

최 종  
연구보고서

미생물 대사공학을 이용한 첨단김치의  
제조기술 개발

Development of high-tech kimchi  
by microbial metabolic engineering

연구기관

조선대학교

전남대학교

목포대학교

농림부

# 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물 대사공학을 이용한 침단김치의 제조기술 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005년 10월 15일

주관연구기관명 : 조선대학교

총괄연구책임자 : 장 해 춘

세부연구책임자 : 이 명 렬

연 구 원 : 장 지 윤

연 구 원 : 최 현 숙

협동연구기관명 : 전남대학교

협동연구책임자 : 전 덕 영

협동연구기관명 : 목포대학교

협동연구책임자 : 김 인 철

# 요 약 문

## I. 제 목

미생물 대사공학을 이용한 첨단김치의 제조기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 필요성

- 김치는 특별한 지식 없이도 가정에서 누구나 전래의 보편적인 방법으로 제조하면 자연발생적으로 발효가 일어나 김치의 제조가 가능하였으므로 김치가 지니는 오랜 역사에 비해 체계적이고 과학적으로 정량·정성화된 김치발효 시스템 구축이 미진한 실정이다. 서양의 대표적인 발효식품인 유발효제품은 대장균등의 유해미생물이 번식하기 쉽기 때문에 인위적인 살균과 발효시스템에서의 종균화등의 기술이 일찍부터 개발·도입됨과는 비교되는 결과이다. 즉 양념맛이나 재료자체의 맛과 아울러 인위적 발효조절에 의한 품질의 균일화, 식문화 변화에 따른 차세대 및 외국인을 위한 제품의 다양화, 김치가 지니는 생물학적 효능(biological function) 및 가치 규명, 그리고 기업적 김치 생산을 위한 우량 김치발효 미생물의 대량 생산 및 안정성 유지 등의 연구가 요구되어 진다.
- 현재까지의 김치관련연구는 크게 맛있는 김치 만드는 방법 즉 조리적 측면과 과학적이고 체계적인 김치의 특성규명이라는 과학적 지식 측면으로 나뉘어져 왔다. 이제 연구실에서 연구된 첨단과학 기술을 우리의 오랜 역사가 자랑하는 전통식문화와의 접목이 요구된다. 즉 실제 규명자체에서 더 나아가 체계화, 정련화된 발효과학기술을 우리전통 조리방법에 적용시켜 이론적

지식이 실제 김치 발효 시스템에서 어떤 식으로 작용될 수 있으며, 어떤 부분의 개발·발전이 가능한지 제시하여야 할 것이다. 이와 같은 방향의 연구는 기 수행된 바 없으며 이제 시대적 요구에 따라 세계속의 김치, 차세대의 우리 김치에 대한 자긍심 함양 차원에서도 반드시 수행되어야 할 과제이다.

#### 1) 기술적 측면

- 우수한 연구들이 근간 수많은 우수한 연구들이 수행되어져 왔음에도 불구하고, 김치의 상품화에서 품질의 균일화 및 규격화 그리고 보존성은 아직도 해결해야 할 많은 문제점으로 남아있다. 그 가장 큰 이유로는 김치는 발효 유제품처럼 아직 ‘중균화’가 이루어지지 못하고 있다는 것이다. 즉 김치의 조성물인 원·부재료들은 가열 살균할 수 없으므로 김치재료로부터 이행되는 초기균수와 균종이 일정하지 않기 때문에 발효 유제품과 같은 발효시스템을 사용할 수 없다는 것이다. 기존 연구된 김치의 스타터 개발 연구에서는 우수한 종균을 개발해도 원료살균이 이루어지지 않은 김치 발효계에서는 상대적으로 많은 종균양을 초기에 접종 시 가해야 하고, 이로 말미암아 김치발효속도 조절이 어려워 너무 신 김치가 만들어진다는 문제점을 제시하였다.
- 본 과제에서는 이와 같이 우수한 우리의 전통식품인 김치에 첨단 미생물대사 공학을 접목시켜 발효과학에 의한 우리 고유의 전통 김치맛을 계승발전 시킴과 동시에 맛의 다양화 및 제조법의 과학화를 통한 김치의 세계화를 꾀하고자 한다.

## 2) 경제·산업적 측면

- 김치소비량은 연간 150만톤으로 추정되며, 상품김치의 최근 국내수요 증가율이 연간 15~20%로 나타나 그 수요가 증가 될 것으로 전망되며, 김치시장은 매년 10% 이상의 성장을 거듭하여 현재 5,000억원이 넘는 국내시장규모를 가지게 되었다. 또한 한국김치의 해외수출은 비약적으로 발전하여 1987년도의 850만불 수출에서 2003년도에는 그 10배가 넘는 9,000만불을 상회하고 양태로, 보다 적극적인 수입 국가별 취향에 맞는 김치 제품의 다양화를 통한 수출 국가의 다양화와 고른 수출 물량 분포가 요구되어진다.

## 3) 사회·문화적 측면

- 우리나라 기존의 김치문화 전통의 맥을 기존산업의 축으로 하고, 여기에 미생물 대사공학을 통한 정련된 김치발효기술을 접목하여 상품김치로써의 품질 균일화, 양념맛이 아닌 발효에 의한 김치 맛의 다양화 및 차별화, 품질 유지, 생물학적 기능을 지닌 김치 등의 개발을 통한 ‘첨단김치’를 개발한다면 그 부가가치 및 산업적 차원의 대외 경쟁력은 막대하리라 본다. 기존의 김치 연구가 김치자체의 분석과 특성규명에 집중되었다면, 이제 그 기초지식을 실제 산업에 응용, 발전시키는 단계가 이루어져야 할 것이다.

## 2. 연구개발의 목표

- 본 연구개발의 목표는 김치 발효를 인위적으로 조절하여 품질이 균일하고 보존성이 향상됨과 동시에 probiotics 기능을 지닌 미생물(Bifidus)를 개발하여 전통김치에 접목시켜 생물학적기능이 보강된 첨단 BT기술로 이루어진 상품김치 제조에 있다.

- 본 과제에서는 김치발효에서 우수한 김치유산균을 종균화하기 위하여 미생물 대사공학 차원에서 복합적인 김치발효시스템을 적절히 조절하여 증으로서 김치발효의 인위적 조절 및 품질균일화, 보존성의 향상을 꾀하고자 한다.
- 본 연구과제에서 침단김치의 개발을 위한 방법으로는, **첫째** 맛있는 김치 발효 종균을 개발하고 이를 비살균처리 김치 발효 시스템에서 미생물 대사 공학 차원에서의 김치 발효 조절, **둘째** 통성혐기적 조건인 김치 발효 시스템에서 정장작용을 할 수 있는 Probiotics의 개발, **셋째** 이를 상품김치로 대량 생산하기 위한 종균의 고농도배양 및 안정화 등의 기술 개발, **넷째** 이와 같이 개발된 우수종균 및 김치의 생물학적 효능 검사 기술을 개발하고자 한다. 그리고 최종 개발된 이 기술을 전통 김치에 접목시켜 실용화를 확립하는데 있다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 우량김치종균에 의한 침단김치 발효시스템의 개발

##### 가. 우량김치종균의 개발

- ① 균주의 분리 및 동정
- ② 분리종균의 특성조사
  - 박테리오신 생성능 조사
  - 감수성균주에 의한 박테리오신 유도효과
  - 박테리오신의 특성조사(온도, pH, 각종 효소의 영향)
- ③ 분리종균의 발효특성
  - 내염성, 당 발효능

나. 우량 신균주를 이용한 김치발효시스템의 개발

- ① 발효대사 제어 시스템 개발
- ② 종균별 최적 대사 시스템 개발
- ③ 품질의 균일화 및 종균에 의한 맛의 다양화

다. 개발 신균주를 이용한 첨단김치 개발 및 제품 다양화

- ① 미생물 대사 제어에 의한 유통기간 및 저장방법 설정
- ② 제품 다양화

라. 시작품제작

## 2. 미생물 대사공학기법으로 제조된 첨단김치의 생리활성 효능연구

가. 우량 김치 종균의 독성시험

- ① 실험동물 및 식이선정
- ② 일반독성 시험(급성, 아급성 독성)
- ③ 자료의 통계처리

나. 우량 신균주를 이용하여 개발한 김치의 노화억제 물질 탐색

- ① 실험동물 및 식이선정
- ② 노화억제 물질의 추출 및 분리
- ③ *In vitro*에서 노화억제 효과 실험
  - 전자공여능 측정
  - 아질산 소거능 측정
  - linoleic acid에 대한 효과 측정

- 지질과산화 억제 효과 측정
- ④ *In vivo*에서 노화억제 효능 실험
  - 유리기 함량 측정
  - 항산화효소활성(SOD, catalase, xanthine oxidase, GSH-Px) 측정
  - 항산화물질(GSH)측정
  - 지질과산화물(TBARS)측정
  - 혈청중 효소활성(GOT, GPT, LDH) 측정
  - 자료의 통계처리

다. 침단 전라도 김치의 고지혈증 억제 활성 검색

- ① 실험동물 및 식이선정
- ② *In vivo*에서 고지혈증억제 효과 실험
  - 식이섭취량 측정
  - 체중증가율 및 식이효율 측정
  - 혈청중 지질 함량 측정
  - 혈청중 HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤 및 HMG-CoA활성 측정
  - Atherogenic index 조사
  - 자료의 통계처리

3. Bifidobacteria 김치의 건강기능성에 대한 연구

가. Bifidobacteria 균주의 분리

- ① 우점종 Bifidobacteria의 선발
- ② 동정

- Morphology, TLC, F6PPK assay
- 당발효 실험으로 grouping
- 16S rRNA 분석

나. Bifidobacteria를 이용한 기능성 김치 제조

- ① 다양한 Bifidobacteria 미생물 첨가에 따른 김치의 변화
- ② 부재료 첨가가 Bifidobacteria 김치에 미치는 영향
  - 발효과정 중 미생물 천이변화
  - 발효과정중 김치의 이화학적(pH, 산도, 당, Vit C) 변화 조사
  - 김치의 관능평가
- ③ Bifidobacteria의 갓김치, 동치미, 깍두기 제조에의 응용

다. 분리된 Bifidobacteria 의 건강 기능성 연구

- ① Bifidobacteria 김치의 통변에 대한 영향 조사
  - 비피도박테리아 김치의 제조
  - 인체 실험자 선발 및 김치 섭취
  - 김치 섭취 전, 후 미생물의 변화 조사
  - 분변내 유효 효소의 활성 조사
  - 김치 섭취 후 변비 개선 효과 조사
- ② 분리된 Bifidobacteria의 면역증강능력 조사
  - 김치 섭취후 실험 대상자의 혈액내 IL-2, TNF- $\alpha$ 의 변화 조사

라 분리된 Bifidobacteria의 콜레스테롤 저하능 조사

- 김치 섭취후 실험 대상자의 혈장내 콜레스테롤 저하 효과 조사

#### 4. 김치 종균의 대량 생산을 위한 배양조건 확립 및 안정화 기술 개발

##### 가. 김치 종균의 배양 조건 최적화

- ① 발효 온도, pH, 염농도 등의 배양 기본조건의 분석
- ② 5L-jar 발효조에서의 발효 조건 최적화
- ③ 발효시 배양 pH 조절을 위한 조절 방식의 선택
- ④ pH 조절용 완충제의 선정

##### 나. 김치 종균의 항균활성 유도를 위한 유도물질 생산의 최적화

- ① 감수성균주의 배양 조건 최적화
- ② 감수성균주로부터 유도물질 제조방법의 최적화

##### 다. 김치 종균용 특수배지의 개발

- ① 탄소원의 최적화
- ② 유기 및 무기 질소원의 최적화
- ③ 미량 원소의 최적화

##### 라. 김치종균의 저장 안정성 최적화

- ① 배양 배지조성에 따른 안정성
- ② 안정제 존재하에서의 안정성
- ③ 저장 조건에 따른 안정성

#### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

##### 1. 우량 김치종균에 의한 침단김치 발효시스템의 개발

###### 가. 우량김치종균의 개발

- 미생물 대사공학을 이용하여 김치발효를 인위적으로 조절하고, 품질이 균일하며 보존성이 향상된 침단 BT기술로 이루어진 상품김치를 제조하기 위한 우량김치종균의 요건(① 우수한 박테리오신 생성능 + ② 감수성균에 의한 박테리오신 생산 유도효과 기능) + ③ 맛있는 김치 발효능)을 만족시키는 김치우량종균을 6종 확보하였으며 이 중 *Leuconostoc citreum* GJ7과 *Leuconostoc kimchii* GJ3가 가장 기호도가 높았다..

###### 나. 우량김치종균으로부터 생산된 박테리오신의 특성규명 및 유도효과

- 타유산균 뿐만 아니라 유해세균(*E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, 및 *Streptococcus* 등)에 대해서도 항균활성을 갖는 박테리오신 생성 김치유산균을 최종 6종 확보하였으며, 이들이 생산하는 박테리오신들은 pH 및 열안정이 뛰어나고 단백질분해효소에 실활되어, 실제 식품산업에서 생물학적 식품보존제(biopreservation) 등으로서의 활용 가능성을 나타내었다.
- 또한 김치발효계내의 잡균이나 산패균(감수성균주)의 박테리오신 유도물질(IF)에 의하여 박테리오신을 보다 강력하고 안정되게 생산함으로써 이를 이용한 김치발효시스템에서의 잡균제어를 가능케 하였다.

###### 다. 우량 신균주를 이용한 김치 발효조절 시스템의 구축

- 우량김치종균GJ7을 사용하여 최적발효조건에서 발효 및 숙성하였을 때(산

도 0.9% 이하) 종균에 의한 잡균의 제어가 이루어졌으며 종균GJ7이 우점종으로(약 70~100%) 차지하였으나 이에 반해 종균을 가하지 않는 대조구에서는 유산균과 함께 무수히 많은 잡균이 검출되었다. 또한 종균김치의 경우 김치 상미기간을 약 128일(4개월)간 유지할 수 있었으며, 이는 기존의 김치 유통기한이 약 28일임을 고려하였을 때 획기적인 연구성과임을 알 수 있다. 종균김치의 맛은 부드러운 단맛과 상큼하고 시원하며 특쓰는 청량한 맛의 특징을 나타내었다. 종균첨가김치와 동일한 조건에서 장기간(약 128일)저장하였을 때 1.25% 이상의 높은 산도와 함께 매우 신맛, 군내 등의 맛과 연부현상이 평가되었다.

- GJ7종균김치는 *Leu. citreum* GJ7의 김치환경내의 미생물제어능이 확실히 인정되어 동일한 조건에서 종균비첨가김치와는 맛에 있어서나 김치환경내의 미생물 우점종 유지 능력이 탁월하였다. 본 연구에서 사용된 김치양념 배합비는 MSG 무첨가와 함께 특별히 맛있는 양념이 아닌 기본 김치양념을 사용하였다. GJ7첨가김치는 반복된 관능검사를 통하여 관능평가자 전원이 양념맛이 아닌 발효에 의한 GJ7김치 특유의 맛을 구별해 낼 수 있었다.

## 2. 미생물 대사공학기법으로 제조된 침단김치의 생리활성 효능연구

- 우량 김치 종균의 독성시험
  - 우량 김치종균과 우점종 비피더스종균에 대한 급성독성시험에서, 경구 투여시 5,000mg/kg이상, 복강내 투여시 2,500mg/kg이상에서도 독성작용을 나타내지 않았다.
  - 4주간의 아급성독성시험에서도 최고용량인 5,000mg/kg투여에서 일반증상, 혈액생화학적 검사 및 장기의 육안적 관찰 모두에서 시험물질과

관련된 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다.

- 따라서 우량 김치종균과 우점종 비피더스종균은 섭취시 안전성이 매우 우수하고 저독성인 물질로 평가되었다.

○ 우량 신균주를 이용하여 개발한 김치의 노화억제 물질 탐색

- 김치시료가 알코올투여로 둔화된 체중증가율과 저하된 식이효율을 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰는데, 이는 알코올 투여로 유발된 간세포 독성이 차츰 완화 및 해독되어 나타난 결과로 보여지고, 그 효과는 우량 김치종균으로 담긴 김치가 제일 좋았고 시판김치와 우점종 비피더스균으로 담긴 김치는 동일하였다.

- 우량종균김치의 항산화작용은 주로 알코올 투여로 증가된 유리기 해독계 효소인 GSH-Px활성억제와 비효소적 항산화작용을 나타내는 GSH함량을 증가시키므로써 지질과산화물에 대한 방어력이 증강되어 나타난 결과로 보여지고, 알코올투여로 상승된 ALT 및 AST활성이 정상군에 근접되도록 유의성있게 감소되었음은 김치시료가 알코올투여로 손상된 간세포 기능을 점차 회복시킬 수 있을 것이다.

- 따라서 우량종균김치가 만성 퇴행성 질환을 유발하는 주요 요인인 유리기를 효과적으로 방어할 수 있는 우수한 항산화제로의 활용에 크게 기여할 것이다.

○ 첨단 전라도 김치의 고지혈증 억제 활성 검색

- 김치재료를 급여한 전군에서 콜레스테롤급여로 증가된 체중 증가율이 둔화되었으며, 둔화율은 우점종 비피더스균으로 담긴 김치 급여군이 가장 우수하였다.

- 콜레스테롤 급여로 증가된 혈청 중 총 콜레스테롤 및 중성지방 농도는 우량 김치종균으로 담긴 김치 및 시판김치 급여로 큰 폭으로 감소되었으며, 감소율은 우량김치종균이 38.9%로 가장 우수하였다.

- 따라서 동맥경화증은 여러 가지 원인에 의하여 유발되는 매우 복잡한 질병으로 그 병리발생의 원인과 기전에 대하여는 아직도 분명치 못한 점이 많지만, 본 실험에서 우량김치종균으로 담근 김치가 혈청 중 LDL-콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수의 감소, HDL-콜레스테롤농도 및 총 콜레스테롤농도에 대한 HDL-콜레스테롤농도의 비를 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰음은 미생물 대사공학 기법으로 제조된 첨담 전통김치를 섭취함으로써 지방저하, 동맥경화의 예방 및 치료 뿐만 아니라 현대인의 관심사인 만성 성인병의 예방과 치료기대에 부응할 수 있는 기능성 식품으로 이용이 기대된다.

### 3. Bifidobacteria 김치의 건강기능성에 대한 연구

- *Bifidobacterium animalis* DY-64를 함유한 김치의 건강 기능성을 조사하기 위하여 bifidobacteria가 첨가된 김치를 제조하고 이를 변비 증세를 보이는 10명의 대상자들에게 2주 동안 공급하였다. 시료 공급 전, 과정동안, 이후에 대상자들의 변비 호전도, 분변 미생물 변화, 분변 내 유해 효소 활성, 혈청 면역력을 측정하였다. 김치를 섭취하는 동안 배변 횟수, 과도한 힘주기, 단단한 대변 형태, 불완전 배출감 등의 변비 지표는 유의적으로 개선되어 변비 치료에 도움이 되었다.
- 분변 내 유용한 미생물인 bifidobacteria와 lactobacillus는 유의적으로 증가하였고, *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia coli* 및 *Staphylococcus* spp. 등은 유의적으로 감소하였다.
- 발암과 관련된 분변 내 유해 효소인  $\beta$ -glucuronidase와  $\beta$ -glucosidase의 활성은 김치 섭취과정동안 유의적으로 감소하였으며 면역력의 지표인 IL-2와 TNF- $\alpha$ 는 유의적으로 증가하였다.

- 본 실험의 결과 *B. animalis* DY-64를 함유한 김치가 변비와 장내 미생물 균총 개선, 유해효소 활성 억제 및 면역력 증강에 효과를 보여 *B. animalis* DY-64가 건강 기능성 식품의 제조에 이용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

#### 4. 김치 종균의 대량 생산을 위한 배양조건 확립 및 안정화 기술 개발

- 종균김치용 대량배양 시 본 연구에서 개발된 배지를 사용할 경우 기존 유산균용 배지의 제조단가에서 50 - 75%의 원가 절감효과가 기대된다.
- 김치종균의 안정적인 유통조건을 설정하여 저장기간을 28일로 하였을 경우 김치종균의 생존율이 90% 이상으로 충분히 산업화 조건을 충족시킬 수 있다.
- 따라서 현재의 김치제조 공법에서 탈피하여 종균김치의 제조가 일반화 될 경우 종균김치의 제조원가 상승을 최소화하면서 우수한 품질의 김치를 제조할 수 있을 것으로 기대된다.

## V . 주 요 연 구 실 적 및 성 과

### 1. 논 문 계 재

- Enhancement of bacteriocin GJ7 production by *Leuconostoc citreum* GJ7 and identification of the responsible agent that influence the bacteriocin GJ7 production, *Int. J. Food Microbiol.*, 논문심사중 (접수번호: IJFM-MS5446105), 2005
- 랫트와 마우스에서 우량 김치종균(*Leuconostoc citreum* GJ7)의 급성 및 아 급성 독성연구, 한국식품유통학회지, 투고중(2005, 8)
- G17-종균김치(*Leuconostoc citreum* GJ7)가 에탄올투여로 유도된 간 손상 흰 쥐의 항산화계에 미치는 영향, 한국식품영양과학회지, 투고중(2005. 10))
- Isolation of *Bifidobacterium animalis* DY-64 and its application to Kimchi preparation, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005. 7. 28. Accepted.
- 김치로부터 *Lactobacillus plantarum* 생육저해 박테리오신 생산균주의 분리 및 박테리오신 생산의 유도효과, 한국식품과학회지, 34(22):311-318

### 2. 학 술 발 표

- Screening and identification of Kimchi LAB producing functional substances, International symposium of Kor. Soc. Food Sci. & Nutr., 2005. 10. 19-21, Young Pyeong, Korea
- Healthy Aspects of *Bifidobacterium animalis* DY-64 Kimchi. 한국미생물 생명공학회, 2005년도 한국미생물학회 연합 국제 학술 대회, 2005. 10. 13-14, 서울교육문화회관
- 김치유산균의 기능성과 김치종균 개발 및 적용, 광주국제식품산업전 학술

세미나, 2005.10.08, pp. 109-129

- Enhancement of bacteriocin production by its sensitive strain, 2005 Int. Meeting of the Soc. of Kor., 2005. 6. 30, pp. 69-72
- 김치유산균의 기능성 탐색 및 발효, 한국식품저장유통학회, 2005. 6. 1, 순천대학교
- 김치유산균의 배양기술, 한국식품영양과학회 춘계산업심포지움, 2005, 5 20, pp41-55
- 김치에서 종균화 및 이를 활용한 김치발효 특성, 한국미생물생명공학회, 2005. 4. 20, pp.43-45
- 김치종균의 개발 및 적용, 제11회 광주김치대축제 학술세미나 자료집 「김치산업의 현황과 발전방안」 2004. 10. 22, pp.68-87
- 김치 및 김치유산균 현황, 제11회 광주김치대축제 학술세미나 자료집 「김치산업의 현황과 발전방안」 2004. 10. 22, pp.237-265
- 김치로부터 분리한 *Leuconostoc citreum* GJ7의 발효조건 최적화, Fermented Food and Health(전주국제발효식품엑스포), 2004. 10. 22-24, pp.164
- Bacteriocin GJ7을 생성하는 *Leuconostoc citreum* GJ7균주를 이용한 종균김치의 발효특성, Fermented Food and Health(전주국제발효식품엑스포), 2004. 10. 22-24, pp.171
- Identification and characterization of protein that induces production of the *Leuconostoc mesenteroides* B7. KMB International Symposium. 2003. 6. 24-26, pp.296
- Isolation of a Bifidobacteria-like probiotic *Oxalobacter* sp. KMB International Symposium. 2003. 6. 24-26, pp. 202

### 3. 저 서

- 김치의 기능성과 산업화, 2005, p167, 푸른세상

### 4. 특 허

- 내산성, 내산소성 및 내염성이 우수한 비피도박테리움 아니말리스 DY-64 및 이를 함유한 식품 [출원번호: 2004-66154]
- 루코노스톡 시트레움 GJ7 및 그로부터 생산되는 박테리오신 [출원번호: 2003-0059677]

### 5. 기 술 이 전

- 기술이전사업체: (주) 풀무원(2002.10-2004)

### 6. 수 상

- 2005 Annual Meeting & International Symposium, Microorganisms and Human Well-Being, 2005, 6. 29-30, 고려대학교 인촌기념관, 학술장려상 수상
- 전주국제발효식품엑스포, Fermented Food and Health, 전주대학교, 2004. 10. 22-24, 우수 포스터상 수상

## SUMMARY

### ○ Development of fermentation system for high-tech Kimchi by using Kimchi-starter

Although extensive scientific studies on Kimchi have been carried out, a systematic investigation of Kimchi has been difficult because of the complexity of the preparation methods, varieties of ingredients, and nature of fermentation. The fermentation of Kimchi is carried out by various microorganisms, especially the lactic acid bacteria that are present naturally in the ingredients. Kimchi quality should be controlled by microorganisms that are present in Kimchi ingredient and various fermentation conditions. The best quality Kimchi may be obtained from day 5 until day 14. After day 14, it might be classified as overripped Kimchi. Commercial shelf life of Kimchi is considered as day 28. In this study, we tried to expand Kimchi shelf life and to control the Kimchi fermentation by using Kimchi-starter strain which was isolated from Kimchi. We achieved to control the Kimchi fermentation by Kimchi starter usage (<80~90% dominant m/o in Kimchi) and to extend Kimchi shelf life up to 4 months by using microbial metabolic engineering and regulation technique. Such starter using technique leads to diminish undesirable microorganisms which can be occurred during Kimchi fermentation and to control the Kimchi fermentation artificially.

The results have advantage for good flavored-Kimchi(high quality) and long-term shelf life of Kimchi.

## ○ The physiological efficacy of traditional by microbial-engineering

In the first experiments, to investigate the toxicological effects of *kimchi* lactic acid bacteria, we performed the oral subacute toxicity test, and the acute toxicity test of peritoneal injection and per oral using mice. In the subacute oral toxicity test, *kimchi* lactic acid bacteria was administered into mice at a dosage of 5 g/kg, and then mice were brought up for 4 weeks. No clinical signs and pathological changes were observed in mice treated *kimchi* lactic acid bacteria throughout the experimental period. In addition, there were also no significant changes in general conditions, body weight gain, serum biochemical analyses and any gross or histopathological lesions. Peritoneal and oral acute toxicity tests in mice were also conducted to evaluate the toxicity of *kimchi* lactic acid bacteria. The LD<sub>50</sub> of *kimchi* lactic acid bacteria was 5 g/kg in oral toxicity test and 2.5 g/kg in peritoneal toxicity test, respectively. Therefore, the major dominant or main lactic acid bacteria strains isolated from *kimchi* were evaluated for safety reagent on toxicity and side effect to the mouse.

In the second experiments, to investigate the protective effects of the major dominant or main *kimchi* lactic acid bacteria on ethanol-induced liver damage in rat. The growth rate and feed efficiency ratio were decreased by ethanol, but increased by administering *kimchi* lactic acid bacteria. The serum ALT and AST activities that were elevated by ethanol were significantly inhibited by the *kimchi* lactic acid bacteria administration. It was also observed that GSH-Px activity and glutathione content in liver increased by ethanol were also markedly decreased in the *kimchi* lactic acid bacteria administered group

as compared to the control group. Among the *kimchi* lactic acid bacteria groups, the main *kimchi* lactic acid bacteria group showed greater effects on inhibiting free radicals and increasing anti-oxidative enzyme activities than the major dominant *kimchi* lactic acid bacteria group or commercial *kimchi* group. In conclusion, decrease in free radicals and increase in anti-oxidative enzyme activities of *kimchi* lactic acid bacteria groups suggesting that the *kimchi* lactic acid bacteria might have important role on retarding aging and could be developed as a new anti-oxidant agents.

In the third experiments, cholesterol lowering effects of the rat administered with the major dominant or main lactic acid bacteria isolated from *kimchi* were studied. Male Sprague-Dawley rats were administered 1% cholesterol and 0.25% sodium cholate to induce hypercholesterolemia. It was found out that significant decrease in body weight gain, feed efficiency ratio, serum triglyceride level, serum total cholesterol level, LDL-cholesterol level and atherogenic index was observed in *kimchi* lactic acid bacteria groups as compared to control group fed only high cholesterol diet. Decreased HDL-cholesterol level by high cholesterol diet was re-increased by *kimchi* lactic acid bacteria administered groups. Among the *kimchi* lactic acid bacteria groups, the main *kimchi* lactic acid bacteria group also showed greater effects on lowering cholesterol level and atherogenic index than the major dominant *kimchi* lactic acid bacteria group or commercial *kimchi* group. Taken together, it is suggested that the *kimchi* lactic acid bacteria exerts antiatherosclerotic effect by reducing serum cholesterol level.

### ○ Healthy aspects of *Bifidobacterium animalis* DY-64 Kimchi

To identify healthy aspects of *Bifidobacterium animalis* DY-64 we prepared Kimchi containing *B. animalis* DY-64 and provided to 10 subjects with constipation symptom for 2 weeks. We investigated the improvement of constipation symptoms, change of intestinal microflora, enzyme activity in feces, and immune activities of serum during entire experimental period. Constipation indexes including bowel movement frequency, straining, stool consistency, hard stool, sense of complete evacuation were significantly ( $p < 0.05$ ) improved during the Kimchi administration period. Bifidobacteria and lactobacilli in feces significantly ( $p < 0.05$ ) increased while *Bacteroides* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus* spp. significantly ( $p < 0.05$ ) decreased during the Kimchi administration period. Moreover, enzymatic activities of  $\beta$ -glucuronidase or  $\beta$ -glucosidase in feces significantly ( $p < 0.05$ ) decreased while the content of  $IL-2$  and  $TNF-\alpha$  significantly ( $p < 0.05$ ) in serum increased. From these results, We found that *B. animalis* DY-64 can be used to prepare functional foods because Kimchi containing *Bifidobacterium animalis* DY-64 showed the improvement of constipation, intestinal microflora, enzyme activity in feces, and immune activity in serum.

○ **Optimization and development of fermentation and storage conditions for industrial application.**

To settle down the starter Kimchi making process, starter strain should be supplied in industrial scale. Because generally LAB need a complete nutritional supply, cost for fermentation of starter strain result in increasing original Kimchi making cost. To overcome these problems in starter Kimchi making process, efficient fermentation system, newly reconstructed low cost medium, and storage condition of starter strain should be developed. So, our research purpose is to find out the solution of those problems.

In first research year, optimum growth, agitation methods, pH controlling system and pH controller were determined. All fermentation data were obtained from 5L-jar fermentation not flask culture. When these fermentation conditions were applied in 300L-scale fermentation, almost the same fermentation results as cell growth time, pH controlling methods, and final cell concentration, were obtained.

Also new medium compositions were determined only for Kimchi starter. two types of media were developed and called as reconstructed medium 1 and reconstructed medium 2. Cost of reconstructed medium was 25% - 75% lower than commercial media which was used for LAB production in OEM company. Final cell concentration in reconstructed medium was more than  $5 \times 10^9$  cfu/ml. Generally when Kimchi starter was grown in MRS medium, Final cell concentration was less than  $3 \times 10^9$  cfu/ml. These results means that reconstructed medium could replace the commercial LAB production medium and be used for LAB production exclusively.

Finally, storage condition was set-up. Under these conditions, cell ( $> 10^{11}$  cfu/ml) could survive in the ratio of more than 90% in 28 days. When these stored-concentrated cell was applied in Kimchi making process, there was no any problem caused by stored cell.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction.....	33
Section 1. Significance.....	33
1) Technological aspect.....	35
2) Economical and industrial aspect.....	37
3) Social and cultural aspect.....	39
Section 2. Objective and scope.....	41
Chapter 2. Conditions for national or international technique development .....	45
Chapter 3. Method & Results.....	52
Section 1. Scientification of traditional Kimchi by microbial-engineering.....	52
1. Method.....	52
a. Isolation & Identification.....	52
b. Characterization of the isolate.....	53
c. Characterization of the bacteriocin.....	54
d. Fermentation characteristics of the isolate.....	55
e. Kimchi fermentation system for the isolated starter.....	55
2. Results.....	59
a. Isolation & identification of Kimchi LAB.....	59
b. Characterization of the isolate.....	67
c. Fermentation characteristics of the isolate.....	74
d. Development of optimum Kimchi fermentation control system.....	79

e. Storage of Kimchi: shelf-life determination·····	85
f. Manufacturing of GJ3 starter Kimchi·····	92
g. Sensory evaluation of GJ7 starter Kimchi·····	94
h. Fermentation of GJ7 starter Kimchi according to carbon source ·····	98
I. Fermentation of the starter Kimchi by rapid fermentation·····	104
Section 2. The physiological efficacy of traditional Kimchi by microbial- engineering·····	111
1. Methods·····	111
a. The toxicity test of dominant <i>kimchi</i> lactic acid bacteria···	111
b. The antiaging effects of traditional Kimchi by microbial- engineering·····	112
c. The cholesterol lowering effects of traditional Kimchi by microbial-engineering·····	115
2. Results·····	117
a. The toxicity test of dominant <i>kimchi</i> lactic acid bacteria···	117
b. The antiaging effects of traditional Kimchi by microbial- engineering·····	127
c. The cholesterol lowering effects of traditional Kimchi by mcrobial-engineering·····	137
Section 3. Preparation of functional Kimchi using Bifidobacteria·····	145
1. Methods·····	145
a. Selection of subjects and study design·····	145

b.	Preparation of microbes and kimchi	147
c.	Analysis of <i>B. animalis</i> DY-64 effects on constipation	148
d.	Enumeration of intestinal microflora	148
e.	Preparation of <i>B. animalis</i> DY-64 specific primer	149
f.	PCR detection of <i>B. animalis</i> DY-64	150
g.	$\beta$ -glucuronidase and $\beta$ -glucosidase assay	151
h.	<b>IL</b> -2 and <b>TNF</b> - $\alpha$ assay	151
2.	Results	152
a.	Characteristics of subjects	152
b.	Effects of <i>B. animalis</i> DY-64 on constipation	152
c.	Changes of intestinal microflora	153
d.	Identification of <i>B. animalis</i> DY-64	154
e.	$\beta$ -glucuronidase and $\beta$ -glucosidase activities	156
f.	<b>IL</b> -2 and <b>TNF</b> - $\alpha$ concentration	158
Section 4.	Optimization and development of fermentation and storage conditions for industrial application	159
1.	Introduction	159
2.	Research contents	159
3.	Method and Results	162
a.	Effect of growth temperature, medium composition and culture methods on growth of <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7	162
b.	Effect of types of sugars on growth of <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7	164

c. Effect of types of amino acids in defined medium on growth of <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7	165
d. Medium pH effect on growth of <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7	167
e. Effects of physical conditions in 5L jar fermentor on growth of <i>Lactobacillus plantarum</i>	168
f. Determination of agitation methods in <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7 fermentation	172
g. Determination of pH controlling protocol in <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7 fermentation	176
h. Screening of sugar and protein replacement	177
i. Optimization of reconstructed medium composition and analysis of original medium cost	183
j. Optimization of strain storage conditions	185
Chapter 4. Contribution in relative research area	190
Chapter 5. Utilization of this study	199
Chapter 6. References	202

# 목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요.....	33
제 1 절 연구개발의 필요성.....	33
1) 기술적 측면.....	35
2) 경제·산업적 측면.....	37
3) 사회·문화적 측면.....	39
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용.....	41
제 2 장 국내·외 기술개발 현황.....	45
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	52
제 1 절 첨단미생물공학에 의한 전통김치의 과학화.....	52
1. 연구수행방법.....	52
가. 유산균분리 및 동정.....	52
나. 분리종균의 특성.....	53
다. 박테리오신 특성조사.....	54
라. 분리종균의 발효특성.....	55
마. 우량 신균주를 이용한 김치 발효조절 시스템의 구축.....	55
2. 연구내용 및 결과.....	59
가. 김치유산균의 분리 및 동정.....	59
나. 분리종균의 특성.....	67
다. 분리균주의 발효특성.....	74
라. 우량 신균주를 이용한 김치의 최적 발효대사 제어시스템 개발.....	79
마. 미생물대사제어시스템에 의한 첨단김치의 장기저장.....	85

바. 종균 GJ3에 의한 침단김치 개발	92
사. GJ7종균김치의 관능조사	94
아. 당원에 따른 GJ7종균김치의 발효특성	98
자. 속성발효에 의한 종균김치의 발효특성	104
제 2 절 미생물대사공학기법으로 제조된 전통김치의 생리활성효능 연구	111
1. 연구수행방법	111
가. 우량 김치 종균의 독성실험	111
나. 우량 신균주를 이용하여 개발된 김치의 노화억제 효능실험	112
다. 우량 신균주를 이용하여 개발된 김치의 고지혈증 억제 효능	115
2. 연구결과	117
가. 우량종균김치의 독성실험	117
나. 우량신균주를 이용하여 개발된 김치의 노화억제 효능실험	127
다. 우량신균주를 이용하여 개발된 김치의 고지혈증 억제효능	137
제 3 절 Bifidobacteria를 이용한 기능성 김치의 제조	145
1. 연구수행방법	145
가. 실험 대상자 선정	145
나. 미생물 준비 및 김치 제조	147
다. 통변에 대한 영향조사	148
라. 분변 미생물 균총 조사	148
마. <i>B. animalis</i> DY-64 확인용 primer 제작	149
바. <i>B. animalis</i> DY-64 확인	150
사. 유해 효소	151
아. 면역력 측정	151

2. 연구내용 및 결과	152
가. 대상자의 특성	152
나. 변비 호전 효과	152
다. 분변 미생물 균총	153
라. <i>B. animalis</i> DY-64 확인	154
마. 유해 효소	156
바. 면역력 측정	158
제 4 절 김치 종균의 대량 생산을 위한 배양조건 확립 및 안정화 기술 개발	159
1. 서론	159
2. 연구내용	159
3. 연구방법 및 결과	162
가. 생육 온도 및 배지 조성 그리고 배양 방법이 <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7의 성장에 미치는 영향	162
나. <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7의 성장에 탄소원이 미치는 영향	164
다. Defined 배지에서 첨가되는 아미노산의 종류에 따른 배양 특성	165
라. 배지 pH가 균 생육에 미치는 영향	167
마. 5L jar fermentor에서의 물리적 조건이 <i>Lactobacillus plantarum</i> 의 발효에 미치는 영향	168
바. <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7 발효 방식 결정	172
사. <i>Leuconostoc citreum</i> GJ7 발효시 배지 pH의 조절 방식 결정	176
아. 대체 당 및 대체 단백질의 탐색	177

자. 신규배지의 최적화 및 원가 절감 효과.....	183
차. 균주 안정화 조건 확립.....	185
제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도.....	190
제 1 절 연도별 연구목표 및 평가 착안점제.....	190
제 2 절 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도...	191
제 5 장 연구개발의 활용계획.....	199
제 6 장 참고문헌.....	202

## 제 1 장 연구개발 과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 필요성

- 김치의 기원은 삼국시대를 거슬러 올라갈 만큼 오랜 역사를 가지고 있으며, 오늘날과 같은 김치 모양은 1600년대 고추가 상용화되기 시작하면서 나타났다.
- 김치는 종류에 따라 배추, 무, 오이, 열무 등의 기본재료에 다양한 양념이 첨가되는 복합식품이다. 김치에 들어가는 여러 재료들은 발효하는 과정에서 각 재료가 가지고 있는 장점을 해치지 않는 범위에서 서로 시너지 효과를 내며 다량의 유산균과 각종 비타민 등을 생성한다.
- 중국과 일본에도 채소의 소금 절임이나, 된장 간장에 담근 장아찌식 절임과 젓산발효 초기에 머무른 비교적 담백한 야채 절임류가 많았다. 그러나 김치처럼 채소류에 젓갈과 같은 단백질 부원료를 가하여 발효를 행하므로 얻어지는 독특한 풍미와 조화로운 영양학적 가치를 갖춘 발효야채식품은 한국의 김치뿐이다. 이러한 김치는 한반도의 기후, 계절, 각 가정의 생활환경 및 식습관에 따라 다양하게 발달 정착했다.
- 김치는 특별한 지식 없이도 가정에서 누구나 전래의 보편적인 방법으로 제조하면 자연 발생적으로 발효가 일어나 김치의 제조가 가능하였으므로 김치가 지니는 오랜 역사에 비해 체계적이고 과학적으로 정량·정성화된 김치발효 시스템 구축이 미진한 실정이다. 서양의 대표적인 발효식품인 유발효제품은 대장균등의 유해미생물이 번식하기 쉽기 때문에 인위적인 살균과 발효 시스템에서의 종균화 등의 기술이 일찍부터 개발·도입됨과는 비교되는 결과이다.

- 우수한 연구들이 근간 많이 수행되어져 왔지만, 김치의 상품화에서 품질의 균일화 및 규격화 그리고 보존성은 아직도 해결해야 할 많은 문제점으로 남아있다. 그 가장 큰 이유로는 김치는 발효유제품처럼 아직 ‘종균화’가 이루어지지 못하고 있다는 것이다. 초기균수와 균종이 일정하지 않기 때문에 발효유제품과 같은 발효시스템을 사용할 수 없다는 것이다. 기존 연구된 김치의 스타터 개발 연구에서는 우수한 종균을 개질해도 원료살균이 이루어지지 않은 김치 발효계에서는 상대적으로 많은 종균양을 초기에 접종 시 가해야 하고, 이로 말미암아 김치발효속도 조절이 어려워 너무 신 김치가 만들어진다는 문제점을 제시하였다.
- 김치 제품의 다양화 측면에서도 김치재료를 배추, 무, 오이, 갯, 고들빼기 등 김치 원재료를 바꾸어 제조하거나 다양한 양념맛을 주어서 제조함에 집중되어 있는 실정이다. 즉 김치가 다른 절임 채소류 식품과 달리 우수함은 발효식품이기 때문이라고 하면서도, 다양한 미생물 대사 체계를 이용하며 김치를 발효시킴으로서 각기 다른 발효산물이 생산됨에 따른, 풍미가 다른 김치의 생산은 개념자체가 없는 실정이다. 서양의 와인이나 각종 발효 유제품이 발효의 차이에 따라 독특한 풍미를 나타내는 제품으로 생산되고 그 발효정도에 따라 품질의 등급이 달라짐과는 크게 다른 실정이다. 그러므로 기존의 김치연구에서 해결하지 못한 상기의 문제점들은 반드시 해결하여야 하는 당면문제이고 이것이 해결되었을 때, 우리 전통김치의 우수성 및 부가가치는 더욱 크게 부각될 것이다.
- 최근 산업구조가 지식, 정보를 기반으로 하여 재편하고 있는 것이 세계적인 추세이다. 즉 기존산업이 지니고 있는 생산성 및 효율성의 한계를 고부가가치를 창출할 수 있는 고도의 지식기반과의 접목을 통한 발전산업으로 전환하여 산업 경쟁력 제고가 필요하다. 우리나라 기존의 김치문화 전통의 맥을 기존산업의 축으로 하고, 여기에 미생물 대사공학을 통한 정련된 김치발효

기술을 집목하여 상품김치로써의 품질 균일화, 양념맛이 아닌 발효에 의한 김치 맛의 다양화 및 차별화, 품질유지, 생물학적 기능을 지닌 김치 등의 개발을 통한 ‘첨단김치’를 개발한다면 그 부가가치 및 산업적 차원의 대외 경쟁력은 막대하리라 본다. 기존의 김치연구가 김치자체의 분석과 특성규명에 집중되었다면, 이제 그 기초지식을 실제 산업에 응용, 발전시키는 단계가 이루어져야 할 것이다.

### 1) 기술적 측면

- 국내에서 김치관련 연구는 1960년대부터 조금씩 시행되기는 하였으나, 1985 서울 올림픽 전후로 세계적으로 우리의 전통 김치의 우수성을 알리고자 하는 차원에 과학적이고 체계적인 학술적 차원의 규명이 요구되면서 급속히 이루어져왔다. 이를 요약하면 다음과 같다.
- 김치의 발효에 관한 연구는 1960년, 1970년대, KIST, 국방과학연구소, 원자력 연구소 등지에서 김치발효에 관계되는 *Leuconostoc*, *Lactobacillus* 및 *Streptococcus* 속에 대한 분리 동정을 기점으로 1980년대에 미생물과 김치의 품질에 관한 연구가 많이 보고되었고, 1988년 서울 올림픽을 전후하여 식품 개발 연구원에서 김치 발효조절(1989), 김치품질향상을 위한 스타터 개발연구(1990), 김치발효의 현상학적 특성 및 품질균일화에 관한 연구(1991), 김치류 가공공장의 자동화 시스템 개발(1992) 및 국제 식품화를 위한 김치류의 제조공정 및 품질관리 기술(1993), 김치의 종합연구(1993), 김치의 고품질 상품화 기술개발(1999) 그리고 경희대학교를 중심으로 김치제조 공정개선 및 보존성증대(1995) 및 부산대학교에서 기능성 김치개발(1995)등에 대해서 다양하게 연구되었다.
- 이와 같이 우수한 연구들이 근간 많이 수행되어져 왔지만, 김치의 상품화에서 품질의 균일화 및 규격화 그리고 보존성은 아직도 해결해야 할 많은 문

제점으로 남아있다. 그 가장 큰 이유로는 김치는 발효 유제품처럼 아직 ‘중균화’가 이루어지지 못하고 있다는 것이다. 즉 김치의 조성물인 원·부재료들은 가열 살균할 수 없으므로 김치재료로부터 이행되는 초기균수와 균종이 일정하지 않기 때문에 발효 유제품과 같은 발효시스템을 사용할 수 없다는 것이다. 기존 연구된 김치의 스타터 개발 연구에서는 우수한 종균을 개발해도 원료살균이 이루어지지 않은 김치 발효계에서는 상대적으로 많은 종균양을 초기에 접종 시 가해야 하고, 이로 말미암아 김치발효속도 조절이 어려워 너무 신 김치가 만들어진다는 문제점을 제시하였다.

- Bifidobacteria의 식품에 응용은 1949년 Meyer가 bifidobacteria를 유아 식품에 적용하는데 성공하였고 1968년 독일의 Schuler 등이 우유에 다른 젖산균과 bifidobacteria를 혼합 배양하여 발효유를 제조한 이래로 유럽, 일본, 미국 등지에서 최근까지 요구르트, 치즈, sour cream, butter milk, 분유, 과자 등에 폭넓게 이용되고 있다.
- 현재 국내에서는 bifidobacteria를 한국인으로부터 분리하여 발효유에 적용하고 있으며, 유산균 식품, 의약품 및 동물 약품 등에 사용하고 있으나, 대부분 외국에서 원료를 수입하여 제품에 사용하고 있다.
- 따라서 유산균 식품, 의약품 및 동물 약품, 기능성 식품 소재 등에 사용할 생균제를 제조시 한국인에서 유래한 bifidobacteria가 연구 개발될 필요가 있다. 또한 식품에 이용시에는 내산성, 내염성, 내산소성이 있는 bifidobacteria를 분리하여야 한다. 분리한 미생물이 probiotics로 이용되기 위해서는 인체 건강에 미치는 기능을 확인하여야 한다.
- 종균 김치의 산업화를 위하여 반드시 확보되어야하는 종균의 대량 공급을 위한 발효시스템의 확립과 유산균의 대량생산에 필요한 저가의 배지 공급 그리고 마지막으로 확보된 종균의 안정적 유통을 위한 저장 안정성에 관한 조건을 최적화하는데 그 목적이 있다.

- 종균김치의 제조는 단일 종의 유산균을 우점종으로 발효를 진행시키는 개방 발효방식을 위하기 때문에 초기에 다량의 종균이 첨가되어야 한다.
- 다량의 유산균을 산업적으로 확보하기 위해서는 배양 방법의 최적화가 우선적으로 이루어져야 한다.
- 유산균은 통성 또는 편성 혐기성균이기 때문에 대량 배양이 용이하지 않고, 이러한 조건에서 대량배양 시 균체량을 최대화 한다는 것은 매우 까다로운 작업이다. 지금까지 산업적으로 유산균의 균체 농도를 획기적으로 증가시키는 방법에 대한 연구 논문은 거의 없는 실정이며, 대부분이 유산균 제조업체의 know-how로서 외부에는 밝혀지지 않고 있다. 그러므로 본 과제에서 분리된 신 김치종균의 산업화를 위한 보급을 위해서는 반드시 김치종균의 고농도 대량 배양 시스템의 확립 또는 유사한 효과를 기대하기 위한 생산단가의 절감이 반드시 필요하다.
- 본 연구개발에서는 미생물 대사공학을 이용한 첨단 김치의 제조기술 개발을 하고자 한다. 본 과제에서는 이와 같이 우수한 우리의 전통식품인 김치에 첨단 미생물대사 공학을 접목시켜 발효과학에 의한 우리 고유의 전통 김치맛을 계승발전 시킴과 동시에 맛의 다양화 및 제조법의 과학화를 통한 김치의 세계화를 꾀하고자 한다.

## 2) 경제·산업적 측면

- 김치의 종주국인 우리나라 김치가 2001. 7. 6일(현지시간 5일 오후), 스위스 제네바에서 열린 제24차 총회 국제식품규격위원회(Codex)에서 국제식품으로 정식 승인되었다. 김치의 Codex 규격이 제정됨으로써 수입국에게 합리적인 김치기준을 제공하며 교역상의 비관세 무역장벽 해소가 가능해졌음은 물론이고, 김치의 무역분쟁 발생 시 WTO에 제소 방지할 수 있는 수단을 마련함으로써 김치의 수출증대 및 국제적 상품가치 향상에 기여할 수 있게 되었

다. 또한, 우리나라 전통식품 중 최초로 김치가 국제식품으로 제정됨으로써 향후 인삼 등의 다른 우리 전통식품의 국제규격화를 위해 김치 Codex 국제 규격식품 승인이 도움이 될 전망이다.

- 김치소비량은 연간 150만톤으로 추정되며, 1997년 추정된 김치의 기업적 생산은 40만톤으로 약 27%수준으로 시장규모가 4,000억원 정도이나 상품김치의 최근 국내수요 증가율이 연간 15~20%로 나타나 그 수요가 증가 될 것으로 전망된다.
- 국내 김치 시장 규모는 2000년 5,000억원 수준이며 김치 수출규모는 1999년 78,840,000달러(24,560M/T) 규모이며 이는 10년 전에 비하여 가격면에서는 5.6배 양적으로는 4.3배 증가된 것이다.
- 김치의 기업적 생산은 1960년대 베트남에 파월국군에게 김치 통조림을 군납 하면서 시작되었고, 1970년대부터는 핵가족화에 따른 가족 구성원의 변화, 여성의 사회진출 등과 맞물려 일반 소비자의 상업적 김치 구매가 급속히 증가하기 시작하였다. 1990년에는 기업적으로 생산된 상업적 김치의 38.9%는 단체급식소나 군용으로, 56.6%는 일반 소비자에게 그리고 나머지 4.5%는 수출되었다.
- 김치 제조업체는 1997년 9월말 현재 459개 업체로 현재 대부분 중소기업으로 그 규모가 영세하고 시설 및 제조기술이 낙후되어 있으며 체계적인 연구개발이 능력이 부족하여 김치산업을 고도의 기술산업으로 발전시키지 못하고 있는 실정이다. 1994년 9월부터 관련법규의 해제로 대기업도 김치산업에 참여하여 향후 김치산업도 급속히 발전하고 있다.
- 김치 수출은 1988년 서울 올림픽 이후 일본, 미국, 홍콩 등을 비롯한 약 75개국에 이르고 있다. 최대 김치 수입국인 일본 외 다른 국가들에 대한 수출액이 점차적으로 증가하고 있으나 아직은 일본이 전 수출 물량의 약 97%정도를 차지 할 정도로 일본에 물량이 집중된 양태로, 차후보다 적극적인 수

입 국가별 취향에 맞는 김치 제품의 다양화를 통한 수출 국가의 다양화와  
고른 수출 물량 분포가 요구되어진다.

### 3) 사회·문화적 측면

- 최근 산업구조가 지식, 정보를 기반으로 하여 재편하고 있는 것이 세계적인 추세이다. 즉 기존산업이 지니고 있는 생산성 및 효율성의 한계를 고부가가치를 창출할 수 있는 고도의 지식기반과의 접목을 통한 발전산업으로 전환하여 산업 경쟁력 제고가 필요하다.
- 우리나라 기존의 김치문화 전통의 맥을 기존산업의 축으로 하고, 여기에 미생물 대사공학을 통한 정련된 김치발효기술을 접목하여 상품김치로써의 품질 균일화, 양념맛이 아닌 발효에 의한 김치 맛의 다양화 및 차별화, 품질 유지, 생물학적 기능을 지닌 김치 등의 개발을 통한 ‘첨단김치’를 개발한다면 그 부가가치 및 산업적 차원의 대외 경쟁력은 막대하리라 본다. 기존의 김치 연구가 김치자체의 분석과 특성규명에 집중되었다면, 이제 그 기초지식을 실제 산업에 응용, 발전시키는 단계가 이루어져야 할 것이다.
- 광주광역시에서는 국내외에 한국김치 맛과 문화의 우수성을 알리고 국내 김치 관련 산업 발전과 국가 경쟁력을 강화하고, 국내외 관광객 유치와 통한 지역 경제 활성화 등의 목적으로 올해로 9회를 맞는 광주 김치 대축제를 개최하고 있으며, 이 음식 문화 관광 축제를 통하여 지역의 문화와 음식이 아닌 세계적 음식 문화로써의 김치 위상을 제고하고자 하고 있다. 또한 김치 산업 양성을 위한 상설 기관으로 광주시 남구 김치타운(부지 23천평, 건물 3.4천평, 총 사업비 197억원)설립을 추진하고 있다.
- 그러나 이러한 일련의 지역사업은 기존의 김치를 문화 관광적 측면에서 상품화 하려는 노력이고 김치를 과학적 측면에서 재정립하는 내용과는 크게 다르다. 그러므로 본 과제에서는 광주광역시나 남구(區)와 같은 지역 행정기

구가 감당하지 못하는 학술적 자문을 뒷받침 해주고, 본 과제에서 궁극적으로 개발하고자 하는 첨단김치의 개발 단계에서의 소비자 기호도 조사, 홍보, 산업화를 지역에서의 이러한 김치산업 발전 추진체계와 연계하여 이를 그 창구로 활용함으로써 그 기대 효과를 극대화시키고자 한다. 이는 전통 문화유산의 현대적 계승 발전, 관광 산업 발전과 지역 경제 활성화 및 국가 경쟁력 강화에 크게 기여할 것이다.

## 제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

### 가. 연구개발 목표와 내용

- 본 연구개발의 목표는 김치 발효를 인위적으로 조절하여 품질이 균일하고 보존성이 향상됨과 동시에 probiotics 기능을 지닌 미생물(Bifidus)를 개발하여 전통김치에 접목시켜 생물학적기능이 보강된 첨단 BT기술로 이루어진 상품김치 제조에 있다.
- 본 과제에서는 김치발효에서 우수한 김치유산균을 종균화하기 위하여 미생물 대사공학 차원에서 복합적인 김치발효시스템을 적절히 조절하여 줌으로써 김치발효의 인위적 조절 및 품질균일화, 보존성의 향상을 꾀하고자 한다.
- 본 연구과제에서 첨단김치의 개발을 위한 방법으로는, **첫째** 맛있는 김치 발효 종균을 개발하고 이를 비살균처리 김치 발효 시스템에서 미생물 대사 공학 차원에서의 김치 발효 조절, **둘째** 통성혐기적 조건인 김치 발효 시스템에서 정장작용을 할 수 있는 Probiotics의 개발, **셋째** 이를 상품김치로 대량 생산하기 위한 종균의 고농도배양 및 안정화 등의 기술 개발, **넷째** 이와 같이 개발된 우수종균 및 김치의 생물학적 효능 검사 기술을 개발하고자 한다. 그리고 최종 개발된 이 기술을 전통 김치에 접목시켜 실용화를 확립하는데 있다.
- 본 연구에서는 미생물 대사 제어 시스템에 의하여 비살균 개방형 김치발효 체계에서 사용된 유산균주가 김치발효계내에 80~90%의 우점종을 차지하여 종균화가 가능함을 보여주었다. 이러한 종균화 기술은 김치에 잡균을 제어하고 김치발효를 인위적으로 조절 가능하여 저장성 향상의 효과를 동반한다.
- 또한 김치의 원료나 부재료에 의한 김치맛의 다양화가 아닌 종균 특유의 발

효에 의한 김치맛의 다양화가 가능함을 보여주었다.

**목표 1) 우량 김치 종균의 개발 (약10여종)**

- 발효에 의한 맛있는 김치를 제조할 수 있는 최적 대사계를 지닌 유산  
종균의 분리 및 특성규명
  - 균주 동정 : 형태학적, 생리·생화학적, 분자 생물학적 특성
  - 분리된 종균의 특성 조사
  - 분리된 종균의 발효 특성

**목표 2) 우량 신 균주를 이용한 김치 발효 시스템 개발**

- 발효 대사 제어 시스템 개발 : 생물학적 보전제 개발 및 특성규명
- 종균별 최적 대사 시스템 개발 : 김치 발효 시스템
- 품질의 균일화 및 각기 다른 발효 시스템에 의한 맛의 다양화  
(종균에 따른 맛 김치 개발)

**목표 3) 개발 신 균주를 이용한 전통김치 개발 및 제품 다양화**

- 종균김치 제조
  - :우량 신균주 및 대사 공학 기술 + 종래 김치 제조법
- 제품 다양화
  - 개발 종균의 발효능에 따른 김치맛의 다양화
- 미생물 대사 제어에 의한 유통기간 및 저장방법 설정

**목표 4) 장수노인 유래 유용 Bifidobacteria 분리**

- Bifidobacteria균주의 분리: 대상-95세 이상의 장수노인, morphology,  
TLC, F6PPK assay

- 우점종 Bifidobacteria의 선발 : 당발효 실험으로 grouping
- 우점종 Bifidobacteria의 동정 : API kit, Biolog, 16S rRNA 분석한국인에 적합한 장내 미생물 분리·동정

**목표 5) Bifidobacteria를 이용한 기능성 김치 제조**

- 다양한 Bifidobacteria 미생물 첨가에 따른 김치의 변화
- 부재료 첨가가 Bifidobacteria 김치에 미치는 영향
  - 발효과정중 미생물 천이변화
  - 발효과정중 김치의 이화학적 검사
  - Bifidobacteria의 갓김치, 동치미, 깍두기 제조에의 응용: 관능검사

**목표 6) 분리된 Bifidobacteria 의 건강 기능성 연구**

- Bifidobacteria 김치의 통변에 대한 영향 조사
- 분리된 Bifidobacteria의 면역증강능력 조사
- 분리된 Bifidobacteria의 콜레스테롤 저하능 조사

**목표 7) 우량 김치 종균(유산균, 비피더스)의 독성 및 인체건강 증진성 평가**

- 안전성 평가를 위한 독성 실험
- 기능성 생리활성 물질 추출 및 분획

**목표 8) 우량 신균주를 이용하여 개발한 김치의 노화 억제 효능 검색**

- 실험동물 및 식이 선정
- 노화 억제 물질의 추출 및 분리
- 노화 억제 효과에 대한 *in vitro* 및 *in vivo* 효능 실험

**목표 9) 침단김치의 고지혈증 억제 물질 검색**

- 고지혈증 억제 효능 검색(*in vitro* , *in vivo*)
- 동물실험을 통한 고지혈증 억제물의 분획별 탐구

**목표 10) 김치 종균의 배양 조건 최적화**

- 발효 온도, pH, 염농도 등의 배양 기본조건의 분석
- 5L-jar 발효조에서의 발효 조건 최적화  
발효시 배양 pH 조절을 위한 조절 방식의 선택  
pH 조절용 완충제의 선정

**목표 11) 김치 종균의 항균활성 유도를 위한 유도물질 생산의 최적화**

- 감수성균주의 배양 조건 최적화
- 감수성균주로부터 유도물질 제조방법의 최적화

**목표 12) 김치 종균용 특수배지의 개발**

- 탄소원의 최적화
- 유기 및 무기 질소원의 최적화
- 미량 원소의 최적화

**목표 13) 김치종균의 저장 안정성 최적화**

- 배양 배지조성에 따른 안정성
- 안정제 존재하에서의 안정성
- 저장 조건에 따른 안정성

## 제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

### 가. 국내 · 외 관련기술의 현황

- 1994년 6월 현재 발표된 김치 관련 연구자료 및 문헌은 약 526건으로 1988년 이전 문헌 230건, 1988년 이후 문헌 420건으로 서울올림픽 이후 김치 연구가 매우 활발히 이루어 졌다. 개략적으로 분류한 연구현황은 원부재료 관련 연구 17%, 발효 속성에 관한 연구 32%, 영양 및 성분분석 분야 15%, 저장 유통분야 17%, 제조시설분야 3%, 산업현황 4%, 기타 12%이었다. 국외의 연구 현황은 외국의 전통식품들인 sauerkraut, pickle 및 일본의 지물 등에 관한 연구는 많으나 외국인이 행한 김치에 관한 연구는 아직 없다.

#### 1. 첨단 미생물공학에 의한 전통 김치의 과학화 (미생물을 이용한 김치 발효조절)

- 김치는 숙성과정중 미생물 상호작용에 의해 자연적으로 발효되는 식품으로 미생물군의 천이의 양상과 균집발달은 김치품질을 결정하는 중요한 인자가 된다. 김치발효에 직접적 관련 유산균인 *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* 및 *Leuconostoc* 속자체에 대한 보고는 많이 있으며 이외에도 김치로부터 분리 동정된 미생물들은 유산균들을 포함하여 200여종 이상으로 매우 다양하다.
- 김치는 발효초기에 *Leuconostoc mesenteroides* 등과 같은 이상 젖산균(hetero-fermentative lactic acid bacteria)의 번식에 의하여 발효가 시작되며 김치가 가장 먹기 좋은 완숙기에 이상 젖산균의 성장은 그 최고치를

나타낸다. 이것은 김치의 맛과 이상젖산균은 밀접한 관계가 있음을 시사하고 있다. 그러나 발효 중기 이후 pH가 4.0이하로 낮아지면 내산성이 강한 정상 젖산균(homo-fermentative lactic acid bacteria)인 *Lactobacillus plantarum* 속이 빨리 증식하면서 많은 산을 생성하여 김치의 산패를 일으킨다고 알려지고 있다.

- 이와 같은 김치의 산패 현상을 억제함으로써 가식기간을 연장시키려는 목적으로 저온살균, 방사선조사, 방부제 처리, 완충제 첨가, 염혼합물의 첨가 등 물리 화학적 방법이 시도되었으나, 품질저하 및 소비자의 거부감 등이 지적되어 실용화 단계에 이르지 못하였다. 김치 산패균인 *Lb. plantarum*의 생육 억제를 위하여 산초유, 계피유, 호프, 부추, 자몽씨, 대나무잎 추출물, 키토산 등과 같은 천연 보존제 첨가에 대한 연구 역시 시도되었으나, 현재까지 이상적인 천연보존제의 개발은 이루어지지 못한 실정이다.
- 미생물을 이용한 김치발효의 인위적 조절연구는 김치가 복잡한 발효식품이라는 특성 때문에 아직 초기단계에 있으며 현재까지 이루어진 연구 내용은 스타터와 박테리오신 생성균주의 이용으로 주로 sauerkraut 또는 유제품 발효관련 균주들 중에서 screening 되었다. 김치에서 screening된 경우도 있으나 이는 박테리오신 생성으로 잡균 제어적 측면에서는 성공적이라 할 수 있으나, 이 분리균주가 (*Enterococcus hirae*) 맛있는 김치 발효를 주로 하는 균이 아니라 김치 유해 환경 제어용이라는 데 문제점이 있다.

## 2. 미생물 대사공학 기법으로 제조된 첨단김치의 생리활성 효능 연구 (Biological function of Kimchi)

- 최근 인간의 암, 동맥경화증, 노화 등 퇴행성 질환은 자연계에 존재하는 free radical에 의하여 발생하며, 이 free radical에 대하여 방어할 수 있는

물질로서 항산화제 효능에 대한 관심이 고조되고 있는데 김치는 주재료인 배추 및 갓뿐만 아니라 부재료로 첨가되는 마늘, 고춧가루 등에 함유되어 있는 플라보노이드, 베타카로틴, 페놀 물질 등에 의해 항산화작용, 항돌연변이 및 항암효과 등과 같은 다양한 기능성을 갖는다고 보고되어 있다.

- 김치를 동물에게 투여했을 때 혈중 지질농도 저하 및 간의 항산화효소활성을 증가시키고, 갓김치를 섭취한 누르마우스의 피부에서 유리기 생성을 억제시켰다고 보고되어 있으며, 또한 김치는 채소로 구성되어 있으므로 다량의 식이섬유를 함유하고 있으므로 동맥경화증과 심장병을 억제할 수 있어 우리나라의 전통식품인 김치가 우리나라뿐만 아니라 일본과 미국 등 해외에서도 현대인의 관심사인 성인병의 예방과 치료기대에 부응할 수 있는 기능성식품으로서 건강에 유익한 식품으로 인식되고 있고 또한 많은 관심을 가지고 있다.
- 그러나 우리나라의 김치산업은 대부분 영세성을 면치 못하여 기술 개발이 미흡상태로 현재까지 김치관련 기술개발은 전통적인 김치제조기술에 기초한 김치 산업육성 및 김치의 국제규격화에만 집중되어 왔으며 전통 김치의 계승, 품질균일화 및 노화 등 기능성에 대한 과학적인 연구는 아직도 미진한 편이다.
- 외국의 경우 발효유제품에서의 유산균발효 작용에 의한 생리활성 효능에 관한 연구로, 유산균은 정장작용, 비타민 합성, 유당 및 단백질의 흡수 촉진 등 건강식품 기능 이외에 숙주의 면역체계를 활성화함으로써 병원균이나 암에 대한 저항성 증가효과가 수차례 보고되어 왔는데 1962년 Bogdanov 등이 *Lactobacillus bulgaricus*에서 Sa-rcoma 180과 Ehrleinoma 57에 의한 복수암에 효과가 있는 3가지의 glycopeptide를 분리한 후 발효유제품의 젖산균에 대한 항암 효과를 보았다.
- 또한 Reddy 등과 Farmer등은 유산균 발효유를 쥐에 투여할 때 복수암 세

포의 증식이 억제되거나 균이 없는 유제품은 효과가 없었다고 하였으며 Shackelford 등도 *Streptococcus thermophilus*와 *Lactobacillus bulgaricus* 발효유가 모두 dimethylhydrazin hydrochloride(DMH)유도 발암에 제어효과가 현저하다고 하였다. 이들은 종래의 항생제나 항암제와는 달리 직접 병원균이나 암세포에 작용하는 것이 아니라 숙주의 면역체계를 활성화시켜 숙주의 생체 방어 기능을 증강시키는 역할을 하므로 이를 biological response modifier(BRM)라 부르고 있으며 이들은 투여 시 숙주에 대하여 독성이 매우 낮은 장점을 갖고 있다. 그러나 이를 우리 김치에 적용하여 연구한 경우는 없다.

### 3. Bifidobacteria를 이용한 기능성 김치의 제조

- 현재 국내에서는 bifidobacteria를 한국인으로부터 분리하여 발효유에 적용하고 있으며, 유산균 식품, 의약품 및 동물 약품 등에 사용하고 있으나, 대부분 외국에서 원료를 수입하여 제품에 사용하고 있다. 따라서 유산균 식품, 의약품 및 동물 약품, 기능성 식품 소재 등에 사용할 생균제를 제조시 한국인에서 유래한 bifidobacteria가 연구 개발될 필요가 있다. 또한 식품에 이용시에는 내산성, 내염성, 내산소성이 있는 bifidobacteria를 분리하여야 한다. 분리한 미생물이 probiotics로 이용되기 위해서는 인체 건강에 유익한 기능을 하여야 한다.
- Bifidobacteria는 편성 혐기성 미생물로 식품에 이용되기 위해서는 생물학적 특성상 내산소성, 내산성 및 내염성을 지니고 있어야 한다. 현재 보고된 한국인에서 분리된 bifidobacteria는 내산소성이 없거나 (한국특허등록 82056호; 김치제조방법 제시하고 있으나 공기가 있는 조건에서 생육하기 어려움), 김치에서 생존 여부가 불확실하고 (한국특허출원 2000-8938; 호기성 비피도

박테리움 균주의 특성과 선발과정 불명확), 외국인 유래의 bifidobacteria를 김치 제조에 이용(한국특허공개 2003-31553;내산소성, 내산성 및 내염성을 지닌 비피도박테리움 락티스 DSM10140을 김치에 적용, 고기능성 김치제품 개발, 상기 균주는 외국인 유래의 균주로 한국인의 장내 정착성에 문제점이 있을 것으로 추정되며 생존율에 대한 결과제시가 불명확)함으로서 한계성이 있다.

- 본 연구에서는 내산소성, 내산성 및 내염성이 있는 *Bifidobacteria animalis* DY-64를 이용하여 김치를 제조함으로써 기존의 김치에 부가가치를 높이는 기능성 식품 제조가 가능하다. 또한 이를 변비 환자에게 공급하여 임상실험을 거침으로서 변비 개선효과, 장내 미생물 균총 개선 및 면역력 상승효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 *Bifidobacteria animalis* DY-64가 생균제제로서 가능성이 있음을 제시한다.

#### 4. 김치 종균의 대량 생산을 위한 배양조건 확립 및 안정화 기술 개발

- 유산균 연구는 대부분이 유가공산업으로부터 유래되었다  
현재 유산균이라하면 유산균 발효유 혹은 유산균 음료, 그리고 치즈, 발효버터 등의 제조에 사용되는 균을 의미하며 여기에 사용되고 있는 유산균의 종류는 제조회사에 따라서 다르며, 제품의 특성에 따라서 다른 종균을 사용하고 있다. 그러나 이러한 균들은 분명히 김치제조에 사용하는 균과는 다르며, 또한 발효 특성도 다르기 때문에 김치에 적용하기는 매우 어렵다.
- 국내 김치유산균의 연구는 김치 발효 현상만을 다루고 있다.  
김치에 존재하는 유산균에 대한 연구는 주로 발효과정에서의 유산균 및 기타 균총의 변화(김치발효의 지표로서 미생물군집의 측정)나 온도에 따른 균총 변화 및 균 특성(온도강하에 의한 김치발효의 유산균 군집의 특징, 김치

에서 분리한 유산균의 인공위액과 담즙에서의 생존특성과 항균성 ) 등 대사 제어 보다는 발효과정에서 생기는 물리·화학적 변화 및 미생물 집단의 특성에 관한 연구가 이루어졌다.

○ 국내 유산균의 기능성 연구

국내의 김치 또는 사람으로부터 분리한 유산균이나 비피더스의 경우 항 돌연변이, bacteriocin 생성 연구 그리고 항 콜레스테롤 저하 효과 등의 연구는 진행되었거나, 현재 진행중이다. 그러나 이는 분리된 유산균의 strain마다 특성이 다르므로 같은 종의 유산균이라해도 동일한 효과를 나타낸다고 할 수는 없다.

○ 김치 종균의 대량 또는 고농도발효에 관한 자료는 아직 없다.

유산균 자체에 관한 균체증식에 관한 자료는 국외에 유청 여과액을 이용한 방법 또는 bacteriocin 생성을 위한 fed-batch fermentation에 관한 자료가 있기는 하나, 대량 배양에 적용하기가 어렵고, 본 연구에서 분리될 김치 종균에 적용가능성이 낮아 새로운 발효 조건의 정립이 필요하다.

## 나. 국내·외 관련기술의 현황 및 문제점

□ : 기술현황 및 문제점, □ : 수행

기술	기술 현황 및 문제점	본 연구에서 보완 내용
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 김치의 품질 균일화 및 규격화</li> <li>○ 김치의 보존성(유통기간 연장기술)</li> <li>○ 김치 맛의 다양화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 김치는 복잡한 발효식품이며 초기 원·부재료의 살균이 불가능하여 김치의 종균화가 어렵고 재료에 따라 제품이 제각각</li> <li>- 물리화학적 처리(저온살균, 방사선조사, 방부제, 염혼합물등)</li> <li>- 천연 식품 보존제 첨가(산초유, 계피유, 호프, 부추, 키토산 등)</li> <li>- 박테리오신 생산균 이용(잡균 제어적 측면에서는 성공적이나 맛있는 김치 발효균이 아닌 김치 유해 환경제어용)</li> <li>- 김치의 주재료(배추, 무, 갓, 열무, 꼬들 배기등)와 양념맛의 차이로 다양화 꾀함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 맛있는 김치 발효에 관계하는 우수 김치 종균 및 대사 제어용 종균개발 → 품질 균일화</li> <li>• 물리화학적 처리와 식품첨가물을 가하는 것이 아니라 미생물 자체의 대사제어 시스템에 의한 김치 발효 조절 → 품질 균일화 및 보존성 증대 가능성 제시</li> <li>• 양념이나 김치 원·부재료의 차이에 의해서가 아닌 발효에 의한 맛의 다양화(유산균+비피더스+대사제어 시스템)</li> <li>• 제조된 김치를 불특정 다수의 관능평가 결과를 feedback하여 기호도 높은 제품 제조에 반영</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유익 장내 미생물의 분리 및 식품에의 적용</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유익한 장내 미생물 섭취를 위한 기능성 식품 개발(발효 유제품, 쌀당화액+사과박 발효음료)</li> <li>- 수입 균종에 의존적이며, 산업적 제품 제조 적성(내산소성, 내염성)이 우수하지 못함</li> <li>- Probiotics로서의 기능성 연구는 주로 in vitro에서 이루어짐</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최초로 건강한 한국인 장수노인으로부터 비피더스를 분리하고 이를 김치에 적용(비피더스 김치 개발)</li> <li>• 분리된 미생물을 김치에 적용하여 김치 발과정중 변화 및 관능성 평가</li> <li>• 비피도박테리아가 함유된 김치를 인체에 공급하고 변비 및 건강기능성에 미치는 효과를 조사</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 김치종균의 대량 생산 및 안정화 기술</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 유산균은 혐기성균이므로 대량 배양이 어렵다. 산업적 유산균 대량 배양에 관한 연구논문은 거의 없으며, 대부분이 유산균 제조업체(주로 외국)의 know-how로 외부에 알려지지 않음</li> <li>- 기초자료가 되는 유산균 생육 및 발효 관련 연구도 거의 외국의 유제품기원 유산균이므로 김치 발효균에 그대로 적용하기 어렵다.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 특수한 김치 유산균 및 비피더스용 대량 배양 시스템 구축</li> <li>• 연구 책임자의 고농도 배양 know-how 보유</li> <li>• 김치 유산균용 전용 배지 개발 및 이의 응용</li> <li>• 김치 종균의 안정화 조건의 확립으로 산업적 응용의 기반 마련</li> </ul>

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 첨단미생물공학에 의한 전통김치의 과학화

#### 1. 연구수행방법

##### 가. 유산균분리 및 동정

###### 1) 유산균분리

- 시료: 가정용 김치 중 맛있는 김치 수십종 수집(광주, 나주, 영암지역)
- 선별배지: m-LBS, PES-3, CaCO<sub>3</sub>-MRS, MRS
- 배양온도 및 시간: 30℃, 24hr

###### 2) 동정

① 형태학적 관찰: 그람염색, 현미경관찰

② 분자생물학적 방법: 16s rDNA 서열결정

- Genomic DNA 분리: GNOME DNA kit(Bio101) 사용
- 16s rDNA 증폭을 위한 primer 제작 및 PCR

: 본 실험에서 사용된 primer는 총 5개 set를 사용하였으며 PCR조건은 다음과 같다.

Pre-denaturation	: 95℃, 5min	} 30회
Denaturation	: 95℃, 1min	
Annealing	: 52℃, or 42℃(LmesP) 1min 30sec	
Extension	: 72℃, 2min	

- 염기서열 결정 및 분석

Ligation: PCR product + pGEM-T Easy vector(Promega, USA) →

Transformation: *E. coli* TG1 → Sequencing(한국기초과학지원연구원) →

상동성 검사: Blast program([http://www. ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov))

## 나. 분리종균의 특성

### 1) 조항균물질의 제조

30℃, 24hr 전배양 → 100 mL MRS, 30℃, 24시간 → 원심분리(9,500×g, 10 min) → 제균(0.45 μm membrane filter, Millipore) → 상정액 동결건조(Labconco., Kansas, USA) → 수세(투석: dialysis membrane, m.w. 1,000) → 동결건조 → 용해(50 mM Tris-HCl, pH 8.3 or 3차 증류수 4 mL)

### 2) 박테리오신 생성능 조사

Direct method, agar diffusion method(1)

### 3) 박테리오신 induction 효과

- Inducing factor 분획

감수성균주(*Lb. plantarum* KFRI 464, *Lb. delbruekii* KFRI 347): 30℃, 24hr → 각각 원심분리(9,950×g, 4℃, 15 min) → 균체 + 50 mM Tris-HCl(pH 8.3) 20 mL → sonication(Ampi:60, Pulse:2sec, Time:10min, Sonics VC 130, Newtown, USA) → 원심분리(9,950×g, 4℃, 25 min) → i) 세포내 분획 (intracellular extract), ii) cell debris로 분리 → i) 세포내 분획: membrane filter(0.45 μm, Millipore)로 제균, ii) cell debris + 20 mL MRS

## 다. 박테리오신 특성조사

### 1) 온도의 영향

- 4, 37, 50, 70°C: 12hr, 100°C: 30min, 121°C: 15min

### 2) pH의 영향

- pH 2.5(50 mM Glycine-HCl), pH 4.5(50 mM Sodium acetate), pH 6.0(50 mM Sodium citrate), pH 7.0(50 mM Phosphate), pH 8.3(50 mM Tris-HCl), pH 9.5(50 mM Glycine-NaOH) → 25°C, 12hr

### 3) 각종 효소의 영향

- 사용효소
  - Trypsin(EC 3.4.21.4 type I, Sigma, Missouri, USA), lipase(EC 3.1.1.3 type VII, Sigma), protease(type I, Sigma): 50 mM Tris-HCl 완충액(pH 7.5)
  - pepsin(EC 3.4.23.1 type I, Sigma): 50 mM citrate 완충액(pH 2.0)
  - proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma): 10 mM Tris-HCl-50 mM NaCl-5 mM EDTA(pH 7.5)
  - $\alpha$ -amylase(EC 3.2.1.1 type VIII-A, Sigma): 0.1 M sodium phosphate 완충액 (pH 7.0)
- 반응조건: 최종 4 mg/mL, 37°C, 12hr
- 대조구: 모든 동일한 조건에서 효소액만 빼고 처리한 것

## 라. 분리종균의 발효특성

### 1) 생육시간에 따른 항균물질의 활성변화

- 배양: MRS 배지, 30°C, 24시간 → A<sub>600</sub> 흡광도 측정
- 항균활성측정: 배양시간에 따른 항균활성측정, agar diffusion method, 지시균; *Lb. plantarum* KFRI 464

### 2) 내염성

- NaCl 농도: 0, 1, 3, 5, 7%(w/v)/MRS배지, 30°C, 24시간 → A<sub>600</sub> 흡광도 측정

### 3) 당 발효능: API 50CHL kit(Biomerieux, France)

## 마. 우량 신균주를 이용한 김치 발효조절 시스템의 구축

### 1) 종균김치의 제조

#### 가) 사용균주

- 1차년도 연구 결과 분리·선별된 10종 균주 가운데 우량김치종균의 요건(① 우수한 박테리오신 생성능 + ② 감수성균에 의한 박테리오신 생산 유도효과 기능 + ③ 맛있는 김치 발효능)을 만족시키는 *Leuconostoc citreum* GJ7과 *Leuconostoc kimchii* GJ3를 본 연구에서의 우량종균으로 최종 선발하였다. 선발된 2종의 김치종균은 박테리오신 감수성균 *Lb. plantarum* KFRI 464의 세포내분획에 존재하는 박테리오신 유도물질(Inducing factor: IF)를 이용하여 박테리오신 생산을 증강시켜 김치 starter로 사용하였다.

- 박테리옌 감수성균주로부터 Inducing factor 분획

감수성균주(*Lb. plantarum* KFRI 464): 30°C, 24hr → 원심분리(9,950×g, 4°C, 15 min) → 균체 + 50 mM Tris-HCl(pH 8.3) → sonication → 원심분리 (9,950×g, 4°C, 25 min) → i) 세포내 분획(intracellular extract), ii) cell debris + MRS → GJ7 또는 GJ3에 세포내분획첨가: 30°C, 24hr 배양

#### 나) 김치제조

- 원료배추를 잘 다듬은 후 천일염으로 제조한 16.7%(w/v)의 소금용액에서 5~6시간 실내온도에서 절임하고 흐르는 물에 3회 세척하여 5~10°C에서 4~5시간 탈수하였다. 재료의 배합비는 탈수된 절임배추 100g에 대하여 고춧가루 2.7g, 마늘 1.3g, 생강 0.5g, 액젓 4.0g, 파 1.7g, 무 1.6g, 당근 1.07g, 설탕 0.86g, 명태지 0.04g으로 하였고 김치의 염도는 2.0~2.1%가 되도록 조정하였다. 우수종균 GJ7 또는 GJ3는 박테리옌 유도물질로 박테리옌 생성능을 강화시킨 후 그 배양액을 김치에 첨가하였다. 담은 종균김치는 폴리에틸렌수지 또는 나일론+PE 1kg용 포장지에 담아 진공포장하였다.

## 2) 일반분석

- 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 걸른 김치여액으로 pH와 산도를 측정하였다.

#### 가) pH

- pH meter(Denver Instrument Co., Model 15)로 측정하였다.

#### 나) 산도

- AOAC방법에 의하여 김치여액 10 mL를 0.1N NaOH용액으로 pH 8.3이 될 때까지의 NaOH용액 소비량으로 정의하였으며, 이것을 아래식에 의하여 잰산

함량으로 환산하여 총산함량(%)으로 표시하였다.

$$\text{총산(\%)} = a \times f \times F \times 10$$

a: 0.1N NaOH용액의 소비mL수

f: 0.1N NaOH용액의factor

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

### 3) 미생물균수의 측정

- 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 걸른 김치여액을 3종류의 고체배지에 도말하여 나온 colony를 그람염색 및 현미경으로 관찰하였다.

가) 선별배지: LB, MRS, CaCO<sub>3</sub>-MRS

나) 형태학적관찰: 그람염색, 현미경관찰

### 3) 온도별 종균김치의 발효 pattern 분석

- 김치를 위의 방법으로 GJ7종균첨가 포기배추를 제조한 다음, 김치를 발효시키면서 pH, 산도, 균총(총균수, 우수종균수)의 변화 양상을 분석하였다.

### 4) 산도별 저장에 따른 종균김치의 숙성 pattern 분석

- 종균김치를 일정기간 발효 후 산도 약 0.4~0.85% 부근일 때 발효를 멈춘 후 0~-2℃에서 저장하면서 발효양상 및 균총의 변화를 지속적으로 관찰하였다.

#### 5) 장기저장에 따른 발효양상 및 미생물 변화

- GJ7을 starter로 사용하여 제조한 김치를 5~10℃에서 숙성시킨 후 산도 0.47%, 0.59%, 0.71% 일 때 숙성을 멈춘 후 김치냉장고에 4개월간 저장하면서 pH 및 산도 그리고 미생물의 변화를 관찰하고 관능조사를 하였다.

#### 6) 종균김치의 관능조사

- 우수김치종균 GJ7을 starter로 사용하여 제조한 종균김치의 관능조사를 위하여 (주)○○○에서 미리 선정하여 훈련시킨 주부관능전문요원 9명과 (주)○○○내 연구원 11명이 참여하여 3차례에 걸쳐 실시하였다. 김치제조용 종균을 첨가한 김치의 관능적인 특징 및 기호도를 젓산균을 첨가하지 않은 대조구와 현재 시판되고 있는 (주)○○○스펙으로 제조한 김치와 비교하여 조사하였다. 관능검사는 저장 후 각 처리구의 적숙기에 대하여 실시하였으며 평가항목은 맛, 냄새, 조직감, 색깔 및 기호도 그리고 전반적인 기호도로 나누어 9점 만점으로 평가하였다. 관능검사의 결과의 통계처리는 T-test 또는 Student t-test에 의해 처리하였다.
- 최적 발효온도 및 최적 산도별 저장시기에 대한 예비적 실험용 김치의 관능조사는 몇 개월간 훈련시킨 조선대학교 식품영양학과 대학원생 10명을 대상으로 청량감, 단맛, 신맛, 기호도를 중심으로 관능조사를 실시하였다.

#### 7) 종균 GJ3에 의한 김치 개발

- *Leu. kimchii* GJ3를 starter로 사용하여 GJ7종균김치와 동일한 부재료와 배합비로 제조한 GJ3김치를 발효시킨 후 김치의 산도가 약 0.5% 부근일 때 김치냉장고에 저장하면서 pH, 산도, 균총(총균수, GJ3종균수) 및 관능조사를 실시하였다.

## 8) 당원(fructose 또는 sucrose)에 따른 GJ7종균김치의 발효특성

- 김치재료 중 당원인 설탕(0.86g/절임배추 100g)의 일부를 fructose로 김치배합비를 변경한 김치재료에 박테리오신 유도물질로 박테리오신 생성능을 강화시킨 *Leuconostoc citreum* GJ7을 첨가시킨 GJ7종균김치와 종균을 첨가하지 않은 종균비첨가김치를 제조하였다. 이들의 당원 대조구로서 기존의 배합비로 설탕만을 첨가한 GJ7종균김치를 제조하였다. 이들 김치는 최적발효온도에서 김치를 발효시켜 산도 0.5~0.6% 부근일 때 발효를 멈춘 후 0~-2℃에서 저장하면서 발효양상 및 균총의 변화를 지속적으로 관찰하였다. 또한 이들 김치의 관능조사는 조선대학교 식품영양학과 대학원생 20명을 선정하여 2차례에 걸쳐 실시하였으며 당원별 GJ7종균김치, 종균비첨가김치 그리고 현재 시판되고 있는 (주)○○○김치를 비교하였다. 관능검사는 저장 후 최적 적숙기에 대하여 실시하였으며 평가항목은 전반적인 외관, 향미(맛, 냄새 등) 및 전체적인 기호도로 나누어 9점 만점으로 평가하였다.

## 2. 연구내용 및 결과

### 가. 김치유산균의 분리 및 동정

#### 1) 균주 분리

- 우량김치 종균을 분리하기 위하여 가정용 김치 중 맛있는 김치를 시료로 수집하였다. 수집대상 지역은 광주, 나주, 영암으로 하였으며, 김치시료에서 수십종의 균주를 분리하였다. 균종이 다르다고 잠정적으로 확정된 35종의 유산균을 확보하였다.

- 본 연구에서는 “우량김치종균 = ① 우수한 박테리오신 생성능 + ② 감수성 균에 의한 박테리오신 생산 유도효과 기능 + ③ 맛있는 김치 발효능”을 만족하여야 함이 필수 사항이다. 그러므로 분리균주 35종 중 박테리오신 생성능과 항균활성, 항균spectrum, 생육도 등이 우수한 10종의 균주를 선별하였다.
- 분리·선별된 10종 균주를 유산균배지인 MRS와 CaCO<sub>3</sub>-MRS: 유산균배지, PES-3: *Leuconostoc*속 선별배지, m-LBS: *Lactobacillus*속 선별배지에서의 배양결과를 Table 1에 정리하였다. 10종의 균주 모두 유산균배지인 MRS와 CaCO<sub>3</sub>-MRS에서 잘 자랐으며 CaCO<sub>3</sub>-MRS에서는 산생성능에 의해 투명환을 형성하였고, 모두 catalase 음성으로 나타나 유산균임을 나타내었다. PES-3배지하에서는 NJ2, NJ3, YY1, YY4가 생육하지 못하였고, m-LBS에서는 GJ2가 생육하지 못하였다. YY3는 PES-3, m-LBS에서 모두 생육을 나타내지 못하였다. 유산균주의 속(genus)에 따른 선별배지는 정확한 분별이 되지 못하여 전체적인 분리·동정 과정 중 균주의 일차적인 grouping 정도로 이용하여야 할 것이다.

Table 1. Cell growth in various media for lactic acid bacteria

배지 \ Strains	GJ2	GJ3	GJ6	GJ7	NJ1	NJ2	NJ3	YY1	YY3	YY4
MRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CaCO <sub>3</sub> -MRS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PES-3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
m-LBS	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+

## 2) 선별균주의 동정

- 분리균주 10종 중 형태학적 관찰과 박테리옌 생성능(항균spectrum, 항균활성), 박테리옌 유도효과 등을 종합하여 우수한 김치종균이 될 수 있는 균주를 최종 6종 선별하였다(GJ2, GJ3, GJ6, GJ7, NJ2, YY4: 총 6종).

### 가) 형태학적 관찰

- 분리균주 10종에 대한 그람염색 및 형태학적 관찰을 시행하였다(Table 2, Figure 1). 분리균주는 모두 그람양성이었고 구균에서 단간균, 간균의 형태를 나타내었다. Colony의 모양은 매끈하고 둥근 형태로 불투명한 우유 빛~크림색을 띠었다.

### 나) 분자생물학적 방법: 16s rDNA 염기서열 결정

- GJ7 : LmesP primer set에 의한 PCR product로 1,304bp를 얻었으며, 16s rDNA 염기서열 결과 *Leuconostoc citreum* AF111949와 98% 상동성을 나타내어 GJ7은 *Leu. citreum*으로 동정되었고 이를 *Leu. citreum* GJ7으로 명하였다(Fig. 2).
- GJ2 : LmesP primer set에 의한 PCR product로 1,304bp를 얻었으며 이 16s rDNA 염기서열 결과 *Leuconostoc kimchii* AF173986과 99% 상동성을 나타내어 GJ2는 *Leu. kimchii*으로 동정되었고 이를 *Leu. kimchii* GJ2로 명하였다(Fig. 3).
- NJ2 : 1-31-Pprimer set에 의한 PCR과 추가적 PCR을 통하여 총 1,210bp를 얻었으며 이 16s rDNA 염기서열 결과 *Lactobacillus sakei* AF401659와 96% 상동성을 나타내어 NJ2는 *L. sakei*으로 동정되었고

이를 *L. sakei* NJ2로 명하였다(Fig. 4)

- YY4 : 1-31-Pprimer set에 의한 PCR과 추가적 PCR을 통하여 총 1,210bp를 얻었으며 이 16s rDNA 염기서열 결과 *Lactobacillus sakei* AF401659와 96% 상동성을 나타내어 NJ2는 *L. sakei*으로 동정되었고 이를 *L. sakei* NJ2로 명하였다(Fig. 5)
  
- GJ3 : LeuP와 LABP primer set에 의한 PCR product로 1,053bp를 얻었으며, 16s rDNA 염기서열 결과 *Leuconostoc kimchii* AF173986과 99% 상동성을 나타내어 GJ3는 *Leu. kimchii*으로 동정되었다. 16s rDNA full sequence를 얻기 위하여 이 염기서열을 바탕으로 추가적 PCR을 통하여 500bp정도 더 분석하여 최종 동정결과로 삼고자 한다(Fig. 6).
  
- GJ6 : LeuP와 LABP primer set에 의한 PCR product로 1,065bp를 얻었으며, 16s rDNA 염기서열 결과 *Weissella confusa* AF477495와 100% 상동성을 나타내어 GJ6은 *W. confusa*으로 동정되었다. 16s rDNA full sequence를 얻기 위하여 이 염기서열을 바탕으로 추가적 PCR을 통하여 500bp정도 더 분석하여 최종 동정결과로 삼고자 한다(Fig. 7).

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated strains

Strains	GJ2	GJ3	GJ6	GJ7	NJ1	NJ2	NJ3	YY1	YY3	YY4
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Morphology	coccus	short rod	rod	coccus	rod	rod	rod	rod	rod	rod
Colony	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular	circular
Colony surface	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth	smooth
Colony color	cream color	milk color	cream color	cream color	milk color	milk color	milk color	cream color	milk color	cream color
Colony opacity	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque	opaque

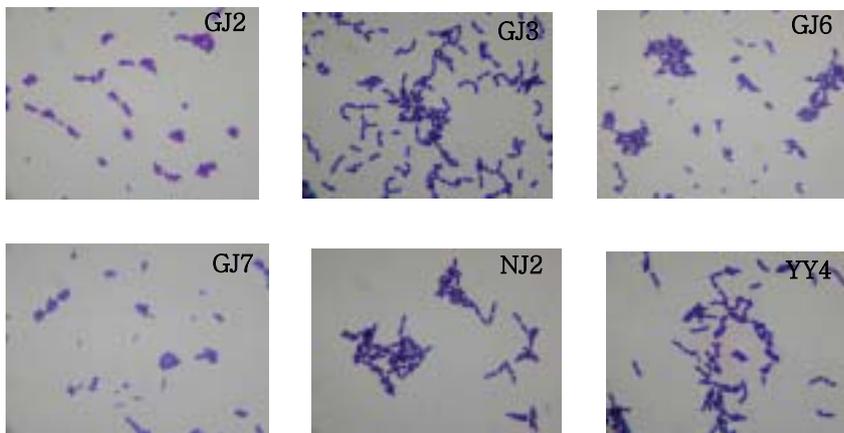


Fig. 1. Gram staining of the isolated strains

TAACTAGTGTCCGATGACATCAAGTTAAAAGGCGCTACGGCGTCACTAGAGATGGATCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAAGGCTTACCAAG  
ACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCCTACGGGAGGCTGCAAGTAGGAAATCTCCACAATGG  
GCGCAAGCTGTAGGAGCAACGCCCGGTGTGTATGAAGCTTTCCGGCTCGTAAAGCACTGTGTATGGGAAGAAATGCTAAAAATAGGGAATGATTTTAGT  
TTGACCGTTACCATAACAGAAAGGGAGCGCTAAATACGTTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTCCGAGCGTTATCCGGATTATTTGGGCGTAAAGCGAGC  
GCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGTGTAGAGGTAAAGTGGAACTCCA  
TGTTGAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTTACTGGACAACAACCTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGGGTAGCAAA  
CAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTAGGAGGTTCCGCCCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTATTCGCG  
TGGGGAGTACGACCCGAAGTTGAAACTCAAAGGAATAGTCGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGGATGTTGTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACC  
AGGCTTGCATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTCTCTTCGGAGACAAGGTGACAGGTTGGTGCATGGTCTGCTGAGTCTGCTGAGATGT  
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATTGTTAGTTCAGCATTAGTTGGGCACTTAGCGAGACTGCCGGTGACAAAGGGGAGGAAGCGGGGAC  
GACGTGAGATCATATGCCCTTATGACCTGGCTACACAGTGTCTACATGGCATTACAACGAGTGGCAACCTGCGAAGGTGAGGTAATCTCTAAAGTA  
CGTCTCAGTTCCGGACTGGACTGCAACTCGACTGCAAGTGGAACTCGTATGATTAATCCGGATCAGCACCGCGGTAATACGTTCCCGGCTTGTGA  
CACACCCCGGTACACCATGGGAGTTGTAATGCCAAAGCCGGTGGCTTACTTCGGAGGGAGCGCTTAAGTGGGACAG

**Fig. 2. 16s rDNA sequences of the isolated strain GJ7**

CTGTCCCACTTAGACGGCTCCCTCTTACGGTTAGGCGACCCGGCTTTGGGCATTACAAACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGGAAACCT  
ATTCACCGCGCGTCTGATCCCGGATTACTAGCGATTCCGACTTCGTGCAGTGCAGTTGCAGACTCCGAACTGAGACGCTACTTTAAGAGATTAGT  
CACCTTCGAGGTTGGCAACTCGTTGATACGCCATTGTAGCAGCTGTGTAGCCAGGTGATAAGGGGATGATGATCTGACGTCGTCGCCCGCTTCTCCG  
GTTTGTACCGGAGTCTCGCTAGAGTGCACATCGAATGCTGGCAACTAAACAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACTCTCACGACACGA  
GCTGACGACGACCTGCAACCTGTCACTTTGTCTCCGAAGAGAACAATCTATCTCTAAAAGCTTCAAAGGATGTCAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGT  
TGCTTCGAATTAACACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGCTCAATCTCTTGTAGTTTCAAACCTTGGGCTGCTACTCCCGGGGAAACACTTAAATGC  
GTTAGCTTCGGCACTAAGAGGCGGAAACCTCTTAACACCTAGTGTTCATCGTTTACGGTGTGGACTGCCAGGATCTAATCCTGTTTGTACCCCACTTT  
CGAGCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGTAAGCCGCTTCGCGCTGGTGTCTTCCATATATCTACGCACTCCACCGCTACACATGGAGTCCACTTACTCT  
TACTGCACTCAAGTTGTCAGGTTTCCCAATGCTTTCGGAGTTGAGCTCCGGCTTTCACATCAGACTTAAACAACCGCTTCGCGCTCGCTTACGCCAAATA  
AATCCGGATAACCGTCCGGACATAGTATTACCGGGCTGTGGCGGTTTACGCGCTCCCTTTCGGTATGGTACCGTCACTAAAATCATTCCCTATT  
TAGCTGTTCTTCCATACAACAGTCTTACGACCCGAAAGCTTCACTACACACGCGGCGTGTCTCATCAGGCTTCGCGCCATTGTTGGAGATTCCT  
ACTGCAGCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATGTCTTGGTAGCCTTTACTCT  
ACCAACTAATATGACCCCGGATCCATCTTAGTGTACCGGATAGGCGCTTTAACTTTATGTATGCGACTAAGCC

**Fig. 3. 16s rDNA sequences of the isolated strain GJ2**

ACACTATCCCGTGAACCCATTACCAAAATGAAGACTTTAATGGTGAAGCTTATCGCAAGCTAAACCAGTCGTCATCGATCCGGTCCGAGTCGGTTCAATT  
CATTATCGTCAAAAATATCGATGAACCTTTAGCATTGGGAACACCCAAATATCCCGGGGAAATGCGGGCGAAATGGCTTATCTAGCTGGTTAGACTGG  
CAAGCTAATGGTATGATGCAAGCAATGGCGAAATGATCTCGTAAAAGTTGCTCGAACAGCGGCTAAAAAACAGCAAAACACCTTTTACTTTACGGTCCA  
ACCGATATCATCACTGATGGTCAACACAGCAACAAAGTCCGCAATGGCACGCCACTTTCCAAAGTCCACGCTCGGCTTCGGGATATGCTAACTGGTCTTTCG  
GCTGCATTTGTCGCGGTAGTCTGACAAATCCCTATCAAGCGGCCATCGACGCGGCAACGACCTTTGCAGTCCGCGTCAAATAGTCCGCCGAAGCAACCGGA  
AGAACCATGCCACTCCTTTACCGGGTCTTTTACCACAACATTTAGACTGCTTGTTTAACTACACAGCAGCTGAGCTTCAAACCCATGCACAAGTCAAG  
GAGGCTTAACTCATGAATAATTTCCCAACAACATTAACAATCGCTGGTTACAGATAGTGGTGGCGCGCGGTTCAAAGCCGACATTAACACCATCAAAGAAC  
GCCAGCTTTTGCACCAACGTTGGTGTGCGAATACGGCCAAAATACAATTTGGCGTTCAAGATAGCTTCCCGCTACCGCTCGAACTAGTCCACAAACAGT  
TTGAATCGTCCGACCGGATTTAAGATCCGAGCTGTAAAACAGGCAATGCTCGCGGATGCTGAGCAGCTCGCCGTCGTTGCCAAAACCTCCGGCACTTCG  
ACTTGGGCCCCTTAACACTCGATCCGGTTATGATTGCAAAAGGTGGTGCCTCTACTAGCCGACTCCGCCATTGACACTTAAGATCAGAACTTTACTCTT  
TGGCAACTGTCTTAACACTAAACTACCAGAAGCAGAGGTGTTAACCGGTCAAAAAATCAAACAACGCGGATTTAAAAATCGCGCAACCGCAACTGCAAA  
AAATGGGTGCTAAAAATATCATCATTAAGGTGGCCATCTCGATAATAGTGACCAAGCCTGTGATTACGTTCTCTACGCTGATGGTAGTACGACTGG

**Fig. 4. 16s rDNA sequences of the isolated strain NJ2**

ACACTATCCCGTGAACCCATTACCAAAATGAAGACTTTAATGGTGAAGCTTATCGCAAGCTAAACCAGTCGTCATCGATCCGGTCCGAGTCGGTTCAATT  
CATTATCGTCAAAAATATCGATGAACCTTTAGCATTGGGAACACCCAAATATCCCGGGGAAATGCGGGCGAAATGGCTTATCTAGCTGGTTAGACTGG  
CAAGCTAATGGTATGATGCAAGCAATGGCGAAATGATCTCGTAAAAGTTGCTCGAACAGCGGCTAAAAAACAGCAAAACACCTTTTACTTTACGGTCCA  
ACCGATATCATCACTGATGGTCAACACAGCAACAAAGTCCGCAATGGCACGCCACTTTCCAAAGTCCACGCTCGGCTTCGGGATATGCTAACTGGTCTTTCG  
GCTGCATTTGTCGCGGTAGTCTGACAAATCCCTATCAAGCGGCCATCGACGCGGCAACGACCTTTGCAGTCCGCGTCAAATAGTCCGCCGAAGCAACCGGA  
AGAACCATGCCACTCCTTTACCGGGTCTTTTACCACAACATTTAGACTGCTTGTTTAACTACACAGCAGCTGAGCTTCAAACCCATGCACAAGTCAAG  
GAGGCTTAACTCATGAATAATTTCCCAACAACATTAACAATCGCTGGTTACAGATAGTGGTGGCGCGCGGTTCAAAGCCGACATTAACACCATCAAAGAAC  
GCCAGCTTTTGCACCAACGTTGGTGTGCGAATACGGCCAAAATACAATTTGGCGTTCAAGATAGCTTCCCGCTACCGCTCGAACTAGTCCACAAACAGT  
TTGAATCGTCCGACCGGATTTAAGATCCGAGCTGTAAAACAGGCAATGCTCGCGGATGCTGAGCAGCTCGCCGTCGTTGCCAAAACCTCCGGCACTTCG  
ACTTGGGCCCCTTAACACTCGATCCGGTTATGATTGCAAAAGGTGGTGCCTCTACTAGCCGACTCCGCCATTGACACTTAAGATCAGAACTTTACTCTT  
TGGCAACTGTCTTAACACTAAACTACCAGAAGCAGAGGTGTTAACCGGTCAAAAAATCAAACAACGCGGATTTAAAAATCGCGCAACCGCAACTGCAAA  
AAATGGGTGCTAAAAATATCATCATTAAGGTGGCCATCTCGATAATAGTGACCAAGCCTGTGATTACGTTCTCTACGCTGATGGTAGTACGACTGG

**Fig. 5. 16s rDNA sequences of the isolated strain YY4**

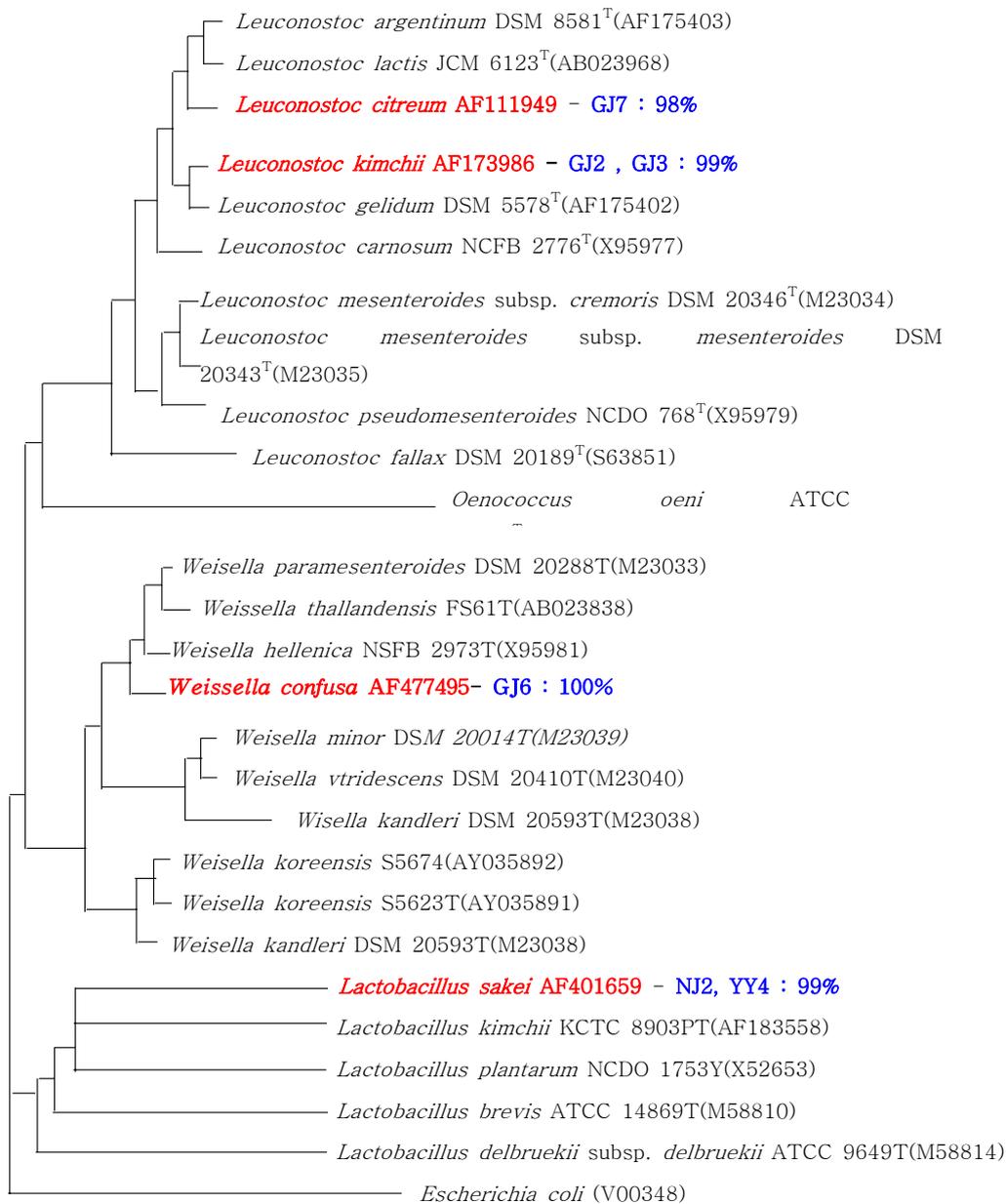
AACTCGACACGAGCTGACGACGACCATGCACCACCTGTCACCTTTGCTCCGAAGAGAACACTTCTATCTCTAAAAGCTTCAAAGGATGTCAAGACCTGGTAA  
GGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCCTGACTCCCAAGGCGG  
AACACTTAATGTGTAGCTTCGGCACTAAGAGGCGGAAACCTCCTAACACCTAGTGTTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTC  
TACCCACACTTTCGAGCTCAACGCCAGTTACAGTCCAGTAAGCCCGCTTCGCGCGTGGTGTCTTCCATATATCTACGCATTCACCCGCTACACATGGAGT  
TCCACTTACCTTACTGCACTCAAGTTGTCAGTTTCCAATGCCTTTCGGAGTTGAGCTCCGGGCTTTCACATCAGACTTAAACAACCGCTTCGCGCTCGCT  
TTACGCCAATAAATCCGGATAACGCTCGGGACATACGTAATACCCGCGCTGCTGGCAGTATTTAGCCGCTCCCTTTCTGGTATGGTACCGCTCACATAAAA  
TCATTCCCTATTCTAGCTGTCTTCCCATACAACAGTGTCTTACGACCCGAAAGCCTTCATCACACACGGGGCTTGTCCATCAGGCTTGGCCCATTTGTG  
GAAGATTCCCTACTGCAGCTCCCGTAGGAGTTTGGCCGTGCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCAGTCTCTCAACTCGGCTATGCATCATTTGCTTTGGTGA  
GCCTTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGGATCCATCTCTAGGTGACGCGGTAGCGCCTTTAACTTTATATCATGCGATACTAAGTTTATTCGGTA  
TTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCAGCCTTGAGGCAGGTTATCCACGTGTTACTACCCGCTTCGCGCACTCGCTTGAAGGTGCAAGCACCTCTCGCTG  
CGGCTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCGCA

**Fig. 6. 16s rDNA sequences of the isolated strain GJ3**

AATACATGCAAGTCGAACGCTTTGTGGTTCAACTGATTTGAAGAGCTTGTCTCAGATATGACGATGGACATTGCAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACG  
TGGGAAACCTACCTTTAGCAGGGGATAACATTTGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAATAGCAACCGCATGGTTGCTACTTAAAAGATGGTTCTGCTA  
TCACTAAGAGATGGTCCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACGATGATGCATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATG  
GGACTGAGACACGGCCCATACTCTACGGGAGGACAGTAGGGAATCTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGGCCGCTGTGTGATGAAGGGTT  
TCGGCTCGTAAACACTGTGTGAAGAGAAGAAATGACATTGAGAGTAACGTTCATGTTGACCGTATCTTACCAGAAAGGAAACGGCTAAATACGTGCCAG  
CAGCCGCGGTTAATACGTATGTTCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCTGAAGTGAAGCCCTCAGCTCAAC  
TGAGGAATGCTTTGAAACTGGATGACTTGAGTGCAGTAGAGGAAAGTGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTG  
GCGAAGGCGGCTTTTGGACTGTAACGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTGTCCACCCGTAACAGATGAGTG  
CTAGGTGTTGAGGGTTTCGCGCTTAAGTGCAGCAGTAAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGAGTACGACCCGAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG  
GGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGGAAGAACCTTACCAGGCTTTCGACATCCCTTGACAACCTCCAGAGATGGAGCGTTCCT  
TTCGGGACAAGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTG

**Fig. 7. 16s rDNA sequences of the isolated strain GJ6**

- 본 16s rDNA 염기서열을 바탕으로 분리·동정균주와 다른 유연관계 미생물과의 계통발생학관계를 Fig. 8에 나타내었다.



**Fig. 8. Phylogenetic relationship between the isolated strains GJ7, GJ2 and other related bacteria based on 16s rDNA sequence.**

## 나. 분리종균의 특성

### 1) 생육시기에 따른 박테리오신의 활성

- 6종의 분리균주 모두 배양 12~15시간에 정지기에 도달하였다. 생육초기에는 항균활성을 나타내지 않으나 대수기 중반부터 항균활성을 나타내기 시작하여 정지기에 이르는 12시간 이후부터 높은 활성을 나타내었다.

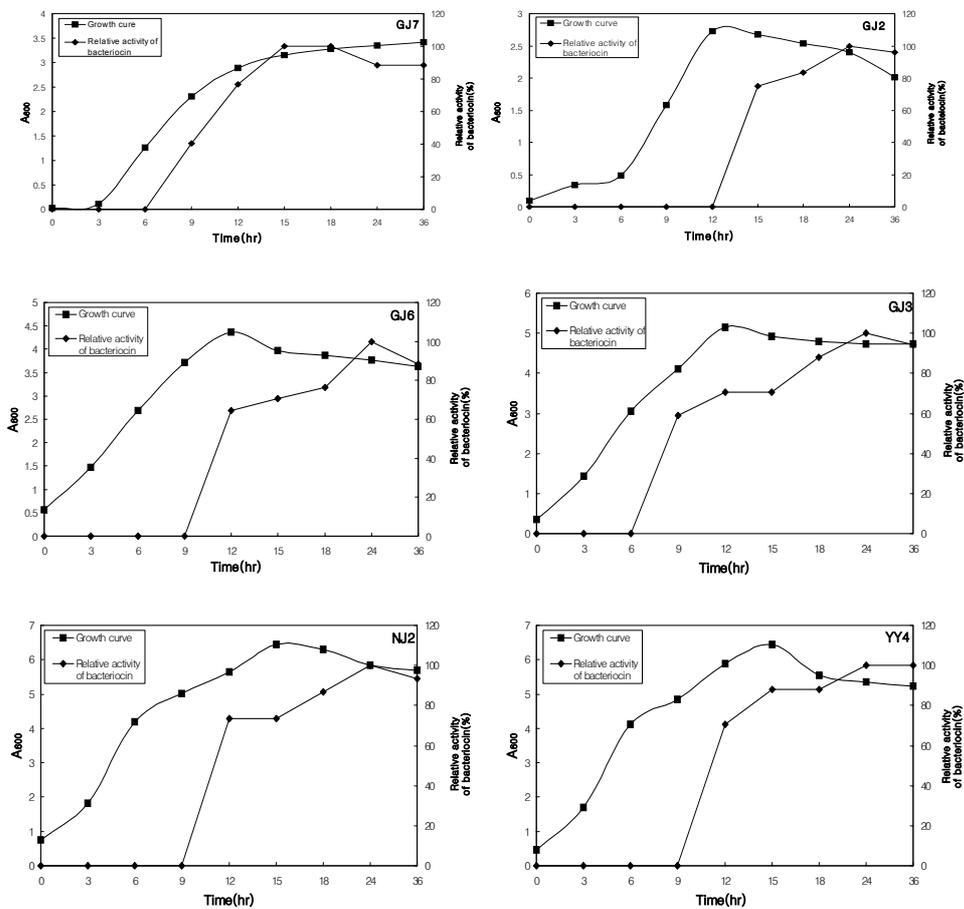


Fig. 9. Growth and production of the bacteriocins from the isolated six strains.

## 2) 박테리오신 생성능 조사

- 분리균주 35종 중 항균활성과 항균spectrum이 우수하여 선발된 6종 유산균의 항균spectrum을 Table 3에 나타내었다. 선발된 분리균주 6종은 같은 유산균(*Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbruekii*, *Lactobacillus acidophilus*)에 대해서 뿐만 아니라 분변오염의 지표가 되는 *E. coli*, 패혈증을 일으키는 *Pseudomonas*, 식중독의 원인균인 *Listeria*, *Micrococcus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* 속 등에서도 항균활성을 지니는 것으로 나타났다.
- Fig. 9에서는 보여지는 바와 같이 유해세균 *E. coli*, *Listeria*, *Salmonella*, *Pseudomonas*에 대해 분리균주들로부터 박테리오신의 항균활성은 분리균주에 따라 항균활성이 조금씩 차이가 나며, GJ2, GJ6, GJ7의 경우는 실험에 사용된 감수성균주에 대해 전반적으로 항균활성이 낮은 것으로 나타났다.

## 3) 박테리오신 생산 유도효과

- 본 과제에서 선발하려고 하는 우수김치종균의 둘째 요건은 단순히 박테리오신 생산균주에 그치지 않고, 이 박테리오신 생산이 감수성균주에 의하여 오히려 증강되어야 한다는 점이다. 즉 감수성균주내의 박테리오신 유도물질(Inducing factor:IF)에 의해 선발된 우수김치종균의 박테리오신 생산이 증강되고, 감수성균주내의 유도물질이 주는 자극 때문에 박테리오신 생산이 항상 일정하게 증강되어 생산되게 하는 미생물대사체계를 사용하는 것이다. Table 4에서 같이 박테리오신 유도작용이 있는 6종의 유산균이 선발되었다. 박테리오신 유도작용을 일으키는 감수성균 역시 GRAS(Generally Recognized As Safe)인 미생물을 선별해야 하므로 본 연구에서는 *L. plantarum* KFRI 464와 KFRI 347을 사용하였다. 감수성균주와 감수성균주의 세포분획에 따라 박테

리오신 생산 유도현상의 강약이 다르게 나타났다. 예를 들어 GJ7의 박테리오신 생산은 KFRI 347 세포내 분획 사용시는 유도효과가 없으나 KFRI 464 debris 분획을 사용하면 강력한 박테리오신 유도효과가 나타남을 알 수 있다. GJ2, GJ6, GJ7이 '② 박테리오신 생성능' 조사결과 비교적 낮은 항균활성을 나타내었지만(Fig. 10) 감수성균주의 IF에 의해 유도되었을 때 약 2~3배 항균활성이 증가되는 현상을 발견하였다(Table 4). 이와 같이 최적의 박테리오신 생산을 하기 위해서는 최상의 유도효과를 내는 박테리오신 감수성균주와 그 찾아내어야 함이 핵심사항이다.

Table 3. Inhibition spectrum of the bacteriocin from the isolated strains

Sensitive indicator	Activity					
	GJ2	GJ3	GJ6	GJ7	NJ2	YY4
<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 464	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus delbruekii</i> KFRI 347	+	+	+	+	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KCTC 1628	+	+	-	-	+	+
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI 218	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KFRI 150	+	+	+	+	+	+
<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 236	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	+	+	+	+	+	+
<i>Micrococcus luters</i> ATCC 9341	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella thphimurium</i> ATCC 19430	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	+	+	+	+	+	+
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	+	+	+	+	+	+

\* For the assay of antibacterial activity, producer strain was directly applied onto sensitive strains

Table 4. Inducing effect of *Lb. plantarum* KFRI 464 on the antibacterial activity of bacteriocins from the isolated microorganisms

		GJ2	GJ3	GJ6	GJ7	NJ2	YY4
Bacteriocin alone		+	++	+	+	+++	++
<i>Lb. plantarum</i> KFRI 464	Intracellular extract	+	++	+	++	+++	++
	derbis	++++	++++	++	++++	++++	+++
Bacteriocin alone		+	++	+	+	+++	++
<i>Lb. delbruekii</i> KFRI 347	Intracellular extract	+	+++	+	+	+++	++
	derbis	+	++	+	+++	++++	+++

\**Lb. plantarum* KFRI 464 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: 1.9~2.0 cm:++++, 1.7~1.8 cm: +++, 1.4~1.6 cm: ++, 1.1~1.3 cm: +, No clear zone: -

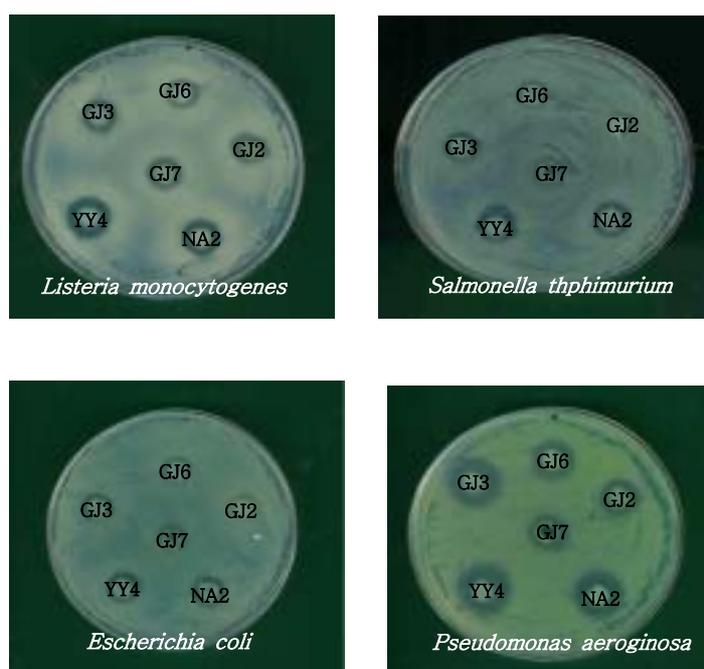


Fig. 10. Antimicrobial activity of the bacteriocin from the isolated microorganisms

#### 4) 박테리오신의 특성(Table 5 ~ Table 7)

- 분리된 6종 균주로부터의 박테리오신의 열안정성, pH 안정성, 각종 효소처리에 대한 안정성을 조사하였다.
- 6종의 박테리오신 모두 4~121℃ 범위의 열처리에 안정하였으며 GJ3, YY4 박테리오신은 121℃ 15분처리에 의하여 오히려 역가가 증가하였다(Table 5). 이는 열처리에 의한 박테리오신 단백질의 3차원적 구조의 변형에 기인하는 것으로 추정된다.

Table 5. Effect of temperature an antibacterial activity of bacteriocin from the isolated microorganisms.

Temperature(℃)	Activity					
	GJ2	GJ3	GJ6	GJ7	NJ2	YY4
4	+	++	+	+	+++	++
37	+	++	+	+	+++	++
50	+	++	+	+	+++	++
70	+	++	+	+	+++	++
100	+	++	+	+	+++	++
121	+	++ <sup>+</sup>	+	+	+++	+++

\**Lb. plantarum* KFRI 464 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: 1.9~2.0 cm:++++, 1.7~1.8 cm: +++, 1.4~1.6 cm: ++, 1.1~1.3 cm: +, No clear zone: -

- 전반적으로 pH 안정성 역시 pH 2.5~9.5 전구간에서 안정되게 나타났으나, GJ2만 pH 9.5에서는 역가가 소실되는 것으로 나타났다(Table 6).
- 6종의 박테리오신 모두 trypsin, protease, proteinase K에 역가가 소실되었고  $\alpha$ -chymotrypsin에 의해서는 GJ7과 YY4의 역가가 소실되었다. Lipase,  $\alpha$ -amylase는 YY4를 제외한 5종의 박테리오신 모두 영향을 받지 않아 6종의 박테리오신은 모두 단백질성 물질로 이루어져 있음을 알 수 있었다. 다만 YY4의 경우 처리된 모든 효소(당분해효소, 지질분해효소, 단백분해효소)에도 영향을 받는것(3회 반복실험)으로 나타나 YY4 박테리오신은 단백질로만 이루어진 물질이 아닌 당이나 지질이 구조에 관여함을 추정할 수 있다.

**Table 6. Effect of pH an antibacterial activity of bacteriocin from the isolated microorganisms.**

pH	Activity					
	GJ7	GJ2	GJ3	GJ6	NJ2	YY4
2.5	+	+	++	+	+++	++
4.5	+	+	++	+	+++	++
6.0	+	+	++	+	+++	++
7.0	+	+	++	+	+++	++
8.3	+	+	++	+	+++	++
9.5	+	-	++	+	+++	++

\**Lb. plantarum* KFRI 464 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: 1.9~2.0 cm:++++, 1.7~1.8 cm: +++, 1.4~1.6 cm: ++, 1.1~1.3 cm: +, No clear zone: -

**Table 7. Effect of various enzyme on the antibacterial activity of bacteriocin from the isolated microorganisms.**

Enzyme (4mg/ml: at 37°C, for 12hr )	Activity					
	GJ2	GJ3	GJ6	GJ7	NJ2	YY4
Control (non-enzyme treated sample)	+	++	+	+	+++	++
Trypsin	-	-	-	-	-	-
Protease	-	-	-	-	-	-
Lipase	+	++	+	+	+++	-
α-Amylase	+	++	+	+	+++	-
Proteinase K	-	-	-	-	-	-
α-Chymotrypsin	+	++	+	-	+++	-

\**Lb. plantarum* KFRI 464 was used as an indicator. Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: 1.9~2.0 cm:++++, 1.7~1.8 cm: +++, 1.4~1.6 cm: ++, 1.1~1.3 cm: +, No clear zone: -

#### 다. 분리균주의 발효특성

##### 1) 생육도 및 배양 후 배지의 pH

- 분리균을 MRS배지에서 30°C, 24시간 배양 후 배지의 pH와 생육도(A<sub>600</sub>)를 측정하였다(Table 8). 이 결과는 본 분리균을 종균으로 하여 김치 제조시 김치의 신맛을 예측할 수 있는 예비자료로 사용하기 위해서이다. 대조구로는 김치에 강한 신맛을 주는 *Lb. plantarum* KFRI 464를 삼았다. 김치에 매우

신맛을 주는 KFRI 464는 배양 후 배지 pH가 4.0으로 가장 낮은 수치를 나타내었으며, 분리균주는 pH 4.2~4.5로 나타내어 KFRI에 비해 상대적으로 높은 pH를 나타내었다. 본 결과는 본 분리균주가 김치종균으로 사용되고 이 종균이 우점종으로 김치발효계를 제어할 경우 일반 신김치보다는 덜 시어짐을 의미한다. 즉 최종 김치종균 선정시 선정요인 중 한가지 변수가 될 수 있는 결과이다.

Table 8. Cell growth( $A_{600}$ ) and pH of the medium.

	GJ2	GJ3	GJ6	GJ7	NJ2	YY4	<i>Lb. plantarum</i> KFRI 464
$A_{600}$	2.53	5.0	3.87	3.33	5.14	5.30	7.76
pH	4.59	4.3	4.52	4.53	4.27	4.22	4.01

\* The six isolated strains were cultivated in MRS media

## 2) 내염성

- 우리나라 표준김치의 염도는 2~3%이다. 그러나 남도의 김치는 환경적 영향으로 보다 더 높은 염도의 김치가 만들어지고 있다. 개발된 김치종균을 실제 김치에 적용 시 김치의 염도에 따라 종균의 작용이 달라질 수 있다. 본 연구에서는 분리균주의 내염성을 측정하여 각 분리종균의 적용이 가능한 김치 염도를 조사하는 기초 자료로 삼고자 하였다.
- 6종의 분리균주는 모두 3%까지는 잘 생육하여 모두 내염성균주이며, GJ7, NA2, GJ3, YY4는 염도(NaCl) 5~7%(w/v)까지도 높은 균 생육을 나타내어 ( $A_{600}$ : 약 3.0) 호염성균으로 보여진다(Fig. 11). 즉 분리균주 중 위 4균주는

염의 농도가 높은 김치에서도 활용 가능성을 알 수 있다.

### 3) 당 발효능

- Biolog에 의한 유산균(*Lactobacillus* sp.) 동정 kit에 해당하는 API 50CHL을 사용하여 분리된 6종의 유산균의 C-화합물 대사능을 살펴보았다(Table 9).

- 본 API kit에 의하여 김치에서 분리된 6종의 균주 동정 결과는 실험 data 처리 후 신뢰도 %값 차이가 변동이 커서 유의성이 없어 보였다. 즉 유제품기원 유산균을 위한 Biolog kit은 김치유산균에 적용함은 적절하지 못함을 시사한다.

본 연구에서 분리균주의 동정은 미생물의 일반특성과 함께 16s rDNA 염기서열로 결정하였으며, 본 Biolog data는 C-화합물 대사능을 알아보는 자료로 삼았다.

본 결과에서 흥미로운 사실은 일반적으로 유산균은 유당(lactose)을 에너지 대사원으로 삼으므로 유당대사능이 있음에 반해, 본 분리균주는 6종 모두 유당 대사능이 음성으로 나타났다. 김치에는 우유에서와 달리 유당이 존재하지 않는데 김치에서 살고 있는 유산균이 유당대사능은 불필요하게 여기고, 다른 당을 에너지원으로 택하였음은 당연한 결과라 생각된다. 또한 본 결과로부터 균주에 따라 어떠한 C-화합물을 김치제조시 균의 활성화를 위해 첨가할 수 있는지를 결정할 수 있는 기초 자료로 활용하고자 한다.

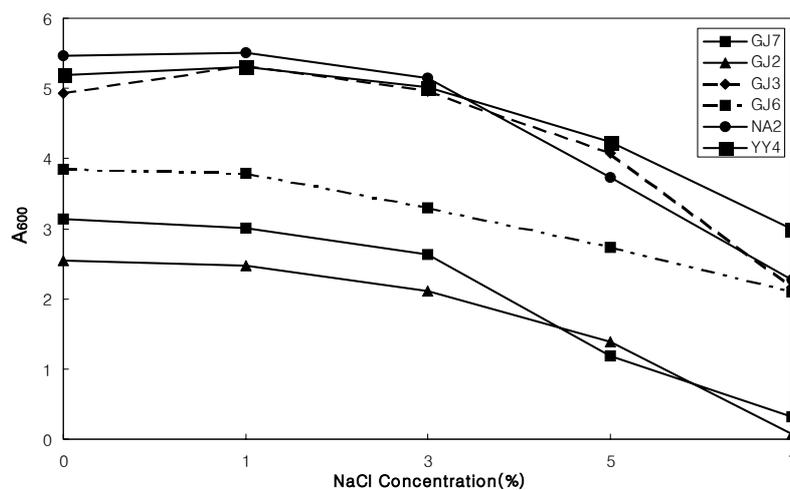


Fig. 11. Cell growth in MRS media with NaCl

Table 9. Metabolic characteristics of the isolated microorganisms.

Characteristics	GJ7	GJ2	GJ3	GJ6	NJ2	YY4
Glycerol	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	+	+
Ribose	-	+	+	?	+	+
D-Xylose	-	-	-	+	-	-
L-Xylose	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-
β-Methyl-xyloside	-	-	-	-	-	-
Galactose	-	+	+	+	+	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	?	+	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	-

Characteristics	GJ7	GJ2	GJ3	GJ6	NJ2	YY4
α-Methyl-D-Glucoside	+	+	+	-	+	+
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+
Amygdaline	+	+	+	+	+	+
Esculine	+	+	+	+	+	+
Salicine	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	-
Maltose	+	-	-	+	<b>+</b>	<b>-</b>
Lactose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	<b>-</b>	<b>+</b>	-	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	-	+	+
Inuline	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	-
Amidon	-	-	-	-	-	-
Glycodene	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-
β-Gentiobiose	+	+	+	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-

\*Bold character: 16s rDNA 서열에 따른 동정결과 database내의 동일균주와 동일한(99%) 상동성을 나타내었으나 당대사능이 서로 다른 부분 → 즉 GJ2와 GJ3, NJ2와 YY4는 strain 이 서로 다른 균주임

## 라. 우량 신균주를 이용한 김치의 최적 발효대사 제어시스템 개발

### 1) 김치발효온도별 종균김치의 발효특성(Table 10~12)

- 김치가 생김치상태에서 적숙기, 과숙기 상태로 변하는 것은 김치환경내의 미생물균총의 변화가 있기 때문이다. 즉 어느 균총이 일정기간 우점종을 유지하다가 또 다른 균총으로 우점종이 변하는 현상을, 관능적으로는 김치맛의 변화로 느낀다고 해석할 수 있다.
- 본 연구에서는 김치발효능(맛)이 우수한 김치종균의 박테리오신생산에 의하여 김치발효대사계를 제어하는 시스템을 사용하였다. 이 우량종균은 박테리오신을 생산할 뿐만 아니라 그 박테리오신 감수성균(*Lb. plantarum*)에 의하여 오히려 박테리오신 생성능이 강화된다는 강점을 지닌다. 본 연구에서의 우량종균(①맛있는 김치발효능 + ②박테리오신 생성능 + ③감수성균에 의한 박테리오신 유도현상)을 사용할 경우, 김치환경하에서 우량종균의 우점종으로서의 점유율이 확보된다. 이 점유율을 얼마동안 타균주에 빼앗기지 않으며 유지하느냐에 따라 김치맛(GJ7 발효에 의한 맛)의 유지가 결정될 것이다.
- 박테리오신 GJ7에 대하여 감수성균주인 *Lb. plantarum* KFRI 464를 사용하여 *Leu. citreum* GJ7의 박테리오신 생성능을 강화시킨 후(김치발효 환경하에서 김치발효 대사제어능이 강력하도록 제조된 *Leu. citreum* GJ7) 이를 종균으로 사용하여 김치를 제조하였다. 이 때 종균김치의 발효적온을 알아보기 위하여, 김치를 제조하여 발효시키면서 pH, 산도, 균총(총균수 및 우수김치종균)의 변화를 분석하였다.

가) 발효

- 5℃ 발효김치(Table 10)

Table 10의 결과에서와 같이 일반적으로 김치가 가장 맛있다고 알려진 산도 0.4~0.75% 범위에 발효 15일째 진입하여 약 4~5일간(발효경과일 15~20일) 그 기간을 유지하였다. 발효 20일 이후 급격히 산도가 높아져서 발효 35일경에는 매우 시다고 느껴지는 산도 0.95% 이상으로 올라갔다.

- 6.5℃ 발효김치(Table 11)

Table 11와 같이 산도 0.4~0.75% 범위는 발효 8~9일째 진입하여 약 3~4일간 그 기간을 유지하였다. 발효 35일경에 산도 0.95%경에 도달하였다.

- 10℃ 발효김치(Table 12)

Table 12의 결과 산도 0.4~0.75% 범위는 발효개시 후 6~9일경에 도달하였고, 산도 0.95%는 발효 30일경에 도달하여 5℃, 6.5℃보다 더 빨리 발효가 진행됨을 확인하였다.

나) 총균수 및 우량종균의 점유율

- 5℃ 발효 총균김치의 경우 발효개시 후 약 15일째 총균수가  $10^{10}$ CFU/mL로 최고치를 나타내었고, 6.5℃ 발효시에는 약 10일째  $10^9$ CFU/mL, 10℃ 발효의 경우에는 약 6~10일경에 총균수가  $10^9$ CFU/mL를 나타내었다.

- 김치가 익어감에 따른 김치환경내에서 종균 점유율은 GJ7 5℃ 발효시 5~19일까지 총균수의 80% 이상이였으며, 35일까지도 70% 이상을 차지하였다. 6.5℃ 발효 총균김치의 경우에는 점유율이 발효초기 4일경부터 총균수의 80% 이상 확보하면서 발효 8일경에는 100%, 35일까지도 총균수의 75% 이

상 유지하였다. 10℃에서 발효한 종균김치는 GJ7의 점유율이 발효개시 후 8~10일경에 총균수의 약85% 이상을 차지하였으며, 30일경에는 70% 정도로 감소하였다.

#### 다) 관능검사

- GJ7종균을 starter로 김치에 첨가하여 5℃, 6.5℃, 10℃에서 발효숙성시킨 결과 상쾌한 맛(톡쏘는 맛)은 6.5℃ 발효시 가장 강하게 나타났으며 발효개시 후 약 8~30일경에 나타났다. 그 다음으로는 10℃ 발효로 발효개시 후 4~20일경에 나타났으며, 5℃ 발효에서는 발효 7일경부터 톡쏘는 맛이 있긴 했으나 매우 약하였으며 그 기간은 발효개시 후 7~25일경이었다.
- 신맛의 경우 10℃에서 발효한 경우가 가장 시게 느껴졌으며 6.5℃에서 발효한 김치가 5℃에서 발효한 김치보다 오히려 신맛이 덜 하였다.
- 전체적인 기호도는 6.5℃ 발효김치가 가장 좋았으며 10℃, 5℃순으로 GJ7종균김치의 발효적온은 6.5℃로 결정되었다.

Table 10. 5℃에서 발효중 김치발효 특성 및 관능조사

경과일		0(2/12)	2(2/14)	5(2/17)	7(2/19)	8(2/20)	12(2/24)	15(2/27)	19(3/2)	20(3/3)	25(3/8)	30(3/13)	35(3/18)	
5℃ 발효	pH	6.75	6.1	5.785	5.755	5.803	5.569	4.907	4.616	4.175	4.105	4.02	3.95	
	산도	0.18	0.22	0.25	0.32	0.31	0.34	0.425	0.5	0.84	0.89	0.93	0.97	
	균 총	LB	잡균 많음	잡균 많음	6.9×10 <sup>9</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	3.4×10 <sup>9</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	4.6×10 <sup>9</sup> GJ7: 92.5% 간균: 10% 구균: 7.5%	7.8×10 <sup>9</sup> GJ7: 90% 간균: 5% 구균: 5%	1.91×10 <sup>10</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	1.56×10 <sup>9</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	6.5×10 <sup>8</sup> GJ7: 80% 간균: 10% 구균: 10%	3.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 75% 간균: 15% 구균: 10%	7.9×10 <sup>7</sup> GJ7: 73% 간균: 15% 구균: 12%	3.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균: 20% 구균: 5%
		MRS	잡균 많음	잡균 많음	7×10 <sup>8</sup> GJ7: 90% 간균: 10%	4×10 <sup>9</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	4.5×10 <sup>9</sup> GJ7: 80% 간균: 10% 구균: 10%	5.5×10 <sup>9</sup> GJ7: 85% 간균: 10% 구균: 5%	2.07×10 <sup>10</sup> GJ7: 80% 간균: 10% 구균: 10%	1.74×10 <sup>9</sup> GJ7: 83% 간균: 15% 구균: 2%	3.7×10 <sup>8</sup> GJ7: 75% 간균: 20% 구균: 5%	4.5×10 <sup>8</sup> GJ7: 75% 간균: 5% 구균: 20%	9.3×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	2.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 72% 간균: 18% 구균: 10%
		MRS-CaCO <sub>3</sub>	잡균 많음	잡균 많음	3.7×10 <sup>7</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	5.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 90% 간균: 10%	6.7×10 <sup>7</sup> GJ7: 90% 간균: 10%	6.8×10 <sup>7</sup> GJ7: 90% 간균: 10%	1.84×10 <sup>10</sup> GJ7: 85% 간균: 10% 구균: 5%	1.3×10 <sup>7</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	5.5×10 <sup>6</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	6.4×10 <sup>6</sup> GJ7: 78% 간균: 12% 구균: 10%	3.5×10 <sup>6</sup> GJ7: 75% 간균: 15% 구균: 10%	1.2×10 <sup>6</sup> GJ7: 70% 간균: 10% 구균: 20%
관능	생 김 치 맛 (배추의 단맛)	아직 안익음	안익은 맛	톡쏘는 맛이 나기 시작하지만 안익은 맛	톡쏘는 맛이 약하게 나지만 안익은 맛	아직 안 익었으나 약간 의 톡쏘는 맛	톡쏘는 맛이 약간 나며 단맛이 남	톡쏘는 맛이 약간 나며 신맛있음	톡쏘는 맛이 약간 나며 신맛이 강해짐	톡쏘는 맛이 약하며 신맛 강함	신맛강하며 톡쏘는 맛 거의 없음	신맛 매우 강함		

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

Table 11. 6.5℃에서 발효중 김치발효 특성 및 관능조사

경과일		0(1/15)	5(1/20)	8(1/23)	10(1/25)	11(1/26)	12(1/27)	14(1/29)	18(2/2)	20(2/4)	25(2/9)	30(2/14)	35(2/19)
6.5℃ 발효	pH	5.75	5.183	5.12	4.43	4.30	4.318	4.34	4.249	4.234	4.178	4.15	4.01
	산도	0.21	0.34	0.366	0.61	0.73	0.84	0.836	0.84	0.85	0.857	0.88	0.90
	균총	LB	잡균 많음 3.20×10 <sup>8</sup> GJ7: 100%	9.8×10 <sup>7</sup> GJ7: 100%	4.0×10 <sup>9</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	6.2×10 <sup>9</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	9×10 <sup>8</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	1.4×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	4.5×10 <sup>8</sup> GJ7: 87% 간균: 13%	6.0×10 <sup>8</sup> GJ7: 86% 간균: 14%	3.4×10 <sup>8</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	8.7×10 <sup>7</sup> GJ7: 78% 간균: 12% 구균: 10%	4.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균: 15% 구균: 10%
		MRS	잡균 많음 3.7×10 <sup>8</sup> GJ7: 100%	9.9×10 <sup>7</sup> GJ7: 100%	2.7×10 <sup>9</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	4.7×10 <sup>8</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	7×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	5.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	3×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	1.42×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	7.8×10 <sup>7</sup> GJ7: 80% 간균: 10% 구균: 10%	6.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	3.9×10 <sup>7</sup> GJ7: 73% 간균: 27%
		MRS-CaCO3	잡균 많음 7.2×10 <sup>6</sup> GJ7: 87.5% 단간균: 12.5%	8.0×10 <sup>7</sup> GJ7: 100%	2.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	5.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	5.3×10 <sup>7</sup> GJ7: 82% 간균: 18%	8×10 <sup>7</sup> GJ7: 66.6% 간균: 33.3%	5.3×10 <sup>7</sup> GJ7: 82% 간균: 18%	3×10 <sup>7</sup> GJ7: 87% 간균: 13%	4.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 78% 간균: 22%	1.1×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	6×10 <sup>6</sup> GJ7: 75% 간균: 25%
관능	생 김 치 맛 (배추 의 단맛)	약간 안 익 은 맛	톡쏘는 맛이 나며 GJ7만 의 단맛이 남	톡쏘는 맛이 강하게 나며 GJ7만의 특유 단맛으로 맛이 부드러움	톡쏘는 맛이 강하며 단맛 이 남	톡쏘는 맛이 강하게 나며 GJ7만의 특유 단맛으로 맛이 부드러 고 신맛이 남	특유의 시원 함이 있고 특유 단맛으 로 인한 부 드러움	톡쏘는 맛과 함께 신맛이 나나 부드러 다	톡쏘는 맛이 있으며 부드 러운 신맛	신맛이 강하 지만 부드러 게 느껴지고 시원한맛	톡쏘는 맛은 약하나 단맛 이 있고 신 맛은 강함	신맛 강해짐	

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

Table 12. 10℃에서 발효중 김치발효 특성 및 관능적 조사

경과일		0(1/6)	4(1/10)	6(1/10)	8(1/14)	10(1/16)	15(1/21)	20(1/26)	25(1/31)	30(2/5)	
10℃ 발효	pH	5.765	5.411	4.604	4.37	4.172	4.179	4.101	4.079	4.039	
	산도	0.22	0.28	0.47	0.74	0.85	0.84	0.9	0.92	0.95	
	균총	LB	잡균많음 4.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 50% 간균: 40% 구균: 10%	4.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 50% 간균: 40% 구균: 10%	5.0×10 <sup>9</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	3.4×10 <sup>9</sup> GJ7: 100%	1.8×10 <sup>9</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	9.5×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	5.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	3.4×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균: 10% 구균: 5%	1.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 74% 간균: 26%
		MRS	잡균많음 6.6×10 <sup>8</sup> GJ7: 84.85% 간균: 15.15%	4.7×10 <sup>9</sup> GJ7: 85% 간균: 25%	2.7×10 <sup>9</sup> GJ7: 88.8% 간균: 11.1%	1.55×10 <sup>9</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	7.6×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	4.7×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균: 15% 구균: 10%	3.1×10 <sup>7</sup> GJ7: 73% 간균: 12% 구균: 15%	2.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 70% 간균: 30%	
		MRS-CaCO <sub>3</sub>	잡균많음 5.5×10 <sup>5</sup> GJ7: 50% 간균: 16.6% 구균: 16.6%	1.3×10 <sup>9</sup> GJ7: 92.30% 단간균: 7.69%	1×10 <sup>9</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	5.5×10 <sup>8</sup> GJ7: 100%	4×10 <sup>8</sup> GJ7: 83.4% 간균: 16.6%	6.3×10 <sup>7</sup> GJ7: 82% 간균: 18%	5.8×10 <sup>7</sup> GJ7: 70% 간균: 20% 구균: 10%	4.1×10 <sup>7</sup> GJ7: 72% 간균: 28%	
	관능	단맛(배추단맛으로느껴짐)이 나며 양념취가 많이 남, 짠맛 없음	안익은 맛, 단맛(배추)이 나며 약간 톡쏘는 맛 있음	단맛(배추)이 나며 익은 맛, 톡쏘는 맛과 시원한 맛이 남	신맛이 많이 나며 톡쏘는 맛과 단맛이 많이 남	신맛이 많이 나며 톡쏘는 맛과 단맛이 많이 남	신맛이 많이 나지만 단맛으로 부드럽어움	신맛이 강하지만 부드럽게 느껴지고 쏘는 맛 약간 있음	쏘는 맛 약하며 신맛 강함	신맛강함	

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

#### 마. 미생물대사제어시스템에 의한 첨단김치의 장기저장(Table 13, 14)

- 김치의 주 원료인 배추는 여름배추가 동절기 배추보다 당도가 낮으며 수분 함량도 많아 배추자체의 맛도 떨어지며 배추조직의 물러짐이 쉬워진다. 또한 여름에 김치 담금 시 온도의 상승으로 인한 배추 자체의 초기 잡균수가 상승하게 되어 인위적인 김치 발효조절이 동절기의 김장김치보다 훨씬 어려워진다. 본 연구에서는 당도가 높고 배추조직이 아삭하며 속이 딱 찬 동절기 배추일 때 미생물대사제어시스템에 의한 종균김치를 제조하여, 최상의 김치 맛을 얼마동안 유지할 수 있는지 조사하였다.
- 본 연구의 핵심기술인 미생물대사제어기술(감수성균에 의하여 박테리오신 생성능이 강화된 우량균주에 의한 발효대사계조절 기술)에 의하여 종균김치가 앞 실험의 결과 최적 김치 발효조건에서(5℃~10℃ 발효 → 산도 0.5~0.65% 발효종료 → 0~-2℃ 저장) 얼마동안(장기저장)이나 너무 시어짐이 없이 그 맛을 유지할 수 있는지를 조사하였다. 조사방법은 저장일수에 따른 미생물군총의 변화와 pH, 산도, 관능검사를 통하여 수행하였다. 이 때 모든 김치제조공정이 동일하고 종균만을 첨가하지 않은 김치를 대조구로 삼아 저장일수에 따른 실험을 동시에 수행하였다.

##### 1) 산도

- 발효 후 산도 0.47%일 때 발효를 종료하고 0~-2℃에서 저장한 종균김치의 경우 발효개시 후 30일경 0.84%로 산도가 급격히 증가했으나 30일 이후 128일까지는 완만하게 증가하여 산도 0.96%를 나타내었다.
- 산도 0.59%에서 0~-2℃에서 저장한 종균김치는 발효개시 후 30일경 산도가

0.72%로 0.47%일 때 저장한 종균김치보다 낮았으며 그 이후 매우 완만하게 증가하여 128일째에도 발효개시 후 86일 지난 산도 0.47%일 때 저장 종균김치와 같은 산도 0.91%를 나타내었다.

- 0.71%일 때 저장한 종균김치도 저장 후 128일경까지 산도가 완만하게 증가하여 128일경에는 산도가 0.94%로, 0.47%에 저장한 구의 128일째 산도 0.96%보다 낮았다.
- 종균비첨가구의 경우 산도 0.61%일 때 저장 이후 급격히 산도가 증가하였으며 발효개시 후 100일에는 1.0%, 128일째에는 1.25%까지 증가하였다.

## 2) 총균수 및 우량김치종균점유율

- 산도 0.47%, 0.59%, 0.74%일 때 각각 저장한 종균김치의 총균수 및 우량김치종균점유율은 비슷한 양상을 나타내었으며 발효개시 후 86일 이후부터는 총균수가 크게 줄어들었다. 총균수내 우량김치종균점유율은 산도 0.47%, 0.59%, 0.71%일 때 저장한 종균김치 모두 발효개시 후 58일까지 80%이상 유지하였으며, 114일 이후에도 70%정도 유지하였다.
- 종균비첨가구의 균총분포는 간균, 구균, 단간균의 유산균이 관찰되었고, 발효 70여일 이후부터는 효모도 관찰되었다.

## 3) 관능검사

- 특쓰는 맛은 산도 0.59%일 때 저장한 종균김치가 가장 강했으며 >산도 0.71% 저장종균김치 > 산도 0.47% 저장종균김치 > 종균비첨가구 순이었다.

- 단맛의 경우 종균을 첨가한 구는 산도별로 저장에 따른 차이 없이 모두 GJ7 종균김치 특유의 부드러운 단맛을 나타내었으나, 종균비첨가구에는 특유단맛이 나지 않았다.
- 신맛의 경우 종균비첨가구가 가장 시었으며 > 다음으로 종균김치는 산도 0.49% > 0.71% > 0.59% 때 저장한 종균김치순이었다.
- 전체적 기호도는 산도 0.59%일 때 저장한 종균김치가 가장 좋았으며 > 다음으로는 산도 0.71% > 0.47%일 때 저장한 종균김치 > 종균비첨가구 순이었다.

Table 13. 발효 후 각 산도별 장기저장에 따른 김치발효 특성 및 관능적 조사

경과일		0(3/10)	5(3/15)	6(3/16)	7(3/10)	9(3/15)	
발효	pH	6.75	5.807	5.638	5.505	5.415	
	산도(%)	0.18	0.29	0.35	0.35	0.37	
	균총	LB	잡균많음	$4.2 \times 10^8$ GJ7: 82% 간균: 18%	$4.2 \times 10^9$ GJ7: 92% 간균: 5% 구균: 3%	$8.5 \times 10^8$ GJ7: 92% 간균: 8%	$4.2 \times 10^9$ GJ7: 94% 간균: 6%
		MRS	잡균많음	$3.9 \times 10^8$ GJ7: 85% 간균: 15%	$5.2 \times 10^9$ GJ7: 87% 간균: 13%	$7.3 \times 10^8$ GJ7: 94% 간균: 6%	$6.2 \times 10^9$ GJ7: 92% 간균: 8%
		MRS-CaCO3	잡균많음	$4.7 \times 10^6$ GJ7: 84% 간균: 16%	$5.87 \times 10^6$ GJ7: 85% 간균: 15%	$2.1 \times 10^6$ GJ7: 80.9% 간균: 14.3% 간균: 4.76%	$3.2 \times 10^7$ GJ7: 87% 간균: 13%
	관능	단맛(배추단맛으로 느껴짐)이 나며 양념취가 많이 남	발효취가 약간 나지만 덜 익은 맛이 나며 특소는 맛도 약간 있음	덜 익은 맛	덜 익은 맛	조금 익은 듯한 맛	

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

※ 산도 0.47%일 때 발효종료

경과일		저장: 0~-2℃(산도 0.47%일 때)										
		10(3/20)	16(3/26)	30(4/9)	44(4/23)	58(5/7)	72(5/21)	86(6/4)	100(6/18)	114(7/2)	128(7/16)	
0~-2℃	pH	5.008	4.705	4.401	4.349	4.370	4.253	4.097	4.053	4.032	4.012	
	산도(%)	0.47	0.64	0.84	0.75	0.87	0.9	0.91	0.92	0.94	0.96	
	균총	LB	4.7×10 <sup>8</sup> GJ7: 92% 간균: 8%	3.5×10 <sup>8</sup> GJ7: 90% 간균: 10%	5.1×10 <sup>7</sup> GJ7: 92.2% 간균: 7.8%	5.4×10 <sup>7</sup> GJ7: 82% 간균: 18%	4.8×10 <sup>7</sup> GJ7: 80% 간균: 15% 장간균: 5%	7×10 <sup>7</sup> GJ7: 78% 간균: 12% 구균: 10%	2.3×10 <sup>7</sup> GJ7: 74% 간균: 20% 구균: 6%	1.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균:18% 구균:7%	3.5×10 <sup>6</sup> GJ7: 69% 간균: 15% 구균: 15%	3.4×10 <sup>5</sup> GJ7: 67% 간균: 20% 구균: 13%
		MRS	3.8×10 <sup>8</sup> GJ7: 93% 간균: 7%	3.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	5.4×10 <sup>7</sup> GJ7: 94.4% 간균: 5.5%	4.9×10 <sup>7</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	3.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 82% 간균: 10% 구균: 8%	6.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	3.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 76% 간균: 24%	8.4×10 <sup>6</sup> GJ7: 72% 간균: 25% 구균: 3%	4.3×10 <sup>6</sup> GJ7: 67% 간균: 13% 구균: 20%	2.1×10 <sup>5</sup> GJ7: 62% 간균: 15% 구균: 23%
		MRS-CaCO <sub>3</sub>	2.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 89% 간균: 11%	1.1×10 <sup>7</sup> GJ7: 70% 간균: 20% 구균: 10%	6×10 <sup>7</sup> GJ7: 83.3% 간균: 16.6%	9.8 ×10 <sup>6</sup> GJ7: 81.9% 간균: 18.1%	5 ×10 <sup>6</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	4×10 <sup>6</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	6.7×10 <sup>5</sup> GJ7: 73% 간균: 15% 구균: 12%	2.1×10 <sup>5</sup> GJ7: 69% 간균: 31%	1.7×10 <sup>5</sup> GJ7: 65% 간균: 20% 구균: 10% 효모: 5%	6.7×10 <sup>5</sup> GJ7: 65% 간균: 25% 구균: 10%
관능	특소는 맛이 약간 나머 익은 발효취 남	특소는 맛이 마며 신맛이 많이 나지 않음	특소는 맛과 시원한맛	특소는 맛이 약하지만 시원하고 신맛이 강해짐	신맛이 강하며 특소는 맛 약	특소는 맛 약하며 신맛 강함	약하게 청량감 남아있으며 시원	신맛 강함	신맛 강함	신맛 강함		

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

※ 산도 0.59%일 때 발효종료

경과일		저장: 0~-2℃(산도 0.59%일 때)										
		11(3/21)	17(3/27)	31(4/10)	45(4/24)	59(5/8)	72(5/21)	86(6/4)	100(6/18)	114(7/2)	128(7/16)	
0~-2℃	pH	4.718	4.403	4.439	4.362	4.366	4.254	4.132	4.075	4.070	4.063	
	산도(%)	0.59	0.72	0.72	0.8	0.8	0.84	0.86	0.87	0.9	0.91	
	균총	LB	3.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 87% 간균: 13%	4.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	3.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 87.5% 간균: 12.5%	7×10 <sup>7</sup> GJ7: 87% 간균: 3% 구균: 10%	4.3×10 <sup>7</sup> GJ7: 83% 간균: 17%	3.2×10 <sup>7</sup> GJ7: 78% 간균: 12% 구균: 10%	1.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 76% 간균: 20% 구균: 4%	8.7×10 <sup>6</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	5.2×10 <sup>6</sup> GJ7: 70% 간균: 15% 구균: 15%	7.7×10 <sup>5</sup> GJ7: 68% 간균: 15% 구균: 17%
		MRS	2.9×10 <sup>8</sup> GJ7: 85% 구균: 12% 간균: 3%	3.8×10 <sup>8</sup> GJ7: 90% 간균: 10%	4.5×10 <sup>8</sup> GJ7: 86% 간균: 7% 구균: 6.6	8.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	3.9×10 <sup>7</sup> GJ7: 84% 간균: 10% 구균: 6%	4.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 76% 간균: 14% 구균: 10%	9.8×10 <sup>6</sup> GJ7: 72% 간균: 28%	7.5×10 <sup>6</sup> GJ7: 70% 간균: 30%	2.2×10 <sup>6</sup> GJ7: 68% 간균: 22% 구균: 10%	1.9×10 <sup>5</sup> GJ7: 67% 간균: 23% 구균: 10%
		MRS-CaCO <sub>3</sub>	1.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 87% 간균: 13%	2.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	1.9×10 <sup>7</sup> GJ7: 84.2% 간균: 15.8%	7 ×10 <sup>6</sup> GJ7: 83% 간균: 17%	3.3×10 <sup>6</sup> GJ7: 78% 간균: 12% 구균: 10%	6.1×10 <sup>5</sup> GJ7: 78% 간균: 22%	3.2×10 <sup>5</sup> GJ7: 75% 간균: 15% 구균: 10%	1.7×10 <sup>5</sup> GJ7: 74% 간균: 20% 구균: 6%	1.4×10 <sup>5</sup> GJ7: 70% 간균: 20% 구균: 10%	9.5×10 <sup>4</sup> GJ7: 70% 간균: 25% 구균: 5%
관능	특소는 맛이 좀 더 강해졌으며 특유단맛	특소는 맛이 강하게 나며 특유단맛	특소는 맛이 강하며 시원한 맛	특소는 맛이 강하지만 신맛이 강해짐	신맛이 강하며 C보다 특소는 맛 강함	특소는 맛과 단맛 있음, 신맛이 부드럽고 시원	특소는 맛 있으며 발효취 있음	특소는 맛 있지만 발효취, 단맛	약하게 청량감이 있으며 깊은 단맛, 부드러운 신맛	신맛이 부드럽게 나며 깊은 발효취, 기호도 좋음		

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

※ 산도 0.71%일 때 발효종료

경과일		저장: 0~-2℃(산도 0.71%일 때)										
		12(3/22)	18(3/28)	32(4/11)	46(4/25)	60(5/8)	72(5/21)	86(6/4)	100(6/18)	114(7/2)	128(7/16)	
0~-2℃	pH	4.554	4.432	4.481	4.359	4.409	4.35	4.21	4.109	4.092	4.054	
	산도(%)	0.71	0.75	0.77	0.81	1.0	0.88	0.88	0.9	0.91	0.94	
	균총	LB	5.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 85% 간균: 15%	3.9×10 <sup>8</sup> GJ7: 84.6% 간균: 15.4%	6.4×10 <sup>8</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	7.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	9.9×10 <sup>6</sup> GJ7: 81% 간균: 19%	6.5×10 <sup>6</sup> GJ7: 75% 간균: 15% 구균: 10%	2.3×10 <sup>6</sup> GJ7: 73% 간균: 27%	7.4×10 <sup>5</sup> GJ7: 71% 간균: 29%	2.7×10 <sup>6</sup> GJ7: 63% 간균: 16% 구균: 21%	6.1×10 <sup>5</sup> GJ7: 62% 간균: 20% 구균: 18%
		MRS	3.7×10 <sup>8</sup> GJ7: 90% 간균: 10%	4.2×10 <sup>8</sup> GJ7: 89% 간균: 11%	1.27×10 <sup>8</sup> GJ7: 80% 간균: 20%	8.9×10 <sup>7</sup> GJ7: 82% 간균: 18%	3.4×10 <sup>7</sup> GJ7: 78% 간균: 12% 구균: 10%	7.2×10 <sup>6</sup> GJ7: 78% 간균: 12% 구균: 10%	1.5×10 <sup>6</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	4.7×10 <sup>5</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	5.1×10 <sup>6</sup> GJ7: 65% 간균: 20% 구균: 15%	3.4×10 <sup>5</sup> GJ7: 68% 간균: 22% 구균: 10%
		MRS-CaCO <sub>3</sub>	2.5×10 <sup>7</sup> GJ7: 85% 간균: 53%	1.6×10 <sup>8</sup> GJ7: 78% 간균: 22%	4.1×10 <sup>7</sup> GJ7: 80% 간균:10% 간균:10%	3.5×10 <sup>6</sup> GJ7: 82.5% 간균: 17.5%	2.1×10 <sup>6</sup> GJ7: 81% 구균: 19%	8.2×10 <sup>5</sup> GJ7: 73% 간균: 27%	3.1×10 <sup>5</sup> GJ7: 74% 간균: 18% 구균: 8%	3.5×10 <sup>4</sup> GJ7: 75% 간균: 25%	2.8×10 <sup>4</sup> GJ7: 67% 간균: 13% 구균: 20%	3.5×10 <sup>4</sup> GJ7: 65% 간균: 20% 구균: 15%
관능	특소는 맛이 나며 특유단맛 남	특소는 맛이 강하게 나며 특유 단맛	신맛이 강하게 나며 특소는 맛 약함	특소는 맛이 약하며 신맛 강해짐	신맛이 강하지만 특소는 맛 약하게 남아있음	신맛 강하지만 특소는 맛 있음	신맛 강하지만 깊은 발효취	신맛 강하지만 부드럽게 느껴짐	신맛 강함	신맛 강함		

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

Table 14. 종균 비침가구의 발효 후 각 산도별 장기저장에 따른 김치발효 특성 및 관능적 조사

경과일		저장: 0~-2℃(산도 0.61%일 때)									
		11(3/21)	17(3/27)	31(4/10)	59(5/8)	72(5/21)	86(6/4)	100(6/18)	114(7/2)	128(7/16)	
0~-2℃	pH	4.514	4.657	4.3	4.30	4.216	4.101	4.026	4.016	3.96	
	산도(%)	0.61	0.71	0.77	0.89	0.91	0.95	1.01	1.15	1.25	
	균총	LB	4.7×10 <sup>8</sup> 간균: 64% 구균: 26% 단간균: 10%	5.2×10 <sup>8</sup> 구균: 70% 구균: 10% 장간균: 20%	2.2×10 <sup>8</sup> 간균: 54.5% 구균: 22.7% 간균: 22.7%	4.4×10 <sup>7</sup> 간균: 81% 구균: 12% 단간균: 7%	3.5×10 <sup>7</sup> 간균: 75% 구균: 15% 장간균: 5%	5.4×10 <sup>6</sup> 간균: 65% 구균: 10% 장간균:25%	3.5×10 <sup>5</sup> 간균: 65% 구균: 10% 단간균:25%	1.2×10 <sup>5</sup> 간균: 60% 구균: 20% 장간균:20%	1×10 <sup>5</sup> 간균: 58% 구균: 22% 장간균:20%
		MRS	3.31×10 <sup>8</sup> 간균: 72% 구균: 23% 장간균: 5%	1.5×10 <sup>8</sup> 간균: 60% 구균: 40%	4.2×10 <sup>8</sup> 간균: 60% 구균: 40%	1.5×10 <sup>7</sup> 간균: 75% 효모: 3% 구균: 22%	1.2×10 <sup>7</sup> 간균: 700% 구균: 10% 장간균 10%	2.3×10 <sup>6</sup> 간균: 80% 구균: 10% 효모: 10%	1.7×10 <sup>5</sup> 간균: 78% 구균: 12% 효모: 10%	1.4×10 <sup>5</sup> 간균: 60% 구균: 10% 장간균 10% 효모: 10%	7.5×10 <sup>4</sup> 간균: 65% 구균: 15% 장간균:15% 효모: 5%
		MRS-CaC O3	7×10 <sup>7</sup> 간균: 85.7% 구균: 14.2%	1.4×10 <sup>7</sup> 간균: 75% 구균: 15% 간균: 10%	5×10 <sup>6</sup> 간균: 70% 구균: 10% 간균: 20%	5.4×10 <sup>5</sup> 간균: 60% 구균: 31% 효모: 9%	4.7×10 <sup>5</sup> 간균: 70% 구균: 20% 효모 10%	3.5×10 <sup>4</sup> 간균: 60% 구균: 30% 효모: 10%	1.9×10 <sup>4</sup> 간균: 65% 구균: 15% 효모: 20%	2×10 <sup>4</sup> 간균: 50% 구균: 30% 효모 20%	2.5×10 <sup>4</sup> 간균: 50% 구균: 20% 장간균:10% 효모: 20%
	관능	톡쏘는 맛이 약간 나며 GJ7보다 시게 느껴진다	톡쏘는 맛이 나나 GJ7보다 약하고 맛있다	톡쏘는 맛이 나나 GJ7보다 약하고 맛있다	GJ7보다 더 시며 톡쏘는 맛 거의 없음	종균김치보다 신맛이 강하며 소는 맛 약함	톡쏘는 맛 없으며 매우 시며 맛도 맛있다	톡쏘는 맛 없으며 매우 시며 맛도 맛있다	신맛 매우 강함	신맛 매우 강함	

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

## 바. 종균 GJ3에 의한 첨단김치 개발

- 종균에 따른 김치맛의 다양화가 가능한지 알아보고자 하였다. 우량김치종균의 요건을 지님으로서 본 연구에서 우량종균으로 선발된 *Leu. kimchii* GJ3를 사용하여 *Leu. citreum* GJ7과 동일한 김치양념배합비로 GJ3종균김치를 제조하였다. GJ3종균김치는 최적발효온도에서 일정기간 발효 후 최적 저장시작산도인 0.5% 부근에서 발효를 멈추고 0~-2℃에서 후숙성(저장)하면서 pH, 산도 및 균수(총균수, 우량김치종균점유율)의 변화를 조사하였다(Table 15).

### 1) 산도

- 발효 후 산도 0.5%일 때 저장한 GJ3종균김치의 산도는 완만한 증가를 보였으며 발효개시 후 35일까지도 맛있는 산도 구간인 0.4~0.75%를 유지하였다.

### 2) 총균수 및 우량김치종균점유율

- 산도 0.5% 저장시 GJ3종균김치내 총균수는 발효개시 11일경에  $10^9$ CFU/mL로 최고치를 나타냈으며 총균수 내 점유율은 85% 이상 차지하였고 35일까지 80% 이상을 나타내었다.

### 3) 관능검사

- *Leu. citreum* GJ7종균김치는 특유의 부드러운 단맛과 함께 톡쏘는 맛이 강하였다. 이러한 현상은 수십 번 반복 시에도 GJ7이 김치환경 미생물 중 70~80% 이상 차지하는 우점종일 때는 재현되어 종균에 의한 발효에 다른 김치맛 구현이 가능함을 보여주었다.

- GJ3종균김치는 GJ7종균김치와 달리 특소는 맛이 덜하였지만 맛이 깔끔하고 시원하며 뒷끝맛이 개운하여 마치 잘 익은 물김치와 같은 맛을 나타내어 일반김치보다는 고기(불고기 등)구이 등에 곁들이는 김치에 활용하면 적합하게 사료되었다.

- 본 연구를 통하여 기존의 김치맛의 다양화가 배추, 무우, 열무 등의 원재료나 부재료(양념)에 의해 이루어졌지만, 서양의 발효유제품이나 포도주처럼 종균의 발효능 차이로 제품의 맛과 풍미를 결정할 있음을 시사하였다. 또한 종균김치의 경우 김치종균의 발효작용에 따라 특정한 맛이 재현되므로 맛과 품질의 균일화 및 규격화가 가능함을 제시하는 결과이다.

Table 15. 발효 후 저장한 GJ3종균김치의 발효특성

경과일		0(5/3)	11(5/14) → 저장	21(5/24)	35(6/8)	
발효 ↓ 저장 0~-2℃	pH	5.9	4.602	4.395	4.319	
	산도(%)	0.2	0.5	0.62	0.71	
	균 총	LB	잡균많음	4.1×10 <sup>9</sup> GJ3: 87% 구균: 13%	5.4×10 <sup>9</sup> GJ3: 85% 구균: 15%	4.0×10 <sup>8</sup> GJ3: 80% 구균: 20%
		MRS	잡균많음	2.8×10 <sup>9</sup> GJ3: 90% 구균: 10%	6.2×10 <sup>9</sup> GJ3: 89% 구균: 11%	3.5×10 <sup>8</sup> GJ3: 85% 구균: 15%
		MRS-CaCO <sub>3</sub>	잡균많음	1.1×10 <sup>9</sup> GJ3: 85% 구균: 15%	9.8×10 <sup>8</sup> GJ3: 90% 구균: 10%	6.3×10 <sup>7</sup> GJ3: 84% 구균: 16%
	관능	안 익은 맛	특소는 맛이 약간 있으며 맛이 개운하고 시원	맛이 개운하고 고기쌈 샐러드용처럼 깔끔	특소는 맛은 GJ7종균김치보다 덜 하지만 맛이 깔끔하고 시원하며 신맛이 덜함	

▶ 균총표시: \* 검은글씨: 유산균, \*\* 파랑글씨: 비유산균

## 사. GJ7종균김치의 관능조사

- 우수김치종균 GJ7을 starter로 사용하여 제조한 종균김치와 김치종균을 첨가하지 않은 대조구, 현재 시판되고 있는 (주)○○○스펙으로 제조한 김치 등 이상3종의 김치로 관능검사를 시행하였다. 모든 김치는 제조 후 최적발효온도에서 최적 산도 0.5~0.65%일 때 발효를 멈춘 후 일주일정도 후숙성(0~-2℃)시킨 후, 관능조사를 위하여 (주)○○○에서 미리 선정하여 훈련시킨 주부관능전문요원 9명과 (주)○○○내 연구원 11명이 참여하여 3차례에 걸쳐 실시하였다. 관능검사 시 시험구는 무작위 번호를 부여하여 Blind test를 하였다. (주)○○○ 연구원인 경우 모두 자사의 김치를 Blind test에서도 알고 있어(양념의 차이), 관능평가 결과를 9인의 주부 모니터링요원((주)○○○에서 관능평가를 전문적으로 훈련시킨 관능요원)과 (주)○○○ 연구원을 ①분리한 경우와 ②통합하여 처리한 경우로 나타내었다.
- 1차 관능평가에 의한 전체적인 기호도는 ① 8인의 주부요원 대상: GJ7종균김치 > (주)○○○스펙으로 담은 김치 > 종균비첨가구 순이었으며, ② 8인 주부요원 + 10인 (주)○○○ 연구원 대상: GJ7종균김치 = (주)○○○스펙으로 담은 김치 > 종균비첨가구 순이었다
- 2차 관능평가에 의한 전체적인 기호도는 ① 9인의 주부요원 대상: GJ7종균김치 > (주)○○○스펙으로 담은 김치 > 종균비첨가구 순이었으며, ② 9인 주부요원 + 11인 (주)○○○ 연구원 대상: (주)○○○스펙으로 담은 김치 > GJ7종균김치 > 종균비첨가구 순이었다
- 3차 관능평가에 의한 전체적인 기호도는 ① 9인의 주부요원 대상: GJ7종균김

치>(주)○○○스팩으로 담은 김치>종균비침가구 순이었으며, ② 9인 주부  
 요원 + 11인 (주)○○○ 연구원 대상: GJ7종균김치>(주)○○○스팩으로 담  
 은 김치>종균비침가구 순이었다.

1) 1차 관능조사

가) 주부모니터링 8명과 (주)○○○내 연구원 10명에 의한 항목별 관능검사

	색	푹맛	신맛	짠맛	단맛	젓갈맛	상쾌 한맛	군내	감칠맛	조식감
GJ7종균김치(283)	6.222	4.667	5.333	5.556	5.333	5.444	5.667	5.444	5.222	5.778
(주)○○○스팩김치(471)	5	5.556	4.444	5.222	5.222	4.556	5.333	3.778	5.444	5.222
종균비침가구(609)	3.889	4.778	4.889	5	5.222	5.222	5.222	4.333	4.222	4.222
z-value	2.345	-1.42	1.253	0.671	0.256	1.668	0.577	2.9	-0.371	1.0783

나) 주부모니터링 요원 8명과 (주)○○○내 연구원 10명에 의한 기호도 평가

	GJ7종균김치(283)	(주)○○○스팩김치(471)	종균비침가구(609)
표준편차	1.4775	2.045	1.437
합계	86	86	68
평균	5.0588	5.059	4
95% 신뢰수준내에서의 유의성 검증			
z-value	283과 471	0 : 유의차 없음	
	283과 609	2.179: 유의차 있음	
	471과 609	1.797: 유의차 없음	
<p>전반적인 기호도에서 GJ7종균김치와 (주)○○○스팩김치는 9점배법에서 1점 이상 종균비침가구김치에 비하여 우수하게 평가되었으며, GJ7종균김치와 (주)○○○스팩김치는 95% 신뢰수준에서 유의성 있게 차이점을 발견할 수 없었으나, 종균비침가구는 GJ7종균김치에 대하여 95% 신뢰수준에서 유의성 있게 다르게 분석되었다.</p>			

## 2) 2차 관능평가

가) 주부모니터링 8명과 (주)○○○내 연구원 10명에 의한 항목별 관능검사

	색	꽃맛	신맛	짠맛	단맛	젓갈맛	상쾌한맛	군내	감칠맛	조직감
GJ7종균김치(967)	5.85	4.55	5.1	5.05	4.95	5	5.4	5.15	4.8	5.65
(주)○○○스팩김치(576)	5.45	5.7	5.3	5.3	5.45	5.35	5.65	4.65	5.7	5.65
종균비침가구(115)	4.1	4.65	4.45	4.7	4.85	4.7	4.55	4.3	4.5	4.95
z-value	1.11	-2.8	-0.5	-0.6	-1.3	-0.89	-0.655	1.1	-2.28	0

나) 주부모니터링 요원 8명과 (주)○○○내 연구원 10명에 의한 기호도 평가

	GJ7종균김치(967)	(주)○○○스팩김치(576)	종균비침가구(115)
표준편차	1.22	1.53	
합	103	108	80.8
평균	5.14	5.39	4.04

Ho: GJ7종균김치=(주)○○○스팩김치, Ha: GJ7종균김치>(주)○○○스팩김치  
 $z = 2.546$ ,  $\alpha = 0.05$ 에서의 기각역: 1.645(단측검정)  
 $z$ 값은 기각역에 포함됨. 그러므로 Ho 기각못함, 즉 GJ7종균김치와 (주)○○○스팩김치는 유의적 차이가 없다.  $z = -0.6$

다) 주부모니터링 요원 8명에 의한 기호도 평가

	GJ7종균김치(967)	(주)○○○스팩김치(576)	종균비침가구(115)
표준편차	1.199	1.565	0.962
합	51.7	41.8	37.9
평균	5.744	4.644	4.211

Ho: GJ7종균김치=(주)○○○스팩김치, Ha: GJ7종균김치>(주)○○○스팩김치  
 $z = 2.546$ ,  $\alpha = 0.05$ 에서의 기각역: 1.645(단측검정)  
 $z$ 값은 기각역에 포함됨. 그러므로 Ho 기각, 즉 GJ7종균김치는 (주)○○○스팩김치보다 높은 기호도를 보인다.

### 3) 3차 관능평가

가) 주부모니터링 8명과 (주)○○○내 연구원 10명에 의한 항목별 관능검사

	색	꽃맛	신맛	짠맛	단맛	젓갈맛	상쾌한맛	군내	감칠맛	조식감
GJ7종균김치(386)	5.6842	4.6842	5.789	5.947	5.579	5.6842	5.556	5.6111	5	5.5789
(주)○○○스팩김치(571)	5.7895	5.3158	4.737	4.947	5.263	5.2105	5.211	4.6315	5.2631	5.5263
종균비침가구(699)	3.9474	4.9444	5.316	5.526	5.368	5.1052	5.263	5.368	5.1578	5.1578
z-value	-0.416	-2.223	4.4	5.081	1.302	1.5576	1.157	2.6602	-0.725	0.2060

나) 주부모니터링 요원 8명과 (주)○○○내 연구원 10명에 의한 기호도 평가

	GJ7종균김치(386)	(주)○○○스팩김치(571)	종균비침가구(699)
표준편차	0.8144	1.0194	0.886
합	110	96	100
평균	5.7895	5.0526	5.263

Ho: GJ7종균김치=(주)○○○스팩김치, Ha: GJ7종균김치>(주)○○○스팩김치  
 $\alpha=0.05$ 에서의 기각역: 1.645(단측검정),  $Z=2.4616$  기각 그러므로 GJ7종균김치가 우수하다

다) 9인의 주부모니터링 요원 관능평가 결과

	GJ7종균김치(386)	(주)○○○스팩김치(571)	종균비침가구(699)
표준편차	0.6666667	0.881971	1.1666667
합	56	40	46
평균	6.222222	4.444444	5.11111

Ho GJ7종균김치=(주)○○○스팩김치, Ha GJ7종균김치>(주)○○○스팩김치  
 $z=13.090909$ ,  $\alpha=0.05$ 에서의 기각역: 1.645(단측검정)  
 $z$ 값은 기각역에 포함됨. 그러므로 Ho 기각  
 즉 GJ7종균김치는 (주)○○○스팩김치보다 높은 기호도를 보인다.

- 본 연구 결과를 정리하면 GJ7종균김치가 종균비첨가김치보다 전반적인 기호도가 더 높으며, 기존의 김치산업체에 의해 시판되고 있는 김치((주)○○○ 시판김치)보다도 더 GJ7종균김치의 기호도가 높은 것으로 평가되었다.

#### 아. 당원에 따른 GJ7종균김치의 발효특성

- 김치제조 시 당원에 의해 균의 활성화 및 김치의 관능적 면을 향상시킬 수 있는지 조사하기 위해 *Leu. citreum* GJ7에 의해 대사 가능한 fructose를 기존의 김치배합성분인 sucrose 대신 첨가하였다. Sucrose의 일부 함량을 fructose로 대체하여 제조한 GJ7종균김치(fructose-GJ7종균김치)와 종균을 첨가하지 않은 fructose 첨가 김치(fructose-종균비첨가김치) 그리고 sucrose 함량을 그대로 제조한 GJ7종균김치(sucrose-GJ7종균김치)를 최적발효조건에서(발효→산도 0.5~0.65% 발효종료→0~-2℃저장) 저장일수에 따른 미생물균총의 변화와 pH, 산도, 당도 및 관능검사를 수행하였다. 또한 조선대학교 식품영양학과 대학원생 20명을 대상으로 fructose-GJ7종균김치, fructose-종균비첨가김치, sucrose-GJ7종균김치 및 현재 시판중인 (주)○○○사의 김치를 2차례에 걸쳐 관능검사를 실시하였으며, 시험구는 무작위 번호를 부여하여 Blind test로 9점 만점으로 평가하였다.

#### 1) 미생물균총의 변화, 산도, 당도 및 관능검사(Table 16)

가) 산도

- Sucrose를 첨가한 GJ7종균김치가 fructose-GJ7종균김치와 fructose-종균비첨가김치보다 발효가 더 빨리 진행되었으나 저장 2주후(담금 후 26일경)에는 fructose-종균비첨가김치의 산도가 0.59%로 fructose-GJ7종균김치의 산도 0.5%, sucrose-GJ7종균김치의 산도 0.55%로 완만히 산도가 증가함에 비해 급격히 증가하였다.

#### 나) 총균수 및 우량김치 종균 점유율

- fructose-GJ7종균김치, fructose-종균비첨가김치 및 sucrose-GJ7종균김치의 총균수는 당원 및 종균첨가에 상관없이 비슷한 양상을 보였으며 fructose-GJ7종균김치와 sucrose-GJ7종균김치의 우량종균점유율은 저장 3주후(담금후 33일경)까지 fructose-GJ7종균김치(71~73%)보다 sucrose-GJ7종균김치에서(73~75%) 약간 더 높게 나타났다.

#### 다) 관능검사

- 신맛의 경우 fructose-종균비첨가김치가 가장 시었으며, sucrose-GJ7종균김치의 산도가 fructose-GJ7종균김치의 산도보다 낮았음에도 불구하고 관능시에는 비슷하게 나타났다.
- 단맛의 경우 sucrose-GJ7종균김치가 fructose-GJ7종균김치보다 당도가 당도계 측정시 더 높게 나타났으나 관능시에는 비슷하게 느껴졌는데 이는 당에 따른 threshold value가 다르기 때문인 것으로 생각되어진다. fructose-GJ7종균김치의 단맛은 sucrose-GJ7종균김치의 단맛과는 또 다른 특유의 단맛의 나타내었다.
- 특쓰는 맛은 fructose-GJ7종균김치, fructose-종균비첨가김치, sucrose-GJ7

종균김치 모두 저장 1주일후부터(담금 후 19일경) 나타났고 저장 2주일후부터(담금후 26일경) 가장 강하였으며, sucrose-GJ7종균김치 > fructose-GJ7종균김치 > fructose-종균비첨가김치순이었다.

- 전체적인 기호도는 fructose를 첨가한 fructose-GJ7종균김치가 가장 좋았으며 > 다음으로는 sucrose-GJ7종균김치 > fructose-종균비첨가김치 순이었다.

- 이상의 결과를 정리하면 *Leu. citreum* GJ7은 sucrose, fructose 모두 당대사가 가능하며 이들 당원의 대사에 의해 발효산물이 달라져 같은 발효조건하에서도 당원에 따른 단맛이 달라짐을 알 수 있었다. 당원으로 일반적으로 가장 많이 쓰이는 sucrose 대신 fructose를 김치제조에 사용하고 김치종균 GJ7으로 발효 시 가장 기호도가 높은 김치를 얻을 수 있었다. 이는 같은 김치 배합비에 같은 종균에 의한 김치발효로도 당원에 의해 김치맛을 다르게 할 수 있음을 제시하는 바이다.

Table 16. 당원변경에 의한 종균김치의 발효특성

		경과일					
		저장직후(담금 후 12일)			숙성 1주일(담금후 19일)		
		Fructose GJ7	Fructose Control	Sucrose GJ7	Fructose GJ7	Fructose Control	Sucrose GJ7
pH		4.82	4.94	4.83	4.79	4.73	4.65
산도		0.52	0.5	0.51	0.54	0.55	0.61
염도		2.48	2.47	2.22	2.52	2.23	2.38
당도		5.25-5.5	5.25	5.75	4.25	5.0	5.25
균 총	CaCO <sub>3</sub> -MRS	1.35×10 <sup>8</sup> - GJ7: 75% - 간균: 20% - 구균: 5%	3.7×10 <sup>8</sup> - 간균: 60% - 구균: 40%	3.6×10 <sup>8</sup> - GJ7: 80.5% - 간균: 19.5%	4.9×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 20%	3.2×10 <sup>6</sup> - 간균: 75% - 구균: 15% - 장간균: 5% - 효모: 5%	2.2×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 20%
	MRS	2.48×10 <sup>8</sup> - GJ7: 80% - 간균: 15% - 구균: 5%	7.6×10 <sup>8</sup> - 간균: 60% - 구균: 30% - 간균: 10%	7.5×10 <sup>8</sup> - GJ7: 80% - 간균: 10% - 구균: 10%	3.32×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 20% - 구균: 5%	3.5×10 <sup>7</sup> - 간균: 65% - 구균: 25% - 효모: 10%	8.3×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%
	LB	9.5×10 <sup>8</sup> - GJ7: 80% - 간균: 20%	2.6×10 <sup>8</sup> - 간균: 65% - 장간균: 25% - 구균: 10%	5.5×10 <sup>8</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	9.7×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 15% - 구균: 10%	1.21×10 <sup>7</sup> - 간균: 70% - 구균: 30%	4.0×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 10% - 구균: 10%
관능		Sucrose GJ7종균김치가 Fructose GJ7종균김치보다 발효가 더 먼저 진행됨			Fructose GJ7종균김치가 Sucrose GJ7종균김치와는 다른 부드러운 단맛이 있음.		

		경과일					
		숙성 2주(담금후 26일)			숙성 3주(담금후 33일)		
		Fructose GJ7	Fructose Control	Sucrose GJ7	Fructose GJ7	Fructose Control	Sucrose GJ7
pH		4.81	4.668	4.733	4.579	4.309	4.51
산도		0.51	0.59	0.55	0.65	0.76	0.69
염도		2.32	2.22	2.13	2.44	2.21	2.4
당도		5.25	4.0	6.0	5.5	3.75	6.0
균총	CaCO <sub>3</sub> -MRS	3.4×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	2.9×10 <sup>7</sup> - 간균: 60% - 구균: 35% - 효모: 5%	1.25×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 20%	1.33×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 20%	1.3×10 <sup>7</sup> - 간균: 50% - 구균: 50%	9.9×10 <sup>6</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%
	MRS	1.5×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	2.8×10 <sup>7</sup> - 간균: 65% - 구균: 35%	3.3×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 20%	1.6×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	4.4×10 <sup>6</sup> - 간균: 45% - 구균: 55%	1.88×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 20%
	LB	5.6×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 10% - 구균: 10%	9.8×10 <sup>6</sup> - 간균: 80% - 구균: 20%	3.7×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	4.5×10 <sup>6</sup> - GJ7: 75% - 간균: 15% - 구균: 10%	7.4×10 <sup>6</sup> - 간균: 40% - 구균: 60%	8.7×10 <sup>6</sup> - GJ7: 70% - 간균: 30%
관능		- 전체적인 기호도: Sucrose GJ>7Fructose GJ7>Fructose C - 신맛: Fructose C>Sucrose GJ7=Fructose GJ7 - 단맛: Sucrose GJ7>Fructose GJ7>Fructose C - 특쓰는 맛: Sucrose GJ7>Fructose GJ7>Fructose C - 균덕내: Fructose C에서 남			- 전체적인 기호도: Sucrose=GJ7Fructose GJ7>Fructose C - 신맛: Fructose C>Sucrose GJ7=Fructose GJ7 - 단맛: Sucrose GJ7>Fructose GJ7>Fructose C - 특쓰는 맛: Sucrose GJ7>Fructose GJ7>Fructose C - 균덕내: Fructose C에서 남		

## 2) 관능검사

### 가) 1차 관능평가

- 1차 평가에 의한 전체적인 기호도는 fructose-GJ7종균김치 > sucrose-GJ7종균김치 > (주)○○○의 시판김치 > fructose-종균비첨가김치 순이었다.

관능항목	색	윤기	풋맛	신맛	짠맛	단맛	젓갈맛	상쾌한맛	군내	감칠맛	조식감	전체적 기호도
Fructose-GJ7종균김치(405)	3.6842	5.8947	3.7368	5.1052	4.2105	4.8421	3.7368	5.0526	3.8421	4.4210	4.8947	5.7894
Fructose-종균비첨가김치(233)	4.4210	5.1578	5.1052	5.6315	3.8421	3.6842	3.7894	3.5789	4.2631	2.7894	4.7894	3.8947
Sucrose-GJ7종균김치(578)	4.2105	5.4210	3.9473	5.3684	4.1578	5.0526	3.1578	4.9473	3.3684	3.6315	4.7368	5.4592
(주)○○○(607)	4.5263	5.0526	3.1052	5.8421	6.1578	3.9473	5.4210	4.3157	4.0000	4.7894	4.8947	5.0526

### 나) 2차 관능평가

- 2차 평가에 의한 전체적인 기호도는 fructose-GJ7종균김치 > sucrose-GJ7종균김치 > (주)○○○의 시판김치 > fructose-종균비첨가김치 순이었다.

관능항목	색	윤기	풋맛	신맛	짠맛	단맛	젓갈맛	상쾌한맛	군내	감칠맛	조식감	전체적 기호도
Fructose-GJ7종균김치(603)	4.3684	5.7894	4.2105	5.4210	3.9473	5.4736	3.7368	4.5789	4	4.4210	4.8947	6.0526
Fructose-종균비첨가김치(312)	4.9473	4.9473	4.7368	6.2363	4.1578	3.2105	3.4210	3.5789	4.5789	3.0000	4.7894	4.1578
Sucrose-GJ7종균김치(406)	4.3684	5.9473	3.9473	5.4736	4.1578	5.2631	3.1578	4.9473	3.8421	4.3684	4.7368	5.9056
(주)○○○(725)	4.3684	5.5263	3.4210	7.2105	6.7368	4.7368	5.7894	4.4736	4	4.8947	3.8947	5.8947

- 본 연구 결과를 정리하면 sucrose를 첨가한 sucrose-GJ7종균김치나 fructose-GJ7종균김치 모두 단맛, 상쾌한 맛, 윤기 등은 비슷하였으나 fructose를 첨가한 fructose-GJ7종균김치가 sucrose를 첨가한 sucrose-GJ7종균김치보다 전반적인 기호도가 높았으며 현재 시판중인 (주)○○○의 김치보다 더 기호도가 높은 것으로 평가되었다.

#### 자. 속성발효에 의한 종균김치의 발효특성(Table 17)

- 우량 김치종균에 의한 김치의 최적발효시스템인 ‘발효하여 0.5~0.65% 부근에서 본 발효를 종료하고 숙성에 들어감’이 최상의 김치맛과 우량김치종균의 점유율을 높이는 조건임을 알 수 있었다. 그러나 김치의 산도가 0.5~0.65% 부근이 되기까지 약 11~12일경의 시간이 소요되므로 실제 김치발효 대사시스템을 산업화에 적용 시 산업체가 부담해야 하는 김치의 저장공간 및 온도 유지 시스템 등이 경제적인 부담으로 김치단가 상승과 직결되는 문제가 발생하게 된다. 따라서 발효기간을 단축하기 위해 발효온도를 10℃ 이상(A)으로 10℃ 이하(B)로 하여 종균김치를 속성발효하면서 미생물균총, pH, 산도 및 관능검사를 시행하였다. 이상의 실험은 사계절 중의 김치시료 중 가장 최악의 재료 상태가 되는 여름배추(물이 많고 단맛이 적음)를 가지고 시행하였다.

##### 1) 산도

- 10℃ 이상에서 발효한 종균김치의 산도는 Table 12에서 보여준 10℃에서 발효 후 산도 0.63%에서 저장한 김치와 같은 양상을 나타내었으며 저장 3주후(담금 후 35일경)부터는 급격히 산도가 증가하였다.

- 10℃이하에서 발효 후 저장한 종균김치는 저장 3주후(담근 후 35일경)까지도 산도 0.76%로 완만한 증가를 보였다.

## 2) 총균수 및 우량김치 종균 점유율

- 이전의 겨울배추로 담근 후 10℃에서 발효하여 저장한 종균김치(Table 15)의 총균수는  $10^{7-9}$  CFU/mL이었으며 종균점유율은 약 80%이상이었으나, 여름배추로 담근 종균김치의 10℃이상과 10℃ 이하 발효시 총균수는  $10^{7-8}$  CFU/mL이었으며, 종균점유율은 10℃이상 발효의 경우 65~75%, 10℃ 이하 발효의 경우 70~80%를 유지하였다.

## 3) 관능검사

- 10℃ 이상에서 발효한 종균김치는 급격한 산도 증가로 담근 후 30일경부터는 강한 신맛을 나타내었으나, 10℃ 이하에서 발효한 종균김치는 신맛이 약했고 특쓰는 맛은 6.5℃에서 발효한 김치보다는 덜 하였지만 10℃보다는 강하게 나타났다.

Table 17. 숙성발효에 의한 종균김치의 균총 및 관능조사

		경과일							
		배양직후				숙성 1주(15일경)			
		10℃ 이상(A): 발효후 숙성(5일)		10℃ 이하(B): 발효 후 숙성(8일)		10℃ 이상(A): 발효후 숙성		10℃ 이하(B): 발효 후 숙성	
		GJ7	Control	GJ7	Control	GJ7	Control	GJ7	Control
pH		4.813	4.804	4.86	4.92	4.544	4.454	4.813	4.986
산도		0.53	0.535	0.51	0.495	0.67	0.75	0.525	0.48
염도		2.42	2.4	2.78	2.62	2.61	2.75	2.36	2.58
당도		5.25	5.0	9.0-9.25	8.75	6.0	5.0	8.25	6.75
균총	CaCO <sub>3</sub> -MRS	1.97×10 <sup>7</sup> - GJ7: 90% - 간균: 3.1% - 간균: 6.9%	5.2×10 <sup>6</sup> - 간균: 65% - 구균: 25% - 장간균: 10%	1.06×10 <sup>8</sup> - GJ7: 97.1% - 간균: 2.8%	1.22×10 <sup>8</sup> - 간균: 41.8% - 구균: 58.1%	1.4×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	4.2×10 <sup>7</sup> - 간균: 65% - 구균: 25%	5.02×10 <sup>8</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	1.1×10 <sup>6</sup> - 간균: 60% - 구균: 20% - 효모: 20%
	MRS	2.34×10 <sup>7</sup> - GJ7: 85% - 간균: 10% - 구균: 5%	2.98×10 <sup>7</sup> - 간균: 60% - 구균: 20% - 간균: 20%	1.71×10 <sup>8</sup> - GJ7: 97% - 간균: 3%	1.32×10 <sup>8</sup> - 간균: 39.3% - 구균: 60.6%	4.0×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 20% - 구균: 10%	6.4×10 <sup>7</sup> - 간균: 60% - 구균: 40%	3.5×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 10% - 구균: 10%	4.5×10 <sup>7</sup> - 간균: 70% - 구균: 30%
	LB	1.42×10 <sup>7</sup> - GJ7: 85% - 간균: 13.6% - 간균: 1.4%	1.24×10 <sup>7</sup> - 간균: 60% - 구균: 20% - 장간균: 20%	6.7×10 <sup>7</sup> - GJ7: 97% - 간균: 3%	8.9×10 <sup>7</sup> - 간균: 10.1% - 구균: 89.9%	1.7×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 10% - 구균: 20%	2.0×10 <sup>7</sup> - 간균: 60% - 구균: 40%	2.8×10 <sup>7</sup> - GJ7: 80% - 간균: 20%	1.4×10 <sup>6</sup> - 간균: 70% - 구균: 30%
관능		- A, B이하 모두 GJ7종균 김치의 발효가 더 빨리 진행됨 - control보다 단맛이 나며 control은 맛이 밋밋함				- 전체적인 기호도: B GJ7>A GJ7>B 이하 C>A 이상 C - 신맛: A C>A GJ7>B C>B GJ7 - 단맛: B GJ7>B C>A GJ7>A C - 특쓰는 맛(전체적으로 약함): B GJ7>B C=A GJ7>A C			

		경과일							
		숙성 2주(23일경)				숙성3주(35일경)			
		10℃ 이상(A): 발효후 숙성		10℃ 이하(B): 발효 후 숙성		10℃ 이상(A): 발효후 숙성		10℃ 이하(B): 발효 후 숙성	
		GJ7	Control	GJ7	Control	GJ7	Control	GJ7	Control
pH		4.347	4.301	4.65	4.52	4.193	4.025	4.42	4.29
산도		0.755	0.77	0.59	0.68	0.9	0.925	0.76	0.85
염도		2.45	2.5	2.52	2.45	2.44	2.52	2.65	2.55
당도		6.5	5.0	6.5-6.75	5.5	6.0	5.0-5.25	6.5-6.75	5.0
균 총	CaCO <sub>3</sub> -MRS	1.2×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 20% - 구균: 10%	8.9×10 <sup>7</sup> - 간균: 60% - 구균: 30% - 효모: 10%	2.0×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 20% - 구균: 10%	2.0×10 <sup>6</sup> - 간균: 60% - 구균: 20% - 장간균: 20%	7.8×10 <sup>6</sup> - GJ7: 65% - 간균: 25% - 구균: 10%	2.3×10 <sup>7</sup> - 간균: 50% - 구균: 50%	1.5×10 <sup>6</sup> - GJ7: 70% - 간균: 30%	1.6×10 <sup>6</sup> - 간균: 50% - 구균: 50%
	MRS	1.2×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 30%	1.47×10 <sup>8</sup> - 간균: 60% - 구균: 40%	4.2×10 <sup>7</sup> - GJ7: 75% - 간균: 25%	1.47×10 <sup>8</sup> - 간균: 60% - 구균: 40%	8×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 20% - 구균: 10%	5.4×10 <sup>7</sup> - 간균: 40% - 구균: 60%	2.9×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 30%	5.6×10 <sup>7</sup> - 간균: 50% - 구균: 50%
	LB	7×10 <sup>6</sup> - GJ7: 70% - 간균: 30%	6.5×10 <sup>7</sup> - 간균: 70% - 구균: 30%	2.3×10 <sup>7</sup> - GJ7: 70% - 간균: 30%	3.8×10 <sup>8</sup> - 간균: 50% - 구균: 50%	4×10 <sup>6</sup> - GJ7: 65% - 간균: 20% - 구균: 10%	1.9×10 <sup>6</sup> - 간균: 60% - 구균: 40%	8.6×10 <sup>6</sup> - GJ7: 75% - 간균: 15% - 구균: 10%	5.3×10 <sup>7</sup> - 간균: 60% - 구균: 40%
관능		- 전체적인 기호도: B GJ7>A GJ7>B C>A C - 신맛: A C>A GJ7>B C>B GJ7 - 단맛: B GJ7>A GJ7>B C=A C - 특쓰는 맛(전체적으로 약함): B GJ7>A GJ7>B C>A C				- 전체적인 기호도: B GJ7>A GJ7>B C>A C - 신맛: A C>A GJ7>B C>B GJ7 - 단맛: B GJ7>A GJ7>B C=A C - 특쓰는 맛(전체적으로 약함): B GJ7>A GJ7>B C>A C - 균덕내 및 훈내: control에서 많이 남			

● 이상의 결과를 정리하면 다음과 같다.

- 선발된 우수김치종균 *Leu. citreum* GJ7을 첨가하여 제조한 종균김치를 5℃, 6.5℃, 10℃에서 발효하여 산도가 각각 약 0.4%~0.75% 범위일 때 발효를 멈추고 0~-2℃에 저장하면서 종균김치의 pH, 산도, 균총(총균수 및 우수종균수)의 양상 및 관능조사를 하였다.
- 김치의 맛과 저장중의 pH, 산도, 균총 변화의 양상은 산도별 저장시기에 따라 큰 차이를 나타내었다.
- 저장중의 pH 및 산도는 산도 0.5~0.65% 부근일 때 저장에 들어간 구가 다른 산도에서 저장한 구간보다 완만한 속도로 저하되었으며, 총균수 중의 종균 GJ7의 점유율도 80% 이상이었다.
- 종균김치의 기호도를 보면 청량감(톡쏘는 맛)의 경우 산도 약 0.5~0.65% 부근에서 발효를 종료후 0~-2℃에서 저장한 종균김치가 가장 높게 평가되었으며 그 다음이 산도 0.7~0.85%, 0.4% 순이었다. 신맛의 정도는 김치를 산도 0.7~0.85% 부근일 때 저장한 구가 가장 신맛이 강했으며 산도 0.5~0.65%에 저장한 구가 0.4%에 저장한 구보다 신맛이 덜 하였다.
- 1) 김치발효온도별 특성 2) 발효에 따른 적정 산도별 후숙성(저장)에 따른 김치 발효의 결과로부터 김치발효는 6.5℃에서 수행하여 산도 0.5~0.65%부근에서 본 발효를 종료하고 숙성에(0~-2℃)에 들어감이 최상의 김치맛과 우량김치종균의 점유율을 높이는 조건임을 알 수 있었다.
- 감수성균주(*Lb. plantarum* KFRI 464)를 이용한 박테리오신 강화균주 *Leu.*

*citreum* GJ7을 종균으로 사용하는 미생물 대사제어시스템을 김치제조에 도입시켰다. 종균김치를 발효 후 산도 0.59%에서 발효를 종료시켜 0~-2℃에서 저장시키는 조건에서 *Leu. citreum* GJ7은 지속적으로(128일째까지) 김치환경하의 미생물 중 우점종(약 70%↑)을 유지하였고, 김치의 맛도 산도에 비하여 시다고 느끼지 못하는 정도였다. 이는 GJ7이 생산하는 당(dextran)에 의하여 신맛이 어느 정도 masking된 결과로 추측된다. 종균비첨가김치(대조구)는 동 조건에서 산도 1.25%를 나타내었고 관능평가 시 매우 시다고 느껴지고 군내도 느껴졌다. 본 연구결과는 현재 김치 유통기간을 약 20-25일 정도로 잡고 이 기간을 넘어가면 관능적으로도 매우시다고 느껴 김치의 상품가치가 크게 떨어져 판매가 거의 불가능한 상황을 보다 연장시킬 수 있는 매우 긍정적인 결과로 평가된다.

- 관능 평가 시 시판김치 약 20~30일 경과된 김치보다도 본 연구에서의 미생물대사제어시스템에 의한 종균김치 약 130일 경과된 김치가 훨씬 덜 시며 군내도 나지 않는다고 평가되었다(본 실험실 연구원 10인, (주)○○○ 연구원 6인 평가). 그러나 현재의 김치를 단순히 저장식품이라는 개념에서 서양의 요구르트처럼 살아있는 유산균을 섭취하는 급원으로 받아들일 경우는 적어도  $10^7$ 이상의 생균수를 나타내는 발효 후 약 80일경이 유통기한이 될 수 있을 것이다.
- 이러한 연구는 추후의 후속적 연구를 통하여 종래의 김치에 대한 개념의 재정립과 그에 따른 유통기한의 설정이 별도로 이루어져야함을 시사한다.
- 속성발효에 의한 종균김치의 발효특성을 조사한 결과 종균점유율면에서 종균김치의 최적발효온도에서 발효한 김치의 경우 약 80~90%이었으나 10℃

이하에서 종균김치를 발효할 경우 우점종은 약 70~80%이었다. 또한 특소는 맛도 최적온도에서 발효한 김치보다 강하진 않았지만 유통기한이 28~30일로 현재 시판되고 있는 김치의 경우 최적 가식기간은 14~20일인 반면, 10℃ 이하에서 발효 후 숙성한 김치는 담근 후 35일경까지도 산도가 급격히 증가하지 않아 훨씬 덜 시며  $10^7$ CFU/mL 이상의 생균수를 유지하였다. 또한 겨울배추로 동절기 김치를 담그는 경우와 여름배추로 하절기 김치를 담그는 경우 김치 원재료의 초기 잡균수 및 김치 담금중의 주변 환경 등의 영향으로 동절기가 김치재료에 보다 더 적합한 환경임을 알 수 있었다. 참고로 최근 출시된 (주) 두산의 종균김치는 종균점유율이 약 50% 정도임을 감안할 때 본 기술은 최악의 상황인 하절기에도 GJ7 미생물 대사공학을 사용한 김치발효환경하에서는 종균 점유율은 70~80% 유지하면서 김치의 최적 가식기간을 35일경까지 연장할 수 있는 강력한 기술임을 알 수 있다.

## 제 2 절 미생물대사공학기법으로 제조된 전통김치의 생리활성효능 연구

### 1. 연구수행방법

#### 가. 우량 김치 종균의 독성실험

##### 1) 실험재료 조제

- 분양받은 우량 김치종균(A)와 우점종 비피더스종균(B)를 10,000 xg에서 15분간 원심분리한 다음 균체를 회수하여 12시간 동결 건조한 후 시료로 사용하였다.

##### 2) 독성시험

###### 가) 급성독성시험

- 평균치사량(LD<sub>50</sub> mg/kg)은 Behrens-Karber법에 따라 마우스의 복강내에 주사한 후 24 시간내 죽는 마리수로부터 평균치사량(LD<sub>50</sub> mg/kg)을 산출하였고, 급성중독증상은 7일간 시험물질을 경구투여하는 동안 시험동물의 일반상태의 변화, 중독증상의 발현 등 임상 증상 및 사망유무를 관찰하였다.

###### 나) 아급성 독성시험

- 30일간 시험물질을 투여하는 동안 매일 일정한 시간에 동물의 일반상태 변화, 중독증상발현 및 사망 유무관찰과 체중, 사료섭취량 및 물섭취량을 측정하였고 30일째 시험동물을 처사한 후 외관 및 내부장기의 이상 유무를 관찰

하였으며 장기 중량 측정과 혈액생화학적 검사를 시행하여 시험물질의 아급성독성을 평가하였다.

## 나. 우량 신균주를 이용하여 개발된 김치의 노화억제 효능실험

### 1) 실험재료 조제

- 우량 김치종균으로 담근 김치, 우점종 비피더스균으로 담근 김치 및 시판김치를 세절한 다음 ultra turax homogenizer(10,000 xg, 2분)로 마쇄한 후 동결건조하여 -70℃에 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

### 2) 실험동물 및 처치

- 체중  $80 \pm 100$  g Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 1주일간 고형배합사료(삼양사료)로 적응시키고, 난피법(randomized complete block design)으로 각 군당 10마리씩 선별하여 정상군(NOR), 알코올 투여군(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day(CON), 우량 김치종균으로 담근 김치가 10%함유된 사료를 급여한 군(A), 우점종 비피더스균 담근 김치가 10%함유된 사료를 급여한 군(B) 및 시판김치가 10%함유된 사료를 급여한 군(C)의 5군으로 나누어 6주간 사육하였다(Table 1). 알코올 투여는 Fujji 등(77)의 방법에 준하여 35% 에탄올 10 mL/kg을, 예비실험을 토대로 동결건조된 각 시료가 10% 함유되도록 고형배합사료에 혼합한 다음 6주간 급여하였다. 실험기간 중 동물의 상태를 관찰하면서 체중은 1주일 간격으로, 식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였고 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율(feed efficiency ratio, FER)을 구하였다. 실험동물은 처치 전 16시간 절식시킨 후 에테르 마취하에서 경동맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 간은 적출하여

0.9% 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 수분을 제거한 후 무게를 측정하고 다음 -70 °C의 냉동고에 보관하면서 효소 활성 측정에 사용하였다. 실험기간동안 고품사료 및 물은 자유로히 섭취토록 하였다.

**Table 1. Composition of experimental diet**

Groups	Diet composition
NOR	Basal diet <sup>1)</sup>
CON	Basal diet + EtOH <sup>2)</sup>
A	Basal diet + A <sup>3)</sup> + EtOH
B	Basal diet + B <sup>4)</sup> + EtOH
C	Basal diet + C <sup>5)</sup> + EtOH

<sup>1)</sup> According to AIN-93 diet composition

<sup>2)</sup> EtOH : 35 % ethanol(10 mL/kg of bw/day, po) treated group

<sup>3)</sup> A : kimchi made by 우량 종균

<sup>4)</sup> B : kimchi made by 우점종 비피더스균

<sup>5)</sup> C : kimchi purchased from market

### 3) 효소원 조제

- 간 조직 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하고 빙냉하에서 ultra turax homogenizer(Janke & Kunkel, Germany)로 10,000 ×g에서 2분간 마쇄하였다. 마쇄액의 일부는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량 측정에 사용하였고, 나머지는 4 °C, 600 ×g 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상정액을 15,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 xanthine oxidase(XO), superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성측정의 효소원 및 단백질함량 측정에 사용하였다. 또

한 간 조직 0.1 g에 5%(W/V) sulfosalicylic acid(SSA) 2 mL를 가하고 마쇄 후 10,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 상정액을 glutathione(GSH)함량 측정에 사용하였다. 혈청은 분리하여 alanine aminotransferase(ALT) 및 aspartate aminotransferase(AST)활성을 측정하였다.

#### 4) 효소활성 측정

- 간조직 중 xanthine oxidase 활성은 Downey 등의 방법, SOD활성은 Crapo 등의 방법, catalase활성은 Aebi의 방법, GSH-Px활성은 Flohe 등의 방법으로 측정하였다. 과산화지질 함량은 malondialdehyde량을 thiobarbituric acid로 비색정량하는 Buege 와 Aust의 방법, glutathione(GSH)함량은 Tietze의 방법으로 측정하였다. 혈청중의 ALT 및 AST활성은 Reitman- Frankel 방법에 의하여 조제된 아산제약 kit를 사용하여 측정하였다.

#### 5) 단백질 정량 및 실험결과의 통계처리

- 단백질의 정량은 Lowry등의 방법에 준하여 bovine serum albumin( Sigma Fr.v)을 표준품으로 하여 측정하였으며, 실험결과는 SPSS 통계 package를 이용하여 실험군당 평균 ± 표준오차로 표시하였으며 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후  $p < 0.05$  수준에서 Tukey(T) test를 이용하여 상호 검정하였다.

## 다. 우량 신균주를 이용하여 개발된 김치의 고지혈증 억제 효능

### 1) 실험재료 조제

- 우량 김치종균으로 담근 김치(A), 우점종 비피더스균으로 담근 김치(B) 및 시판김치(C)를 세절한 다음 ultra turax homogenizer(10,000 xg, 2분)로 마쇄한 후 동결건조하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

### 2) 실험동물의 사육 및 식이

- 5주령의 Sprague Dawley계 웅성 흰쥐 50마리를 10일간 적응시킨 후 체중  $100\pm 10$  g인 것을 난괴법에 의하여 5군(Table 1)으로 나누고 6주동안 사육하였다. 고콜레스테롤혈증 유발식은 AIN-93을 기준으로 1% 콜레스테롤과 0.25% 콜산나트륨을 첨가하여 조제하였다. 예비실험을 토대로 고형배합사료에 각 시료가 10%함유되도록 조제하여 급여하였다. 물과 식이는 제한없이 공급하였고 사육실 온도는  $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며 조명은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 실험 사육 기간중 1주일 간격으로 최중을 측정하였고, 최종 체중에서 실험개시 전의 체중을 감하여 실험개시 전의 체중으로 나누어 체중증가율을 표시하였고, 식이섭취량은 일정시각에 측정하였으며 식이효율은 체중증가율을 식이섭취량으로 나누어 계산하였다..

**Table 1. Composition of diet**

Group	Diet composition
N)R	Basal diet <sup>1)</sup>
CON	Basal diet + cholesterol(1.00%) + sodium cholate(0.25%)
A	Basal diet + cholesterol(1.00%) + sodium cholate(0.25%) + 10% A <sup>2)</sup>
B	Basal diet + cholesterol(1.00%) + sodium cholate(0.25%) + 10%B <sup>3)</sup>
C	Basal diet + cholesterol(1.00%) + sodium cholate(0.25%) + 10%C <sup>3)</sup>

<sup>1)</sup> According to AIN-93 diet composition

<sup>2)</sup> A : kimchi made by 우량 종균

<sup>3)</sup> B : kimchi made by 우점종 비피더스균

<sup>4)</sup> C : kimchi purchased from market

### 3) 시료 채취

- 흰쥐를 16시간 절식시킨 흰쥐를 마취 후 복부대동맥에서 채혈하고 실온에서 30분간 방치한 다음 600 x g에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청은 Reitman과 Frankel의 방법으로 조제된 kit를 사용하여 ALT 및 AST활성 측정에 사용하였고 나머지는 지질측정용 시료로 하였다.

### 4) 혈청 지질농도 측정

- 혈청중 총콜레스테롤 함량은 Richmond의 효소법에 준하여 조제된 kit(Am202-k, Asan), HDL- 콜레스테롤 함량은 Noma 등의 효소법에 준하여 조제된 kit(Am203-k, Asan), 중성지질 함량은 McGowan 등의 방법에 준하여 조제된 kit(AM157S-K. Asan), 인지질은 Eng와 Noble의 방법으로 조제된 kit(AM157S-K. Asan)를 사용하여 측정하였다. LDL 콜레스테롤 함량은 총콜레스테롤-HDL 콜레스테롤-(중성지질/5)으로, 콜레스테롤 에스테르 함량은 총콜레스테롤 함량에서 유리콜레스테롤 함량을 뺀 값으로 구하였고 심혈관계질

환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(atherogenic index : AI)는 (총콜레스테롤- HDL-콜레스테롤/ HDL-콜레스테롤로 나누어 계산하였다.

## 5) 통계처리

- 실험결과는 SPSS Package를 이용하여 실험군당 평균  $\pm$  표준오차로 표시하였고, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후  $p < 0.05$  수준에서 Tukey(T) test를 이용하여 상호 검정하였다.

## 2. 연구내용 및 결과

### 가. 우량종균김치의 독성실험

#### 1) 급성독성시험(평균치사량, LD<sub>50</sub> mg/kg 추정)

가) 복강주사에 의한 평균치사량 추정

- 시험물질 A에서, 마우스사망은 1,500, 1,700 및 2,100mg/kg군에서 24시간내에 1례, 1,900mg/kg에서 3일 후에 2례가 죽었을 뿐 나머지는 계속 생존하여 2,500mg/kg까지는 치사량(LD<sub>50</sub>)을 나타내지 않았다. 또한 시험물질 B에서, 동일한 량을 동일한 기간 투여하였을 때 사망례는 24시간내에 1,700 및 2,100mg/kg에서 1례, 5일 후에 2,100mg/kg에서 1례, 7일째 2,500mg/kg에서 1례가 사망하였을 뿐 나머지는 모두 계속 생존하여 시험물질 A의 경우와 같이 본 실험에서 투여한 최고용량(2,500mg/kg)까지는 치사량(LD<sub>50</sub>)을 나타내지 않았다. 따라서 급성독성을 나타내는 양은 매우 높을 것으로 생각되며 본 시험물질은 복강내 투여시 2,500mg/kg이상에서도 독성작용을 나타내지 않는 저독성물질로 판단된다(Table 1).

**Table 1. Acute toxicity of sample A and B in mice.**

Animal (mouse)	Dose (mg/kg)	700	900	1,100	1,300	1,500	1,700	1,900	2,100	2,300	2,500	LD <sub>50</sub> (mg/kg)
A	IP	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	1/6	2/6	1/6	0/6	0/6	> 2,500
B	IP	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/6	2/6	0/6	1/6	> 2,500

나) 경구투여에 의한 평균치사량 측정

- 마우스에 시험물질 A 및 B를 1일 1회 7일간 경구투여하고 관찰한 결과 전 시험물질투여군과 대조군에서 시험기간내 사망동물은 없었다(Table 2).

**Table 2. Mortality and LD<sub>50</sub> values in mice administered with sample A and B for 7 days<sup>a</sup>**

Species	Dose (mg/kg)	Days after treatment					Final Mortality	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	Days after treatment					Final Mortality	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	
		0	1	3	5	7			0	1	3	5	7			
		A						B								
Mouse	5,000	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6		0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
	2,500	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6		0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
	1,250	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	> 5.00	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	> 5.00
	625	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6		0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	
	0.00	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6		0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	

<sup>a</sup> Values are expressed as number of dead animals/total animals

- 5,000mg/kg투여군의 경우 전동물에서 투여직후 약간의 활동성 감소가 나타났고, 투여 3일 쯤 연변이나 설사와 유사한 상태로 시험물질이 배설되었으나, 기타 시험물질에 기인한 중독증상은 관찰되지 않았으며, 대조군에서도 투여 직후 설사증상이 관찰되었으나 곧 소실되었다(Table 3, 4).

**Table 3. Clinical signs in mice administered with sample A and B for 7 days<sup>a</sup>**

Species	Dose (mg/kg)	Clinical signs	Hours				Days after treatment				Hours				Days after treatment				
			1	2	--5	6	1	3	5	7	1	2	--5	6	1	3	5	7	
			A								B								
Mouse	5,000	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	2,500	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	1,250	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	625	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	0.00	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

<sup>a</sup> Values are expressed as number of dead animals/total animals

<sup>b</sup> NAD : no abnormality detected

- 투여 초기에 관찰된 사료섭취량 감소현상은 시험물질혼입에 의한 기피현상으로 판단되었고, 이러한 현상은 투여 3일째에 소실되어 정상으로 회복되었으며, 체중측정시 마우스의 시험물질 A 및 B의 최고 용량투여군(5,000mg/kg)에서 투여 1일째에 유의성있는 체중감소가 관찰되었으나, 이는 시험물질의 과량 투여로 인한 일시적 사료섭취량 감소에 기인한 것으로 사료되며, 이러한 현상은 곧 회복되었으며 그 이후 대조군과 시험물질 투여군사이에 유의성있는 체중변화는 나타나지 않았다(Table 4).

**Table 4 . Body weights in mice administered with sample A and B for 7 days<sup>a</sup>**

Sex	Dose (mg/kg)	Days after treatment				
		0	1	3	5	7
A	5,000	31.0 ± 1.1	30.9 ± 1.1	35.9 ± 1.1	36.2 ± 0.7	36.9 ± 1.1
	2,500	30.5 ± 1.0	31.1 ± 1.2	33.9 ± 1.6	34.6 ± 1.0	35.2 ± 1.0
	1,250	30.6 ± 1.2	31.2 ± 1.4	34.1 ± 1.5	36.1 ± 1.7	36.4 ± 1.7
	0.00	30.8 ± 0.7	30.3 ± 1.9	35.0 ± 1.9	35.8 ± 1.5	36.1 ± 1.7
B	5,000	23.7 ± 1.3	21.6 ± 1.5	26.6 ± 1.5	26.6 ± 2.0	26.8 ± 2.7
	2,500	23.5 ± 1.3	25.8 ± 1.5	26.0 ± 1.6	26.4 ± 1.8	26.4 ± 1.5
	1,250	23.7 ± 1.0	23.1 ± 1.5	27.1 ± 1.6	27.0 ± 1.7	26.3 ± 1.5
	0.00	23.9 ± 1.2	24.2 ± 1.4	26.4 ± 1.1	26.6 ± 1.3	26.3 ± 1.3

<sup>a</sup> Values are expressed as mean±S.D.

<sup>b</sup> Significantly different from the control at p<0.05

- 부검결과 대조군과 전시험물질 투여군의 모든 장기에서 별다른 육안적 소견이 발견되지 않았다(Table 5). 이상의 시험결과에서 시험물질 A 및 B는 경구투여 시 모두 LD<sub>50</sub>이 5,000mg/kg이상인 저독성 물질로 평가되었다. 최고용량군에서 투여직후에 활동성 감소가 관찰되었는데 이는 다량의 시험물질이 위내에 있어 나타난 것으로 생각되며 그외의 다른 독성증상은 나타나지 않았고 위의 증상도 곧 소실되었다.

**Table 5 . Gross findings of necropsy in mice administered with sample A and B for 7 days<sup>a</sup>**

Species	Dose (mg/kg)	Observation	Frequency	Observation	Frequency
		A		B	
Mouse	5,000	N.G.L.	6/6	N.G.L.	6/6
	2,500	N.G.L.	6/6	N.G.L.	6/6
	1,250	N.G.L.	6/6	N.G.L.	6/6
	0.000	N.G.L.	6/6	N.G.L.	6/6

<sup>a</sup> Values are expressed as animal numbers, <sup>b</sup> N.G.L. : no gross lesion

## 2) 아급성 독성시험

### 가) 사망률

- 시험물질 A투여군의 경우, 고용량군(5,000mg/kg)에서 투여 21일째 1례, 중용량군(2,500mg/kg)에서 투여 14일 및 28일째 각 1례, 대조군에서 14일째 1례가 사망하였으며, 시험물질 B투여군의 경우, 고용량군에서는 사망례가 없었으나 중용량군(2,500mg/kg)에서 투여 7일째 1례, 저용량군(1,250mg/kg)에서 투여 28일째 1례가 사망하였다. 본 실험결과에서 사망례가 용량이나 투여기간 의존성이 없었고, 사망동물을 부검한 결과 모두 폐에 이상물질(시험물질으로 추측)이 팽만해 있었으므로, 사망의 원인이 시험물질의 독성에 의한 것이 아닌 투여실수에 의한 것으로 판단된다(Table 6).

**Table 6. Mortality of rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b,c</sup>**

Sample	Dose (mg/kg)	0 7 14 21 28 30 end (days)							Mortality
A	0	0/6	0/6	1/6	0/5	0/5	0/5	T.S	1/6
	1,250	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	T.S	0/6
	2,500	0/6	0/6	1/6	0/5	1/5	0/4	T.S	2/6
	5,000	0/6	0/6	0/6	1/6	0/5	0/5	T.S	1/6
B	0	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	T.S	0/6
	1,250	0/6	0/6	0/6	0/6	1/6	0/5	T.S	1/6
	2,500	0/6	1/6	0/5	0/5	0/5	0/5	T.S	1/6
	5,000	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	T.S	0/6

<sup>a</sup>Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30days, <sup>b</sup>Values are expressed as the numbers of dead animals/total numbers of animals, <sup>c</sup>T.S : terminal sacrifice.

나) 일반증상

- 시험물질 A투여에서, 대조군은 7일째 1례, 고용량군은 7일 및 21일째 각 1례, 시험물질 B투여에서, 저용량군에서 14일째 1례씩 연변이 관찰되었는데, 이러한 현상은 시험물질의 급성독성시험에서 관찰된 설사와 마찬가지로 시험물질이 위장관내의 물을 흡수하여 유발된 것으로 판단되며, 정도가 심하지 않았고 곧 회복되었다. 그 외 별다른 임상증상은 관찰되지 않았다(Table 7).

**Table 7. Clinical signs in rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b</sup>**

Sample	Dose (mg/kg)	Clinical signs	1	7	14	21	28	30
			(days)					
A	0	NAD <sup>c</sup>	0/6	0/6	1/6	0/5	0/5	0/5
		soft stool		1				
	1,250	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	2,500	NAD	0/6	0/6	1/6	0/5	1/5	0/4
	5,000	NAD	0/6	0/6	0/6	1/6	0/5	0/5
		soft stool		1		1		
B	0	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
	1,250	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	1/5	0/5
		soft stool			1			
	2,500	NAD	0/6	1/6	0/5	0/5	0/6	0/5
	5,000	NAD	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

<sup>a</sup>Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30 days, <sup>b</sup>Values are expressed as the numbers of dead animals/total numbers of animals, <sup>c</sup>NAD : no abnormalities detected.

다) 체중증가율

- 체중은 시험물질투여군과 대조군간에 유의성있는 변화가 관찰되지 않았다 (Fig.1).

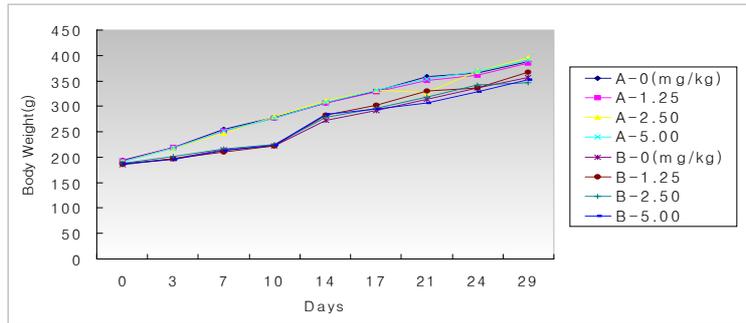


Fig.1. Body weight change in rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30 days.  
<sup>b</sup> Values(unit:g)are expressed as means  $\pm$  S.D. for 4 to 6 rats.

### 라) 사료섭취량

- 투여 초기에 관찰된 사료섭취량 감소현상은 시험물질혼입에 의한 기피현상으로 판단되었으며, 이러한 현상은 투여 3일째에 소실되어 정상으로 회복되었다 (Fig. 2).

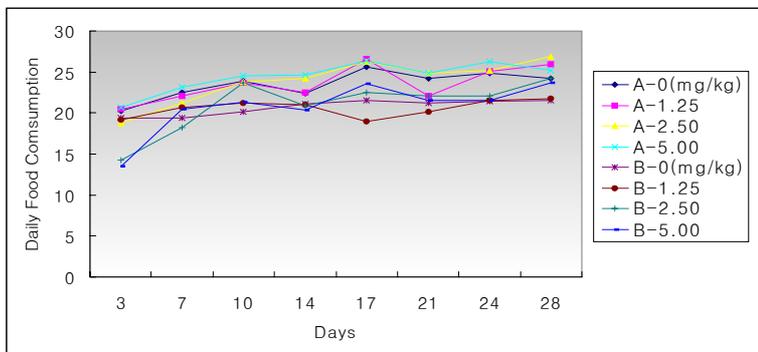


Fig.2. Food consumption in rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30 days.  
<sup>b</sup> Values(unit:g)are expressed as means  $\pm$  S.D. for 4 to 6 rats.

마) 물섭취량

- 물섭취량 측정결과 전반적으로 시험물질투여군이 대조군보다 증가하였는데 이는 시험물질이 흡수력이 강하여 위장관내에서 물을 흡수하여 일어난 현상으로 생각된다(Fig.3). 또한 특이한 것은 시험물질투여기간동안 시험물질A군이 B군보다 더 빈번한 거부반응을 나타냈는데 이는 실험동물이 시험물질A의 냄새보다는 B의 냄새를 더 좋아한 것 때문으로 생각되며, 대체적으로 투여한 시험물질에 대한 적응도는 B군이 A군보다 훨씬 빨랐다. 이상의 결과로부터 시험물질 투여에 의한 특이적인 독성증상은 유발되지 않았으며, 체중, 사료섭취량 및 물섭취량에 유의성있는 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다(Fig.3).

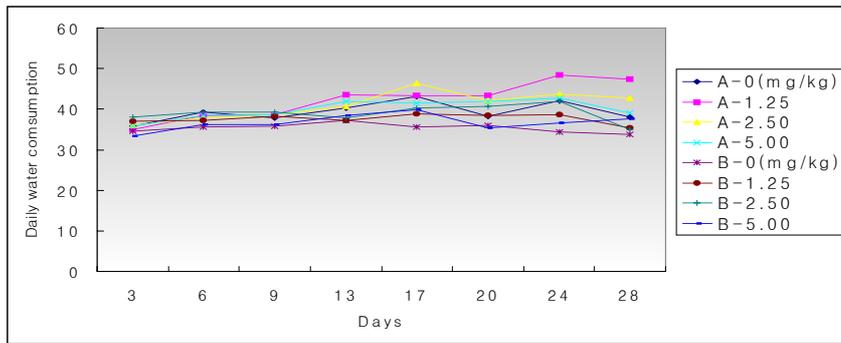


Fig.3. Water consumption in rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30 days.  
<sup>b</sup> Values(unit:g)are expressed as means ± S.D. for 4 to 6 rats.

바) 혈액생화학적 검사

- 시험물질 A 및 B투여에서 ALT, AST 및 ALP 등의 항목에서 대조군과 비교하여 증가하는 경향을 나타냈으나, 용량과 상관성이 없었으며 모두 생리적 정상범위내의 변화였으므로 시험물질에 기인한 독성증상으로는 판단되지 않는다 (Table 8).

Table 8. Levels of serum biochemical indices in rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b</sup>

(Units)	A				B			
	0	1,250	2,500	5,000	0	1,250	2,500	5,000
	Dose(mg/kg)							
ALT(U/L)	35±12	40±7	37±11	39±11	27±8	32±10	29±12	38±8
AST(U/L)	139±20	141±49	134±24	137±26	125±23	129±29	143±34	135±23
BUN(mg/dl)	16±2.2	19±2.1*	18±1.9	18±2.1	19±1.3	23±2.0*	21±3.5	20±3.0
GLU(mg/dl)	134±24	131±36	132±20	145±23*	149±27	139±37	141±78	156±69
ALP(U/L)	125±58	120±50	130±42	137±38	125±26	139±16	135±41	137±34

<sup>a</sup>Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30days.

<sup>b</sup>Values(unit : gm/day)represent means± S.D. for 4 to 6 rats.

\*Significantly different from the control at P<0.05

사) 부검소견

- 시험물질 A투여군중 최고용량군에서 폐 침엽의 적갈색 침착이 관찰되었고, 대조군에서 좌측 신장표면의 함몰소견이 관찰되었는데 이는 환경에 따른 개체의 생리적 반응에 의한 것으로 생각되고 기타 다른 장기의 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다(Table 9).

**Table 9. Gross findings in rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b</sup>**

Dose (mg/kg)	A				B			
	0	1.25	2.50	5.00	0	1.25	2.50	5.00
<b>Kidney</b>								
No. of observation	5	6	4	5	6	5	5	6
No. gross findings	5(100%)	6(100%)	4(100%)	5(100%)	6(100%)	5(100%)	5(100%)	6(100%)
<b>Heart</b>								
No. of observation	5	6	4	5	6	5	5	6
No. gross findings	5(100%)	6(100%)	4(100%)	5(100%)	6(100%)	5(100%)	5(100%)	6(100%)
<b>Spleen</b>								
No. of observation	5	6	4	5	6	5	5	6
No. gross findings	5(100%)	6(100%)	4(100%)	5(100%)	6(100%)	5(100%)	5(100%)	6(100%)
<b>Liver</b>								
No. of observation	5	6	4	5	6	5	5	6
No. gross findings	5(100%)	6(100%)	4(100%)	5(100%)	6(100%)	5(100%)	5(100%)	6(100%)

<sup>a</sup>Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30days. <sup>b</sup>Values are expressed as animal numbers(the percentage of animal numbers).

아) 장기중량

- 각 장기의 절대중량과 체중에 대한 상대중량 측정결과, 시험물질투여군이 대조군에 비해 증가되는 경향을 나타냈으나, 용량의존성 반응은 보이지 않았다 (Table 10).

Table 10. Absolute and relative organ weights in rats administered with sample A and B for 30 days<sup>a,b</sup>

Dose (mg/kg)	A				B			
	0	1.25	2.50	5.00	0	1.25	2.50	5.00
Kidney(g)	1.48±0.141	2.73±0.456	2.96±0.378	2.00±0.488	1.85±0.133	1.93±0.155	1.95±0.223	<b>1.78±0.067</b>
Rel.wt	0.39±0.400	0.76±0.063	0.80±0.060	0.79±0.085	0.78±0.029	0.82±0.049	0.82±0.060	<b>0.77±0.012</b>
Heart(g)	1.24±0.096	1.26±0.127	1.26±0.193	1.32±0.169	0.86±0.093	0.89±0.133	0.95±0.001	<b>0.84±0.076</b>
Rel.wt	0.32±0.040	0.34±0.033	0.34±0.027	0.35±0.025	0.36±0.032	0.38±0.040	0.40±0.006	<b>0.38±0.050</b>
Spleen(g)	0.70±0.104	0.66±0.123	0.69±0.186	0.70±0.158	0.46±0.037	0.47±0.031	0.51±0.054	<b>0.48±0.049</b>
Rel.wt	0.19±0.036	0.17±0.027	0.18±0.034	0.18±0.034	0.19±0.017	0.20±0.016	0.22±0.022	<b>0.21±0.016</b>
Liver(g)	11.10±1.375	10.96±1.716	10.74±1.386	11.94±2.514	7.22±0.649	7.37±0.625	7.79±1.029	<b>6.94±0.507</b>
Rel.wt	2.95±0.262	2.96±0.259	2.92±0.197	3.16±0.469	3.07±0.268	3.16±0.288	3.33±0.369	<b>3.05±0.234</b>

<sup>a</sup>Rats were administered orally with sample A and B once a day for 30 days.

<sup>b</sup>Values(unit:g) are expressed as means± S.D. for 4 to 6 rats.

<sup>c</sup>Ret.wt : Relative organ weights were expressed as the percentage of organ

이상의 아급성독성시험 결과를 종합하여 보면, 본 시험에서 설정한 최고용량군인 5,000mg/kg에서도 일반증상, 혈액생화학적 검사 및 장기의 육안적 관찰 모두에서 시험물질과 관련된 유의성있는 변화가 관찰되지 않았으므로, 시험물질 A 및 B에 대한 1개월간 경구투여시 무영향량은 5,000mg/kg이상일 것으로 추정되었다.

#### 나. 우량신균주를 이용하여 개발된 김치의 노화억제 효능실험

##### 1) 노화억제 효과 실험(*in vitro* 실험)

- Rancimat로 측정된 항산화활성에서, 항산화지수(AI)는 A가 1.46, B가 1.32, C가 1.30으로 대조구보다 높은 활성을 나타냈으며, A의 활성이 가장 높았다.

- 아질산염 소거작용은 pH 1.2의 경우 A가 86.3%, B가 87.0%, C가 75.2%, pH 4.2의 경우 A가 70.3%, B가 72.3%, C가 67.8%, pH 6.0의 경우 A가 15.5%, B가 20.6%, C가 15.0%로 pH저하에 따라 우수하게 나타났으며, 시료군간의 소거작용은 유사하였다.
- 지질과산화생성억제율은 A가 89.7%, B가 83.0%, C가 78.3%로 B의 억제율이 가장 높았으나 대조구로 사용한 BHT의 억제율(94.2%)보다 낮았다.

## 2) 노화억제 효능 실험(*in vivo* 실험)

가) 각 시료의 항산화력 측정

- Soybean oil에 대한 각 시료의 항산화력을 측정한 결과는 Table 11과 같다. AI(antioxidant index)는 A가 1.46, B가 1.32, C가 1.30으로 모두 대조구보다 항산화력이 높게 나타났으며 시료중 A의 항산화력이 가장 우수하였다. 이 결과는 시료인 김치에 항산화작용을 나타내는 물질이 다량 함유되어 나타난 결과로 판단되었다.

**Table 11. Antioxidative activities of samples on soybean oil**

sample <sup>1)</sup>	IP <sup>2)</sup>	AI <sup>3)</sup>
control	7.83 h	1.00
A	11.50 h	1.46
B	10.39 h	1.32
C	10.20 h	1.30

<sup>1)</sup>See the legend of Table 1

<sup>2)</sup>IP: Induction period (hr) of oil was determined by Rancimat test at 110°C

<sup>3)</sup>AI: antioxidant index was expressed as IP of soybean oil (control) containing various sample

나) 흰쥐의 체중증가율과 식이효율

- 주별 각 실험군의 체중증가율 및 식이효율은 Table 12 및 13과 같다. 알코올만을 투여한 ETH는 정상군인 NOR과 김치시료 A, B 및 C 급여군에 비하여 유의하게 체중증가율이 둔화되었다. 특히 6주에서 CON에 비하여 약 34.1 % 정도 체중증가율이 둔화되었다. 알코올과 시료를 급여한 A, B, C의 체중증가율은 NOR에 비하여 유의적으로 증가되었으나 CON에 비해서는 뚜렷하게 감소되었다. 시료군간의 증가율은 A가 높았고 B와 C는 동일하였다. 식이효율에서 CON은 NOR에 비하여 유의적인 저하를 나타냈으나 타군들은 NOR과 유사하였다. 본 실험에서 알코올투여군의 체중증가율이 정상군에 비하여 유의적으로 둔화되었는데 이 현상은 Shaw나 Halsted의 보고처럼 만성적인 알코올섭취로 소화관 점막이 손상되고 이로 인하여 영양소 흡수가 저하될 뿐만 아니라 알코올을 과량 섭취시 높은 열량 공급으로 인하여 식사량이 감소되어 나타난 결과로 생각된다. 또한 알코올을 투여하여 발생한 식이효율의 저하현상은 알코올을 투여하므로써 산소소비량이 증가되고 알코올이 생산하는 에너지가 비효율적으로 이용되기 때문인 것으로 생각된다. 본 실험에서 김치시료가 알코올투여로 둔화된 체중증가율과 저하된 식이효율을 정상군과는 차이가 있었으나 CON에 비하여 유의하게 증가시켰음은 알코올에 의한 간세포독성을 차츰 해독 및 완화시킬 수 있을 것으로 여겨지나 앞으로 이에 대한 체계적인 실험이 요구된다.

**Table 12. The growth rate of rats fed alcohol and/or sample A, B and C**

Weeks Groups	Growth rate <sup>1)</sup>						
	0	1	2	3	4	5	6
NOR <sup>2)</sup>	0	1.309±0.026 <sup>2)a3)</sup>	1.362±0.012 <sup>a</sup>	1.433±0.014 <sup>a</sup>	1.509±0.052 <sup>a</sup>	1.711±0.018 <sup>a</sup>	1.918±0.01 <sup>a</sup>
CON	0	1.042±0.025 <sup>c</sup>	1.059±0.019 <sup>c</sup>	1.091±0.038 <sup>b</sup>	1.228±0.014 <sup>b</sup>	1.249±0.051 <sup>b</sup>	1.265±0.065 <sup>b</sup>
A	0	1.110±0.008 <sup>b</sup>	1.244±0.012 <sup>b</sup>	1.323±0.069 <sup>c</sup>	1.475±0.015 <sup>a</sup>	1.560±0.073 <sup>ac</sup>	1.623±0.005 <sup>c</sup>
B	0	1.107±0.017 <sup>b</sup>	1.181±0.019 <sup>b</sup>	1.264±0.015 <sup>b</sup>	1.318±0.085 <sup>b</sup>	1.354±0.031 <sup>bc</sup>	1.567±0.051 <sup>c</sup>
C	0	1.114±0.015 <sup>b</sup>	1.215±0.038 <sup>b</sup>	1.323±0.050 <sup>b</sup>	1.332±0.932 <sup>b</sup>	1.446±0.031 <sup>c</sup>	1.550±0.086 <sup>c</sup>

1) Growth rate ( $W_1/W_0$ ):Ratio of the body weight ( $W_1$ ) to initial body weight ( $W_0$ ), Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group. 2) See the legend of Table 1, 3) Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p<0.05$ ) between groups by Tukey(T) test

**Table 13. The feed efficiency ratio (FER) of rats fed alcohol and/or sample A, B and C**

Groups Contents	NOR <sup>1)</sup>	CON	A	B	C
FER <sup>2)</sup>	0.137±0.005 <sup>3)</sup>	0.074±0.018 <sup>b</sup>	0.138±0.008 <sup>a</sup>	0.122±0.005 <sup>a</sup>	0.134±0.014 <sup>a</sup>

1) See the legend of Table 1  
 2) FER (feed efficiency ratio) : The total amount of weight increased/the total intake of food , Values are mean ±S.E. of 10 rats per each group.  
 3) Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p<0.05$ ) between groups by Tukey(T) test

다) 흰쥐의 혈청중 ALT 및 AST활성

- 흰쥐에 알코올 및 시료 A, B 및 C를 6주간 급여하여 간기능의 지표로 이용되고 있는 혈청중 ALT 및 AST활성을 측정 한 결과는 Table 14와 같다. ALT활성에서, 알코올투여군인 CON은 NOR에 비하여 유의하게 상승되었다. 그러나 알코올과 김치시료를 병합급여함으로서 알코올투여로 상승된 ALT활성을 유의하게 저하시켜 정상군의 활성에 근접되었으나 시료간에 유의한 차이는 보이지 않았다. AST활성도 ALT활성변화와 유사한 경향을 나타냈다. 혈청중 ALT와 AST활성의 상승은 지질대사의 저해로 간세포 괴사 및 간조직 파괴가 진행됨에 따라 간중의 aminotransferase가 혈중으로 유출되므로써 높은 활성을 나타내는 것으로 보고되었는데, 본 실험에서 알코올과 시료의 병합투여로 알코올투여로 상승된 ALT 및 AST활성이 정상군에 근접되도록 유의하게 저하되었음은 김치시료가 알코올투여로 손상된 간세포 기능을 점차 회복시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Table 14. The activities of ALT and AST in serum of rats fed alcohol and/or sample A, B and C

Enzyme activities	6 weeks				
	NOR <sup>1)</sup>	CON	A	B	C
ALT <sup>2)</sup>	27.41±2.30 <sup>a3)</sup>	36.94±1.29 <sup>b</sup>	28.98±1.73 <sup>a</sup>	27.09±1.90 <sup>a</sup>	26.84±0.65 <sup>a</sup>
AST <sup>2)</sup>	123.67±4.63 <sup>a</sup>	158.74±8.97 <sup>b</sup>	129.90±5.64 <sup>a</sup>	127.56±8.45 <sup>a</sup>	125.7±4.21 <sup>a</sup>

1) See the legend of Table 1

2) Karmen unit/mL of serum Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group

3) Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey(T) test

라) 흰쥐의 간조직중 항산화효소활성

- 호기성 세포에서는 superoxide radical(O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), hydroxyl radical(OH<sup>·</sup>) 및

hydrogen peroxide( $H_2O_2$ )가 발생될 수 있으며 어떤 유해물질이나 약물 등에 폭로되었을 때나 병적 상태에서는 이들이 과다하게 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다. 일반적으로 oxygen free radical에 의한 조직 손상은 oxygen free radical의 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 야기되어 지는데 본 실험에서 유리기 생성에 관여하는 효소인 xanthine oxidase(XO)활성과 해독에 관여하는 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px활성을 측정 한 결과는 Table 6과 같다. 유리기 생성계 효소인 XO활성에서, 알코올투여군인 CON은 NOR에 비하여 유의하게 상승되었다. 그러나 알코올과 김치시료를 병합급여한 군은 알코올투여로 상승된 XO활성이 저하는 되었지만 유의성있는 변화는 나타내지는 못했으나 A군이 가장 우수하였다. XO는 xanthine 혹은 hypoxanthine과 반응하여 뇨산을 생성되고 이 뇨산은 체내에서 항산화작용을 나타내지만 만일 뇨산이 다량 생산되어 관절에 축적되면 통풍이 유발되고 심한 통증이 유발된다. 본 실험에서 알코올투여로 XO활성이 상승되었음은 알코올을 흰쥐에 만성적으로 투여시 XO활성이 상승된다는 보고와 일치하나 본 실험에서 알코올과 시료 병합급여군이 알코올투여로 상승된 XO활성을 유의하게 저하시키지 못했음은 시료가 유리라디칼의 생성 억제와 더불어 XO활성 저해작용에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다. 유리기 해독계 효소활성에서, catalase활성은 CON이 NOR에 비하여 유의적으로 상승되었으나 알코올과 시료를 병합급여한 군은 CON에 비하여 활성을 유의성있게 저하시켰다. 시료군간에 유의적인 차이는 없었으나 시료 C급여군이 제일 우수하였고, A, B의 순이었다. Catalase는 대부분의 조직에 존재하는 peroxisome에서  $H_2O_2$ 를 무독성의  $H_2O$ 로 환원시켜  $H_2O_2$  증가에 따른 조직 손상을 방어하는 효과가 있으며, GSH-Px에 비해  $K_m$ 값이 높기 때문에  $H_2O_2$ 의 농도가 높을 때 주로 작용한다. 본 연구에서 알코올투여로 catalase활성이 상승된 것은  $H_2O_2$ 와 같은 유리라디칼 생성이 증가된 것으로 생각된다. SOD활성은 CON이

NOR에 비하여 상승되었고 시료급여군은 CON에 비하여 저하는 되었으나 유의성있는 변화를 나타내지는 못했다. 시료군간에 유의적인 차이는 없었으나 시료 B, C A 순이었으며, 특히 B의 경우 NOR에 근접하였다. SOD는 metalloenzyme으로서 함유되어있는 금속이온(Cu, Zn, Mn 및 Fe)의 종류에 따라 구분되며, O<sub>2</sub>가 한 개의 전자를 받아들여 불완전 산화된 superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 전환시키는 O<sub>2</sub> · 소거효소다. 본 실험에서 ETH의 SOD활성이 NOR에 비하여 현저히 상승된 것은 알코올투여로 증가된 oxygen free radical를 소거하려는 생리적 적응현상으로 생각되며 이 활성은 시료급여로 저하되었다. GSH-Px의 활성은 CON이 NOR에 비하여 유의적으로 상승되었으며 시료급여군은 알코올투여로 상승된 GSH-Px활성을 정상군에 근접하게 저하시켰고 시료 A가 가장 우수하게 저하시켰다. GSH-Px는 세포질과 사립체내에 존재하기에 사립체내에서 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 소거에 일차적으로 작용하고 Km 값이 낮기 때문에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 낮을 때에도 작용한다. 또한 selenium(Se)을 함유하는 항산화계 효소로서 체내에서 NADP<sup>+</sup>를 전자수용체로하여 glutathione(GSH)를 산화형 glutathione(GSSG)과 물 그리고 기타 과산화물을 생성하는 반응을 촉매하므로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소독을 해독하는 효소이다. 이때 생성된 GSSG는 NADPH를 전자공여체로 glutathione reductase에 의하여 GSH로 환원되어 재이용된다. 이 때 사용된 NADPH는 주로 hexose monophosphate pathway(HMP)에 의해서 공급되어진다. 본 연구에서 ETH가 CON에 비하여 GSH-Px활성이 유의하게 상승된 것은 알코올에 의한 간세포독성유발로 증가된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 소거하기 위하여 나타난 결과로 생각된다.

Table 15. The activities of catalase, SOD, XO and GSH-Px in liver of rats fed alcohol and/or sample A, B and C

Enzyme activities	6 weeks				
	NOR <sup>1)</sup>	CON	A	B	C
Catalase <sup>2)</sup>	4,789.00 ±439.9 <sup>a6)</sup>	6,874.00 ±509.6 <sup>b</sup>	4,788.00 ±271.3 <sup>ab</sup>	4,807.00 ±279.2 <sup>ab</sup>	4,698.00 ±300.6 <sup>ab</sup>
SOD <sup>3)</sup>	22.41±2.05 <sup>a)</sup>	30.24±1.93 <sup>b)</sup>	26.42±3.52 <sup>ab</sup>	23.52±1.97 <sup>a</sup>	25.40±1.56 <sup>ab</sup>
XO <sup>4)</sup>	28.98±22.18 <sup>a)</sup>	43.45±1.00 <sup>b)</sup>	38.65±6.12 <sup>b)</sup>	40.05±9.02 <sup>b)</sup>	39.87±4.81 <sup>b)</sup>
GSH-Px <sup>5)</sup>	327.80±30.39 <sup>a</sup>	421.90±43.66 <sup>b)</sup>	330.50±60.91 <sup>a</sup>	342.55±14.09 <sup>a</sup>	355.30±49.93 <sup>a</sup>

1) See the legend of Table 1, 2)  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein, 3) decreased  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein

4)  $\text{mU}/\text{g}$  protein, 5) decreased NADPH  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein, Values are mean±S.E. of 10 rats per each group, 6) Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p<0.05$ ) between groups by Tukey(T) test

마) 흰쥐의 간 조직중 과산화지질함량

- 흰쥐에 알코올 및 김치시료를 6주간 급여 후 간 조직 중 과산화지질함량은 Table 16과 같다. 알코올을 투여한 CON은 NOR에 비하여 유의하게 증가되었다. 그러나 시료를 급여한 군은 알코올투여로 증가된 과산화지질함량을 CON에 비하여 감소는 시켰으나 유의한 효과는 아니었다. 시료별로 보면 A가 가장 우수하였고, B, C의 순이었다. 에탄올만을 투여한 군의 간 TBA 반응성산물량은 급성 혹은 만성적인 에탄올투여가 지질과산화물함량을 증가시킨다는 보고처럼 본 실험에서도 정상군에 비하여 높은 증가를 나타냈는데, 이 결과는 에탄올의 분해산물인 acetaldehyde가 cytosolic xanthine oxidase와 작용하여 부산물로 생성된  $\text{O}_2^-$ 의 양이 증가되어 세포막의 불포화지방산과 결합하여 지질과산화물 생성이 증가된 것으로 여겨지고, 또한 과량의 알코올 섭취 후 생성된 acetaldehyde는 tubulin과 반응하고 polymerization 반응을 방해하여 세포내에서 단백질 이동을 억제하기 때문에 알코올에 의한 간손상시 간세포내에 이상 단백질이 축적되므로써 간세포가 손상 및 괴사를 초래하게

되는 것으로 보고되고 있다. 특히 acetaldehyde가 low km상태의 acetaldehyde dehydrogenase에 의하여 산화작용을 일으키게 되면 유리 산소기가 함유된 더욱더 반응적인 물질이 생성됨으로서 지질과산화 작용을 촉진하게 된다. 지질과산화 반응은 여러 가지 독성화합물이나 약물에 의한 간 손상 발생의 가장 중요한 기전으로 이러한 기전은 세포내 산화적 스트레스의 증가, 즉 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소에 기인한 것으로 보고되고 있다.

**Table 16. The contents of thiobarbituric acid (TBA)-reactants in liver of rats fed alcohol and/or sample A, B and C**

Groups Content	6 weeks				
	NOR <sup>1)</sup>	CON	A	B	C
TBARS	6.09±0.24 <sup>a2)</sup>	9.71±0.42 <sup>bc</sup>	8.46±0.56 <sup>a</sup>	8.61±0.32 <sup>c</sup>	9.04±0.44 <sup>bcd</sup>

1) See the legend of Table 1, Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group

2) Values with different superscripts in the same row are significantly different ( $p < 0.05$ ) between groups by Tukey(T) test

바) 흰쥐의 간 조직 중 GSH함량

- 흰쥐에 알코올 및 김치시료를 6주간 급여 후 간 조직 중 GSH함량은 Table 17과 같다. GSH는 glutathione-S-transferase와 GSH-Px와 같은 외부의 산화적 세포 손상에 대한 방어작용을 나타내는 효소의 기질로 사용되며 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 저장 등 다양한 세포기능을 수행하는 중요한 물질이다. 본 실험에서 GSH함량이 CON이 NOR에 비하여 유의적으로 감소되었는데 이 결과는 GSH를 기질로 과산화수소를 제거하는 GSH-Px활성이 증가되어 GSH가 소모됨으로서 감소된 것으로 여겨지며, 알코올과 김치시료 병합급여군이 알코올만을 투여한 CON에 비하여 GSH함량이 유의성있게 증가되었고 그 함량이

정상치에 근접하게 되었으며, 시료중 A의 증가율이 가장 높았고, 다음으로 B, C 순이었다. 이 결과는 시료가 알코올 투여로 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등 free radical을 소거하여 GSH-Px의 소모가 줄어들어서 GSH의 소모량이 줄어들어 나타난 결과로 여겨진다. 알코올에 의한 간 조직중의 GSH함량의 감소기전에 대해서는 아직도 확실하게 밝혀져 있지는 않았으나 Videla 등의 주장처럼 알코올에 의해 생성된 과산화지질이 GSH와 반응하여 산화됨으로서 GSH함량이 감소된 것으로 보여진다. 그러나 시료가 알코올투여로 감소된 GSH함량을 약 60%정도 증가시켜 정상치에 유사하게 되었으나 Table 7에서 시료와 알코올 병합투여군의 지질과산화물량이 알코올만을 투여한 군에 비해 별다른 변화를 나타내지 않았음은 알코올에 의한 간 조직중의 GSH함량의 감소기전에 대해서는 아직도 확실하게 밝혀져 있지는 않았으나 알코올에 의한 간 조직중의 GSH함량의 감소기전에 대해서는 아직도 확실하게 밝혀져 있지는 않았으나 여러 문헌과 본 실험의 결과인 Table 7과 8을 연결지어 보면 지질과산화물량과 GSH함량사이에는 역상관 관계가 있음을 알 수 있다.

**Table 17. The contents of glutathione(GSH) in liver of rats fed alcohol and/or sample A, B and C**

Content \ Groups	6 weeks				
	NOR <sup>1)</sup>	CON	A	B	C
GSH (mg/g liver)	50.34±2.10 <sup>a2)</sup>	30.54±1.85 <sup>b</sup>	49.21±1.89 <sup>ac</sup>	48.56±2.56 <sup>a</sup>	45.89±2.46 <sup>a</sup>

1) See the legend of Table 1, Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group

2) Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey(T) test

다. 우량신균주를 이용하여 개발된 김치의 고지혈증 억제 효능

1) 체중증가율

- 흰쥐에 고콜레스테롤 식이와 김치시료를 6주간 급여하여 측정된 체중증가율은 Table 18와 같다. CON(고콜레스테롤식이만을 급여한 대조군)은 NOR(기본식이만을 급여한 정상군)에 비하여 체중증가율이 높았으나 김치재료를 병합급여한 전군(A,B,C)에서 CON에 비하여 감소하는 경향을 나타냈다. 특히 김치재료 C를 병합급여군의 체중증가율은 CON에 비하여 유의성있게 둔화되었다.

Table 18. Weight gain in rats fed high cholesterol diet

Groups	Growth rate <sup>2)</sup>					
	1	2	3	4	5	6
NOR <sup>1)</sup>	1.21±0.02 <sup>3)a</sup>	1.50±0.06 <sup>a</sup>	1.82±0.04 <sup>ac</sup>	2.11±0.02 <sup>a</sup>	2.48±0.04 <sup>a</sup>	2.84±0.10 <sup>a</sup>
CON	1.20±0.02 <sup>a</sup>	1.50±0.03 <sup>a</sup>	1.75±0.03 <sup>a</sup>	2.27±0.04 <sup>a</sup>	2.78±0.04 <sup>b</sup>	2.93±0.05 <sup>a</sup>
A	1.09±0.007 <sup>a</sup>	1.53±0.03 <sup>a</sup>	2.25±0.04 <sup>bc</sup>	2.26±0.06 <sup>a</sup>	2.51±0.05 <sup>a</sup>	2.72±0.05 <sup>ab</sup>
B	1.10±0.008 <sup>a</sup>	1.59±0.04 <sup>a</sup>	2.40±0.05 <sup>bc</sup>	2.45±0.04 <sup>b</sup>	2.63±0.05 <sup>a</sup>	2.83±0.04 <sup>a</sup>
C	1.17±0.01 <sup>a</sup>	1.44±0.03 <sup>ab</sup>	2.20±0.02 <sup>bc</sup>	2.13±0.02 <sup>a</sup>	2.38±0.03 <sup>a</sup>	2.62±0.03 <sup>b</sup>

1) See the legend of Table 1

2) Growth rate (  $W_1/W_0$  ) : Ratio of the body weight ( $W_1$ ) to initial body weight ( $W_0$ )

3) Mean ± SE(n=10), Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T)test.

2) 혈청 중 AST 및 ALT 활성

- 김치시료를 고콜레스테롤식이 급여 흰쥐에 6주간 투여 후 혈청 중 AST 및 ALT활성은 Table 19과 같다. AST 및 ALT활성에서, CON은 고콜레스테롤식이

급여로 NOR에 비하여 유의하게 증가했으나 김치시료 A,B,C 급여로 증가된 활성이 감소되었는데, 그 효과는 A가 가장 우수하였고 B는 유의한 감소효과를 나타내지 않았다. AST 및 AST활성은 고지방식이나 알코올 등으로 간 실질세포의 장애가 발생하여 혈청으로 방출되어 증가되는 효소로, 조직의 손상정도를 나타내는 대표적 염증수치를 나타내고 비특이적이며 활성의 증가는 세포장애정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐만 아니라 다른 혈중 유출 효소보다 더욱 예민하게 반응한다. 본 실험에서 고콜레스테롤식이 급여로 증가된 혈청 중 AST 및 ALT활성이 김치시료 A,B,C 급여로 유의하게 감소되었음은 고콜레스테롤식이 급여로 유발되는 간세포 손상의 예방과 치료에 이용이 기대된다.

**Table 19. Serum activities of aspartate aminotransferas(AST) and alanine aminotransferase(ALT) in rats fed high cholesterol diet for 6 weeks**

Group <sup>1)</sup>	Activity(Karmen unit/mL serum)	
	AST	ALT
NOR	117.63±9.46 <sup>a2)</sup>	32.09±3.00 <sup>a</sup>
CON	167.17±9.59 <sup>b</sup>	51.45±3.23 <sup>c</sup>
A	120.12±7.38 <sup>a</sup>	36.36±5.94 <sup>a</sup>
B	145.37±13.82 <sup>b</sup>	46.08±1.93 <sup>bc</sup>
C	125.86±12.78 <sup>a</sup>	40.98±5.61 <sup>ab</sup>

1) See the legend of Table 1.

2) Mean±S.E.(n=10), Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T) test.

### 3) 혈청 중 총콜레스테롤, 중성지질 및 인지질 농도

- 흰쥐에 고콜레스테롤식이 및 김치시료를 6주간 급여 후 혈청 중 총콜레스테롤, 중성지방 및 인지질 농도는 Table 20과 같다. 혈청 중 총콜레스테롤농도는 고콜레스테롤 식이를 급여한 CON이 NOR에 비하여 큰 폭으로 증가되었으며, 김치시료 A,B,C를 급여한 군은 CON에 비하여 각각 38.9%, 25.5%, 32.2%정도 유의하게 감소되었으나 NOR보다 높았다. 콜레스테롤은 세포막의 구성성분이며 스테로이드호르몬과 비타민 D의 전구물질로서 필수적인 성분이지만 과량일 경우 고지혈증, 동맥경화증, 심장질환과 담석증 등 각종 심장순환기계질환이 유발된다. 혈청중 총콜레스테롤농도는 고콜레스테롤식이 급여로 간장내 유리콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테르가 다량 축적되어 증가되며, 식이 콜레스테롤 제한, polyunsaturated fatty acid(PUFA)섭취, 소장에서 중성지방 합성과 chylomicron분비증가, 간장에서 중성지방 합성증가, VLDL과 LDL-콜레스테롤합성과 분비증가, HDL-콜레스테롤 합성 저하 및 lipase활성 감소로 말초조직에서 중성지질이 제거되어 감소된다. 중성지방 농도는 고콜레스테롤 식이 급여로 NOR에 비하여 유의하게 증가되었고 김치시료 급여로 B는 CON에 비하여 유의한 감소를 나타내지는 않았으나 A와 C는 큰 폭으로 감소되어 NOR에 근접하였다. 중성지방 농도는 피하지방으로부터 유출된 지방산, 간세포내에서 합성된 지방산 및 chylomicron remnant중의 중성지방에서 가수분해된 지방산 등의 공급이 증가되어 상승되는데, 본 실험에서 김치시료 급여군의 농도가 CON보다 낮은 것은 시료가 모세혈관벽의 지단백 분해효소(lipoprotein lipase)를 활성화하여 중성지방의 주요 운반체인 킬로미크론과 VLDL의 분해를 더욱 촉진시켜 나타난 결과로 생각되나 앞으로 이에 대한 구체적인 실험이 요구된다. 인지질농도는 고지방식이 급여로 지방간이 발병되면 감소되는데, 본 실험에서 고콜레스테롤식이급여로 NOR에 비하여는 다량 감소됐고, 김치시료 급여로 고콜레스테롤식이급여로 감소된 농도가 NOR에 근접하게 증가됐다. 고지혈증 중 발생빈도가 높은 고콜레스테롤혈증과 고중성지방혈증은 당뇨병, 내분비질환, 유전적인 소인, 간 질환 및 신장질환 등에 인한 2차적인 발병과 운

동부족, 식이, 노화 및 환경인자 등 다양한 요인으로 유발되며, 심장순환기계질환 (coronary heart disease, CHD)의 유발인자로는 여러 가지 복합적인 요인이 있으나 그 중에서도 혈청 중 콜레스테롤농도가 주요한 인자로 알려져 있고 중성지질 농도 및 지단백, 혈장 thromboxane A<sub>2</sub>(TXA<sub>2</sub>)형성 등이 문제시되고 있는데, 본 실험에서 김치시료 급여가 고콜레스테롤식으로 증가된 총콜레스테롤과 중성지방의 농도의 감소 및 감소된 인지질 농도를 대조군에 비하여 유의하게 증가시켰음은 동맥경화 등 심장순환기계 질환 및 지방간 진행을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 예방할 수 있을 것으로 추정된다.

**Table 20. Serum concentrations of triglyceride, total cholesterol and phospholipid in rats fed high cholesterol diet for 6 weeks**

Group <sup>1)</sup>	Concentration(mg/dL)		
	Triglyceride	Total cholesterol	Phospholipid
NOR	51.99±3.75 <sup>a</sup>	128.90±12.03 <sup>a</sup>	248.95±27.29 <sup>a</sup>
CON	69.02±8.14 <sup>b</sup>	324.58±40.37 <sup>b</sup>	193.39±26.62 <sup>b</sup>
A	52.54±2.54 <sup>ab</sup>	198.16±16.68 <sup>a</sup>	232.04±12.71 <sup>a</sup>
B	55.25±4.81 <sup>ab</sup>	240.83±19.29 <sup>c</sup>	220.27±18.27 <sup>a</sup>
C	56.62±6.39 <sup>ab</sup>	220.10± 9.77 <sup>c</sup>	230.03±22.50 <sup>a</sup>

1) See the legend of Table 1.

2) Mean±S.E.(n=10), Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T) test.

#### 4) 혈청 중 유리콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테르 농도

- 고콜레스테롤식이와 김치시료를 6주간 급여한 흰쥐의 혈청 중 유리콜레스테롤, 콜레스테릴 에스테르 농도 및 콜레스테릴 에스테르의 비율은 Table 5와 같다. 혈액 중 콜레스테롤은 대부분 소장에서 흡수되어 80%정도가 지방산과 결합하여 콜레스테릴 에스테르 형태로 점막세포에 존재하고 나머지는 유리형으로 존재하며, 총콜레스테롤에 대한 콜레스테릴 에스테르의 비는 약 70% 전후가 정상적이고 총콜레스테롤에 대한 콜레스테릴 에스테르 비율 저하는 간질환 진단에 있어서 중요한 지표가 되며, 고콜레스테롤혈증일 때 상승된다. 유리콜레스테롤 농도의 경우, 고콜레스테롤 식이 급여로 NOR에 비하여 약 53.8%가 증가되었고 김치시료를 급여한 전군에서 콜레스테롤 급여로 유의하게 증가된 유리콜레스테롤 농도가 NOR의 농도와 근접하게 감소되었다. 특히 김치시료 A,C를 급여한 군은 NOR보다 농도가 더 낮았다. 콜레스테릴 에스테르 농도의 경우, 고콜레스테롤식이 급여로 NOR에 비하여 약 191.2%가 증가되었고 김치시료 A,B,C를 급여한 군은 NOR의 농도에는 미치지 못했으나 CON에 비하여 각각 45.3%, 31.4%, 39.7%가 감소되어 유의한 효과를 나타냈다. 총콜레스테롤에 대한 콜레스테릴 에스테르의 비율은 고콜레스테롤 식이 급여로 NOR에 비하여 13%이상 증가되었으나 김치시료 급여로 CON에 비하여 7-10%가 감소되었다. 이 실험결과를 Table 의 인지질 농도 증가와 관련지어볼 때 김치시료가 고콜레스테롤혈증의 개선 및 예방에 유효할 것으로 예견된다.

**Table 21. Serum concentrations of free cholesterol, cholesteryl ester and cholesteryl ester ratio in rats fed high cholesterol diet for 6 weeks**

Group <sup>1)</sup>	concentrations(mg/dL)		cholesteryl ester ratio(%) <sup>2)</sup>
	free cholesterol	cholesteryl ester	
NOR	29.66±2.90 <sup>a</sup>	99.24±15.79 <sup>a</sup>	76.99
CON	45.62±4.74 <sup>b</sup>	288.96±42.39 <sup>b</sup>	89.03
A	25.22±1.84 <sup>a</sup>	157.94±21.69 <sup>a</sup>	77.84
B	28.80±3.80 <sup>a</sup>	198.22±25.69 <sup>c</sup>	82.40
C	27.88±8.36 <sup>a</sup>	174.12±18.39 <sup>c</sup>	79.40

1) See the legend of Table 1.

2) Cholesteryl ester ratio(%) : Cholesteryl ester / Total cholesterol×100

3) Mean±S.E.(n=10), Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T) test.

**5) 혈청 중 LDL-콜레스테롤농도, HDL-콜레스테롤농도, HDL-콜레스테롤농도/총콜레스테롤농도 및 동맥경화지수**

- 김치시료와 고콜레스테롤식이를 6주간 흰쥐에 급여시 혈청 중 LDL- 및 HDL-콜레스테롤농도, HDL-콜레스테롤농도/총콜레스테롤농도의 비와 동맥경화지수에 미치는 영향은 Table 22와 같다. LDL-콜레스테롤농도는 고콜레스테롤식이 급여로 NOR보다 90%이상 증가했으나 김치시료 A,B,C 급여로 CON에 비하여 각각 14.0%, 14.3%, 24.7% 유의하게 감소했다. 정상상태에서는 혈액 중 지단백의 생성과 제거가 일정하게 유지되나 균형이 깨어지면 간에서 혈액으로 운반되는 LDL-콜레스테롤양이 다량 증가되고 혈관벽에 축적되므로써 고콜레스테롤혈증이 유발되며, 산화된 LDL은 대식세포에 더욱 잘 포획되어 foam cell을 형성하므로써 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 한다. 반면,

HDL-콜레스테롤농도는 고콜레스테롤식이 급여로 NOR에 비하여 34.1%가 감소되었으나 김치시료 A,B,C 급여로 CON에 비하여 30.6%, 14.8%, 25.0%가 증가되어 고콜레스테롤식이급여로 감소된 HDL-콜레스테롤농도가 유의하게 증가되었다. HDL-콜레스테롤은 말초조직이나 혈액 중에 축적된 콜레스테롤을 콜레스테롤 에스테르로 만드는 반응을 촉진하고 간으로 역수송을 촉진하며 이로 인하여 담즙산 배설이 촉진되므로써 혈액 중 콜레스테롤농도를 저하시켜 동맥경화증의 개선 및 예방에 효과가 있으며, LDL-콜레스테롤 농도와는 역상관 관계를 유지한다. 따라서 혈중 총콜레스테롤농도 자체보다 총콜레스테롤농도에 대한 HDL-콜레스테롤농도의 비 또는 HDL-콜레스테롤농도에 대한 LDL-콜레스테롤농도의 비가 심혈관질환의 발병을 예견하는 좋은 지표가 된다. 고콜레스테롤식이 급여로 224%가 증가된 동맥경화지수는 질경이 에틸아세테이트 분획 투여로 CON에 비하여 55.6%, 63.4%가 감소됨으로써 동맥경화 발병 위험율이 NOR에 비해서는 높았으나 유의하게 낮았다. HDL-콜레스테롤농도/총콜레스테롤농도비는 고콜레스테롤식이 급여로 정상군보다 71.7%가 감소했으나 김치시료 A,B,C급여로 CON에 비하여 150.1%, 76.9%, 107%의 유의한 증가를 나타냈다. 동맥경화증은 여러 가지 원인에 의하여 유발되는 매우 복잡한 질병으로 그 병리발생의 원인과 기전에 대하여는 아직도 분명치 못한 점이 많이 있지만, 본 실험에서 김치시료를 급여하여 LDL-콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수의 감소, HDL-콜레스테롤농도 및 총콜레스테롤농도에 대한 HDL-콜레스테롤농도의 비가 대조군에 비하여 유의하게 증가된 것은 지방저하 뿐만 아니라 동맥경화의 예방 및 치료에 도움을 줄 것으로 생각된다.

**Table 22. Serum concentrations of LDL-cholesterol and HDL-cholesterol, HDL-cholesterol/total cholesterol and AI in rats fed high cholesterol diet for 6 weeks**

Group <sup>1)</sup>	concentration(mg/dL)		HDL-C/TC <sup>2)</sup>	AI <sup>3)</sup>
	LDL-cholesterol	HDL-cholesterol		
NOR	61.13±29.79 <sup>a</sup>	59.37±6.44 <sup>a</sup>	0.46±0.42 <sup>a</sup>	1.25
CON	116.34±33.24 <sup>b</sup>	39.13±8.65 <sup>b</sup>	0.13±0.17 <sup>b</sup>	7.30
A	87.76±28.49 <sup>a</sup>	51.09±4.95 <sup>a</sup>	0.35±0.30 <sup>a</sup>	2.84
B	87.59±10.71 <sup>a</sup>	44.93±9.26 <sup>a</sup>	0.23±0.43 <sup>c</sup>	3.24
C	99.74±8.48 <sup>a</sup>	48.29±8.6 <sup>a</sup>	0.27±0.32 <sup>c</sup>	2.6

1) See the legend of Table 1.

2) HDL-C/TC=HDL-cholesterol/total cholesterol

3) AI(atherosclerotic index) =(total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol

4) Mean±S.E.(n=10), Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T) test

## 제 3 절 Bifidobacteria를 이용한 기능성 김치의 제조

### 1. 연구수행방법

#### 가. 실험 대상자 선정

- 인체 실험 대상자는 로마기준 II를 만족하는 기능성 변비 증세가 있는 사람을 대상으로 하였다. 즉 최소 12주 동안 1주에 3회 미만의 배변 횟수, 과도한 힘주기(>1/4 배변), 단단한 대변 형태(>1/4 배변), 불완전 배출감(>1/4 배변)의 4가지 증상들 중 2가지 이상을 지닌 사람을 대상으로 하였다. 설문지(Fig. 1)를 통하여 변비가 있는 성인을 선택하였으며 연구 참가에 앞서, 연구의 목적, 내용, 방법 등에 대하여 충분히 설명을 듣고 서면 동의한 20-30세의 사람 10명을 최종 선정하였다. 이들은 실험 기간동안 생균제, 항생제, 유산균 발효 제품 등 장내 균총에 직접적으로 영향을 줄 수 있는 식품은 제한하였다. 실험 기간은 총 2주 동안 김치를 공급하였고(Fig.2), 김치는 발효 적숙기의 김치(pH 4.5-4.3)에 미생물을 첨가( $10^{10}$ cfu :  $10^9$ /g)하여 100g씩 공급하였다.

Before experiment    **Questionnaire**

나이 (    )    이름(    )

1. 질병(유,    무) 및 약물 복용(예 , 아니오)

2. 화장실에 가는 횟수는?  
 ① 매일    ② 2일에 한번    ③ 3-4일에 한번    ④ 일주일에 한번

3. 아침식사를 하십니까? (예, 아니오)

3-1. 아침 식사로 섭취하는 식품을 구체적으로 써 주십시오.

4. 식사 횟수는?    ① 1일 3회    ② 1일 2번    ③ 1일 1회    ④ 기타(    )

5. 김치를 식사때마다 섭취하십니까, 섭취량은 ?  
 (예,    아니오)    섭취량 : ex) 김치 2쪽

6. 1일 물의 섭취량은? ① 5컵    ② 3-4컵    ③ 1-2컵    ④ 기타(    )

7. 다음 중 본인에 해당하는 것에 ○표 하시오

① 배변횟수가 1주일에 2회 이하 (    )

② 변이 딱딱하고 건조하다(전체 배변의 25% 이상) (    )

③ 배변할 때 힘들다(전체 배변의 25% 이상) (    )

④ 배변후에도 후증감(잔변감)이 있다(전체 배변의 25% 이상) (    )

⑤ 변의 양이 적다(35g 미만) (    )

⑥ 가스가 자주 차고, 배가 부어 오른다 (    )

**Fig. 1. Survey sheet**

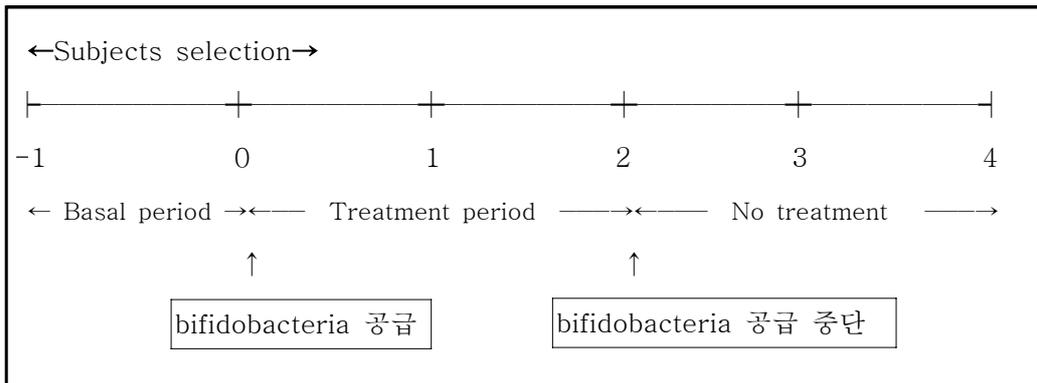


Fig. 2. Study algorithm. Time schedule for selection of subjects and bifidobacteria supplement treatment

#### 나. 미생물 준비 및 김치 제조

- 김치 제조를 위하여 배추는 4등분하고 12% 소금물에 6시간 절인 후, 흐르는 물로 2회 행구고 6시간 탈수시켰다. 김치 제조시 사용된 부재료의 종류 및 배합비는 다음과 같이 절인 배추 100g당 무10g, 고추가루 3g, 마늘 1.4g, 양파 1.5g, 파 2g, 생강 0.6g, 멸치젓 2g, 새우젓 1g, 찹쌀 풀 0.5g, 설탕 0.5g의 비율로 제조하였다. 비피도박테리움 DY-64는 MRS(0.05% L-시스테인 첨가) 배지에서 37 ℃, 48시간 배양하여, 김치 1 g당  $10^9$ cfu/g 수준으로 첨가하여 제조하였다.

#### 다. 통변에 대한 영향조사

- 연구기간 정기적으로 설문지를 통해, 김치 섭취 여부, 배변횟수, 배변시 과도한 힘주기, 완전한 배변감, 복부 불편감 및 복통 등의 항목을 평가하였다.

#### 라. 분변 미생물 균총 조사

- 실험기간 동안 매 주마다 대상자의 분변을 채취하여 실험에 이용하였다. 분변을 혐기성 희석액에 십진 희석하고 각각의 선택배지를 사용하여 배양하였다. 분변 중 해당 미생물의 수는 각각의 배지에서 자란 colony의 숫자를 조사한 뒤 희석배수를 곱하여 분변 1g 당 cfu(colony forming unit)로 나타내었다.
- 총 혐기성 균의 비선택배지로는 BL(Glucose - blood liver), EG(Eggerth-Gagnon) agar를 사용하였고, 총 호기성 미생물, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*의 선택배지로는 각각 Blood agar, NBGT(Neomycin sulfate - brilliant green - taurocholate) agar, BS(*Bifidobacterium* - selective) agar, NN(Neomycin - nagler) agar, DHL(Desoxycholate - hydrogen sulfide - lactose) agar, m-LBS(*Lactobacillus*-selective) agar, PEES(Phenylethylalcohol-egg yolk-selective) agar 등을 사용하였다. 이러한 배지에 십진 희석한 시료액을 도말하고, 37℃에서 48시간 배양하였다. 호기성 미생물은 37℃에서 48시간 호기 배양하였고, 혐기성 미생물의 배양을 위해서는 Gas Pak anaerobic jar(Vented#4360627, BBL, U.S.A)를 이용하여 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. *Bifidobacteria*의 경우 비선택배지에 출현하는 colony



```

iti          GAGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAA-GCTTTCGCGGTATGGGATGGGGTTCG 210
pseudolongum2 GATGTTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGNAAA-GCTTTCGCGGTATGGGATGGGGTTCG 235
longum1      GATGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAA-GCTTTCGCGGTATGGGATGGGGTTCG 236
longum2      GATGCTCCAGTTGATCGCATGGTCTTCTGGGAAA-GCTTTCGCGGTATGGGATGGGGTTCG 207
adolescentis GATGCTCCAGTTGGATGCATGTCTTCTGGGAAA-GATTCATCGGTATGGGATGGGGTTCG 206
catenulatum  GATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTGGNAAAGATTTCATCGGTATGGGATGGGGTTCG 237
          **** *
          ****
          ** ** *
          *
          ***
          ****
          *****

          ←-----
DY-64       TGGGTAG-CACCCGAAGCCGGT-GGCCCGACCCTTGTGGGG-GGAGCCGTCTAAGGTGAG 1389
lactis      TGGGTAG-CACCCGAAGCCGGT-GGCCCGACCCTTGTGGGG-GGAGCCGTCTAAGGTGAG 1444
animalis    TGGGTAG-CACCCGAAGCCGGT-GGCCCGACCCTTGTGGGG-GGAGCCGTCTAAGGTGAG 1452
Infantis    TGGGTAGACACCCGAAGCCGGTGGCCCGACCCTTGTGGG-GGAGCCGTCTAAGGTGAA 1460
pseudologum TGGGCAG-CACCCGAAGACGGT-GGCCTAACCCCTTGTGGGG-GGAGCCGTC----- 1421
bifidum1    TGGGCAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGATGGAGCCGTCTAAGGTGAG 1412
bifidum2    TGGGCAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGATGGAGCCGTCTAAGGTGAG 1434
breve1      TGGGCAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGC GGAGGGGAGCCGTCTAAGGTGAG 1456
iti         TGGGTAG-CACCCG----- 1390
pseudolongum TGGGCAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCTNACCCTTGTGGGATGGAGCCGTCTNAGGTGAG 1460
longum1     TGGGCAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGATGGAGCCGTCTAAGGTGAG 1461
longum2     TGGGCAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGATGGAGCCGTCTAAGGTGAG 1432
adolescentis TGGGTAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCCAACCTTTTGGGGGG---AGCCGTCTAAGGTGAG 1432
catenulatum TGGGTAG-CACCCGAAGCCGGTGGCCTNACCNTTGTGGGATGGAGCCGTCTAAGGTGAG 1463
          **** *
          *****

```

### 바. *B. animalis* DY-64 확인

- 실험 대상자의 분변 bifidobacteria 중 *B. animalis* DY-64를 확인하기 위하여 BS 배지에 존재하는 콜로니를 이용하여 콜로니 PCR (Perkin-Elimer, Boston, MA)을 실시하였다. 배양된 colony에 대하여 사용된 프라이머는 다음과 같다.

정방향 프라이머: 5-AATACCGGATGCTCCGCTC- 3 (서열번호 2)

역방향 프라이머: 5-CCTTAGACGGCTCCCCC- 3 (서열번호 3)

- 콜로니 PCR 반응액은 25 pmole의 각 프라이머, premix 2 $\mu$ l(Bioneer 社,대전), SDDW 5  $\mu$ l를 사용하였다. PCR 증폭조건은 94 $^{\circ}$ C, 5분간 변성(denaturation)시키고 94 $^{\circ}$ C 에서 30초, 60 $^{\circ}$ C에서 15초, 72 $^{\circ}$ C 에서 30초 조건에서 30 사이클을 수행한 후 72 $^{\circ}$ C에서 3분간 증폭하는 조건으로 실시하였다. PCR 반응 후 생성된 PCR 산물은 에티뎀 브로마이드(ethidium bromide)가 포함된 아가로즈 젤 상에서 전기영동을 실시하고 자외선을 조사하여 확인하였다.

## 사. 유해 효소

### 1) $\beta$ -Glucuronidase activity

- 분변을 75mM potassium phosphate buffer에 희석한 후 3mM phenolphthalein glucuronide와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 glycine buffer(0.2M, pH 11.7)로 반응을 정지시킨 후 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2) $\beta$ -Glucosidase activity

- 분변을 75mM potassium phosphate buffer에 희석한 후 기질인 50mM p-nitrophenyl  $\beta$ -D-glucopyranoside (Sigma, USA)와 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시키고 glycine buffer로 반응을 정지시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 아. 면역력 측정

- 실험기간동안 매1주마다 대상자의 혈액을 채취하여 실험에 이용하였다.

TNF- $\alpha$ 와 IL-2의 생성은 Dong 등의 방법을 개량하여 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 방법으로 정량하였다.

## 2. 연구내용 및 결과

### 가. 대상자의 특성

- 대상자 10명은 실험 기간동안 모두 요구사항을 준수하였으며, 임상 식품은 모두 75% 이상 섭취하였다. 실험 시작 전 실험 대상자는 로마기준 II의 4가지 증상(최소 12주 동안 1주에 3회 미만의 배변 횟수, 과도한 힘주기(>1/4 배변), 단단한 대변 형태(>1/4 배변), 불완전 배출감(>1/4 배변))들 중 2가지 이상을 지닌 사람들이었다.

### 나. 변비 호전 효과

- 김치 섭취 전, 섭취 중 그리고 섭취 중단 후의 다섯 기간동안 배변 횟수, 과도한 힘주기, 완전 배변감 그리고 대변의 굳기를 기간별로 비교하였다(Table 1). 배변 횟수는 총 배변 횟수를 관찰 기간 일수로 나누어 1일 평균 배변 횟수로 표시하였다. 김치 섭취 과정 중에는 유의하게 배변횟수가 증가하였으며, 섭취 중지 후에는 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 배변시 과도한 힘주기, 완전 배변감, 배변 굳기는 김치 섭취 과정 중, 이후에 계속적으로 감소하였다. 복부 불편감 및 복통은 김치 섭취기간 동안 감소하다가 섭취 중지 2주후부터

다시 증가하는 경향을 나타내었다.

**Table 1. Change of constipation symptoms of subjects during experimental periods.**

Items	Before	During 1 wks	During 2 wks	After 1 wks	After 2 wks
Straining(%)	60	10	10	10	10
Bowel movement frequency (BM/day)	0.31 ± 0.93 <sup>a</sup>	0.62 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.65 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.43 ± 0.12 <sup>b</sup>	0.39 ± 0.12 <sup>ab</sup>
Sense of complete evacuation (%)	100	30	30	30	40
Stool consistency (hard stool, %)	30	10	0	10	10
Abdominal discomfort/pain (%)	80	20	20	20	30

#### 다. 분변 미생물 균총

- 김치 섭취 전과 섭취 과정 중, 섭취 중단 후의 미생물 균총은 Table 2와 같다. 실험 시작 전 대상자의 분변에 우점종으로 존재하는 장내 미생물은 bifidobacteria, Clostridium, bacteroides 임을 알 수 있었다. bifidobacteria가 함유된 김치를 공급하는 동안 bifidobacteria는 유의적으로 증가(log 1 cycle)하였고, 김치 섭취 중단 2주째부터는 감소하였다. 김치 공급 기간 중에 *Bacteroides*, *Clostridium*, *E. coli*, *Staphylococcus* 등은 유의적으로 감소하였고 섭취 중단 후에는 다시 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 bifidobacteria의 공급으로 장내에서 산과 유해 미생물 억제 물질을 생성함으로써 유해 미생

물들의 감소가 일어났을 것으로 생각된다. Lactobacillus는 김치 섭취기간 동안 유의적으로 증가하였고 섭취 중단 이후에도 유의적으로 높게 유지 되었다. 이는 김치를 섭취함으로써 인해 lactobacillus의 수가 증가하였고, 또한 bifidobacteria에 의해 lactobacillus의 생육이 촉진되었을 것으로 생각된다.

**Table 2. Effect of Bifidobacteria Kimchi on the component of human fecal bacteria**

Microorganism	Before	During 1 wks	During 2 wks	After 1 wks	After 2 wks
Total anaerobic bacteria	9.75 ± 0.55 <sup>1</sup>	9.97 ± 0.27	9.99 ± 0.30	10.04 ± 0.42	9.84 ± 0.71
Total aerobic bacteria	7.32 ± 0.67 <sup>2</sup>	7.28 ± 0.82 <sup>a</sup>	7.37 ± 0.63 <sup>ab</sup>	7.79 ± 0.44 <sup>bc</sup>	7.89 ± 0.63 <sup>c</sup>
<i>Bacteroides</i>	8.51 ± 0.60 <sup>b</sup>	8.40 ± 0.30 <sup>a</sup>	8.40 ± 0.40 <sup>a</sup>	8.58 ± 0.50 <sup>a</sup>	8.58 ± 0.48 <sup>a</sup>
<i>Bifidobacterium</i>	8.79 ± 0.72 <sup>a</sup>	9.68 ± 0.20 <sup>b</sup>	9.65 ± 0.26 <sup>b</sup>	9.31 ± 0.53 <sup>b</sup>	8.92 ± 0.74 <sup>a</sup>
<i>Cl. perfringens</i>	8.64 ± 0.78 <sup>b</sup>	8.08 ± 0.82 <sup>a</sup>	8.15 ± 0.48 <sup>a</sup>	8.31 ± 0.72 <sup>ab</sup>	8.62 ± 0.28 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	6.76 ± 0.58 <sup>b</sup>	5.99 ± 0.50 <sup>a</sup>	6.06 ± 0.32 <sup>a</sup>	6.90 ± 0.56 <sup>b</sup>	6.97 ± 0.50 <sup>b</sup>
<i>Staphylococcus</i>	5.79 ± 0.46 <sup>d</sup>	4.52 ± 0.64 <sup>a</sup>	4.95 ± 0.30 <sup>b</sup>	5.36 ± 0.47 <sup>c</sup>	5.08 ± 0.45 <sup>bc</sup>
<i>Lactobacillus</i>	5.32 ± 0.86 <sup>a</sup>	6.02 ± 0.96 <sup>b</sup>	6.11 ± 0.91 <sup>b</sup>	6.17 ± 1.19 <sup>b</sup>	6.50 ± 1.16 <sup>b</sup>

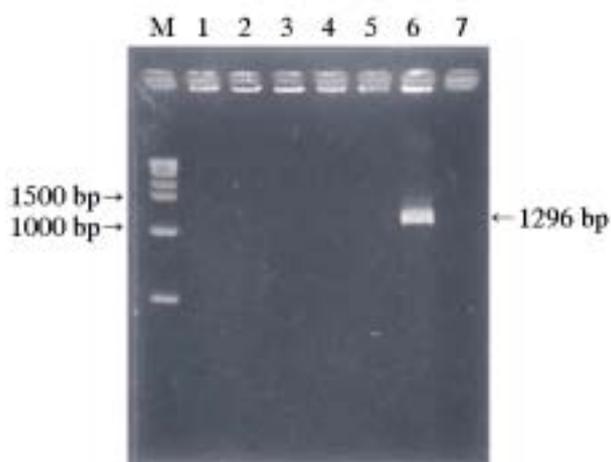
<sup>1</sup>Mean±SD, Data were analyzed by Duncan's multiple range test.

<sup>2</sup>Different superscripts within a row indicate significant difference (p<0.05)

#### 라. *B. animalis* DY-64 확인

- 김치에 함유된 *B. animalis* DY-64를 확인하기 위해 specific primer를 제작하여 PCR을 실시하였다. Fig. 3과 같이 *B. longum*, *B. bifidum*, *B. pseudolongum*, *B. adolescentis* 및 인체 장내에 존재하는 bifidobacteria strain

을 대상으로 PCR을 실시한 결과 본 연구에서 제작한 primer, Fip 164, Fir 164, 는 *B. animalis* DY-64 균주만을 선택적으로 증폭시켰다. 이 방법을 이용하여 김치 섭취 후 분변내 *B. animalis* DY-64의 증가를 확인하였다. Fig. 4는 김치 섭취 후 장내 bifidobacteria에서 *B. animalis* DY-64가 차지하는 비율을 보여준다. 김치 섭취 전에 대상자의 분변에서 *B. animalis* DY-64는 전혀 검출되지 않았으나 섭취 1주후에 총 bifidobacteria의 84%, 2주후에는 88%가 *B. animalis* DY-64( $8 \log_{10}$ )로 확인되었다. 이는 *B. animalis* DY-64가 김치 중에서 사멸하지 않고 생존함을 보여주며, 또한 섭취시 장내 위산이나, 담즙산의 영향을 받지 않고 장내로 이동됨을 의미한다.



**Fig. 3. Electrophoretic analysis of multi bifidobacteria.** The DNAs were electrophoresed on 2% agarose gel in TAE buffer for 1hr at 50V/cm, and the DNA bands were stained with ethidium bromide. 1 lane, 1 Kb DNA ladder marker; 2 lane, *B. longum*; 3 lane, *B. bifidum*; 4 lane, *B. pseudolongum*; 5 lane, *B. adolescentis*; 6 lanes, *Bifidobacterium animalis* DY-64; 7 lane, negative control.

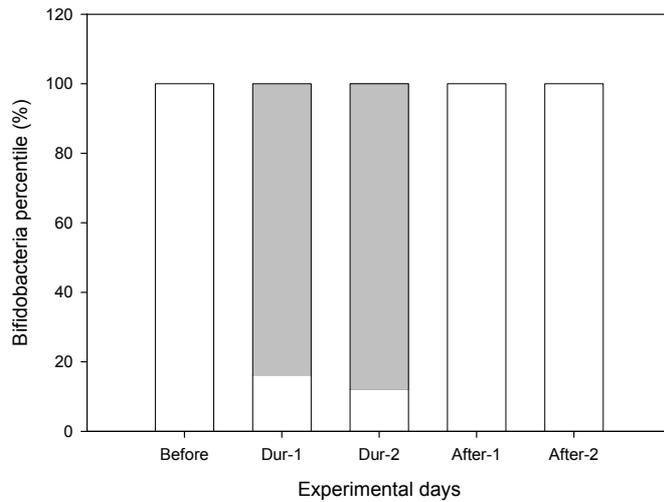


Fig 4. Proportion of bifidobacteria in experimental group with a *B. animalis* DY-64 count above (■) or other bifidobacteria (□)  $8 \log_{10}$  colony-forming units(CFU)/g feces before (days -7), during (days 7 and 14), and after (day 21 and 28) supplementation.

#### 마. 유해 효소

##### 1) $\beta$ -Glucuronidase activity

- 분변 내 유해 효소인  $\beta$ -glucuronidase는 김치 섭취 전에 분변 g당  $16.98 \pm 3.77$ Unit/min을 나타내었고, 섭취 과정동안 유의적으로 감소하여 2주 후에는  $8.02 \pm 2.74$ Unit/min였다 (Table 3). 그러나 김치 섭취 중단 후에는 서서히 증가하는 경향을 나타내었다.  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase, azoreductase, nitroreductase, tryptophanase 등은 대사산물로 발암 성분을 내는 유해효소로 알려져 있다.  $\beta$ -glucuronidase는 장간 순환 물질의 탈포합에 주로 관여한다. 즉, 간에서는 지용성 독성 물질에 글루쿠론산이나 황산 등의 친수성 그룹을 포함시

켜 수용성을 증가시킴으로서 장이나 소변으로의 배설을 촉진한다. 이들  $\beta$ -glucuronidase가 장내에 존재하면 포함된 독성물질과 발암 물질이 다시 탈포합되어 지용성이 증가되고 결과적으로 상피세포를 통한 체내 흡수가 증가되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 bifidobacteria가 함유된 김치 섭취동안 분변 내  $\beta$ -glucuronidase 활성이 낮아졌으며 이는 인체에서 발암 가능성을 낮추어 긍정적인 효과를 주는 것으로 생각된다.

## 2) $\beta$ -Glucosidase activity

- 분변 내 유효 효소인  $\beta$ -glucosidase는 김치 섭취 전에 분변 g당  $16.55 \pm 3.11$  Unit/min을 나타내었고, 섭취 과정동안 유의적으로 감소하여 2주후에는  $9.05 \pm 2.32$  Unit/min를 나타내었다. 그러나 김치 섭취 중단 후에는 섭취전과 유사한 정도로 증가하는 경향을 나타내었다.

**Table. 3  $\beta$ -Glucuronidase and  $\beta$ -Glucosidase activity**

Unit/g/min	Before	During 1 wks	During 2 wks	After 1 wks	After 2 wks
Glucuronidase	$16.98 \pm 3.77^{c1}$	$12.67 \pm 3.14^b$	$8.02 \pm 2.74^a$	$11.32 \pm 3.43^{ab}$	$15.28 \pm 3.38^{bc}$
Glucosidase	$16.55 \pm 3.11^{c1}$	$13.03 \pm 2.48^b$	$9.05 \pm 2.32^a$	$12.12 \pm 3.27^{ab}$	$13.91 \pm 2.44^{bc}$

<sup>1</sup>Mean $\pm$ SD, Data were analyzed by Duncan's multiple range test.

<sup>2</sup>Different superscripts within a row indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

## 바. 면역력 측정

### 1) IL-2(interleukine)

- 혈액 내 면역지표인 IL-2와 TNF- $\alpha$ 는 김치 섭취 전에 serum 1ml당  $5.13 \pm 1.11$  pg/mL을 나타내었고, 섭취 2주후에 유의적으로 증가하였다 (Table 4). 김치 공급이 중단된 후부터는 감소하였다. *B. lactis*를 흰쥐에 공급시 분변내 IgA, anti- $\beta$ -lactoglobulin IgA가 증가한다고 보고되었다.

### 2) TNF- $\alpha$

- 혈액 내 면역지표인 TNF- $\alpha$ 는 김치 섭취 전에 serum 1ml당  $14.83 \pm 2.77$  pg/mL을 나타내었고, 섭취 기간 동안 유의적으로 증가하였다. 김치 공급이 중단된 후부터는 감소하였다.

Table 4. IL-2 and TNF- $\alpha$

pg/mL	Before	During 1 wks	During 2 wks	After 1 wks	After 2 wks
TNF- $\alpha$	$14.83 \pm 2.77^{a1}$	$17.16 \pm 3.68^{ab}$	$19.34 \pm 3.01^b$	$15.85 \pm 2.41^a$	$15.42 \pm 3.41^a$
IL-2	$5.13 \pm 1.11^{a2}$	$7.48 \pm 3.61^{ab}$	$9.55 \pm 2.99^b$	$7.33 \pm 2.68^{ab}$	$7.36 \pm 3.51^{ab}$

<sup>1</sup>Mean $\pm$ SD, Data were analyzed by Duncan's multiple range test.

<sup>2</sup>Different superscripts within a row indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

## 제 4 절 김치 종균의 대량 생산을 위한 배양조건 확립 및 안정화 기술 개발

### 1. 서론

- 본 연구과제의 이론적인 배경은 서양에서 개발되어 현재 사용되어온 발효 유제품의 개발과정과 유사하다고 할 수 있다. 발효 유제품은 대부분이 유산균 발효로 이루어지고 있으며, 이들 유산균의 배양은 손쉽게 skim milk를 이용하여 이루어지고 있으며, 이때 유산균에게 공급되는 당은 대부분이 유당으로 유제품 기원의 유산균은 대부분이 유당을 잘 이용하고 있다. 이러한 관점에서 볼 때, 본 연구에서 사용되는 유산균은 김치로부터 유래한 미생물로써 그 성질이 유제품 기원의 유산균과는 전혀 다를 것이라는 가정에서 진행되었다. 현재 국내에서 사용되는 대부분의 유산균용 배지가 MRS를 기본 골격으로 하여 변형되어오면서 단가를 낮추고 있으나, 결국은 국내 토종의 유산균을 위한 최적의 배지는 안 될 것이라는 것이다. 우리는 우리의 미생물에 맞는 배지를 개발하여야만 높은 활성을 유지하는 우수한 특성의 미생물을 키워낼 수 있을 것이다.

### 2. 연구내용

- 김치 종균의 배양 조건 최적화
  - 분리된 김치 종균의 small scale 배양시 배양 온도, 교반 유무 및 산소 유무 등 종균 배양시 필요한 물리적 조건을 최적화 한다.
- 김치 종균의 영양 요구성 분석
  - 유산균은 영양요구성이 많은 균으로 미지의분리균인 경우 더욱 이러한 측면이

향후 발효에 미치는 영향이 크므로 각각의 분리 종균에 대한 영양요구성을 비교 분석 한다.

○ 배지 조성의 최적화

- 기본 배지는 일반적인 MRS 배지를 사용하다 여기에 첨가되는 미량 성분들의 농도를 최적화하여, 균체 증식에 대한 배지성분의 이용 효율을 극대화 한다.

○ 배양시 배지의 화학적 변화 분석 : pH, 비타민 농도 등

- 발효되는 과정중의 성분 변화 및 pH 변화를 분석하여 2차년도의 대량배양시의 기초자료를 확보한다.

○ 발효 방식 결정

- 유산균의 대량 배양시 가장 문제가 되는 점은 효과적인 균체의 분산 및 용존 산소 농도 그리고 영양분의 고른 분배(distribution)이다. 그러므로 이 세가지 측면을 고려하여 가장 효과적인 방법을 선정하여야 한다.

- ① 투입되는 공기 종류 결정
- ② 투입되는 공기량 결정
- ③ agitation 방법 결정

○ fed batch 가능성 검토

- 균체의 대량증식을 위해서는 다른 균들, 특히 재조합 미생물에서 많이 응용되는 fed batch fermentation을 시도하여야 하나 현재까지 유산균의 고농도배양은 현실적으로 이루어진 경우가 매우 드물기 때문에 이에 대한 가능성을 검토하고자 한다. 이 경우에 첨가되는 feeding solution의 조성 및 control system을 결정한다.

○ pH control용 첨가제 결정

- 유산균의 특징이 성장시 산의 생성이므로 이를 적절히 조절할 수 있는 첨가제를 결정한다.

- ① gas 상태로 첨가될 수 있는 물질
- ② 액체 상태로 첨가될 수 있는 물질
- ③ 첨가시 pH 조절과 함께 영양분으로 작용할 수 있는 물질

○ 김치 종균의 농축화 : 액체 상태, 고체 상태

- ① 발효조(5L-jar fermentor)에서 배양된 김치 종균을 원심분리하여 균체만을 회수한 다음, glycerol 농도가 50%가 되도록 첨가하며, 일정량 씩 나누어 -70℃에서 보관한다.
- ② 회수된 균체를 냉동 건조하여 분말 상태로 -4℃에서 보관한다.
- ③ 회수되어 농축된 균체의 농도는  $10^{12}$ cfu/g 이상의 농도가 되도록 한다.

○ 종균 안정화 : 상온에서 3개월간 90% 생균 조건 확립

- 종균의 보관시 중요한 요소는 얼마만큼의 생균수를 보유하는냐에 따르기 때문에 보관시 여러 가지 안정제를 첨가하여 저장 일수에 따른 균의 안전성을 검증한다.
- 이때 첨가되는 안정제로는 skim milk, 소당류, 산화 방지제 등을 농도별로 단일 혹은 복합으로 사용하며, 최종 목표는 4℃에서 3개월간 저장 시 90%이상의 생균수를 보유하는 조건이다.

### 3. 연구내용 및 결과

#### 가. 생육 온도 및 배지 조성 그리고 배양 방법이 *Leuconostoc citreum* GJ7의 성장에 미치는 영향

- MRS 배지와 defined 배지에 대하여 주관기관인 조선대학교 장해춘교수로부터 분양받은 *Leuconostoc citreum* GJ7을 25, 28 그리고 38℃에서 정치와 진탕배양한 배양한 결과를 그림 1과 2에 나타내었다. 일반적으로 유산균은 정치배양을 기본으로하고 있으나 본 과제에서는 최종적으로 발효조에서의 고농도 배양을 최종 목표로 하고 있기 때문에 향후 영양분의 균일한 공급이라든지, 배지 pH의 빠른 조절을 위하여 유산균의 진탕배양에 관한 특성도 분석하였다. MRS 배지의 경우 정치배양에서는  $2.3 \times 10^9$ , 그리고 진탕배양에서는  $1.5 \times 10^9$  cfu/ml 로 역시 정치배양의 경우가 많은 균체 성장을 나타냈으며, defined 배지에서도 정치 배양의 경우가 많은 균체 성장 효과를 나타내고 있으나, 영양배지인 MRS 배지에 비하여는 역시 잘 자라지 못하였다. Defined 배지의 경우 정치배양에서는  $3 \times 10^8$  cfu/ml, 그리고 진탕배양에서는  $5 \times 10^7$  cfu/ml을 나타내었다. 배양 온도에 대하여는 30℃에서 가장 잘 자라는 것으로 나타났으나, 균의 안정성을 보면 오히려 낮은 온도에서 배양 시간이 길어질수록 균의 사멸 속도가 저하되는 것으로 나타나, 이는 향후 균의 안정화 실험에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

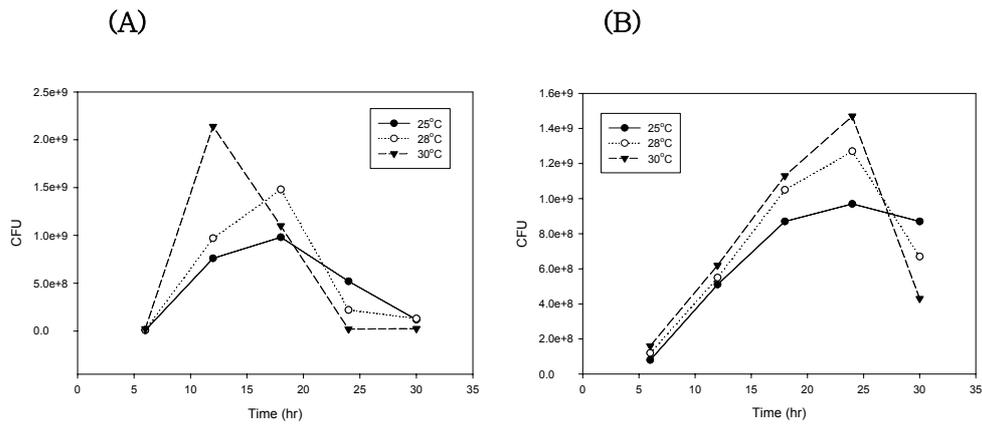


Fig. 1. Growth curves of *Leuconostoc citreum* GJ7 in MRS broth without(A) and with shaking(B).

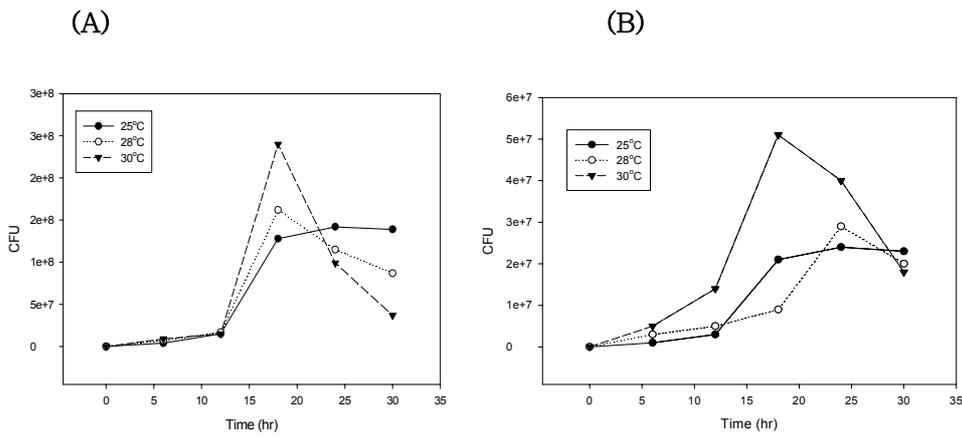


Fig. 2. Growth curves of *Leuconostoc citreum* GJ7 in defined medium without(A) and with shaking(B).

#### 나. *Leuconostoc citreum* GJ7의 성장에 탄소원이 미치는 영향

- 일반적으로 유산균은 유당을 잘 이용하여 유산균중에서 *Leuconostoc* 종은 sucrose을 잘 이용하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 과제에서 주관기관으로부터 분양 받은 *Leuconostoc citreum* GJ은 당 이용성을 분석한 결과 유당은 잘 이용하지 못하여, 당 중에서도 sucrose보다는 maltose을 잘 이용하는 것으로 확인되었다. 이를 근거로 당에 대한 균체 성장 실험 결과를 그림 3에 나타내었다. Defined 배지를 기본 배지로하여 여러 가지 당의 종류를 첨가하여 배양한 결과 단독인 당의 결과는 maltose의 경우가 가장 우수하였으며, 여러 당을 조합하여 첨가하였을 경우는 0.5% maltose에 sucrose와 glucose를 각각 0.25% 씩 첨가한 경우가 가장 좋은 결과를 보여주었다. 이때 최고 균체 농도는 약  $1.0 \times 10^{10}$  cfu/ml로 MRS 배지를 사용하였을 때보다는 더 많은 균생육 결과를 보여주어, 향후 고농도배양에 있어 공급되는 탄소원의 종류를 결정하는 기여할 수 있을 것으로 판단된다. Defined 배지를 사용하여 *Leuconostoc citreum* GJ7을 배양할 경우에 배양시간에 따른 균의 안정성을 검토해보면 MRS 배지의 경우보다, 30℃에서 배양하였음에도 불구하고 배양시간이 지남에 따른 균의 사멸정도가 심하지 않으며, 특히 mixed-sugar의 경우 가장 균체 성장이 좋은 maltose+sucrose+glucose의 경우 배양 36시간까지도 균이 상당히 안정한 상태를 나타내고 있다.

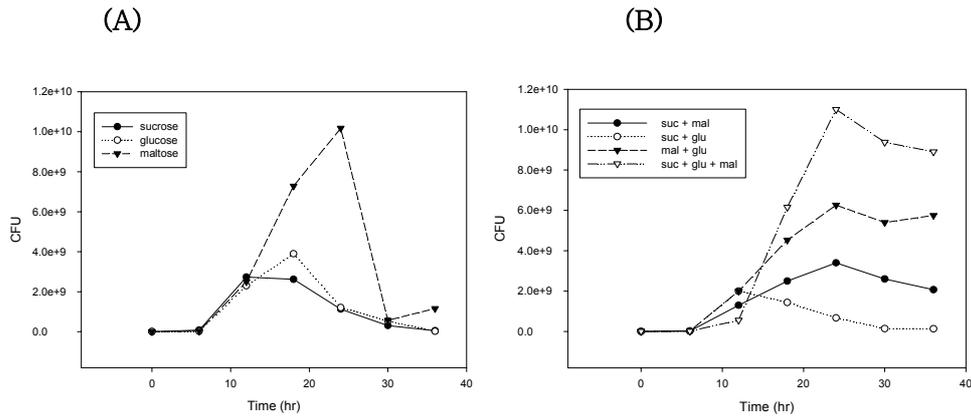


Fig. 3. Effect of single sugar(A) and mixed-sugar(B) on *Leuconostoc citreum* GJ7 growth at 30°C in defined medium

#### 다. Defined 배지에서 첨가되는 아미노산의 종류에 따른 배양 특성

- Defined 배지에 첨가되는 기본 탄소원은 sucrose 0.1%를 사용하였고, 무기염은 배지 1L당  $MnSO_4$  0.28g,  $MgSO_4$  0.58g,  $KH_2 PO_4$  6g을 첨가하였다. Vitamins은 배지 1L당 biotin 10g, vitamin B12 1g, folic acid 10g niacin 1mg, aminobenzoic acid 5mg, pyridoxal.HCl 5mg, riboflavin 1mg, thiamine 1mg, ascorbic acid 5mg를 용해시킨 vitamin mix를 1ml씩 첨가하였고, 염기는 guanine.HCl, adenine, uracil, thymidine이 각각 0.5% 용해된 염기 mix를 배지 1L에 용액 1ml씩 첨가하여 사용하였다. 아미노산에 대한 영양을 분석하기 위하여 아미노산을 계열별(3PGA, PEP, PA, R5P, 그리고 OA)로 나누어 실험하거나, 각각의 아미노산에 대하여 존재 유무에 대한 영양요구성을 검토하였다.

- 표 1(A)은 아미노산에 대한 요구성을 각각의 아미노산 및 이를 계열별로 분류하여 나타낸 것으로 대부분의 아미노산에 대하여 *Leuconostoc citreum* GJ7이 영양요구성을 보이고 있으나, PEP 계열의 phenylalanine과 tryptophane에 대하여 많은 영양요구성을 나타내고 있지 않았다. 그래서 phenylalanine과 tryptophane을 제외한 18개의 아미노산에 대하여 영양요구성 실험을 반복하여 표 1(B)에 나타내었다. 매우 흥미롭게도 *Leuconostoc citreum* GJ7은 phenylalanine과 tryptophane이 없는 상태에서는 tyrosine이 없는 경우에는 나머지 17개의 아미노산중 하나가 없더라도 균 성장에 영향을 받지 않았으나, tyrosine이 없는 경우에는 성장할 수가 없는 것으로 나타나, 향후 고농도 배양시 성장을 조절할 수 있는 아미노산으로 tyrosine은 이용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table1. The growth effect of amino acids on *Leuconostoc citreum* GJ7 in defined media(A) and devoid of Tryptophan and Phenylalanine(B).

(A)

PEP			PA			3PGA			R5P	OA						■-KG			
trp	phe	tyr	leu	ala	val	ser	gly	cys	his	asp	asn	lys	met	thr	ile	gln	glu	pro	arg
+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

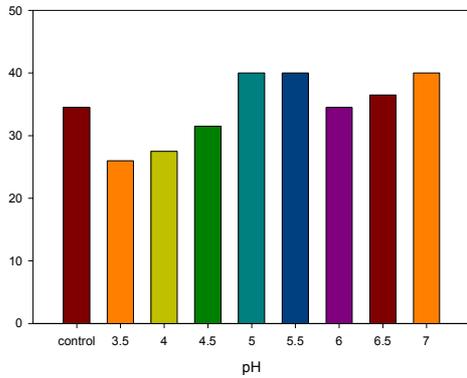
(B)

tyr	leu	ala	val	ser	gly	cys	his	asp	asn	lys	met	thr	ile	gln	glu	pro	arg
-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

## 라. 배지 pH가 균 생육에 미치는 영향

- 유산균은 성장하면서 유산을 생성하기 때문에 발효 말기에 가서는 배지 pH가 5.0 이하로 저하되어 이것이 균의 안정성을 저하시키는 요인으로 알려져 있다. 그러므로 배지내의 pH를 완충용액을 사용하여 일정한 상태로 유지하면서 유산균을 배양할 경우 배양 말기에 발생할 수 있는 생균수의 저하를 방지하고자 pH 3.0에서 7.0까지 0.5단위로 pH 구간을 나누어 3.0에서 5.0까지는 50mM acetate buffer로, 5.5에서 7.0까지는 50mM phosphate buffer를 사용하여 배지를 제조한 다음, 배양 24시간과 72시간 동안 배양한 다음 생균수를 분석하여 그림 4에 나타내었다. 배양 24시간까지는 약간의 차이는 나타나지만 거의 모든 구간에서 균의 성장이 큰 문제없이 이루어지는 것을 확인할 수 있었으나, 배양 72시간후의 결과는 매우 의외로 나타났다. 일반적으로 김치에 존재하는 유산균은 발효말기에 자신이 생성한 유산에 의해 저하된 pH 또는 자신이 생성한 산에 의해 성장에 저해를 받으며, 이로 인해 다른 유산균 또는 잡균의 번식이 이루어지는 것으로 생각되었으나, 본 연구 결과로 보면 김치유산균은 오히려 5.5 이상의 pH에서는 매우 불안정하며, 4.5 또는 5.0에서 매우 안정한 것으로 확인되었다. 이는 유산균을 안정화시키는 조건을 확립하는데 중요한 자료로 이용될 수 있으며, 현재 사용되고 있는 유산균의 일반배지인 MRS 배지의 경우 초기 pH가 5.6-5.8인 것을 감안하면 김치 유래의 유산균을 배양하는데 있어서 pH의 초기 조절이 배양시의 균의 사멸을 방지하는데 도움이 될 것으로 판단된다.

(A)



(B)

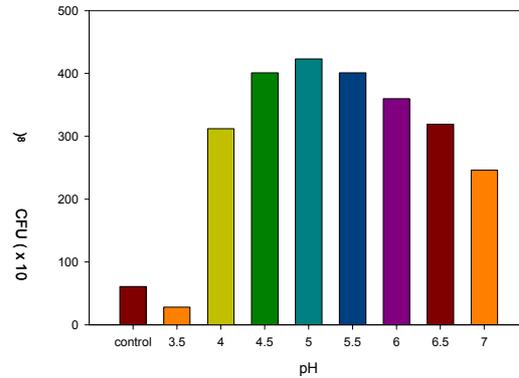


Fig. 4. Effect of buffers on growth and stability of *Leuconostoc citreum* GJ7(A) : 24 hour culture , (B) : 72 hour culture

#### 마. 5L jar fermentor에서의 물리적 조건이 *Lactobacillus plantarum*의 발효에 미치는 영향

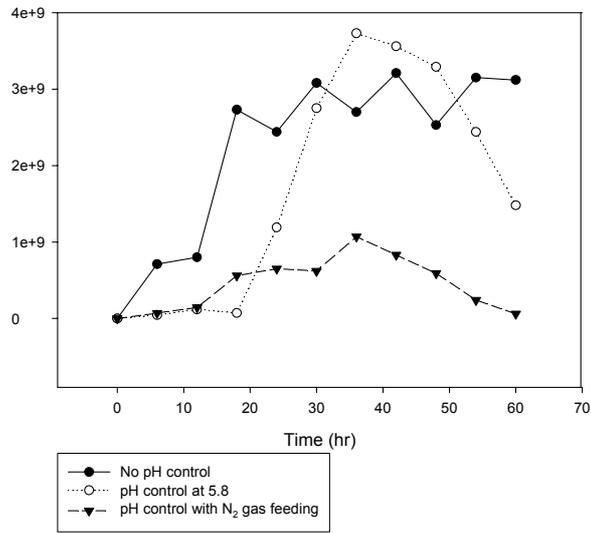
- 김치 숙성시 중요하게 작용하는 유산균인 *Lactobacillus plantarum*의 발효조에서의 배양 최적화를 이루기 위하여 배양온도를 20, 25, 30 그리고 37°C로 변화시키면서 균의 성장 패턴을 분석하였고, 또한 배양시 배지내의 pH를 일정하게 하거나, 또는 pH 조절시 교반에 의해 배지내의 용존 산소의 증가가 균의 생육에 영향을 주는 것을 방지하기 위하여 N<sub>2</sub> gas를 배지내에 feeding 하면서 균의 생육을 분석하여 표2와 그림 5에 나타내었다. *Lactobacillus plantarum*은 *Leuconostoc citreum* GJ7과는 전혀 다른 발효 형태를 보여주고 있는데, *Leuconostoc citreum* GJ7은 30°C 이상에서는 거의 자라지 못하나,

*Lactobacillus plantarum*은 온도가 높아질수록 빠른 균체 성장을 보여, 37°C가 최적 온도로 결정되었으며, 균 배양시 배지내의 pH를 5.8로 유지하면서 배양하였을 때가 pH 저하를 방지하였을 때보다도 좋은 균 성장을 보여주었다. 배지내의 pH 조절을 할 경우에도 N<sub>2</sub> gas를 feeding하는가, 안 하는가에 따라 성장 속도 및 생균수에 차이가 발생하였는데 30°C에서 배양하였을 경우에는 N<sub>2</sub> gas를 feeding하지 않고 pH 조절을 할 경우가 배양시간 25시간에 2.14 x 10<sup>9</sup> cfu/ml로 가장 좋은 결과를 보여주었으며, 37°C로 배양하였을 경우에는 pH 조절은 하지만, N<sub>2</sub> gas를 feeding하는 경우가 월등히 균 성장이 우수하여 배양 12시간 만에 3.11 x 10<sup>9</sup> cfu/ml의 생균수에 도달할 수 있었다.

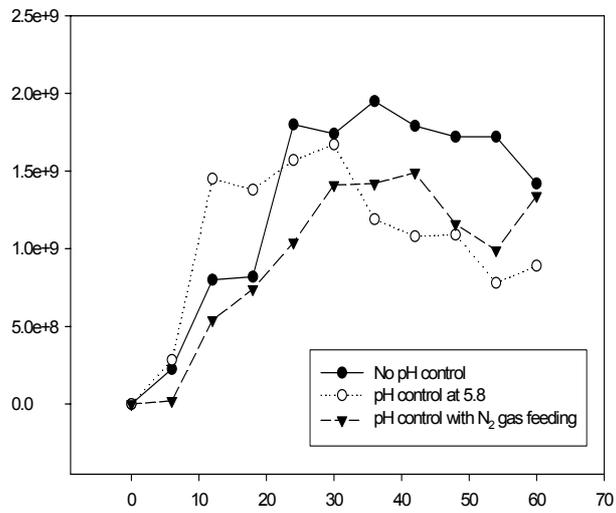
**Table 2. Summary of fermentation of *Lactobacillus plantarum* in 5L-jar fermentor at various culture temperature and with pH control methods.**

culture temperature (°C)	treatment	max. CFU ( x 10 <sup>9</sup> )	culture time at max. CFU	final medium pH
20	no pH control	1.94	42	5.51
	pH control	1.75	48	-
	pH control w/ N <sub>2</sub> gas feeding	1.98	40	-
25	no pH control	1.95	42	4.70
	pH control	2.42	30	-
	pH control w/ N <sub>2</sub> gas feeding	1.49	42	-
30	no pH control	1.37	42	4.04
	pH control	2.14	25	-
	pH control w/ N <sub>2</sub> gas feeding	2.11	30	-
37	no pH control	1.21	24	3.70
	pH control	2.18	24	-
	pH control w/ N <sub>2</sub> gas feeding	3.11	12	-

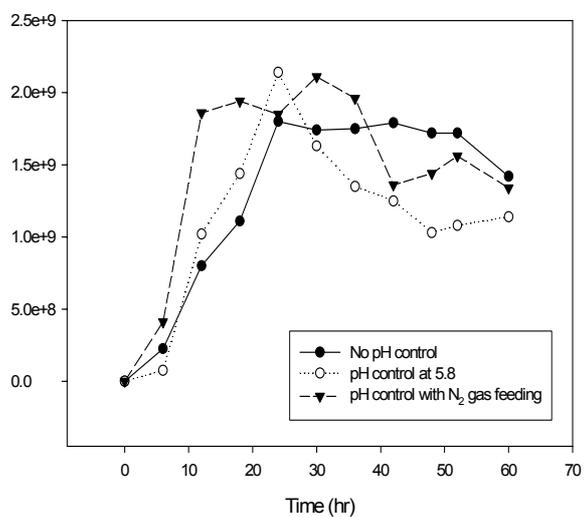
(A)



(B)



(C)



(D)

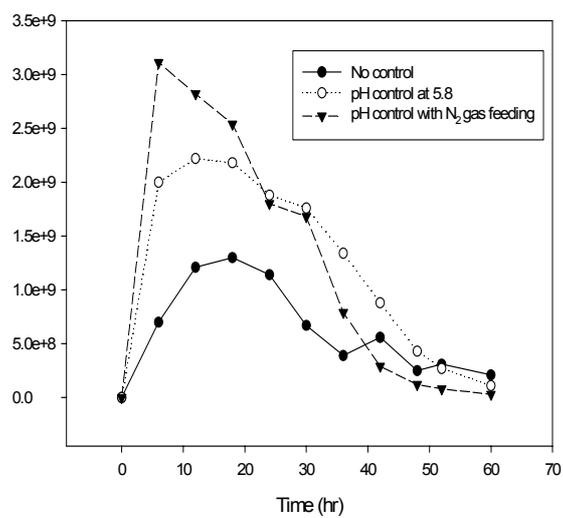


Fig. 5. Number of viable cell count changes of *Lactobacillus plantarum* with various fermentation conditions at 20(A), 25(B), 30(C) and 37°C(D).

## 바. *Leuconostoc citreum* GJ7 발효 방식 결정

### 1) 균체 교반 방식의 결정

- *Leuconostoc citreum* GJ7의 배양 시 균주의 현탁하는 방법에 따른 균의 생육 속도를 분석하였다. 균주를 현탁하는 방법으로는 무산소 조건을 유지하면서 현탁시키기 위하여 N<sub>2</sub> gas를 feeding하면서 현탁한 결과 *Leuconostoc citreum* GJ7은 혐기 조건에서는 단순 정치 배양한 것보다도 낮은 성장을 보여 편선보다는 통성혐기성균에 속하는 것으로 판단되었으며, 이러한 점에 착안하여 발효조의 impeller 속도를 50 rpm의 저속으로 회전시키면서 교반한 결과 정치배양보다는 조금 많은 균체 성장을 보였으나, 큰 차이를 보이지는 않았다(Fig. 6). 이는 향후 배지의 pH를 조절하는데 약간의 agitation은 균체 성장에 영향을 미치는 않는 것이므로 50 rpm의 속도를 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

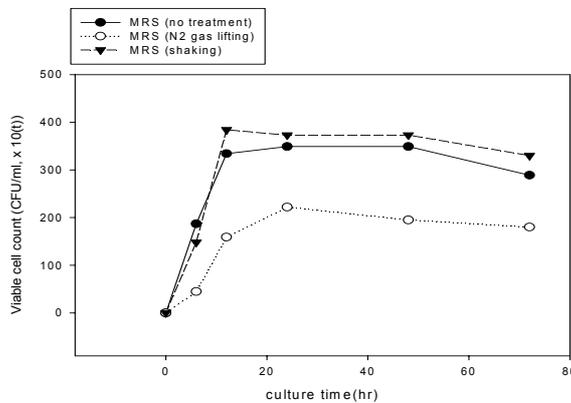


Fig. 6. Growth patterns of *Leuconostoc citreum* GJ7 according to the cell agitation methods.

## 2) 배지 최적 pH의 결정

- *Leuconostoc citreum* GJ7의 성장시의 pH 변화를 측정하여 Fig. 7에 나타내었다. 상기 조건에서 배양한 배지의 pH는 정치배양이든지, 아니면 교반 배양이든지 대부분 배양 후기에는 3.7-3.8의 pH를 유지하였으며, 초기 배지 제조시에 완충용액으로 pH를 저절 한 배지에서는 균체 성장이 완료된 후에도 배지의 pH는 초기 pH와 거의 유사하게 유지되는 것을 확인하였다.

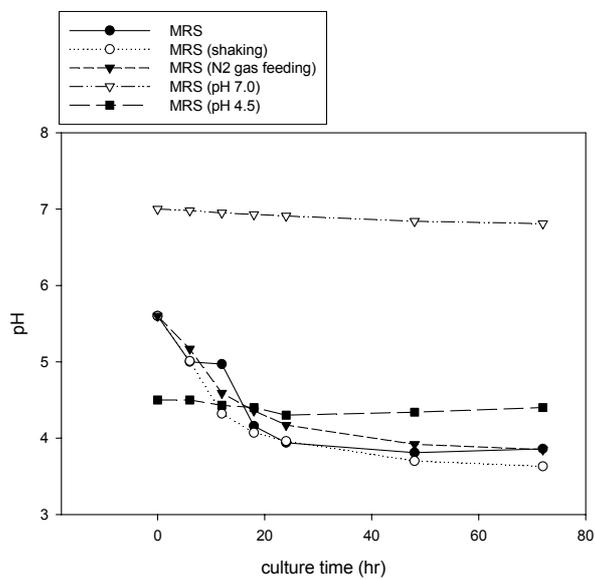


Fig. 7. Culture media pH change of *Leuconostoc citreum* GJ7 according to growth conditions.

### 3) 배지 pH에 따른 균체 성장 비교

- 성장에 pH가 미치는 영향을 분석하기 위하여 MRS 배지를 기본 배지로 하여 배지의 pH를 완충용액을 사용하여 pH 7.0과 4.5로 완충시킨 후, 균체 성장을 비교 분석한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. MRS 배지 pH를 완충용액을 이용하여 4.5로 유지시킨 경우보다는 조절하지 않은 MRS 배지에서의 생육이 우수하였으나, pH를 7.0으로 조절한 경우는 MRS 배지에 비하여 월등한 차이를 나타내는데, 생균수로 약 1.5배의 차이를 나타내었다.

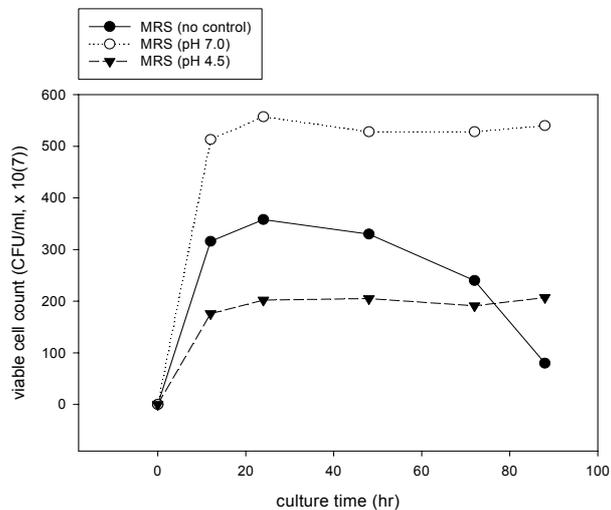


Fig. 8. Media buffering effect for cell growth of *Leuconostoc citereum* GJ7.

#### 4) 최적온도 결정

- *Leuconostoc citreum* GJ7 발효 최적온도를 결정하기 위하여 1차 년도에서 20°C에서 28°C까지의 온도 범위를 이미 분석하였고, 이어서 30°C에서 38°C까지의 온도를 나누어 분석한 결과를 Fig. 9에 나타내었다. 20°C부터 38°C구간에서 30°C가 가장 최적의 배양 온도를 나타냈다.

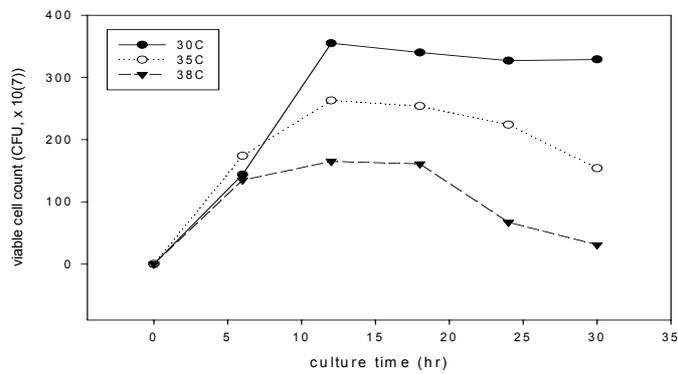


Fig. 9. Growth temperature effect of *Leuconostoc citerum* GJ7.

## 사. *Leuconostoc citreum* GJ7 발효시 배지 pH의 조절 방식 결정

### 1) pH 조절용 물질의 결정

- 최적의 배양 pH가 7.0으로 결정되었기 때문에 일반 MRS 배지를 사용하여 pH를 7.0으로 유지하면서 분석한 결과를 Fig. 10에 제시하였다. 1N NaOH로 조절한 경우보다는 암모니아수를 사용한 결과가 우수하였으나, 배지 pH를 미리 완충용액으로 7.0으로 고정한 후 배양한 결과보다는 낮은 균체 생육을 보여주어, 배양하는 방식에 따라 연속적인 배양 방법을 사용할 경우에는 암모니아수를 사용하여 배지 pH를 7.0으로 유지하는 것이 바람직하나, 회분식으로 유산균을 배양할 경우에는 완충용액으로 미리 배지 pH를 조절하는 것이 바람직하다고 판단된다.

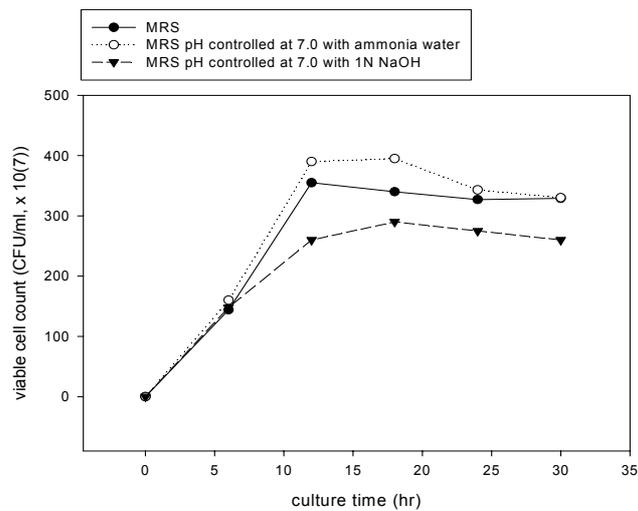


Fig. 10. Growth patterns of *Leuconostoc citreum* GJ7 controlled media pH at 7.0 with ammonia water or 1N NaOH.

**아. 대체 당 및 대체 단백질의 탐색**

**1) 탄소원 및 무기염의 관계**

- 사용한 무기염 종류에 따른 당의 영향을 분석하여 Table 3.에 나타내었다. 당은 이당류인 maltose와 단당류인 dextrose를, 무기염은 IS1과 IS2에 대하여 상관관계를 분석한 결과, 당의 종류에는 유의차가 없고, 무기염의 종류에 따른 유의차가 인정되며, IS1보다는 IS2가 균 생육에 보다 효과적이므로 향후에는 배지에 IS2를 기본 무기염으로 사용하였다.

**Table 3. Analysis of correlation between sugar and inorganic salts.**

	IS1 (CFU, x 10 <sup>7</sup> )	IS2 (CFU, x 10 <sup>7</sup> )				
maltose	58	136				
dextrose	41.7	131				
분산 분석: 반복 없는 이원 배치법						
분산 분석						
변동의 요인	제곱합	자유도	제곱 평균	F 비	P-값	F 기각치
인자 A(행)	113.4225	1	113.4225	3.553058	0.310519	161.4476
인자 B(열)	6997.323	1	6997.323	219.1972	0.042934	161.4476
잔차	31.9225	1	31.9225			
계	7142.668	3				

**2) 무기염과 단백질원간의 관계**

- 기본 무기염으로 정해진 IS2를 실험내용에 기술된 대로 다시 변형하여 IS2와 IS3를 제조한 다음, 각각의 무기염에 대한 단백질원간의 상호작용을 분석하여 Table 4.에 나타내었다. 이 경우 IS2와 IS3간에는 차이가 없었으나, 사용한 4

중의 단백질원간에는 유의차가 인정되었으며, yeast extract와 bacto-peptone 이 본 실험에 사용된 유산균의 생육에 좋은 단백질원으로 판단되었다. 또한 사용한 각 단백질원의 공급가격을 비교해 보았을 때, yeast extract 가 가장 저렴하면서도 유산균 생육에 좋은 것으로 판단되었다.

### 3) 당 혼합물과 단백질원간의 상호 관계

- 실험내용에 기술한 대로 4종의 당 혼합물을 제조한 다음, 각각의 당에 대한 단백질원인 yeast extract의 농도가 유산균의 생육에 미치는 영향을 분석하여 Table 5. 과 Fig. 11. 에 나타내었다. sugar mix 나 yeast extract의 농도에 따른 유산균의 배양은 유의수준 0.05에서 상호간에 크게 영향을 받지 않는 것으로 분석되었으나, 실험값으로 비교하였을 경우 sugar mix 1과 2가 다른 경우 보다는 좋은 균 생육을 보여주었으며, 배지제조가격을 고려하였을 경우 0.1%의 yeast extract의 농도로 배지를 조성하는 것이 바람직하다고 할 수 있다.

**Table 4. Analysis of correlation between protein source and inorganic salts.**

	YE 0.1 (CFU, x 10 <sup>7</sup> )	YE 0.25 (CFU, x 10 <sup>7</sup> )	YE 0.50 (CFU, x 10 <sup>7</sup> )			
sugar mix 1	340	340	345			
sugar mix 2	338	338	343			
sugar mix 3	318	203	238			
sugar mix 4	144	271	289			
분산 분석: 반복 없는 이원 배치법						
분산 분석						
변동의 요인	제곱합	자유도	제곱 평균	F 비	P-값	F 기각치
인자 A(행)	28640.25	3	9546.75	3.068954	0.112584	4.757063
인자 B(열)	811.5	2	405.75	0.130435	0.880136	5.143253
잔차	18664.5	6	3110.75			
계	48116.25	11				

Table 5. Analysis of correlation between sugar and protein source.

	YE (CFU, x 10 <sup>7</sup> )	BE (CFU, x 10 <sup>7</sup> )	PEP (CFU, x 10 <sup>7</sup> )	CA (CFU, x 10 <sup>7</sup> )		
IS2	414	294	439	265		
IS3	393	268	341	272		
분산 분석: 반복 없는 이원 배치법						
분산 분석						
변동의 요인	제공합	자유도	제공 평균	F 비	P-값	F 기각치
인자 A(행)	2380.5	1	2380.5	2.376935	0.220802	10.12796
인자 B(열)	30106.5	3	10035.5	10.02047	0.045119	9.276628
잔차	3004.5	3	1001.5			
계	35491.5	7				

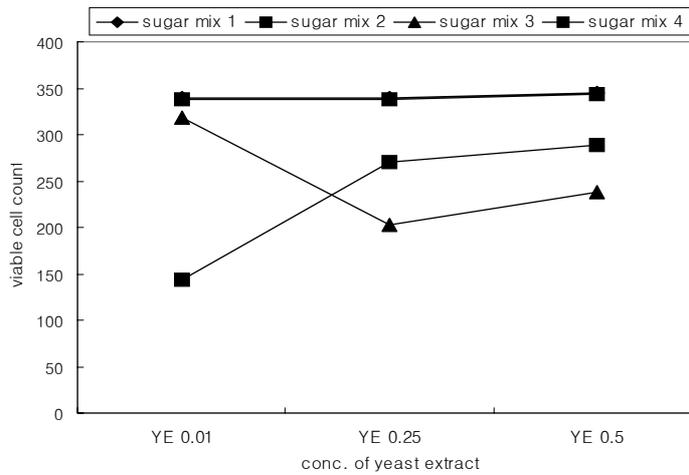


Fig. 11. Number of viable cell count according to protein source and sugar types.

#### 4) 단일 및 복합 당 조성이 균체 성장에 미치는 영향

- 단백질 및 무기염의 기본 조성을 고정한 다음 아래 조성표와 같이 당을 혼합하여 첨가함으로써 당이 김치 종균의 성장에 미치는 영향을 분석하였다. 위의 실험에서 결정된 sugar mix에 함유된 당의 최적 비율을 결정하기 위하여 실시하였으며 결과는 그림 12에 나타내었다. maltose와 maltodextrin을 2: 8의 비율로 첨가한 처리구의 결과가 가장 좋았다.

treatment No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
maltose		2	1.6	1.2	0.8	0.4	0	1.6	1.2	0.8	0.4	0
sucrose	M R S	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2					
malto-dextrin								0.4	0.8	1.2	1.6	2
Mix		8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

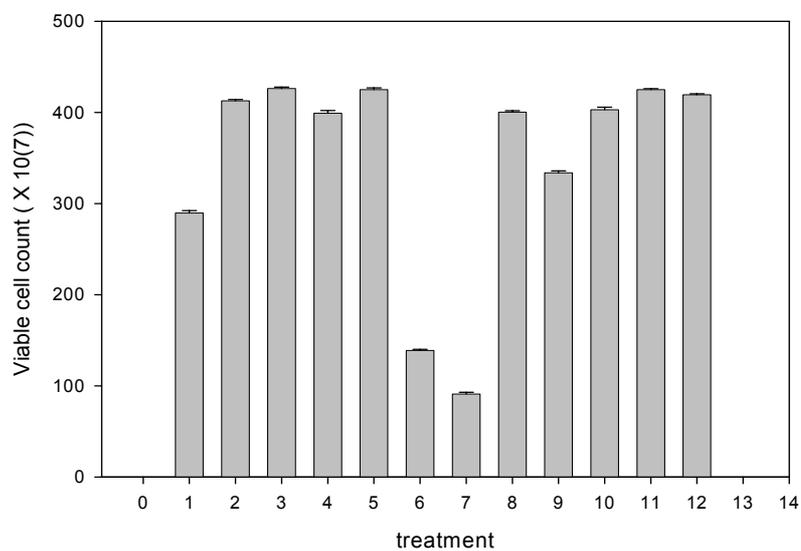


Fig. 12. Effect of sugar mix ratio on growth in reconstruction medium.

5) 혼합당과 yeast extract와의 관계

- 혼합당과 질소원인 yeast extract와의 최종 농도 결정을 위하여 아래 조성과 같은 처리구를 만들어 균체 성장을 분석하였고, 결과를 그림 13에 나타내었다. 가장 우수한 처리구는 12번 처리구로 maltose 와 malto-dextrin의 비가 2: 8의 비율로 첨가되며, 질소원인 yeast extract는 1.0%의 농도를 함유하는 것이었다. 혼합당의 결과는 8-4의 결과와 동일하여 재현성이 있음을 알 수 있다.

처리구	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
maltose			1.6		0.8		1.2		0.4				
sucrose			0.4		1.2								
malto-dextrin							0.8		1.6				
Mix	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
yeast	0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%	0.5%	1.0%	2.0%	

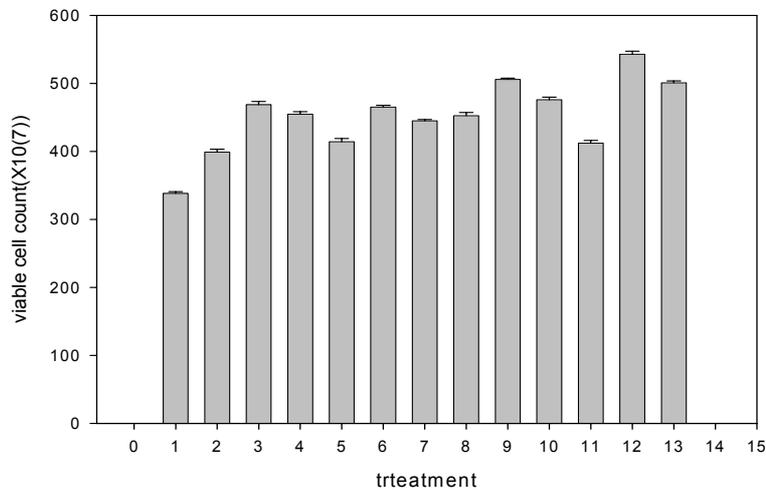


Fig. 13. Effect of sugar mix and yeast extract concentration on *Leu. citreum* GJ7 growth.

### 6) 혼합당, YE 그리고 소금 농도의 결정

- 혼합당의 첨가량 및 질소원인 yeast extract의 농도가 결정되었기 때문에 기타 미량 원소 등의 첨가량은 1차년도 실험결과를 활용하여 적하였으며, 김치 종균이 대부분 소금에 대한 의존성이 조금씩 있으므로, 이에 대한 적정량을 결정하고자 아래 표와 같은 처리구를 제조하여 균체 생육을 분석하여 그림 14에 나타내었다.

treatment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	12
maltose	M R S	1.2						0.4					
maltodextrin		0.8						1.6					
Mix		7.5											
yeast		0.5%	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	1.0%	0.5%	0.5%	0.5%	1.0%	1.0%	1.0%
NaCl		0	0.5%	1.0%	0	0.5%	1.0%	0	0.5%	1.0%	0	0.5%	1.0%

- 그림 14에서 보는 바와 같이 *Leu. citreum* GJ7은 소금의 존재 유무에는 크게 영향을 받지 않는 것으로 분석되었다. 오히려 당의 종류, 농도 그리고 질소원과의 상호관계가 균 생육에 더 큰 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

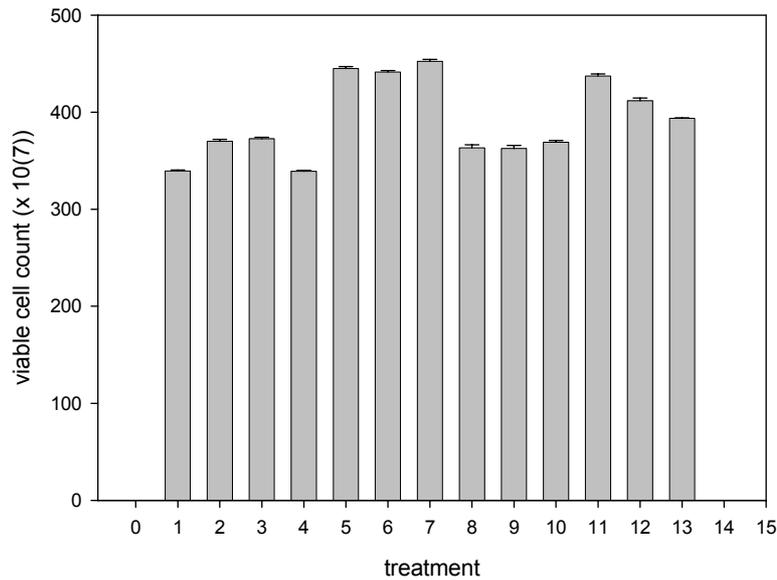


Fig. 14. Effect of sugar mix, yeast extract and NaCl concentration on *Leu. citreum* GJ7 growth.

#### 자. 신규배지의 최적화 및 원가 절감 효과

- 위에 나열된 조건을 최적화하여 신규배지 조성을 확보하였다. 신규배지 조성은 본 과제의 성격상 연구팀의 대외비에 해당하여 자세한 조성 및 비율은 신지 않습니다. 그러나 8-4와 8-5의 경우에서 볼 수 있듯이 처리구에 대한 대조구는 MRS 배지를 사용하고 있다. MRS에서 *Leu. citreum* GJ7을 배양할 경우 대부분의 경우  $3 \times 10^9$  cfu/ml의 농도로 균체가 증식하는 것으로 분석되었으나, 신규배지(이하 reconstructed medium)에서 *Leu. citreum* GJ7을 배양할 경

우 많게는  $5 \times 10^9$  cfu/ml 이상의 농도로 균체가 증식하여 기존에 가장 많이 사용되어온 MRS 보다도 잘 성장하는 것을 알 수 있다. 본 연구팀은 이상의 조건을 기본으로 하여 두 종류의 배지를 개발하여 각각 Reconstructed medium(I), Reconstructed medium(II)로 명명한 다음 MRS 배지와 현재 OEM 방식으로 유산균을 생산하는 회사의 기본 배지 가격을 1200L 기준으로 비교하여 아래 표에 제시하였다.

**Table 6. Comparison of medium cost for LAB growth.**

( won/1200L)

media type	MRS (for exp.)	OEM company	Reconstructed medium(I)	Reconstructed medium(II)
cost	58,740,000	1,700,000	902,024	572,048

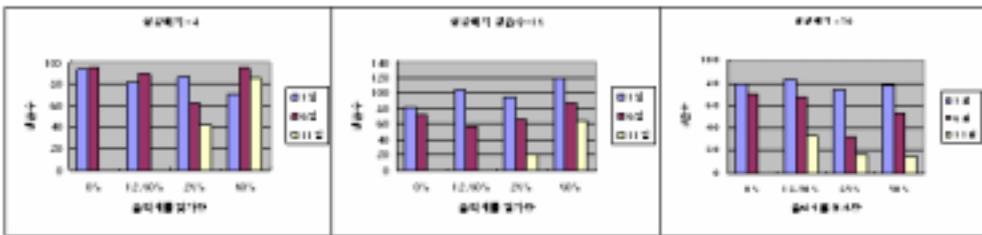
- 표 6에 제시된 것처럼 1200L를 기준으로 하여 유산균을 배양할 경우 MRS는 bulk(10kg) 단위로 사용한다 하여도 원가 부담이 너무 커서 현실적으로 사용하는 것이 불가능하다고 볼 수 있다. 본 연구에서 개발된 배지는 현재 유산균을 제조하는 회사에서 사용하는 자체 개발된 배지보다는 적게는 50% 많게는 75% 이상의 원가를 절감할 수 있는 배지가 개발되었으며, 균체 성장 또한 우수하여 충분히 향후 상업적 목적으로의 사용 및 배지 자체로의 상품화도 가능할 것으로 판단된다.

## 차. 균주 안정화 조건 확립

### 1) Glycerol 존재하에서 저장 온도 및 사용배지에 따른 안정성 분석

- 균체의 안정적인 보관을 위하여 먼저 균체를 회수한 다음, 두 종류의 media로 균체를 현탁시켰다. 하나는 각 성분이 정해져서 들어가는 defined medium를 사용하였고, 다른 하나는 복합영양배지인 MRS를 사용하였다. 각각 희석된 균체는 별도로 0%, 12.5%, 25% 그리고 50%의 농도로 glycerol을 첨가하여 저장 안정성 실험을 수행하였으며, 저장 온도는 4℃, -15℃ 그리고 -70℃에서 안정성 실험을 수행한 결과를 그림 15에 나타내었다.

#### A) defined medium



#### B) MRS

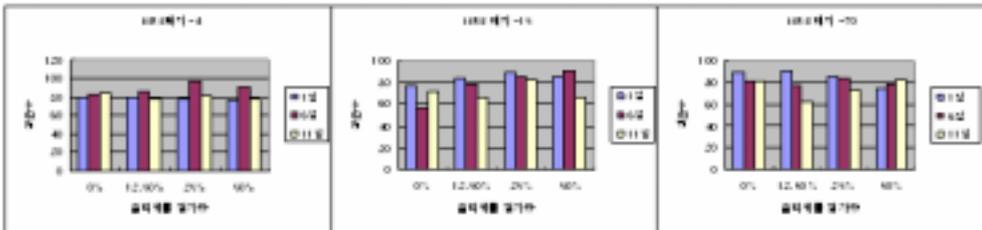


Fig. 15. Strain survival ratio according to the storage temperature, glycerol concentration and suspension media.

- Defined medium 보다는 MRS가 균주 안정성에 월등히 좋은 영향을 미치고 있었으며, MRS의 경우 glycerol 농도는 균주의 안정성에 영향을 미치지 못하는 것으로 판단되었다. 온도는 빙점 근처가 빙점이하보다 우수한 것으로 판단되었다. 저장 온도에 관한 실험은 별도로 수행한 결과를 그림 16에 나타내었다.

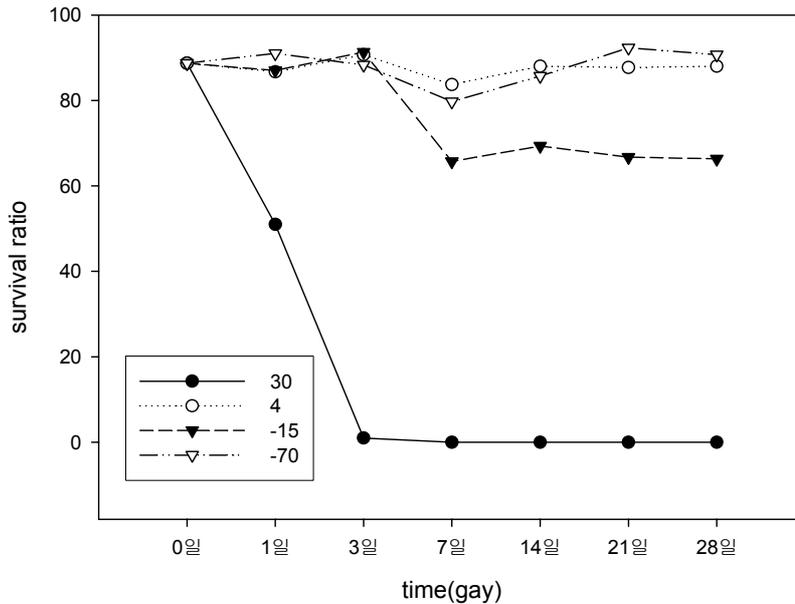


Fig. 16. Temperature effect on storage stability.

- 그림에서 보는바와 같이 유산균을 액상에서 보관하면서 생존율을 높게 유지하려면 -70°C에서의 급속 냉동 및 초 저온 저장을 하던가, 아니면 빙점 근처에서 저장하는 것이 좋은 방법이 될 것이며, -15°C 등의 온도는 완만 냉동 및 얼음의 재결정 등으로 균주저장 방식으로는 적합하지 않은 것으로 판단된다.

2) 안정제의 종류에 따른 저장 안정성

- 본 과제에서는 초기 안정성에 대한 연구 범위가 농축상태와 냉동건조 상태 두 가지로 나뉘어져 있었으나, 김치제조시에 활성이 있는 상태로 종균이 첨가되어야 함을 감안했을 때, 냉동건조는 현실성이 없기 때문에 기술이전 당시 (주) ○○○측과 농축액상 상태에서 28일간 90% 이상의 활성을 유지하는 저장 조건을 목표를 정하고 실험을 수행하였다.

- 균체를 배양한 다음, 농축하는 과정은 아래 그림에 도식화 하여 나타내었다.

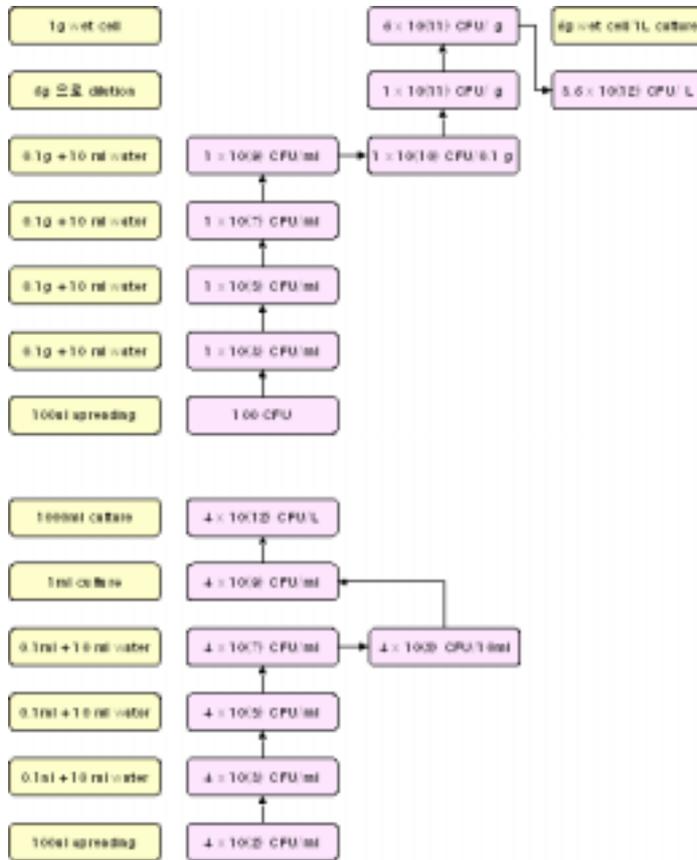


Fig. 17. Making process of original starter concentrate.

- Reconstructed medium 또는 MRS로 배양했을 때, 평균 약 6g의 wet cell을 얻을 수 있으며, wet cell 1g에 안정제 5g을 첨가하여 총 6g의 starter concentrate를 제조하여 보관하면서 실험에 사용하였다. 그러므로 김치 종균 1L를 배양하면 액체농축김치종균을 36g 얻을 수 있다. 이렇게 얻은 농축종균에 다음과 같은 8종의 안정제를 첨가하여 온도별 저장 실험을 수행한 결과를 그림 18에 나타내었다. 안정제로 사용한 첨가물 및 처리구 번호는 다음과 같다.

- |            |                 |
|------------|-----------------|
| 1. DW      | 2. CC + DW      |
| 3. MT      | 4. DW + JG      |
| 5. CC + MT | 6. CC + DW + JG |
| 7. MT + JG | 8. CC + MT + JG |

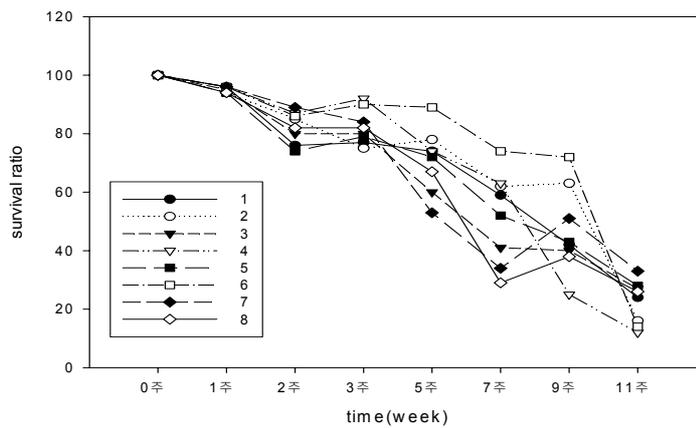


Fig. 18. Survival ratio of Kimchi starter concentrate in the presence of various stabilizers.

- 그림 18에서 볼 수 있듯이 4번과 6번 처리구의 경우가 가장 농축종균의 생존율이 뛰어났으며, 저장 5주후에 4번의 경우는 74%, 6번의 경우는 89%의 생존율을 나타내었다. 따라서 본 연구는 기술이전 당시 업체에서 요구하였던 4주 저장시의 생존율 90% 이상과 활성을 그대로 유지시키는 조건을 모두 충족하는 저장 최적화 조건을 확보하였다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야의 기여도

### 제 1 절 연도별 연구목표 및 평가 착안점

구 분	연구목표	평가착안점
1차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○우량 우수 종균(유산균)개발</li> <li>○유용 비피도 박테리아 개발</li> <li>○종균 생육조건 최적화</li> <li>○균주 독성 실험</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-맛있는 김치발효에 관계하는 종균을 5종 이상 확보하였는가?(30)</li> <li>-김치 환경에서 생육 가능한 유용 비피도 박테리아를 1종 이상 동정하여 확보하였는가?(25)</li> <li>-대량 배양용 종균의 생육조건 최적화가 이루어 졌는가?(25)</li> <li>-균주 독성 실험을 완료하였는가?(20)</li> </ul>
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○우량 신균주를 이용한 발효시스템 개발</li> <li>○비피도 박테리아를 이용한 김치제조</li> <li>○종균의 대량 배양 조건 확립</li> <li>○종균 및 제조김치의 생리활성기능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-우량 신균주를 이용한 김치 발효조절 시스템을 구축하였는가?(30)</li> <li>-비피도 박테리아를 이용하여 김치를 성공적으로 제조하였는가?(25)</li> <li>-종균의 대량 배양 조건을 확립하였는가? (25)</li> <li>-종균 및 제조김치의 생리활성기능을 밝혀졌는가? (1기능 이상)(20)</li> </ul>
3차 년도	<ul style="list-style-type: none"> <li>○우량 신균주를 이용한 첨단김치 개발</li> <li>○우량 신균주를 이용한 제품 다양화</li> <li>○첨단김치 및 비피도 박테리아의 생리 활성 기능</li> <li>○상품 김치용 종균의 대량 생산 및 안정화</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-첨단김치가 개발되었는가? (미생물학적 특성, 기능유지, 기호도↑)(30)</li> <li>-발효의 다양화로 제품이 개발되었는가?(25)</li> <li>-첨단김치 및 비피도 균의 기능성이 확인되었는가?(25)</li> <li>-종균 대량 생산 및 안정화(4℃ 3개월 저장 후 90%생균존재)가 이루어졌는가?(20)</li> </ul>
총점수		300점

## 제 2 절 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도

- 제1세부과제 : 첨단미생물공학에 의한 전통김치의 과학화

### 1. 맛있는 김치발효에 관계하는 종균을 5종 이상 확보하였는가?(30점)

- 본 과제의 최종 목표는 미생물 대사공학을 이용하여 김치발효를 인위적으로 조절하고, 품질이 균일하며 보존성이 향상된 첨단 BT기술로 이루어진 상품 김치 제조에 있다.
- 비살균 개방형 복합발효를 하는 김치에서 위와 같은 목표를 달성하기 위하여는,
  - ① 김치 발효계에서 발생될 수 있는 잡균이나 산패균을 제어할 수 있는 우수 미생물의 확보 → 우수 미생물의 박테리오신 생산에 의한 잡균제어 시스템
  - ② 김치발효계내의 잡균이나 산패균에 의하여(감수성균주) 우수 미생물의 박테리오신 생산이 증강될 것 → 박테리오신 유도효과
  - ③ 맛있는 김치발효 종균개발(같은 유산균 종간에도 발효 중 이취를 내는 것이 있고 맛있는 김치발효를 이끌 수 있는 균이 있음)  
이라는 세 가지 조건을 동시에 만족하는 우량 김치종균의 개발이 필수적 요건이다.
- 본 과제에서는 위 ①+②+③의 조건을 만족시키는 종균을 6종 확보함.

*Leuconostoc kimchii* GJ2, *Leuconostoc kimchii* GJ3, *Weissella confusa* GJ6, *Leuconostoc citreum* GJ7, *Lactobacillus sakei* NJ2, *Lactobacillus sakei* YY4: 이상 6종, 이 중 *Leu. citreum* GJ7와 *Leu. kimchii* GJ3가 가장 관능적으로 뛰어난 효과 지님.

## 2. 우량 신균주를 이용한 김치 발효조절 시스템을 구축하였는가?

첨단김치가 개발되었는가? (미생물학적 특성, 기능유지, 기호도 ↑)(60점)

### 1) 김치발효 온도별 *Leu. citreum* GJ7종균김치의 발효특성

- GJ7종균김치를 5℃~10℃에서 일정기간 발효한 결과, pH, 산도 및 우량김치 종균점유율면에서 6.5℃에서 발효한 구가 가장 기호도가 좋았다.

### 2) 발효에 따른 적정산도별 후숙성(저장)에 따른 김치 발효

- GJ7종균김치를 일정기간 발효하여 산도가 각각 0.4%~0.85% 부근일 때 발효를 멈추고 0~-2℃에 후숙성하였다. 그 결과 저장중의 pH, 산도, 균총변화 및 맛의 양상은 산도별 저장시기에 따라 큰 차이를 나타내었고, 각 발효온도에 따른 변화의 경향은 비슷하였다. 종균김치를 산도 0.5~0.65%일 때 저장하여 숙성한 김치가 가장 기호도가 좋았다.

### 3) 첨단김치의 장기저장: 약 128일(4개월) 저장 가능

- 우량김치종균GJ7을 사용하여 최적발효조건에서 발효 및 숙성하였을 때(산도 0.9% 이하) 종균에 의한 잡균의 제어가 이루어졌다. 사용된 종균GJ7의 김치 발효환경하에서 점유율은 70~100%로 확실한 우점율과 이후 저장기간이 경과함에 따라 다른 미생물군으로의 천이현상이 일어나지 않아 본 김치제조공정에서의 GJ7 대사공학을 이용하여 비살균개방형 김치발효에서 종균화가 가

능함을 증명하였다. 이에 반해 종균을 가하지 않는 대조구에서는 유산균과 함께 무수히 많은 잡균이 검출되었고, 대조구에서의 김치종균은 시간의 경과에 따라 미생물 천이현상이 관찰되었다. 이러한 결과로부터 종균김치의 경우 김치 상미기간을 약 128일(4개월)간 유지할 수 있었으며, 이는 기존의 김치 유통기한이 약 28일임을 고려하였을 때 획기적인 연구성과임을 알 수 있다. 종균김치의 맛은 부드러운 단맛과 상큼하고 시원하며 특소는 청량한 맛의 특징을 나타내었다. 이에 반하여 대조구인 종균비첨가 김치는 종균첨가김치와 동일한 조건에서 제조하여 장기간(약 128일)저장하였을 때 1.25% 이상의 높은 산도와 함께 매우 신맛, 군내 등의 맛과 연부현상이 평가되었다.

#### 4) GJ7종균김치의 관능검사

- GJ7종균김치는 *Leu. citreum* GJ7의 김치환경내의 미생물제어능이 확실히 인정되어 동일한 조건에서 종균비첨가김치와는 맛에 있어서나 김치환경내의 미생물 우점종 유지 능력(80% 이상)이 탁월하였다. 본 연구에서 사용된 김치 양념배합비는 MSG 무첨가와 함께 특별히 맛있는 양념이 아닌 기본 김치양념을 사용하였다. GJ7첨가김치는 반복된 관능검사를 통하여 관능평가자 전원이 양념맛이 아닌 발효에 의한 GJ7김치 특유의 맛을 구별해 낼 수 있었다.

### 3. 발효의 다양화로 제품이 개발되었는가?(25점)

#### 1) 종균GJ3에 의한 첨단김치 개발

- GJ7 첨가 김치와 동일한 김치재료조성에 *Leu. kimchii* GJ3를 첨가하여 김치를 만든 결과, GJ7종균김치와는 다른 발효취가 약하고 맛이 개운하며 깔끔하여 고기 씹 샴 샐러드용으로 이용할 수 있는 가벼운 맛의 김치의 특징을 나타내어, 김치유산균의 발효능 차이에 의한 김치제조가 가능함을 시사하였다.

2) 당원에 따른 GJ7종균김치의 발효특성

- *Leu. citreum* GJ7은 sucrose, fructose 모두 당대사가 가능하며 이들 당원의 대사에 의해 발효산물이 달라져 같은 발효조건하에서도 당원에 따른 단맛이 달라짐을 알 수 있었다. 즉 같은 김치 배합비에 같은 종균에 의한 김치발효로도 당원에 의해 김치맛을 다르게 할 수 있음을 제시하는 바이다.

● 제2세부과제: 미생물 대사공학 기법으로 제조된 첨단김치의 생리활성  
효능연구

1. 균주 독성 실험을 완료하였는가?(20점)

- 우량 김치종균과 우점종 비피더스종균의 급성독성시험에서, 경구 투여시 5,000mg/kg이상, 복강내 투여시 2,500mg/kg이상에서도 독성작용을 나타내지 않았고, 4주간의 아급성독성시험에서도 최고용량인 5,000mg/kg투여에서 일반증상, 혈액생화학적 검사 및 장기의 육안적 관찰 모두에서 시험물질과 관련된 유의성있는 변화가 관찰되지 않아 무독성을 평가되었다..

2. 종균 및 제조김치의 생리활성기능을 밝혀졌는가? (1기능 이상)(20점)

- 우량종균김치의 항산화작용 ; 알코올 투여로 증가된 유리기 해독계 효소인 GSH-Px활성억제와 비효소적 항산화작용을 나타내는 GSH함량 증가로 인한 지질과산화물에 대한 방어력 증강되어 나타난 결과로 판단된다.
- 우량김치종균의 지방저하, 동맥경화의 예방 및 완화 작용 : 혈청 중 LDL-콜레

스테롤 농도 및 동맥경화지수의 감소, HDL-콜레스테롤농도 및 총콜레스테롤 농도에 대한 HDL-콜레스테롤농도의 비가 증가되어 나타난 결과로 판단된다.

● 제1협동과제: Bifidobacteria를 이용한 기능성 김치의 제조

1. 김치 환경에서 생육 가능한 유용 비피도 박테리아를 1종 이상 동정하여 확보하였는가?(25)

1) 미생물의 분리

- 장수벨트 지역인 담양의 95세 이상의 장수노인에서 Bifidobacteria균주를 분리

2) 미생물의 동정

- morphology, TLC, F6PPK assay를 통해서 총 80여종을 분리하였고, 이중 내산소성이 있어 식품 제조에 적성이 있는 균주를 7종 분리, 확보

2. 비피도 박테리아를 이용하여 김치를 성공적으로 제조하였는가?(25점)

1) Bifidobacteria를 이용한 기능성 김치 제조

- Bifidobacteria 미생물을 첨가하여 김치를 제조하였고, 발효 과정중 미생물 천이변화, 김치의 이화학적 검사, 관능 검사를 실시하여 비피도박테리아 첨가 김치 제조

2) Bifidobacteria를 첨가하여 갓김치, 동치미, 깍두기를 제조

- Bifidobacteria를 첨가하여 갓김치, 동치미, 깍두기를 제조하고 발효 과정동안

의 미생물 변화, 이화학적 검사, 관능 검사를 통해 김치 제조에 bifidobacteria  
를 이용할 수 있음을 확인

### 3. 첨단김치 및 비피도 균의 기능성이 확인되었는가?(25점)

1) Bifidobacteria 김치의 인체 건강기능성에 미치는 영향을 조사

2) 변비 개선

- Bifidobacteria animalis DY-64를 첨가한 김치를 섭취기간 동안 실험대상자의 변비관련 지표들을 개선시켜 변비 개선 효과를 나타냄

3) 미생물 균총 변화

- Bifidobacteria animalis DY-64를 첨가한 김치를 섭취하는 동안 장내 bifidobacteria와 lactobacilli의 수는 증가되었고 유해 미생물(Bacteroides, Clostridium)을 억제하여 미생물 균총이 향상되었음을 확인

4) 유해 효소 활성화도

- 김치 섭취기간 동안 실험대상자들의 분변내 유해 효소 활성화는 유의적으로 감소

5) 면역력(IL-2, TNF- $\alpha$ ) 증강 조사

- 김치 섭취동안 실험대상자들의 IL-2, TNF- $\alpha$ 은 유의적으로 증가하였다. 이러한 연구결과로서 B. animalis DY-64는 여러 건강기능성을 나타냄으로서 이는 식품에 probiotics로서의 이용 가능성을 제시

● 제2협동과제: 김치종균의 대량 생산을 위한 배양조건 확립 및 안정화  
기술개발

1. 대량 배양용 종균의 생육조건 최적화가 이루어 졌는가?(25점)

- 생육 온도, 교반 방법, pH조절 방식 및 pH 조절제 등을 1차년도에 선정하였고, flask 배양 및 5L-jar 발효조에서 생육조건이 정확히 최적화되었음을 확인하였다. 또한 신규 배지를 개발함으로써 생육최적화와 더불어 원가 절감에도 기여하였다. 더 나아가 기술이전 업체였던 (주)○○○에서 300L 발효조를 이용하여 본 연구팀이 최적화 시킨 방식으로 종균 배양에 성공함으로써 확보된 생육조건은 scale-up 시에도 문제가 없음을 확인하였다.

2. 종균의 대량 배양 조건을 확립하였는가? (균체 농도  $10^{12}$ cfu/g이상)(25점)

- 기술이전 업체였던 (주)○○○에서 300L 발효조를 이용하여 본 연구팀이 최적화 시킨 방식으로 종균 배양에 성공함으로써 확보된 생육조건은 scale-up 시에도 문제가 없음을 확인하였다. 단 기술이전 당시 균주의 고농도 배양 부분에 대하여 (주)○○○측과의 합의 내용은 균체 확보에 대한 원가 부담을 낮추는 방식으로의 연구를 원하였기 때문에 고농도 배양이 아닌 신규배지 개발로 본 목표를 달성하였다. 산업적으로 사용되는 배지 가격의 약 25% 그리고 균체 생산량은 액 2배 정도 증가되는 신규배지의 개발로 충분히 목표를 달성했다고 판단된다.

3. 종균 대량 생산( $10^{12}$ cfu/g이상) 및 안정화(4℃ 3개월 저장 후 90%생균존재)가 이루어졌는가?(20점)

- 안정화 종균제품의 농축후의 생균수는  $6 \times 10^{11}$ cfu/g이었으며, 이는 균체의 성격상 더 이상의 농축이 불가능하기 때문에 김치제조 공정을 이 농도의 종균에 맞추어 첨가되는 starter 양을 조절하는 방식으로 문제를 해결하였고, 균체의 안정성은 냉동건조 방식이 가장 균체를 안정적으로 보관하는 방식이나 이는 분말상태에서 균체 활성화(activation)에 요구되는 시간 및 기술상의 문제 등으로 산업적인 현장에서는 사용이 어려워 액체농축상태에서의 종균으로 4주(28간) 약 90% 생존율을 나타내는 조건 및 안정제의 확보를 업체로부터 요구 받아 이에 대한 연구를 수행하였으며, 결과적으로 5주간 90%의 생존율을 유지할 수 있는 저장조건을 확립하여 충분히 연구 목표를 달성하였다.

## 제 5 장 연구개발의 활용계획

### 1. 미생물을 이용한 대사 제어 시스템

- 발효는 결국 미생물의 대사를 어떻게 control(제어)하느냐에 따라 결과가 좌우되는데, 일반적인 발효제어는 온도, pH, 공기량 그리고 공급되는 배지내의 양분(고농도 배양의 경우는 feeding solution의 조성 등)으로 이루어지는데 이는 단일균에 의한 발효 시스템에는 적용이 가능하나, 복합균을 이용한 발효에는 거의 적용이 어려우며, 대부분의 복합 발효시스템의 경우 초기 균수의 차이나, 접종시기를 달리함으로써 조절을 실시하고 있다. 그러나 이러한 대사제어 방식은 closed fermentation system에서는 적용이 가능하나 김치 발효나 고체 사료 발효 등의 open fermentation system에서는 적용이 매우 어렵고, 조절이 대부분은 안 되기 때문에 batch 마다 특성이 다른 것이 당연하다고 할 수 있다. 그러나 본 연구에서 수행하고자하는 시스템을 도입한다면, 목적 균주의 발효는 정성적으로 이루어지나, 기타 오염균 등에 의한 발효는 원천적으로 차단되기 때문에 언제나 동일한 특성을 지닌 발효산물을 얻을 수 있고, 이는 원천 핵심 기술로 타 분야로의 활용이 크다고 판단된다.

### 2. 유용 김치 종균의 분리 및 동정

- 미생물 자원의 확보는 현재 세계적으로 매우 활발하게 진행되고 있는 유전 자원의 선점(先占)이란 측면에서 중요한 사항이며, 좋은 맛과 우수 영양성분을 함유한 김치는 한국 김치의 세계화에 큰 일익을 담당할 것으로 기대된다.

### 3. 신규 생균제제(probiotics)로의 활용

- 인간의 건강에 대한 관심이 고조된 이때, 건강보조식품 또는 영양강화식품에 대한 중요도는 이제 더 말할 나위가 없는 식품의 큰 비중을 차지하는 부분이 되었으며, 이중에서도 유용 생균제제 시장은 날로 확장되고 있다. 따라서 본 과제에서 분리될 10 여종의 유산균 및 비피더스균은 이러한 생균제제로의 활용에 크게 기여할 것이다.
- *B. animalis* DY-64는 식품 제조에 유익한 특성을 함유하고 있어 probiotics로 이용 가능성을 제시하고 있다. 또한, 인체 대상자에게 김치를 통해 공급한 결과 변비 개선 및 장내 미생물 균총 개선 등의 유익한 효과를 보임으로써 바람직한 probiotics로의 이용 가능성을 보여준다.
- *B. animalis* DY-64를 probiotics로서 식품에 이용하기 위해서는 경제적으로 다량의 미생물을 배양하는 것이 필요하다. 따라서 *B. animalis* DY-64의 고농도 배양조건의 설정과 이를 위한 배양 기술이 앞으로 더욱 필요하다. 또한 bifidobacteria의 생존성을 증대를 위한 연구가 필요하다.
- 급성 및 아급성 독성시험에서 우량 김치종균과 우점종 비피더스종균은 무독한 물질로 평가되었으므로 일상 생활에서 안전성이 매우 우수한 기능성 식품으로 사용이 기대된다.
- 우량종균김치는 유리기 해독계 효소인 GSH-Px활성억제와 비효소적 항산화작용을 나타내는 GSH함량을 증가시키므로써 지질과산화물에 대한 방어력이 증강시켜 만성 퇴행성 질환을 유발하는 주요 요인인 유리기를 효과적으로 방어할 수 있는 우수한 항산화제로의 활용에 크게 기여할 것이다.
- 우량김치종균으로 담근 김치는 혈청 중 LDL-콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수의 감소, HDL-콜레스테롤농도 및 총콜레스테롤농도에 대한 HDL-콜레스테롤농도의 비를 유의하게 증가시켜 지방저하, 동맥경화의 예방 및 치료 뿐만 아니라 현대인의 관심사인 만성 성인병의 예방과 치료기대에 부응할 수 있

는 기능성 식품으로 이용이 기대된다.

#### 4. 종균제제 산업으로의 응용

- 본 과제에서 수행하는 우수 신 김치종균의 개발은 우수하면서도 항상 일정한 품질을 유지하는 김치 제조 공정을 확립하는 것이고, 이를 수행하기 위해서는 반드시 동일한 균주의 공급이 반드시 필수적이기 때문에 김치산업과 더불어, 김치제조에 필요한 김치종균산업도 반드시 새로운 김치산업의 한 축으로 부상할 것이다.
- 현재 종균 김치를 제조하여 시판하는 업체는 국내에서 종가집 김치가 유일하나, 향후에는 보다 많은 업체에서 우수한 종균을 활용한 종균 김치 내지는 특성화 김치의 출현이 기대되고 있다. 그러나 문제는 이러한 종균김치를 제조하는 과정에서 필수적으로 사용되는 종균에 의한 원가 상승이 김치제조 업체에 커다란 장애물로 작용하게 될 것이다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 전문적인 종균제조업체의 기능이 필요하며 전문화되며, 저렴한 가격으로 종균을 공급해 줄 수 있는 시스템 또는 전문회사의 설립 등에 본 연구에서 개발된 신규 배지 및 균주 안정화 기술이 적용될 수 있을 것이다.

#### 5. 신규 김치 종균용 배지 개발에 따른 상품화

- 기존의 유산균 배지인 MRS가 현재 대부분의 김치 유산균 연구에 사용되는 현실에서 우리 김치 유산균에 적합한 배지의 개발 및 이의 상품화는 우리 김치 유산균의 활성 및 작용에 대한 보다 정확한 이해를 제공해 줄 수 있으며, 이를 위하여 보다 체계적인 김치 유산균용 배지 상품화 과제가 추진되어야 할 것이다.

## 제 6 장 참고문헌

1. So, M.H., Kim, Y.B. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 27(4): 495-505 (1995)
2. Kang, S.M., Yung, W.S., Kim, Y.C., Joung, E.Y. and Han, Y.G. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for Kimchi fermentation and effect of starter. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23(4): 461-471 (1995)
3. Lee, C.W., Ko, C.Y. and Ha, D.M. Microfloral of the lactic acid bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20(10): 102-109 (1992)
4. Kim, O.M., Kim, M.K., Lee, K.R. and Kim, S.D. Selective serial antimicrobial effects of spice extracts against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Kimchi. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 26(5): 373-378 (1998)
5. Kim, M.H., Oh, S.W., Hong, S.P. and Yoon S.K. Microbiology/fermentation: antimicrobial characteristics of chitosan and chitosan oligosaccharides on the microorganism related to Kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 30(6): 1439-1447 (1998)
6. 김치의 고품질 상품화 기술 개발. 농림부 기술 개발사업 기획과제 최종 보고서 (2000)
7. Cummings JH, Macfarlane GT: Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. JPEN J Parenter Enteral Nutr 21(6):357-65(1997)
8. Rolfe RD: The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. J Nutr 130(2S Suppl):396S-402S (2000)
9. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK :Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus*

- acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis*.: Br J Nutr 83(2):167-76 (2000)
10. Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK: Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis*. Eur J Clin Nutr 54(3):263-7(2000)
  11. Vaughan EE, Mollet B :Probiotics in the new millennium.: Nahrung 43(3):148-53(1999)
  12. Daigle A, Roy D, Belanger G, Vuilleumard JC : Production of probiotic cheese (cheddar-like cheese) using enriched cream fermented by *Bifidobacterium infantis*. J Dairy Sci 82(6):1081-91 (1999)
  13. Tejada-Simon MV, Lee JH, Ustunol Z, Pestka JJ :Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. : J Dairy Sci 82(4):649-60(1999))
  14. 신명수 이정준 나석환 배형석 허철성 백영진. 한국인 분변으로부터 생균제용 *Bifidobacterium* spp.의 선발 및 특성. 한국낙농학회지 20(4) 273-282, 1998
  15. 이주연 박종현 장학길 목철균 쌀과 사과박 혼합물을 이용한 *Bifidobacterium* 발효제품의 개발. 산업미생물학회지 27(3) 333-338, 1999)
  16. 김영찬 정후길 김세헌 문용일 김병철 .한국인으로부터 분리한 비피더스균의 특성에 관한 연구 . 한국낙농학회지 20(3) pp.191-204, 1998)
  17. 이영경 김동현 한명주. 한국형유산균인 *Bifidobacterium breve* K-110, K-111 및 *B. infantis* K-525 균주의 항산화 및 항돌연변이효과. 한국식품과학회지 31(2) 547-552, 1999)
  18. 상품김치의 품질 균일화 및 품질유지 기술 개발. 과학기술부 최종보고서 (1998)

### 3장 1절 - 참고문헌

1. Yang, E.J., J.Y. Chang, H.J. Lee, J.H. Kim, D.K. Chung, J.H. Lee and H.C. Chang. Characterization of the antagonistic activity against *Lactobacillus plantarum* and Induction fo bacteriocin production. *Kor. J. Food Sci. Thechnol* 34(2)311~318(2002)
2. National Institutes of Health : Lowering blood cholesterol to prevent heart disease. *J. Am. Med. Assoc.*, 253, 2080-2086(1985)
3. McGrandy, R. B., Hegsted, D. M. and Stare, F. J. : Dietary fats, carbohydrates and atherosclerotic vascular disease. *New Engl. J. Med.*, 277, 242-247(1967)
4. Simopoulos, A. T. :  $\omega$ -3 fatty acids in growth and development and inhealth and disease : The role of  $\omega$ -3 fatty acids in health and disease; dietary implications. *Nutrition Today*, 10, 12-18(1988)
5. Bang, H. O. and Dyerberg, J. : Plasma lipids and ischemic heart disease in Greenland Eskimos. *Adv. Nutr. Res.*, 3, 1-9(1980)
6. Kinsella, J. E. : Dietary fish oils: possible effects of n-3polyunsaturated fatty acids in reduction of thrombosis and heart disease. *Nutrition Today*, 6, 7-14(1986)
7. Lorenz, J. P., Doormen, V, and Orlebeke, K. F. : Stress, personality and serum cholesterol level. *J. Human Stress*, 8, 24-36(1982)
8. Phillips, N. R., Havel, R. J. and Kane, J. P. : Levels andinterrelationships of serum and lipoprotein cholesterol and triglycerides. Association with adiposity and consumption of ethanol, tobacco, and beverages containing caffeine. *Arteri.*, 1, 13-24(1981)
9. Kim, S. Y., Kim, H. S., Kim, S. H., Kim, H. S., Su, I. S and Chung, S.

- Y. : Effects of the feeding *Platycodon grandiflorum* and *Codonopsis lanceolata* on the fatty acid composition of serum and liver in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **22**, 524-530(1993)
10. Dwyer, J. : Overview : dietary approaches for reducing cardiovascular disease risks. *J. Nutr.*, **125**, 656S-665S(1995)
11. Miettinen, T. A. : Dietary fiber and lipids. *Am. J. Clin. Nutr.*, **45**,1237-1242(1987)
12. Lee SK, Ji GE, Park YH. The viability of bifidobacteria introduced into kimchi. *Lett Appl Microbiol.* 1999 28(2):153-6.

### 3장 2절 - 참고문헌

1. Summary of the second report of the national cholesterol education program(NCEP)(1993) Expert Panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults(Adult Treatment Panel II). *JAMA*, 269, 3015-3023
2. Kim, N. J., Jung, E. A., Kim, D. H. and Lee, S. I., (1999) Studies on the development of antihyperlipidemic drugs from oriental herbal medicines(I). *Kor. J. Pharmacogn.* 30(4), 368-376
3. Kim, N. J., Jung, E. A., Kim, D. H. and Lee, S. I., (2000) Studies on the development of antihyperlipidemic drugs from oriental herbal medicines(II). *Kor. J. Pharmacogn.* 31(2) 190-195
4. Reitman, S. and Frankel, S.(1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic transaminase and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 56

5. Brown, M. S. and Goldstein, J. L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232, 34-47
6. Miller, N. E. (1978) The evidence for the antiatherogenicity of high density lipoprotein in man. *Lipids*, 13, 914-919
7. Ross, R. (1986) The pathogenesis of atherosclerosis-A update. *New Engl. J. Med.*, 314 : 488-500
8. Oda, T., Shikata, T., Naito, C., Suzuhi, H. and Kanetaka, T.(1970) Phospholipid fatty liver : a report of three cases with a new type of fatty liver. *Jpn. J. Exp. Med.*, 40, 127-140
9. Steinberg, D. (1983) Lipoproteins and atherosclerosis.: a look back and look ahead. *Atherosclerosis* 3: 283-301
10. Mezey, E.. "Alcoholic liver disease; Roles of alcohol and malnutrition." *Am. J. Clin. Nutr.* 33:2709-2718, 1980.
11. Keshavarzian, A., Fields, J.Z., Vaeth, J., Holmes, E.W.. "The differing effects of acute and chronic alcoholic on gastric and intestinal permeability." *Am. J. Gastro.* 89:2205-2212, 1994.
12. Sung, K.S., Chun, C., Kwon, Y.H., Kim, K.H., Chang, C.C.. "Effects of red ginseng component on the antioxidative enzymes activities and lipid peroxidation in the liver of mice." *J. Ginseng Res.* 24(1):29-34, 2000.
13. Alscher, R.G.. "Antioxidants in higher plants" CRC Press. INC. 12-21, 1993
14. Niki, E.. "Antioxidant defenses in eukariotic cells:An overview." *Free radicals from basic science to medicine.* pp.365-373, 1993.
15. Lee, C.J.. "A study on the antioxidative effects on the oils and identification of antioxidative substances from as *Astragalus membrabaceus* Bunge extracts." Ph. d. dissertation, Sungshin women's university. 1999.

### 3장 3절 - 참고문헌

1. Cummings, J.H., Macfarlane, G.T., 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J. Appl. Bacteriol.*, 70: 443-459
2. Ji, G.E., 1994. Composition of distribution of intestinal microbial flora in Korean. 1994. *Kor. J. Appl. Microbio. Biotechnol.* 22: 453-458
3. El-Gawad, I.A., Sayed, E.M., Hafez, S.A., El-Zeini, H.M., Saleh, F.A., 2005. The hypocholesterolaemic effects of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal* 15: 37-44
4. Ohyama, Y., 1982. Extracellular polysaccharide produced by Bifidobacterium. *Jpn. . Dairy Food Sci.* 31:258-259
5. Wang, M., Tsou, K.C., Norris, R.F., 1969. The depolymerization of Bifidan, a polysaccharide of *Lactobacillus bifidus*, by ascorbic acid. *Arch. Biochem. Biophysics.* 131: 513-520.
6. Trovatelli, L.D., Matteuzzi, D., 1976. Presence of Bifidobacteria in the rumen of calves fed different rations. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 470-473
7. Mayer, J.B., 1948. Development of a new infant food with *Lactobacillus bifidus*. II. Culture of *Lactobacillus bifidus* in the presence of oxygen. *Z. Kinderheilk.*, 65: 319-327
8. Brown, C.D., Townsley, P.M., 1970. Fermentation of milk by *Lactobacillus bifidus*. *J. Inst. Can. Technol. Aliment.* 3: 121-129
9. Mutai, M., Mada, M., Shimada, K., 1980. Method for producing foods and drinks containing *Bifidobacterium*. US Patent. 4187321
10. Jeong, H.K., Juhn, S.L., Yang., J.O., Kang, K.H., 1996. Isolation and

characterization of the factors affecting growth properties of the aerotolerant bifidobacteria. 16: 73-78

11. Glen, E.H., Lambrecht, R.S., 1993. Augmentation of macrophage phagocytic activity by cell-free extracts of selected lactic acid producing bacteria. J. Dairy Sci. 76: 2485-2492

### 3장 4절 - 참고문헌

1. D. Riesenber, R. Guthke (1999) High-cell-density cultivation of microorganisms. Appl Microbiol Biotechnol 51: 422-430
2. Yin Li, Jian Chen, Yingyin Mao, Shili Lun (1997) Fermentation conditions and high-cell density culture of recombinant *Escherichia coli* for enhancement of glutathione production. 4th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference: 431-434
3. Jeong-Woo Shon, Ho-Sup Jung, Cheon-Woo Lee, Hyun-Jo Lee, Kwang-Kim. Production of chitinase by high cell density fed-batch culture of *Serratia marcescens* with glucose concentration control.
4. Hiroyuki Honda, Hiroyasu Sugiyama, Ikuo Saido, Takeshi Kobayashi (1998) High cell density culture of *Rhodococcus rhodochrous* by pH-Stat feeding and dibenzothiophene degradation. Journal of Fermentation and Bioengineering Vol.85 No.3: 334-338
5. Rüdiger Heidemann, Chun Zhang, Hanshi Qi, James Larrick Rule, Carl Rozales, Sinyoung Park, Sandra Chuppa, Manas Ray, James Michaels, Konstantin Konstantinov, David Naveh (2000) The use of peptones as medium additives for the production of a recombinant therapeutic protein in

- high density perfusion cultures of mammalian cells. *Cytotechnology* 32: 157-167
6. Michimasa Kishimoto, Hideyuki Suzuki (1995) Application of an expert system to high cell density cultivation of *Escherichia coli*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* Vol.80 No.1: 58-62
  7. Park, Yong-Cheol, Chang Sup Kim, Chung Im Kim, Kyu Hwan Choi, Jin-Ho Seo (1997) Fed-batch fermentations of recombinant *Escherichia coli* to produce *Bacillus macerans* CGTase. *Journal of Fermentation and Bioengineering* Vol.7 No.5: 323-328
  8. Jeongseok Lee, Sang Yup Lee, Sunwon Park. High cell density culture of *E.coli* W in the fed-batch culture using sucrose as a carbon source.
  9. H. H. Wong, S. Y. Lee (1998) Poly-(3-hydroxybutyrate) production from whey by high-density cultivation of recombinant *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 50: 30-33
  10. C. Shene, N. Mir, B. A. Andrews, J.A. Asenjo (2000) Effect of the growth conditions on the synthesis of a recombinant  $\beta$ -1,4-endoglucanase in continuous and fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology* 27: 248-253
  11. Dae-Hyuk Kweon, Nam Soo Han, Kyung-Moon Park, Jin-Ho Seo (2001) Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry* 36: 537-542
  12. K. Adhikari, A. Mustapha, I. U. Grn, L. Fernando (2000) Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. *J Dairy Sci* 83: 1946-1951
  13. T. M. S. Chang, S. Prakash (2001) Procedures for microencapsulation of

- enzymes. Cells and genetically engineered microorganisms. *Molecular Biotechnology* 17:3/249-260
14. R. Crittenden, A. Laitila, P. Forssell, J. Mtt, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, P. Myllinen (2001) Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implication in probiotic technologies. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 3469-3475
  15. R Mahalakshmi, VVPS Murthy (2000) Growth of *Bifidobacterium bifidum* in whey-based media. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25: 177-179
  16. Raf Callewaert, Luc De Vuyst (2000) Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed-batch fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* Feb: 606-613
  17. Ulrich Kulozik, Jrgen Wilde (1999) Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helbeticus*. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 297-302
  18. Euu-Seung Song, Yeong-Soo Jeon, Hong-Sik Cheigh (2001) Isolation of chlorophyll derivatives and  $\beta$ -carotene from mustard leaf and their antioxidative on the lipid autoxidation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(3): 377-381
  19. A. E. Mars, J. P. L. Gorissen, I. van den Beld, G. Eggink (2001) Bioconversion of limonene to increased concentrations of perillic acid by *Pseudomonas putida* GS1 in a fed-batch reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 56: 101-107
  20. Jan C. R. Demyttenaere, M. del Garmen Herrera, Norbert De Kimpe (2000) Biotransformation of geraniol, nerol and citral by sporulated surface

cultures of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. Phytochemistry 55:  
363-373

## 주 의

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