응시간 조건을 설정하였다.

(다) Gamma glutamyl peptides 생산반응 조건 최적화

Gamma glutamyltransferase(GGT) 활성화에 따른 gamma glutamyl peptides 생산량을 확인하기 위해 바실러스 SmF 기술로 생산한 GGT 효소를 첨가하여 효소반응 실험을 수행하였다. 기질인 유리 아미노산 농도를 높이기 위해 반응환경 조건은 저분자 펩티드, 아미노산 생산반응 및 glutamic acid 전환반응 최적화 조건을 활용하여 온도 45°C, 초기 pH 7, NaCl 9%로 하였다. GGT 효소는 효소반응물 전체 중량의 0~3.2% 수준으로 첨가하였고, 이는 원료 대비 0~10%에 해당하는 첨가량이다.

(라) 실험방법

① 구성, 유리 아미노산 분석법

구성 아미노산 분석을 위해 시료에 6N HCl을 가하고 105°C에서 24시간 동안 반응시켜 단백질의 펩타이드 결합을 분해하는 과정을 거쳤다. pH 2.2 Lithium loading buffer로 희석하여 0.22 μm syringe filter로 여과한 후 기기분석을 수행하였다. 유리 아미노산 분석은 분해 과정없이 바로 buffer로 희석, 여과하여 기기분석을 수행하였다. 아미노산을 ion exchange column으로 분리한 후 130°C에서 ninhydrin과 반응시켜 UV/VIS 검출기로 검출하였다.

표 2-2-2-5. 아미노산 분석 용매

분석용매	pH
Lithium buffer 1	2.80
Lithium buffer 2	3.00
Lithium buffer 3	3.15
Lithium buffer 4	3.50
Lithium buffer 5	3.55
Lithium regeneration buffer 6	-
Ninhydrin reagent	-

표 2-2-2-6. 아미노산 분석을 위한 기기분석 조건

분석기기	Amino Acids Analyzer 30+(Biochrom)
Column	Lithium Accelerated analytical Column (cation-exchange resin)
Injection volume	20 μ L
Flow rate	30mL/h (Ninhydrin reagent 25mL/h)
Detection wavelength	570nm(proline 440nm)

② Pyroglutamic acid 분석법

시료의 pyroglutamic acid 함량은 시료를 6mM HClO₄로 희석 후 0.22 μ m syringe filter로 여과하여 HPLC 분석을 수행하였다. 표준용액 분석 결과로 검량곡선을 작성하고 시료를 대입하여 pyroglutamic acid 함량을 산출하였다.

표 2-2-2-7. Pyroglutamic acid 분석을 위한 기기분석 조건

분석기기	Beckman HPLC/RI
Column	SHODEX RSpak KC-811
Injection volume	30 μ L
Flow rate	0.7mL/min
Run time	35min
Column temperature	40 $^{\circ}$ C

③ Gamma glutamyl peptides 분석법

Gamma glutamyl peptides는 HPLC-MSMS(OSAKA SODA NANOSPACE SI-2, AB SCIEX Triple Quad 5500+)을 이용하여 분석하였다. 분석을 수행한 gamma glutamyl peptides 30종을 아래의 표에 나타내었다.

표 2-2-2-8. Gamma glutamyl peptides 30종

No.	Gamm glutamyl peptides	Molecular Formula
1	γ -Glu-His	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₅
2	γ -Glu-Leu	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅
3	γ -Glu-Lys	C ₁₁ H ₂₁ N ₃ O ₅
4	EVG(γ -Glu-val-Gly)	C ₁₂ H ₂₁ N ₃ O ₆
5	EV(γ -Glu-val)	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅
6	γ -Glu-Tyr	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₆
7	γ -Glu-Phe	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅
8	γ -Glu-Arg	C ₁₁ H ₂₁ N ₅ O ₅
9	γ -Glu-Thr	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₆
10	γ -Glu-Ile	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₆
11	γ -Glu-Glu	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₇
12	γ -Glu-Trp	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅
13	γ -Glu-Gly	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₅
14	γ -Glu-Asn	C ₉ H ₁₅ N ₃ O ₆
15	γ -Glu-Ser	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₆
16	γ -Glu-Met	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅ S
17	γ -Glu-Ala	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅
18	γ -Glu-Orn	C ₁₀ H ₁₉ N ₃ O ₅
19	γ -Glu-val_ol	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅
20	γ -Glu-Cys	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₅ S
21	γ -Glu-Pro	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅
22	γ -Glu-Ile-Gly	C ₁₃ H ₂₅ N ₃ O ₈
23	γ -Glu-Val-Cys	C ₁₃ H ₂₅ N ₃ O ₇ S
24	γ -Glu-Val-Gln	C ₁₅ H ₂₈ N ₄ O ₈
25	γ -Glu-Gln	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆
26	γ -Glu-Ala-Gly	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆
27	γ -GSH-reduced	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S
28	γ -Glu-Glu-Glu	C ₁₅ H ₂₄ N ₃ O ₁₀
29	γ -Glu-Ser-Gly	C ₁₀ H ₁₈ BrN ₃ O ₇
30	γ -Glu-Asp	C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₇

④ 통계적 분석

모든 성분 분석은 3회 반복하여 MiniTab(MiniTab 17, Minitab Inc., USA)을 이용하여 통계적 유의성 p<0.05 수준에서 통계적 분석을 수행하였다.

(2) 연구결과

(가) 저분자 펩티드, 아미노산 생산반응 조건 최적화

① 수분 조건 최적화 결과

SMF119 균주로 발효한 대두 고상발효물에 정제수를 가하여 수분 함량을 60~80%로 조절 후 45℃, 초기 pH 7, NaCl 10%(w/w) 조건으로 72시간 동안 효소반응 실험을 진행하였다. 효소반응 종료 후 여과액의 아미노산 함량을 분석한 결과 수분 함량이 증가할수록 단백질 용출율이 증가하여 수분 함량 80%일 때 56%를 나타내었고, 아미노산 유리율은 수분 함량 70%에서 81%로 가장 높게 나타났다. 수분 함량이 증가할수록 기질 농도는 감소하여 향미모듈 자체의 맛성분(아미노산, 펩타이드) 농도는 감소하나 미생물 안전성 문제로 NaCl 농도는 낮추기가 어렵다. 맛성분 대비 높은 NaCl 농도는 모듈 활용에 제한을 주기에 이를 고려하여 효소반응 시 수분 조건을 70%로 설정하였다.

표 2-2-2-9. 수분 조건에 따른 효소반응 실험 결과

수분 함량	NaCl(%)	TAA(%)	FAA(%)	아미노산 유리율	단백질 용출율
60%	8.95	15.23	12.05	79%	39%
70%	7.03	9.95	8.01	81%	44%
80%	5.69	6.11	4.29	70%	56%

② 반응환경 조건(온도, 초기 pH, NaCl 농도, 시간)에 따른 잔존효소 활성 확인

2-수준 완전 요인배치법으로 설계한 16개의 반응환경 조건으로 효소반응 실험을 수행한 후 잔존효소 활성을 확인하였다. 그 결과 복합효소반응 중 protease, LAP 활성에 유의적으로 영향을 미치는 인자는 온도로 나타났으며(p<0.05), 온도가 증가할수록 활성이 감소하는 것으로 나타났다. CAP 활성 역시 온도가 증가할수록 활성이 감소하는 것으로 나타났으며(p<0.1), 반응환경 인자와 glutaminase 활성 간에 통계적 유의성은 확인되지 않았다. 열안정성이 낮은 glutaminase가 40℃ 이상의 온도 조건에서 대부분 실활되어 반응환경 인자의 영향을 확인하기에 어려움이 있었다.

표 2-2-2-10. 2-수준 완전 요인배치 실험 결과

Run Order	조절 인자				반응값(g)			
	온도	초기 pH	NaCl	시간	Protease(U)	LAP(mU)	CAP(mU)	GLS(mU)
1	1	1	1	-1	0±0	3±5	3,174±420	55±53
2	-1	-1	1	-1	194±56	1,055±607	5,233±793	36±27
3	1	1	1	1	16±6	6±10	3,263±873	43±75
4	-1	1	1	1	113±20	1,048±890	5,647±902	17±29
5	-1	1	-1	1	138±16	1,145±207	6,552±713	0±0
6	1	-1	-1	-1	24±9	206±99	4,555±596	17±29
7	1	-1	1	-1	0±0	109±110	4,141±903	0±0
8	-1	-1	-1	1	160±7	6±5	2,568±592	43±15

9	-1	-1	1	1	147±7	1,161±409	6,046±713	0±0
10	1	1	-1	-1	16±5	6±5	3,198±631	16±12
11	1	-1	1	1	22±8	27±26	4,609±230	28±24
12	-1	1	-1	-1	199±38	1,158±526	5,906±445	0±0
13	-1	-1	-1	-1	182±11	1,136±438	5,468±967	44±45
14	1	1	-1	-1	21±5	3±5	3,484±347	24±21
15	1	-1	-1	-1	0±0	18±17	6,137±78	63±45
16	-1	1	1	1	135±17	867±358	6,055±828	111±99

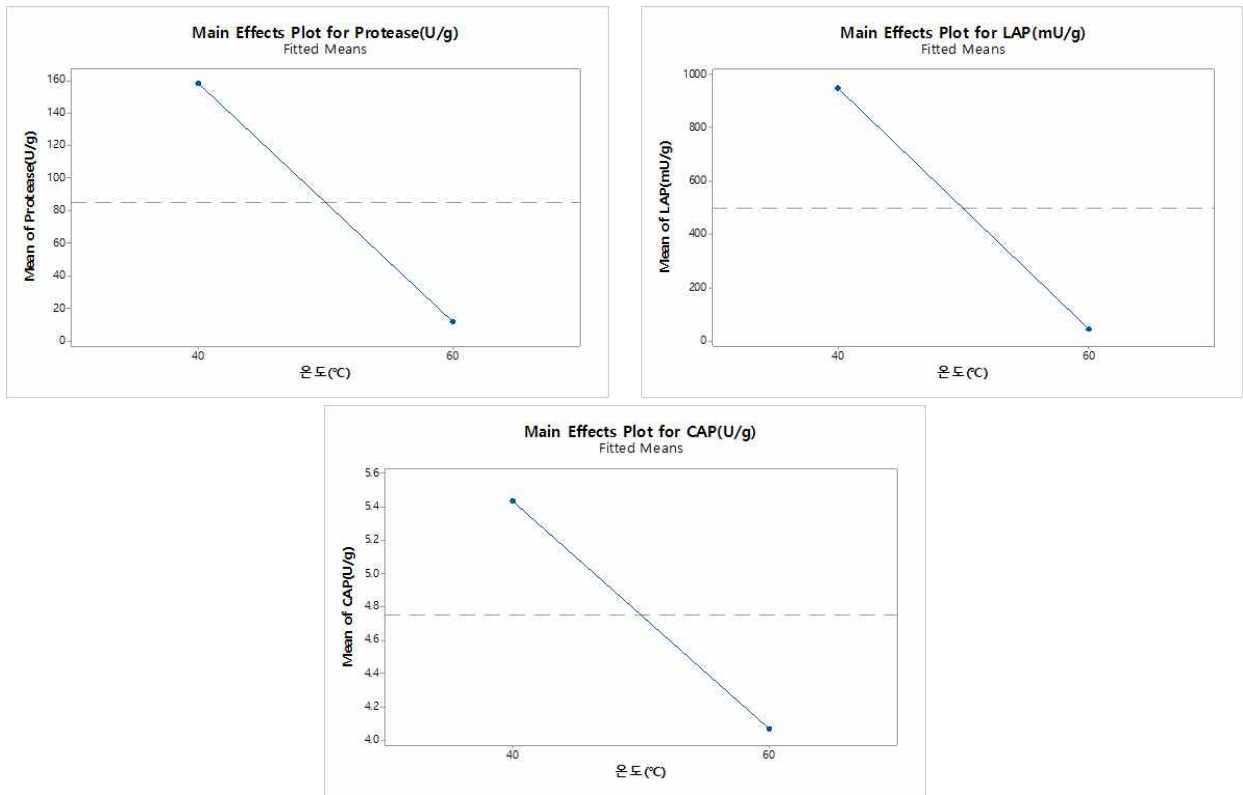


그림 2-2-2-1. Protease, LAP, CAP 잔존 활성에 대한 주효과도

③ 반응표면분석을 이용한 맛성분 최대 생산 반응환경 구간 도출

반응표면법 중 중심합성법으로 설계한 31개의 반응환경 조건으로 효소반응 실험을 수행한 후 미생물 안전성(lactic acid 및 acetic acid 생산량, 종료 pH) 및 맛성분(TAA, FAA, GA) 생산량을 확인하였다. 실험결과에 대하여 정규성 검정(Ryan-Joiner법)을 실시한 결과 상관계수가 1에 가까운 것으로 나타나 정규 분포를 따르고 있음을 확인하였다.

표 2-2-2-11. 반응표면분석 실험계획 및 미생물 안전성 확인 결과

Run Order	조절 인자				반응값		
	온도	초기 pH	NaCl	시간	미생물 안전성(pH 외 %, w/v)		
					종료 pH	Lactic acid	Acetic acid
1	0	0	0	0	6.83±0.08	0.29±0.12	0.10±0.17
2	0	0	0	0	6.73±0.07	0.23±0.04	0.09±0.11
3	0	0	2	0	6.33±0.07	0.01±0.01	0.01±0.01
4	0	0	0	0	4.94±0.04	1.86±0.37	0.16±0.10
5	-1	1	1	-1	6.85±0.04	0.36±0.13	0.11±0.18
6	2	0	0	0	6.43±0.06	0.02±0.02	0.02±0.02
7	1	-1	1	1	6.83±0.13	0.00±0.01	0.01±0.02
8	1	-1	-1	-1	4.68±0.04	0.00±0.00	0.01±0.01
9	-2	0	0	0	4.97±0.11	0.01±0.01	0.02±0.02
10	1	-1	1	-1	6.72±0.06	0.39±0.20	0.15±0.06
11	-1	-1	1	1	7.07±0.10	0.01±0.01	0.02±0.02
12	1	1	-1	-1	5.00±0.27	1.02±0.13	0.17±0.08
13	0	0	-2	0	5.54±0.26	1.58±0.12	0.27±0.12
14	-1	-1	-1	-1	6.85±0.04	0.04±0.03	0.04±0.05
15	1	1	1	-1	7.39±0.13	0.01±0.01	0.01±0.01
16	0	0	0	0	5.54±0.08	0.50±0.28	0.05±0.02
17	-1	-1	1	-1	6.74±0.08	0.18±0.13	0.09±0.16
18	0	0	0	0	5.71±0.07	0.01±0.01	0.01±0.02
19	1	1	1	1	6.22±0.13	0.85±0.27	0.07±0.01
20	-1	1	1	1	5.18±0.09	2.63±0.40	0.10±0.18
21	-1	1	-1	1	4.83±0.09	2.65±0.45	0.17±0.14
22	0	0	0	2	5.30±0.10	0.01±0.02	0.02±0.01
23	1	1	-1	1	6.33±0.10	0.36±0.34	0.29±0.03
24	-1	1	-1	-1	6.82±0.09	0.28±0.13	0.16±0.03
25	0	0	0	-2	4.99±0.10	1.92±0.17	0.27±0.02
26	1	-1	-1	1	7.61±0.03	0.52±0.11	0.16±0.03
27	0	0	0	0	5.42±0.06	0.01±0.01	0.01±0.01
28	0	0	0	0	6.79±0.14	0.39±0.19	0.13±0.03
29	0	-2	0	0	6.41±0.11	0.37±0.23	0.16±0.18
30	0	2	0	0	4.82±0.06	1.54±0.22	0.14±0.05
31	-1	-1	-1	1	5.32±0.07	1.29±0.16	0.35±0.11

표 2-2-2-12. 반응표면분석 실험계획 및 맛성분 결과

Run Order	조절 인자				반응값		
	온도	초기 pH	NaCl	시간	맛성분 생성량(% , w/v)		
					TAA	FAA	GA
1	0	0	0	0	9.86±0.22	7.72±0.46	1.23±0.16
2	0	0	0	0	9.41±0.23	8.05±0.35	1.27±0.04
3	0	0	2	0	9.39±0.34	6.91±0.51	0.84±0.08
4	0	0	0	0	9.44±0.19	8.08±0.41	1.76±0.12
5	-1	1	1	-1	9.71±0.33	7.85±0.42	1.31±0.06
6	2	0	0	0	8.42±0.30	4.80±0.53	0.58±0.06
7	1	-1	1	1	9.92±0.58	6.77±0.39	0.82±0.12
8	1	-1	-1	-1	8.03±0.46	4.67±0.47	0.72±0.15
9	-2	0	0	0	10.21±0.74	7.41±0.21	0.98±0.18
10	1	-1	1	-1	9.29±0.93	7.85±0.33	1.30±0.19
11	-1	-1	1	1	7.54±0.91	4.52±0.53	0.59±0.09
12	1	1	-1	-1	9.08±1.29	7.74±0.98	1.46±0.08
13	0	0	-2	0	9.56±1.36	7.78±1.08	1.56±0.21
14	-1	-1	-1	-1	6.11±1.56	1.86±0.49	0.26±0.05
15	1	1	1	-1	7.09±2.56	4.09±1.51	0.60±0.22
16	0	0	0	0	8.22±2.42	7.24±2.80	1.26±0.48
17	-1	-1	1	-1	9.06±1.87	7.85±1.19	1.38±0.26
18	0	0	0	0	7.81±1.20	5.20±0.66	0.61±0.15
19	1	1	1	1	8.28±2.19	7.45±1.26	1.33±0.19
20	-1	1	1	1	8.58±2.30	7.53±1.72	1.77±0.33
21	-1	1	-1	1	8.20±0.36	6.80±0.41	1.35±0.25
22	0	0	0	2	8.41±1.25	5.76±0.56	0.66±0.14
23	1	1	-1	1	7.10±0.43	4.64±0.37	0.65±0.12
24	-1	1	-1	-1	8.69±1.07	7.63±0.46	1.36±0.06
25	0	0	0	-2	8.21±0.20	6.53±0.15	1.61±0.12
26	1	-1	-1	1	5.89±0.37	3.18±0.67	0.46±0.12
27	0	0	0	0	8.33±1.01	6.60±1.03	0.86±0.08
28	0	0	0	0	8.10±0.47	6.88±0.22	1.27±0.09
29	0	-2	0	0	10.01±0.26	7.88±0.26	1.46±0.36
30	0	2	0	0	7.71±0.90	6.56±1.09	1.35±0.12
31	-1	-1	-1	1	7.81±0.38	6.54±0.68	1.50±0.13

[미생물 안전성]

복합효소반응 중 lactic acid 생산량에 유의적으로 영향을 미치는 인자는 온도, NaCl 농도로 나타났다($p < 0.05$). 실험구간 내에서 온도, NaCl 농도가 감소할수록 lactic acid 생산량이 증가하였다. 또한 초기 pH가 증가할수록 lactic acid 생산량이 증가하는 경향을 나타내었다($p < 0.1$).

복합효소반응 중 acetic acid 생산량에 유의적으로 영향을 미치는 인자는 온도, 초기 pH, NaCl 농도, 시간으로 나타났다($p < 0.05$). 실험구간 내에서 온도, NaCl 농도가 감소할수록 acetic acid 생산량이 증가하였고, 초기 pH, 시간이 증가할수록 acetic acid 생산량이 증가하였다.

복합효소반응 중 종료 pH에 유의적으로 영향을 미치는 인자는 온도, 초기 pH로 나타났으며 ($p < 0.05$), 실험구간 내에서 온도, 초기 pH가 감소할수록 종료 pH가 감소하는 것으로 나타났다. NaCl 농도가 감소하고 시간이 증가할수록 초기 pH가 감소하는 경향을 나타내었다($p < 0.1$).

NaCl 농도 7%(w/w) 환경에서 반응시간을 96시간으로 고정 시 종료 pH 5 이상으로 제어 가능한 구간은 대략 온도 45°C 이상, 초기 pH 6 이상이었다. NaCl 농도 10%(w/w)로 증가 시 종료 pH 5 이상으로 제어 가능한 구간이 대략 온도 40°C 이상, 초기 pH 4.5 이상으로 넓어짐을 확인할 수 있었다.

클린라벨에 적합한 향미모듈을 제조하기 위해서는 제조과정 중 최대한 첨가물을 사용하지 않는 것이 필요하다. 복합효소반응 시 pH 조절제를 미사용할 경우 초기 pH는 pH 6.5~7 범위이다. 초기 pH 7 환경에서 반응시간을 72, 96시간으로 고정 시 실험구간 내에서 lactic acid 생산량을 1%(w/v) 미만으로 제어 가능한 구간은 온도 40°C 이상, NaCl 8%(w/w) 이상이었다. 초기 pH 7 환경에서 반응시간을 72, 96시간으로 고정 시 실험구간 내에서 종료 pH 5 이상으로 제어 가능한 구간은 온도 40°C 이상, NaCl 6%(w/w) 이상이었다. 이 구간에서의 acetic acid 생산량은 0.1%(w/v) 미만이었다.

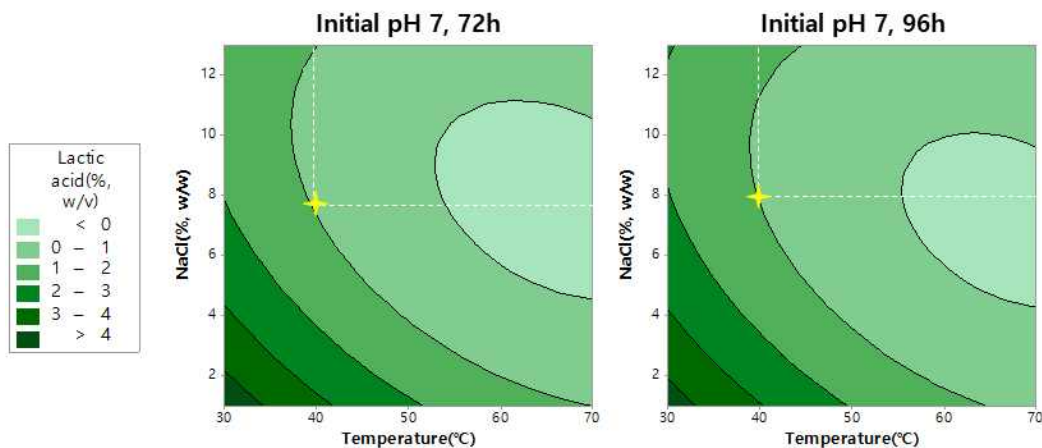
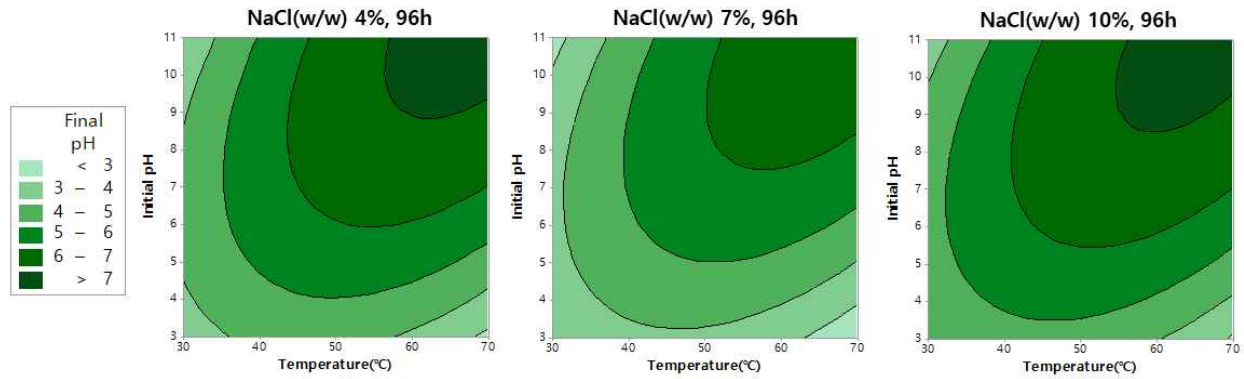


그림 2-2-2-2. 온도, NaCl 농도에 따른 lactic acid 생산량 등고선도 (초기 pH 7, 72~96시간)

* NaCl 4~10%(w/w), 96h



* Initial pH 7, 72~96h

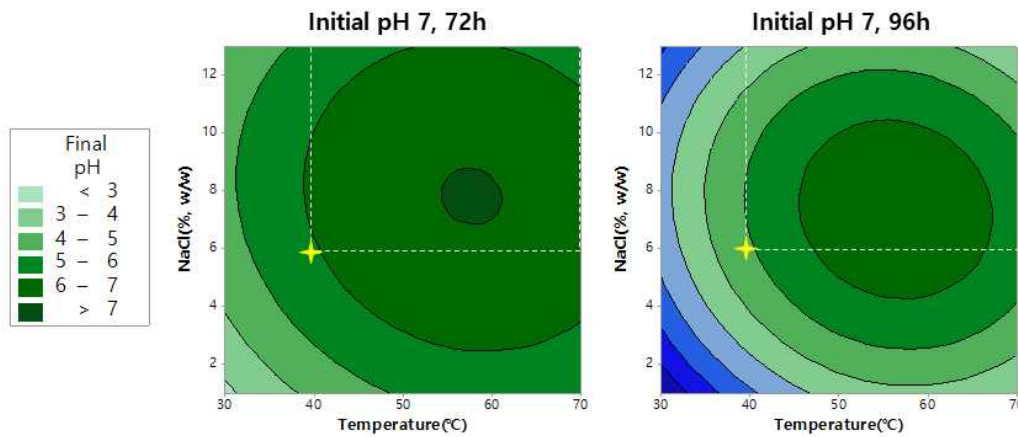


그림 2-2-2-3. 온도, NaCl 농도에 따른 종료 pH 등고선도

[맛성분(TAA, FAA, GA) 생산량]

복합효소반응 중 TAA 생산량에 유의적으로 영향을 미치는 인자는 온도($p < 0.05$), 초기 pH($p < 0.1$)이었으며, 약 45°C 를 기준으로 45°C 미만에서는 온도가 증가할수록 TAA 생산량이 증가하다가 45°C 이상에서는 온도가 증가할수록 TAA 생산량이 감소하는 것으로 나타났다. 초기 pH 6을 기준으로 pH 6 이전에는 pH가 증가할수록 TAA 생산량이 증가하다가 pH 6 이상에서는 pH가 증가할수록 TAA 생산량이 감소하는 모습을 나타내었다.

복합효소반응 중 FAA 생산량에 유의적으로 영향을 미치는 인자는 온도와 초기 pH이었으며 ($p < 0.05$), 실험구간 내에서는 온도가 감소할수록 FAA 생산량이 증가하는 것으로 나타났다. 초기 pH 약 7을 기준으로 pH 7 미만에서는 pH가 증가할수록 FAA 생산량이 증가하다가 pH 7 이상에서는 pH가 증가할수록 FAA 생산량이 감소하는 것으로 나타났다. 아미노산 유리율(FAA/TAA)에도 온도($p < 0.05$), 초기 pH($p < 0.1$)가 영향을 미치는 것으로 확인되었는데, FAA 생산량과 그 경향이 유사하였다.

복합효소반응 중 GA 생산량에 유의적으로 영향을 미치는 인자는 온도, NaCl 농도, 시간이었으며($p < 0.05$), 실험구간 내에서 온도와 NaCl 농도가 감소할수록, 반응시간이 증가할수록 GA 생산량이 증가하는 것으로 나타났다. 초기 pH 7 환경에서 반응시간을 96시간으로 고정 시 실험구간 내에서 lactic acid 생산량 0.5% 미만, GA 생산량 1% 이상으로 제어할 수 있는 구간을 그림에 나타내었다.

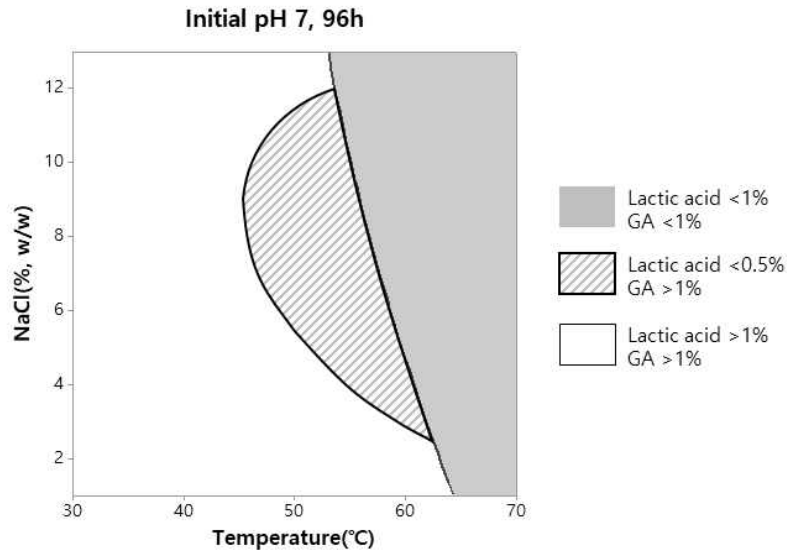


그림 2-2-2-4. 온도, NaCl 농도에 따른 lactic acid 및 GA 생산량 등고선도

(나) Glutamic acid 전환반응 조건 최적화

GA는 유리 아미노산 중 맛 역치가 가장 낮은 맛성분이다. GA의 전구체 아미노산은 glutamine으로 glutamine이 GA로 전환되기 위해서는 glutaminase의 작용이 필요하다. Glutamine은 온도, pH 등과 같은 비효소적 원리로 N 말단이 고리화되어 pyroglutamic acid로 전환될 수 있다. 따라서 효소반응 과정 중에 exopeptidase의 작용으로 펩타이드 말단에서 glutamine이 유리된 즉시 glutaminase가 작용하여 빠르게 GA로 전환될 수 있도록 조건을 최적화하는 것이 필요하다.

반응표면분석 실험을 통해 lactic acid 생산량 0.5% 미만, GA 생산량 1% 이상으로 예측된 구간의 온도, NaCl 농도 조건으로 효소반응 실험을 수행하였다(초기 pH 7, 반응시간 96시간). 효소반응 실험 조건 및 수행 결과를 표에 나타내었다. 모든 실험구의 종료 pH는 pH 5~6 수준이었고, lactic acid 생산량은 0.5% 미만, TAA 생산량은 9% 이상으로 나타났다. 온도가 증가함에 따라 FAA 생산량이 감소하면서 아미노산 유리율도 감소하는 경향을 나타내었다.

GA 및 pyroglutamic acid 생산량을 확인한 결과 온도, NaCl 농도가 증가할수록 GA 생산량이 감소하고, pyroglutamic acid 생산량은 증가하는 경향을 나타내었다. Glutamine 분석 결과 잔여량이 확인되지 않았다. 따라서 복합효소 반응환경 인자 중 온도, NaCl 농도를 GA 최대 생산량을 나타냈던 45°C, NaCl 9%로 설정하였다.

표 2-2-2-13. 온도, NaCl 농도에 따른 미생물 안전성, 맛성분 결과

구분	조절 인자		반응값(pH 외 w/v%)				
	온도	NaCl 농도	Lactic acid	종료 pH	TAA	FAA	아미노산 유리율 (FAA/TAA)
1	45°C	9%	0.13±0.02	5.81±0.04	9.62±0.04	7.11±0.11	74%
2	50°C	6%	0.03±0.01	5.95±0.08	9.57±0.15	6.94±0.07	72%
3	50°C	9%	0.03±0.01	6.26±0.02	9.54±0.09	6.70±0.63	70%
4	55°C	6%	0.01±0.00	6.43±0.04	9.34±0.07	6.33±0.11	68%
5	55°C	9%	0.01±0.00	6.31±0.05	9.28±0.07	5.97±0.30	64%

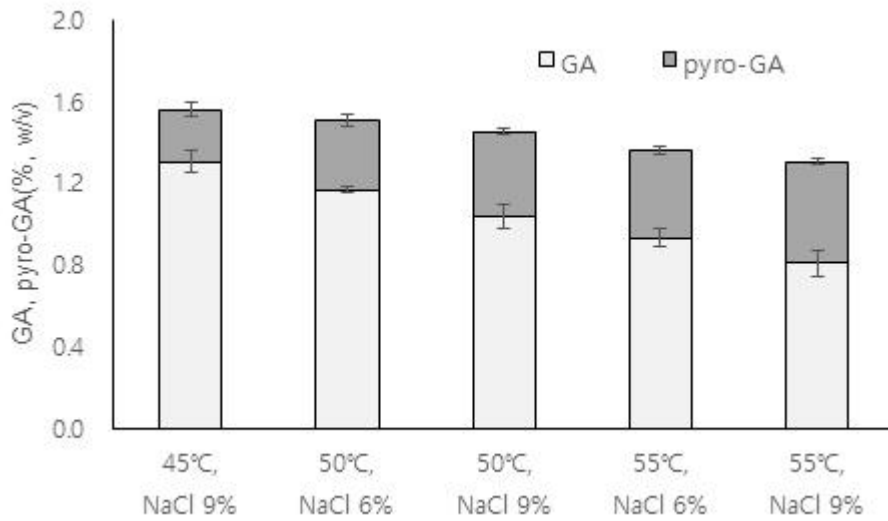


그림 2-2-2-5. 온도, NaCl 농도에 따른 GA, pyroglutamic acid 함량

반응시간을 최적화하기 위해 GA 최대 생산량을 나타낸 초기 pH 7, 온도 45°C, NaCl 9% 조건에서 반응시간에 따른 GA, glutamine, pyroglutamic acid 변화를 확인하였다. Glutamine은 반응 24시간에 0.18%로 가장 높게 나타났고 이후부터는 점차 감소하여 반응 96시간부터는 확인되지 않았다. GA는 반응시간이 증가함에 따라 총 함량이 증가하여 반응 96시간에 1.3%에 도달하였다. 그러나 반응시간이 증가할수록 시간 당 GA 생산량은 점차 감소하여 반응 96시간 이후에는 GA 생산량이 더 이상 증가하지 않았다. pyroglutamic acid는 반응시간이 증가할수록 점차 증가하여 반응 120시간에 0.3%로 확인되었다. 이러한 결과로 보아 펩타이드 말단에서 glutamine이 분해되는 작용은 대부분 효소반응 72시간 이내에 이루어지며, glutaminase의 작용에 의한 GA로의 전환은 효소반응 96시간까지 이루어지는 것으로 판단된다. 또한 고온의 반응환경 조건에 의해 glutaminase가 실활되어 생산된 glutamine 전량이 GA로 전환되지 못하고 일부 pyroglutamic acid로 전환된 것으로 판단된다. 이에 GA로의 전환이 종료되는 시기를 고려하여 복합효소 반응환경 인자 중 반응시간을 96시간으로 설정하였다.

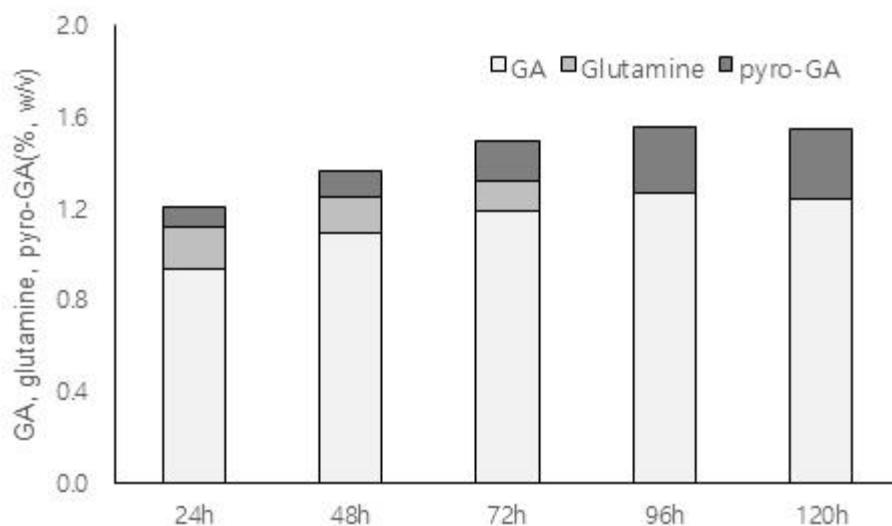


그림 2-2-2-6. 반응시간에 따른 GA, glutamine, pyroglutamic acid 변화

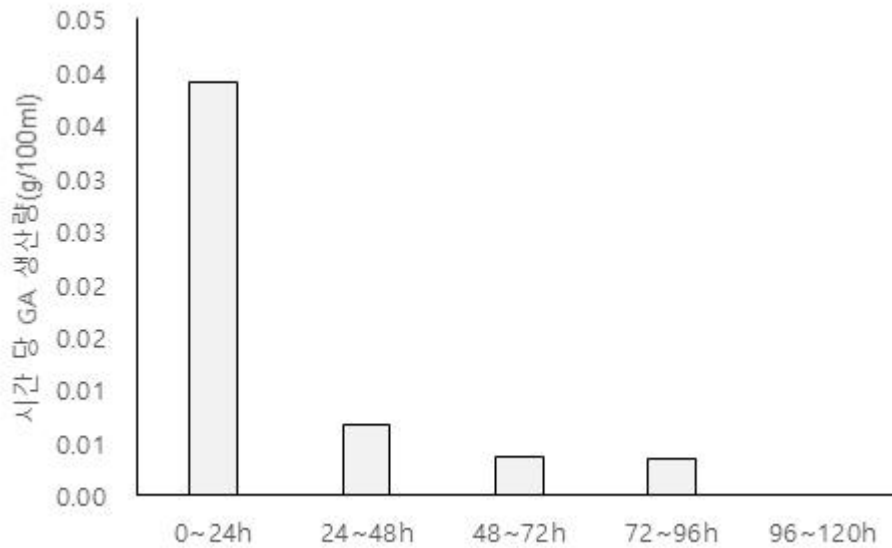


그림 2-2-2-7. 반응시간에 따른 시간 당 GA 생산량

(다) Gamma glutamyl peptides 생산반응 조건 최적화

GGT 효소를 첨가하여 복합효소반응을 수행한 결과 GA 및 gamma glutamyl peptides 생산량이 증가하는 것으로 나타났다. 특히 gamma glutamyl peptides는 GGT 효소 첨가량이 증가함에 따라 유의적으로 생산량이 증가하였다($p < 0.05$). GGT 효소 첨가량이 증가할수록 pyroglutamic acid 함량은 감소하였는데, 이는 glutamine이 유리된 직후 GGT 효소의 작용에 의해 gamma glutamyl peptides 또는 GA로 전환되었기 때문인 것으로 판단된다.

30종의 gamma glutamyl peptides 분석을 수행한 결과 약 20종의 gamma glutamyl peptides가 검출되었으며, GGT 효소 첨가량이 증가함에 따라 대부분의 gamma glutamyl peptides 생산량이 증가하는 것으로 확인되었다. 전체 gamma glutamyl peptides 중 10% 이상의 비율을 차지한 펩타이드는 γ -Glu-His, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Glu, γ -Glu-Ser이었다. 그 외 검출한계 미만으로 나타난 gamma glutamyl peptides는 EVG(γ -Glu-Val-Gly), γ -Glu-Trp, γ -Glu-Asn, γ -Glu-Val-ol, γ -Glu-Pro, γ -Glu-Val-Cys, γ -Glu-Val-Gln, γ -Glu-Ala-Gly, γ -GSH-reduced, γ -Glu-Asp 이었다.

GGT 효소 첨가량이 증가할수록 gamma glutamyl peptides 생산량이 증가하였으나 3.2% 첨가 시 발효취가 증가하는 경향이 있어 GGT 효소 첨가량을 1.6%로 설정하였다.

표 2-2-2-14. GGT 효소를 첨가한 효소반응 실험 결과

GGT	TAA (%, w/v)	FAA (%, w/v)	GA (%, w/v)	pyro-GA (%, w/v)	Gamma glutamyl peptides (ppm)
0.0%	8.93±0.09	7.91±0.18	1.12±0.05	0.38±0.08	317
0.8%	9.03±0.24	8.12±0.13	1.30±0.02	0.25±0.03	575
1.6%	9.03±0.30	7.65±0.26	1.33±0.03	0.21±0.04	705
3.2%	9.28±0.13	7.49±0.19	1.38±0.03	0.18±0.01	741

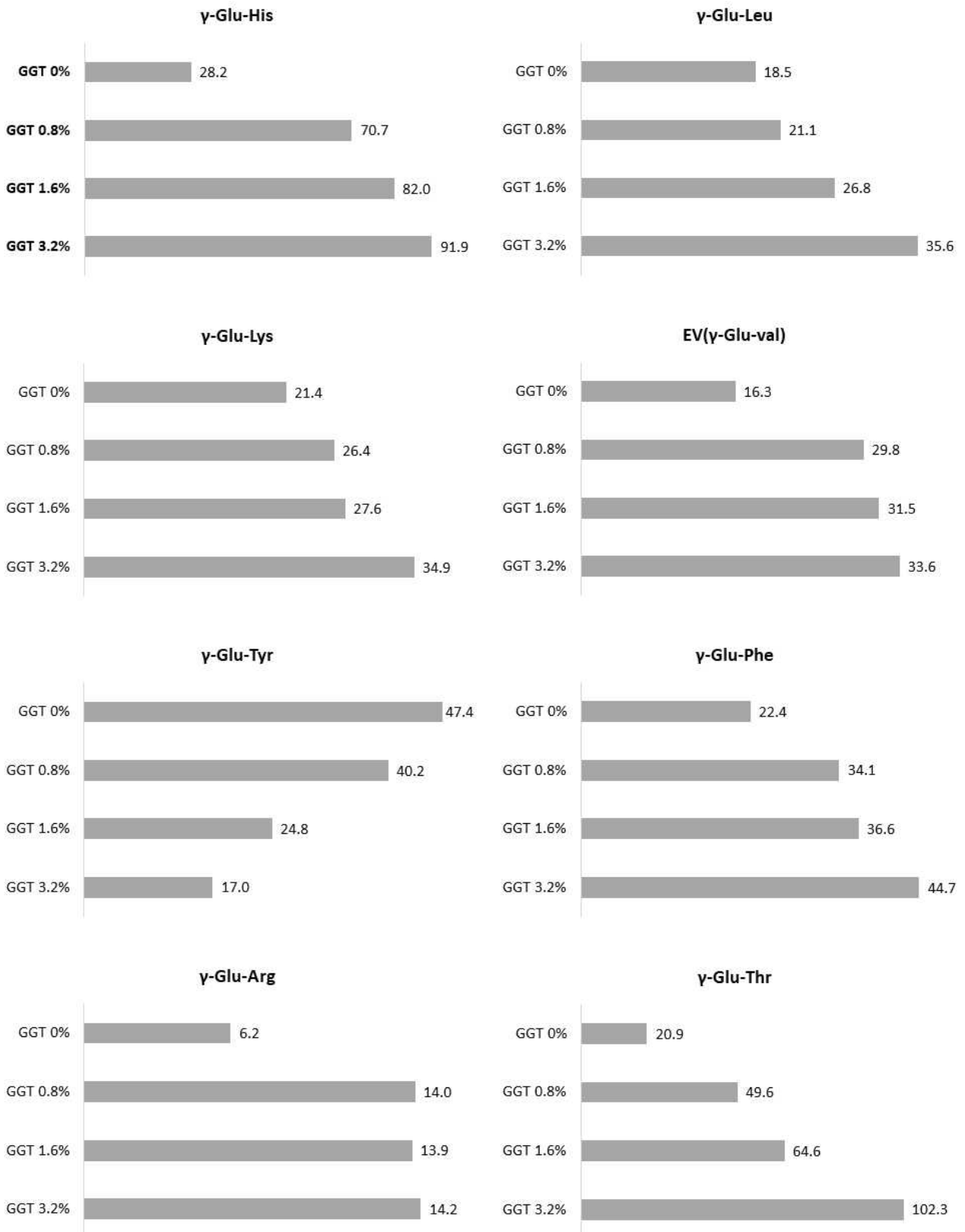


그림 2-2-2-8. GGT 효소 첨가량에 따른 gamma glutamyl peptides 변화(ppm)

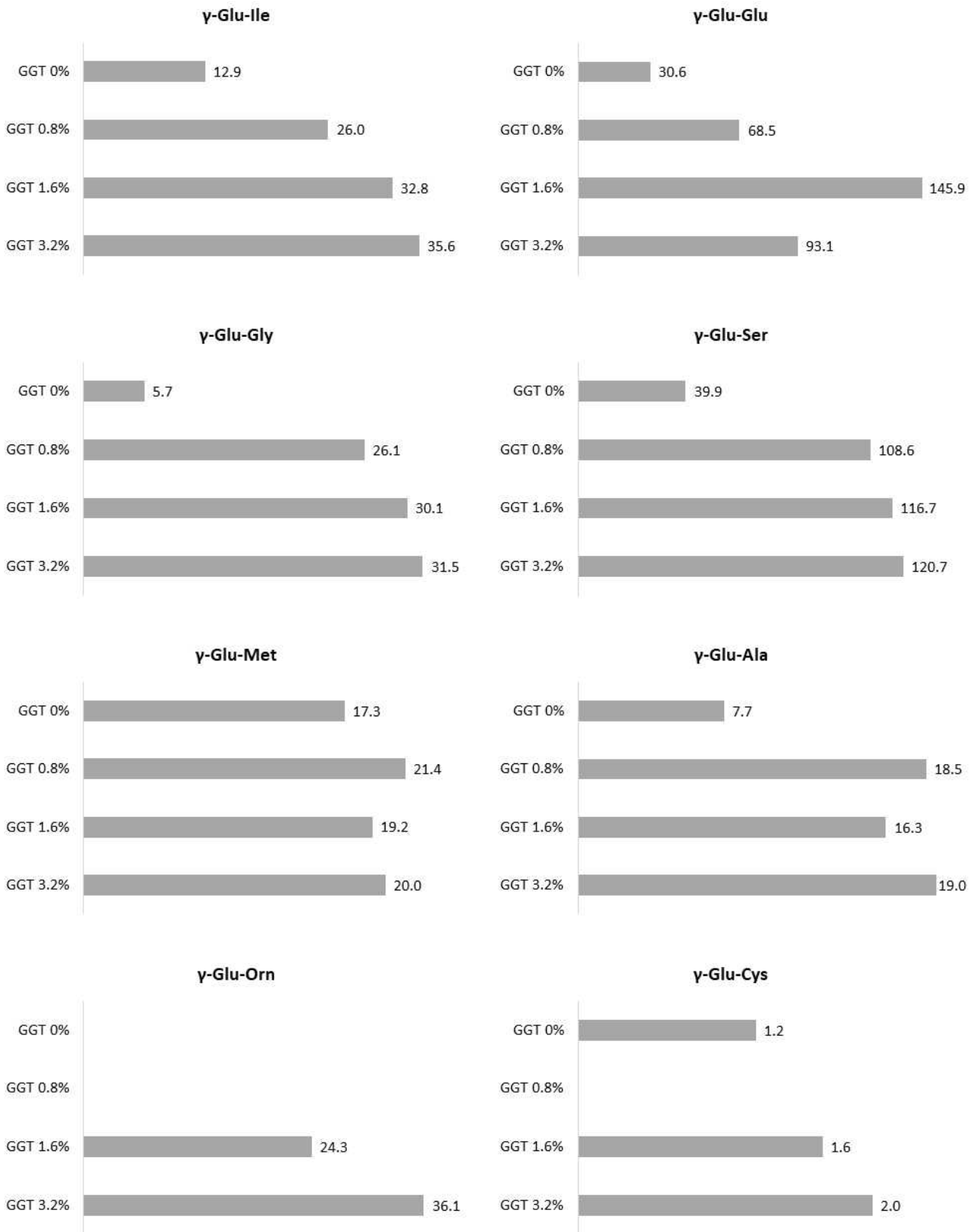


그림 2-2-2-9. GGT 효소 첨가량에 따른 gamma glutamyl peptides 변화(ppm)

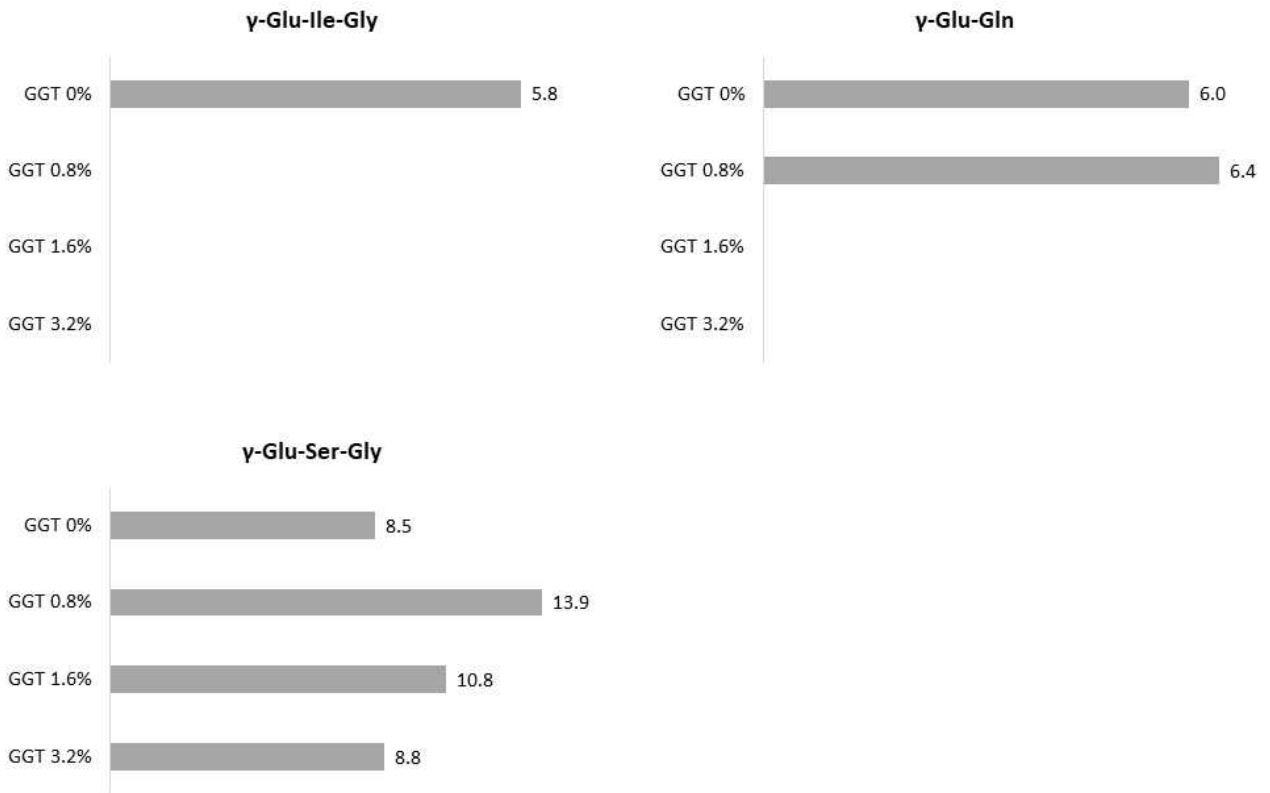


그림 2-2-2-10. GGT 효소 첨가량에 따른 gamma glutamyl peptides 변화(ppm)

(3) 결론

(가) 저분자 펩티드, 아미노산 생산반응 조건 최적화

2-수준 완전 요인배치법으로 설계한 16개의 반응환경 조건으로 효소반응 실험을 수행하여 반응환경 조건에 따른 잔존효소 활성을 확인하였다. 반응 온도가 증가할수록 protease, LAP, CAP 활성이 유의적으로 감소하였고, 열안정성이 낮은 glutaminase는 40°C 이상의 온도 조건에서 대부분 실활되어 반응환경 인자의 영향을 확인하기 어려웠다.

복합효소반응 시 수분 함량에 따른 단백질 용출율, 아미노산 유리율을 확인하고, 최종 향미 모듈의 NaCl 농도를 고려하여 수분 조건을 70%로 설정하였다.

반응표면법 중 중심합성법으로 설계한 31개의 반응환경 조건으로 효소반응 실험을 수행하여 반응환경 조건에 따른 미생물 안전성 및 맛성분 생산량을 확인하였다. 그 결과 lactic acid 생산량 0.5% 미만, GA 생산량 1% 이상으로 제어할 수 있는 온도, NaCl 농도 구간을 도출하였고, 이 때 TAA 생산량은 9%(w/v) 이상을 나타내었다.

(나) Glutamic acid 전환반응 조건 최적화

저분자 펩티드, 아미노산 생산반응 조건 최적화 연구에서 도출한 구간에서 효소반응 실험을 수행하였다. GA, glutamine, pyroglutamic acid 변화를 확인한 결과 초기 pH 7, 45°C, NaCl 9%, 96 시간으로 GA 전환반응 조건을 최적화 하였고, 이 때 GA 생산량은 1.3%(w/v)로 나타났다.

(다) Gamma glutamyl peptides 생산반응 조건 최적화

바실러스 SmF 기술로 생산한 GGT 효소를 복합효소반응에 활용하여 gamma glutamyl peptides 생산량을 증대시켰다. 약 20종의 gamma glutamyl peptides가 검출되었는데 GGT 효소 첨가량이 증가함에 따라 대부분 생산량이 증가하여 최대 741ppm을 나타내었다. 향미모듈을 구성하는 주요 gamma glutamyl peptides는 γ -Glu-His, γ -Glu-Thr, γ -Glu-Glu, γ -Glu-Ser으로 확인되었다. 연구 결과 복합효소반응 시 GGT 효소 첨가량을 1.6%로 최적화하였다.

나) MF/UF 기술 활용

(1) 연구방법

발효 기술을 통해 대두 단백질을 저분자 펩티드, 아미노산으로 분해하면서 대부분의 soy allergen이 제거되거나 모든 soy allergen을 완벽하게 제거하기 위해 membrane filtration 기술을 활용하였다. Membrane filtration 기술 적용에 의한 soy allergen 제거 효과를 확인하기 위해 복합효소 반응물을 Whatman filter paper No.2(pore size 8 μ m)로 1차 여과한 여과액을 준비하였다. 원활한 membrane filtration 진행을 위해 구조토(평균 pore size 0.3 μ m)를 이용한 감압여과 방식으로 2차 여과를 실시하였다. 이후 pore size 0.1 μ m와 molecular weight cutoff(MWCO) 5~10kDa의 membrane filter를 이용하여 단계적으로 여과를 실시하였다. 각 단계의 여과액을 회수하여 대두 단백질의 분해수준을 확인하기 위해 SDS-PAGE 분석을 수행하였다. 또한 soy allergen 제거수준을 확인하기 위해 ELISA법을 이용하여 soy allergen 정량분석을 수행하였다.

표 2-2-2-15. 복합효소 반응물의 여과 처리 조건

Step	단계별 여과 방식		Pore size or MWCO
1	감압여과	Filter paper	8 μ m
2		규조토	0.3 μ m
3	Microfiltration	Hollow Fiber modules	0.1 μ m
4	Ultrafiltration	Ultrafiltration Discs	10kDa
5		Dialysis membrane	7kDa
6		Ultrafiltration Discs	5kDa

(2) 실험방법

① SDS-PAGE 분석법

Mini-PROTEAN® TGXTM Precast Gels 4-20%(BioRad)를 이용하여 SDS-PAGE 수행 후 staining 하고 이미지 분석장비(ChemiDoc XRS+ systems with image lab software, BioRad)로 표준물질과 시료의 발색 차이를 측정하였다.

② Soy allergen 분석법

Soy allergen은 3M사의 Allergen Protein Rapid Kit인 3M™ Soy Protein Rapid Kit(검출한계 11ppb, 정량한계 2ppm)를 사용하여 정량분석을 실시하였다.

(3) 연구결과

대두 원료 및 효소반응물 여과액의 SDS-PAGE 분석을 수행한 결과 DS-PAGE 상에서 대두 원료의 soy allergen인 Gly m6, Gly m5, kunitz soybean trypsin inhibitor 등의 band를 확인할 수 있었다. 복합효소 반응물을 pore size 8 μ m의 filter paper, 규조토로 여과한 여과액은 뚜렷하지는 않으나 14kDa 근처에서 band가 관찰되었다. Membrane filtration 기술 적용 시 pore size 0.1 μ m로 여과한 여과액부터 band가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 membrane filtration 기술의 적용을 통해 14kDa 이상의 soy allergen을 제거할 수 있는 것으로 판단되었다.

복합효소 반응물의 soy allergen 확인 결과를 표에 나타내었다. 1~3차 실험에서 복합효소 반응물을 pore size 8 μ m로 여과한 여과액의 soy allergen은 평균 3.33ppm 이었다. 발효기술을 이용하여 대두 단백질을 저분자 펩티드, 아미노산 형태로 분해한 복합효소 반응물에서는 soy allergen이 미량 잔존하는 것을 확인하였다. 1차 실험에서는 100kDa 사이즈로 여과한 여과액에서 2.58ppm의 soy allergen이 검출되었고, 10kDa 사이즈로 여과한 여과액부터는 정량한계 미만으로 나타났다. 2, 3차 실험에서는 0.3 μ m 사이즈로 여과한 여과액부터 정량한계 미만으로 나타났다.

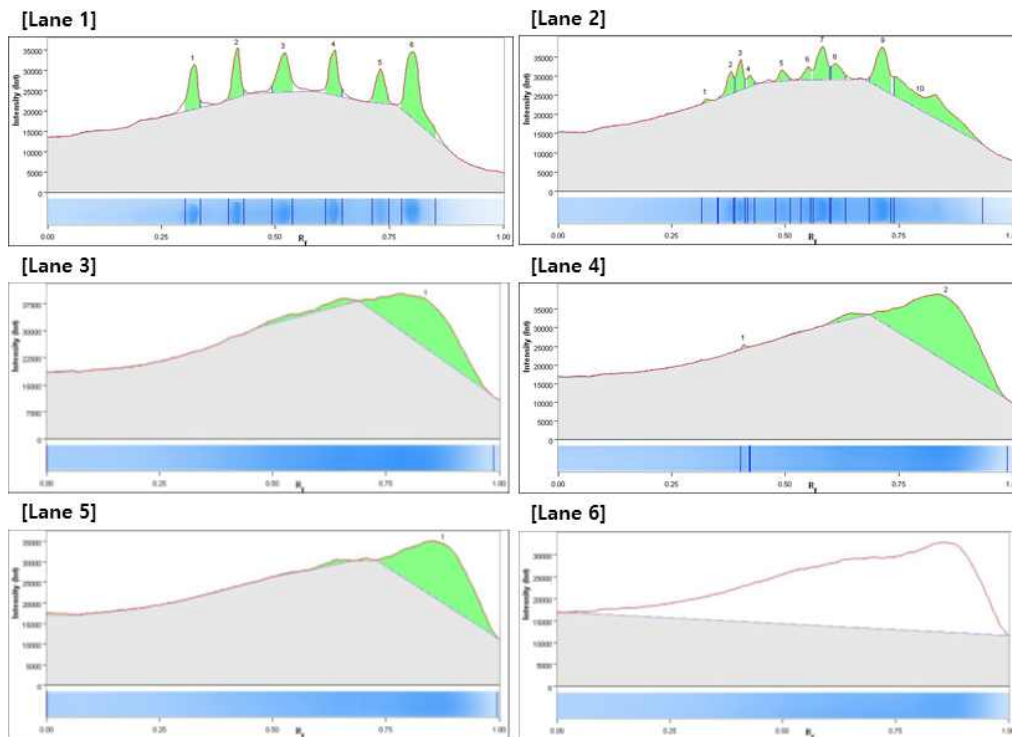
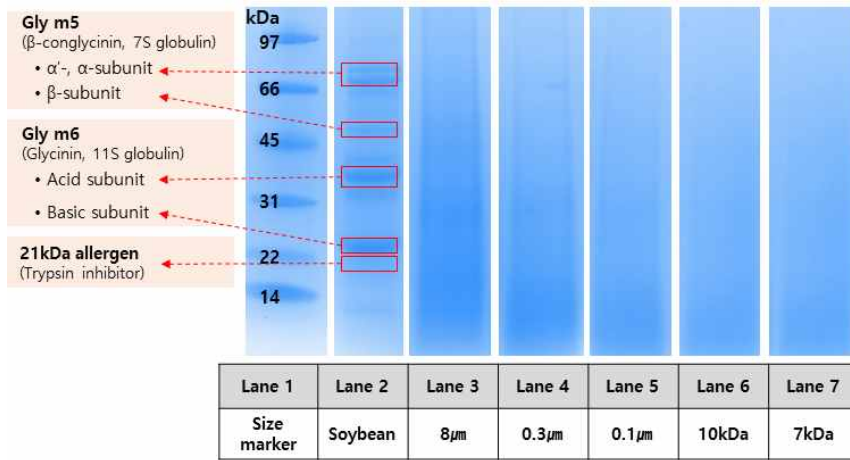


그림 2-2-2-11. Membrane filtration 기술 처리에 따른 SDS-PAGE 분석 결과

표 2-2-2-16. Membrane filtration 기술 처리에 따른 soy allergen 제거 효과

Step	1	2	3	4	5	6	
Pore size or MWCO	8µm	0.3µm	0.1µm	10kDa	7kDa	5kDa	
Soy allergen (mg/kg)	1회	2.94±0.15	2.51±0.17	2.58±0.22	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	2회	3.08±0.14	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	3회	3.98±0.15	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

(4) 결론

이러한 결과로 미루어 보아 soy allergen을 완벽히 제거하기 위해서는 pore size 0.1µm 수준의 membrane filtration 기술을 적용하는 것이 효과적인 것으로 판단하였다. Membrane filtration 기술의 적용으로 연속자동 여과 프로세스 설계가 가능하며, 구조토 여과 방식 대비 폐기물이 발생하지 않는 장점이 있다.

다) 대량생산 공정 표준화 연구

(1) 연구방법



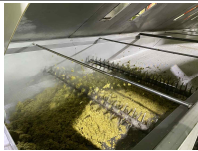


(가) 기존 발효기술 활용한 완두발효모들 대량생산 연구

실제 양산환경에서 완두에 기존 발효기술을 적용한 완두발효모들의 대량생산 연구를 수행하였다. 양산 설비의 최소 capacity를 고려하여 완두 원료 10ton으로 대량생산 연구를 수행하였다. 대형 NK식 증자 설비를 활용하여 완두의 효소활성 저해인자 저감을 위한 수분 함량 및 열처리 조건을 설정하였다. LAP 고활성 SMF119 균주를 적용한 SSF 기술로 복합효소 대량생산 공정을 수행 후 정제수, 천일염을 가하여 수분 70%, NaCl 17%로 조절하였다. 이후 약 30℃의 온도 조건으로 120일간 효소반응을 수행하면서 효소반응 기간별 완두발효모들의 품질을 확인하였다. 효소반응 종료 후 필터프레스로 압착하여 완두발효모들을 생산하고, 품질을 확인하였다.



그림 2-2-2-12. 완두발효모들 대량생산 공정

표 2-2-2-17. 완두발효모들 대량생산 공정별 진행사항

No.	공정	설비	진행사항
1	원료입고		<ul style="list-style-type: none"> ■ Silo tank 및 컨베이어 CIP ■ 원료 중량계근 및 하차
2	분쇄/이송	 Roller mill	<ul style="list-style-type: none"> ■ 완두 분쇄, 증자 설비로 이송
3	가수/증자	 NK식 증자설비	<ul style="list-style-type: none"> ■ 가수량: 원료 무게 대비 80% ■ 증자 조건: 131℃, 1.8기압 조건에서 6분
4	복합효소 대량생산	 10ton 고상발효기	<ul style="list-style-type: none"> ■ 종균: LAP 고활성 <i>Aspergillus oryzae</i> SMF119 10⁶ CFU/g ■ 발효 조건: 약 30℃ 내외, 40시간
5	사입/ 효소반응	 30ton 반응기	<ul style="list-style-type: none"> ■ 사입 조건: 정제수, 천일염을 가하여 수분 70%, NaCl 16%로 조절 ■ 효소반응 조건: 약 30℃, 120일

6	압착	 압착기	■ 압착 조건: 압력 150~300kg/cm ² , 48시간
7	완두 발효모듈	 IBC tank	■ IBC tank에 1ton 단위로 저장

(나) 완두단백발효모듈 대량생산 연구







실제 양산환경에서 완두단백에 복합효소 대량생산 기술 및 저염단기 복합효소 반응 기술을 적용하여 완두단백발효모듈의 대량생산 연구를 수행하였다. 양산 설비의 최소 capacity를 고려하여 완두단백, 미분 원료 2ton으로 대량생산 연구를 수행하였다. 5단증자 설비를 활용하여 완두단백의 효소활성 저해인자 저감을 수행하고, 복합효소 대량생산 공정에 적합한 형태를 구현하였다. LAP 고효성 SMF119 균주를 적용한 SSF 기술로 복합효소 대량생산 공정을 수행 후 정제수, 천일염을 가하여 수분 70%, NaCl 9%로 조절하였다. 이후 45의 온도 조건으로 96시간 동안 효소반응을 수행하였다. 효소반응 종료 후 필터프레스로 압착하고, 활성탄 처리 공정을 수행하였다. 이후 pore size 0.1 μ m 수준으로 MF 공정을 수행하여 완두단백발효모듈을 생산하고, 품질을 확인하였다.



그림 2-2-2-13. 완두단백발효모듈 대량생산 공정

표 2-2-2-18. 완두단백발효모듈 대량생산 공정별 진행사항

No.	공정	설비	진행사항
1	원료입고		■ 원료창고 보관
2	원료 혼합	 분말 혼합기	■ 혼합비율: 완두단백 80%, 쌀 20%
3	가수/증자	 5단 증자설비	■ 가수량: 원료 무게 대비 80% ■ 증자 조건:

4	복합효소 대량생산	 5ton 고상발효기	<ul style="list-style-type: none"> ■ 종균: LAP 고효성 <i>Aspergillus oryzae</i> SMF119 10⁶ CFU/g ■ 발효 조건: 약 30℃ 내외, 40시간
5	사입/ 효소반응	 6ton 반응기	<ul style="list-style-type: none"> ■ 사입 조건: 정제수, 천일염을 가하여 수분 70%, NaCl 9%로 조절 GGT 효소 1.6% 첨가 ■ 효소반응 조건: 45℃, 96시간
6	압착	 필터프레스	<ul style="list-style-type: none"> ■ 약 2시간 소요
7	활성탄 처리	 반응기	<ul style="list-style-type: none"> ■ 처리 조건: 65℃, 1시간
8	MF	 MF 설비	<ul style="list-style-type: none"> ■ Pore size: 0.1 μm
9	완두단백 발효모듈	 IBC tank	<ul style="list-style-type: none"> ■ IBC tank에 1ton 단위로 저장

(라) 실험방법

① 수분

시료의 수분 함량은 식품공전상의 상압가열건조법에 따라 분석하였다. 미리 가열하여 항량으로 한 칭량접시에 시료 3~5g을 정밀히 달아 105℃에서 3~5시간 이상 건조한 후 데시케이터 중에서 식히고 질량을 측정하는 조작을 반복하였다. 건조 후 항량이 되었을 때의 질량을 아래의 수식에 대입하여 수분 함량을 산출하였다.

$$\text{수분(\%)} = \frac{b-c}{b-a} \times 100$$

a: 칭량접시의 질량(g)

b: 칭량접시와 시료의 질량(g)

c: 건조 후 항량이 되었을 때의 질량(g)

② 총질소(조단백)

시료의 총질소 함량은 AOAC에 등재된 DUMAS법에 따라 분석하였다. 도가니에 시료의 무게를

정밀히 달아 기기에 장착시킨 후 800~1,000°C의 열을 가하여 시료 내 질소를 산화질소로 연소시킨다. 구리나 텅스텐을 통해 환원된 N₂를 열전도도 검출기로 정량한다. 총질소 함량에 질소계수(6.25)를 곱하여 조단백 함량을 산출하였다.

③ 조회분

조회분 함량은 미리 건조하여 항량으로 한 도가니에 시료를 넣고 550~600°C의 온도로 6시간 동안 회화시킨 후 데시케이터에 옮기고 식혀 실온이 되면 칭량하여 아래의 식에 따라 산출하였다.

$$\text{조회분(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W₀: 항량이 된 도가니의 질량(g)

W₁: 회화 후의 도가니와 회분의 질량(g)

S: 시료의 채취량(g)

④ 조지방

시료의 조지방 함량은 속슬렛법에 따라 분석하였다. 시료를 원통여지에 넣어 속슬렛 지방 추출기의 추출 플라스크에 장착 후 에테르를 기화시킨다. 냉각관을 지나 다시 액화된 에테르가 원통여지 속 시료로 떨어지는 과정을 반복하여 시료 내 지방질을 추출 후 에테르를 휘발시키고 건조물의 중량을 달아 조지방 함량을 산출하였다.

$$\text{조지방(\%)} = \frac{W_1 - W_0}{S} \times 100$$

W₀: 추출 플라스크의 무게(g)

W₁: 조지방을 추출하여 건조시킨 추출 플라스크의 무게(g)

S: 시료의 채취량(g)

⑤ 저분자 펩티드, 아미노산

시료의 저분자 펩티드, 아미노산 함량 분석을 위해 ultra-filtration을 이용하여 분자량 1,000Da 이하 사이즈로 분획 후 구성 아미노산 분석을 수행하였다.

⑥ 바이오제닉 아민

시료 중 histamine, tyramine을 0.1N HCl로 추출하고 포화탄산나트륨 용액과 1% dansyl chloride 용액을 가하여 45°C에서 100rpm 속도로 1시간 동안 유도체화 한 후 ethyl ether를 가한다. 질소농축기로 농축 후 acetonitrile을 가하고 0.22 μm syringe filter로 여과하여 HPLC 분석을 수행하였다. 표준용액 분석 결과로 검량곡선을 작성하고 시료를 대입하여 histamine, tyramine 함량을 산출하였다.

표 2-2-2-19. 바이오제닉 아민 분석을 위한 기기분석 조건

분석기기	HPLC-UV/HPLC-PDA
Column	OSAKA SODA capcell PAK C18(5,µm, 4.6*250mm)
Injection volume	20µL
Flow rate	1.0mL/min
Run time	45min
Column temperature	40℃

⑦ 명도(a), 황색도(b), 적색도(c)

시료의 명도, 황색도, 적색도는 분광측색계(CM-5, KONICA MINOLTA)를 사용하여 분석하였다.

⑧ 통계적 분석

모든 성분 분석은 3회 반복하여 MiniTab(MiniTab 17, Minitab Inc., USA)을 이용하여 통계적 유의성 $p < 0.05$ 수준에서 통계적 분석을 수행하였다.

(3) 연구결과

(가) 기존 발효기술 활용한 완두발효모들 대량생산 연구

완두 원료의 조단백 함량은 20.64%로 확인되었다. 완두 원료의 품질 확인 결과를 표에 나타내었다.

표 2-2-2-20. 완두 원료의 품질 확인 결과

원료명	수분(%)	조단백(%) TN*6.25	Soy protein
완두	10.81±0.11	20.64±0.18	불검출

완두를 이용하여 복합효소 대량생산 공정을 수행한 결과 protease 771U/g, LAP 7,320mU/g, CAP 1,768mU/g, GLS 2,210mU/g의 효소 활성을 지닌 고상발효물을 생산하였다.

표 2-2-2-21. 완두발효모들의 복합효소 대량생산 결과(건물 기준)

Neutral protease (U/g)	Leucine aminopeptidase (mU/g)	Carboxypeptidase (mU/g)	Glutaminase (mU/g)
771±88	7,320±799	1,768±214	2,210±546

완두 고상발효물에 기존 장 발효기술을 적용하여 복합효소 반응 공정을 수행한 결과 TAA 6.7%, FAA 5.2%, GA 0.7%, gamma glutamyl peptides 537ppm의 완두발효모들을 생산하였다. 기존 장 발효기술을 적용하여 모듈의 NaCl 농도가 16.8%로 높고, 진한 색상을 나타내었다.

표 2-2-2-22. 완두발효모들의 최종 품질 확인 결과

품질 지표		품질 목표	대량생산 결과
맛	TN(% , w/v)	2.2 이상	1.1±0.0
	TAA(% , w/v)	14.0 이상	6.7±0.1
	저분자 펩티드, 아미노산(% , w/v)	12.6 이상	5.9±0.2
	FAA(% , w/v)	10.0 이상	5.2±0.1
	GA(% , w/v)	1.5 이상	0.7±0.0
	G-peptide(ppm)	500 이상	537±19
향기	FD factor	128 이하	1,024 이상
안전성	바이오제닉 아민(mg/kg)	50 이하	65±7
	SDS-PAGE	7kDa 이상 0%	7kDa 이상 0%
	Soy allergen	검출한계 미만	검출한계 미만
나트륨	NaCl	10.0 이하	16.8±0.1
	저분자 펩티드, 아미노산 /NaCl ratio(%)	120 이상	35
색상	명도(L)	75 이상	57.8±1.1
	황색도(a)	25 이하	36.8±1.8
	적색도(b)	70 이하	87.5±1.1
일반성분	수분(% , w/w/)	75 이하	72.8±0.7
	pH	5~6	4.7±0.0

(나) 완두단백발효모들 대량생산 연구

완두단백 원료의 조단백 함량은 81.25%로 확인되었다. 완두단백, 미분 원료의 품질 확인 결과를 표에 나타내었다.

표 2-2-2-23. 완두단백, 미분 원료의 품질 확인 결과

원료명	수분(%)	조단백(%) TN*6.25	조회분(%)	조지방(%)	Soy protein
완두단백	8.10±0.16	81.25±0.54	4.35±0.23	0	불검출
미분	10.82±0.45	7.50±0.50	0.40±0.04	0	불검출

완두단백, 미분을 이용하여 복합효소 대량생산 공정을 수행한 결과 protease 584U/g, LAP 10,435mU/g, CAP 2,140mU/g, GLS 1,442mU/g의 효소 활성을 지닌 고상발효물을 생산하였다.

표 2-2-2-24. 완두단백발효모들의 복합효소 대량생산 공정 결과

Neutral protease (U/g)	Leucine aminopeptidase (mU/g)	Carboxypeptidase (mU/g)	Glutaminase (mU/g)
584±42	10,435±2,421	2,140±293	1,442±197

완두단백 고상발효물에 저염단기 발효기술을 적용하여 복합효소 반응 공정을 수행한 결과 TAA 15.1%, FAA 10.8%, GA 1.7%, gamma glutamyl peptides 788ppm의 완두단백발효모들을 생산하였다. 저염단기 발효기술의 적용으로 저염(NaCl 8.1%)의 향미모들을 생산 가능하였으며, 바이오제닉 아민 확인 결과는 불검출로 나타났다. 완두단백발효모들의 FD factor는 512로 품질 목표에 미치지 못하였으나 기존 장 발효기술을 적용한 완두발효모들 대비 50% 이상 저감되었다.

표 2-2-2-25. 완두단백발효모들의 최종 품질 확인 결과

품질 지표		품질 목표	대량생산 결과
맛	TN(% , w/v)	2.2 이상	2.6±0.1
	TAA(% , w/v)	14.0 이상	16.5±0.3
	저분자 펩티드, 아미노산(% , w/v)	12.6 이상	14.0±0.6
	FAA(% , w/v)	10.0 이상	11.8±0.8
	GA(% , w/v)	1.5 이상	1.9±0.0
	G-peptide(ppm)	500 이상	860±44
향기	FD factor	128 이하	512
안전성	바이오제닉 아민(mg/kg)	50 이하	불검출
	SDS-PAGE	7kDa 이상 0%	7kDa 이상 0%
	Soy allergen	검출한계 미만	검출한계 미만
나트륨	NaCl	10.0 이하	8.8±0.1
	저분자 펩티드, 아미노산 /NaCl ratio(%)	120 이상	159
색상	명도(L)	75 이상	79.6±3.5
	황색도(a)	25 이하	6.5±0.6
	적색도(b)	70 이하	64.6±1.9
일반성분	수분(% , w/w/)	75 이하	76.5±1.0
	pH	5~6	5.9±0.0

라) 비건김치 레시피 개발 및 공정설계 연구용 식물성 발효향미모듈 공급

(1) 식물성 발효향미모듈 prototype 1차 공급

- 공급일자: 2020년 9월
- 공급량: 3kg
- 제공모듈: 대두발효모듈에 발효주정을 혼합
- 제조방법: 대두에 기존 장 발효기술을 적용하여 발효하였다. 밝은 색상을 위해 활성탄 처리 공정을 수행하였고, 이후 염분을 낮추고 맛성분 함량을 높이기 위해 탈염, 농축 공정을 수행하였다. 보존성 확보를 위해 발효주정을 혼합하였다.

식물성 발효향미모듈 prototype 품질 특성



T.N. (w/w%)	1.5
Glutamic acid (w/w%)	1.3
NaCl (w/w%)	9
Alcohol (w/v%)	3.5
pH	4.8
Brix	32
L값	72.1

예상 적용 결과

양념 중 첨가비율	양념 총 NaCl
10%	0.9%
15%	1.4%
20%	1.8%
22%	2.0%
25%	2.3%
30%	2.7%



*김치 중 양념 비율 20% 기준

그림 2-2-2-14. 식물성 발효향미모듈 prototype 1차 공급

(2) 식물성 발효향미모듈 prototype 2차 공급

- 공급일자: 2021년 2월
- 공급량: 3kg
- 제공모듈: 대두단백발효모듈에 식물성 발효향미모듈-2와 발효주정을 혼합
- 제조방법: 농축대두단백에 복합효소 대량생산 기술 및 저염단기 복합효소 반응 기술을 적용하여 대두단백발효모듈을 제조하였다. 밝은 색상을 위해 활성탄 처리 공정을 수행하였다. 이후 향미 부여 및 보존성 확보를 위해 식물성 발효향미모듈-2 prototype과 발효주정을 혼합하였다.

(3) 식물성 발효향미모듈 prototype 3차 공급

- 공급일자: 2021년 6월
- 공급량: 3kg
- 제공모듈: 완두단백발효모듈에 식물성 발효향미모듈-2와 발효주정을 혼합
- 제조방법: 완두단백에 복합효소 대량생산 기술 및 저염단기 복합효소 반응 기술을 적용하여 완두단백발효모듈을 제조하였다. 밝은 색상을 위해 활성탄 처리 공정을 수행하였다. 이후 향미 부여 및 보존성 확보를 위해 식물성 발효향미모듈-2와 발효주정을 혼합하였다.

(4) 식물성 발효향미모듈 prototype 4차 공급

- 공급일자: 2021년 9월
- 공급량: 50LT
- 제공모듈: 대량생산 공정 연구를 통해 제조한 완두단백발효모듈에 식물성 발효향미모듈-2와 발효주정을 혼합
- 제조방법: 실제 양산환경에서 완두단백에 복합효소 대량생산 기술 및 저염단기 복합효소 반응 기술을 적용하여 완두단백발효모듈을 제조하였다. 밝은 색상을 위해 활성탄 처리 공정을 수행하였다. 이후 향미 부여 및 보존성 확보를 위해 식물성 발효향미모듈-2 prototype과 발효주정을 혼합하였다.

표 2-2-2-26. 공급한 식물성 발효향미모듈 prototype의 품질 정보

(부피 기준)

품질지표	품질목표	Prototype 1차 (20년 9월)	Prototype 2차 (21년 2월)	Prototype 3차 (21년 6월)	Prototype 4차 (21년 9월)
T.N (%, w/v)	2.2 이상	1.71	1.78	2.43	2.35
NaCl (%, w/v)	10 이하	10.43	10.42	8.07	8.06
pH	5~6	4.82	5.00	5.31	5.94
명도(L)	75 이상	72.05	78.75	93.58	83.22
황색도(a)	25 이하	16.97	15.50	-3.11	4.4
적색도(b)	70 이하	73.83	84.50	27.63	62.56
수분 (%, w/w)	75 이하	68.20	69.67	75.94	74.51
구성 아미노산(%, w/v)	14 이상	11.47	11.12	15.43	15.10
유리 아미노산(%, w/v)	10 이상	8.10	10.54	12.50	10.77
Glutamic acid(%, w/v)	1.5 이상	1.52	1.72	2.04	1.71
Alcohol(%, w/v)	-	3.50	3.42	3.65	4.35

마) 알리지 프리 식물성 발효향미모듈-1의 품질규격 설정

대량생산 연구를 통해 알리지 프리 식물성 발효향미모듈-1인 완두단백발효모듈의 품질규격을 아래와 같이 설정하였다. 저비용으로 신속하게 모듈의 품질을 확인검증 할 수 있는 규격항목을 설정하였다.

표 2-2-2-27. 식물성 발효향미모듈-1의 품질규격

규격 항목		규격
맛	TN(% , w/v)	2.2 이상
	GA(% , w/v)	1.7 이상
	G-peptide(ppm)	500 이상
안전성	바이오제닉 아민(mg/kg)	50 이하
	Soy allergen	검출한계 미만
나트륨	NaCl	10.0 이하
색상	명도(L)	75 이상
일반성분	수분(% , w/w/)	75 이하
	pH	5~6

2) 식물성 발효향미모듈-2 개발완료 및 공정 표준화

가) 3단계 신선액상발효 기술 개발

(1) 실험방법

(가) Glucose 분석 방법

시료 1mL을 채취하여 원심분리(4°C, 14,000rpm)를 통해 상등액을 획득하여 멸균수에 10배 희석법으로 희석한 후 glucose 분석 장비(Cedex bio, Roche)를 이용하여 분석하였음.

(나) 산도 분석 방법

시료 10g을 EasyPlus™ 자동 적정기(METTLER TOLEDO)를 사용하여 0.1N NaOH 용액으로 pH 7.2에 도달할 때까지의 적정량인 산도(mL)를 확인하였고 총산 함량은 유산균 발효를 통해 생성된 젖산 유기산 상당량(0.009)을 적용하여 계산하였음.

(다) 효모수 분석 방법

시료 100 μ L를 채취하여 멸균수에 10배 희석법으로 10^5 까지 희석하고 효모 배양용 고체 배지(Potato Dextrose Agar)에 100 μ L를 분주하고 실험용 멸균 spreader를 이용하여 도말한 후 30°C 인큐베이터에서 48~72hr 배양한 후 cell counting 방법으로 효모 균수를 확인함.

(라) 유산균수 분석 방법

시료 100 μ L를 채취하여 멸균수에 10배 희석법으로 10^5 까지 희석하고 유산균 배양용 고체 배지(Lactobacilli MRS)에 100 μ L를 분주하고 실험용 멸균 spreader를 이용하여 도말한 후 37°C 인큐베이터에서 48~72hr 배양한 후 cell counting 방법으로 유산균 균수를 확인함.

(마) 향기성분 분석 방법

휘발성 향기성분 추출은 SPME(Solid Phase Microextraction)을 이용하였고, 향기성분 동정은 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry)를 통해 얻은 mass spectral data와 retraction index(RI) value를 이용함. 향기성분의 정량은 SPME 추출 시에 내부표준물질로 1000 mg/L 3-heptanol을 이용하여 최종 농도 1000 μ g/L로 첨가하여 internal standard법으로 진행함.

(2) 연구방법

(가) 종배양 조건

종배양 배지는 알코올 발효를 위해 쌀을 액당화하여 만든 쌀당화액(20%)를 10% 희석 제조하여 멸균하여 쌀당화액 배지 5mL에 유산균과 효모균주를 각각 접종하여 37°C, 30°C에서 24시간 정치배양하여 전배양 배지에 5% 접종하여 사용함.

(나) 전배양 조건

전배양 배지는 종배양 배지와 동일한 10% 쌀당화액 배지를 사용함. 유산균과 효모 균주를 종배양액을 각각 5% 접종하여 37°C, 25°C에서 1~2일 정치배양하여 본 배양에 1% 접종하여 사용함.

(다) 액.당화

아래 표와 같은 비율로 담금을 한 후 알코올 발효에 필요한 포도당을 생성하기 위해 액화(70℃, 2hr)공정과 당화(60℃, 16~20hr)공정을 진행하였음. 20시간 당화공정을 거쳐 포도당 함량이 20%에 도달하여 당화공정을 종료하였음.

표 2-2-2-28. 액당화 담금 비율

원재료명	첨가량(w/w %)
쌀(미분)	23.27
액화효소(BAN 480L)	0.06
당화효소(AMG 300L)	0.06
단백분해효소(SUMIZYME LP50)	0.005
정제수	76.6
합계	100

(라) 알코올 발효

발효 조건은 정치배양으로 초기 37℃에서 25℃, 13℃로 배양온도를 단계적으로 낮추어 조절하였고 발효 추적분석(알코올, 포도당, pH, 산도, 미생물)을 통해 알코올발효 진행 상황을 확인하였음

나) 쌀발효물 모듈 개발(Pilot scale) 및 시작품 제작

(1) 연구결과

(가) 담금비율

아래 표와 같은 비율로 담금을 한 후 액화(70℃, 2hr)공정과 당화(60℃, 20hr)공정을 거쳐 포도당 함량이 18.1%에 도달하여 당화공정을 종료하였음.

표 2-2-2-29. 원재료명 및 담금비율

원재료명	담금비(w/w %)	배합량(kg)
쌀(미분)	23.5	47
액화효소(BAN 480L)	0.06	0.12
당화효소(AMG 300L)	0.06	0.12
단백분해효소(SUMIZYME LP50)	0.005	0.01
정제수	76.4	153
합계	100	200

(나) 알코올 발효

유산균 및 효모를 활성화하여 각각 접종하고 발효 조건은 정치배양으로 초기 37℃에서 25℃, 13℃로 배양온도를 단계적으로 낮추어 조절하였고 발효 추적분석(알코올, 포도당, pH, 산

도, 미생물)을 통해 알코올발효 진행상황을 확인하였음.

산도는 3일차부터 점차 증가하기 시작하였으며 포도당함량은 발효 3일차까지 큰 변화는 없었으며 3일차 이후 포도당함량이 감소하면서 알코올이 생성되었음. 미생물 균수는 유산균과 효모 균주 모두 발효 9일차까지 서서히 증가하여 각각 8.5×10^8 cfu/mL, 3.0×10^7 cfu/mL를 나타내었고 이후 감소하는 경향을 보임.

표 2-2-2-30. 발효기간에 의한 이화학 성분 및 미생물 분석 결과

일차	알코올 (v/v%)	포도당 (v/v%)	pH	산도 (mL)	효모 (CFU/mL)	유산균 (CFU/mL)
2		20.6	3.4	4.7	8.0.E+06	2.8E+08
3	0.5	19.8	3.1	9.5	1.0.E+06	6.7E+08
6	3.2	15.0	2.8	17.8	3.0.E+06	7.7E+08
9	5.1	11.5	2.9	17.6	3.0.E+07	8.5E+08
13	6.5	9.9	2.8	19.0	1.0.E+07	6.4E+08
17	7.1	8.6	2.8	20.6	6.0.E+06	5.3E+08
21	8.0	6.6	2.8	24.3	2.7.E+06	4.7E+08
24	9.2	3.5	2.8	24.2	3.1.E+06	2.4E+07

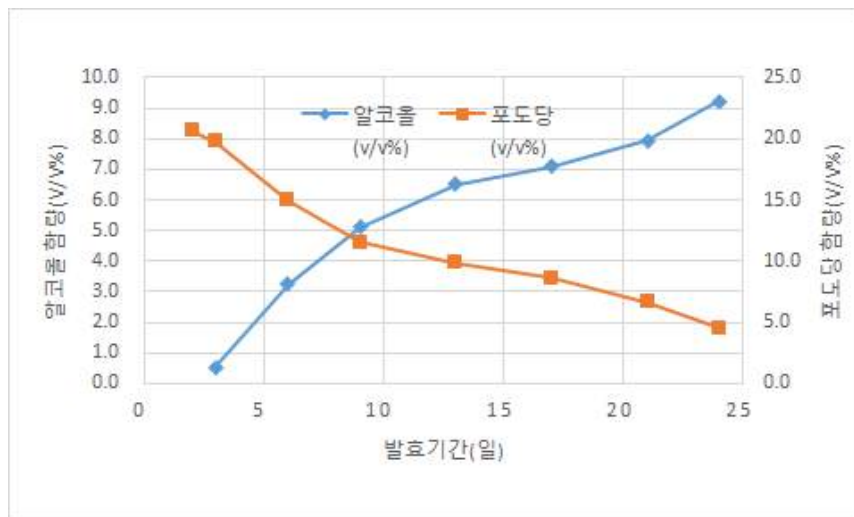


그림 2-2-2-15. 발효기간에 따른 알코올 및 포도당 함량 변화

(다) 알코올 발효 최종 결과

알코올 발효는 24일차에 종료하였고 최종 분석결과는 아래표와 같음. 알코올 함량은 분석 kit를 이용하였고 포도당, pH, 산도는 분석장비를 사용하였음.

산도 함량은 유산균 발효에 따른 젖산(lactic acid)의 상당량 0.009을 적용하여 계산함.

표 2-2-2-31. 발효액 최종 분석

알코올(v/v%)	포도당(w/v%)	pH	산도(mL)	산도(%)
9.2	3.5	2.8	24.2	2.2

(라) 살균(제균) 공정

① 발효액 여과

알코올 발효액은 Filter press로 압착하여 여과액을 취하고 MF 최종 여과(0.1 μ m)를 통해 살균(제균) 처리함.

② 여과에 의한 이화학적 성분 비교

여과 전, 후에 따른 이화학적 성분 비교를 위해 알코올 함량, 포도당 함량, pH, 산도를 비교 분석한 결과, 유의적 변화는 나타나지 않았음.

표 2-2-2-32. 여과 전/후의 이화학적 성분 비교

구분	알코올(v/v%)	포도당(w/v%)	pH	산도(mL)
여과 전	9.2	3.5	2.8	24.2
여과 후	9.0	3.3	2.8	24.0

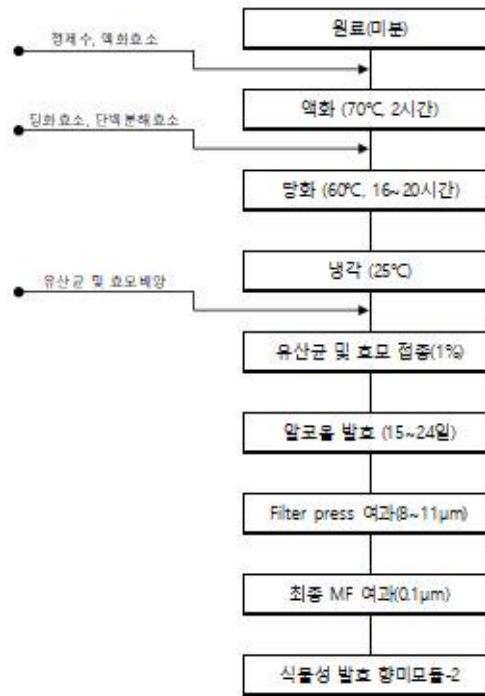
(마) 이화학 성분 품질 규격

Pilot scale로 제조한 쌀발효모들 prototype의 이화학 성분분석을 통해 품질 규격을 설정 완료하였고 품질에는 이상이 없음을 확인함.

표 2-2-2-33. 쌀발효모들 품질 규격

구분	알코올(v/v%)	포도당(w/v%)	pH	산도(%)
품질 규격	9.0 ~ 11.0	4.0 이하	2.8 ~3.6	1.5 ~2.5
분석 결과	9.0	3.3	2.8	2.2

(바) 제조공정도



* 유산균: SMB092(*L.paracasei*)
 * 효모: SMY072(*S.cerevisiae*)

(사) 허브향미를 첨가한 쌀발효물 모듈 및 규격

아래 표는 쌀발효물 모듈에 허브향미 모듈을 일정량 첨가.배합하여 허브향미가 첨가된 쌀발효물 모듈을 제조하였음.

표 2-2-2-34. 허브향미를 첨가한 쌀발효물 모듈 배합비율

원재료명	첨가량(w/w %)	비고
쌀발효 모듈	99.65	
허브향미 모듈	0.35	Eugenol 1,550 mg/kg
합계	100	

아래 표는 허브향미를 첨가한 쌀발효물 모듈의 규격을 나타내었음. 알코올은 8.9%, pH 2.9, acidity 2.1%, eugenol 5.4 mg/kg으로 분석되었음.

표 2-2-2-35. 허브향미를 첨가한 쌀발효물 모듈 규격

구분	분석항목	규격	분석결과
이화학성분	알코올(%)	9.0~11.0	8.9
	pH	2.8~3.6	2.9
	Acidity(%)	1.5~2.5	2.1
주요 향미성분	Eugenol(mg/kg)	5.0 이상	5.4

다) 신선한 과실향미 정량 분석

(1) 연구결과

(가) 주요 향미 성분 분석

식물성 향미모듈의 향기성분 profiling 확인을 위하여 자사 바이오분석센터에 향기 성분 분석 (정성 및 정량)을 의뢰함

식물성 향미모듈 sample에서 검출된 휘발성 향기성분은 총 48종으로 aldehyde 4종, ester류 19종, alcohol류 17종, ketone류 2종, acid류 3종, 기타류 3종이 검출됨.

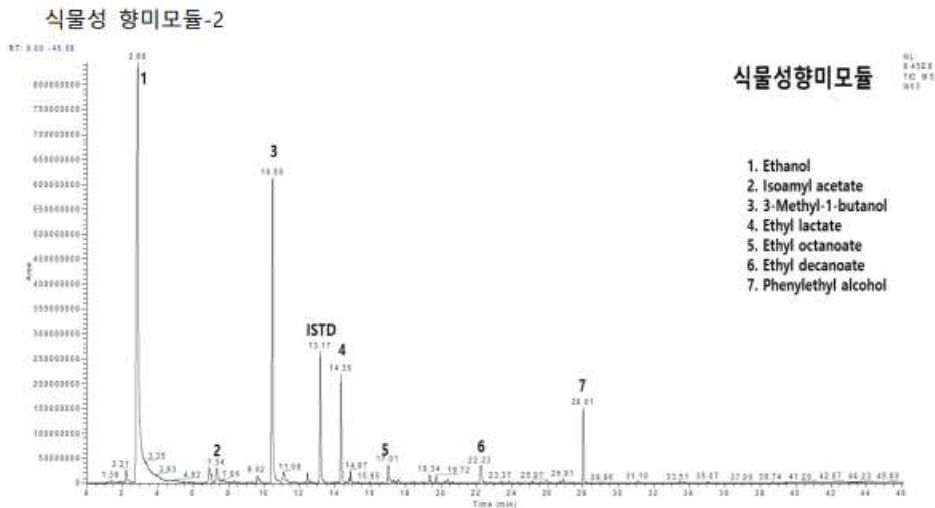


그림 2-2-2-15. 식물성 향미모듈-2 TIC(Total ion chromatogram)

(나) 신선한 과실향미 정량 분석

정량분석 Esters 3 종 성분명: ethyl butyrate, ethyl hexanoate, ethyl lactate

휘발성 성분 정량 분석: Esters 3종의 휘발성 성분 정량분석을 위한 표준물질은 고순도의 sigma-aldrich 제품을 사용하였으며, 표준물질의 GC-MS 분석으로 각 성분의 mass spectral data와 retention time(RT)를 확인하여, SIM mode의 mass scan range 조건을 설정함. 정량분석은 internal standard addition method를 사용하였으며, 표준물질 무첨가 시료를 포함해 5 point 이상 농도별로 표준물질을 첨가하여 아래 그림과 같은 회귀식을 얻어 시료 내 함량을 산출함.

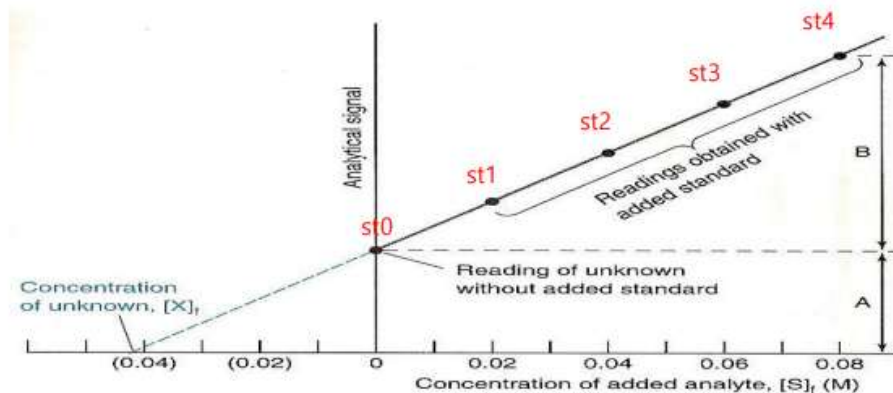


그림 2-2-2-16. Internal standard addition curve

표 2-2-2-36. 정량분석을 위한 esters 성분 3종의 표준물질 정보

표준물질	CAS No.	Molecular Weight	Density (g/ml, 25°C)	Purity (%)	Quantitative of m/z	Chemical formula	제조사
ethyl butyrate	105-54-4	116.16	0.875	99.5 이상	71, 43, 88	C ₆ H ₁₂ O ₂ <chem>CCCC(=O)OCC</chem>	sigma
ethyl hexanoate	123-66-0	144.21	0.869	99.5 이상	88, 99, 43	C ₈ H ₁₆ O ₂ <chem>CCCCCC(=O)OCC</chem>	sigma
ethyl lactate	97-64-3	118.13	1.031	98.5 이상	45, 43, 75	C ₅ H ₁₀ O ₃ <chem>CC(O)C(=O)OCC</chem>	sigma

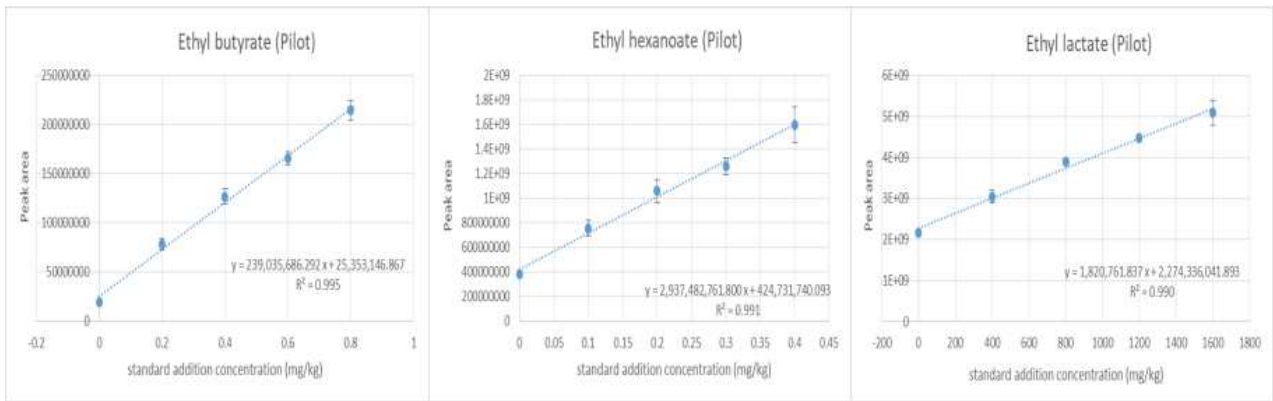


그림 2-2-2-17. Internal standard addition curve of vegetable aroma module-2

식물성 향미모듈-2 내 esters 3종에 대한 정량값은 ethyl lactate 1249 mg/kg, ethyl hexanoate 0.145 mg/kg, ethyl butyrate 0.106mg/kg 로 함유되어 있으며, esters 3종 모두 반복분석에 의한 상대표준편차(RSD)는 10% 미만임.

표 2-2-2-37. 쌀발효모듈 향기 분석 결과

향기 성분	peak area (mg/kg)	향미 특성
Ethyl butanoate*	0.106	파인애플향, 오렌지 주스향
Ethyl hexanoate**	0.145	향긋한 파인애플향
Ethyl lactate	1249.112	부드러운 버터크림, 코코넛향

* Ethyl butanoate = Ethyl butyrate

** Ethyl hexanoate = Ethyl caproate

2-3. 식물성 발효 향미소재 최적 비건 김치 상품화 및 생산 체계 확립

2-3-1. 식물성 발효 향미소재 최적 SPEC/ 공정 설계 및 현지 김치 컨셉 정보화(1차년)

2-3-1-1. 김치 컨셉/ 기호도 조사

1) 수출국 대상 현지인 김치 인식 및 소비패턴 조사

가) 미국 소비자 김치 인식도/ 소비 패턴 조사

(1) 연구방법

(가) 정량 온라인 조사

미국 뉴욕(뉴저지 포함), L A지역 거주하고 있는 아시아인을 제외한 20~40대 남녀(미혼/ 기혼 포함), 한국 김치 인식자, 취식 경험자, 한국 김치에 대해 거부감이 없는 자, ‘나소야’ 브랜드 인지자 포함하여 5점 척도 기준 540명의 온라인 설문지 조사를 진행하였습니다.

(2) 연구결과

(가) 미국 김치 시장에서 소비자의 김치 이용 행태

① 김치에 대한 인식

김치는 발효된 배추로 만들어진 맵지만 맛이 좋은 음식으로 인식하며, ‘색다른 맛과 향이 나는 맛 좋고 영양이 풍부한 대표적인 발효식품’으로 ‘건강하고’, ‘품질이 좋은’, ‘전통적인’ 이미지로 포지셔닝 됩니다. 반면, ‘트렌디하면서 고급스럽고 전문적인’ 이미지는 상대적으로 부족한 것으로 평가됩니다. 대부분의 미국 소비자가 ‘한국’이 김치의 원산지라는 점은 정확하게 인지하며, ‘장 건강 증진’ 및 ‘면역력 향상’에 대한 기대감이 특히 높은 것으로 조사 되었습니다.

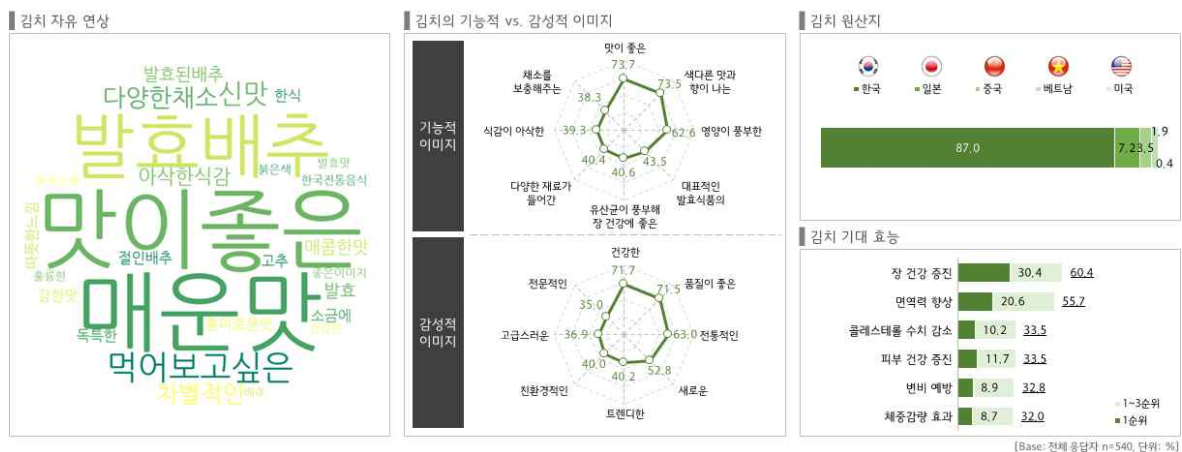


그림 2-3-1-1. 김치에 대한 인식 조사 결과

② 김치 정보 탐색

김치를 처음 인지하는 경로로 ‘한국 음식점’이 김치에 대한 정보를 접하는 중요한 재철로 작용함으로 확인하였습니다. 오프라인보다 ‘SNS채널’ 및 ‘유튜브 먹방’ 채널을 통해 김치에 대해 인지하는 비율이 상대적으로 높았으며, 정보를 수집하는 채널로도 높게 활용되었습니다. ‘김치 재료’, ‘김치의 맛’, ‘김치의 종류’에 대한 정보를 가장 많이 수집하며, ‘김치 담그는 법’에 대한 탐색률 역시 높았습니다.

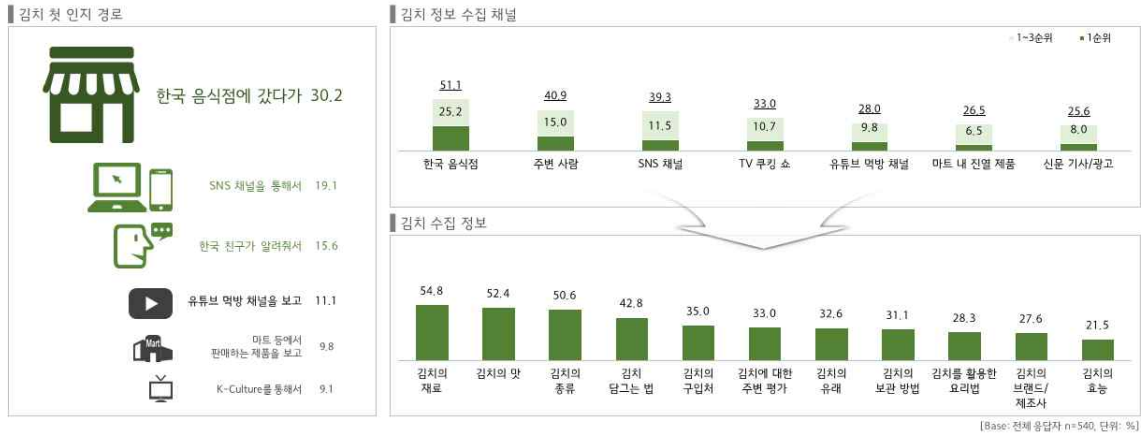


그림 2-3-1-2. 김치 정보탐색 경로

③ 김치 구입 형태

10인 중 5인은 ‘1개월에 1회 이상’ 김치를 구입하며, 오프라인에서는 ‘아시아 식료품점’, 온라인에서는 ‘아마존 Pantry/Fresh’가 김치 주 구입 채널로 파악되었습니다. 또한, 1회 구입 시 평균 USD 19.33을 지불하며 대체로 유리병에 담긴 김치를 2개 정도 구입하는 비중이 가장 높았습니다.

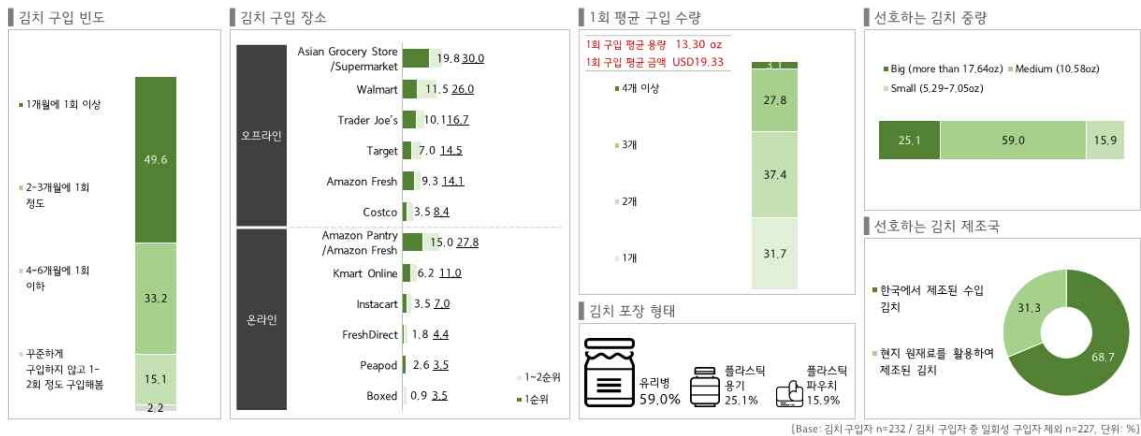


그림 2-3-1-3. 김치 구매 형태

④ 김치 취식 형태

김치 취식의 목적은 ‘풍부한 맛’과 ‘유산균을 통한 장 건강 증진’이 주요하게 작용하며, 이와 같은 목적을 위해 ‘2~3주일에 1회 이상’ 취식하는 비중이 48.5%로 절반 가량을 차지하였습니다. ‘아시아 음식점에서 외식’과 ‘현지 음식점에서 김치를 사용한 메뉴’가 주요 취식 방법이며, ‘Cabbage Kimchi’ 취식 경험률이 60%로 가장 높았습니다.



그림 2-3-1-4. 김치 취식 형태

김치의 소비량은 지속적으로 증가할 것으로 예상되며, 김치와 함께 즐기는 메인 메뉴는 ‘Asian Noodle Dish’와 ‘볶음밥’이었습니다. 다양한 맛과 향이 어울리는 김치의 특성으로 인해 여러 가지 야채가 섞인 ‘샐러드’와 ‘Cooked Vegetables’를 주요 대체할 것으로 보입니다.

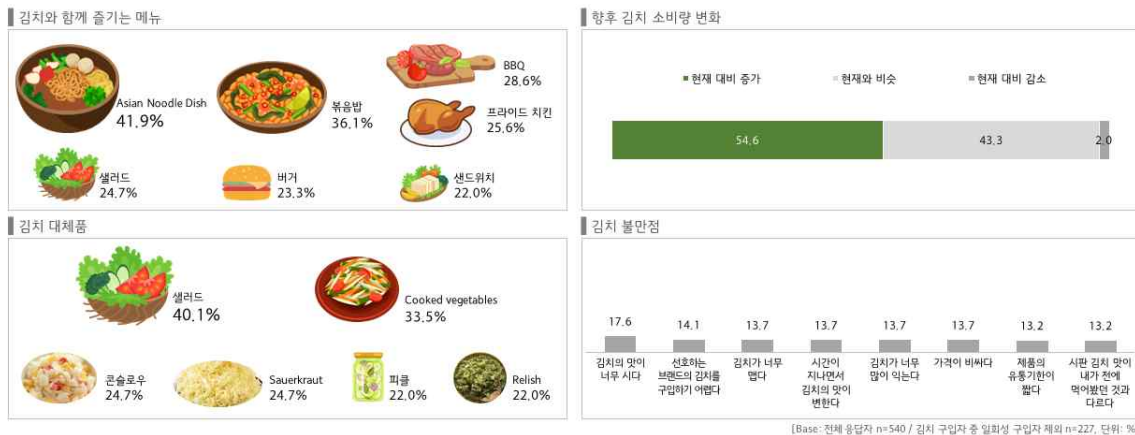


그림 2-3-1-5. 김치 관련 기타 조사 결과

2) 수출국 대상 현지인 김치 적용 컨셉 조사

가) 미국 소비자 김치 적용 컨셉 조사

(1) 연구방법

미국 뉴욕(뉴저지 포함), L A 지역 거주하고 있는 아시아인을 제외한 20~40대 남녀(미혼/ 기혼 포함), 한국 김치 인식자, 취식 경험자, 한국 김치에 대해 거부감이 없는 자, ‘나소야’ 브랜드 인지자 포함하여 Worry Free와 Probiotics 김치에 대한 컨셉지를 배포한 뒤 5점 척도 기준 540명의 온라인 설문지 조사를 진행하였습니다.

① Worry Free 김치 컨셉지



Worry Free
Korean Kimchi
Korean Napa Cabbage Kimchi

▪ "No Bio", "No High Fructose Corn Syrup", "No Trans Fat & Cholesterol", and "Vegan" are made of "Gluten Free" without using any raw materials and animal ingredients, considering allergies, for healthy and fresh eating.

#1 **Vegan Kimchi** Vegetarian Kimchi without any animal ingredients (such as salted fish)

#2 **Gluten Free** It is a Kimchi that is safe for gluten allergies because it does not use wheat ingredients, which is an allergy ingredient, and it has a clean and cool taste without any meat.

#3 **No Bio/ No High Fructose Corn Syrup/ No Trans Fat & Cholesterol Kimchi**

They don't use chemical, liquid fructose, trans fat, cholesterol Kimchi that can be eaten healthier

Weight: 14oz (397g) Sold: \$5.8 (formerly \$5.24)
Refrigerated, 180 days shelf life



② Probiotics 김치 컨셉지



BIO Billion Living Lactobacillus
Korean Kimchi
Korean Napa Cabbage Kimchi

▪ **Korean Napa Cabbage Kimchi adds more than 1 billion live lactobacillus to give it a healthy taste and flavor.**

* It is a vegetable lactobacillus derived from Kimchi that produces healthy and various beneficial ingredients while Kimchi is being cooked, adding flavor and freshness.

#1 **It contains more than 1 billion live lactobacillus,** which can suppress harmful bacteria, take care of intestinal health and boost immunity by changing intestinal microorganisms!

#2 **It's a traditional Korean Kimchi fermentation method called "Kimjang dog cooling system"** that makes it crunchy for a long time!

#3 **No worries about Korean agricultural products** and the principle of no addition!

Weight: 14oz (397g) Sold: \$6.8 (formerly \$5.24)
Refrigerated. 180 days shelf life



(2) 연구결과

① Worry Free 김치 주요 속성 평가

컨셉에 대하여 75% 이상이 긍정적으로 반응하였으며, 특히, 남자와 Heavy&Medium 유저일 수록 더욱 긍정적으로 평가하였습니다. 다만, 긍정적인 반응 대비 필요도에 대한 속성이 낮게 평가되었습니다.



그림 2-3-1-6. Worry Free 김치 속성 평가 결과

② Worry Free 김치 구입 의향과 이유

구입 의향은 긍정평가를 85.4%로 긍정적인 수준이며, 특히 남자와 Heavy&Medium User에서 상대적으로 높았으며, 특히 '반드시 구입할 것이다' 라는 Top1의 응답률이 50% 이상인 점이 주목할 만한 점입니다. '비건 제품으로 글루텐이 없고, 화학적 원료가 들어가지 않는다' 는 점이 긍정적인 이미지와 '건강에 좋을 뿐 아니라 맛도 좋을 것 같다' 는 점이 긍정적으로 적용한 반면, '김치는 식당/전문점에서 먹는다.', '전통적인 김치를 선호한다.', '비건에 관심이 없다.', '가격이 비싸다.' 등이 비구입 의향 이유로 지적되었습니다.



그림 2-3-1-7. Worry Free 김치 구매 의향 및 사유

③ Probiotics 김치 주요 속성 평가

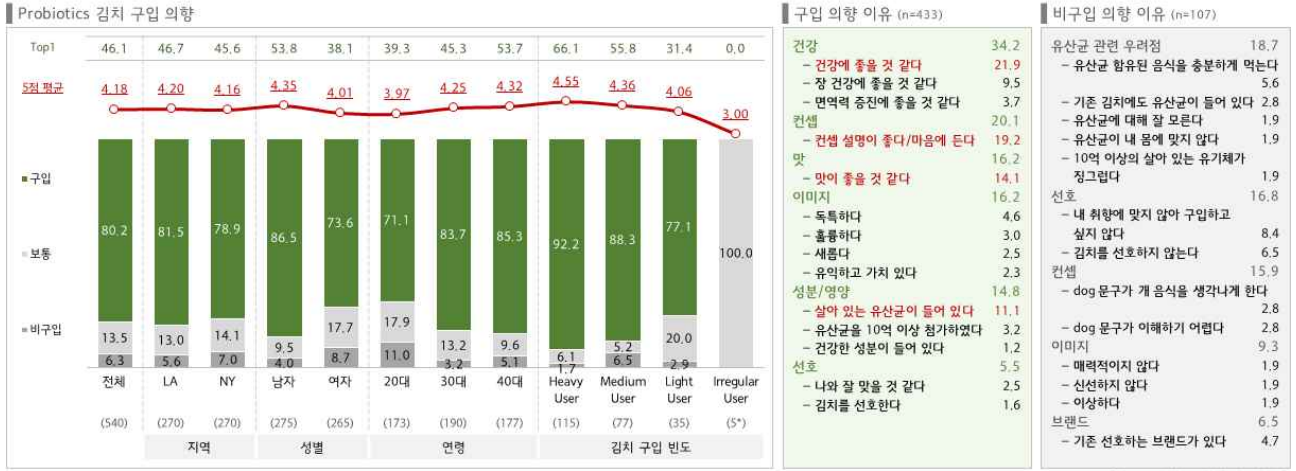
‘Probiotics 김치’는 전반적 만족도를 포함하여 주요 속성(차별성, 필요도, 신뢰도) 모두 78% 이상으로 긍정적이었으며, 전반적으로 주요 속성은 40대와 김치 Heavy&Medium User에서 상대적으로 높으며, ‘필요도’는 남자에서도 높게 응답되었습니다.



그림 2-3-1-8. Probiotics 김치 속성 평가 결과

④ Probiotics 김치 구입 의향 및 이유

‘Probiotics 김치’ sms 전체 응답자의 80.2%가 구입할 의향이 있어 긍정적인 수준이며, 특히 남자와 40대 그리고 김치 빈도가 높을수록 구입 의향률이 높았으며, 컨셉에서 ‘10억 이상의 살아있는 유산균’이라는 점이 주된 trigger 요소로 평가되었습니다. 그 외에 ‘건강에 좋을 것 같다.’, ‘맛이 좋을 것 같다.’, ‘컨셉에 대한 선호’가 긍정적으로 어필 된 반면, ‘기존에 먹던 김치를 포함하여 유산균 음식을 충분히 먹는다.’, ‘10억 이상의 삶이 있는 유기체가 징그럽다’는 부정적 의견도 확인하였습니다.



[Base: 구입/비구입 의향자, 단위: %]

그림 2-3-1-9. Probiotics 김치 구매 의향 및 사유

(3) 결론

미국 소비자의 김치 이용 행태와 김치 적용 컨셉 조사 결과 미국 소비자는 김치의 원산지를 한국으로 인식하며 ‘발효된 배추로 만들어진 맵지만 맛이 좋고 건강한 음식’으로 인식하였으며, 김치 특성 중 “색다른 맛과 향이 나고 영양이 풍부한 대표 발효식품”으로 “건강, 품질 좋음, 전통적” 이미지로 포지셔닝 하였습니다. 주로 한국 음식점을 방문하여 김치를 처음 접하고, Medium사이즈의 한국제조 수입 김치를 선호하고, 김치의 취식 목적은 ‘풍부한 맛’과 ‘유산균을 통한 장 건강 증진’임을 확인 할 수 있었습니다. Worry Free 김치 컨셉 조사 결과 구입의향, 만족도, 차별성에서 긍정적인 답변을 얻었으며, 구입가격에 있어 가치를 높게 평가함에 시장 가치가 있을 것으로 판단됩니다. Worry Free에 대한 구체적인 소비자 Benefit 제안이 필요할 것으로 사료됩니다.

Probiotic 김치 컨셉 조사 결과 'Probiotics 김치'의 주요 지표는 전반적으로 긍정적인 수준이나, 기존에 출시된 제품과 유사하다는 점에서 필요도와 가격 대비 가치가 소폭 낮은 편입니다. 10억 이상의 생 유산균이 들어 있어 장 건강과 면역력 증진에 좋을 것 같다는 호의적인 반응이 있는 반면, 유산균의 작용 기작을 이해하기 어려우며 기존에 먹던 김치를 포함하여 유산균이 함유된 음식을 충분히 섭취하고 있어 필요하지 않다는 점이 비구입 의향 이유로 지적되었습니다. 전반적인 Probiotic 김치 컨셉에 호의적이거나 ‘유산균’ 특화 제품으로서의 강점을 보다 명확히 전달할 필요 존재가 필요하여, 상기 컨셉 적용 김치에 대한 소비자 니즈는 2차 소비자 조사를 통해 추가 Benefit 발굴을 진행하고자 합니다.

2-3-1-2. 발효 향미 소재 적용화 검토 및 최적 제조 공정 설계

1) 비건김치 적용 발효향미 소재 적용화 검토

가) 발효 향미 소재 품질 검토

(1) 연구방법

발효 향미 모듈 Prototype 소재의 품질 점검을 진행 하였으며, 항목은 T.N, Glutamic acid, Nacl, Alchoh, Ph, Brix, 혼탁도를 측정하였습니다.

(2) 연구결과

(가) 발효 향미 소재 기본 품질 검사

품질분석 결과는 하기 표와 같았으며, 비여과 타입은 여과도에 따라 혼탁도와 기본 품질 차이가 있음. 여과 공정 추가에 따른 제조 비용 증가 의견으로 비여과 발효 향미 소재 검토 진행 하였습니다.

표 2-3-1-1. 발효 향미 소재 기본 품질분석 결과

품질항목	A
T.N(w/w%)	1.32
Glutamic acid (w/w%)	1.26
Nacl (w/w%)	9.7
Alcohol (w/v%)	3.6
pH	4.65
Brix	34
혼탁도	액상 내 부유물 및 침전물 발생 (냉장/ 상온 모두 발생 후 혼합에 의해서 침전물 균질화 보완 필요)

(3) 결론

발효 향미 소재 적용화 검토 및 최적 제조 공정 설계 연구 결과 1차 proto 발효 향미 소재 기본 품질은 여과 정도에 따라 다르나 여과품 기준 품질은 지미도를 나타내는 T.N(w/w%) 1.62로 국내 유통 액젓 대비 10~20% 정도 높고, 기타 지미 소재 대비 유사하거나 약간 낮으며, 염도는 액젓 대비 40-50% 정도 낮고, 약한 산성을 보였습니다. 혼탁도는 양념에 사용시 외관 품질에 영향력이 적을 것으로 사료되나 냉장/ 상온 보관시 액상 내 부유물 및 침전물이 발생하였고, 강제 혼합 후에도 침전물 균질화가 어려워 보완 필요로 판단됩니다.

2) 발효 향미 소재 적용 최적화 설계

가) 비건 김치 적용 발효 향미 소재 적용 공정 검토

(1) 발효 향미 소재 투입 공정 설계 및 품질 평가

(가) 연구방법

① 샘플 제조

비건김치 제조 발효 향미 소재 투입공정별 샘플을 제조하였습니다.

㉠ 공정별 적용시 품질 점검

- 김치 양념 제조시 발효 향미 소재 투입/ 혼합
- 김치 양념 + 절임 배추 혼합 공정 시 투입/ 혼합
- 김치 섭취 전 발효 향미 소재 투입/ 혼합

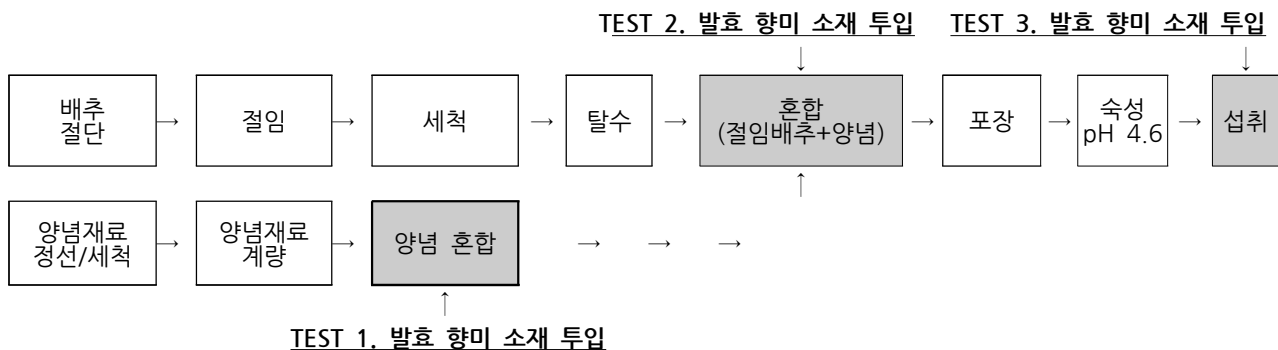


그림 2-3-1-10. 비건 김치 제조 발효 향미 소재 투입공정

(나) 연구결과

김치 제조 공정별 발효 향미 소재 적용시 공정 효율성 및 품질 점검 결과 양념 혼합시 발효 향미 소재 적용이 제조 효율성이 가장 높고, 소재의 균질화가 높아 숙성 전 후 관능 품질이 가장 양호하였습니다.

특히 수출김치의 경우 장기 유통기한에 의해 국내 상품 김치 대비 소비자 구입시 산도가 높으며, 발효로 지미 성분 분해/ 잔존양 감소로 발효로 인한 산미 제어 필요성 감안하여 발효 후 섭취 전 발효 향미 소재 적용성 검토시 김치 숙성 풍미와 발효 향미 소재의 향미간의 이질감 발생 및 조화도 저하로 적용 제외하였습니다.

나) 비건김치 적용 발효 향미 소재 최적 함량 설계

(1) 발효 향미 소재 함량 최적 설계(대두 베이스)

(가) 발효 향미 소재 적용 TEST

① 연구방법

대두유래 발효 향미 소재 함량 0.5~3.0% 함량간 별 김치 제조 및 숙성 후 품질 점검을 진행하였습니다.

② 연구결과

발효 향미 소재 2% 이상 적용시 현 풀무원 나소야 비건김치 품질과 유의도가 높았습니다. 함량 2% 기준 관능 유의적 차 있으나, 함량간별 관능도 유의적 차는 없으며, 발효향미모듈 적용 후 발효 시 품질 저하 없음 검증하였습니다. (산막효모, 무름, 이미/이취 없음)

(나) 최적 함량 설계 소비자 조사

① 연구방법

국내 20인 대상 대두 유래 발효향미모듈 소재 함량 별(0.5~2.0%) 적용 비건김치 관능 선호도 조사하였습니다.

② 연구결과

관능평가 결과 대두 유래 발효향미모듈 2.00, 2.50% 함량에서 관능 선호도 높았습니다.

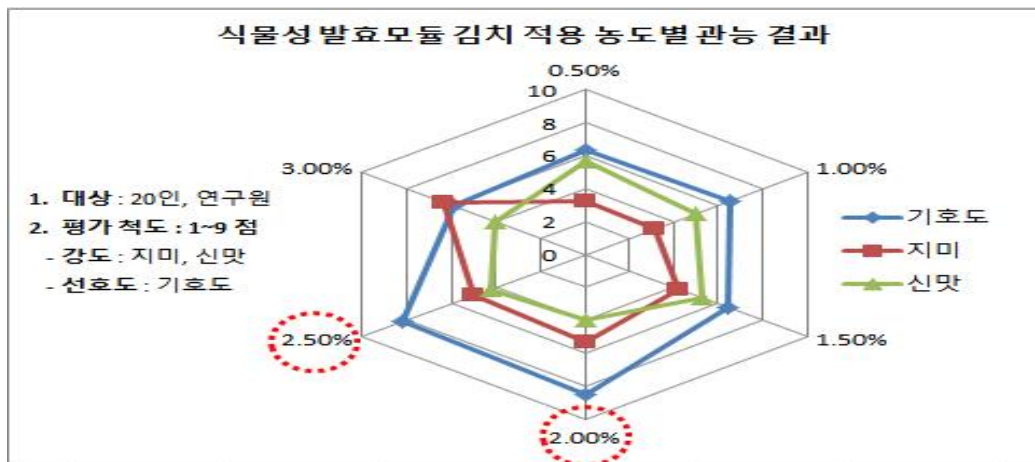


그림 2-3-1-11. 식물성 발효 소재 적용 농도별 김치 관능 조사 결과

다) 결론

김치 제조 공정별 발효 향미 소재 적용시 공정 효율성 및 품질 점검 결과 양념 혼합 시 발효 향미 소재 적용이 제조 효율성이 가장 높고, 소재의 균질화가 높아 숙성 전 후 관능 품질이 가장 양호하였습니다. 발효 향미 소재의 최적 함량 설정을 위해 적용 함량별 품질 점검 결과 발효 향미 소재 2% 이상 적용 시 현 풀무원 나소야 비건김치 품질과 유의도가 높았습니다.

함량 2% 기준 관능 유의적 차 있으나, 함량간별 관능도 유의적 차는 없으며, 발효향미모듈 적용 후 발효 시 품질 저하 없음(산막효모, 무름, 이미/이취 없음)을 검증하였고, 최적 함량 설계 관능평가 결과 대두 유래 발효 향미 소재 2.00, 2.50% 함량에서 관능 선호도 높았습니다.

비건 김치 적용 발효 향미 소재 최적 공정 및 함량 설계는 양념 혼합 공정 중 투입하며, 함량은 전체 제품 기준 2.0~2.5%으로 설계하였습니다.

2-3-1-3. 발효 향미 소재 적용 제품 특성 검증

1) 발효 향미 소재 적용 여부별 품질 특성 검증

가) 발효 향미 소재 적용 여부에 따른 품질 비교

(1) 발효 향미 소재 적용 유/ 무 김치 저장기간별 숙성도 변화 시험(1차)

(가) 연구방법

Con군은 기존 지미소재 적용 김치, P-1은 발효향미모듈 Prototype 1 소재 2.4% 적용 김치, P-2군은 발효향미모듈 Prototype 2 1.0% 적용 김치로 하여 35일간 가스발생(외관), 일반세균, 유산균, 효모의 수를 측정하여 비교하여 발효패턴을 비교하였습니다.

(나) 연구결과

발효향미 소재 적용 테스트 (1차) : 풀무원 수출김치 지미소재 Con군과 대체 발효 향미 소재 적용 P-1, P-2의 발효 패턴을 모니터링 한 결과, Con군, P-1, P-2의 발효패턴은 유사하였으나, 초기 발효는 Con군의 숙성속도가 느린 것으로 확인하였습니다. 가스 발생 정도는 Con군>P-1군>P-2군 순으로 6개의 샘플 중 Con군은 팽창 제품이 없었고, P-1은 2개, P-3은 5개가 팽창 되었습니다.



그림 2-3-1-12. 1차 발효 향미 소재 적용 김치 저장기간별 숙성도 변화 시험 미생물 변화

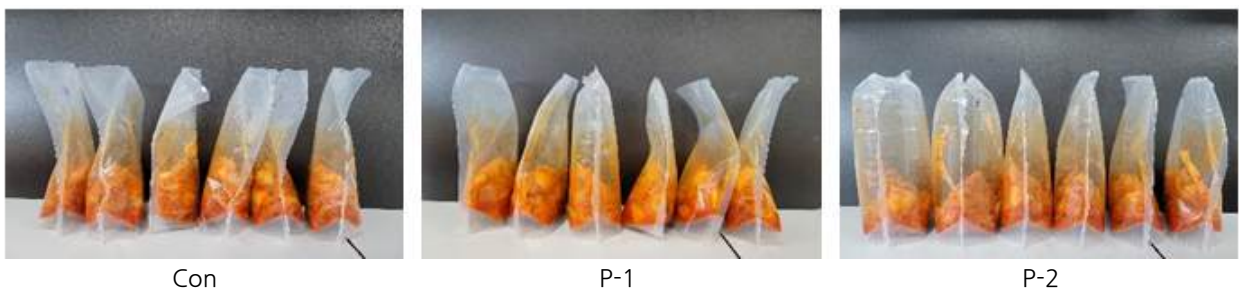


그림 2-3-1-13. 1차 발효 향미 소재 적용 김치 저장기간별 숙성도 변화 시험 미생물 변화

(2) 발효 향미 소재 적용 함량별 발효 품질 검증(2차)

(가) 연구방법

발효향미소재 Prototype 3의 최적함량 설계를 위한 발효 패턴을 모니터링 하기 위하여 소재 2.0%적용김치, 2.2 % 적용김치, 2.4% 적용김치를 제조하여 이화확(PH, 염도, 당도), 미생물(유산균, 효모)을 온도 5°C 에서 17일간 저장하여 비교하였습니다.

(나) 연구결과

2.0%, 2.2%, 2.4% 테스트 군 발효 기간 경과에 따라 당도가 감소하나 유의적 차는 없었으며, 미생물 유산균과 효모 모두 증가하는 일반적인 패턴을 보이며 발효향미소재 함량에 따른 품질변화의 유의차는 없었습니다. 관능시에는 초기 관능 차는 크지 않았고, 숙성후기 숙성에 따른 산미 발생시 마스킹하는 정도의 차이가 있었으나 이미, 이취는 발생하지 않았으며 그 외적 관능적 유의차는 없었습니다.

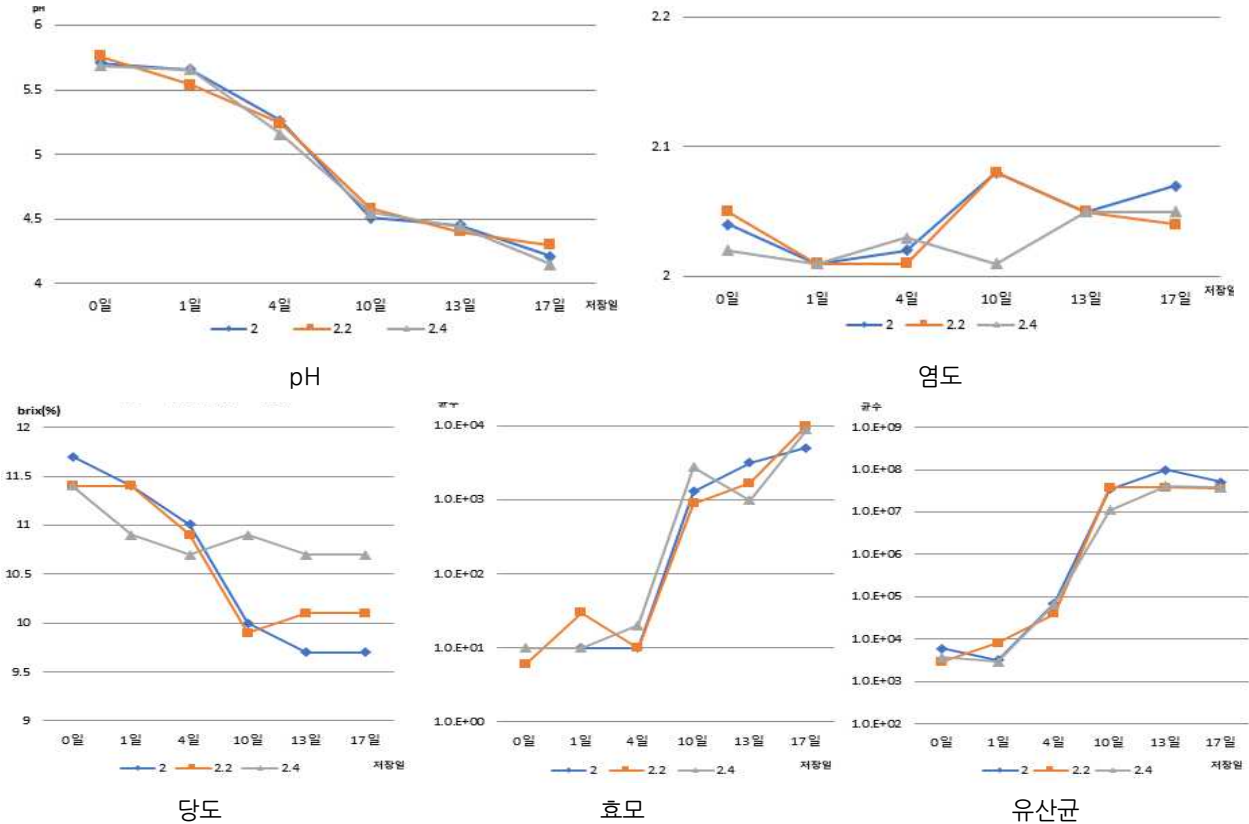


그림 2-3-1-14. 2차 발효 향미 소재 적용 김치 저장기간별 숙성도 변화 (이화학, 미생물)

나) 발효 향미 소재 적용 관능 품질 검증

(1) 발효 향미 소재 적용 김치 소비자 조사

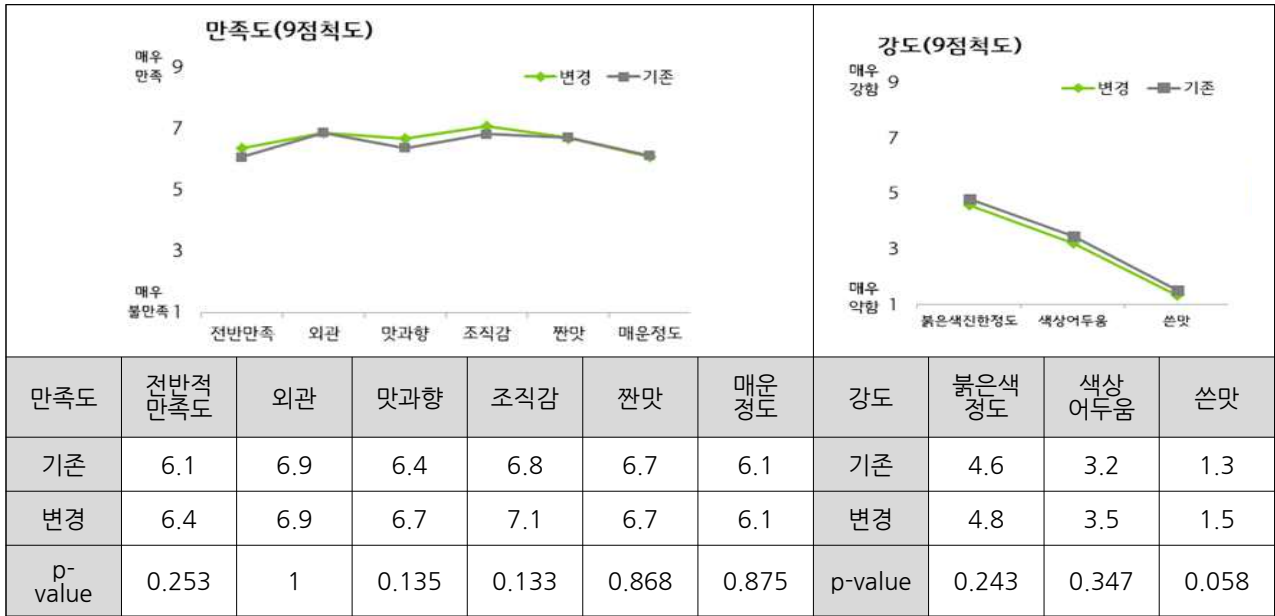
(가) 연구방법

수출용 지미소재 적용 김치와 발효향미모듈 2.4% 적용 김치를 30~49세 여성 소비자 50인을 대상으로 관능 평가를 진행하였고, 평가항목은 9점 척도를 기준으로 하여 선호도(전반적 만족도, 외관, 맛과향, 조직감, 짠맛, 매운정도), 강도(붉은색적합정도, 색상어두움, 쓴맛)로 진행하였습니다.

(나) 연구결과

발효향미모듈 적용 김치제품이 일반 수출용 지미소재 적용 김치 대비 RQI 1.05, 선호도 60%로 관능 우위를 확인 하였습니다. 세부 만족도 평가 전반적만족도, 외관, 맛과향, 조직감, 짠맛, 매운맛 모두 발효향미모듈 적용 김치에서 동일수준 또는 점수가 높았으나 신뢰도 95% 기준 유의차가 있는 항목은 없었으며, 강도평가 붉은색, 색상어두움, 쓴맛도 유의차 있는 항목은 없었습니다. 선호율은 발효향미모듈 적용군의 선호도가 60%로 우위를 차지 하였습니다.

① 만족도 및 강도



② 선호율 : 기존 40%, 변경 60%

선호율(%)



다) 결론

발효 향미 소재 적용 김치 품질 특성 검증 결과 발효 향미 소재 적용 여부에 따라 초기 숙성 패턴 및 품질 변화도 유의적 차이가 있으나 전반적 품질 패턴은 유사하며, 발효 향미 소재 적용 경우 미적용 대비 발효로 인한 가스 발생량이 많아 포장 팽창 등 품질 변화 있었습니다. 발효 향미 소재 함량별 품질 검증시 발효 향미 소재 함량간 발효 패턴이 유사하여 유의적 품질 차는 없었습니다. 발효 향미 소재 적용 김치의 관능품질 검증 결과 발효 향미 소재 적용이 현 수출 김치 사용 소재 적용 대비 선호도가 높고, 관능품질이 우수한 것으로 확인되었습니다.

라) 김치/ 비건김치 군집 분석을 통한 유효적 특성 검증 (추가)

(1) 수출용 비건김치의 미생물 군집분석을 통한 대사산물 예측과 기능성 예측

(가) 연구방법

젓갈을 사용한 일반김치와 비건김치를 각각 제조 후 10℃ 저장고에서 pH4.4 적숙기까지 숙성한 후 16S RNA amplicon sequencing을 진행하여 미생물 군집 비교하였습니다.

(나) 연구결과

① α -diversity metric

비건김치와 일반김치 간의 균종의 수 차이 유의차를 확인하였습니다.

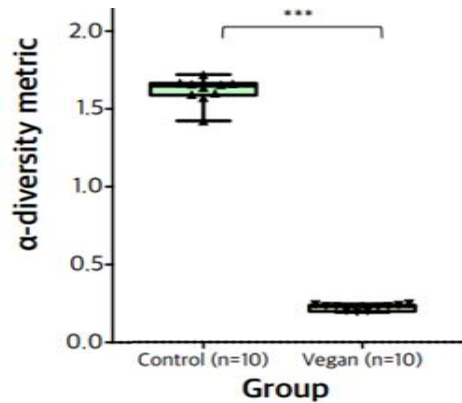


그림 2-3-1-15. α -diversity metric

② 균종 및 점유율

Vegan그룹과 Control 그룹간 우점 균종 및 점유율 유의차가 크게 나타났으며, Con군은 *b. sakei* 균종 우점이 우점을하였고, Vegan은 *Weissella_koreensis* 90% 이상 우점을 보였습니다.

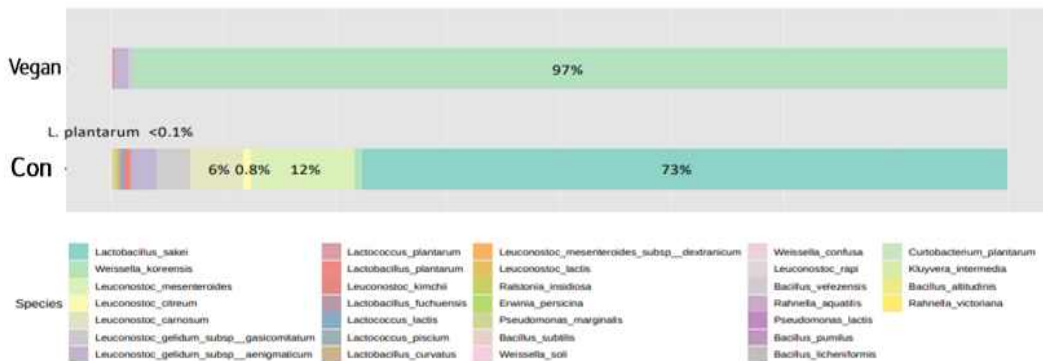


그림 2-3-1-16. 균종 및 점유율

③ 그룹간 핵심 미생물 비교

Con그룹의 핵심 미생물은 *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gelidum subsp. aenigmaticum*, *Leuconostoc gelidum subsp. gasicomitatum* 으로 총 5종이며, Vegan그룹의 핵심 미생물은 *Weissella koreensis*, *Leuconostoc gelidum subsp aenigmaticum*으로 총 2종입니다.

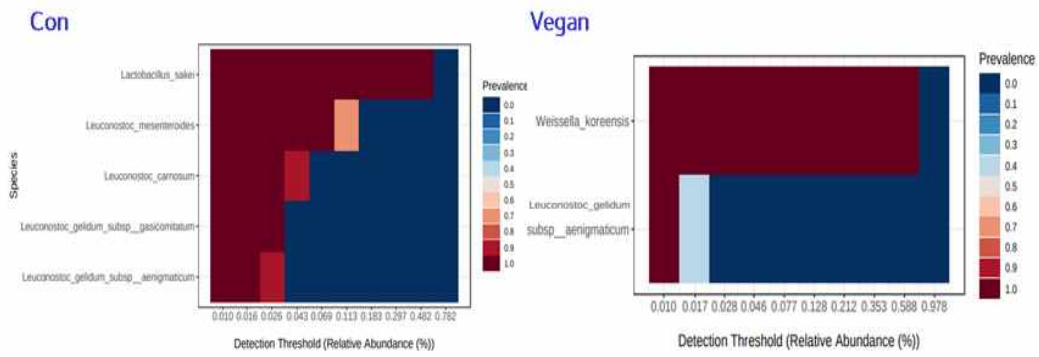


그림 2-3-1-17. 그룹간 핵심 미생물

④ Metabolic pathway prediction

㉞ 당 분해능

대부분의 당 분해 관련 pathway는 control 그룹에서 많이 발현될 것으로 예측되었으며, 특히 sucrose degradation pathway 발현량의 차이가 클 것으로 예측되었습니다. 유일하게 galactose degradation pathway가 vegan 그룹에서 많이 발현될 것으로 예측되었습니다.

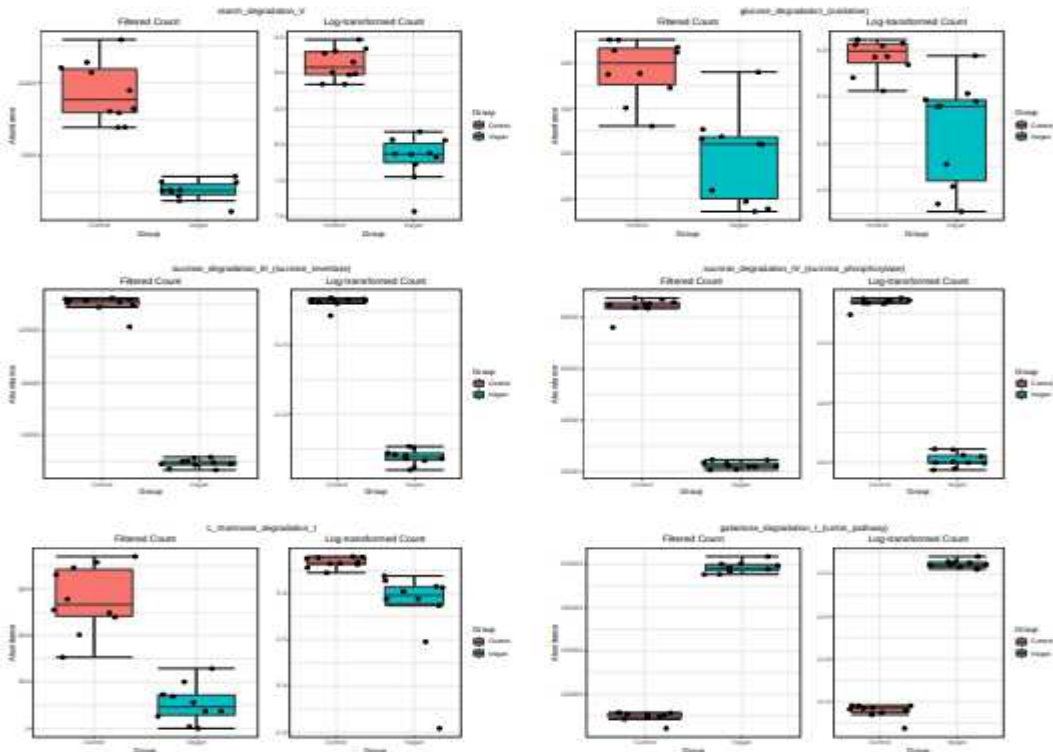


그림 2-3-1-18. 당 분해능

㉞ 아미노산 생합성능

대부분의 아미노산 생합성 관련 pathway는 vegan 그룹 보다 control 그룹에서 현저히 많이 발현될 것으로 예측됩니다.

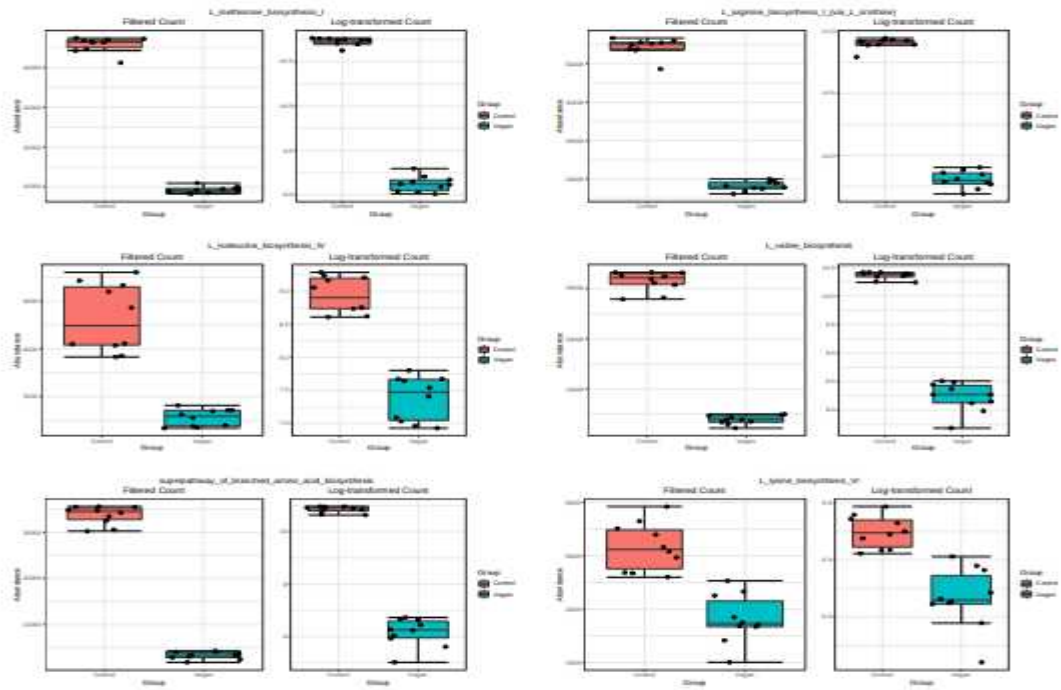


그림 2-3-1-19. 아미노산 생 합성능

(다) 결론

비건김치와 일반김치간의 미생물 군집 차가 극명하게 차이 나는 것을 확인 하였고, 이를 기반으로 Metabolic pathway prediction을 진행 한 결과 대부분의 당 분해 관련 pathway는 일반김치에서 많이 발현 될것으로 예측 되었으나, galctose 분해 pathway는 vegan 그룹에서 많이 발현될 것으로 예측 됩니다. 이러한 Metabolic pathway prediction 한 결과를 2차년도 검증을 진행하고 vegan 김치의 benefit 부여 근거 자료로 활용하고자 합니다.

2-3-1-4. 수출 김치 제조공정 및 유통 안전성 점검

1) 수출 김치 제조 공정 및 유통 품질 점검 통한 수출 경로 보완 검토

가) 폴무원 수출라인 생산품질 점검

(1) 연구방법

폴무원 소속 PPEC 글로벌김치 공장의 수출 라인 생산 제품 2개월 간격으로 생산 lot 전수 품질 검사를 진행하였습니다. 수출 대상국의 미생물 품질규격은 대장균, 리스테리아 모노사이토제네스, 살모넬라, 황색포도상구균, 클로스트리디움 보툴리눔으로 위 규격으로 미생물 분석을 진행하였습니다.

(2) 연구결과

21년 1월부터 7월까지의 생산, 출고된 전 제품의 품질 검사 결과 미생물 규격 적합으로 안전성을 검증하였습니다.

표 2-3-1-2. 폴무원 수출라인 생산품 품질 검사 결과

분석월	제품 구분	LOT	대장균	리스테리아 모노사이토제네스	살모넬라	황색포도상구균	클로스트리디움 보툴리눔
1월	M	21.01.10	0	음성	음성	음성	불검출
	S	21.01.15	0	음성	음성	음성	불검출
	M	21.01.24	0	음성	음성	음성	불검출
	S	21.01.30	0	음성	음성	음성	불검출
3월	S	21.03.15	0	음성	음성	음성	불검출
	S	21.03.22	0	음성	음성	음성	불검출
	M	21.03.27	0	음성	음성	음성	불검출
5월	S	21.05.17	0	음성	음성	음성	불검출
	M	21.05.17	0	음성	음성	음성	불검출
	M	21.05.24	0	음성	음성	음성	불검출
	S	21.05.24	0	음성	음성	음성	불검출
7월	S	21.07.02	0	음성	음성	음성	불검출
	M	21.07.09	0	음성	음성	음성	불검출
	S	21.07.13	0	음성	음성	음성	불검출

나) 폴무원 미국 수출김치 현지 유통품 품질 모니터링

(1) 연구방법

폴무원 생산 수출 김치의 현지 유통, 판매 중인 제품을 2개월 간격으로 샘플링 후 품질 분석을 진행하였으며, 품질분석은 미국 현지에서 진행 되었으며 내부 품질 검사 기준인 일반세균, 대장균/군, 효모, 곰팡이를 분석하였습니다.

(2) 연구결과

한국에서 생산 미국으로 유통된 제품의 품질 검사 결과 이상없음으로 확인하였으며, 일부 숙성 및 보관 상태에 따라 일반세균, 유산균, 효모의 수가 차이가 있음을 확인하였습니다.

표 2-3-1-3. 풀무원 미국 수출김치 현지 유통품 모니터링 결과

분석일	항목	M	S
20.05.06	제조일	20.03.06	20.03.06
	APC	TNTC>3000	TNTC>3000
	E.coli	<10	<10
	Coliforms	<10	<10
	Yeast	10	10
	Mold	<10	30
20.07.13	제조일	/	20.04.04
	APC		TNTC>3000
	E.coli		<10
	Coliforms		<10
	Yeast		4.4*10 ²
	Mold		<10
	제조일		20.04.23
	APC		TNTC>3000
	E.coli		<10
	Coliforms		<10
	Yeast		<10
	Mold		<10
20.09.04	제조일	20.05.22	20.06.20
	APC	>10 ⁵	2.3*10 ⁵
	E.coli	<10	<10
	Coliforms	3.0x10 ¹	9.7x10 ¹
	Yeast	<10	3.7x10 ²
	Mold	9.0x10 ¹	6.3x10 ¹
	LAB	1.5x10 ⁵	9.7x10 ⁴
	제조일	20.06.01	20.07.24
	Yeast	5.6x10 ⁶	4.1x10 ⁶
	Mold	<10	<10
20.11.15	제조일	20.06.27	/
	Mold	3.6x10 ⁶	
	APC	<10	

다) 결론

풀무원 제조 유통 수출김치는 수출 대상국의 법적 기준에 적합함을 확인하였으며, 미국 현지 유통 제품을 현지에서 검증시에도 내부 관리 항목 기준 이슈 없이 안정적인 품질로 유통되고 있음을 확인하였습니다. 이러한 결과를 바탕으로 풀무원 제조 유통 수출김치는 안정적인 품질로 제조, 수출, 유통 되고 있음을 검증하였습니다.

2-3-2. 비건김치 대량 생산화 및 최적 상품 설계/ 품질 검증 (풀무원, 2차년도)

2-3-2-1. 비건김치 Pilot 생산 및 대량 생산화 설계

1) 발효 향미 소재 적용 대량 생산 공정 설계 및 강화 공정 고안

가) 발효 향미 소재 베이스별(콩, 완두) 대량 생산 공정 설계

(1) 연구방법

발효 향미 소재의 최적 투입 공정 설계를 위한 투입공정 설계 및 품질 평가를 진행하여 최적 공정 및 발효 향미 소재를 선정 하고자 투입 공정 3가지를 비교 하였습니다.

생산량은 각 공정 별 1 batch(200kg)를 기준으로 생산하였으며, 투입공정은 1. 김치양념제조 시투입, 2. 김치양념과 절임배추 혼합시 소재 투입, 3. 김치제조 후 포장 시 소재 분사로 하여 생산 품질 비교를 진행하였습니다.

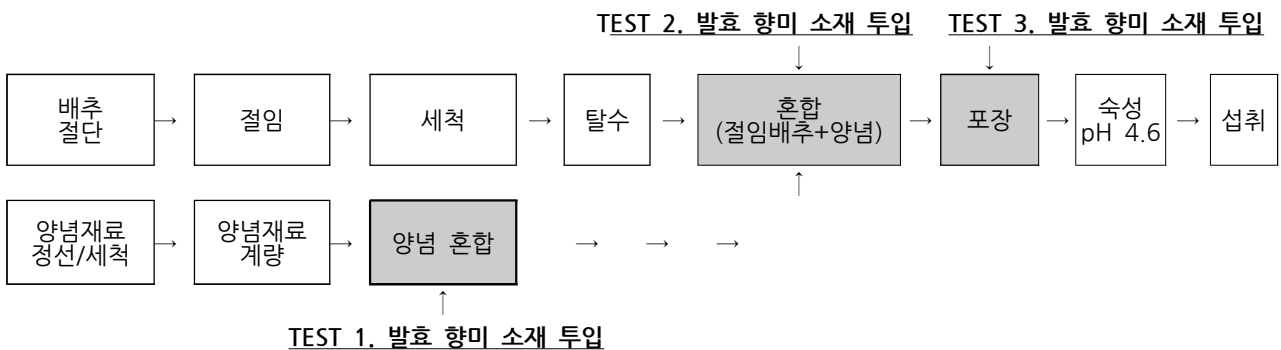


그림 2-3-1-20. 발효 향미 소재 베이스별 투입공정

(2) 연구결과

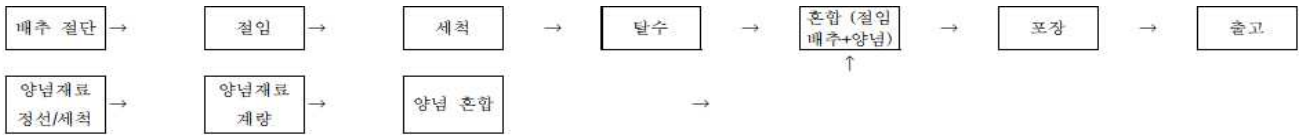
발효 향미 소재별(콩, 완두 베이스) 공정 적용성 및 생산 효율성의 차이는 없었으나 공정별 발효 향미 소재의 균질도에 따라 발효 패턴 및 숙성 속도의 차이는 있었습니다. 생산 효율성을 높이고, 유통 중 양념 스며들므로 포장 충전시 발효 향미 소재의 표면 투입 경우 김치 품질의 상하 편차가 있었습니다.

나) 발효 향미 소재 적용 품질 강화 공정 설계

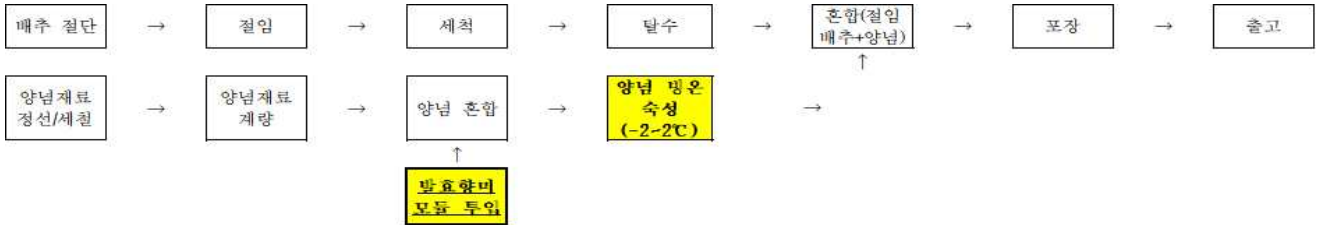
(1) 연구방법

기존 공정 비건김치와 발효향미 강화 공정 1~3 적용한 발효 향미 모듈 적용 김치를 제조하여 발효 향미 모듈 향미 강화 최적화 공정에 따른 기존 지미소재를 사용한 비건김치와의 관능 품질을 검증하였습니다. 관능평가는 30~49세 여성 소비자 50인을 대상으로 9점 척도 기준, 선호도(전반적 만족도, 외관, 맛과향,조식감, 짠맛, 매운정도)와 강도(붉은색적합정도, 색상어두움, 쓴맛)를 확인 하였습니다.

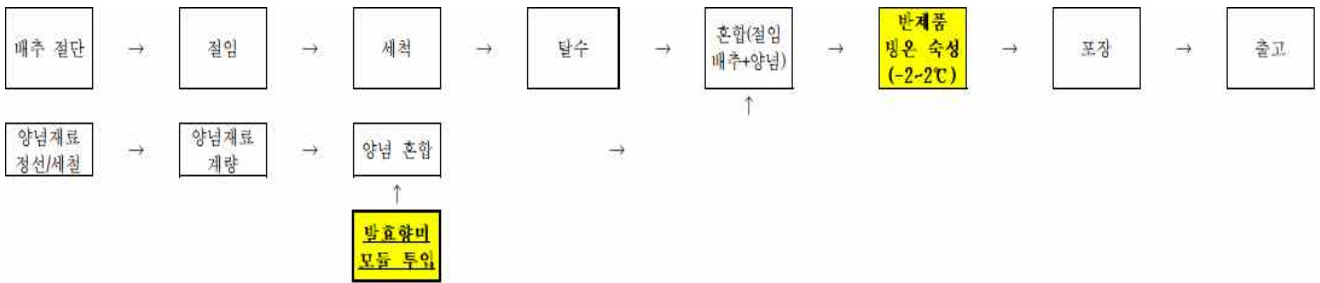
① 기존 공정



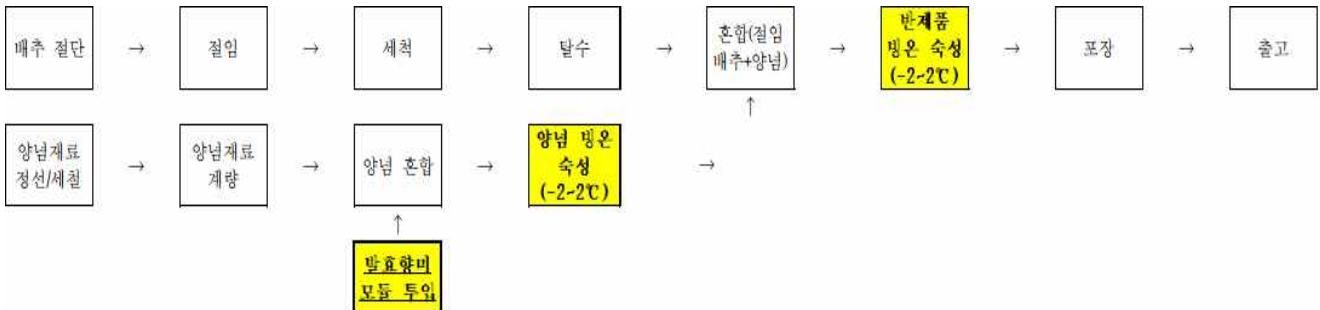
② 향미강화 공정 - 양념 빙온 숙성



③ 향미강화공정 2 - 반제품 빙온 숙성



④ 향미강화공정 3 - 양념/반제품 빙온 숙성



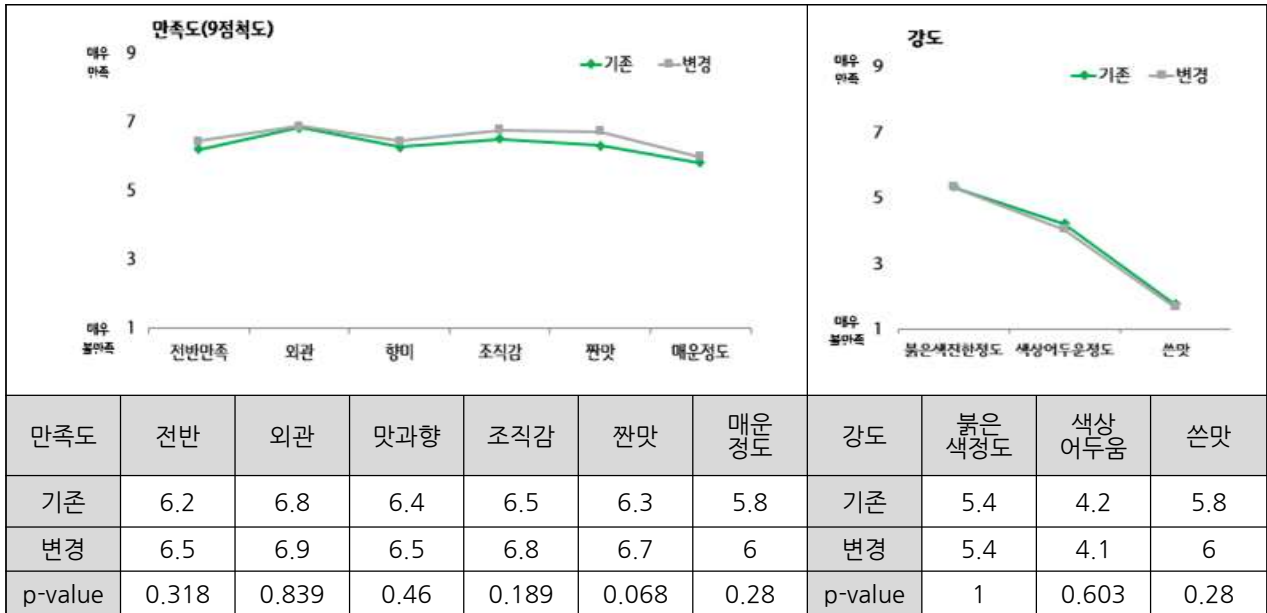
(2) 연구결과

기존공정과 향미강화공정 1~3 적용 김치를 제조 및 비교한 결과 발효향미모듈의 향미 강화를 위하여 양념 혼합시 발효향미 모듈 투입, 양념/반제품 빙온숙성 공정을 적용한 향미강화공정3이 기존공정과 대비하여 선호도 80.9%를 보이고, 전반적 만족도가 유의적인 차이를 보이며 우수하여 향미강화공정 3을 발효향미모듈 적용 공정으로 셋팅 하였습니다.

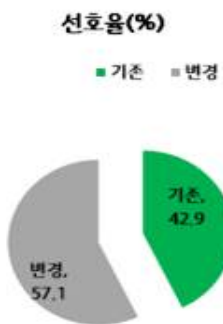
① 기존공정 vs 발효향미공정 -1

관능 선호도는 57.1%로 기존 공정 보다 높았으나, 유의적인 수준은 아니며 향미에서도 유의적인 차를 보이지 않음에 발효향미 공정 -2 설계 및 비교 하였습니다.

㉞ 만족도 및 강도



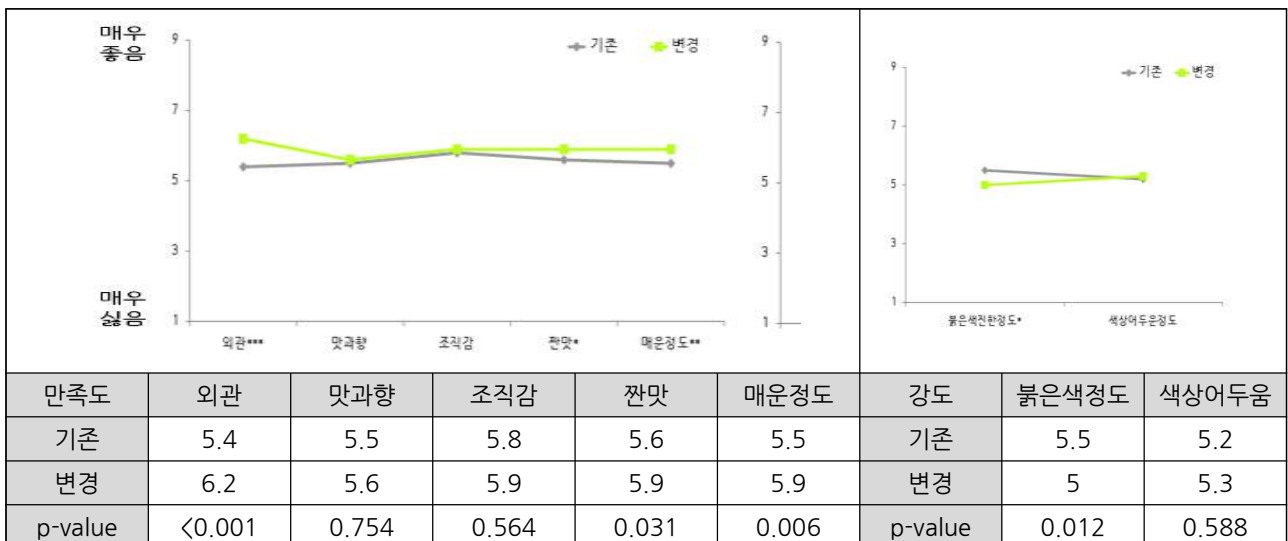
㉟ 선호율



㉞ 기존공정 vs 발효향미공정 -2

관능 선호도 59.6%로 변경 공정이 선호도는 높으나, 맛과 향은 유의차가 차를 보이지 않음에 발효향미공정 -3을 설계하여 비교하였습니다.

㉞ 만족도 및 강도



㉔ 선호율



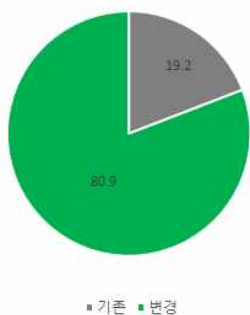
③ 기존공정 vs 발효향미공정 -3

발효향미강화공정 3 적용시, 기존 공정과 비교하여 80.9%로 선호도 증가 및 맛과 향 선호도에서 신뢰수준 95%로 유의적인 선호도차를 보였습니다.

㉕ 만족도



㉔ 선호율



다) 발효 향미 소재 베이스별 최적 함량 설계/ 품질 검증

(1) 발효 향미 소재 베이스별 (완두 베이스) 최적 함량 설계

(가) 연구 방법

완두 베이스의 발효 향미 베이스 소재를 김치에 0.5% 간격으로 0~4% 적용하여 5℃ 저장 조건에서 20일 발효 후 발효 품질 및 관능 품질을 비교분석 하였습니다.

(나) 연구 결과

함량	0	0.5	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
외관	X	X	X	X	X	X	X	X	X
관능	X	X	X	X	X	X	O	O	O
숙성도	X	X	X	O	O	O	O	O	O

① 외관

0~4% 발효 향미 베이스 소재 적용 김치와 기존 사용 지미 소재 사용 김치의 외관차이는 없었습니다.

② 관능

함량 3% 미만에서는 기존 사용 지미 소재 대비 관능에서 지미도가 떨어졌으며, 함량 3~4% 구간에서는 지미도가 유의적 차이가 없었습니다.

③ 숙성도

0~1% 함량 구간에서는 숙성이 기존 지미소재 사용 김치보다 낮았으나, 1.5% 이상 구간에서는 숙성도의 차이는 발생하지 않았습니다.

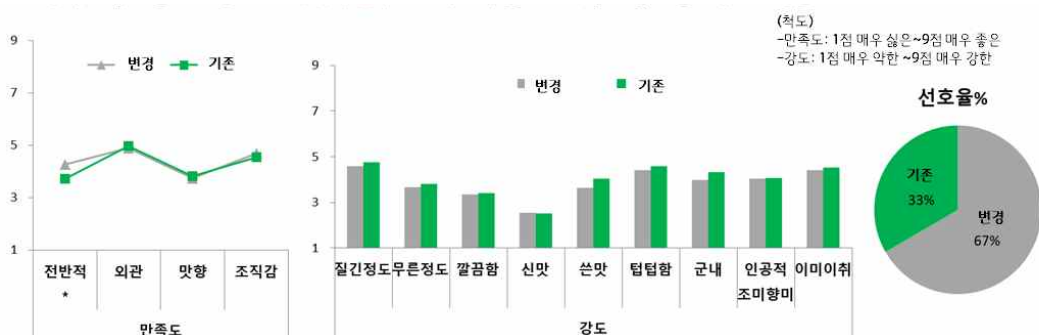
(2) 발효 향미 소재 베이스별 (완두 베이스) 최적 함량 적용 품질 검증

(가) 연구 방법

완두 베이스 발효 향미 소재 최적 함량 3% 적용 김치와 기존 지미 소재 사용 비건김치의 비교 관능 평가를 진행하였으며, 30~49세 여성 소비자 50인을 대상으로 9점척도 기준 선호도(전반적 만족도, 외관, 맛과향, 조직감, 짠맛, 매운정도), 강도(붉은색적합정도, 색상어두움, 쓴맛)를 비교하였습니다.

(나) 연구 결과

완두소재발효향미모듈 3.0% 적용 비건김치와 기존 지미소재 사용 비건김치 비교 평가 발효 향미모듈 적용 제품의 RQI 1.21, 선호율 67%로 관능우위를 확인하였습니다.



(3) 결론

완두 베이스 발효향미 소재의 함량별 품질 비교시 3.0% 이상 투입시 기존 지미 소재와 유사한 풍미 구현하며, 함량간 품질 편차는 없어 최적 함량 3.0% 로 설정했습니다.

완두 베이스 발효 향미 소재 최적 적용 및 발효향미 강화 공정 적용 김치의 관능 결과 양념과 반제품 빙온숙성 공정을 추가한 발효향미 강화 공정 적용과 완두 베이스 발효 향미 소재를 기존 지미 소재 대체 3.0% 적용한 제품이 기존 대비 품질적 우위 선점하여 상기 함량 및 공정을 선정하였습니다.

2-3-2-2. 김치 상품화 최적 포장 개발

1) 수출 타겟 제품 현지 소비 니즈 반영 포장 신규 설계

가) 디자인, TC 문구 신규 설계

(1) 연구방법

1차년도 미국 소비자 조사 기반 김치의 주요 구매 속성 정보를 반영하여 비건 김치 신제품 디자인, TC 문구를 설계하였습니다.

(2) 연구결과

① 1차년도 소비자 김치 인식 결과

건강함, 원산지(한국) 이미지는 좋으나, 현지 제품 대비 디자인 요소가 부족하여 보완이 필요하고, 한국 제조의 전통성, 전문적 사항 TC 문구화가 필요하다는 결과였습니다. 제품의 특징인 Probiotics, non-MSG 등 품질정보 강조 표시와 트렌디한/유행하는 항목의 이미지 부족에 따라 전반적 디자인 변경이 필요하다고 조사 되었습니다.

▶ 품무원 수출 김치 자유 연상



▶ 품무원 수출 김치 이미지



- 건강함, 원산지(한국) 이미지는 좋으나, 현지 제품 대비 디자인 요소가 부족하여 보완 필요
- 한국제조의 전통성, 전문적 사항 TC 문구화
- 제품 특성인 Probiotics, non-MSG 등 품질 정보 강조 표시
- 트렌디한/ 유행하는 항목의 이미지 부족은 전체적 디자인 변경 필요

② 2차년도 비건김치 디자인

전반적인 디자인은 트렌디함을 강조하기 위하여 녹색과 빨간색 배색에서 누드톤에 빨간색을 강조 포인트로 하여 이미지를 보완하였고, TC문구는 한국 Authenticity와 주요 Claim인 김치 건강 Gluten free, No-msg added, Probiotics 강조하여 디자인을 하였습니다.



2) 수출 김치 품질 개선 최적 포장 개발[김치 향 유출을 30% 감소]

가) 이슈 개선을 위한 포장 개발 및 검증

(1) 연구방법

기존 PP 캡 용기와 탈취소재 적용 캡 적용 용기에 각각 김치를 포장하여 Tedlar bag 5L안에 밀봉한 뒤 24시간 경과 후 발생된 냄새를 전자코 장비를 사용하여 측정하였습니다.

(569 : 탈취소재 적용 캡, 872 : 기존 캡, Blank)



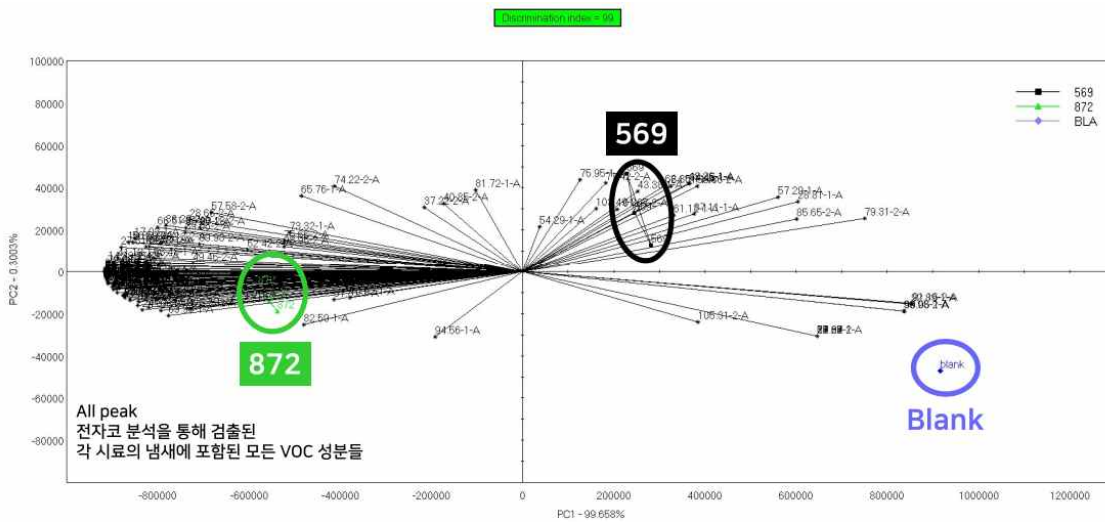
< Analysis Parameter >

Sample Volume	1g
Pumping Injection duration	30s (200ml/min)
Trap initial temperature	40℃
Oven temperature	50℃(2s) 80℃(1℃/s) 250℃(3℃/s)(21s)
Acquisition time	110s

* Reference : 569

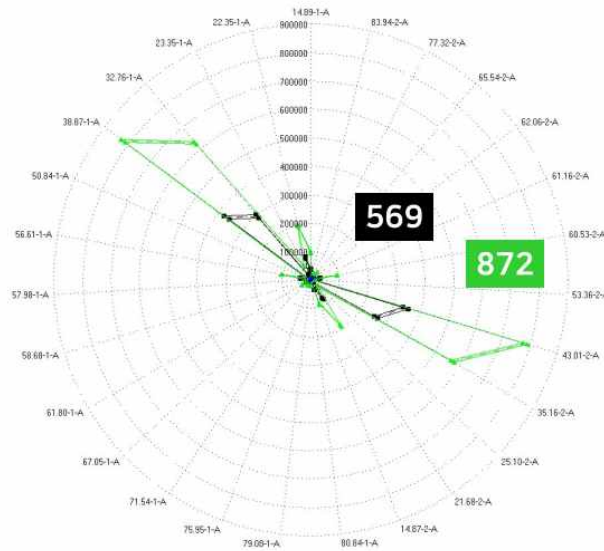
(2) 연구결과

가) All Peak 결과



(나) 유의차 Peak 선정 결과

유사한 냄새의 종류 보이나 면적의 크기로 냄새의 강도에 유의차 있었습니다.



No	RT (MXT-5)	RT (MXT-1701)	RI (MXT-5)	RI (MXT-1701)	Compound	Sensory description	Peak Area
1	14.89	14.87	425	457	Trimethylamine	Amine Ammoniacal Fishy Fruity Oily Pungent Rancid Sweaty	872 > 569
3	22.35	-	564	-	Ethene, 1,2-dichloro, (E)-	Sweet	872 > 569
4	-	21.68	-	583	Cyclopentane	Mild, Sweet	872 > 569
5	23.35	25.10	604.5	643.5	2-methylfuran	Acetone, Burnt, Chocolate, gassy (sweet), Metallic, Musty, Solvent	872 > 569 > Blank
6	32.76	35.16	709	766	Ethyl propanoate	Acetone, Fruity, Solvent	872 > 569
7	38.87	43.01	756	827	Methyl crotonate	Fruity, Green, Sharp	872 > 569 > Blank
8	50.84	-	870	-	3-Furanthiol, 2-methyl-	Barbeque Broth Fatty ham (cured) Meaty Metallic Nutty Onion Spicy Sulfurous Sweet Toasted	872 > 569
9	-	53.36	-	955.5	1S-(j)-a-pinene	Fresh, Herbaceous, Pine, Resinous, Sharp, Terpenic, Turpentine, Warm	872 > 569 > Blank
10	56.61	60.53	925	1005	2,3-dimethylpyrazine	Baked Bread Burnt sugar Butter Caramelized Chocolate Cocoa Coffee Dusty Green Leather Linseed oil Malty Meaty Nutty oxidized Peanut Peanut butter Pungent Roast Sweet Walnut	872 > 569 > Blank
11	57.98	-	946	-	Propyl 2-butenate	-	872 > 569

No	RT (MXT-5)	RT (MXT-1701)	RI (MXT-5)	RI (MXT-1701)	Compound	Sensory description	Peak Area
12	58.69	-	962	-	1-Chloroheptane	-	872 > 569
13	-	61.16	-	989	2,3-Butanediol	Creamy Fruity Odorless Onion	872 > 569
14	-	62.06	-	1051	5-ethyl nonane	-	872 > 569 > Blank
15	61.80	65.54	991	1080	Putrescine	Animal Strong	872 > 569 > Blank
16	67.05	-	1065	-	Acetophenone	Almond, Cheese, Chemical, Floral, Glue, Hawthorn, Jasmine, Musty, Orange, Orange blossom, Pungent, Sweet	872 > 569
17	71.54	77.32	1125	1263	Naphthalene, octafluoro	-	872 > 569 > Blank
18	75.95	-	1196	-	5-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-2(5H)-furanone	Brown sugar Butterscotch Caramelized Fruity fruity (sweet) Maple Nutty Seasoning Spicy Sweet	569 > 872 > Blank
19	79.08	-	1238	-	2-Butenoic acid, hexyl ester	Fruity Green Oily Sweet Walnut	872 > 569 > Blank
20	80.84	-	1271	-	3-Methyl-dodecane	-	872 > 569
21	-	83.94	-	1349	Sotolon	Burnt Burnt sugar Caramelized Coffee Cotton candy Curry Maple Mushroom Seasoning Spicy Strong Sweet	872 > 569

(3) 결론

탈취소재를 용기 캡에 적용 한 결과 기존 용기와 냄새의 종류에는 유의차가 없었음에 김치의 발효 향미에는 영향을 주지 않으며, 냄새의 강도가 적어짐을 검증하였음. 이러한 결과를 바탕으로 향후 수출용 비건김치 제품에 탈취소재 적용 용기 캡을 적용하고자 합니다.

2-3-2-3. 비건 김치 및 김치 유통 경로별 품질 검증

1) 발효 향미 소재 적용 비건김치 저장 환경별 품질 변화 분석

가) 저장 조건별 품질 변화 분석

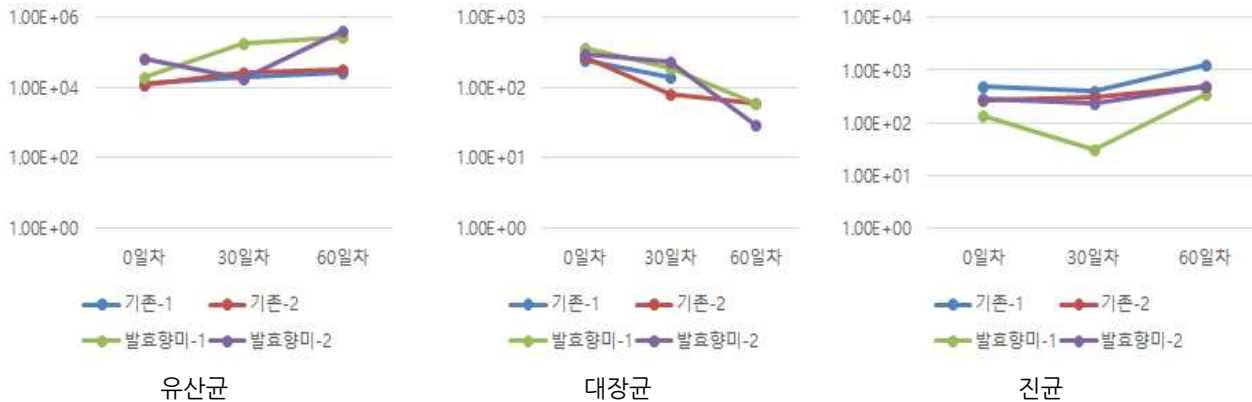
(1) 연구방법

폴무원 나소야 기존 비건김치와 완두소재 유래 발효향미모듈 적용 비건김치를 유통조건과 유사한 조건에서 미생물 수(유산균 대장균군, 진균)와 균총의 변화를 분석하였습니다.

저장일수	0일차	30일차	60일차
온도 조건	2℃	2℃	5℃
가정 조건	해양운송 1개월소요		현지 참고 보관

(2) 연구결과

① 미생물 수 변화



유산균은 발효향미 모듈이 llog 정도 높은 양상을 보임. 대장균군은 숙성이 진행됨에 전제적으로 감소하는 경향성을 보이고 진균은 숙성에 따라 일부 증가하는 경향성을 보였습니다.

② 미생물 균총 변화

기존 비건김치의 경우 30일차 까지 균총의 변화는 없었으나 60일차 *Leuconostoc citreum*이 미검출 되었고, 발효향미모듈 적용 비건김치의 경우 초기 미생물 균총은 기존과 동일하였으나, 30일차 *Leuconostoc lactis*이 미검출 되었으며, 60일차 *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc citreum* 미검출 되었습니다.

(3) 결론

수출 유통경로의 조건과 유사한 온도조건에서 60일간 저장 및 품질 변화를 분석한 결과 폴무원 나소야 기존 비건김치와 완두소재 유래 발효향미모듈을 적용한 김치의 미생물 수의 변화로 보아 발효 패턴은 유사한 것으로 보입니다. 미생물 균총의 변화에서는 기존 비건제품과 발효향미모듈 적용 비건김치의 초기 미생물 균총의 차이는 없었으나, 발효향미모듈 적용에 따른 초기 당류와 질소원의 차이로 인하여 미생물 균총 변화에서는 차이가 있는 것으로 사료됩니다.

	0일차	30일차	60일차
기존	Weissella confusa	Weissella confusa	Weissella confusa
	Leuconostoc lactis	Leuconostoc citreum	Leuconostoc mesenteroides
	Leuconostoc citreum	Leuconostoc mesenteroides	Lactobacillus curvatus
	Leuconostoc mesenteroides	Lactobacillus curvatus	Lactobacillus casei
	Lactobacillus curvatus	Lactobacillus casei	Lactobacillus plantarum
	Lactobacillus casei	Lactobacillus plantarum	
	6균총 22종 검출 (no ID 2종 제외)	6균총 18종 검출 (no ID 2종 제외)	5균총 15종 검출 (no ID 5종 제외)
발효항미모듈	Weissella confusa	Weissella confusa	Weissella confusa
	Leuconostoc lactis	Leuconostoc citreum	Lactobacillus plantarum
	Lactobacillus plantarum	Lactobacillus plantarum	Leuconostoc mesenteroides
	Leuconostoc mesenteroides	Leuconostoc mesenteroides	Lactobacillus curvatus
	Lactobacillus curvatus	Lactobacillus curvatus	
	Lactobacillus casei		
	6균총 19종 검출 (no ID 2종 제외)	5균총 16종 검출 (no ID 4종 제외)	4균총 15종 검출 (no ID 5종 제외)

2) 실 수출 유통환경 및 품질 변화 검증

가) 수출 경로 온도 모니터링(미국)

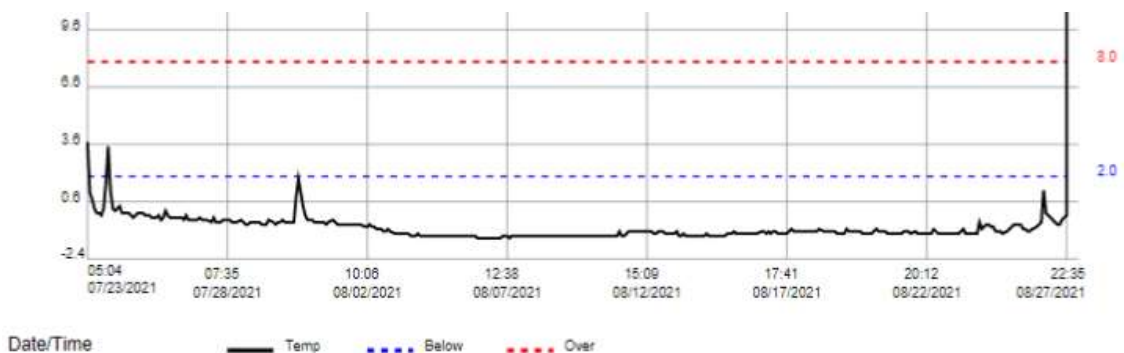
(1) 연구방법

2021년 7월~10월 3회 제조 후 병원성 미생물 안전성 분석 및 미국 출고 컨테이너 운송 온도 모니터링을 위하여 외포장에 데이터로거를 부착하여 운송 온도 모니터링을 하였습니다.

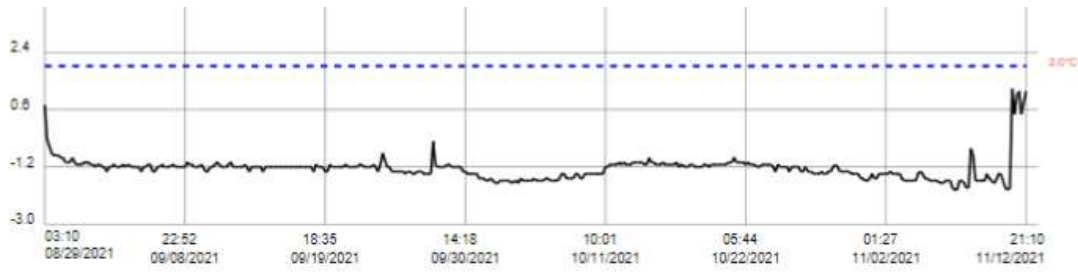
(2) 연구결과

‘21년 3차(7월~10월) 모니터링 결과 풀무원 자사 기준 2°C 이하 운송 적합 확인 하였습니다.

① 21년 7월



② 21년 8월



Date/Time — Temp - - - - Below Over

③ 21년 10월



Date/Time — Temp - - - - Below Over

나) 실 수출 유통 경로 품질 모니터링

(1) 연구방법

일반 수출김치와 비건김치의 수출 경로 별 품질 변화 모니터링을 진행 하고자 출고 시점, 미국 창고 출고 시점, 유통 시점의 품질을 점검 하였습니다. 미국 현지의 사정으로 유통 시점을 점검할 수 없어 미국 유통조건인 5°C에 3개월 저장 후 분석을 하였습니다. 분석 항목은 한국 출고 시점에 대장균, 리스테리아 모노사이토제네스, 살모넬라, 황색포도상구균, 클로스트리디움 보툴리눔, 효모를 분석하였고, 현지 출고시점은 ph, 효모, 외관(마름, 산막효모)를 점검하였고, 유통 시점 제품은 ph, 염도, 효모/곰팡이를 분석하였습니다.

(2) 연구결과

수출품, 현지 출고품, 유통품 모두 품질 이슈는 없으나 제품별 편차가 있고, 특히 현지 출고품의 경우 저장고별 저장 환경의 차이로 동일 제조일 제품 경우도 발효 정도의 차이가 있었습니다. 현지 유통저장품의 경우 Con 대비 비건김치의 숙성도가 높았으며, 제품별 효모&곰팡이 편차가 크고, 대장균, 대장균군 등 병원성 미생물 적합, 장기 저장에 따른 외관 품질 저하 없었습니다.

① 출고제품

항목	일반김치	비건김치
대장균	0	0
리스테리아 모노사이토제네스	음성	음성
살모넬라	음성	음성
황색포도상구균	음성	음성
클로스트리디움 보툴리눔	불검출	불검출
효모	10 ¹ ~3	10 ¹ ~3

② 거점 창고 출고시점

거점창고	ph	효모/곰팡이	외관
길로이	3.5~3.8	<10 ³	양호
에이어	4.0~.42	10 ⁶ ~7	양호

③ 유통 제품

제품별	ph	염도	효모/곰팡이
일반 수출김치	4.5	2.2	효모: 10 ¹ ~6 곰팡이:<10
비건김치	4.2	2.2	효모: 10 ¹ ~7 곰팡이<10

2-3-2-4. 수출국 현지 소비자 조사

1) 발효 향미 소재 적용 김치 컨셉 조사(Worry Free) - 2차

가) 김치 적용 컨셉 인지/수용도 소비자 조사

(1) 연구방법

미국 동부, 서부, 남부 지역을 중점으로 하여 이 지역에 거주하고 있는 아시아인을 제외한 20~40대 남녀(미혼/ 기혼 포함), 김치 취식 경험이 있고, 김치에 대한 인지도가 있는 600명을 선정하여 5점척도를 기준으로 온라인 설문지 조사를 진행하였습니다.

(2) 연구결과

① Worry Free에 대한 인식

Worry Free를 인지하는 비율은 40% 정도이며, 김치를 더 자주 구입할수록 Worry Free 의미를 알고 있다고 응답하였습니다. Worry Free를 식품첨가물, 화학 성분에 대해 걱정이 없다 라는 의미로 이해하는 비율이 13%로 가장 높으며, 그 외 ‘건강한/몸에 좋은’, ‘안전한’, ‘편리한/쉬운’ 등 다양한 의미로 이해하고 있었습니다.

Worry-Free 중 중요하게 여기는 속성으로는 ‘no trans-fat & cholesterol’, ‘no-high fructose corn syrup’ 이 2 TOP 요인이며 이를 바탕으로 체중 감량에 관련되어 기대하는 것으로 사료됩니다.

Worry Free 인지도 및 의미



Worry Free 중요 고려 요인

		1-3순위	2순위	3순위	4순위	5순위
		69.8	26.7	69.5	24.7	47.8
		18.7	17.3	37.5	17.3	36.3
		9.8				
1-3순위 기준 (Base)		No High-fructose Corn Syrup	No Trans-fat & Cholesterol	Gluten-free	Vegan	No-bio
세대 구성	20대 남자 (90)	66.7	62.2	45.6	36.7	48.9
	20대 여자 (120)	75.8	70.0	42.5	42.5	30.0
	30대 남자 (90)	61.1	72.2	57.8	43.3	37.8
	30대 여자 (120)	67.5	64.2	51.7	37.5	34.2
	40대 여자 (90)	67.8	77.8	47.8	35.6	35.6
인종	백인 (479)	69.5	68.7	48.0	38.0	35.9
	히스패닉 (74)	74.3	70.3	43.2	43.2	33.8
	흑인 (40)	62.5	77.5	50.0	25.0	52.5
김치 구입 빈도	주1회 이상 (125)	66.4	64.8	60.0	50.4	39.2
	2주에 1회 (188)	63.3	66.5	55.9	42.0	36.7
	3-4주에 1회 (166)	73.5	71.7	40.4	29.5	36.1
	2-3개월에 1회 (121)	78.5	76.0	33.1	28.1	33.1

※주요 응답값만 제시

[Base: 전체 응답자(n=600), 단위: %]

(3) 결론

김치를 자주 구매하는 소비자 일 수록 Worry Free에 대한 인식율이 높으나, 대부분의 소비자는 Worry Free 들어본 적 없어 생소하나 화학약품, 유전자 변형, 고당도, 고비만 등의 식품 안전성 저해 요소가 없는 의미로 해석하므로 건강하고 안전한 식품을 간편하고 섭취할 수 있도록 제공한다는 정보로 접근시 상품 컨셉으로 기대효과가 있습니다.

2) 김치 인식, 소비 패턴 조사- (정량/ 정성)

가) 미국 현지 김치 소비 정보 조사(정량 조사, 정성 조사)

(1) 연구방법

① 정량 조사

미국 동부, 서부, 남부 지역을 중점으로 하여 이 지역에 거주하고 있는 아시아인을 제외한 20~40대 남녀(미혼/ 기혼 포함), 김치 취식 경험이 있고, 김치에 대한 인지도가 있는 600명을 선정하여 5점척도를 기준으로 온라인 설문지 조사를 진행하였습니다.

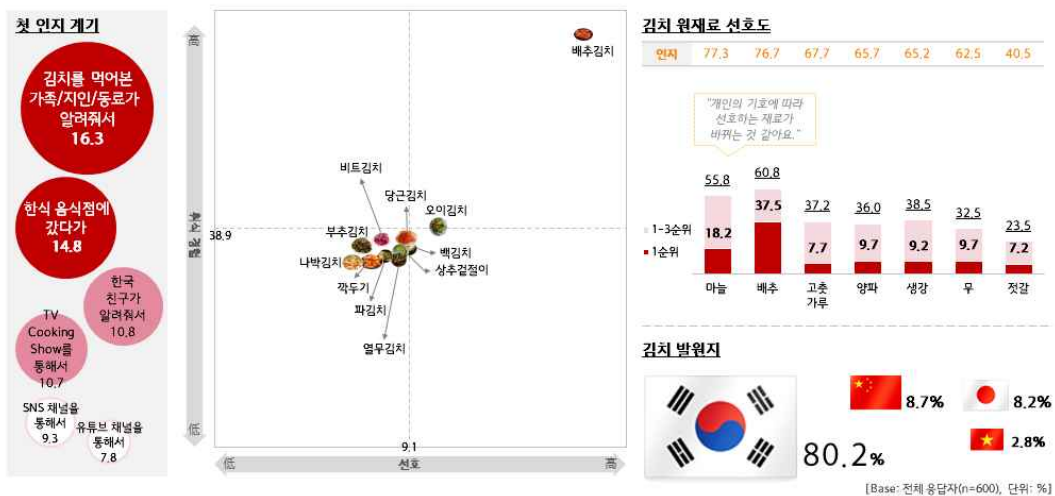
② 정성 조사

미국 남부 지역(중소도시 6개)에 거주하고 있는 25-39세 무자녀의 미혼, 기혼 여성과 30-39세 유자녀 기혼 여성 중 아시아인을 제외하고 김치 인식, 섭취, 활용 경험이 있는 소비자의 Online Home Visit 설문 조사를 진행하였습니다.

(2) 연구결과

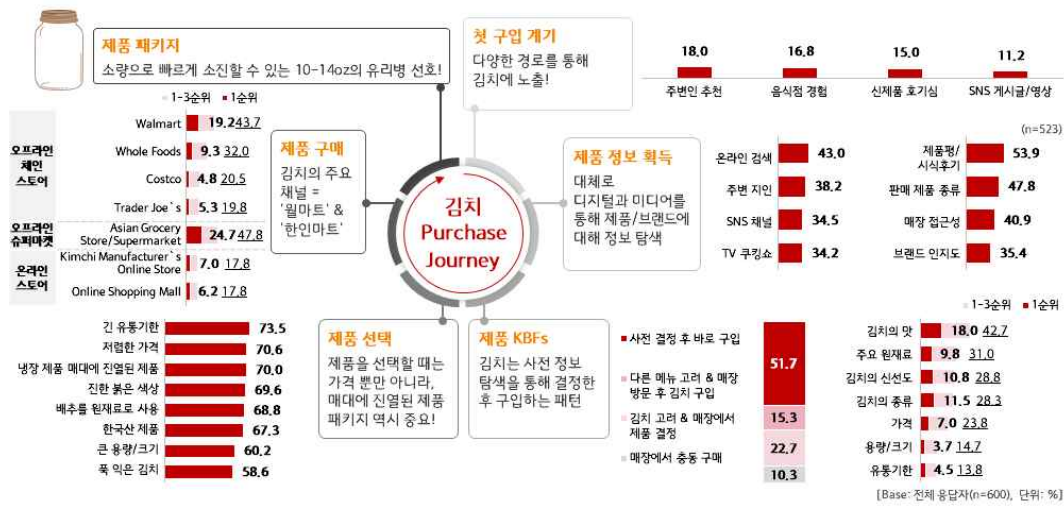
① 김치에 대한 인식

미국 소비자에게 가장 익숙한 김치는 배추김치형태로 평소 메뉴와 어울림이 좋고, 유산균이 풍부해 장건강에 유익하다. ‘는 점에서 취식을, 선호도 증가함. ‘주변 지인 ‘,’ 한식음식점 ‘,’ 요리프로그램 및 SNS ‘ 등 다양한 채널 통해 접하며, ‘ 주변 지인의 WOM’ 영향력 가장 컸습니다.



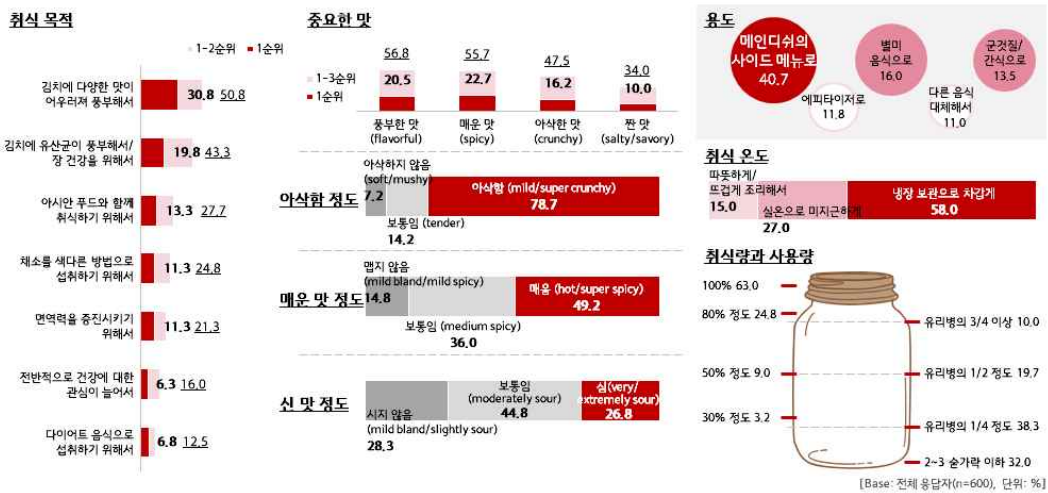
② 시판김치 구입 행태

김치는 계획 구매 품목으로 대형마트 중점 구매하는데 사전 '온라인 검색', 'SNS 채널', 'TV 쿠킹쇼' 등을 통해 '제품 후기', '판매 제품 종류', '판매 매장' 등을 파악하고 구입하였으며, 김치 계획 구매 시 '김치의 맛', '주요 원재료', '김치의 신선도와 종류' 등을 고려함을 확인하였습니다. 오프라인 대형마트에서 김치 제품을 직접 구입할 때는 '유통기한', '진열된 제품의 외향적인 디자인' 등을 주요점으로 고려하고, 특히 제품 내부 확인가능한 투명 재질의 유리용기를 선호하였습니다.



③ 시판 김치 취식 행태

미국 소비자는 김치에서 '다양한 맛이 어우러져 풍부한 맛을 느끼는 동시에 풍부한 유산균으로 인한 장 건강 증진', '색다른 방법으로 채소 섭취' 등에 대한 기대감 가지며, 사이드 메뉴용, 간식용, 에피타이저용 등 다양한 TPO에서 취식하였습니다. 실 취식은 냉장 보관 후 김치 그대로 소량 간식처럼 섭취해 섭취량 및 활용도가 낮았습니다.



(3) 결론

김치의 인지는 '지인', '한국음식점', 'TV 쿠킹쇼' 순으로 인지 계기를 얻고, 주변지인의 WOM 영향력이 가장 크므로 바이럴 마케팅 활동을 통해 김치의 효능, 레시피 활용법 등 지속적으로 노출시키야 합니다. 상품 김치 판매 활성화를 위해서 김치는 계획 구매 품목으로 대형마트 중점 구매하며, 사전 정보탐색 후 소비자 니즈에 맞는 상품을 고려하여 선택 (맛, 원재료, 신선도등)하고 사전 결정 구매 비율이 절반 이상이므로 김치에 대한 사전 정보를 다양한 채널을 통해 제시해야 합니다. 직접 매장 구매시 '유통기한', '외향 디자인' 이 주요 고려 대상으로 소비자 니즈 반영 디자인 설계 필요하며, 내부 확인 가능한 소재로 미디움 사이즈 김치로 설계함이 중요합니다. 시판 김치 구매 고려 요소 1위는 1,2차 설문 조사시 모두 '맛'으로 김치의 맛 Key Factor는 '풍미'와 '매운 맛' 이 필수 요소이므로 충족될 수 있는 현지 선

호 풍미 파악 및 상품화가 필요합니다. 김치 섭취를 통해 '장 건강 증진' 효능을 가장 많이 기대하며, 그 다음으로 '면역력 향상', > '콜레스테롤 수치 감소' > '피부 건강 증진' > '변비 예방' 등의 순으로 김치의 기대 특성을 강화한 특성 설계 및 홍보화가 중요합니다.

김치 섭취에 대한 기대효과 관심은 높으나 실 섭취량은 소량으로 생으로만 섭취하여 소비빈도와 활용도가 낮을 개선하기 위해 다양한 섭취/ 조리방법 제안 필요합니다.

2-3-2-5. 수출/ 국내 타겟 비건 김치 상품화

1) 수출 및 국내 타겟 제품화

가) 수출 및 국내 타겟 비건 김치 개발

(1) 연구방법

식물성 발효 향미소재 최적 비건 김치 상품화 및 생산 체계 확립을 위한 연구 개발 과제 수행 시 도출된 결과를 바탕으로 수출 및 국내 타겟 비건 김치 최적 SPEC 개발을 하였습니다.

(2) 연구결과

본 과제로 개발된 콩 및 완두 베이스 발효 향미 소재를 최적으로 적용하여 발효 품질 및 유통 중 품질 안정성을 확보하였으며, 관능품질도 기존 소재 대비 품질적 우수함을 검증하였습니다. 풀무원에서 개발한 비건김치의 발효 향미 소재 적용 대량 생산화 공정 및 향미 소재 강화 공정을 설계 및 최적화하고 제품 적용을 통해 신제품 설계하였으며, 제품은 글로벌 및 국내 소비자 특성에 맞추어 Spicy와 Mild 2종의 타입으로 제품으로 설계 하였습니다, 소비자 조사 결과를 바탕으로 한국 김치 Authentic Korean 문구와 Worry-Free 문구 대신 소비자가 직관적으로 이해 가능하도록 Probiotics, gluten-free 문구로 김치건강 소구점을 강조한 포장재를 아래 그림과 같이 디자인 완료 하였습니다.



한국 김치 Authenticity 강조



김치 건강 클레임 강조

(3) 결론

글로벌 및 국내 소비자 특성 고려 맞춤 식물성 발효 소재 적용 비건 김치 2종을 제품화 하였습니다. (Nasoya kimchi spicy, Nasoya kimchi mild)

2-3-2-6. 김치/ 비건 김치 유효성 검증

1) 김치, 비건김치 유효성 검증 시험

가) 김치, 비건김치 in-vivo 시험

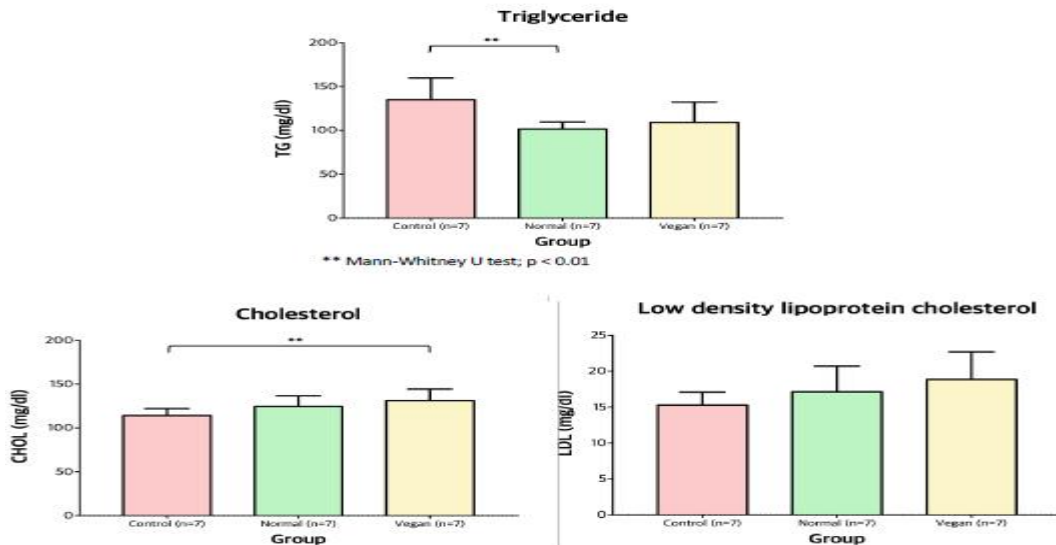
(1) 연구방법

실험군은 Control(1.8% 염수 식이군), Normal(일반 김치 식이군), Vegan(비건 김치 식이군)으로 설정하여, 실험군별 마우스 대상 4주간 식이를 진행하였습니다. 장내 마이크로바이옴 검사와 대사체, 면역효능 분석을 16S rRNA sequencing, Mouse 실험/검사, 면역세포활성시험으로 진행하고 멀티오믹스로 결과를 통계처리 하였습니다.

(2) 연구결과

① Serological test

일반 김치 투여 마우스에서 TG값이 감소경향이 있었으며, Vegan 김치 투여 마우스는 TG값 약간 감소하나 CHOL, LDL값 증가 경향 보였습니다.



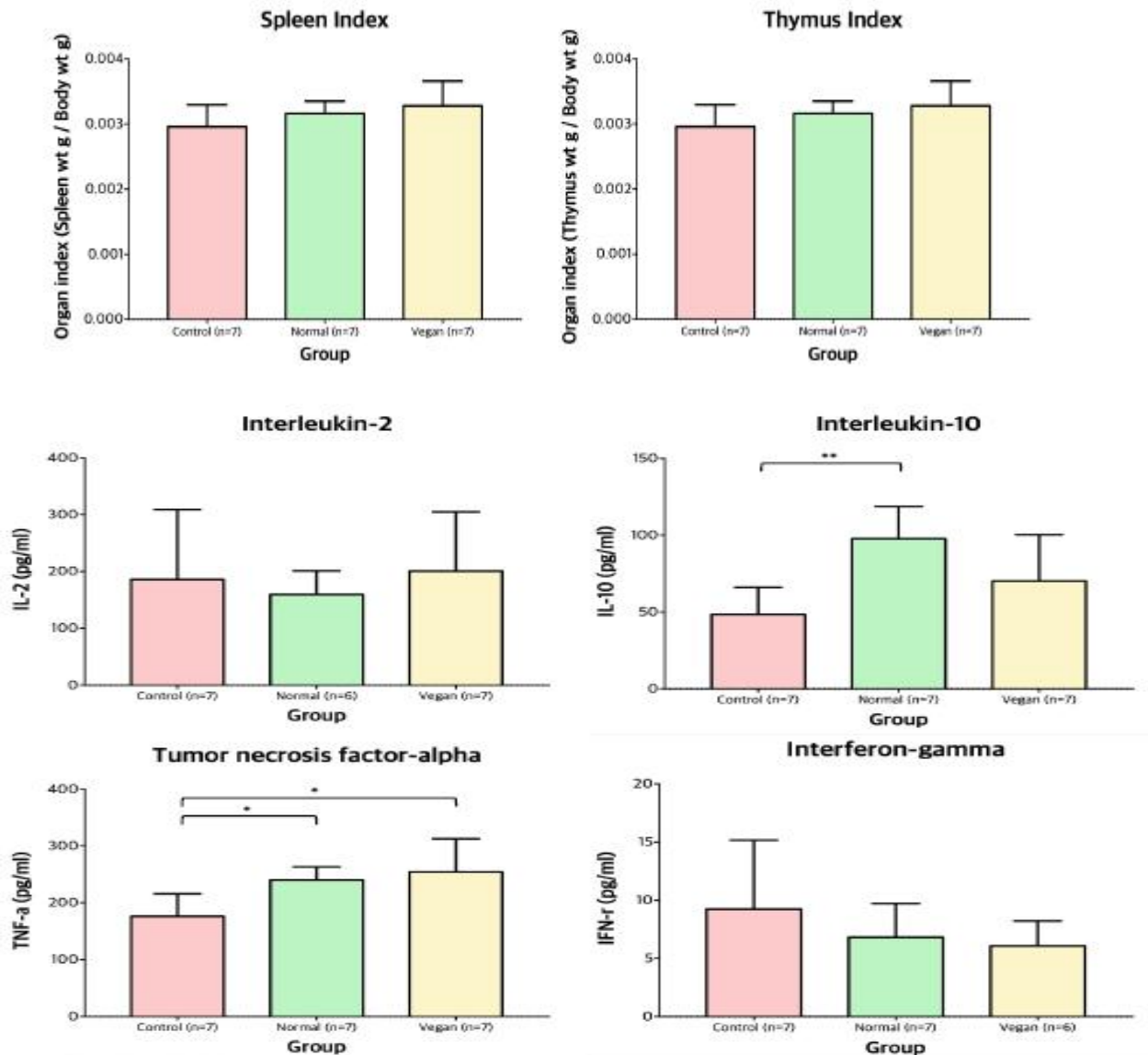
② Immune efficacy test

- Spleen index(비장지수)는 Normal, Vegan 그룹에서 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었습니다.(Nor, P=0.65; Vegan, P=0.39).
- Thymus index(흉선지수)는 Normal, Vegan 그룹에서 약간 증가하였으나 통계적 유의성은 없었습니다. (Nor, P=0.32; Vegan, P=0.32).
- Proliferation rate(비장세포 증식능)은 Con A(세포성 면역 연관 T-cell 선택적 증식)처리시 Normal, Vegan 그룹에서 통계적 유의한 증가를 확인하였습니다. (all, P<0.05). LPS(체액성 면역 연관 B-cell 선택적 증식)처리시 Normal 그룹의 유의적 증가 확인하였고, Vegan 그룹도 증가 경향을 보였습니다.
- Interleukin-2(T cell 활성화, 증식 유도/ NK cell, B cell 증식 관여로 종양전이억제 관여)은 Normal 그룹의 약간 감소 경향있으나 유의미하지 않았습니다.
- Interleukin-10(대식세포에 작용해 TNF- α , IL-6 등 염증성cytokine 발현 억제, COVID-19중증환자의 TNF- α , IL-6 등 혈중level 상승(cytokine storm) 증상 억제 역할함)은 Normal그룹

에서 유의미하게 증가하였으며, Vegan 그룹도 증가 경향 보였습니다.(Nor, P=0.004; Vegan, P=0.12).

- Tumor necrosis factor- α (T cel, 대식세포 내 주 생산. 감염초기염증반응 유발 조절. 항염증 cytokine인 IL-10 의해 억제)는 Normal/ Vegan 그룹 모두 유의미한 증가 보였습니다.(Nor, P=0.01; Vegan, P=0.04).

- Interferon-gamma (T cell, NK cell 내 생산 대식세포 활성화, T cell 및 NK cell분비 촉진 되었으며, 인체 발생 암항원단백질의 면역 높임)는 모든 그룹의 통계적 유의성이 없고, 감소 경향보였습니다. (all, P>0.05).



(3) 결론

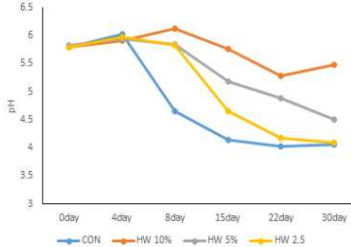
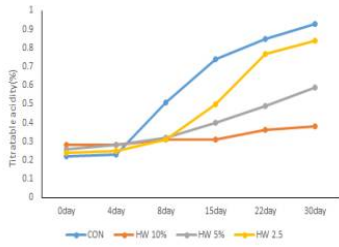
실험군별 김치를 마우스에 4주간 반복 경구 투여한 결과, Normal김치는 TG감소 효과가 관찰되어 혈액 내 지질 조절 효능과 비장증식능시험 결과에 따라 T cell과 B cell의 증식 효과도 기대해 볼 수 있을 것으로 기대합니다.. 또, IL-10의 증가가 관찰되어 항염증 또는 면역 억제 효과가 예측됩니다. Vegan 김치는 TG나 Cholesterol 감소 효과는 보이지는 않았으나, 다른 두 김치보다 강력한 T cell, B cell 증식 효과가 관찰되었고, 면역 활성화 cytokine인 TNF- α 의 증가도 확인되어 면역활성 증가에 효과가 있는 것으로 판단됩니다.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

○ 비건김치 레시피 개선 및 김치 숙성기간 연장 김치 개발



6°C 30일간 저장한 김치의 pH, 산도 변화

○ 식물성 발효향미모듈 3종 개발

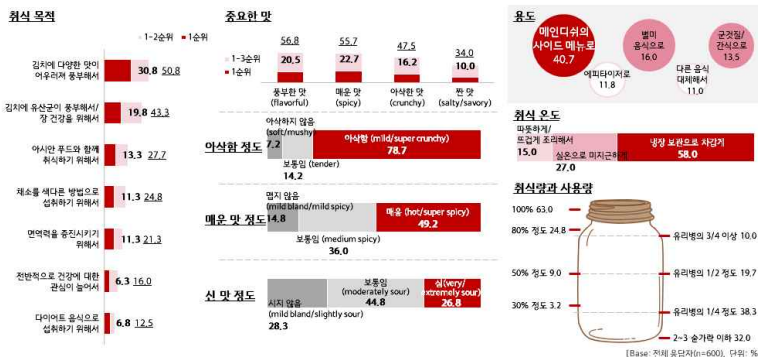
- 식물성 발효향미모듈-1 2종: 대두단백발효모듈, 완두단백발효모듈

품질 지표		품질 목표	대두단백발효모듈	완두단백발효모듈
맛	TN(% w/v)	2.2 이상	2.0	2.6
	TAA(% w/v)	14.0 이상	12.2	16.5
	저분자 펩티드, 아미노산(% w/v)	12.6 이상	11.7	14.0
	FAA(% w/v)	10.0 이상	11.5	11.8
	GA(% w/v)	1.5 이상	1.9	1.9
G-peptide(ppm)	500 이상	720	861	
향기	FD factor	128 이하	512	512
	바이오제닉 아민(mg/kg)	50 이하	불검출	불검출
안전성	SDS-PAGE	7kDa 이상 0%	7kDa 이상 0%	7kDa 이상 0%
	Soy allergen	검출한계 미만	검출한계 미만	검출한계 미만
나트륨	NaCl	10.0 이하	11.4	8.8
	저분자 펩티드, 아미노산 / NaCl ratio(%)	120 이상	102	159
색상	명도(L)	75 이상	86	80
	황색도(a)	25 이하	17	6
	적색도(b)	70 이하	92	65
일반성분	수분(% w/w)	75 이하	68	72
	pH	5~6	5.21	5.94

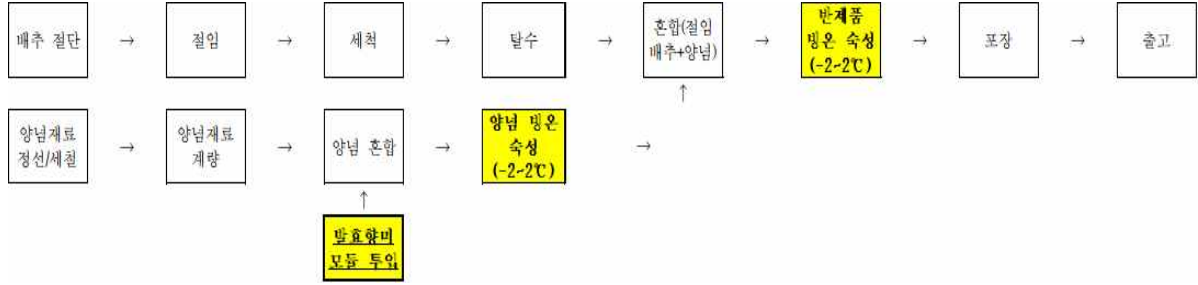
- 식물성 발효향미모듈-2 1종: 쌀발효모듈

품질 지표		품질 목표	쌀발효모듈
일반성분	알코올(% v/v)	9.0~11.0	9.0
	포도당(% w/v)	4.0 이하	3.3
	pH	2.8~3.6	2.8
	산도(%)	1.5~2.5	2.2
향기	Ethyl butanoate(mg/kg)	0.01 이상	0.11
	Ethyl hexanoate(mg/kg)	0.01 이상	0.15
	Ethyl lactate(mg/kg)	0.01 이상	1249.11

○ 수출국(미국) 현지 소비자조사를 통한 김치소비 정보 수집, 비건김치 타겟 개발



○ 비건김치 대량생산 체계 제조공정 확보: 향미강화공정 3 - 양념/반제품 빙온 숙성



(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

○ 특허출원 4건

출원번호	발명명	특허청장	출원번호	발명명	특허청장	출원번호	발명명	특허청장	출원번호	발명명	특허청장
202101131	비건 김치 제조 방법	특허청장	202102222	비건 김치 제조 방법	특허청장	202103001	비건 김치 제조 방법	특허청장	202103002	비건 김치 제조 방법	특허청장
202101132	비건 김치 제조 방법	특허청장	202102223	비건 김치 제조 방법	특허청장	202103003	비건 김치 제조 방법	특허청장	202103004	비건 김치 제조 방법	특허청장
202101133	비건 김치 제조 방법	특허청장	202102224	비건 김치 제조 방법	특허청장	202103005	비건 김치 제조 방법	특허청장	202103006	비건 김치 제조 방법	특허청장

○ 기술이전 1건 (22백만원)

기술이전명	기술이전내용	기술이전금액
비건 김치 제조 방법	비건 김치 제조 방법의 기술이전. 기술이전 대상 기술은 비건 김치 제조 방법이다. 기술이전 대상 기술은 비건 김치 제조 방법이다.	22백만원

○ 상품화 2건

- 국가별 김치 맛 지표 선별하고 제품 2종 개발 품목제조신고 완료
- 글로벌 및 국내 소비자 특성 고려 맞춤 식물성 발효 소재 적용 비건 김치 2종을 제품화 (Nasoya kimchi spicy, Nasoya kimchi mild)



농림축산식품 연구개발과제 제품출시 확인서

과제명	연구개발과제명	개발기간	개발비용
농림축산식품	비건 김치 제조 방법	2021.01.13 - 2021.12.31	1,760
연구개발비	연구비	2021.01.13 - 2021.12.31	1,760
총 개발비용	600,000,000원		

개발 기간 제품출시 유형

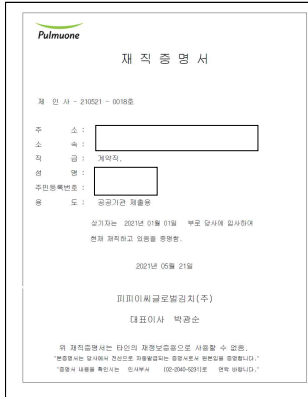
시제품/제품출시 유형	제품출시 여부	제품출시 시기
시제품/제품출시 유형	()	제품출시 시기
시제품/제품출시 유형	()	제품출시 시기

제품 출시 실적

제품명	제품명	제품출시 시기	제품출시 실적
Nasoya Kimchi Spicy	Nasoya Kimchi Mild	2022.01.13	제품출시 실적

2021년 12월 13일
연구책임자: 박정희 (인)

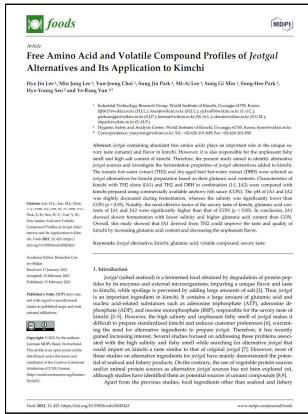
○ 고용창출 2명



○ 연구인력 양성 1명



○ SCI 논문 1편, 학술발표 3건



< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도	1단계 (2020~2021)		n단계 (YYYY~YYYY)	계	가중치 (%)
		1	2			
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	1	특허출원	4		4	20
		실적(누적)	4		4	
	2	SCI 논문	0		0	
		실적(누적)	1		1	
	3	학술발표	0		0	
		실적(누적)	3		3	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	1	기술이전	1		1	20
		실적(누적)	1		1	
	2	기술료	22,000		22,000	20
		실적(누적)	22,000		22,000	
	3	상품화	2		2	30
		실적(누적)	2		2	
	4	고용창출	2		2	10
		실적(누적)	2		2	
	5	인력양성	0		0	
		실적(누적)	1		1	
계					100	100

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ² (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치		목표설정 근거
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (YYYY~YYYY)	n단계 (YYYY~YYYY)	
1								
2								

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

(22쪽 중 7쪽)

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Free Amino Acid and Volatile Compound Profiles of Jeotgal Alternatives and Its Application to Kimchi	Foods	Ye-Rang Yun		스위스	MDPI	SCI	15 February 2021	2304-8158	10

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국미생물학회	허병석	2020.11.07	온라인 발표	대한민국
2	한국식품과학회	박성희	2021.07.09	대전	대한민국
3	한국식품과학회	한응수	2021.07.09	대전	대한민국

기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2022	최종보고서	2022.02	

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[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	특허(4-비닐구아아콜 생성능이 우수한 데바리오마이세스 균주를 포함하는 천연향미 조성물)	대한민국	샘표식품 주식회사	2020.10 .13	10-2020- 0131931				50%		
2	안토시아닌 색소를 이용하여 유산균 발효 정도가 측정되는 휴대용 배양장치	대한민국	한국식품 연구원	2021.06 .07	10-2021- 0073565				50%		
3	땅콩새싹의 종자겉질 제거장치 및 이를 이용한 땅콩새싹 세척방법	대한민국	한국식품 연구원	2021.07 .22	10-2021- 0096693				50%		
4	깊은맛의 식물성 발효물을 위한 감마-글루타미드 펩타이드 증진 제조방법	대한민국	샘표식품 주식회사	2021.12 .14	10-2021- 0178943				50%		

○ 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	√									
2	√			√						
3			√		√					
4	√									

저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

(22쪽 중 8쪽)

표준화

○ 국내표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증여부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

* 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.

* 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

* 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.

* 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)

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	노하우 기술이전	김치 숙성지연 천연소재	(주)폴무원	2021.12	2,200만원	2,200만원

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²))
(22쪽 중 9쪽)

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)			
	소요예산(천원)			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		단위(%)	현재까지	3년 후
	시장 점유율	국내		
국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출			

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1		(주)샘표		1	1
2		(주)풀무원		1	1
합계			0	2	2

□ 고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	
		생산인력	
	개발 후	연구인력	
		생산인력	

비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

(22쪽 중 10쪽)

기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	인턴	2020		1					1				1	

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)
(22쪽 중 11쪽)]

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

- SCI 논문 1편 게재 - 젓갈대체 소재의 특성에 관한 아미노산 관련 자료 기여
- 학술발표 3건
- 인력양성 1명(인턴, 석사) - 과학기술인 양성에 기여

<참고 1> 연구성과 실적 증빙자료 예시

성과유형	첨부자료 예시
연구논문	논문 사본(저자, 초록, 사사표기)을 확인할 수 있는 부분 포함, 연구개발과제별 중복 첨부 불가)
지식재산권	산업재산권 등록증(또는 출원서) 사본(발명인, 발명의 명칭, 연구개발과제 출처 포함)
제품개발(시제품)	제품개발사진 등 시제품 개발 관련 증빙자료
기술이전	기술이전 계약서, 기술실시 계약서, 기술료 입금 내역서 등
사업화 (상품출시, 공정개발)	사업화된 제품사진, 매출액 증빙서류(세금계산서, 납품계약서 등 매출 확인가능 내부 회계자료) 등
품목허가	미국 식품의약국(FDA) / 식품의약품안전처(MFDS) 허가서
임상시험실시	임상시험계획(IND) 승인서

<참고 2> 국가연구개발혁신법 시행령 제33조제4항 및 별표 4에 따른 연구개발성과의 등록·기탁 대상과 범위

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

(22쪽 중 12쪽)

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○비건김치 레시피 4종 개발	○식물성 발효향미 모듈 2종 활용 최적 레시피 개발 ○마늘향 저감 레시피 개발 ○숙성지연 비건김치 레시피 개발 ○상기 레시피 풀무원에 공유하여 제품화 적용 검토 중	○ 100
○식물성 발효향미모듈 3종 개발 및 제품화	○식물성 발효향미 모듈 1-1 : 대두 발효물 개발 ○식물성 발효향미 모듈 1-2 : 완두 발효물 개발 ○식물성 발효향미 모듈 2 : 쌀 발효물 개발 ○상기 개발품에 대해 과제종료 3년이내에 제품화 예정	○ 100
○수출용 비건김치 4종 제품화 및 수출	○수출용 비건김치 2종 개선제품 품목제조신고 완료 ○식물성 발효향미 모듈을 활용한 비건김치 2종과 숙성지연 비건김치 2종 시제품 shipping test 중 ○상기 test 중인 제품은 과제종료 1년 이내 수출 계획	○ 100

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

2) 자체 보완활동

3) 연구개발 과정의 성실성

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 현재 공동연구기업에서 사용중인 젓갈대체소재는 수입품으로 본 과제에서 개발한 식물성 발효향미 모듈을 제품에 적용할 경우 수입원료 대체에 대한 효과가 기대됨
- 코로나 이슈로 수출선적 기간이 30일 이상 연장된 현재 상황에서 수출김치의 골마지 문제, 과숙으로 인한 군덕내 등 품질특성이 나빠지는 수출현장 애로를 해소 가능한 소재 발굴로, 김치 상미기간 연장하여 김치 상품성 향상 효과 기여
- 세계적으로 늘어나는 비건인구와 김치에 관심은 있으나 젓갈의 향과 맛, 알러지 등 건강상의 이유로 김치가 부담스러웠던 새로운 소비층을 확보할 수 있는 레시피로 수출 물량 확대 효과

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 비건김치 레시피 4종 개발 완료하여 공동연구기관에 공유하였음
- 식물성 발효향미모듈 3종을 개발완료 하였으며, 과제 종료 3년 이내에 대량생산조건을 확립하여 제품화할 계획임
- 연구기관 중 성과목표인 2종에 대해 품목제조보고 하였으며, 상품 라벨을 새로 제작하였음
- 개발 상품은 선적 test 등 품질 점검 후 수출 계획에 있음

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	4	
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
사업화	상품출시	2	
	기술이전		
	공정개발		
제품개발	시제품개발		
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1.	1) 자체평가의견서
	2) 연구성과 활용계획서
2.	1)
	2)

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 종질지(80g/m²)]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		120024-02	
사업구분	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명					주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	글로벌 소비 트렌드 변화에 따른 수출용 비건 김치 개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구개발기관	세계김치연구소			연구책임자	박 성 희
연구기간 연구개발비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2020.04.20.~12.31	280,000	186,700	466,700
	2차년도	2021.01.01.~12.31	370,000	246,700	616,700
	3차년도				
	4차년도				
	5차년도				
	계		650,000	433,400	1,083,400
참여기업	공동연구기관: (주) 샘표, (주) 풀무원				
상대국				상대국연구개발기관	

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2022.02.06

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
세계김치연구소	선임연구원	박 성 희

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	박 성 희
-----	-------

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히불량)

- 이미 건강식품으로 세계적으로 인정받고 있는 김치이지만 알려지 발생 우려 소재를 포함하고 있어 비건인 뿐 아니라 건강을 생각하는 세계소비자들의 관심에서 소비로 이끌지 못하는 한계가 있었으나, 김치 최적화된 식물성 발효향미 모듈을 이용한 all worry free 맛있는 비건 김치 개발이라는 생각의 전환으로 과제를 발굴 수행하였기에 창의성이 있다고 판단됨.
- 본 과제에서 대두와 완두콩을 활용하여 젓갈의 감칠맛을 대체할 수 있는 식물성 발효향미 모듈을 개발하여 수출제품에 적용하여 상품화 함으로써 건강의 김치의 맛과 건강상 위험으로 김치를 꺼려오던 새로운 소비층까지 확대 수용할 수 있는 계기를 국내 최초로 마련하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : 우수, **보통**, 미흡, 극히불량)

- 현재 공동연구기업에서 사용 중인 젓갈대체 소재는 수입품으로 본 과제에서 개발한 식물성 발효향미 모듈을 제품에 적용 국산화할 계획임
- 김치 숙성지연 소재활용 김치는 김치 상미기간이 30일 이상 연장 가능하기에 코로나로 인한 수출기간 연장으로 수출 김치의 골마지 문제, 상미기간 연장 이슈를 해소 가능

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히불량)

- 현재 공동연구기업에서 사용중인 젓갈대체소재는 수입품으로 본 과제에서 개발한 식물성 발효향미 모듈을 제품에 적용할 계획임
- 코로나 이슈로 수출선적 기간이 30일 이상 연장된 현재 상황에서 수출김치의 골마지 문제, 과속으로 인한 군덕내 등 품질특성이 나빠지는 것을 해소하기 위해, 상미기간 연장 이슈를 해소하기 위해 shipping test 준비중으로 검증 후 상품 적용 계획임

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : **우수**, 보통, 미흡, 극히불량)

- 연구목표 달성도 100%
- 공동연구기관과 연2회 주기적 자체진도점검회의를 진행하여 연구진행상황 및 공동연구결과 공유하여 개발 제품의 개선점 및 문제점 전달 (2차년도 21년에는 코로나로 화상회의 진행)
- 공동연구기관의 소재를 주관과 제2공동연구기관에서 김치에 적용 검토하여 제품활용 조건 최적화등 함께 협동연구를 수행하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : 우수, **보통**, 미흡, 극히불량)

- 연구목표성과에는 없었으나 SCI논문 1편, 학술발표 4건 등 추가 달성하였음
- all worry free 비건 김치 개발을 위한 식물성 발효향미 모듈 개발 기술을 특허출원 완료하였음

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
비건김치 레시피 4종 개발	30	100	-비건김치 레시피 4종 개발 완료하여 공동 연구기관에 공유하였음 -숙성기간 연장 비건김치에 대해 선적 test 검토 후 상품화 예정임
식물성 발효향미모듈 3종 개발 및 제품화	40	100	-식물성 발효향미모듈 3종을 개발완료하였음 -과제 종료 3년 이내에 대량생산조건을 확립하여 제품화할 계획임
수출용 비건김치 4종 제품화 및 수출	30	100	-연구기관중 성과목표인 2종에 대해 품목 제조보고하였음 -선적 test 중인 제품을 수출 계획에 있음
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 본 과제에서 대두와 완두콩을 활용하여 젓갈의 감칠맛을 대체할 수 있는 식물성 발효향미 모듈을 개발하여 수출제품에 적용하여 상품화 함으로써 건강의 김치의 맛과 건강상 위험으로 김치를 꺼려오던 새로운 소비층까지 확대 수용할 수 있는 계기를 국내 최초로 마련하였기에 연구결과의 창의성이 있다고 평가하며,
- 현재 공동연구기업에서 사용중인 젓갈대체소재는 수입품으로 본 과제에서 개발한 식물성 발효향미 모듈을 제품에 적용할 경우 수입원료 대체에 대한 효과도 기대할 수 있음.
- 계획대었던 연구 내용 뿐 아니라 코로나 이슈로 수출선적 기간이 30일 이상 연장된 현재 상황에서 수출김치의 골마지 문제, 과속으로 인한 군덕내 등 품질특성이 나빠지는 수출현장 애소를 해소하기 위해, 김치의 상미기간 연장을 위해 추가 연구한 결과 현장적용까지 할 수 있는 효과를 확인하고 현장 적용을 검토중임.
- 상기 내용을 포함하여 참여기관 모두 연구 수행을 위해 노력하여 상품화 준비를 완료하여 목표 성과를 달성하였음..

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 코로나 19 이슈로 국외 조사와 대면 조사를 통한 연구가 어려워, 계획했던 시기와 연구방법이 다소 다르게 연구가 수행되었기에 평가시 고려 바람.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 현재 공동연구기업에서 사용중인 젓갈대체소재는 수입품으로 본 과제에서 개발한 식물성 발효향미 모듈을 제품에 적용할 계획으로 상품화가 연계 진행될 수 있도록 해야 함
- 코로나 이슈로 수출선적 기간이 30일 이상 연장된 현재 상황에서 수출김치의 골마지 문제, 과속으로 인한 군덕내 등 품질특성이 나빠지는 사회적 이슈가 발생한 시점에 현장 애로를 해결할 수 있는 연구가 변행된 것은 긍정적이며, 또한 그 결과물을 현장에 적용할 수 있도록 최적화 조건 수립에 대한 후속 지원이 필요할 것임

IV. 보안성 검토

o 연구책임자의 보안성 검토의견, 연구개발기관 자체의 보안성 검토결과를 기재함

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

보고서 내용중 제품개발을 위한 레시피나 미공개된 기술을 이전한 내용 등이 포함되어 있어 일부 삭제, 기호화 되어 있음을 양해 부탁드립니다. 혹시, 수정 요하는 사항이 있다면 보완하겠습니다.

2. 연구개발기관 자체의 검토결과

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제	<input type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	
연구과제명	글로벌 소비 트렌드 변화에 따른 수출용 비건 김치 개발			
주관연구개발기관	세계김치연구소		주관연구책임자	박 성 희
연구개발비	정부지원 연구개발비	기관부담연구개발비	기타	총연구개발비
	650,000,000	433,400,000		1,083,400,000
연구개발기간	2020. 04. 20. - 2021. 12. 31. (21개월)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전	<input type="checkbox"/> 교육 및 지도	<input type="checkbox"/> 정책자료	<input type="checkbox"/> 기타()
	<input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 비건김치 레시피 4종 개발	<ul style="list-style-type: none"> 식물성 발효향미 모듈 2종 활용 최적 레시피 개발 마늘향 저감 레시피 개발 숙성지연 비건김치 레시피 개발 상기 레시피 풀무원에 공유하여 제품화 적용 검토 중
② 식물성 발효향미모듈 3종 개발 및 제품화	<ul style="list-style-type: none"> 식물성 발효향미 모듈 1-1 : 대두 발효물 개발 식물성 발효향미 모듈 1-2 : 완두 발효물 개발 식물성 발효향미 모듈 2 : 쌀 발효물 개발 상기 개발품에 대해 과제종료 3년 이내에 제품화 예정
③ 수출용 비건김치 4종 제품화 및 수출	<ul style="list-style-type: none"> 수출용 비건김치 2종 개선제품 품목제조신고 완료 식물성 발효향미 모듈을 활용한 비건김치 2종과 숙성지연 비건김치 2종 시제품 shipping test 중 상기 test 중인 제품은 과제종료 1년 이내 수출 계획

* 결과에 대한 의견 첨부 가능

3. 연구목표 대비 성과

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표										
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용액) (명)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T 지식재산권	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문	S C I	비 S C I	논 문 평 인 - F			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
단위	건	건	건	건	건	백만원	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건	명	건	건				
가중치	20				20	20	30		10													
최종	4	4			1	22	4	740	8,100	2												

목표																		
당해 년도	목표	3			1	22	2			1								
	실적	3			1	22	2			2			1			3		1
달성률 (%)		100			100	100	100			200			추가			추가		추가

210mm×297mm[(백상지(80g/m²) 또는 중질지(80g/m²)]

[별첨 2]

(22쪽 중 21쪽)

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	식물성 발효향미 모듈: 대두 발효물 개발 및 대량생산 기술
②	식물성 발효향미 모듈: 완두 발효물 개발 및 대량생산 기술
③	숙성지연 천연 첨가제 개발

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해결	정책 자료	기타
①의 기술		√				√	√			
②의 기술		√				√	√			
③의 기술							√	√		

* 각 해당란에 v 표시

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	젓갈대체품으로 상품화 예정임
②의 기술	알러지 프리 젓갈대체품으로 상품화 예정임
③의 기술	공동연구기관에서 shipping test 준비중으로 검증후 상품 적용 계획임

7. 연구종료 후 성과창출 계획

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화				기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구 활용액) (이전연구 활용액)	
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	S M A R T	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출		투 자 유 치	논문				학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I						
단위	건	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	명	건	건			
가중치	20				20	20	30			10										
최종목표	4	4			1	22	4	740	8,100	2										

주 의

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