

117118

생강

보존용

항

진균

김치유산균

분말

개발

최종

보고서

서

(견고딕
14p)

2019

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

농식품기술개발사업 제1차 연도 최종보고서

발간 등록번호

11-1543000-002631-01

생강 보존용 항 진균 김치유산균 분말 개발 최종보고서

2019. 3. .

주관연구기관 / (주)프로바이오틱

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생강 보존용 항 진균 김치유산균 분말 개발”(개발기간 : 2017. 12. 28. ~ 2018. 12. 27.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 2. .

주관연구기관명 : (주)프로바이오틱 (대표자) 박용하 (인)

주관연구책임자 : 김병천

연 구 원 : 송성철

연 구 원 : 정솔로몬

연 구 원 : 김희주

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

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	117118-1	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.12.28. ~ 2018.12.27.	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	농생명산업기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	생강 보존용 향 진균 김치유산균 분말 개발			
연구책임자	김 병 천	해당단계 참여연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:49,175천원 민간:16,392천원 계:65,567천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 0명	총 연구개발비	정부:49,175천원 민간:16,392천원 계:65,567천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	(주)프로바이오닉 기술연구소			참여기업명: (주)프로바이오닉	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	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	
								생명정 보	생물자 원	정보	실물
등록·기탁 번호		출원번호 : 10-2018-0168391									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

보고서 면수: 57

1. 연구개발 목적

- 항 진균 기능을 가진 유산균을 이용하여 생강의 보존성 증가를 위한 방안을 모색함
- 생강 보관 과정의 생강 손실의 주요 원인인 곰팡이병 억제 기능이 있는 김치유산균을 이용한 생강 보존용 유산균 제제 개발을 시도함

2. 연구개발 성과

- 생강의 보존성 향상에 도움을 줄 수 있는 김치 유래의 항 진균 김치유산균 개발
- 항 진균 김치유산균 균체 및 대사산물을 이용한 생강 보존
- 생강 보존을 위한 항 진균 김치유산균의 확보
- 생강 농가용 항 진균 김치유산균 분말 생산
- 국내 저명 학술지 발표, 학술회의 발표
IPC 2018 발표 김치유산균을 이용한 생강 보존
Isolation of Anti-Pathogenic Microbial Lactic Acid Bacteria from Kimchi, and Application of Isolated LAB for Prevention of Ginger Spoilage
- 항 진균 김치유산균의 우수성 홍보를 위한 국외 학술회의 발표
- 항 진균 유산균 및 생강용 유산균 생산 기술이전
- 유산균 균체를 이용한 항 진균 방법 특허 등록
발명의명칭: 유산균 및 나노입자를 포함하는 항균용 조성물
출원번호: 10-2018-0168391 (접수번호 1-1-2018-1297564-63)

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>연구개발목적</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 생강의 보존성 향상에 도움을 줄 수 있는 김치 유래의 항 진균 김치유산균 분말 개발 - 생강 보관 과정의 생강 손실의 주요 원인인 곰팡이병 억제 기능이 있는 김치유산균을 이용한 생강 보존용 유산균 제제 개발 <p>연구개발내용</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 생강용 항 진균 유산균 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 생강의 부패 원인인 곰팡이 억제용 항 진균 유산균 개발 - 생강의 부패 원인인 세균 억제용 항 병원성 세균 유산균 개발 ○ 생강 적용을 위한 항 진균 김치유산균의 배양 조건 탐색 ○ 항 진균 김치유산균 배양액을 이용한 유산균 분말 생산 ○ 항 진균 김치유산균 분말을 이용한 생강 보존 ○ 수확한 생강의 보존을 위한 항 진균 김치유산균 균체 및 대사산물의 이용 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생강의 보존성 향상에 도움을 줄 수 있는 김치 유래의 항 진균 김치유산균 개발 ○ 항 진균 김치유산균 균체 및 대사산물을 이용한 생강 보존 ○ 생강 보존을 위한 항 진균 김치유산균의 확보 ○ 생강 농가용 항 진균 김치유산균 분말 생산 ○ 국내 저명 학술지 발표, 학술회의 발표 IPC 2018 발표 김치유산균을 이용한 생강 보존 Isolation of Anti-Pathogenic Microbial Lactic Acid Bacteria from Kimchi, and Application of Isolated LAB for Prevention of Ginger Spoilage ○ 항 진균 김치유산균의 우수성 홍보를 위한 국외 학술회의 발표 ○ 항 진균 유산균 및 생강용 유산균 생산 기술이전 ○ 유산균 균체를 이용한 항 진균 방법 특허 등록 발명의명칭: 유산균 및 나노입자를 포함하는 항균용 조성물 출원번호: 10-2018-0168391 (접수번호 1-1-2018-1297564-63) 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 농가에서 가을에 수확한 생강의 안정적인 보존 ○ 유기농 농산물용 항 진균 김치유산균 제품 보급 ○ 안정적인 생강 수급으로 농산물 시장 안정화 ○ 항 진균 김치유산균을 이용한 시설 작물 병충 억제용 시제품개발 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>생강</p>	<p>항 진균</p>	<p>보관</p>	<p>김치유산균</p>	<p>유산균 분말</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Ginger</p>	<p>Anti fungi</p>	<p>Preservation</p>	<p>Kimchi Lactic acid bacteria</p>	<p>Lactic acid bacteria powder</p>

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	1
2. 연구수행 내용 및 결과	5
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	53
4. 연구 결과의 활용 계획 등	56
붙임. 참고문헌	57

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

1. 연구개발과제의 개요

가. 연구개발 목적

- 생강의 보존성 향상에 도움을 줄 수 있는 김치 유래의 항 진균 김치유산균 분말 개발
 - 생강 보관 과정의 생강 손실의 주요 원인인 곰팡이병 억제 기능이 있는 김치유산균을 이용한 생강 보존용 유산균 제제 개발

나. 연구개발의 필요성

<연구개발 대상 및 기술·제품의 개요>

○ 연구개발 개요

- 수확 후 생강 보관 시 생강 부패의 주요 원인인 곰팡이의 생육을 억제하는 기능이 있는 김치유산균을 이용한 생강 보존용 김치유산균 분말 개발

○ 제품 개념

- 생강 곰팡이 병 억제용 김치유산균 분말

< 생강 보존용 김치유산균 분말 >

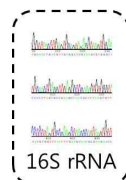
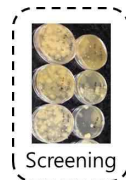


사용 전 -> 사용 후

○ 연구 개념:

- 진균 억제용 김치유산균 개발
- 생강에 적용하기 위한 진균 억제 김치유산균 제품의 배양을 위한 생리조건 확인
- 생강 보존용 김치유산균 pilot 배양 및 동결건조 생균 분말
- 생강 보존용 김치유산균의 생강 보존능 확인

<생강 보존용 항 진균 김치유산균 분말 개발 개념도>



생강 보존용 김치유산균



○ 연구개발 대상의 '용도' 및 '적용 분야'

- 수확 후 보관 중에 곰팡이 병에 의해 상품성이 소실되는 생강의 보존을 위한 김치유산균 분말 생산 및 생강의 보존 기간 증가에 기여
- 항 진균 김치유산균을 이용한 유기농 농작물의 진균병 억제에 응용

○ 기존 연구 대비 본 연구의 중요성

- 생강은 김치의 부재료, 약재, 차의 원료로 사용되는 특용작물로 전국적으로 많은 농가에서 재배하고 있음
- 다른 농산물과 비슷하게 생강의 재배 농가도 출하량에 의해 수입에 영향을 많이 받고 있음
- 현재 국내에는 생강을 재배하는 지역이 늘어나고 있음에도, FTA 등에 의해 수입 생강이 지속적으로 국내에 유입되고 있음
- 주로 늦가을에 수확되는 생강은 수확 후 다음 해 봄까지 많게는 수확량의 50% 이상이 곰팡이 생육에 의해 그 상품성이 감소됨
- 수확 된 생강은 $13\pm 1^{\circ}\text{C}$ 의 토굴에서 주로 보관하는데 (습도 85~90%이상), 생강 저장시설에서 메탄가스가 발생하여 간혹 농민의 인사사고가 발생하기도 함
- 김치유산균은 전통 발효식품인 김치에 존재하는 유산균으로 균주에 따라 다양한 생리 활성을 가지고 있음이 보고되고 있음

○ 본 연구 결과 산물의 응용에 의한 유기농 농산품 생산

- 항 진균 활성을 가지는 유산균도 보고되고 있음으로, 항진균 활성을 가지는 김치유산균은 생강의 곰팡이병 감소에 기여할 수 있음
- 항 진균 김치유산균의 개발은 유기농 농산물의 진균병 억제에도 기여할 수 있음

○ 주관연구 기관의 김치 유산균 연구

- 1,000 균주 이상의 김치유산균 isolate를 확보하고 있음

○ 항 진균 활성을 가진 김치 유산균 screening 경험 있음

- 항 진균 김치유산균 활성 검사

<김치유산균 배양액을 이용한 항 곰팡이 활성 검사>



- 생강에 액체 배양한 유산균 분무 후 전체 생강 파쇄물의 유산균수 변화 관찰
 - 수확 후 표면에 흙이 묻어있는 상태의 생강에 유산균 생균 처리 후 균수 측정 (CFU/g)

측정 시점	무처리	유산균, 1/30	유산균, 1/10	유산균, 1/1
접종 직후	4.8 E+07	9.0 E+06	3.2 E+06	6.9 E+07
2달 후	6.1 E+07	1.9 E+06	2.0 E+06	1.6 E+06

- 생강에 유산균 처리 후 생강 부패 관찰
 - 유산균 처리 후 장기간 저온 보관 생강의 관능 평가 (냄새, n=5)
 - 밀봉한 상태의 저온 다습 냉장 보관에서 유산균 처리 구의 생강 상태가 비교적 양호함



부패 냄새 강도: +++ +/- +/- ---

다. 연구개발 범위

- 생강 보존용 항 진균 유산균 개발
 - : 생강의 부패 원인인 곰팡이 억제용 항 진균 유산균 개발
 - : 생강의 부패 원인인 세균 억제용 항 병원성 세균 유산균 개발
 - 김치 시료 및 김치 분리 유산균을 대상으로 항 진균 활성 유산균 선별
 - 김치 유산균 MRS 액체 배지 배양
 - 곰팡이 배양 및 포자수 측정
 - 김치유산균의 항 진균 활성 측정
 - 분리한 항 진균 유산균의 유전적 위치 분석
 - 분리한 항 진균 유산균의 계통분류학적 분석

- 생강 보존용 항 진균 김치유산균의 배양 조건 탐색
 - 항 진균 유산균의 배양 최적 온도, 초기 pH, 탄소원 확인
 - 항 진균 유산균의 최소 배지 조건 탐색: 유기성 질소원의 투여량 조절 배양

- 항 진균 김치유산균 배양액을 이용한 유산균 분말 생산 (300L 배양기)
 - : 항 진균 유산균의 분말 제작
 - 300L 배양기 발효
 - 배양액이 연속원심분리
 - 배양한 유산균체 동결건조
 - 동결건조 분말 회수
 - 동결건조 분말 유산균 균수 측정 및 공인 분석

- 항 진균 김치유산균 분말을 이용한 생강 보존
 - : 액체 및 분말 상태의 항 진균 유산균을 이용한 생강 보존
 - Curing 시 액체 혹은 분말 유산균 처리
 - 생강 파쇄물, 흙 혹은 기타 부재료와 유산균 분말 혼합물의 생강 처리

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 연구내용

(1) 생강 보존용 항 진균 유산균 개발

(가) 생강의 부패 원인인 곰팡이 억제용 항 진균 유산균 개발

- ㉠ 김치 시료 및 김치 분리 유산균을 대상으로 항 진균 활성 유산균 선별
- ㉡ 김치 시료 채집
- ㉢ 채집된 김치 시료를 분쇄 (무균조작)
- ㉣ 유산균 선별에 사용되는 BCP 한천배지에 분쇄한 김치 시료 도말
- ㉤ 30℃ 항온 정치 배양기에서 1~2일 배양
- ㉥ 형성된 세균 집락 주위가 노란색으로 변한 집락 선택 후, 주변의 세균 집락의 교차 오염을 방지하면서 살균된 백금선으로 선택한 집락을 새로운 BCP 한천배지에 접종하고 획선했 후 배양
- ㉦ 단세포 분리가 확인된 산생성 유산균의 stock 조제
- ㉧ 분리한 집락의 항 진균 활성 측정

[표] BCP 한천배지 기본 성분 및 함량

성분	함량 (g/L)
Yeast extract	2.5
Peptone	5
Dextrose	1
Polysorbate 80	1
L-Cysteine	0.04
Bromocresol Purple	5
Agar	15

[표] 곰팡이 배양용 한천배지 기본 성분 및 함량

성분	함량 (g/L)
Malt extract	20
Yeast extract	5
Sucrose	400
Agar	15

- ② 김치 유산균 MRS 액체 배지 배양
- ㉠ 김치에서 분리한 산생성 유산균을 MRS 액체 배지에 접종
 - ㉡ 30℃ 항온 정지 배양기에서 1~2일 배양
 - ㉢ 유산균 배양액을 항균활성 측정에 바로 사용 혹은 - 4℃ 냉장고에서 보관 후 항균활성 측정
- ③ 김치스타터 유산균 배양용 기본 액체 배지
- ㉠ 포도당을 제외한 MRS 배지 성분을 측량하여 플라스크 혹은 시약병에 분주 후 용해
 - ㉡ 포도당은 별도의 용기에 분주 후 용해
 - ㉢ 배지의 pH 조절
 - : 상온에서 pH 6.5
 - ㉣ 배지의 살균
 - : 고압증기 살균기를 이용하여 121℃, 15분 살균
 - ㉤ 배지 혼합
 - : 고압증기 살균 후 포도당을 다른 성분과 혼합
 - ㉥ 배지의 보관 및 사용
 - : 냉장보관 (4℃) 상태에서 1달 이내에 사용
 - : 고압증기 살균이 종료된 배지는 실온까지 냉각 후 사용
- ④ 항진균 유산균 배양용 기본 고체 배지
- ㉠ 포도당을 제외한 MRS 배지 성분을 측량하여 플라스크 혹은 시약병에 분주 후 용해, 액체 배지에 포함되지 않은 한천을 최종 1.5% 농도로 첨가
 - ㉡ 포도당은 별도의 용기에 분주 후 용해
 - ㉢ pH 조절
 - : 상온에서 pH 6.5
 - ㉣ 배지의 살균
 - : 고압증기 살균기를 이용하여 121℃, 15분 살균
 - ㉤ 배지 혼합
 - : 고압증기 살균 후 포도당을 다른 성분과 혼합
 - ㉥ 배지의 분주, 보관 및 사용
 - : 크린벤치에서 페트리디쉬에 적정량씩 분주 후 한천이 고화되면 사용
 - : 냉장보관 (4℃) 상태에서 1달 이내에 사용

[표] 유산균 배양용 MRS 배지 기본 성분 및 함량

성분	함량 (g/L)
Soy peptone	10
Beef extract	10
Yeast extract	5
Dextrose	20
Polysorbate 80	1
Ammonium sulfate	2
Sodium acetate	5
Magnesium sulfate	0.1
Manganese sulfate	0.05
Dipotassium phosphate	2

③ 곰팡이 배양 및 포자 수 측정

- ㉠ 곰팡이 균주를 균주은행에서 분양받음
- ㉡ 곰팡이 균주의 사면 한천 배지에 접종 후 20~25℃에서 7일간 배양
- ㉢ 곰팡이의 균사가 충분히 자라고 포자형성이 관찰되면 사면 한천배지를 4℃에서 보관 혹은 실험에 사용
- ㉣ 균사체 집락을 무균적으로 채취하여 적정량의 생리 식염수가 포함된 살균된 시험관에 옮김
- ㉤ 곰팡이 균사체가 포함된 시험관을 교반기로 강하게 교반하여 포자가 균일하게 퍼지게 함
- ㉥ 헤마사이토미터에 커버글라스를 얹은 후 곰팡이 현탁 시료가 모세관 현상으로 눈금이 표시된 슬라이드 글라스와 커버글라스 사이에 빨려가게 함
- ㉦ 현미경에 재물대에 올린 후 시료의 포자 수 계측

④ 김치유산균의 항 진균 활성 측정

- ㉠ 김치 유산균을 MRS 액체 배지에 배양하여 유산균 배양액 준비
- ㉡ 곰팡이 균주 사면 한천 배지에 접종 후 20~25℃에서 7일간 배양
- ㉢ 곰팡이의 포자를 생리 식염수에 넣고 교반기로 강하게 현탁하여 10⁵ spore/ml의 농도의 포자 현탁액 조제
- ㉣ 포자 현탁액을 곰팡이 생육용 한천평판배지에 접종
접종방법은 0.1ml 도말하여 한천배지 전면에서 포자가 퍼지게 하거나, 획선하여 접종하여 곰팡이가 자라게 함
- ㉤ 곰팡이 포자가 접종된 한천평판배지에 김치유산균 배양액 처리. 유산균

배양액은 한천평판배지 중간에 직경 8mm의 구멍을 만들고 배양액을 넣어 배양액이 배지로 스며들게 하거나, 유산균 배양액을 올려 필터 디스크를 한천평판배지 중간에 올려 유산균에 의한 곰팡이 생육 저해를 관찰함

- ㉞ 유산균 배양액을 처리한 한천평판배지를 20~25℃에서 7일간 배양
- ㉟ 곰팡이의 생육 관찰

⑤ 분리한 항 진균 유산균의 유전적 위치 분석

: 항균 활성이 있는 유산균의 동정을 위한 16S rRNA 유전자 서열확인 및 유사 서열과 상동성 비교

㉠ PCR mix 조건 (전체 20 μ l 반응)

Primer 27 F	1 μ l
Primer 1492 R	1 μ l
SDDW	17 μ l
Template	1 μ l

㉡ PCR PreMix

Component volume(20 μ l)

Top polymerase 1U

Each: dNTP 250 μ m

Tris-HCl(pH 9.0) 10mM

KCl 30mM

MgCl₂ 1.5mM

Stabilizer and tracking dye

㉢ PCR primer 및 Taq polymerase

: Bacteria용 Universal primer

- 27F; AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG, 20mer

- 1492R; GGT TAC CTT GTT ACG ACT T, 19mer

: Taq polymerase

- 바이오니아 Taq polymerase

㉣ PCR cycle

: PCR tube를 PCR thermal cycler에 넣고 30-35 cycle PCR

1st: 95℃, 3min

2nd: 35 cycle

95°C, 30sec

50°C, 30sec

72°C, 1min 30sec

3rd: 72°C, 10min

4th: 4°C, endless

㉞ PCR 증폭 DNA의 염기서열 분석

⑥ 분리한 향 진균 유산균의 계통분류학적 분석

㉠ 분리균의 16S rRNA 유전자 서열분석으로 확보

㉡ 분리균의 16S rRNA 유전자 서열과 가장 상동성이 높은 표준균주의 분리균의 16S rRNA 유전자 서열 확보. EzTaxon database에서 BLAST 2.2.224를 이용하여 분류학적 분류를 수행함. Pairwise alignment를 이용하여 similarity를 계산함

㉢ 확보한 서열의 alignment

㉣ Neighbor Joining 방법을 이용한 계통도 작성

(나) 생강의 부패 원인인 세균 억제용 향 병원성 세균 유산균 개발

① 김치 시료 및 김치 분리로부터 유산균 확보 및 병원성 세균 확보

㉠ 선별된 김치유산균 배양

㉡ 생강발병 원인 세균 균주 확보, 균주 은행에서 분양

㉢ 생강 병원성 세균 배양

② 김치유산균의 향 진균 활성 측정

㉠ 김치 유산균을 MRS 액체 배지에 배양하여 유산균 배양액 준비

㉡ 생강 병원성 세균을 세균 생육용 평판 배지에 도말

㉢ 세균이 접종된 한천평판배지에 김치유산균 배양액 처리. 한천평판배지 중간에 직경 8mm의 구멍을 만들고 유산균 배양액을 0.1ml를 분주하고 배양액이 배지로 스며들게 하거나, 유산균 배양액을 흡수한 필터 디스크를 한천평판배지 중간 올림

㉣ 유산균 배양액을 처리한 한천평판배지를 30 °C에서 1~7일간

㉤ 생강 병원성 세균의 억제환 생성 관찰

(2) 생강 보존용 향 진균 김치유산균의 배양 조건 탐색

(가) 향 진균 유산균의 배양 최적 온도, 초기 pH, 탄소원 확인

① 항 진균 유산균의 배양 최적 온도

㉠ 항 진균 유산균 배양용 종균 해동 및 종균 배양

: 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 16~18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양

㉡ 발효기 접종용 종균 배양

: 배양된 종균이 1%되게 발효기 접종용 MRS 액체 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양, 16~18시간

㉢ 항 진균 유산균 최적 온도 확인용 MRS 배지 조제

㉣ 서로 다른 온도의 항온기에 유산균이 접종된 플라스크 넣고 배양

배양온도: 20, 25, 30, 37℃에서 2일 간 배양

㉤ 유산균의 생육측정

: 일정 시간 간격으로 배양중인 시료를 취하여 1/10, 혹은 1/20 배 희석 후 유산균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값으로 측정

② 항 진균 유산균의 배양 초기 pH

㉠ 항 진균 유산균 배양용 종균 해동 및 종균 배양

: 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 16~18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양

㉡ 발효기 접종용 종균 배양

: 배양된 종균이 1%되게 발효기 접종용 MRS 액체 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양, 16~18시간

㉢ 항 진균 유산균 최적 초기 pH 확인용 MRS 배지 조제. 초기 pH는 1 HCL과 2N NaOH를 이용하여 조절함

㉣ 서로 다른 온도의 30℃ 항온기에 유산균이 접종된 플라스크 넣고 배양

㉤ 유산균의 생육측정

: 일정 시간 간격으로 배양중인 시료를 취하여 1/10, 혹은 1/20 배 희석 후 유산균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값으로 측정

③ 항 진균 유산균의 배양 탄소원 확인

㉠ 항 진균 유산균 배양용 기본 배지 성분

: 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함

㉡ 항 진균 유산균 배양용 탄소원

: Glucose, Sucrose, Maltose, Fructose

㉔ 배지 조제 MRS 배지의 성분에 Dextrose와 동일한 함량으로 다른 탄소원이 함유된 배지 조제

㉕ 종균배양

: 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양

㉖ 본 배양

: 배양된 종균이 1%되게 본 배양용 배지에 접종

: 항온기 (30℃)에서 배양

㉗ 유산균의 생육측정

: 일정 시간 간격으로 배양중인 시료를 취하여 1/10, 혹은 1/20 배 희석 후 유산균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값으로 측정

(나) 항 진균 유산균의 최소 배지 조건 탐색: 유기성 질소원의 투여량 조절 배양

① MRS에 포함되는 유기성 질소원을 달리한 배지에서 유산균의 생육 확인

② MRS 배지 조성을 기본으로 하여 질소원의 농도가 상이한 배지 조제

③ 항 진균 유산균 배양용 종균 해동 및 종균 배양

: 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 16~18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양

④ 본 배양 실험용 종균 배양 및 접종

: 배양된 종균이 1%되게 발효기 접종용 MRS 액체 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양, 16~18시간

⑤ 30℃ 항온기에 유산균이 접종된 플라스크 넣고 배양

⑥ 24시간 후 유산균 생육 측정

(3) 항 진균 김치유산균 배양액을 이용한 유산균 분말 생산 (300L 배양기)

: 항 진균 유산균의 분말 제작

(가) 300L 배양기 발효

① 항 진균 유산균 활성화. 냉동 균주의 활력 증가 및 본 배양용 종균 생산을 위한 증량

② 균주 활성화 1차

- ㄱ. -70℃ 보관중인 유산균 균주 stock을 MRS broth 10ml에 접종
- ㄴ. 배양기(30℃)에서 배양.
- ㉠ 균주 활성화 2차
 - ㄱ. 1차 종균을 MRS broth 500ml에 접종
 - ㄴ. 배양기(30℃)에서 배양.
- ㉡ 균주 활성화 3차
 - ㄱ. 2차 종균을 pilot 배양용 MRS broth 5L에 접종
 - ㄴ. 배양기(30℃)에서 배양.
- ② 항 진균 유산균의 배양을 위한 300L 발효기 운전
 - ㉠ 발효조 설비 가동 및 점검
 - ㄱ. 발효조의 조작판 가동, 벨브 작동 및 roter 정상 가동 확인
 - ㄴ. 압축공기 생산기 가동 및 고압 공기라인 점검
 - ㄷ. 고압 수증기 발생기 가동 및 고압 수증기 공급 확인
 - ㉡ 본 배양용 배지혼합 공정
 - ㄱ. 발효조에 일정의 물을 받아놓고 배지 원료를 주입
 - ㄴ. Working volume 확인 (총 vol. - 3차 종균 vol. - Glucose vol.)
 - ㄷ. 발효조 조작판 조작으로 배지성분 용해도 증가
 - 교반기 속도: 60rpm (Auto mode)
 - ㉢ 배지멸균
 - ㄱ. 발효조 조작판 조작
 - 압력 : 1.4g/cm³(Auto mode)/culture온도: 30℃(Auto mode)
 - 멸균온도 : 121℃, 멸균시간 : 15min, 공기 주입속도 조절 : 50L/min
 - 배지 살균 시작: Heat start 작동
 - ㄴ. 중간점검
 - : 수시로 온도 압력 등 기기정상가동 확인
 - ㄷ. 발효조 압력 조절 및 공기 공급용 공기 여과 장치 멸균
 - : 발효조의 멸균온도가 121℃가 되면 공기 여과 장치 밸브를 개방
 - 스팀주입시간 : 3~5분
 - ㄹ. 중간점검
 - : 수시로 발효기 컨트롤 조작판의 수치 확인하여 발효기의 정상가동 점검
 - : 점검항목; 발효기 내부 온도, 양압 상태 유지
 - ㉣ 본 배양

ㄱ. 발효조 조작판 온도 확인

: 배양온도 $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 확인

ㄴ. 포도당 용액 및 3차 중균 주 발효기로 이송

: 접종구 입구 주변 화염 살균 후, 중균 접종 및 포도당 주입 진행

ㄷ. 발효조 조작판 조작

: 배기 밸브 닫기

: 발효조압($0.5\text{kg}/\text{cm}^3$) 이상 확인 후 공기 공급 차단

교반기 속도 : - 25rpm(Auto mode)

㉞ 배양 후 확인

ㄱ. 시료 채취 라인 5분간 스팀 멸균 후 배양액 시료 채취.

ㄴ. 배양 종료 후 냉각 진행

(나) 배양액의 균체 회수; 바울형 연속원심분리

① 원심분리 준비

㉠ 원심분리기부품 살균

바울 본체 멸균 : 세척 후, 화염멸균

바울 부속품 멸균 : 상수 세척 후 121°C , 15min 멸균

㉡ 시료이송라인 살균: 배양액 시료 전달용 수송관

상수를 이용한 세척 후 steam 30분간 멸균

㉢ 원심분리기조립 및 라인 연결

원심분리기 바울, 바울 부속품 조립

발효조와 원심분리기 사이에 배양액 시료 전달용 수송관 연결

② 원심분리기 가동

㉠ 원심분리기 전원 켜기

㉡ 원심분리기 조작판넬의 조작 수치 설정 및 가동

원심분리기 rpm : 14,000rpm

원심분리기 가동시간 : 5시간

원심분리기 start 버튼 클릭

㉢ 이송 펌프 전원 켜기

㉣ 이송 펌프 조작

이송 펌프 속도 : 100(150L/1hour)

㉤ 원심분리기로 시료 공급을 위한 발효조 조작

: 원심분리기의 바울의 회전 속도가 14,000rpm으로 유지되는지 확인

: 발효조 harvest valve open

③ 원심분리기 가동 상태확인

㉠ 원심분리기 가동 초기상태 확인

배양액 유입 흐름상태 및 유산균 세포 회수 상태 확인

원심분리기 소음 확인

배양액 유입속도 확인(25~30L/10min)

㉡ 원심분리기 가동 중간점검

수시로 원심분리기 가동 초기상태 확인 사항과 동일하게 점검

④ 원심분리기 종료

㉠ 발효조 내 배양액 및 배출되는 배양액 없음 확인

㉡ 원심분리기 조작

원심분리기 조작 종료 버튼 클릭

㉢ 원심분리기 해체

원심분리기 rpm : 0 확인

원심분리기 보조 부품 및 bowl 분리

(다) 배양한 유산균체 동결건조

① 원심분리기 바울에 모여진 유산균 균체 회수 준비

㉠ 유산균 균체 회수용 도구준비 및 살균

세포 회수용 주걱, 바울 내부 삽입용 멸균시트지, 세포 회수용 용기

㉡ 무균작업대 청결 상태확인

② 유산균 균체 회수 진행 조작 순서

㉠ 멸균 시트지를 무균작업대 작업면에 넓게 펴

㉡ 바울에서 분리한 균체가 모여진 시트를 무균작업대에 올림

㉢ QC용 시료 채취: 시트지의 균체를 세군데 정도 무작위로 채취

㉣ 세포 회수용 용기의 무게를 측정

㉤ 세포 회수용 주걱을 사용하여 세포를 긁어 회수용 용기에 담음

㉥ 세포 무게를 측정

(세포 담은 용기 무게 - 초기 용기 무게)

③ 유산균 균체와 동결보호제 혼합

㉠ 동결보호제 준비

동결보호제 성분: 2Kg sucrose/10L 증류수

2Kg 전분/10L 증류수

㉞ 동결보호제 성분 준비 살균 후 4℃ 냉장 보관

㉟ 균체와 동결보호제 성분 혼합

균체 : 동결보호제 = 1 : 2

④ 유산균 동결건조 분말 생산을 위한 예비동결

㉠ 예비동결공정 준비

ㄱ. 동결건조판 멸균

ㄴ. 예비동결공정 도구 멸균.

균체와 동결보호제 혼합용 살균 용기

동결판 분주시 시료의 부피 측정용 비커, 분주컵, 혼합기, 주걱

ㄷ. 동결건조기 전원 켜기, 선반 온도 냉장(-40℃ 설정)

동결건조기 동결판의 냉장 온도가 -40℃ 도달하는데 필요한 시간을 고려

ㄹ. 무균작업대 청결 상태를 유지

㉡ 예비동결 (무균조작)

ㄱ. 유산균 균체와 동결보호제 혼합 시료의 총 부피 확인.

ㄴ. 균체와 동결보호제 혼합 시료를 살균된 동결판에 분주

하나의 동결 판에 1,800~2,200ml의 액상 시료를 분주

ㄷ. 동결건조기 입구 열기

ㄹ. 균체와 동결보호제 혼합 시료가 분주된 동결판을 동결건조기에 투입

ㅁ. 동결건조기의 시료 온도 감지기를 시료에 투입

ㅂ. 동결건조기 입구 닫기

⑤ 동결건조 분말 생산을 위한 동결건조

㉢ 동결건조기 가동

ㄱ. 냉동기 동작 : -70℃

예비동결 3시간 이상 소요 후 가동(샘플온도 확인)

ㄴ. 진공 가동 : 5mTorr

냉동기 -40℃ 이하일 때, 가동 가능

ㄷ. 프로그램 가동(-40℃ -> +20℃)

㉣ 동결건조기 가동상태 중간점검

ㄱ. 선반온도, 냉동기온도, 샘플온도 점검

ㄴ. 진공건조기 내부의 진공 상태 유지 점검

(라) 동결건조 분말 회수

- ① 동결건조 시료의 분쇄 준비
 - ㉠ 분쇄기 준비
 - 분쇄기를 1시간 70% 알코올에 침지시켜 살균
 - 분쇄기를 40℃ 건조기에서 건조
 - 분쇄기 조립
 - 분쇄기 정상가동 확인
 - ㉡ 무균작업대 청결상태 유지
 - ㉢ 분말 회수용 주걱 멸균 및 건조
 - ㉣ 원말수거용 위생용 용기 준비
- ② 동결건조 분말의 분쇄
 - ㉠ 동결건조기 확인
 - 선반온도, 샘플온도, 육안 정상 확인
 - ㉡ 동결건조기 프로그램 종료 실시
 - 프로그램 종료 -> 진공해체 -> 냉동기 종료 -> 선반종료
 - ㉢ 동결판에서의 원말 수거 실시
 - 주걱을 사용하여 위생용 용기에 담아 입자의 크기를 축소시킴
 - ㉣ 분쇄기 가동
 - 분쇄기에 넣어 10~15초 정도 분쇄
 - ㉤ 분쇄상태 육안 확인
 - ㉥ 분쇄된 원말을 위생용 용기에 담아 보관
- ③ 분쇄된 동결건조 분말의 이물 검출 준비
 - ㉠ 이물검출기(50mesh) 세척 및 멸균
 - 이물검출기(50mesh)를 60℃ 건조기에서 건조 (24시간 이상 완전 건조)
 - 이물검출기(50mesh) 건조 상태 확인
 - ㉡ 무균작업대 청결상태 유지
- ④ 분쇄된 동결건조 분말의 이물 검출
 - ㉠ 이물검출기(50mesh)에 분쇄한 원말을 넣고 이물 거르기
 - ㉡ 최종 원말 육안상태 확인
- ⑤ 유산균 분말 시료 수거

- ㉠ 김치유산균 시료 수거용 스푼 살균
- ㉡ 김치유산균 시료 수거
- ㉢ 김치유산균 시료 냉장고에 보관

(마) 동결건조 분말 유산균 균수 측정 및 공인 분석

- ① 동결건조 분말의 생균수 확인
 - ㉠ 회수한 동결건조 분말의 무게 확인
 - ㉡ 멸균된 9ml 희석수에 시료1ml(분말인 경우 1g)를 넣어 현탁
 - ㉢ 멸균된 9ml 희석수에 ㉡의 희석액 1ml를 순차적으로 희석
 - ㉣ MRS 평판 배지에 10ⁿ배 희석한 희석액 100 μ l을 떨어뜨려 도말
 - ㉤ 분말을 10진 희석하여 희석한 시료를 MRS 한천 평판 배지에 도말
 - ㉥ 한천 평판 배지를 30 $^{\circ}$ C 항온기에서 24시간 배양
 - ㉦ 생균수 세균 집락의 수 측정
- ② 유산균 분말 시료 균수 공인기관 분석
 - ㉠ 냉장보관중인 김치유산균 시료를 공인분석기관으로 송부
 - ㉡ 공인분석기관에서 유산균 분말의 균수 결과 수령

(4) 향 진균 김치유산균 분말을 이용한 생강 보존

: 액체 및 분말 상태의 향 진균 유산균을 이용한 생강 보존

(가) Curing 시 액체 혹은 분말 유산균 처리

- ① Curing 시 분말 유산균 처리
 - : 수확한 생강의 1차 건조 과정에 김치 유산균 분말 시제품 처리 후, 곰팡이 균사체 생육 여부 육안 관찰
 - ㉠ 향 진균 김치 유산균 배양 후 회수한 균체를 이용한 동결건조 분말 확보
 - ㉡ 햇생강 확보
 - : 생강 재배 농가 및 재배농가 현지 보관 장소 확보
 - : 경상북도 영주시 장수면 소재 생강밭에서 수확한 햇생강 사용
 - : 햇생강 종자 영주시 토종 종자가 아닌 개량종으로 중국에서 수입된 종자생강을 2018년 봄에 파종하여 수확한 생강으로 대한민국의 서해안 지역의 생강밭에서 수확한 생강보다 15일가량 빨리 수확된 생강
 - : 상품성이 좋은 햇생강과 수확 시부터 상품성이 낮은 것으로 분류된 변강을 실험에 사용함
 - : 변강 - 상품성이 낮은 생강으로 수확 전에 병해를 입은 생강

㉔ 유산균 분말과 생강 혼합

: 소량의 상수에 유산균 분말을 혼합하여 생가에 분무

: 유산균 처리량은 생강 1Kg에 1×10^{10} CFU이상이 처리되게 함

: 각 시험구당 생강 처리량은 20Kg

: 상품성이 높은 생강과 상품성이 낮은 변강을 상대로 시험구 구성

: 대조구는 동일한 양의 상수를 분무한 생강 시험구

㉕ 상온 보관

: 현지 농가에서 단기간 보관하는 보관 창고 임대

㉖ 생강 변화 관찰

: 생강에 유산균 분말 처리 후, 생강표면에 곰팡이 균사의 생육 육안 관찰

(나) 유산균 배양액 혹은 배양 상증액을 이용한 햇생강 보전

① 햇생강을 항균 유산균 배양액에 담구어 생강 보전 확인

㉑ 항균능 유산균 배양액 및 균체를 제거한 배양 상증액 준비

㉒ 생강구매 - 금년 수확

㉓ 생강 세척

㉔ 유산균 배양 액과 생강 혼합

㉕ 냉장 보관

㉖ 생강 변화 관찰



[그림] 항 진균 유산균 배양액 처리용 생강



[그림] 향진균 김치 유산균 균체 및 대사 산물과 생강 혼합

(다) 시설 작물의 곰팡이병 억제를 위한 향진균 김치 유산균 균체 및 대사 산물 처리

- ① 시설 딸기 재배사의 향진균 김치 유산균 효과 확인
 - ㉠ 향진균 김치 유산균 배양
 - ㉡ 향진균 김치 유산균 배양액 혼합 및 시제품 생산
 - ㉢ ㉡ 희석액 (200~500배)를 딸기 재배사에 옆면 살포



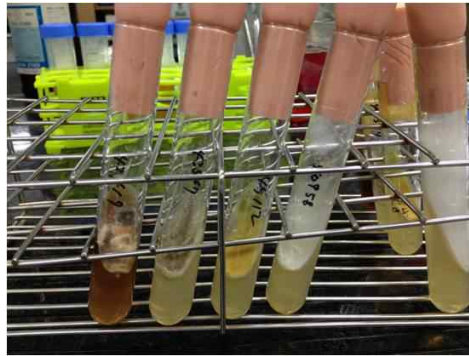
[그림] 향진균 김치 유산균 균체 및 대사 산물을 이용한 시설 딸기 재배 병해방지 실험용 포장

나. 연구결과

(1) 생강 보존용 항진균 유산균 개발

(가) 생강의 부패 원인인 곰팡이 억제용 항진균 유산균 개발

- ① 김치 시료 및 김치 분리 유산균을 대상으로 항진균 활성 유산균 선별
: 김치 유래 유산균 균주 200개를 대상으로 항진균 활성을 확인함
- ② 김치 유산균 MRS 액체 배지 배양
: 각 균주를 MRS 액체 배지에 접종하고 30°C에서 2일 배양하여 항진균 활성 검사용 배양액을 준비함
- ③ 곰팡이 배양 및 헤마사이토미터를 사용한 곰팡이 포자 수 측정
: 곰팡이 균사체와 포자 모두 붙어있는 한천배지를 살균된 칼로 잘라 살균된 생리 0.85% 생리식염수에 넣은 후 교반기로 교반하여 곰팡이 현탁액을 준비함
: 분양 받아 배양한 4종의 곰팡이 시료 모두에 대한 포자 현탁액을 준비하고, 생리식염수로 현탁하여 1×10^5 spore/ml 의 시료를 준비함. 곰팡이 포자의 수는 헤마사이토미터를 이용하여 현미경 하에서 격자 내의 균수를 측정함

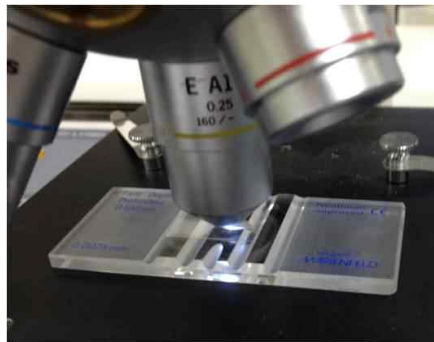


[그림] 곰팡이 배양, 한천사면배지 곰팡이 접종 후 배양함

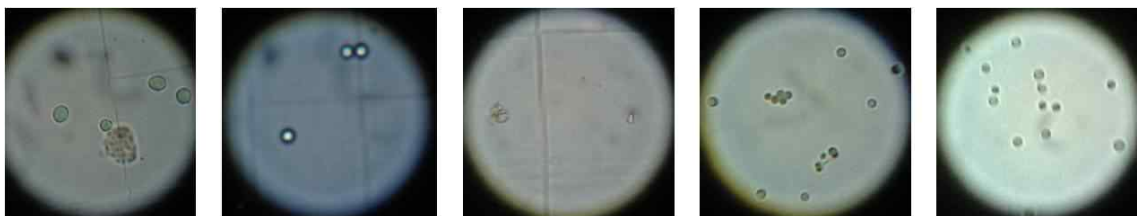
[표] 병원성 세균 및 곰팡이 균주 목록

균주명 (학명)	기탁번호*
<i>Ralstonia solanacearum</i>	KACC 10666
<i>Sclerotium rolfsii</i>	KACC 40958
<i>Armillaria mellea</i>	KACC 42419
<i>Aspergillus niger</i>	KACC 43547
<i>Aspergillus flavus</i> var <i>columnaris</i>	KACC 45112

* 균주는 국립농업과학원의 유전자원센터(KACC)에서 분양 받음



[그림] 곰팡이의 포자수 측정. 헤마사이토미터에 포자를 현탁한 시료를 올린 후 현미경으로 관찰하면서 격자 내의 포자수를 측정함



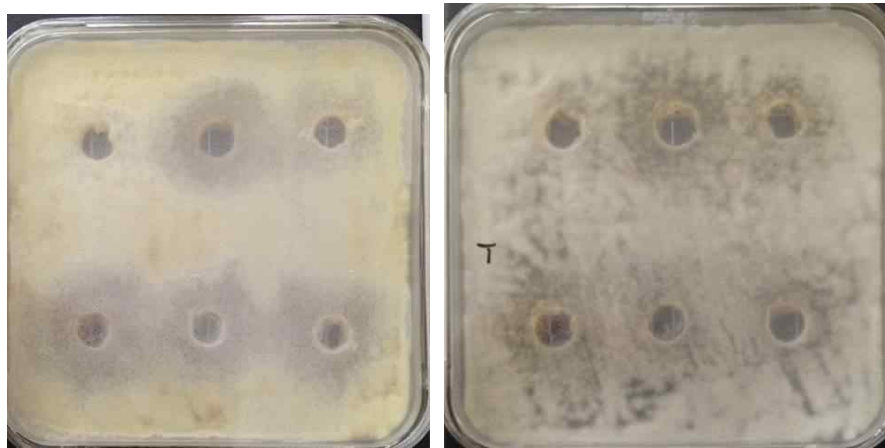
[그림] 항진균 시험에 곰팡이 포자의 현미경 사진

④ 김치유산균의 항진균 활성 측정

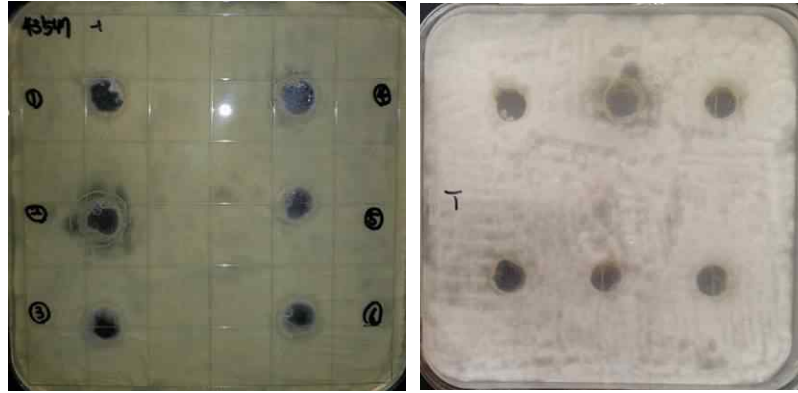
- : 김치 유산균 배양액을 준비하고 곰팡이 포자 현탁액을 준비하여, 곰팡이 포자 용액 (1×10^5 spore/ml) 0.1ml를 도말로 한천평판 배지에 접종한 후, 각각의 유산균 배양액 0.1ml를 분주하여 배양함
- : 항진균 유산균 배양액이 분주된 환의 중심을 기준으로 직경 18mm 이상의 생육 억제 환의 형성을 유발하는 항곰팡이 활성이 있는 균주 중 균주 Ga와 균주 Na를 대량 배양용 후보 균주로 선별함



[그림] 항진균 유산균 배양액에 의한 곰팡이 억제 (*Sclerotium rolfsii* KACC 40958) 곰팡이 포자를 희석하여 한천평판 배지에 접종한 후, 살균된 필터 디스크를 놓은 후 유산균 배양액 0.1ml를 필터 디스크에 분주 함



[그림] 항진균 유산균 배양액에 의한 곰팡이 억제 (*Aspergillus flavus* var *columnaris* KACC 45112). 곰팡이 포자 용액 (1×10^5 spore/ml) 0.1ml를 도말로 접종한 후, 각각의 유산균 배양액 0.1ml를 분주함



[그림] 항진균 유산균 배양액에 의한 곰팡이 억제 (*Aspergillus niger* KACC 43547). 곰팡이 포자 용액 (1×10^5 spore/ml) 0.1ml를 도말로 접종한 후, 각각의 유산균 배양액 0.1ml를 분주함

⑤ 분리한 항진균 유산균의 유전적 위치 분석

㉞ 분리균주 Ga의 16S rRNA 유전자 서열

>Strain Ga

```

GGATCGATGTCGGATTTATTGGGCGTAAGGGAACGCAGGCGGTCTTTTA
AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGTAGTGCATTGGAAACT
GGAAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGG
TCTGTAAGTACGCTGAGGTTTCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGG
TTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCCTTTGACCACCTAAGAGATTAGGTTTTCCCTTCGGGGA
CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGT
TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTCAGTTGCCAGCAT
TAAGTTGGGCACTCTGGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG
CTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATC
TCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATG
AAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACC

```

CAAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGTCTAAAGTGGGACAG
ATGATTGGGGTGAAGTCGTAAGGAGAGTGATATACACAGTGTA

㊤ 분리균주 Na의 16S rRNA 유전자 서열

>Strain Na

GGGTAGGATGTCGGATTTATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAAC
TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTG
GTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGG
GTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGG
AGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA
AGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCTTCGGGG
ACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGCGTGAGATG
TTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCA
TTTAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT
GGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAAT
CTCTTAAAACCATTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACAT
GAAGCCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACG
TTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACAC
CCAAAGCCGGTGAGGTAACCCTTCGGGGAGCCAGCCGTCTAAAGTGGGA
CAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAAGAGGATGTACAGCGCTGATA

㊤ 분리균주 Da의 16S rRNA 유전자 서열

>Strain Da

GGNNNTTCGGATTATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGT
CTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGG
AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAA
ATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC
TGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGAT

ACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTT
TCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGT
CTTGACATCTTTTGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCCTTCGGGGGCA
AAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTT
AGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCT
ACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCTAATCTC
TTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAA
GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTTC
CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAACACCCG
AAGCCGGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACA
AATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAGGGTAACCCGTAAA

㉔ 분리균주 Ra의 16S rRNA 유전자 서열

>Strain Ra

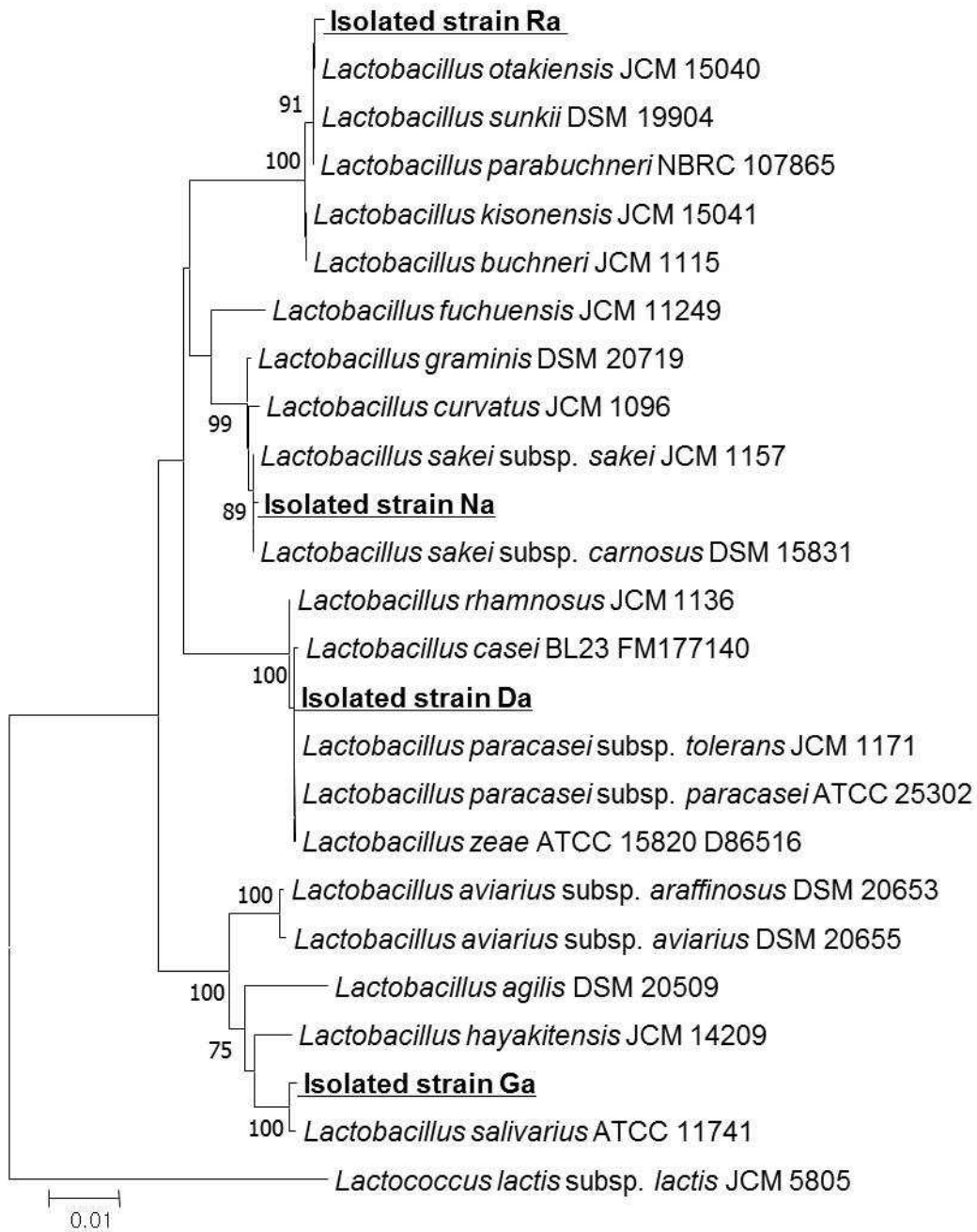
GNGGACNNGTCGGGATTATTGGGCGTAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTA
GGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACC
AGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGG
TCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGG
TTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGA
GTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCTACGCGAAGAACCTTACCAG
GTCTTGACATCTTCTGCCAACCTAAGAGATTAGGCGTTCCCTTCGGGGA
CAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGT
TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCAT
TTAGTTGGGCACTCTAGCAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG
GGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTG

CTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAACCGCGAGGTCAAGCTAATC
TCTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATG
AAGTTGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACACC
CAAAGCCGGTGAGGTAACCTTCGGGGACCAGCCGTCTAAGGTGGGACAG
ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAGGGNTAACCGTAAA

[표] 향균 유산균과 가장 상동성이 높은 유산균 표준균주

No.	Isolates	Taxonomic name (균주명)	16S rRNA 상동성 (%)
1	Ga	<i>Lactobacillus salivarius</i> ATCC 11741	99.9
2	Na	<i>Lactobacillus sakei</i> DSM 15831	99.9
3	Da	<i>Lactobacillus paracasei</i> JCM 1171	99.9
4	Ra	<i>Lactobacillus otakiensis</i> JCM 15040	99.9

⑥ 분리한 항진균 유산균의 계통분류학적 분석

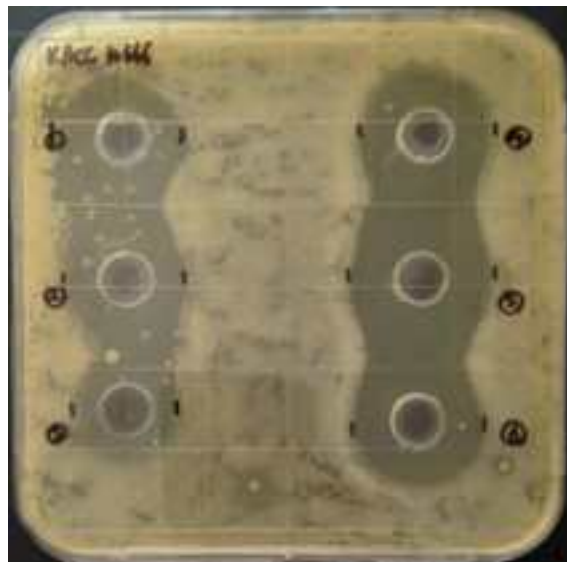


[그림] 항균 김치 유산균의 계통분류학적 위치를 나타내는 계통도

Lactococcus lactis subsp. *lactis* JCM 5805 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 outgroup으로 사용함. 각 노드의 반복형성 횟수가 70% 이상 경우에 상응하는 반복 수치를 계통도에 표기함

(나) 생강의 부패 원인인 세균 억제용 항 병원성 세균 유산균 개발

- ① 김치 시료 및 김치 분리 유산균을 대상으로 생강 병원성 세균의 생육을 억제하는 유산균 선별함
- ㉓ 김치 유래 유산균 균주 200개를 대상으로 활성 유무 검증
- ㉔ 김치 유산균 MRS 액체 배지 배양
 - : 각 균주를 MRS 액체 배지에 접종하고 30℃에서 2일 배양하여 활성 검사용 배양액을 조제 함
- ㉕ *Ralstonia solanacearum* KACC 10666 균주가 도말된 한천평판배지에 김치유산균 배양액 처리
 - : 한천평판배지 중간에 직경 8mm의 구멍을 만들고 유산균 배양액 0.1ml를 분주하고 배양액이 배지로 스며들게 하거나, 유산균 배양액이 흡수된 필터 디스크를 한천평판배지 중간 올린 후 30℃에서 1~7일간 배양하면서 *Ralstonia solanacearum* 10666의 생육 억제를 나타내는 균주를 선별함
- ㉖ 생육억제환의 크기가 18mm 이상을 유발하는 후보 유산균 중 균주 Da와 균주 Ra를 항 *Ralstonia solanacearum* KACC 10666균주로 선별함



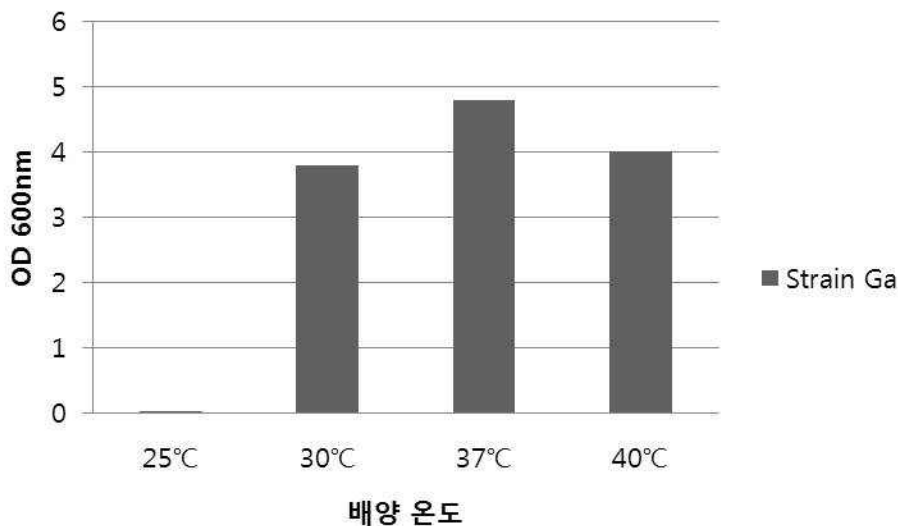
[그림] 김치유산균 배양액에 의한 생강병원균 *Ralstonia solanacearum* KACC 10666의 생육 억제

(3) 생강 보존용 항 진균 김치유산균의 배양 조건 탐색

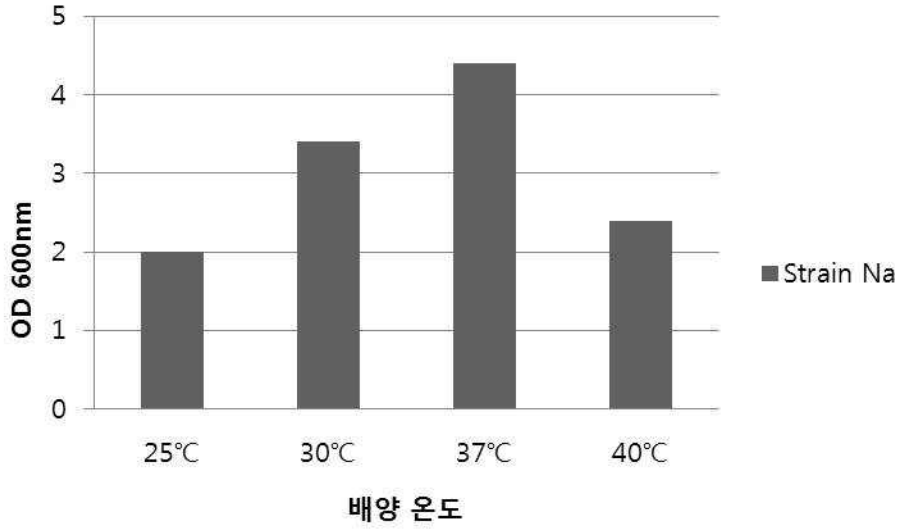
(가) 항 진균 유산균의 배양 최적 온도, 초기 pH, 탄소원 확인

- ① 항 진균 유산균의 배양 최적 온도 확인

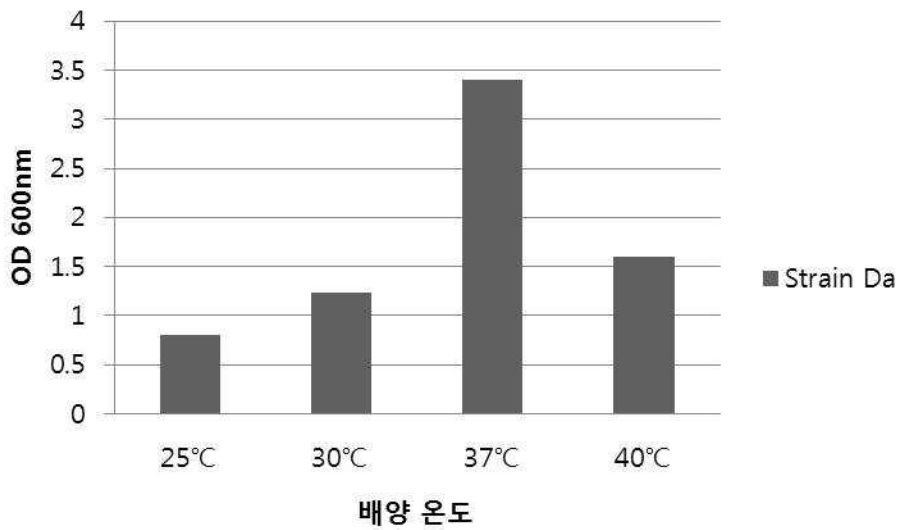
- ㉠ 자연계에 존재하는 미생물들은 분류학상의 학명이 같은 균주일지라도 각각의 균주의 특성에 따라 최적의 배양온도 및 생육 가능한 온도 범위가 다른 경우가 많으므로, 항균 김치유산균의 생육 온도를 조사함. 균주에 별로 특이한 온도에서 생육이 우수함
- ㉡ 기본 MRS 배지에 균주를 접종하고 25℃, 30℃, 37℃, 혹은 40℃로 유지되는 배양기에서 18시간 정치 배양한 후 생육 정도를 흡광도의 변화로 확인함
- ㉢ 균주 Ga, Na, Da, Ra는 모두 37℃에서 최고의 생육을 보였으며, 균주 Ga는 30℃과 40℃에서도 양호한 생육을 나타냄
- ㉣ 각 균주의 생균수 측정을 위해 배양액을 10진 희석하여 MRS 한천평판배지에 0.1ml씩 도말하고 30~37℃ 사이에서 배양함. 배양후 생성된 집락의 수를 희석된 비율로 곱하여 배양액에 포함된 생균수 값을 계산한 결과 OD 2이하에서는 모든 시료에서 1×10^9 CFU/ml의 균수가 확인됨



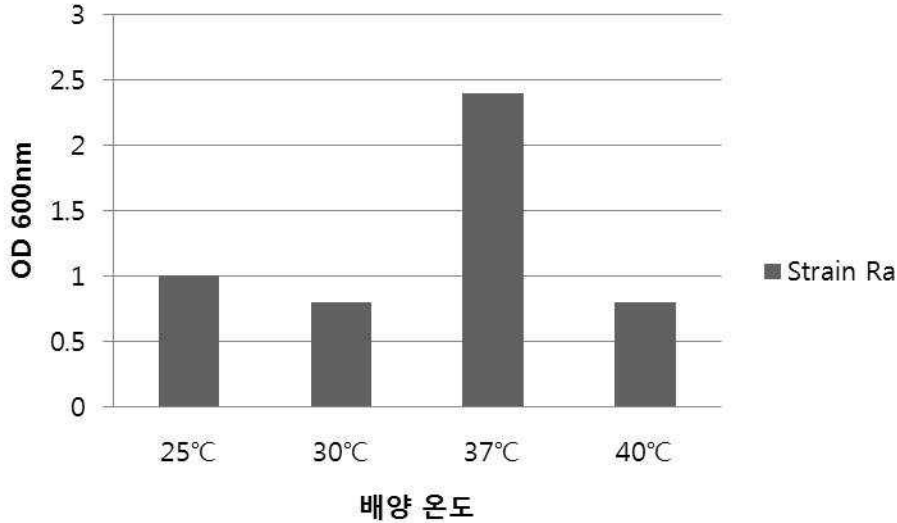
[그림] 김치 유산균 균주 Ga의 생육 온도



[그림] 김치 유산균 균주 Na의 생육 온도



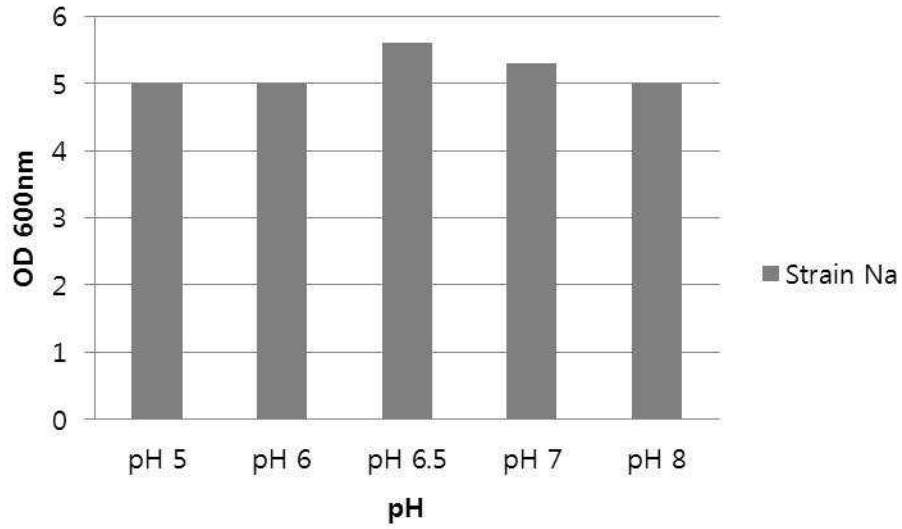
[그림] 김치 유산균 균주 Da의 생육 온도



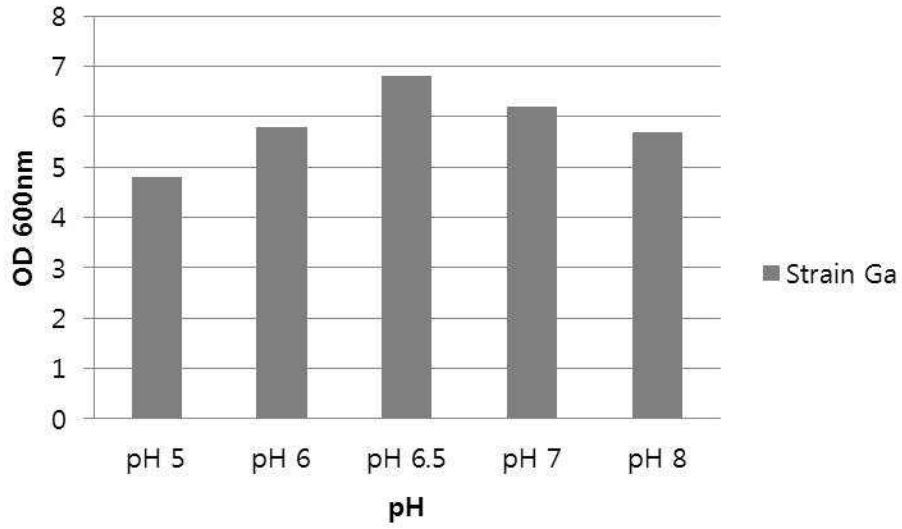
[그림] 김치 유산균 균주 Ra의 생육 온도

② 항 진균 유산균의 배양 최적 초기 pH 확인

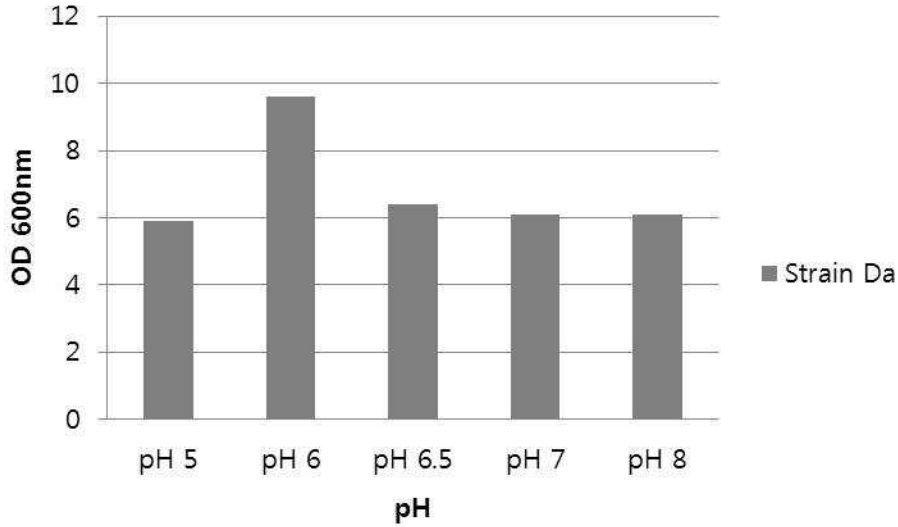
- ㉠ 항 진균 김치 유산균의 생육은 다른 유산생성 균주와 유사하게 산소를 요구하지 않고 생육하며, 이 과정에서 NADH의 순환을 위하여 미생물 생육 과정에서 lactic acid가 대사산물로 배출되고, 배지 내의 산도가 감소되고 이로 인해 유산균의 생육이 저해됨
- ㉡ 기본 MRS 배지를 1N NaOH 혹은 1N HCL을 사용하여 배지의 초기 pH를 pH 5, pH 6, pH 6.5, pH 7, 혹은 pH 8로 조정하여 배지를 조제한 후, 0.22 micro miter 크기의 필터로 여과하여 무균 상태를 배지를 만들고, 각각의 유산균의 생육을 관찰함
- ㉢ 균주 Ga, Na는 초기 pH 6.5에서 가장 높은 생육을 보임. 균주 Da는 초기 pH 6인 배지에서 가장 높은 생육을 보임. 균주 Ra는 초기 pH 5에서 가장 높은 생육을 보임



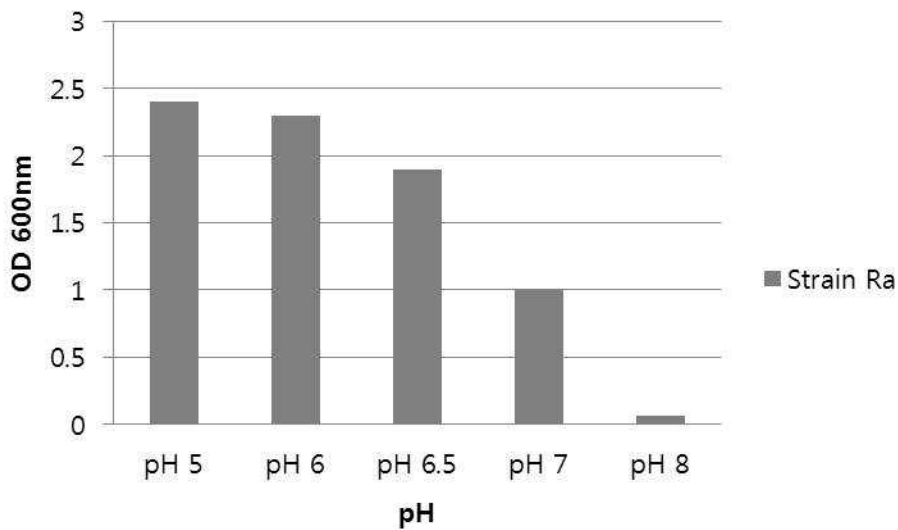
[그림] 김치 유산균 균주 Na의 초기 pH에 따른 생육



[그림] 김치 유산균 균주 Ga의 초기 pH에 따른 생육



[그림] 김치 유산균 균주 Da의 초기 pH에 따른 생육



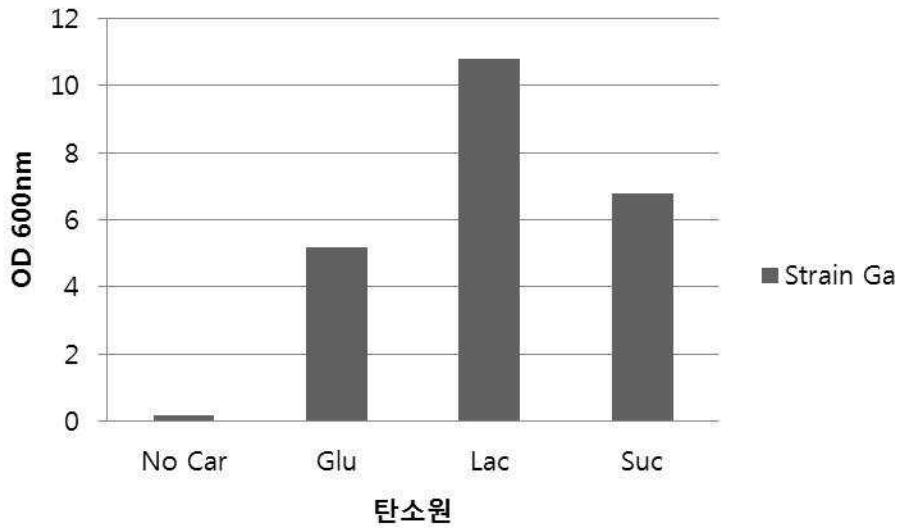
[그림] 김치 유산균 균주 Ra의 초기 pH에 따른 생육

③ 향 진균 유산균의 배양 최적 탄소원 확인

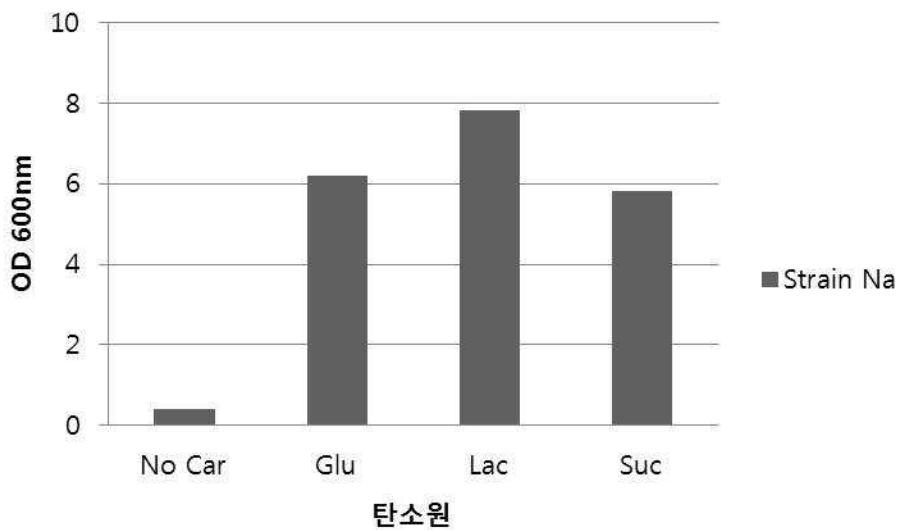
- ㉠ 김치 유산균의 탄소원 및 에너지원인 당류의 선호도 확인을 위하여 단당인 glucose와 이당인 sucrose와 lactose를 대상으로 최적의 탄소원을 조사함
- ㉡ 기본 MRS 배지의 탄소원 이외의 모든 조성이 동일한 배지를 조제하고, 각각의 시험구에 glucose, lactose, 혹은 sucrose를 넣고 유산균을 접종하여 18시간 정치 배양한 후 생육 정도를 흡광도의 변화로 확인함. 대조구로는

탄소원이 포함되지 않은 배지를 이용함

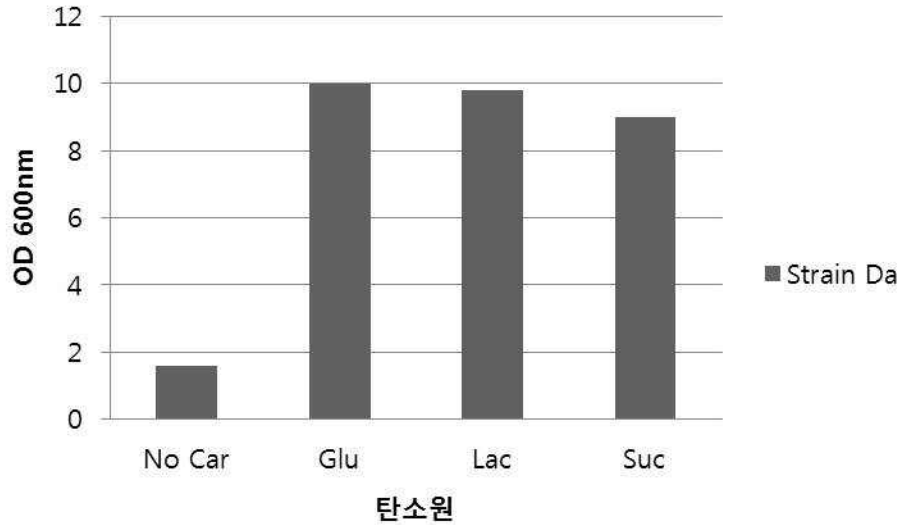
- ㉔ 김치에서 분리한 유산균 임에도 불구하고 균주 Ga와 Na는 lactose를 가장 선호하였고, 균주 Da는 glucose를 가장 선호하였음. 균주 Ra는 sucrose에서 잘 생육하였으나 lactose는 잘 이용하지 못함



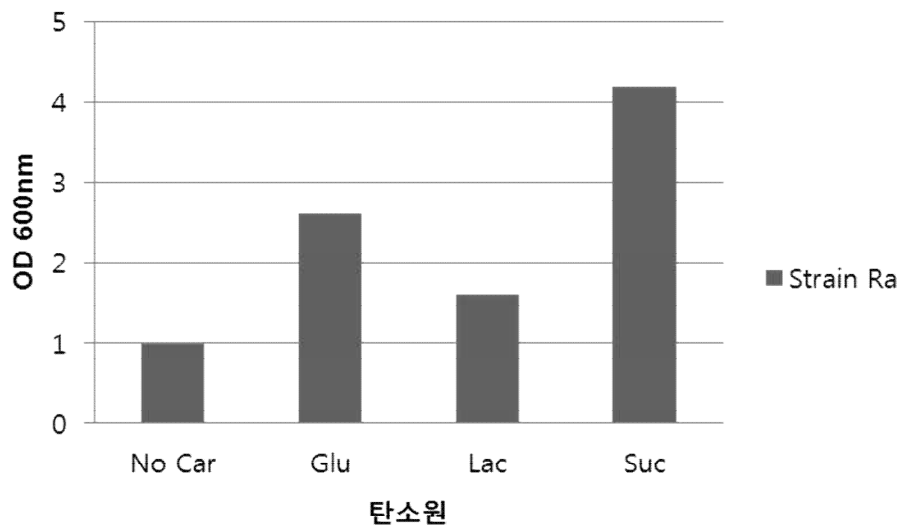
[그림] 김치 유산균 균주 Ga의 최적 생육 탄소원



[그림] 김치 유산균 균주 Na의 최적 생육 탄소원



[그림] 김치 유산균 균주 Da의 최적 생육 탄소원



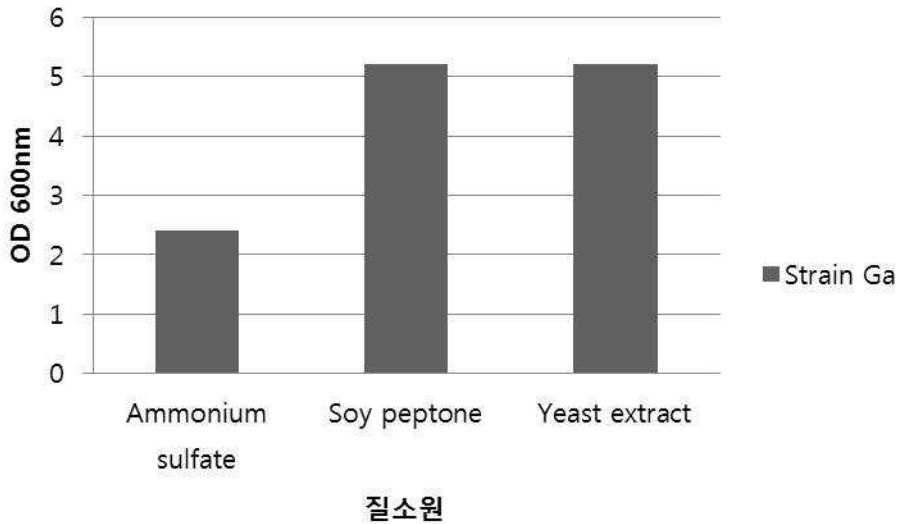
[그림] 김치 유산균 균주 Ra의 최적 생육 탄소원

(나) 항 진균 유산균의 최소 배지 조건 탐색: 유기성 질소원의 투여량 조절 배양

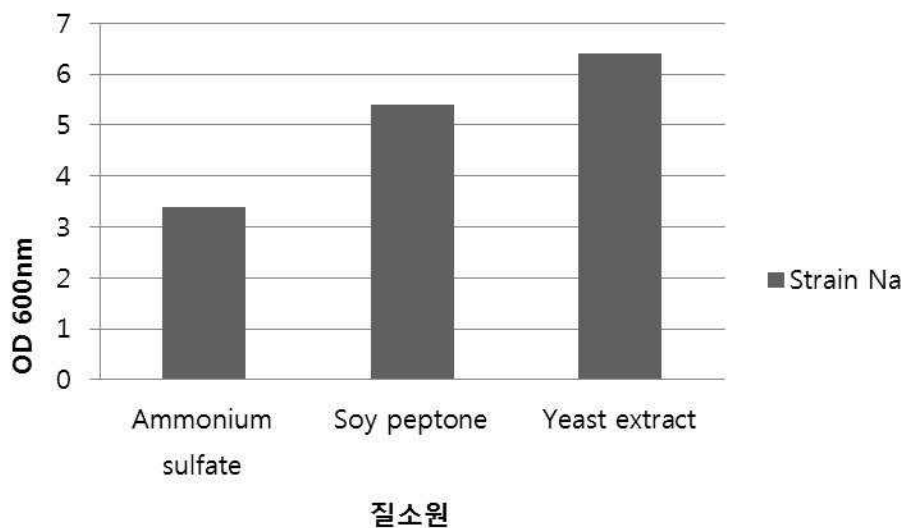
① 항 진균 유산균의 최소 배지 조건 탐색: 유기성 질소원 확인

㉠ 유산균의 배양에 최적인 질소원을 확인하기 위해 MRS에 포함된 질소원인 ammonium sulfate, soy peptone, yeast extract가 결핍된 배지를 조제하고 시험 구에 따라 각각 1종류의 질소원만 첨가한 후 유산균의 배양을 관찰함

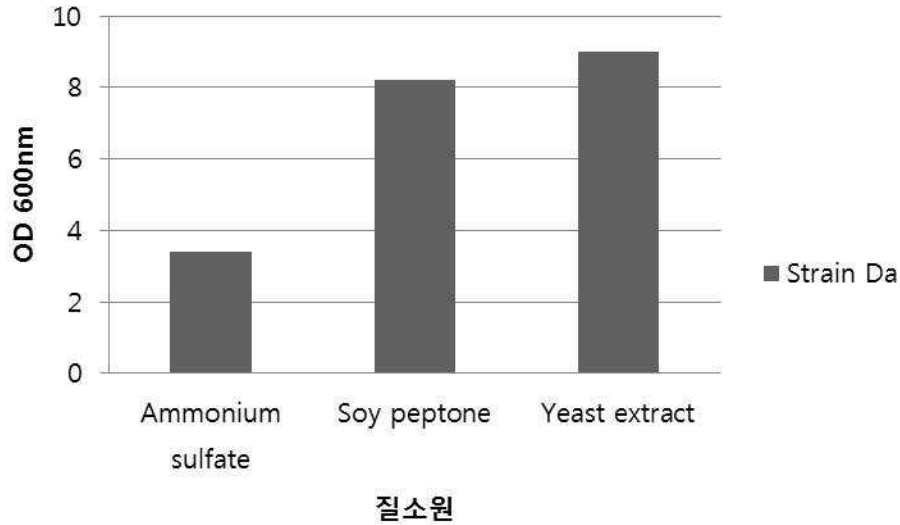
- ㉔ 균주 접종후 30℃ 배양기에서 18시간 정치 배양한 후 생육 정도를 흡광도의 변화로 확인함
- ㉕ 균주 Ga, Na, Da, Ra는 모두 yeast extract를 잘 이용하였고, 균주 Ga는 soy peptone에서도 비슷한 효과를 얻었음. 균주 Ra를 제외한 균주는 ammonium acetate로도 최적 배양의 40%~50% 범위의 생육을 보임



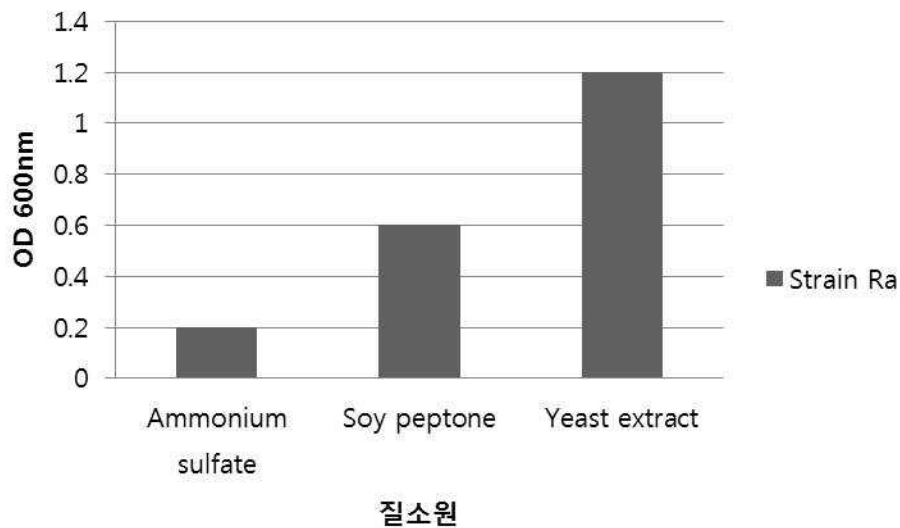
[그림] 김치 유산균 균주 Ga 생육에 최적인 질소원



[그림] 김치 유산균 균주 Na 생육에 최적인 질소원



[그림] 김치 유산균 균주 Da 생육에 최적인 질소원



[그림] 김치 유산균 균주 Ra 생육에 최적인 질소원

(3) 향진균 김치유산균 배양액을 이용한 유산균 분말 생산 (300L 배양기)

: 향진균 유산균의 분말 제작

(가) 파이릿 300L 배양기 발효

- ① (주)코바이오에서 제작한 300L 발효용 발효기의 탱크에 250L 배양에 필요한 MRS 배지 성분을 투입하여 유산균 배양용 배지를 조제함
- ② 향진균 활성과 향세균 활성을 가진 2종류의 김치유산균 (strain Ga와 strain Na)을 배양함

- ③ 전체 250L의 배양액에서 회수한 wet cell의 균주 Ga의 생균수는 4×10^{11} CFU/g이었으며, 균주 Na의 생균수는 2×10^{11} CFU/g이었음



[그림] 김치 유산균 배양용 발효기 (300L, 코바이오)

(나) 배양액이 연속원심분리

- ① 발효 과정의 유산균 생육을 OD 600nm에서의 흡광도의 변화로 확인하고, 발효가 종료 시점을 결정함
- ② 발효 종료 시점 이전에 원심분리기 부품을 살균 혹은 무균조작하고 바울을 조립하고, 바울을 원심분리기에 장착함. 원심분리기와 발효기 사이의 균체 이송 라인을 조립함
- ③ 발효 종료 후, 원심분리기를 가동함. 발효기에서 원심분리기로 이송되는 라인을 열고, 소송용 펌프를 이용하여 유산균 배양액을 원심분리기로 이송함
- ④ 원심 분리 종료. 배양 여액이 제거되고 균체가 남은 바울을 원심분리기에서 탈착한 후, 바울 안쪽 표면에 삽입된 시트를 분리함. 시트에 쌓인 균체를 회수함



[그림] 항 진균 김치유산균 배양체. 유산균을 바울형태의 연속원심분리기를 이용한 후 수확한 cell pellet

(다) 배양한 유산균체 동결건조

- ① 원심분리한 후 회수한 세포를 동결보호성분과 혼합하여 액상 현탁액으로 조제한 후 무균 처리한 상용 동결건조관에 2L씩 분주하고 동결건조 실시함
- ② 동결건조기 운전조건은 -40°C 에서 6시간 예비 냉각으로 시료를 완전히 동결한 후, 동결건조기의 진공을 가함.
- ③ 동결건조기 냉각관의 온도는 -40°C , -30°C , -20°C , -10°C , 0°C , 10°C , 20°C 의 순서로 서서히 오르게 하였고, 각 온도별 작동 시간은 6~12시간을 유지함



[그림] 유산균 동결건조 분말 조제용 동결건조기 내부

(라) 동결건조 분말 회수

- ① 동결건조 종료 후, 동결관을 꺼낸 후 시료를 회수함. 균체 별로 2개의 동결관에서 균체를 회수함
- ② 회수한 균체는 무균처리한 분쇄기에 넣고 분쇄하여 미세 분말형태로 조제함



동결판 1



동결판 2

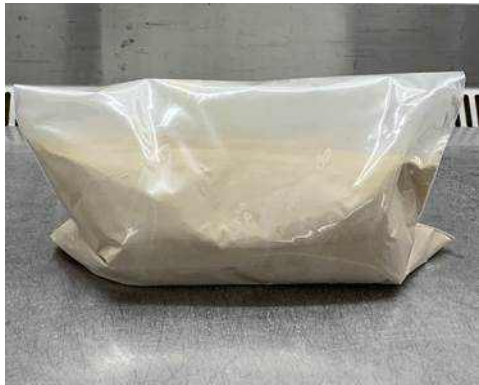


동결판 3



동결판 4

[그림] 향진균 유산균 동결건조 후 분쇄 전의 동결건조가 종료된 동결판



동결건조 시료 1



동결건조 시료 2

[그림] 향진균 유산균 동결건조 분말

시료 1, *Lactobacillus salivarius* Ga; 시료 2, *Lactobacillus sakei* Na

(마) 동결건조 분말 유산균 균수 측정 및 공인 분석

- ① 동결건조 분말을 혼합한 후 생균수 분석을 위해 한국기능식품연구원에 균수 분석을 의뢰함. 유산균 분석 결과 150,000,000,000 CFU/g의 생균을 유지하는 유

산균 분말이 조제됨을 확인함

(4) 항진균 김치유산균 분말을 이용한 생강 보존

: 액체 및 분말 상태의 항진균 유산균을 이용한 생강 보존

(가) Curing 시 액체 혹은 분말 유산균 처리

① 항진균 유산균 분말을 이용한 생강보존 현장 실험

- 사전 현장 답사: 2018년 10월 19일
- 처리 0일; 2018년 10월 25일
- 관찰 2주; 2018년 11월 09일
- 관찰 4주; 2018년 11월 23일

[표] 항진균 유산균 분말을 이용한 생강보존 현장 실험 시험구 구성

시험구	생강 상태	생강(Kg)	#분무량(ml)	유산균 (CFU/ml)	기타
1	변강	10	300	0	
2	변강	10	300	2×10^9	*Tween 80, 15ml
3	원강	10	300	0	
4	원강	10	300	2×10^9	
5	원강	10	300	10×10^9	
6	원강	10	300	10×10^9	Tween 80, 15ml

분말 상태의 유산균 입자의 생강 표면 도포를 위해 최소량의 액체량을 정하고 분말을 현탁한 후 생강표면에 분무한 후 건조함

* Tween 80은 고 농도의 분말 상태인 유산균이 단일 세포로 잘 퍼지게 하는 보조제로 사용함

② 경상북도 영주 특용작목반 생강재배 농가에서 수확 후 2일 경과한 생강의 1차 건조 과정에 김치 유산균 분말 시제품을 생강 1Kg당 1×10^{10} CFU이상 분무 도포 처리 후, 특용작목반에서 사용하고 있는 보관 창고(영주농협고추종합처리장; 경상북도 영주시 장수면 장수로 107)에서 생강의 변화를 곰팡이 균사체 생육 여부로 육안으로 관찰함.

③ 유산균 분말의 입자의 현탁 정도를 높여 동결 건조된 균체입자가 표면에 잘

퍼지게 하기 위한 유산균 배양에 사용하는 계면활성제인 Tween 80이 첨가된 시험구를 구성함. 현장에서 수확 시 상품성이 낮은 것으로 판정된 변강을 이용한 시험구를 구성함



[그림] 향 진균 유산균 분말 시험용 햇생강 수확 전 생강 밭 (2018년 10월 19일)
: 경상북도 영주시 장수면



[그림] 향 진균 유산균 분말 처리용 생강



[그림] 향 진균 유산균 분말 생강 처리 및 관찰, 영주농협고추종합처리장
: 경상북도 영주시 장수면 장수로 107
: 영주농협 특용작목반 작업 및 제품 보관용 창고



[그림] 향 진균 유산균 분말 생강 처리 0일, 2018년 10월 25일



1. 변강 2. 변강 LAB-T 3. 원강 4. 원강 LAB 5. 원강 LAB+ 6. 원강 LAB-T

[그림] 향 진균 유산균 분말 생강 처리 0일, 유산균 처리 생강을 담은 포대



[그림] 향 진균 유산균 분말 생강 처리 0일, 유산균 처리 생강 보관

- ④ 상품성이 높은 햇생강 및 상품성이 낮은 변강 모두에서 향 진균 김치유산균 처리에 의한 유의한 곰팡이 균사체 생육 억제 효과가 나타나지 않음.
- ⑤ 일반 생강의 경우, 김치유산균 분말을 처리한 시험구 및 동일한 양의 상수를

분무한 대조구 모두에서 4주 후에 90% 이상 대부분의 생강의 표면에 다량 혹은 소량의 균사체 형성이 관찰되었음. 김치유산균 분말의 처리량이 높은 시험구와 낮은 시험구도 곰팡이 균사 형성의 차이점이 관찰되지 않음

⑥ 수확 시부터 품질이 낮은 변강의 경우, 일반 햇생강 비해 생강표면에 곰팡이 균사체 형성이 관찰되지 않았으나, 4주 후의 상품성은 곰팡이 균사가 자란 일반 생강보다 더 낮은 상태로 판별되었음



[그림] 향진균 김치 유산균 분말을 이용한 생강 보존 관찰 2주, 2018년 11월 09일

[표] 생강 표면 균사체 형성 관찰, (2주 후)

시험구	생강 상태	유산균 (CFU/ml)	표면 곰팡이 균사
1	변강	0	없음
2	변강 (T)	2×10^9	없음
3	원강	0	약 5%
4	원강	2×10^9	약 10%
5	원강	10×10^9	약 10%
6	원강 (T)	10×10^9	약 10%

원강: 모든 유산균 처리 시험구의 생강에서 생강에서 곰팡이 균사 발견, 표면에 균사가 있으나 상품성은 변강에 비해 우수

변강: 곰팡이 관찰은 되지 않으나 품질은 2주 전에 비해 더 떨어짐



[그림] 생강 표면 균사체 형성 관찰 (4주 후)

- 원강: 모든 시험구 대부분의 생강에서 곰팡이 균사 발견
- 변강: 표면 곰팡이 관찰은 되지 않음 . 품질은 4주 전에 비해 더 떨어짐



변강

생강 유산균 분말 처리 후 곰팡이 발생

[그림] 향진균 김치 유산균 분말 처리 후 발생한 곰팡이

(나) 향진균 유산균 배양액을 이용한 생강 보존

- ① 향균 유산균의 배양액에 의한 생강보존을 확인하기 위해 유산균 배양액과 상수로 세척한 생강을 준비함
- ② 세척한 생강을 유산균 배양액 혹은 균체를 제거한 배양 상층액에 넣고 생강의 변화를 관찰함.

대조구1; 표면을 건조한 햇생강

대조구2; 유산균 배양액 대신 상수를 사용한

③ 시험 시작 50일 후 관찰 결과

㉞ 생강만 투입된 시험구의 생강의 표면은 곰팡이 생육이 관찰됨

㉟ 유산균 배양 상증액이 사용된 시험구의 액상 표면에 곰팡이 균사 발견됨

㊱ 유산균 배양액 대신 상수를 사용한 시험구내부에서 혐기성 발효 과정에서 발생된 것으로 추정되는 기포가 관찰됨

㊲ 유산균 배양액에 담긴 생강은 비교적 양호한 상태로 보관됨

④ 유산균 배양액에 침지하여 생강을 보관하는 것은 생강보존에 효과가 있을 것으로 사료됨



[그림] 항진균 김치 유산균 균체 및 대사산물을 이용한 생강 보존



[그림] 무처리 시험구 헛생강 표면에 형성된 곰팡이 균사체

(다) 항 진균 김치유산균을 이용한 생강 보존 실험 결과 고찰

- ① 항 진균 기능을 가진 유산균을 생존력이 있는 상태로 분말화하고 이 분말에 의한 생강의 보존성 향상을 기대하였으나, 분말을 생강에 도포한 필드실험에서 유의한 효과를 보이지 않았음
- ② 유산균의 대사산물이 포함된 액체 상태의 배양액은 진균의 발생을 억제하였으나, 분말에서 효과를 보이지 않은 것은 항 진균 유산균의 대사산물에 의한 차이라고 사료됨
- ③ 분말을 도포한 필드실험에서 생강 주변의 환경이 유산균 보다 곰팡이 생육에 더 적합하였고 이로 인해 곰팡이 생육억제 효과를 관찰하지 못한 것으로 사료됨
- ④ 본 연구 결과는 유산균 분말을 이용한 작물 현장 보존연구로 향후 작물 주변 마이크로비움 및 병원균 생육환경 변화에 의한 작물 보존 방안을 제시할 수 있는 기초 연구결과가 될 수 있을 것으로 사료됨

다. 연구개발성과

(1) 항진균 유산균 분말 유산균수 분석

(가) 시제품 공인분석기관 검사성적서

① 항균 유산균 분말

: Lactobacillus 균주 동결건조 후 분쇄한 분말 시료 내 생존하는 유산균수 측정
 : 균수 측정 단위 CFU/g

② 유산균 균수 측정 공인기관 검사 기관

: 한국기능식품연구원

③ 공인기관 검사 결과

: 유산균 균수, 150,000,000,000 CFU/g

제 D2018120962 호 문서확인		시험·검사성적서							
제품명	균주2종혼합분말	제조일자 (유통기한)	2018-12-05 (2019-12-04)						
외의인	업체명	(주)프로바이오너	성명						
	주소	전라북도 전주시 덕진구 원장동길 111-18, 204호, 205호 (장동, 전북생물산업진흥원 바이오식품산업화센터)							
제조번호		접수년월일	2018-12-11						
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2018120962						
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일: 2018-12-17 시험·검사 책임자: 이정규 검사관련 총 책임자: 김천희</p> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>유산균수(CFU/g)</td> <td>150,000,000,000 CFU/g</td> <td>이정환</td> </tr> </tbody> </table>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	유산균수(CFU/g)	150,000,000,000 CFU/g	이정환
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원							
유산균수(CFU/g)	150,000,000,000 CFU/g	이정환							
<p>※ 위 값정은 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다. ※ 본성적서는 참고용 성격서입니다. 시험·검사결과에 시험·검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용될 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제3자 용도로 활용될 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2018년 12월 17일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원</p> <p style="text-align: center;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 (031)528-0400-1</p>									

[그림] 공인분석기관인 한국기능식품연구원의 유산균 수 검사성적서

(2) 유산균을 이용한 항균용 조성물 지적재산권 확보

(가) 특허출원

발명명칭 유산균 및 나노입자를 포함하는 항균용 조성물

출원일자 2018.12.24

출원번호 10-2018-0168391 (접수번호 1-1-2018-1297564-63)

출원인명칭 주식회사 프로바이오닉(1-2000-028349-4)

발명자성명 김병천 라더 이르판 아흐마드

출원번호통지서

출원일자 2018.12.24

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2018-0168391 (접수번호 1-1-2018-1297564-63)

출원인명칭 주식회사 프로바이오닉(1-2000-028349-4)

대리인성명 특허법인태백(9-2008-100101-3)

발명자성명 김병천 라더 이르판 아흐마드

발명명칭 유산균 및 나노입자를 포함하는 항균용 조성물

특 허 청 장

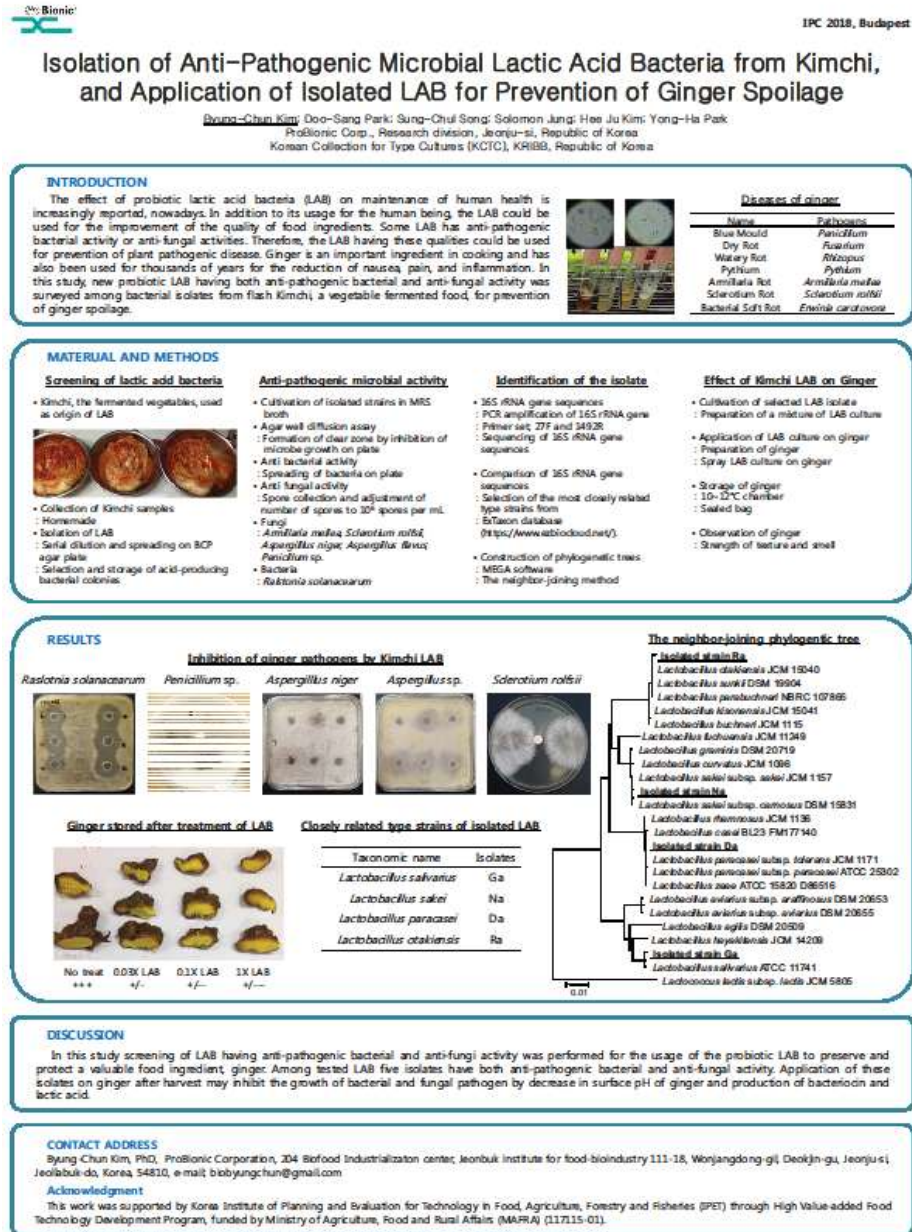
[그림] 출원번호통지서 표지

(3) 학술논문 발표

(가) 국제 학술대회 발표

① IPC 2018 국제 학술대회에 항진균 효능을 가지는 김치유산균을 보고함

㉠ 발표 포스터



[그림] 학술대회발표자료 포스터

(4) 시설 작물 곰팡이병 보호 및 생육촉진용 김치유산균제품 프로바이오테이드 제조방법

업 체 명	(주)프로바이오틱		
제 품 명	프로바이오 에이드	유 형	기타가공품
< 제 조 방 법 >			
공정명	제조방법 설명		
원료	식품공전에 적합한 원료를 사용한다.		
▼			
종균배양	종균을 멸균한 유산균선택배지(액상)에 접종한 후 접종량에 따라 30 ± 2℃에서 9~15시간 배양한다.		
▼			
칭량	배지 배합비에 맞게 원료를 칭량한다.		
▼			
혼합	Lactobacillus salivarius, Lactobacillus sakei과 포도당, 무수구연산을 제외한 원료를 정제수와 함께 발효기에 넣고 혼합한다.		
▼			
멸균	배지혼합액을 121℃, 15분 멸균한다. 포도당은 별도로 121℃, 15분 멸균한다.		
▼			
포도당, 종균접종	포도당과 Lactobacillus salivarius, Lactobacillus sakei를 접종구를 통해 투입한다.		
▼			
유산균 액상 제조	30 ± 2℃에서 9~15시간 배양한다.		
▼			
원심분리	유산균 액상을 원심분리한다.		
▼			
제품 냉각 및 포장	원심분리 후 상등액을 포장단위로 분주하고 무수구연산을 함량에 맞게 투입한다.		
▼			
자가품질검사	제품규격에 의한 품질검사를 실시한다.		
▼			
제품 보관 및 출하	제품을 냉장 보관하며, 검사결과가 적합한 제품에 한하여 출하한다.		

(5) 사업화성과 및 매출실적

○ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	1 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	0 억원	
			향후 3년간 매출	2 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 2 % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 0 % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : 3 % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위

○ 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)				
	소요예산(백만원)				
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0	1	2	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	0	2	5
		국외			
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수치 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

생강의 보존성 향상에 도움을 줄 수 있는 김치 유래의 향진균 김치유산균 분말 개발

- 생강 보관 과정의 생강 손실의 주요 원인인 곰팡이병 억제 기능이 있는 김치유산균을 이용한 생강 보존용 유산균 제제 개발

가. 생강 보존을 위한 향진균 김치유산균 개발

- (1) 향진균 유산균 2종 이상 분리
- (2) 항 병원성 세균 유산균 1종 이상 분리
- (3) 생강 보존용 유산균 배양체 생산을 위한 향진균 김치유산균의 배양조건 탐색
 - : 1×10^9 CFU/ml 생산 가능한 최소 유기성 질소원 종류 및 함유량 결정
 - : 최적 탄소원 1종 선정
 - : 최적 배양 온도 선정

나. 향진균 김치유산균 배양액을 이용한 유산균 분말 생산 (300L 배양기)

- (1) 선별된 김치유산균 2종 이상이 포함된 유산균 분말 생산
- (2) 생산된 분말의 유산균 수 1×10^{10} CFU/g 이상 유지

다. 향진균 김치유산균에 의한 생강 보존

- (1) 향진균 김치유산균 분말을 이용한 생강 보존
- (2) 향진균 유산균으로 부패 생강 10% 이상 감소

3-2. 목표 달성여부

가. 생강 보존을 위한 향진균 김치유산균 개발

- (1) 향진균 유산균 2종 이상 분리
 - : 향진균 유산균 2종 분리함
- (2) 항 병원성 세균 유산균 1종 이상 분리
 - : 항 병원 세균 유산균 2종 분리함
- (3) 생강 보존용 유산균 배양체 생산을 위한 향진균 김치유산균의 배양조건 탐색
 - : 유기성 질소로 yeast extract를 최적으로 선정하고 투여량은 1%로 결정함
 - : 각 균주별 최적 탄소원 선정함
 - : 각 균주별 최적 배양 온도 선정 함

나. 향진균 김치유산균 배양액을 이용한 유산균 분말 생산 (300L 배양기)

(1) 선별된 김치유산균 2종 이상이 포함된 유산균 분말 생산

: 김치유산균 2종이 포함된 유산균 분말 생산함

(2) 생산된 분말의 유산균 수 1×10^{10} CFU/g 이상 유지

: 유산균 분말에 포함된 유산균이 1×10^{10} CFU/g 이상임을 공인분석으로 확인함

다. 향진균 김치유산균에 의한 생강 보존

(1) 향진균 김치유산균 분말을 이용한 생강 보존

: 영주 특용작목반 창고에서 김치유산균 분말을 이용한 생강보존 연구 실시함

(2) 향진균 유산균으로 부패 생강 10% 이상 감소

: 유산균 분말처리에 의한 부패 생강감소는 유의성 있게 관찰되지 않았음

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

가. 목표 미달성 연구 결과

항목: 향진균 유산균으로 부패 생강 10% 이상 감소

결과: 김치유산균 분말의 생강 직접 처리에 의한 생강 보존 효과 없음

나. 대책

연구 수행 과정에 대안을 모색함

대안: 김치유산균 균체 및 대사산물을 이용한 생강 보존

3-4. 관련분야 기여도

가. 향진균 효과가 있는 김치 유산균 제품 개발

나. 프로바이오틱 유산균 처리 방법의 최적화가 필요함을 나타내는 네거티브 증거 확보

다. 향진균 유산균 제품을 이용한 생강 보존법 개발

라. 유산균을 이용한 향균 소재 개발

3-5. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. 생강용 항 진균 유산균 2종 이상 선별	15	15	○ 항 진균 유산균 2종 이상 확보하고 균주 동정함
2. 생강용 항 병원성 세균 유산균 1종 이상 선별	15	15	○ 항 세균 유산균 2종 이상 확보하고 균주 동정함
3. 생강용 유산균주의 생육 조건 조사	15	15	○ 10 ⁹ CFU/ml 이상 배양되는 온도, pH 결과 도출함
4. 생강용 유산균주 배양용 질소원 조사	15	15	○ 10 ⁹ CFU/ml의 균수를 나타내는 최소 유기성 질소 및 질소량 확인함
5. 생강용 유산균 최소배지를 이용하여 유산균 상용 배양 및 동결 건조 분말 (10 ¹⁰ CFU/g) 생산	20	20	○ 균주 2종 혼합 분말을 제작함 ○ 균수 1×10 ¹⁰ CFU/g 공인성적 인증 받음
6. 항 진균 활성 김치유산균 분말의 생강저장성 개선 효과	20	0	○ 분말 상태의 유산균은 곰팡이 병 억제 효과가 관찰되지 않음 ○ 분말유산균은 생강저장성 개선효과가 미미함
합계	100점	80점	○ 유산균 개발 및 배양은 성공적으로 수행함 ○ 액체상태의 항 진균 유산균은 생강보전에 기여할 수 있으나, 분말 상태의 유산균은 효과가 미미했음

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 사업화 및 자체 기술이전

- 개발된 항진균 유산균 제품의 사업화
: 자체 기술이전을 통한 시설작물 병해 예방을 제품 생산

4-2. 타 연구에의 응용

- 김치 유산균을 이용한 발효 생강제품 생산 방안 모색

4-3. 추가 연구의 필요성

- 발효 생강 제품 개발을 위한 김치 유산균 개발
- 마이크로비움 세균에 의한 곰팡이 독성 감소 보고가 있으므로 혼합 미생물 처리에 의한 추가 연구가 필요함

붙임. 참고문헌

○ Yun Chen, Jing Wang, Nan Yang, Ziyue Wen, Xuepeng Sun, Yunrong Chai & Zhonghua Ma, Wheat microbiome bacteria can reduce virulence of a plant pathogenic fungus by altering histone acetylation, Nature Communications 9, 3429 (2018)

<별첨 1> 연구개발보고서 초록

<별첨 2> 자체평가의견서

<별첨 3> 연구성과 활용계획서

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.