

발간등록번호
11-1543000-001948-01

김치의 저장성 및 풍미 증진용 상용
김치스타터의 생산량 증가 연구
최종보고서

2017. 12. .

주관연구기관 / (주)프로바이오틱스

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “김치의 저장성 및 풍미 증진용 상용 김치스타터의 생산량 증가 연구 ”
(개발기간 : 2016. 08. 19. ~ 2017. 08. 18.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. .

주관연구기관명 : (주)프로바이오닉 (대표자) 박용하 (인)



주관연구책임자 : 김병천

연 구 원 : 송성철

연 구 원 : 이종환

연 구 원 : 정솔로몬

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

보고서 요약서

과제고유번호	116045-1	해당단계 연구기간	2016.08.19. ~2017.08.18.	단계구분	(해당단계)1/ (총단계)1
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	김치의 저장성 및 풍미 증진용 상용 김치스타터의 생산량 증가			
연구책임자	김병천	해당단계 참여 연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:47,000천원 민간:15,667천원 계:62,667천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 4명 내부: 4명 외부: 0명	총연구개발비	정부:47,000천원 민간:15,667천원 계:62,667천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)프로바이오닉 기술연구소			참여기업명: (주)프로바이오닉	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
<p>요약</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 상용 김치스타터로 사용되고 있는 유산균인 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 균의 생산량을 높일 수 있는 배양방법 및 배지 조건을 제시함 ○ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 김치스타터 분말 시제품 생산 및 배양 방법 및 조건 변경에 의한 생산성 향상을 pilot 규모의 배양에서 확인 ○ 김치스타터 분말의 첨가에 의해서 발효과정에서 김치의 균총이 큰 변화를 받지 않는다는 사실을 pyrosequencing에 의한 미생물 균총 분석으로 제시함 				보고서 면수: 83쪽	

. 국문 요약문

		코드번호	D-01			
연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연구 목표 <ul style="list-style-type: none"> - 김치의 저장성 및 풍미 증진을 위해 사용하는 김치스타터의 생산량 증가 - 김치스타터용 유산균의 산업화를 위해 배양과정의 유산균 생산량 증가 및 동결건조 후 생존수를 높일 수 있는 배양조건 도출 ○ 연구 내용 <ul style="list-style-type: none"> - 김치용 상용 종균의 생산성증가를 위한 기본 조사 : 김치 종균 생산용 최적 배지 성분 조사 : 동결건조 후 생존수를 높일 수 있는 배양 조건 조사 : Pyrosequencing을 이용하여 김치스타터 첨가 김치의 미생물 변화 확인 : 김치 종균의 최적 배양용 pH 최적화 (30L 이상 규모의 배양기) : 반응표면분석법을 이용한 배지 조성 최적화 - 최적 배양 조건을 이용한 김치용 상용의 생산 (700L 이상 규모의 배양기) 					
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 김치스타터 첨가 후 김치의 발효과정의 미생물 변화 추이 분석으로 김치유산균의 군집이 일정하게 유지됨을 확인 ○ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 김치스타터 균주의 생산량 증가를 위한 최적 pH 조건 선정 ○ <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 김치스타터 균주의 생산량 증가를 위한 배지 조건 선정 ○ 시험규모의 발효기에서 생산되는 <i>Leuconostoc mesenteroides</i>을 이용한 김치스타터 분말 시제품 생산 ○ 김치유산균 스타터 이용 방안 제시 					
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생산성이 증가된 배양방법에 의한 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> 김치유산균 스타터 제품 생산 ○ 김치스타터 사용에 의한 상용 김치의 저장성 연장 ○ 김치스타터 사용에 의한 저염 김치의 개발 ○ 상용 김치의 균질한 품질 유지 ○ 김치 유산균 군집 변화결과 및 김치 스타터 제품의 홍보 					
중심어 (5개 이내)	김치스타터	반응표면분석법	보존기간 연장	동결건조분말	상용 발효	

< SUMMARY >

		코드번호	D-02			
Purpose & Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Purpose <ul style="list-style-type: none"> - Increase of production of kimchi starter strain which can be used to improve the storage and flavor of kimchi - Increase of cell number in the batch culture of lactic acid bacteria for production of kimchi starter ○ Contents <ul style="list-style-type: none"> - Basic investigation to improve the productivity of commercial species for kimchi <ul style="list-style-type: none"> : Investigation of optimum media components for the production of kimchi species : Survey of culture conditions that can increase viable cell count after lyophilization : Pyrosequencing analysis for the confirmation of the change of the microorganism of starter-added kimchi : Optimization of optimum pH for culture of Kimchi species (incubator with a size of 30L or more) : Optimization of media composition using RSM - Commercial production of kimchi using optimal culture conditions (incubator with a size of 700L or more) 					
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ After the addition of kimchi starter, it was confirmed that the microbiota in Kimchi was kept constant during fermentation process of kimchi ○ Selection of optimum pH conditions for increasing production of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ○ Specification of the medium composition to increase the production of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ○ Production of kimchi starter powder type using pilot fermentor 					
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Production of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> kimchi lactic acid bacteria starter by an improved culture method ○ Extend the storage capacity of commercial kimchi by using the starter ○ Development of low-salt Kimchi by using kimchi starter ○ Maintain homogeneous quality of marketed Kimchi products 					
Keywords	Kimchi starter	RSM	Increment of shelf life	Freeze-dried powder	Commercial fermentation	

< Contents >

1. Outline of research and development project	1
2. Technology development status in domestic and overseas	8
3. Research contents and results	11
4. Achievement of project goal and contribution to related field	80
5. Plan to use research results	81
6. Overseas science and technology information collected during the research proces	81
7. Security rating of R & D achievement	81
8. Research facilities registered in the National Science and Technology Comprehensive Information System	81
9. Implementation of safety measures in laboratories	82
10. Representative Research Results of R & D Project	82
11. Others	82
12. References	83

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	8
3. 연구수행 내용 및 결과	11
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	80
5. 연구결과의 활용계획 등	81
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	81
7. 연구개발성과의 보안등급	81
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	81
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	82
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	82
11. 기타사항	82
12. 참고문헌	83

〈별첨〉 김치 미생물 균집 분석보고서

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

- 김치 저장성 및 풍미 증진용 김치스타터의 상용 생산을 위한 최적 발효 조건 및 배지 조건 도출
- 김치의 저장성 및 풍미 증가를 위해 개발된 유산균의 산업화를 위한 최적 pH 및 발효 조건에서 김치 종균의 시험 생산

1-2. 연구개발의 필요성

<연구개발 대상 및 기술·제품의 개요>

- 연구개발 개요: 김치 생산용 상용 스타터로 사용하는 유산균의 배양조건 최적화를 위한 조건 검색
- 제품 개념: 상용 김치의 보존성 및 풍미 증진용 김치스타터

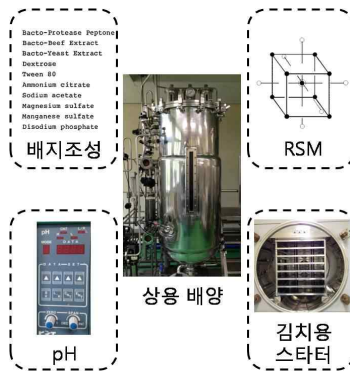
< 상용 김치스타터 Pro-01의 제품 라벨 >

김치스타터 Pro-01
 ● 영업허가번호: 대전유성제82호
 ● 식품의유형: 기타가공품
 ● 제품명: 김치스타터 Pro-01
 ● 원재료명및함량: 혼합유산균분말, 포도당
 ● 내용량: 1kg
 ● 제조번호(Lot No.): P20150202Pro1
 ● 유통기한: 2016. 02. 01까지
 ● 유통 및 보관상 주의사항: 냉장보관
 ● 업소명 및 소재지: (주)프로바이오닉
 대전광역시 유성구 테크노2로 125-11
 ● 포장재질: PE
 분청, 불량식품은 국번없이 1399

○ 연구 개념:

- 김치용 스타터의 배양 최적 pH
- 김치용 스타터의 생산을 위한 상용 배지의 경제성을 높이기 위한 최적 배지 성분 선정
- 동결건조 과정에서 김치 종균의 생존률 증가를 위한 배양특성 선정
- 상용 배지의 각 성분의 최적 첨가 농도 결정

<김치용 스타터 제품 생산 개념도>



○ 연구개발 대상의 ‘용도’ 및 ‘적용 분야’

- 김치용 스타터의 원료의 단가를 낮추고 생산량을 높여서 김치스타터의 대중화 및 김치 품질의 안정화에 기여
- 동 종의 유산균을 이용하여 개발할 수 있는 종균 개발에 기여

1-3. 연구개발의 중요성

- 김치는 전 세계 어느 발효식품과 견주어도 손색이 없는 대한민국의 전통 발효 식품임
- 김치에는 수 백여 종의 유산균이 발효에 관여함
- 김치 맛의 일정한 유지 및 품질 향상을 위해 김치스타터의 사용이 필요함
- 개발된 종균을 사용하여 제작된 김치는 풍미가 증가하고, 김치 냉장고가 아닌 일반 냉장고, 보존온도 4℃에서도 김치의 맛을 장기간 유지 할 수 있음
- 개발된 김치용 종균이 김치 품질향상에 현저한 기여를 하지만, 개발된 종균은 기존의 유산균 배양 배지에서 균체의 생산량이 높지 않음
- 김치 종균 시장의 확장 및 김치 종균의 보급을 위해서 종균 배양용 배지의 최적화 연구가 필수적임
- 김치용 종균의 배양 최적화 연구는 김치 품질의 안정성에 기여할 수 있음
- 상용 김치스타터용 유산균주를 개발하고 있으며 그중 *Leuconostoc* 균주 2종을 상용으로 사용하고 있음
 - *Leuconostoc mesenteroides* Probio 67
 - *Leuconostoc citreum* Probio 68
- 상용 스타터로의 이용성이 가장 높은 완제품의 형태는 동결건조 분말 형태임
- 유산균들은 각각의 생육특성이 있어 동일한 배지를 사용한 경우에 각 균주의 생산량은 현저하게 차이가 남
 - 김치스타터용인 *Leuconostoc* 유산균 배양체 생산량은 *Lactobacillus* 균주에 비해 낮음
 - 발효기에서 회수한 균체의 수분을 제거한 wet cells에도 다량의 수분이 남아 있으므로 동일한 비율의 동결보호제를 첨가 한 후에도 최종 동결건조 세포 분말의 무게는 감소하게 됨

<표> 동일 발효조건에서 배양한 유산균들의 균주에 따른 균체 생산량 비교

Strains (속명 종명 균주명)	Wet cells Kg/100L	Lyophilized cells Kg/100L
<i>Lactobacillus sakei</i>	0.64	0.4
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.96	0.56
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Probio 67	0.4	0.24
<i>Leuconostoc citreum</i> Probio 68	0.4	0.24

- 동결건조 후 생균 수 감소
 - 동결건조 후 동결건조 전에 비하여 생균수가 감소함
- 김치의 보존 기한 증가 및 풍미 향상을 위한 김치스타터용 유산균주 개발 과정
 - 다양한 김치에서 유산 생산능이 있는 스타터 후보 유산균 screening
 - 김치의 맛을 증가시키는 스타터용 유산균 후보군 확보
 - 스타터용 유산균을 김치에 첨가한 후 김치의 맛과 저장성 증가 검증

- 최적의 김치 유산균의 상용 생산

○ *Leuconostoc* sp. 김치스타터 첨가 방법

- 포기김치

: 김치양념에 유산균이 10만-100만 cfu 가 되도록 첨가하여 혼합함

(예: 배추김치양념 1톤 당 김치유산균 1-3 kg)

- 기타 김치 (동치미, 갓김치, 파김치, 오이지 등)

: 원료 1톤당 (동치미의 경우 무와 물의 무게를 합한 양) 에 들어가는 분량의 양념에 김치 유산균 스타터 1-2 kg을 넣어 잘 혼합하여 사용

○ 김치스타터 균주 사용 효과

- 계절별, 제조자별, 생산공장별 제품의 맛과 품질을 표준화할 수 있음

- 가식기간 (유통기간)을 김치스타터 사용 전 대비 최소 1주일이상 연장 할 수 있음

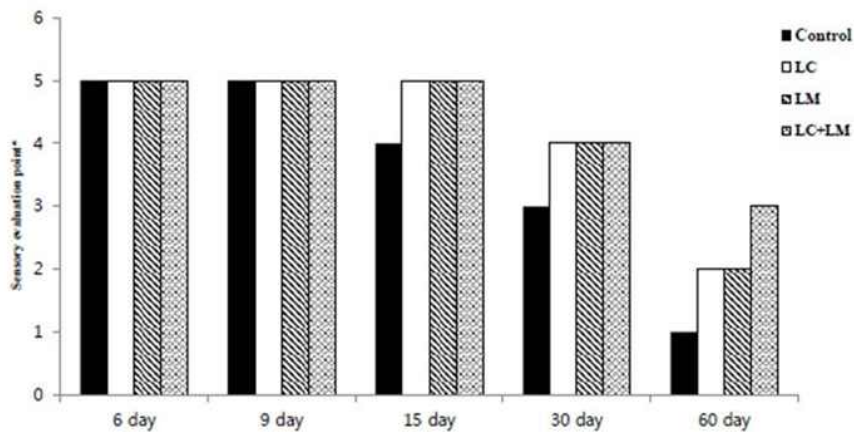
- 제품 내 유해한 병원균을 조기에 제거할 수 있음

○ *Leuconostoc* sp. 김치스타터 사용에 의한 김치 관능 변화

- *Leuconostoc mesenteroides* and/or *Leuconostoc citreum*

LM; *Leuconostoc mesenteroides* Probio 67

LC; *Leuconostoc citreum* Probio 68

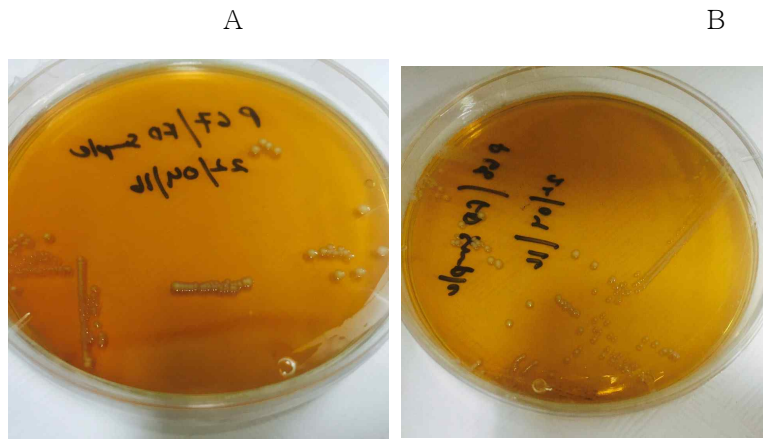


*A scoring method that employed a 5 point scale with odors being ranked as one of the following: very bad (1 point), slightly bad (2 points), common (3 points), good (4 points), and very good (5 points).

<그림> 김치스타터용 균주 Probio 67 (A)과 균주 Probio 68 (B)첨가에 의한 관능 변화

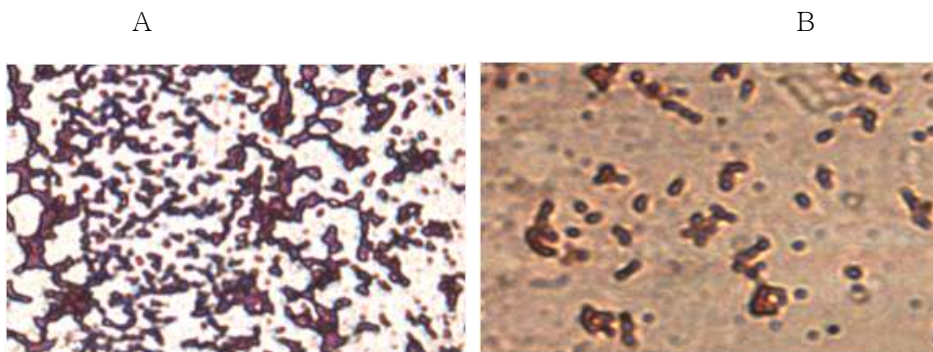
○ 김치스타터용 균주의 특성

- 김치의 숙성 과정에서 *E.coli*, *Salmonella* 등의 병원성 균의 생육을 억제하였음
- 한천평판배지에서 코로니의 형태



<그림> 김치스타터용 균주 Probio 67 (A)과 균주 Probio 68 (B)의 코로니 형태

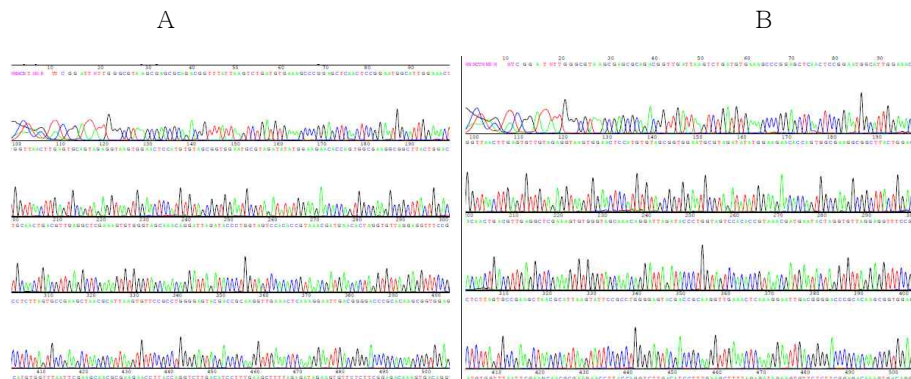
- 그람염색 후 관찰되는 세포 형태



<그림> 김치스타터용 균주 Probio 67 (A)과 균주 Probio 68 (B)의 세포 형태

○ 김치스타터인 *Leuconostoc* spp. 균주의 16S rRNA sequence 분석

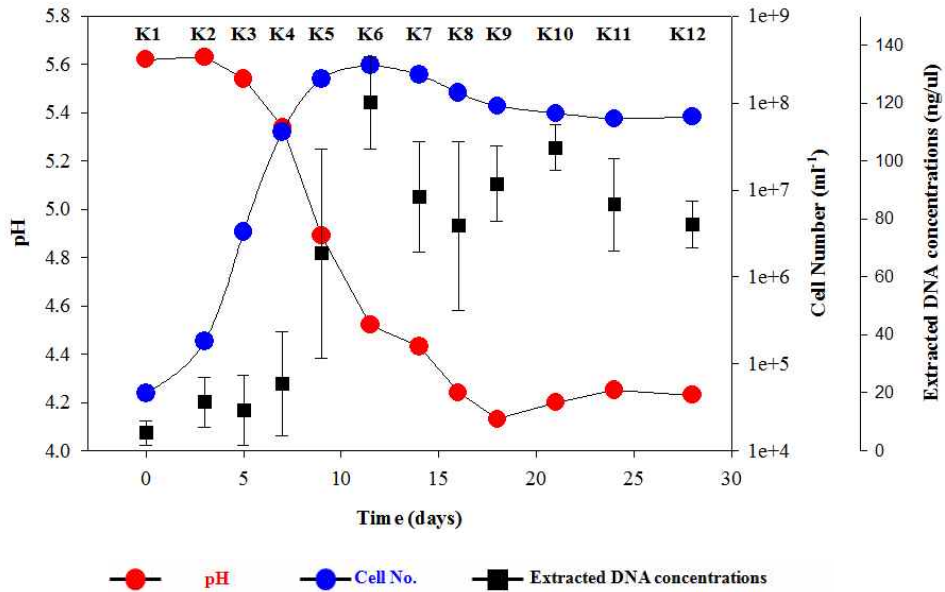
- 김치스타터 균주의 유전자 서열 분석
- 김치스타터 균주의 계통학적 분석



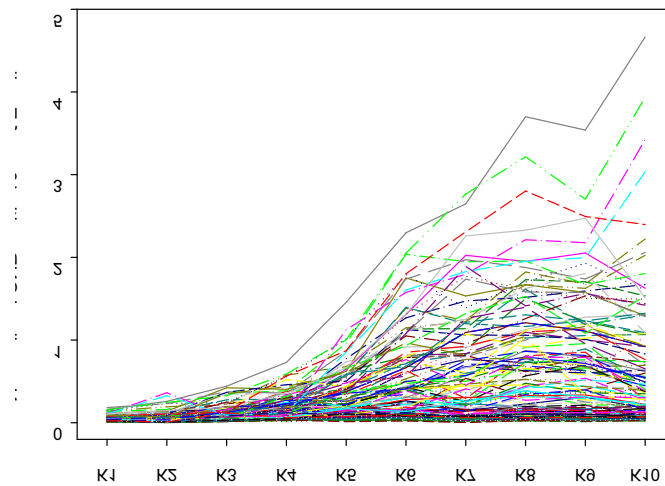
<그림> 김치스타터용 균주 Probio 67 (A)과 균주 Probio 68 (B)의 16S rRNA sequence chromatogram

○ 김치 내 유산균의 변이 연구

- 김치내에 존재하는 유산균의 변이를 유전자를 이용하여 분석하는 연구를 수행함
- 시판되는 P사의 김치의 저장기간 동안 변이 측정



<그림> 김치 발효과정의 미생물 변화

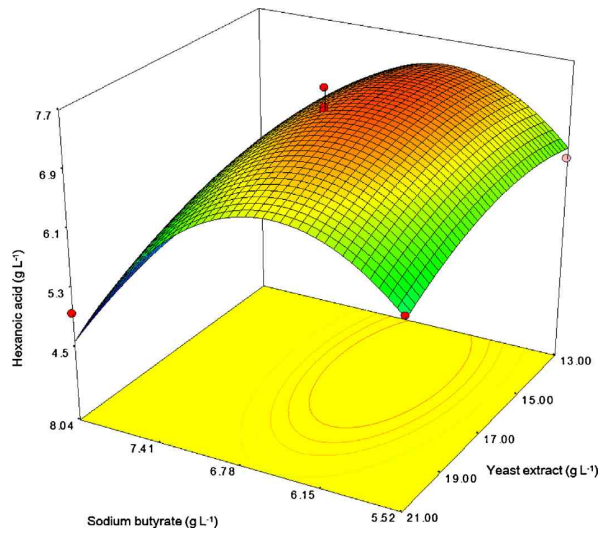


<그림> 김치 발효 과정에서의 유산균의 균집 변화

○ 반응표면분석법을 이용한 배양 배지양의 최적화

- 절대 혐기성 균주이며 유기산을 생산할 수 있는 미생물의 배지 최적화 연구를 수행하여 국제저명학술지에 투고함
- Fractional factorial experimental design를 이용한 배지성분 최적화 연구

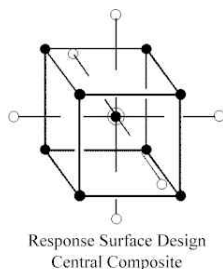
- Box-Behnken experimental design를 이용한 배지성분 최적화 연구



<그림> Predicted model: 3D contour plot showing the effect of the amounts of yeast extract and sodium butyrate on the response of hexanoic acid by *Clostridium* sp. BS-1.

1-3. 연구개발 범위

- 김치용 스타터 사용 후 균총의 변화를 pyrosequencing을 이용한 추적
 - 김치스타터 사용 전 후의 균총 변화를 확인
- 동결건조 분말의 생균활성 확인
 - 김치스타터용 균주를 salt stress 환경에서 배양한 경우, 분말의 생균 활성 조사 확인
- 동결건조 분말의 생존률 향상 방안 모색
 - 김치스타터용 유산균이 고 삼투압 조건에서 배양하였을 경우 생존률 증감 측정
 - 동결건조시 NaCl 첨가에 의한 동결 건조 분말의 생존성 확인
- 김치생산용 상용 종균의 salt resistance 조사
 - 삼투압 저항성을 높이는 최적 salt 농도 결정
 - 분말 형태의 동결건조 김치스타터 분말내의 유산균 생존율 변화 확인
- 김치생산용 상용 종균 1종 이상에 대한 발효용 최적 pH 조사
 - 배양도중 NaOH 혹은 ammonia를 이용하여 pH 조절
 - 30L 이상 규모의 발효기를 이용한 pH 값 도출
- 기존 유산균 배양용 배지의 성분을 기반으로 하여 필수 배지 성분 조사
 - 포도당, 설탕, 유당등 상용 최적 에너지원 선정
 - Yeast extract, soy peptone 등의 상용 질소원 선정
 - 질소원 단가 감소를 위한 탈지대두박 등의 질소원의 이용 가능성 확인
- 반응표면분석법을 이용한 배지 조성 최적화
 - 반응표면분석법을 이용하여 최적 발효 조건을 위한 인자 선정
 - 선정된 주요 성분의 최적 농도 도출 계산식 설정
 - 최적 발효용 배지 조성 최적화 농도 선정
 - 최적화된 배지를 이용한 배양



- 최적화된 배양조건에서 상용배양
 - *Leuconostoc mesenteroides* Probio 67의 상용 배양
 - 동결건조 분말 (균수 기준 10^{11} CFU/g이상) 형태의 스타터용 균주 생산
 - 700L 이상 발효기 사용, 25% 이상의 생산량 증가 달성

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 김치공장에서 김치 제품의 균질화를 위해 상용으로 사용하는 종균은 미미함
- 김치용 종균을 생산하는 유산균 스타터의 발효 및 동결건조 분말 제품 생산 회사는 몇 되지 않음
- ㈜프로바이오틱은 김치용 유산균의 개발 연구를 수년간 지속하였음
- ㈜프로바이오틱은 자체 개발 김치용 유산균을 보유하고 있음
- ㈜프로바이오틱은 자체 개발 김치스타터를 생산하여 판매 중임
- ㈜프로바이오틱은 상용 김치생산 회사인 P사의 종균을 위탁 받아 생산 중임

○ 시장현황

- 김치스타터용 종균은 일부 기업 및 대학에서 연구결과를 보고하고 있음
- 소규모 김치 공장에서는 김치스타터를 개발할 여력이 부족함
- 유산균 종균을 분말 혹은 액상형태로 공급할 수 있는 회사는 있으나 김치용 종균의 생산하는 유산균 분말 생산 기업은 없음
- 김치의 보존성 및 품질은 김치스타터의 사용으로 개선될 수 있음
- 김치의 표준화 및 균일한 품질의 유지를 위해서는 안정적인 김치용 스타터의 공급이 필요함

○ 경쟁기관현황

- 김치용 종균을 상용으로 생산하여 판매하는 국내회사로는 ㈜프로바이오틱이 유일함
- 기타 유산균 분말 원료를 생산할 수 있는 회사

CJ: 자체 김치 종균을 보유하고 있음

셀바이오텍: 유산균코팅 전문

메디오젠: 유산균 분말 생산

락토메이슨: 유산균 분말 생산

- 김치용 종균의 개발

대학교 실험실

세계김치연구소

CJ, 하선정

대상, 종가집

○ 지식재산권현황

특허검색 <http://kpat.kipris.or.kr/>

- 검색어 김치스타터: 287개의 특허가 있음
- 검색어 김치스타터 + 반응표면분석법: 관련 특허 없음
- 김치 생산용 종균에 대한 특허가 대부분임

○ 표준화현황

- 김치용 종균의 상용화가 진행 중인 시점으로 표준화는 진행되지 않고 있음
- 김치용 종균 생산의 표준화도 아직 진행 중이지 않음

○ 기타현황

- 국내의 유산균 분말을 만들 수 있는 회사의 대부분은 건강기능 식품용 유산균 분말 생산에 치중하고 있음
- 김치 발효용 스타터의 연구로 다양한 균종의 개발이 진행되고 있음

<표. 김치 발효에 효과가 있다고 보고된 스타터의 특징>

Starter cultures	Characteristics	Effects on kimchi
<i>Lh. plantarum</i> HSU015, <i>P. cerevisiae</i> HSU02, <i>Lh. brevis</i> HSU01, <i>Leu. mesenteroides</i> HSU05	Rapid fermentation	Acceleration of the fermentation process
<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> A02, <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> A18, <i>Leu. paramesenteroides</i> B30, <i>Lh. hvaricus</i> B01, <i>Lh. hamohiochii</i> B21	Psychrotrophic lactic acid bacteria	Acceleration of the fermentation process
<i>Leu. paramesenteroides</i> as an acid-resistant mutant	Acid resistance	Inhibition of <i>Lh. plantarum</i>
Mutant strain of <i>Leu. mesenteroides</i> and <i>Leu. paramesenteroides</i>	Adipic acid resistance	Delayed acidification and higher in total acceptability
<i>Leu. citreum</i> IH22	Predominant lactic acid bacteria involved in kimchi fermentation	Maintained kimchi quality for prolonged periods
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Production of conjugated linoleic acid (CLA)	Increased CLA contents
<i>B. longum</i> BO-11	Tolerance to acid and bile	Improvement of functionality
<i>Leu. mesenteroides</i> K2M5, <i>Lh. sakei</i> K5M3	Predominant lactic acid bacteria involved in kimchi fermentation	Maintained kimchi quality for prolonged periods
<i>Leu. citreum</i> GJ7	Production of bacteriocin	Prevented over-ripening and extended shelf-life
<i>Lh. plantarum</i> PL62	Production of conjugated linoleic acids with anticancer and anti-obesity activities	Improvement of functionality
<i>Leu. citreum</i> , <i>Lh. plantarum</i>	Predominant lactic acid bacteria involved in kimchi fermentation	Improvement of functionality
<i>Leu. mesenteroides</i> strain B1	Production of mannitol	Shortened the time to reach optimal ripened state
<i>Leu. mesenteroides</i> LK93	Resistance to acid and bile salts; antimicrobial and antifungal activities	Inhibition of the growth of film-forming yeast
<i>Lh. plantarum</i> 3099K, <i>Lh. plantarum</i> pmuK, <i>Leu. mesenteroides</i> pmuK	Antioxidant and anticancer activities	Improvement of functionality
<i>Leu. citreum</i> KACC91035	High dextransucrase activity	Improvement of isomaltooligosaccharide production

참고문헌. Lee ME, Jang JY, Lee JH, Park HW, Choi HJ, Kim TW. Starter cultures for kimchi fermentation. J Microbiol Biotechnol. 2015, 25:559-68.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 기술현황

- 김치의 종주국이 대한민국임으로 김치스타터에 대한 연구는 미진함
- 김치 생산용 종균의 연구도 미진함

○ 시장현황

- 유산균 원말을 생산할 수 있는 외국 종균 회사에서 김치용 종균을 생산 할 수 있으나 현재

생산 및 공급하는 외국 회사는 없음

- 김치의 표준화 및 균일한 품질의 유지가 가능해지면 수출에 의한 국외 시장이 확장될 것으로 사료됨
- 크리스찬한센에서는 야채 발효 스타터용 종균을 개발하였으나 상용화하지는 않고 있음

○ 경쟁기관현황

- 국외 유산균 원말 생산 기관
크리스찬한센 (치즈, 요구르트, 사료용 유산균 종균 생산)

○ 지식재산권현황

- Google patent 검색
검색어: Lactic acid bacteria starter culture, 검색결과 약 8,670개
검색어: Kimchi starter, 검색결과 약 298개
- Kimchi starter 관련 특허를 보유한 국가
중국
ex) Novel *Leuconostoc citreum* and fermented foods using the same as a starter,
and compositions thereof,
CN 102625828 B
한국

○ 표준화현황

- 김치 및 김치 종균의 표준화는 진행되지 않음

3. 연구수행 내용 및 결과

	코드번호	D-05
가. 연구내용		
(1) 김치용 스타터 사용 후 균총의 변화를 pyrosequencing을 이용한 추적		
(가) 김치 균총 변화 추적 및 김치스타터 사용에 전후의 균총 변화 비교를 위한 김치 조제		
① 김치의 미생물 균총 변화 추적에 사용된 김치의 구성 성분 결정		
㉠ 김치의 종류 결정		
: 식품으로 가장 많이 사용되고 있고, 스타터 사용이 가장 많은 배추김치		
㉡ 배추김치의 조제		
: 상용으로 제조되는 김치 중 김치스타터를 사용하지 않는 배추김치 선정		
: 김치조제 원료 - 모든 원료는 국내산을 사용함		
: 김치조제 방법 - P김치회사 공장의 배추김치 제조공정을 기준으로 함		
② 김치 유산균 첨가 시험구의 구성		
㉠ 김치 조제를 위한 염장배추, 양념은 P김치회사의 비율을 기준으로 함		
㉡ 김치스타터에 의한 효과 확인을 위해 양념의 첨가량을 변화한 저염 김치도 포함		
㉢ 김치스타터 함량에 의한 효과 관찰을 위해 스타터 첨가량을 증가한 김치 시험구도 포함 함		
③ 김치스타터 첨가에 의한 관능 변화 관찰		
㉠ 관능변화의 지표는 향(odor), 과 좋은 맛(good taste)의 변화로 측정		
㉡ 관능평가의 향과 좋은 맛의 평가는 5단계로 구분함		
최고 점: 5		
최저 점: 1		
④ 김치 숙성과정에서 김치스타터 첨가에 의한 김치의 생리적 성상 변화		
㉠ 스타터 첨가 여부에 따른 가스 생성량의 변화		
: 조제한 김치를 식품포장용 비닐 봉투에 넣음		
: 비닐 봉투를 밀봉시킴		
: 밀봉된 비닐이 팽창한 정도를 정성적으로 측정		
㉡ 김치 숙성과정에서 스타터 첨가 여부에 따른 김치 pH 변화		
: 발효일자 별로 김치 시료를 채취하여 시료의 액상 부분의 pH를 pH meter를 이용하여 측정		

- ㉔ 김치 숙성과정에서 스타터 첨가 여부에 따른 생균수의 변화
 - : 김치 숙성과정에서 변화하는 생균수의 증가를 측정하기 위하여 유산균 생육용 MRS 한천 평판 배지를 준비
 - : 각각의 김치 시료를 채취하여 액상부분을 10진 희석함
 - : 희석된 김치 시료를 적정량 취하여 한천 평판 배지에 도말
 - : 항온기에서 생육한 단세포 유래의 균락의 수를 측정하여 희석배수를 환산하여 CFU/ml로 표시함

(나) 김치 시료채취 및 DNA 추출

- ① 김치스타터용 유산균이 첨가된 김치 시료의 채취
 - ㉔ 서로 다른 구성을 가진 김치 시료 제조
 - ㉔ 임의 온도에서 제조된 김치를 보관하면서 김치 발효 진행
 - ㉔ 김치의 발효 과정에 일정 간격으로 김치 시료 채취
- ② 김치스타터용 유산균이 첨가된 김치 시료의 DNA 추출
 - : PowerSoil® DNA Isolation Kit를 이용
 - ㉔ 시료 준비
 - Add 김치 sample to PowerSoil Bead Tube
 - Add Solution C1
 - Attach to Vortex Adapter
 - Vortex 후 원심분리
 - ㉔ 세포 분해
 - Add Solution C2
 - Incubate at 4°C
 - 원심분리
 - ㉔ 추출방해물질 제거
 - Add Solution C3
 - Incubate at 4°C
 - 원심분리
 - ㉔ 컬럼에 DNA 결합
 - Add Solution C4
 - Load into Spin Filter
 - 원심분리
 - ㉔ 이물질 세척

- Wash with Solution C5
- 원심분리
- ㉞ DNA 용출
 - Elite with Solution C6
 - 원심분리
- ③ 추출된 게놈의 agarose gel 전기영동 확인
 - ㉠ Agarose gel 준비
 - Agarose를 TAE buffer에 넣고 가열하여 녹임
 - Gel tray에 combs을 장착
 - Gel 용액이 굳기 전에 gel 판에 분주
 - Gel이 굳으면 combs 제거 .
 - Gel을 electrophoresis chamber로 이동
 - TAE Buffer로 electrophoresis chamber 채우기
 - ㉡ DNA 시료 gel에 Loading
 - DNA 시료와 6X Sample Loading Buffer 혼합
 - 혼합액을 gel에 loading
 - 마카 DNA를 gel에 loading
 - ㉢ Gel Running
 - Gel을 전기영동 장치에 장착
 - 전극 연결 후 전류 스위치 켜기
 - 15-30분간 전기영동
 - 전류 스위치 끄기
 - ㉣ Gel 염색
 - Gel을 염색통으로 이동
 - DNA 염색시약 EtBr 주입
 - 염색, 25-30 분 .
 - Gel을 염색통에서 꺼내어 세척
 - Gel을 UV 형광관에 올린 후 UV에서 DNA 관찰

(다) Pyrosequencing 분석

- ① PCR amplification and Illumina sequencing
 - ㉠ PCR 증폭은 추출한 DNA의 16S rRNA gene의 V3에서 V4 영역을 증폭하는 프라이머를 이용하여 수행함

- ㉔ 세균 유전자 증폭을 위해서 341F와 805R 프라이머를 이용함
- 341F 프라이머 서열:
(5'-TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-
CCTACGGGNGGCWGCAG-3'; underlining sequence indicates the
target region primer)
 - 805R 프라이머 서열:
(5'-GTCTCGTGGGCTCGG-AGATGTGTATAAGAGACAG-
GACTACHVGGGTATCTAATCC-3').
- ㉕ 증폭은 다음의 조건에서 진행함
- 1 step, 1 cycle
initial denaturation at 95 °C for 3min
 - 2 step, 25 cycle
denaturation at 95 °C for 30 sec
primer annealing at 55 °C for 30 sec
extension at 72 °C for 30 sec
 - 3 step, 1 cycle
a final elongation at 72 °C for 5 min.
- ㉖ Illumina NexTera barcode를 붙이기 위한 두 번째 증폭:
- i5 forward primer:
(5'-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-XXXXXXXX-
TCGTCGGCAGCGTC-3'; X indicates the barcode region)
 - i7 reverse primer:
(5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT
-XXXXXXXX-AGTCTCGTGGGCTCGG-3').
- ㉗ 두 번째 증폭조건
: 첫 번째 증폭조건과 동일하고 증폭 cycle의 수만 8회로 설정함
- ㉘ PCR 산물의 확인 ㉘ 두 번째 증폭조건
: 2% agarose gel electrophoresis
: Gel Doc system (BioRad, Hercules, CA, USA)에서 육안 확인
- ㉙ PCR 산물의 정제
: QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제함
- ㉚ Short fragments (non-target products)의 제거

: 동일한 농도의 정제된 PCR 산물을 모은 후 short fragments는 Ampure beads kit (Agencourt Bioscience, MA, USA)를 사용하여 제거함

㉔ Quality 및 증폭산물 크기 분석

: The quality and product size were assessed on a Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) using a DNA 7500 chip.

㉕ 혼합한 amplicons을 모은 후 sequencing은 친랩에서 Illumina MiSeq Sequencing system (Illumina, USA)을 이용하여 수행함

② 16S 서열 분석: Miseq pipeline Method

㉔ Raw reads의 처리는 Quality 검사를 수행함.

㉕ Low quality (<Q25) reads의 trimmomatic 0.321로 filtering 함

㉖ QC 통화 후, paired-end sequence data는 PandaSeq2를 이용하여 병합함

㉗ 상동성 cut off 0.8을 기준으로 ChunLab's in-house program으로 프라이머를 잘라냄

㉘ 서열을 병합하고, 서열상의 최고 2개의 차이만을 허용하는 유일한 서열들을 추출하는 Mothur's3 pre-clustering program으로 sequence의 noise를 제거함.

㉙ EzTaxon database에서 BLAST 2.2.224를 이용하여 분류학적 분류를 수행함. Pairwise alignment5를 이용하여 similarity를 계산함

㉚ EzTaxon의 Uchime6와 non-chimeric 16S rRNA database를 이용하여 similarity rate에서 97%이하를 나타내는 reads에 포함된 chimera를 검출함

㉛ 정리된 서열정보는 CD-Hit7 과 ULCLUST8를 이용하여 cluster화하고, alpha diversity analysis를 수행 함

(2) 동결건조 분말의 생균활성 확인

(가) 김치스타터용 균주를 기존 환경에서 배양한 경우, 동결건조 분말의 생산량

① 김치스타터용 유산균의 배양

㉔ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지 성분

: 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함

[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

② 김치스타터 유산균의 접종 및 배양

㉠ 종균배양

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

㉡ 본배양

: 배양된 종균이 1%되게 본 배양용 배지에 250L에 접종

: 발효조 배양 30℃

③ 김치스타터용 유산균의 회수

㉠ 원심분리기를 이용한 균체 회수

④ 김치스타터용 유산균의 동결건조

㉠ 회수된 유산균 균체와 동결보호제 혼합

㉡ 동결건조기를 이용한 균체 동결건조

④ 김치스타터용 유산균의 생균수 확인

㉠ 회수한 동결건조 분말의 무게 확인

㉡ 분말을 10진 희석하여 희석한 시료를 MRS 한천 평판 배지에 도말

㉢ 균체가 도말된 한천 평판배지를 30℃ 항온기에서 24시간 배양

㉣ 생균수 세균 집락의 수 측정

(나) 김치스타터용 균주를 salt stress 환경에서 배양한 후 생균 활성을 조사

① 김치스타터용 유산균의 배양

㉠ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지 성분

: 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함

② 김치스타터 유산균의 접종 및 배양

㉠ 종균배양

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

㉡ 본배양

: 본 배양용 배지는 NaCl을 2% 첨가하여 조제

: 배양된 종균이 1%되게 본 배양용 배지에 250L에 접종

: 발효조 배양 30℃

③ 김치스타터용 유산균의 회수

㉠ 원심분리기를 이용한 균체 회수

④ 김치스타터용 유산균의 동결건조

㉠ 회수된 유산균 균체와 동결보호제 혼합

㉡ 동결건조기를 이용한 균체 동결건조

④ 김치스타터용 유산균의 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℃ 항온기에서 24시간 배양

㉦ 생균수 세균 집락의 수 측정

(다) 김치스타터용 균주 *Leuconostoc mesenteroides*를 salt stress 환경에서 배양한 후 동결건조 분말의 오염 여부 확인

① 오염 확인 Q.C 방법

㉠ 오염균 생육 확인용 선택 배지 조제

㉡ 멸균된 9ml 희석수에 시료 1ml(분말인 경우 1g)를 넣어 현탁

㉢ 멸균된 9ml 희석수에 ㉡의 희석액 1ml를 순차적으로 희석

㉣ ㉡의 희석액 1ml을 petri dish에 분주한 후 오염검사용 배지를 혼합

㉤ 배양온도 및 시간

PCA, EMB: 35~37℃에서 24~72시간 배양한다.

PDA: 25℃에서 5일간 배양한다.

㉥ 배양과정에 오염균 생육 여부 확인

㉦ 생균수 세균 집락의 수 측정

(3) 김치생산용 상용 종균의 salt resistance 조사

(가) 김치스타터 유산균 배양을 위한 액체 및 고체 배지

① 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지 조제

㉠ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지 성분

: 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함

② 김치스타터 유산균 배양용 기본 액체 배지

㉠ 포도당을 제외한 MRS 배지 성분을 측정하여 플라스크 혹은 시약병에 분주 후 용해

㉡ 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 보관 및 사용

: 냉장보관 (4℃) 상태에서 1달 이내에 사용

: 고압증기 살균이 종료된 배지는 실온까지 냉각 후 사용

③ 김치스타터 유산균 배양용 기본 고체 배지

㉠ 포도당을 제외한 MRS 배지 성분을 측정하여 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

(나) 삼투압 저항성을 높이는 최적 salt 농도 결정

① 김치스타터 유산균의 salt 저항성 확인을 위한 배지 조제

㉠ 김치스타터 유산균 배양용 기본 MRS 액체 배지에 각각 다른 농도의 NaCl이 첨가된 배지 조제

㉡ 조제한 배지 살균 후 사용

② 김치스타터 유산균의 접종 및 배양

㉠ 종균배양

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

㉡ 본배양

: 배양된 종균이 1%되게 본 배양용 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양

㉢ 김치스타터 유산균의 생육측정

: 일정 시간 간격으로 배양중인 시료를 취하여 1/10, 혹은 1/20 배 희석 후 OD600nm 값을 측정

(다) 분말 형태의 동결건조 김치스타터 분말내의 유산균 생존율 변화 확인

① 김치스타터용 유산균의 배양

㉠ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지 성분

: 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함

② 김치스타터 유산균의 접종 및 배양

㉠ 종균배양

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

㉡ NaCl 첨가 되지 않은 MRS 배지에서의 본 배양

: 배양된 종균이 1%되게 본 배양용 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양

㉢ NaCl이 첨가된 MRS 배지에서의 본배양

: 본 배양용 배지에 2%의 NaCl을 첨가 한 salt stress 배지 조제

: 배양된 종균이 1%되게 본 배양용 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양

- ③ 김치스타터용 유산균의 회수
 - ㉠ 원심분리기를 이용한 균체 회수
- ④ 김치스타터용 유산균의 동결건조
 - ㉠ 동결보호제 준비
 - ㉡ 회수된 유산균 균체와 동결보호제 혼합
 - ㉢ 동결건조기를 이용한 균체 동결건조
- ⑤ 김치스타터용 유산균의 분말의 보관 및 생균수 확인
 - ㉠ 회수한 동결건조 분말을 각각 다른 보관 온도에서 보관한 시료(-20℃, 4℃) 및 NaCl이 함유된 배지에서 생육한 동결건조 시료
 - ㉡ 분말을 10진 희석하여 희석한 시료를 MRS 한천 평판 배지에 도말
 - ㉢ 한천 평판배지를 30℃ 항온기에서 24시간 배양
 - ㉣ 생균수 세균 집락의 수 측정
- ⑥ 김치스타터용 유산균의 생육활성 측정
 - ㉠ 각각의 시료 (-20℃, 4℃, NaCl stress)의 단위 무게 당 균수 확인
 - ㉡ 분말을 10진 희석하여 MRS 액체 배지에 접종
 - ㉢ 30℃ 항온기에서 배양하면서 각 분말별 김치유산균 균수 측정

(4) 김치생산용 상용 종균 1종 이상에 대한 발효용 최적 pH 조사

(가) 배양 중 NaOH를 이용한 배양용 배지의 pH 조절

- ① 발효기를 이용한 pH 조절 조건에서 *Leuconostoc mesenteroides* 배양
 - ㉠ 발효기 준비 (7L 혹은 50L 발효기 사용, 코바이오)
 - : 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함
 - ㉡ 사용배지 MRS 액체 배지
 - ㉢ pH 조절용 염기: 2N NaOH

(나) pH 조절 발효기 배양에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 최적 pH 도출

- ① 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 접종 및 배양
 - ㉠ 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

- ㉔ 발효기 준비
 - : 발효기에 본 배양용 배지를 넣고 살균
 - : 2N NaOH 준비 및 발효기로 연결되는 라인 조립

- ㉕ 발효기 배양
 - : 발효기에 종균 접종 후 배양
 - : 반응기 교반속도; 50 rpm
 - : 반응기 온도; 30℃ 유지

② 김치스타터용 유산균의 생육 최적 pH 선정

- ㉔ pH 설정을 하지 않은 반응기 운전을 대조구로 운전
- ㉕ pH 조절 반응기의 pH 설정 값
 - : pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0

③ 김치스타터용 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 확인

- ㉔ 생육을 OD 값으로 측정
- ㉕ NaOH 소모량 측정
- ㉖ 반응기의 pH 유지 상태 측정

(5) 기존 유산균 배양용 배지의 성분을 기반으로 하여 필수 배지 성분 조사

(가) 포도당, 설탕, 유당등 상용 최적 에너지원 선정

- ① 김치스타터용 유산균 배양용 기본 배지를 이용하여 탄소원이 상이한 배지 조제
 - ㉔ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지 성분
 - : 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함
 - ㉕ 김치스타터 유산균 배양용 탄소원
 - : Glucose, Sucrose, Maltose, Fructose, Fructo oligosaccharide (FO)
 - ㉖ 배지 조제 MRS 배지의 성분에 Dextrose와 동일한 함량으로 다른 탄소원이 함유된 배지 조제
 - ㉗ 종균배양
 - : 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양
 - ㉘ 본 배양
 - : 배양된 종균이 1%되게 본 배양용 배지에 접종
 - : 항온기 (30℃)에서 배양

② *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 배양 과정중의 생육 및 pH 측정

- ㉔ 김치 유산균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값으로 측정
- ㉕ 배양액의 pH를 pH meter를 이용하여 측정

(나) Yeast extract, soy peptone 등의 상용 질소원 선정

- ① 김치스타터용 유산균 배양용 기본 배지를 이용하여 질소원의 농도가 상이한 배지 조제
 - ㉔ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지 성분
 - : 유산균 배양용 기본배지의 성분은 MRS 배지를 이용함
 - ㉕ 김치스타터 유산균 배양용 질소원
 - : Yeast extract, soy peptone, ammonium sulfate
 - ㉖ Yeast extract의 함량이 다른 배지
 - : MRS 배지의 성분에 yeast extract의 양이 상이한 배지조제
 - ㉗ Soy peptone의 함량이 다른 배지
 - : MRS 배지의 성분에 soy peptone의 양이 상이한 배지조제
- ② 질소원 확인용 반응기 운전
 - ㉔ 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 접종 및 배양
 - : 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 16~18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양
 - ㉕ 발효기 접종용 종균배양
 - : 배양된 종균이 1%되게 발효기 접종용 MRS 액체 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양 16~18시간
 - ㉖ 발효기 준비
 - : 발효기에 본 배양용 배지를 넣고 살균
 - : pH 조절용 NaOH 준비 및 발효기로 연결되는 라인 조립
 - ㉗ 발효기 배양
 - : 발효기에 종균 접종 후 배양
 - : 반응기 교반속도; 50 rpm
 - : 반응기 온도; 30℃ 유지
 - : 대조구
 - MRS 배지와 동일한 yeast extract, soy peptone, ammonium sulfate
- ③ *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 배양과정중의 생육 및 pH 측정

- ㉞ 김치 유산균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값으로 측정
- ㉟ 배양액의 pH를 pH meter를 이용하여 측정

(다) 질소원 단가 감소를 위한 탈지대두박 등의 질소원의 이용 가능성 확인

- ① 탈지대두박 함유 배지의 조제
 - ㉞ 탈지대두박을 soy peptone 대신으로 첨가한 배지 조제
 - ㉟ 유산균 배양용 기본 배지 성분인 MRS의 기타 성분은 동일하게 사용
 - ㊱ 김치유산균 접종 후 생육 관찰
- ② 탈지대두박의 알카리 분해물이 함유된 배지의 조제
 - ㉞ 탈지대두박의 알카리 분해: 탈지대두박에 NaOH 용액과 혼합 후 boiling
 - ㉟ 알카리 분해 탈지대두박을 soy peptone 대신으로 MRS 배지 투입하여 배지 조제
 - ㊱ 김치유산균 접종 후 생육 관찰
- ③ 탈지대두박의 알카리 처리 후 중화
 - ㉞ 탈지대두박의 알카리 분해 후 중화시키기 위해 산을 첨가함

(6) 반응표면분석법을 이용한 배지 조성 최적화

(가) 반응표면분석법을 이용하여 최적 발효 조건을 위한 인자 선정

- ① MRS 기본배지에서 발효 조건 최적화용 인자 선정
 - ㉞ 기본배지 성분의 단가 분석
- ② 선정된 배지 성분 변경된 MRS 배지를 이용한 발효기 배양
 - ㉞ 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 접종 및 배양
 - : 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 16~18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양
 - ㉟ 발효기 접종용 종균배양
 - : 배양된 종균이 1%되게 발효기 접종용 MRS 액체 배지에 접종 후 30℃ 배양실에서 정치 배양 16~18시간
 - ㊱ 발효기 준비
 - : 발효기에 본배양용 배지를 넣고 살균
 - : pH 조절용 NaOH 준비 및 발효기로 연결되는 라인 조립
 - ㊲ 발효기 배양

- : 발효기에 종균 접종 후 배양
- : 반응기 교반속도; 50 rpm
- : 반응기 온도; 30℃ 유지
- : 대조구 - yeast extract, soy peptone, ammonium sulfate의 양이 MRS 배지와 동일한 배양

- ㉞ Leuconostoc mesenteroides 김치 유산균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값으로 측정
- ㉞ 배양액의 pH 조정을 위해 소비한 NaOH 투입량 측정

(나) Fractional factorial experimental design

- ① 최적 발효 조건을 위한 인자 선정에서 조절인자 4개 선정
 - ㉞ 질소원으로 사용한 yeast extract, soy peptone, ammonium sulfate 및 기타 배지 성분중 함유량이 많은 성분의 김치유산균 생육에 미치는 효과를 반응기배양으로 확인
- ② Design-Expert 프로그램을 이용한 결과 분석
- ③ 2-Level factorial design에 의거하여 4개의 선택한 배지 성분에 대하여 24개의 시험구 구성
- ④ 구성된 24개의 시험구의 조성에 따른 MRS 배지를 이용한 *Leuconostoc mesenteroides* 발효기 배양

(다) Steepest ascent experimental design

- ① SAM 시험구 구성을 위한 FFD 결과 분석
 - ㉞ Design-Expert 프로그램에 FFD의 결과를 입력
 - ㉞ Design-Expert에서 Two-level factorial screening designs 결과를 바탕으로 model의 significant 분석
- ② Design-Expert에서 SAM 시험구 구성을 위한 배지조성 결정
 - ㉞ Two-level factorial screening 분석의 유효성 검사
 - ㉞ Steepest ascent experimental design 분석을 선택한 요소의 증가계수
- ③ SAM 시험구 확인용 반응기 운전
 - ㉞ 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 접종 및 배양
 - : 동결 보존 상태의 균주 stock을 deep freezer에서 꺼내어 MRS 액체 배지에 접종하여 16~18시간, 30℃ 배양실에서 정치 배양
 - ㉞ 발효기 접종용 종균배양

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

㉔ 발효기 준비

: 발효기에 본 배양용 배지를 넣고 살균
: pH 조절용 NaOH 준비 및 발효기로 연결되는 라인 조립
: 3개의 발효기를 동시에 동일한 조건으로 운전

㉕ 발효기 배양

: 발효기에 종균 접종 후 배양
: 반응기 교반속도; 50 rpm
: 반응기 온도; 30℃ 유지

㉖ *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 생육을 spectrophotometer를 이용하여 600nm 파장에서 OD 값으로 측정

㉗ 배양액의 pH 조절을 위해 소비한 NaOH 투입량 측정

㉘ 배양액에 포함된 생균수 측정

㉙ 배양액을 원심분리하여 상층액을 제거하고 남은 cell pellet의 무게 측정

(7) 최적화된 배양조건에서 *Leuconostoc mesenteroides* 균주의 상용배양

(가) *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 종균 활성화

① 1차 균주 활성화 (1차 종균)

㉚ -70℃ 보관중인 *Leuconostoc mesenteroides* stock을 MRS broth에 접종
㉛ 배양기(30℃)에서 배양.

② 2차 균주 활성화 (2차 종균)

㉜ 1차 종균을 MRS broth에 접종
㉝ 배양기(30℃)에서 배양.

③ 3차 균주 활성화 (3차 종균)

㉞ 2차 종균을 pilot 배양용 MRS broth에 접종
㉟ 배양기(30℃)에서 배양.

(나) *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 발효

① 발효조 설비 가동 및 점검

㉠ 발효조 system 가동 및 roter 정상 가동 확인
㉡ Air compressor 가동 및 air 공급 확인
㉢ Steam generator 가동 및 steam 공급 확인

② 배지혼합 공정

- ㉠ 발효조에 일정의 물을 받아놓고 배지 투입
- ㉡ Working volume 확인 (총 vol. - 3차 종균 vol. - Glucose vol.)
- ㉢ 발효조 조작
 - 교반기 속도: 60rpm (자동 방식)
- ③ 배지멸균
 - ㉠ 발효조 조작
 - 압력 : 1.4g/cm³(자동 방식) / 배양 온도: 30℃(자동 방식)
 - 멸균온도 : 121℃ , 멸균시간 : 15min / air 볼륨 조절 : 50L/min
 - medium sterilization → Heat start 작동
 - ㉡ 중간점검
 - : 수시로 기기정상가동 확인 등 점검 실시 (온도)
 - ㉢ 공기 여과장치 멸균
 - : 멸균온도가 121℃가 되면 공기 여과장치 밸브를 개방
 - 스팀주입시간 : 3~5분
 - ㉣ 중간점검
 - : 수시로 기기정상가동 확인 등 점검 실시 (온도, 양압 유지 확인)
- ④ 본배양
 - ㉠ 발효조 온도 확인
 - : 배양온도 30 ± 2℃ 확인
 - ㉡ 포도당 용액 및 3차 종균 주 발효기로 이송
 - : 접종부위 화염살균 하에 종균 접종 및 포도당 주입 진행
 - ㉢ 발효조 조작
 - 배기 밸브 닫기
 - 발효조압(0.5kg/cm³) 이상 확인 후 공기 공급 차단
 - 교반기 속도 : - 25rpm(자동 방식)
- ⑤ 배양 후 확인
 - ㉠ 시료 채취 라인 5분간 스팀 멸균 후 배양액 시료 채취
 - ㉡ 배양 종료 후 냉각 진행

(다) *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 농축(원심분리)

- ① 원심분리 준비
 - ㉠ 원심분리기부품 살균
 - Bowl 멸균 : 수세 세척 후, 화염멸균
 - Accessory 멸균 : 수세 세척 후 121℃, 15min 멸균
 - ㉡ 발효조 - 원심분리기 라인멸균

수세세척 후 steam 30분간 멸균

- ㉔ 원심분리기조립 및 라인 연결
원심분리기 bowl, accessory 조립
발효조 - 원심분리기 라인연결

② 원심분리기 가동

- ㉔ 원심분리기 전원 켜기
- ㉔ 원심분리기 조작
원심분리기 rpm : 14,000rpm
원심분리기 가동시간 : 5시간
원심분리기 start 버튼 클릭
- ㉔ 이송 펌프 전원 켜기
- ㉔ 이송 펌프 조작
이송 펌프 속도 : 100(150L/1hour)
- ㉔ 발효조 조작
원심분리기 14,000rpm 확인 후, 발효조 수확 밸브 개방

③ 원심분리기 가동 상태확인

- ㉔ 원심분리기 가동 초기상태 확인
배양액 유입 흐름상태 및 유산균 세포 회수 상태 확인
원심분리기 소음 확인
배양액 유입속도 확인(25~30L/10min)
- ㉔ 원심분리기 가동 중간점검
수시로 원심분리기 가동 초기상태 확인사항과 동일하게 점검

④ 원심분리기 종료

- ㉔ 발효조 내 배양액 및 배출되는 배양액 없음 확인
- ㉔ 원심분리기 조작
원심분리기 조작 종료 버튼 클릭
- ㉔ 원심분리기 해체
원심분리기 rpm : 0 확인
원심분리기 보조 부품 및 bowl 분리

(라) *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 균체 회수

① *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 균체 회수 준비

- ㉔ 유산균 균체 회수 도구준비
세포 회수용 주걱, 멸균시트지, 세포 회수 비커
- ㉔ 무균작업대 청결상태 유지

② *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 균체 회수 조작

- ㉠ 멸균 시트지를 무균작업대 작업면에 넓게 펴
- ㉡ bowl에서 분리한 시트지를 무균작업대에 올림
- ㉢ 시트지의 세포를 세군데 정도 무작위로 채취
- ㉣ 세포 harvest용 비커의 무게를 측정
- ㉤ 주걱을 사용하여 세포를 긁어 회수용 비커에 담음
- ㉥ 세포 무게를 측정

(세포 담은 5L비커 무게 - 초기 5L비커 무게)

③ 유산균 균체와 동결보호제 혼합

- ㉠ 동결보호제 준비
동결보호제 성분: 2Kg sucrose/10L 증류수
2Kg 전분/10L 증류수
- ㉡ 동결보호제 성분 준비 살균 후 4℃ 냉장 보관
- ㉢ 균체와 동결보호제 성분 혼합
균체 : 동결보호제 = 1 : 2

(마) *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 동결건조 분말 생산을 위한 예비동결

① 예비동결공정 준비

- ㉠ 동결건조판 멸균
- ㉡ 예비동결공정 도구 멸균.
스테인레스 통, 5L 비커, 600cc 분주컵, 혼합기, 주걱
- ㉢ 동결건조기 전원 켜기, 선반 온도 냉각(-40℃ 설정)
동결건조기 동결판의 냉각 온도가 -40℃ 도달하는데 소요되는 시간 고려
- ㉣ 무균작업대 청결 상태를 유지

② 예비동결 (무균조작)

- ㉠ *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 균체와 동결보호제 혼합 시료의 총 부피 확인.
- ㉡ 균체와 동결보호제 혼합 시료를 살균된 동결판에 분주
하나의 동결 판에 1,800~2,200ml의 액상 시료를 분주
- ㉢ 동결건조기 입구 열기
- ㉣ 균체와 동결보호제 혼합 시료가 분주된 동결판을 동결건조기에 투입
- ㉤ 동결건조기 샘플 온도센서를 샘플에 투입
- ㉥ 동결건조기 입구 닫기

(바) 동결건조 분말 생산을 위한 동결건조

① 동결건조기 가동

- ㉠ 냉동기 동작 : -70°C
예비동결 3시간 이상 소요 후 가동(샘플온도 확인)
- ㉡ 진공 가동 : 5mTorr
냉동기 -40°C 이하일 때, 가동 가능
- ㉢ 프로그램 가동($-40^{\circ}\text{C} \rightarrow +20^{\circ}\text{C}$)
- ② 동결건조기 가동상태 중간점검
 - ㉠ 선반온도, 냉동기온도, 샘플온도 점검
 - ㉡ 진공건조기 내부의 진공 상태 유지 점검
- (사) 동결건조 분말 생산을 위한 분쇄
 - ① 동결건조 시료의 분쇄 준비
 - ㉠ 분쇄기 준비
분쇄기를 1시간 70% 알코올에 침지시켜 살균
분쇄기를 40°C 건조기에서 건조
분쇄기 조립
분쇄기 정상가동 확인
 - ㉡ 무균작업대 청결상태 유지
 - ㉢ 분말 회수용 주걱 멸균 및 건조
 - ㉣ 원말수거용 위생용 지퍼백 준비
 - ② 동결건조 분말의 분쇄
 - ㉠ 동결건조기 확인
 - 선반온도, 샘플온도, 육안 정상 확인
 - ㉡ 동결건조기 프로그램 종료
 - 프로그램 종료 \rightarrow 진공해체 \rightarrow 냉동기 종료 \rightarrow 선반종료
 - ㉢ 동결판에서의 원말 수거
 - 주걱을 사용하여 위생용 지퍼백에 담아 입자의 크기를 축소시킴
 - ㉣ 분쇄기 가동
 - 분쇄기에 넣어 10~15초 정도 분쇄
 - ㉤ 분쇄상태 육안 확인
 - ㉥ 분쇄된 원말을 위생용 지퍼백에 담아 보관
 - ③ 분쇄된 동결건조 분말의 이물검출 준비
 - ㉠ 이물검출기(50mesh) 준비
이물검출기(50mesh)를 멸균해서 준비
이물검출기(50mesh)를 60°C 건조기에서 건조 (24시간 이상 완전 건조)
이물검출기(50mesh) 건조 상태 확인
 - ㉡ 무균작업대 청결상태 유지

- ④ 분쇄된 동결건조 분말의 이물검출
 - ㉠ 이물검출기(50mesh)에 분쇄한 원말을 넣고 이물 거르기
 - ㉡ 최종 원말 육안상태 확인
- ⑤ *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 분말 시료 수거
 - ㉠ 김치유산균 시료 수거용 스푼 살균
 - ㉡ 김치유산균 시료 수거
 - ㉢ 김치유산균 시료 냉장고에 보관
- ⑥ *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 분말 시료 균수 공인기관 분석
 - ㉠ 냉장보관중인 김치유산균 시료를 공인분석기관으로 송부
 - ㉡ 공인분석기관에서 김치유산균 분말의 균수 결과 수령

나. 연구결과

(1) 김치용 스타터 사용 후 김치 균총의 변화를 pyrosequencing 방법으로 추적

(가) 김치 균총 변화 추적을 위한 김치 조제

- ① 김치의 미생물총 변화 추적 및 김치유산균 첨가에 의한 유산균빈도 변화 비교 분석을 위해 사용된 김치의 구성 성분
 - ㉠ 김치의 재료는 모두 국내산원료를 이용함
 - ㉡ 김치의 재료의 혼합 비율은 P김치 공장에서 사용되고 있는 조성을 이용함
 - ㉢ 김치의 조제는 P김치 공장의 GMP 시설에서 P김치 공장에서 보유하고 있는 원료를 사용하여 진행함

[표] 일반 배추김치 양념 재료 및 함량

번호	재료	투여량(%)
1	무즙	13.9
2	육수(건새우, 무, 양파)	5
3	고춧가루	3.9
4	마늘	3.35
5	참쌀 풀	3.3
6	젓갈1.멸치육젓	2.8
7	젓갈2.새우젓갈	1.4
8	젓갈3.멸치액젓	0.56
9	물엿	1.66
10	양파	1.39
11	정백당	0.27
12	생강	0.167
13	절인 배추	62.303
	양념 합	37.697
	합	100

② 김치 유산균 첨가 시험구의 구성

- ㉠ 김치 조제를 위한 염장배추, 양념, 스타터의 혼합 비율은 기본 혼합비율과

고농도 혼합 비율 2가지를 선택함

- ㉠ 염분에 의한 효과확인을 위해 기본 김치 조제에 사용된 양념의 비율을 조정하여 저염 배추김치를 조제함
- ㉡ 일반 배추김치와 저염 배추김치의 원료중 염분에 가장 많이 영향을 주는 재료는 3종류의 젓갈로 사료됨
- ㉢ 일반 배추김치의 젓갈 함량은 4.76%인데 반하여 저염 배추김치의 젓갈 함량은 3.6%로 일반 배추김치는 젓갈이 1.11% 더 첨가됨
- ㉣ 스타터 첨가량에 의한 효과 확인을 위해 기준이 되는 유산균양 $6.3E+06/g$ 보다 5배 더 첨가된 저염 배추김치도 조제함

[표] 저염 배추김치 양념 재료 및 함량

번호	재료	투여량(%)
1	무즙	10.54
2	육수(건새우, 무, 양파)	3.79
3	고춧가루	2.96
4	마늘	2.54
5	참쌀 풀	2.5
6	젓갈1.멸치육젓	2.12
7	젓갈2.새우젓갈	1.06
8	젓갈3.멸치액젓	0.42
9	물엿	1.26
10	양파	1.05
11	정백당	0.2
12	생강	0.13
13	절인 배추	71.43
	양념 합	28.57
	합	100

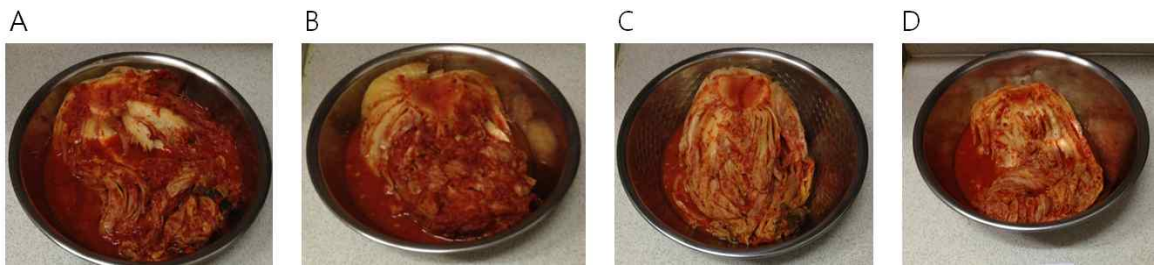
[표] 김치 재료 및 함량

김치 종류	염장배추 (Kg)	양념혼합 (Kg)	스타터 (g)	균수 (CFU/g)
A; 스타터 무첨가	5	3	0	0
B; 스타터 첨가	5	3	1	6.3E+06
C; 저염, 스타터 첨가	5	2	1	7.1E+06
D; 저염, 스타터 5X	5	2	5	3.6E+07

㉔ 원료 혼합으로 김치 조제함

: 아래 그림에 보이는 바와 같이 저염 시험구로 혼합양념의 첨가량이

기준양보다 적은 C, D 시험구의 김치에서 붉은 색이 좀 더 약하게 나타남



[그림] 시험에 사용한 김치 시료

③ 김치스타터 첨가에 의한 관능 변화 관찰

㉔ 총 15명의 일반인을 대상으로 발효과정의 김치 맛의 변화를 조사함. 발효 속도를 증가하기 위해 김치는 상온(25℃)에서 보관하면서 발효시킴

㉕ 관능평가의 항목은 김치의 향과 김치의 좋은 맛의 합으로 평가하였으며 좋은 맛은 신맛과 감칠맛을 포함시킴

㉖ 조제된 4종류의 김치의 맛 변화를 관찰함, 처음 조제 되었을 때 양념이 기준양으로 들어간 시험구인 A, B가 가장 맛이 좋았음. 이는 양념에 다량 포함된 젓갈 등의 영향으로 사료됨

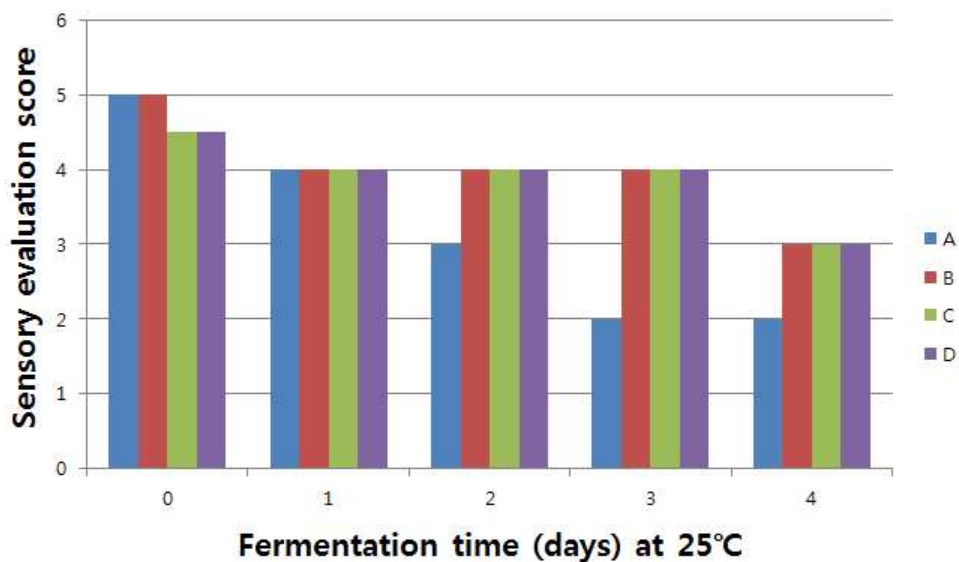
㉗ 조제된 4종류의 김치중 양념의 양이 감소된 저염 김치는 김치의 맛이 기준 시험 구에 비해 떨어짐

㉘ 김치 발효과정에서 김치 맛이 감소되었으나, 김치스타터가 첨가된 시험구의

맛의 감소가 덜함

[표] 김치스타터 첨가에 의한 시간별 맛 변화

Days	A	B	C	D
0	5	5	4.5	4.5
1	4	4	4	4
2	3	4	4	4
3	2	4	4	4
4	2	3	3	3



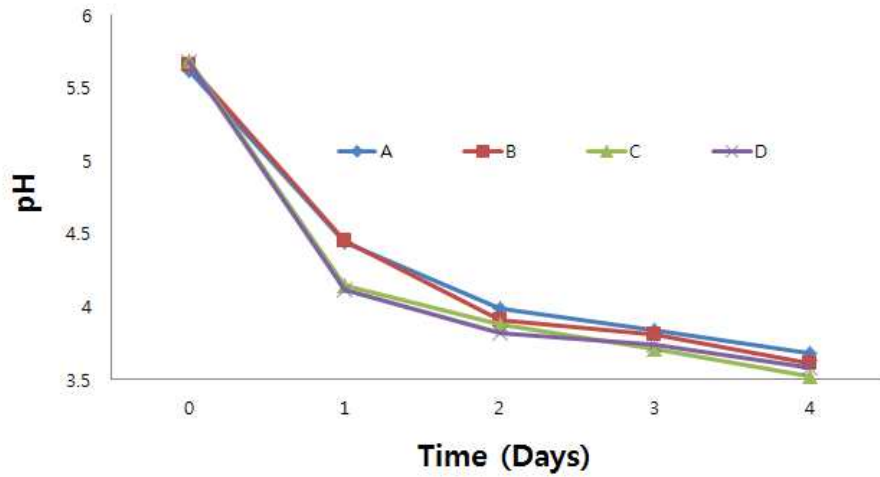
[그림] 김치스타터 첨가에 의한 시간별 맛 변화

- ④ 김치 숙성과정에서 김치스타터 첨가에 의한 김치의 생리적 성상 변화
- ㉞ 김치스타터 첨가에 의해 김치 내부의 가스 생산량의 변화가 관찰되었음
 - ㉟ 염분이 기준량 포함된 김치에서는 스타터 첨가에 의해 가스발생량의 차이가 보이지 않았으나, 저염 김치에서는 김치스타터 첨가에 의해 가스발생이 증가하였고, 김치스타터 첨가량이 많은 경우 가스발생이 더 늘어났음

[표] 김치스타터 첨가 후 김치의 가스 생성량

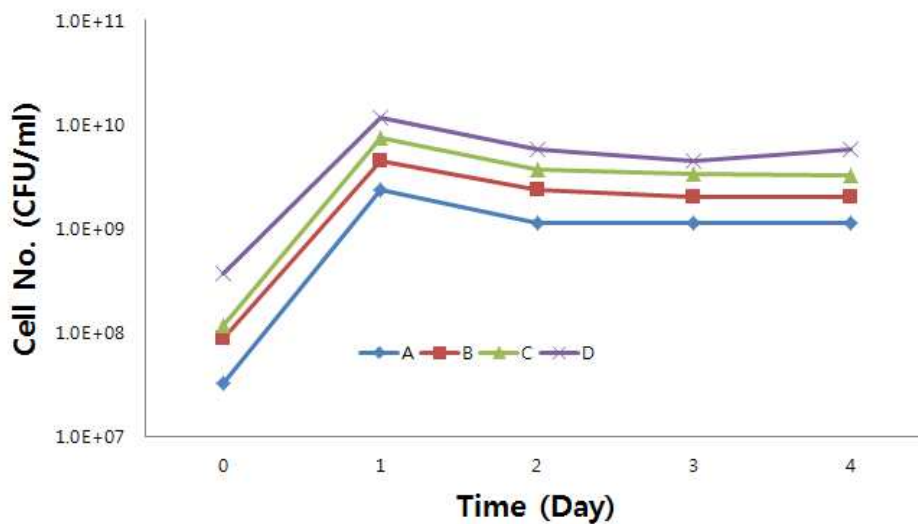
김치 실험구	A	B	C	D
가스량	+	+	+++	++++

- ㉞ 김치 숙성과정에서 스타터 첨가 여부에 따른 김치 pH 변화
 - : 김치스타터 첨가에 의해 김치 pH 변화가 일부 관찰되었음.
 - : 저염 김치에서 pH가 더 감소되었음



[그림] 김치스타터 첨가에 의한 발효과정에서 pH의 변화

- ㉞ 김치 숙성과정에서 스타터 첨가 여부에 따른 생균수의 변화
 - : 유산균 생육용 한천 평판 배지에서 생육하는 생균수를 발효기간의 경과에 따라 측정 함
 - : 시험구 모두의 생균 변화 양상은 비슷함. 유산균 첨가 시험구의 생균수가 좀 더 많았음



[그림] 김치스타터 첨가에 의한 발효과정에서 유산균 수의 변화

(나) 김치 시료채취 및 DNA 추출

- ① 김치 시료의 마이크로 비움 분석용 시료 채취
 - ㉔ 김치 시료의 마이크로비움 분석용 시료를 일정 시간 간격으로 채취함
 - : A시험구 - 기존의 방법으로 만든 김치 (무처리)
 - : B시험구 - A 시험구와 동일하나, 김치스타터가 첨가됨
 - : C시험구 - A 시험구보다 염분농도가 낮으며, 김치스타터가 첨가됨

[표] 김치발효과정의 균총 변화 추적을 위한 시료

Days	A	B	C
0	A0	B0	C0
1	A1	B1	C1
2	A2	B2	C2

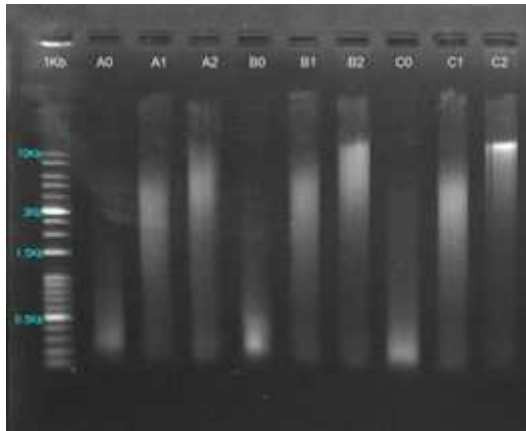
- ㉕ 마이크로비움 분석용 시료에서 추출한 DNA의 QC 결과
 - : QC 측정 결과 모든 샘플이 통과된 것을 확인 함

[표] 김치 시료에서 추출한 DNA의 QC 결과

No.	Sample Name	Concentration (ng/ul)	Volume (ul)	Total amount (ng)	A260/A280 Ratio	QC Result
1	A0	39.881	28	1116.668	1.658	Pass (degradation)
2	A1	56.818	28	1590.904	1.788	Pass
3	A2	73.259	28	2051.252	1.724	Pass
4	B0	51.036	24	1224.864	1.74	Pass
5	B1	69.107	25	1727.675	1.773	Pass
6	B2	83.438	25	2085.95	1.788	Pass
7	C0	44.611	25	1115.275	1.741	Pass
8	C1	49.75	26	1293.5	1.814	Pass
9	C2	44.551	27	1202.877	1.815	Pass

A0; 무처리 0 time, A1; 무처리 1일, A2; 무처리 2일, B0; 스타터 0 time, B1; 스타터 1일, B2; 스타터 2일, C0; 저염 0 time, C1; 저염 1일, C2; 저염 2일

- ㉖ 마이크로비움 분석용 시료에서 추출한 DNA
 - : 추출한 DNA 1ul를 1% Agarose gel(1X TAE buffer)에 loading 하고, 100V에서 25mins 전기 영동한 후 DNA의 전개 결과는 아래 그림과 같음



[그림] 김치발효과정의 균총 변화 추적을 위한 시료에서 추출된 DNA

A0; 무처리 0 time, A1; 무처리 1일, A2; 무처리 2일, B0; 스타터 0 time, B1; 스타터 1일, B2; 스타터 2일, C0; 저염 time, C1; 저염 1일, C2; 저염 2일

(다) Pyrosequencing 분석

① 시험구 김치시료에서 도출한 16S 서열 수

㉞ 3개의 김치 시료를 분석에서 500,000개의 read를 얻을 수 있었고 각각의 sample에서 100,000개 이상의 read를 획득함

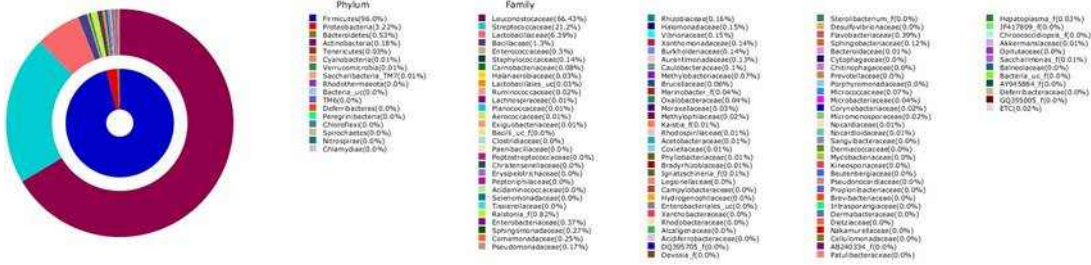
㉞ 김치 유산균 스타터를 첨가하지 않은 시험구는 김치 조제 직후 리드 수가 4394개 였으나, 발효과정에서 10 배 및 20배의 리드가 분석됨. 초기 김치시료 DNA의 단편화에 의한 영향도 있을 것으로 추론됨

[표] 김치 시료에서 미생물 군집 pyrosequencing 분석 read 수

시험구	Read	합
A0	4394	
A1	42074	
A2	77233	
A 시험구		123,701
B0	65384	
B1	94642	
B2	70146	
B 시험구		230,172
C0	44436	
C1	63372	
C2	63897	
C 시험구		171,705
Sum (Number)		525,578

② 시험구 김치의 미생물 군집간의 비교

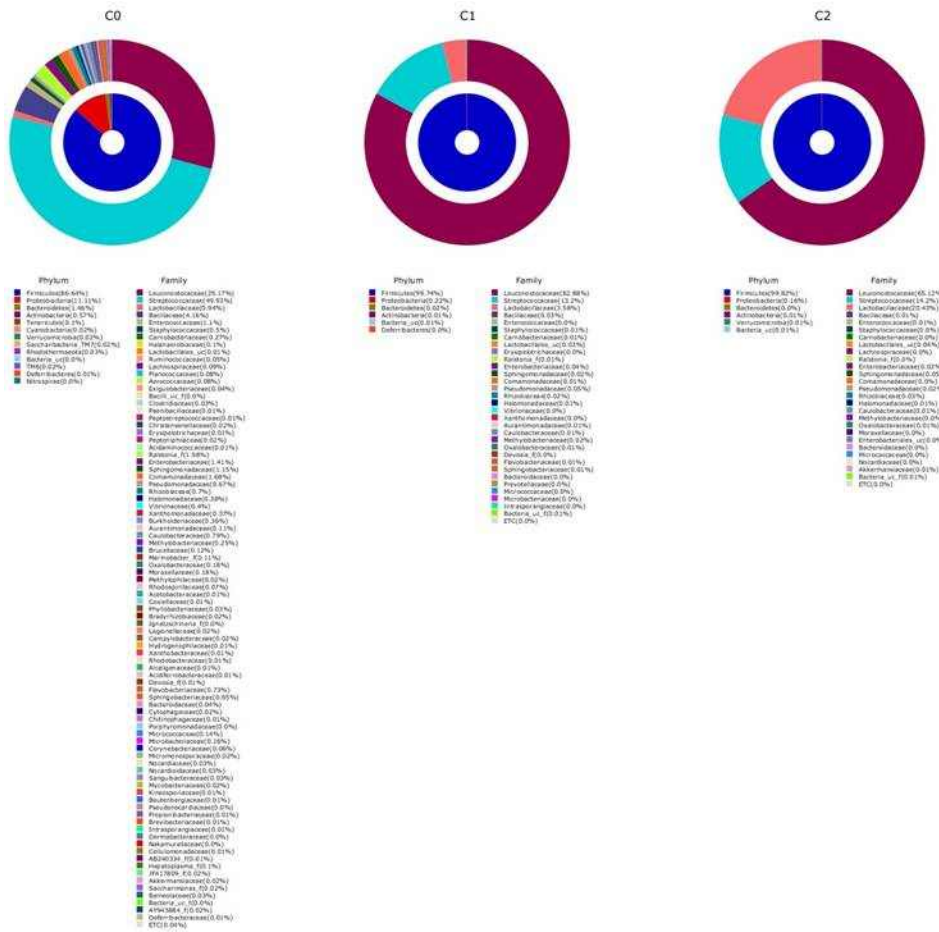
㉠ Phylum과 Family를 나타내는 Double pie 분석



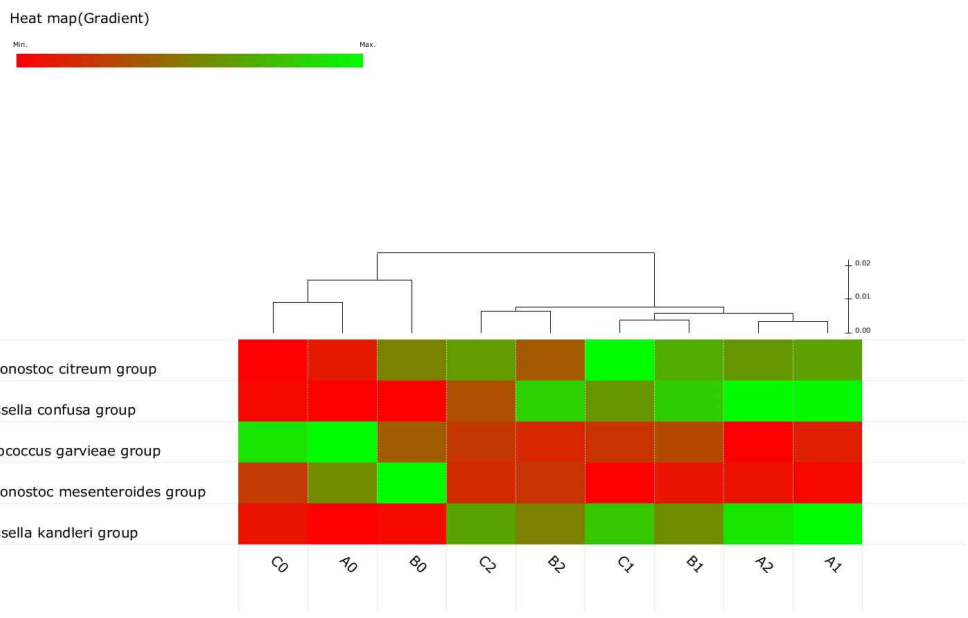
[그림] 김치발효과정의 균총 변화 Phylum과 Family를 나타내는 Double pie 분석 평균



[그림] 김치발효과정의 균총 변화 Phylum과 Family를 나타내는 Double pie 분석 시험구 A 기본 배추김치



[그림] 김치발효과정의 균총 변화 Phylum과 Family를 나타내는 Double pie 분석 시험구 C 김치스타터 함유 저염 배추김치



[그림] 김치발효과정의 균총 변화가 두드러진 대표 김치 유산균

[표] 3종류의 김치 시료에서 분석한 Phylum 수준의 read 수

No.	Phylum Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2	Sum (Number)
1	Firmicutes	4161	42001	77065	54993	94180	70051	38500	63205	63781	507937
2	Proteobacteria	194	36	132	8082	364	79	4938	142	101	14068
3	Bacteroidetes	6	16	12	1942	71	9	649	14	3	2722
4	Actinobacteria	28	9	15	245	25	0	253	6	4	585
5	Tenericutes	4	0	0	55	0	0	45	0	0	104
6	Saccharibacteria_TM7	0	0	0	22	0	0	9	0	0	31
7	Verrucomicrobia	0	9	1	10	0	0	7	0	4	31
8	Bacteria_uc	0	2	7	0	2	5	1	4	4	25
9	Cyanobacteria	1	0	1	13	0	0	9	0	0	24
10	Rhodothermaeota	0	0	0	11	0	0	12	0	0	23
11	Deferribacteres	0	0	0	0	0	2	5	1	0	8
12	TM6	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7
13	Peregrinibacteria	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6
14	Chloroflexi	0	1	0	2	0	0	0	0	0	3
15	Spirochaetes	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
16	Chlamydiae	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
17	Nitrospirae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

[표] 3종류의 김치 시료에서 분석한 Phylum 수준의 read의 구성 비율

No.	Phylum Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2	SUM
1	Firmicutes	94.69	99.82	99.78	84.10	99.51	99.86	86.64	99.73	99.81	863.987
2	Proteobacteria	4.415	0.086	0.171	12.36 1	0.385	0.113	11.11	0.224	0.158	29.024
3	Bacteroidetes	0.137	0.038	0.016	2.970	0.075	0.013	1.461	0.022	0.005	4.735
4	Actinobacteria	0.637	0.021	0.019	0.375	0.026	0.000	0.569	0.009	0.006	1.664
5	Tenericutes	0.091	0.000	0.000	0.084	0.000	0.000	0.101	0.000	0.000	0.276
6	Saccharibacteria _TM7	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.054
7	Verrucomicrobia	0.000	0.021	0.001	0.015	0.000	0.000	0.016	0.000	0.006	0.060
8	Bacteria_uc	0.000	0.005	0.009	0.000	0.002	0.007	0.002	0.006	0.006	0.038
9	Cyanobacteria	0.023	0.000	0.001	0.020	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.064
10	Rhodothermaeot a	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.044
11	Deferribacteres	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.011	0.002	0.000	0.016
12	TM6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.016
13	Peregrinibacteria	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009
14	Chloroflexi	0.000	0.002	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
15	Spirochaetes	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
16	Chlamydiae	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
17	Nitrospirae	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002

[표] 3종류의 김치 시료에서 분석한 Order 수준의 read 수

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2	Sum (Number)
1	Lactobacillales	3936	41968	77021	52743	94121	70020	36215	63181	63768	502973
2	Burkholderiales	12	12	9	4249	84	7	1872	21	11	6277
3	Bacillales	224	24	24	2035	48	28	2125	23	11	4542
4	Flavobacteriales	4	0	0	1690	60	5	324	5	0	2088
5	Rhizobiales	51	5	29	887	148	14	563	35	19	1751
6	Enterobacteriales	49	2	23	472	39	12	625	23	15	1260
7	Sphingomonadales	28	6	39	315	13	27	511	14	31	984
8	Pseudomonadales	7	2	10	473	14	9	377	33	13	938
9	Vibrionales	3	0	0	556	4	1	178	3	0	745
10	Xanthomonadales	5	2	3	502	22	0	166	3	0	703
11	Sphingobacteriales	2	5	0	219	10	1	295	4	0	536
12	Oceanospirillales	23	5	12	278	21	2	169	5	6	521
13	Caulobacteriales	1	0	7	64	2	2	349	5	5	435
14	Micrococcales	22	0	7	124	8	0	165	6	2	334
15	Clostridiales	0	4	6	87	5	3	95	0	2	202
16	Alteromonadales	3	0	0	146	0	5	47	0	0	201
17	Halanaerobiales	0	0	3	111	0	0	46	0	0	160
18	Corynebacteriales	3	0	0	67	9	0	47	0	2	128
19	Mycoplasmatales	4	0	0	55	0	0	45	0	0	104
20	Bacteroidales	0	10	12	22	1	3	19	5	3	75
21	Methylophilales	5	0	0	54	0	0	8	0	0	67
22	Rhodospirillales	2	0	0	25	3	0	37	0	0	67
23	Micromonosporales	3	4	8	31	0	0	8	0	0	54
24	Propionibacteriales	0	2	0	7	7	0	19	0	0	35
25	Saccharimonas_o	0	0	0	22	0	0	9	0	0	31
26	Legionellales	3	0	0	8	4	0	12	0	0	27
27	Bacteria_uc_o	0	2	7	0	2	5	1	4	4	25
28	Balneolales	0	0	0	11	0	0	12	0	0	23
29	Verrucomicrobiales	0	9	1	2	0	0	7	0	4	23
30	Cytophagales	0	0	0	11	0	0	11	0	0	22
31	Campylobacteriales	0	0	0	8	0	0	8	0	0	16
32	Bacilli_uc	1	1	7	0	4	0	2	0	0	15
33	JF417809_o	0	0	1	6	0	0	8	0	0	15
34	Hydrogenophilales	0	0	0	9	0	0	6	0	0	15
35	Tissierellales	0	0	0	6	0	0	7	0	0	13
36	Erysipelotrichales	0	0	2	5	2	0	3	1	0	13
37	Rhodobacteriales	0	0	0	9	0	0	3	0	0	12
38	Pseudonocardiales	0	0	0	6	1	0	2	0	0	9
39	Frankiales	0	0	0	3	0	0	5	0	0	8
40	Deferribacteriales	0	0	0	0	0	2	5	1	0	8

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2	Sum (Number)
41	Acidaminococcales	0	2	0	0	0	0	5	0	0	7
42	Babela_o	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7
43	Kineosporiales	0	3	0	1	0	0	3	0	0	7
44	Bdellovibrionales	0	0	0	1	5	0	0	0	0	6
45	DQ395705_o	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6
46	Selenomonadales	0	1	0	5	0	0	0	0	0	6
47	ASND_o	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6
48	Opitutales	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
49	Desulfovibrionales	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
50	Sterolibacterium_o	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
51	Acidiferrobacterales	0	0	0	2	0	0	3	0	0	5
52	Solirubrobacterales	0	0	0	5	0	0	0	0	0	5
53	Cellvibrionales	0	0	0	2	0	0	2	0	0	4
54	Stigonematales	0	0	0	4	0	0	0	0	0	4
55	AB240334_o	0	0	0	0	0	0	4	0	0	4
56	Myxococcales	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3
57	Betaproteobacteria_uc	0	0	0	2	0	0	0	0	1	3
58	Pedosphaera_o	0	0	0	3	0	0	0	0	0	3
59	Desulfobulbaceae_o	0	0	0	0	3	0	0	0	0	3
60	Ignatzschineria_o	2	0	0	0	0	0	1	0	0	3
61	Spirochaetales	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
62	Firmicutes_uc_o	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
63	HM996811_o	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
64	Anaerolineales	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
65	Chroococcales	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
66	JQ650114_o	0	0	0	1	0	0	1	0	0	2
67	Bradymonadales	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
68	Coriobacterales	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
69	Pleurocapsales	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
70	Nitrospirales	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
71	Veillonellales	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
72	Pasteurellales	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
73	AF269002_o	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
74	Bacteroidia_uc	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
75	Thiobacillus_o	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
76	AY234747_o	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
77	Chlamydiales	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
78	Clostridia_uc	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
79	DQ129389_o	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

[표] 3종류의 김치 시료에서 분석한 Order 수준의 read의 구성 비율

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2	SUM (Ratio)
1	Lactobacillales	89.577	99.748	99.726	80.667	99.450	99.820	81.499	99.699	99.798	849.983
2	Burkholderiales	0.273	0.029	0.012	6.499	0.089	0.010	4.213	0.033	0.017	11.174
3	Bacillales	5.098	0.057	0.031	3.112	0.051	0.040	4.782	0.036	0.017	13.225
4	Flavobacteriales	0.091	0.000	0.000	2.585	0.063	0.007	0.729	0.008	0.000	3.483
5	Rhizobiales	1.161	0.012	0.038	1.357	0.156	0.020	1.267	0.055	0.030	4.095
6	Enterobacteriales	1.115	0.005	0.030	0.722	0.041	0.017	1.407	0.036	0.023	3.396
7	Sphingomonadales	0.637	0.014	0.051	0.482	0.014	0.038	1.150	0.022	0.049	2.457
8	Pseudomonadales	0.159	0.005	0.013	0.723	0.015	0.013	0.848	0.052	0.020	1.849
9	Vibrionales	0.068	0.000	0.000	0.850	0.004	0.001	0.401	0.005	0.000	1.330
10	Xanthomonadales	0.114	0.005	0.004	0.768	0.023	0.000	0.374	0.005	0.000	1.292
11	Sphingobacteriales	0.046	0.012	0.000	0.335	0.011	0.001	0.664	0.006	0.000	1.075
12	Oceanospirillales	0.523	0.012	0.016	0.425	0.022	0.003	0.380	0.008	0.009	1.399
13	Caulobacterales	0.023	0.000	0.009	0.098	0.002	0.003	0.785	0.008	0.008	0.936
14	Micrococcales	0.501	0.000	0.009	0.190	0.008	0.000	0.371	0.009	0.003	1.092
15	Clostridiales	0.000	0.010	0.008	0.133	0.005	0.004	0.214	0.000	0.003	0.377
16	Alteromonadales	0.068	0.000	0.000	0.223	0.000	0.007	0.106	0.000	0.000	0.404
17	Halanaerobiales	0.000	0.000	0.004	0.170	0.000	0.000	0.104	0.000	0.000	0.277
18	Corynebacteriales	0.068	0.000	0.000	0.102	0.010	0.000	0.106	0.000	0.003	0.289
19	Mycoplasmatales	0.091	0.000	0.000	0.084	0.000	0.000	0.101	0.000	0.000	0.276
20	Bacteroidales	0.000	0.024	0.016	0.034	0.001	0.004	0.043	0.008	0.005	0.134
21	Methylophilales	0.114	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.214
22	Rhodospirillales	0.046	0.000	0.000	0.038	0.003	0.000	0.083	0.000	0.000	0.170
23	Micromonosporales	0.068	0.010	0.010	0.047	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.154
24	Propionibacteriales	0.000	0.005	0.000	0.011	0.007	0.000	0.043	0.000	0.000	0.066
25	Saccharimonas_o	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.054
26	Legionellales	0.068	0.000	0.000	0.012	0.004	0.000	0.027	0.000	0.000	0.112
27	Bacteria_uc_o	0.000	0.005	0.009	0.000	0.002	0.007	0.002	0.006	0.006	0.038
28	Balneolales	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000	0.044
29	Verrucomicrobiales	0.000	0.021	0.001	0.003	0.000	0.000	0.016	0.000	0.006	0.048
30	Cytophagales	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.042
31	Campylobacterales	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.030
32	Bacilli_uc	0.023	0.002	0.009	0.000	0.004	0.000	0.005	0.000	0.000	0.043
33	JF417809_o	0.000	0.000	0.001	0.009	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000	0.028
34	Hydrogenophilales	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.027
35	Tissierellales	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.025
36	Erysipelotrichales	0.000	0.000	0.003	0.008	0.002	0.000	0.007	0.002	0.000	0.021
37	Rhodobacterales	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.021
38	Pseudonocardiales	0.000	0.000	0.000	0.009	0.001	0.000	0.005	0.000	0.000	0.015
39	Frankiales	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.016
40	Deferribacterales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.011	0.002	0.000	0.016

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2	SUM (Ratio)
41	Acidaminococcales	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000	0.016
42	Babela_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.016
43	Kineosporiales	0.000	0.007	0.000	0.002	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.015
44	Bdellovibrionales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.007
45	DQ395705_o	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009
46	Selenomonadales	0.000	0.002	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010
47	ASND_o	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009
48	Opituales	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
49	Desulfovibrionales	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
50	Sterolibacterium_o	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
51	Acidiferrobacterales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.010
52	Solirubrobacterales	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008
53	Cellvibrionales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.008
54	Stigonematales	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006
55	AB240334_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.009
56	Myxococcales	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
57	Betaproteobacteria_uc	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.005
58	Pedosphaera_o	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005
59	Desulfobulbaceae_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
60	Ignatzschineria_o	0.046	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.048
61	Spirochaetales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
62	Firmicutes_uc_o	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
63	HM996811_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.005
64	Anaerolineales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
65	Chroococcales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
66	JQ650114_o	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.004
67	Bradymonadales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
68	Coriobacteriales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
69	Pleurocapsales	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023
70	Nitrospirales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002
71	Veillonellales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
72	Pasteurellales	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
73	AF269002_o	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
74	Bacteroidia_uc	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
75	Thiobacillus_o	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
76	AY234747_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002
77	Chlamydiales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
78	Clostridia_uc	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
79	DQ129389_o	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002

(2) 동결건조 분말의 생균활성 확인

(가) 김치스타터용 균주 *Leucosnostoc mesenteoides*를 salt stress 환경에서 배양한 후 동결건조 분말의 생균수를 측정 함

- ① MRS 배지에 배지를 조제하고, *Leucosnostoc mesenteoides*를 배양함
- ② 전체 250L의 배양액에서 회수한 wet cell의 생균은 $2.6 \sim 5.5 \times 10^{11}$ CFU/g이었으며, 전체 회수된 *Leucosnostoc mesenteoides*의 wet cell 생산량은 960~1200g의 범위에서 배양되었음

(나) 김치스타터용 균주 *Leucosnostoc mesenteoides*를 salt stress 환경에서 배양한 후 동결건조 분말의 생균수를 측정 함

- ① MRS 배지에 2%의 NaCl을 첨가한 salt stress 배지를 조제하고, *Leucosnostoc mesenteoides*를 배양함
- ② 전체 250L의 배양액에서 회수한 wet cell의 생균은 5.5×10^{11} CFU/g이었으며, 전체 회수된 wet cell의 무게는 640g이었음.
- ③ NaCl이 첨가되지 않은 MRS 배지 250L의 이용한 통상의 배양에서 *Leucosnostoc mesenteoides*의 wet cell 생산량은 960~1200g의 범위에서 배양되었음으로, 2%의 NaCl 첨가에 의해 전체 cell의 생산량이 감소됨

(다) 김치스타터용 균주 *Leucosnostoc mesenteoides*를 salt stress 환경에서 배양한 후 동결건조 분말의 오염 여부 확인

- ① NaCl 존재하여서 배양한 *Leucosnostoc mesenteoides* 김치유산균 동결건조 분말의 오염을 EMB, DLA, PCA, XLD, YPD, PDA를 확인함
- ② 동결건조 분말에서 오염균이 발견되지 않음

[표] NaCl 존재하여서 배양한 *Leucosnostoc mesenteoides* 김치유산균 동결건조 분말에서의 오염균 존재 여부

오염 검사용 배지명	오염균의 존재 여부 (O/X)
EMB	X
DLA	X
PCA	X
XLD	X
YPD	X
PDA	X



[그림] NaCl 존재하여서 배양한 *Leucosnostoc mesenteroides* 김치유산균 동결건조 분말을 배양한 배지 사진

(3) 김치생산용 상용 종균의 salt resistance 조사

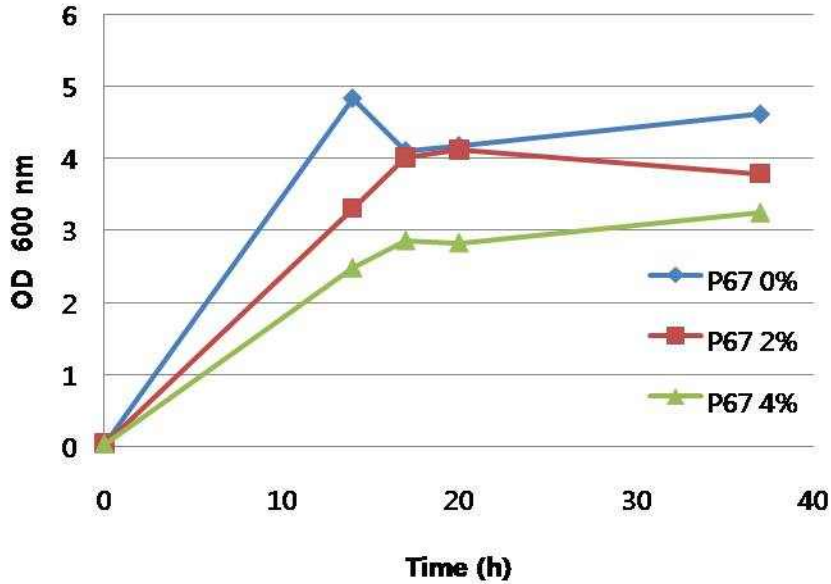
(가) 삼투압 저항성을 높이는 최적 salt 농도 결정

- ① 김치스타터 유산균의 salt 저항성 확인을 위해 기본 MRS 액체 배지에 각각 다른 농도의 NaCl을 첨가 한 후 균의 생육을 OD 값으로 측정함

[표] NaCl 함유 MRS 액체 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육

Time (h)	NaCl 농도		
	0%	2%	4%
0	0.04	0.04	0.04
14	4.84	3.31	2.49
17	4.11	4.01	2.87
20	4.18	4.12	2.84
37	4.62	3.79	3.26

- ② 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*는 MRS 배지에 4% NaCl이 첨가되어도 생육이 가능함.
- ③ 서로 다른 농도의 NaCl에서의 생육을 비교하면 *Leuconostoc mesenteroides*는 NaCl의 첨가가 생육 감소의 원인이 됨을 확인 함



[그림] 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 NaCl 함유 MRS 액체 배지에서의 생육

(나) 분말 형태의 동결건조 김치스타터 분말내의 유산균 생존율 변화 확인

① 김치스타터용 유산균분말의 균수 측정

- ㉠ 서로 다른 배양 및 보관 상태의 김치스타터 분말에 포함된 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 생균수를 측정함
- ㉡ 사용한 동결건조 분말을 각각 다른 보관 온도에서 보관한 시료(-20℃, 4℃) 및 NaCl이 함유된 배지에서 생육한 동결건조 시료를 사용함
- ㉢ 동일한 발효조건에서 배양한 동결건조 분말을 4℃와 20℃에서 2달간 보관한 경우 생균수에 차이가 없었음.
- ㉣ NaCl이 함유된 배지에서 생육한 김치유산균 균체를 동결 건조한 시료의 경우 생균수가 20%정도 감소 된 것으로 나타남

[표] 동결건조 김치스타터 분말내의 *Leucosnostoc mesenteoides* 김치유산균의 생균수

동결건조 분말	생균수 (CFU/g)
4℃	5.4×10^{11}
-20℃	5.6×10^{11}
NaCl strass 배양	4.3×10^{11}

② 김치스타터용 유산균의 생육활성 측정

㉠ 각각의 시료 (-20℃, 4℃, NaCl stress)의 단위 무게당 균수 확인하여 동일한 양의 유산균분말을 MRS 액체 배지에 접종한 후 균의 생육을 관찰 함

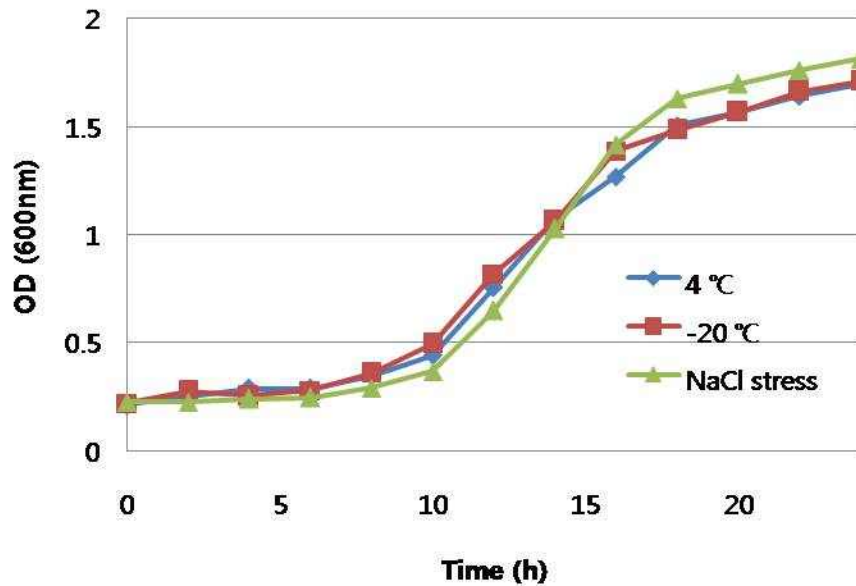
㉡ 동결건조 분말의 접종은 생균수 기준 3.4×10^9 CFU/L이 배지에 접종되도록 함

㉢ 보관온도 및 NaCl stress 배양방법에 의해 두드러진 차이는 없음

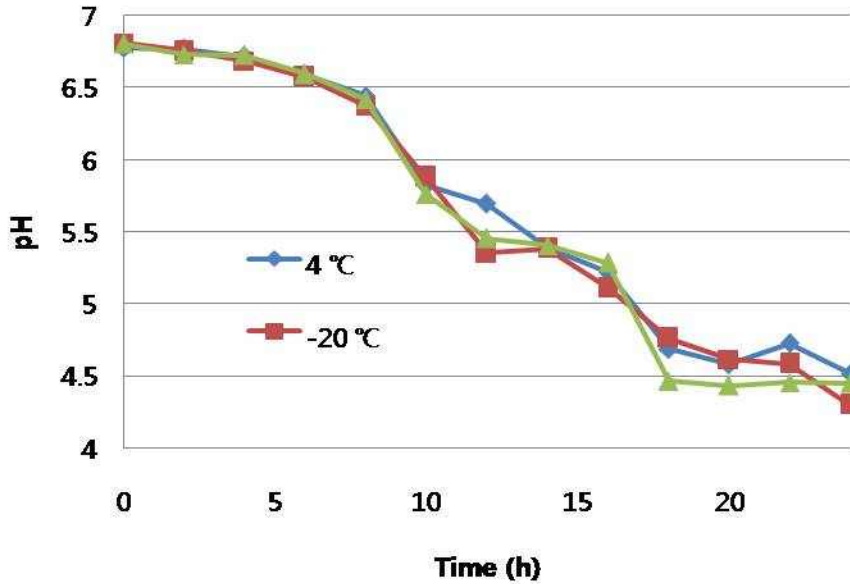
: 동결건조 스타터의 균수는 -20℃에서 3.7% 높게 나타남

: 동결건조 스타터는 보관온도 4, - 20℃에서 생육속도의 차이가 없음

: 동결건조 스타터는 NaCl stress 배지에서 배양시 OD가 더 증가함



[그림] 김치스타터 *Leuconostoc mesenteroides*의 동결건조 분말 종류에 따른 생육



[그림] 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 동결건조 분말 종류에 따른 배양 과정 pH 변화

(4) 김치생산용 상용 종균 1종 이상에 대한 발효용 최적 pH 조사

(가) 배양도중 NaOH를 이용한 배양용 배지의 pH 조절

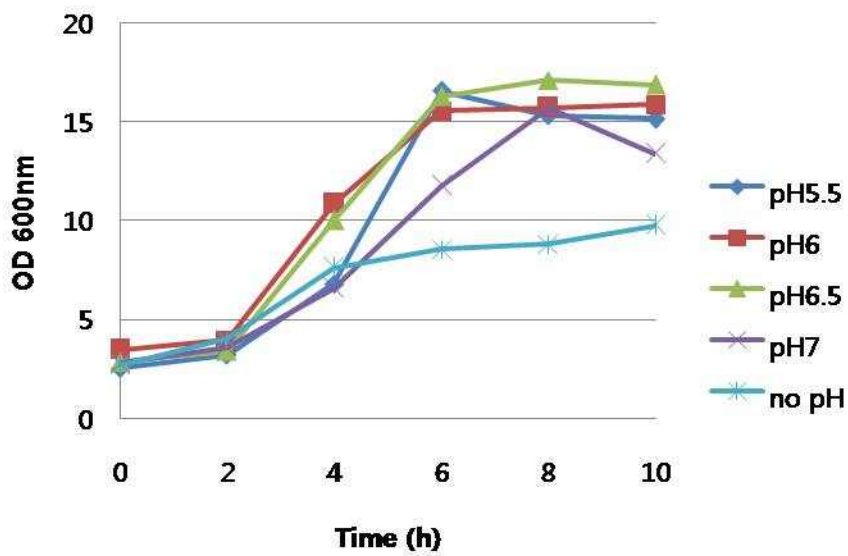
- ① 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*은 다른 유산생성 유산균과 비슷하게 산소가 소모되지 않는 혐기 생육과정에서 lactic acid가 대사산물로 배출됨
- ② *Leuconostoc mesenteroides*가 생산되는 유기산은 pH가 lactic acid의 pKa 값 보다 낮은 pH에서는 세포내로 흡수가 용이하게 되어 유산균의 생육을 저해함
- ③ 배양도중 배양액의 pH를 연속적으로 점검 하면서 pH가 설정값 이하로 낮아지면 NaOH를 배양 배지에 주입한 경우 *Leuconostoc mesenteroides*의 생산량이 증가됨이 확인됨

(나) pH 조절 발효기 배양에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 최적 pH 도출

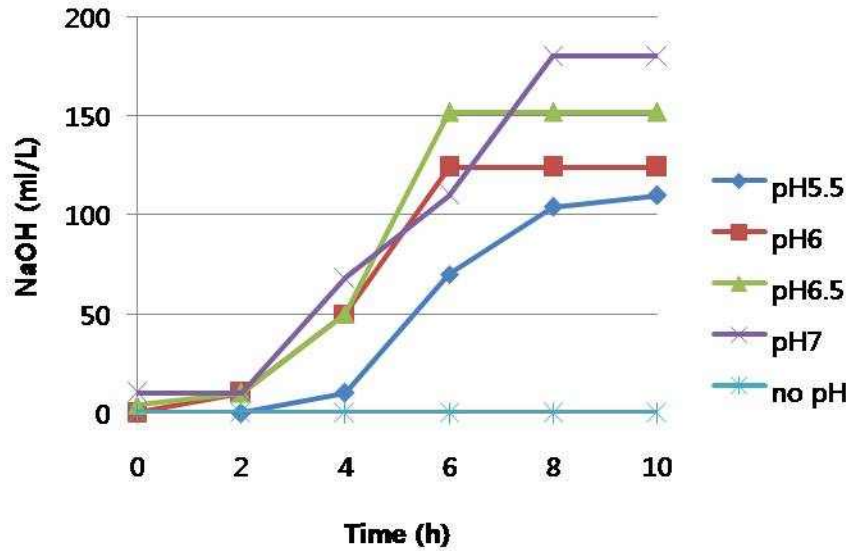
- ① 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 최적 pH 선정
 - ㉠ pH 설정을 하지 않은 반응기 운전을 대조구로 하고 pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0로 유지되는 시험구를 설정하여 발효기를 운전함
 - ㉡ 반응기 운전 도중에 2시간 간격으로 생육 OD를 측정하고, NaOH 소모량을 기록하고, pH meter에 표시된 반응기내의 pH 값을 기록함
- ② 김치스타터용 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 최적 pH
 - ㉠ *Leuconostoc mesenteroides*는 pH 6.5로 유지된 배양에서 OD 값이 가장

높게 나타남.

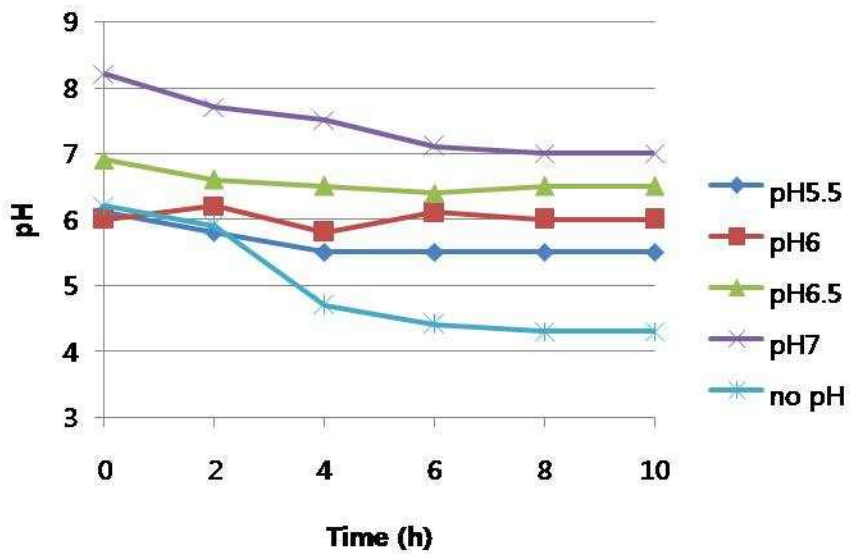
- ㉔ NaOH 소모량을 pH7로 유지된 반응기의 소모량이 가장 높았고, 그다음은 pH 6으로 유지되는 반응기 배양이었음
- ㉕ *Leuconostoc mesenteroides*는 pH 6.5에서 가장 높은 생육을 보여 OD600nm 값 16을 나타내었고, NaOH 소모량은 pH 7.0에서 180mL/L로 가장 높게 나타났음
- ㉖ *Leuconostoc mesenteroides*의 발효기 배양에서 배양액의 pH는 설정값을 유지하였고, NaOH가 투입되지 않는 대조구의 pH는 6시간 후 pH 4.5이하로 감소하였음



[그림] 발효기 배양에서 pH에 따른 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육



[그림] 발효기 배양에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 의한 NaOH 소비량



[그림] 발효기 배양에서 pH에 설정 따른 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 과정의 pH 변화

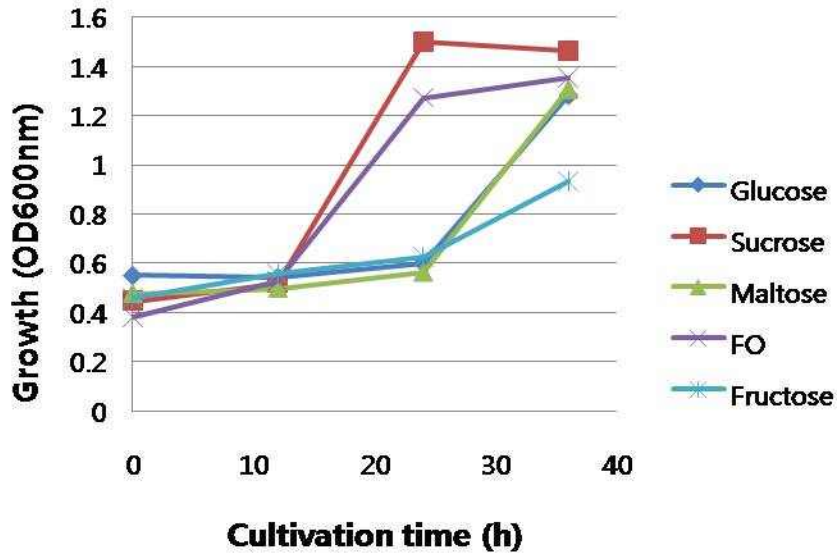
(5) 기존 유산균 배양용 배지의 성분을 기반으로 하여 필수 배지 성분 조사

(가) 포도당, 설탕, 유당등 상용 최적 에너지원 선정

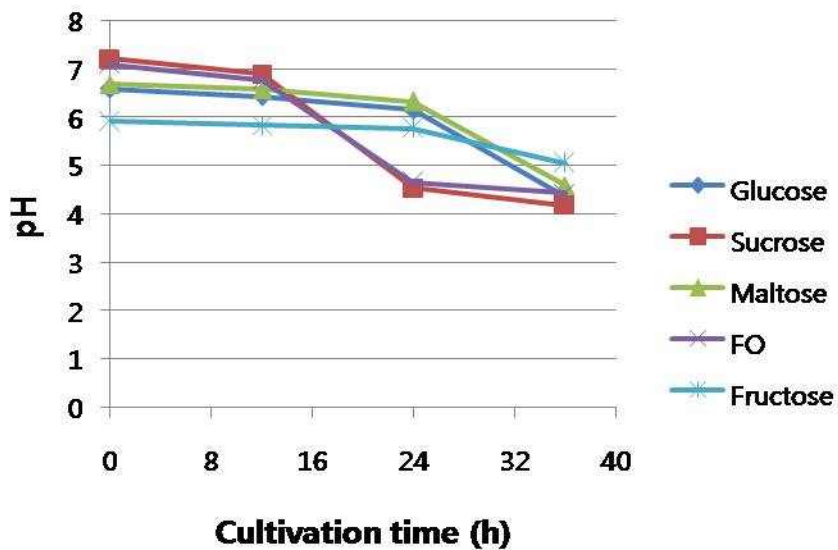
- ① 김치 유산균이 잘 이용하는 탄소원을 확인하기 위해 기본 배지성분에 탄소원으로 Glucose, Sucrose, Maltose, Fructoligo saccharide, 혹은 Fructose를 첨가한 배지를 조제하고 김치유산균을 접종하여 30℃ 항온기에서 배양하면서

균의 생육을 OD의 변화로 확인함

② *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균은 설탕이 함유된 배지에서 가장 높은 OD 값을 보임



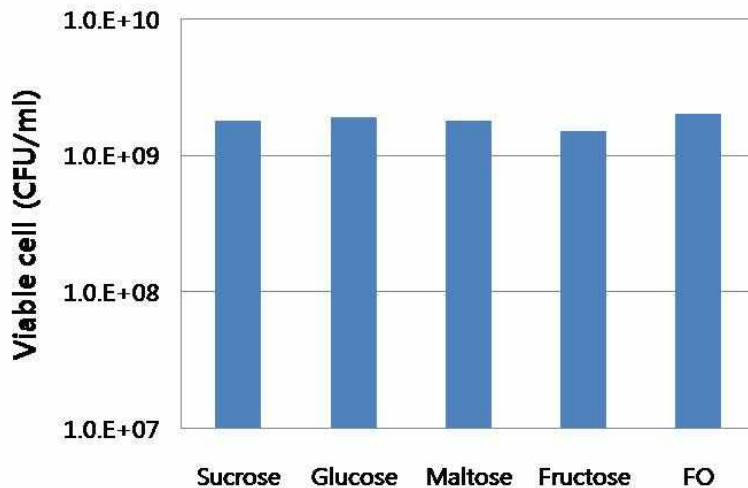
[그림] 탄소원이 다른 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 생육



[그림] 탄소원이 다른 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 생육에 의한 pH의 변화

② 기본 배지성분에 탄소원 Glucose, Sucrose, Maltose, Fructoligo saccharide, Fructose를 첨가한 배지에서 생육한 김치 유산균의 생균수 측정함

㉔ 탄소원이 상이한 배지에서 생육한 김치유산균은 생육을 나타내는 지표인 OD에서는 탄소원의 종류에 따른 생육의 차이가 두드러지게 나타나는 탄소원이 존재하였으나, 생균수에는 두드러진 차이가 나타나지 않음



[그림] 탄소원이 다른 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 생육, 생균수 비교

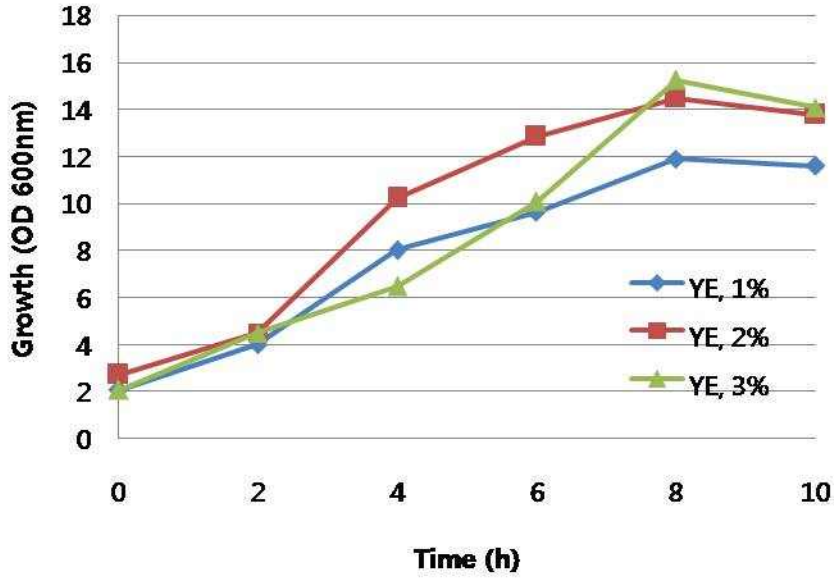
(나) Yeast extract, soy peptone 등의 상용 질소원 선정

① 질소원으로 사용한 yeast extract 농도에 따른 *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 생육

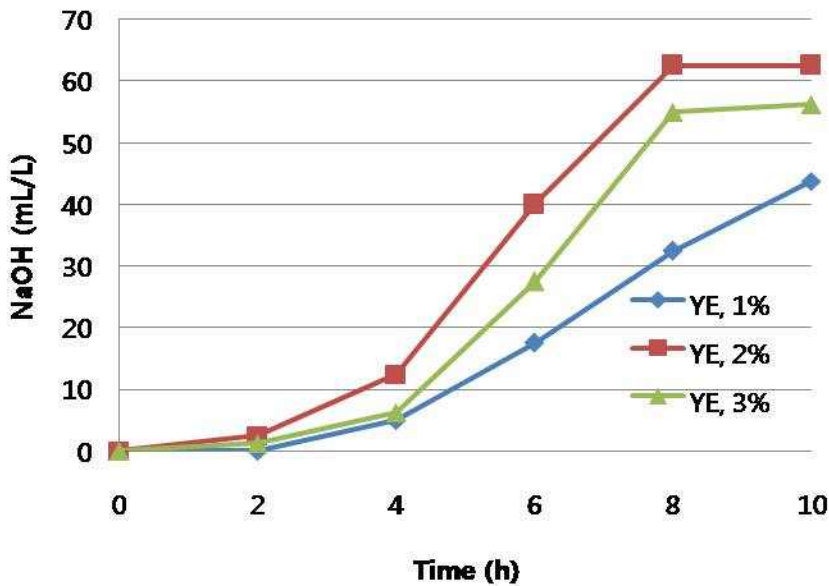
㉔ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지에 yeast extract의 함량이 다른 시험구를 구성함 성분

㉕ Yeast extract 함량이 다른 시험구는 발효기를 이용하여 pH를 control 한 조건에 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 균의 생육을 측정하고, NaOH의 소모량도 측정 함

㉖ 유산균 배양용 기본배지에서 yeast extract이 다른 경우 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 차이가 발생하였음. 2% Yeast extract 함유 배지에서 NaOH 소모량이 가장 많았음. 균의 생육은 3% yeast extract 함유 배지에서 약간 높아 보였으나, 그 차이가 크지 않음



[그림] Yeast extract의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육



[그림] Yeast extract의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 의한 NaOH 소비량

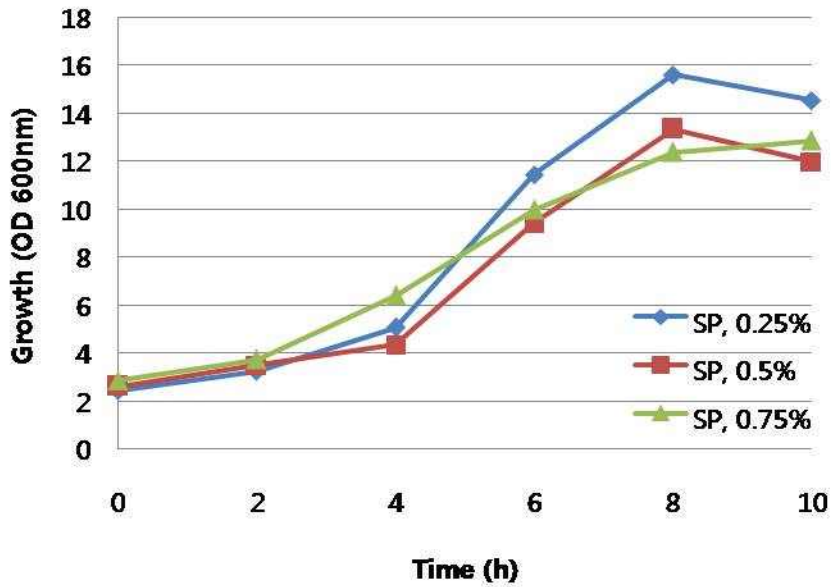
② 질소원으로 사용한 soy peptone 농도에 따른 *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 생육

㉞ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지에 soy peptone의 함량이 다른 시험구를 구성함 성분

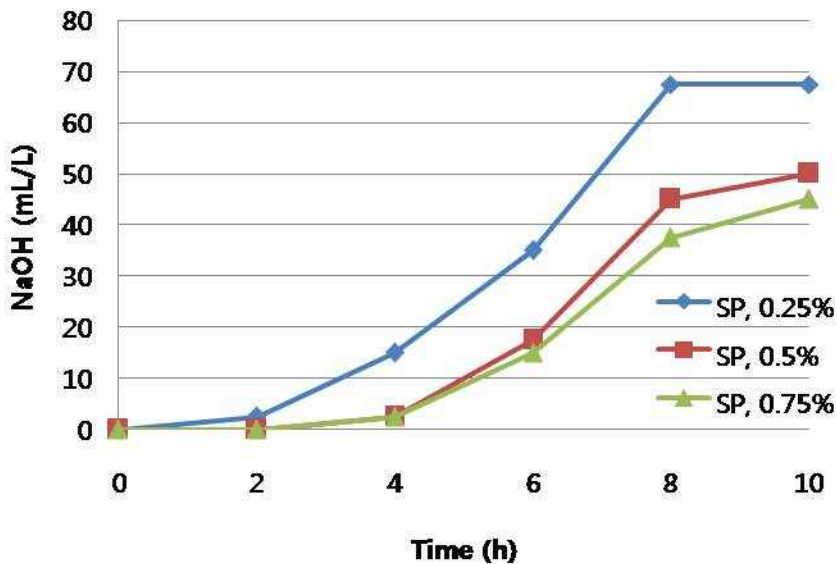
㉟ Soy peptone 함량이 다른 시험구는 발효기를 이용하여 pH를 control 한

조건에 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 균의 생육을 측정하고, NaOH의 소모량도 측정 함

- ㉔ 유산균 배양용 기본배지에서 soy peptone이 함유량이 다른 경우 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 큰 차이가 발생하였음. 0.25% Soy peptone 함유 배지에서 NaOH 소모량이 가장 많았고 균의 생육 OD값도 높게 나타났음



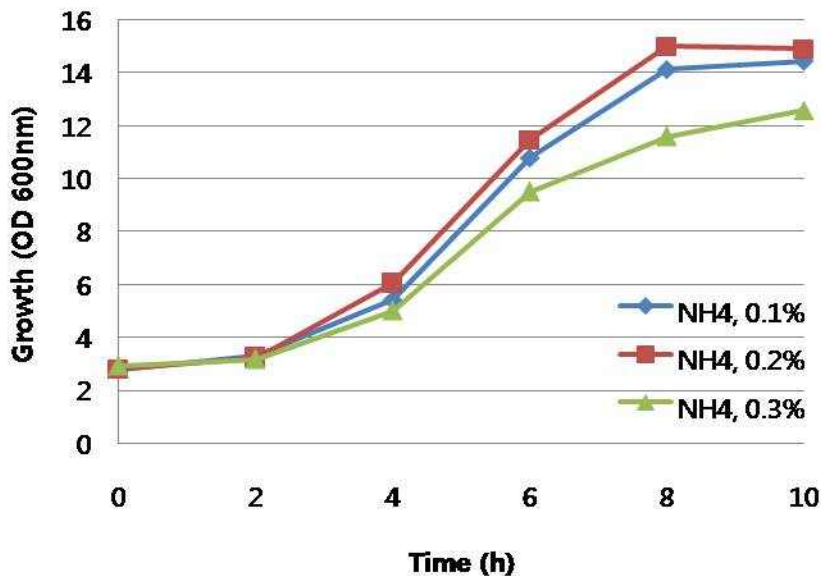
[그림] Soy peptone의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육



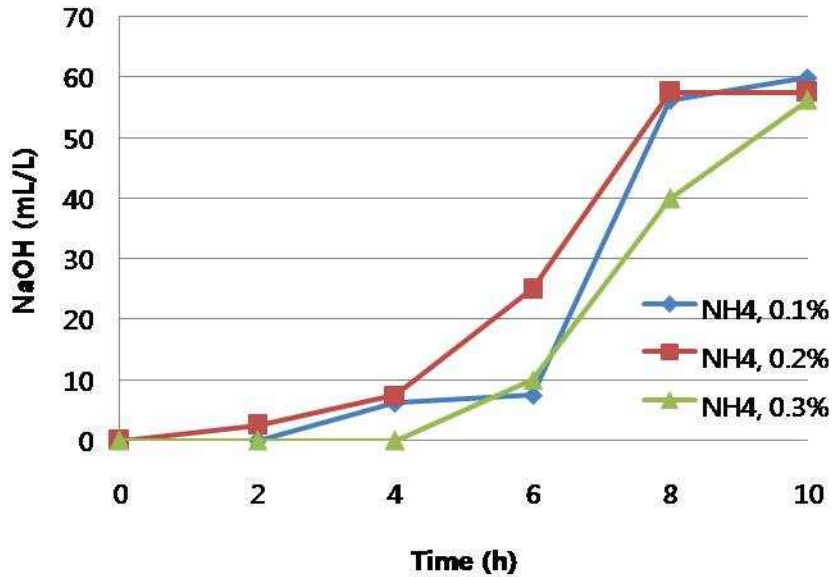
[그림] Soy peptone의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 의한 NaOH 소비량

③ 질소원으로 사용한 ammonium sulfate 첨가 농도에 따른 *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균의 생육

- ㉞ 김치스타터 유산균 배양용 기본 배지에 ammonium sulfate의 함량이 다른 시험구를 구성함 성분
- ㉟ Ammonium sulfate 함량이 다른 시험구는 발효기를 이용하여 pH를 control 한 조건에 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 균의 생육을 측정하고, NaOH의 소모량도 측정 함
- ㊱ 유산균 배양용 기본배지에서 ammonium sulfate이 함유량이 다른 경우 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 큰 차이가 발생하지 않았음. 0.1, 0.2, 0.3% 의 ammonium sulfate 함유 배지 균은 생육은 비슷하였으며, NaOH 소모량은 0.1%에서 조금 높게 나타났음



[그림] Ammonium sulfate의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육



[그림] Ammonium sulfate의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 의한 NaOH 소비량

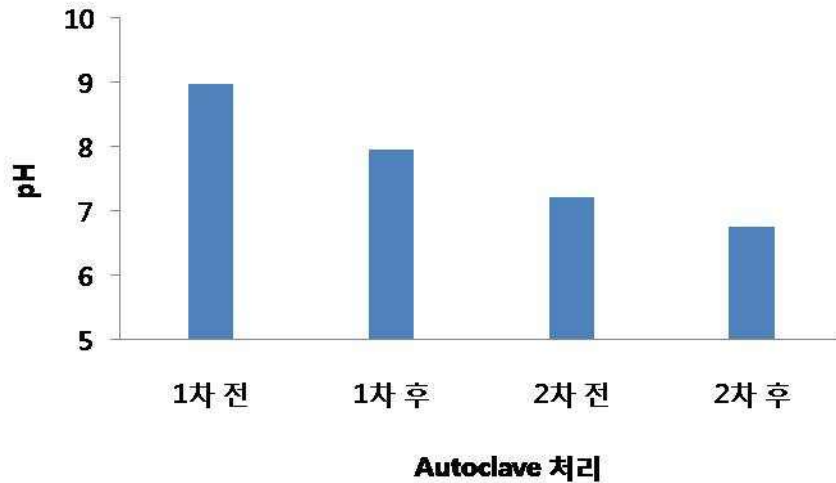
(다) 질소원 단가 감소를 위한 탈지대두박 등의 질소원의 이용 가능성 확인

① 탈지대두박 함유 배지의 조제

- ㉠ MRS 배지성분중 soy peptone을 대신하여 탈지대두박이 첨가된 배지를 조제하여 김치유산균을 접종하여 배양함
- ㉡ 균의 생육은 액체배지와 고체배지에서 모두 관찰됨.
- ㉢ 탈지대두박 함유 액체배지의 경우 액체 배지의 탁도로 인해 균 생육 측정방법으로 흡광도 측정이 불가능함
- ㉣ 탈지대두박의 가용화 방법이 필요함

② 탈지대두박의 알카리 분해물이 함유된 배지의 조제

- ㉠ 탈지대두박의 분해를 위해 탈지대두박 0.5%가 포함된 MRS 액체 배지에 0.04%의 NaOH를 첨가한 배지를 만들어 고온 고압 살균하여 배지를 조제함. 조제한 배지는 pH 7.22였으나 autoclave에서 121℃, 30분 처리 후 pH 6.22로 산도가 내려갔음
- ㉡ 알카리 분해 탈지대두박 배지와 처리하지 않은 탈지대두박을 사용한 배지에 김치유산균을 접종하여 배양한 결과, 알카리 처리 탈지 대두박 배지에서 김치유산균의 생육이 더 낮았음
- ㉢ 알카리 분해 탈지대두박의 중화에 의한 산도 조절 방법의 시도가 필요함



[그림] 알카리 분해 탈지대두박 배지의 autoclave 처리 전후의 pH 변화

③ 탈지대두박의 알카리 처리 후 중화

- ㉞ 탈지대두박의 분해 촉진을 위해 5%의 탈지대두박만 포함된 현탁액을 조제하여 3%되게 NaOH를 첨가한 현탁액을 만들어 가열함.
- ㉟ 알카리 분해 후 탈지대두박 현탁액의 중화를 위해 HCl을 첨가하여 중화를 시도함. 탈지대두박 현탁액의 pH가 낮아지면서 탈지대두박이 엉키기 시작함

④ 김치유산균 배양을 위한 탈지대두박의 사용

- ㉞ 탈지대두박의 첨가가 김치유산균의 생육이 도움이 될 것으로 사료됨. 하지만 탈지대두박이 완전히 용해되지 않음으로 발효기를 사용한 상용배양에서 이송라인에 대두박이 쌓이는 문제가 발생할 수 있음으로 김치유산균 배양에 적합한정도의 분해를 유발할 수 있는 대두박의 분해 방법의 개발이 필요함



[그림] 알카리 및 산처리 후 탈지대두박의 성상

(6) 반응표면분석법을 이용한 배지 조성 최적화

(가) 반응표면분석법을 이용하여 최적 발효 조건을 위한 인자 선정

① MRS 기본배지에서 발효 조건 최적화용 인자 선정

㉠ 기본배지 성분의 단가 분석

: *Leuconostoc mesenteroides* 배양에 사용되는 배지원료성분 중 함량비가 높은 것 성분은 아래의 표에 제시된 바와 같음.

: 질소원 실험에서 첨가량이 증가함에 따라 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육의 증가가 관찰되는 yeast extract는 배지 최적화용 후보물질에서 제외함

[표] *Leuconostoc mesenteroides* 배양용 기본배지 성분의 단가

원재료	단가 (원/Kg)	투입량(%)	투입량(Kg/T)	금액(원/T)
Glucose	1,300	2	20	26,000
Soy peptone	37,500	0.5	5	187,500
Yeast extract	12,500	2	20	250,000
Sodium acetate	5,500	0.5	5	27,500
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,400	0.4	4	17,600
K ₂ HPO ₄	6,000	0.4	4	24,000
합		5.8	58	532,600

㉡ 질소원으로 이용되는 3가지 인자에 첨가량이 비교적 많은 다른 2개를 선정

㉢ Sodium acetate와 인산원인 dipotassium phosphate를 기초 인자로 선정

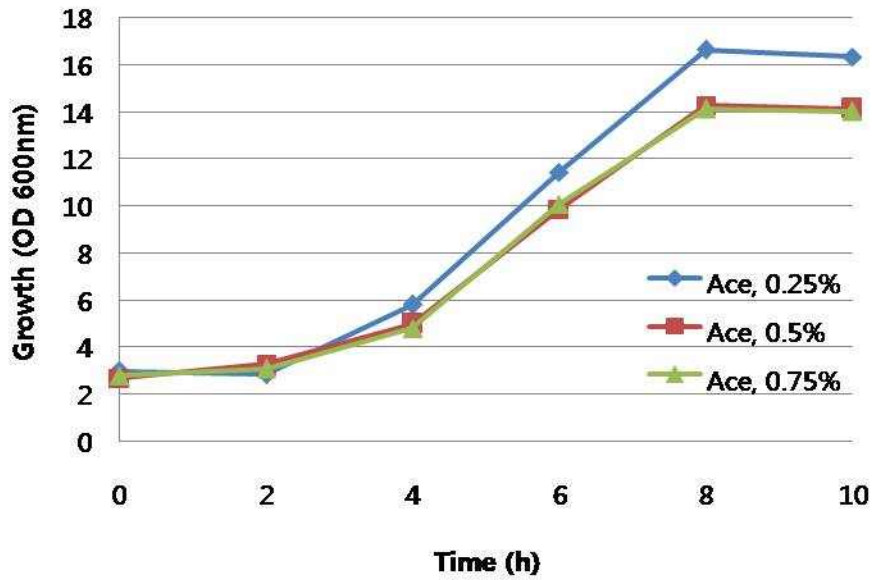
② Sodium acetate 성분 변경된 MRS 배지를 이용한 발효기 배양

㉣ *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균 기본 배지에 Sodium acetate의 함량이 다른 시험구를 구성함 성분

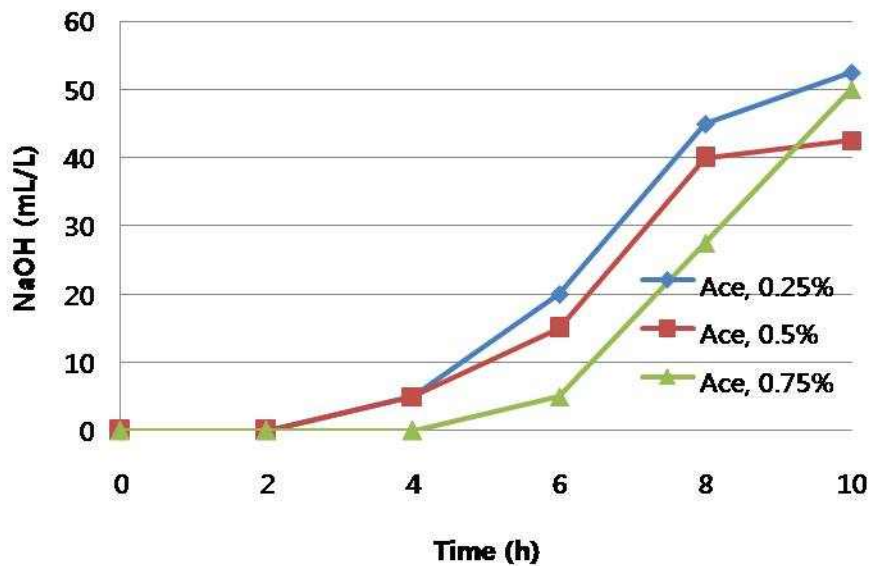
㉤ Sodium acetate 함량이 다른 시험구는 발효기를 이용하여 pH를 control 한 조건에 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 균의 생육을 측정하고, NaOH의 소모량도 측정 함

㉥ 유산균 배양용 기본배지에서 sodium acetate이 함유량이 다른 경우 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 큰 차이가 발생하지 않았으나 0.25%가 첨가된 MRS 배지에서 생육을 나타내는 흡광도가 가장 높았고, NaOH의 소모량도 많았음. 기존에 사용하던 농도인 0.5%와 그 보다

초과하여 배지가 투입된 0.75%의 결과는 유사하게 나타났음.



[그림] Sodium acetate의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육

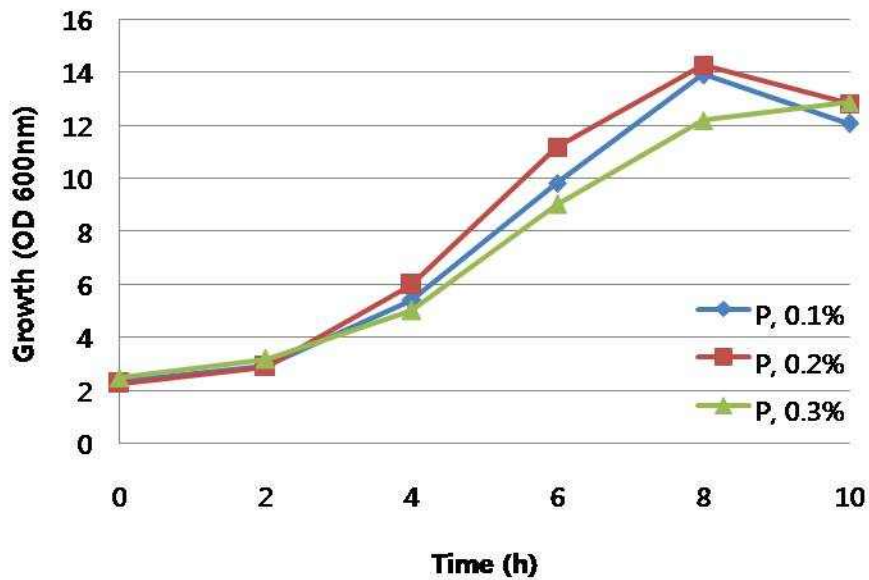


[그림] Sodium acetate의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 의한 NaOH 소비량

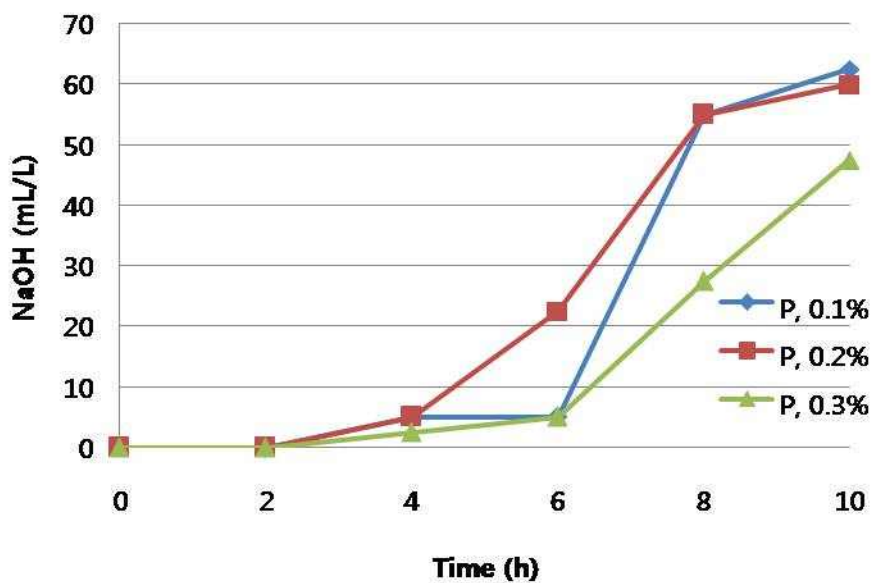
- ③ 인산원인 Dipotassium phosphate의 양이 상이한 MRS를 이용한 발효기 배양
- ㉞ *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균 기본 배지에 Dipotassium phosphate의 함량이 다른 시험구를 구성함 성분
 - ㉟ Dipotassium phosphate 함량이 다른 시험구는 발효기를 이용하여 pH를 control 한 조건에 배양하면서 일정 시간 간격으로 시료를 채취하여 균의

생육을 측정하고, NaOH의 소모량도 측정 함

- ㉔ 유산균 배양용 기본배지에서 dipotassium phosphate 이 함유량이 다른 경우 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 큰 차이가 발생하지 않았으나, 0.1과 0.2%의 Sodium acetate 함유 MRS 배지에서 균은 생육과 NaOH의 소모량이 비슷하게 관찰되었음. Dipotassium phosphate의 양이 기준보다 많은 0.3%가 첨가된 배양에서는 0.2% 투입한 시험구에 비해 균의 생육이 낮았으며, NaOH의 소모량도 작았음



[그림] Dipotassium phosphate의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육



[그림] Dipotassium phosphate의 농도가 다른 MRS 배지에서 *Leuconostoc*

*mesenteroides*의 생육에 의한 NaOH 소비량

(나) Fractional factorial experimental design

- ① 최적 발효 조건을 위한 인자 선정에서 조절인자 선정
 - ㉔ *Leuconostoc mesenteroides* 최적 배양 배지 조성을 위해 5개의 배지 성분에 대해 반응기 운전한 결과에 기반을 두고 2-Level factorial design용 배지 성분 투여량을 결정함
- ② 2-Level factorial design에 의거하여 4개의 선택한 배지 성분에 대하여 24개의 시험구 구성
 - ㉔ 2-Level factorial design은 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 필요한 가장 중요한 요소를 찾을 수 있으며, main effects와 interaction을 추정할 수 있음
 - ㉕ 2-Level factorial design에서 선정된 4개의 성분을 *Leuconostoc mesenteroides* 최적 배양 배지 조성을 위해 5개의 배지 성분에 대해 반응기 운전한 결과에 기반을 두고 2-Level factorial design용 배지 성분 투여량을 결정함

[표] 2-Level factorial design을 위해 선정한 5개 성분의 최대 및 최소값

NAME	UNIT	LOW	HIGH
YE	%	2	3
SP	%	0.1	0.25
NA	%	0.1	0.25
DP	%	0.1	0.2
AS	%	0.05	0.1

- ㉔ 4개의 성분에 대해 24개의 시험구를 구성함

2-Level Factorial Design

Design for 2 to 21 factors where each factor is varied over 2 levels. Useful for estimating main effects and interactions. Fractional factorials can be used for screening many factors to find the significant few. The color coding represents the

		Number of Factors																			
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Runs	4	2 ²	2 ³⁻¹																		
	8		2 ³	2 ⁴⁻¹ _{IV}	2 ⁵⁻² _{III}	2 ⁶⁻³ _{III}	2 ⁷⁻⁴														
	16			2 ⁴	2 ⁵⁻¹ _{IV}	2 ⁶⁻² _{IV}	2 ⁷⁻³ _{IV}	2 ⁸⁻⁴ _{IV}	2 ⁹⁻⁵ _{III}	2 ¹⁰⁻⁶ _{III}	2 ¹¹⁻⁷ _{III}	2 ¹²⁻⁸ _{III}	2 ¹³⁻⁹ _{III}	2 ¹⁴⁻¹⁰ _{III}	2 ¹⁵⁻¹¹						
	32				2 ⁵	2 ⁶⁻¹ _V	2 ⁷⁻² _{IV}	2 ⁸⁻³ _{IV}	2 ⁹⁻⁴ _{IV}	2 ¹⁰⁻⁵ _{IV}	2 ¹¹⁻⁶ _{IV}	2 ¹²⁻⁷ _{IV}	2 ¹³⁻⁸ _{IV}	2 ¹⁴⁻⁹ _{IV}	2 ¹⁵⁻¹⁰ _{IV}	2 ¹⁶⁻¹¹ _{IV}	2 ¹⁷⁻¹² _{III}	2 ¹⁸⁻¹³ _{III}	2 ¹⁹⁻¹⁴ _{III}	2 ²⁰⁻¹⁵ _{III}	2 ²¹⁻¹⁶ _{III}
	64					2 ⁶	2 ⁷⁻¹ _{VI}	2 ⁸⁻² _V	2 ⁹⁻³ _{IV}	2 ¹⁰⁻⁴ _{IV}	2 ¹¹⁻⁵ _{IV}	2 ¹²⁻⁶ _{IV}	2 ¹³⁻⁷ _{IV}	2 ¹⁴⁻⁸ _{IV}	2 ¹⁵⁻⁹ _{IV}	2 ¹⁶⁻¹⁰ _{IV}	2 ¹⁷⁻¹¹ _{IV}	2 ¹⁸⁻¹² _{IV}	2 ¹⁹⁻¹³ _{IV}	2 ²⁰⁻¹⁴ _{IV}	2 ²¹⁻¹⁵ _{IV}
	128						2 ⁷	2 ⁸⁻¹ _{VI}	2 ⁹⁻² _{VI}	2 ¹⁰⁻³ _V	2 ¹¹⁻⁴ _V	2 ¹²⁻⁵ _{IV}	2 ¹³⁻⁶ _{IV}	2 ¹⁴⁻⁷ _{IV}	2 ¹⁵⁻⁸ _{IV}	2 ¹⁶⁻⁹ _{IV}	2 ¹⁷⁻¹⁰ _{IV}	2 ¹⁸⁻¹¹ _{IV}	2 ¹⁹⁻¹² _{IV}	2 ²⁰⁻¹³ _{IV}	2 ²¹⁻¹⁴ _{IV}
	256							2 ⁸	2 ⁹⁻¹ _{VII}	2 ¹⁰⁻² _{VI}	2 ¹¹⁻³ _{VI}	2 ¹²⁻⁴ _V	2 ¹³⁻⁵ _V	2 ¹⁴⁻⁶ _V	2 ¹⁵⁻⁷ _V	2 ¹⁶⁻⁸ _V	2 ¹⁷⁻⁹ _{IV}	2 ¹⁸⁻¹⁰ _{IV}	2 ¹⁹⁻¹¹ _{IV}	2 ²⁰⁻¹² _{IV}	2 ²¹⁻¹³ _{IV}
	512								2 ⁹	2 ¹⁰⁻¹ _{VII}	2 ¹¹⁻² _{VII}	2 ¹²⁻³ _{VI}	2 ¹³⁻⁴ _{VI}	2 ¹⁴⁻⁵ _{VI}	2 ¹⁵⁻⁶ _{VI}	2 ¹⁶⁻⁷ _{VI}	2 ¹⁷⁻⁸ _{VI}	2 ¹⁸⁻⁹ _V	2 ¹⁹⁻¹⁰ _V	2 ²⁰⁻¹¹ _V	2 ²¹⁻¹² _V

[그림] 2-Level factorial design에서 유의 값

[표] 2-Level factorial design을 위해 선정 한 성분의 조성이 다른 시험구

Standard	Run		SP %	NA %	DP%	AS%
3	1	Block 1	0.15	0.05	0.02	0.1
17	2	Block 1	0.1	0.1	0.06	0.06
13	3	Block 1	0.05	0.15	0.1	0.02
18	4	Block 2	0.1	0.1	0.06	0.06
9	5	Block 2	0.05	0.05	0.1	0.1
7	6	Block 2	0.15	0.15	0.02	0.02
19	7	Block 3	0.1	0.1	0.06	0.06
11	8	Block 3	0.15	0.05	0.1	0.02
5	9	Block 3	0.05	0.15	0.02	0.1
20	10	Block 4	0.1	0.1	0.06	0.06
15	11	Block 4	0.15	0.15	0.1	0.1
1	12	Block 4	0.05	0.05	0.02	0.02
14	13	Block 5	0.05	0.15	0.1	0.02
21	14	Block 5	0.1	0.1	0.06	0.06
4	15	Block 5	0.15	0.05	0.02	0.1
8	16	Block 6	0.15	0.15	0.02	0.02
10	17	Block 6	0.05	0.05	0.1	0.1
22	18	Block 6	0.1	0.1	0.06	0.06
6	19	Block 7	0.05	0.15	0.02	0.1
12	20	Block 7	0.15	0.05	0.1	0.02
23	21	Block 7	0.1	0.1	0.06	0.06
16	22	Block 8	0.15	0.15	0.1	0.1
2	23	Block 8	0.05	0.05	0.02	0.02
24	24	Block 8	0.1	0.1	0.06	0.06

③ 구성된 24개의 시험구의 조성에 따른 MRS 배지를 이용한 *Leuconostoc mesenteroides* 발효기 배양

㉠ 발효기를 이용하여 3개의 발효기를 한 block으로 설정하여 8회에 나누어 24개의 배지 조건에 대한 발효기 이용 pH 조절 발효를 진행함

㉡ 발효과정의 생육정도를 OD 및 발효후 wet cell 무게로 측정함

[표] 2-Level factorial design 실험결과

Standard	SP %	NA %	DP%	AS%	OD	cell weight
1	0.05	0.05	0.02	0.02	16.3	0.692
2	0.05	0.05	0.02	0.02	15.2	0.448
3	0.15	0.05	0.02	0.1	13.22	0.649
4	0.15	0.05	0.02	0.1	15.58	0.893
5	0.05	0.15	0.02	0.1	14.22	0.659
6	0.05	0.15	0.02	0.1	15.08	0.851
7	0.15	0.15	0.02	0.02	12.98	0.571
8	0.15	0.15	0.02	0.02	15.7	0.772
9	0.05	0.05	0.1	0.1	15.64	0.757
10	0.05	0.05	0.1	0.1	15.26	0.802
11	0.15	0.05	0.1	0.02	15.2	0.798
12	0.15	0.05	0.1	0.02	16.46	1.065
13	0.05	0.15	0.1	0.02	12.34	0.655
14	0.05	0.15	0.1	0.02	17.72	0.911
15	0.15	0.15	0.1	0.1	17.54	1.027
16	0.15	0.15	0.1	0.1	15.52	0.489
17	0.1	0.1	0.06	0.06	16.24	0.755
18	0.1	0.1	0.06	0.06	13.88	0.65
19	0.1	0.1	0.06	0.06	14.82	0.705
20	0.1	0.1	0.06	0.06	15.54	0.794
21	0.1	0.1	0.06	0.06	14.78	0.848
22	0.1	0.1	0.06	0.06	14.44	0.942
23	0.1	0.1	0.06	0.06	14.18	0.758
24	0.1	0.1	0.06	0.06	14.54	0.445

(다) Steepest ascent experimental design

① Steepest ascent experimental design 시험구 구성을 위한 FFD 결과 분석

㉠ Design-Expert 프로그램에 FFD의 결과 수치를 선별하여 입력하고 유의성 분석을 실시함

- ㉔ Two-level factorial screening designs 결과를 바탕으로 model의 significant 분석 결과를 도출함
- ㉕ 분석 결과 model에 대한 p-value값이 0.0136으로 의미 있게 나타나고, 유의성에서 significant한 값이 도출되어 본 모델을 유효한 것으로 간주함
- ㉖ Model F-value값이 7.00으로 나옴. 이는 이 모델이 significant 함을 나타냄. 이 경우에 noise에 의해 이값이 나타날 확률은 1.36%로 아주 낮음
- ㉗ "Prob > F" 값이 0.0500이하인 경우 이 모델의 항목이 significant 함을 나타냄. 본 모델에서는 A와 C가 significant한 것으로 확인됨. 0.100이사의 수치를 나타내는 것은 이모델의 항목이 not significant 함을 나타냄. 그럼으로 B와 D 항목은 not significant한 것으로 판정됨 model terms.

- ㉘ Curvature는 center points의 값의 평균값과 factorial points값의 차이를 측정하여 나타냄. Design-Expert 프로그램에 FFD의 결과 수치를 선별하여 입력하고 유의성 분석을 실시함. Curvature F-value값 5.20가 의미하는 것은 design space에서 curvature가 존재함을 의미함. 이 정도의 Curvature F-value가 noise에 의해 발생할 확률은 5.66%임

- ㉙ Lack of Fit F-value 수치 0.87이 의미하는 바는 Lack of Fit 가 완전한 error에 비해 not significant 함을 나타냄. Noise에 의해 0.87의 Lack of Fit F-value가 나타날 확률은 52.56%로 비교적 높음

[표] Two-level factorial screening 분석의 유효성 검사

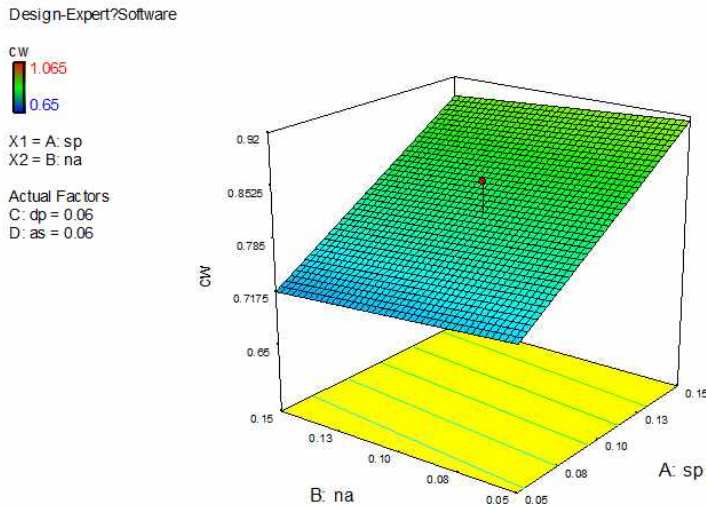
Source	Sum of Squares	df	Mean square	F value	p-value Prob > F	
Model	0.1391425	4	0.034786	7.000453	0.0136	significant
A-sp	0.060031125	1	0.060031	12.081	0.0103	
B-na	0.000861125	1	0.000861	0.173298	0.6897	
C-dp	0.077815125	1	0.077815	15.65995	0.0055	
D-as	0.000435125	1	0.000435	0.087567	0.7759	
Curvature	0.025831202	1	0.025831	5.198415	0.0566	not significant
Residual	0.034783375	7	0.004969			
Lack of Fit	0.013759375	3	0.004586	0.872614	0.5256	not significant
Pure Error	0.021024	4	0.005256			
Cor Total	0.199757077	12				

㉞ Final Equation in Terms of Coded Factors:

$$cw = 0.852625 + 0.086625 * A - 0.010375 * B + 0.098625 * C - 0.007375 * D$$

㉟ Final Equation in Terms of Actual Factors:

$$cw = 0.56325 + 1.7325 * sp - 0.2075 * na + 2.465625 * dp - 0.184375 * as$$



[그림] Predicted model: 3D contour plot showing the effect of the amounts of soy peptone and sodium acetate on the response of cell growth

② Steepest ascent experimental design 시험구 구성을 위한 배지조성 결정

㉞ Two-level factorial screening 분석 결과에서 유효한 모델 값과 함께 0.0103의 p-value 값을 가지는 A 시험구와 0.0055의 p-value 값을 가지는 D 시험구에 대한 배지성분의 변경이 유의미한 것으로 판정됨

㉟ Two-level factorial screening 결과에 의거하여 Steepest ascent experimental design을 진행함

[표] Steepest ascent experimental design 분석을 선택한 요소의 증가계수

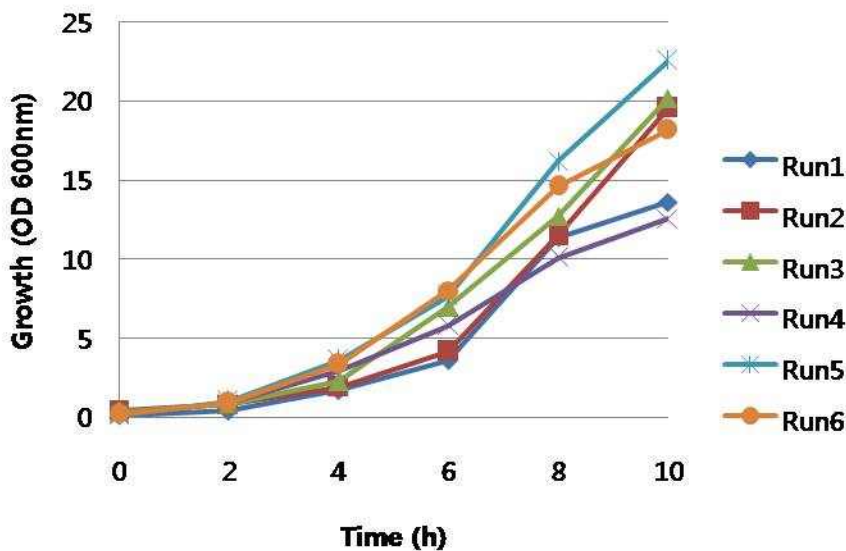
유의성(p-value < 0.05) 있어 선택한 성분	A (SP)	C (DP)
Coefficient Estimate	0.087	0.099
증가계수	0.878787879	1
기본 증가 농도 비율	0.05	0.04
Central point	0.1	0.06
증가계수X 기본 증가비율	0.043939394	0.04

[표] Steepest ascent experimental design 시험구 배치조성

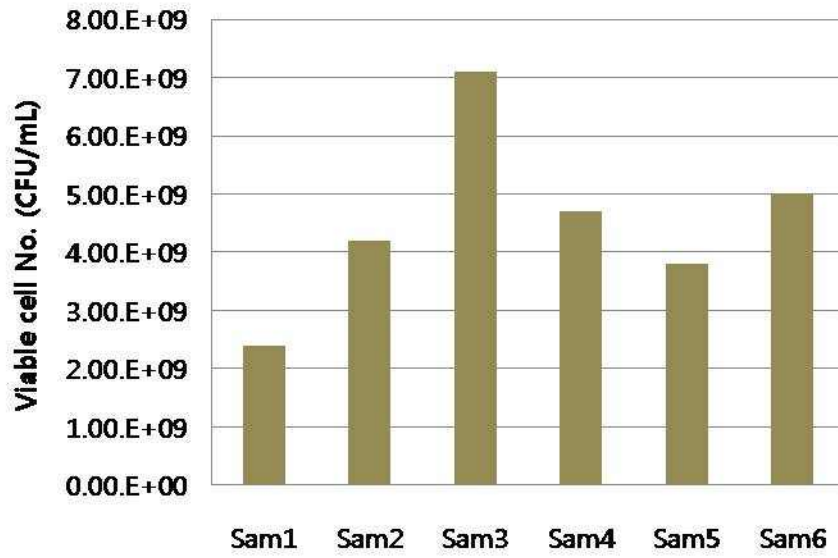
	A	B	C	D
SAM1	0.14	0.1	0.10	0.06
SAM2	0.19	0.1	0.14	0.06
SAM3	0.23	0.1	0.18	0.06
SAM4	0.28	0.1	0.22	0.06
SAM5	0.32	0.1	0.26	0.06
SAM6	0.36	0.1	0.30	0.06

③ Steepest ascent experimental design 시험구 확인용 반응기 운전

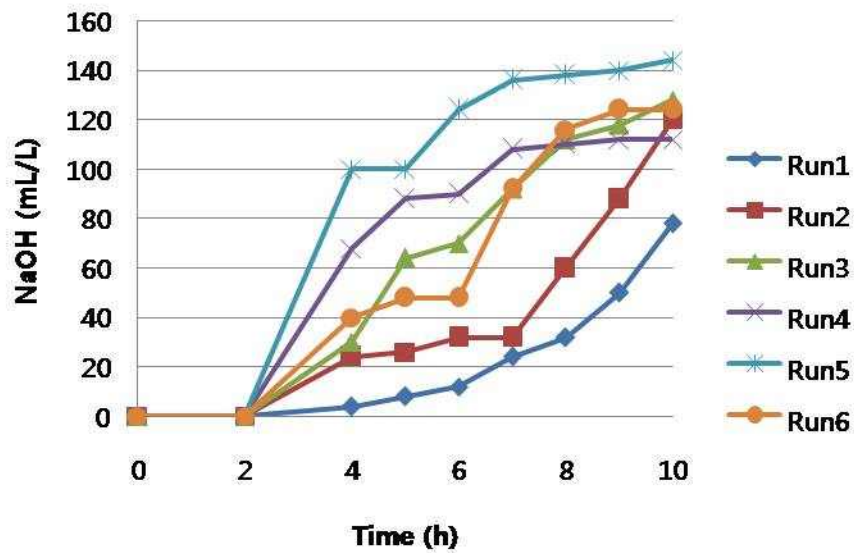
- ㉔ *Leuconostoc mesenteroides* 김치 유산균 기본 배지 선택한 4개의 배지 성분이 상이한 MRS 배지를 조제하고, pH가 조절되는 발효기를 이용하여 유산균 배양을 진행함. 동일한 시험조건에서 실험을 진행하는 것이 가장 유의성이 높은 결과를 도출할 수 있지만, 발효기를 동시에 운전하는 어려움이 있어 3개의 시험구를 1set로 하여 2set의 시험구를 운전함
- ㉕ SAM1, SAM2, SAM3을 1 set로 하여 동시에 3개의 발효기를 이용하여 김치유산균의 배양을 관찰하였으며, SAM4, SAM5, SAM6을 2 set로 하여 반응기를 운전하였음. 반응기 운전 과정에서 각 반응기내의 균의 생육을 OD값으로 측정하고, pH 조절을 위해 소모된 NaOH의 양을 기록하고, 배양이 종료된 후의 생균수를 측정하고, 회수된 균체의 단위 부피당 무게를 측정함
- ㉖ NaOH의 소비량과 흡광도 값은 Sam5의 발효기 운전에서 가장 높게 관찰되었고, live cell은 Sam3 발효기 운전에서 가장 높게 관찰되고, cell pellet의 무게는 Sam4의 발효기 운전에서 가장 높게 측정되었음



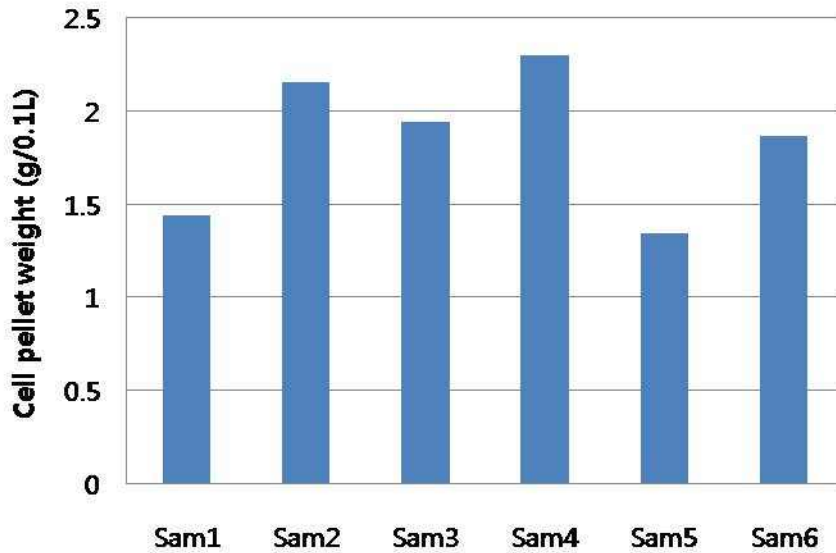
[그림] SAM 실험구 MRS배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육



[그림] SAM 실험구 MRS배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생균수



[그림] SAM 실험구 MRS배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육에 의한 NaOH 소비량



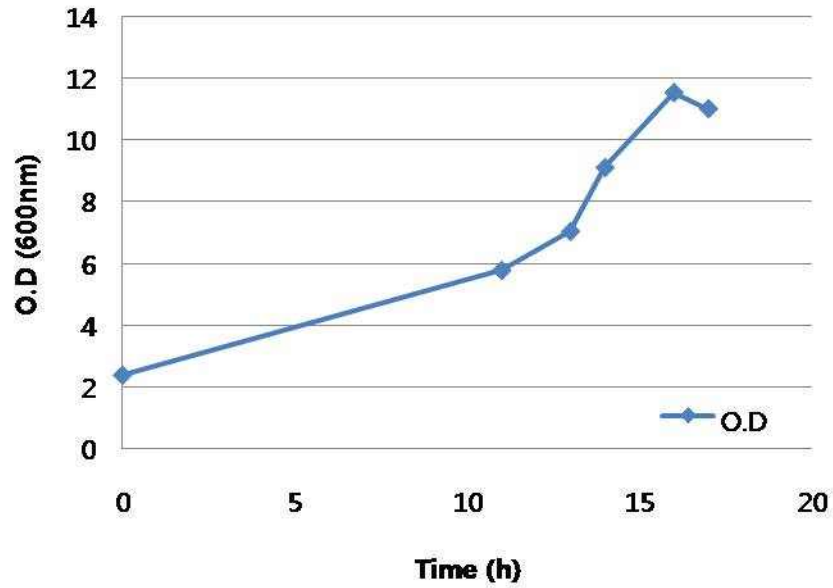
[그림] SAM 실험구 MRS배지에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 무게

(7) 최적화된 배양조건에서 상용배양

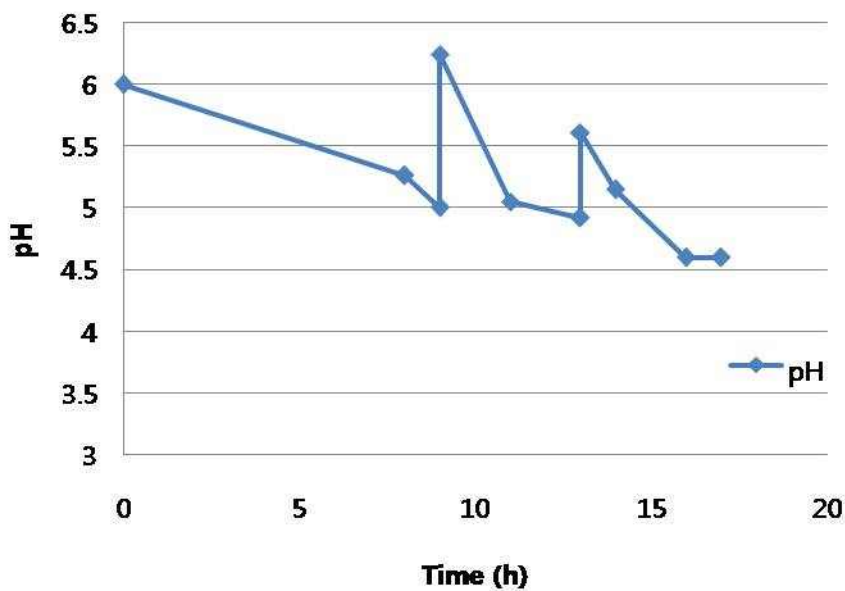
(가) *Leuconostoc mesenteroides*의 상용 배양

① *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 발효용 MRS 배지를 이용한 배양

- ㉠ 상용 발효기 (코바이오, 프로바이오닉, 700L)를 가지고 500L의 working volume으로 *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 발효를 진행함
- ㉡ 발효기의 배지 조성은 최적화를 위해 선택한 조합의 1개를 사용하였음
- ㉢ 발효기의 pH조절은 수동으로 실시하였으며, pH가 5이하로 내려가는 경우 10N의 NaOH를 투입하여 pH를 높였음
- ㉣ 발효기의 pH가 실시간으로 조절되지 않았으나, OD값이 12까지 올라갔고, 10N NaOH의 소모량은 3 L였음
- ㉤ 최적 발효 pH는 pH 5.5~6.5 사이였으나, 수동 발효기운전 과정 오염을 최소화하기 위해 pH가 5.0 부근 까지 낮아 졌을 때 NaOH를 투입하여 pH를 생육 최적 범위로 올림



[그림] 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 최적화된 MRS 액체 배지에서의 생육

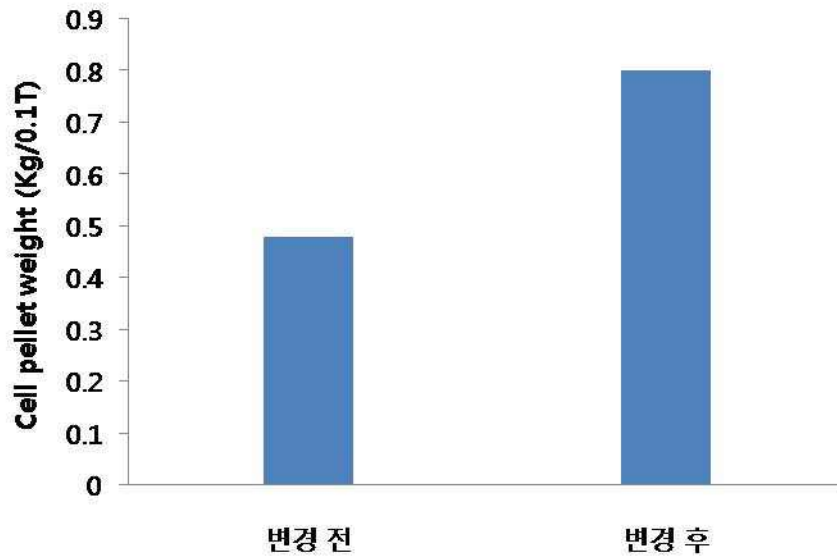


[그림] 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 최적화된 MRS 액체 배지에서의 pH 변화

② *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균의 회수

- ㉞ *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 배양액 500L를 연속 원심 분리기를 이용하여 회수함

- ㉔ 배지 성분 조절 및 pH조절이 되지 않은 기존의 배양에서 500L 발효에 의해 얻을 수 있는 *Leuconostoc mesenteroides*의 원심분리 후 cell pellet의 무게는 2.0~2.4Kg이었으나, 변경된 배지조건에 따라 3.2~4Kg의 cell이 회수되었음
- ㉔ 배지성분의 조성 변화와 배양방법의 변경에 의해 생산량이 33~67% 증가됨이 확인 됨



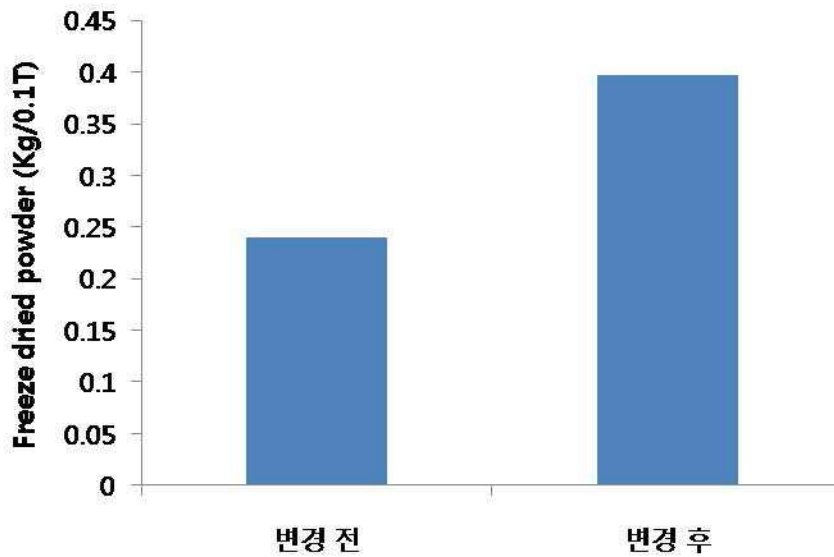
[그림] 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 배양조건 변경 전후의 cell pellet 생산량 변화

(나) 상용 발효기를 이용한 *Leuconostoc mesenteroides* 동결건조 분말 생산

- ① *Leuconostoc mesenteroides* 동결건조 분말 생산 (균수 기준 10^{11} CFU/g 이상) 형태의 스타터용 균주 생산
 - ㉔ 상용 발효 후 동결보존제와 혼합한 cell pellet을 동결건조기를 이용하여 건조함
 - ㉔ *Leuconostoc mesenteroides*의 배양 방법을 변경한 후 500L의 MRS 배지를 이용한 발효로 나온 동결건조 분말의 무게는 1980gram이었고, 분말에 포함된 단위 무게 당 생균수의 공인 분석 시험 결과는 8.6×10^{11} CFU/g이었음
- ② 700L 발효기에서의 동결건조 분말 생산량
 - ㉔ *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균 배양액 500L를 연속 원심 분리기를 이용하여 회수함
 - ㉔ *Leuconostoc mesenteroides* 김치유산균을 기존에 배양하던 방법으로 MRS

배지를 사용하여 배양하였을 경우 0.2~0.24 Kg의 동결건조 분말을 100L의 배양액으로부터 얻을 수 있었음

- ㉔ MRS 배지의 배지 성분의 투여량 조절 및 pH조절이 된 500L 발효 후 회수한 *Leuconostoc mesenteroides* 세포를 기존의 방법과 동일한 비율의 동결보존제와 혼합하고 동결건조 과정이 종료된 후 회수한 동결건조 분말의 무게인 0.32-0.39 Kg/100L와 비교하면 배양 방법의 개선에 의해 33~35%의 동결건조 분말 생산량의 증가가 가능하였음
- ㉕ pH 조절을 좀 더 정교하게 진행할 수 있는 반응기 운전에 의해 더 높은 생산량의 획득이 가능할 것으로 보임



[그림] 김치스타터 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*의 동결건조 분말 생산량

다. 연구개발성과

(1) 김치스타터분말 유산균수 분석

(가) 시제품 공인분석기관 검사성적서

① 김치스타터분말의 유산균

: *Leuconostoc* 균주 동결건조 분말제품인 “김치스타터분말”의 유산균 분말내 생존 유산균수 측정




: 균수 측정 단위 CFU/g

② 유산균 균수 측정 공인기관 검사 기관

: 한국기능식품연구원

③ 공인기관 검사 결과

: 유산균 균수, 860,000,000,000/g

제 D2017081109 호 문서화인			시험·검사성적서								
제품명	김치스타터분말	제조일자 (유통기한)	2017-08-07								
시험인	업체명	(주)프르바이오닉	성명	박종하							
	주소	전라북도 전주시 덕성구 원장동길 111-18, 204호, 205호 (장동, 진북생물산업진흥원 바이오식품산업특생태)									
제조번호		검사년월일	2017-08-14								
검사의뢰목적	참고용	접수번호	D2017081109								
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 시험·검사 완료일 : 2017-08-21 시험·검사 책임자 : 이정규 검사관련 총 책임자 : 김진희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>유산균수(/g)</td> <td>860,000,000,000/g</td> <td>고민재</td> </tr> </tbody> </table>						시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원	유산균수(/g)	860,000,000,000/g	고민재
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사원									
유산균수(/g)	860,000,000,000/g	고민재									
<p>* 위 판정은 리피된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. * 지면이 부족한 경우 시험·검사 및 결과판은 별지로 작성 가능합니다.</p> <p style="text-align: center;">2017년 8월 21일 한국기능식품연구원 </p>											
<p>(사)한국전통기능식품협회 부산 한국기능식품연구원 http://www.khfi.re.kr 전화번호 (051)628-0400-1</p>											
 											

[그림] 공인분석기관 검사성적서

(2) 발효 식품용 유산균 스타터 조성물 지적재산권 확보

(가) 특허출원

발명의 명칭 발효 식품 조제용 유산균 스타터 조성물

출원일자 2017.08.18

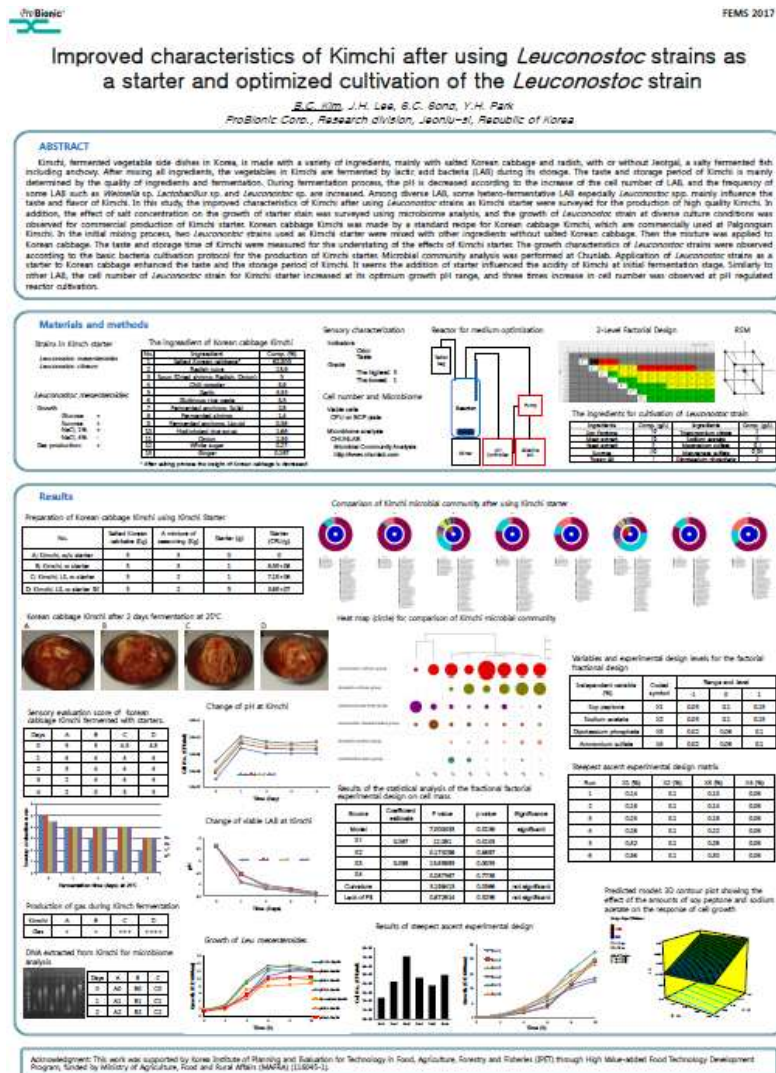
출원번호 10-2017-0104765 (접수번호 1-1-2017-0798368-14)

(3) 학술논문 발표

(가) 국제 학술대회 발표

① FEMS 2017 발표 김치스타터분말의 유산균

② 발표 포스터



[그림] 학술대회발표자료 포스터

㉔ 초록집

FEMS7-0137

Food Microbiology - Part II

IMPROVED CHARACTERISTICS OF KIMCHI AFTER USING LEUCONOSTOC STRAINS AS A STARTER AND OPTIMIZED CULTIVATION OF THE LEUCONOSTOC STRAIN

B.C. Kim¹, J.H. Lee¹, S.C. Song¹, P. Yong-Ha¹

¹*ProBionic Corp., Research division, Jeonju-si, Republic of Korea*

Backgrounds

Kimchi, fermented vegetable side dishes in Korea, is made with a variety of ingredients, mainly with Korean cabbage and radish, with or without Jeotgal, a salty fermented fish. After mixing all ingredients, the vegetables in Kimchi are fermented by lactic acid bacteria (LAB) during its storage. The taste and storage period of Kimchi is mainly determined by the quality of ingredients and fermentation. During fermentation process, the pH is decreased according to the increase of LAB, and the frequency of some LAB such as *Weissella* sp. *Lactobacillus* sp. and *Leuconostoc* sp. are increased. Among diverse LAB, some hetero fermentative LAB especially *Leuconostoc* spp. mainly influence the taste and flavor of Kimchi.

Objectives

In this study, the improved characteristics of Kimchi after using *Leuconostoc* strains as Kimchi starter were surveyed for the production of high-quality Kimchi. In addition, the growth of *Leuconostoc* strain at diverse culture conditions was observed for commercial production of Kimchi starter.

Methods

Korean cabbage Kimchi was made by a standard recipe for Kimchi. In the initial mixing process, *Leuconostoc* strains used as Kimchi starter were mixed with other ingredients without Korean cabbage. Then the mixture was applied to Korean cabbage. The taste and storage time of Kimchi were measured for the understating of the effects of Kimchi starter. The growth characteristics of *Leuconostoc* strains were observed according to the basic bacteria cultivation protocol for the production of Kimchi starter.

Conclusions

Application of *Leuconostoc* strains as a starter to Korean cabbage enhanced the taste and the storage period of Kimchi. It seems the addition of starter influenced the acidity of Kimchi at initial fermentation stage. Similarly to other LAB, the cell number of *Leuconostoc* strain for Kimchi starter increased at its optimum growth pH range, and three times increase in cell number was observed at pH regulated fermentor culture.

[그림] 학술대회 발표자료 초록집

(나) 논문투고

① 논문 발표

㉔ 제목: The intertwine of nanotechnology with the food industry

㉔ 학술지: *Saudi Journal of Biological Sciences*, Accepted 21 September 2017

(4) 김치유산균 스타터 *Leuconostoc mesenteroides* 제조공정서

제 조 공 정 서

제품명	Leuconostoc mesenteroides 동결건조 분말	등록번호	
상호	(주)프로바이옌	사업장소재지	전라북도 전주시 덕진구 원장동길 111-18
전화		팩스	

공정	공정조건	기능성지표	수율
종균배양	종균확인: 종균의 16s rDNA 염기서열 확인 배양배지: MRS broth medium* (별첨1) 배양조건: 37°C, 16~18시간 배양 * 배양배지는 종균배양과 본배양에서 동일	유산균 1×10 ⁸ CFU/mL	100
↓			
본배양	배양배지: MRS broth medium (별첨1) 배양조건: 30~37°C, 16~18시간 배양 종균 및 물: 유산균 3% 및 물 91.494% 투입	유산균 5.00E+9 CFU/mL	100
↓			
균체회수	회전속도: 15,000rpm 시간: 3~4시간 배양 종결 후 냉각상태 유지		0.6
↓			
동결보호제	동결보호제: 단당류, 다당류 (20% 용액) 살균 동결보호제 저온 보관	유산균 수 CFU/g 1.00E+11	0.6
↓			
균현탁	세포현탁: 동결보호제와 혼합 후 균질화	유산균 수 CFU/g 1.00E+11	
↓			
예비동결	동결판 분주: 세포현탁액 동결판에 분주 (무균조작) 예비동결조건: 영하40°C/ 6~12시간		
↓			
동결건조	동결건조조건: 5torr, 영하 40°C에서 영상 20°C로 온도 변화, 60시간		
↓			
분쇄	분쇄기에서 분쇄	유산균 수 CFU/g 1.00E+11	0.19
↓			
사균원말	Leuconostoc mesenteroides 동결건조 분말	유산균 수 CFU/g 1.00E+11	0.19

(5) 사업화성과 및 매출실적

○ 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.05억원	
			향후 3년간 매출	2억원	
		관련제품	개발후 현재까지	50억원	
			향후 3년간 매출	200억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 1% 국외 : 30%	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 5% 국외 : 0%	
			향후 3년간 매출	국내 : 20% 국외 : 50%	
	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
			0.2	2	5
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1	3	5
		국외	0	0.1	0.3
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획					
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)				
	수 출				

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호 D-06

4-1. 목표달성도

○ 정량적 성과 목표 달성

평가항목	단위	비중 (%)	개발목표치	달성 (%)
1. 발효용 최적 pH 김치용 스타터 균주 1종 이상 (<i>Leuconostoc spp.</i> 기준)	CFU/mL	15	균수 증가량 10% 이상	1. pH에 따른 균수 변화 측정 (식품공전 방법) 2. pH 조절로 균수 증가량 10%이상 달성 3. 달성율 100%
2. 상용 스타터용 최적 탄소원 조사	CFU/mL, 개	15	원료 단가 대비 생산성이 가장 높은 탄소원 선정	1. 상이한 탄소원에서 균수 변화 비교 (식품공전 방법) 2. 균체 무게가 가장 높은 탄소원 선정함 3. 달성율 100%
3. 상용 스타터용 최적 질소원 조사	CFU/mL, 개	15	원료 단가 대비 생산성이 가장 높은 질소원 선정	1. 질소원에 따른 균수 변화 비교 (식품공전 방법) 2. 균수 생산성 높은 질소원 선정 3. 달성율 100%
4. 반응표면분석법을 분석	CFU/mL	15	균수 증가량 10% 이상	1. 균수 변화 비교 (식품공전 방법) 2. 균수 증가량 10%이상 달성 3. 달성율 100%
5. 상용배양 및 동결 스타터 분말 (10 ¹¹ CFU/g) 생산 - 김치스타터 생산 - 배양조건 변경 전후의 균수 결과 확인	700L 규모 이상	20	스타터 분말 생산량 25% 이상 증가	1. 동결건조 분말 시제품 생산 및 생산량 25% 증가 확인 2. 시제품 균수의 공인분석으로 균수 10 ¹¹ CFU/g 이상 확인 3. 달성율 100%
6. Pyrosequencing을 이용한 미생물 균종 변화 분석	read/sample	20	100,000 reads 이상 확보	1. 3개의 시험구에 대한 미생물 군집 분석으로 500,000개 이상 reads 확보 및 군집보고서 작성 2. 달성율 100%

○ 사업화지표 및 연구기반지표 달성

성과목표	사업화지표								연구기반지표								
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 연구 등) 활용
	출원	등록		제품화	기술창업	매출출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책 활용	홍보전시	
										SCI	비 SCI						
최종목표	1		1	1	1				1	1							
1차년도	1		1	1	1				1	1							
달성	1		1	1	1				1	1							

4-2. 관련분야 기여도

- 김치 유산균 스타터 생산량 증가
- 유사한 김치유산균인 *Leuconostoc* strain의 생산량 증가를 위한 기초 자료 제공
- 김치에서 개발된 균주의 발효식품용 스타터로 개발 할 수 있는 방안 제시

5. 연구결과의 활용계획

	코드번호	D-07
<ul style="list-style-type: none"> ○ 전통김치의 제조에 스타터 첨가에 의한 영향 홍보자료 ○ Leuconostoc 균주 김치스타터사용에 의해 발생할 수 있는 gas 예측 ○ 유산균 배양 최적화 ○ 김치 유산균 스타터의 효과 홍보 ○ 개발된 김치 유산균의 스타터를 이용한 신제품 개발 ○ 개발된 배양 방법으로 유산균 분말의 생산단가 저감 ○ 미생물 군집 분석 결과를 바탕으로 한 스타터 첨가에 의한 군집영향 분석 		

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08
<ul style="list-style-type: none"> ○ FEMS 2017 학회 참석 수집 정보 <ul style="list-style-type: none"> : 미생물 생육의 열역학적 이론에 근거한 미생물 생동성 및 군집 형태 분석 : 유산균 배양 예측이 가능한 kinetic modeling : Defined 배지성분을 이용한 미생물 배양에서는 kinetic modeling이 가능함 : 관련 전문가 <ul style="list-style-type: none"> Dr Theodore Bouchez Group leader Hydrosystems and bioprocesses research unit Irstea-Antony, France : 논문, Desmond-Le Quéméner & Bouchez, 2014 		

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 보안 관련 없음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

○ 장비구입현황 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 연구실 안전조치</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 실험실 관리: 책임연구원이 연구원의 안전 준수사항을 관리 2) 관리위험등급 지정하여 올바른 취급방법으로 보관 및 사용 3) 실험실 환기, 소화설비 점검 <p>○ 교육 훈련</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구 활동에 기여하고자 일회 교육 및 소방 훈련 실시 2) 교육대상: 기술연구소 기수연구원 전원 등 3) 교육구분 <ul style="list-style-type: none"> - 정기교육 : 매월 1회 교육 - 비정기 임시교육 : 사이버 교육 환경안전교육 등(홈페이지 개설 동영상교육), 자료/유인물 등 		

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/특허/기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허출원일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	특허	발효 식품 조제용 유산균 스타터 조성물	(주)프로바 이오닉	주관	대한민국		2017.08.18	단독	
2	논문	The Intertwine of Nanotechnology with the Food Industry	(주)프로바 이오닉	공동	Saudi Journal of Biological Sciences	1.78	2017.	단독	SCIE

11. 기타사항

	코드번호	D-13
○		

12. 참고문헌

코드번호	D-14
○ Byoung Seung Jeon, Chuloo Moon, Byung-Chun Kim, Hyunook Kim, Youngsoon Um & Byoung-In Sang (2013) In situ extractive fermentation for the production of hexanoic acid from galactitol by <i>Clostridium</i> sp. BS-1, <i>Enzyme Microb Technol.</i> 53: 143-51.	
○ Myungjin Kim, Jongsik Chun (2005) Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis <i>International Journal of Food Microbiology</i> 103 91- 96	
○ Patra JK, Das G, Paramithiotis S and Shin H-S (2016) Kimchi and Other Widely Consumed Traditional Fermented Foods of Korea: A Review. <i>Front. Microbiol.</i> 7:1493. doi: 10.3389/fmicb.2016.01493	
○ Ji Young Jung, Se Hee Lee, Hyo Jung Lee, Hye-Young Seo, Wan-Soo Park, Che Ok Jeon (2012) Effects of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. <i>International Journal of Food Microbiology</i> 153 378-387	
○ Park Kun Young, Jeong Ji Kang, Lee Young Eun, and Daily James W. III. (2014) Health Benefits of Kimchi (Korean Fermented Vegetables) as a Probiotic Food <i>Journal of Medicinal Food.</i> 17(1): 620. doi:10.1089/jmf.2013.3083.	
○ Jounghoon Hwang, Jinchul Kim, Hyungsil Moon, Jiyeon Yang, Mee Kyung Kim (2017) Determination of sodium contents in traditional fermented foods in Korea. <i>Journal of Food Composition and Analysis.</i> 56: 110-114	
○ Dong Woon Kim, Sang Buem Cho, Young Hwa Kim, Sung Daw Lee, Hyun Jung Jung, Sang Ho Kim, Kyu Ho Cho, Soo Jin Sa, In Cheul Kim, Mi-Young Won, Su-Ok, Kim and Soo-Ki Kim (2012) Screening of effective medium composition for the cultivation of <i>Lactobacillus plantarum</i> and <i>Lactobacillus reuteri</i> using statistical methods. <i>Journal of Life Science</i> 22. 575~581	
○ Fernanda Fonseca, Stéphanie Cenard, Stéphanie Passot. Freeze-drying of lactic acid bacteria. <i>Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols</i> , 1257, Humana Press Inc., 12 p., 2015, <i>Methods in Molecular Biology</i> , 978-1-4939-2192-8.	
○ Desmond-Le Quéméner E1, Bouchez T1. A thermodynamic theory of microbial growth. <i>ISME J.</i> 2014 8(8): 1747-51.	

천랩 결과 리포트

ChunLab,Inc.

2017.11.28

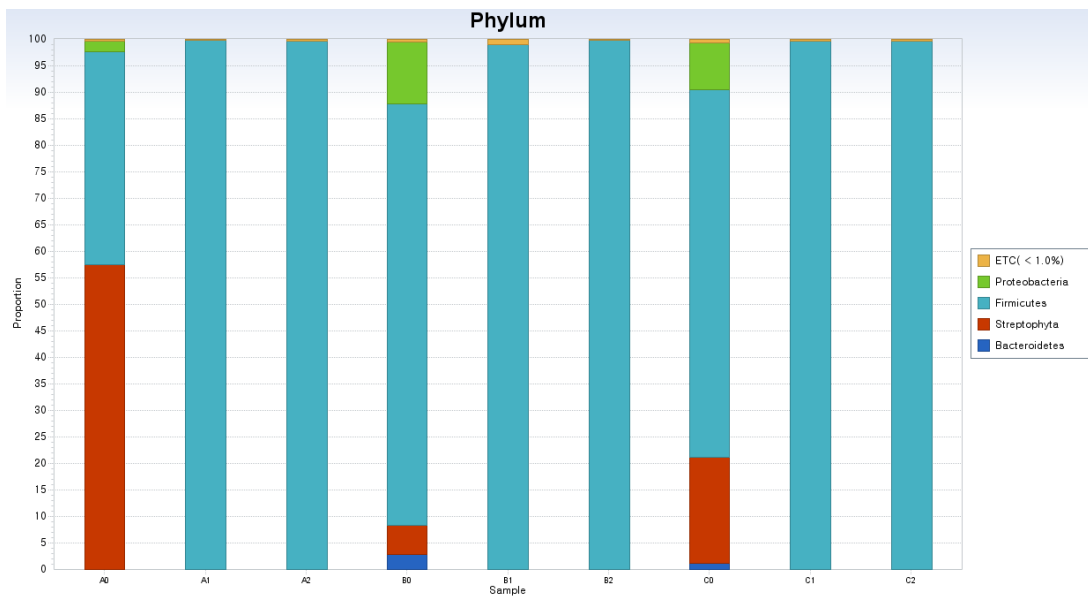
성 명: 김 병 천
소 속: 프로바이오닉
분석시행사: (주) 천 랩

www.chunlab.com

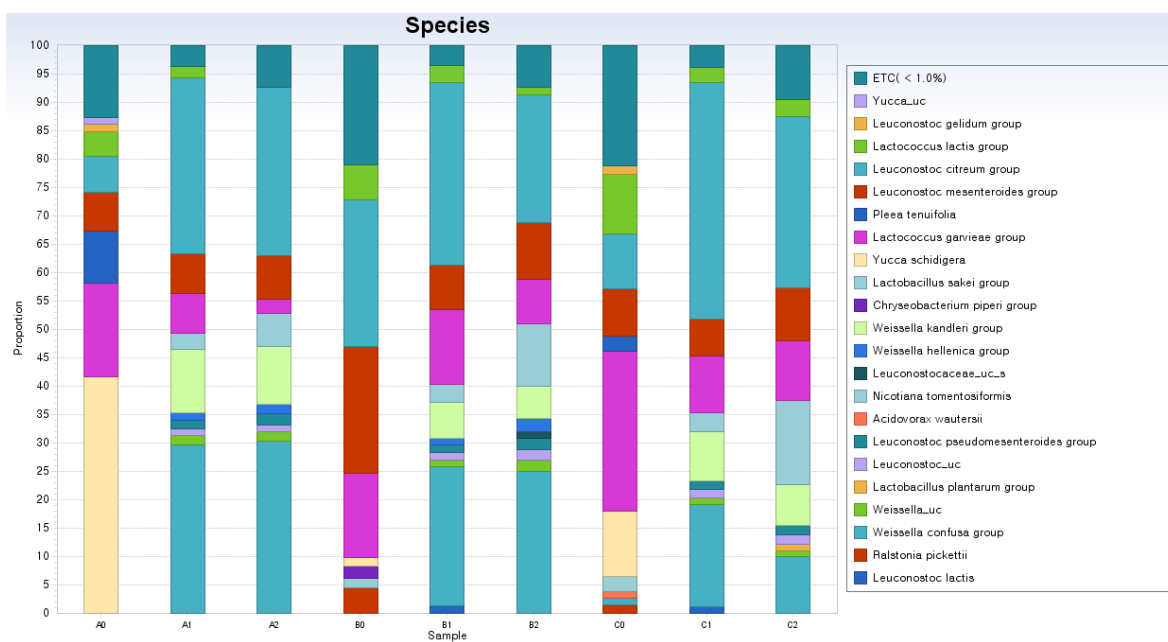
1. 분석 책임자: 김 병 천
2. 소 속: 프로바이오틱
3. 분석 시행사: (주) 천 랩
4. 과 제 명: Microbial community analysis
5. 분석결과: Illumina Miseq 플랫폼을 이용한 NGS sequencing 데이터 결과 분석

A. Taxonomic Composition Chart 구성

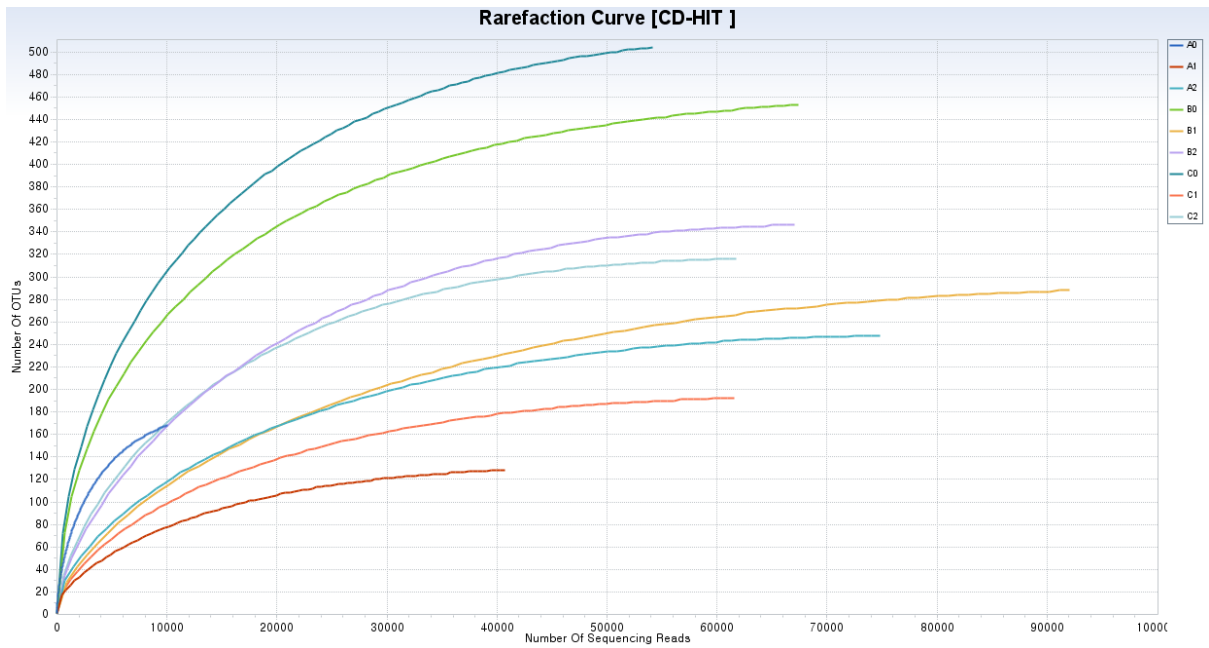
Phylum level



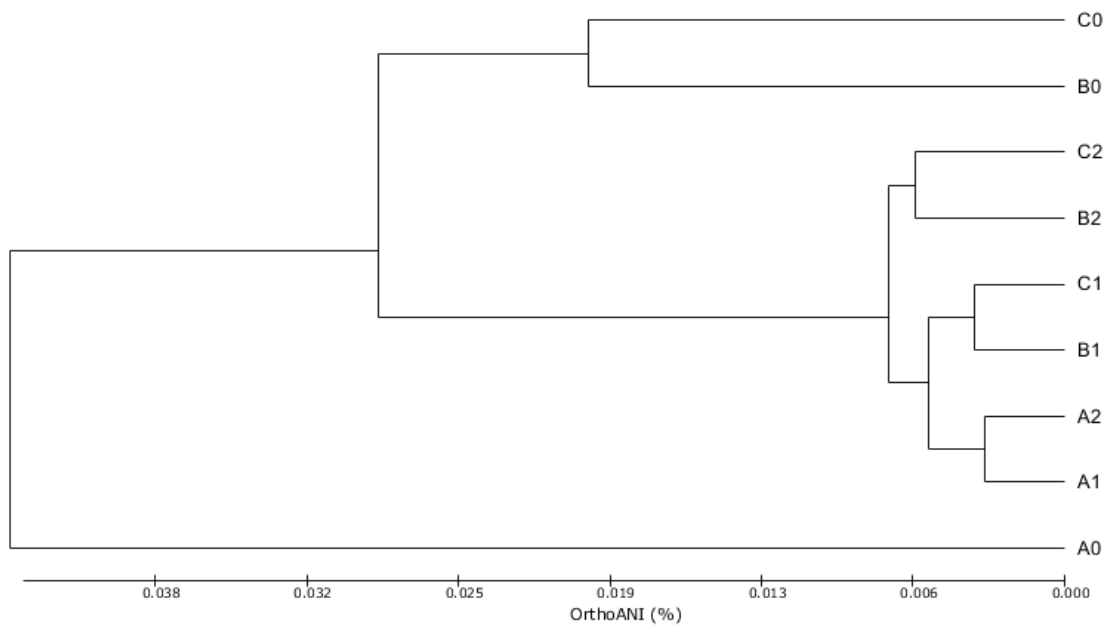
Species level



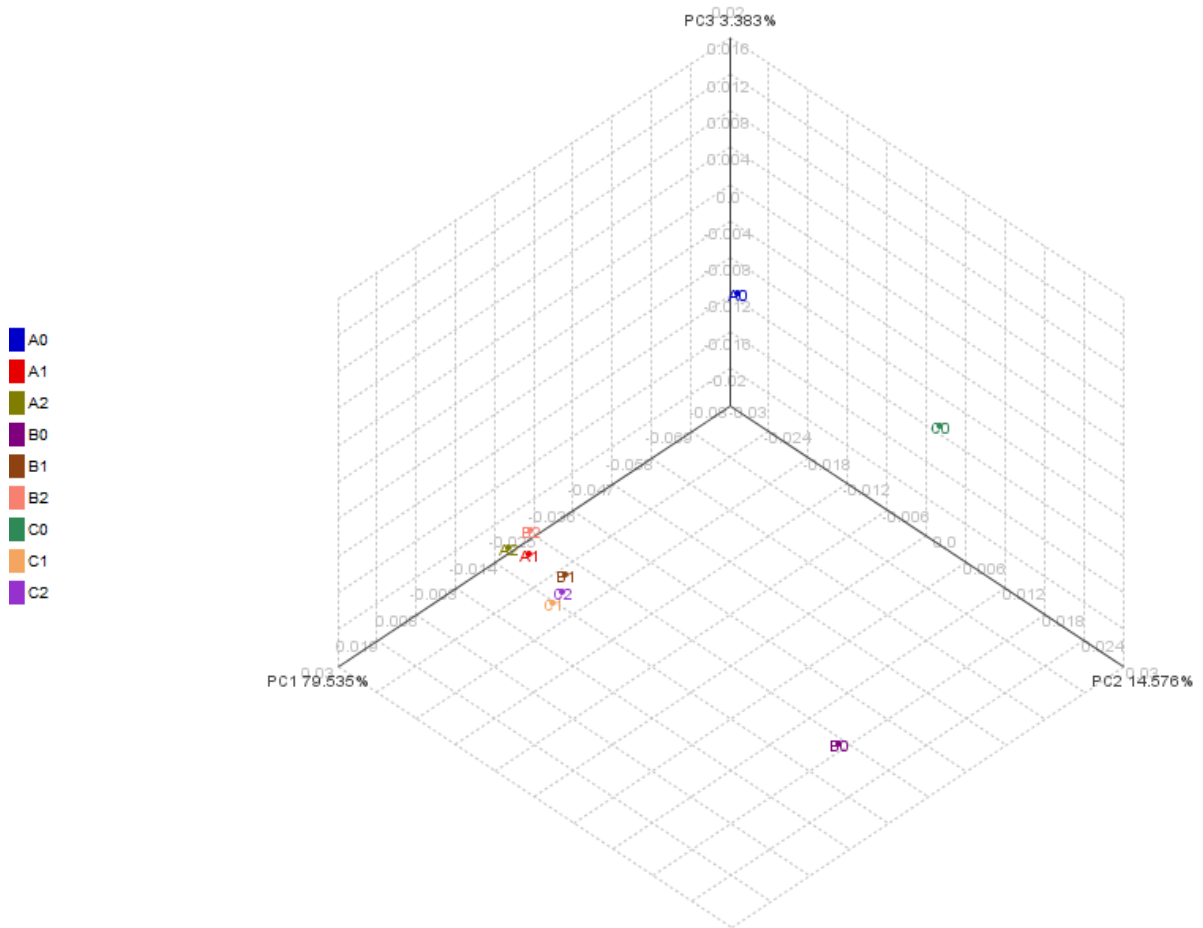
B. Rarefaction Curve



C. UPGMA Dendrogram



D. PCO 3D



* 분석 데이터는 “data.chunlab.com” 에서 다운로드 가능합니다. (분석 데이터 첨부)

상기 내용에 따라 모든 분석을 완료하였습니다.

2017 년 11 월 28 일

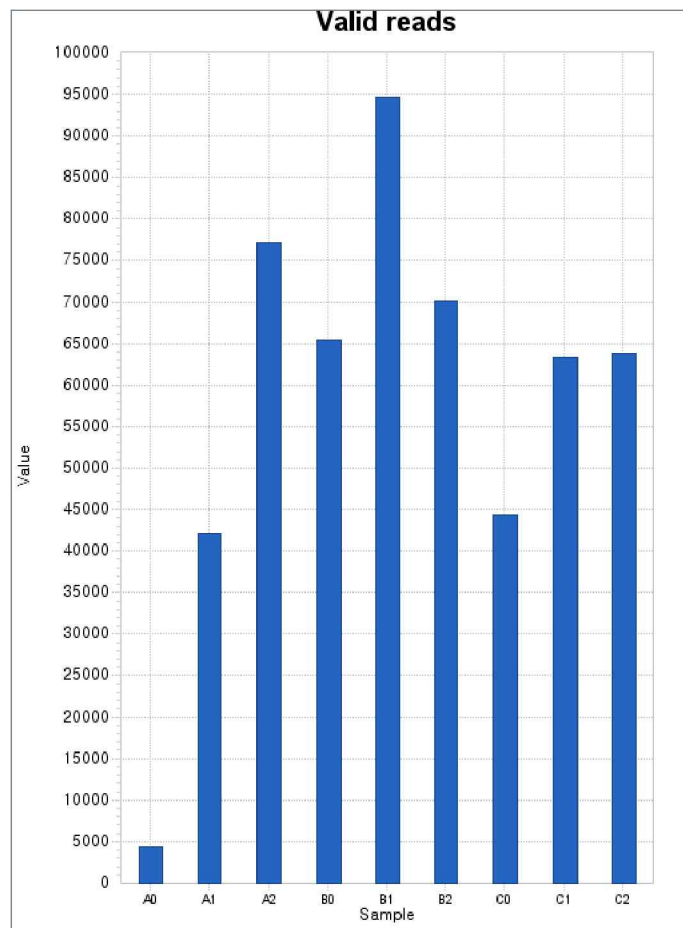
(주) 천 랩



분석 데이터 1). 김치시료의 미생물군집용 pyrosequencing 결과 valid reads 비교

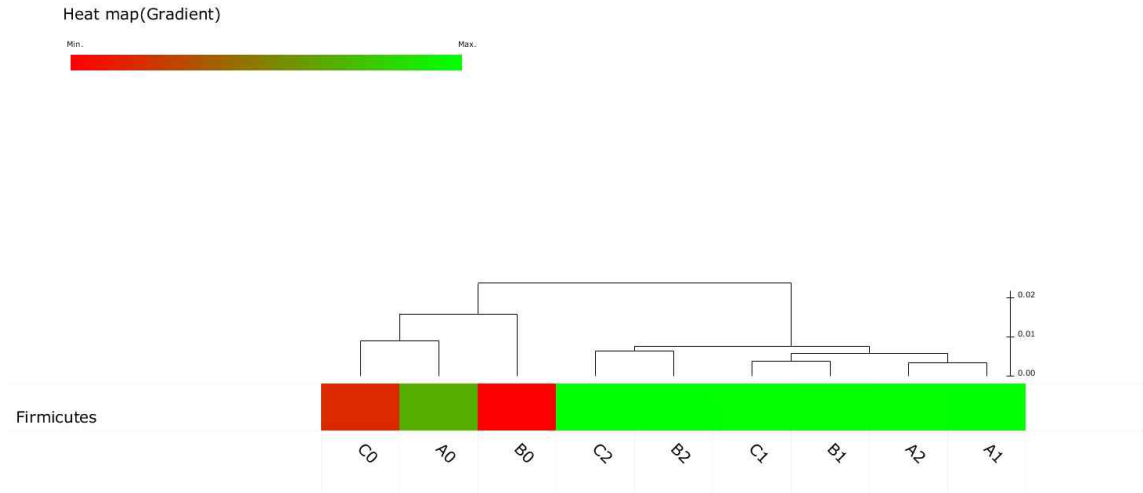
[표] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 reads 수 비교

Sample	Valid reads	OTUs	Chao 1	HCI	LCI	JackKn life	NPS Shannon	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
A0	4394	168	185	206	175	204	2.2	2.17	0.23	99.64
A1	42074	128	130	138	128	142	1.88	1.87	0.22	99.97
A2	77233	248	249	253	248	259	2.03	2.02	0.21	99.99
B0	65384	453	464	479	458	496	2.72	2.71	0.15	99.94
B1	94642	288	292	301	289	317	1.99	1.98	0.21	99.97
B2	70146	346	346	350	346	356	2.3	2.30	0.16	99.99
C0	44436	504	521	538	512	561	2.97	2.96	0.13	99.89
C1	63372	192	193	197	192	203	1.89	1.88	0.24	99.98
C2	63897	316	317	322	316	328	2.35	2.34	0.16	99.98

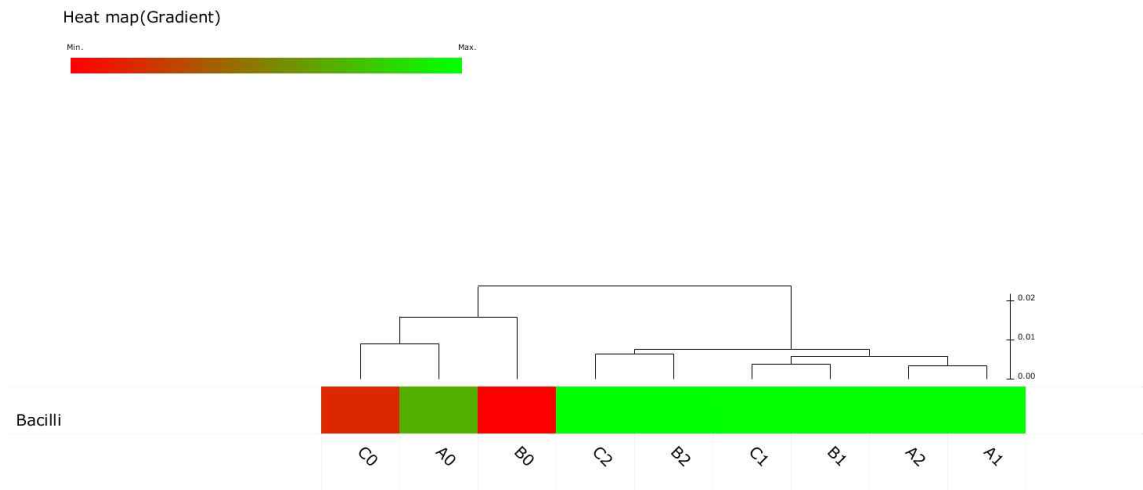


[그림] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 reads 수 비교

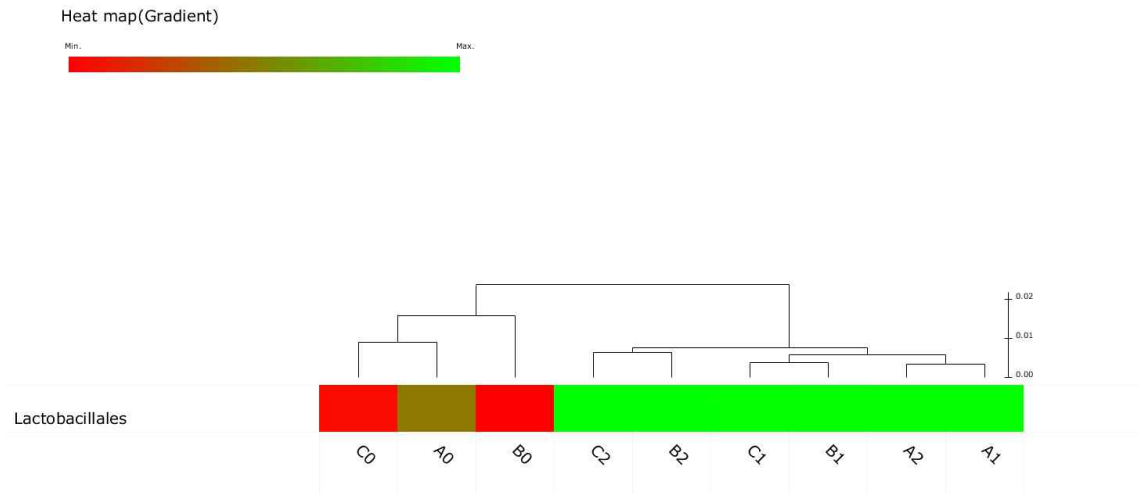
분석 데이터 2). 김치 미생물의 heat map 분석



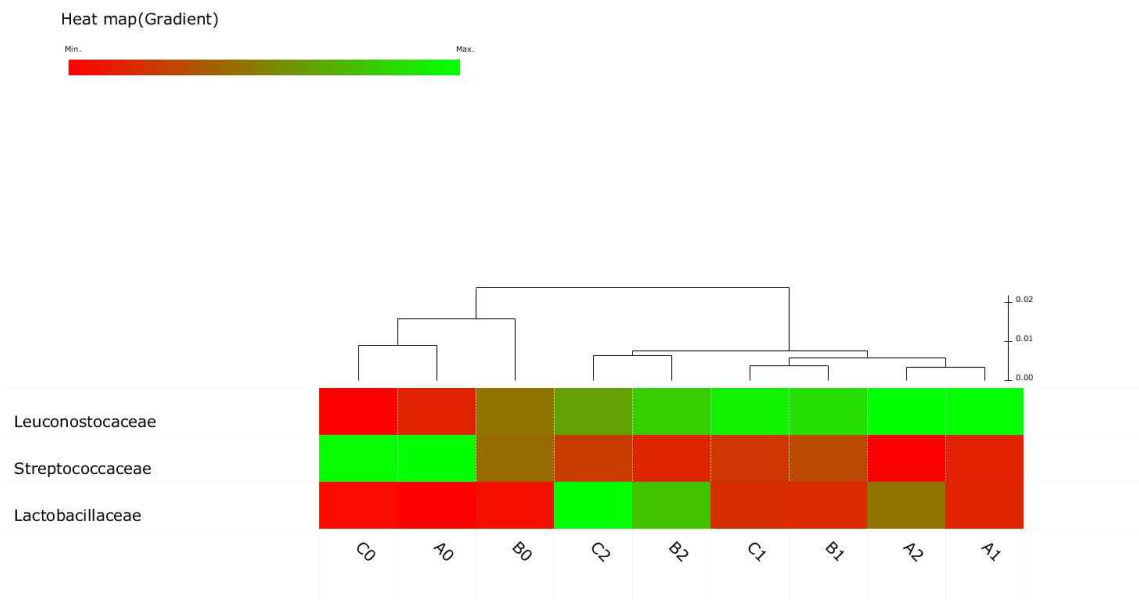
[그림] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 Phylum 수준의 heat map



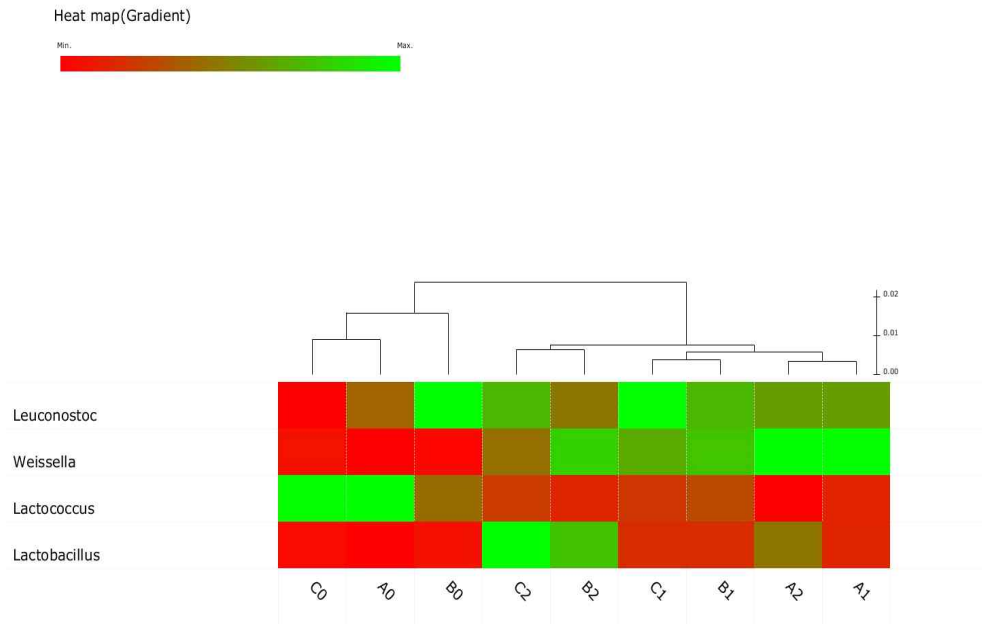
[그림] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 Class 수준의 heat map



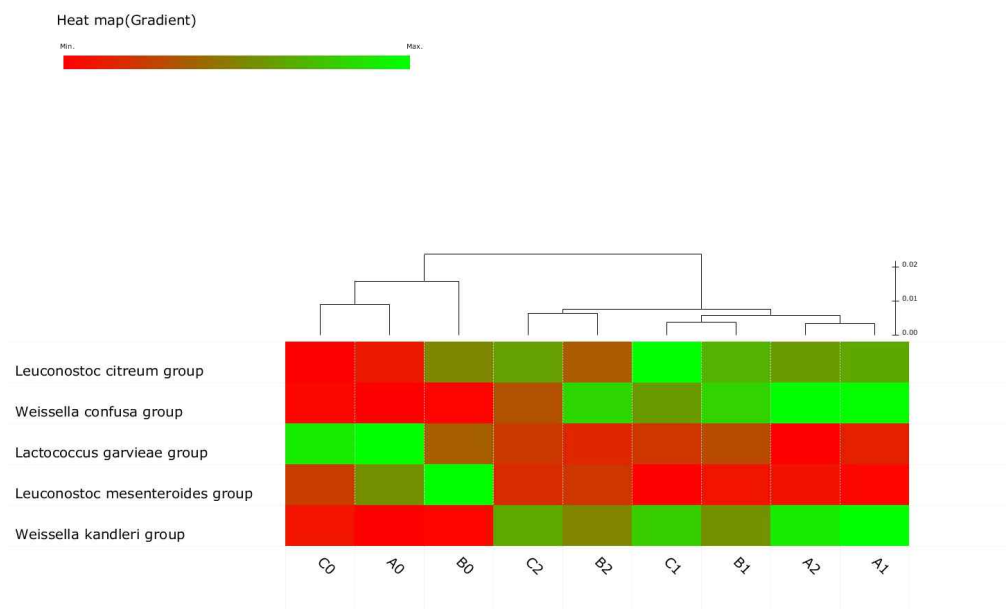
[그림] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 Order 수준의 heat map



[그림] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 Family 수준의 heat map



[그림] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 Genus 수준의 heat map



[그림] 김치 미생물의 군집 분석용 시료의 Species 수준의 heat map

분석 데이터 3). 김치시료 미생물의 Phylum 수준의 분석

[표] 김치 미생물의 군집 분석용 시료에서 확보한 Phylum 수준의 read 수

No	Phylum Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2	Sum (Number)
1	Firmicutes	4161	42001	77065	54993	94180	70051	38500	63205	63781	507937
2	Proteobacteria	194	36	132	8082	364	79	4938	142	101	14068
3	Bacteroidetes	6	16	12	1942	71	9	649	14	3	2722
4	Actinobacteria	28	9	15	245	25	0	253	6	4	585
5	Tenericutes	4	0	0	55	0	0	45	0	0	104
6	Saccharibacteria_TM7	0	0	0	22	0	0	9	0	0	31
7	Verrucomicrobia	0	9	1	10	0	0	7	0	4	31
8	Bacteria_uc	0	2	7	0	2	5	1	4	4	25
9	Cyanobacteria	1	0	1	13	0	0	9	0	0	24
10	Rhodothermaeota	0	0	0	11	0	0	12	0	0	23
11	Deferribacteres	0	0	0	0	0	2	5	1	0	8
12	TM6	0	0	0	0	0	0	7	0	0	7
13	Peregrinibacteria	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6
14	Chloroflexi	0	1	0	2	0	0	0	0	0	3
15	Spirochaetes	0	0	0	2	0	0	0	0	0	2
16	Chlamydiae	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
17	Nitrospirae	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1

[표] 김치 미생물의 군집 분석용 시료에서 확보한 Phylum 수준의 read의 구성

No.	Phylum Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2
1	Firmicutes	94.69	99.82	99.78	84.10	99.51	99.86	86.64	99.73	99.81
2	Proteobacteria	4.415	0.086	0.171	$\frac{12,36}{1}$	0.385	0.113	11.11	0.224	0.158
3	Bacteroidetes	0.137	0.038	0.016	2.970	0.075	0.013	1.461	0.022	0.005
4	Actinobacteria	0.637	0.021	0.019	0.375	0.026	0.000	0.569	0.009	0.006
5	Tenericutes	0.091	0.000	0.000	0.084	0.000	0.000	0.101	0.000	0.000
6	Saccharibacteria_TM7	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000
7	Verrucomicrobia	0.000	0.021	0.001	0.015	0.000	0.000	0.016	0.000	0.006
8	Bacteria_uc	0.000	0.005	0.009	0.000	0.002	0.007	0.002	0.006	0.006
9	Cyanobacteria	0.023	0.000	0.001	0.020	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000
10	Rhodothermaeota	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000
11	Deferribacteres	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.011	0.002	0.000
12	TM6	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000
13	Peregrinibacteria	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
14	Chloroflexi	0.000	0.002	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
15	Spirochaetes	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
16	Chlamydiae	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
17	Nitrospirae	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000

분석 데이터 4). 김치시료 미생물의 Order 수준의 분석

[표] 김치 미생물의 군집 분석용 시료에서 확보한 Order 수준의 read 수

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2
1	Lactobacillales	3936	41968	77021	52743	94121	70020	36215	63181	63768
2	Burkholderiales	12	12	9	4249	84	7	1872	21	11
3	Bacillales	224	24	24	2035	48	28	2125	23	11
4	Flavobacteriales	4	0	0	1690	60	5	324	5	0
5	Rhizobiales	51	5	29	887	148	14	563	35	19
6	Enterobacteriales	49	2	23	472	39	12	625	23	15
7	Sphingomonadales	28	6	39	315	13	27	511	14	31
8	Pseudomonadales	7	2	10	473	14	9	377	33	13
9	Vibrionales	3	0	0	556	4	1	178	3	0
10	Xanthomonadales	5	2	3	502	22	0	166	3	0
11	Sphingobacteriales	2	5	0	219	10	1	295	4	0
12	Oceanospirillales	23	5	12	278	21	2	169	5	6
13	Caulobacterales	1	0	7	64	2	2	349	5	5
14	Micrococcales	22	0	7	124	8	0	165	6	2
15	Clostridiales	0	4	6	87	5	3	95	0	2
16	Alteromonadales	3	0	0	146	0	5	47	0	0
17	Halanaerobiales	0	0	3	111	0	0	46	0	0
18	Corynebacteriales	3	0	0	67	9	0	47	0	2
19	Mycoplasmatales	4	0	0	55	0	0	45	0	0
20	Bacteroidales	0	10	12	22	1	3	19	5	3
21	Methylophilales	5	0	0	54	0	0	8	0	0
22	Rhodospirillales	2	0	0	25	3	0	37	0	0
23	Micromonosporales	3	4	8	31	0	0	8	0	0
24	Propionibacteriales	0	2	0	7	7	0	19	0	0
25	Saccharimonas_o	0	0	0	22	0	0	9	0	0
26	Legionellales	3	0	0	8	4	0	12	0	0
27	Bacteria_uc_o	0	2	7	0	2	5	1	4	4
28	Balneolales	0	0	0	11	0	0	12	0	0
29	Verrucomicrobiales	0	9	1	2	0	0	7	0	4
30	Cytophagales	0	0	0	11	0	0	11	0	0
31	Campylobacterales	0	0	0	8	0	0	8	0	0
32	Bacilli_uc	1	1	7	0	4	0	2	0	0
33	JF417809_o	0	0	1	6	0	0	8	0	0
34	Hydrogenophilales	0	0	0	9	0	0	6	0	0
35	Tissierellales	0	0	0	6	0	0	7	0	0
36	Erysipelotrichales	0	0	2	5	2	0	3	1	0
37	Rhodobacterales	0	0	0	9	0	0	3	0	0
38	Pseudonocardiales	0	0	0	6	1	0	2	0	0
39	Frankiales	0	0	0	3	0	0	5	0	0
40	Deferribacterales	0	0	0	0	0	2	5	1	0

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2
41	Acidaminococcales	0	2	0	0	0	0	5	0	0
42	Babela_o	0	0	0	0	0	0	7	0	0
43	Kineosporiales	0	3	0	1	0	0	3	0	0
44	Bdellovibrionales	0	0	0	1	5	0	0	0	0
45	DQ395705_o	0	0	0	6	0	0	0	0	0
46	Selenomonadales	0	1	0	5	0	0	0	0	0
47	ASND_o	0	0	0	6	0	0	0	0	0
48	Opitutales	0	0	0	5	0	0	0	0	0
49	Desulfovibrionales	0	0	0	5	0	0	0	0	0
50	Sterolibacterium_o	0	0	0	5	0	0	0	0	0
51	Acidiferrobacterales	0	0	0	2	0	0	3	0	0
52	Solirubrobacterales	0	0	0	5	0	0	0	0	0
53	Cellvibrionales	0	0	0	2	0	0	2	0	0
54	Stigonematales	0	0	0	4	0	0	0	0	0
55	AB240334_o	0	0	0	0	0	0	4	0	0
56	Myxococcales	0	0	0	3	0	0	0	0	0
57	Betaproteobacteria_uc	0	0	0	2	0	0	0	0	1
58	Pedosphaera_o	0	0	0	3	0	0	0	0	0
59	Desulfobulbaceae_o	0	0	0	0	3	0	0	0	0
60	Ignatzschinaria_o	2	0	0	0	0	0	1	0	0
61	Spirochaetales	0	0	0	2	0	0	0	0	0
62	Firmicutes_uc_o	0	0	2	0	0	0	0	0	0
63	HM996811_o	0	0	0	0	0	0	2	0	0
64	Anaerolineales	0	0	0	2	0	0	0	0	0
65	Chroococcales	0	0	0	2	0	0	0	0	0
66	JQ650114_o	0	0	0	1	0	0	1	0	0
67	Bradymonadales	0	0	0	0	2	0	0	0	0
68	Coriobacteriales	0	0	0	1	0	0	0	0	0
69	Pleurocapsales	1	0	0	0	0	0	0	0	0
70	Nitrospirales	0	0	0	0	0	0	1	0	0
71	Veillonellales	0	0	0	1	0	0	0	0	0
72	Pasteurellales	0	1	0	0	0	0	0	0	0
73	AF269002_o	0	0	0	1	0	0	0	0	0
74	Bacteroidia_uc	0	1	0	0	0	0	0	0	0
75	Thiobacillus_o	0	1	0	0	0	0	0	0	0
76	AY234747_o	0	0	0	0	0	0	1	0	0
77	Chlamydiales	0	0	0	1	0	0	0	0	0
78	Clostridia_uc	0	1	0	0	0	0	0	0	0
79	DQ129389_o	0	1	0	0	0	0	0	0	0

[표] 김치 미생물의 군집 분석용 시료에서 확보한 Order 수준의 read의 구성

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2
1	Lactobacillales	89.57	99.74	99.72	80.66	99.45	99.82	81.49	99.69	99.79
2	Burkholderiales	0.273	0.029	0.012	6.499	0.089	0.010	4.213	0.033	0.017
3	Bacillales	5.098	0.057	0.031	3.112	0.051	0.040	4.782	0.036	0.017
4	Flavobacteriales	0.091	0.000	0.000	2.585	0.063	0.007	0.729	0.008	0.000
5	Rhizobiales	1.161	0.012	0.038	1.357	0.156	0.020	1.267	0.055	0.030
6	Enterobacteriales	1.115	0.005	0.030	0.722	0.041	0.017	1.407	0.036	0.023
7	Sphingomonadales	0.637	0.014	0.051	0.482	0.014	0.038	1.150	0.022	0.049
8	Pseudomonadales	0.159	0.005	0.013	0.723	0.015	0.013	0.848	0.052	0.020
9	Vibrionales	0.068	0.000	0.000	0.850	0.004	0.001	0.401	0.005	0.000
10	Xanthomonadales	0.114	0.005	0.004	0.768	0.023	0.000	0.374	0.005	0.000
11	Sphingobacteriales	0.046	0.012	0.000	0.335	0.011	0.001	0.664	0.006	0.000
12	Oceanospirillales	0.523	0.012	0.016	0.425	0.022	0.003	0.380	0.008	0.009
13	Caulobacterales	0.023	0.000	0.009	0.098	0.002	0.003	0.785	0.008	0.008
14	Micrococcales	0.501	0.000	0.009	0.190	0.008	0.000	0.371	0.009	0.003
15	Clostridiales	0.000	0.010	0.008	0.133	0.005	0.004	0.214	0.000	0.003
16	Alteromonadales	0.068	0.000	0.000	0.223	0.000	0.007	0.106	0.000	0.000
17	Halanaerobiales	0.000	0.000	0.004	0.170	0.000	0.000	0.104	0.000	0.000
18	Corynebacteriales	0.068	0.000	0.000	0.102	0.010	0.000	0.106	0.000	0.003
19	Mycoplasmatales	0.091	0.000	0.000	0.084	0.000	0.000	0.101	0.000	0.000
20	Bacteroidales	0.000	0.024	0.016	0.034	0.001	0.004	0.043	0.008	0.005
21	Methylophilales	0.114	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000
22	Rhodospirillales	0.046	0.000	0.000	0.038	0.003	0.000	0.083	0.000	0.000
23	Micromonosporales	0.068	0.010	0.010	0.047	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000
24	Propionibacteriales	0.000	0.005	0.000	0.011	0.007	0.000	0.043	0.000	0.000
25	Saccharimonas_o	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000
26	Legionellales	0.068	0.000	0.000	0.012	0.004	0.000	0.027	0.000	0.000
27	Bacteria_uc_o	0.000	0.005	0.009	0.000	0.002	0.007	0.002	0.006	0.006
28	Balneolales	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.027	0.000	0.000
29	Verrucomicrobiales	0.000	0.021	0.001	0.003	0.000	0.000	0.016	0.000	0.006
30	Cytophagales	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000
31	Campylobacterales	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000
32	Bacilli_uc	0.023	0.002	0.009	0.000	0.004	0.000	0.005	0.000	0.000
33	JF417809_o	0.000	0.000	0.001	0.009	0.000	0.000	0.018	0.000	0.000
34	Hydrogenophilales	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000
35	Tissierellales	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000
36	Erysipelotrichales	0.000	0.000	0.003	0.008	0.002	0.000	0.007	0.002	0.000
37	Rhodobacterales	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
38	Pseudonocardiales	0.000	0.000	0.000	0.009	0.001	0.000	0.005	0.000	0.000
39	Frankiales	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000
40	Deferribacterales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.011	0.002	0.000

No.	Order Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2
41	Acidaminococcales	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.000	0.000
42	Babela_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000
43	Kineosporiales	0.000	0.007	0.000	0.002	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
44	Bdellovibrionales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000
45	DQ395705_o	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
46	Selenomonadales	0.000	0.002	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
47	ASND_o	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48	Opitutales	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
49	Desulfovibrionales	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
50	Sterolibacterium_o	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
51	Acidiferrobacterales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000
52	Solirubrobacterales	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
53	Cellvibrionales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000
54	Stigonematales	0.000	0.000	0.000	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
55	AB240334_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.009	0.000	0.000
56	Myxococcales	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
57	Betaproteobacteria_uc	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002
58	Pedosphaera_o	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
59	Desulfobulbaceae_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000
60	Ignatzschineria_o	0.046	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
61	Spirochaetales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
62	Firmicutes_uc_o	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
63	HM996811_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000
64	Anaerolineales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
65	Chroococcales	0.000	0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
66	JQ650114_o	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
67	Bradymonadales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000
68	Coriobacteriales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
69	Pleurocapsales	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
70	Nitrospirales	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
71	Veillonellales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
72	Pasteurellales	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
73	AF269002_o	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
74	Bacteroidia_uc	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
75	Thiobacillus_o	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
76	AY234747_o	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000
77	Chlamydiales	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
78	Clostridia_uc	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
79	DQ129389_o	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

분석 데이터 5). 김치시료 미생물의 주요 균주 Genus의 분석

[표] 3종류의 김치 시료의 Genus 수준의 read중 상위 0.1% 이상 구성 비율

Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2
Leuconostoc	0.30	3.38	6.20	6.62	8.07	5.08	2.14	6.38	5.46
Weissella	0.01	3.54	6.54	0.24	6.04	4.74	0.32	3.55	2.35
Lactococcus	0.42	0.76	0.44	2.84	3.03	1.29	4.20	1.58	1.70
Lactobacillus	0.00	0.24	1.34	0.17	0.61	1.99	0.08	0.42	2.43
Ralstonia	0.00	0.00	0.00	0.65	0.01	0.00	0.17	0.00	0.00
Bacillus	0.04	0.00	0.00	0.28	0.01	0.00	0.31	0.00	0.00
Leuconostocaceae_uc	0.00	0.05	0.11	0.02	0.12	0.15	0.01	0.06	0.10
Chryseobacterium	0.00	0.00	0.00	0.30	0.01	0.00	0.03	0.00	0.00
Sphingomonas	0.01	0.00	0.01	0.05	0.00	0.00	0.10	0.00	0.01
Acidovorax	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.13	0.00	0.00
Pseudomonas	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.06	0.01	0.00
Lactobacillaceae_uc	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.04	0.00	0.01	0.05
Paraburkholderia	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
Streptococcaceae_uc	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
Aureimonas	0.00	0.00	0.00	0.09	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00
Xanthomonas	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
Rhizobium	0.00	0.00	0.00	0.03	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00

분석 데이터 6). 김치시료 미생물의 주요 균주 Species의 분석

[표] 3종류의 김치 시료의 species 수준의 read중 상위 0.1% 이상 구성 비율

Name	A0	A1	A2	B0	B1	B2	C0	C1	C2
<i>Leuconostoc citreum</i>	0.13	2.48	4.36	3.39	5.82	2.99	1.01	5.04	3.67
<i>Weissella confusa</i>	0.00	2.38	4.45	0.09	4.45	3.34	0.12	2.19	1.21
<i>Lactococcus garvieae</i>	0.32	0.57	0.36	1.95	2.36	1.05	2.99	1.20	1.27
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.13	0.56	1.14	2.94	1.42	1.34	0.89	0.79	1.14
<i>Weissella kandleri</i>	0.00	0.90	1.50	0.04	1.13	0.76	0.08	1.06	0.88
<i>Lactobacillus sakei</i>	0.00	0.22	0.85	0.10	0.59	1.47	0.05	0.40	1.81
<i>Lactococcus lactis</i>	0.09	0.16	0.06	0.81	0.55	0.18	1.12	0.32	0.35
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	0.00	0.12	0.29	0.02	0.25	0.27	0.01	0.18	0.20
<i>Leuconostoc_uc</i>	0.01	0.10	0.18	0.12	0.24	0.23	0.03	0.18	0.20
<i>Weissella_uc</i>	0.00	0.13	0.26	0.01	0.22	0.27	0.01	0.14	0.13
<i>Weissella hellenica</i>	0.00	0.10	0.24	0.02	0.20	0.32	0.03	0.12	0.11
<i>Leuconostoc lactis</i>	0.00	0.08	0.12	0.04	0.23	0.11	0.04	0.13	0.10
<i>Ralstonia pickettii</i>	0.00	0.00	0.00	0.60	0.01	0.00	0.16	0.00	0.00
<i>Leuconostoc gelidum</i>	0.03	0.03	0.09	0.11	0.09	0.10	0.15	0.05	0.11
<i>Leuconostocaceae_uc_s</i>	0.00	0.05	0.11	0.02	0.12	0.15	0.01	0.06	0.10
<i>Lactococcus_uc</i>	0.01	0.02	0.01	0.07	0.12	0.06	0.08	0.06	0.08
<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.00	0.00	0.07	0.06	0.00	0.08	0.02	0.00	0.14
<i>Lactobacillus brevis</i>	0.00	0.00	0.11	0.01	0.00	0.07	0.01	0.01	0.10
<i>Lactobacillus_uc</i>	0.00	0.01	0.06	0.00	0.01	0.10	0.00	0.01	0.12
<i>Lactobacillus farciminis</i>	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00	0.10
<i>Weissella diestrammenae</i>	0.00	0.04	0.08	0.00	0.04	0.05	0.00	0.05	0.03
<i>Chryseobacterium piperi</i>	0.00	0.00	0.00	0.27	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.11	0.00	0.00	0.09
<i>Bacillus subtilis</i>	0.01	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00
<i>Weissella ghanensis</i>	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.09	0.00	0.00
<i>Acidovorax wautersii</i>	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00	0.13	0.00	0.00
<i>Lactobacillaceae_uc_s</i>	0.00	0.00	0.02	0.00	0.01	0.04	0.00	0.01	0.05
<i>Streptococcaceae_uc_s</i>	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
<i>Bacillus cereus</i>	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
<i>Aureimonas ureilytica</i>	0.00	0.00	0.00	0.08	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00
<i>Xanthomonas campestris</i>	0.00	0.00	0.00	0.08	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.04	0.00	0.00

주 의

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