

수출용

김치

품질향상

및

차별화를

위한

종군

활성화

기술

개발

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

발간등록번호

11-1543000-002651-01

수출용 김치 품질향상 및 차별화를 위한 종군 활성화 기술 개발 최종보고서

2019.03.28.

주관연구기관 / 세계김치연구소
참여기업 / (주)뜨레찬

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “수출용 김치 품질향상과 차별화를 위한 중균 활성화 기술 개발 및 사업화”(개발
기간 : 2017.04.21. ~ 2018.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 15.

주관연구기관명 : 세계김치연구소 (대표자) 하재호 (인)

참여기관명 : (주)뜨레찬 (대표자) 윤경미



주관연구책임자 : 김태운

참여기관책임자 : 윤경미

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117036-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.04.21. -2018.12.31.	단 계 구 분	2/2
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	수출용 김치 품질향상 및 차별화를 위한 종균 활성화 기술 개발			
연구책임자	김태운	해당단계 참여연구원 수	총: 12 명 내부: 9명 외부: 3명	해당단계 연구개발비	정부: 66,000천원 민간: 22,000천원 계: 88,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 23명 내부: 17명 외부: 6명	총 연구개발비	정부:134,000천원 민간: 45,000천원 계: 179,000천원
연구기관명 및 소속부서명	세계김치연구소 미생물기능성연구단			참여기업명 (주) 프레찬	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
-------------------------	----

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	1	2									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 김치의 품질기한을 연장하고자 김치 발효에 관여하는 *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp., *Leuconostoc* spp. 등 주요 유산균들의 생육을 억제할 수 있는 *Lactococcus lactis* 두 균주를 선발하였음
- 항균 활성이 우수한 *Lactococcus lactis*에 저해를 받지 않으면서 만니톨 생성능이 우수한 *Leuconostoc citruem* 두 균주를 선발하였음
- *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citruem* 두 균주를 효율적으로 배양하고 종균 활성을 증대시키기 위해 유당, 효모추출물, 구연산칼륨 등 식품첨가물 등급의 기질을 이용하여 기존 상업용 배지와 유사한 증식 능력을 가질 수 있는 김치 종균용 식용배지를 개발하였음
- 개발된 식용배지에 두 균주를 배양한 후 김치에 첨가하여 pH, 유산균수, 배양학적 및 비배양학적 방법을 이용한 종균 우점율 분석, 관능검사 등을 통해 종균 첨가 효과를 분석한 결과 첨가한 종균은 사멸하지 않고 우점율을 나타내었으며 이들에 의해 발효가 조절됨에 따라 대조군 김치에 비해 품질유지기한을 1.5배 연장시킬 수 있었음
- 발효특성 향상용 균주 선발을 위해 올리고당 생성능이 있는 *Leuconostoc mesenteroides* 1균주를 선발하였음

보고서 면수 : 50p

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 김치는 저장유통 중에 발효가 지속적으로 진행되어 품질변화가 일어나며, 일정시간 후에는 과도하게 시어져 품질이 저하되나 이를 해결할 수 있는 방법이 거의 없는 실정임 ○ 김치용 종균을 이용하여 품질유지기한 연장 등 김치 품질을 개선하려는 연구가 많이 수행 되었으나 대부분 건조된 균체를 양념 등에 단순 첨가함으로써 활성이 많이 저하되어 종균으로서 제 기능을 발휘하지 못함. 첨가하는 종균의 활성화 조건이나 우점율을 향상시키는 방법에 대해서는 연구된 바가 거의 없음 ○ 국내산 김치의 경우 해외 현지 생산 김치와의 가격 경쟁력 약화, 운송·유통 중 지속적인 발효 진행으로 인해 김치 수출에 있어 큰 애로점을 안고 있음 ○ 수출용 김치 품질향상 및 차별화를 위한 종균 활성화 기술을 개발하고 이를 활용하여 김치 품질유지기한 연장 기술을 개발하고자 함 ○ 김치 품질유지기한 연장 및 발효특성 향상용 종균 선발 <ul style="list-style-type: none"> - 품질유지기한 연장용 항균활성 우수 균주 및 올리고당 전환능 우수 균주 선발 ○ 김치 종균 최적 활성화 조건 탐색 및 첨가방법 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 종균 활성 증대를 위한 증균용 식용 배양액 개발 ○ 김치 발효기간 내 종균 모니터링 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 배양학적 및 비배양학적 방법을 이용한 종균 우점율 분석 ○ 종균 첨가 김치의 이화학적 특성 및 관능적 특성 측정 <ul style="list-style-type: none"> - 품질유지기한 연장 일수 및 발효특성 변화량 분석 ○ 종균을 활용한 품질 안정성 향상 및 발효특성 강화 김치 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 수출용 품질유지기한 연장 김치 개발 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 기술이전 1건 : 김치숙성도 제어 균주 4종 및 배양기술 ○ 상품화 1건(진행 중) : 품질유지기한이 연장된 수출용 김치 상품화 ○ 특허 출원 2건 : <ul style="list-style-type: none"> - 신규한 락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움 균주, 및 이들을 이용한 김치숙성도 제어방법 - 락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움의 혼합배양용 식용배지 조성물 ○ 논문 SCI(E) 1건 : Mixed starter of <i>Lactococcus lactis</i> and <i>Leuconostoc citreum</i> for extending kimchi shelf-life ○ 김치종균 2종 : 품질유지기한 2종(항균우수 균주 <i>Lactococcus lactis</i> 2종, <i>Leuconostoc citreum</i> 2종), 발효특성 향상 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 1종 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수출용 상품김치의 품질유지기한 연장으로 인한 제품 가치 제고 ○ 수출용 김치의 장거리 수송 및 유통 가능에 따른 수출국 다변화 및 수출량 증가 ○ 종균 활성화 기술을 통한 김치 종균 사용 비용 감소 ○ 김치종균의 산업체 적용을 통한 김치산업 선진화 ○ 유용 김치유산균의 자원화 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	김치	종균	배양	품질유지기한	수출
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Kimchi	Starter	cultivation	Shelf-life	export

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	11
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	44
4. 연구결과의 활용 계획 등	47
붙임. 참고 문헌	48

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

- 김치종균 최적 활성용 배양액을 제조하고 이를 현장에서 편리하게 사용할 수 있도록 편의형 용기를 개발함으로써 김치 종균의 활성도를 높이고 기존 종균 대비 사용량을 줄일 수 있는 김치 종균 활성화 기술을 개발하고자 함

1-2. 연구개발의 필요성

- 김치는 자연발효 식품으로 원·부재료의 품종, 생산시기, 종류 및 배합비에 따라 가공적성과 발효속성 조건이 달라지게 되며, 현재 기업적 생산에서도 일부 대기업을 제외하고 전래의 보편적인 방법에 의해 제조 되고 있는 실정임
- 김치의 경우 배추 품종, 절임방법, 양념 혼합, 숙성 방법 및 미생물 발효 패턴 등 품질 균일화를 위해서는 많은 변수가 조절되어야 함. 이 중에서 제조 공정 관리 부분은 현재까지 축적된 산업화 노하우와 연구 데이터로 인하여 산업현장에서 어느 정도 품질관리가 가능하지만 미생물 발효패턴 조절 기술은 아직 산업현장에서 현실화 된 것이 미비한 실정임
- 김치의 상품화에 있어 품질 균일화 및 저장성 연장이 가장 큰 문제로 대두되고 있으나 이를 해결 할 수 있는 방법이 아직 실용화 되지 못하고 있는 실정임
- 따라서 김치 발효 기작의 정확한 규명을 통해 발효능이 우수한 균주를 선발한 후, 이를 종균으로 첨가하여 김치의 품질균일화 및 품질 유지 기술을 확보하는 것은 김치의 품질 향상, 다양화 및 세계화에 있어 매우 중요한 의미를 갖고 있음
- 일반 가정용 소포장 상품김치가 출시되면서 소비자의 상품김치에 대한 인식이 크게 개선되었으며 품질 균일화와 보존성 향상을 위하여 유산균 종균(starter)을 사용한 연구가 시도되고 있음. *Leuconostoc mesenteroides* 균주를 첨가하여 산패가 억제되고 보존성이 연장된 김치를 제조하는 방법(대한민국 공개특허 제1989-0006153호)과 *Leuconostoc paramesenteroides*와 *Leuconostoc mesenteroides* 균주를 혼합 첨가함으로써 맛과 산패가 지연된 김치의 제조방법(대한민국 등록특허 제0181009호)등이 시도된 바 있음
- 일부 대기업을 중심으로 김치의 제조에 종균이 적용되고 있으나, 국내 김치 산업체의 경우 약 55%가 10인 이하 영세기업으로 독자적으로 김치발효 조절용 종균을 개발하기는 매우 어려운 실정임. 대다수의 영세한 김치제조업체에서의 종균 적용을 위한 기술 보급이 절실히 필요한 실정임
- 김치와 유사한 염지 및 야채발효식품인 일본의 쓰게모노(漬物), 서양의 sauerkraut와 pickles 등은 이미 많은 연구가 진행 되어 발효기작이 거의 밝혀져 있으며, 따라서 발효의 인위적

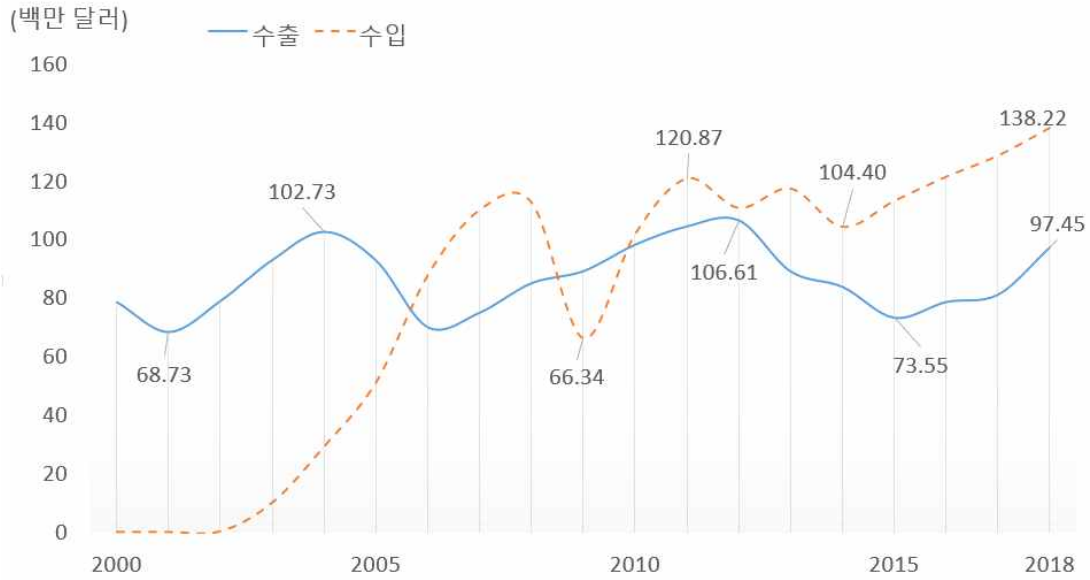
조절이 가능한 단계에 이르렀음

- 따라서 김치 발효 기작의 정확한 규명을 통해 발효능이 우수한 균주를 선발한 후, 이를 종균으로 첨가하여 김치의 품질균일화 및 품질 유지 기술을 확보하는 것은 김치의 품질 향상, 다양화 및 세계화에 있어 매우 중요한 의미를 갖고 있음
- 김치의 품질유지기한은 국내의 경우 냉장보존에서 통상 30일 정도로 정해져서 유통되고 있으나, 발효말기에는 과도하게 시어지거나 포장이 팽창하여 상품가치를 상실하는 경우도 발생되고 있음. 수출 김치의 경우는 제품출하 → 선적 → 수입통관 → 해외 시장 소비자까지 일본, 대만 등과 같이 가까운 지역은 보통 7-10일정도 소요되지만 미국, 호주 등의 국가까지는 한달 정도가 소요되고 이라크 등 중동지역까지는 두달 정도가 소요되고 있음. 중국 등은 지리적으로 가까운 편이나 통관에 1-2주가 소요되고 있는 실정임. 따라서 수출용 김치의 경우 지역에 따라 최소 2개월 이상 품질유지기한이 요구되고 있는 실정임



해외시장 확대의 어려움 저장기술능력 부재에 따른 해외 확대 어려움 ⇨ 유통기한 연장
 가격경쟁력 부재(품질)에 따른 해외 시장 개척의 어려움 ⇨ 품질향상

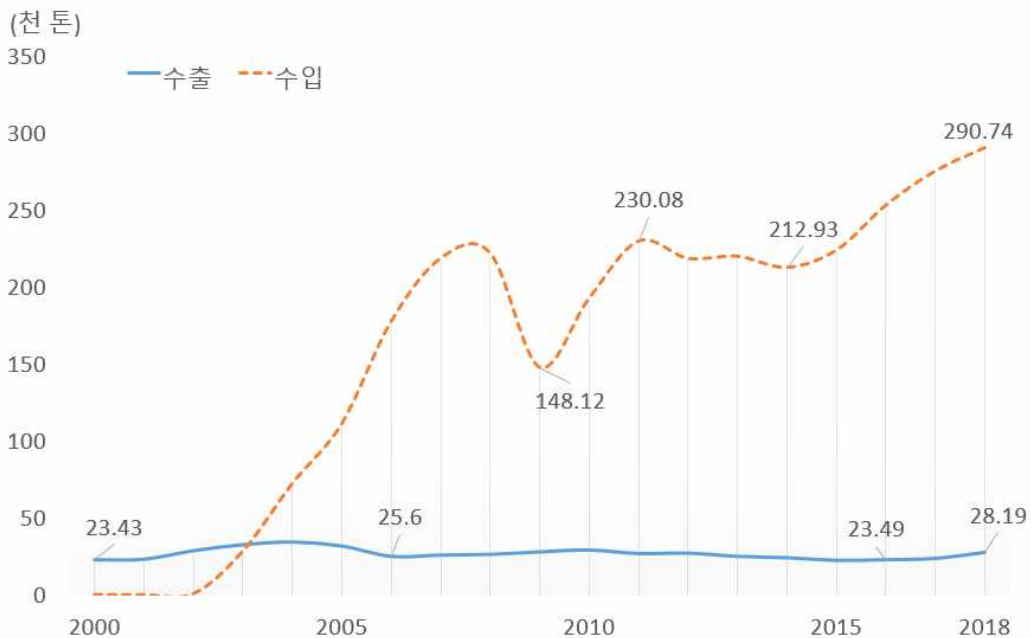
- 2018년 김치 수출액은 9,745만 달러로 전년 대비 증가했지만 무역적자는 여전히 심각한 상황임. 2018년 연간 김치 수출액은 9,745만 달러로서 전년 대비 19.7%, 수출량은 2만8,188톤으로서 전년 대비 15.9% 증가하였음. 2018년에 김치 수출 규모가 확대된 것은 한국 인지도 상승으로 인한 한류 식문화 확산 등이 긍정적인 영향을 준 것으로 보이며 일본의 경우, 김치유산균에 대한 내용이 공용매체를 통해 소개되면서 김치 수요가 증가한 것으로 보임. 그러나 무역수지 적자는 지난 6년간 계속해서 지속되고 있는 상황임



<김치 교역액 추이>

(출처: 2018 김치수출입 동향, 세계김치연구소)

- 중국산 수입 김치는 국내 소비량의 약 14.1%를 차지하고 있음. 2018년 중국산 김치 수입액은 1억 3,820만 달러로서 전년 대비 7.4%, 수입량은 29만 739톤으로서 전년 대비 5.5% 증가하였음. 2018년 중국산 김치 수입 단가는 0.48달러(523원)/kg로서 전년의 0.47달러(513원)/kg에 비해 1.8% 상승하였음. 한국으로 김치를 수출하는 국가의 수는 7개국으로 집계되었으나, 전체 김치 수입에서 중국이 차지하는 비중이 금액과 중량 모두 99.9%를 상회하여, 국내에서 유통되는 수입 김치는 모두 중국산 이라고 할 수 있음



<한국의 김치 교역량 추이>

(출처: 2018 김치수출입 동향, 세계김치연구소)

○ 김치용 종균을 이용하여 품질유지기한 연장 등 김치 품질을 개선하려는 연구가 많이 수행되었으나 대부분 건조된 균체를 양념 등에 단순 첨가함으로써 활성이 많이 저하되어 종균으로서 제 기능을 발휘하지 못하고 있음. 또한, 김치는 다른 발효식품과는 달리 원·부재료의 살균 공정 없이 제조가 됨으로 첨가된 종균이 원·부재료로부터 기인하는 미생물들과 경쟁을 해야 함으로써 우점종이 되기에는 더욱 어려움이 있음. 지금까지는 첨가하는 종균의 활성화 조건이나 우점율을 향상시키는 방법에 대해서 연구된 바가 거의 없음

○ 종균 김치 국내 업체 현황

- 품질균일화를 위한 종균김치는 일부 대기업을 중심으로 생산되고 있음
- 유제품은 종균을 이용한 맛춤형 발효 단계이나 김치는 대부분 자연발효단계 수준으로 생산되고 있으며 종균을 첨가한 김치는 일부 업체에서만 제조하고 있음. 자체적으로 종균을 생산하여 사용하고 있는 업체는 극소수에 불과함
- 1998년: 베지퀸에서 최초 시도하여 제품 출시 (*Leuconostoc citreum* IH-22)
- 2000년대 초반: 한울바이오김치(*Leuconostoc kimchii*), 종가집 어린이 김치 (*Leuconostoc* DRC 0211 함유)
- 2000년대 후반: CJ 하선정 김치, 동원양반김치, 풀무원, 아워홈 등에서 유산균 첨가 김치 출시. 대상(종가집 김치)의 경우 항헬리코박터 *Lactobacillus plantarum* PL901 함유 김치를 암웨이를 통해서 판매함

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

- 김치 품질유지기한 연장 및 발효특성 향상을 위한 김치용 종균의 최적활성 조건 및 첨가법에 대한 연구가 절실히 필요한 실정임
- 국내산 김치의 경우 해외 현지 생산 김치와의 가격 경쟁력 약화, 운송·유통 중 품질저하로 인해 김치 수출에 있어 큰 애로점을 안고 있음. 또한, 해외 소비자의 신규 수요를 창출할 수 있는 발효 특성 향상 등 차별화된 김치가 부재한 실정임
- 수출용 김치 품질향상 및 차별화를 위한 종균 활성화 기술을 개발하고자 함

1-3. 연구개발 범위

- 김치 품질유지기한 연장 및 발효특성 향상용 종균 선정
 - 품질유지기한 연장용 항균활성 우수 균주 및 올리고당 전환능 우수 균주 선발
- 김치 종균 최적 활성화 조건 탐색 및 첨가방법 개발
 - 종균 활성 증대를 위한 증균용 식용 배양액 개발
 - 종균 배양을 위한 현장적용 편의형 배양 용기 개발
- 김치 발효기간 내 종균 모니터링 분석
 - 배양학적 및 비배양학적 방법을 이용한 종균 우점율 분석
- 종균 첨가 김치의 이화학적 특성 및 관능적 특성 측정
 - 품질유지기한 연장 일수 및 발효특성 변화량 분석
- 종균을 활용한 품질 안정성 향상 및 발효특성 강화 김치 개발
 - 품질유지기한 연장 김치 및 올리고당 함량 증대 김치 개발

2. 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 품질유지기한 연장용 항균활성 우수 균주의 선발

1. 실험방법

가. 유산균의 분리

일반가정과 시중에서 시판되고 있는 김치를 수집하여 유산균을 분리하고자 거즈를 이용하여 김치국물에 있는 고형분을 제거 한 후, 희석하여 MRS배지에 0.2% bromophenol blue 지시약 1%를 넣어 제조한 MRS-BPB 배지에 도말하여 30°C에서 48시간 동안 혐기적으로 배양한 다음 주변에 노란색 환을 생성한 colony를 분리하였다.

나. 항균 활성 우수 균주 선발

항균활성 시험은 well diffusion assay를 이용하여 김치 과숙 관련 지시균주에 대하여 분리 균주들의 생육저해활성을 확인하였다. 분리된 500여개의 균주의 항균활성을 측정하기 위해 김치 과숙 관련 지시균주로 *Lb. sakei*를 사용하였다. 지시균주 배양액을 0.7%(v/v) soft MRS agar에 접종하여 MRS plate에 overlay하여 균힌 다음, cork borer를 이용하여 직경 5 mm의 구멍을 내고 분리 균주의 상등액 30 μ l를 접종하였다. 30°C에서 24시간 배양한 후, 저해환의 생성 여부를 확인하였다.

다. 균주 동정

선발된 균주는 MRS 배지를 사용하여 배양한 후 genomic DNA Prep kit (Quiagen, Valecia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 16S rRNA gene을 증폭하기 위해 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT AGG ACT T-3')을 사용하였다[Lane, 1991]. PCR 반응은 T3000 Thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였고, 50 μ L PCR 반응계에는 template DNA, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 10 pmol의 primer를 첨가하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C에서 1분간 변성, 57°C에서 1분 결합, 72°C에서 1분 신장의 과정을 30회 반복하였고, 마지막에 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit (Quiagen, USA)을 사용하여 정제한 후, 수탁업체(Macrogen)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 EZBioCloud Database에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast search를 통해 계통발생학적 분석을 수행하였다. Database에 등록된 표준균주 (type strain)와 가장 높은 상동성을 나타내는 분류군을 해당 염기서열에 해당하는 bacteria로 동정하였다.

2. 실험 결과

가. 항균 활성 우수 균주 선발 및 동정

항균활성 측정은 agar-well diffusion assay 방법을 사용하여 김치 발효 관련 지시균주에 대해서 분리균주들의 생육저해활성을 확인하였다. 30°C 에서 1일간 배양하여 생육저지환의 생성을 확인하였다. 항균 활성의 정도는 배양 후 생성된 clear zone의 크기를 측정하였다. Fig. 1에 나타낸 바와 같이 *Lb. plantarum* MGB0106; (2), *Lb. paraplantarum* MGB0564; (3), *Lb. curvatus* MGB0015; (4), *P. inopinatus* MGB0374; (5), *Lb. brevis* MGB0551; (6), *Lb. carnosum* MGB0028; (7), *W. confusa* MGB0330; (8), *W. koreensis* MGB0025; (9), *P. pentosaceus* MGB0620; (10), *Lb. sakei* MGB0026; (11), *Leu. mesenteroides* MGB0014에 대하여 항균활성을 나타내었다. 그러나, *Leu. citreum* WiKim0096에 대해서는 항균활성을 나타내지 못했다. 항균 활성 결과를 통해 두 균주를 선발하였고, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 이들 균주는 *Lactococcus lactis*로 동정이 되었으며 각각 *Lactococcus lactis* WiKim0098 및 *Lactococcus lactis* WiKim0099로 명명되었다.

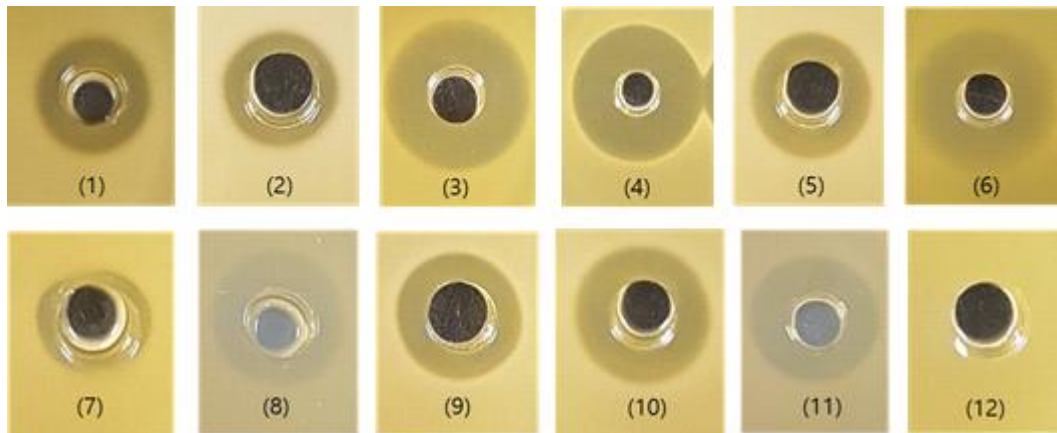


Fig. 1. Agar-well diffusion assay을 이용한 항균활성 측정

Reference strains: (1), *Lb. plantarum* MGB0106; (2), *Lb. paraplantarum* MGB0564; (3), *Lb. curvatus* MGB0015; (4), *P. inopinatus* MGB0374; (5), *Lb. brevis* MGB0551; (6), *Lb. carnosum* MGB0028; (7), *W. confusa* MGB0330; (8), *W. koreensis* MGB0025; (9), *P. pentosaceus* MGB0620; (10), *Lb. sakei* MGB0026; (11), *Leu. mesenteroides* MGB0014; (12), *Leu. citreum* WiKim0096

제 2 절 Mannitol 생성능 우수 균주의 선발

가. 유산균의 분리

일반가정과 시중에서 시판되고 있는 김치를 수집하여 유산균을 분리하고자 거즈를 이용하여 김치국물에 있는 고형분을 제거 한 후, 희석하여 MRS배지에 0.2% bromophenol blue 지시약 1%를 넣어 제조한 MRS-BPB 배지에 도말하여 30℃에서 48시간 동안 혐기적으로 배양한 다음 주변에 노란색 환을 생성한 colony를 분리하였다.

나. Mannitol 생성능 우수 균주 선발

앞서 분리한 항균 활성이 우수한 *Lactococcus lactis* 균주들이 *Leuconostoc citreum* 균주는 저해하지 못하는 것으로 나타나 만니톨 생성으로 인해 김치 관능에 좋은 영향을 줄 수 있는 *Leuconostoc citreum* 균주를 종균으로 함께 이용하고자 만니톨 생성능이 우수한 *Leuconostoc citreum* 균주를 선발하고자 하였다. 김치로부터 분리된 유산균들을 4%의 과당(fructose)를 첨가한 5ml의 MRS 액체배지에 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 후, 원심분리 (10,000×g, 5min)하여 얻은 상층액을 0.45µm syringe filter로 여과하여 배지 내 만니톨(mannitol) 생성량을 분석하는데 사용하였다. 배양액 내 과당 잔존율 및 만니톨 생성율은 HPLC(Waters 2695 eAlliance, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 당 분석 검출기는 Waters RI detector를 사용하였고, column은 Sugar-pak column(Waters, USA)을 사용하였다. 시료는 20µl를 주입하였으며, 이동상으로는 H₂O(HPLC-grade, Fisher)를 사용하여 0.5ml/min의 속도로 흘러주었다. 만니톨(mannitol), 포도당(glucose), 과당(fructose)의 표준물질은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 각각 100mg/ml의 농도가 되도록 계산하여 용량 플라스크에 정밀히 취하고 물을 첨가하여 정용하였으며, 물로 희석하여 0.4mg/ml, 0.8mg/ml, 1.6mg/ml, 3.2mg/ml 용액을 검량선 작성용 표준용액으로 이용하였다. 시료 중의 당 농도는 표준물질의 성분과 머무름 시간이 일치하는 피크의 면적값을 해당 표준물질의 표준곡선에 대비하여 정량하였다.

다. 균주 동정

선발된 균주는 MRS 배지를 사용하여 배양한 후 genomic DNA Prep kit (Quiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 16S rRNA gene을 증폭하기 위해 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT AGG ACT T-3')을 사용하였다[Lane, 1991]. PCR 반응은 T3000 Thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였고, 50µL PCR 반응계에는 template DNA, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 10 pmol의 primer를 첨가하였다. PCR 반응은 95℃에서 5분간 예비가열 후, 95℃에서 1분간 변성, 57℃에서 1분 결합, 72℃에서 1분 신장의 과정을 30회 반복하였고, 마지막에 72℃에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit (Quiagen, USA)을 사용하여 정제한 후, 수탁업체(Macrogen)에 의뢰하여 염기서열을 결정하

였다. 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 EZBioCloud Database에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast search를 통해 계통발생학적 분석을 수행하였다. Database에 등록된 표준균주 (type strain)와 가장 높은 상동성을 나타내는 분류군을 해당 염기서열에 해당하는 bacteria로 동정하였다.

2. 실험 결과

가. Mannitol 생성능 우수 균주 선발 및 동정

만니톨 생성능이 우수한 균주의 선발은 MRS 액체 배지 내에 함유된 과당을 전환시켜 만니톨을 많이 생성한 두 균주를 선발하였다(Fig. 1). 선발한 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통해 *Leuconostoc citreum*으로 동정이 되었으며 *Leuconostoc citreum* WiKim0096, *Leuconostoc citreum* WiKim0101로 명명하였다.

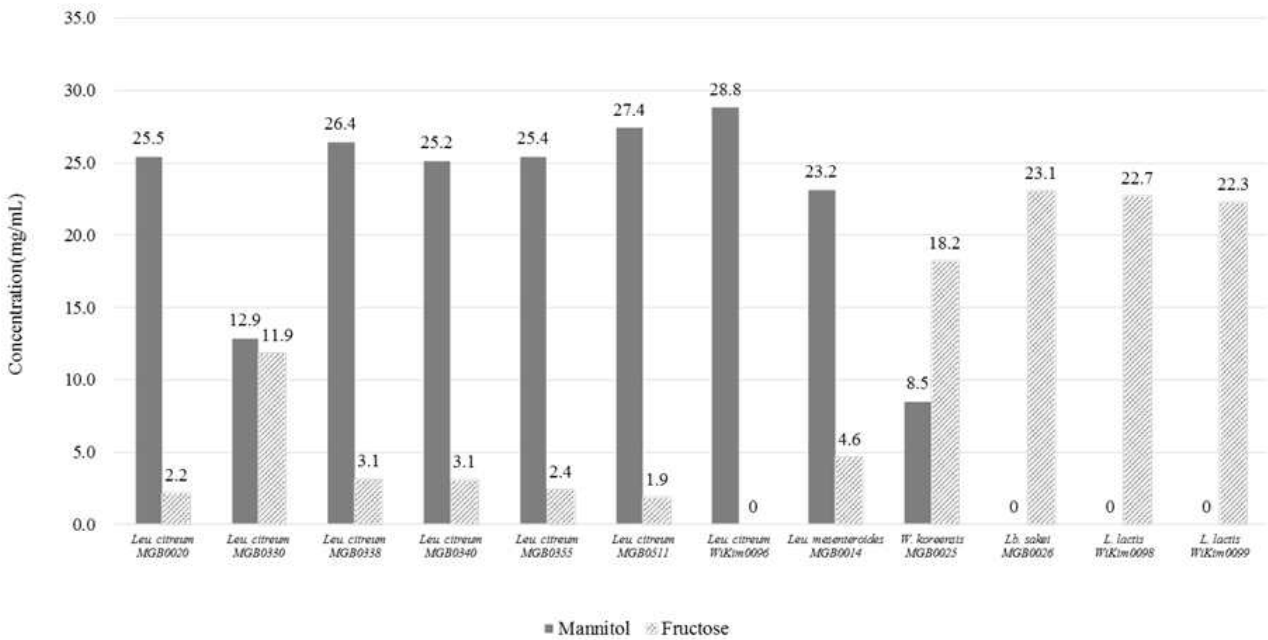


Fig. 1. 각 균주별 mannitol 생성량

제 3 절 Oligosaccharide 생성능 균주의 선발

1. 실험방법

가. TLC 상에서 단당류 및 올리고당 확인

Oligosaccharide 합성을 확인하기 위해 sucrose와 maltose를 함유하는 배지에서 배양한 후 TLC 분석을 진행했다. TLC plate (Whatman K5 TLC plates, Merck, Darmstadt, Germany)는 Silica gel 60 F₂₅₄ aluminum sheet를 사용했다. 시료를 1-2 µg/µl 범위 이내로 전개판 아래에서 20mm 거리에, 시료간격은 15mm가 되도록 적용시켰다. 전개판이 약 10mm 정도 잠기도록 전개 상자에 전개용매를 설치했고, 전개거리가 180mm가 되도록 하여 전개 용매면이 전개판의 끝까지 도달하게끔 약 70분 정도 전개를 진행했다. 전개가 끝난 후 전개판을 건조시킨 후 발색제를 전개판에 분무시켰다. 전개용매의 조성비는 acetonitrile/distilled water (85:15, v/v)이며, 발색제는 에탄올에 α-naphtol(0.5%, w/v)과 sulfuric acid(5%, v/v)의 농도로 첨가하여 사용하였다. 발색제가 마르기까지 기다린 후 65°C oven에서 10분 동안 전개판에 spot이 나타날 때까지 건조시켰다.

2. 실험 결과

가. Oligosaccharide 생성능 균주 선발 및 동정

Sucrose와 maltose를 함유하는 배지에서 배양한 유산균들의 상등액에 있는 당 성분을 TLC로 분석한 결과 아래 Fig. 1에서 보는 바와 같이 *Leu. citreum* 균주와 *Leu. mesenteroide* 균주들에서 올리고당 생성능이 나타나 이들 균주들의 생성량을 향후 정량하고 이들을 김치 종균으로서 활용할 계획이다.

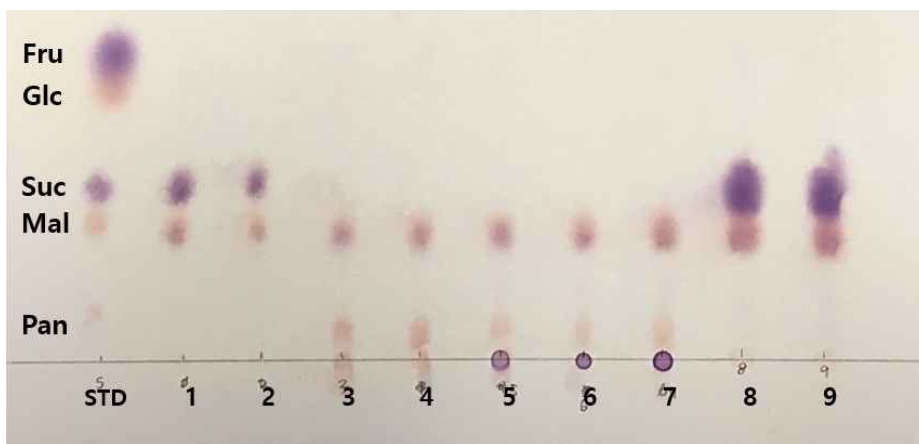


Fig. 1. TLC를 이용한 당류 분석

(1), *L. lactis* WiKim0098; (2), *L. lactis* WiKim0099; (3) *Leu. citreum* WiKim0096; (4), *Leu. citreum* WiKim0101; (5), *Leu. mesenteroides* CO1; (6) *Leu. mesenteroides* SR2; (7), *Leu. mesenteroides* PS2; (8) *Lb. sakei* 154; (9), *Lb. sakei* sin3

제 4 절 김치 중균 최적 활성화 조건 탐색 및 첨가 방법 개발

1. *Lactococcus lactis* 최적 증식을 위한 식용 액체 배지용 pH 완충제의 선발

*Lactococcus lactis*는 일반적으로 유산균 분리 및 계수에 많이 사용되는 MRS 배지에서도 증식하지만 0.5% lactose가 포함된 M17에서 보다 더 잘 증식한다. M17배지는 치즈나 요구르트 등 유제품에서 lactic streptococci을 분리하거나 계수하는데 사용하고 있다. 이들 균들의 성장에는 탄소원, 질소원, 비타민, 무기질 등 여러 가지 까다로운 영양성분들이 요구된다. M17배지는 이러한 성분들을 포함하고 있으며, 주요 성분으로 tryptone, peptone, beef extract, yeast extract 등이 있고 magnesium sulfate는 성장에 필요한 필수이온을 제공하며 ascorbic acid는 성장을 촉진시키는 인자로 사용되고 있으며 pH 완충제로서 disodium- β -glycerophosphate가 사용되고 있다. 이중 tryptone, peptone, yeast extract, ascorbic acid 등은 식품첨가물 등급의 동일 성분으로 대체가 가능하나 pH 완충제로서 사용되고 있는 disodium- β -glycerophosphate는 동일 성분의 식품첨가물이 없다. *Lactococcus lactis*는 homofermentative lactic acid bacteria로 증식과 더불어 많은 양의 젖산을 생성하여 배양액의 pH를 낮추는데 이는 역으로 *Lactococcus lactis*의 증식을 억제하는 요인이 된다. 따라서 pH 완충제로서 disodium- β -glycerophosphate를 대체할 수 있는 식품첨가물 등급의 pH 완충제가 필수적으로 필요하다. 식품첨가물로 사용되고 있는 여러 가지 pH 완충제 중에서 식용 배양액에 적용했을 때 침전 여부, 사용량, 이미 등을 고려하여 사용 가능한 성분을 알아본 결과 disodium- β -glycerophosphate 보다도 potassium citrate가 더 효과적인 것으로 나타났다(Table 1). Potassium citrate 농도에 따른 효과를 살펴본 결과 0.5% 이하의 농도에서는 균수가 감소하였고 1.0%의 농도에서는 0.5% 농도보다 약 1.2배의 균수의 증가를 나타내어 1.0%를 최종농도로 선정하였다. 한편 dipotassium phosphate, CaCO₃, ark shell(비소성 꼬막껍질), calcium citrate 등도 함께 살펴보았으나 침전이 발생하거나 그 효과가 potassium citrate에 비해 없었다.

Table 1. pH 완충제가 *Lc. lactis* 균수에 미치는 영향

균주명	배지 종류	균수(CFU/ml)
<i>Lactococcus lactis</i>	M17	4.6×10^9
	disodium- β -glycerophosphate(1.9%) ¹⁾	1.1×10^8
	potassium citrate (0.5%) ²⁾	6.7×10^8
	potassium citrate (1.0%) ³⁾	8.0×10^8

¹⁾ 2% glu + 2% yeast extract + 0.5% soypeptone + 0.05% ascorbic acid+1.9% disodium β -glycerophosphate

²⁾ 2% glu + 2% yeast extract + 0.5% soypeptone + 0.05% ascorbic acid + 0.5% potassium citrate

³⁾ 2% glu + 2% yeast extract + 0.5% soypeptone + 0.05% ascorbic acid + 1.0% potassium citrate

2. 액체 배지 제조 시 물을 대용할 김치용 육수 제조 및 이들이 균주의 증식에 미치는 영향

김치에 첨가하는 종균 증식용 배양액의 경우 많은 양이 첨가되었을 때 이미, 이취 뿐만 아니라 김치에 미칠 수 있는 관능적 특성까지도 고려해야 한다. 이러한 부분을 고려하여 배지에 사용되는 물 대신 김치 제조 시 많이 사용되는 김치 육수가 이를 대용할 수 있을지를 알아보았다. 액체 배지의 기본 조성은 casein peptone, soypeptone, beef extract, yeast extract, ascorbic acid, MgSO₄, potassium citrate, lactose를 이용하였다. 우선 Table 2와 같이 김치 육수 제조에 사용되는 재료로 북어, 다시마, 양파, 무, 건고추, 대파, 건표고, 건새우 등을 이용하여 육수를 제조한 후 이들 재료가 *Lactococcus lactis* 균주의 증식에 미치는 영향을 알아보았다. 그리고 단일 재료별로 육수를 제조하여 각각의 재료가 균주의 증식에 미치는 영향도 알아보았다.

Table 2. 김치 육수 조성표

재료명	사용량
물	2리터
다시마	2장(10*10cm)
북어	1/4 마리(20g)
양파	1/2 개(90g)
무	100 g
건고추	1개(8g)
대파	1/2 대 (35g)
건표고	20g
건새우	20g

김치 제조용 육수와 물을 사용하여 이들이 *Lactococcus lactis*의 증식에 미치는 영향을 알아본 결과 Table 3에서 보듯이 물을 사용했을 때 보다 육수를 사용했을 때 균수도 적고 항균 활성도 낮았다. 따라서 육수를 제조할 때 사용되는 재료들 중 어느 성분이 이와 같은 영향을 미치는지를 알아보기 위하여 단일 재료별로 육수를 제조한 후 이들 재료가 *Lactococcus lactis*의 증식에 미치는 영향을 살펴보았다.

Table 3. 김치용 육수가 *Lc. lactis* 증식에 미치는 영향

균주명	배지 종류	항균 활성		균수 (CFU/ml)	배양액 pH
		<i>Lb.sakei</i> 1	<i>Lb.sakei</i> 2		
<i>Lactococcus lactis</i>	M17	+++ ³⁾	+++	4.5 × 10 ⁹	5.59
	육수 사용 ¹⁾	+++	++-	1.2 × 10 ⁹	5.08
	물 사용 ²⁾	+++	++-	3.4 × 10 ⁹	4.95

¹⁾ 0.5% casein peptone + 0.5% soypeptone + 0.5% beef extract + 0.25% YE + 0.05% ascorbic acid + 0.025% MgSO₄ + 1% potassium citrate + 0.5% lactose + 육수 95ml

²⁾ 0.5% casein peptone + 0.5% soypeptone + 0.5% beef extract + 0.25% YE + 0.05% ascorbic acid + 0.025% MgSO₄ + 1% potassium citrate + 0.5% lactose + 증류수 95ml

³⁾ +++ (항균 활성 강함), ++ (항균 활성 보통), + (항균 활성 약함)

복어, 다시마, 무, 건고추, 양파, 대파, 건표고, 건새우 등 육수 재료별로 살펴본 결과 건새우를 제외한 모든 재료가 *Lactococcus lactis*의 증식에 좋지 않는 영향을 미치는 것으로 나타나 액체 배지용 육수 재료로서 건새우 육수를 최종적으로 선정하였다(Table 4).

Table 4. 육수 재료가 *Lc. lactis* 증식에 미치는 영향

균주명	배지 종류	항균 활성		균수(CFU/ml)	배양액 pH
		<i>Lb.sake1</i>	<i>Lb.sake2</i>		
<i>Lactococcus lactis</i>	M17	+++ ²⁾	+++	4.4×10^9	5.35
	복어 ¹⁾	+	-	1.4×10^8	6.26
	다시마 ¹⁾	++	+	1.1×10^8	5.25
	무 ¹⁾	++	++	9.2×10^8	4.54
	건고추 ¹⁾	++	++	2.1×10^9	5.19
	양파 ¹⁾	++	++	2.1×10^9	4.79
	대파 ¹⁾	++	++	1.8×10^9	4.94
	건표고 ¹⁾	+++	++	1.6×10^9	5.39
	건새우 ¹⁾	+++	++	4.2×10^9	4.99

¹⁾ 0.5% casein peptone + 0.5% soypeptone + 0.5% beef extract + 0.25% YE + 0.05% ascorbic acid + 0.025% MgSO₄ + 1% potassium citrate + 0.5% lactose + 각 단일 재료로 제조한 육수 95ml

²⁾ +++ (항균 활성 강함), ++ (항균 활성 보통), + (항균 활성 약함)

3. 배지 조성이 *Lactococcus lactis* 증식에 미치는 영향

*Lactococcus lactis*의 경우 M17 배지에 잘 증식하며 그 항균 활성도 우수한 것으로 나타났다. 그러나 김치 육수를 기본 배양액으로 하고 여기에 M17에 사용된 성분들을 식품첨가물 등급의 성분으로 대체하여 식용배지(0.5% casein peptone + 0.5% soypeptone + 0.5% beef extract + 0.25% yeast extract + 0.05% ascorbic acid + 0.025% MgSO₄ + 1% potassium citrate + 0.5% lactose)를 제조한 후 비교 실험을 한 결과 M17에 못 미치는 결과가 나타났다. 따라서 이러한 문제점을 보완하고자 식용배지에 사용된 성분들의 조성비를 달리하여 *Lactococcus lactis*의 균수 및 항균 활성도를 높이고자 하였다. Lactose 농도를 0.5%, 1%, 2%, 3%로, yeast extract 농도를 0.25%, 1%, 2%, 3%로 각각 달리하여 실험을 한 결과 lactose와 yeast extract를 3% 농도로 동시에 첨가했을 때 가장 균수도 많고 항균활성도 우수하였다(Table 5).

Lactococcus lactis 최적 배양을 위한 액체 배지 제조를 위하여 건새우 육수 또는 물에 casein peptone 0.5%, soypeptone 0.5%, yeast extract 3%, ascorbic acid 0.05%, potassium citrate 1%, lactose 3%를 첨가하여 제조한 결과 균수와 항균 활성 측면에서 M17과 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 다만, 식용 배양액의 제조 편의성과 김치 관능에 미칠 수 있는 영향을 감안하여 일부 성분들을 줄이고자 각각의 성분들이 균수나 항균활성에 미치는 영향을 알아본 결과 casein peptone과 soypeptone은 *Lactococcus lactis*의 증식이나 항균활성에 큰 영향을 미치지 않는 것

으로 나타나 건새우 육수 또는 물에 yeast extract 3%, ascorbic acid 0.05%, potassium citrate 1%, lactose 3%를 함유하는 액체 배지를 *Lactococcus lactis* 최적 배양을 위한 액체 배지로 결정하였으며 이를 *Lactococcus lactis*용 식용 액체배지 1이라고 명명하였다.

Table 5. 배지 조성에 따른 *L. lactis* 증식 정도

균주명	배지 종류	항균 활성		균수 (CFU/ml)	배양액 pH
		<i>Lb.sakei</i> 1	<i>Lb.sakei</i> 2		
<i>Lactococcus lactis</i>	M17	+++ ³⁾	+++	4.5×10^9	5.39
	액체배지A ¹⁾	++	++	3.9×10^9	4.98
	액체배지B ²⁾	+++	+++	4.7×10^9	4.76
	액체배지C ³⁾	+++	+++	4.9×10^9	4.85

¹⁾ 0.5% casein peptone + 0.5% soypeptone + 0.25% YE + 0.05% ascorbic acid + 1% potassium citrate + 0.5% lactose + 건새우 육수

²⁾ 0.5% casein peptone + 0.5% soypeptone + 3% YE + 0.05% ascorbic acid + 1% potassium citrate + 3% lactose + 물

³⁾ 0.5% casein peptone + 0.5% soypeptone + 3% YE + 0.05% ascorbic acid + 1% potassium citrate + 3% lactose + 건새우 육수

4. *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 균주 혼합 배양을 위한 식용 액체 배지 제조

본 연구에서 사용하는 *Lactococcus lactis* 균주는 nisin과 같은 항균물질을 내는 균주로서 김치에 첨가했을 때 김치 발효에 관여하는 주요 유산균들의 생육을 억제함으로써 김치 발효를 지연시켜 김치의 품질유지기한을 연장시킬 수 있다. 그러나 김치 맛에 좋은 영향을 줄 수 있는 유산균들의 생육도 억제함으로써 김치의 관능품질에 영향을 줄 수도 있다. 이러한 단점을 보완하고자 김치발효에 관여하는 주요 균주 중 *Lactococcus lactis*에 의해 저해를 받지 않으면서 만니톨 생성능이 우수한 *Leuconostoc citreum*을 *Lactococcus lactis*와 같이 사용하고 이 두 균주를 혼합배양 할 수 있는 식용 액체 배지를 제조하였다.

위에서 제조한 식용배지의 경우 *Lactococcus lactis*는 잘 증식 되었지만 *Leuconostoc citreum*은 잘 증식되지 않았다. 이를 해결하고자 식용 액체배지 1에 glucose, maltose, fructose, sucrose 등 여러 가지 탄소원을 달리하여 *Leuconostoc citreum*의 생육정도를 살펴본 결과 *Leuconostoc citreum* strain 별로 maltose 또는 fructose를 식용 액체배지 1에 첨가했을 때 특이적으로 잘 증식하였다. 특히, *Leuconostoc citreum* strain 별로 0.1%~1%의 농도로 maltose 또는 fructose를 첨가했을 때 *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 두 균주 모두 잘 증식하여 이를 *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 균주의 최적 혼합배양을 위한 식용 액체배지 2로 명명하였다. Glucose 첨가 시에는 *Leuconostoc citreum*은 잘 증식하였으나 *Lactococcus lactis*의 균수가 maltose나 fructose를 첨가했을 때 보다 적어 항균활성도가 낮아졌다.

제 5 절 종균 첨가 김치의 이화학적 특성 변화 및 종균 모니터링 분석

1. 실험방법

가. 김치 제조

염도 2%의 절임배추를 제조하고 다음과 같이 배합비를 사용하여 김치를 제조하였다. 다음과 같은 배합비(Table 1)로 제조한 김치양념에 식용배양액에서 준비한 *Lactococcus lactis* WiKim0098, *Lactococcus lactis* WiKim0099와 *Leuconostoc citreum* WiKim0096, *Leuconostoc citreum* WiKim0101 혼합 균주 배양액을 전체 배합비의 10%가 되도록 첨가하여 절임배추와 혼합함으로써 종균 첨가 김치를 제조하였다. 식용배지에 *Lactococcus lactis* WiKim0098, *Leuconostoc citreum* WiKim0096, WiKim0101 균주를 접종하여 30°C에서 16시간 배양 시킨 종균을 첨가하여 제조된 김치들은 1Kg씩 pouch pack에 담아 10°C ± 0.5에서 12일, 4°C ± 0.5에서 8주 동안 저장하면서 일정한 기간으로 발효특성을 확인하였다.

Table 1. 배추김치 재료 배합비

재료명	중량(g)
절임배추	75
고춧가루	3.7
무	2
마늘	3.2
생강	0.8
파(쪽파)	1
멸치액젓	3.3
참쌀풀	1
물 (배양액)	10
합계	100

나. 김치의 pH 측정

제조한 4군의 실험군 김치와 대조군 김치를 대상으로 pH를 측정하였다. 제조된 김치를 핸드 블렌더로 2분간 마쇄한 후, 멸균 거즈로 여과한 김치액을 pH 미터(Thermo Orion 720A., USA)를 이용하여 pH를 측정하였다.

다. 유산균수 측정

제조한 4군의 실험군 김치와 대조군 김치의 유산균수를 측정하기 위해 25g의 김치를 스토마커 처리를 한 후 순차적으로 희석하고 희석액 100 μ L를 취해 MRS 배지에 도말하여 30 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 혐기배양한 후 계수하였다.

라. 생존능 실험을 위한 균주 동정

김치에 첨가한 종균이 김치 발효 기간 내 생존하고 있는지 알아보기 위하여 각 배지에서 생장한 colony 25개를 선발하고 MRS 배지를 사용하여 순수분리한 후 genomic DNA Prep kit (Quiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 16S rRNA gene을 증폭하기 위해 27F(5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT AGG ACT T-3')을 사용하였다. PCR 반응은 T3000 Thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였고, 50 μ L PCR 반응계에는 template DNA, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 10 pmol의 primer를 첨가하였다. PCR 반응은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열 후, 95 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성, 57 $^{\circ}$ C에서 1분 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 신장의 과정을 30회 반복하였고, 마지막에 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit (Quiagen, USA)을 사용하여 정제한 후, 수탁업체(Macrogen)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 EZBioCloud Database에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast search를 통해 계통발생학적 분석을 수행하였다. Database에 등록된 표준균주 (type strain)와 가장 높은 상동성을 나타내는 분류군을 해당 염기서열에 해당하는 bacteria로 동정하였다.

마. 김치의 community 분석

추출된 genomic DNA에서 16S rRNA의 V4 region을 타겟으로한 dual-index primer를 이용하여 증폭시켰다. 증폭을 위한 PCR 조성은 각각의 500 nM primer, 17 μ L의 AccuPrimeTM master mix (Invitrogen), DNA template (10 ng/ μ L)이고, PCR 조건은 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 예비가열 후, 95 $^{\circ}$ C에서 30초간 변성, 55 $^{\circ}$ C에서 30초간 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 1분간 신장의 과정을 30회 반복하였고, 마지막에 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리하여 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동으로 확인한 후, normalize되었다. 라이브러리를 제작하기 위해 각각의 샘플을 하나의 튜브에 모으고 product size와 라이브러리 농도는 Agilent 2100 Bioanalyzer System과 KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems)을 사용하여 측정한 후 Illumina MiSeq 기기를 통해 염기서열을 분석하였다.

2. 실험 결과 및 고찰

가. 10°C 저장동안 김치 발효 특성 변화

1) 김치의 pH 변화

김치의 10°C ±0.5에서의 발효기간에 따른 김치의 pH 변화를 측정된 결과, 대조군(균주 비첨가 김치)의 pH는 발효 0일에 pH 5.11를 나타내었고 발효 일수 경과에 따라 빠른 속도로 낮아져 발효 7일째에는 pH 4.29, 발효 10일째에는 pH 4.06을 나타내었다. 반면 *Lactococcus lactis*를 종균으로 첨가한 김치는 발효 7일째에는 pH 4.87, 발효 10일째에는 pH 4.36을 나타내었다. *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum*을 혼합 배양하여 종균으로 첨가한 김치는 발효 7일째에는 pH 4.91, 발효 10일째에는 pH 4.40을 나타내었다. 일반적으로 알려진 김치의 적숙기 최저 범위인 pH 4.2 도달 시간을 고려했을 때 *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 균주의 혼합 첨가균이 대조군에 비해 약 1.5배 정도 김치의 품질유지기한을 연장시키는 것으로 나타났다.

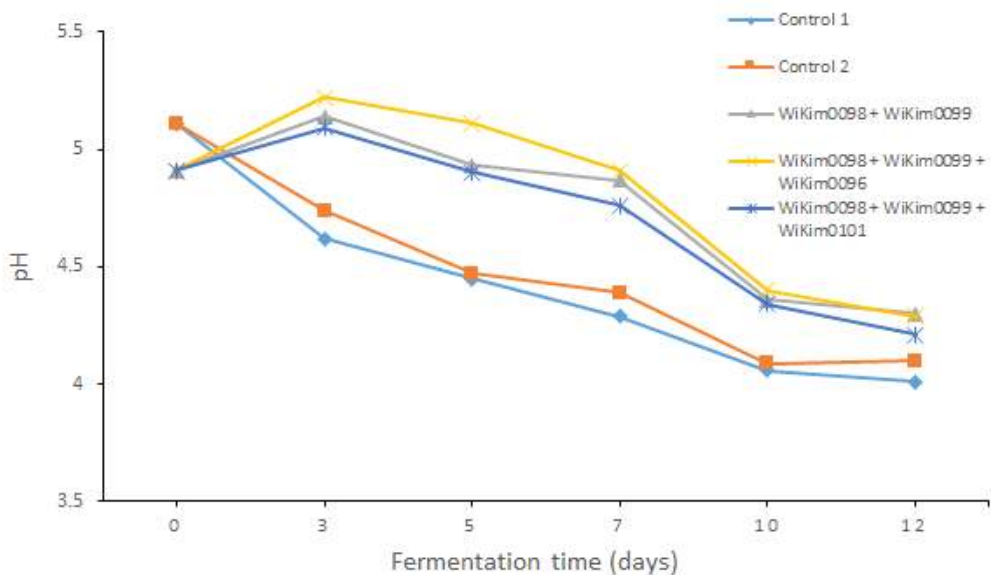


Fig. 1. 10°C 에서 발효기간 경과에 따른 pH의 변화

2) 김치의 유산균 수 변화

김치를 10°C ±0.5에서 발효시키면서 발효기간 경과에 따른 유산균수의 변화를 측정된 결과, 대조군(균주 비첨가 김치)의 경우 발효 0일째 7.0 log CFU/g를 나타낸 반면 종균을 첨가한 김치는 발효 0일째 8.5 log CFU/g를 나타내어 대조군 보다 약 15배 정도 더 유산균수가 많았다. 이는 식용배지에 접종한 종균이 충분히 증식하여 김치에 첨가되었음을 알 수 있었다. 발효 3일째에는 대조군 김치가 8.4 log CFU/g, 종균 첨가 김치도 8.4-8.6 log CFU/g 수를 나타내었고 그

이후에는 비슷한 양상을 나타내었다.

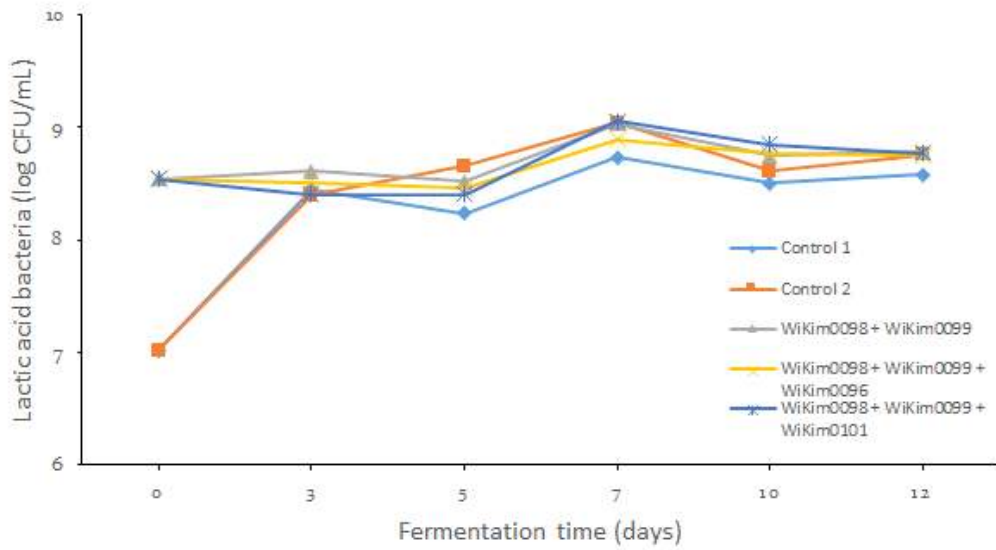


Fig. 2. 10°C 에서 발효기간 경과에 따른 유산균수의 변화

3) 김치 내 첨가 종균 생존능 분석

김치에 첨가한 종균이 김치 발효 기간 내 생존하고 있는지 알아보기 위하여 배양학적 방법과 비배양학적 방법을 이용하였다. 비배양학적 방법인 Next generation sequencing (NGS) 분석 결과, 10°C ± 0.5에서 김치 발효 12일 후에 종균으로 첨가한 *Lactococcus lactis* 균주가 검출되었다.

Table. 2. 10°C 에서 김치 발효 12일 후 bacteria 분포

Species	12d, K1	12d, K2	12d, K3	12d, K4
<i>Aerosakkonema funiforme</i>	17.61%	27.96%	24.63%	21.30%
<i>Lactobacillus sakei</i>	76.27%	39.23%	37.39%	43.03%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.23%	0.28%	0.59%	0.23%
<i>Weissella confusa</i>	0.80%	0.40%	0.75%	0.32%
<i>Weissella koreensis</i>	0.02%	0.00%	0.01%	0.01%
<i>Lactococcus lactis</i>	0.22%	27.00%	33.71%	30.22%
<i>Vibrio litoralis</i>	0.07%	0.02%	0.03%	0.02%
<i>Vibrio palustris</i>	0.07%	0.02%	0.03%	0.03%
Other	4.60%	5.00%	2.75%	4.75%

*K1: 대조군, K2: *L. lactis* WiKim0098 첨가, K3: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가, K4: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가

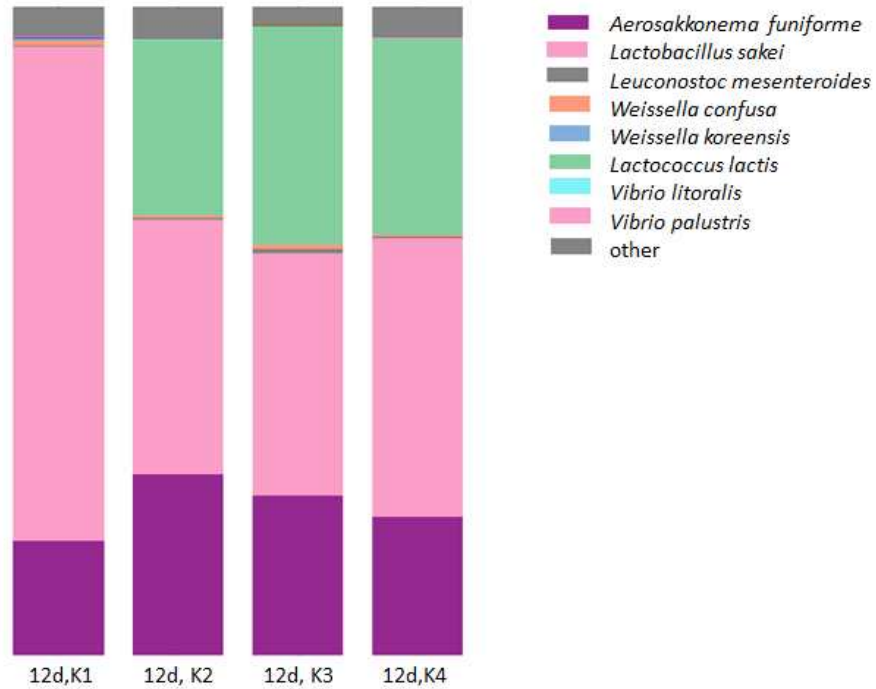


Fig. 3. Table. 10°C 에서 김치 발효 12일 후 bacteria 분포

또한, MRS agar 배지를 이용하여 colony를 분리한 다음 16S rRNA gene 염기서열 분석을 통한 배양학적 방법을 이용하여 종균의 우점율을 확인 하였다. 종균으로 첨가한 *Lactococcus lactis*의 경우 7일째까지 우점종으로 존재하였으나 그 이후에는 다른 유산균들의 증식으로 인해 그 비율이 점점 감소하였다. 반면 *Lactococcus lactis*와 함께 첨가되었던 *Leuconostoc citreum*은 발효 후반기에도 우점종으로 생존하고 있음을 확인할 수 있었다. 발효 12일째 김치에서 분리된 유산균들을 16S rRNA gene 염기서열 분석을 통해 분석한 결과 대조군 김치는 *Leuconostoc mesenteroides* (54%)와 *Lactobacillus sakei* (29%)가 우점종을 차지한 반면 *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 종균을 혼합하여 첨가한 김치군에서는 *Leuconostoc citreum* (58%)과 *Leuconostoc mesenteroides* (33%)가 우점종을 차지하고 있어 첨가한 종균에 의해 발효가 주도적으로 일어나고 있음을 알 수 있었다. 이와 같은 균총 변화는 김치의 관능적 특성에도 직접적으로 영향을 줄 수 있을 것으로 사료 되었다.

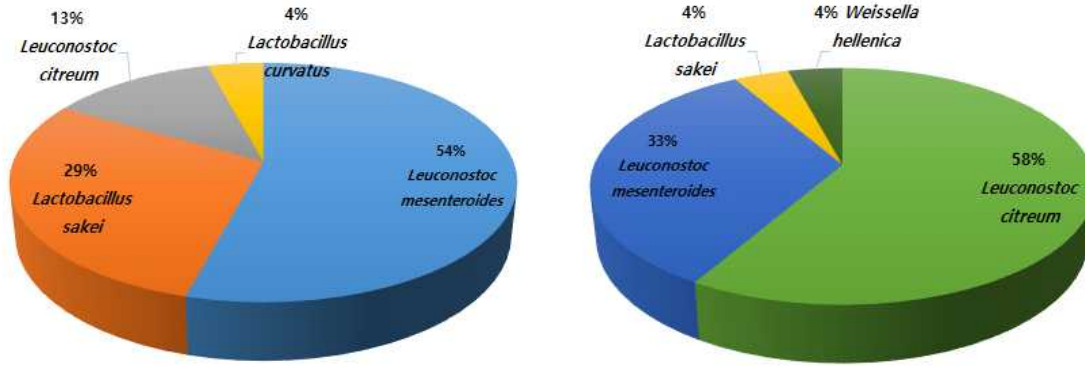


Fig. 4. 10°C 에서 발효 12일차 김치 내 종균 생존율
(좌: 대조군 김치, 우: *Lc. lactis*와 *Leu. citreum* 혼합 종균 첨가군)

나. 4°C 저장동안 김치 발효 특성 변화

1) 김치의 pH 변화

김치의 4°C ±0.5에서의 발효기간에 따른 김치의 pH 변화를 측정된 결과, 대조군(균주 비첨가 김치)의 pH는 발효 0일에 pH 5.04를 나타내었고 발효 일수 경과에 따라 빠른 속도로 낮아져 발효 4주째에는 pH 4.58, 발효 6주째에는 pH 4.29를 나타내었다. 반면 *Lactococcus lactis*를 종균으로 첨가한 김치는 발효 4주째에는 pH 5.08, 발효 6주째에는 pH 4.70을 나타내었다. *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum*을 혼합 배양하여 종균으로 첨가한 김치는 발효 4주째에는 pH 5.04, 발효 6주째에는 pH 4.88을 나타내었다. 10°C 저장 조건에서와 마찬가지로 4°C 저장 조건에서도 김치의 적숙기 최저 범위인 pH 4.2 도달 시간을 고려했을 때 *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 균주의 혼합 첨가군이 대조군에 비해 약 1.5배 정도 김치의 품질 유지기한을 연장시키는 것으로 나타났다.

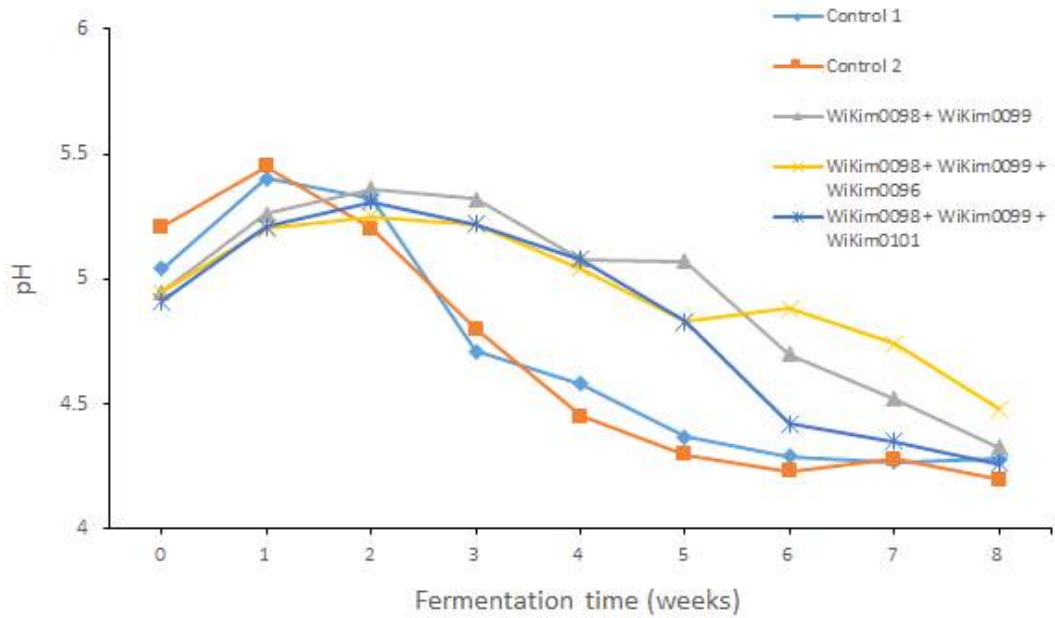


Fig. 5. 4°C 에서 발효기간 경과에 따른 pH의 변화

2) 김치의 유산균 수 변화

김치를 4°C ±0.5에서 발효시키면서 발효기간 경과에 따른 유산균수의 변화를 측정한 결과, 대조군(균주 비첨가 김치)의 경우 발효 0일째 6.0 log CFU/g를 나타낸 반면 종균을 첨가한 김치는 발효 0일째 8.7 log CFU/g를 나타내어 대조군 보다 약 560배 정도 더 유산균수가 많았다. 이는 식용배지에 접종한 종균이 충분히 증식하여 김치에 첨가되었음을 알 수 있었다. 발효 2주째에는 대조군 김치가 7.5 log CFU/g, 종균 첨가 김치도 7.3-8.2 log CFU/g 수를 나타내었고 그 이후에는 종균을 첨가한 김치의 유산균수가 대조군에 비해 다소 떨어지는 것을 확인하였다.

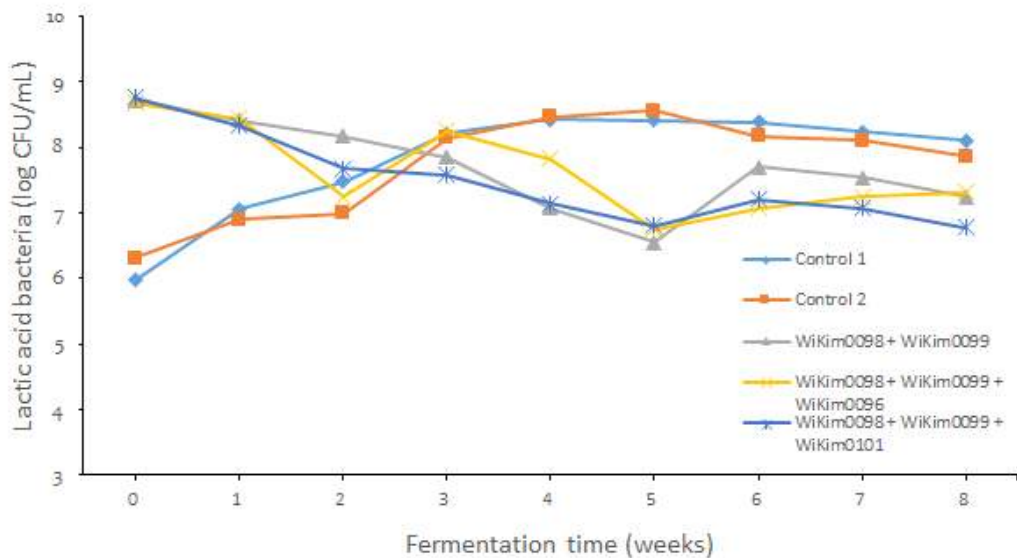


Fig. 6. 4°C 에서 발효기간 경과에 따른 유산균수의 변화

3) 김치 내 첨가 종균 생존능 분석

김치에 첨가한 종균이 김치 발효 기간 내 생존하고 있는지 알아보기 위하여 배양학적 방법과 비배양학적 방법을 이용하였다. 비배양학적 방법인 Next generation sequencing (NGS) 분석 결과, 4°C ± 0.5에서 김치 발효 4주 후에 종균으로 첨가한 *Lactococcus lactis* 균주가 검출되었다.

Table. 3. 김치 담금 직후 bacteria 분포

Species	0w, K1	0w, K2	0w, K3	0w, K4
<i>Aerosakkonema funiforme</i>	40.28%	30.51%	28.29%	24.54%
<i>Lactobacillus graminis</i>	37.17%	15.38%	20.20%	19.08%
<i>Lactobacillus sakei</i>	0.00%	0.02%	0.02%	0.03%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4.10%	1.37%	1.82%	1.56%
<i>Weissella koreensis</i>	0.21%	0.03%	0.08%	0.06%
<i>Lactococcus lactis</i>	0.01%	41.31%	37.91%	42.30%
<i>Vibrio litoralis</i>	0.00%	0.00%	0.02%	0.15%
<i>Vibrio palustris</i>	1.53%	0.63%	0.71%	1.93%
Ooher	14.78%	9.78%	9.76%	9.04%

*K1: 대조군, K2: *L. lactis* WiKim0098 첨가, K3: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가, K4: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가

Table. 4. 4°C에서 김치 발효 4주 후 bacteria 분포

Species	0w, K1	0w, K2	0w, K3	0w, K4
<i>Aerosakkonema funiforme</i>	56.64%	59.01%	64.97%	54.67%
<i>Lactobacillus graminis</i>	35.20%	10.75%	6.03%	10.54%
<i>Lactobacillus sakei</i>	0.00%	0.02%	0.02%	0.03%
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	1.55%	1.38%	0.63%	0.80%
<i>Weissella koreensis</i>	2.81%	0.00%	0.02%	0.03%
<i>Lactococcus lactis</i>	0.00%	23.99%	21.77%	28.71%
<i>Vibrio litoralis</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.02%
<i>Vibrio palustris</i>	0.08%	0.11%	0.17%	0.36%
Ooher	3.43%	4.42%	4.47%	4.43%

*K1: 대조군, K2: *L. lactis* WiKim0098 첨가, K3: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가, K4: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가

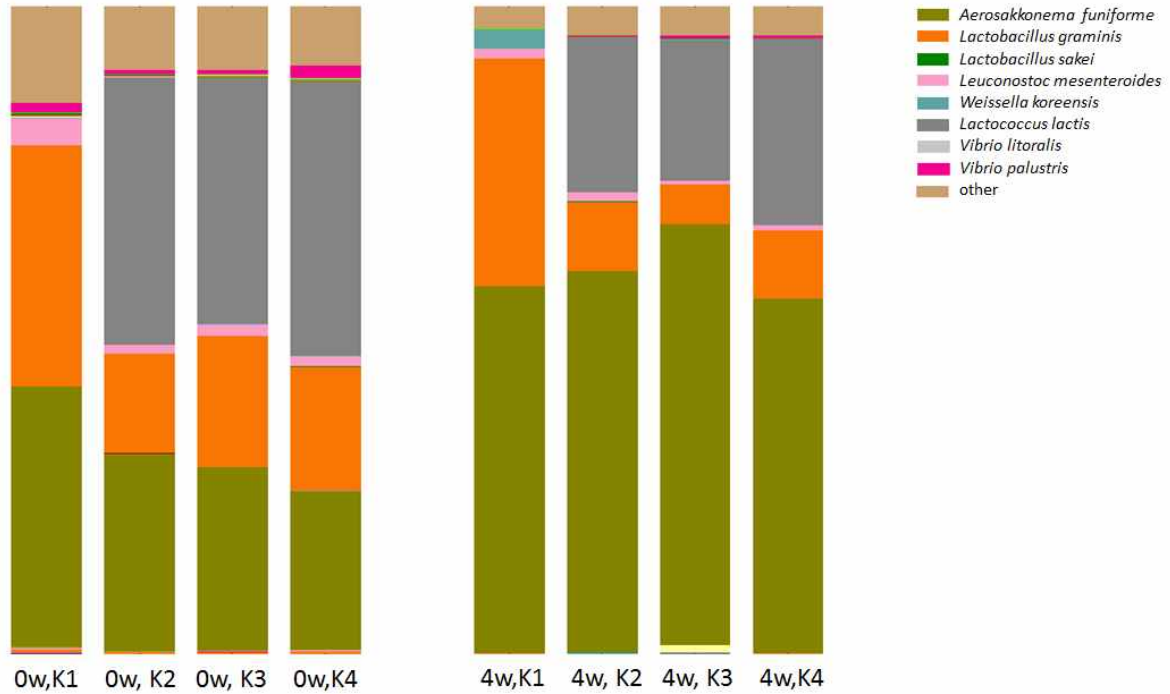


Fig. 7. 김치 담금 직후와 4°C 에서 김치 발효 4주 후 bacteria 분포 비교

또한 4°C 저장 조건에서도 MRS agar 배지를 이용하여 colony를 분리한 다음 16S rRNA gene 염기서열 분석을 통한 배양학적 방법을 이용하여 종균의 우점율을 확인 하였다. 발효 4주 후 김치에서 분리된 유산균들을 16S rRNA gene 염기서열 분석을 통해 분석한 결과 대조군 김치는 *Lactobacillus curvatus* (55%)와 *Leuconostoc mesenteroides* (34%)가 우점종을 차지한 반면 *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 종균을 혼합하여 첨가한 김치군에서는 *Leuconostoc mesenteroides*가 100%로 분석되어 첨가한 종균이 미생물의 변화에 영향을 미쳤음을 알 수 있었다. 그러나 비배양학적인 방법과 배양학적 방법 분석에 의한 결과가 상이하게 나타나 향후 이와 관련한 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

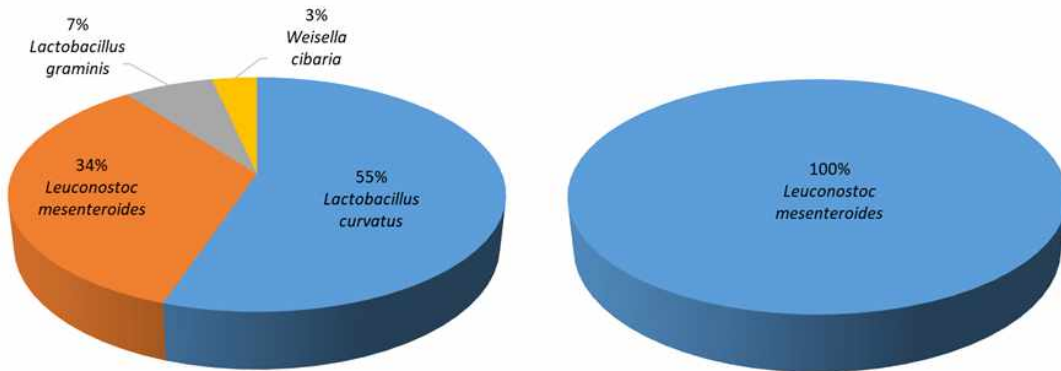


Fig. 8. 4°C 에서 발효 4주차 김치 내 종균 생존율
(좌: 대조군 김치, 우: *Lc. lactis*와 *Leu. citreum* 혼합 종균 첨가군)

제 6 절 중균 첨가 김치의 대사산물 분석 및 관능적 특성 분석

1. 실험방법

가. Mannitol 분석

김치 5mL를 원심분리 (10,000×g, 5min)하여 얻은 상층액을 0.45μm syringe filter로 여과하여 배지 내 만니톨(mannitol) 생성량을 분석하는데 사용하였다. 배양액 내 과당 잔존율 및 만니톨 생성율은 HPLC(Waters 2695 eAlliance, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 당 분석 검출기는 Waters RI detector를 사용하였고, column은 Sugar-pak column(Waters, USA)을 사용하였다. 시료는 20μl를 주입하였으며, 이동상으로는 H₂O(HPLC-grade, Fisher)를 사용하여 0.5mL/min의 속도로 흘러주었다. 만니톨(mannitol), 포도당(glucose), 과당(fructose)의 표준물질은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, 각각 100mg/mL의 농도가 되도록 계산하여 용량 플라스크에 정밀히 취하고 물을 첨가하여 정용하였으며, 물로 희석하여 0.4mg/mL, 0.8mg/mL, 1.6mg/mL, 3.2mg/mL 용액을 검량선 작성용 표준용액으로 이용하였다. 시료 중의 당 농도는 표준물질의 성분과 머무름 시간이 일치하는 피크의 면적값을 해당 표준물질의 표준곡선에 대비하여 정량하였다.

나. 대사산물 분석

김치 1mL를 동결건조 한 후 200μL의 *O*-methoxyamine hydrochloride (15 mg/mL) 용액을 첨가하고 25°C에서 16시간 방치한다. 100 μL의 *N,O*-bis-trimethylsilyl-trifluoroacetamide containing 1% trimethylchlorosilane 용액을 첨가한 후 70°C에서 1시간 처리하여 유도체화를 시키고 즉시 꺼내어 어두운 곳에서 냉각하고 600μL의 heptane을 넣고 잘 섞이도록 vortexing한다. 혼합된 용액을 원심분리 (10,000×g, 15min)하여 얻은 상층액 2μL를 GC/MS (Agilent 7890A)에 주입하여 김치의 대사산물을 분석하였다. 질량분석을 위해 Agilent 5977A quadrupole mass spectrometer를 사용하였고, column은 DB5-MS UI column (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm film thickness, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였다. 오븐 온도는 60°C에서 1분 동안 유지한 후 30°C까지 10° C/min의 속도로 올렸으며, 10분 동안 유지하였다. GC/MS 분석을 통해 얻어진 결과는 Agilent mass hunter qualitative analysis software (version B.6.00)를 사용하여 WILEY10N library를 통해 대사산물을 정성분석 하였고, 각각의 성분들은 MetaboAnalyst 4.0 software를 이용하여 통계 분석을 실행하였다.

다. 관능검사

관능검사는 SensMine 프로그램(Sensmine standard version, Sensometrics, Seoul, South Korea)을 활용하여 세계김치연구소에서 훈련된 패널 15명을 대상으로 실시하였으며, 9점 척도(1점: 매우 약하다, 5점: 보통, 9점: 매우 강하다)를 이용하여 각 특성별로 느끼는 강도를 표시하도록

하였다(기호도의 경우 1점: 매우 싫다, 5점: 보통, 9점: 매우 좋다). 관능검사 항목은 외관(기호도), 냄새(신냄새), 맛(신맛, 단맛), 조직감(기호도) 그리고 종합적 기호도로 구성하였다. 시료는 색에 영향을 주는 초록색 부분을 제거한 후 사용하였으며, 20 g 씩 무늬가 없는 백색용기에 담아 제시하였으며, 시료와 시료 사이에는 물과 크래커로 입가심을 하여 후미를 제거하도록 하였다.

배추김치 4종 관능검사

일시 : _____ 설명 : _____

점수	1	2	3	4	5	6	7	8	9
품질	매우 악하다	아주 악하다	악하다	약간 악하다	보통 이다	약간 좋다	좋다	아주 좋다	매우 좋다
기호도*	매우 나쁘다	아주 나쁘다	나쁘다	약간 나쁘다	보통 이다	약간 좋다	좋다	아주 좋다	매우 좋다

***스타(*)마크가 있는 항목은 품질기준의 척도가 다르니 확인하여주시기 바랍니다.**

항목	시료				I
외관	*기호도 (나쁘다-좋다)				
냄새	신냄새				
맛	신맛				
	단맛				
조직감	*기호도 (나쁘다-좋다)				
*전체적인 기호도 (나쁘다-좋다)					

참여해주셔서 감사합니다.

Fig. 1. 관능검사 설문지 양식

2. 실험결과

가. 김치의 대사산물 분석

10°C 발효 조건에서 종균 첨가에 따른 김치의 만니톨 생산량은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 김치 발효 12일 후 대조군은 종균을 첨가한 김치들의 비해 과당(fructose)의 농도는 높고, 만니톨(mannitol)의 농도는 낮음을 확인하였다. 또한 김치 담금 직후와 발효 12일 후의 fructose 감소량을 비교하였을 때, *Lactococcus lactis*와 *Leuconostoc citreum* 종균을 혼합하여 첨가한 김치군(4.4mg/mL)은 대조군(3.2mg/mL)보다 높았으며, mannitol의 생산량도 종균 첨가 김치는 5.1mg/mL, 대조군은 3.4mg/mL로 종균 첨가 김치가 높음을 알 수 있었다. 이는 김치 미생물들에 의해 fructose가 분해되어 mannitol을 생성한 것으로 김치의 관능적인 특성에 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

Table 1. 10°C에서 김치 발효 12일 후 이화학적 특성 분석

Compounds (mg/mL)	12d, K1	12d, K2	12d, K3	12d, K4
Glucose	3.79	6.10	4.81	5.51
Fructose	5.90	4.77	4.00	4.54
Mannitol	3.41	6.21	5.10	5.34

*K1: 대조군, K2: *L. lactis* WiKim0098 첨가, K3: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가, K4: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가

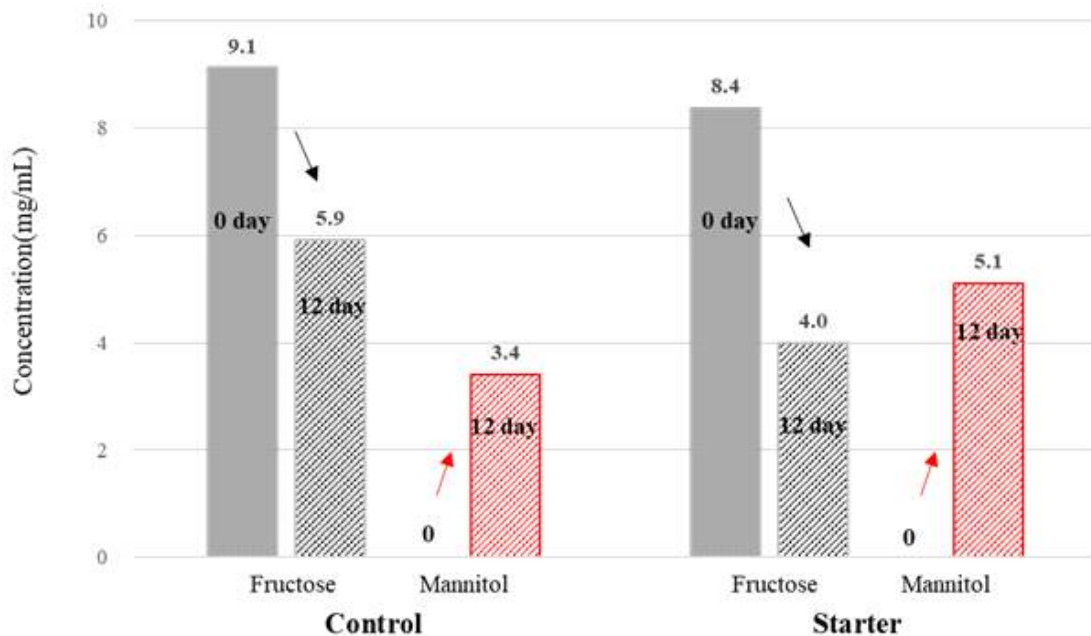


Fig. 2. 김치 담금 직후와 10°C에서 김치 발효 12일 후 이화학적 특성 분석 비교

또한, 종균을 첨가한 김치의 대사산물인 유기산, 아미노산, 당성분의 변화를 분석하기 위해 GC/MS를 이용하였다. 김치 담금 직후와 발효 12일 후 대부분의 대사산물들이 대조군과 종균 첨가 김치에서 유의한 차이를 보였다. 김치 담금 직후 lactic acid는 종균 첨가 김치가 대조군에 비해 높았는데 이는 식용 배지에서 배양 종균에 의해 생산된 것으로 사료된다. 반면 발효 12일 후에는 종균 첨가 김치의 lactic acid가 대조군에 비해 줄어들었음을 확인하였는데 이는 종균 첨가에 의해 미생물 억제되어 산생성이 덜 되었고 김치 품질유지기한 연장이 효과가 있음을 보여주었다. 또한 종균 첨가 김치와 대조군 김치에서 아미노산과 당성분의 변화는 김치의 관능적 특성에 직접적인 영향을 미칠 것이라고 사료된다.

Table 2. 김치 담금 직후와 발효 12일 후 대사산물 비교 분석

Metabolite	0 day			12 day		
	대조군 (area, %)	종균 첨 가 김치 (area, %)	p-value	대조군 (area, %)	종균 첨가 김치 (area, %)	p-value
Lactic acid	3.97	6.88	<0.001	25.33	18.92	<0.001
Valine				0.32	4.74	<0.001
Isoleucine					0.41	<0.001
Butanedioic acid	1.07	1.81	<0.001	1.06	1.12	0.002
Proline		1.14	<0.001	1.68	1.86	<0.001
Phenylalanine					0.38	<0.001
Xylose	0.50		<0.001			
Fructose	38.06	35.30	<0.001	23.90	18.08	<0.001
Talose	38.40	31.80	<0.001	12.13	5.85	<0.001
Glucose	9.79	9.38	0.005	5.56	9.31	<0.001
Mannitol				27.22	30.28	<0.001
Myo-inositol	4.75	3.14	<0.001	2.79	2.20	<0.001
Cellobiose	3.45	10.53	<0.001		6.85	<0.001

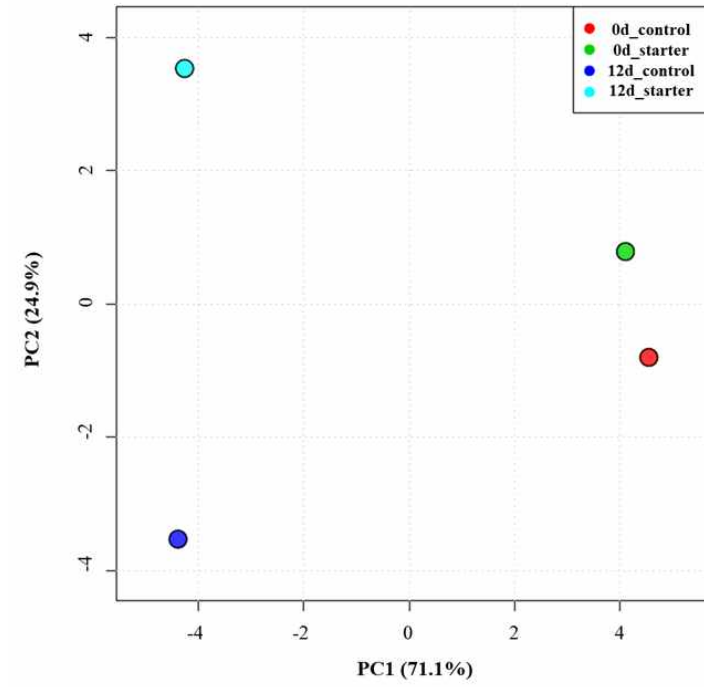


Fig. 3. 김치 담금 직후와 발효 12일 후 대사산물의 PCA 분석

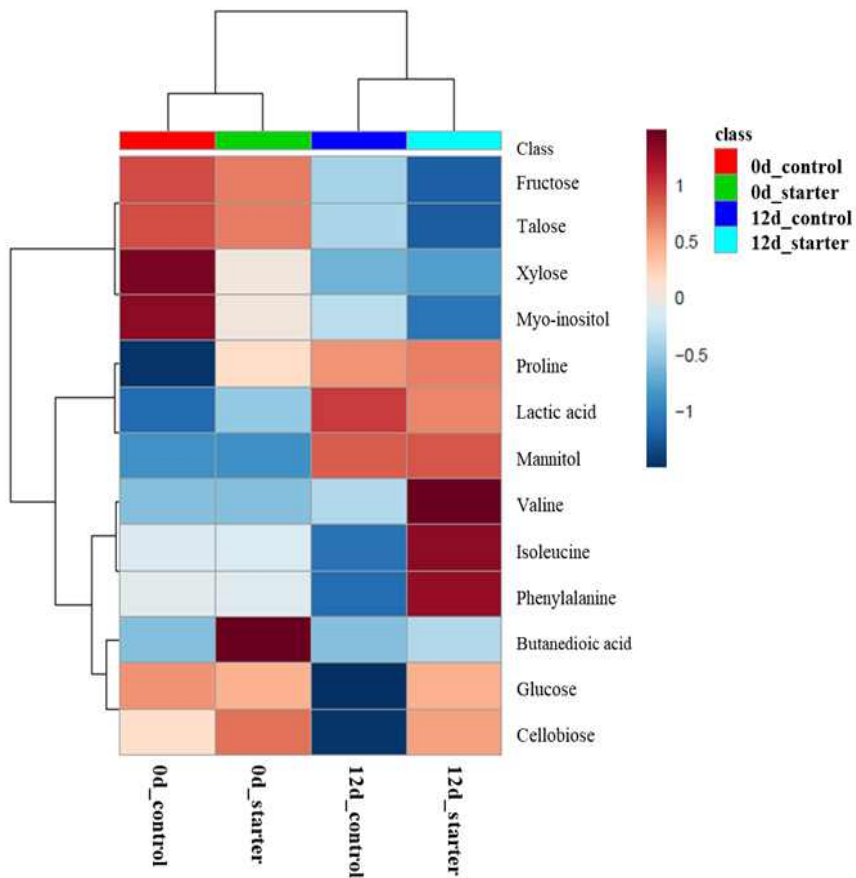


Fig. 4. 김치 담금 직후와 발효 12일 후 대사산물의 비교 분석

4℃에서 6주 동안 발효한 김치의 이화학적 성분의 변화를 분석한 결과에서도 대조군은 종균을 첨가한 김치들의 비해 fructose의 농도는 높고, mannitol의 농도는 낮음을 확인하였고, 이와 같은 이화학적 변화는 김치의 관능적 특성에도 직접적으로 영향을 줄 수 있을 것으로 사료 되었다.

Table 3. 4℃에서 김치 발효 6주 후 이화학적 특성 분석

Compounds (mg/mL)	6w, K1	6w, K2	6w, K3	6w, K4
Glucose	6.44	8.76	9.85	6.87
Fructose	3.50	7.56	9.86	4.12
Mannitol	6.05	2.71	1.15	6.21

*K1: 대조군, K2: *L. lactis* WiKim0098 첨가, K3: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가, K4: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가

나. 김치의 관능적 특성 분석

종균 첨가에 따른 품질유지기한 연장 효과를 알아보기 위하여 4℃에서 4주 동안 발효된 김치의 신맛, 단맛, 전체적인 기호도 등의 관능적 특성을 분석한 결과 조직감을 제외한 모든 항목에서 대조군과 유의적인 차이를 나타내었다. 특히, 신맛과 신냄새 항목은 대조군에 비해 낮게 나타나 종균 첨가에 따른 품질유지기한 연장에 효과가 있을 것으로 사료된다. 다만 전체적인 기호도는 대조군 김치에 비해 떨어지게 나타났지만 이는 김치의 숙성이 덜 되어 나타난 현상으로 사료되어 발효 6주 후에 관능적 특성 검사를 재실시하였다.

Table 4. 종균 첨가 김치의 관능적 특성 (4℃, 4주 경과)

시료명	항목		결과
김치 1	특성차이 검사	신냄새	5.27±1.59
		신맛	5.20±1.61
	기호도 검사	외관	5.67±1.59
		단맛	4.33±1.76
		조식감	5.33±1.45
		전체적인 기호도	5.47±1.88
김치 2	특성차이 검사	신냄새	3.87±1.81
		신맛	3.73±1.91
	기호도 검사	외관	5.20±1.66
		단맛	4.00±1.46
		조식감	5.13±1.41
		전체적인 기호도	4.67±1.50
김치 3	특성차이 검사	신냄새	3.00±1.41
		신맛	3.87±1.81
	기호도 검사	외관	5.87±1.46
		단맛	3.80±1.57
		조식감	5.13±1.06
		전체적인 기호도	5.00±1.56
김치 4	특성차이 검사	신냄새	3.67±1.88
		신맛	3.80±2.18
	기호도 검사	외관	4.80±1.26
		단맛	3.60±1.99
		조식감	4.87±1.19
		전체적인 기호도	4.00±1.69

*김치1: 대조군, 김치2: *L. lactis* WiKim0098 첨가, 김치3: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가, 김치4: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가

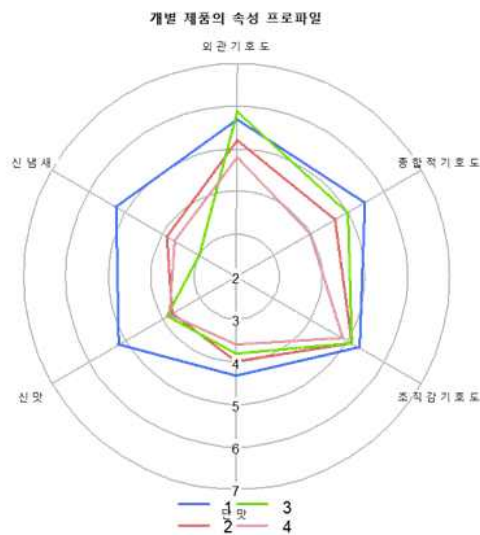


Fig. 5. 종균 첨가 김치의 관능적 특성 (4℃, 4주 경과)

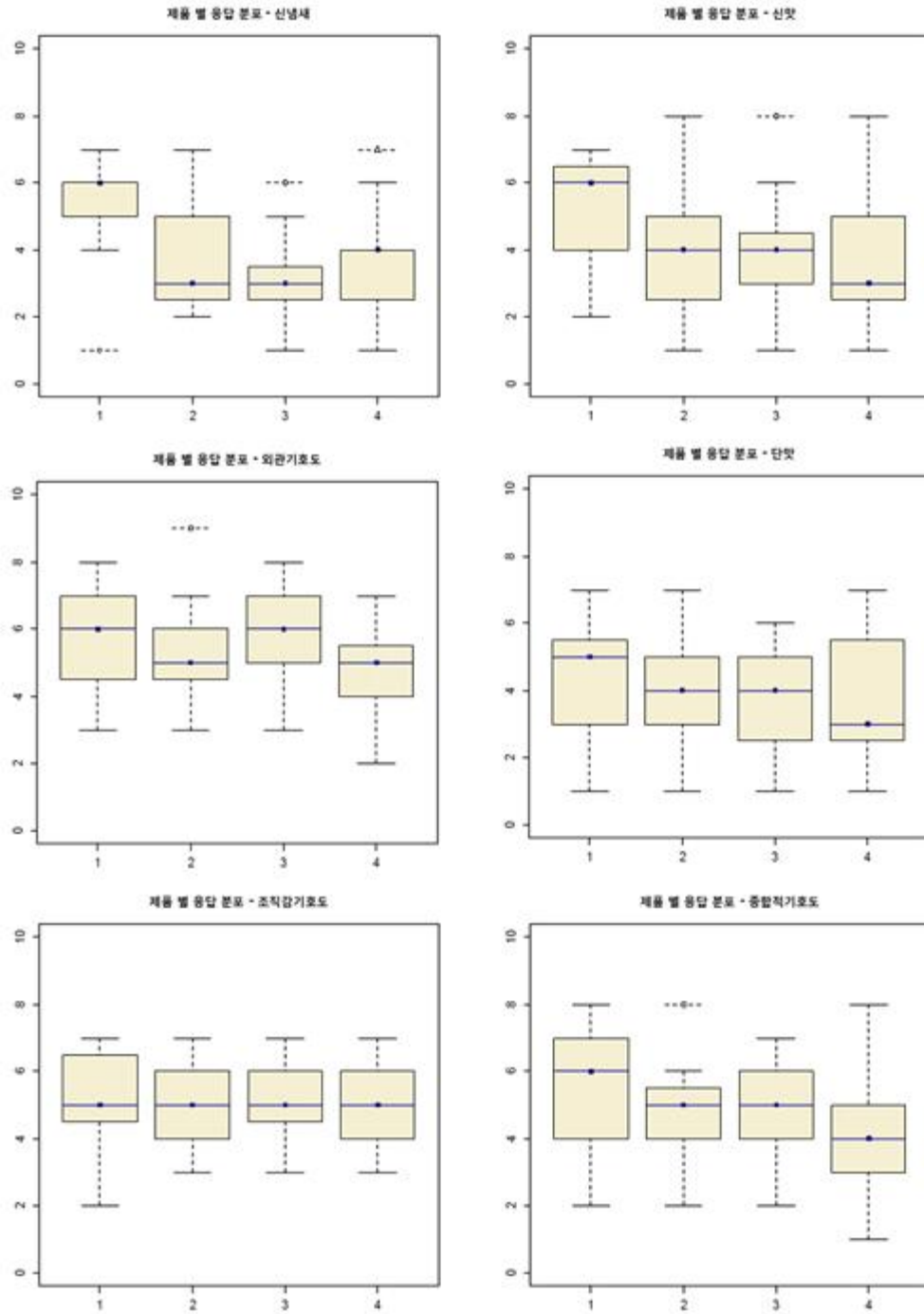


Fig. 6. 평균 첨가 김치의 관능적 특성 (4°C, 4주 경과)

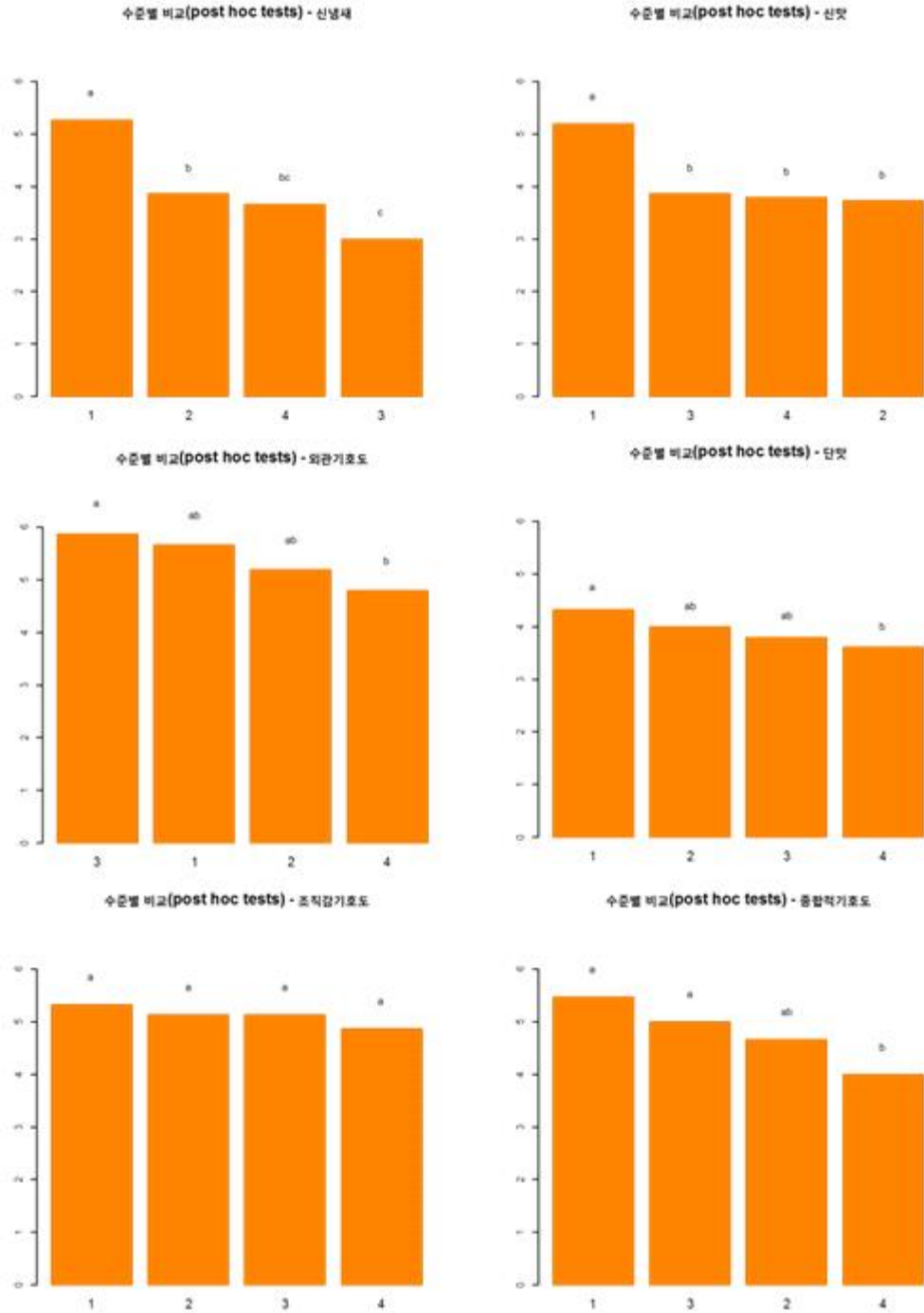


Fig. 7. 평균 첨가 김치의 관능적 특성 (4℃, 4주 경과)

4℃에서 발효 기간 6주 경과 후, 관능적 특성을 재분석한 결과 신맛과 신냄새 항목에서 *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가한 김치는 대조군과 유의적 차이가 없었으나 전체적인 기호도는 가장 높았으며, *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가한 김치는 신맛과 신냄새 항목에서 유의적 차이를 보였을 뿐 아니라 가장 낮게 나타나 평균 첨가에

따른 품질유지기한 연장에 효과가 있을 것으로 사료된다.

Table 5. 종균 첨가 김치의 관능적 특성 (4℃, 6주 경과)

시료명	항목		결과
김치 1	특성차이 검사	신냄새	6.33±1.29
		신맛	6.47±1.55
	기호도 검사	외관	5.33±1.45
		단맛	3.93±1.94
		조직감	5.07±1.22
		전체적인 기호도	4.27±1.53
김치 2	특성차이 검사	신냄새	4.47±1.51
		신맛	5.20±1.78
	기호도 검사	외관	5.40±1.12
		단맛	3.87±1.88
		조직감	5.80±1.37
		전체적인 기호도	4.40±1.55
김치 3	특성차이 검사	신냄새	4.33±1.95
		신맛	4.93±1.39
	기호도 검사	외관	4.80±1.06
		단맛	4.27±1.83
		조직감	5.40±1.12
		전체적인 기호도	4.00±1.73
김치 4	특성차이 검사	신냄새	6.33±1.40
		신맛	6.20±1.26
	기호도 검사	외관	5.67±1.23
		단맛	4.40±1.06
		조직감	5.60±1.45
		전체적인 기호도	5.07±1.39

*김치1: 대조군, 김치2: *L. lactis* WiKim0098 첨가, 김치3: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0096 첨가, 김치4: *L. lactis* WiKim0098 + *Leu. citreum* WiKim0101 첨가

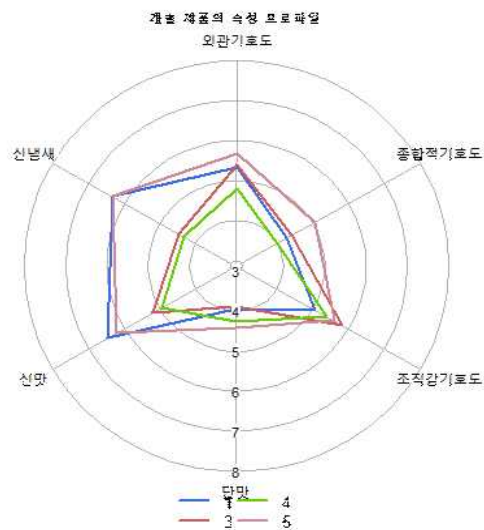


Fig. 8. 종균 첨가 김치의 관능적 특성 (4℃, 6주 경과)

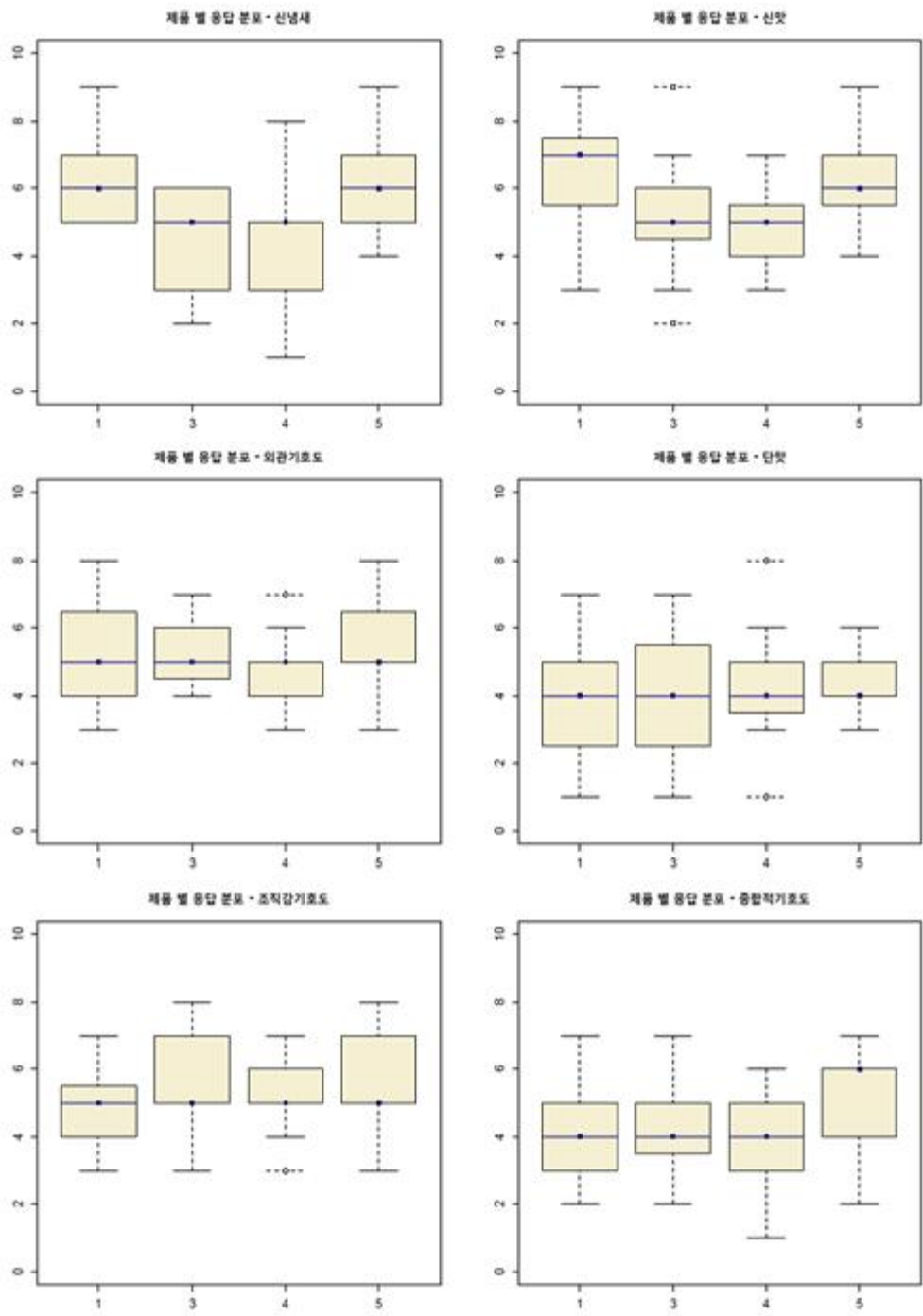


Fig. 9. 종균 첨가 김치의 관능적 특성 (4℃, 6주 경과)

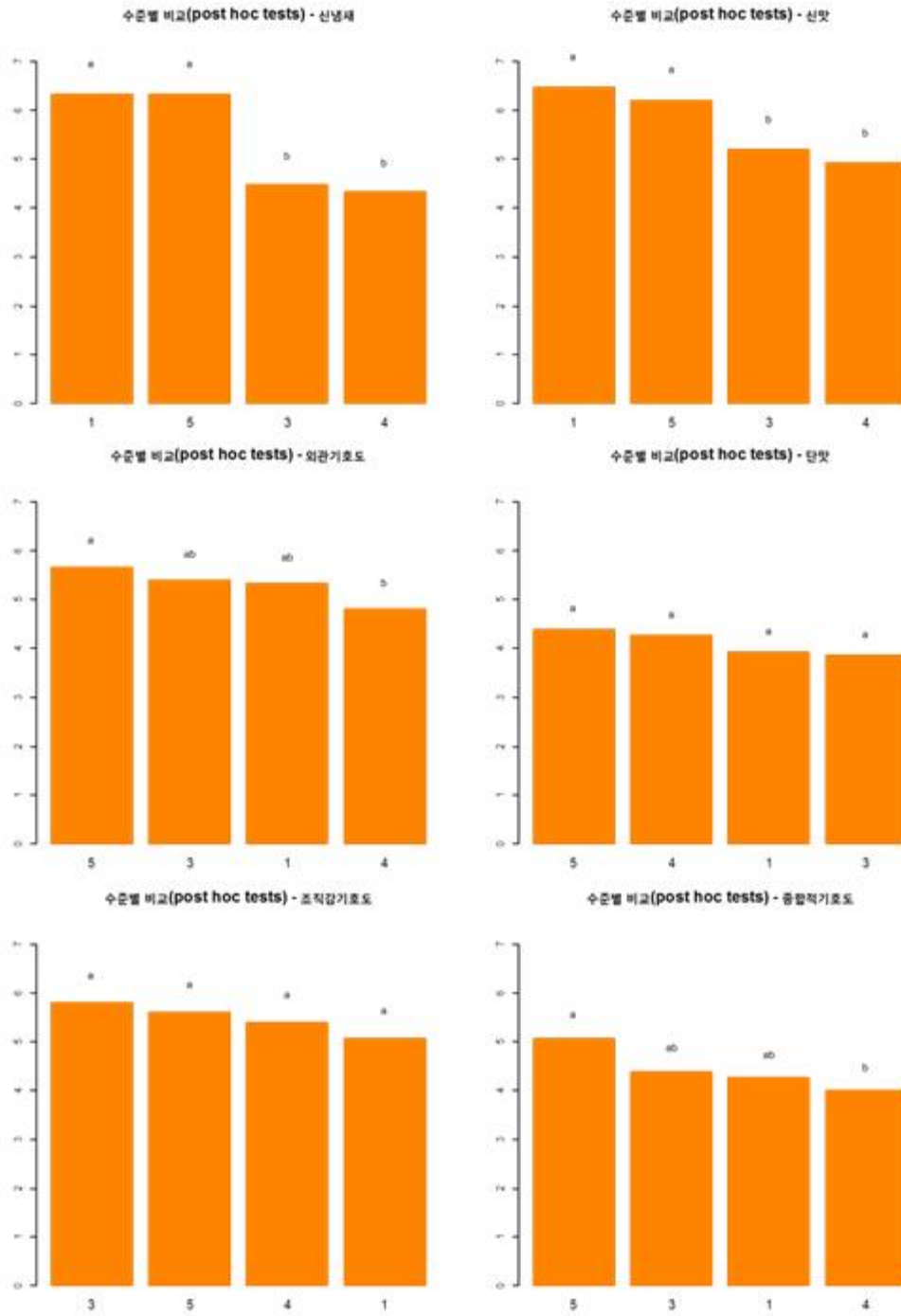


Fig. 10. 평균 첨가 김치의 관능적 특성 (4°C, 6주 경과)

- 연구개발 추진전략

- 주관연구기관인 세계김치연구소에서는 김치 종균 활성화를 위한 기반 기술을 개발하고 참여 기업인 (주)뜨레찬에서는 김치 제조 현장에서 종균 김치 상용화를 위한 공정 및 상품 개발을 수행함



- 연구개발 추진방법

- 개발된 기술에 대해서는 특허 관련 지적 재산을 획득하고 이를 참여기업인 (주)뜨레찬에 기술이전을 실시하고 참여기업과의 지속적인 기술교류를 통하여 제품의 실용화 및 상품화를 추진하고 있음

- 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	수출용 김치 품질향상 및 차별화를 위한 종균 활성화 기술 개발	주관연구책임자 (김태운)외 총 11명

기관별 참여 현황		
구분	연구기관수	참여연구원수
출연(연)	1	9
중소기업	1	3

세계김치연구소
김치종균 활성화 기반기술 개발
연구책임자 (김태운)외 8명
담당기술개발내용
○ 김치 종균 최적 활성화 조건 탐색 및 첨가 방법 개발
○ 김치 종균 개발
○ 김치 발효기간 내 종균 모니터링 분석

(주)뜨레찬
김치종균 현장 적용 기술 개발
참여연구원 (윤경미)외 2명
담당기술개발내용
○ 김치종균용 배양액 및 배양용기 현장적용
○ 종균 첨가 김치의 이화학적 특성 및 관능적 특성 측정
○ 김치 종균 적용 상품 김치 개발

- 연구성과

가. 국내외 논문 게재 : SCI(E) 1건

No	논문명	학술지명	주저자명	호	코드번호		C-06-01		
					국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	Mixed starter of <i>Lactococcus lactis</i> and <i>Leuconostoc citreum</i> for extending kimchi shelf-life	Journal of Microbiology	김미주 이해원 이모은 노성운 김태운		한국	한국미생물학회	SCI (IF 2.3)	2019.02.14. Accepted	

나. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램) : 특허 출원 2건

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
			1	신규한 락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움 균주, 및 이들을 이용한 김치 숙성도 제어방법	한국	김태운 김미주 장자연 이모은 박해웅 최학중	2019.02.08	10-2019-0014787	
2	락토코커스 락티스 및 류코노스톡 시트리움의 혼합배양용 식용배지 조성물	한국	김태운 김미주 장자연 이모은 박해웅 최학중	2019.02.08	10-2019-0014788				95

다. 기술거래(이전) 등 : 기술 이전 1건

No	기술이전 유형	기술실시 계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	코드번호		누적 징수현황
					C-06-08		
1	통상실시권	김치 숙성도 제어 균주 4종 및 배양기술	(주)뜨레찬	2019.02.18.	기술료 (당해연도 발생액)		
					선금 : 5백만원		

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 김치 종균 최적 활성용 배양액을 제조하고 이를 현장에서 편리하게 사용할 수 있도록 편의형 용기를 개발함으로써 김치 종균의 활성도를 높이고 기존 종균 대비 사용량을 줄일 수 있는 김치 종균 활성화 기술을 개발하고자 함

3-2. 목표 달성여부

구분 (연도)	세부 과제명	세부 연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2017)	김치 종균 최적 활성화 증균용 배양액 및 종균 개발	김치 종균 개발	100	김치 발효에 관여하는 주요 유산균들의 생육을 억제할 수 있는 항균 활성이 우수한 <i>Lactococcus lactis</i> 2균주를 선발하였음. <i>Lactococcus lactis</i> 에 의해 저해 되지 않으며 mannitol 생성능이 우수한 <i>Leuconostoc citreum</i> 2균주를 선발하였음
		김치 종균 최적 활성화 조건 탐색 및 첨가방법 개발	100	<i>Lactococcus lactis</i> 와 <i>Leuconostoc citreum</i> 두 균주를 효율적으로 배양하고 종균 활성을 증대시키기 위해 건새우 육수, 유당, 효모추출물, 구연산칼륨 등 식품첨가물 등급의 기질을 이용하여 기존 상업용 배지와 유사한 증식 능력을 가질 수 있는 김치 종균용 식용배지를 개발하였음
		김치 발효기간 내 종균 모니터링 분석	100	첨가한 종균의 생존율을 알아보기 위하여 MRS 배지를 이용하여 분리한 유산균들의 16S rRNA 유전자 분석을 통해 분석함. 또한 비배양학적 방법인 metagenome 분석을 통해 종균의 생존율을 알아보았음
	개발 배양액 및 종균의 김치 적용	김치 종균용 배양액 현장 적용	100	종균 배양액의 김치 적용 시 적정량을 알아보기 위하여 첨가량을 알아본 결과 김치 무게의 10%를 첨가하는 적절한 것으로 나타났음
		종균 첨가 김치의 이화학적 특성 및 관능적 특성 측정	100	본 연구에서 분리한 <i>Lactococcus lactis</i> 와 <i>Leuconostoc citreum</i> 를 식용배지에 배양한 후 김치에 첨가하여 pH, 유산균수, 관능검사를 실시한 결과 대조군 김치에 비해 품질유지기한이 연장됨을 확인함

구분 (연도)	세부 과제명	세부 연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용
2차 년도 (2018)	김치 종균 활성 편의형 배양 용기 및 종균 개발	김치 종균 최적 활성화 조건 탐 색 및 첨가방법 개발	100	<i>Lactococcus lactis</i> 와 <i>Leuconostoc citreum</i> 을 혼합 배양 시 탄소원인 maltose의 농도를 조절함으로써 두 균주의 증식 비율을 달리 할 수 있었음. Maltose의 농도를 높 임으로써 <i>Leuconostoc citreum</i> 의 비율이 높아졌고 이는 김치 숙성을 촉진시켰고 이를 통해 숙성도 맞춤형 김 치를 제조할 수 있었음
		김치 종균 개발	90	김치 품질특성 향상용 올리고당 생성능 우수 종균을 선발 하고자 <i>Leuconostoc mesenteroide</i> 3균주를 분리하였음
		김치 발효기간 내 종균 모니터 링 분석	100	첨가한 종균의 생존율을 알아보기 위하여 MRS 배지를 이용하여 분리한 유산균들의 16S rRNA 유전자 분석을 통해 분석함. 또한 비배양학적 방법인 metagenome 분 석을 통해 종균의 생존율을 알아보았음
	개발 기술의 상용화 및 제품화	김치 종균용 배 양액 및 배양 용 기 현장 적용	90	건새우 육수, 유당, 효모 추출물, 아스코르브산, 구연 산칼륨을 성분으로 하는 종균 배양액을 상품김치에 적 용하여 분석한 결과 건새우 육수에 의한 이미가 다소 발생하여 이를 물로 대체하였음. 종균 배양을 위한 현 장 적용 편의형 배양 용기 개발의 경우 당초 계획 시 에는 김치에 첨가되는 양을 2-3% 정도로 예상하였으 나 실제 적용 시에는 10%가 사용됨에 따라 편의형 배 양용기를 제작하는 것은 현실성이 없는 것으로 나타났 음. 대신 편의형 식용배지 조성물을 사용하는 것이 적 절할 것으로 판단되었음
		김치 종균 적용 상품김치 개발	90	건새우 육수 대신 물을 사용한 식용 배양액에 <i>Lactococcus lactis</i> 와 <i>Leuconostoc citreum</i> 균주를 접종하 여 상품김치에 첨가한 후 대조군 김치와 비교한 결과 이미가 줄어들었으며 발효 지연 효과도 동일하게 나타 나 품질유지기한이 연장된 상품김치를 개발할 수 있었 음

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 김치 종균 최적 활성 증식을 위한 배양액을 현장에서 편리하게 사용할 수 있도록 편의형 배양 용기를 개발하고자 하였으나 당초 김치에 첨가하고자 했던 예상 양(2~3%) 보다 훨씬 더 많은 양(10%)을 첨가해야 만 종균 배양액 첨가에 의한 실질적인 효과를 얻을 수 있음에 따라 편의용 배양 용기 개발은 현실성이 없는 것으로 판단되었음. 대신 현장에서 김치 제조량에 따라 효율적으로 쉽게 종균 배양액을 사용할 수 있도록 편의형 식용배지 조성물을 파우더 형태로 공급하고자 함
- 종균을 활용한 올리고당 함량이 증대된 발효특성 강화 김치 개발의 경우 sucrose로부터 유리된 glucose를 dextransucrase에 의해 maltose에 α -(1→6)-glycosyl bond로 연결시킴에 따라 isomaltooligosaccharide를 생성할 수 있는 *Leuconostoc* 속 균주를 선발하였으나 이들

을 김치에 평균으로 적용하여 실질적으로 isomaltooligosaccharide 양이 김치 발효에 따라 증가하는지에 대한 분석은 수행을 하지 못한 실정임. 추후 실험을 통해 보완할 예정임

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 기업으로의 기술 이전을 통한 발효 특성이 향상된 김치 상품화 추진
- 김치품질유지기한 연장을 통한 수출 김치 품질 향상 및 김치수출 대상국 확대
- 종균 활성화 기술을 통한 김치 종균 사용 비용 감소
- 김치종균의 산업체 적용을 통한 김치산업 선진화
- 유용 김치유산균의 자원화

붙임. 참고문헌

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

- S.W., and Lee, S.H. 2018. Role of jeotgal, a Korean traditional fermented fish sauce, in microbial dynamics and metabolite profiles during kimchi fermentation. *Food Chemistry*, 265, 135-143.
- Kang, B.K., Cho, M.S., Ahn, T.Y., Lee, E.S., and Park, D. S. 2015. The influence of red pepper powder on the density of *Weissilla koreensis* during kimchi fermentation. *Scientific Reports*, 5, 15445.
- Kim, D.W., Kim, B.M., Lee., H.J., Jang, G.J., Song, S.H., Lee, J.I., Lee, S.B., Shim, J.M., Lee, K.W., Kim, J.H., Ham, K.S., Chen, F., and Kim, H.J. 2017. Effects of different salt treatments on the fermentation metabolites and bacterial profiles of kimchi. *Journal of Food Science*, 82, 1124-1131.
- Kim, H.J., Shin, H.K., and Yang, E.J. 2013. Production and fermentation characteristics of mukeunji with a mixed starter. *Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42, 1467-1474.
- Lane, D.J. 1991. 16S-23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester: Wiley.
- Lee, K., Kim, H.J., and Lee, E.J. 2013. Mixed cultures of kimchi lactic acid bacteria show increased cell density and lactate productivity. *African Journal of Biotechnology*, 12, 4000-4005.
- Lee, M.E., Jang, J.Y., Lee, J.H., Park, H.W., Choi, H.J., and Kim, T.W. 2015. Starter cultures for kimchi fermentation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 559-568.
- Moon, S.H., Chang, M., Kim, H.Y., and Chang, H.C. 2014. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened kimchi. *Food Science and Biotechnology*, 23, 489-497.
- Park, S.E., Seo, S.H., Kim, E.J., Byun, S., Na, C.S., and Son, H.S. 2019. Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters. *Food Chemistry*, 274, 558-565.
- Sadiq, S., Imran, M., Hassan, M.N., Iqbal, M., Zafar, Y., and Hafeez, F.Y. 2014. Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. *LWT-Food Science and Technology*, 59, 204-210.
- Suzuki, A., Muraoka, N., Nakamura, M., Yangagisawa, Y., and Amachi, S. 2018. Identification of undesirable white-colony-forming yeasts appeared on the surface of Japanese kimchi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 82, 334-342.