

| |
|----------------------|
| 발간등록번호 |
| 11-1543000-000200-01 |

묵은지의 속성제조를 위한 미생물학적 공정개발 및 품질기준의 확립

(Establishment of quick process for long-term fermented kimchi in microbial approach and its quality control)

화원농협김치가공공장

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “묵은지의 속성제조를 위한 미생물학적 공정개발 및 품질기준의 확립” 과제(세부 과제 “가스 발생이 없는 묵은지 발효공정의 확립 및 품질표준화를 통한 속성 묵은지의 상품화”, “속성 묵은지 제조를 위한 종균의 분리 및 개발”)의 보고서로 제출합니다.

2013년 8월 일

주관연구기관명 : 화원농협김치가공공장

주관연구책임자 : 김 병 규

세부연구책임자 : 김 병 규

협동연구기관명 : 전남 식품산업연구센터

협동연구책임자 : 신 현 경

요 약 문

I. 제목

묵은지의 속성 제조를 위한 미생물학적 공정개발 및 품질기준의 확립

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

묵은지의 속성 제조를 위한 제조공정을 종균개발, 발효공정 표준화 등의 미생물학적인 접근 방법으로 확립하고 묵은지에 대한 품질적 중요요소와 품질기준을 확립하여 고품질의 속성 묵은지를 제품화.

2. 연구개발의 필요성

최근 우리나라는 경제 성장과 더불어 삶이 여유로워지면서 먹거리에 대한 관심이 증가하고 있다. 건강에 대한 관심이 증가하면서 식품의 유래와 생산방식, 건강식품에 대한 관심도 같이 증가하고 있다. 이와 더불어 전통발효식품에 대한 여러 기능성이 알려지면서 이에 대한 소비도 꾸준히 증가하고 있는 추세다.

김치를 장기적으로 발효시켜 먹는 묵은지는 항암, 항산화 등의 여러 기능성과 이를 이용한 여러 요리가 알려지면서 소비는 꾸준히 증가하고 있다. 하지만 제품의 특성상 1년 이상의 장기 발효를 요하기 때문에 제품 생산에 한계를 야기시킨다. 생산 기간의 단축은 생산자는 생산량을 늘릴 수 있고 소비자는 보다 저렴한 가격에 구매할 수 있어 묵은지의 경쟁력을 높일 수 있다.

묵은지는 발효과정과 유통과정에서 가스 생성으로 기인한 팽창으로 인해 품질이 떨어지는 문제를 안고 있다. 묵은지 발효 시 가스비생성균을 이용하여 발효시킴으로서 발효과정 및 유통과정에서 가스생성으로 인한 품질 저하를 방지할 수 있다. 또한 가스비생성균을 김치에도 적용하여 유통 특히 수출 제품에서 발생하는 가스팽창을 방지함으로써 수출 시 어려움을 해소할 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

묵은지 발효용 속성 유산균을 분리 적용하여 단기간에 묵은지 생산이 가능한 종균 개발과 묵은지 내 가스 발생을 억제시키는 유산균을 이용한 고품질의 묵은지 생산.

2. 연구개발 범위

가. 묵은지 주요 발효균을 이용한 묵은지의 속성 발효용 종균 개발

- (1) 묵은지의 1년 숙성을 통한 microflora의 변화 관찰
- (2) 묵은지 건전숙성과정 중 우수한 관능품질(특히 감칠맛)에 기여하는 우점종 미생물 분리 동정
- (3) 묵은지 발효균의 생리적 특징구명 및 묵은지 발효의 역할 규명
- (4) 묵은지 발효균(가스 비발생 및 관능품질 향상)의 종균 개발
- (5) 묵은지 제조를 위한 상업용 스타터의 개발
- (6) 유산균 접종 묵은지의 속성발효용 종균접종 후의 품질적 변화 관찰

나. 가스 비생성 유산균을 이용한 묵은지의 제조를 통한 제품의 고품질화

- (1) 묵은지 제조용 원·부재료의 미생물학적 품질 표준화를 위한 원·부재료의 처리 기준 및 품질 규격 확립
- (2) 가스 비생성 유산균의 스크리닝 및 개발
- (3) 수출용 묵은지 포장개발을 위한 가스 비생성 유산균의 묵은지 적용실험
- (4) 유산균 접종과 발효기작의 관찰
- (5) 가스 비생성 유산균 발효가 묵은지의 품질에 미치는 영향

다. 묵은지의 주요 품질요소의 탐구 및 품질기준의 확립

- (1) 묵은지의 관능적 품질요소의 기준 확립
- (2) 묵은지의 발효과정중의 향기 분석
- (3) 묵은지의 발효과정중의 일반성분 분석
- (4) 묵은지 발효균 접종 묵은지의 품질 변화 분석
- (5) 가스 비생성 유산균 및 묵은지 발효균의 융합 접종
- (6) 완성된 속성 제조 묵은지의 유통중 관능품질 유지를 위한 조건 및 관리기준의 확립
- (7) 속성 제조 묵은지의 포장 및 유통설계 제품의 완료

IV. 연구개발 결과

1. 가스 발생이 없는 묵은지 발효공정의 확립 및 품질 표준화를 통한 숙성 묵은지의 상품화

묵은지 품질 표준화를 위해 먼저 묵은지 제조에 사용되는 원·부재료에 대한 미생물학적 품질을 분석하였다. 각각의 원·부재료에는 유산균 $10^2 \sim 10^6$, 일반세균 $10^2 \sim 10^6$, 효모 $10 \sim 10^4$, 그람음성균이 $10 \sim 10^5$ 수준으로 분포하였다. 계절별 원·부재료의 분석 결과에서는 온도가 높아지는 하절기에 미생물 수치가 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 묵은지 제조에 사용되는 원·부재료에 전처리를 하여 미생물을 제어한 다음 묵은지 모의 발효 실험을 한 결과 사용 비중이 가장 높은 배추만 전처리한 실험구와 모든 원·부재료에 전처리 한 실험구에서 유의차를 보이지 않았다. 전처리를 하지 않은 대조구와는 미생물 수치에서 유산균 수는 늘고 효모수는 감소하는 차이를 보여 배추에 대한 전처리를 실시하기로 하였다. 배추에 대한 전처리 방법으로는 배추 절임과정에서 절임수의 pH를 초산을 0.03% 첨가하여 낮추는 방법과 절임 배추 새척 후 최종 단계에서 유산균이 현탁된 액에 담근 후 꺼내는 방법, 감귤 농축액이 희석된 물에 최종 단계에서 담근 후 꺼내는 방법이 있었다. 세가지 방법에서 미생물 제어효과가 나타났으나 유산균은 차후 묵은지 양념에 배합되어 배재하였고 감귤 농축액 역시 pH를 낮추어 미생물을 제어하는 것으로 판단되어 배제시켰다. 절임수에 초산을 0.03% 첨가하는 것만으로 90% 이상의 미생물 사멸 효과가 있었다.

묵은지 품질의 표준화를 위해 관능적 품질을 검토하였다. 현재 생산되고 있는 묵은지의 품질을 비교하였을 때 제조 시기별, 그리고 제품 로트별 기호도의 차이를 보였다. 미생물학적 분포면에서도 각 제품간 차이가 나타났으며 이는 1년의 숙성과정 중 미생물의 작용이 달라 최종 제품인 묵은지의 맛이 다른 것으로 판단되었다.

이들 제품 중 1차 숙성 온도가 높고 pH를 4.2까지 떨어뜨린 후 2차 숙성을 진행시킨 제품에서 기호도가 높게 나타났다. 이를 바탕으로 묵은지의 주원료인 배추에 전처리를 실시하고 양념에 유산균을 첨가하여 초기 1차 숙성 기간을 달리하여 모의발효를 진행시킨 제품에 대하여 관능평가를 실시한 결과 대조구보다 절임배추에 전처리를 실시하고 묵은지 양념에 유산균을 첨가한 실험구에서 기호도가 높게 나타났다. 동일 실험구내에서는 1차 숙성시 유산균이 충분히 생육하도록 pH 4.2 수준까지 숙성시킨 후 0℃에서 2차숙성을 진행시킨 제품의 기호도가 높게 나타났다. 1년 숙성 묵은지와 기호도 비교에서도 큰 유의차를 나타내지 않았다.

가스 비발생 발효균의 분리를 위해 브로콜리, 당근, 감귤, 녹차, 일반김치, 묵은지 등에서 유산균을 분리하였다. 분리 유산균 중 배지에서 생육이 우수한 균을 선별한 후 배양하여 묵은지 모의 발효 실험시 양념에 첨가하여 진행시켰다. BRC-01, JH-332 균주 등에서 가스 발생 정도가 현저하게 차이를 보였으며 관능적 기호도에서도 우수하였다. 가스 발생이 적은 모의 발효구의 미생물 분포를 확인한 결과 공통적으로 효모의 개체수가 감소한 것을 확인할 수 있었다.

초기 묵은지 발효시 가스 생성의 주 원인을 파악하기 위해 김치에서 분리한 효모를 인위적으로 배양한 후 묵은지 모의 발효시 양념에 첨가하였다. 효모가 첨가된 실험구에서 가스 발생 정도가 심하게 나타났으며 유산균을 인위적으로 첨가한 실험구에서는 가스 발생 정도가 첨가

한 유산균의 종류에 따라 달랐다. 대조구에 비해 팽창 정도가 높은 것도 있었으나 대부분 낮은 팽창 정도를 나타냈다. 특히 BRC-01 균주와 JH-332 균주를 첨가한 실험구는 가스 팽창이 나타나지 않았다. 미생물 분포를 확인한 결과에서도 효모의 개체수가 상당히 감소하였으며 BRC-01 균주와 JH-332 균주가 첨가된 실험구에서는 효모 개체수의 감소가 확연히 차이가 나타났다.

이는 묵은지의 발효시 가스 생성의 주 원인으로 작용하는 것은 유산균 보다 효모의 생리활동에 의한 것을 확인할 수 있었으며 묵은지 내의 효모를 효율적으로 관리할 수 있으면 가스 팽창을 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.

BRC-01 균주의 경우 효모의 생육을 효과적으로 억제하여 가스 생성을 방지할 수 있을 뿐 아니라 묵은지 숙성 시 묵은지의 pH를 4.0 수준으로 유지시키는 작용이 있어 최종 제품의 신맛을 줄여주는 효과도 있었다.

가스 발생이 없는 숙성 묵은지의 대량 생산을 위하여 먼저 원료의 품질을 균일하게 표준화하였다. 절임 배추의 오염도를 줄이기 위해 절임 공정에서 절임수에 초산을 0.03% 첨가하여 pH를 떨어뜨린 후 15시간 절임처리를 하였다. 묵은지의 조기 숙성과 가스 발생을 억제하기 위해 유산균 BRC-01과 ML17균주를 양념 중량 대비 0.3% 첨가하여 절임배추와 버무린 후 500kg 숙성통에 밀봉하여 숙성을 진행시켰다. 1차 숙성은 10℃에서 15일, 2차 숙성은 0℃에서 75일 진행시켰다. 90일 숙성된 묵은지는 관능검사에서 1년 숙성 묵은지의 기호도와 유사한 결과를 나타냈다.

묵은지의 발효에 관여하는 유산균의 산업적 생산을 위해 배지 조성을 검토한 결과 MY배지(당사 제조)에서 생육이 우수한 것으로 확인되었다.

기존 묵은지 공정에서 늘어난 부분은 배추 절임시 초산을 0.03% 첨가하는 부분과 묵은지 양념 배합 시 유산균을 첨가하는 부분이다. 1차 숙성 온도와 시간, 2차 숙성 온도와 시간을 정하였다.

2. 숙성 목은지 제조를 위한 종균의 분리 및 개발

목은지의 발효 특성을 확인하기 위해 5℃, 10℃에서 1차 숙성을 진행시키고 0℃에서 2차 숙성을 진행시켰다. 염도, 환원당, 색도, 경도, 유리 아미노산, 향기성분 등은 두 실험구 간에 큰 유의차를 보이지 않았다. 산도와 pH는 5℃ 처리구에서 느리게 변화했으나 최종일에는 두 실험구간 유의차는 나타나지 않았다. 유기산 중 lactic acid와 acetic acid는 초기 숙성 온도가 높은 10℃ 실험구에서 초반 증가폭이 크게 나타났다. 유리 아미노산과 유산균 수 증가 폭 역시 비슷하였다. 기호도 위주의 관능평가 결과에서는 10℃에서 1차 숙성 시킨 후 0℃에서 2차 숙성 시킨 실험구에서 높게 나타났다.

시판 목은지에서 발효 균주를 분리하기 위해 경기도, 경상도, 전라도 등에서 22종의 제품을 구입하였다. 각각의 제품은 숙성기간이 6개월에서 3년 6개월까지 다양하였다. 시판 목은지는 pH 3.5~4.2, 산도 1.0 이상, 염도는 0.91~1.7%로 대체로 낮게 나왔으며, 미생물은 숙성기간이 상대적으로 길어 $10^3 \sim 10^5$ 수준으로 낮게 나타났다.

구입 제품 중 관능적으로 기호도가 높은 목은지에서 미생물을 분리하여 유산균 9종, 효모 6종을 분리하여 모의 발효를 진행하였다. 1차 모의 발효 후 유산균 4종, 효모 1종을 선별하였으며 이를 다시 2차 모의 발효를 진행시켜 관능적으로 우수한 ML17균주와 MY7균주를 선별하였다.

종균 첨가 목은지의 발효 특성을 확인하기 위해 분리 유산균 ML17과 MY7균주를 사용하여 발효를 진행시켰다. 1차 발효는 10℃에서 7일 동안 발효시킨 후 90일까지 김치냉장고(-1℃)에서 숙성시켰다. pH와 산도는 90일경 1년 숙성 목은지와 비슷한 수치를 나타냈으며, 첨가한 균주는 우점율 90%를 유지하였다. 관능평가 결과에서는 혼합종균을 처리한 실험구에서는 1년 숙성 목은지보다 기호성이 높게 나타나기도 했다.

종균의 산업적 내구성 및 기능성을 확인하였다. 인체 안전성을 확인하기 위해 용혈성 테스트를 실시한 결과 용혈 반응은 나타나지 않았다. 효소 활성 분석 결과 β -glucosidase와 β -glucuronidase 활성이 없는 것으로 확인되었다. 각 균주에 대하여 pH 내구성과 내염성을 확인한 결과에서도 초기 균수와 거의 차이가 없어 pH 내구성과 내염성이 우수한 것으로 확인되었다. 인공 위액과 인공 담즙하에서 생존 실험을 실시한 결과에서도 80%이상 생존이 확인되었다. 또한 ML17균주는 유해균주 및 식중독 균에 대한 항균 활성을 나타냈다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

본 연구에서는 묵은지의 숙성제조 기술을 확립하여 묵은지의 장기 숙성 기간을 단축시켰다. 숙성 기간의 단축은 묵은지의 숙성을 위한 공간의 축소 및 묵은지 제품의 수요를 만족시킬 수 있을만큼 생산량을 증대시킬 수 있다. 그리고 묵은지에 종균을 사용함으로써 일정한 품질의 묵은지의 생산이 가능해졌다.

그리고 묵은지 내 생육하는 효모의 생장을 억제해 이로 인한 가스 발생을 줄임으로써 숙성 과정과 유통과정에서 가스의 발생에 의한 피해를 줄임으로써 고품질의 묵은지 생산이 가능해졌다. 특히 수출 묵은지와 김치의 경우 선박을 이용한 수출 과정에서 포장이 가스 발생으로 터지는 문제로 수출에 대한 부담이 증가한다. 하지만 가스 비발생 균주를 적용함으로써 고품질의 수출용 김치의 제조가 가능하며 묵은지와 김치 산업의 새로운 세계적 도약의 계기가 될 것이다.

당사에서는 현재 생산되고 있는 묵은지에 대하여 숙성 발효 및 가스 비발생 종균을 적용시켜 일본 수출 김치에 적용시킬 예정이다. 가스 비발생 종균에 대해서는 수출용 김치 제조에 적용시킬 예정이다.

SUMMARY

I. Title

Establishment of quick process for long-term fermented kimchi in microbial approach and its quality control

II. Purpose and Importance of the Research

1. Purpose of the research

The purpose is to establish the micro-biologic approach method in spawn development, fermentation processing standardization for the production processing as well as qualitative elements and quality standard to produce high quality rapidly ripe Mukenji for commercialization.

2. Importance of the Research

As Korea is becoming accustomed to more enriched life style coming from its economic growth, there is a growing interest in what to eat. There is a steady increase in interest on history of food, production method and diet food. Along with the foregoing, there are several functionalities on traditional fermented food and there is a steady increase in consumption thereof.

The Mukenji that is made by fermenting kimchi for a significant time has steady increase of consumption as it is known to have several functionalities in anti-cancer and anti-oxidation as well as several ways of cooking. However, since it requires long-term fermentation of over a year, there is certain limitation in product production. Shortening of the production period enables the producer to extend the production volume and consumers to purchase for more affordable price to increase the competitiveness of the Mukenji.

The Mukenji has the problem of declining quality in the fermentation process and distribution process due to the gas generation from the expansion thereof. When fermenting the Mukenji, it uses the non-gas generated bacteria to ferment that it may prevent the decline in quality from the gas generated from the fermentation process and distribution process. In addition, the non-gas generated bacteria are applied to kimchi to relieve the difficulties in exporting by preventing the gas expansion generated from the distribution and export products.

III. Contents and Scope of Research

1. Contents of Research

Development of spawn possible for production for Mukenji in short period of time by separately applying the aged lactic acid bacteria for Mukenji fermentation and production of high quality Mukenji by using the lactic acid bacteria that controls the gas generation in Mukenji

2. Scope of Research

A. Development of spawn for aged fermentation of Mukenji by using major fermented bacteria of Mukenji

- (1) Observation of change in microflora through one year of maturity of Mukenji
- (2) Dominant microbe separation process that contributes to the outstanding sensory quality (particularly the savory taste) from the sound ripening process of Mukenji
- (3) Clarification of physiological characteristics of the fermented bacteria of Mukenji and clarification of role for the Mukenji fermentation
- (4) Development of spawn for fermented bacteria of Mukenji (non-generation of gas and improvement of sensory substance quality)
- (5) Development of starter for commercialization with the production of Mukenji
- (6) Observation of qualitative change after the spawn inoculation for aged fermentation of lactic acid bacteria inoculation Mukenji

B. High quality of product through production of Mukenji by using non-gas generated lactic acid bacteria

- (1) Establishment of quality dimension and processing criteria of raw and incidental materials for the micro-biologic quality standardization of raw and incidental materials for Mukenji production
- (2) Screening and development of non-gas generated lactic acid bacteria
- (3) Experiment to apply the non-gas generated lactic acid bacteria on Mukenji for developing packing of Mukenji for export
- (4) Observation of lactic acid bacteria inoculation and fermented behavior

(5) Influence of the fermentation of non-gas generated lactic acid bacteria on the quality of Mukenji

C. Search of major quality elements and establishment of the quality standard of Mukenji

(1) Establishment of the standard for sensory quality element of Mukenji

(2) Scent analysis during the fermentation process of Mukenji

(3) General ingredient analysis of Mukenji during the fermentation process

(4) Analysis of quality change of Mukenji with the fermentation bacteria inoculation

(5) Converged inoculation of non-gas generated lactic acid bacteria and Mukenji fermentation bacteria

(6) Establishment of the management standard and requirements to maintain the sensory quality during the distribution of completed ripe production Mukenji

(7) Completion of packing of the ripe production Mukenji and distribution design product

IV. Result of Research

1. Commercialization of Mukenji through the establishment of the fermentation processing of Mukenji without gas generation and quality standardization

For the quality standardization of the Mukenji, the analysis was made on the microbiologic quality on the raw and incidental materials used in the Mukenji production. For respective raw and incidental material, it is distributed 10²-10⁶ of lactic acid bacteria, 10²-10⁶ of general cell, 10¹-10⁴ of enzyme and 10¹-10⁵ of Gram negative bacteria. Under the analysis result of the raw and incidental material for each season, the microbe figure is confirmed to be heightened in summer when the temperature is heightened. As a result of the mock fermentation experiment for the Mukenji after controlling the microbe with the pre-processing on raw and incidental materials used in making Mukenji, it did not shown the noticeable difference between the experiment group with the pre-process and experiment group with the pre-process for all raw and incidental materials in the lettuce with the highest use ratio. The contrast group without the pre-process showed the difference in extending the lactic acid bacteria number and decreasing enzyme number in the microbe figure that the pre-processing on the lettuce is to be implemented. For the pre-processing methods on lettuce, there are a method to add 0.03% of acetic acid for pH of the preserved water in the lettuce seasoning process to lower, a method to wash the salted lettuce and then dip in the liquid with the lactic acid bacteria in the final phase, and method to dip in the water diluted with the tangerine condensed liquid and then take out. For the three methods, the microbe controlling effect was shown, but the lactic acid bacteria was mixed into the Mukenji condiments to be excluded and the tangerine condensed liquid also lowered pH to control the microbe in its exclusion. Adding the 0.03% of acetic acid to the preserved water alone may have 90% or more of microbe eliminating effect.

For the standardization of the Mukenji quality, the sensory quality is reviewed. When the quality of the currently produced Mukenji was compared, it showed the difference of preferential level for each production time and for each product lot. In the micro-biologic distribution aspect, products showed difference and it has different reaction of microbe in the ageing process of one year to have different taste in the final product, the Mukenji.

From these products, the first ageing temperature was high and then pH was dropped to 4.2 and then progressed for the second ageing to show high preference level. On the basis of the foregoing, the pre-processing is implemented on the lettuce that is the main ingredient of the Mukenji as well as adding the lactic acid bacteria to make different first aging period to implement the sensory evaluation on products with mock fermentation, and the preference level was shown to be higher at the experiment group added with the lactic acid bacteria on the Mukenji condiment as implementing the pre-processing on the preserved lettuce than the contrast group. Under the same experiment group, it is aged up

to the pH 4.2 level to sufficiently grow the lactic acid bacteria at the first ageing period and the preference level of the product with the second ageing at 0°C was shown to be high. In the comparison of preference level with the one-year Mukenji, there was no significantly noticeable difference.

For the separation of the non-gas generated fermented bacteria, the lactic acid bacteria was separated from broccoli, carrot, tangerine, green tea, kimchi and Mukenji. From the separated lactic acid bacteria, the bacteria with outstanding growth from the medium were selected to process with the addition to the condiment at the time of mock fermentation experiment for the Mukenji. From BRC-01, JH-332 strain and others, the gas generation was shown for clear difference and it was outstanding in the sensory preference level. As a result of confirming the microbe distribution of the mock fermentation with less gas generation, the number of enzyme was reduced in common.

In order to find out the main cause of gas generation at the time of initial Mukenji fermentation, the enzyme separated from kimchi was artificially cultured and then it is added to the condiment at the time of mock fermentation of the Mukenji. The experiment group added with the enzyme showed severe gas generation and the experiment group added with lactic acid bacteria artificially had different types of lactic acid bacteria added with the different gas generation. Compared to the contrast group, there are some with high expansion but most have shown low expansion level. In particular, the experiment tools that added the BRC-01 strain and JH-332 strain were not shown to have the gas expansion. The number of enzyme was significantly reduced in the result of confirming the microbe distribution and the experiment group added with the BRC-01 strain and JH-332 strain has shown clear difference in the reduction of experiment numbers.

Working as the main cause of gas generation when fermenting the Mukenji was confirmed as the physiological activities of the enzyme rather than the lactic acid bacteria, and if the enzyme in the Mukenji could be effectively managed, gas expansion could be controlled.

For the BRC-01 strain, the growth of enzyme is effectively controlled to prevent the gas generation and when the Mukenji is aged, pH of the Mukenji is maintained for 4.0 range to reduce the sour taste of the final product.

For the mass production of the Mukenji without the gas generation, the quality of the raw ingredient was standardized. In order to reduce the pollution of the preserved lettuce, 0.03% of acetic acid was added to the preserved water in the preserving processing to decrease pH for the preservation for 15 hours. In order to control the initial ageing of the Mukenji and gas generation, it adds 0.3% of lactic acid bacteria BRC-01 and ML17 strain for the condiment weight to process the ageing by sealing into the 500kg container after blending with the preserved lettuce. The first ageing was undertaken for 15 days at 10°C and the second ageing was [regressed for 75 days at 0°C. The Mukenji ripe for 90 days showed the result similar to the preferential level of 1-year Mukenji in the sensory test.

As a result of building up the medium for industrial production of the lactic acid bacteria involving in the Mukenji fermentation, the MY medium (produced by our company) was confirmed to have outstanding growth.

The part extended from the existing Mukenji processing is the part to add the lactic acid bacteria at the time of mixing in the Mukenji condiment and the part to add 0.03% of acetic acid when preserving the lettuce. The first ageing temperature and the second ageing temperature are set forth.

2. Separation and development of spawn for production of rapidly ripe Mukenji

In order to confirm the fermentation of the Mukenji, the first ageing was undertaken at 5°C and 10°C with the second ageing at 0°C. Salinity, restored sugar, pigment, hardness, free amino acid, and aromatic ingredient did not show great noticeable difference between two experiment groups. The acidity and pH changed slowly for 5°C, but there was no noticeable difference in the two experiment groups on the final date. From the organic acids, lactic acid and acetic acid were shown to have great initial increase range in the experiment group with high initial ageing temperature of 10°C. The range of the increase in the number of free amino acid and lactic acid bacteria also had similar range. Under the preference level-oriented sensory evaluation result, the figure was higher in the experiment group that had the first ageing at 10°C, followed by the second ageing at 0°C.

In order to separate the fermented strain from the Mukenji on the market, 22 types of products were purchased from Gyeonggi-do, Gyeongsang-do and Jeolla-do. Respective products have diverse ageing period ranging for 6 months to 3 years and 6 months. The Mukenji on the market had generally low figures of pH for 3.5~4.2, acidity for 1.0 or more, and salinity of 0.91~1.7% and the microbe had relatively long ageing period to show for low level of 10³~10⁵.

From the purchased products, the microbe was separated from the Mukenji with high sensory preference level to separate 9 types of lactic acid bacteria and 6 types of experiment for the mock fermentation. After the first mock fermentation, 4 types of lactic acid bacteria and 1 type of enzyme were selected, and the second mock fermentation was undertaken to select ML17 strain and MY7 strain with outstanding sensory feature.

In order to confirm the fermentation characteristics of the spawn-added Mukenji, the separated lactic acid bacteria of ML17 and MY7 strain were used for the fermentation. The first fermentation was ripe for 90 days in kimchi refrigerator ((-1°C) after fermenting for 7 days at 10°C. pH and acidity showed similar figure for 1-year aged Mukenji around 90 days and the added strain is maintained with 90% of the rate. Under the sensory evaluation result, the experiment group processed with the mixed spawn was shown to have high preference level than the Mukenji with one year of ageing.

It confirmed the industrial durability and functionality of the spawn. In order to confirm the bodily safety, the blood test was implemented without showing the clogging reaction. As a result of enzyme facilitation analysis, β -glucosidase and β -glucuronidase facilitation were shown not to be available. For each strain, under the result of confirming the pH durability and salt tolerance, it has almost no difference with the initial number of bacteria that it has outstanding pH durability and salt tolerance. For the artificial stomach liquid and artificial juice, the survival experiment was implemented with the survival rate of 80% or more. In addition, the ML17 strain showed the anti-lactic acid bacteria facilitation on the harmful strain and food poisoning bacteria.

V. Research Outcome and Outcome Facilitation Plan

Under this study, the ageing production technology of the Mukenji was established to shorten the ageing period of the Mukenji. Shortening of ageing period may increase the production volume to satisfy the demand of the Mukenji product and reduction of space for the ageing of the Mukenji. And, by using the spawn on the Mukenji, it enables to produce consistent quality of Mukenji.

And, by reducing the gas generation by controlling the growth of enzyme in the Mukenji, the gas is reduced and high quality Mukenji is available by reducing the damage from the gas in the ageing process and distribution process. In particular, in the event of the Mukenji and kimchi for exporting, it may have the packing torn out because of the gas in the vessel that the additional care is required in exporting. However, by applying the non-gas generated strain, it is possible to produce high quality kimchi for exporting and it will be the turning point to reach out to the world for the Mukenji and kimchi industry.

The company is planned to apply the ageing fermentation and non-gas generated spawn on the currently produced Mukenji to apply on the kimchi to export to Japan. With respect to the non-gas generated spawn, it is expected to apply to the kimchi processing for exporting.

CONTENTS

| | | |
|-----------|---|-----|
| Chapter 1 | Introduction ----- | 18 |
| Chapter 2 | The Present State of Technical Development ----- | 20 |
| Chapter 3 | Contents and Results of Research ----- | 21 |
| Section 1 | Commercialization of Mukenji through the establishment of the fermentation processing of Mukenji without gas generation and quality standardization ----- | 21 |
| Section 2 | Separation and development of spawn for production of rapidly ripe Mukenji ----- | 55 |
| Chapter 4 | Achievement and Contributions of Research ----- | 118 |
| Chapter 5 | Application Plans for the Results ----- | 121 |
| Chapter 6 | Reference ----- | 123 |

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

묵은지의 전체적인 발효공정을 규명하고 제조공정을 표준화하기 위한 종균개발, 발효공정 표준화 등의 미생물학적인 접근방법으로 확립하고, 묵은지에 대한 품질적 중요요소와 품질기준을 확립하여 고품질의 숙성 묵은지를 제품화하고 가스비발생균을 이용한 발효를 통하여 유통과정 중 특히 수출시에 가스팽창으로 제품의 품질 저하를 방지하는 동시에 제조시기를 단축할 수 있는 신 공정을 개발함.

제 2 절 연구개발의 필요성

김치는 배추를 비롯한 각종 채소를 소금에 절인 후 젓갈 및 고추를 비롯한 다양한 부재료를 혼합하여 발효, 숙성시키는 우리나라 고유의 전통 발효식품이다. 2000년대 들어 김치가 세계에 알려지기 시작하여 최근 한식 세계화에 발맞추어 확산 속도가 증가하는 추세이다. 김치는 세계 5대 건강식품으로 거론될 정도로 세계인의 관심이 증가하고 있다.

국내에서는 핵가족화 등 주거환경의 변화, 가공식품산업의 발달, 여성의 사회 참여 증가 등으로 인해 가정에서 직접 김치를 담아 먹는 비중이 줄어들었다(Lee, 2009). 최근 전통 발효식품의 효능이 알려지기 시작하면서 소비자의 반응이 점차 증가하는 추세이며 이에 따라 생산이 점차 증가하고 있지만 묵은지의 특성상 오랜 발효기간을 필요로 하고 발효기간 중 이상 발효로 인해 묵은지의 맛이 변질되는 경우도 있다. 또한 김치에는 미생물이 생균상태로 잔류하여 유통과정에서 가스를 생성하여 소비자의 기호를 떨어뜨리기도 한다.

묵은지의 수요는 급속히 증가하고 있지만 지금까지 상품김치에 대한 모든 관련규격은 산도 1% 이하의 김치에만 한정되어 있어서 묵은지에 대한 표준 품질기준이나 관련규격이 없는 실정이다. 대부분의 묵은지는 가정에서 생산하던 방식을 현장에 적용시켜 생산함으로써 숙성온도에 대한 기준이나 숙성 기간에 대한 기준은 없는 실정이라 생산하는 묵은지마다 다른 묵은지 맛이 형성되는 이유이기도 하다. 이에 숙성묵은지의 숙성온도와 숙성기간에 대한 기준을 마련함으로써 일정한 품질의 묵은지 생산이 가능하리라 본다.

묵은지의 숙성제조 기술의 확립은 묵은지의 장기숙성 기간을 단축시켜 묵은지 제품의 수요를 만족 시키고, 묵은지의 종균을 접종함으로써 생산시스템의 품질관리를 용이하게 하고 안정적인 수급의 기틀을 마련한다. 또한 묵은지의 수출 등 운송과정에서 발생하는 가스의 발생을 줄임으로서 고품질, 고차기술이 함유된 고품격의 수출용 김치의 제조가 가능하고 묵은지와 김치산업의 신기술을 확보하고 김치산업의 새로운 세계적 도약과 수입이 창출될 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 묵은지 주요 발효균을 이용한 묵은지의 숙성 발효용 종균 개발
 - 가. 묵은지의 1년 숙성을 통한 microflora의 변화 관찰
 - 나. 묵은지 건전숙성과정 중 우수한 관능품질(특히 감칠맛)에 기여하는 우점종 미생물 분리 동정
 - 다. 묵은지 발효균의 생리적 특징구명 및 묵은지 발효의 역할 규명
 - 라. 묵은지 발효균(가스 비발생 및 관능품질 향상)의 종균 개발
 - 마. 묵은지 제조를 위한 상업용 스타터의 개발
 - 바. 유산균 접종 묵은지의 숙성발효용 종균접종 후의 품질적 변화 관찰

2. 가스 비생성 유산균을 이용한 묵은지의 제조를 통한 제품의 고품질화
 - 가. 묵은지 제조용 원·부재료의 미생물학적 품질 표준화를 위한 원·부재료의 처리 기준 및 품질 규격 확립
 - 나. 가스 비생성 유산균의 스크리닝 및 개발
 - 다. 수출용 묵은지 포장개발을 위한 가스 비생성 유산균의 묵은지 적용실험
 - 라. 유산균 접종과 발효기작의 관찰
 - 마. 가스 비생성 유산균 발효가 묵은지의 품질에 미치는 영향

3. 묵은지의 주요 품질요소의 탐구 및 품질기준의 확립
 - 가. 묵은지의 관능적 품질요소의 기준 확립
 - 나. 묵은지의 발효과정중의 향기 분석
 - 다. 묵은지의 발효과정중의 일반성분 분석
 - 라. 묵은지 발효균 접종 묵은지의 품질 변화 분석
 - 마. 가스 비생성 유산균 및 묵은지 발효균의 융합 접종
 - 바. 완성된 숙성 제조 묵은지의 유통중 관능품질 유지를 위한 조건 및 관리기준의 확립
 - 사. 숙성 제조 묵은지의 포장 및 유통설계 제품의 완료

제 2 장 국내외 기술개발 현황

묵은지는 전통적인 방법으로 김장독을 땅에 묻어 6개월에서 2-3년 정도 장기간 숙성한 김치를 말하며, 지역별 더 나아가 가정별로 소금이 사용되는 양과 양념비가 각각 다르며 제조방법 역시 차이를 보이고 있다. 묵은지는 장기간의 발효기간이 소요되고 정확한 발효기작에 대한 과학적 접근이 미흡하여 묵은지에 대한 생산 기술은 가정에서 행해지던 방법을 그대로 옮겨 놓은 방법이 사용되고 있어 체계적이지 못한 실정이다. 김치에 관한 연구는 생김치에서 적숙김치까지의 일반 김치에 관한 것이 대부분이고 묵은지에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

묵은지는 발효 특성상 발효기간이 상당히 길어 발효를 위한 넓은 저장시설이 필요하며 이 시설을 유지하기 위한 설비 투자와 냉동기 운전비용 등으로 생산단가가 상승하게 된다. 또한 묵은지는 저온에서 장기 발효 후 유통과정에서 가스 생성으로 인해 제품의 품질이 저하되기도 한다. 특히 수출과정에서는 가스 발생정도가 심해 수출에 어려움을 겪고 있기도 하다.

묵은지의 발효기간을 단축시킬 수 있고 가스 발생을 억제시킬 수 있는 기술 개발은 저장공간의 축소와 운전비용의 감소로 생산 단가를 줄일 수 있으며, 수출 과정에서 발생하는 가스 발생을 억제하여 수출 시 어려움을 해소시킬 수 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 가스발생이 없는 묵은지 발효공정의 확립 및 품질표준화를 통한 속성 묵은지의 상품화

1. 묵은지 제조용 원·부재료의 미생물학적 품질의 검토

가. 묵은지 제조용 원·부재료의 미생물 분포

묵은지의 제조에 사용되는 원·부재료는 당사에서 사용되는 재료를 사용하였으며 각각 1월, 4월, 7월, 10월에 입고된 재료를 선별하여 사용하였다. 원·부재료의 미생물 분석을 위해 절입수를 비롯하여 배추 등 총 17종 재료에 대하여 김치 제조를 위한 전처리 단계에서 시료를 채취하였다. 시료는 각 균속 별 일반 선택 배지(PCA(Plate count agar, Difco), BCP(bromocresol purple, EIKEN), YM(Difco), Desoxycholate lactose agar(Difco))를 이용하여 각 재료의 즙으로부터 10^2 배부터 10^8 배까지 단계적으로 희석하여 Pouring method로 검사하였다. 균종은 생균수로서 우점종으로 판단되는 100 CFU(colony forming unit) 전후 희석액에서의 생육 콜로니를 직접 검경 및 Negative 염색 검경(600X, 1,500X)과 선택 배지에서 생육 특성(콜로니의 형태, 색, 크기 등) 관찰로 분류하였다.

각 균속 별 일반 선택 배지로 검사한 결과 표 1.에서와 같이 열처리된 찹쌀풀과 볶은 참깨를 제외한 모든 재료에서 다양한 균종이 관찰되었다. 원·부재료 자체에 유산균이 $10^2 \sim 10^6$ 수준의 유산균과 일반세균이 존재하였으며, 효모는 $10 \sim 10^4$ 수준으로 그람음성균은 $10 \sim 10^6$ 수준으로 관찰되었다. 묵은지 제조시 사용되는 원·부원료의 비중은 절입배추 (77.8%), 찹쌀풀(6.6%), 무(5%), 고춧가루(3%), 마늘(1.4%)이 사용되고 나머지 재료에 대해서는 사용량이 1% 미만이다. 원·부원료에 존재하는 미생물에 의해 묵은지의 발효 및 숙성에 영향을 미치는데 이에 대한 미생물학적 품질 관리 방법이 필요한 것으로 판단된다. 특히 묵은지의 주원료로 사용되는 배추는 생배추보다 절입과정을 거친 절입배추에서 미생물 분포가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 절입과정에서 절입수 및 절입기간 중 미생물 증식에 대한 관리가 필요한 것으로 나타났다. 홍갓 등 일부 부원료에서 일반세균과 효모균이 높게 나타났으나 세척 후 바로 사용으로 미생물의 증식을 줄일 수 있으며 사용량이 0.5% 수준으로 적어 제품에 큰 영향은 미치지 않는 것으로 판단되었다.

나. 계절별(시기별) 원·부재료의 미생물 분포

각 시기별로 원·부재료의 미생물 변화를 검사한 결과 표 2.에서와 같이 재료별로 다양한 균종이 관찰되었으며, 특히 하절기 온도가 높아지는 시기에 전체적으로 미생물 수가 증가하는 경향을 보였다. 특히 절입배추에서 하절기 미생물 수의 증가가 높게 나타났는데 절입과정 중 절입수의 온도 상승으로 인해 절입수 내의 미생물 증가로 판단되어 진다. 묵은지의 제조가 하

질기를 피해 12월에서 4월에 집중되어 이루어지고 있는 것도 원·부재료에 존재하는 미생물
 표 1. 목은지 제조용 원 · 부재료 중의 미생물 분포

| 재료 | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 생배추 | 5.0×10^3 | 3.7×10^5 | 1.3×10^4 | 9.2×10^2 |
| 절임배추 | 8.8×10^5 | 8.7×10^5 | 9.0×10^4 | 9.7×10^2 |
| 무 | 9.0×10^2 | 2.4×10^4 | 4.6×10^2 | 2.7×10^2 |
| 고추가루 | 1.0×10^3 | 4.5×10^4 | 4.7×10^4 | 2.0×10^1 |
| 마늘 | 1.3×10^4 | 1.3×10^4 | 3.2×10^3 | 4.6×10^1 |
| 생강 | 2.5×10^2 | 2.7×10^3 | 4.2×10^2 | 0 |
| 홍갓 | 1.3×10^6 | 1.1×10^6 | 6.3×10^5 | 1.2×10^6 |
| 양파 | 2.2×10^3 | 4.5×10^3 | 4.8×10^1 | 0 |
| 대파 | 7.4×10^3 | 5.6×10^4 | 3.3×10^2 | 1.6×10^2 |
| 청각 | 1.3×10^6 | 3.1×10^4 | 3.0×10^3 | 2.7×10^4 |
| 표고 | 1.5×10^3 | 1.2×10^3 | 7.9×10^1 | 0 |
| 다시마 육수 | 1.2×10^3 | 1.6×10^3 | 2.1×10^2 | 0 |
| 참쌀풀 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| 참깨 | 0 | 0 | 6 | 0 |
| 새우젓 | 7.0×10^2 | 3.7×10^3 | 1.9×10^2 | 4.6×10^1 |
| 멸치액젓 | 5.0×10^2 | 3.0×10^2 | 2.1×10^2 | 0 |
| 절임수 | 8.0×10^4 | 2.4×10^4 | 4.5×10^4 | 0 |

에 의한 이상 발효와 관련이 있는 것으로 판단된다. 하지만 목은지의 숙성 제조를 위해서는 계절에 관계없이 언제나 제조가 가능할 수 있어야 한다. 이는 목은지 원·부재료에 대한 품질 관리를 통해 목은지의 이상 발효를 방지할 수 있어야 한다.

표 2. 원·부재료의 시기별 미생물 분포

| 재료 | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) | |
|------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 생배추 | 1월 | 2.4×10^3 | 2.9×10^5 | 3.3×10^3 | 1.4×10^2 |
| | 4월 | 5.0×10^3 | 3.7×10^5 | 1.3×10^4 | 9.2×10^2 |
| | 7월 | 2.2×10^4 | 7.2×10^5 | 2.4×10^4 | 3.6×10^3 |
| | 10월 | 4.1×10^3 | 4.4×10^5 | 2.2×10^4 | 3.2×10^2 |
| 절임배추 | 1월 | 6.8×10^4 | 3.3×10^5 | 1.4×10^4 | 3.8×10^2 |
| | 4월 | 8.8×10^5 | 8.7×10^5 | 9.0×10^4 | 9.7×10^2 |
| | 7월 | 7.1×10^6 | 6.3×10^6 | 9.7×10^4 | 9.9×10^2 |

| | | | | | |
|----------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 10월 | 5.2×10^5 | 4.9×10^5 | 6.9×10^4 | 6.2×10^2 |
| 무 | 1월 | 4.9×10^2 | 1.6×10^4 | 1.8×10^2 | 1.4×10^2 |
| | 4월 | 9.0×10^2 | 2.4×10^4 | 4.6×10^2 | 2.7×10^2 |
| | 7월 | 2.4×10^3 | 6.4×10^4 | 5.1×10^2 | 3.1×10^2 |
| | 10월 | 6.2×10^2 | 2.0×10^4 | 2.2×10^2 | 3.0×10^2 |
| 고추 가루 | 1월 | 5.6×10^2 | 1.4×10^4 | 3.1×10^4 | 1.4×10 |
| | 4월 | 1.0×10^3 | 4.5×10^4 | 4.7×10^4 | 2.0×10 |
| | 7월 | 2.2×10^3 | 5.3×10^4 | 3.3×10^4 | 2.1×10 |
| | 10월 | 1.6×10^3 | 3.3×10^4 | 4.1×10^4 | 1.6×10 |
| 마늘 | 1월 | 6.3×10^3 | 2.8×10^3 | 3.6×10^2 | 3.3×10 |
| | 4월 | 1.3×10^4 | 1.3×10^4 | 3.2×10^3 | 4.6×10 |
| | 7월 | 2.8×10^4 | 2.2×10^4 | 4.2×10^3 | 5.2×10 |
| | 10월 | 9.2×10^3 | 1.1×10^4 | 3.3×10^3 | 1.8×10 |
| 생강 | 1월 | 1.1×10^2 | 1.1×10^3 | 1.4×10^2 | 0 |
| | 4월 | 2.5×10^2 | 2.7×10^3 | 4.2×10^2 | 0 |
| | 7월 | 3.6×10^2 | 3.8×10^3 | 4.6×10^2 | 0 |
| | 10월 | 1.4×10^2 | 7.4×10^2 | 3.4×10^2 | 0 |
| 홍갓 | 1월 | 4.9×10^5 | 8.5×10^5 | 1.4×10^5 | 6.2×10^4 |
| | 4월 | 1.3×10^6 | 1.1×10^6 | 6.3×10^5 | 1.2×10^5 |
| | 7월 | 2.8×10^6 | 6.3×10^6 | 5.2×10^5 | 3.3×10^5 |
| | 10월 | 7.4×10^5 | 2.8×10^6 | 2.6×10^5 | 1.8×10^5 |
| 양파 | 1월 | 2.6×10^3 | 2.8×10^3 | 2.1×10^2 | 0 |
| | 4월 | 2.2×10^3 | 4.5×10^3 | 4.8×10^1 | 0 |
| | 7월 | 4.3×10^3 | 3.6×10^3 | 3.3×10^2 | 0 |
| | 10월 | 1.4×10^3 | 3.3×10^3 | 1.4×10 | 0 |
| 대파 | 1월 | 5.1×10^3 | 1.4×10^4 | 1.1×10^2 | 5.4×10 |
| | 4월 | 7.4×10^3 | 5.6×10^4 | 3.3×10^2 | 1.6×10^2 |
| | 7월 | 7.9×10^3 | 6.2×10^4 | 3.6×10^2 | 2.2×10^2 |
| | 10월 | 6.4×10^3 | 5.1×10^4 | 1.4×10^2 | 6.2×10 |
| 청각 | 1월 | 1.1×10^6 | 3.1×10^4 | 1.8×10^3 | 1.4×10^4 |
| | 4월 | 1.3×10^6 | 3.1×10^4 | 3.0×10^3 | 2.7×10^4 |
| | 7월 | 1.6×10^6 | 4.5×10^4 | 6.2×10^3 | 4.1×10^4 |
| | 10월 | 1.3×10^6 | 2.8×10^4 | 2.1×10^3 | 1.8×10^4 |
| 표고 | 1월 | 4.1×10^2 | 4.5×10^2 | 3.2×10 | 0 |
| | 4월 | 1.5×10^3 | 1.2×10^3 | 7.9×10 | 0 |
| | 7월 | 3.3×10^3 | 2.2×10^3 | 8.3×10 | 0 |
| | 10월 | 5.9×10^2 | 1.4×10^3 | 3.3×10 | 0 |
| 절임수 | 1월 | 6.2×10^4 | 1.4×10^4 | 1.1×10^4 | 3.3×10^2 |
| | 4월 | 8.0×10^4 | 2.4×10^4 | 4.5×10^4 | 8.7×10^2 |
| | 7월 | 6.5×10^5 | 3.2×10^4 | 2.2×10^4 | 9.4×10^2 |
| | 10월 | 4.1×10^4 | 1.3×10^4 | 1.6×10^4 | 6.2×10^2 |

LB: Lactic acid bacteria, GB: General bacteria, YM: Yeast & mold, CB: Colifoam Bacteria

다. 묵은지 제조용 원·부재료의 부패성 미생물 조절

묵은지에 사용되는 원·부재료 대부분에 미생물이 존재하고 있으며 계절에 따라 미생물의 수가 유동적이어서 일정하게 미생물을 조절할 수 있는 방법이 필요하다. 열처리 등에 의한 방법을 적용시키기에는 원·부재료의 특성상 제품에 영향을 미치기 때문에 적용이 어렵다. 세척이 가능한 원·부재료의 경우 세척 공정에서 세척수의 pH를 낮추어 미생물을 조절할 수 있는데, 유기산 중 초산을 0.03% 첨가하여 살균 효과를 높였다. 배추를 제외한 원·부재료에 대해서는 1차, 2차 세척 후 최종 세척조에 초산을 0.03% 첨가하여 30분간 처리하였으며, 배추는 절임과정에서 절임수에 초산을 0.03% 첨가하여 15시간동안 처리하였다. 각각의 시료에 대하여 0.03% 초산을 처리한 후 처리하기 전과 후의 미생물 변화를 관찰하였다. 미생물 실험은 균속별 일반선택 배지를 사용하여 각 재료의 즙으로부터 희석하여 측정하였다.

표 3에서와 같이 세척이 가능한 모든 원·부재료에서 0.03% 초산을 처리시 미생물 살균 효과가 나타났다. 일반세균의 경우 90% 수준의 살균효과를 보였으며, 효모의 경우는 80% 수준의 살균 효과를 보였다. Colifoam bacteria의 경우는 0.03% 초산 처리 결과 검출되지 않았다. 즉 원·부재료의 절임수나 세척수에 0.03% 초산을 첨가하여 pH를 조절하여 처리하는 것으로도 미생물의 증식 억제 및 살균에 효과가 있었다.

표 3. pH 조절에 따른 미생물의 변화

| 재료 | | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|-------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 절임 배추 | 처리전 | 3.8×10^4 | 2.6×10^5 | 3.6×10^3 | 2.4×10^2 |
| | 처리후 | 2.1×10^3 | 8.4×10^3 | 6.4×10^2 | 0 |
| 무 | 처리전 | 3.3×10^2 | 2.6×10^4 | 2.8×10^2 | 1.7×10^2 |
| | 처리후 | 9.8×10 | 1.8×10^3 | 4.6×10 | 0 |
| 마늘 | 처리전 | 5.6×10^3 | 4.2×10^3 | 2.7×10^2 | 2.1×10 |
| | 처리후 | 2.8×10^3 | 2.3×10^2 | 4.3×10 | 0 |
| 생강 | 처리전 | 2.7×10^2 | 1.6×10^3 | 1.4×10^2 | 0 |
| | 처리후 | 1.6×10^2 | 2.1×10^2 | 4.1×10 | 0 |
| 홍갓 | 처리전 | 2.8×10^5 | 4.6×10^5 | 3.4×10^5 | 3.7×10^4 |
| | 처리후 | 1.6×10^5 | 3.2×10^4 | 7.2×10^4 | 0 |
| 양파 | 처리전 | 2.8×10^3 | 3.7×10^3 | 2.2×10^2 | 0 |
| | 처리후 | 2.2×10^3 | 2.6×10^2 | 4.8×10 | 0 |
| 대파 | 처리전 | 5.1×10^3 | 2.4×10^4 | 1.4×10^2 | 2.6×10 |
| | 처리후 | 2.8×10^3 | 1.4×10^3 | 4.1×10 | 0 |
| 청각 | 처리전 | 1.1×10^6 | 4.2×10^4 | 2.7×10^3 | 7.8×10^3 |
| | 처리후 | 9.1×10^5 | 4.8×10^3 | 5.2×10^2 | 0 |
| 표고 | 처리전 | 4.1×10^2 | 3.6×10^2 | 3.3×10 | 0 |
| | 처리후 | 3.4×10^2 | 4.2×10 | 1.4×10 | 0 |

LB: Lactic acid bacteria, GB: General bacteria, YM: Yeast & mold, CB: Colifoam Bacteria

고춧가루와 같은 건조된 부원료의 경우는 세척이 용이하지 않다. 세척과정에서 고춧가루의 색소가 빠져나가고 매운맛이 감소하는 문제점이 있어 사용이 어려워지므로 pH 조절에 의한 방법을 이용하기에 용이하지 않아 에탄올을 고춧가루 중량 대비 30%를 첨가하여 교반 후 건조하여 사용하였다. 알코올 처리로 색소의 유출과 색상의 변화, 고춧가루의 매운맛의 변화는 없었다. 알코올 처리로 인한 미생물 감소 효과를 표 4과 같이 확인 할 수 있었다. 일반세균과 효모균에 대해서는 99% 이상의 살균 효과를 보였으며, colifoam bacteria는 검출되지 않았다.

표 4. 알콜 처리에 따른 고춧가루의 미생물 변화

| 재료 | | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|----------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| 고춧 가루 | 처리전 | 2.4×10^3 | 4.7×10^4 | 3.6×10^4 | 2.7×10 |
| | 처리후 | 4.3×10 | 2.3×10^2 | 8.6×10 | 0 |

LB: Lactic acid bacteria, GB: General bacteria, YM: Yeast & mold, CB: Colifoam Bacteria

라. 묵은지의 원료별 미생물 분포도가 묵은지 발효에 미치는 영향

묵은지의 제조에 사용되는 원부재료에는 많은 미생물이 포함되어 있다. 이들 미생물이 묵은지의 발효 과정과 숙성과정에서 영향을 끼치고 있다. 이들 원부재료에 대하여 전처리를 통해 미생물을 제어한 후 발효과정에서 산도, 당도, 유산균 수를 측정하여 원부재료에 남아있는 미생물이 발효에 미치는 영향을 확인하였다. 총산은 AOAC법에 따라 김치여액 10ml을 0.1N NaOH로 pH 8.3이 될 때까지 적정한 다음 소비된 NaOH의 부피를 젖산량으로 환산하여 계산하였고, 당도는 ATAGO사의 PR-32a를 이용하여 측정하였다.

표 5를 보면 원·부재료의 전처리에 의해 초기 유산균수는 대조구에서 각 실험구보다 높게 나타났다. 발효 6일차가 되면서 유산균의 증식이 실험군 1,2,3에서 빠르게 진행됨을 확인할 수 있었으며, 이는 초기 묵은지에서 유산균의 생육에 지장을 주는 다른 미생물의 수가 적어 상대적으로 유산균이 빠르게 증식된 것으로 판단된다. 묵은지에서 신맛에 영향이 미치는 산도의 경우는 대조구에서 높게 측정되어 유산균의 수와 반대 결과를 나타냈다.

실험군들 간에는 유산균수, 산도, 당도에서 큰 유의차를 보이지 않았다. 이는 묵은지의 배합비 상 절임배추의 비중이 75% 이상이고 절임배추에서 유래하는 미생물이 대부분을 차지하고 있으며, 다른 부재료의 비중이 상대적으로 적어 이로 인해 유래하는 미생물이 적음으로 인한 것으로 판단된다.

표 5. 원료별 처리에 따른 묵은지의 품질 변화

| | | 제조 직후 | 발효 6일차 | 발효 1개월 | 발효2개월 | 발효3개월 |
|-------|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| 대조구 | 산도 | 0.21% | 0.98% | 1.08% | 1.14% | 1.08% |
| | 당도(brix) | 13.1 | 12.7 | 11.9 | 11.1 | 10.4 |
| | 유산균(CFU/ml) | 6.2x10 ⁵ | 3.8x10 ⁸ | 3.4x10 ⁸ | 1.4x10 ⁸ | 6.5x10 ⁷ |
| 실험군 1 | 산도 | 0.27% | 0.97% | 1.10% | 1.04% | 0.99% |
| | 당도(brix) | 12.7 | 13.0 | 12.1 | 11.4 | 10.3 |
| | 유산균(CFU/ml) | 3.4x10 ⁵ | 7.4x10 ⁸ | 6.8x10 ⁸ | 4.6x10 ⁸ | 3.8x10 ⁸ |
| 실험군 2 | 산도 | 0.28% | 0.92% | 1.08% | 1.06% | 1.01% |
| | 당도(brix) | 12.9 | 12.9 | 11.8 | 11.2 | 10.4 |
| | 유산균(CFU/ml) | 3.7x10 ⁵ | 6.8x10 ⁸ | 6.7x10 ⁸ | 4.8x10 ⁸ | 3.4x10 ⁸ |
| 실험군 3 | 산도 | 0.28% | 0.94% | 1.09% | 1.06% | 1.04% |
| | 당도(brix) | 13.0 | 12.9 | 11.9 | 11.0 | 10.3 |
| | 유산균(CFU/ml) | 3.4x10 ⁵ | 7.1x10 ⁸ | 7.0x10 ⁸ | 5.8x10 ⁸ | 4.3x10 ⁸ |

* 대조군 : 무처리, 실험군1 : 절임배추 초산 처리,
 실험군2 : 절임배추, 무, 고춧가루 초산 처리, 실험군3 : 모든 재료 초산 처리

마. 절임 배추의 처리 방법

묵은지의 원·부재료 중 대부분을 차지하는 배추에 대한 전처리 방법의 확립으로 묵은지의 품질 표준화를 확립할 수 있다. 절임 배추에 대한 전처리 방법으로 앞에서 언급한 초산처리 방법 외에 유산균 처리, 감귤 농축액 처리, 호화 전분 용액 처리하는 방법을 적용하여 표 6의 조건으로 실험실에서 진행시켰다.

표 6. 절임배추 실험구별 처리 방법

| 구분 | 대조군 | 실험군1 | 실험군2 | 실험군3 | 실험군4 |
|------|-------|-------|--------|----------|---------|
| 처리방법 | 기존 공정 | 초산 처리 | 유산균 처리 | 감귤농축액 처리 | 호화전분 처리 |

초산 처리 공정은 배추 절임시 절임수에 초산을 처리한 후 배추를 절인 후 세척하여 실험에 사용하였으며, 실험군 2, 3, 4는 기존 절임 공정과 같이 배추를 절인 후 유산균, 감귤농축액, 호화전분을 각각 0.1% 첨가한 세척수로 세척한 후 사용하였다.

표 7. 절임배추 각 실험구별 미생물 분포 (절임처리 후 7일 보관 후, 12℃)

| 재료 | LB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) |
|------|-------------------|-------------------|
| 대조군 | 7.2×10^7 | 2.2×10^5 |
| 실험군1 | 8.4×10^7 | 3.2×10^4 |
| 실험군2 | 4.0×10^8 | 6.4×10^3 |
| 실험군3 | 1.3×10^8 | 1.4×10^4 |
| 실험군4 | 1.1×10^8 | 9.0×10^5 |

그림 1 과 그림 2에서 보는 바와 같이 기존 절임배추 처리와 달리 초산, 유산균, 감귤 농축액 처리를 통해 유산균의 증식효과와 효모의 억제 효과를 확인할 수 있었다. 호화 전분은 유산균수 증가에는 효과가 있었으나, 효모 억제에는 효과가 없고 오히려 증식을 촉진시키는 것으로 확인되었다. (표 7)

저장 중 갈변 등의 색상 변화면에서도 대조구에 비해 실험구에서 갈변 억제 효과가 있었으며, 특히 유산균과 감귤 농축액 처리에서 높게 나타났다. (그림 3)

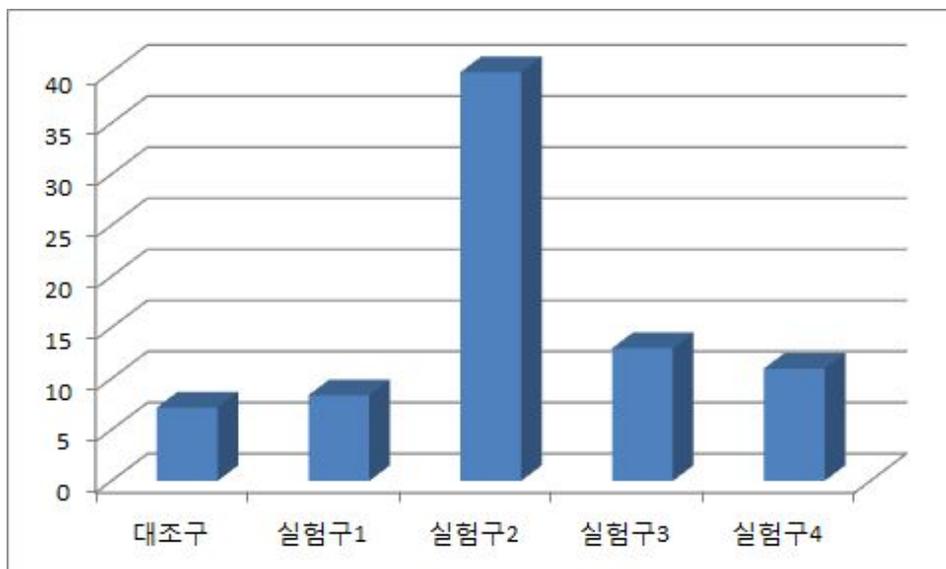


그림 1. 실험구별 유산균수 (× 10⁷)

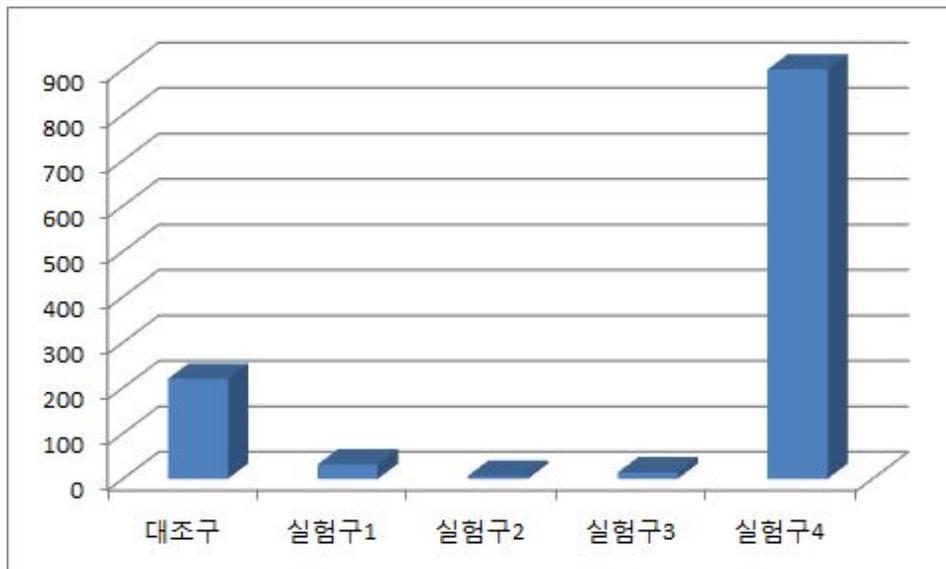


그림 2. 실험구별 효모수 ($\times 10^3$)



대조구



실험구 1



실험구 2



실험구 3



실험구 4

그림 3. 각 처리구별 절임배추

바. 원·부재료의 전처리가 발효에 미치는 영향의 검토 (실험실)

묵은지 원·부재료 중 배추는 다른 부재료와는 달리 15시간 이상의 절임 과정에서 미생물이 증식하여 묵은지의 발효에 영향을 끼칠 수 있다. 배추 절임과정에서 미생물의 증식으로 인한 오염을 줄이는 방법으로 절임수의 pH를 초산을 이용하여 낮춘 후 절임과정을 실시하였다.

절임수에 0.03% 초산을 첨가한 실험구와 초산을 처리하지 않은 대조구로 나누어 24시간 절임처리 한 후 1회 세척 후 실험에 사용하였으며 미생물 분석 결과는 표 8, 표 9와 같다.

표 8. 절임배추에서 미생물 성장

| | LB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | GB (CFU/ml) |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 무처리구 | 1.8×10^5 | 1.9×10^4 | 4.5×10^4 |
| 초산처리구 | 9.0×10^3 | 7.0×10^3 | 5.0×10^3 |

* 초산 처리 농도 : 절임수 양의 0.03%

표 9. 절임수에서 미생물 성장

| | BCP | YM | PCA |
|-------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 무처리구 | 8.0×10^4 | 4.5×10^4 | 2.4×10^4 |
| 초산처리구 | 1.0×10^3 | 5.4×10^3 | 1.0×10^3 |

* 초산 처리 농도 : 절임수 양의 0.03%

절임배추와 절임수에서 초산을 처리하여 pH를 낮춘 실험구에서 초산을 처리하지 않은 실험구보다 미생물의 수가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있다. 이는 초산처리로 인해 pH가 낮은 환경에서 미생물의 생육이 억제된 것으로 생각할 수 있다.

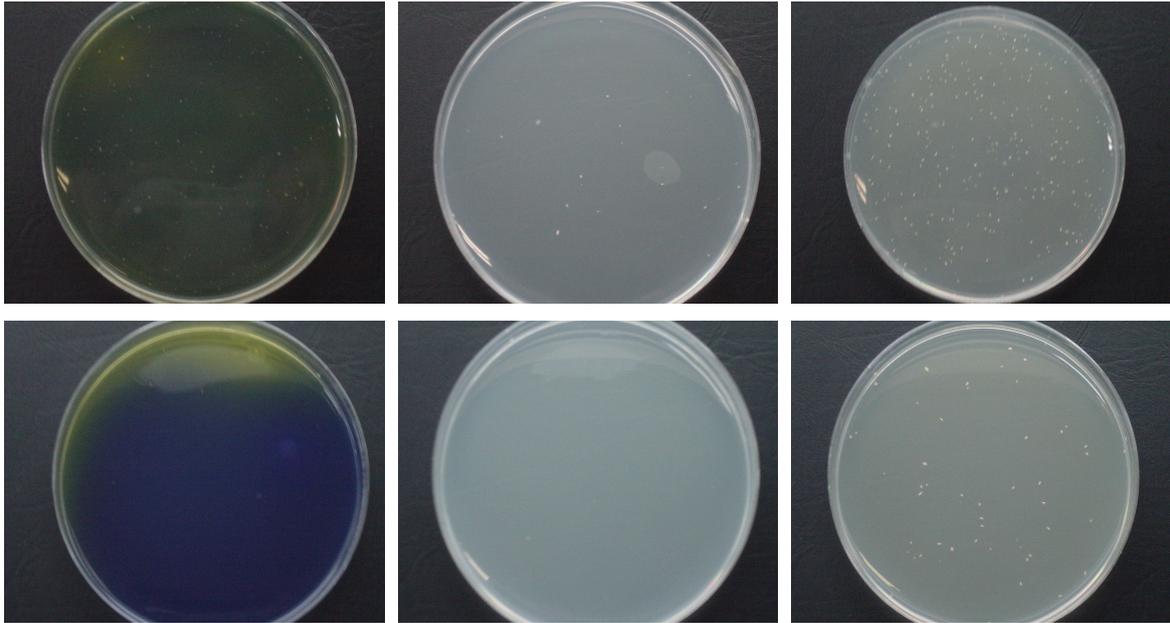


그림 4. pH 조절에 따른 절임수 미생물(상 : 초산 무처리, 하 : 초산 처리, BCP 10^2 , PCA 10^3 , YM 10^2)

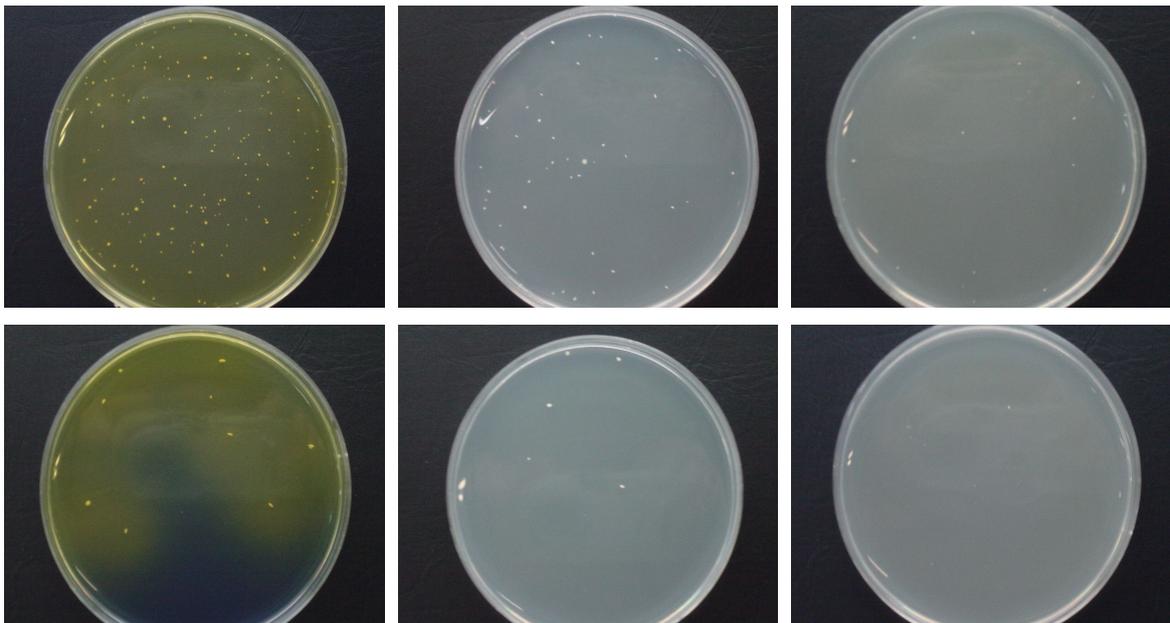


그림 5. pH 조절에 따른 절임배추 미생물(상 : 초산 무처리, 하 : 초산 처리, BCP 10^3 , PCA 10^3 , YM 10^3)

사. 원·부재료의 전처리가 발효에 미치는 영향의 검토 (공장 규모)

공장 작업 환경에서 묵은지 발효를 위하여 동일한 기존의 제조공정에서 배추 절임 시 미생물 증식억제에 효과가 있는 초산을 처리하는 방법과 식물체에서 분리한 유산균을 인위적으로 배합된 양념에 첨가하는 방법(Fig 6.)으로 묵은지 발효에 미치는 영향을 조사하였다.

표 10의 실험 결과에서 보는 바와 같이 제조 직후에는 pH, 당도, 산도에서 각 처리구별 유의차는 나타나지 않았으나, 1차 발효 후 유산균을 첨가한 실험구 1과 실험구 3에서 pH가 떨어지

고, 산도가 높아지는 경향이 나타났다. 이는 인위적으로 첨가한 유산균에 의해 초기 발효가 빠르게 진행된 것으로 판단되며, 2차 발효 후에는 대조구를 제외한 처리구에서 pH가 조금씩 증가하는 경향이 나타났다. 이는 1차 발효 후 젖산균의 생육이 떨어진 데 기인한 것으로 판단된다.

표 10. 실험구별 목은지의 품질 변화

| | | 제조 직후 | 1차발효 | 2차발효 |
|------|----|-------|-------|-------|
| 대조구 | pH | 5.7 | 4.09 | 4.06 |
| | 산도 | 0.34% | 1.04% | 0.98% |
| | 당도 | 14.1 | 13.9 | 13.4 |
| 실험구1 | pH | 5.65 | 3.8 | 4.11 |
| | 산도 | 0.27% | 1.15% | 0.93% |
| | 당도 | 11.4 | 12.8 | 13.0 |
| 실험구2 | pH | 5.68 | 4.01 | 4.02 |
| | 산도 | 0.28% | 1.07% | 1.01% |
| | 당도 | 12.5 | 11.9 | 12.7 |
| 실험구3 | pH | 5.64 | 3.78 | 4.02 |
| | 산도 | 0.33% | 1.18% | 1.04% |
| | 당도 | 13.1 | 12.3 | 13.1 |

* 대조구 : 초산 무처리, 유산균 무첨가, 실험구 1 : 초산 무처리, 유산균 첨가,
 실험구 2 : 초산 처리, 유산균 무첨가, 실험구 3 : 초산 처리, 유산균 첨가,
 * 1차 발효 상온(10℃)에서 6일 발효, 2차 발효 : 1차 발효 후 0℃에서 2개월 발효

각 처리구별 미생물의 변화는 표 11의 결과와 같이 나타났으며, 초기 유산균을 인위적으로 첨가한 실험구에서 유산균수가 높게 나타났으며, 다른 일반세균과 효모, 그람음성균에서는 유의차가 없었다. 1차 발효 후 그람음성균은 유산균의 증식에 의해 사멸한 것으로 판단되며, 유산균의 수는 유산균 처리구가 높게 나타났다. 효모의 수는 유산균을 첨가한 실험구에서 적게 나타났으며, 초산을 처리한 실험구에서는 대조구보다 다소 높게 나타났다. 하지만 발효 2개월째에는 초산처리와 유산균 첨가를 병행한 실험구에서 효모의 개체수가 가장 낮게 나타났다.

표 11. 실험구별 묵은지의 미생물 변화

| | | 제조직후 | 1차 발효 | 2차발효 |
|------|-------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| 대조구 | LB (CFU/ml) | 7.0×10^5 | 6.6×10^8 | 1.6×10^8 |
| | GB (CFU/ml) | 9.0×10^5 | 7.0×10^8 | 2.6×10^8 |
| | YM (CFU/ml) | 7.0×10^5 | 3.2×10^3 | 2.4×10^5 |
| | CB (CFU/ml) | 1.2×10^5 | 0 | 0 |
| 실험구1 | LB (CFU/ml) | 2.0×10^6 | 1.0×10^9 | 1.7×10^8 |
| | GB (CFU/ml) | $10. \times 10^6$ | 1.0×10^9 | 1.2×10^8 |
| | YM (CFU/ml) | 1.2×10^6 | 4.0×10^2 | 3.5×10^4 |
| | CB (CFU/ml) | 5.0×10^4 | 0 | 0 |
| 실험구2 | LB (CFU/ml) | 3.0×10^5 | 3.63×10^8 | 2.3×10^8 |
| | GB (CFU/ml) | 1.1×10^6 | 3.0×10^8 | 2.9×10^8 |
| | YM (CFU/ml) | 9.7×10^5 | 1.2×10^5 | 5.9×10^5 |
| | CB (CFU/ml) | 4.6×10^4 | 0 | 0 |
| 실험구3 | LB (CFU/ml) | 3.0×10^6 | 8.5×10^8 | 1.5×10^8 |
| | GB (CFU/ml) | 1.8×10^6 | 8.5×10^8 | 1.4×10^8 |
| | YM (CFU/ml) | 1.5×10^6 | 9.0×10^2 | 1.0×10^3 |
| | CB (CFU/ml) | 5.0×10^4 | 0 | 0 |

* 대조구 : 초산 무처리, 유산균 무첨가,
 실험구 2 : 초산 처리, 유산균 무첨가,
 * 1차 발효 상온(10℃)에서 6일 발효,

실험구 1 : 초산 무처리, 유산균 첨가,
 실험구 3 : 초산 처리, 유산균 첨가,
 2차 발효 : 1차 발효 후 0℃에서 2개월 발효



유산균 계량

유산균 양념 혼합

양념 버무리기

포장

그림 6. 실험구별 묵은지 제조과정

2. 묵은지 품질의 표준화를 위한 관능적 품질의 검토

가. 기존 묵은지(시판 상품)의 잔존 미생물 검사

시판 중인 1년 이상 숙성시킨 묵은지에 대하여 미생물 종류별 선택 배지를 이용하여 묵은지의 줍으로부터 10²배부터 10⁸배까지 단계적으로 희석하여 Pouring method로 검사하였다.

균종은 생균수로서 우점종으로 판단되는 100 CFU(colony forming unit) 전후 희석액에서의 생육 콜로니를 직접 검경 및 Negative 염색 검경(600X, 1,500X)과 선택 배지에서의 생육 특성(콜로니의 형태, 색, 크기 등) 관찰로 분류하였다.

표 12. 묵은지(시판 상품)의 미생물 분포

| 구분 | | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|--------------|-------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------------|-------------|
| 시판 묵은지 상품 | 생균수(CFU/ml) | 7.6×10 ⁷ | 7.9×10 ⁷ | 3.2×10 ³ | 0 |
| | 균 속(우점종) | Bacillus 1종 Coccus 1종 | 3종 이상 | 1종 (<i>Saccharomyces</i> sp.) | - |

LB: Lactic acid bacteria, GB: General bacteria, YM: Yeast & mold, CB: Colifoam Bacteria

시판 묵은지 상품은 1년 이상 냉장 숙성시킨 제품이나, 제품 로트 별 균의 분포가 유의적인 차이를 보이고 있으며, 유통 중 가스 발생의 정도, 온도에 따른 풍미의 변화, 높은 온도에서의 산막 효모 증식으로 인한 김치 조직의 연화, 기호성 저하 등의 문제점이 파악되고 있다.

나. 묵은지 제조시기별 물리·화학적 관능 품질의 비교 검사

당사에서 제조·숙성된 묵은지 중 1월, 2월, 3월에 생산한 제품 3가지를 선별하여 물리·화학적 관능 품질의 비교 검사를 실시하였다.

표 13. 제조 시기별 묵은지 기초 품질의 변화

| 구분 | 초기숙성온도 (°C) | 초기숙성시간 (day) | 당도(Brix) | 산도(%) | pH |
|--------|-------------|--------------|----------|-------|------|
| 1월생산제품 | 5.2 | 10 | 13.4 | 1.04 | 4.15 |
| 2월생산제품 | 6.3 | 10 | 12.6 | 1.08 | 4.17 |
| 3월생산제품 | 11.2 | 6 | 14.1 | 1.12 | 4.25 |

시기별 제품 생산시 초기 숙성 온도에 차이가 있었으며, 3월은 기온이 상승하는 시기여서 초기 숙성 온도가 높았으며, 1월, 2월 생산제품에 비해 숙성 시간이 짧았다. 당도와 산도에 있어

서 유의차를 보이지는 않았지만 3월 생산제품에서 산도에 비해 pH가 높게 나타났으며, 당도에서도 높게 나타났다. 이는 신맛이 줄고 감미가 늘어나 1월, 2월 생산 제품보다 높은 선호도를 보이는 원인으로 파악된다. 그림. 7에서 보는 바와 같이 당사 직원 22명을 대상으로 기호도 평가에 대한 blind test 결과 3월 생산 제품이 13명으로 가장 높은 선호도를 보였다.

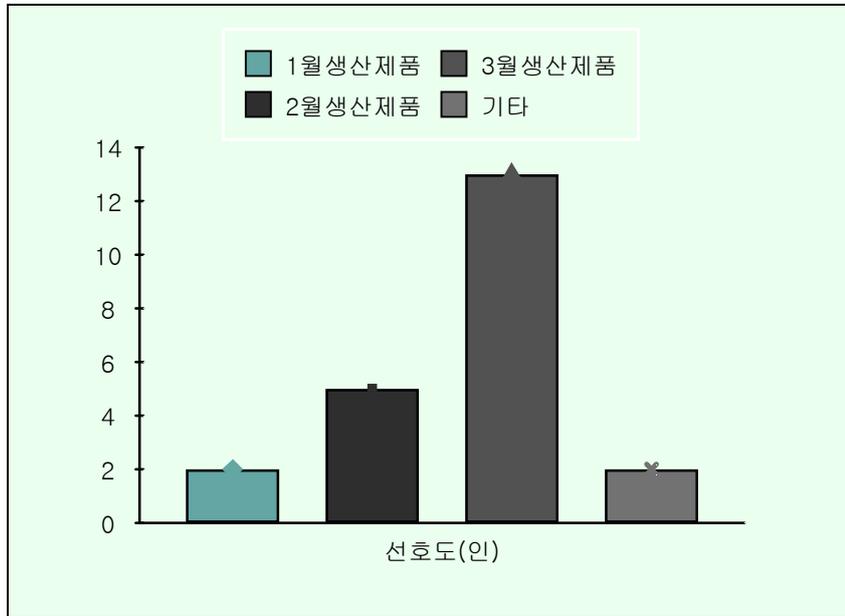


그림 7. 제조 시기별 묵은지의 blind test

선호도가 가장 높은 묵은지 제품과의 미생물 성장에 대한 비교 결과는 표 14.에서 보는 바와 같이 큰 유의차를 보이지 않았으나 효모 곰팡이 선택 배지상에서 3월 생산 제품이 1월 생산 제품에 비하여 50% 이상 적게 나타난 것으로 봐서 효모의 경우 묵은지 제품의 품질에 좋은 영향을 주지는 않는 것으로 판단되었다. 초기 숙성 기간에서 온도가 높을수록 유산균의 증식이 빠르게 이루어져 다른 균의 증식을 억제시키고 이는 2차 숙성과정에서 관능적으로 우수한 묵은지가 만들어지는 것으로 판단된다.

표 14. 시판 묵은지 제품의 제조 시기별 묵은지의 미생물 성장

| 제조시기 | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|
| 1월 | 2.2×10^8 | 2.1×10^8 | 5.8×10^4 | 0 |
| 2월 | 1.9×10^8 | 2.1×10^8 | 3.2×10^4 | 0 |
| 3월 | 2.4×10^8 | 2.0×10^8 | 2.7×10^4 | 0 |

표 15. 관능평가 질의서

| 평가일자 | 20 | 평가자 | | | | |
|---------|------------|------|----|----|----|------|
| 시료번호 | | 아주나쁨 | 나쁨 | 보통 | 좋음 | 아주좋음 |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 외관 | 색깔 | | | | | |
| | 윤기 | | | | | |
| 향미 | 균내 | | | | | |
| 맛 | 감칠맛 | | | | | |
| | 신맛 | | | | | |
| | 묵은지 고유의 맛 | | | | | |
| | 청량미 | | | | | |
| 질감 | 아삭함 정도 | | | | | |
| 전체적 기호도 | | | | | | |

다. 전처리 묵은지의 관능 품질 비교

사용된 실험구는 기존 공장에서 생산되는 방식의 제품과 유산균을 인위적으로 첨가한 제품, 절임배추 처리시 pH를 조절하여 전처리한 제품을 사용하였으며, 각각의 제품은 상온에서 1차 숙성 시간을 4회에 나누어 실시한 후 0℃에서 2차 숙성을 3개월간 실시한 후 관능 평가를 실시하였다.

관능평가는 16개의 sample에 대하여 이루어졌으며 이중 2개의 기호도가 높은 제품을 선정해 2차 관능 평가를 하였다. 1차 관능평가 결과는 표 16과 같다

1차 관능평가 결과 대조구의 경우 숙성도가 많이 떨어진다는 평이 많았으며, 유산균 첨가구와 절임 배추 처리 후 유산균 첨가구에서 전체적 기호도가 높게 나타났다. 1차 관능평가에서 전체적 기호도가 높게 나타난 절임배추 처리 후 유산균 첨가구 중 A와 D구를 2차 관능평가를 실시하였다. 이 때 화원농협 김치가공공장에서 생산되어 출하되고 있는 제품도 첨가하여 실시하였다.

표 16. 1차 관능평가 결과

| 재료 | | 외관 | | 향미 | 맛 | | | 질감 | 전체적 기호도 | |
|---------------------------|---|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|----------|
| | | 색깔 | 윤기 | (군내) | 감칠맛 | 신맛 | 고유맛 | | | 청량감 |
| 대조구 | A | 3.24±1.2 | 3.44±0.8 | 3.64±1.1 | 2.88±0.7 | 3.42±1.0 | 2.16±1.3 | 3.62±1.1 | 3.74±1.3 | 3.34±0.9 |
| | B | 3.21±0.8 | 3.45±1.0 | 3.48±0.5 | 2.96±0.9 | 3.48±0.7 | 2.92±1.1 | 3.59±1.0 | 3.84±0.9 | 3.38±1.1 |
| | C | 3.22±1.3 | 3.48±0.7 | 3.56±0.9 | 2.96±1.1 | 3.33±1.1 | 3.02±1.2 | 3.59±0.9 | 3.16±0.8 | 3.42±1.0 |
| | D | 3.18±1.0 | 3.14±1.4 | 3.16±1.5 | 3.34±1.3 | 3.11±1.2 | 3.24±0.8 | 3.11±1.0 | 3.01±0.9 | 3.08±1.2 |
| 절임배 추처리 구 | A | 3.21±1.1 | 3.38±1.1 | 3.58±0.9 | 3.16±0.7 | 3.82±0.8 | 2.72±0.6 | 3.68±1.0 | 3.82±1.0 | 3.44±0.9 |
| | B | 3.41±0.6 | 3.41±0.8 | 3.60±0.9 | 3.12±0.8 | 3.48±1.3 | 3.24±1.1 | 3.44±1.0 | 3.56±1.1 | 3.16±0.8 |
| | C | 3.44±0.4 | 3.51±0.9 | 3.76±1.2 | 3.48±1.1 | 3.36±1.0 | 3.64±0.9 | 3.59±1.1 | 3.45±0.8 | 3.49±1.1 |
| | D | 3.44±0.9 | 3.59±1.0 | 3.69±1.1 | 3.51±0.9 | 3.35±1.1 | 3.68±1.1 | 3.51±0.6 | 3.44±1.1 | 3.51±1.1 |
| 유산균 첨가구 | A | 3.38±1.1 | 3.64±1.1 | 3.68±0.9 | 3.62±1.1 | 3.51±1.1 | 3.62±1.1 | 3.71±1.0 | 3.42±1.1 | 3.48±0.9 |
| | B | 3.46±1.0 | 3.59±0.9 | 3.71±0.9 | 3.59±1.3 | 3.51±1.1 | 3.66±1.0 | 3.70±1.1 | 3.51±0.9 | 3.58±1.1 |
| | C | 3.48±0.9 | 3.68±0.6 | 3.64±1.4 | 3.64±1.2 | 3.62±0.9 | 3.61±1.2 | 3.81±1.2 | 3.49±1.0 | 3.57±1.2 |
| | D | 3.46±1.1 | 3.71±0.7 | 3.78±1.0 | 3.68±0.9 | 3.58±1.0 | 3.68±0.9 | 3.62±0.9 | 3.59±0.8 | 3.53±0.9 |
| 절임배 추처리, 유산균 첨가구 | A | 3.62±1.0 | 3.69±0.8 | 3.81±0.6 | 3.68±1.1 | 3.52±1.0 | 3.84±0.4 | 4.03±1.2 | 3.62±1.2 | 3.74±0.5 |
| | B | 3.48±0.9 | 3.59±0.9 | 3.83±0.7 | 3.68±1.2 | 3.51±1.2 | 3.62±1.1 | 3.86±0.6 | 3.59±1.1 | 3.62±0.8 |
| | C | 3.66±1.1 | 3.71±0.9 | 3.83±0.8 | 3.72±0.9 | 3.64±0.9 | 3.68±0.9 | 3.84±0.7 | 3.58±0.9 | 3.61±0.9 |
| | D | 3.59±1.3 | 3.71±1.1 | 3.82±1.0 | 3.94±0.8 | 3.63±1.0 | 3.86±1.0 | 3.76±0.9 | 3.59±1.0 | 3.76±0.6 |

* 각 처리구별 1차 숙성 조건은 10℃에서 숙성시켜 pH변화를 기준으로 종료 후 2차 숙성을 개시함

A : pH 6.0 B : pH 5.3 C : pH 4.8 D : pH 4.2

표 17. 2차 관능평가 결과

| 재료 | 외관 | | 향미 | 맛 | | | 질감 | 전체적 기호도 | |
|----|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|----------|
| | 색깔 | 윤기 | (군내) | 감칠맛 | 신맛 | 고유맛 | | | 청량감 |
| A | 3.46±1.1 | 3.64±0.9 | 3.84±0.8 | 3.72±1.0 | 3.58±1.1 | 3.83±0.6 | 4.02±0.8 | 3.64±1.0 | 3.82±0.8 |
| D | 3.51±0.9 | 3.62±1.0 | 3.81±1.1 | 3.91±0.9 | 3.69±1.0 | 3.92±1.1 | 3.82±1.0 | 3.60±0.7 | 3.94±1.1 |
| 제품 | 3.49±1.0 | 3.68±1.1 | 3.92±1.1 | 3.98±0.8 | 3.72±1.2 | 4.01±1.0 | 3.83±0.9 | 3.62±1.1 | 3.99±0.9 |

2차 관능평가 결과 1년을 숙성한 제품의 전체적 기호도가 높게 나타났다. 1차 숙성 후 3개월간 2차 숙성시킨 제품에서는 D제품이 높은 전체적 기호도를 나타냈다. 1년 숙성 제품과의 기호도에서도 유의차가 높게 나타나지 않았으며, 위의 숙성 조건을 토대로 하여 단기 숙성 기간 내에 1년 숙성 제품과 유사한 목은지의 생산에 적용하였다.



그림 8. 묵은지 관능평가 현장

라. 묵은지 이용 조리식품에 대한 기호성 비교 평가

표 16과 표 17의 관능평가 결과를 바탕으로 기호성이 높은 배추 절임시 초산을 처리한 후 양념에 유산균을 첨가한 실험구 D와 화원농협에서 생산되어 판매중인 묵은지를 이용하여 조리식품을 만들고 기호성 평가를 실시하였다. 두 제품을 동일한 방법으로 묵은지 찜 요리를 만들어서 시식하였다. 기호도 측면에서 비교한 결과 30명 중 D 제품에서 13명 화원농협 1년 숙성 묵은지에서 17명이 높은 기호도를 나타냈다. 이는 조리전 묵은지의 관능평가 결과와 유사한 결과이며 조리 전 후 묵은지로서의 맛에 근접했음을 확인할 수 있었다.

3. 가스를 발생시키지 않는 고활성 발효균의 분리 및 전처리된 원·부재료를 이용한 묵은지 발효 실험

가. 가스 비발생 발효균의 분리 및 동정

브로콜리 잎, 당근 잎, 번행초, 미숙감귤, 완숙감귤, 보리순, 칩 잎, 꾸지뽕 잎, 조릿대, 녹차 묵은 잎, 녹차 어린잎, 일반김치, 묵은지 등에서 유산균을 비롯하여 발효성을 나타내는 세균, 효모 등을 종합적으로 순수 분리하여 묵은지 실험용 균주로 확보하고 주요 분리균에 대한 분리 동정을 실시하였다. 야생 발효균의 분리를 위하여 실험 재료를 밀봉하여 냉동 보관, 밀봉하여 자연 발효, 생잎 분쇄물을 멸균 생리 식염수에 10배 희석한 후 BCP첨가 배지에 접종한 후 37℃에서 2일간 배양한 후 산을 생성하는 유산균과 유사균을 선별 계대 배양 방법 등을 활용하여 단독 콜로니를 분리하였다. 분리된 균을 그람염색과 MRS배지와 당사에서 제조한 유산균 배양배지(MY배지)에서 균을 생육활성을 테스트하여 생육 활성이 우수한 균을 중심으로 동정실험을 수행하였다. 또한 배양한 생균을 이용하여 젖산염 확인 반응으로 젖산 생성 여부를 확인 한 후 선별된 유산균의 가스 생성 유무를 확인하기 위하여 MRS broth 배지에 듀럼판을 이용하여 가스 생성 유무를 확인하였다.

분리된 주요 유산균에 대하여 Fig. 7에서 보는 바와 같이 Agar Plate 상에서의 유산균 Colony의 형태는 일반 동물성 유산균과 달리 다양한 형태와 색을 나타내며, 광학 현미경을 통한 유산균 Cell 형태 또한 주로 단간균의 모습을 나타내며 Cell의 길이, 굵기 등에서 차이를 보여 주었다.

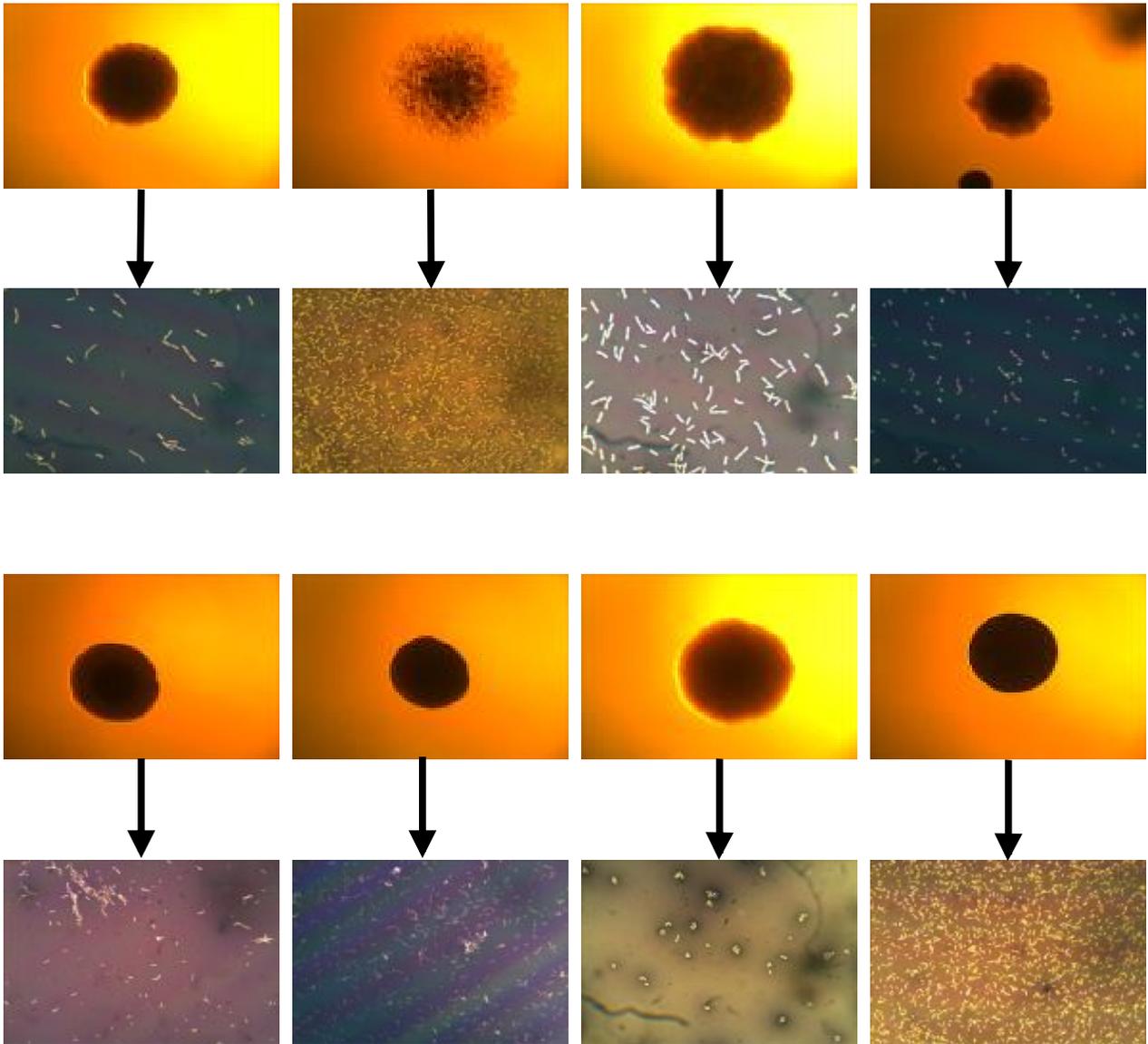


그림 9.. 식물체에서 분리한 주요 유산균의 콜로니 형태 및 광학 현미경 촬영 결과

표 18.은 분리된 발효균 들 중에서 생육 활성이 우수한 균들에 대한 분리 동정 결과이다. 동정 결과에 따르면 Gene sequence가 100% 일치하더라도 균주의 Phenotype의 차이를 나타낼 수 있으며 99% 이하의 동일성을 보이는 균주에 대해서는 구체적인 생리활성 시험이 필요하고 신규의 야생균주일 가능성을 배제할 수 없다.

표 18. 주요 분리 발효균의 분리 동정 분석

| 균주명 | Identities | Blast results | 동정결과 |
|-----------|---------------------|--|-----------------------------------|
| GH-01 | 1440/1441 (99%) | Bacillus casgulans 16S ribosomal RNA gene | <i>Bacillus coagulans</i> |
| GH-02 | 1216/1252 (98%) | Streptococu thermophilus strain STKWT 16S ribosomal RNA gene | <i>Streptococcus thermophilus</i> |
| GH-03 | 1456/1459 (99%) | Lactobacillus reuteri gene 16S ribosomal RNA gene | <i>Lactobacillus reuteri</i> |
| GH-LB | 1250/1251 (99%) | Lactobacillus plantarum strain Bom 816 16S ribosomal RNA gene | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| KC-08 | 657/677 (97%) | Acetobacter sp. TUB6 partial 16S rRNA gene | <i>Acetobacter sp.</i> |
| KC-09 | 1439/1440 (99%) | Bacillus subtilis WJ17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <i>Bacillus subtilis</i> |
| YE-02 | 761/765 (99%) | Saccharomyces cerevisiae strain KDLYS901 ITS1, 5.8S ribosomal RNA gene | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| AC-03 | 630/636 (99%) | Acetobacter cerevisiae 16S ribosomal RNA gene | <i>Acetobacter cerevisiae</i> |
| JH-05 | 508/510 (99%) | Issatchenkia orientalis isolate ZA020 18S ribosomal RNA gene | <i>Issatchenkia orientalis</i> |
| JH-332 | 307/313 (98%) | Streptococu thermophilus strain STKWT 16S ribosomal RNA gene | <i>Streptococu thermophilus</i> |
| AC-02 | 635/643 (99%) | Gluconobacter albidus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:NBRC 3273 | <i>Gluconobacter albidus</i> |
| YE-04 | 748/749 (99%) | Saccharomyces cerevisiae isolate F25 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| JH-07 | 1449/1449 (100%) | Enterococcus faecalis rRNA-16S ribosomal RNA | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| KC-06 | 1435/1435 (100%) | Lactobacillus sp. SXVIII9(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence | <i>Lactobacillus sp.</i> |
| LAB-06 | 1439/1439 (100%) | Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: AB13 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| LAB-BR507 | 1440/1441 (99%) | Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: AB13 | <i>Lactobacillus plantarum</i> |
| BRC-01 | 1445/1445 (100%) | Lactobacillus brevis strain IMAU80136 16S ribosomal RNA gene | <i>Lactobacillus brevis</i> |
| JH-332 | 1466/1467 (99%) | <i>Lactobacillus rhamnosus strain LP1 16S ribosomal RNA gene</i> | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> |

나. 복합 발효균을 이용한 발효 실험

분리된 식물 유래의 유산균 10종을 묵은지 제조용 양념에 배합하여 묵은지의 초기 발효에 유산균이 어느 정도 영향을 주는지에 대하여 기본 발효정도를 비교 측정하였다. 유산균 접종 후 상온(20℃)에서 4일간 밀봉하여 발효 후 pH, 당도, 산도 및 미생물을 측정된 결과는 표 19. 및 표 20에서 보는 바와 같았다. 실험 결과 시료 11과 12에서 가스 팽창이 가장 적었으며 나머지 실험구에서는 대조구와 가스 팽창 정도가 덜하였으나 큰 유의차는 없었고 LAB-DO504를 접종한 시료 8에서 팽창 정도가 조금 높았다. 이는 김치 양념에 존재하는 가스 생성균과의 상호 대사작용에 의한 것으로 판단되고, LAB-06을 접종한 시료 6에서 타 실험구에 비해 김칫국물의 점도 상승이 관찰되었는데 현미경 검정 결과 일반적으로 알려져 있는 *Leuconostoc* sp. 균주에 의한 것은 아닌 듯 하며 모든 실험구가 동일한 배추와 양념을 사용하였으므로 그 차이에 대한 구체적인 검토가 요구된다. 시료 6, 7, 8, 11, 12의 초기 발효 김치의 시식 결과 다른 실험구에 비하여 풍미가 우수한 것으로 판단되어, 이들에 사용된 유산균주를 배양 종균으로 하여 공장 실험을 진행하였다.

표 21.에 의하면 유산균을 접종한 실험구와 대조구(시료1, 시료2)에서 그람 음성균은 모두 검출되지 않았지만, 대조구에 비하여 유산균을 인위적으로 첨가한 실험구서 전반적으로 효모수가 감소하는 것으로 나타났으며 특히 실험구 시료 3, 5, 9, 10, 11, 12에서는 대조구에 비하여 평균 90% 이상 감소한 것을 확인할 수 있었다. 관능 시험 결과 기호성이 우수한 시료 6, 7, 8, 11, 12 중에서 가스팽창 정도가 가장 적은 시료 11과 12를 선별하여 가스발생 억제 균주로 사용하였다.

표 19. 식물성 유산균을 종균으로 첨가시킨 묵은지용 김치 발효의 변화

| 시료명 | 접종균주 | origin | pH | 당도 | 산도 |
|-------|-----------|--------|------|------|------|
| 시료1 | 대조균 | - | 4.26 | 13.7 | 1.25 |
| 시료2 | 대조균 | - | 4.3 | 14.5 | 1 |
| 시료3 | GH-001 | 보리순 | 4.25 | 12.2 | 1.15 |
| 시료4 | GH-LB | 보리순 | 4.26 | 13.1 | 1.04 |
| 시료5 | LAB-05 | 취 | 4.05 | 12.5 | 1.08 |
| 시료6 | LAB-06 | 번행초 | 4.26 | 15.4 | 1.01 |
| 시료7 | LAB-BR507 | 브로콜리 | 4.16 | 12.5 | 1.08 |
| 시료8 | LAB-DO504 | 당근 | 4.17 | 11.1 | 1.25 |
| 시료9 | LAB-40980 | 브로콜리 | 4.19 | 10.6 | 1.27 |
| 시료10 | LAB-40992 | 번행초 | 4.18 | 11.5 | 1.17 |
| 시료 11 | BRC-01 | 브로콜리 | 4.19 | 12.6 | 1.06 |
| 시료 12 | JH-332 | 번행초 | 4.18 | 12.4 | 1.04 |

* 발효 온도 : 20℃, 발효 시간 : 4일

표 20. 식물유래 유산균을 접종한 묵은지 발효 시험구의 미생물 변화

| 구분 | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | CB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) |
|-------|-------------------|-------------------|-------------|-------------------|
| 시료1 | 2.6×10^7 | 9.2×10^5 | 0 | 1.8×10^3 |
| 시료2 | 2.8×10^8 | 6.4×10^5 | 0 | 1.5×10^3 |
| 시료3 | 9.8×10^7 | 2.4×10^5 | 0 | 100이하 |
| 시료4 | 4.2×10^8 | 1.2×10^5 | 0 | 5.0×10^2 |
| 시료5 | 8.5×10^8 | 4.0×10^4 | 0 | 100이하 |
| 시료6 | 2.8×10^8 | 3.2×10^5 | 0 | 2.0×10^2 |
| 시료7 | 1.5×10^8 | 1.8×10^5 | 0 | 8.0×10^2 |
| 시료8 | 2.1×10^7 | 2.7×10^5 | 0 | 9.0×10^2 |
| 시료9 | 6.2×10^7 | 2.9×10^5 | 0 | 1.0×10^2 |
| 시료10 | 2.9×10^7 | 1.8×10^5 | 0 | 100이하 |
| 시료 11 | 6.2×10^7 | 2.4×10^5 | 0 | 100이하 |
| 시료 12 | 7.4×10^7 | 3.3×10^5 | 0 | 100이하 |

다. 묵은지의 숙성과정 중 효모에 의한 gas 발생 억제 유산균

묵은지의 발효 과정 중 gas 발생은 효모와 유산균에 의한 영향이 크다. 하지만 유산균에 의한 발생하는 gas 보다 효모에 의해 발생하는 gas가 많은 부분을 차지한다. 유산균의 증식이 효모의 증식에 영향을 미치는 부분과 gas 생성여부를 확인하기 위해 화원농협에서 제조한 김치 양념과 해남 지역에서 생산된 배추를 이용해 김치를 제조하였고, 김치 양념에 감귤 농축액과 미생물 6종을 각각 첨가하였다. 그리고 김치에서 분리된 효모를 배양하여 인위적으로 첨가하여 비교하였다. 각 실험구는 15℃에서 4일동안 1차 발효 후 미생물과 1차 pH 변화를 측정하였고 냉장보관 1개월 후 2차 pH를 측정하였다.

표 21과 같이 실험구별 각각의 유산균 수는 대조구와 큰 유의차는 나타나지 않았으나 gas 발생의 주 요인으로 의심되는 효모의 수에서 유의차를 나타내었다. 전체적으로 대조구에 비해 효모수가 감소하였다. 특히 감귤농축액과 JH-332, BRC-01 첨가구에서 상당수 감소하였으며 BRC-01 첨가구에서는 100 이하로 큰 감소폭을 보였다. pH 변화에서는 전체적으로 상온 보관 후 pH 4 전후에서 측정되었으며, 냉장 숙성 후에는 pH 3.5 ~ pH 3.6 으로 측정되어 신맛이 증가하는 경향을 보였으나 BRC-01 처리구에서만 상온 발효 후 pH 4.12에서 냉장 1개월 숙성 후에도 pH 4.06으로 변화가 매우 낮았다.

표 21. 감귤 농축액과 유산균 첨가에 따른 유산균, 효모 및 pH 변화

| | 유산균 | 효모 | pH | |
|---------|-------------------|-------------------|------|------|
| | | | 1차 | 2차 |
| 대조구 | 4.7×10^8 | 4.3×10^4 | 3.97 | 3.52 |
| 감귤농축액 | 3.7×10^8 | 5×10^3 | 3.94 | 3.55 |
| JH-332 | 5.6×10^8 | 1×10^4 | 3.92 | 3.55 |
| PLF-500 | 3.4×10^8 | 3×10^4 | 4.00 | 3.61 |
| BRC-01 | 4.3×10^8 | 100이하 | 4.12 | 4.06 |
| D-0504 | 6.3×10^8 | 2.4×10^4 | 3.99 | 3.61 |
| BC-06 | 3.1×10^8 | 2.1×10^4 | 4.08 | 3.62 |
| SC-0509 | 7.4×10^8 | 2.5×10^4 | 3.73 | 3.53 |

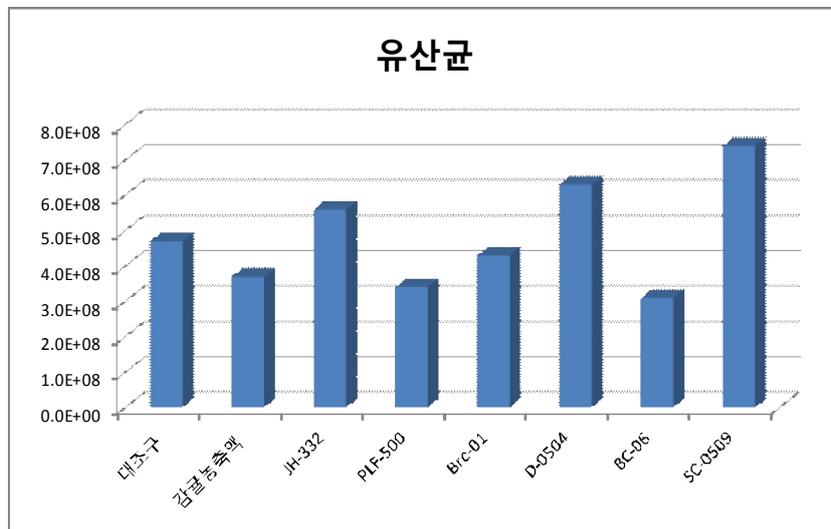


그림 10. 감귤농축액, 유산균 첨가 목은지의 4일 발효 후 유산균 수

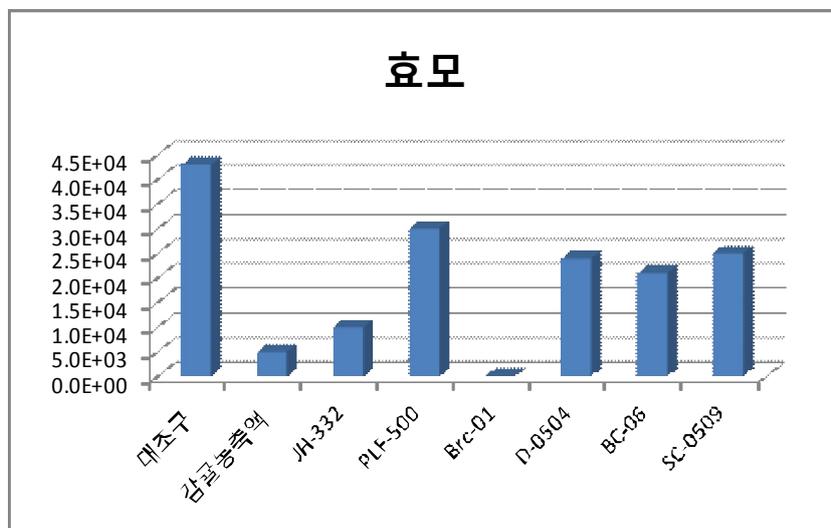


그림 11. 감귤 농축액, 유산균 첨가 목은지의 4일 발효 후 효모 수

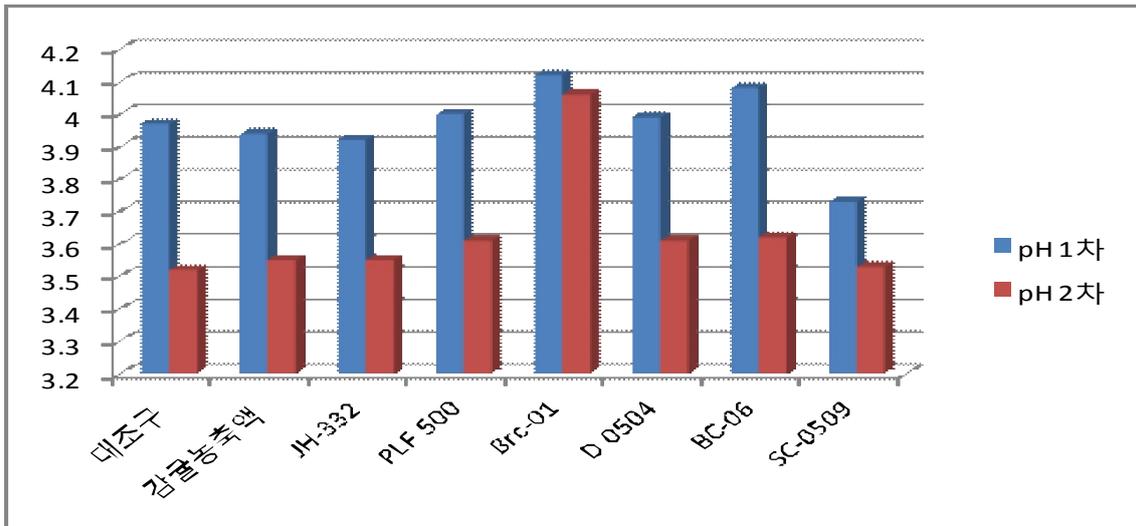


그림 12. 감귤 농축액, 유산균 첨가 목은지의 pH 변화

표 22. 인위적 효모 첨가에 따른 미생물 및 pH 변화

| | | 유산균 | 효모 | pH | |
|----------|---------|-------------------|-------------------|------|------|
| | | | | 1차 | 2차 |
| 대조구 | | 3.8×10^8 | 4.3×10^4 | 3.97 | 3.52 |
| 효모 첨가 | 대조구 | 3.3×10^8 | 1.8×10^7 | 3.99 | 3.63 |
| | 감귤농축액 | 4.2×10^8 | 4×10^6 | 3.94 | 3.55 |
| | JH-332 | 4.9×10^8 | 7.2×10^6 | 3.96 | 3.68 |
| | PLF-500 | 2.7×10^8 | 2.4×10^7 | 4.04 | 3.63 |
| | BRC-01 | 4.1×10^8 | 3.3×10^5 | 4.09 | 4.05 |
| | D-0504 | 5.7×10^8 | 1.8×10^7 | 4.05 | 3.67 |
| | BC-06 | 3.3×10^8 | 1.4×10^7 | 4.04 | 3.70 |
| | SC-0509 | 6.2×10^8 | 1.6×10^7 | 3.78 | 3.63 |

표 22와 같이 인위적으로 효모를 첨가하여 진행한 실험에서도 유사한 결과가 도출되었다. 감귤 농축액, JH-332균주, BRC-01 균주의 효모 증식을 저해하는 작용이 있음이 확인되었으며, BRC-01의 경우 pH를 4근처에서 안정적으로 유지시킴으로서 BRC-01균주의 첨가로 목은지의 장기 발효시에 첨가 유산균의 산생성에 의한 신맛의 증가는 없는 것으로 판단되며 오히려 대조구보다 안정적으로 pH를 유지시키는 작용이 있는 것으로 확인되었다.

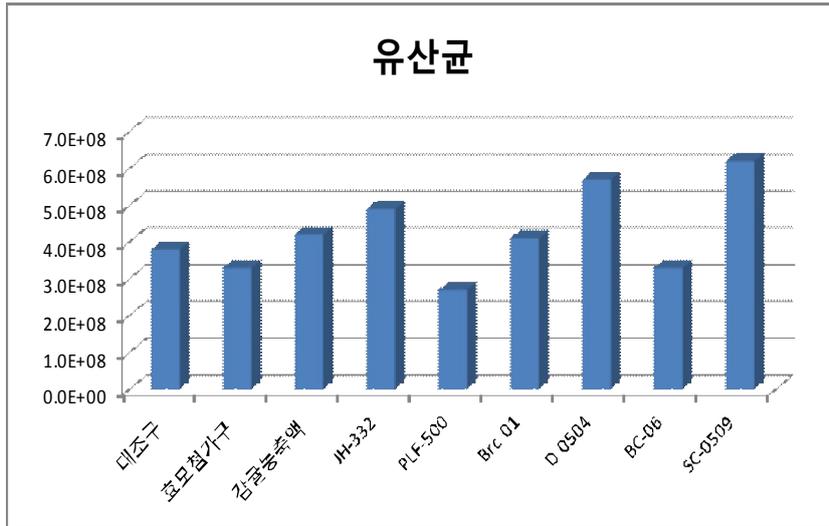


그림 13. 인위적 효모 첨가에 따른 유산균수

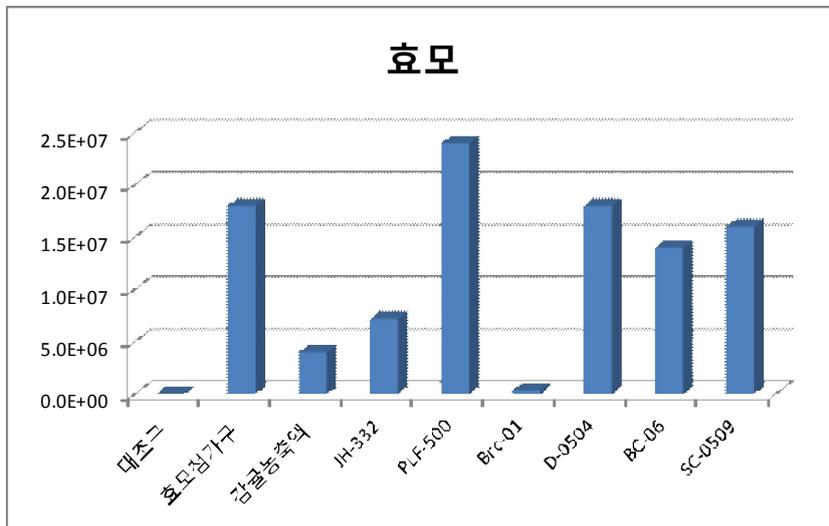


그림 14. 인위적 효모 첨가에 따른 효모수

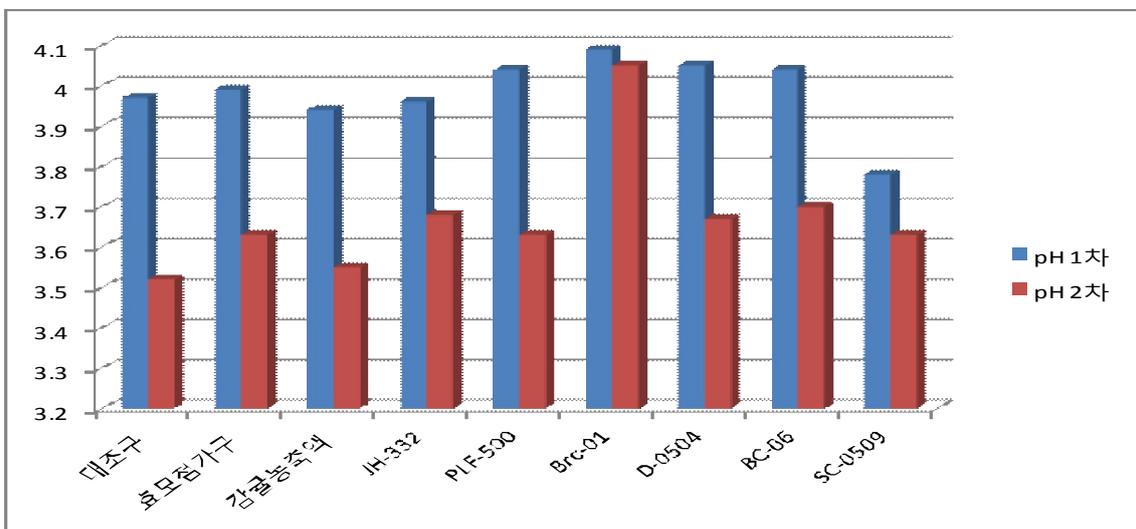


그림 15. 인위적 효모 첨가에 따른 pH 변화

효모를 인위적으로 첨가하여 발효를 진행시킨 경우 감귤농축액처리구, BRC-01 처리구에서 다른 효모첨가 실험구와 비교하여 gas 팽창 정도에 차이를 보였다. 김치내 효모의 수와 비례하여 gas 팽창 정도가 증가하였으며, 특히 BRC-01을 처리한 실험구에서는 gas에 의한 팽창이 현저히 적었다. 효모를 첨가하지 않은 발효 실험에서는 BRC-01 처리구와 감귤농축액 처리구에서 gas 팽창이 발생하지 않았으며, JH-332에서 gas 팽창이 있었으나 대조구와는 차이를 보였고 나머지 실험구에서는 대조구와 큰 유의차를 보이지 않았다.

라. 가스발생 억제 유산균을 이용한 김치 발효 실험

분리된 유산균 중 가스 발생 정도가 가장 적고 관능적으로 맛이 우수한 균이 BRC-01균주와 JH-332 균주를 이용하여 묵은지 발효 실험을 진행하였다. 표 23와 같이 첨가구에서 발효 초기부터 90일 까지 대조구에 비해 많은 유산균이 검출되었으며, 첨가된 유산균이 묵은지에 사멸하지 않고 생존하면서 발효에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

표 23. 유산균 첨가 김치에서 유산균 변화

| 시료명 | 1일 | 3일 | 5일 | 90일 |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 대조구 | 2.6×10^4 | 4.6×10^5 | 8.6×10^7 | 6.8×10^7 |
| BRC-01 첨가구 | 7.2×10^4 | 2.8×10^6 | 4.0×10^8 | 3.8×10^8 |
| JH-332 첨가구 | 6.9×10^4 | 3.3×10^6 | 3.2×10^8 | 2.1×10^8 |

BRC-01균주와 JH-332균주를 김치에 첨가하여 1차 숙성 후 3개월간 2차 숙성 후 대조군과의 미생물 분포를 비교하였다(표 24). 3개월 후 유산균수는 대조구에 비하여 높게 나타났으며 상대적으로 효모는 감소한 것을 확인할 수 있었다. Coilfoam bacteria의 경우는 대조구와 실험구에서 모두 검출되지 않았다.

표 24. 유산균 첨가 후 미생물 분포(3개월 경과 후)

| 시료명 | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|
| 대조구 | 6.8×10^7 | 7.4×10^7 | 4.6×10^4 | 0 |
| BRC-01 첨가구 | 3.8×10^8 | 4.2×10^8 | 3.1×10^2 | 0 |
| JH-332 첨가구 | 2.1×10^8 | 2.4×10^8 | 3.6×10^2 | 0 |

LB: Lactic acid bacteria, GB: General bacteria, YM: Yeast & mold, CB: Colifoam Bacteria

마. 묵은지의 발효 조건 확립(가스 비발생 발효균의 우점화)

묵은지의 숙성과정 중 gas 발생 여부를 확인하기 위해 분리 유산균 BRC-01과 JH-332 중 효모 억제 효과와 MY배지에서 생육이 우수한 유산균인 BRC-01균주를 사용하였다. 유산균을 첨가한 실험구와 대조구를 상온에서 발효 과정을 진행시켰다. 5일 동안 숙성 후 미생물 변화는 표 25과 같다.

표 25. 묵은지의 숙성 과정 중 미생물의 변화 및 gas 생성

| 시료명 | 대조구 | BRC-01 첨가구 |
|-------------|--|---|
| LB (CFU/ml) | 4.6×10^7 | 4.3×10^8 |
| YM (CFU/ml) | 6.2×10^4 | 2.8×10^2 |
| |  |  |

BRC-01을 첨가한 실험구의 경우 유산균이 대조군에 비해 높게 나타난 반면 효모는 대조구에 비해 감소하였다. 유산균의 생육으로 인해 효모가 억제된 것을 확인할 수 있었다. BRC-01을 첨가한 실험구에서 높은 유산균 수에도 불구하고 gas 발생정도는 적었으며, 대조구에서는 실험구보다 낮은 유산균 수치에도 불구하고 gas 발생 정도가 높았다. 대조구에서 효모의 생육이 증가함으로 인해 gas 발생 정도가 증가한 것으로 판단되어진다. 묵은지의 숙성과정에서 발생하는 gas를 억제하기 위해 gas 발생이 없는 유산균을 이용하는 방법보다 효모의 gas 발생을 억제할 수 있는 즉 효모의 증식을 제어할 수 있는 유산균을 이용함으로써 최종적으로 gas 발생을 조절하는 방법이 효과가 높은 것으로 판단된다

4. 묵은지의 수출용 상품화 및 대량 생산을 위한 제조 공정의 확립

가. 원·부재료의 전처리 방법의 확립

묵은지의 품질 표준화를 위해서는 묵은지에 사용되는 원·부재료의 균일화가 먼저 이루어져야 한다. 원부재료의 품질 표준화를 이루기 위한 전처리 방법으로 초산을 첨가하여 pH를 떨어뜨려 미생물의 생육을 억제하는 방법과 유산균을 첨가하는 방법, 고춧가루와 같이 세척이 불가능한 부원료에 대해서는 알콜 처리에 의한 미생물을 제어하는 방법을 제시하였다.

하지만 묵은지의 원·부재료 중 배추가 차지하는 비중이 75% 이상으로 매우 높아서 절임배추에 대한 전처리만으로도 모든 원·부원료를 전처리하여 얻어지는 미생물 변화와 유의차가 거의 없는 것으로 확인되었다. 고춧가루에 알콜 처리의 방법은 비용적인 면 등을 고려해보면 절임배추에 대한 전처리만으로 묵은지의 품질 표준화는 가능하다.

절임배추의 전처리 방법에서 pH 조절 방법과 유산균 첨가 방법 중 pH 조절 방법만으로도 묵은지 품질 표준화를 위한 전처리 방법으로 적용이 가능하며 묵은지 양념에 첨가되는 유산균의 작용과 병행하여 발효 초기의 품질 표준화가 가능하다. 유산균에 의한 전처리는 절임배추를 상품으로 출고할 시 먼저 절임공정에서 초산을 처리하여 미생물을 제어한 후 포장 직전 유산균 현탁액에 침지시킨 후 포장한다. 이는 가정에서 절임배추를 구매하여 김치 양념을 따로하여 버무릴 시 절임배추에 남아있는 유산균이 김치 발효에 작용하여 김치 발효에 도움이 된다.

본 가스발생이 없는 숙성 묵은지의 대량 생산을 위한 원료의 전처리 방법으로 500L의 절임수에 초산을 0.03% 첨가한 후 pH를 떨어뜨린 후 배추를 15시간 침지시킨 후 세척하여 사용하였다.

나. 묵은지 발효 조건의 확립

묵은지 발효 조건의 확립을 위해 실험실에서 진행한 결과를 토대로 pilot 단위의 묵은지 숙성을 진행시켰다. 실험구를 배추 절임시 초산을 첨가하여 pH를 조절한 절임배추를 이용한 실험구와 일반 절임배추에 양념에 유산균을 첨가하여 숙성시킨 실험구, 배추 절임과정과 양념에 유산균을 동시에 처리하여 발효시킨 실험구를 각각 1차 숙성 조건을 달리하여 진행시켰다. 1차 숙성시 묵은지의 pH를 각각 6.0, 5.3, 4.8, 4.2로 맞춘 후 2차 숙성을 진행시켰으며, 2차 숙성은 묵은지 생산 시점을 기준으로 3개월을 진행하였다. 숙성된 묵은지의 미생물 분포는 표 26과 같다.

표 26. pilot 생산 묵은지의 3개월 숙성 후 미생물 분포

| 재료 | | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|---------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|
| 대조구 | A | 1.1×10^7 | 2.2×10^7 | 5.3×10^5 | 0 |
| | B | 1.0×10^7 | 1.8×10^7 | 8.2×10^5 | 0 |
| | C | 1.6×10^7 | 2.5×10^7 | 4.8×10^5 | 0 |
| | D | 2.1×10^7 | 2.2×10^7 | 5.4×10^5 | 0 |
| 절임배추 처리구 | A | 3.2×10^7 | 2.8×10^7 | 3.0×10^4 | 0 |
| | B | 4.4×10^7 | 4.8×10^7 | 4.1×10^4 | 0 |
| | C | 3.8×10^7 | 4.6×10^7 | 2.6×10^4 | 0 |
| | D | 3.2×10^7 | 2.9×10^7 | 3.1×10^4 | 0 |
| 유산균 첨가구 | A | 4.4×10^7 | 2.8×10^7 | 5.2×10^4 | 0 |
| | B | 5.8×10^7 | 4.9×10^7 | 4.5×10^4 | 0 |
| | C | 5.6×10^7 | 5.2×10^7 | 4.8×10^4 | 0 |
| | D | 4.7×10^7 | 5.2×10^7 | 4.2×10^4 | 0 |
| 절임배추 처리, 유산균 첨가구 | A | 8.4×10^7 | 7.2×10^7 | 2.7×10^3 | 0 |
| | B | 9.2×10^7 | 9.1×10^7 | 2.6×10^3 | 0 |
| | C | 8.1×10^7 | 9.2×10^7 | 2.5×10^3 | 0 |
| | D | 7.9×10^7 | 8.1×10^7 | 2.0×10^3 | 0 |

* 각 처리구별 1차 숙성 조건은 8°C에서 숙성시켜 pH변화를 기준으로 종료 후 2차 숙성을 개시함

A : pH 6.0 B : pH 5.3 C : pH 4.8 D : pH 4.2

pilot 단위의 숙성 조건에서도 실험실 숙성시 나타났던 미생물 분포와 비슷한 양상이 나타났다. 대조구에 비해 실험구에서 전체적으로 유산균 수치가 높게 나타났으며, 효모 수치는 낮게 나타났다. 배추 절임시 초산을 처리한 실험구와 유산균을 첨가한 실험구에서는 비슷한 수치로 나타났으며, 절임배추에 초산처리와 유산균 첨가를 병행한 실험구에서는 유산균 수치는 가장 높고 효모 수치는 가장 낮게 나타났다. gas 발생 정도에 있어서도 절임배추에 초산처리와 유산균 첨가를 병행한 실험구에서 가장 낮게 나타났다. 표 16과 17의 결과를 보듯 관능평가 에서도 절임배추 초산처리와 유산균 첨가를 병행한 실험구에서 가장 높게 나타났다. 1차 숙성에서 pH를 4.2까지 떨어뜨린 후 2차 숙성시킨 숙성 묵은지에서 관능 평가 결과도 높게 나타났다.

pilot 숙성 결과를 기준으로 하여 공장 생산기준을 토대로 시험 생산을 진행하였다. 절임수에 0.03% 초산을 첨가하여 절임배추를 전처리 한 후 묵은지 양념에 유산균을 첨가하여 버무린 후 1차 숙성 온도를 10℃로 하여 진행시켰다. 1차 숙성 기간은 pH4.2로 떨어지는 시점에서 종료시켰으며, 묵은지 생산 시점을 기준으로 3개월까지 0℃에서 2차 숙성을 진행하였다.

3개월간 숙성시킨 숙성 묵은지와 화원농협에서 1년간 숙성시킨 묵은지의 기초품질 비교 결과와 미생물 분포는 표 27, 표 28과 같다.

표 27. 묵은지 기초 품질 비교

| 구분 | 초기숙성온도 (°C) | 초기숙성시간 (day) | 당도(Brix) | 산도(%) | pH |
|------------|-------------|--------------|----------|-------|------|
| 1년 숙성 묵은지 | 5 | 10 | 12.1 | 1.09 | 4.02 |
| 3개월 숙성 묵은지 | 10 | 15 | 12.6 | 1.14 | 3.95 |

표 28. 묵은지의 미생물 분포

| 구분 | LB (CFU/ml) | GB (CFU/ml) | YM (CFU/ml) | CB (CFU/ml) |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------|
| 1년 숙성 묵은지 | 8.4×10^7 | 7.9×10^7 | 1.6×10^5 | 0 |
| 3개월 숙성 묵은지 | 2.7×10^8 | 2.4×10^8 | 3.9×10^3 | 0 |

기초 품질 비교면에서 1년 숙성 묵은지와 유산균을 첨가하여 3개월 숙성 묵은지간의 유의차는 크게 나타나지 않았다. 3개월 숙성 묵은지에서 pH가 조금 낮고 산도가 조금 높지만 그 차이는 매우 적었다. 미생물 분포면에서는 3개월 숙성 묵은지에서 1년 숙성 묵은지보다 유산균 수치가 높게 나타났고 효모 수치에서는 낮게 나타났다. 공장 생산 라인을 이용한 방식에서도 첨가된 유산균이 효모의 생육을 효과적으로 억제하여 가스 발생을 줄이고 있는 것을 확인 할 수 있었다.

다. 숙성 묵은지에 대한 관능 평가

유산균을 첨가하여 3개월 숙성시킨 묵은지와 1년 숙성된 묵은지의 관능평가를 실시한 결과는 표 29와 같다. 전체적인 기호도는 1년 숙성된 묵은지에서 높게 나타났으나 3개월 숙성 묵은지와 큰 차이는 보이지 않았다. 묵은지의 색깔, 윤기, 향미, 감칠맛, 신맛, 고유타에서 두 그룹간 차이를 보이지 않았으나 청량감에서 3개월 숙성 묵은지에서 조금 차이를 보였다. 청량감은 김치 내 존재하는 효모에서 생성되는 탄산가스에 의해 차이를 보이는데 3개월 숙성 묵은지에서는 효모의 생육이 억제되어 청량감에 차이를 보이는 것으로 판단된다.

표 29. 유산균 첨가 3개월 숙성 묵은지와 1년 숙성 묵은지의 관능 평가 결과

| 재료 | 외관 | | 향미 (군내) | 맛 | | | | 질감 | 전체적 기호도 |
|----|----------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|----------|------------|
| | 색깔 | 윤기 | | 감칠맛 | 신맛 | 고유맛 | 청량감 | | |
| A | 3.79±1.0 | 3.66±0.9 | 4.04±0.8 | 3.82±1.1 | 3.64±0.9 | 3.92±1.1 | 3.52±0.8 | 3.96±1.1 | 3.99±0.8 |
| B | 3.72±0.7 | 3.61±0.8 | 3.92±0.8 | 3.99±0.9 | 3.69±0.9 | 4.09±1.1 | 3.82±1.0 | 3.60±0.7 | 4.09±1.1 |

A : 유산균 첨가 3개월 숙성 묵은지, B : 1년 숙성 묵은지

라. 종균 배양 조건의 확립

분리 유산균을 산업적으로 대량 생산하기 위한 배지의 조성으로 효모추출물, 당밀, 클로렐라 추출물 등을 이용하여 다양한 배합 비율을 적용한 후 표 30.과 같이 배지를 조성하였다. 표 30의 방법으로 배지를 조성한 후 Fermenter를 이용하여 37℃, 300rpm에서 유산균을 배양한 결과 Brc-01과 JH-332에 대하여 각각 2.4×10^9 과 2.2×10^9 의 유산균 배양액을 얻을 수 있었다.(표 31)

표 30. 유산균 배양 배지(MY) 조성

| 첨가물 | 첨가량 (%) |
|-------------------|---------|
| 효모추출물 | 5 |
| 당밀 | 3 |
| 클로렐라 추출물 | 1 |
| 나한과 추출물 | 0.5 |
| 울금추출분말 | 0.3 |
| Twin 80 | 0.1 |
| CaCO ₃ | 0.5 |

표 31. MY 배지를 이용한 유산균 배양 결과

| 균주명 | 동정명 | 배양결과 |
|--------|-------------------------------|-------------------|
| Brc-01 | <i>Lactobacillus brevis</i> | 2.4×10^9 |
| ML17 | <i>Lactobacillus curvatus</i> | 2.2×10^9 |

마. 숙성 목은지의 생산 공정

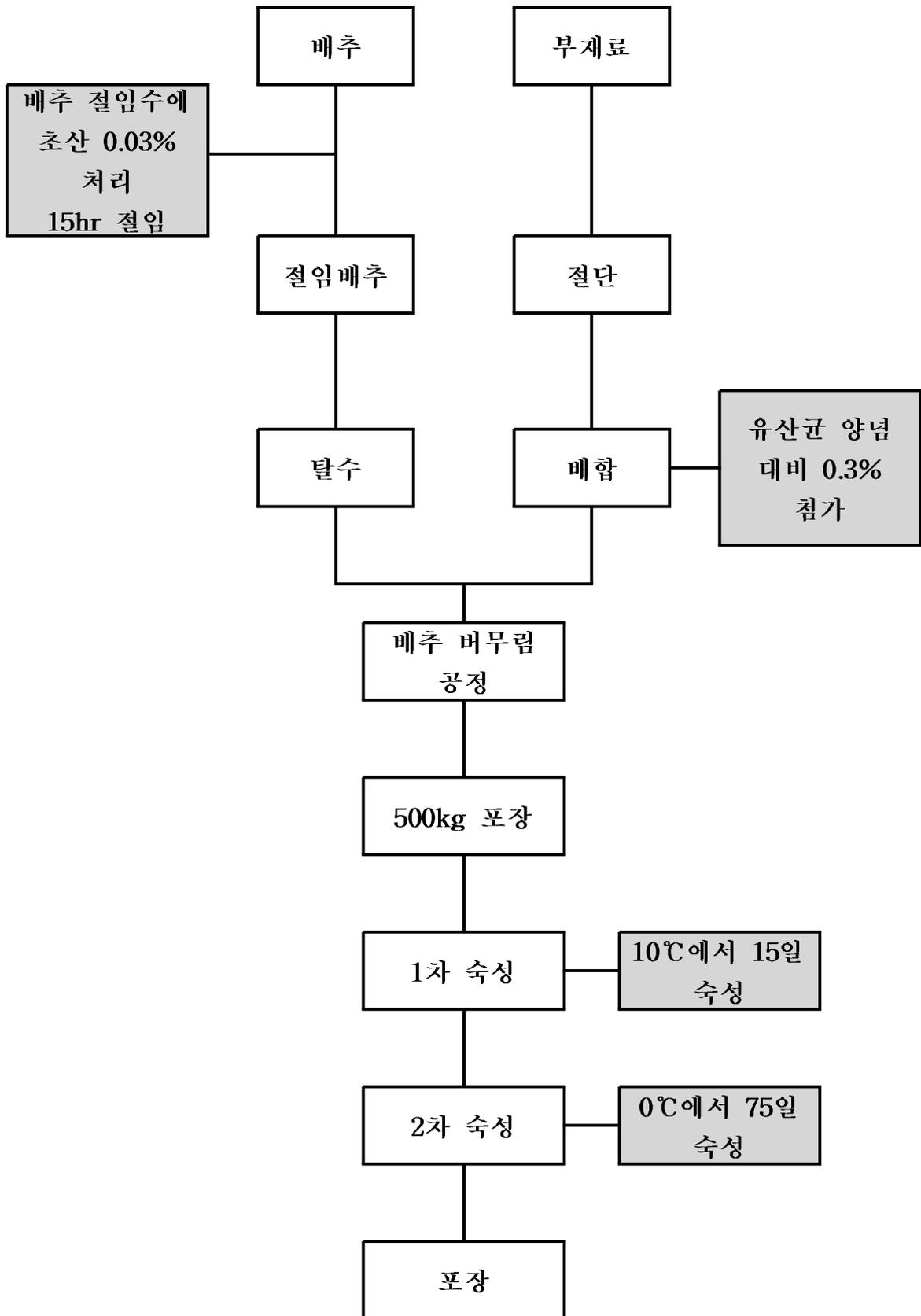


그림 16. 숙성 목은지의 제조 공정도



그림 17. 묵은지 생산 과정

제 2 절 숙성 묵은지 제조를 위한 종균의 분리 및 개발

1. 연구 수행 방법

가. 묵은지의 발효 특성 분석

(1) 묵은지의 발효 및 숙성

묵은지의 발효 특성 분석을 위한 김치는 화원농협 김치가공공장에서 제조한 이맑은 묵은지를 숙성이 되지 않은 상태로 제조당일 공급받아 사용함. 사용된 묵은지의 배합은 절임배추 77.8%(배추 98%, 소금), 찹쌀풀 6.64%, 고춧가루 3%, 무 5%, 멸치액젓 1%, 새우젓 1%, 마늘 1.4%, 대파 0.8%, 양파 0.8%, 홍갓 0.5%, 생강 0.22%, 설탕 0.3%, 재제소금 0.14%, 참깨 0.1%, 표고버섯 0.01%의 비율로 제조함.

묵은지의 발효 및 숙성은 화원농협 김치가공공장의 실제 발효조건을 적용하여 진행하였음. 1차 발효는 겨울철 발효온도인 5℃와 봄·가을의 발효온도인 10℃로 나누어 7일 동안 발효를 진행함. 2차 숙성은 묵은지 숙성온도인 0℃와 냉장온도인 4℃로 나누어 제조일로부터 231일까지 숙성을 진행함.

표 1. 묵은지의 발효 및 숙성 온도

| | 1차 발효 | 2차 숙성 |
|-----|-------|-------|
| MK1 | 5℃ | 0℃ |
| MK2 | 5℃ | 4℃ |
| MK3 | 10℃ | 0℃ |
| MK4 | 10℃ | 4℃ |

(2) 숙성에 따른 묵은지의 발효 특성 분석

(가) pH 및 산도

pH는 김치를 믹서기로 마쇄하여 거즈로 여과한 김치 여과액을 pH meter(Mettler-toledo GmbH 8603)를 사용하여 측정함. 총산은 AOAC법에 따라 김치여액 10 mL을 0.1 N NaOH로 pH 8.3이 될 때까지 적정한 다음 소비된 NaOH의 부피를 젖산량으로 환산하여 계산함.

(나) 염도

염도 측정은 김치여과액을 염도계(Takemura Electric Works Ltd TM-30D)를 사용하여 측정함.

(다) 환원당

환원당 측정은 DNS(dinitro salicylic acid)법을 사용하여 측정함. 시료는 김치여과액을 원심분리(6,500 ×g, 5 min)하고 상정액을 100배 희석하여 사용함. 시료 1 mL에 DNS용액 3

mL을 넣고 95~100°C에서 5 min 반응한 후 ice에서 식히고 spectrophotometer로 550 nm에서 흡광도를 측정함. Standard는 glucose를 사용함.

(라) 색도

색도 측정은 여과액을 색차계(KONICA MINOLTA spectrophotometer CM-3500d)를 이용하여 'L', 'a', 'b'값을 측정함.

(마) 물성

김치의 물성측정은 Rheometer(Sun rheometer compac-100II, Sun Scientific Co., Ltd)를 사용하여 측정함. 시료는 배추하단으로부터 7 cm 지점의 줄기부위를 3×3 cm로 준비한 후 adaptor No. 4(3 mm)를 이용하여 경도를 측정함. 측정 조건은 Fixed depth 10 mm, Distance 200%, Table speed 60 mm/min, Road cell max weight 2 kg으로 하였음.

(바) 유기산

유기산은 김치 여과액에 증류수 1 mL를 가하여 혼합한 후 원심분리(1,550 ×g, 10 min)하여 얻은 상등액을 0.45 μm membrane filter(Adventec)로 여과함. 여과액은 10배 희석한 후 HPLC(ICS-3000, Dionex Co., Sunnyvale)를 이용하여 유기산을 분석하였음. 표준물질은 malic acid, succinic acid, acetic acid, lactic acid, citric acid(Sigma Chemical Co.)를 사용함. 컬럼은 Capcell pak C18(4.6 × 250 mm, 5 μm, Shiseido)을 사용하였고, solvent는 0.02% KH₂PO₄(pH 2.8)를 사용하였으며 flow rate는 0.2 mL/min로 설정함. UV 조건은 210 nm, injection volume은 20 μL로 분석함.

(사) 유리 아미노산

유리 아미노산 분석을 위하여 김치 여과액 0.5 g에 16% TFA 1 mL를 가하여 1시간 방치한 후, 원심분리(90 ×g, 5 min)하여 농축하고 0.02 N HCl를 이용하여 5 mL로 정용하여 자동아미노산분석기(HITACH L-8900)로 분석함. 분석조건은 표 2와 같음. 표준용액은 Wako 표준 아미노산 Amino acid Mixture Standard Solution Type ANII(Wako, Cat No : 015-14401, Lot No : TSE8059), Type B(Sigma, Cat No : 016-08641, Lot No : TSK8775)로부터 각각 시료 2 mL를 취하여 0.02 N HCl로 희석하여 50 mL로 제조하여 사용함.

표 2. 유리 아미노산 분석 조건

분석조건

System Amino acids analyzer (HITACH L-8900)
 Column Column for physiological Fluids Analysis #2622(4.6 × 60 mm)
 Injection vol. 20μL
 Mobile phase

| | | | | | | |
|-----|------|------------|------------|------|-----|-------|
| 펌프 | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 |
| 이동상 | PF-1 | PF-2 | PF-3 | PF-4 | H2O | PF-RG |
| 펌프 | R1 | R2 | R3 | | | |
| 이동상 | Nin | Nin-Buffer | 5% Ethanol | | | |

| Time (min) | %B1 | %B2 | %B3 | %B4 | %B5 | %B6 | Pump1 Flow rate (mL/min) | Column Temp. | %R1 | %R2 | %R3 | Pump2 Flow rate (mL/min) |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------------|--------------|-----|-----|-----|--------------------------|
| 0.0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.350 | 38 | 50 | 50 | 0 | 0.3 |
| 2.0 | | | | | | | | 30 | | | | |
| 21.5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 21.6 | 80 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 60 | | | | |
| 33.5 | 70 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 33.6 | 10 | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 36.5 | | | | | | | | 40 | | | | |
| 43.5 | 10 | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 43.6 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 50.5 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 70 | | | | |
| 50.6 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 68.4 | | | | | | | | 45 | | | | |
| 69.5 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 69.6 | 60 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | | | | | | |
| 75.0 | 60 | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | | | | | | |
| 75.1 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | | | | | | |
| 82.0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | | | | | | |
| 82.1 | 0 | 20 | 0 | 80 | 0 | 0 | | | | | | |
| 92.5 | | | | | | | | 70 | | | | |
| 99.5 | 0 | 20 | 0 | 80 | 0 | 0 | | | | | | |
| 99.6 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | | | | | | |
| 112.5 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | | | | | | |
| 112.6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | | | | | | |
| 116.0 | | | | | | | | | 50 | 50 | 0 | |
| 116.1 | | | | | | | | | 0 | 0 | 100 | |
| 121.5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | | | | | | |
| 121.6 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 125.0 | | | | | | | | 38 | | | | |
| 126.0 | | | | | | | | | 0 | 0 | 100 | |
| 126.1 | | | | | | | | | 50 | 50 | 0 | |
| 148.0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |

(아) 휘발성 향기성분 분석

숙성에 따른 묵은지의 향기성분 분석은 김치 여과액을 Head space vial에 3 mL씩 분주하여 HP 7694 Headspace sampler(Hewlett-Packard Co.)에 삽입하여 표 3과 같은 조건으로 분석함. 시료 내 향기성분들은 Willy 08 library를 이용하여 동정함.

표 3. 휘발성 향기 성분 분석 조건

| Headspace | | GC/MS | |
|-----------------------------|---------|---------------------------|--|
| Sample Temperature | 80°C | injector | 200°C, Splitless |
| Equilibration Time | 30 min | Column | J&W Scientific, HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 μm) |
| Mix ON | High | Temperature | 40°C(hold 5 min). |
| Pressure Stabilization Time | 0.1 min | Program | Increase to 100°C at 4°C/min(hold 15 min) |
| Loop Fill Time | 0.5 min | Carrier | Helium, at 1.5 mL/min |
| Loop Stabilization Time | 0.1 min | Ion Trap | 150°C |
| Inject Time | 1 min | Temperature | 230°C |
| Sample Loop Temperature | 90°C | Transfer Line Temperature | 230°C |
| Tresfer Line Temperature | 100°C | Mass Range | 40~550 amu |

(자) 미생물 균총 분석

김치의 미생물 분석을 위해 사용한 배지로는 총균수는 PCA(plate count agar, Merck) 배지, 유산균수는 MRS(Difco Laboratories)와 BCP(bromocresol purple, EIKEN) 배지, 효모는 PDA(potato dextrose agar, Merck)와 YPD(Difco Laboratories) 고체배지를 사용함. 김치는 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치 여과액을 0.9% saline solution으로 10배씩 연속 희석하여 각각의 평판배지에 100 μL씩 도말한 후 총균은 37°C에서 2일간, 유산균은 30°C에서 2일간, 효모는 25°C에서 2일간 배양하였음.

(차) 관능평가

관능 평가는 훈련된 전남식품산업연구센터 연구원 12명이 묵은지 맛(mujeunji flavor)대한 평가자의 기호도를 5점 척도법으로 평가함. 각 항목들은 1점(매우 나쁨), 3점(보통), 5점(매우 좋음)으로 평가함.

나. 시중 묵은지의 특성 분석 및 발효 균주 분리

(1) 시중 묵은지 구입

강원도, 경기도, 경남, 경북, 충남, 충북, 전남, 전북 등 제조 지역별로 6개월~3년 6개월 숙성된 묵은지 22종을 구입함. 시중 묵은지는 제조지역 및 숙성기간에 따라 나열하여 M1~M22번으로 명명함. 묵은지의 사용재료는 표 4와 같음.

표 4. 지역별 시중 묵은지 목록

| | 제품명 | 제조 지역 | 숙성 기간 | 사용재료 |
|-----|-------------|-------|--------|---|
| M1 | 오모가리묵은지 | 강원도횡성 | 1년6개월 | 절임배추73.9%(배추98%,식염2%), 멸치액젓, 콩치액젓, 진한 다시마베이스, 고춧가루, 대파, 마늘, 양파, 생강, 종가집 새우액젓, 설탕, 종가집 김치전용풀 |
| M2 | 오복 묵은지 | 강원도횡성 | 1년 | |
| M3 | 푸른가족일품 숙성김치 | 경기도안성 | 4개월 | 배추63.5%, 무, 일품전용풀(알파미), 멸치액젓, 고춧가루, 마늘, 양파, 대파, 갓/부추, 새우젓, 일품전용 김치양념(명태, 다시마, 양파, 무, 건새우), 밀분해추출물, 생강, 설탕, 제재염, 효소처리 스테비아 |
| M4 | 농가김치 | 경기도포천 | 2년 | 배추, 무, 양파, 고춧가루, 생강, 마늘, 대파, 새우젓, 멸치액젓, 갓, 제재염 |
| M5 | 옹골찬 묵은지 | 경남김해 | 1년 | 배추78%, 고춧가루4%, 멸치젓3%, 새우젓5%, 생강1%, 마늘2%, 물엿, 정제염 |
| M6 | 참한묵은지1 | 경남김해 | 1년 | 배추80%, 다시액(건멸치,건다시마), 고춧가루, 멸치액젓, 마늘, 전분풀, 새우젓, 생강, L-글루타민산 나트륨, 식염 |
| M7 | 참한묵은지2 | 경남김해 | 2년 | |
| M8 | 참한묵은지3 | 경남김해 | 3년 | |
| M9 | 전통참묵은지 | 경남전관 | 2년7개월 | 배추78%, 무, 고춧가루, 멸치젓, 새우젓, 양파, 마늘, 생강 |
| M10 | 토종맛묵은지 | 경북구미 | 3년6개월 | 배추70%, 마늘, 파, 생강, 고추, 청강, 새우, 멸치액젓, 참쌀풀 |
| M11 | 한누리묵은지 | 경북봉화 | 9-10개월 | 배추80%, 무, 고춧가루, 멸치젓, 새우젓, 양파, 마늘, 생강 |
| M12 | 청아묵은지 | 부산 | 1년 | 무우65%, 마늘, 파, 생강, 배, 당근, 절임고추, 다시마액기스 |
| M13 | 청매실묵은지 | 전남광양 | 2년 | 배추77%, 청매실3%, 고추분4%, 멸치액젓4%, 매실원액3%, 새우젓, 매실건가루, 마늘, 생강, 파, 무, 소금 |
| M14 | 장흥표고묵은지 | 전남장흥 | 1년 | 배추78%, 고춧가루6%, 표고버섯가루2%, 새우젓3%, 참쌀가루2%, 파/마늘/생강/양파/미나리3%, 식염3%, 생새우1%, 멸치액젓2% |
| M15 | 황토방묵은지 | 전남해남 | 2년 | 배추78%, 무, 고춧가루, 멸치젓, 새우젓, 양파, 마늘, 생강 |
| M16 | 장독대묵은지 | 전남해남 | 2년 | 배추75%, 무, 고춧가루, 멸치젓, 새우젓, 양파, 마늘, 생강 |
| M17 | 이맑은묵은지 | 전남해남 | 1년 | 절임배추77.8%(배추98%,소금), 참쌀풀, 고춧가루, 무, 멸치액젓, 새우젓, 마늘, 대파, 양파, 홍갓, 생강, 설탕, 제제소금, 참깨, 표고버섯 |
| M18 | 푸른가족 숙성김치 | 전북무주 | 1년5개월 | 배추70%, 무, 식염, 고춧가루, 마늘, 생강, 파, 양파, 멸치액젓 |
| M19 | 한아름묵은지 | 충남충주 | 1년3개월 | 배추77%, 고춧가루3%, 멸치젓2%, 새우젓4%, 생강1%, 마늘2%, 물엿, 정제염 |
| M20 | 6개월묵은지 | 충북청원 | 6개월 | 배추84.55%, 무채, 양파, 부추, 고춧가루, 대파, 마늘, 멸치액젓, 생강, 제재염, 정백당, 밀가루풀, L-글루타민산나트륨 |
| M21 | 활옥광산묵은지 | 충북충주 | 1년 | 배추82%, 고춧가루3%, 마늘2%, 파15%, 생강1%, 사과1.7%, 젓갈1%, 소금0.8% |
| M22 | 이가장터묵은지 | 충북충주 | 1년5개월 | 배추75%, 무7%, 고춧가루3%, 마늘2.5%, 생강0.5%, 양파2.5%, 새우젓3%, 갓1%, 참쌀풀3%, 다시육수2.5% |

(2) 시중 묵은지의 발효 특성 분석

pH, 산도, 당도, 염도, 환원당, 물성 및 미생물학적 특성 분석을 상기의 방법으로 시행함.

(3) 시중 묵은지의 관능적 특성 및 요소별 상관관계 분석

시중 묵은지 22종에 대한 관능검사는 색깔, 윤기, 풋내, 군내, 짠맛, 단맛, 신맛, 감칠맛, 아삭함, 질감, 전체적 기호도 등 11가지 특성을 조사함. 관능검사원은 전남식품산업연구센터 직원 중 관능검사 경험이 있는 20명을 선정하였음. 관능검사 시료는 포기로 된 묵은지를 2x2 cm로 자른 후, 일회용 플라스틱 용기(직경 5 cm, 높이 1 cm)에 5 조각씩 담고 뚜껑을 씌워 관능검사 요원에게 제공함. 각 용기에는 임의로 정한 시료 이름을 적어놓았음. 이렇게 준비한 시료는 관능검사를 위해 임시로 마련한 장소에서 개별적으로 제공한 후 실시함. 각 특성의 평가는 5점 척도법으로 평가하였으며, 1점으로 갈수록 기호도가 낮고, 5점으로 갈수록 높아지는 것으로 나타나도록 하였음. 요소별 상관성은 Sigma plot을 이용하여 도식화하였음.

(4) 묵은지 발효 미생물의 분리

(가) 유산균의 분리

묵은지의 발효 유산균을 분리하기 위하여 묵은지 여과액을 BCP(EIKEN) 평판배지에 도말하여

37°C에서 48시간 배양한 후 노란색으로 변한 colony를 분리하고 이를 다시 2% CaCO₃가 함유된 MRS plate에 배양하여 투명환을 생성한 균주를 유산균으로 추정하고 형태학적으로 다른 균주를 분리함.

(나) 효모의 분리

묵은지 발효 효모를 분리하기 위한 배지는 일반 세균의 생육을 저해하기 위하여 젖산으로 pH 4.0으로 보정된 PDA를 사용함. 묵은지 여액을 PDA(pH 4.0)에 도말하여 25°C에서 2일간 배양 후 나타난 colony위에 TTC(2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride, J.T.Baker) agar를 중층시켜 30°C에서 3시간 정지한 후 나타난 colony의 정색에 의하여 다른 색깔을 나타내고 형태학적으로 다른 균주를 분리함.

(5) 묵은지 분리 균주의 동정

(가) 형태학적 특성

분리된 균주에 대하여 그람염색 및 현미경 관찰을 시행하여 형태학적 특성을 관찰함.

(나) 생화학적 특성

균주의 당대사능을 이용한 유산균 동정 kit인 API 50CHL(BioMerieux)을 사용하여 유산균 당대사능을 확인함. 당대사능 확인은 같은 김치에서 분리된 균주들 중 우점을 나타낸 균주에 대하여 선택적으로 확인함.

(다) 분자생물학적 동정

분리 균주의 분자생물학적 동정을 위해 유산균은 16S rRNA 염기서열을, 효모는 18S(partial), ITS, 5.8S, 28S(partial)을 포함하는 rRNA의 염기서열을 결정된 후 NCBI(National Center for Biotechnology Information)의 blastn program을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열들과 비교하였으며, 표준균주(type strain)와의 상동성은 Clustal X와 Mega 2 program을 이용하여 분석함.

다. 모의발효 실험을 통한 묵은지 종균의 선정

(1) 1차 모의 발효 실험

(가) 사용한 균주

시중 묵은지에서 분리한 유산균과 효모 중 관능적 풍미가 우수한 묵은지에서 우점을 나타내는 균주를 기준으로 유산균 9종(M3-1, M4-1, M5-1, M6-1, M7-1, M11-1, M13-1, M16-1, M17-2)과 효모 6종(M1DP, M2LP, M4LP, M7DPW, M10R, M11W)을 선별하여 사용함.

(나) 김치 제조

모의발효를 위한 김치를 제조하기 위하여 화원농협 김치가공공장으로부터 당일 생산된 이맑은 묵은지를 제공받아 사용함. 김치에 첨가한 균주는 유산균은 MRS 배지에서 30°C, 24시간 배양하였고, 효모는 YPD 배지에서 25°C, 24시간 배양하여 원심분리한 균체침전물을 생리식염수에 현탁하여 준비함. 묵은지 250 g에 분리균주를 1×10^6 CFU/g로 첨가하여 잘 섞은 다음 500 mL 플라

스틱 시료통에 담아 보관하였음. 모의발효를 위한 김치의 숙성은 10℃에서 7일간 1차 발효한 후 0℃에서 28일간 숙성하였음.

(다) 관능평가

관능패널은 식품센터와 화원농협직원 20명을 대상으로 하여 관능평가를 실시함. 시료는 밀폐된 용기로 김치를 제공하였으며, 패널들은 김치에 대한 향미를 묘사분석으로 평가함. 관능평가를 통하여 묵은지의 향미와 가장 일치하며 기호성이 우수한 시료의 발효 균주를 선정하여 2차 모의발효 실험에 사용함.

(2) 2차 모의 발효 실험

(가) 사용균주

1차 모의 발효를 통하여 유산균 4종(M7-1, M11-1, M13-1, M17-2)과 효모 1종(M7DPW)을 선정함. 선정된 균주의 strain명을 보다 간소화하기 위해 유산균 M7-1은 ML7로 M11-1은 ML11로 M13-1은 ML13으로 M17-2는 ML17로 변경하였고, 효모 M7DPW는 MY7으로 변경하였음.

(나) 김치 제조

김치는 화원농협 김치가공공장에서 제조한 이맑은 묵은지를 숙성이 되지 않은 상태로 제조당일 공급받아 사용하였으며, 3~5 cm로 절단하여 준비하였음. 김치에 첨가할 균주는 상기의 방법으로 동일하게 준비한 후 김치 중량 기준으로 유산균은 1×10^7 CFU/g을, 효모는 1×10^5 CFU/g을 단독 혹은 혼합형태로 김치에 첨가하여 버무린 후 1 kg 용기에 담아 10℃에서 7일 동안 발효시킨 후 0℃에서 30일까지 숙성하였음.

(다) 모의발효 김치의 발효특성 분석

모의발효 김치는 발효 0, 2, 4, 7, 10, 20, 30일 지점에서 pH와 산도 및 미생물학적 특성을 모니터링 하였으며, 발효 30일 후에 물성, 유기산, 아미노산 분석을 시행함. 분석 방법은 상기의 방법과 동일함.

(라) 휘발성 향기 성분 분석

향기 성분 분석을 위한 시료는 김치를 동결건조한 후 분쇄한 김치분말을 사용함. 김치분말 2 g을 Head space vial에 넣고 HP 7694 Headspace sampler(Hewlett-Packard Co.)에 삽입하여 표 5와 같은 조건으로 분석함. 시료 내 향기성분들은 Willy 08 library를 이용하여 동정함.

표 5. 휘발성 향기 성분 분석 조건

| Headspace | | GC/MS | |
|-----------------------------|---------|---------------|---|
| Sample Temperature | 80℃ | injector | 250℃, Splitless |
| Equilibration Time | 30 min | Column | J&W Scientific, DB-5MS (30 m×0.25 mm×0.5 μm) |
| Mix ON | High | Temperature | 40℃(hole 10min). |
| Pressure Stabilization Time | 0.1 min | Program | Increase to 100℃ at 2℃/min(hole 5min) |
| Loop Fill Time | 0.5 min | | Increase to 200℃ at 10℃/min(hole 5min) |
| Loop Stabilization Time | 0.1 min | Carrier | Helium, at 1.0 mL/min |
| Inject Time | 1 min | Ion Trap | 150℃ |
| Sample Loop | | Temperature | 150℃ |
| Temperature | 90℃ | Transfer Line | 230℃ |
| Tresfer Line | | Temperature | 230℃ |
| Temperature | 100℃ | Mass Range | 40~550 amu |

(마) 관능평가

관능 평가는 훈련된 전남식품산업연구센터 연구원 12명이 외관(appearance), 향미(flavor), 묵은지 맛(mukeyunji flavor), 신맛(sourness), 탄산미(carbonated flavor), 감칠맛(savory taste), 질감(texture), 종합 기호도(overall acceptability)에 대하여 평가자의 기호도를 5점 척도법으로 평가함. 각 항목들은 1점(매우 나쁨), 3점(보통), 5점(매우 좋음)으로 평가함.

라. 종균 묵은지의 제조 및 발효 특성 분석

(1) 종균 묵은지의 제조

(가) 사용 균주

모의 발효 실험을 통하여 발효특성 및 관능적 특성이 우수한 두개 균의 발효 균주를 선정함. 선정된 균주는 단일균주로 유산균 1종(*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ML7)과 혼합균주로 유산균 1종(*Lactobacillus curvatus* ML17)과 효모 1종(*Saccharomyces servazzii* MY7)을 묵은지 제조를 위한 종균으로 사용함.

(나) 김치 제조

종균 묵은지를 위한 김치를 제조하기 위하여 화원농협 김치가공공장에서부터 묵은지용 절임배추와 양념을 받아 실험구별로 각 4 kg씩 포기김치로 제조함. 묵은지 배합비율은 상기 배합비와 동일함. 종균 첨가를 위하여 묵은지 양념에 유산균은 김치 g당 10^7 CFU를, 효모는 김치 g당 10^5 CFU를 혼합하여 절임배추에 버무림. 종균을 첨가하지 않은 김치를 대조구 김치로 제조함. 제조된 김치는 10℃에서 7일간 1차 발효시킨 후 김치냉장고(-1℃)에서 90일까지 숙성하였음.

(2) 발효특성 조사

종균첨가 김치는 0, 7, 30, 60, 90일 지점에서 pH와 산도, 물성, 미생물 균총 변화를 모니터링 하였으며. 최종 발효점인 90일 지점에서 유기산, 아미노산 등을 추가 분석하고 화원농협 김치가공공장에서 시판 중인 1년 숙성 묵은지(이맑은 묵은지)를 양성 대조구로하여 비교분석

하였음. 각 항목은 상기의 방법과 같이 분석함. 종균의 점유율 확인은 1차적으로 집락의 특이적 형태를 관찰하고 광학현미경(Olympus BX41TF, Olympus Co.)으로 세포의 형태를 관찰한 후 2차적으로 16S rRNA 및 18S rRNA 염기서열 분석을 통하여 종균의 rRNA 염기서열과 동일함을 확인함.

(3) 관능 평가

김치의 관능평가는 발효 90일 후에 시행하였으며 대조군으로서 종균을 첨가하지 않은 대조구 김치와 시판중인 1년 숙성 묵은지(이맑은 묵은지)를 함께 평가함. 관능평가는 미리 훈련된 전남식품산업연구센터 연구원과 화원농협 김치가공공장 직원 20명이 시행하였으며, 외관(appearance), 군덕내(off-flavor), 묵은지 맛(mukeunji flavor), 신맛(sourness), 탄산미(carbonated flavor), 감칠맛(savory taste), 질감(texture), 종합 기호도(overall acceptability)에 대하여 평가자의 기호도를 5점 척도법으로 평가함. 각 항목에 대한 점수는 군덕내의 경우 1점(매우 약함), 3점(보통), 5점(매우 강함)으로, 그 외 항목들은 1점(매우 나쁨), 3점(보통), 5점(매우 좋음)으로 평가함. 평가 결과는 SPSS program(Statistical Package for Social Science, version 17, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 사후 검증함($p < 0.05$).

마. 묵은지 종균의 산업적 내구성 및 기능성 평가

(1) 생육곡선 측정

ML17 유산균은 30°C, MRS 액체배지에서 정치배양하고 MY7 효모는 25°C, YPD 액체배지에서 진탕배양(180 rpm)하면서 배양 72시간 까지 생육도를 측정함. 생육도는 배양시간에 따른 생균수를 측정하였으며 동시에 배양액의 pH를 측정함.

(2) 인체 안전성 평가

(가) 용혈성 테스트(Hemolysis test)

인체안전성 확인을 위하여 적혈구 분해현상인 β -용혈성 여부를 조사함. Blood agar plate(Hanil Komed Co., Ltd)에 균주를 streaking 한 후 유산균은 30°C, 효모는 25°C에서 각각 48시간 배양하여 균체 주위에 투명한 생성여부를 측정함. 양성반응 대조군으로 *Bacillus cereus* KCCM 11204를 사용함.

(나) 효소활성 검사

효소활성 측정을 위해서는 API ZYM kit(BioMerieux SA)를 사용함. 균주는 suspension medium(BioMerieux SA)에 5~6 McFarland로 탁도를 맞춘 후 스트립의 각 cupule에 65 μ L 씩 분주하여 37°C에서 4시간 배양함. 반응 확인은 ZYM A와 ZYM B 시약(BioMerieux SA)을 각각의 cupule에 한 방울씩 떨어뜨린 후 5분 후에 색의 변화 정도를 관찰하여 효소활성을 측정함.

(3) 산업적 내구성 평가

(가) pH 내구성

ML17 유산균은 MRS 액체배지에 30℃에서, MY7 효모는 YPD 액체배지에 25℃에서 24시간 배양한 후 원심분리(6,500 ×g, 5 min, 4℃)하여 균체를 회수한 후 5 N HCl과 5 N NaOH를 이용하여 pH가 3, 4, 5, 7, 9로 조정된 배지에 현탁하여 4℃에서 24시간 처리한 후 생균수를 측정함.

(나) 염내구성

ML17 유산균은 MRS 액체배지에 30℃에서, MY7 효모는 YPD 액체배지에 25℃에서 24시간 배양한 후 원심분리(6,500 ×g, 5 min, 4℃)하여 균체를 회수한 후 NaCl이 2, 5, 8, 10, 15% 함유된 배지에 현탁하여 4℃에서 24시간 처리한 후 생균수를 측정함.

(4) 장내생존성 평가

ML17 유산균을 MRS 액체배지에 30℃에서 24시간 배양한 후 원심분리(6,500 ×g, 5 min, 4℃)하여 균체를 회수한 후 MRS 배지(pH 2.5)와 인공위액(pepsin 1,000 units/mL, pH 2.5)에서는 37℃에서 2시간 처리하고 인공담즙(0.3% oxgall, g/v)에서는 37℃에서 24시간 처리한 후 생존율을 확인함.

(5) 장내 부착능 확인

ML17 유산균의 장내 부착능을 Caco-2 세포주를 이용하여 조사함. 이때 장내 부착능이 우수하다고 알려진 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 양성 대조구로 사용하여 부착능을 비교함. ML17을 FBS, penicillin과 streptomycin이 첨가되지 않은 순수한 DMEM 배지로 교환된 Caco-2 세포에 10⁷~10⁹ CFU/mL이 되게 접종하여 37℃에서 5% CO₂ 조건하에 2시간동안 배양 후 부착된 유산균수를 counting하여 부착율을 확인하고, gram 염색하여 광학 현미경으로 관찰함. 부착율(%)은 Caco-2 cell에 부착한 초기 균수에 대한 부착된 균수의 비로 계산함.

(6) 항균활성 평가

(가) 사용균주

실험에 사용한 지시균주 목록과 배양 조건을 표 6에 정리함.

표 6. 항균활성 평가 지시균주

| Group | Strains | Medium | Incubation temperature |
|------------------------|--|--------|------------------------|
| Gram-positive bacteria | <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240 | LB | 37℃ |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 | LB | 37℃ |
| | <i>Bacillus cereus</i> KCCM 11204 | LB | 37℃ |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 40307 | BHI | 37℃ |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621 | LB | 37℃ |
| Gram-negative bacteria | <i>Escherichia coli</i> KCTC 12119 | LB | 37℃ |
| | <i>Escherichia coli</i> O157 ATCC 43895 | LB | 37℃ |
| | <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> KCTC 2515 | LB | 37℃ |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | LB | 37℃ |

(나) ML17 유산균에 의한 항균활성

ML17의 항균활성은 지시균주에 대하여 균체를 직접가하는 direct method법으로 측정함. 지시균을 1×10^6 CFU/plate로 도달하여 준비한 후 지시균이 도달된 평판배지위에 ML17 균주의 배양액 10 μ L를 3 cm 길이로 그어준 다음 37°C에서 24시간 배양하여 저해환 생성여부를 관찰함.

(다) ML17이 생산하는 항균물질에 의한 항균활성

Lb. curvatus ML17의 24시간 배양액을 제공한 후 5배 농축하여 지시균에 대한 항균활성을 paper disc assay법으로 측정함. 지시균이 1×10^6 CFU/plate로 도달된 배지위에 paper disc를 올리고 ML17의 5배 농축 배양액 100 μ L를 떨어뜨린 후 각 지시균의 배양 온도에서 24시간 배양하여 지시균에 대한 생육 저해환을 측정함.

(라) *Lb. curvatus* ML17의 생육에 따른 항균활성

Lb. curvatus ML17의 생육에 따른 항균활성을 측정하기 위하여 배양시간에 따른 배양액을 준비한 후 5배 농축한 조항균물질을 준비함. 조항균물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 지시균으로 사용한 *B. cereus*가 도달된 배지위에 10 μ L를 spotting(spot-on-the lawn test)하여 항균활성을 측정함. 활성역가는 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고 이 값에 1 mL에 대하여 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU/mL로 나타냄.

(마) ML17이 생산하는 항균물질의 안정성

Lb. curvatus ML17이 생산하는 항균물질의 pH의 영향을 알아보기 위하여 배양상징액을 pH 3.0~9.0으로 조정하여 37°C에서 2시간 처리 후 역가를 측정함. 이 때 같은 pH(pH 3.0~7.0)로 조정한 배지(MRS) 자체의 항균활성을 측정하여 유산균주 배양액의 항균활성 값에서 빼주어 배지의 pH가 미치는 항균활성의 영향을 제거하였음.

Lb. curvatus ML17이 생산하는 항균물질의 온도의 영향을 알아보기 위하여 조항균물질을 각 온도 조건별로 처리하여 항균활성을 측정함.

Lb. curvatus ML17이 생산하는 항균물질의 효소에 대한 영향을 알아보기 위하여 조항균물질을 효소 proteinase K, protease, trypsin, α -chymotrypsin, pronase E, α -amylase, lipase를 1 mg/mL의 농도로 37°C에서 6시간 처리하고 100°C에서 5분 동안 끓여 효소를 불활성시킨 후 잔존활성을 측정함.

(7) Mannitol 생성능 확인

Lb. curvatus ML17로부터 mannitol 생성능을 확인하기 위하여 3% fructose가 첨가된 LM 액체배지(yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g/L, NaCl 0.01 g/L, $FeSO_4$ 0.01 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.01 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.015 g/L)에 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리하여 얻은 상징액을 TLC plate에 1 μ L 점적한 후 전개용매(MeCN : EtOAc : 1-propanol : water = 85 : 20 : 20 : 15)로 10cm씩 2번 전개시켜 $AgNO_3$ -acetone 용액에서 5분, alkaline-methanol 용액에서 30분, $Na_2S_2O_3$ (1.5 M), Na_2SO_3 (0.08 M), $NaHSO_3$ (0.25 M) 용액에서 발색하여 확인함. Standard는 fructose와 mannitol을 사용함.

(8) 항산화 활성 측정

Lb. curvatus ML17의 항산화 활성 측정은 DPPH radical 소거활성을 측정하여 확인함. ML17 배양 상정액 0.5 mL에 0.1 mM DPPH 0.95 mL을 혼합하여 빛이 차단된 상태로 상온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정함.

$$\text{소거능(\%)} = [(\text{대조군의 흡광도} - \text{시료의 흡광도}) / \text{대조군의 흡광도}] \times 100.$$

(9) 암세포 성장 억제 효과 측정

암세포 성장 억제 효과를 측정하기 위하여 *Lb. curvatus* ML17로부터 상정액을 회수하여 인체 위암세포 AGS와 인체 결장암 세포 HT-29에 농도별로 처리하여 암세포 증식정도를 XTT assay로 측정함. 배양된 각각의 cell은 48 well plate에 well당 5×10^4 cells/mL이 되도록 0.5 mL씩 seeding 하고 incubator에서 24시간 동안 cell을 부착한 후 배지를 제거하고 상정액을 10, 20, 40, 80 $\mu\text{L/mL}$ 로 첨가한 배양액을 분주 후 48시간 배양함. 48시간 후, XTT-phenazine methosulfate(PMS) 용액(1 mg XTT-10 μg PMS/mL of RPMI without phenol free) 125 μL 을 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생성된 formazan을 microplate reader(MQX200R, BioTek Instruments)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함. 배양세포의 생존율은 대조구에 대한 상대적 생존율(%)로 표시함. 세포의 형태적 변화를 관찰하기 위해 배양된 각각의 cell을 culture dish(100×20 mm, Falcon Co.)에 1×10^5 cells/mL이 되도록 seeding하고 incubator에서 24시간 동안 부착시킨 후 상정액을 10, 20, 40, 80 $\mu\text{L/mL}$ 를 첨가한 배양액을 분주하여 48시간 동안 배양한 후 광학현미경(TMS-F, Nikon Co.)으로 관찰함.

2. 연구 결과

가. 묵은지의 발효 특성 분석

주관기관인 화원농협에서 제조되고 있는 묵은지의 일반적인 발효 특성을 조사하고 계절에 따른 1차 발효 온도(겨울 5°C, 봄·가을 10°C) 및 2차 숙성 온도에 따른 발효 특성과 관능적 상관관계를 비교분석함.

(1) 이화학적 특성

(가) pH 및 산도 변화

묵은지의 숙성기간이 지날수록 pH는 낮아지고 산도는 높아지는 경향을 나타냄. 1차 발효 종료 시점인 7일에 초기 5°C에서 발효시킨 MK1과 MK2가 10°C에서 발효시킨 MK3과 MK4보다 더 높은 pH와 더 낮은 산도를 나타내며 발효가 더 느리게 진행됨. 1차 발효 후 2차 숙성온도에 따라 발효양상에 영향을 주는 것으로 나타남. 0°C에서 2차 숙성한 MK1과 MK3의 적숙기가 112일과 84일임에 반해 4°C에서 숙성한 MK2와 MK4는 56일과 24일로 나타나 4°C숙성의 경우 발효가 급격히 진행됨을 알 수 있음. 적숙기 이후 시점부터는 발효가 완만하게 진행되어 발효 종료시점인 231일에는 모든 실험구에서 시판중인 묵은지와 유사한 수준의 pH(pH 3.87~3.96)와 산도(1.18~1.25%)를 나타냄(그림 1~2).

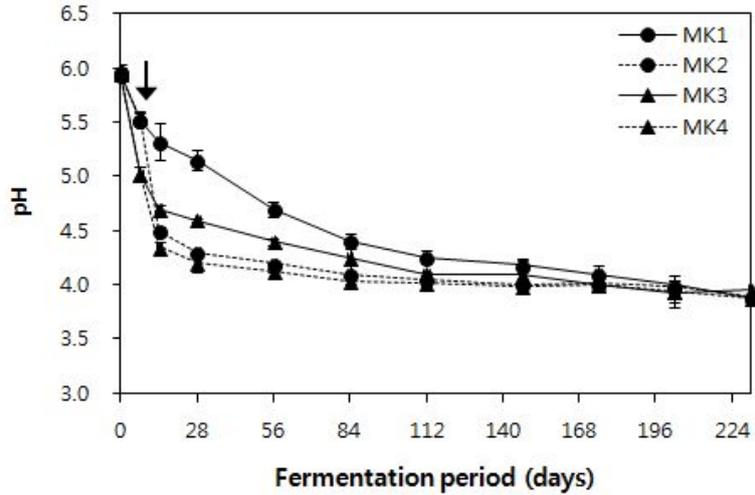


그림 1. 묵은지 숙성 중의 pH 변화
The arrow indicate the start of storage.

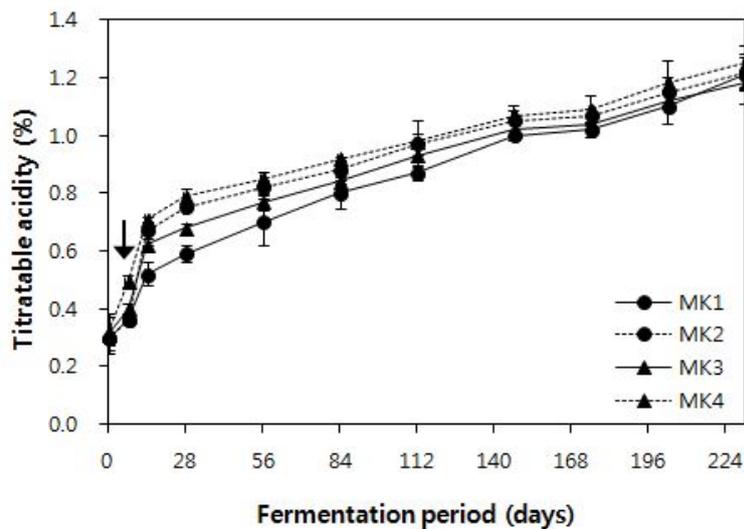


그림 2. 묵은지 숙성 중의 산도 변화
The arrow indicate the start of storage.

(나) 염도 변화

묵은지 숙성 중의 염도는 발효가 진행됨에 따라 일정한 수준을 유지하다가 발효 중기이후 완만하게 감소하였음. 이는 김치의 삼투작용으로 인한 결과로 생각되며 실험구에 따른 차이는 보이지 않았음(그림 3).

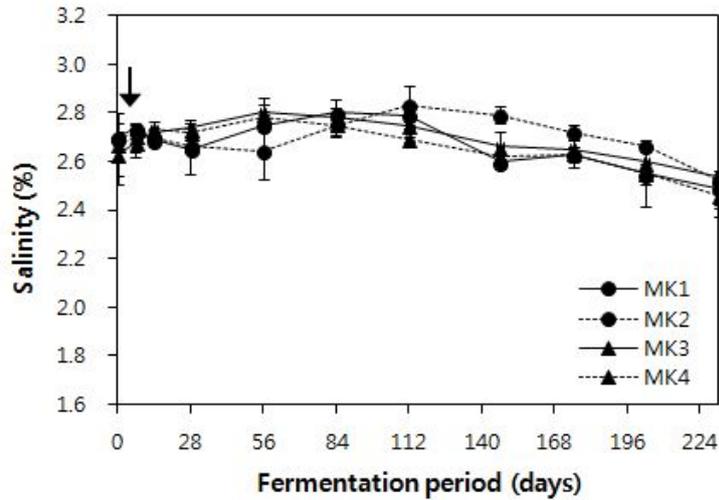


그림 3. 묵은지 숙성 중의 염도 변화
The arrow indicate the start of storage.

(다) 환원당 변화

김치발효에서 환원당의 변화는 보통의 경우 발효초기에 크게 감소하다가 이후 완만한 감소형태를 보이고 숙성이 끝날 무렵 거의 소실됨. 본 실험에서도 발효온도와 저장온도에 따라 큰 차이 없이 변화하는 양상은 일반적인 결과를 보임(그림 4). 환원당역시 발효가 더 빨리 진행되는 숙성조건 4°C에서 발효미생물의 당대사로 인해 더 낮은 수치를 나타내었으며 발효 후기에서 말기로 갈수록 감소폭은 작으나 꾸준히 감소함.

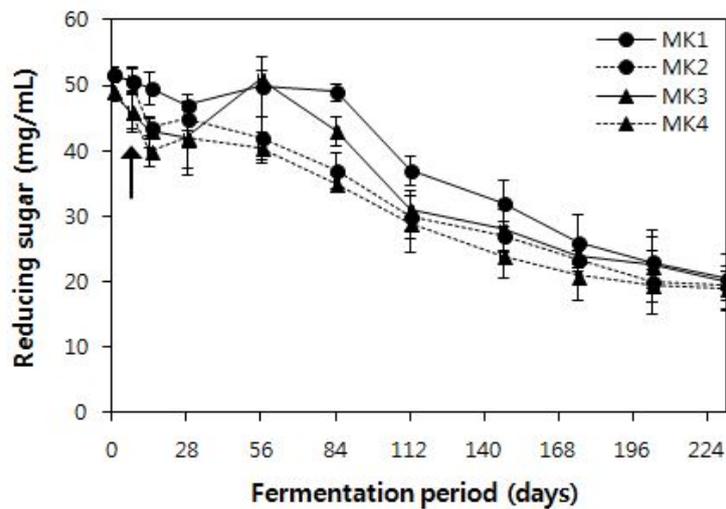


그림 4. 묵은지 숙성 중의 환원당 변화
The arrow indicate the start of storage.

(2) 색도 변화

발효가 진행됨에 따라 김치의 색은 점점 밝아 졌으며 황색도 역시 점점 증가함. 시료 간 큰 차이는 없으나 4°C 숙성 김치(MK2, MK4)에서 좀 더 높은 값을 나타내었으며, MK4의 황

색도가 가장 높은 것으로 나타남. 적색도는 약간씩 증가하였으나 거의 초기 값과 큰 차이 없으며 시료 간에도 유의적인 차이를 보이지 않음(그림 5).

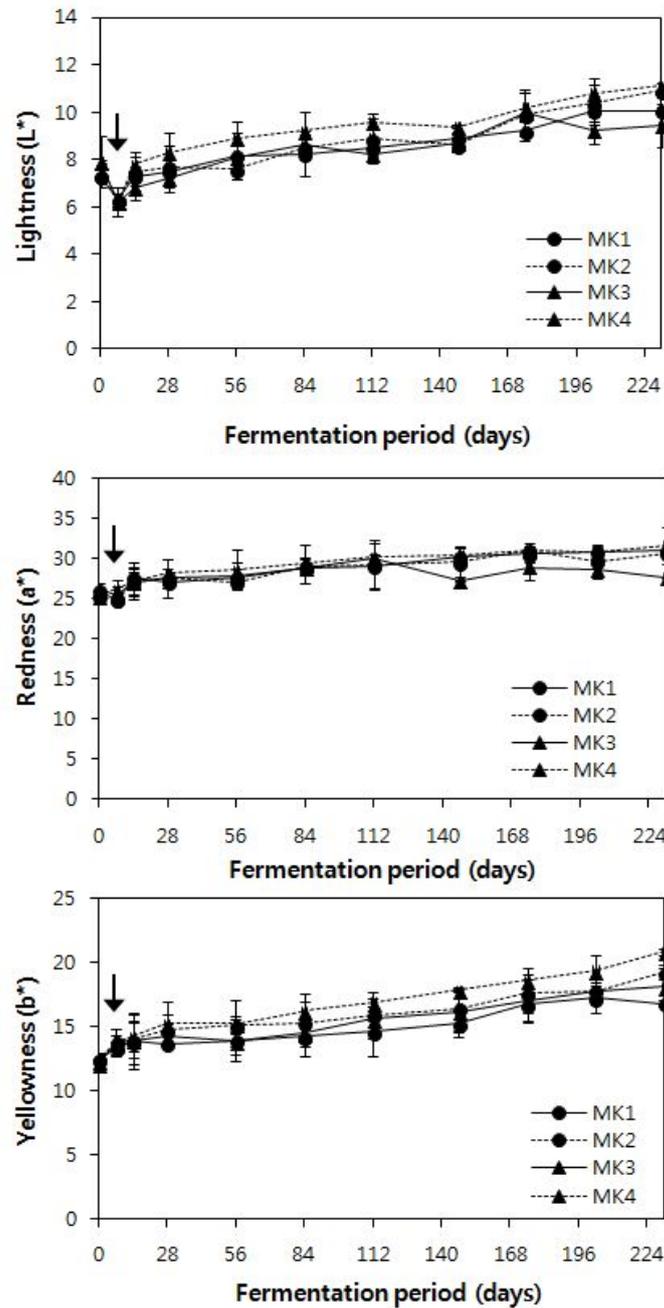


그림 5. 묵은지 숙성 중의 색도 변화

The arrow indicate the start of storage. L: Measurement of lightness and varies from 100 for perfect white to zero for black, a: Measurement of redness when plus, and greenness when minus, b: Measurement of yellowness when plus, and blueness when minus.

(3) 물성 변화

김치의 숙성 기간이 지날수록 발효가 진행되면서 소금의 탈수작용에 의한 분해 효소의 활성화와 미생물들의 작용으로 인한 조직의 연화로 경도는 점차 감소하는 경향을 나타냄(그림

6). 발효의 진행 속도가 빠른 4℃ 숙성 김치(MK2, MK4)는 0℃ 숙성 김치(MK1, MK3)에 비하여 전체 발효기간 동안 상대적으로 낮은 경도 값을 나타냄. 숙성 112일 이후에 강도의 감소폭이 커지는데 이는 김치의 연부작용을 일으키는 효모의 출현으로 조직의 연화가 급격히 더 심해지는 것으로 여겨짐. 김치의 경도는 1차 발효와 2차 숙성 온도가 낮은 김치일수록 높은 값을 나타내며 아삭한 특성을 유지하였음.

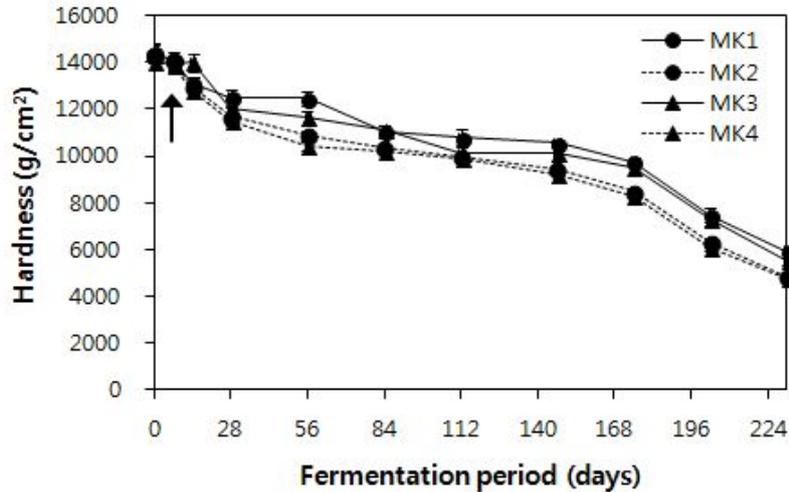


그림 6. 묵은지 숙성 중의 물성 변화
The arrow indicate the start of storage.

(4) 유기산 변화

묵은지의 주요 유기산은 함량에 따라 lactic acid, acetic acid, citric acid, malic acid 순으로 나타남(표 7). Malic acid는 1차 발효 이후 숙성에 따라 감소하여 발효 231일째에는 낮은 함량을 나타냄. Malic acid는 유산균에 의해 lactic acid와 acetic acid로 전환되므로 유산균의 증식에 따라 malic acid는 급격히 감소하는 것으로 여겨짐. Lactic acid는 1차 발효 후 유산균의 증식에 따라 발효 14일에서 84일 사이에 최대 함량을 나타내었으며, 이 후 완만하게 감소하였으나 발효 말기까지 높은 함량을 유지함. Acetic acid는 1차 발효 후 발효 28일(MK2, MK3, MK4) 또는 84일(MK1) 사이에 최대 함량을 나타내었으며, 이 후 발효 기간 동안 비슷한 수준을 유지함. Citric acid는 모든 김치에서 발효 28일에 최대 함량을 나타내었으며, 발효가 진행됨에 따라 점진적으로 감소하여 발효 말기에는 MK2, MK3, MK4 김치에서 낮은 함량을 나타냄. 1차 발효 온도가 10℃인 경우 5℃ 조건에 비하여 유산균의 생육이 빨리 진행되면서 1차 발효기간 동안 lactic acid와 acetic acid의 함량이 급격히 증가하였음. 유기산 함량 변화에서 2차 숙성 온도에 따른 영향은 유의성 있게 나타나지 않음.

표 7. 묵은지 숙성 중의 유기산의 변화

| Kimchi | Days | Organic acids (mg%) | | | | |
|--------|------|---------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | | Malic acid | Lactic acid | Acetic acid | Citric acid | Succinic acid |
| MK1 | 0 | 167.63 | 35.53 | 16.94 | 238.47 | - |
| | 7 | 256.12 | 99.41 | 24.45 | 259.47 | - |
| | 14 | 81.63 | 267.67 | 37.90 | 280.93 | - |
| | 28 | 34.71 | 371.91 | 120.26 | 1167.30 | - |
| | 56 | 22.68 | 455.05 | 155.35 | 984.46 | - |
| | 84 | 20.31 | 690.23 | 238.27 | 743.57 | - |
| | 112 | 16.16 | 649.92 | 159.26 | 988.39 | - |
| | 147 | 14.48 | 625.74 | 181.51 | 876.94 | - |
| | 175 | 36.73 | 551.87 | 184.55 | 418.88 | - |
| | 203 | 35.56 | 607.03 | 198.12 | 264.10 | - |
| | 231 | 28.37 | 660.40 | 203.37 | 187.14 | - |
| MK2 | 0 | 167.63 | 35.53 | 16.94 | 238.47 | - |
| | 7 | 256.12 | 99.41 | 24.45 | 259.47 | - |
| | 14 | 156.85 | 391.86 | 61.25 | 511.79 | - |
| | 28 | 211.39 | 697.81 | 183.72 | 1123.49 | - |
| | 56 | 61.53 | 681.91 | 163.60 | 789.92 | - |
| | 84 | 43.83 | 586.27 | 107.11 | 685.31 | - |
| | 112 | 35.40 | 525.53 | 151.55 | 436.37 | - |
| | 147 | 43.65 | 570.57 | 137.69 | 378.02 | - |
| | 175 | 36.09 | 639.45 | 220.62 | 201.00 | - |
| | 203 | 36.55 | 531.39 | 222.05 | 115.32 | - |
| | 231 | 30.36 | 632.01 | 235.33 | 52.47 | - |
| MK3 | 0 | 167.63 | 35.53 | 16.94 | 238.47 | - |
| | 7 | 132.03 | 668.77 | 72.25 | 147.86 | - |
| | 14 | 146.21 | 853.70 | 196.34 | 223.42 | - |
| | 28 | 122.73 | 720.24 | 267.33 | 895.20 | - |
| | 56 | 69.43 | 725.51 | 382.83 | 622.37 | - |
| | 84 | 65.30 | 655.14 | 235.74 | 404.71 | - |
| | 112 | 62.11 | 690.88 | 198.12 | 354.25 | - |
| | 147 | 58.26 | 579.47 | 172.69 | 187.94 | - |
| | 175 | 20.42 | 631.94 | 172.34 | 159.82 | - |
| | 203 | 24.52 | 676.43 | 196.56 | 129.84 | - |
| | 231 | 12.67 | 703.71 | 183.09 | 53.31 | - |
| MK4 | 0 | 167.63 | 35.53 | 16.94 | 238.47 | - |
| | 7 | 132.03 | 668.77 | 72.25 | 147.86 | - |
| | 14 | 268.63 | 942.92 | 121.95 | 534.23 | - |
| | 28 | 206.10 | 864.95 | 296.28 | 690.66 | - |
| | 56 | 38.78 | 781.53 | 292.77 | 601.71 | - |
| | 84 | 23.72 | 615.61 | 288.95 | 343.12 | - |
| | 112 | 21.53 | 729.89 | 236.22 | 299.18 | - |
| | 147 | 19.14 | 727.22 | 175.85 | 167.82 | - |
| | 175 | 14.20 | 604.54 | 258.48 | 95.16 | - |
| | 203 | 7.64 | 543.00 | 322.55 | 88.79 | - |
| | 231 | 6.99 | 670.58 | 230.09 | 87.60 | - |

-; not detected.

(5) 유리 아미노산의 변화

유리 아미노산은 생체 활성물질의 구성성분으로서 중요할 뿐만 아니라 그 자체가 특징있는 맛을 식품에 부여하고 특히 김치에서의 유리아미노산은 맛뿐만 아니라 유산균의 번식에 영향을 주어 김치의 품질에 큰 영향을 주는 요소가 됨. 4종의 묵은지의 주요 아미노산은 asparagine, alanine, proline으로 나타났으며, 다음으로 aspartic acid, serine, glutamic acid, lysine 등의 함량이 비교적 높게 나타남(표 8). Glutamic acid와 aspartic acid는 감칠맛을 나타내며, alanine, proline, lysine은 단맛을 내는 아미노산으로 보고되어 있음. 1차 발효의 온도가 높은 경우(10℃) 다수의 아미노산들이 5℃에 비하여 증가하였으나, 2차 숙성 온도에 따른 아미노산 함량 변화는 일정한 경향성을 나타내지 않음.

표 8. 묵은지 숙성 중의 유리 아미노산의 변화

| Kimchi | Days | Free amino acids (mg/100g) | | | | | | | | | | | | | | |
|--------|------|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|---------------------|-------|-------|--------|--------|------|-------|
| | | P-Ser | Tau | PEA | Urea | Asp | Thr | Ser | Glu | Asp-NH ₂ | Sar | α-AAA | Gly | Ala | Cit | α-ABA |
| MK1 | 0 | 9.86 | 17.45 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.95 | 0.00 | 148.95 | 66.05 | 0.00 | 1.87 | 0.00 | 0.00 | 8.13 |
| | 7 | 0.00 | 10.66 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 10.83 | 19.60 | 20.09 | 75.11 | 0.00 | 1.14 | 13.04 | 53.78 | 1.51 | 6.98 |
| | 14 | 0.00 | 9.01 | 0.00 | 0.00 | 31.58 | 9.18 | 15.07 | 10.23 | 68.81 | 0.00 | 1.02 | 11.66 | 52.69 | 0.00 | 4.26 |
| | 28 | 0.00 | 9.38 | 0.00 | 0.00 | 52.96 | 16.37 | 30.71 | 18.68 | 91.81 | 0.71 | 2.25 | 18.36 | 79.32 | 0.00 | 7.40 |
| | 56 | 0.00 | 10.46 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 12.83 | 18.77 | 8.91 | 65.68 | 0.00 | 0.94 | 12.91 | 48.31 | 0.00 | 3.42 |
| | 84 | 0.00 | 8.31 | 0.00 | 0.00 | 40.29 | 18.90 | 30.90 | 19.43 | 111.94 | 0.00 | 0.99 | 20.55 | 84.11 | 0.00 | 6.38 |
| | 112 | 0.00 | 2.12 | 0.00 | 6.91 | 13.18 | 7.59 | 9.16 | 33.45 | 19.87 | 0.00 | 5.08 | 17.17 | 78.27 | 0.00 | 11.16 |
| | 147 | 15.37 | 8.37 | 44.47 | 0.00 | 47.97 | 17.79 | 28.18 | 26.10 | 111.13 | 0.00 | 0.72 | 20.46 | 68.34 | 2.81 | 5.18 |
| | 175 | 13.34 | 4.64 | 20.54 | 0.00 | 29.39 | 11.73 | 19.08 | 14.04 | 52.21 | 0.00 | 0.69 | 12.47 | 43.51 | 0.41 | 2.42 |
| | 203 | 0.00 | 3.99 | 0.00 | 0.00 | 40.00 | 11.28 | 16.81 | 37.05 | 64.54 | 0.00 | 0.71 | 11.91 | 36.59 | 0.00 | 2.36 |
| 231 | 0.00 | 7.87 | 0.00 | 10.89 | 57.30 | 23.43 | 40.81 | 24.11 | 17.19 | 0.00 | 1.48 | 27.94 | 95.70 | 0.94 | 4.33 | |
| MK2 | 0 | 9.86 | 17.45 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.95 | 0.00 | 148.95 | 66.05 | 0.00 | 1.87 | 0.00 | 0.00 | 8.13 |
| | 7 | 0.00 | 10.66 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 10.83 | 19.60 | 20.09 | 75.11 | 0.00 | 1.14 | 13.04 | 53.78 | 1.51 | 6.98 |
| | 14 | 0.00 | 14.28 | 0.00 | 0.00 | 45.40 | 19.30 | 30.79 | 27.50 | 147.41 | 3.18 | 1.20 | 21.74 | 119.48 | 0.00 | 7.37 |
| | 28 | 0.00 | 10.21 | 25.57 | 0.00 | 29.18 | 14.41 | 2.51 | 19.78 | 84.03 | 0.00 | 0.69 | 15.30 | 67.52 | 1.52 | 4.53 |
| | 56 | 0.00 | 8.26 | 0.00 | 0.00 | 27.77 | 12.17 | 17.92 | 9.33 | 64.35 | 0.00 | 0.63 | 13.57 | 55.59 | 0.00 | 3.25 |
| | 84 | 0.00 | 7.04 | 0.00 | 0.00 | 40.97 | 16.18 | 25.02 | 12.98 | 92.02 | 0.00 | 1.16 | 16.18 | 65.73 | 0.00 | 4.67 |
| | 112 | 15.92 | 3.45 | 15.70 | 0.00 | 46.48 | 16.79 | 23.06 | 13.52 | 152.30 | 0.00 | 1.31 | 17.47 | 66.81 | 0.00 | 6.35 |
| | 147 | 18.91 | 8.10 | 42.22 | 0.00 | 35.50 | 18.46 | 28.18 | 24.55 | 110.26 | 0.00 | 0.60 | 19.98 | 78.85 | 3.53 | 4.88 |
| | 175 | 9.20 | 3.33 | 13.73 | 0.00 | 14.13 | 8.20 | 11.78 | 29.85 | 45.05 | 0.00 | 0.23 | 8.68 | 32.96 | 1.22 | 2.00 |
| | 203 | 0.00 | 3.81 | 0.00 | 0.00 | 53.22 | 10.31 | 19.56 | 36.78 | 47.62 | 0.00 | 0.40 | 11.85 | 54.57 | 1.97 | 2.22 |
| 231 | 0.00 | 11.32 | 0.00 | 0.00 | 64.84 | 30.96 | 48.24 | 42.91 | 126.64 | 0.00 | 1.19 | 37.72 | 132.39 | 3.98 | 6.86 | |
| MK3 | 0 | 9.86 | 17.45 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.95 | 0.00 | 148.95 | 66.05 | 0.00 | 1.87 | 0.00 | 0.00 | 8.13 |
| | 7 | 0.00 | 13.43 | 0.00 | 0.00 | 21.15 | 14.91 | 26.73 | 86.67 | 21.10 | 0.00 | 1.22 | 18.15 | 75.27 | 2.20 | 8.08 |
| | 14 | 0.00 | 13.01 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 15.70 | 27.53 | 20.22 | 121.96 | 0.00 | 1.07 | 18.10 | 79.43 | 1.87 | 6.78 |
| | 28 | 0.00 | 12.61 | 37.13 | 0.00 | 43.17 | 17.44 | 28.43 | 21.22 | 95.20 | 0.00 | 1.03 | 18.76 | 77.36 | 0.00 | 6.56 |
| | 56 | 0.00 | 10.38 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 19.44 | 32.61 | 14.41 | 114.99 | 0.00 | 0.96 | 20.84 | 87.38 | 0.00 | 5.09 |
| | 84 | 0.00 | 8.33 | 0.00 | 0.00 | 39.06 | 18.39 | 29.72 | 16.69 | 87.61 | 2.37 | 1.00 | 19.49 | 84.78 | 0.00 | 4.79 |
| | 112 | 18.00 | 7.15 | 28.78 | 3.69 | 56.96 | 20.01 | 36.42 | 13.22 | 89.29 | 0.00 | 1.53 | 18.79 | 89.80 | 0.00 | 5.57 |
| | 147 | 23.88 | 8.11 | 45.44 | 0.00 | 43.40 | 17.90 | 31.21 | 27.63 | 115.20 | 0.00 | 0.91 | 18.75 | 81.82 | 3.05 | 4.90 |
| | 175 | 12.50 | 4.62 | 22.26 | 0.00 | 38.02 | 10.79 | 15.86 | 40.52 | 59.67 | 0.00 | 0.38 | 11.36 | 41.02 | 1.69 | 2.70 |
| | 203 | 0.00 | 3.68 | 0.00 | 0.00 | 34.76 | 11.49 | 19.00 | 32.48 | 38.62 | 0.00 | 0.38 | 12.51 | 55.46 | 5.86 | 2.25 |
| 231 | 0.00 | 6.36 | 0.00 | 0.00 | 42.36 | 19.00 | 26.01 | 32.66 | 82.36 | 0.00 | 0.63 | 20.65 | 101.68 | 10.26 | 4.89 | |
| MK4 | 0 | 9.86 | 17.45 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.22 | 0.95 | 0.00 | 148.95 | 66.05 | 0.00 | 1.87 | 0.00 | 0.00 | 8.13 |
| | 7 | 0.00 | 13.43 | 0.00 | 0.00 | 21.15 | 14.91 | 26.73 | 86.67 | 21.10 | 0.00 | 1.22 | 18.15 | 75.27 | 2.20 | 8.08 |
| | 14 | 0.00 | 6.22 | 0.00 | 0.00 | 21.24 | 6.55 | 10.01 | 6.46 | 43.45 | 0.00 | 0.72 | 7.56 | 29.83 | 0.00 | 3.23 |
| | 28 | 0.00 | 9.82 | 30.40 | 0.00 | 41.00 | 15.38 | 23.37 | 15.42 | 79.70 | 0.00 | 0.90 | 16.37 | 63.36 | 1.40 | 5.04 |
| | 56 | 0.00 | 9.21 | 0.00 | 0.00 | 37.84 | 15.60 | 25.48 | 12.41 | 83.54 | 0.98 | 0.91 | 16.22 | 71.37 | 0.00 | 3.43 |
| | 84 | 0.00 | 5.63 | 0.00 | 0.00 | 21.29 | 10.98 | 15.56 | 11.28 | 56.54 | 0.00 | 0.36 | 12.37 | 56.20 | 0.00 | 3.14 |
| | 112 | 0.00 | 5.41 | 24.12 | 0.97 | 28.33 | 15.36 | 20.74 | 23.19 | 79.37 | 0.00 | 2.15 | 18.07 | 82.27 | 0.00 | 7.53 |
| | 147 | 23.68 | 8.58 | 46.70 | 0.00 | 46.69 | 19.63 | 28.93 | 13.97 | 108.86 | 0.00 | 0.69 | 21.20 | 72.92 | 1.06 | 4.97 |
| | 175 | 13.43 | 4.86 | 20.53 | 0.00 | 26.37 | 12.49 | 17.65 | 32.83 | 67.58 | 0.00 | 0.38 | 13.55 | 40.19 | 0.71 | 2.86 |
| | 203 | 0.00 | 3.77 | 0.00 | 0.00 | 56.80 | 11.10 | 18.72 | 33.54 | 65.78 | 0.00 | 0.46 | 12.92 | 50.13 | 1.57 | 2.41 |
| 231 | 0.00 | 6.26 | 0.00 | 0.00 | 41.98 | 22.25 | 35.14 | 41.69 | 95.26 | 0.00 | 0.82 | 23.91 | 86.92 | 2.96 | 4.74 | |

| Kimchi | Days | Free amino acids (mg/100g) | | | | | | | | | | | | |
|--------|-------|----------------------------|-------|-------|--------------|--------|---------------|------------------------|-------|-------|-------|--------|------|--------|
| | | Leu | Tyr | Phe | β -Ala | b-AiBA | γ -ABA | EOHN H ₂ | Hylys | Orn | Lys | 1Mehis | His | 3Mehis |
| MK1 | 0 | 6.31 | 0.00 | 0.72 | 0.00 | 12.97 | 0.58 | 60.96 | 0.00 | 5.06 | 1.75 | 4.98 | 0.00 | 0.00 |
| | 7 | 16.72 | 7.07 | 11.48 | 3.18 | 1.40 | 8.88 | 0.00 | 0.64 | 5.87 | 21.80 | 2.62 | 5.08 | 0.00 |
| | 14 | 14.73 | 6.24 | 9.71 | 2.79 | 1.35 | 8.80 | 1.64 | 0.54 | 6.93 | 18.96 | 1.93 | 4.38 | 0.00 |
| | 28 | 26.60 | 11.60 | 18.56 | 3.99 | 3.53 | 10.52 | 3.03 | 0.91 | 10.14 | 33.04 | 3.46 | 7.76 | 0.00 |
| | 56 | 18.27 | 7.82 | 11.75 | 2.86 | 1.58 | 6.66 | 1.78 | 0.52 | 22.68 | 22.26 | 2.06 | 4.97 | 0.00 |
| | 84 | 29.95 | 11.31 | 19.48 | 4.20 | 1.95 | 9.67 | 2.77 | 0.00 | 37.57 | 34.93 | 3.45 | 8.07 | 0.00 |
| | 112 | 34.39 | 2.09 | 20.70 | 1.22 | 0.50 | 72.23 | 2.33 | 0.00 | 5.53 | 9.67 | 1.98 | 1.29 | 0.00 |
| | 147 | 29.33 | 13.17 | 18.06 | 3.05 | 1.09 | 8.28 | 2.41 | 0.32 | 33.47 | 34.32 | 2.06 | 7.24 | 0.00 |
| | 175 | 18.13 | 8.52 | 8.40 | 1.68 | 0.92 | 11.05 | 1.50 | 0.00 | 23.50 | 20.82 | 1.74 | 5.28 | 0.00 |
| | 203 | 17.31 | 8.37 | 11.05 | 1.58 | 0.96 | 5.34 | 1.81 | 0.00 | 21.68 | 19.60 | 1.44 | 4.71 | 0.00 |
| 231 | 36.16 | 18.25 | 24.36 | 2.41 | 0.09 | 76.73 | 2.89 | 0.00 | 44.17 | 41.85 | 3.82 | 12.27 | 0.00 | |
| MK2 | 0 | 6.31 | 0.00 | 0.72 | 0.00 | 12.97 | 0.58 | 60.96 | 0.00 | 5.06 | 1.75 | 4.98 | 0.00 | 0.00 |
| | 7 | 16.72 | 7.07 | 11.48 | 3.18 | 1.40 | 8.88 | 0.00 | 0.64 | 5.87 | 21.80 | 2.62 | 5.08 | 0.00 |
| | 14 | 29.05 | 11.55 | 18.48 | 4.41 | 1.89 | 14.85 | 3.24 | 0.62 | 32.86 | 33.94 | 5.03 | 8.83 | 0.00 |
| | 28 | 21.25 | 7.39 | 13.59 | 3.48 | 1.33 | 7.28 | 2.11 | 0.00 | 25.20 | 25.56 | 2.92 | 5.99 | 0.00 |
| | 56 | 20.49 | 7.31 | 13.21 | 3.38 | 1.44 | 7.23 | 1.75 | 0.46 | 20.88 | 23.61 | 1.78 | 4.90 | 0.00 |
| | 84 | 22.94 | 9.95 | 15.24 | 4.17 | 3.12 | 9.38 | 2.00 | 0.00 | 30.84 | 27.82 | 2.56 | 6.79 | 0.00 |
| | 112 | 26.86 | 11.51 | 18.82 | 0.00 | 0.00 | 109.27 | 2.85 | 0.00 | 32.48 | 30.31 | 3.52 | 8.80 | 0.00 |
| | 147 | 29.50 | 7.50 | 18.55 | 1.66 | 0.16 | 11.70 | 2.35 | 0.00 | 19.46 | 33.27 | 2.30 | 7.43 | 0.00 |
| | 175 | 13.54 | 5.38 | 8.51 | 1.38 | 0.71 | 4.77 | 1.23 | 0.00 | 14.15 | 14.69 | 1.04 | 3.20 | 0.00 |
| | 203 | 16.80 | 4.37 | 11.10 | 0.92 | 0.09 | 12.92 | 1.53 | 0.00 | 7.48 | 18.30 | 1.84 | 4.80 | 0.00 |
| 231 | 51.04 | 20.48 | 33.48 | 3.41 | 0.17 | 23.30 | 4.11 | 0.00 | 52.57 | 56.91 | 4.03 | 15.34 | 0.00 | |
| MK3 | 0 | 6.31 | 0.00 | 0.72 | 0.00 | 12.97 | 0.58 | 60.96 | 0.00 | 5.06 | 1.75 | 4.98 | 0.00 | 0.00 |
| | 7 | 22.02 | 9.41 | 14.64 | 2.85 | 0.13 | 11.33 | 0.00 | 0.77 | 8.61 | 27.74 | 3.52 | 7.05 | 0.00 |
| | 14 | 23.25 | 9.45 | 15.12 | 3.90 | 1.34 | 10.23 | 2.43 | 0.62 | 17.83 | 28.44 | 3.52 | 7.06 | 0.00 |
| | 28 | 25.48 | 10.55 | 16.78 | 4.07 | 1.71 | 9.11 | 2.89 | 0.61 | 27.62 | 31.69 | 3.56 | 7.40 | 0.00 |
| | 56 | 29.83 | 2.77 | 24.53 | 2.16 | 0.08 | 9.76 | 2.89 | 0.51 | 36.22 | 35.17 | 2.93 | 6.66 | 0.00 |
| | 84 | 28.15 | 11.06 | 19.75 | 5.22 | 3.34 | 9.29 | 2.49 | 0.00 | 36.16 | 32.56 | 3.45 | 7.94 | 0.00 |
| | 112 | 28.37 | 13.36 | 20.43 | 0.00 | 1.83 | 7.90 | 3.80 | 0.79 | 5.37 | 34.30 | 4.37 | 9.70 | 0.00 |
| | 147 | 28.41 | 11.96 | 18.59 | 3.08 | 1.67 | 7.72 | 2.53 | 0.33 | 16.67 | 32.84 | 3.50 | 7.38 | 0.00 |
| | 175 | 18.14 | 7.45 | 11.03 | 1.62 | 0.83 | 5.69 | 1.69 | 0.00 | 11.69 | 20.16 | 1.23 | 4.31 | 0.00 |
| | 203 | 17.56 | 4.15 | 11.09 | 0.95 | 0.09 | 17.70 | 1.85 | 0.00 | 14.21 | 19.85 | 1.72 | 4.94 | 0.00 |
| 231 | 31.51 | 6.62 | 20.30 | 2.17 | 0.08 | 12.06 | 2.97 | 0.00 | 14.35 | 33.83 | 3.01 | 8.57 | 0.00 | |
| MK4 | 0 | 6.31 | 0.00 | 0.72 | 0.00 | 12.97 | 0.58 | 60.96 | 0.00 | 5.06 | 1.75 | 4.98 | 0.00 | 0.00 |
| | 7 | 22.02 | 9.41 | 14.64 | 2.85 | 0.13 | 11.33 | 0.00 | 0.77 | 8.61 | 27.74 | 3.52 | 7.05 | 0.00 |
| | 14 | 10.59 | 4.31 | 6.75 | 2.27 | 1.18 | 5.42 | 1.10 | 0.47 | 5.24 | 13.00 | 1.20 | 2.82 | 0.00 |
| | 28 | 23.33 | 9.64 | 14.66 | 3.83 | 1.35 | 9.35 | 2.38 | 0.41 | 25.93 | 28.58 | 2.68 | 6.46 | 0.00 |
| | 56 | 23.23 | 8.91 | 15.84 | 4.01 | 1.65 | 7.75 | 2.04 | 0.42 | 30.47 | 27.15 | 2.92 | 6.56 | 0.00 |
| | 84 | 18.20 | 6.34 | 11.77 | 3.52 | 2.19 | 6.98 | 1.45 | 0.00 | 19.54 | 20.77 | 1.61 | 4.59 | 0.00 |
| | 112 | 28.59 | 8.26 | 19.73 | 0.00 | 0.00 | 63.11 | 2.69 | 0.00 | 21.96 | 25.72 | 3.48 | 4.90 | 0.00 |
| | 147 | 30.62 | 13.21 | 19.36 | 1.81 | 0.13 | 9.59 | 2.28 | 0.00 | 35.74 | 35.84 | 2.51 | 8.28 | 0.00 |
| | 175 | 20.10 | 8.53 | 12.23 | 1.12 | 0.10 | 6.70 | 1.86 | 0.00 | 23.25 | 23.43 | 1.60 | 5.37 | 0.00 |
| | 203 | 17.59 | 8.26 | 11.59 | 1.04 | 0.11 | 6.07 | 1.48 | 0.00 | 20.37 | 19.90 | 1.59 | 4.88 | 0.00 |
| 231 | 36.03 | 16.26 | 22.87 | 2.02 | 0.07 | 10.78 | 3.10 | 0.00 | 36.78 | 38.85 | 3.19 | 10.01 | 0.00 | |

Name of amino acids - P-Ser:o-Phosphoserine, Tau:Taurine, PEA:o-Phosphoethanolamine, Urea:Urea, Asp:L-Aspartic acid, PEA:o-Phosphoethanolamine, Urea:Urea, Asp:L-Aspartic acid, Asp-NH:Asparagine, Sar:Sarcosine, α -AAA: L-2-Amino adipic Acid, Gly:Glycine, Ala:L-Alanine, Cit:L-Citrulline, α -ABA:DL-2-Amino-3-norbornane carboxylic acid, Met:L-Methionine, Cysth:LCystathionine, Ile:L-Isoleucine, Leu: L-Leucine, Tyr:L-Tyrosine, Phe:L-Phenylalanine, β -Ala: β -Alanine, β -Ala: β -Alanine, Hylys:DL- β -Hydroxylysine, Orn:L-Ornithine, Lys:L-Lysine, 1Mehis:L-1-Methylhistidine, His:L-Histidine, 3Mehis:3-Methylhistidine, Arg:L-Arginine, Hypro: Hydroxyproline, Pro:proline.

(6) 휘발성 향기 성분의 변화

GC-MS 분석에 따라 발효기간 동안 김치의 향기 성분은 unknown compound 3종을 포함하여 총 10종의 성분이 검출됨(표 9). 동정이 이루어진 7종의 휘발성 향미성분들은 모두 김치의 주요 향기성분으로 규명된 물질들임. 발효가 진행되어 묵은지가 되어감에 따라 4종의 김치에서 공통적으로 나타나는 향기 성분은 unknown 1, unknown 2, 4-isothiocyanato-1-butene, bicyclo[2.2.1]heptane,2,2-dimethyl-3-methylene, butanoic acid, methyl-2-propenyl disulfide로 나타났으며, 특히 butanoic acid는 묵은 배추김치 특유의 콧콕한 군덕내와 관계가 있는 물질임. 1차 발효기간 동안 온도 조건이 동일한 김치에서 동일한 향기 성분이 검출되어 온도에 따른 영향을 나타내었으나, 2차 숙성이 진행될수록 여러 가지 요인들에 의하여 향기성분의 경향성은 김치마다 다르게 나타남. 발효 종료 후 MK1 김치의 향기성분이 가장 많이 검출되었으며 MK3는 가장 적은수의 향기성분을 보유하고 있음.

표 9. 묵은지 숙성 중의 향기성분의 변화

| Kimchi | Compounds | Fermentation period (days) | | | | | | | | | | |
|--------|--|----------------------------|---|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 0 | 7 | 14 | 28 | 56 | 84 | 112 | 147 | 175 | 203 | 231 |
| MK1 | Unknown 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Disulfide, di-2-propenyl | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Bicyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl) | + | + | + | - | + | + | - | + | + | + | + |
| | 4-Isothiocyanato-1-butene | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Bicyclo[2.2.1]heptane,2,2-dimethyl-3-methylene | + | - | + | + | + | + | + | + | - | + | + |
| | Butanoic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Methyl-2-propenyl disulfide | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 3 | + | + | + | + | - | - | - | + | + | + | + |
| | 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MK2 | Unknown 1 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Disulfide, di-2-propenyl | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Bicyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl) | + | + | + | - | + | + | - | + | + | - | - |
| | 4-Isothiocyanato-1-butene | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Bicyclo[2.2.1]heptane,2,2-dimethyl-3-methylene | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Butanoic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Methyl-2-propenyl disulfide | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 3 | + | + | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| | 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol | + | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MK3 | Unknown 1 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Disulfide, di-2-propenyl | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| | Bicyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl) | + | + | + | - | + | + | + | + | + | - | - |
| | 4-Isothiocyanato-1-butene | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Bicyclo[2.2.1]heptane,2,2-dimethyl-3-methylene | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Butanoic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Methyl-2-propenyl disulfide | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 3 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| | 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol | + | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| MK4 | Unknown 1 | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Disulfide, di-2-propenyl | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | |
| | Bicyclohexene, 4-methylene-1-(1-methylethyl) | + | + | + | + | + | + | + | + | + | - | - |
| | 4-Isothiocyanato-1-butene | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Bicyclo[2.2.1]heptane,2,2-dimethyl-3-methylene | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Butanoic acid | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Methyl-2-propenyl disulfide | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | Unknown 3 | + | + | + | + | - | + | + | + | + | - | - |
| | 2,4-Bis(1,1-dimethylethyl)phenol | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+; detected, -; not detected.

(7) 미생물 균총 변화

(가) 총균수

김치에서 총균수의 변화는 그림 7과 같음. MK1은 초기 5.92 log CFU/mL에서 발효 84일에 8.7 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 7.9 log CFU/mL를 나타냄. MK2는 초기 5.93 log CFU/mL에서 발효 28일에 9.43 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 7.42 log CFU/mL를 나타냄. MK3은 초기 5.91 log CFU/mL에서 발효 56일에 9.1 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 7.85 log CFU/mL를 나타냄. MK4는 초기 5.96 log CFU/mL에서 발효 28일에 9.52 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 7.04 log CFU/mL를 나타냄. 발효와 숙성온도가 낮은 MK1 김치의 총균수 변화가 가장 완만하게 발생하였으며 발효와 숙성온도가 높은 MK4의 총균수가 가장 큰 폭으로 증가 및 감소하였음.

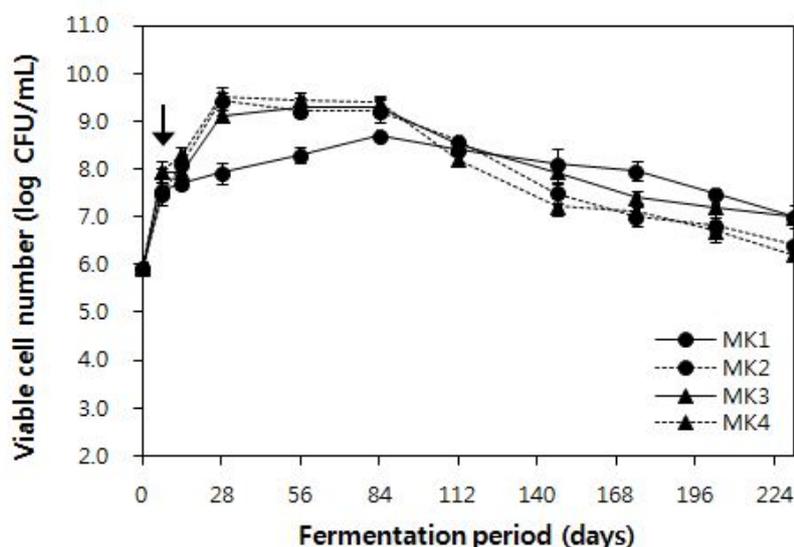


그림 7. 묵은지 숙성 중의 총균 변화
The arrow indicate the start of storage.

(나) 유산균수

유산균수의 변화는 총균수의 변화와 유사한 경향을 나타냄(그림 8). MK1은 초기 5.85 log CFU/mL에서 발효 84일에 8.65 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 6.9 log CFU/mL를 나타냄. MK2는 초기 5.84 log CFU/mL에서 발효 28일에 9.21 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 6.23 log CFU/mL를 나타냄. MK3은 초기 5.53 log CFU/mL에서 발효 56일에 9.1 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 6.91 log CFU/mL를 나타냄. MK4는 초기 5.51 log CFU/mL에서 발효 28일에 9.43 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 231일에 6.13 log CFU/mL를 나타냄.

유산균수는 적숙기 부근에 도달 할 때까지 증가하였다가 그 이후 감소하는 것으로 보이며 숙성온도가 높을수록 더 빨리 최대균수에 도달하고 그 이후 점차 감소하여 발효 112일 이후

에는 더 낮은 균수를 나타냄.

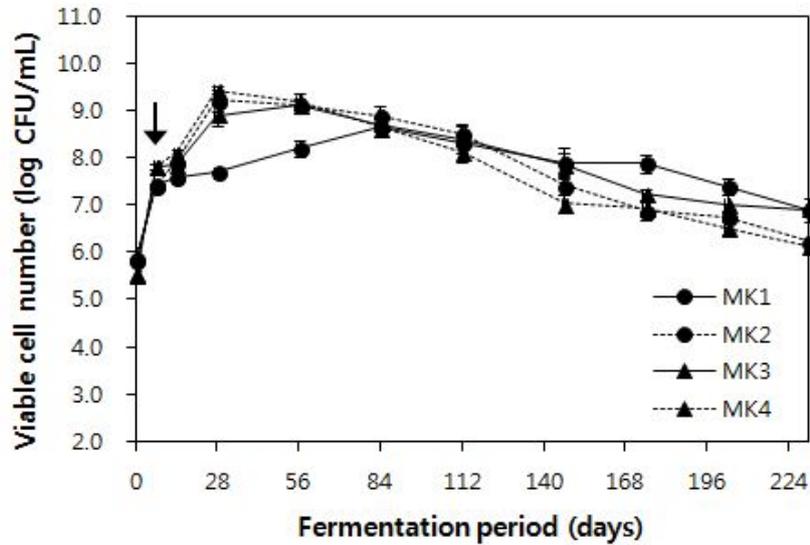


그림 8. 묵은지 숙성 중의 유산균 변화
The arrow indicate the start of storage.

(다) 효모수

효모의 경우 모든 실험구에서 발효초기에 검출되지 않았으나 숙성기간이 증가함에 따라 점차 증가하여 발효 231일에는 MK1, MK2, MK3, MK4에서 각각 4.27, 4.80, 4.33, 4.96 log CFU/mL를 나타내었음(그림 9). 효모의 수적 증가는 발효 28일까지는 실험구간에 큰 차이를 보이지 않다가 28일 이후부터 4°C 숙성온도 김치에서 더 높은 수적 증가를 나타냄. 발효·숙성 온도가 가장 높은 MK4에서 전체 발효 기간 동안 가장 많은 효모수를 나타냄.

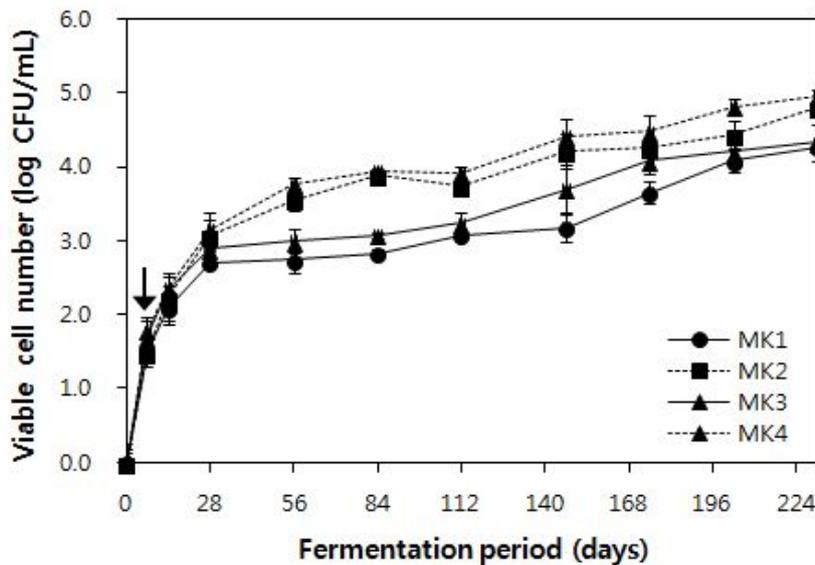


그림 9. 묵은지 숙성 중의 효모수 변화
The arrow indicate the start of storage.

(8) 관능적 특성 변화

발효 기간 동안 묵은지의 관능적 특성 변화를 그림 10에 나타냄. 1차 발효직후(발효 7일) 5℃에 비해 10℃ 발효 김치(MK3, MK4)의 기호도가 좀 더 높은 값을 나타내었으며, 이후 숙성 온도에 따라 관능적 특성은 다르게 나타남. 발효 후기와 말기로 갈수록 4℃ 숙성에 비해 0℃ 숙성 묵은지의 기호도가 더 우수한 것으로 나타남. 4℃ 숙성 묵은지는 발효 중기 이후로 강한 신맛과 균덕내가 나타나며 0℃ 숙성 묵은지는 발효 후기로 갈수록 부드러운 신맛이 유지되며 묵은지의 풍미가 발현됨. 1차 발효 온도가 낮은(5℃) MK1은 전체적인 발효가 늦게 진행되면서 묵은지의 깊은 맛이 다소 부족하나 1차 발효를 10℃에서 진행한 MK3은 숙성 175일 이후 숙성된 묵은지의 풍미가 나타남. 묵은지의 발효 특성 분석과 관능적 특성 분석에 따라 1차 발효 온도에 따라 묵은지 숙성 시기를 조절할 수 있으며, 2차 숙성 온도는 낮을수록 품질 특성이 우수한 묵은지를 제조할 수 있을 것으로 사료됨.

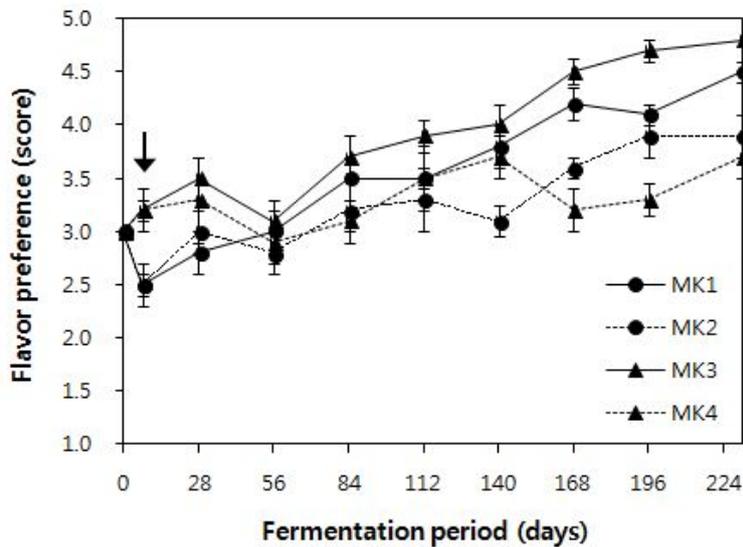


그림 10. 묵은지 숙성 중의 관능적 특성 변화
The arrow indicate the start of storage.

나. 시중 묵은지의 특성 분석 및 발효 미생물 분리

시판중인 묵은지의 발효 특성을 분석하고 관능적 특성과 요소별 상관관계를 비교 분석하여 묵은지의 주요 품질요소를 분석하고자 함. 또한 숙성 제조를 위한 묵은지의 종균을 개발하기 위하여 시중 묵은지로부터 발효 미생물을 분리하여 형태학적 관찰과 당대사능을 분석하고, 특성이 우수한 발효 미생물의 분자생물학적 동정을 시행함.

(1) 시중 묵은지의 발효 특성 분석

(가) pH 및 산도

시중 묵은지의 경우 pH는 pH 3.5~4.2 범위로 다양하게 나타났으나 산도는 대부분 1.0이 상의 값을 나타냄(표 10). 숙성기간과 제조지역에 따른 유의적 상관관계는 나타나지 않음.

(나) 염도측정

김치는 염도가 2-3% 정도로 고염식품이지만 시중 묵은지의 경우 0.91~1.70% 범위로 비교적 낮은 염도를 나타냄(표 10). 김치 제조시의 염도는 높으나 묵은지의 숙성기간이 길어짐에 따라 탈수현상에 의하여 염도가 낮아진 것으로 추정됨.

(다) 환원당

시중 묵은지의 환원당은 27.6~84.8 µg/mL의 범위로 매우 다양하게 나타남. 묵은지의 숙성기간에 따른 상관성은 나타나지 않음.

(라) 물성

시중 묵은지의 경도는 최소 6465.0 g/cm²와 최대 10647.4 g/cm²의 범위로 다양하게 나타남. 그러나 숙성기간에 상관없이 다양한 경도를 나타내어 묵은지의 부재료 및 미생물 균종에 따라 묵은지의 아삭한 정도가 달라지는 것으로 생각됨.

표 10. 시중 묵은지의 이화학적 특성 및 물성

| Mukeunji | pH | Acidity(%) | Salinity(%) | Reducing sugar (µg/mL) | Hardness (g/cm ²) |
|----------|------|------------|-------------|------------------------|-------------------------------|
| M1 | 4.06 | 1.26 | 1.37 | 57.4 | 10302.0 |
| M2 | 3.96 | 1.34 | 1.24 | 63.3 | 8933.6 |
| M3 | 4.14 | 1.03 | 1.03 | 75.1 | 10647.4 |
| M4 | 4.07 | 1.14 | 1.14 | 33.4 | 10153.4 |
| M5 | 4.34 | 1.02 | 1.06 | 66.2 | 8510.4 |
| M6 | 4.13 | 1.37 | 1.36 | 42.6 | 9692.0 |
| M7 | 3.96 | 1.53 | 1.69 | 45.2 | 7067.2 |
| M8 | 4.29 | 1.05 | 1.70 | 46.3 | 7868.6 |
| M9 | 4.27 | 0.99 | 1.36 | 73.1 | 7497.0 |
| M10 | 4.20 | 1.16 | 1.25 | 59.8 | 6465.0 |
| M11 | 4.24 | 0.97 | 1.09 | 68.2 | 6952.6 |
| M12 | 4.12 | 1.07 | 1.05 | 61.6 | 9309.6 |
| M13 | 4.24 | 0.75 | 1.28 | 27.6 | 8849.4 |
| M14 | 4.28 | 1.09 | 1.32 | 72.0 | 8219.8 |
| M15 | 4.23 | 1.04 | 1.44 | 43.9 | 7693.2 |
| M16 | 4.29 | 1.03 | 1.31 | 75.5 | 10504.2 |
| M17 | 4.04 | 1.24 | 1.29 | 75.4 | 8984.8 |
| M18 | 3.59 | 1.95 | 1.16 | 31.3 | 7576.8 |
| M19 | 4.06 | 1.15 | 1.24 | 44.4 | 8890.0 |
| M20 | 4.41 | 0.74 | 1.09 | 43.3 | 8037.2 |
| M21 | 4.00 | 1.39 | 1.09 | 84.8 | 10297.2 |
| M22 | 4.18 | 1.00 | 0.91 | 53.0 | 7707.8 |

(마) 미생물학적 특성

시중 묵은지의 경우 장기간 숙성으로 일반 김치에 비하여 다소 낮은 균수를 나타내어 총 균수는 10³~10⁶ CFU/mL 범위로, 유산균수는 10³~10⁶ CFU/mL 범위로 나타남(표 11). 효모는 10¹~10⁶ CFU/mL 범위로 나타나 묵은지에 따라 균종이 매우 다양함을 알 수 있었으며 숙성기간이 2년 이상인 묵은지의 경우 10⁴~10⁶ CFU/mL의 많은 효모가 검출되어 묵은지의 깊은 맛과 독특한 향을 나타내는 것이 후반기에도 장기적으로 분포하는 효모의 영향일 것이라 생각됨. 묵은지 중 강원도횡성에서 제조된 M1과 M2 시료의 경우가 다른 시료들에 비해

균수가 없고, 유산균은 전혀 검출되지 않았음. pH 3.9~4.0, 산도 1.26%와 1.34%의 결과를 볼 때 많이 시어짐에 따라 산에 약한 유산균들이 사멸된 것으로 추정됨.

표 11. 시중 묵은지의 미생물학적 특성

| Mukeunji | Microbial population(CFU/mL) | | |
|----------|------------------------------|----------------------|---------------------|
| | Total bacteria | Lactic acid bacteria | Yeast |
| M1 | 2.0×10 ³ | - | 1.0×10 ³ |
| M2 | 1.0×10 ³ | - | 1.0×10 ² |
| M3 | 9.1×10 ⁴ | 1.2×10 ⁴ | 1.8×10 ⁴ |
| M4 | 4.2×10 ⁴ | 3.0×10 ³ | 2.1×10 ³ |
| M5 | 1.3×10 ⁶ | 2.0×10 ⁶ | 8.6×10 ³ |
| M6 | 1.1×10 ⁶ | 2.7×10 ⁵ | 6.0×10 ¹ |
| M7 | 5.5×10 ⁵ | 1.8×10 ⁴ | 1.0×10 ¹ |
| M8 | 4.6×10 ⁵ | 1.4×10 ⁴ | 8.0×10 ⁵ |
| M9 | 1.2×10 ⁶ | 1.2×10 ⁶ | 1.9×10 ⁵ |
| M10 | 1.4×10 ⁵ | 5.3×10 ⁴ | 5.0×10 ⁴ |
| M11 | 1.0×10 ⁵ | 3.0×10 ⁵ | 2.0×10 ⁴ |
| M12 | 1.2×10 ⁶ | 2.0×10 ⁵ | 2.9×10 ⁴ |
| M13 | 6.2×10 ⁴ | 1.6×10 ⁵ | 3.0×10 ⁶ |
| M14 | 9.6×10 ⁴ | 5.3×10 ⁴ | 8.9×10 ⁵ |
| M15 | 1.3×10 ⁵ | 1.3×10 ⁶ | 3.5×10 ⁵ |
| M16 | 2.6×10 ⁵ | 1.2×10 ⁵ | 1.8×10 ⁴ |
| M17 | 7.3×10 ⁵ | 1.4×10 ⁵ | 2.2×10 ⁴ |
| M18 | 3.6×10 ⁴ | - | 1.8×10 ⁴ |
| M19 | 1.1×10 ⁶ | 7.7×10 ⁵ | 1.0×10 ⁴ |
| M20 | 1.6×10 ⁶ | 3.0×10 ⁵ | 9.8×10 ⁵ |
| M21 | 1.2×10 ⁵ | 1.0×10 ⁴ | 2.0×10 ⁴ |
| M22 | 1.9×10 ⁵ | 2.7×10 ⁴ | 3.0×10 ⁴ |

(2) 시중 묵은지의 관능적 특성 및 요소별 상관관계 분석

관능적으로 총 기호도에서 높은 점수를 받은 시료는 M3, M4, M11, M12, M16, M17, M19이며, 낮은 점수를 받은 군은 M8, M9, M15였음(표 12). 본 관능검사의 결과로 보아 상대적으로 높은 점수를 받은 시료군은 최소 4개월의 김치에서 최장 2년으로 매우 다양하였고 그에 비해 오히려 낮은 점수를 받은 시료군은 각각 3년, 2년 7개월, 2년으로 장기 숙성의 묵은지는 관능적으로 좋은 점수를 받지 못했음. 부재료는 모든 시료들이 절임배추, 고추, 무, 생강, 마늘, 파 등의 기본적인 부재료를 사용하고 약간의 차이점은 있었으나 관능검사를 좌우하는 큰 차이점은 발견할 수 없었음.

관능적 요소들과 총기호도의 관계를 살펴본 결과(그림 11) 어떤 요소(맛요소, 향기요소, 색깔요소)의 강약이 총기호도를 좌우하는 큰 상관관계를 결부 짓기에는 어려운 점이 있으나, 낮은 총기호도를 보이는 것은 맛의 요소들의 결과와 볼 때 짠맛과 신맛이 높고 단맛과 감칠맛이 적은 것이 대체적으로 낮은 총기호도를 보였고, 그렇다 하더라도 짠맛과 신맛이 낮고 단맛과 감칠맛이 높다

고 기호도가 높아지진 않았고 4가지의 맛이 모두 강하게 입에 남은 것이 높은 기호도를 보였음. 아쉬운 점은 향기는 맛에 비해 감각요소가 매우 쉽게 피로되는 점에서 신선한 김치향과 묵은 김치향이 뚜렷하게 대비될 수 있는 요소인데도 패널들이 모두 비슷한 점수를 주었음.

묵은지의 관능검사를 결론적으로 요약하면 맛(신맛, 짠맛, 단맛, 그리고 감칠맛), 향기(신선한 김치향기, 묵은 김치향기), 그리고 색 기호도 및 씹힘성의 기호도 모두 높게 나온 것이 대체적으로 높은 점수를 획득하였음.

표 12. 시중 묵은지의 관능평가

| Mukeunji | Sensory test | | | | | | |
|----------|--------------|----------|-----------|--------------|--------------|------------|-----------------------|
| | Saltness | Sourness | Sweetness | Savory taste | Fresh flavor | OFF-flavor | Overall acceptability |
| M1 | 3.10 | 2.95 | 2.71 | 2.76 | 2.48 | 2.76 | 2.86 |
| M2 | 2.76 | 2.76 | 2.24 | 2.43 | 2.71 | 2.48 | 2.38 |
| M3 | 2.90 | 2.62 | 2.90 | 2.95 | 2.76 | 3.19 | 3.19 |
| M4 | 2.90 | 2.90 | 2.38 | 2.76 | 2.52 | 2.81 | 2.95 |
| M5 | 2.81 | 2.29 | 2.24 | 2.14 | 2.67 | 2.57 | 2.48 |
| M6 | 2.75 | 2.62 | 2.10 | 2.19 | 2.24 | 2.29 | 2.05 |
| M7 | 3.00 | 3.38 | 2.05 | 2.29 | 2.33 | 2.48 | 2.57 |
| M8 | 2.62 | 2.52 | 1.76 | 1.86 | 2.19 | 1.95 | 1.62 |
| M9 | 2.86 | 2.38 | 2.05 | 1.80 | 2.25 | 2.14 | 1.71 |
| M10 | 2.90 | 2.43 | 2.62 | 2.24 | 2.57 | 3.05 | 2.33 |
| M11 | 3.00 | 2.90 | 2.76 | 2.76 | 2.67 | 3.38 | 3.24 |
| M12 | 3.00 | 3.00 | 3.10 | 2.76 | 2.81 | 2.86 | 2.86 |
| M13 | 2.38 | 2.67 | 2.19 | 1.90 | 2.71 | 2.76 | 1.95 |
| M14 | 2.81 | 2.38 | 2.05 | 2.00 | 2.24 | 2.33 | 2.05 |
| M15 | 1.90 | 2.19 | 2.00 | 1.48 | 2.10 | 2.05 | 1.60 |
| M16 | 3.14 | 3.00 | 3.19 | 3.33 | 3.24 | 3.24 | 3.52 |
| M17 | 3.05 | 3.24 | 2.67 | 3.29 | 3.00 | 3.10 | 3.05 |
| M18 | 2.67 | 2.48 | 1.86 | 1.86 | 2.90 | 2.76 | 1.95 |
| M19 | 2.57 | 2.86 | 2.67 | 2.81 | 2.86 | 3.00 | 2.95 |
| M20 | 3.00 | 2.55 | 2.70 | 2.45 | 2.89 | 2.70 | 2.65 |
| M21 | 3.05 | 3.00 | 2.81 | 2.95 | 2.81 | 2.95 | 2.95 |
| M22 | 2.79 | 2.65 | 2.30 | 2.25 | 2.75 | 2.55 | 2.50 |

Values are means from 20 determinations. Score 5 is extremely good.

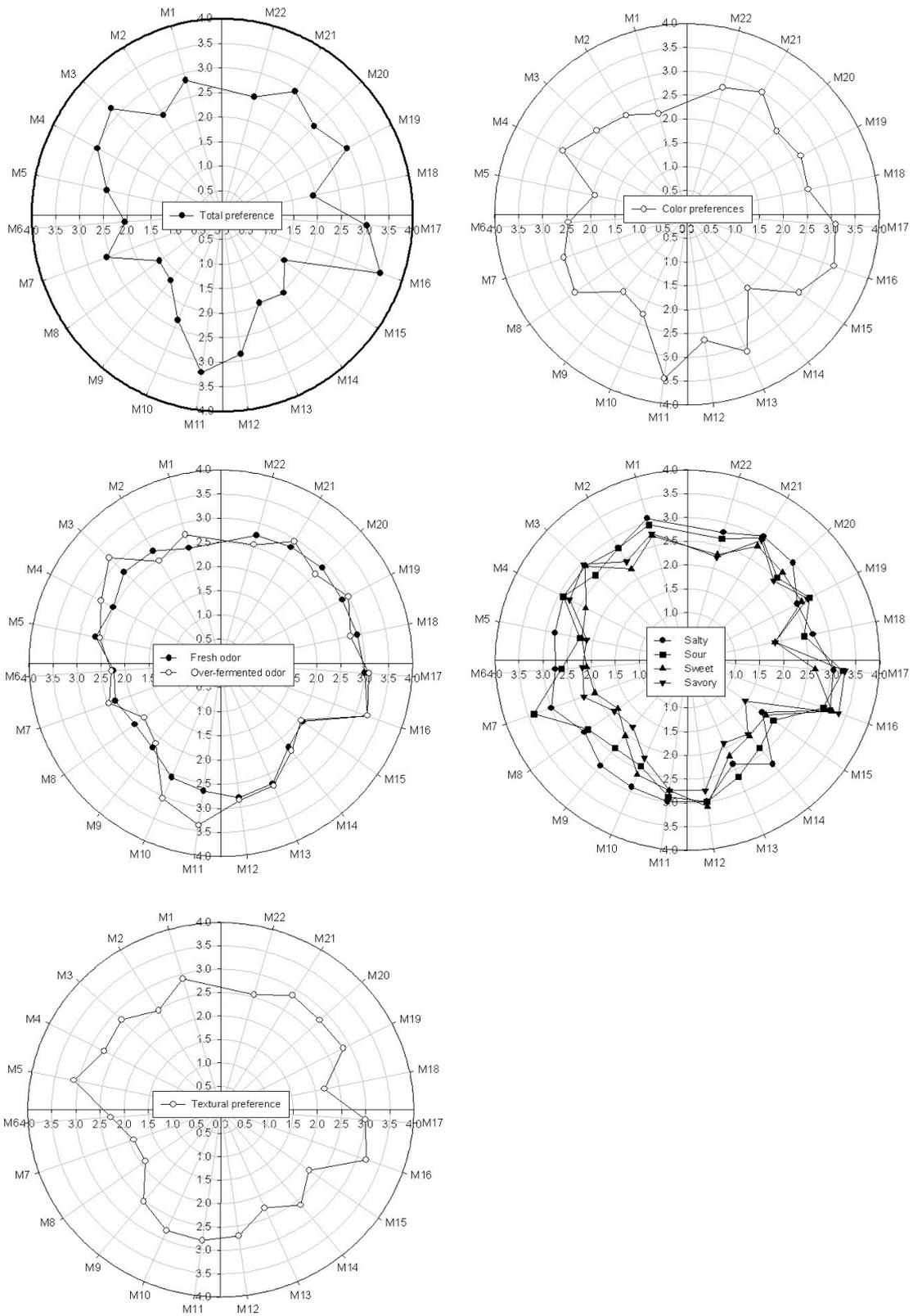


그림 11. 관능 요소별 상관관계 분석

(3) 시중 묵은지의 발효 미생물의 분리

유산균은 2% CaCO₃가 함유된 MRS plate에 배양하여 투명환을 생성한 균주를 유산균으로 추정하고 모양과 색깔이 다른 45종의 균주를 분리함(표 13). 효모는 TTC 정색반응에 의하여 다른 색깔을 나타내고 모양과 크기가 다른 34종의 균주를 분리함(표 14).

(4) 시중 묵은지 분리 균주의 동정

(가) 형태학적 특성

분리된 45종의 유산균에 대하여 그람염색, 현미경관찰 및 집락에 대한 형태학적 특성을 관찰함(표 13). 분리균주 45종 모두 그람양성이었고 간균의 형태를 나타냄. Colony의 모양은 모두 매끈하고 둥근 형태를 지녔고, colony 색은 모두 불투명하였으며 3종은 아이보리색을, 18종은 흰색을 띠었으며 나머지 24종은 우유색을 나타냄.

분리된 34종의 효모에 대해 현미경관찰 및 집락의 형태학적 특성을 관찰함(표 14). 분리균주 M8DPW, M14DPW, M16PL, M17DPL 4종은 구형을 나타냈으며 나머지 30종은 타원형을 나타냄. Colony의 모양은 모두 매끈하고 둥근 형태를 지녔고, colony 색은 모두 불투명하였으며 아이보리색을 나타냄.

표 13. 분리 유산균의 형태학적 특성

| Strains | Gram stain | Morphology | Colony | Colony surface | Colony color | Colony opacity | Strains | Gram stain | Morphology |
|---------|------------|------------|----------|----------------|--------------|----------------|---------|------------|------------|
| M3-1 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M12-2 | + | rod |
| M3-2 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M12-3 | + | rod |
| M3-3 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M12-4 | + | rod |
| M4-1 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M13-1 | + | rod |
| M5-1 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M13-2 | + | rod |
| M5-2 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M13-3 | + | rod |
| M5-3 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M13-4 | + | rod |
| M6-1 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M14-1 | + | rod |
| M6-2 | + | rod | circular | smooth | ivory | opaque | M14-2 | + | rod |
| M6-3 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M15-1 | + | rod |
| M7-1 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M15-2 | + | rod |
| M7-2 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M15-3 | + | rod |
| M8-1 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M16-1 | + | rod |
| M8-2 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M16-2 | + | rod |
| M9-1 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M17-2 | + | rod |
| M9-2 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M19-1 | + | rod |
| M9-3 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M19-2 | + | rod |
| M10-1 | + | rod | circular | smooth | white | opaque | M20-1 | + | rod |
| M10-2 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M20-2 | + | rod |
| M11-1 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M21-1 | + | rod |
| M11-2 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M22-1 | + | rod |
| M11-3 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | M22-2 | + | rod |
| M12-1 | + | rod | circular | smooth | milk | opaque | | | |

표 14. 분리 효모의 형태학적 특성

| Strains | Morphology | Colony | Colony surface | Colony color | Colony opacity |
|---------|------------|----------|----------------|--------------|----------------|
| M1DP | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M2LP | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M3P | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M3W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M4LP | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M4R | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M6LP | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M7DPW | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M8DPW | round | circular | smooth | ivory | opaque |
| M9P | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M10R | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M10W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M11DPL | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M11DPS | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M11W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M12DPW | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M13LP | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M13W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M14R | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M14DPW | round | circular | smooth | ivory | opaque |
| M15R | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M15W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M16PL | round | circular | smooth | ivory | opaque |
| M16PS | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M17DPL | round | circular | smooth | ivory | opaque |
| M17DPS | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M17W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M18P | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M18LP | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M19W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M20DP | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M21DPW | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M22W | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |
| M22P | ellipse | circular | smooth | ivory | opaque |

(나) 생화학적 특성

API 50 CHL system을 이용하여 분리균주의 당 이용능을 조사한 결과는 표 15와 같음. 유제품 유래의 유산균의 경우 유당(lactose)을 에너지원으로 이용하므로 유당 대사능이 있으나, 본 실험에서 같은 김치에서 분리된 균주들 중 우점을 나타낸 21종의 유산균에 대하여 당대사능을 확인한 결과 14종은 유당 대사능을 가지지 않았음(표 15). 이는 분리원이 유당이 없는 김치이기 때문에 오랜 기간 적응하면서 유당 대사능이 퇴화된 것으로 생각됨.

표 15. 분리유산균의 당대사능 확인

| Sugar | Metabolism | | | | | | | | | | |
|----------------------|------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| | M3-1 | M4-1 | M5-1 | M6-1 | M7-1 | M8-1 | M9-1 | M10-1 | M11-1 | M12-1 | M13-1 |
| Control | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glycerol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Erythritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabinose | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - |
| Ribose | + | + | + | + | + | + | + | - | + | + | - |
| D-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Adonitol | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - |
| β-Methyl-xyloside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | ? |
| D-Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Fructose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Mannose | ? | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| L-Sorbose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Rhamnose | - | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Manitol | - | - | - | + | + | + | + | + | - | - | + |
| Sorbitol | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | + |
| α-Methyl-D-mannoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α-Methyl-D-Glucoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| N-Acetyl glucosamine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Amygdaline | - | - | - | - | ? | + | - | - | + | - | - |
| Arbutin | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| Esculine | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | - |
| Salicine | - | - | ? | + | + | + | - | + | + | - | - |
| Cellobiose | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| Maltose | + | + | - | + | + | + | + | + | - | + | + |
| Lactose | - | - | + | + | - | + | - | + | + | - | - |
| Melibiose | - | - | + | + | - | - | - | - | + | - | - |
| Sucrose | - | + | + | + | + | + | - | + | + | - | + |
| Trehalose | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | - |
| Inuline | - | - | - | + | - | + | + | - | - | - | - |
| Melezitose | - | - | - | + | - | + | - | - | - | - | - |
| Rafinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Startch | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glycogen | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Xylitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β-Gentiobiose | - | - | + | + | + | - | - | - | + | - | - |
| D-Turanose | - | - | - | + | + | + | - | - | - | - | - |
| D-Lyxose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Tagatose | - | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| D-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabitol | - | - | - | - | - | + | ? | - | - | - | - |
| Gluconate | - | - | + | + | + | + | - | - | + | - | - |
| 2-Keto-Gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5-Keto-Gluconate | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

| Sugar | Metabolism | | | | | | | | | |
|------------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | M14-1 | M15-1 | M16-1 | M17-2 | M19-1 | M19-2 | M20-1 | M20-2 | M21-1 | M22-1 |
| Control | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Glycerol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Erythritol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabinose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabinose | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| Ribose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Xylose | - | + | + | + | + | ? | - | - | - | - |
| L-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Adonitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| β -Methyl-xyloside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Galactose | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Fructose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Mannose | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| L-Sorbose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + |
| Rhamnose | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| Dulcitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inositol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | ? |
| Manitol | + | + | + | - | + | - | - | - | + | + |
| Sorbitol | + | + | ? | - | - | - | - | - | - | + |
| α -Methyl-D-mannoside | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| α -Methyl-D-Glucoside | - | + | - | + | + | + | + | - | - | - |
| N-Acetyl glucosamine | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Amygdaline | ? | - | - | + | + | ? | - | - | - | ? |
| Arbutin | + | + | ? | - | + | + | - | - | + | + |
| Esculine | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Salicine | + | - | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Cellobiose | ? | - | + | + | + | + | - | - | + | + |
| Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Lactose | - | - | - | ? | + | - | - | - | + | - |
| Melibiose | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - |
| Sucrose | + | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Trehalose | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| Inuline | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Melezitose | - | - | - | - | - | - | - | - | + | + |
| Rafinose | - | - | + | + | + | + | - | - | - | - |
| Starch | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Glycogen | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Xylitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| β -Gentiobiose | + | - | + | + | + | + | - | - | + | + |
| D-Turanose | - | - | - | + | + | + | - | - | + | + |
| D-Lyxose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Tagatose | - | - | - | - | - | - | - | + | + | + |
| D-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Fucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| D-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| L-Arabitol | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| Gluconate | + | + | + | ? | ? | - | - | - | + | + |
| 2-Keto-Gluconate | - | - | ? | + | ? | + | - | - | - | - |
| 5-Keto-Gluconate | - | + | - | - | ? | - | - | - | - | - |

(다) 분자생물학적 동정

시중 묵은지에서 분리한 유산균과 효모 중 관능적 풍미가 우수한 묵은지에서 우점을 나타내며 형태학적 특성 및 생화학적 특성이 다른 유산균 9종과 효모 6종을 선별하여 분자생물학적 동정을 시행함. 유산균 동정결과 M3-1, M4-1, M16-1, M17-2의 4종은 *Lactobacillus curvatus*로 동정되었고, M5-1, M6-1, M11-1의 3종은 *Lactobacillus sakei*, M7-1은 *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*로 동정되었으며, M13-1은 *Lactobacillus coryniformis*로 동정되었음(표 16). 효모의 경우 M10R 1종만 *Kazachstania barnettii*로 동정되었으며, 나머지 5종은 *Saccharomyces servazzii*로 동정되었음(표 16).

표 16. 분리유산균 및 효모의 염기서열 분석 결과

| Strains | Sequencing(bp) | Identities |
|---------|----------------|---|
| M3-1 | 16S rRNA(1506) | <i>Lactobacillus curvatus</i> strain CTSPL4 99% |
| M4-1 | 16S rRNA(1491) | <i>Lactobacillus curvatus</i> strain CTSPL4 99% |
| M5-1 | 16S rRNA(1534) | <i>Lactobacillus sakei</i> strain NRIC0128 99% |
| M6-1 | 16S rRNA(1499) | <i>Lactobacillus sakei</i> strain NRIC0128 99% |
| LAB | M7-1 | 16S rRNA(1502) <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> 99% |
| | M11-1 | 16S rRNA(1499) <i>Lactobacillus sakei</i> strain NRIC0128 99% |
| | M13-1 | 16S rRNA(1516) <i>Lactobacillus coryniformis</i> sub. <i>torquens</i> strain 30 99% |
| | M16-1 | 16S rRNA(1451) <i>Lactobacillus curvatus</i> ssp <i>curvatus</i> 92.7% |
| | M17-2 | 16S rRNA(1592) <i>Lactobacillus curvatus</i> strain CTSPL4 99% |
| Yeast | M1DP | 18S rRNA(1209) <i>Saccharomyces servazzii</i> 99% |
| | M2LP | 18S rRNA(703) <i>Saccharomyces servazzii</i> 99% |
| | M4LP | 18S rRNA(1507) <i>Saccharomyces servazzii</i> 99% |
| | M7DPW | 18S rRNA(779) <i>Saccharomyces servazzii</i> 99% |
| | M10R | 18S rRNA(1102) <i>Kazachstania barnettii</i> 99% |
| | M11W | 18S rRNA(723) <i>Saccharomyces servazzii</i> 99% |

다. 모의발효 실험을 통한 묵은지 종균의 선정

묵은지로부터 분리한 발효 미생물 중 묵은지 제조에 이용할 우량 종균을 개발하기 위하여 모의 발효 실험을 시행함. 1차 모의 발효는 유산균과 효모를 첨가한 김치의 향기 묘사분석을 시행하여 묵은지로서의 향미가 우수한 발효 미생물을 1차적으로 선별함. 2차 모의 발효는 1차로 선별된 발효 미생물을 첨가한 김치의 발효 특성 분석 및 관능 평가를 시행하여 특성이 우수한 균주를 최종 묵은지 종균으로 선정함.

(1) 1차 모의 발효 실험

묵은지 종균을 선정하기 위하여 관능적으로 평가가 우수한 묵은지에서 우점을 나타낸 분리 유산균 9종 및 효모 6종을 선별하여 김치를 제조하고 발효시킨 후 향기 묘사분석을 시행한 결과는 표 17과 표 18에 나타냄. 향미 묘사분석 결과에 따라 유산균은 숙성된 김치의 향미에 관여하고 있으며, 효모는 과숙되거나 묵은 김치의 향미에 관여함을 알 수 있음. 1차 모의 발효 결과를 바탕으로 하여 묵은지의 향미로서 기호도가 우수한 묵은지 발효종균 후보로 유산

균 4종(M7-1, M11-1, M13-1, M17-2)과 효모 1종(M7DPW)을 선별하여 최종 종균 선정을 위한 2차 모의 발효를 시행함.

표 17. 유산균 접종 김치의 향기 묘사

| Strains | Description | |
|---------|-------------|---|
| M3-1 | 긍정적 | 구수한 향기, 적당히 익은 냄새 |
| | 중간적 | 군내가 있으나 시큼함, 신냄새, 숙성 초기의 향기 |
| | 부정적 | 젓갈냄새, 덜숙성된 냄새, 숙성이 안된 냄새, 생김치의 상온에서 익은 냄새, 숙성이 시작되는 냄새 |
| M4-1 | 긍정적 | 약간익은 냄새, |
| | 중간적 | 숙성초기의 향기, 숙성은 약하나 청량감이 있음 |
| | 부정적 | 젓갈냄새가 심함, 이취가 있음 |
| M5-1 | 긍정적 | 없음 |
| | 중간적 | 숙성약하나 청량감, M3,4와 비슷하나 약간 숙성취가 더 있음, M3,4와 비슷함, |
| | 부정적 | 냄새없음, 덜숙성된 냄새, 군내, 이취, |
| M6-1 | 긍정적 | 상큼한 냄새, 묵은지의 초기단계 20일정도 숙성냄새, 숙성되는 냄새 |
| | 중간적 | 조금 익어간 김치향, 발효취, |
| | 부정적 | 신냄새, 젓갈향, 덜숙성된 냄새, 이취, 시큼한냄새, |
| M7-1 | 긍정적 | 상큼한 신냄새, 숙성이 잘된 김치냄새(4), |
| | 중간적 | 화장품향기, 상온에서 발효된 냄새, 일반김치에서 숙성된 김치향기, 묵은지향기 |
| | 부정적 | 숙성이 좀 지난김치향기, 이취 |
| M11-1 | 긍정적 | 약간익은 냄새, |
| | 중간적 | 묵은지 초기단계의 냄새 |
| | 부정적 | 숙성이 지나친 김치향기, 시큼한냄새(2), 짠내, 숙성이 되었으나 큰 향미없음, 냉장고에 오래둔 향기, 씻은 김치향기 |
| M13-1 | 긍정적 | 청량감이있음, 상큼한 맛이 느껴짐, 부드러운향기 |
| | 중간적 | |
| | 부정적 | 많이 발효된 향, 비린냄새, 시큼함, 덜익은 냄새, 밋밋한 냄새, 이취, 화장품향기같은 김치와는 다른 향기 |
| M16-1 | 긍정적 | 가장 평이한 김치향, 시원한 시큼함 |
| | 중간적 | 약간의 묵은지 향기, 약간 신향기 |
| | 부정적 | 향이 떨어지고 과숙김치향, 익은 향기, 향이 강하지 않음 |
| M17-2 | 긍정적 | 약간숙성된 냄새, 탄산취있는 신향, 식욕을 자극하는 향기 |
| | 중간적 | 묵은지향기(3) |
| | 부정적 | 독한향기, 발효냄새가 강함 |

표 18. 효모 접종 김치의 향기 묘사

| Strains | | Description |
|---------|-----|--|
| M1DP | 긍정적 | 시큼하면서 상큼함, 구수한 냄새, 탄산취, 색이 목은지의 색 갈과 유사함 |
| | 중간적 | 목은지와 매우 유사함(2), 균등냄새(3), 약간 이취가 있으나 잘 익은 김치향기 |
| | 부정적 | 과숙김치향(3), 쏘는시큼함(3), 독한시큼함, 데친향 |
| M2LP | 긍정적 | 구수한 냄새, 독특한 향미, 목은지의 향기 |
| | 중간적 | |
| | 부정적 | 매우 균등내가 심함, 상큼하지 않은 목은 냄새, 너무 과숙된 냄새(2), 식욕이 전혀 자극되지 않는 냄새, 시큼한 냄새, 쓴맛 이 느껴지는 향기와 같이 강제발효된 냄새(2) |
| M4LP | 긍정적 | 목은지 냄새 그러나 매우 다양한 냄새, 잘익은 냄새 |
| | 중간적 | 강한김치향(2) |
| | 부정적 | 오래묵힌 김치향, 익은듯하나 향기는 조금약함, 균냄새, 좋지 않은 균내, 기존 목은지와 다른 시큼한 향기, 젓갈 비린내가 남 |
| M7DPW | 긍정적 | 시큼한 목은지의 균등내, 잘익은냄새, 시큼하고 좋은 향(2), 좋은 목은지 냄새(2) |
| | 중간적 | 잘익은 김치향기 그러나 향이 조금 부족함 |
| | 부정적 | 이취(2), 신냄새, 향이 약함 |
| M10R | 긍정적 | 목은지향기, 적절한 목은지향기, 목은 향기가 나면서 향기가 더욱 다채로움 |
| | 중간적 | |
| | 부정적 | 과숙된 냄새, 약한 김치냄새, 이취 |
| M11W | 긍정적 | 잘익은 냄새 |
| | 중간적 | 중간정도 숙성된 목은지 |
| | 부정적 | 시큼한 균내(2), 약간 비린내(3), 강한 신냄새, 이취, 너무 강 하고 독한 김치냄새(2) |

(2) 2차 모의 발효 실험

목은지 발효 종균 선정을 위하여 1차 모의 발효를 통해 선정된 유산균 4종(ML7, ML11, ML13, ML17)과 효모 1종(MY7)을 김치에 단독 또는 혼합 형태로 첨가하여 2차 모의 발효를 시행함. 균주를 첨가한 김치는 10℃에서 7일간 1차 발효한 후 발효 30일까지 0℃에서 2차 숙성하면서 pH, 산도, 미생물 균총 변화를 측정하고 발효 종료 후 물성, 유기산, 유리 아미노산, 휘발성 향기 성분 분석 및 관능평가를 시행함.

(가) pH 및 산도의 변화

9종의 모의 발효 김치의 pH는 1차 발효(10℃, 7일) 후 pH 4.0~4.2의 범위로 적숙기의 pH를 나타내며, 산도 역시 대부분 1.0 이상으로 발효가 상당히 빨리 진행되고 있음을 확인할 수 있음. 이후 0℃ 숙성 후에는 완만한 변화 양상을 나타냄(표 19~20).

표 19. 모의 발효 김치의 pH 변화

| pH | Fermentation time (days) | | | | | | |
|----------|--------------------------|-------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| | 0 | 2 | 4 | 7 | 10 | 20 | 30 |
| | Fermentation at 10℃ | | | | Storage at 0℃ | | |
| ML7 | 5.894 | 5.808 | 4.581 | 4.082 | 4.014 | 4.121 | 3.905 |
| ML11 | 6.023 | 6.075 | 4.599 | 4.19 | 4.111 | 4.073 | 4.058 |
| ML13 | 6.051 | 6.154 | 4.687 | 4.138 | 4.143 | 4.077 | 4.026 |
| ML17 | 6.033 | 6.085 | 4.668 | 4.183 | 4.117 | 4.133 | 4.079 |
| MY7 | 6.046 | 5.753 | 4.599 | 4.208 | 4.155 | 4.143 | 4.109 |
| ML7+MY7 | 5.938 | 5.748 | 4.464 | 4.127 | 4.06 | 4.001 | 3.937 |
| ML11+MY7 | 5.998 | 6.008 | 4.726 | 4.216 | 4.22 | 4.223 | 4.147 |
| ML13+MY7 | 6.188 | 5.922 | 4.561 | 4.179 | 4.129 | 4.128 | 4.000 |
| ML17+MY7 | 5.985 | 5.876 | 4.59 | 4.249 | 4.172 | 4.178 | 4.128 |

표 20. 모의 발효 김치의 산도 변화

| Acidity(%) | Fermentation time (days) | | | | | | |
|------------|--------------------------|-------|-------|-------|---------------|-------|-------|
| | 0 | 2 | 4 | 7 | 10 | 20 | 30 |
| | Fermentation at 10℃ | | | | Storage at 0℃ | | |
| ML7 | 0.306 | 0.306 | 0.586 | 0.928 | 1.036 | 1.144 | 1.288 |
| ML11 | 0.288 | 0.284 | 0.640 | 1.036 | 1.054 | 1.171 | 1.144 |
| ML13 | 0.279 | 0.261 | 0.649 | 1.144 | 1.234 | 1.207 | 1.405 |
| ML17 | 0.270 | 0.279 | 0.766 | 1.036 | 1.144 | 1.171 | 1.144 |
| MY7 | 0.270 | 0.342 | 0.712 | 1.113 | 1.009 | 1.009 | 1.063 |
| ML7+MY7 | 0.288 | 0.360 | 0.964 | 1.216 | 1.243 | 1.239 | 1.248 |
| ML11+MY7 | 0.297 | 0.279 | 0.766 | 1.225 | 1.207 | 1.207 | 1.203 |
| ML13+MY7 | 0.248 | 0.293 | 0.784 | 1.023 | 1.072 | 1.117 | 1.144 |
| ML17+MY7 | 0.288 | 0.297 | 0.838 | 1.081 | 1.234 | 1.216 | 1.117 |

(나) 미생물학적 특성

전체 발효 기간 동안 모의 발효 김치의 유산균 및 효모수의 변화를 측정함(표 21~22). 1차 발효 직후 유산균수는 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL까지 증가하여 최대값을 나타내었으며, 이후 완만하게 감소하여 효모가 첨가된 김치도 유산균만 첨가된 김치와 동일한 양상을 나타냄. 발효 30일 후에는 약 10^8 CFU/mL의 균수를 나타냄.

효모수의 변화는 유산균만 첨가된 김치에서는 초기 약 10^3 CFU/mL에서 시작하여 발효가

진행됨에 따라 일정한 수준을 유지하다가 숙성 20일부터 급격히 증가하여 발효 30일에는 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL의 효모수를 나타냄. 효모 또는 유산균과 효모가 함께 첨가된 김치에서는 효모수가 첨가된 효모에 의하여 제조당일 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL에서 시작하여 1차 발효 직후 최대 값($10^7 \sim 10^8$ CFU/mL)을 나타내었으며, 이후 완만하게 감소하여 발효 30일에 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL를 나타냄.

표 21. 숙성 발효 묵은지의 유산균의 경시적 변화

| LAB viable cell(CFU/mL) | Fermentation time (days) | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|--------------------|
| | 0 | 2 | 4 | 7 | 10 | 20 | 30 |
| | Fermentation at 10℃ | | | | Storage at 0℃ | | |
| ML7 | 2.34×10^8 | 2.29×10^8 | 1.21×10^9 | 2.85×10^9 | 1.71×10^9 | 1.56×10^9 | 5.9×10^8 |
| ML11 | 7.0×10^4 | 1.47×10^6 | 1.14×10^8 | 6.08×10^9 | 2.6×10^9 | 6.6×10^8 | 1.56×10^8 |
| ML13 | 1.82×10^7 | 2.29×10^7 | 1.23×10^9 | 1.87×10^{10} | 1.71×10^{10} | 8.9×10^8 | 3.6×10^8 |
| ML17 | 5.5×10^5 | 2.83×10^6 | 1.67×10^8 | 3.04×10^9 | 1.6×10^9 | 9.2×10^8 | 1.48×10^8 |
| MY7 | 3.0×10^4 | 1.95×10^6 | 2.73×10^8 | 4.5×10^9 | 7.4×10^8 | 5.0×10^8 | 3.7×10^8 |
| ML7+MY7 | 9.9×10^7 | 1.51×10^8 | 1.43×10^9 | 9.5×10^9 | 3.15×10^9 | 2.34×10^9 | 1.81×10^9 |
| ML11+MY7 | 1.0×10^4 | 9.5×10^5 | 1.05×10^8 | 8.6×10^9 | 1.52×10^9 | 1.07×10^9 | 3.02×10^8 |
| ML13+MY7 | 7.7×10^6 | 1.59×10^7 | 3.12×10^8 | 4.6×10^9 | 1.73×10^9 | 1.36×10^9 | 3.2×10^8 |
| ML17+MY7 | 3.1×10^5 | 3.3×10^6 | 2.46×10^8 | 3.9×10^9 | 1.82×10^9 | 1.57×10^9 | 1.79×10^8 |

표 22. 숙성 발효 묵은지의 효모의 경시적 변화

| Yeast viable cell(CFU/mL) | Fermentation time (days) | | | | | | |
|---------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | 0 | 2 | 4 | 7 | 10 | 20 | 30 |
| | Fermentation at 10℃ | | | | Storage at 0℃ | | |
| ML7 | 6.3×10^3 | 4.3×10^3 | 1.7×10^3 | 2.0×10^2 | 3.5×10^2 | 8.0×10^3 | 8.0×10^5 |
| ML11 | 8.2×10^3 | 8.7×10^2 | 6.0×10^2 | 8.7×10^2 | 4.6×10^2 | 2.36×10^4 | 1.22×10^5 |
| ML13 | 3.4×10^3 | 1.89×10^3 | 1.1×10^3 | 7.7×10^3 | 2.81×10^4 | 7.1×10^4 | 3.6×10^6 |
| ML17 | 7.4×10^3 | 5.8×10^2 | 6.0×10^2 | 4.0×10^2 | 5.2×10^2 | 3.7×10^4 | 2.74×10^5 |
| MY7 | 1.94×10^6 | 1.72×10^7 | 9.1×10^7 | 1.07×10^8 | 3.1×10^7 | 4.5×10^7 | 1.16×10^7 |
| ML7+MY7 | 1.42×10^6 | 7.2×10^6 | 1.03×10^8 | 1.46×10^8 | 5.9×10^7 | 3.2×10^7 | 4.6×10^6 |
| ML11+MY7 | 1.03×10^6 | 3.9×10^6 | 3.8×10^7 | 6.9×10^7 | 6.0×10^7 | 5.4×10^7 | 1.72×10^7 |
| ML13+MY7 | 5.3×10^5 | 8.3×10^6 | 7.4×10^7 | 2.39×10^8 | 6.1×10^7 | 5.5×10^7 | 1.3×10^6 |
| ML17+MY7 | 1.19×10^6 | 4.7×10^6 | 7.6×10^7 | 1.48×10^8 | 9.7×10^7 | 7.3×10^7 | 1.88×10^7 |

(다) 물성 측정

김치의 경도 및 강도가 가장 낮은 김치는 ML11 유산균이 첨가된 김치(ML11, ML11+MY7)였으며, ML7과 ML17의 유산균이 첨가된 김치(ML7, ML17, ML7+MY7,

ML17+MY7)는 비교적 높은 경도 및 강도를 나타냄. 이러한 결과는 유산균의 종류에 따른 유기산 및 대사물질에서 기인하는 것으로 생각되며, 효모가 첨가된 김치에서 경도 및 강도가 특별히 감소되지 않음은 MY7 효모가 연부현상을 일으키는 산막 효모의 종류가 아님을 알 수 있음.

표 23. 모의 발효 김치의 물성

| Kimchi | Strength (g/cm ²) | Hardness (g/cm ²) |
|----------|-------------------------------|-------------------------------|
| ML7 | 6843.333±1352.196 | 8353.333±1305.425 |
| ML11 | 4323.333±1046.438 | 5456.667±1053.107 |
| ML13 | 4486.667±675.747 | 5950.000±1033.199 |
| ML17 | 6455.000±219.203 | 7835.000±162.635 |
| MY7 | 4540.000±1307.784 | 5966.667±1183.272 |
| ML7+MY7 | 5003.333±360.046 | 6306.667±740.968 |
| ML11+MY7 | 4230.000±1217.415 | 5606.667±1496.741 |
| ML13+MY7 | 4566.667±350.048 | 5883.333±336.502 |
| ML17+MY7 | 5016.667±425.480 | 6566.667±1266.386 |

(라) 유기산 함량

유기산 분석 결과 모의 발효 김치의 주요 유기산은 lactic acid와 acetic acid이며, 첨가된 발효 균주에 따라 citric acid와 succinic acid의 생성 여부가 다르게 나타남(표 24). Malic acid의 경우 모든 김치에서 검출되지 않았으며 lactic acid는 ML13 김치에서 가장 많은 함량을 나타내었으며 ML17+MY7에서 가장 낮은 함량을 나타냄. Acetic acid는 393.4~595.9 mg% 범위로 측정됨. Citric acid는 ML7, ML11, ML13, ML17, ML11+MY7 김치에서 검출되었으며, 김치에 감칠맛을 부여하는 succinic acid는 ML13, ML17, ML11+MY7, ML17+MY7 김치에서만 검출되었음. 모든 김치는 동일한 재료를 사용하여 제조되었으므로 김치의 유기산 종류 및 함량의 차이는 김치 내 미생물의 천이에 따라 달라진 것으로 생각됨.

표 24. 모의 발효 김치의 유기산 함량

| Kimchi | Organic acids (mg%) | | | | |
|----------|---------------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| | Malic acid | Lactic acid | Acetic acid | Citric acid | Succinic acid |
| ML7 | 0.00 | 857.29 | 445.49 | 62.93 | 0.00 |
| ML11 | 0.00 | 1012.55 | 427.74 | 101.30 | 0.00 |
| ML13 | 0.00 | 2592.52 | 561.46 | 121.29 | 197.40 |
| ML17 | 0.00 | 1993.75 | 464.87 | 128.50 | 413.65 |
| MY7 | 0.00 | 1167.34 | 492.44 | 0.00 | 0.00 |
| ML7+MY7 | 0.00 | 2093.85 | 393.42 | 0.00 | 0.00 |
| ML11+MY7 | 0.00 | 860.60 | 595.88 | 126.30 | 279.89 |
| ML13+MY7 | 0.00 | 784.01 | 460.11 | 0.00 | 0.00 |
| ML17+MY7 | 0.00 | 832.44 | 498.58 | 0.00 | 116.21 |

(마) 유리 아미노산 함량

모의 발효 김치의 주요 유리 아미노산은 alanine과 asparagine이며 glutamic acid, valine, proline, lysine 등이 비교적 높은 함량을 나타냄(표 25). 효모 또는 유산균 첨가에 의한 유리 아미노산의 함량 변화는 뚜렷한 경향성을 나타내지 않음. 유리 아미노산은 종류에 따라 감칠맛, 단맛, 쓴맛 등 다양한 맛에 관여하므로 김치의 종류에 따른 다양한 유리 아미노산의 종류와 함량에 따라 김치의 관능적 특성에 상당한 영향을 받을 것으로 추정됨.

표 25. 모의 발효 김치의 유리 아미노산 함량

| Free amino acids (mg/100g) | Kimchi | | | | | | | | | |
|--------------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|-------------|--------------|--------------|--------------|--|
| | ML7 | ML11 | ML13 | ML17 | MY7 | ML7+ MY7 | ML11 +MY7 | ML13 +MY7 | ML17 +MY7 | |
| Taurine | 8.13 | 7.90 | 7.60 | 6.06 | 7.49 | 6.67 | 7.98 | 5.01 | 7.81 | |
| Urea | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| Aspartic acid | 12.15 | 8.89 | 10.29 | 4.71 | 3.27 | 4.30 | 16.12 | 1.85 | 4.79 | |
| Threonine | 16.56 | 18.77 | 17.56 | 13.22 | 16.71 | 13.52 | 19.83 | 13.00 | 22.45 | |
| Serine | 21.43 | 23.93 | 23.05 | 17.12 | 21.32 | 18.35 | 27.29 | 16.74 | 30.25 | |
| Glutamic acid | 35.28 | 39.57 | 48.52 | 36.42 | 32.00 | 28.97 | 29.14 | 29.62 | 33.80 | |
| Asparagine | 54.90 | 61.45 | 66.97 | 46.01 | 68.08 | 54.36 | 76.81 | 49.65 | 81.13 | |
| Sarcosine | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| α -Amino adipic acid | 0.98 | 1.16 | 1.38 | 0.89 | 1.01 | 0.59 | 1.79 | 0.51 | 1.11 | |
| Glycine | 15.79 | 16.59 | 17.47 | 12.84 | 19.41 | 15.90 | 21.27 | 13.45 | 23.24 | |
| Alanine | 90.57 | 106.36 | 110.73 | 80.28 | 113.15 | 93.00 | 110.37 | 357.78 | 125.75 | |
| Citrulline | 3.03 | 2.69 | 2.39 | 1.26 | 1.94 | 3.05 | 1.12 | 2.43 | 4.05 | |
| α -Amino-n-butyric acid | 3.52 | 3.59 | 3.61 | 2.66 | 3.42 | 3.02 | 3.21 | 2.16 | 3.59 | |
| Valine | 28.16 | 30.46 | 32.81 | 22.50 | 28.29 | 23.92 | 32.40 | 20.31 | 34.57 | |
| Cystine | 3.40 | 3.59 | 4.53 | 2.61 | 2.95 | 2.42 | 2.98 | 1.84 | 4.42 | |
| Methionine | 7.12 | 6.86 | 8.73 | 5.54 | 7.47 | 5.88 | 8.42 | 5.07 | 10.90 | |
| Cystathionine | 0.55 | 0.65 | 6.04 | 0.46 | 0.72 | 0.52 | 0.48 | 0.35 | 1.07 | |
| Isoleucine | 16.73 | 17.94 | 18.69 | 12.95 | 15.15 | 13.06 | 17.66 | 10.63 | 19.26 | |
| Leucine | 24.20 | 24.94 | 25.87 | 18.04 | 21.59 | 17.84 | 26.00 | 16.26 | 28.95 | |
| Tyrosine | 7.52 | 6.51 | 7.72 | 4.83 | 5.09 | 5.27 | 7.86 | 4.07 | 5.54 | |
| Phenylalanine | 16.48 | 17.10 | 17.36 | 12.36 | 15.84 | 14.21 | 18.67 | 11.02 | 18.97 | |
| β -Alanine | 3.35 | 2.50 | 2.92 | 2.25 | 3.02 | 2.37 | 4.09 | 1.25 | 2.20 | |
| β -Amino isobutyric acid | 0.52 | 0.27 | 0.30 | 0.21 | 0.39 | 0.28 | 0.84 | 0.22 | 0.51 | |
| γ -amino-n-butyric acid | 8.33 | 8.31 | 8.10 | 6.13 | 9.14 | 7.01 | 10.68 | 6.05 | 9.37 | |
| Tryptophan | 2.40 | 2.65 | 2.57 | 1.84 | 2.68 | 2.06 | 3.04 | 1.88 | 3.11 | |
| Hydroxylysine | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| Ornithine | 17.62 | 19.21 | 21.25 | 8.90 | 8.03 | 9.23 | 25.60 | 4.78 | 5.05 | |
| Lysine | 26.78 | 28.16 | 29.01 | 20.52 | 26.33 | 20.74 | 32.34 | 18.82 | 33.06 | |
| 1-Methylhistidine | 2.73 | 3.24 | 3.35 | 2.12 | 2.98 | 2.60 | 3.72 | 2.05 | 3.74 | |
| Histidine | 7.54 | 7.95 | 8.57 | 5.52 | 6.14 | 6.15 | 9.42 | 4.54 | 8.16 | |
| 3-Methylhistidine | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| Anserine | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| Carnosine | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 11.39 | |
| Arginine | 3.42 | 1.39 | 0.96 | 0.79 | 0.68 | 2.75 | 0.26 | 0.68 | 0.39 | |
| HydroProline | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | |
| Proline | 22.70 | 18.09 | 46.64 | 28.91 | 29.88 | 24.43 | 36.48 | 25.24 | 20.03 | |

(바) 휘발성 향기성분

모의 발효 김치의 휘발성 향기 성분을 GC-MS를 이용하여 분석하였으며, 대조구로 1년 숙성 묵은지(화원농협)를 사용하여 비교함(표 26). 휘발성 향기 성분은 김치에 따라 12~19종의 성분이 분석되었음(표 27). 검출된 향기성분은 alcohols, aldehydes, acids, sulfides, nitrogen compounds, terpenoides 화합물이 검출되었음. 실험구간 검출된 성분의 종류에는 다소 차이가 있으나 실험구 모두에서 sulfides가 가장 많이 검출되었음. 이들 sulfide는 alkyl, allyl, alkyl allyl sulfide가 대부분이었으며, 이들 물질들은 배추에 함유된 sulfoxides, thioglucosides, sulfur-containing amino acid와 sulfonium compound 등의 전구물질로부터 분리된 것으로 보임. 또한 전체 실험구 및 대조구에서 3종의 같은 terpenoides물질(alpha-pinene, camphene, beta-phellandrene)이 검출되었음. 검출된 향기 성분 중 acetaldehyde, 3-methyl-2-butanol, heptanal, 3-methoxy-1,2-propanediol, benzeneacetaldehyde, allyl methyl trisulfide, ethyl acetate는 유산균 첨가 김치에서만 검출되었으며 MY7 효모만 단독으로 첨가한 김치에서 methylthio methane, 1-pentanol이 검출됨. Sulfides물질 중 4-isothiocyano-1-butene의 경우 배추의 주된 휘발성분으로서 군덕내에 관여하는 물질로서 1년 숙성 묵은지에서만 검출되었음.

표 26. 모의 발효 김치의 휘발성 향기 성분 종류

| No. | Compounds (group) | Mukeunji | | | | | | | | | |
|-----|--|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 | Ethanol (alcohols) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | Dimethyl sulfide (sulfides) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | 0 | | | 0 |
| 3 | Acetaldehyde (aldehydes) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 4 | Acetic acid (acids) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 3-Methyl butanal (aldehydes) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 3-(Methylthio)-1-propene = allyl methyl sulfide (sulfides) | 0 | | | 0 | | | | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 3-Methyl-2-butanol (alcohols) | 0 | | | | | | | | | |
| 8 | Heptanal (aldehydes) | 0 | | | | | | | | | |
| 9 | Dimethyl disulfide (sulfides) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 10 | 2,3-Butanediol (alcohols) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11 | 3-Methoxy-1,2-propanediol (alcohols) | 0 | | | 0 | | | | | | |
| 12 | 3-(Methyldisulfanyl)-1-propene = allyl methyl disulfide (sulfides) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 13 | Alpha-pinene (terpenoides) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 14 | Camphene = 2,2-dimethyl-3-methylene-bicyclo 2.2.1 heptane (terpenoides) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 15 | Dimethyl trisulfide (sulfides) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 0 | | 0 | 0 |
| 16 | Beta-phellandrene(sabinene) (terpenoides) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 17 | Benzeneacetaldehyde (aldehydes) | 0 | | | | | | | | | |
| 18 | Diallyl disulphide (sulfides) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 19 | Allyl methyl trisulfide (sulfides) | 0 | 0 | 0 | 0 | | | | | | |
| 20 | 1-(Methylthio)-1-propene (sulfides) | | 0 | | | 0 | | | | | |
| 21 | Ethyl acetate (acids) | | 0 | | 0 | | | | | | |
| 22 | 1,3-Butanediol (alcohols) | | | 0 | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 23 | 3-Methyl-1-butanol (alcohols) | | | 0 | | | 0 | | 0 | 0 | |
| 24 | 4-Methyl-4-heptanol (alcohols) | | | 0 | | | | | | | |
| 25 | Methylthio methane (sulfides) | | | | | 0 | | | | | |
| 26 | 1-Pentanol (alchols) | | | | | 0 | | 0 | | | |
| 27 | 3-Methyl-2-pentanol (alcohols) | | | | | | | | 0 | | |
| 28 | Allyl sulfide (sulfides) | | | | | | | | | | 0 |
| 29 | Pentanedinitrile (nitrogen compounds) | | | | | | | | | | 0 |
| 30 | 4-Isothiocyanato-1-butene (sulfides) | | | | | | | | | | 0 |

1, ML7; 2, ML11; 3, ML13; 4, ML17; 5, MY7; 6, ML7+MY7; 7, ML11+MY7; 8, ML13+MY7; 9, ML17+MY7; 10, 1 year fermented mukeunji.

표 27. 휘발성 향기 성분의 화학적 분류

| Compounds group | Kimchi | | | | | | | | | |
|-------------------|--------|------|------|------|-----|---------|----------|----------|----------|---------|
| | ML7 | ML11 | ML13 | ML17 | MY7 | ML7+MY7 | ML11+MY7 | ML13+MY7 | ML17+MY7 | Control |
| Alchols | 4 | 2 | 5 | 3 | 3 | 4 | 4 | 5 | 4 | 3 |
| Acids | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Aldehydes | 4 | 2 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Sulfides | 7 | 7 | 6 | 7 | 6 | 3 | 5 | 4 | 5 | 7 |
| Terpenoides | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Nitrogen compound | | | | | | | | | | 1 |
| Total | 19 | 16 | 17 | 17 | 14 | 12 | 14 | 14 | 14 | 16 |

(사) 관능평가

모의 발효 30일 후 김치의 관능평가를 시행하였으며 1년 숙성 묵은지를 대조구로 사용함 (표 28). 전체 기호도는 1년 숙성 묵은지 > ML17+MY7 > ML7 > ML11 > ML13 > ML17 > ML7+MY7 > MY7=ML11+MY7 > ML13+MY7 순이었음. 1년 숙성 묵은지와 ML17+MY7는 거의 비슷한 값으로 높은 기호도를 나타냄. ML17+MY7을 제외한 효모가 첨가된 혼합 균주 실험구 에서는 균덕내의 발생으로 전반적으로 기호도가 낮았음.

김치의 외관(윤기, 색)은 ML7+MY7 > ML17+MY7 > ML7 > MY7 > 1년 숙성 묵은지 > ML11 > ML13 > ML17 > ML11+MY7 > ML13+MY7 순으로 나타남.

향미의 정도는 ML17+MY7 > 1년 숙성 묵은지 > ML11 > ML7 > MY7 > ML17 > ML7+MY7 > ML13 > ML11+MY7 > ML13+MY7 순으로 나타났으며, 유산균 단일 첨가군 보다 효모의 분포가 많은 혼합 균주 실험구 에서 대체로 낮은 기호도를 나타냄.

고유한 묵은지맛은 ML17+MY7 > 1년 숙성 묵은지 > MY7 > ML13+MY7 > ML13 > ML17 > ML7+MY7 > ML11 > ML7 > ML11+MY7 순으로 나타났으며, 요소별 상관성은 없었음.

신맛에 대한 기호도는 1년 숙성 묵은지 > ML17+MY7 > ML7 > ML17 > ML11 > MY7 > ML13 > ML7+MY7 > ML11+MY7 > ML13+MY7 순으로 나타남.

탄산미는 1년 숙성 묵은지 > ML17+MY7 > ML13 > ML11 > ML17 > ML13+MY7 > ML7 > ML11+MY7 > ML7+MY7 > MY7 순으로 나타났으며, 유산균 단일 처리 실험구에서 더 높은 기호도를 나타냄.

감칠맛은 ML17+MY7 > 1년 숙성 묵은지 > ML7 > ML11 > ML11+MY7 > MY7 > ML7+MY7 > ML13 > ML17 > ML13+MY7 순으로 나타남.

아삭한 정도는 ML17+MY7 > ML7 > ML13 > ML11 > ML11+MY7 > ML17 > ML7+MY7 > ML13+MY7 > MY7 > 1년 숙성 묵은지 순으로 나타남.

묵은지 종균 선정에 위한 모의발효 실험의 결과에 따라 발효특성이 우수하며 관능평가에서 묵은지 맛과 전체 기호도가 가장 우수한 ML17 유산균과 MY7 효모를 묵은지 종균으로 최종 선정하였음. 단일종균에 의한 발효특성을 비교하기 위하여 유산균 첨가구 중 전체 기호도가 가장 우수한 ML7 유산균을 비교 실험구로 선정함.

표 28. 모의 발효 김치의 관능 평가

| | Sensory test | | | | | | | |
|----------|--------------|-----------|-----------------|-----------|-------------------|--------------|-----------|-----------------------|
| | Appearance | Flavor | Mukeunji flavor | Sourness | Carbonated flavor | Savory taste | Texture | Overall acceptability |
| ML7 | 3.67±0.6 | 2.92±0.9 | 2.83±1.0 | 3.00±0.8 | 2.75±0.7* | 3.08±0.9 | 3.42±0.5* | 3.17±1.0 |
| ML11 | 3.08±0.7 | 3.00±0.9 | 2.92±0.6* | 2.75±0.9 | 2.92±0.6* | 3.00±1.0 | 3.08±0.9* | 2.92±0.9 |
| ML13 | 3.00±0.9 | 2.25±0.6* | 3.00±0.8 | 2.42±0.9* | 3.08±0.7 | 2.75±0.9* | 3.33±0.8* | 2.91±0.8 |
| ML17 | 2.83±0.5 | 2.67±0.6 | 3.00±0.7 | 2.92±0.6 | 2.83±0.7* | 2.67±0.8* | 3.00±0.6* | 2.75±0.7* |
| MY7 | 3.36±0.9 | 2.83±1.1 | 3.08±0.9 | 2.50±1.1* | 2.67±0.9* | 2.92±1.1 | 2.58±1.0 | 2.50±1.0* |
| ML7+MY7 | 3.92±0.5 | 2.33±0.8* | 3.00±1.1 | 2.25±1.0* | 2.73±0.7* | 2.83±0.8* | 3.00±0.9 | 2.67±0.8* |
| ML11+MY7 | 2.83±0.8 | 2.25±0.8* | 2.83±1.1 | 2.25±1.0* | 2.75±0.9* | 3.00±0.9 | 3.08±0.6* | 2.50±1.0* |
| ML13+MY7 | 2.50±1.0 | 1.92±0.5* | 3.08±1.2 | 2.17±1.0* | 2.83±0.9* | 2.67±1.0* | 2.75±0.9 | 2.42±0.9 |
| ML17+MY7 | 3.92±0.6 | 3.50±0.6 | 3.75±0.7 | 3.17±1.0 | 3.50±0.6 | 3.67±0.8 | 3.75±0.6* | 3.50±0.7 |
| Control | 3.33±0.9 | 3.33±0.9 | 3.58±0.9 | 3.42±0.7 | 3.58±0.5 | 3.50±0.5 | 2.25±0.9 | 3.55±0.8 |

Values are means from 20 determinations. score 5 is extremely good. student's t-test $p < 0.05$, * $p < 0.05$ compared to the control. control: 1 year fermented mukeunji.

라. 종균 묵은지의 제조 및 발효 특성 조사

모의 발효 실험 결과 묵은지 종균으로 선정된 ML17 유산균과 MY7 효모를 혼합종균(mixed starter)으로 하고, 비교 실험구로 선정된 ML7을 단일종균(single starter)으로 하여 종균 묵은지의 발효 특성 분석과 제조 공정 확립을 위한 종균 묵은지를 제조함. 종균 묵은지는 모의 발효 시 김치의 발효 특성과 관능평가 결과를 바탕으로 종균의 첨가량을 조정하였으며, 10℃에서 7일 발효 후 90일 까지 김치 냉장고(-1℃)에서 숙성하며 발효 특성을 조사함. 종균을 첨가하지 않은 김치를 대조구(control) 김치로 하였음.

(1) pH 및 산도 변화

김치의 숙성에 따라 pH는 저하되고 산도는 증가하는 경향을 나타내었으나, 대조구 김치에 비하여 종균 첨가 김치의 pH가 더 빨리 저하되어 90일 동안 낮은 pH를 유지하였으며, 산도 또한 더 높은 상태를 유지하였음(그림 12~13). 단일종균 첨가 김치의 경우 혼합종균 첨가 김치에 비해 같은 기간 더 낮은 pH와 더 높은 산도를 나타내었음. 이는 혼합종균의 경우 첨가된 효모에 의하여 유산균이 생산한 유기산이 일부 소모되었기 때문으로 생각됨. 그러나 발효 종료시점인 90일 후에는 두 종균 첨가구 모두에서 pH 3.94, 산도 1.18%로서 같은 값을 보이며 1년 숙성 묵은지(화원농협 묵은지; pH 3.96, 산도 1.25%)와 유사한 수준을 나타냄.

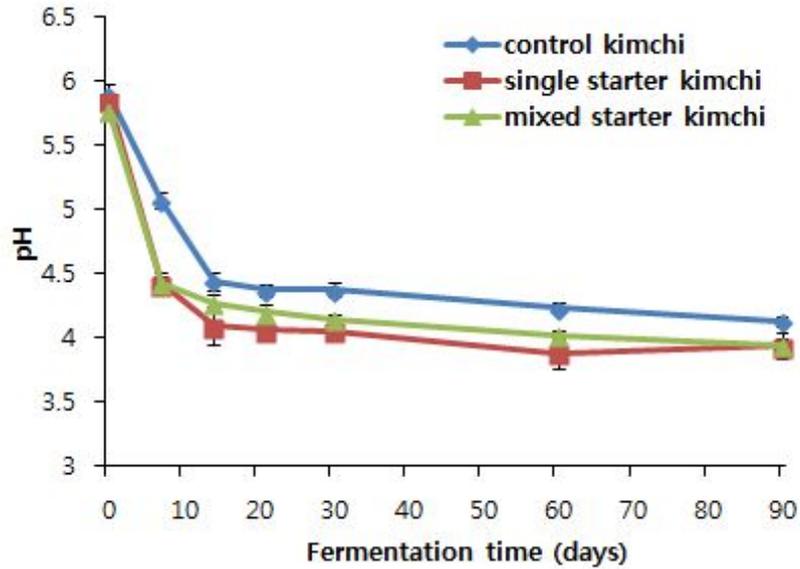


그림 12. 김치의 pH 변화

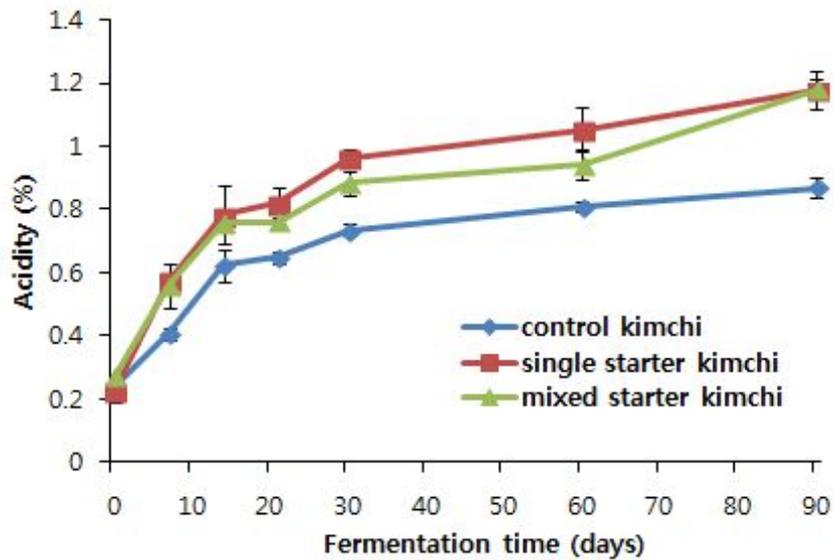


그림 13. 김치의 산도 변화

(2) 김치의 물성 변화

발효가 진행됨에 따라 전반적으로 김치의 경도는 감소하는 경향을 나타냄(표 29). 단일종균 김치의 경도는 제조 직후 9,987 g/cm²에서 발효 90일에 8,834 g/cm²로 감소하였고, 혼합종균 김치의 경도는 김치제조 직후 9,917 g/cm²에서 발효 90일에 8,707 g/cm²로 감소하였으며, 대조구 김치의 경도는 제조 직후 9,902 g/cm²에서 발효 90일에 8,179 g/cm²로 감소하는 것으로 나타나 대조구 김치의 경도변화가 단일 및 혼합종균 김치에 비해 좀 더 빠르게 진행됨을 알 수 있었음.

김치에서 물성의 변화는 소금의 탈수작용으로 인하여 배추조직에 함유된 효소들이 활성화되면서 세포벽 다당류와 단백질 등의 거대분자를 분해시켜 초래되며 이와 더불어 발효후기

에 나타나는 효모가 분비하는 펙틴분해효소에 의해 세포벽과 펙틴 물질이 분해되어 김치조직이 연화하는 연부현상이 발생하는 것으로 알려져 있음. 그 외에도 미생물에 의해 생성된 유기산의 함량에 의하여 조직감의 변화가 발생함.

단일 및 혼합종균 김치와 대조구 김치는 동일한 농도의 소금 절임으로 제조되었으므로 이들 김치의 정도의 차이는 발효 기간 동안 유산균에 의해 생성되는 유기산의 종류 및 함량과 발효 후기에 나타나는 효모의 차이에서 발생한 것으로 여겨짐.

표 29. 김치의 물성 변화

| Kimchi | Fermentation time (days) | | | | | |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| | Fermentation at 10℃ | | Storage at -1℃ | | | |
| | 0 | 7 | 30 | 60 | 90 | |
| Control kimchi | 9,902±235 ^a | 9,315±112 ^b | 8,927±326 ^{bc} | 8,554±210 ^{cd} | 8,179±173 ^d | |
| Hardness (g/cm ²) | Single starter kimchi | 9,987±384 ^a | 9,498±362 ^{ab} | 9,291±245 ^{bc} | 9,065±296 ^{bc} | 8,834±336 ^c |
| | Mixed starter kimchi | 9,917±187 ^a | 9,474±133 ^{ab} | 9,307±331 ^b | 8,940±239 ^{bc} | 8,707±450 ^c |

Means with the same letter in a row are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(3) 미생물 균총 변화

(가) 총균수

대조구 김치는 초기 5.3 log CFU/mL에서 발효 30일에 9.2 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하였음. 단일종균 김치는 초기 7.7 log CFU/mL에서 서서히 증가하여 발효 60일에 9.4 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 발효 90일에는 8.7 log CFU/mL로 감소하였음. 혼합종균 김치는 초기 6.8 log CFU/mL에서 시작하여 대조구 김치와 유사하게 발효 30일에 9.2 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으나 이 후 대조구 김치와 단일종균 김치에 비하여 더 낮은 균수를 보이며 발효 90일에는 7.0 log CFU/mL까지 감소하였음.

(나) 유산균수

대조구 김치는 초기 5.2 log CFU/mL에서 발효 30일에 8.9 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 이 후 서서히 감소하여 발효 90일에는 7.8 log CFU/mL을 나타내었음. 단일종균 김치는 초기 7.4 log CFU/mL에서 서서히 증가하여 발효 60일에 9.2 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으며 발효 90일에는 8.3 log CFU/mL로 감소하였음. 혼합종균 김치는 초기 6.5 log CFU/mL에서 시작하여 대조구 김치와 유사하게 발효 30일에 9.1 log CFU/mL로 최대균수를 나타내었으나 이 후 대조구 김치와 단일종균 김치에 비하여 더 낮은 균수를 보이며 발효 90일에는 6.8 log CFU/mL까지 감소하였음.

(다) 효모수

대조구 김치는 초기 1.5 log CFU/mL로 시작하여 발효 60일에 4.1 log CFU/mL까지 증가

하였으며, 발효 90일에는 3.7 log CFU/mL을 나타내었음. 단일종균 김치는 초기 0.1 log CFU/mL에서 발효가 진행되는 동안 지속적으로 증가하여 발효 90일에 4.3 log CFU/mL까지 증가하였음. 혼합종균 김치는 초기 4.2 log CFU/mL에서 시작하여 1차 발효후(발효 7일) 6.2 log CFU/mL까지 증가하였으나 이 후 약간 감소하여 발효 90일에는 5.5 log CFU/mL를 나타냄.

(라) 종균 점유율

단일종균 김치에서 ML7 유산균의 점유율은 초기 98.6%로 시작하여 1차 발효후(발효 7일)에 90%로 약간 감소하였으나 이 후 다시 증가하여 95%이상을 유지하며 발효 90일에는 98.8%의 압도적으로 높은 점유율을 나타내며 발효 우점균주임을 확인함. 혼합종균 김치에서 ML17 유산균의 점유율은 초기 96.1%로 시작하여 발효가 진행될수록 서서히 감소하였으나 발효 90일 후에도 75.3%의 높은 점유율을 나타냄. 혼합종균 김치에서 MY7 효모의 점유율은 전체 발효 기간 동안 90% 이상의 점유율을 유지하며 다른 효모의 생육은 거의 발생하지 않았음.

단일 및 혼합종균 김치에서 종균의 점유율이 상당히 높은 비율을 나타내고 있음은 원부재료에 존재하는 유산균보다 첨가한 종균에 의해 발효가 조절되는 것임을 보여주는 결과이며, 이는 김치산업에서 일정한 품질을 유지할 수 있는 발효종균으로서 적용 가능성을 나타내는 결과임.

표 30. 김치의 미생물 균총 변화

| Kimchi | Microbial population (log CFU/mL) | Fermentation time (days) | | | | |
|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------|-----------------|------------|------------|
| | | Fermentation at 10°C | | Storage at -1°C | | |
| | | 0 | 7 | 30 | 60 | 90 |
| Control kimchi | Total viable cells | 5.3 ± 0.2 | 8.4 ± 0.3 | 9.2 ± 0.1 | 8.5 ± 0.2 | 8.4 ± 0.2 |
| | Lactic acid bacteria | 5.2 ± 0.3 | 8.3 ± 0.4 | 8.9 ± 0.3 | 8.3 ± 0.1 | 7.8 ± 0.2 |
| | Yeasts | 1.5 ± 0.4 | 2.8 ± 0.3 | 3.9 ± 0.3 | 4.1 ± 0.1 | 3.7 ± 0.3 |
| Single starter kimchi | Total viable cells | 7.7 ± 0.1 | 9.1 ± 0.2 | 9.1 ± 0.2 | 9.4 ± 0.3 | 8.7 ± 0.1 |
| | Lactic acid bacteria | 7.4 ± 0.2 | 8.8 ± 0.2 | 8.8 ± 0.4 | 9.2 ± 0.1 | 8.3 ± 0.2 |
| | Yeasts | 0.1 ± 0.4 | 2.5 ± 0.1 | 3.2 ± 0.2 | 3.7 ± 0.2 | 4.3 ± 0.3 |
| | Dominance of starter ML7 (%) | 98.6 | 90.0 | 95.5 | 97.6 | 98.8 |
| Mixed starter kimchi | Total viable cells | 6.8 ± 0.3 | 8.8 ± 0.2 | 9.2 ± 0.2 | 7.3 ± 0.3 | 7.0 ± 0.1 |
| | Lactic acid bacteria | 6.5 ± 0.3 | 8.6 ± 0.1 | 9.1 ± 0.3 | 7.2 ± 0.2 | 6.8 ± 0.1 |
| | Yeasts | 4.2 ± 0.1 | 6.2 ± 0.2 | 5.3 ± 0.1 | 5.8 ± 0.1 | 5.5 ± 0.2 |
| | Dominance of starter ML17/MY7 (%) | 96.1 /99.8 | 92.3 /98.7 | 93.9 /96.3 | 78.0 /93.3 | 75.3 /99.8 |

(4) 유기산 함량

발효 90일 후 김치의 유기산 함량을 측정하여 비교함(표 31). 유기산 분석결과 대조구 김치는 acetic acid의 함량이 가장 많은 것으로 나타났으나 1년 숙성 묵은지, 단일 및 혼합종균 김치에서는 lactic acid의 함량이 가장 많이 검출되었음. 모든 김치에서 lactic acid, acetic

acid의 함량이 많은 것으로 나타났으며, malic acid와 succinic acid의 경우 모든 김치에서 검출되지 않았음. Citric acid는 1년 숙성 묵은지에서는 75.540 mg%가 검출되고 대조구 김치에서는 검출되지 않은 반면 단일종균 김치에서는 499.876 mg%, 혼합종균 김치에서는 514.730 mg%의 많은 양이 검출되었음(표 31).

표 31. 김치의 유기산 함량

| Kimchi | Organic acids (mg%) | | | | |
|---------------------------|---------------------|------------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| | Malic acid | Lactic acid | Acetic acid | Citric acid | Succinic acid |
| Control kimchi | - | 612.719 ^c | 778.727 ^a | - | - |
| Single starter kimchi | - | 1,418.871 ^a | 323.100 ^c | 499.876 ^b | - |
| Mixed starter kimchi | - | 815.128 ^b | 561.761 ^b | 514.730 ^a | - |
| 1 year fermented mukeunji | - | 825.260 ^b | 563.858 ^b | 75.540 ^c | - |

-, not detected. Means with the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

(5) 유리 아미노산 함량

발효 90일 후 김치의 유리 아미노산을 분석한 결과 총 30~33종의 유리 아미노산이 검출되었음(표 32). 대조구와 단일종균 및 혼합종균 김치의 유리 아미노산의 함량은 일부 아미노산에서 다소 차이가 있으나 전체적인 비율은 대체로 비슷한 경향을 보임. 모든 김치에서 alanine의 함량이 가장 높았으며, 대조구 김치의 경우 serine, glutamic acid, valine, leucine, lysine, proline등의 함량이 비교적 많았음. 단일종균 및 혼합종균 김치에서는 aspartic acid, serine, glutamic acid, valine, leucine, lysine, arginine, proline등의 함량이 많았으며 특히 aspartic acid와 arginine의 경우 대조구 김치나 1년 숙성 묵은지에 비해 특히 높은 함량을 나타냄. 김치의 맛 성분을 형성하는 요인인 유리 아미노산의 경우 원 재료에서 유래되는 protease의 작용과 함께 발효 미생물에서 유래된 효소에 의해 단백질원이 분해되어 생성되며, 식품에 있어서 영양적 기능뿐만 아니라 식품의 맛에도 관여하므로 아미노산의 조성 및 함량에 따라 김치의 풍미에 영향을 줄 것으로 생각됨.

표 32. 김치의 아미노산 함량 분석

| Free amino acids (mg/100g) | Control kimchi | Single starter kimchi | Mixed starter kimchi | 1year fermented mukeunji |
|--------------------------------|-------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|
| Taurine | 6.34 | 7.34 | 6.30 | 8.95 |
| Aspartic acid | 11.64 | 33.10 | 26.49 | 7.58 |
| Threonine | 16.17 | 15.60 | 14.33 | 30.36 |
| Serine | 28.47 | 28.10 | 28.22 | 39.66 |
| Glutamic acid | 52.14 | 51.57 | 53.21 | 29.02 |
| Asparagine | 16.88 | 22.64 | 16.88 | 66.22 |
| Sarcosine | - | 1.01 | - | - |
| α -Amino adipic acid | 0.88 | 1.28 | 0.84 | 0.80 |
| Glycine | 15.11 | 15.40 | 14.68 | 29.16 |
| Alanine | 88.59 | 74.69 | 80.24 | 131.67 |
| Citrulline | 4.48 | 3.27 | 2.85 | 7.27 |
| α -Amino-n-butyric acid | 2.83 | 3.41 | 2.49 | 4.81 |
| Valine | 25.90 | 26.30 | 24.33 | 42.47 |
| Cystine | 3.19 | 3.18 | 3.09 | 3.47 |
| Methionine | 7.83 | 9.23 | 6.98 | 14.75 |
| Cystathionine | 0.78 | - | 0.41 | 1.39 |
| Isoleucine | 16.87 | 16.32 | 13.89 | 26.14 |
| Leucine | 23.04 | 24.31 | 19.59 | 43.66 |
| Tyrosine | 6.27 | 10.85 | 8.51 | 4.10 |
| Phenylalanine | 16.44 | 16.70 | 15.28 | 27.07 |
| β -Alanine | 3.24 | 3.16 | 3.24 | 2.08 |
| β -Amino isobutyric acid | 1.99 | 2.19 | 2.11 | 0.62 |
| γ -Amino-n-butyric acid | 9.97 | 12.78 | 11.34 | 34.38 |
| Tryptophan | 1.79 | 1.93 | 1.94 | 2.62 |
| Hydroxylysine | 0.04 | 0.09 | - | - |
| Ornithine | 5.74 | 4.11 | 0.43 | 1.28 |
| Lysine | 22.02 | 22.65 | 19.34 | 21.25 |
| 1-Methylhistidine | 3.22 | 3.24 | 3.36 | 5.09 |
| Histidine | 6.80 | 8.13 | 7.26 | 12.48 |
| 3-Methylhistidine | - | - | - | - |
| Anserine | - | 2.54 | - | - |
| Carnosine | - | 1.10 | - | 10.37 |
| Arginine | 7.16 | 31.58 | 28.88 | 16.17 |
| Hydroproline | 0.26 | 0.43 | 0.40 | - |
| Proline | 23.82 | 30.96 | 29.99 | 61.27 |
| total | 429.9 | 489.19 | 446.9 | 686.16 |

-, not detected.

(6) 관능 평가

90일 동안 발효된 대조구 김치와 단일 및 혼합종균 김치의 외관은 그림 14와 같음. 시판중인 1년 숙성 묵은지(화원농협)와 함께 관능평가를 시행한 결과(표 33) 김치의 외관(색, 윤기)은 혼합종균 김치(3.9점) > 단일종균 김치(3.7점) > 1년 숙성 묵은지(3.5점) > 대조구 김치(3.4점) 순으로 종균을 첨가한 김치가 더 좋은 점수를 나타냄.

균덕내의 정도는 대조구 김치(2.9점) > 1년 숙성 묵은지(2.6점) > 혼합종균 김치(2점) > 단일종균 김치(1.8점) 순으로 종균 첨가 김치가 대조구나 1년 숙성 묵은지 보다 더 낮은 강도를 나타냄. 김치의 균덕내는 발효후기 산막효모와 호기성 세균의 번식으로 발생하므로 종균 첨

가 김치의 경우 종균에 의한 주도적인 발효로 김치의 변패를 일으키는 미생물이 억제되어 균 덕내가 거의 나타나지 않은 것으로 여겨짐. 혼합종균 김치의 경우 종균 효모의 발효향미로 인해 단일종균 김치보다는 약간 높은 강도를 나타낸 것으로 생각됨.

묵은지 맛은 1년 숙성 묵은지(4.0점) > 혼합종균 김치(3.9점) > 단일종균 김치(3.5점) > 대조구 김치(2.8점) 순으로 1년 숙성 묵은지가 가장 높게 나타났으며 혼합종균 김치가 이와 유사하게 높은 점수를 나타냄.

신맛의 기호도는 혼합종균 김치(4.3점) > 단일종균 김치(4.1점) > 1년 숙성 묵은지(3.8점) > 대조구 김치(2.8점) 순으로 혼합종균 김치가 가장 높은 점수를 나타냄. 유기산 분석 결과를 볼 때 citric acid 함량이 신맛의 기호도에 영향을 주는 요인으로 생각되며 종균 김치의 경우 더 낮은 pH와 높은 산도에도 불구하고 신맛의 기호도가 높은 이유는 혼합종균에 의해 생성된 유기산들의 조화에 의한 것으로 생각됨.

탄산미의 기호도는 혼합종균 김치(3.7점) > 단일종균 김치(3.6점) > 1년 숙성 묵은지(3.5점) > 대조구 김치(2.9점) 순으로 혼합종균 김치가 가장 높은 점수를 나타냄. 김치에서 탄산미는 시원한 청량감을 주는 요소이며 종균에 의해 생성된 유기산과 더불어 바람직한 풍미를 형성함.

감칠맛은 혼합종균 김치 = 1년 숙성 묵은지(3.8점) > 단일종균 김치(3.5점) > 대조구 김치(3.1점) 순으로 나타남.

질감은 단일종균 김치(3.5점) > 혼합종균 김치(3.2점) > 1년 숙성 묵은지(2.8점) > 대조구 김치(2.6점) 순으로 물성 측정 결과에서와 같이 단일종균 김치가 가장 아삭한 것으로 나타남.

전체 기호도는 혼합종균 김치(4.1점) > 단일종균 김치 = 1년 숙성 묵은지(3.7점) > 대조구 김치(3.0점) 순으로 혼합종균 김치의 기호도가 가장 높게 나타남.

이상의 결과를 종합해 볼 때 혼합종균 김치가 1년 숙성 묵은지와 가장 유사한 묵은지 맛을 나타내며 각 관능 항목에서도 높은 기호도를 나타내었음. 김치에서 스타터의 첨가는 김치의 고유한 맛과 특성을 향상시키면서 품질을 일정하게 조절할 수 있는 가능성을 부여한다고 알려져 있음. 본 연구에서 혼합종균(유산균 *Lb. curvatus* ML17과 효모 *S. servazzii* MY7)을 묵은지 스타터로 사용하고 1차 발효와 2차 숙성으로 나누어 김치 발효를 진행하여 숙성기간을 단축시킴으로써 단기간에 묵은지 고유의 풍미가 발현되는 우수한 품질의 묵은지를 생산할 수 있는 가능성을 보여주었음.



그림 14. 90일 숙성 김치

표 33. 관능평가

| | Sensory test | | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Appearance | Off-flavor | Mukeunji flavor | Sourness | Carbonated flavor | Savory taste | Texture | Overall acceptability |
| Control kimchi | 3.4±0.7 ^b | 2.9±0.7 ^b | 2.8±0.6 ^c | 2.8±0.8 ^c | 2.9±1.0 ^b | 3.1±0.9 ^b | 2.6±0.7 ^c | 3.0±0.8 ^c |
| Single starter kimchi | 3.7±0.5 ^{ab} | 1.8±0.8 ^a | 3.5±1.0 ^b | 4.1±0.7 ^{ab} | 3.6±0.8 ^a | 3.5±1.2 ^{ab} | 3.5±0.8 ^a | 3.7±0.5 ^b |
| Mixed starter kimchi | 3.9±0.6 ^a | 2.0±0.7 ^a | 3.9±0.7 ^{ab} | 4.3±0.7 ^a | 3.7±0.8 ^a | 3.8±0.9 ^a | 3.2±0.6 ^{ab} | 4.1±0.3 ^a |
| 1year fermented mukeunji | 3.5±0.5 ^b | 2.6±0.5 ^b | 4.0±0.7 ^a | 3.8±0.6 ^b | 3.5±0.7 ^a | 3.8±0.9 ^a | 2.8±0.4 ^{bc} | 3.7±0.5 ^b |

Score 5 is extremely good or extremely strong (off-flavor). Values are mean (n=20). Means with the same letter in a column are not significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

마. 목은지 종균의 산업적 내구성 및 기능성 평가

목은지 종균으로 선정된 *Lb. curvatus* ML17과 *S. servazzii* MY7의 산업적 이용 가능성을 검토하기 위하여 균주의 생육곡선과 인체 안전성 여부를 평가하였으며, 식품에 적용하기 위한 내구성 평가로 pH 내구성과 내염성 여부를 측정함. 또한 유산균 *Lb. curvatus* ML17의 목은지 종균뿐만 아니라 다양한 산업적 활용 가능성을 검토하기 위하여 장내 생존성과 장내 부착능을 이용한 프로바이오틱 기능성, 항균 활성, 만니톨 생성능, 항산화 및 항암 활성여부를 평가함.

(1) 생육곡선 측정

ML17 유산균은 생육 4시간부터 대수기에 접어들어 생육 12시간 정도에 생육 정지기에 도달함. 이 후 생균수는 완만하게 감소함(그림 15). MY7 효모는 생육 8시간 이후에 대수기에 접어들어 생육 16시간 정도에 최대 생육도를 나타냄.

종균의 생육곡선에 따라 최적 배양 조건은 최대 생균수를 나타내는 배양 조건으로 설정함. ML17 유산균은 30℃, 24시간 배양조건으로, MY7 효모는 25℃, 16시간 배양 조건으로 설정함.

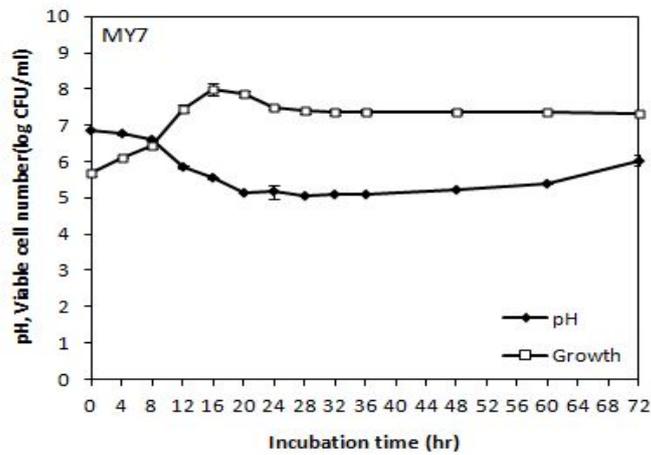
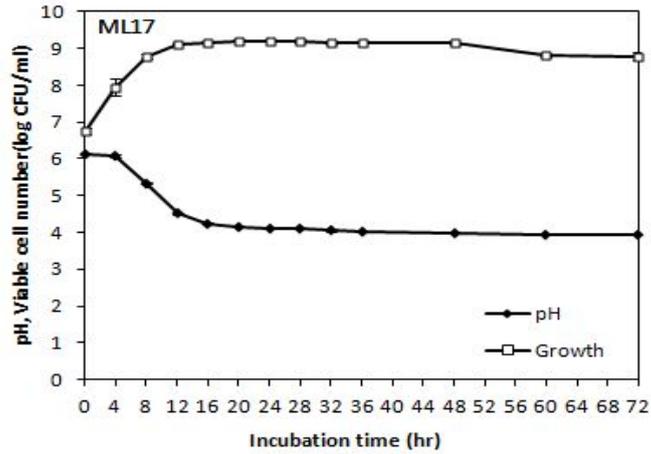


그림 15. *Lb. curvatus* ML17과 *S. servazzii* MY7의 생육곡선

(2) 인체 안전성 평가

(가) 용혈성 테스트 (Hemolysis test)

대조구로 사용한 *B. cereus*는 균체 주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환을 생성하여 용혈반응을 나타내었으나, ML17 유산균과 MY7 효모는 용혈반응을 나타내지 않았음(그림 16). 용혈독성이 없으므로 묵은지 발효 종균으로 안전성이 있는 것으로 확인됨.

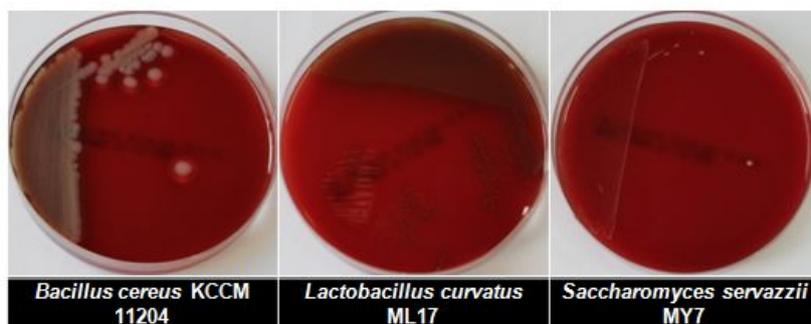


그림 16. *Lb. curvatus* ML17과 *S. servazzii* MY7의 용혈성 검사

(나) 효소활성 검사

식품에서 발효종균으로 사용하거나 프로바이오틱으로 이용되기 위해서는 균주가 생산하는 효소 또한 중요한 부분을 차지함. ML17 유산균의 경우 leucine arylamidase와 valine arylamidase에 대해 양성 반응을 나타내었고, MY7 효모의 경우 alkaline phosphatase와 leucine arylamidase에 대해 양성 반응을 나타냄(표 34). 장내 세균의 대사작용으로 분비되는 β -glucosidase와 β -glucuronidase의 경우 β -glucoside 배당체 화합물과 glucuronic acid 화합물을 유해화합물로 변형시키는 발암유발 효소로 알려져 있음. β -Glucuronidase의 경우 benzopyrene과 같은 독성물질이 인체에 들어왔을 때, 간에서 gluculonic acid와 결합되어 그 독성이 중화가 되지만, 이 결합된 물질이 소장에서 담즙과 함께 장내에 배설되어 장내세균의 β -glucuronidase에 의해 탈포합되면 다시 독성이 생길 수 있음. 따라서 이와 같은 효소를 생성하는 균주는 종균으로서 바람직하지 않으며 두 균주 모두 발암 유발 효소인 β -glucosidase와 β -glucuronidase의 활성이 없는 것으로 나타나 안전한 것으로 확인됨.

표 34. *Lb. curvatus* ML17과 *S. servazzii* MY7의 효소활성

| Enzyme | ML17 | MY7 |
|------------------------------------|-----------------|-----|
| Control | - ¹⁾ | - |
| Alkaline phosphatase | - | + |
| Esterase(C4) | - | - |
| Esterase lipase(C8) | - | - |
| Lipase(C14) | - | - |
| Leucine arylamidase | + | + |
| Valine arylamidase | + | - |
| Crystine arylamidase | - | - |
| Trypsin | - | - |
| α -Chymotrypsin | - | - |
| Acid phosphatase | - | - |
| Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase | - | - |
| α -Galactosidase | - | - |
| β -Galactosidase | - | - |
| β -Glucuronidase | - | - |
| α -Glucosidase | - | - |
| β -Glucosidase | - | - |
| N-Acetyl- β -glucosaminidase | - | - |
| α -Mannosidase | - | - |
| α -Fucosidase | - | - |

¹⁾Enzyme activity was determined by using color strength values: 0, negative reaction; 1, 2, 3, 4, intermediate reaction; 5, maximal reaction. +, \geq color strength value 3.

(3) 산업적 내구성 평가

선정 균주를 발효 종균으로서 이용 및 산업적으로 이용 시 가공 처리 공정에서 발생하는 다양한 환경변화에 영향을 받지 않아야함. 특히 장기 숙성으로 인해 높은 염도와 산도를 나타내는 묵은지의 경우 이러한 환경에서도 우수한 생존성을 가져야 지속적으로 발효를 주도할 수 있음. 따라서 ML17 유산균과 MY7 효모에 대하여 pH 내구성과 내염성을 조사함.

(가) pH 내구성 실험

ML17 유산균의 경우 모든 pH 처리구간에서 초기균수(10^9 CFU/ml 이상)를 유지하여 pH에 대한 내구성이 있음을 확인하였음(그림 17). MY7 효모 역시 모든 pH 처리구간에서 초기균수(10^7 CFU/ml 이상)를 유지하여 pH에 대한 내구성이 있음을 확인함(그림 18).

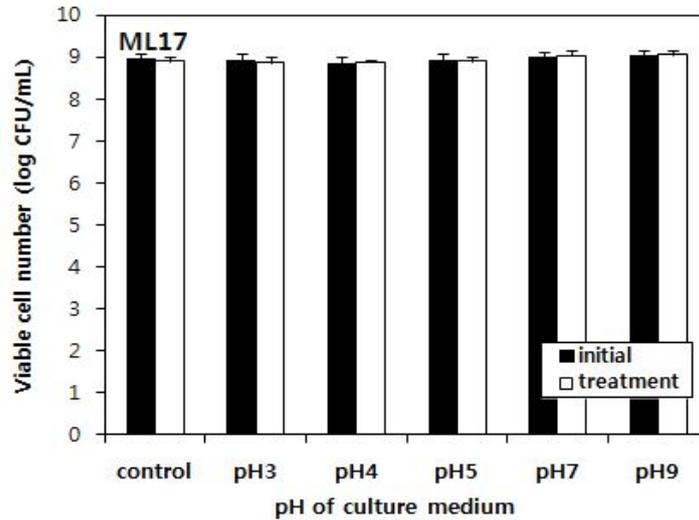


그림 17. *Lb. curvatus* ML17의 pH 내구성

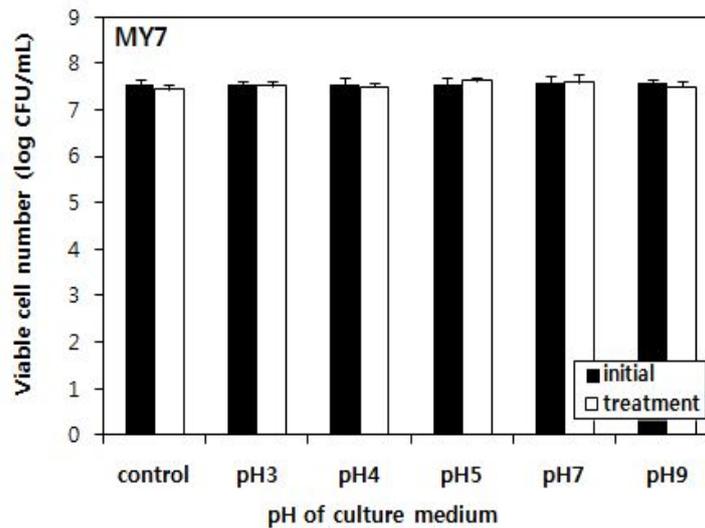


그림 18. *S. servazzii* MY7의 pH 내구성

(나) 염내구성 실험

ML17 유산균의 경우 모든 NaCl 농도구간에서 초기균수(10^9 CFU/ml 이상)를 유지하여 염에 대한 내구성이 있음을 확인함(그림 19). MY7 효모의 경우 모든 NaCl 농도구간에서 초기균수(10^7 CFU/ml 이상)를 유지하여 염에 대한 내구성이 있음을 확인함(그림 20).

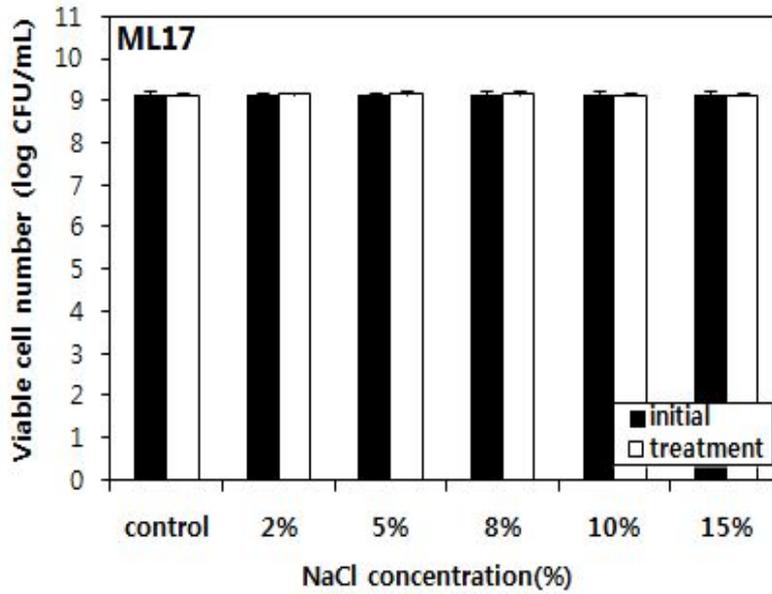


그림 19. *Lb. curvatus* ML17의 염내구성

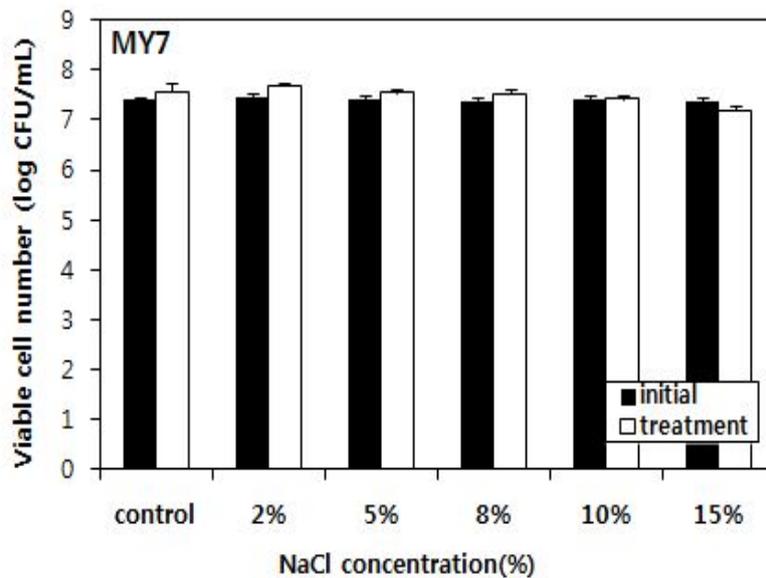


그림 20. *S. servazzii* MY7의 염내구성

(4) 장내생존성 평가

목은지 발효종균 중 *Lb. curvatus* ML17 유산균의 프로바이오틱 생균으로서의 가능성을 조사하기 위하여 장내생존성 평가를 시행함. 구강을 통하여 섭취된 유산균이 장에 도달하기 위해서는 pH 3 이하의 강산성의 위액과 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내성을 갖추어야 함.

Lb. curvatus ML17 유산균은 초기 생균수 9.1 log CFU/ml에서 pH 2.5인 MRS 배지와 인공위액에서 2시간 처리 후 각각 7.2와 7.3 log CFU/ml로 감소하였으며, 인공담즙에서 24시간 처리 후에는 7.6 log CFU/ml를 나타냄(그림 21). 실제 섭취한 유산균이 위를 거쳐 장으로 이동하기 때문에 인공위액에서 2시간 처리 후 인공담즙을 처리한 경우 생균수는 8.2 log

CFU/ml로 상승하였음. 인공위액에서 다소 감소되었던 것이 인공담즙 조건에서 생존 및 증식을 하는 것으로 나타남. 인공위액과 인공담즙 처리 후 8.0 log CFU/ml 이상을 유지하므로 프로바이오틱으로서의 활용가능성이 있을 것으로 생각됨.

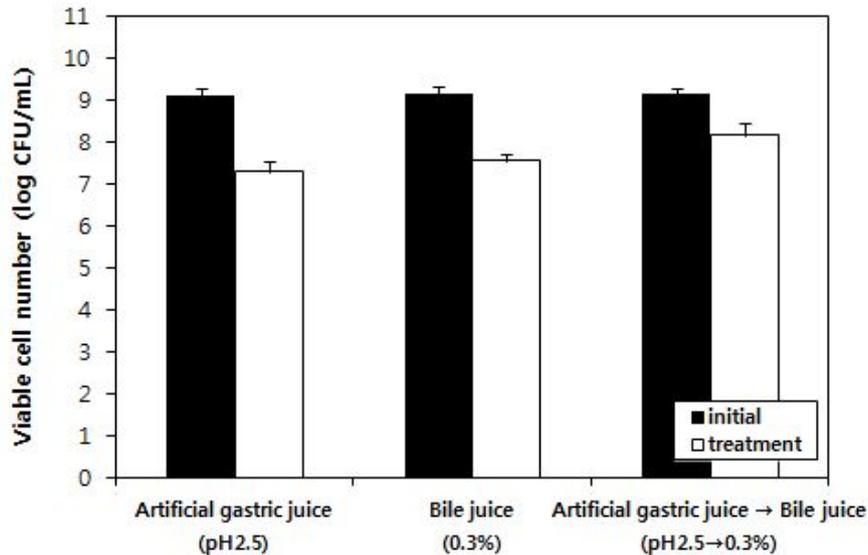


그림 21. *Lb. curvatus* ML17의 장내생존성

(5) 장내 부착능 확인

장내 부착능은 프로바이오틱 균주가 갖추어야 하는 중요한 요소로서 위산과 담즙을 통과해 최종 목적부위인 장에 도달하였을 때 장내 부착능이 있어야 그 효능을 제대로 발휘할 수 있음. 따라서 *Lb. curvatus* ML17의 장내 부착능을 Caco-2 세포주를 이용하여 장내 부착능 확인여부를 조사함. 이때 장내 부착능이 우수하다고 알려진 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 양성 대조구로 사용하여 부착능을 비교함.

Caco-2 cell을 이용하여 장내 부착능을 확인한 결과 *Lb. curvatus* ML17은 초기 접종균수 (10^7 , 10^8 , 10^9 CFU/mL)에 따라 9.17%, 10.07%, 17.31%의 부착율을 나타내었으며 양성 대조구 *Lb. rhamnosus* GG의 경우 18.12%, 19.36%, 20.78%의 부착율을 나타냄(표 35). *Lb. curvatus* ML17은 양성 대조구 *Lb. rhamnosus* GG의 부착율과 근접하게 상당히 높은 부착율을 나타내었으며, 초기 접종균수가 많을수록 높은 부착율을 나타냄. 장 부착능은 세포간의 접촉과 세포막의 구성과 구조에 의한 영향 및 세포 표면에 의한 영향 등 다양한 요소에 의해 이루어지며, 표면 단백질의 상피세포 및 점액층에 대한 receptor-ligand 결합, 전자기적 결합, 소수결합, passive 및 steric forces 등의 작용이 있음.

표 35. *Lb. curvatus* ML17의 장내 부착능

| Strains | CFU/mL/well | | Adhesion rate (%) |
|--------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | Initial cell | Adhered cell | |
| <i>Lb. rhamnosus</i> GG | $(5.63 \pm 0.52) \times 10^9$ | $(1.17 \pm 0.26) \times 10^9$ | 20.78 |
| | $(5.63 \pm 0.52) \times 10^8$ | $(1.09 \pm 0.13) \times 10^8$ | 19.36 |
| | $(5.63 \pm 0.52) \times 10^7$ | $(1.02 \pm 0.12) \times 10^7$ | 18.12 |
| <i>Lb. curvatus</i> ML17 | $(5.66 \pm 0.34) \times 10^9$ | $(9.8 \pm 0.45) \times 10^8$ | 17.31 |
| | $(5.66 \pm 0.34) \times 10^8$ | $(5.7 \pm 0.36) \times 10^7$ | 10.07 |
| | $(5.66 \pm 0.34) \times 10^7$ | $(5.5 \pm 0.28) \times 10^6$ | 9.71 |

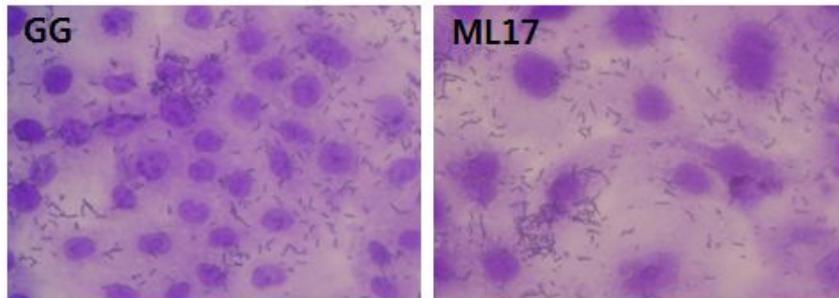


그림 22. Caco-2 세포에 부착된 *Lb. curvatus* ML17

(6) 항균활성 평가

김치는 살균이 되지 않은 원·부재료에서 이입되는 다양한 복합균으로 인하여 발효제어가 되지 않으므로 일정한 맛과 품질을 유지하기 어려움. 김치의 발효종균으로 이용되기 위해서는 발효 초기에 오염된 잡균을 제어하면서 발효기간 동안 높은 점유율을 유지하며 김치의 맛과 품질을 일정하게 유지할 수 있어야함. 식품 유해균주에 대한 *Lb. curvatus* ML17의 항균활성을 생균과 배양액의 상태에서 평가하고, 생육에 따른 항균활성과 항균 물질의 열, pH, 효소 안정성을 측정함.

(가) ML17 유산균에 의한 항균활성

Lb. curvatus ML17 균주의 항균 활성을 direct method 방법으로 측정한 결과 *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli* O157, *Salmonella enterica* 등의 유해 균주 및 식중독 균주에 대한 높은 항균활성을 나타냄(그림 23).



그림 23. *Lb. curvatus* ML17 균주에 의한 항균활성

(나) ML17이 생산하는 항균물질에 의한 항균활성

Lb. curvatus ML17의 배양액을 이용하여 지시균에 대한 항균 활성을 측정한 결과 *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa* 균주에 대하여 우수한 항균활성을 나타냄(표 36).

표 36. *Lb. curvatus* ML17의 항균활성 역가

| | Indicator species | Antimicrobial activity |
|-------------------------------|--|------------------------|
| Gram- positive bacteria | <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240 | +++ |
| | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433 | + |
| | <i>Bacillus cereus</i> KCCM 11204 | +++ |
| | <i>Listeria monocytogenes</i> KCTC 40307 | + |
| | <i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1621 | ++ |
| Gram- negative bacteria | <i>Escherichia coli</i> KCTC 12119 | ++ |
| | <i>Escherichia coli</i> O157 ATCC 43895 | ++ |
| | <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i> KCTC 2515 | +++ |
| | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 | +++ |

Activity was expressed as the diameter of inhibition zone against each sensitive indicator. -, no inhibition; +, below 14.0 mm; ++, 14.0~16.0 mm; +++, above 16.0 mm.

(다) ML17의 생육에 따른 항균활성

Lb. curvatus ML17의 생육에 따른 항균활성을 측정하기 위하여 배양시간에 따른 조항균 물질을 지시균으로 사용한 *B. cereus*에 처리하여 항균활성을 측정한 결과 항균활성역가는 배양 8시간부터 나타나기 시작하여 배양 20시간에 최대 활성을 나타내었으며, 72시간까지 활성을 유지함(그림 24).

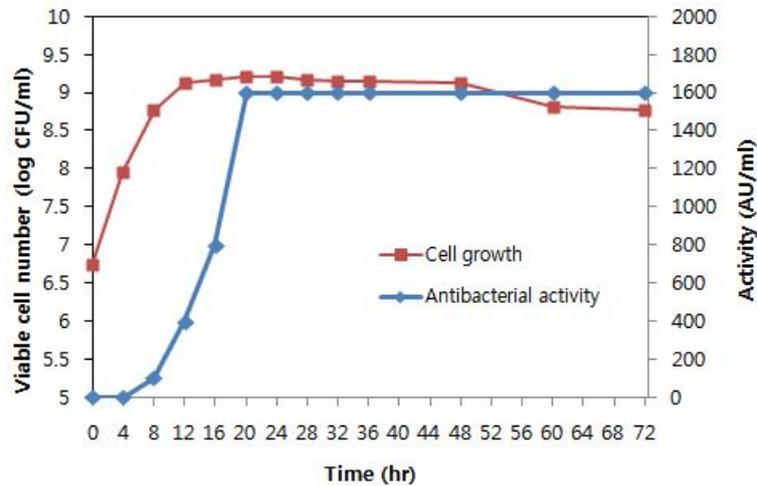


그림 24. *Lb. curvatus* ML17 균주의 생육에 따른 항균활성

(라) ML17이 생산하는 항균물질의 안정성

Lb. curvatus ML17이 생산하는 항균물질의 pH, 온도, 효소의 영향을 측정한 결과 열과 효소처리에는 매우 안정하나 pH 처리 후에는 pH 5.0 이상부터 항균활성이 감소하기 시작하여 pH 7.0 이상에서는 항균활성을 나타내지 않으므로, 항균물질이 산성의 pH 조건에서 안정한 것으로 나타남(표 37).

표 37. *Lb. curvatus* ML17이 생산하는 항균물질의 안정성

| Treatment | | Antimicrobial activity (AU/mL) |
|-----------|----------------|--------------------------------|
| Heating | 4℃, 24 h | 1,600 |
| | 30℃, 24 h | 1,600 |
| | 50℃, 24 h | 1,600 |
| | 70℃, 24 h | 1,600 |
| | 100℃, 30 min | 1,600 |
| | 121℃, 15 min | 1,600 |
| pH | 3.0 | 3,200 |
| | 4.0 | 1,600 |
| | 5.0 | 400 |
| | 6.0 | 100 |
| | 7.0 | 0 |
| | 8.0 | 0 |
| | 9.0 | 0 |
| Enzyme | Proteinase K | 1,600 |
| | Protease | 1,600 |
| | Trypsin | 1,600 |
| | α-Chymotrypsin | 1,600 |
| | Pronase E | 1,600 |
| | α-Amylase | 1,600 |
| | Lipase | 1,600 |

(7) Mannitol 생성능 확인

이형젖산발효 유산균은 과당 발효를 통해 만니톨을 생성하는 것으로 알려져 있음. 이런 세균들은 이형발효 경로를 통해 과당을 에너지 생성에 부분적으로 사용하며 나머지 과당은 mannitol로 전환함. 김치 발효 동안 유산균이 생성하는 mannitol은 김치에 청량감을 주고 신맛을 억제하여 김치의 맛 향상에 중요한 역할을 함. Mannitol생성 확인을 위한 TLC 분석결과 *Lb. curvatus* ML17은 mannitol을 생성하지 않는 것으로 확인됨(그림 25).

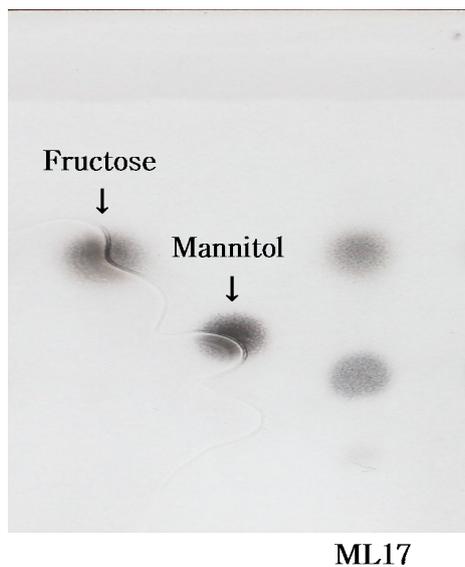


그림 25. *Lb. curvatus* ML17의 mannitol 생성능 확인

(8) 항산화 활성 측정

체내 대사과정 중에 발생하는 superoxide anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical과 같은 활성산소는 체내에 축적될 경우 산화적 스트레스를 야기하며 각종 질병을 초래하게 됨. 따라서 이러한 스트레스를 소거할 수 있는 항산화 활성은 중요한 특성중 하나임.

Lb. curvatus ML17의 DPPH를 이용한 항산화 활성 측정결과 72.88%의 free radical 소거능을 나타내었음(표 38). 양성 대조구인 ascorbic acid(0.1 mg/mL)가 62.57%의 free radical 소거능을 나타내는 것과 비교했을 때 *Lb. curvatus* ML17의 항산화 효과가 상당히 높은 결과임을 확인할 수 있었음.

표 38. *Lb. curvatus* ML17의 항산화 활성

| | <i>Lb. curvatus</i> ML17 | Vit C (0.1 mg/mL) |
|--------------------------------------|--------------------------|----------------------|
| DPPH radical scavenging activity (%) | 72.88±0.51 | 62.57±1.25 |

(9) 암세포 성장 억제 효과 측정

인체 위암세포 AGS와 인체 결장암 세포 HT-29에 대한 암세포 성장 억제 효과를 측정한 결과 *Lb. curvatus* ML17의 배양 상정액을 10~80 μ L/mL 처리 시, AGS에 대한 성장 억제 효과는 10~40 μ L/mL 처리 하였을 때 대조구와 유의적 차이를 보이며 31%~38% 억제를 나타내었으며, 80 μ L/mL 처리 시 82.91%의 억제율을 보이며 다른 처리 농도에서보다 현저히 높은 세포 성장 억제 효과를 나타내었음. HT-29에 대한 성장 억제 효과에서는 10~40 μ L/mL 처리 하였을 때 40 μ L/mL 처리 군부터 대조구와 유의적 차이를 보이며 9% 억제를 나타내었으며, 80 μ L/mL 처리 시 79.35%의 억제율을 보이며 다른 처리 농도에서보다 유의적으로 가장 높은 세포 성장 억제 효과를 나타내었음(그림 26~27).

Lb. curvatus ML17로부터의 배양 상정액의 AGS와 HT-29 세포에 대한 성장 억제효과는 용량 비의존적이나 고용량에서 상대적으로 억제 효과가 증가하는 것으로 나타남. 이와 같은 결과는 *Lb. curvatus* ML17이 암세포 성장을 억제하는 물질을 생성함을 의미하며 이에 관한 기전이나 물질 규명을 위해서는 추후 추가적인 실험이 필요함.

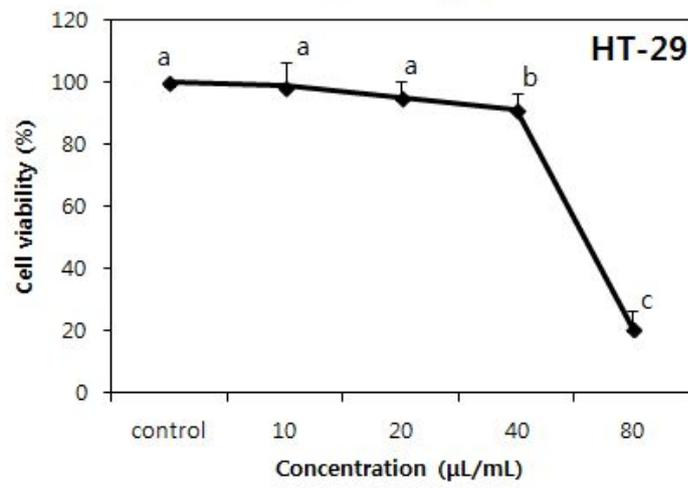
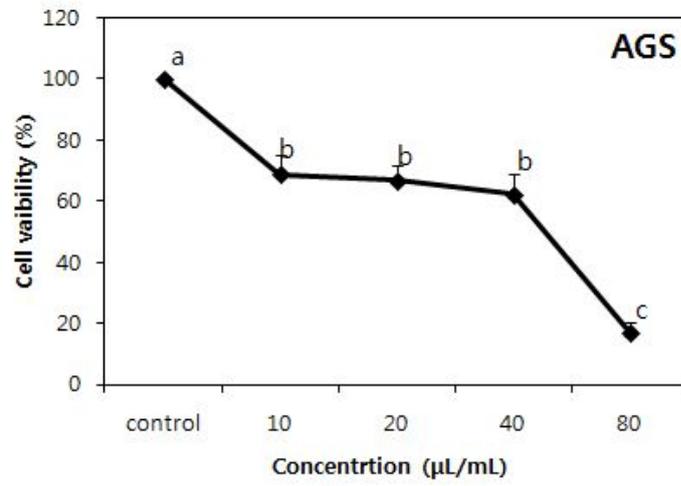


그림 26. *Lb. curvatus* ML17의 암세포 성장 억제 효과

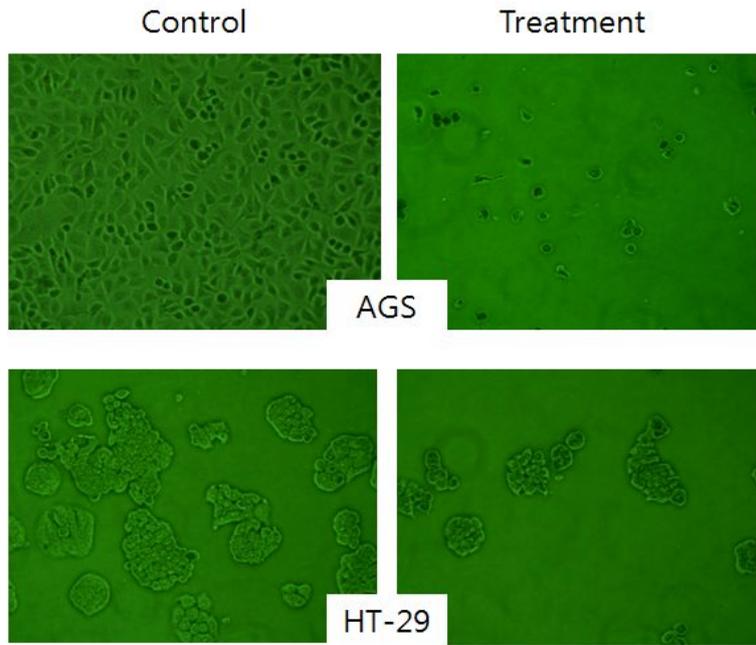


그림 27. *Lb. curvatus* ML17이 처리된 암세포 AGS와 HT-29

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

주관기관: 해남화원농협

가스팽창 방지용 목은지 발효기법의 확립 및 품질표준화를 통한 숙성 목은지의 상품화

| 구분 | 연도 | 연구개발의 목표 | 달성도 | 연구개발의 내용 |
|------|-----------|-----------------------------------|------|--|
| 1차년도 | 2010-2011 | 목은지의 관능적 품질요소의 확립 및 가스 비생성균의 적용실험 | 100% | 목은지의 품질 표준화를 위해 원·부재료에 대한 전처리 방법을 통해 품질 기준을 확립하였다. 품질 표준화된 원·부재료를 이용하여 목은지를 생산한 후 목은지의 관능적 품질 요소를 확립하였다. 효모의 생육을 억제하여 가스 생성을 줄이는 유산균인 lactobacillus brevis를 분리하였으며, 이균주를 이용하여 목은지 발효 실험에 적용하여 가스 생성 억제를 확인하였으며 숙성 목은지 제품을 생산하였다. |
| 2차년도 | 2011-2012 | 가스비생성 목은지의 숙성제조를 위한 모의실험 | 100% | 가스 비생성 숙성 목은지를 생산하기 위해 BRC-01 균주를 적용하여 목은지를 생산하였다. 10℃에서 15일 숙성시킨 후 0℃에서 75일 숙성을 진행하였다. 관능평가 결과에서도 1년 숙성 목은지와 유사한 기호도를 나타내었고, 품질적 측면에서도 우수하였다. |
| 3차년도 | 2012-2013 | 가스비생성 목은지의 숙성제조법의 확립 및 상용화 | 100% | 공장 생산 라인을 이용하여 목은지의 숙성 제조를 실시하였으며, 원료의 전처리 방법 유산균의 양념 배합량, 목은지의 1차 숙성 조건, 2차 숙성 조건을 결정하였으며, 유산균의 산업적 배양을 위한 배지 조성도 결정하였다. 공장 생산라인을 이용한 숙성 목은지에서도 가스 생성 억제가 확인되었으며 3개월 숙성으로 1년 숙성 목은지와 유사한 맛을 유도하였다. |

세부•협동기관: 전남식품산업연구센터
 숙성 묵은지 제조를 위한 종균의 분리 및 개발

| 구분 | 연도 | 세부개발목표 | 달성도 (%) | 관련분야의 기술발전에의 기여도 |
|-------|-------------|-------------------------------|---------|---|
| 1차 연도 | 2010 ~ 2011 | 묵은지의 발효 특성 분석 | 100 | 일반 김치와 달리 장기 숙성기간(6개월 이상)이 필요한 묵은지를 발효기간 동안 이화학적 특성, 미생물 균종, 색도, 물성, 유기산, 아미노산, 관능 평가 항목에 대한 분석을 통하여 주요 품질요소를 모니터링하였으며, 계절적 환경을 고려한 1차 발효 및 2차 숙성 온도에 따른 발효 특성 분석으로 묵은지 발효에 적합한 조건을 평가함. |
| 2차 연도 | 2011 ~ 2012 | 시중 묵은지의 발효 특성 분석 및 발효 미생물의 분리 | 100 | 전국의 시판 묵은지를 수거하여 일반적인 발효 특성 및 관능적 특성을 분석하고 발효 유산균 45종과 발효 효모 34종을 분리함. 학술연구가 미흡한 묵은지에 대하여 시판중인 묵은지의 품질과 발효 미생물 균종에 대한 학술 자료를 제공하고 우량 묵은지 종균 후보를 확보함. |
| | | 모의 발효 실험을 통한 묵은지 종균의 선정 | 100 | 2단계의 체계적 모의 발효 실험을 통하여 묵은지의 향미와 발효 특성을 발현시킬 수 있는 종균을 선정함. 묵은지 종균 개발에 대한 최초의 학술 연구임. |
| 3차 연도 | 2012 ~ 2013 | 종균 묵은지의 제조 및 발효 특성 조사 | 100 | 종균 묵은지를 제조하고 발효 특성을 모니터링하여 종균 묵은지의 제조 방법 및 발효와 숙성 조건을 최적화하여 제조 공정을 확립함. 제조 공정에 대한 특허를 출원함. 장기 숙성에 따른 산업체의 부담을 줄이고 일정하지 않은 묵은지의 품질을 종균 시스템을 이용하여 맛과 품질의 균일화에 기여함. |
| | | 묵은지 종균의 산업적 내구성 및 기능성 평가 | 100 | 묵은지 발효 종균 ML17 유산균과 MY7 효모의 인체안전성, 산업적 내구성, 장내생존성, 장내부착능, 항균활성, 만니톨(mannitol) 생성능, 항산화 활성, 항암활성 등의 기능성 평가를 통하여 묵은지 종균으로서의 적합성 뿐만 아니라 다양한 산업적 활용 가능성을 제시함. 묵은지 유래 유산균의 우수한 기능성을 규명하는 학술적 연구 자료임. |

제 2 절 관련 분야에의 기여도

묵은지는 특성상 장기숙성을 요하는 식품이다. 최근에는 묵은지에 대한 수요가 점차 증가하고 있는 실정이다. 묵은지의 숙성 기간을 단축시킴으로서 증가하고 있는 수요를 충족시킬 수 있으며 숙성 과정에서 차지하는 냉장 보관고의 운전 비용을 줄일 수 있어 원가 경쟁력이 갖출 수 있다. 또한 기존에는 묵은지의 숙성이 완료될때까지 1년 이상의 재고 부담을 지니고 있어야 하지만 숙성 기간의 단축은 이에 대한 부담을 감소시킨다. 또한 스타터를 이용하여 묵은지를 제조함으로써 일정한 품질의 묵은지 생산이 가능하다. 본 과제의 연구결과로는 1년에 묵은지의 생산량을 2~3배 증가시킬 수 있으며, 기존 묵은지 생산시스템을 그대로 활용하여 생산이 가능하다. 묵은지 절임배추에 대한 전처리 비용과 스타터에 대한 비용이 발생하지만 묵은지의 숙성 기간 단축 및 운전 비용 감소로 기존 묵은지 생산원가의 70% 수준으로 원가절감효과가 나타난다.

묵은지는 제품 내 활성 균이 다량 함유되어 있어서 유통 과정에서 가스 팽창에 의해 제품의 품질을 저하시킨다. 묵은지 내 효모의 생육을 억제시켜 가스 생성을 억제시키는 기술은 이러한 문제점을 해결해준다. 최근에는 한식 세계화를 통해 김치가 세계에 널리 알려지고 있으나 수출 시 가스 팽창 등의 문제가 있어 수출량에는 한계가 있었다.

묵은지에 적용되는 가스 생성 억제균은 일반 김치에의 적용도 가능하여 김치의 수출 물량 증가에 기여할 것으로 생각된다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구개발 결과의 활용

1. 논문게재: 1건

| 게재 연도 | 논문명 | 저자 | | | 학술지명 | Vol. (No.) | 비고 |
|-------|----------------------------|-----|------|------|------------|------------|-------|
| | | 주저자 | 교신저자 | 공동저자 | | | |
| 2013 | 혼합스타터를 이용한 묵은지의 제조 및 발효 특성 | 김효주 | 양은주 | 신현경 | 한국식품영양과학회지 | 미정 | 게재 확정 |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

| 논문번호/ 접수일 | 논문제목 | | History | |
|--------------------------------|-----------------------------|------------|----------------|--------|
| | 현재진행상황 | 다음진행상황 | 논문종류 | 해당분야 |
| K13-05-15 2013-05-16 | 혼합 스타터를 이용한 묵은지의 제조 및 발효 특성 | | History | |
| | 논문 게재 확정 | 초교확인요청서작성중 | 연구논문 | 식품미생물학 |

2. 특허출원: 1건

| 출원 연도 | 특허명 | 출원인 | 출원국 | 출원번호 |
|-------|---|---------------|------|-----------------|
| 2013 | 사카로미세스 세르바찌 MY7 및 락토바실러스 쿠르바투스 ML17 함유 스타터를 이용한 묵은지의 제조방법 | 신 현 경 외 2명 | 대한민국 | 10-2013-0040535 |
| | | | | |
| | | | | |

3. 학술발표: 7건

- (1) Hyo Ju Kim, Min Ji Kim, Mi Ae Bang, Ki Myong Kim, Kyung Hee Jung. Effect of Storage Temperature on Fermentation Characteristics of Mukeunji. 2011년도 한국식품과학회 제78차 학술대회 및 정기총회. 대구 엑스코. 2011. 06. 08~10.
- (2) Hyo Ju Kim, Min Ji Kim, Mi Ae Bang, Ki Myong Kim, Hyun Kyung Shin. A Comparative Study Characteristics of Mukeunji Prepared in Various Region. 2011년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회. 부산 BEXCO. 2011. 10. 31~11. 02.
- (3) Hyo Ju Kim, Eun Ju Yang, Hyun Kyung Shin. Mixed Starter Culture System for the Fermentation of Mukeunji, a Korean Long-Term Ripened Kimchi. 2012년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회. 제주 국제컨벤션센터. 2012. 10. 31~11. 02.

- (4) Hyo Ju Kim, Eun Ju Yang, Hyun Kyung Shin. Investigation of Functional Characteristics of *Lactobacillus curvatus* ML17 Isolated from Mukeunji. 2012년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회. 제주 국제컨벤션센터. 2012. 10. 31~11. 02.
- (5) Eun Ju Yang, Hyo Ju Kim, Hyun Kyung Shin. Production and Characterization of Kimchi Using a New Strain *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ML7 Isolated from Mukeunji. 2012년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회. 제주 국제컨벤션센터. 2012. 10. 31~11. 02.
- (6) Eun Ju Yang, Hyo Ju Kim, Hyun Kyung Shin. Antimicrobial Activity of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ML7 Isolated from Mukeunji. 2012년도 한국식품영양과학회 국제심포지엄, 정기학술대회 및 정기총회. 제주 국제컨벤션센터. 2012. 10. 31~11. 02.
- (7) Hyo Ju Kim, Hea Mi Sung, Hyun Kyung Shin, Eun Ju Yang. Investigation of Functional Characteristics of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* ML7 Isolated from Mukeunji. 2013년도 한국식품과학회 제80차 학술대회 및 정기총회. 천안 예술의전당. 2013년 8월 28일~30일(발표예정).

제 7 장 참고문헌

1. AOAC. 1995. *Official methods of analysis*. 16th ed. Association of official analytical chemists, Arlington, Virginia, USA. ch 33, p 7.
2. Bang JH, Shin HJ, Choi HJ, Kim DW, Ahn CS, Jeong YK, Joo WH. 2012. Probiotic potential of *Lactobacillus* isolates. *J Life Sci* 22: 251-258.
3. Chang JY, Chang HC. 2010. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *J Food Sci* 75: 103-110.
4. Chung HJ, Kim HR, Yoo MJ. 2005. Changes in texture and sensory properties of low-temperature and long-term fermented baechu kimchi during the fermentation. *Korean J Food Culture* 20: 426-432.
5. Choi KS, Sung C, Kim MH, Oh IK. 1999. Fermentation method of *Kimchi* using halophilic *Lactobacillus* sp. HL-48 and lactic acid. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 246-251.
6. Cho SH. 1988. Studies on kimchi fermentation added lactic acid bacteria starter. *MS Thesis*. Sungkyunkwan University, Seoul, Korea. p 21-24.
7. Choi SY, Lee SH, Koo YJ, Shin DH. 1989. Production of rapid-fermented kimchi with starter. *Kor J Appl Microbiol Bioeng* 17: 403-406.
8. Han GJ, Choi HS, Lee SM, Lee EJ, Park SE, Park KY. 2011. Addition of starters in pasteurized brined baechu cabbage increased kimchi quality and health functionality. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 110-115.
9. Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. 1986. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzopyrene by β -glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J Med Microbiol* 22: 351-355.
10. Ko KH, Liu W, Lee HH, Yin J, Kim IC. 2013. Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 89-95.
11. Kim YH. 2012. Evaluation of physico-chemical characteristics and identification of microorganisms from mukeunji. *MS Thesis*. Kyung Hee University, Seoul, Korea. p 7-8.
12. Kim SY, Kim JD, Son JS, Lee SK, Park MS. 2011. Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 43: 446-452.
13. Ku HS, Noh JS, Kim HJ, Cheigh HS, Song YO. 2007. Antioxidant effects of sea tangle added Korea cabbage kimchi *in vitro* and *in vivo*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1497-1502.
14. Kim YH, Kim HZ, Kim JY, Choi TB, Kang SM. 2005. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on kimchi fermentation as a starter. *Kor J Microbiol Biotechnol* 33: 41-50.

15. Kim DK, Kim SY, Lee JK, Noh BS. 2000. Effects of xylose and xylitol on the organic acid fermentation of *Kimchi*. *Korean J Food Sci Technol* 32: 889-895.
16. Kim SD, Kim KH, Oh YA. 1998. Effects of yeast addition during salting and preparation on fermentation of kimchi. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1077-1085.
17. Kim HJ, Kang SM, Yang CB. 1997. Effects of yeast addition as starter on fermentation of kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 29: 790-799.
18. Kim SD, Lee SH, Kim MJ, Oh YA. 1988. Changes in pectic substance of lower salted chinese cabbage kimchi with pH adjuster during fermentation. *J Korean Soc Food Nutr* 17: 255-261.
19. Kim HO, Rhee HS. 1975. Studies on the nonvolatile organic acids in kimchis fermented at different temperatures. *Korean J Food Sci Technol* 7: 74-81.
20. Kobayashi Y, Tohyama K, Terashima T. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. tolerance of the multiple antibiotic resistance strain *L. casei* PSR3002 to artificial digestive fluids. *Jpn J Microbiol* 29: 691-698.
21. Neeser JR, Chambaz A, Golliard M, Link-Amster H, Fryder V, Odziejczyk E. 1989. Adhesion of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains to human enterocytelike differentiated HT-29 cells: a basis for host-pathogen interactions in the gut. *Infect Immun* 57: 3727-3734.
22. National Center for Biotechnology Information. Nucleotide blast search program, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. USA.
23. Rhee HS. 1995. The measurement methods of the textural characteristics of fermented vegetables. *Korean J Soc Food Sci* 11: 83-91.
24. Shin DH, Kim MS, Han JS, Lim DK, Bak WS. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean J Food Sci Technol* 28: 137-145.
25. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680.
26. Yoo MJ, Kim HR, Chung HJ. 2001. Changes in physicochemical and microbiological properties in low-temperature and long-term fermented kimchi during fermentation. *Korean J Dietary culture* 16: 431-441.

주 의

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