

발간등록번호

11-1543000-001696-01

비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제 개발 최종보고서

2017. 03. 31.

주관연구기관 / 조선대학교 김치연구센터
협동연구기관 / 대상FNF(주)
한국화학융합시험연구원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제 개발”(개발기간 : 2013.11.20 ~ 2016.11.19.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 03. 31.

주관연구기관명 : 조선대학교 산학협력단 (대표자) 이 인 화 (인)
협동연구기관명 : 한국화학융합시험연구원 (대표자) 변 중 략 (인)
참여기관명 : 대상FNF(주) (대표자) 최 정 호 (인)



주관연구책임자 : 장 해 춘
협동연구책임자 : 고 상 범
참여기관책임자 : 류 병 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	313027-3	해당 단계 연구 기간	2013.11.20. -2016.11.19	단계 구분	3/3
연구 사업명	중 사업명	농식품기술개발서			
	세부 사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구 과제명	대 과제명	해당 없음			
	세부 과제명	비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제 개발			
연구 책임자	장해춘	해당단계 참여 연구원 수	총: 37명 내부: 37명 외부: 0명	해당단계 연구 개발비	정부: 300,000천원 민간: 200,000천원 계: 500,000천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 117명 내부: 117명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 900,000천원 민간: 600,000천원 계: 1,500,000천원
연구기관명 및 소속부서명	조선대학교 김치연구센터/식품영양학과			참여기업명 대상FNF(주)	
위탁 연구	연구기관명: 해당 없음			연구책임자: 해당 없음	
<p><요약></p> <p>① 강력한 항균활성 GRAS 미생물 개발 : 기존의 GRAS 등급 미생물 유래 항균제중 가장 강력한 항균력 및 항균 spectrum 지님 → GRAS 등급 미생물 유래 항세균/항진균활성 물질(국내외 최초)</p> <p>② 천연항균물질 개발 : 분리·정제 과정 없이 유산균 생산 후 배양상징액 만으로도 식중독/부패균 제어 가능 → 생산단가 낮음(process의 단축)</p> <p>③ 식품원료규격의 천연항균물질 개발 : GRAS 등급 미생물(유산균: 식품원료 규격), 균주생산배지(식용배지: 식품 원료 규격) 모두 식품첨가물 규격이 아닌 식품원료 규격에 부합하도록 하여 국내외 시장 진입 바로 가능 → 실용화 가능</p>				<p><보고서 면수></p> <p>358쪽</p>	

④ 균주 생산배지를 배추농가에서 과잉 생산된 배추, 김치제조사에서 김치생산 과정 중 발생하는 폐절임 배추 활용 방안 도출
: 미이용자원 및 폐자원의 자원화 및 부가가치 제고
→ 농가소득 증대 및 김치제조사 현안 해결

※ 본 연구성과물인 미생물유래 천연항균제는 기술이전 및 사업화

< 요약 문 >

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>1) 제1세부: 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발</p> <p>(1) 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식중독균 저해활성을 지닌 GRAS 미생물의 분리·동정 - 천연항균소재의 특성 규명 - 식중독균에 대한 항균활성 및 항균 spectrum - 식중독균 저해기작 규명 - 천연항균물질의 정제 및 구조규명 <p>(2) 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 생산 실용화 기술 : 천연항균물질 생산용 식용배지 개발 - 개발 식용배지에서 천연항균소재 생산 - 비가열 식품에서 현재 사용되는 천연보존제와 비교우위 검증 - 천연항균소재의 식품에 적용(Lab scale - 비가열 식품/신선 식품/반조리·최소가공 식품) <p>2) 제1협동: 천연항균소재의 산업화 및 상품화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 산업화를 위한 비가열 제품별 가공표준의 설정 - 천연항균소재의 대량생산 및 정제 기술 개발 - 천연항균소재의 비가열 식품 적용 기술 개발 (산업적 scale) - 신규 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발 <p>3) 제2협동: 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제의 독성 평가(국가공인 비임상시험실시기관: GLP 기관)</p> <ul style="list-style-type: none"> - 평가대상: 개발 천연항균소재(유산균 유래 소재 2건/고초균 유래 소재 1건) 	
연구개발성과	<p>1) 제1세부: 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발</p> <p>① 항식중독 미생물 활성을 지닌 GRAS미생물 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> : 유산균 3종, 고초균 1종 개발 → 유산균 3종은 강력한 항세균 활성 뿐 아니라 항진균 활성을 지님. <p>② 천연 항균물질의 분리 및 동정</p> <ul style="list-style-type: none"> : 유산균 유래 항진활성 물질 분리·동정(3-hydroxy-5-dodecenoic acid) 고초균 유래 항세균물질(박테리오신 - mejucin) → 전 세계적으로 유산균 유래 항진물질 규명은 25건에 불과함. 국내보고는 본 연구진의 보고가 유일함. 고초균 유래 항균물질은 novel peptide로 NCBI에 그 서열등록 (Accession No. PRJNA309888) <p>③ 유산균, 고초균용 식용배지의 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> : 폐배추, 폐절임 배추를 활용한 배지 4건 개발 <p>④ 기존 천연보존제와의 비교우위 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> : 기존 천연보존제(4종)의 사용 권장량 최대 허용치 농도에서 활성 비교시 개발 천연 항균물질은 균주 배양 상징액만으로도 항균 spectrum, 항균활성 모두 더 강력함. <p>⑤ 개발 천연항균물질의 비가열, 신선식품 등 식품 적용</p> <ul style="list-style-type: none"> : 식중독균/식품변패균 제어능 100% 검증. 유용발효균, 관능적 특성에는 영향 없음. 	

2) 제1협동: 천연항균소재의 산업화 및 상품화

- ① 산업화를 위한 비가열 제품별 가공표준의 설정
: 김치류, 장아찌류, 절임류에 대한 가공표준 및 규격 3건 설정
- ② 천연항균소재의 대량생산 및 정제 기술 개발
: 최적 배양 조건 확립 후 농축을 통한 대량생산 확립
→ 3톤이상 대량생산 공정 확립
- ③ 천연항균소재의 비가열 식품 적용 기술 개발 (산업적 scale)
: 비가열 식품 적용사례 4건 구축(김치, 곁절이, 쌈무, 고들빼기)
- ④ 신규 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발
: 기존 사용되는 항균소재 4종과 비교 항균력 실험 통한 대체 가능성 확인
: 즉석식품 적용 실험 통한 사례 구축
: 가열 공정 완화로 관능 개선 사례 구축
: 유통기한 연장 효과 Data 확보

3) 제2협동: 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제의 독성평가(국가공인 비임상시험실시기관: GLP 기관)

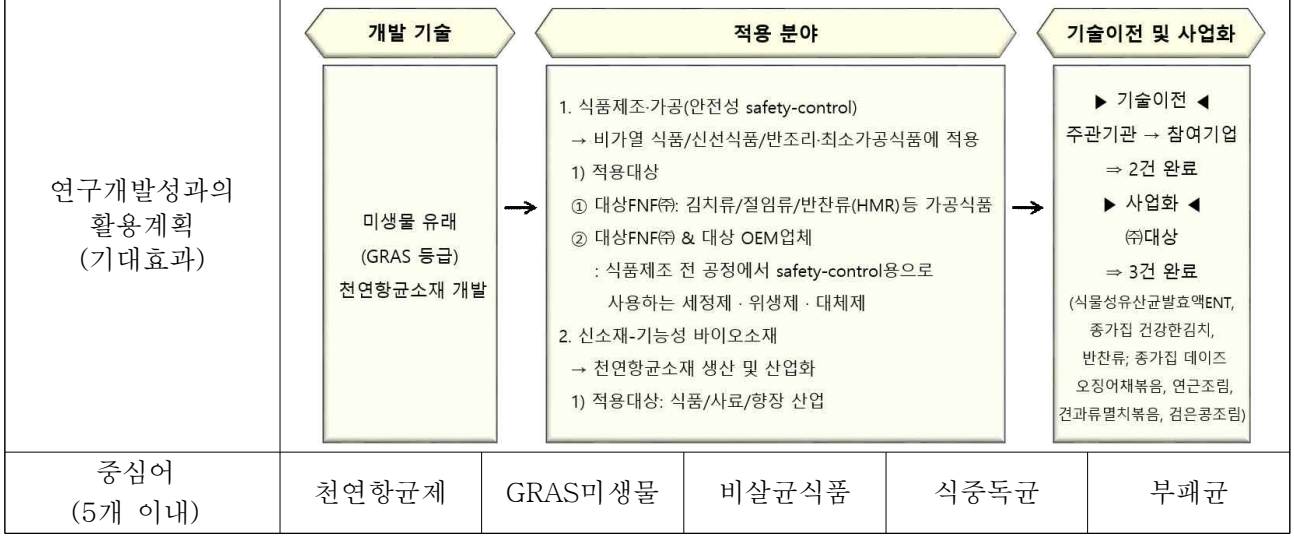
- ① 부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum* AF1+HD1)의 조항균물질의 독성평가
 - SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험
rat에 부분정제한 유산균(*Lb. plantarum* AF1+HD1)의 조항균물질을 단회 경구 투여시 시험물질 투여와 관련된 독성학적 소견이 인정되지 않았으므로 개략의 치사량은 2000 mg/kg B.W.이상으로 사료됨.
 - SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험(Non-GLP)
부분정제한 유산균(*Lb. plantarum* AF1+HD1)의 조항균물질을 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg B.W.의 용량으로 4 주간 반복 경구투여 시, 시험물질 투여와 관련된 독성학적인 변화가 관찰되지 않았으므로 무독성량(NOAE ; No Observed Adverse Effect Level)은 2000 mg/kg/day 이상이며, 표적장기는 없는 것으로 사료되었음. 이에 따라, 13 주 반복경구투여 독성시험의 용량은 0, 500, 1000, 및 2000 mg/kg의 군으로 사료됨.
 - 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
부분정제한 유산균(*Lb. plantarum* AF1+HD1)의 조항균물질은 본 시험 조건에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
 - 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험
부분정제한 유산균(*Lb. plantarum* AF1+HD1)의 조항균물질은 본 시험조건하에서 CHL/IU세포에 대하여 염색체이상을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
 - ICR 마우스에 대한 소핵시험
부분정제한 유산균(*Lb. plantarum* AF1+HD1)의 조항균물질은 본시험 조건하에서 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
- ② 부분정제한 고초균(*Bacillus subtilis* SN7)의 조항균물질의 독성평가
 - SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험
rat에 부분정제한 고초균(*B. subtilis* SN7)의 조항균물질을 단회 경구 투여시 시험물질 투여와 관련된 독성학적 소견이 인정되지 않았으므로 개략의 치사량은 2000 mg/kg B.W.이상으로 사료됨.
 - SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험(Non-GLP)
부분정제한 고초균(*B. subtilis* SN7)의 조항균물질을 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg B.W.의 용량으로 4 주간 반복 경구투여 시, 시험물질 투여와 관련된 독성학적인 변화가 관찰되지 않았으므로 무독성량(NOAE ; No

Observed Adverse Effect Level)은 2000 mg/kg/day 이상이며, 표적장기는 없는 것으로 사료되었음. 이에 따라, 13 주 반복경구투여 독성시험의 용량은 0, 500, 1000, 및 2000 mg/kg의 군으로 사료됨.

- 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
부분정제한 고초균(*B. subtilis* SN7)의 조항균물질는 본 시험 조건에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
- 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험
부분정제한 고초균(*B. subtilis* SN7)의 조항균물질은 본 시험조건하에서 CHL/IU세포에 대하여 염색체이상을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
- ICR 마우스에 대한 소핵시험
부분정제한 고초균(*B. subtilis* SN7)의 조항균물질은 본시험 조건하에서 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.

③ 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* EM)의 조항균물질의 독성평가

- SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험
rat에 부분정제한 유산균 (*Lb. plantarum* EM)의 조항균물질을 단회 경구투여시 시험물질 투여와 관련된 독성학적 소견이 인정되지 않았으므로 개략의 치사량은 2000 mg/kg B.W.이상으로 사료됨.
- SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험(Non-GLP)
부분정제한 유산균 (*Lb. plantarum* EM)을 0, 500, 1000 및 2000 mg/kg B.W.의 용량으로 4 주간 반복 경구투여 시, 시험물질 투여와 관련된 독성학적인 변화가 관찰되지 않았으므로 무독성량(NOAEL ; No Observed Adverse Effect Level)은 2000 mg/kg/day 이상이며, 표적장기는 없는 것으로 사료되었음. 이에 따라, 13 주 반복경구투여 독성시험의 용량은 0, 500, 1000, 및 2000 mg/kg의 군으로 사료됨.
- 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
부분정제한 유산균 (*Lb. plantarum* EM)의 조항균물질는 본 시험 조건에서 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
- 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험
부분정제한 유산균 (*Lb. plantarum* EM)의 조항균물질은 본 시험 조건하에서 CHL/IU세포에 대하여 염색체이상을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.
- ICR 마우스에 대한 소핵시험
부분정제한 유산균 (*Lb. plantarum* EM)의 조항균물질은 본시험 조건하에서 수컷 ICR 마우스의 골수세포에 소핵을 유발하지 않는 것(음성)으로 판단됨.



< SUMMARY >

	코드번호	D-02
Purpose & Contents	<p>1) Unit 1. Development of valuable microorganisms harboring antimicrobial activity against food-borne pathogens and application technique of new biopreservative into non-thermal processed foods</p> <p>(1) Development of valuable microorganisms harboring antimicrobial activity against food-borne pathogens</p> <ul style="list-style-type: none"> - Isolation & identification of GRAS m/o harboring antimicrobial activity against food-borne pathogens - Characterization of the developed natural antimicrobial agent - Antimicrobial activity and spectrum against food-borne pathogens - Growth inhibition mechanism of food-borne pathogens - Purification and structural identification of the antimicrobial agents <p>(2) Application technique of new antimicrobial agents(biopreservative) into non-thermal processed foods.</p> <ul style="list-style-type: none"> - Technique for commercial production: Development of edible media for natural antimicrobial agent production. - Production of natural antimicrobial agent in edible media - Validation of the developed antimicrobial agent in non-thermal processed foods compared to commercially used natural preservative - Application of the developed antimicrobial agent into food system(Lab scale: non-thermal processed food/fresh food/minimal processed food) <p>2) Unit 2. Production and commercialization of natural antimicrobial agent</p> <ul style="list-style-type: none"> - Set-up of process standardization of each non-thermal process food for commercialization - Mass production of natural antimicrobial agent and development of purification technique - Development of application technique of the natural antimicrobial agent into non-thermal processed food system - Development of profit creation model using the natural antimicrobial agents <p>3) Unit 3. Toxicity evaluation of antimicrobial agent derived from microorganism for control of food-borne pathogens in non-thermal processed food(Good laboratory practice)</p> <ul style="list-style-type: none"> - Evaluation target : Developed antimicrobial agents in this study (antimicrobial agents derived from lactic acid bacteria : 2 ea / derived from <i>Bacillus subtilis</i> : 1 ea) 	

Results	<p>1) Unit 1. Development of valuable microorganisms harboring antimicrobial activity against food-borne pathogens and application technique of new biopreservative into non-thermal processed foods</p> <p>① Development of GRAS m/o harboring antimicrobial activity against food-borne pathogens : LAB 3 sp., <i>Bacillus subtilis</i> 1 sp. → The developed 3 LAB species showed strong antibacterial activities as well as antifungal activities.</p> <p>② Purification and characterization of natural antimicrobial agents</p> <p>i) Antimicrobial agent from LAB: 3-hydroxy-5-dodecenoic acid → The identified antifungal compounds world-widely: only 25 compounds Our report is only one report in Korea.</p> <p>ii) Antimicrobial agent from <i>B. subtilis</i>: a novel bacteriocin → Its a.a. sequence was registered in NCBI; Acession NO. PRJNA309888; The novel bacteriocin was designated as Mejucin.</p> <p>③ Development of edible media for LAB & <i>Bacillus</i> sp. : Four kinds of edible media was developed using waste Korean cabbage.</p> <p>④ Verification of comparative advantage compared to commercially used natural preservative : The developed antimicrobial agent culture supernatant of GRAS m/o in this study showed much stronger activities as well as broader spectrum than the commercially used proservatives(4 kinds) even at their maximum recommended concentration.</p> <p>⑤ Application of the developed antimicrobial agents into foods(non-thermal processed food/fresh food) : 100% control of Food-borne pathogens/putrefactive microorganism However, the agents were not effective into useful fermentation m/o as well as olfactory characteristics of the foods.</p> <p>2) Unit 2. Production and commercialization of natural antimicrobial agent</p> <p>① Setup of standards processing for non-heated products for industrialization : Standards processing and specifications for kimchi and pickles</p> <p>② Mass production and purification technology of natural antibacterial materials : Establishment of optimal culture conditions and mass production through concentration → Establishment of mass production process over 3 tons</p> <p>③ Technology development of natural antibacterial material on non-heated food (industrial scale) : Construction of non-heated food application 4 cases (kimchi, geotjeori, white radish cabbage, korean lettuce kimchi)</p> <p>④ Development of creating profit models using new natural antibacterial materials. : Check of replaceability through comparative antibacterial activity experiment of four kinds of existing antibacterial materials : Establishment of case through application experiment of instant food : Establishment of case for sensory improvement through deregulation of heating process : Possession of data for extension of shelf life</p>
---------	---

3) Unit 3. Toxicity evaluation of antimicrobial agent derived from microorganism for control of food-borne pathogens in non-thermal processed food(Good laboratory practice)

① The toxicity study of crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* AF1+HD1

◦ Single dose oral toxicity study of in rat

The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1+HD1 did not observed any toxic effects in single dose oral treated animals at 2000 mg/kg body weight dose level. Approximate lethal dose(ALD) of the material was considered to be higher than 2000 mg/kg body weight in rats.

◦ Repeated dose 4 weeks oral dose range finding study in SD rats (Non-GLP)

Adverse effect related with the dose of The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1+HD1 was not observed up to 2000 mg/kg. Therefore, the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) of The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1+HD1 was considered to be 2000 mg/kg/day (the highest dose tested) in both sexes. So dose range of 13 weeks repeated oral dose toxicity test was considered to be 0, 500, 1000, and 2000 mg/kg body weight.

◦ Bacterial reverse mutation study

The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1+HD1 was not mutagenic (negative) under the conditions employed in the present study.

◦ In vitro mammalian chromosomal aberration test

The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1+HD1 was not considered to have the ability to induce the chromosomal aberrations in CHL/IU cells under the present experimental conditions.

◦ Mammalian erythrocyte micronucleus test

The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* AF1+HD1 was determined not to induce an increased frequency of micronuclei in the bone marrow cells of male ICR mice under the present experimental condition

② The toxicity study of crude antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* SN7

◦ Single dose oral toxicity study of in rat

The crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 did not observed any toxic effects in single dose oral treated animals at 2000 mg/kg body weight dose level. Approximate lethal dose(ALD) of the material was considered to be higher than 2000 mg/kg body weight in rats.

◦ Repeated dose 4 weeks oral dose range finding study in SD rats (Non-GLP)

Adverse effect related with the dose of The crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 was not observed up to 2000 mg/kg. Therefore, the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) of The crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 was considered to be 2000 mg/kg/day (the highest dose tested) in both sexes. So dose range of 13 weeks repeated oral dose toxicity test was considered to be 0, 500, 1000, and 2000 mg/kg body weight.

- Bacterial reverse mutation study

The crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 was not mutagenic (negative) under the conditions employed in the present study.

- In vitro mammalian chromosomal aberration test

The crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 was not considered to have the ability to induce the chromosomal aberrations in CHL/IU cells under the present experimental conditions.

- Mammalian erythrocyte micronucleus test

The crude antifungal compounds produced by *B. subtilis* SN7 was determined not to induce an increased frequency of micronuclei in the bone marrow cells of male ICR mice under the present experimental condition.

③ The toxicity study of crude antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* EM

- Single dose oral toxicity study of in rat

The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* EM did not observed any toxic effects in single dose oral treated animals at 2000 mg/kg body weight dose level. Approximate lethal dose(ALD) of the material was considered to be higher than 2000 mg/kg body weight in rats.

- Repeated dose 4 weeks oral dose range finding study in SD rats (Non-GLP)

Adverse effect related with the dose of The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* EM was not observed up to 2000 mg/kg. Therefore, the NOAEL (No Observed Adverse Effect Level) of The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* EM was considered to be 2000 mg/kg/day (the highest dose tested) in both sexes. So dose range of 13 weeks repeated oral dose toxicity test was considered to be 0, 500, 1000, and 2000 mg/kg body weight.

- Bacterial reverse mutation study

The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* EM was not mutagenic (negative) under the conditions employed in the present study.

- In vitro mammalian chromosomal aberration test

The crude antifungal compounds produced by *Lb. plantarum* EM was not considered to have the ability to induce the chromosomal aberrations in CHL/IU cells under the present experimental conditions.

	<p>◦ Mammalian erythrocyte micronucleus test The crude antifungal compounds produced by <i>Lb. plantarum</i> EM was determined not to induce an increased frequency of micronuclei in the bone marrow cells of male ICR mice under the present experimental condition.</p>				
<p>Expected Contribution</p>	<pre> graph LR A[Developed technique] --> B[Application field] B --> C[Transfer of technique & commercialization] </pre> <p>Developed technique Development of natural antimicrobial agents derived from microorganisms (GRAS status)</p> <p>Application field 1. Food manufacture, process(safety control) → Application into non-thermal processed food / fresh food / minimal processed food 1) Application field ① Food system : kimchi / salted foods / HMR food ② Non-Food system : Alternative agent for a cleaning agent; sanitizer agent used in food manufacture process 2. New-functional biomaterials → Production & commercialization of the antimicrobial agent 1) Application field : food / feed / cosmetic industry</p> <p>Transfer of technique & commercialization ▶ Transfer of Technique ◀ Chosun univ. → Food industry ▶ Commercialization of natural antimicrobial agent ◀ Food industry</p>				
<p>Keywords</p>	<p>natural antimicrobial agent</p>	<p>GRAS microorganism</p>	<p>non-thermal processed food</p>	<p>food-pathogens</p>	<p>putrefactive microorganism</p>

< **CONTENT** >

1. Synopsis of R/D subject	1
Section 1. Objective	1
Section 2. Significance	1
Section 3. Scope	4
2. The present situation of national and world-wide technical development	10
Section 1. Developed technique & market situation in world-wide	10
Section 2. Status of this study among world-widly developed techniques	16
3. Research content and result	18
Chapter 1. Development of valuable microorganisms harboring antimicrobial activity against food-borne pathogens and application technique of new biopreservative into non-thermal processed foods	18
Section 1. Material & Method	18
Section 2. Research contents & Results	38
Chapter 2. Production and commercialization of natural antimicrobial agent	198
Section 1. Material & Method	198
Section 2. Research contents & Results	201
Chapter 3. Toxicity evaluation of antimicrobial agent derived from microorganism for ontrol of food-borne pathogens in non-thermal processed food(Good laboratory practice)	235
Section 1. Material & Method	235
Section 2. Research contents & Results	238
Chapter 4. Summerized analysis & Discussion	291
Section 1. Summerized results	291
Section 2. Technical outcome	311
Section 3. Economical outcome	313
Section 4. Training, Publicity activities	315
Section 5. Poter/oral presentation, Education of human resources	316

4. Outcome of research purpose and contribution in relative process	318
Section 1. Outcome of research purpose	1
Section 2. Contribution in relative process	1
5. Utilization of this study	327
6. International scientific information acquired during research process	329
7. Security grade of R&D output	333
8. R&D equipment & facilities registered in national scientific information system	334
9. Safety assesment of laboratory during research process ...	335
10. Representative research outcome of this study	339
11. Others	341
12. References	342

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구개발의 목적	1
제 2 절 연구개발의 필요성	1
제 3 절 연구개발의 범위	4
2. 국내외 기술개발 현황	10
제 1 절 국내외 기술개발 및 시장(제품) 현황	10
제 2 절 본 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치 ..	16
3. 연구수행 내용 및 결과	18
제 1 장 [제1세부] 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발	18
제 1 절 연구수행방법	18
제 2 절 연구내용 및 결과	38
제 2 장 [제1협동] 천연 항균소재의 산업화 및 상품화	198
제 1 절 연구수행방법	198
제 2 절 연구내용 및 결과	201
제 3 장 [제2협동] 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연 항균제의 독성평가	235
제 1 절 연구수행방법	235
제 2 절 연구내용 및 결과	238
제 4 장 종합분석 및 고찰	291
제 1 절 연구결과 종합 요약	291
제 2 절 기술적 성과	311
제 3 절 경제적 성과	313
제 4 절 교육지도 · 홍보성과	315
제 5 절 학술 발표 · 인력양성성과	316
4. 목표달성도 및 관련분야 기여도	318
제 1 절 목표달성도	318
제 2 절 관련분야 기여도	320

5. 연구결과의 활용계획	327
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	329
7. 연구개발결과의 보안등급	333
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	334
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	335
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	339
11. 기타사항	341
12. 참고문헌	342

1. 연구개발과제의 개요

코드번호

D-03

제 1 절 연구개발의 목적

1. 최종목표

- 비가열 식품, 신선식품, 반조리·최소가공식품에서 문제되는 식중독제어 기술 개발
- 천연항균소재의 산업화

2. 세부과제별 목표

가. 제1세부: 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발

(1) 항식중독미생물활성을 지닌 유용 미생물의 개발

- 강력한 식중독균 저해활성 GRAS 등급의 미생물 개발 2종 이상
- 천연 항균물질의 동정 및 분리 2건 이상

(2) 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용기술 개발

- 기존 천연보존제 보다 뛰어난 항균활성 효과 천연항균소재 개발 2건 이상
- 식용배지에서 천연항균소재의 생산 1건 이상
- 비가열 식품, 신선식품, 반조리·최소 가공식품에서 적용기술 개발(Lab scale) 2건 이상

나. 제1협동: 천연 항균소재의 산업화 및 상품화

- 비가열 제품 적용(산업적 scale) 2건 이상
- 천연항균소재 생성 미생물 1톤 이상의 대량 배양 공정 개발
- 신규 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발

다. 제2협동: 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제의 독성평가

- 개발 천연항균소재의 안전성(독성) 평가 2건 이상

제 2 절 연구개발의 필요성

○ 식중독 발생에 따른 국내 사회·경제적 총 손실 비용은 1조 3천억 원으로 추정됨. 그러므로 식중독 발생 사전예방은 국가의 사회경제적 비용의 효율적 감소 방안임.

○ 식중독의 분류는 <표 1>와 같으며, 이 중 미생물에 의한 식중독은 세균형/ 곰팡이형으로 나눌 수 있음. 또한 식약처 통계자료<표 2>에 따르면 최근 5년간 세균성 식중독 발생건수에서 대장균 > 살모넬라 > 황색포도상구균 > 장염비브리오 > 캄필로가 가장 높은 빈도로 발생하는 식중독균임을 알 수 있음.

〈표 1. 식중독의 분류〉

분류		종류	원인균 및 물질
미생물 식중독 (26종)	세균성 (16종)	감염형	살모넬라(3종), 장염 비브리오균(2종), 병원성대장균(4종), 시겔라(세균성이질), 캄필로박터, 바실러스 세레우스, 여시니아, 리스테리아 모노사이토제네스
		독소형	황색포도상구균, 클로스트리디움 퍼프린젠스
	바이러스성 (6종)	공기, 접촉, 물 등의 경로로 전염	노로바이러스, 로타바이러스, 아스트로, 장관아데노, 간염A 및 사포바이러스
	원충성 (4종)	-	이질아메바, 람블편모충, 작은와포자충, 원포자충
자연독 식중독		동물성 자연독에 의한 중독	복어독, 시가테라독
		식물성 자연독에 의한 중독	감자독, 버섯독
		곰팡이 독소에 의한 중독	황변미독, 맥가독, 아플라톡신 등
화학적 식중독		고의·오용으로 첨가되는 유해물질	식품첨가물
		본의 아니게 잔류·혼입되는 유해물질	잔류농약, 유해성 금속화합물
		제조·가공·저장 중 생성되는 유해물질	지질의 산화생성물, 니트로스아민
		기타 물질에 의한 중독	메탄올 등
		조리기구·포장에 의한 중독	녹청(구리), 납, 비소 등

〈표 2. 세균성 식중독 발생 빈도수〉

연도 빈도수	원인균				
	2008	2009	2010	2011	2012
1	대장균	대장균	대장균	대장균	대장균
2	장염비브리오	살모넬라	살모넬라	살모넬라	퍼프린젠스
3	살모넬라	황색포도상구균	황색포도상구균	캠필로	장염비브리오
4	황색포도상구균	장염비브리오	장염비브리오	황색포도상구균	살모넬라
5	바실러스	캠필로	캠필로	장염비브리오	캠필로
6	퍼프린젠스	퍼프린젠스	바실러스	퍼프린젠스	바실러스
7	캠필로	바실러스	프리젠스	바실러스	황색포도상구균
8	보툴리눔	보툴리눔	보툴리눔	보툴리눔	보툴리눔
9	기타	기타	기타	기타	기타

○ 본 과제에서는 이와 같은 국내 다빈도 발생 식중독균의 제어와 동시에 부패균 제어를 위하여 실용화 가능한 천연항균제(biopreservative) 개발을 하고자 함. 전통발효식품은 우선 오랜기간 동안 인류가 섭취한 식품이므로 안전성이 보장되며, 그 속의 발효미생물은 GRAS 등급의 미생물이므로 우리나라 전통발효식품에서 천연항균제 개

발을 시작하고자 함. 전통발효식품 내의 발효미생물은 식품의 자연발효 과정 중 발효를 주도하는 우점종이 되기 위하여 식품 내에 잔존하는 수많은 주변 미생물과의 경쟁관계에서 우위를 차지하고자 강력한 항균물질을 생성하며, 이 항균물질 중에는 항균, 항진균, 항바이러스성 특징을 지닌 물질이 있음. 그러므로 화학적방부제의 남용을 막고 이들 화합물에 의한 내성균주 출현을 더이상 가속화 시키는 것을 막기 위해 본 과제에서는 그 해결책을 전통발효식품에서 찾고자 함.

- 전통 발효미생물과 같은 GRAS등급미생물로부터 항균성물질(항세균/항진균)을 차세대 천연항균제 목적으로 개발하여 사용되고 있는 예는 많지 않음. 그 이유는 GRAS 미생물 유래 항균물질이 가장 이상적인 biopreservative이나 현재 사용되고 있는 항균제만큼 활성이 높은 경우가 매우 적기 때문임(GRAS등급 유산균유래 항진균제 관한 보고는 현재까지 총 25건에 불과함).
- 그러므로 보다 강력한 GRAS미생물로부터 차세대 천연항균제를 개발하기 위해서는 확률적으로 수많은 신규 GRAS미생물로부터 스크리닝 작업이 이루어져야 함. 본 연구진은 약 20여 년간 국내발효식품으로부터 GRAS등급의 유산균/고초균 등을 1,000균주 이상 현재 보유하고 있음. 또한 신규 우량 GRAS미생물 분리·동정 및 배양기술을 보유함.
- 기대효과: 본 과제는 식품 미생물 유래 천연항균제를 개발함으로써 위해미생물 저해 효과로 인해 비가열 식품의 ① 부패 유발 미생물의 활동을 억제해 유통기한을 연장시켜줄 뿐만 아니라, ② 가열 살균 공정을 완화하여 식품의 고유의 맛을 유지하고 ③ 가공비 절감 효과를 꾀하고자 함. 또한 ④ 식중독 세균에 우수한 항균효과로 식중독 유발 균주의 증식을 억제함으로써 국민 건강에 증진 등의 효과를 기대할 수 있음.
- 과제 추진 방법상 특이점: 김치 가공시 부산물로 생산되는 폐배추 및 폐절임배추는 김치 가공량이 증가함에 따라 비례적으로 증가 하는 추세임. 그 동안 이와 같은 배추 폐기물은 산업폐기물로 버려져 왔으나, 런던협약에 따라 2014년부터 산업폐기물의 해양투척금지 조약으로 김치 가공시 생기는 배추 폐기물 처리방안이 당장 모색되어야 함. 이와 같은 문제는 우리나라 전 김치가공업체의 현안과제임. 이에 본 과제에서는 천연항균물질 생산용 미생물 배양 배지로서 배추 폐기물을 활용하고자 함. 즉 미생물유래 천연항균물질 개발과 동시에 이 항균물질을 배추/절임배추 폐기물을 활용한 식용배지에서 생산하는 시스템을 구축하여 본 과제를 통하여 배추 폐기물 처리방안 도출 및 이 폐자원의 자원화를 통해 부가가치 창출도 동시에 이루고자 함.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 주관연구기관(제1세부): 항식중독미생물활성을 지닌 유용미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발

목표 1. 식중독균/부패균의 생육 저해활성을 지닌 GRAS 미생물의 개발

가. 식중독균/부패균 생육 저해 활성 GRAS 미생물의 분리·동정

- 전통발효식품(김치 및 장류) 유래 미생물 중 식중독균(세균/곰팡이) 및 부패균(세균/효모/곰팡이)에 생육저해 활성을 가진 유산균과 고초균을 선별

: 생균 assay, paper disc assay

- 항식중독균/항부패균 활성 균주 동정

: 형태학적, 생화학적, 분자생물학적 특성

나. 항균활성균주의 미생물학적 특성규명

- 생육곡선 및 생육에 따른 항균활성 측정
- 배양시간에 따른 A_{600} 또는 생균수 측정
- 배양액의 항균활성 측정: paper disc assay
- 생육 최적 조건 설정: 배지 pH, 배양 온도, 배양 시간

다. 항균활성 및 spectrum 조사

- 식중독균/부패균(세균, 효모, 곰팡이)에 대한 생육 저해 활성 측정
- 생균 assay, paper disc assay

라. 항균활성균주의 안전성 평가(*in vitro*)

- 유산균: 용혈성, 효소활성
- 고초균: 용혈성, 효소활성, 독성검사(enterotoxin), 항생제 내성 측정(MIC)

목표 2. 천연항균물질의 특성 규명

가. 천연항균물질(조항균 물질)의 분리

- SPE(solid phase extraction) cartridge 사용

나. 천연항균물질(조항균 물질)의 활성 범위 측정

- 식중독균 및 부패균에 대한 항균활성: paper disc assay
- MIC 측정: 2-fold dilution

다. 천연항균물질(조항균 물질)의 안정성 실험

- pH, 열, 각종 효소, 용매에 대한 안정성

목표 3. 천연항균물질의 정제 및 구조 규명

가. 대상균주: 유산균, 고초균

나. 천연항균물질의 정제

- Ion-exchange chromatography, Gel filtration chromatography, Prep-HPLC, Anal-HPLC 등

다. 천연항균물질의 구조규명

- 항세균/항진균 물질의 분자량 측정: LC/MS, ESI-MS, GC-MS
- 항세균/항진균 물질의 구조규명: A.A 서열분석, NMR 분석
(1차원적 $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, 2차원적 COSY, HMQC, HMBC NMR)

목표 4. 식중독균 저해기작 규명

가. 공동배양(정균/사균 활성 측정)

- 천연 항세균/항진균 생성 개발균주 + 식중독균/부패균
- 공동배양 후 생균수 측정: colony shape에 따른 균주 구별
- 천연 항세균/항진균 생성 개발균주 배양상징액 + 식중독균/부패균
- 배양 후 생균수 측정

나. 정균/사균 기전 확인

- 공동배양 후 균주의 세포벽 및 세포 형태 관찰: SEM/TEM 촬영

목표 5. 천연항균물질 생산용 식용배지 개발: 생산실용화 기술

가. 배추폐기물(① 김치 가공시 파생되는 폐배추, ② 폐절임배추)의 처리공정 개발

- 수거방식에 따른 배추폐기물의 성분조성 비교
- 수거 배추 폐기물의 오염도 측정
- 배추폐기물의 물리적 처리공정 최적화

나. 식용성분을 이용한 미생물배지 개발

- 배추 폐기물(①+②)를 활용한 GRAS 미생물 배지조성 개발
- 균주의 생육 및 항균활성측정: 개발 식용배지 vs. 시판배지에서 비교

다. 개발 식용배지에서 GRAS 미생물 생육 및 항균활성 최적화

- 탄소원 및 무기염의 최적화
- 탄소원 최적화: glucose, maltose, table sugar 등을 단독 or 혼합 형태로 첨가
- 다양한 무기염과 질소원 등을 여러 가지 농도로 조합
- 배지 pH의 최적화
- 배양 온도의 최적화
- 배양 시간의 최적화

목표 6. 개발 식용배지에서 천연항균소재 생산

가. 개발 식용배지에서 천연항균소재의 생산 및 특성 조사

- 생육 곡선 및 이에 따른 항균활성 측정

- pH, 열 안정성 확인
 - : MRS배지 생산 항균소재와 비교
- 개발배지와 MRS배지에서 생산한 항균소재의 활성 비교
 - : 항균 spectrum 및 MIC 측정
- 나. 개발배지에서 항균활성 균주의 보존 및 안정성 보존 유지 기술 개발
 - 생육활성 유지를 위한 안정화 최적조건 확립
 - 안정제 첨가(당, 미네랄, 산 등)
 - 안정제 첨가 농도 결정
 - 안정제 첨가에 따른 항균활성 유지기간 설정
- 다. 천연항균소재의 활용화 검증
 - 신규 천연항균소재 vs. 기존 천연보존제 대비 항균활성 측정
 - : 항균 spectrum 및 MIC 측정
 - 식중독균(세균, 곰팡이)/부패균(세균, 효모, 곰팡이)을 저해하는 항균소재의 농도 결정
 - : 저해 유효농도 구간 설정

목표 7. 천연항균소재의 식품적용 기술 개발 (Lab scale)

- 가. 천연항균소재의 식품적용
 - 천연항균소재: GRAS 미생물이 생산한 조항균 물질
 - 적용대상: 비가열/신선/반조리·최소가공식품
 - 실험구: 신규 천연항균소재 적용 식품
 - 대조구: ① 기존 천연보존제 적용 식품
 - ② 천연항균소재 비적용 식품
- 나. 천연항균소재 적용 식품의 특성 조사: 대조구 식품과 비교
 - 저장기간에 따른 미생물군 조사
 - 식중독균/부패균 발생 여부 및 시점 관찰
 - 적용 식품의 관능적 특성 조사: 맛, 향, 색 등
 - 신규 천연항균소재 적용 식품의 유통기한 설정

2. 제1협동 과제: 천연항균소재의 산업화 및 상품화

목표 1. 산업화를 위한 비가열 제품별 가공표준의 설정

- 가. 비가열 제품의 제조 공정 확립
 - 대량 생산 라인을 적용한 제품 제조 방법 설계
 - 비가열 제품 기준 규격 설정: 이화학적 기준(염도, 당도, pH, 산도 등)

나. 가공표준 적용 비가열 제품의 식중독 미생물 균총 확인

- 초기 식중독 미생물: 식중독 미생물 균총 및 정량 분석
- 식중독 미생물 균총 변화 조사: 제조일에 따른 미생물 균총 및 정량 분석

목표 2. 천연항균소재 대량 생산 및 정제 기술 개발

가. 천연항균물질 생성 미생물 대량 배양 기술 개발

- 최적 배양 조건 확립: 배지 조성, 배양 시간, 배양 온도 설정
- 1톤 이상의 배양 공정 확립

나. 정제 기술 개발

- 필터 적용: 필터링 적용 전 후 목표 항균물질의 배양액 내 농도 확인
- 정제 전 후 적용 제품 내에서의 미생물 제어능 검사
: 미생물 제어능 기준의 최소 적용 농도 비교

목표 3. 천연항균소재의 비가열 식품 적용 기술 개발(산업적 scale)

가. 천연항균소재 적용 제품 대량 생산 공정 확립

- 대량 생산 적용 가능성 여부 확인
: 천연 항균제 적용 제품 대량 생산 후 활성 유무 확인
- 대량 생산 제품 품질 안전성 확인
: 유통 온도 (10°C) 보관 시 미생물, 외관, 관능 품질 검사

나. 대량 생산 식품 내에서의 기존 천연 항균제와 활성 비교 검사

- 최소 적용 농도 비교: 식중독 미생물 제어 가능 최소 농도 측정
- 식품의 외관, 관능 품질 비교

목표 4. 신규 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발

가. 기술 이전에 따른 천연항균소재 제품 상품화

- 효능 발현 확인 및 적용 가능성 검토

나. 기존 천연 보존제 대체

- 자몽종자추출물, 비타민B, 안티크로DM 대체로 수익 창출

다. 식중독 균 취약 즉석 조리 제품군 적용

- 즉석조리 판매 제품, 단체 급식 제안으로 수익 창출

라. 가열 살균 제품 살균 방법 대체로 매출 및 생산성 향상

- 가열로 인한 식감 저하 문제 개선으로 매출 향상
: 가열 살균 제품과 미생물 제어능 비교

- 가열, 냉각 공정 제거로 생산성 향상

마. 비가열 제품 유통기한 연장

- 유통기한 연장으로 매출 증대 기여
- 바. 3차년도 식품적용 시 기존 항균제 대비 효능 검사, 유통기한 연장 및 관능품질 개선에 대한 실험결과를 토대로 추후 적용 식품군을 넓혀감.
- 사. 천연항균제로 알려져 있는 자몽종자추출물 사용 식품군 및 합성보존료 사용 식품군으로 신규 천연항균제의 적용 확대, 매출 상승 효과.
- 아. 장기적으로 식품군 이외에도 항균력을 필요로하는 제품군에 적용.

3. 제2협동 과제: 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제의 독성평가

목표 1. 부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum*)의 조항균물질의 독성평가

- 가. SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험
 - 단회투여(급성)독성평가에 따른 독성평가 및 LD₅₀ 설정
- 나. SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험
 - 부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum*)의 조항균물질을 4주간 반복경구투여하여 나타나는 독성반응을 평가하고 13주 반복경구투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용
- 다. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
 - 부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum*)의 조항균물질 복귀돌연변이성 유무를 살모넬라균과 대장균을 이용하여 평가
- 라. 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험
 - 부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum*)의 조항균물질 포유류 배양세포에 대한 염색체 이상 유발성 검토
- 마. ICR 마우스에 대한 소핵시험
 - 부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum*)의 조항균물질 경구투여시 시험물질의 소핵 유발성을 평가

목표 2. 부분정제한 고초균의 조항균물질의 독성평가

- 가. SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험
 - 단회투여(급성)독성평가에 따른 독성평가 및 LD₅₀ 설정
- 나. SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험
 - 부분정제한 고초균의 조항균물질을 4주간 반복 경구투여하여 나타나는 독성반응을 평가하고 13주 반복 경구투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용
- 다. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
 - 부분정제한 고초균의 조항균물질 복귀돌연변이성 유무를 살모넬라균과 대장균을 이용하여 평가

라. 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험

- 부분정제한 고초균의 조항균물질 포유류 배양세포에 대한 염색체 이상 유발성 검토

마. ICR 마우스에 대한 소핵시험

- 부분정제한 고초균의 조항균물질 경구투여시 시험물질의 소핵 유발성을 평가

목표 3. 부분정제한 신규 유산균의 조항균물질의 독성평가

가. SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험

- 단회투여(급성)독성평가에 따른 독성평가 및 LD₅₀ 설정

나. SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험

- 부분정제한 신규 유산균의 조항균물질을 4주간 반복경구투여하여 나타나는 독성반응을 평가하고 13주 반복 경구투여 독성시험의 용량설정 근거자료로 이용

다. 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

- 부분정제한 신규 유산균의 조항균물질 복귀돌연변이성 유무를 살모넬라균과 대장균을 이용하여 평가

라. 포유류 배양세포를 이용한 염색체 이상 시험

- 부분정제한 신규 유산균의 조항균물질 포유류 배양세포에 대한 염색체 이상 유발성 검토

마. ICR 마우스에 대한 소핵시험

- 부분정제한 신규 유산균의 조항균물질 경구투여시 시험물질의 소핵유발성을 평가

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

제 1 절 국내외 기술개발 및 시장(제품) 현황

- 식품의 원료, 가공, 저장, 유통 중 발생하는 부패성 및 유해 미생물에 의한 오염과 균의 증식 정도는 국민건강은 물론 식품의 보존기간과 부패 유형의 중요한 인자로 작용하며, 이로 인한 식품의 변질을 막기 위해 다양한 방법(가열처리, 냉장, 냉동, 보존제 첨가, 방사선 조사 등)이 이용되고 있음. 식품보존제는 식품의 보존을 목적으로 첨가되는 것으로, 주로 각종 합성보존제를 이용하여 저장기간의 연장을 시도하고 있으나, 살균제, 방부제나 식품보존제들은 체내에 축적되고 해를 입히는 잔류성 문제로 인해 갈수록 인류의 보건에 치명적인 위해요소로 인식되고 있음.
- 특히 식품의 국제화시대에 있어서 살균제, 소독제 및 식품보존제의 과량사용은 수출과 수입 시 가장 큰 문제로 대두 되고 있음. 따라서 식품보존을 위해 유해 살균제와 소독제, 식품보존제를 남용함으로써 인해 발생할 수 있는 부작용 및 잔류성 문제를 해결하고, 이와 동시에 유해 미생물의 증식으로 인해 발생할 수 있는 식중독의 발병을 감소시킬 수 있는 천연 유해 미생물 생육 억제제가 절실히 요구되고 있음.
- 전 세계 살균제시장은 2008년기준 약 500billion 유로로 추정되며 국내 살균제 시장은 2004년 250억 원 규모로 성장속도를 고려할 때 2010년 500억 원으로 예상됨.
- 현재 식품산업에서 사용되고 있는 화학적 항균활성 제제는 <표 3>과 같음. 이들은 화합물로서 독성을 지니므로 사용권장량 가이드라인 하에 사용하여야 하며, 특이한 이미, 이취를 부여하거나 제한된 식품에서만 사용해야 하는 단점이 있음.

〈표 3. 화학적 합성첨가물 중 항균활성을 가진 첨가물〉

연번	첨가물명	사용기준 ¹⁾	시판제품	특징
1	데히드로초산과 그 염류	자연치즈, 가공치즈, 버터류, 마가린류 : 0.5 g/kg 이하	- 제품명: Sodium Dehydro-acetate - 회사명: noveon.kalamaInc. - 단가: 468천 원/kg - 원산지: US	- 백색의 결정성 분말 - 냄새가 조금 있음 - 치즈, 버터·마가린류의 사용 불가
2	안식향산과 그 염류	식품종류에 따라 0.25~2.0 g/kg 이하 단, 탄산수, 비가열 제품, 분말음료에 사용불가	- 제품명: Benzoic acid - 회사명: Alfa Aesar - 단가: 54천 원/kg - 원산지: US	- 알칼리영역에서 항균활성 저하 → 최적 pH 2.5~4.0 제한 - 흰색가루, 단맛과 떼은맛 - 벤조산과 그 염류는 직간접적으로 소화기관내 대사장애를 일으킴
3	소르빈산과 그 염류	자연치즈, 가공치즈 : 3.0 g/kg 이하 그 외 식품종류에 따라 0.05~2.0 g/kg 이하	- 제품명: Sorbic acid - 회사명: noveon.kalamaInc. - 단가: 268천 원/kg - 원산지: -	- 무색, 무취 혹은 조금 극적인냄새 - 주로 효모, 곰팡이 생육 억제 - pH가 낮을수록 항균효과 증가 - pH 5.0이상인 경우 효과 없음
4	아황산나트륨	식품종류에 따라 0.02~5.0 g/kg 이하 단 참깨·두·서유, 과실유·채소류·단순가공품, 건강기능식품 불가	- 제품명: Sodium Sulfite - 회사명: noveon.kalamaInc. - 단가: 96천 원/kg - 원산지: -	- 백색, 무취, 짠맛, 아황산냄새 - 열에 분해, 강한 환원성, 공기중에 불안정, 항산화제로 쓰임 - <i>Candida albicans</i> 의 생육저해
5	프로피온산과 그 염류	빵류: 2.5 g/kg 이하 자연치즈, 가공치즈 : 3.0 g/kg 이하 잼류: 1.0 g/kg 이하	- 제품명: Napropion - 회사명: Krishna che. Inc. - 단가: 219천 원/kg - 원산지: 인도	- 무색, 무취 - 약간의 Acetic-butyrlic 냄새 - 곰팡이 생육억제 효과

¹⁾ 사용기준: 식품첨가물 일반사용기준에 적용 받음

- 천연물소재를 활용하는 천연식품보존제 개발기술은 현재 국내적으로 미약한 상황이며, 현재 사용되고 있는 천연식품첨가물 대부분은 식물 유래로서 <표 4>와 같이 정리됨. <표 3>의 화학적 보존제보다는 천연물이므로 상대적 독성은 없으나 사용 식물 특유의 맛과 향이 강하여 식품첨가물로 사용될 때 원식품의 향과 맛을 손상시키는 관능적 문제점 때문에 사용에 제한이 따름.

〈표 4. 천연식품첨가물(식물 및 동물유래) 중 항균활성을 가진 첨가물〉

연번	첨가물명	구분	제품명	회사명	단가 ¹⁾	원산지 (성분)	특징
1	감초추출물	단일	감초추출물	Shaanxi zhengsheng KangyuanBiomedical Co., Ltd	235	중국	- 항균, 항바이러스 - 황갈색
2	봉선화 추출물	단일	봉숭아 추출물	Xian Guany Bio-Tech Co., Ltd	7-13	중국	- 포도상구균, 곰팡이, 젖산균 에 대한 항균작용 - 쓴맛, 갈색
3	자몽종자 추출물	단일	DF-100	(주)FA	85	미국, 브라질	- 대장균, 이질균, 리스테리아균, 살모넬라균, 황색포도상구균에 대한 항균작용 - 특이한 냄새 (레몬향, 쓴 약 냄새)
			천연방부제 자몽종자 추출물	ES story	110	브라질	
		혼합	햅스후레쉬 (+글리세린)	NCL	14	-	- 강한 쓴맛 - 높은 점성
4	금박	혼합	복합황금추출액 (+감초추출물)	ES story	90	-	- 진균 및 곰팡이에 대한 항균작용
5	키틴	단일	키틴	Qingdao		중국	- Anti-bacteria - 특유의 냄새
6	키토산	혼합	키크린 (+주정, 구연산, 자몽추출물)	(주)금호화성	4.4	-	- 대장균, 포도상구균에 대한 항균작용 - 백색이나 옅은 황색, 적색 - 약간 특유의 냄새
7	나린진	단일	나린진 추출물	SaiNa	35-50	중국	- 항세균, 항진균, 항바이러스 - 갈색, 쓴맛
8	차추출물	단일	Teaphenols	Handary	149	인도, 벨기에	- 항균력 - 녹차향(특이한 냄새), 흑갈색
9	유카추출물	단일	유카추출물	Henry Lamotte	1,000	독일	- 항균 (진균류, 특히 효모에 대한 항균작용)
		혼합	Biokeeper NE (+녹차추출물, 트레하)	Young-Add F.I	45	유카:미국, 녹차:중국, 트레하:일본	- 암갈색 - 특이한 냄새 - 발포성

¹⁾ 단가: 천 원/kg 혹은 L

- 이에 반하여 미생물 유래 천연항균제제는 <표 5>과 같이 무향, 무취인 경우가 많아 식품첨가물로서는 바람직하나 그 원래의 목적인 항균활성 및 항균 spectrum이 좁아 사용에 제한이 따름.

〈표 5. 천연식품첨가물(미생물 유래) 중 항균활성을 가진 첨가물〉

연번	첨가물명	유래 미생물	사용기준	시판제품	특징
1	리소짐	<i>Streptomyces sp.</i>	- ¹⁾	- 제품명: Lysoch®G4 - 회사명: Handary - 단가: 49~12,000천 원/kg - 원산지: 네덜란드	- 그람양성, 음성세균에 대한 항균작용 - 무향, pH 4~10에서 안정함 - 곰팡이, 효모에 대한 항균효과는 없음 - 다당류 존재하에서는 작용이 저하됨
2	폴리리신	<i>Streptomyces albulus</i>	-	- 제품명: Epolylly™ - 회사명: Handary - 단가: 560천 원/kg - 원산지: 벨기에	- 세균, 효모, 곰팡이에 대한 항균작용 - 무향, 무취, pH 4~10에서 안정함
3	나타마이신	<i>Streptomyces natalensis</i>	1 mg/dm ² 이하	- 제품명: Natap® - 회사명: Handary - 단가: 625천 원/kg - 원산지: 벨기에	- 항진균(효모, 곰팡이)작용 - 알러지반응(-), pH에 안정 - 다른첨가물에 비해 비싼 단가 - 식품표면에 사용 불가
4	니신	<i>Lactococcus lactis</i>	250 mg/kg 이하	- 제품명: NisinA®P - 회사명: Handary - 단가: 387천 원/kg - 원산지: 벨기에	- 항세균작용, 치즈에만 사용가능(제한) - pH 3~6에서 안정함 - 당성분을 부패시켜 작용 저하

¹⁾ 사용기준: 식품첨가물 일반사용기준에 적용 받음

- 현재 식약처(KFDA)에서 허용된 미생물유래 천연항균제 중 GRAS(Generally Recognized As Safe) 등급 미생물 유래는 니신 1건에 불과하며, 이 경우도 치즈에 한정하여 사용하도록 함. 나머지 3건은 non-GRAS 미생물(방선균) 유래이므로 항균물질을 완전 정제하여 권장량 범위에서만 사용 가능.
- 새로운 천연항균소재가 개발된 후, 이를 실제 산업현장에서 사용하고자 할 때, 대한민국 식품의약품안전처에서 제시한 관련 허가 사항에 의거하여야 함. 즉 가장 경제적으로 생산가능하며, 동시에 관련 규정의 장벽 없이 가장 빠른 시간 내 개발제품을 실용화하고자 할 때, <그림 1>에 제시한 흐름도와 같이 두 가지 방법이 제안됨. **첫째**, 식품원료(신소재)로 접근하며 식용 가능한 성분(식품원료)에서 GRAS등급 항균미생물(식품원료기준)을 배양 후, 분리·정제 없이 항균물질 생산균주의 「배양상징액」을 그대로 이용하는 경우임<그림 1>-①. 이 경우는 관련 허가사항 없이 「식품원료」 기준 규격에 의거하여 바로 실용화가 가능함. **둘째**, 첫째과정과 동일하나 기존에 쓰던 공정으로 추출·분리·정제하는 과정을 거치게 되는 「조항균물질」은 한시적 인정으로<그림 1>-② 제시된 식품원료에 해당하는 자료 제출시 식품원료 또는 식품첨가물로 활용이 가능함.

① 관련 허가 사항



② 한시적 인정 신청 대상의 범위

< 고시 제2조 >

- 국내에서 새로 원료로 사용하려는 농산물·축산물·수산물 및 미생물 등
- 농산물·축산물·수산물 등으로부터 추출·농축·분리·배양 등의 방법으로 얻은 것으로서 식품으로 사용하려는 원료






③ 제출 자료

식품원료	식품첨가물
<ul style="list-style-type: none"> • 제출자료의 요약본 • 기원 및 개발경위 • 국내·외 인정 및 허가 현황 • 국내·외 사용 현황 • 제조방법에 관한 자료 • 원료의 특성에 관한 자료 (성상 및 물성, 주요 성분 등) • 안전성에 관한 자료 <ul style="list-style-type: none"> - 우수실험실운영규정 (Good Laboratory Practice, GLP) - 독성시험자료 (단회투여독성, 반복투여독성, 유전독성) 	<ul style="list-style-type: none"> • 제품명, 기준 및 규격, 성상, 확인시험, 순도 시험, 용도, 용법, 사용량, 포장단위 등 • 첨부자료 <ol style="list-style-type: none"> ① 명칭 ② 화학구조 ③ 제조방법 ④ 이화학적 성질 및 순도 ⑤ 사용목적 또는 용도, 사용량 및 사용방법 ⑥ 효과 ⑦ 독성시험 (단회투여독성, 반복투여독성, 유전독성) ⑧ 외국의 사용 예

<그림 1. 관련 허가규정 흐름도(대한민국 식품의약품안전처)>

○ 이에 따라, 그 용도는 항균제로서 식품보존제 기능을 하지만 식약처 허가사항에서는 식품첨가물 규격이 아닌 식품원료 규격으로 제품유형은 기타가공식품으로 판매되고 있는 국내현황은 <표 6>과 같이 정리됨.

〈표 6. 천연 식품 보존제: 유산균 배양액(식품 원료규격)〉

연번	보존제	특징 및 사용기준
1	 <p>식물성 유산균발효액 ENT</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제품 유형: 기타가공식품 - 무, 배추 등 천연 원료를 김치 유산균으로 발효한 Probiotic 향균제 - 유래 미생물: <i>Lactobacillus plantarum</i> DSR CK10&M2 - 식품 위해 미생물에 대한 향균효과(항세균 활성) - 수용성 - pH: 3.3±0.3 - 산도: 10% 이상의 젖산
2	 <p>절임식품용 유통기한연장제 (유산균발효분말)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제품유형: 식품(기타가공품) - 적용농도: 배합 중 0.3~0.7% - 가열 및 pH 변화에 따른 향균력 변화 없음 - 유산균으로 발효시킨 천연보존료 - 유산균 제어 효과 우수(항세균 활성)
3	 <p>락토프로</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제품유형: 기타가공품 - 식물성 유산균 식품보존제/천연방부제 - 무독성 향균 및 항산화 작용 우수(항세균 활성) - 열안정성
4	 <p>식물성유산균 배양액 분말 J9-E</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제품유형: 기타가공품 - 유래 미생물: <i>Pediococcus acidilactici</i> J9 - 빵의 선도유지와 향미 증진(항세균 활성)
5	 <p>식물성유산균 분말JS</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제품유형: 기타가공품 - 유래 미생물: <i>Lactobacillus fermentum</i> JS - 빵의 풍미와 보존기간 연장효과(항세균 활성) - 건강기능식품의 원료로 이용가능 - 높은 내산성과 내열성
6	<p>본 연구성과 개발제품</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 제품유형: 기타가공식품 - 유래 미생물: <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 + ENT 유산균 2종, 총 3종의 유산균을 ENT배지(배추즙 배지)에서 배양 - 식품 위해/부패미생물에 대한 향균효과(항세균&항진균)

- 현재까지 식품에 사용되고 있는 천연항균제품으로는 자몽종자추출물이 주를 이루고 있으나, 식품 내에서 미생물 제어 효과가 완벽하지 못하여 가열 살균법과 병용되고 있는 실정임.
- 또한 국내 식품 유래 미생물을 이용한 천연항균소재가 상품화되어 판매되고 있는 제품은 <표 6>과 같이 식물성유산균발효액ENT를 비롯한 몇가지 제품이 있으나 모두 항진균 활성의 보완이 필요함.
- 국내 천연보존제 시장은 최근 몇 년간 천연 물질로부터 추출한 항균제의 개발이 활발해지고, 보존제의 안전성 및 소비자들의 합성물질에 대한 인식 변화로 인해 천연 물질에 대한 관심이 증가하여 시장의 성장세는 증가할 것으로 예상됨.

제 2 절 본 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

- **식품첨가물규격 상품(천연식품보존제)시장:** 안전성과 기능성을 지니는 천연식품 보존제를 개발하고 상품화함으로써 기존 보건 의료시장에서 뒤떨어진 국내 기술을 농업 분야에서 만회하는 한편, 세계시장에서 우위를 점할 수 있는 천연물 활용 기술 개발의 연구가 더욱이 필요한 실정임. 식중독 원인 미생물이나 부패 미생물을 제어하여 식품을 안전하게 장기간 저장하기 위한 수단으로 식품에 적용 가능한 천연항균물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있음. 그러나 이들 중에는 <표 4>에서 제시한 바와 같이 특유의 맛과 냄새, 자극성으로 인하여 식품에 적용하기 위해서는 관능적 측면에서 해결되어야 할 문제가 남아 있는 것도 있고, 항균력이 약하거나 항균 spectrum이 좁아 아직까지 천연 항균제로 개발되어 상품화된 제품은 극히 일부임.
- **식품원료규격 상품(천연식품보존제)시장:** 당초 연구계획은 항균활성을 지닌 GRAS 미생물에서 항균활성 물질을 분리·정제(partially)하여 사용하는 식품첨가물 규격에 부합되는 천연식품보존제가 개발 목표였음. 그러나 본 과제에서 예상 외 성과로 강력한 활성(항세균/항진균)의 GRAS 미생물을 개발함. 즉 본 연구개발 성과물인 GRAS 미생물 유래 천연항균제는 배양상징액만으로도 기존 시판되고 있는 천연보존제의 최대 사용 권장량에서의 항균활성 보다 더 강력한 활성을 나타냄.
- 이에 본 개발 항균제를 식품원료 규격으로 접근함이 가능하였음. <그림 1>의 식품첨가물 규격과 식품원료 규격 중 식약처 허가규정을 살펴보면, 식품원료 규격으로 접근함이 산업화에 유리함. 즉, 식약처 허가가 용이하고 분리·정제 과정이 없으므로 생산단가가 훨씬 낮음.

- 현재 국내시장에서 식품원료 규격으로 기타가공식품 제품유형으로 천연보존제 기능을 할 수 있는 제품은 <표 6>과 같음. 그러나 이 제품들은 항세균활성에 국한되거나 항진균제재 용도로 사용될 때에도 빵과 같이 수분함량이 낮은 식품에 제한적으로 사용되는 실정임.

- **본 개발 제품의 위치:** 본 연구 성과물인 천연보존제는 GRAS 미생물(식품원료규격)을 식용배지(식품원료규격)에서 배양한 배양상징액으로서 그 항균활성이 항세균과 항진균활성을 모두 지님. 또한 그 역가가 매우 높아 식품적용 시 수분함량이 높은 식품(김치, 샐러드, 청국장, 생막걸리)에서도 기존 시판 보존료(4종: 자몽종자추출물, ϵ -폴리리신, 주정, 크린콜)보다 뛰어난 식중독균 및 부패균 제어 효과 나타냄. 즉 천연식품보존제 기능을 지니지만 식품첨가물 규격이 아닌 식품원료 규격을 충족하여 그 생산 단가가 기존 제품 대비 매우 낮고 실용화가 바로 가능한 최대 장점을 지님. 또한 배양상징액 뿐만 아니라 부분정제된 항균물질도 독성시험에서(제2협동: KTR - 국가공인GLP기관) 무독성으로 판정된 안전한 물질임이 검증됨. 이에 따라 부분정제 항균물질도 고농축의 고효성 천연식품보존제(식품첨가물규격)로 활용 가능함.

- 최근 소비자의 식품에서 천연성, 안전성, 건강 기능성에 대한 요구도가 높아짐에 따라, 식품보존료 산업에서도 천연성, 안전성 및 복합적인 건강 유효성이 겸비된 항균소재의 개발이 필요한 실정임. 천연항균소재 중 GRAS 미생물 유래의 항균소재는 이와 같은 요건을 완벽히 충족시키고 동시에 타첨가물에 비해 고부가가치임. 현재 개발되어 사용되고 있는 천연식품보존제는 대부분 외국에서 독점생산과 독점판매하여 국내 기업이 사용 시 비용적 부담이 큼. 그러므로 본 연구의 우리 전통식품인 김치·장류로부터 우리기술에 의하여 개발된 천연보존제 개발 성과는 비가열 식품에서의 식중독제어능 뿐만아니라 장기간 식품보존을 위한 천연식품보존제로서 최근 대두되고 있는 소비자의 요구도를 완벽히 충족시키는 제품임. 현재까지는 국내·외 개발제품 중 그 성능면에서 비교우위가 독보적으로 탁월하여 향후 조직적 마케팅 및 유통전략이 뒷받침되면 세계시장에서의 그 파급효과가 클 것임.

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

제 1 장 [제1세부] 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발

제 1 절 연구수행 방법

1. 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발

가. 식중독균/부패균 저해활성을 지닌 GRAS 미생물의 개발

(1) 식중독균/부패균 생육저해활성을 지닌 GRAS 미생물의 분리

(가) GRAS 미생물 분리

① 김치유산균

- 광주 및 전남 지역을 포함한 전국의 가정집, 명가, 식당, 사찰 등 80여 곳에서 분리하여 본 연구실에서 보유중인 김치 유래 유산균 450여종을 대상으로 함. 김치유산균의 분리는 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 거른 김치액을 MRS 고체배지 및 2% CaCO₃-MRS 고체배지에 도말하여 30℃에서 48시간 배양함. 2% CaCO₃-MRS 고체배지에서 투명환을 생성하고 catalase 음성인 균주를 유산균으로 분리함.

② 고초균

- 고초균을 분리하기 위하여 광주 및 전남 지역의 가정집, 명가, 식당, 사찰 등 20여 곳에서 분리하여 본 연구실에서 보유중인 장류 유래 균주 100종을 대상으로 함. 고초균의 분리는 TSB (tryptic soy broth, for 1L, enzymatic digest of casein 17g, enzymatic digest of soybean meal 3g, NaCl 5g, dipotassium phosphate 2.5g, dextrose 2.5g, pH 7.3±0.2 at 25℃)고체배지에 도말한 다음 37℃에서 2일 배양하여 얻은 균주 중 균주 형태가 고초균(*Bacillus*속)에 해당하는 것들을 분리함.

(나) 식중독균/부패균 생육 저해활성 균주 선별

① 식중독균/부패균 선정

- 미생물에 의한 식중독은 세균형/곰팡이형으로 나눌 수 있으며(Table 1), 식품의약품안전처 통계자료(Table 2)에 따르면 2002년부터 2013년 동안 세균성식중독 발생건수 및 환자수는 대장균>살모넬라>황색포도상구균>장염비브리오>퍼프린젠스>캠필로박터>바실러스가 가장 높은 빈도로 발생하는 식중독균으로 나타남. 또한 비가열식품, 신선식품 중 위해미생물을 모니터링 한 결과 *E. coli*, *Salmonella* spp., *B. cereus* 등이 가장 많이 나타난 것으로 보고된 바 있음(Ref. 1-3).

Ref. 1) 식품의약품안전평가원 지원, 「비가열 고위해식품의 미생물 저감화 연구, 2011, 이민석」
 Ref. 2) 식품의약품안전청 지원, 「비가열처리식품 중 위해미생물 저감화 방법 연구, 2002, 박지용」
 Ref. 3) 식품의약품안전청 지원, 「신선식품 중 위해미생물 저감화 방법 연구, 2002, 박지용」

- 본 과제에서 저해하고자 하는 유해미생물의 범위는 Table 1과 Table 2에서 제시된 바와 같이 미생물유래 식중독(세균성+곰팡이성)과 우리나라에서 최근 12년간 발생빈도가 높은 식중독 및 비가열식품의 주된 유해 식중독세균을 대상으로 함. 이와 더불어 식품유통과정 중 다빈도로 발생하는 부패미생물을 생육저해 유해 미생물(식중독/부패균) 대상으로 삼았으며, 이에 본 연구에서 사용된 식중독균 및 부패균을 Table 3에 정리하여 제시함.

Table 1. 식중독의 분류

분류		종류	원인균 및 물질
미생물 식중독 (26종)	세균성 (16종)	감염형	살모넬라(3종), 장염 비브리오균(2종), 병원성대장균(4종), 시겔라(세균성이질), 캄필로박터, 바실러스 세레우스, 여시니아, 리스테리아 모노사이토제네스
		독소형	황색포도상구균, 클로스트리디움 퍼프린젠스
	바이러스성 (6종)	공기, 접촉, 물 등의 경로로 전염	노로바이러스, 로타바이러스, 아스트로, 장관아데노, 간염A 및 사포바이러스
	원충성 (4종)	-	이질아메바, 람블편모충, 작은와포자충, 원포자충
자연독 식중독		동물성 자연독에 의한 중독	복어독, 시가테라독
		식물성 자연독에 의한 중독	감자독, 버섯독
		곰팡이 독소에 의한 중독	황변미독, 맥가독, 아플라톡신 등
화학적 식중독		고의·오용으로 첨가되는 유해물질	식품첨가물
		본의 아니게 잔류·혼입되는 유해물질	잔류농약, 유해성 금속화합물
		제조·가공·저장 중 생성되는 유해물질	지질의 산화생성물, 니트로스아민
		기타 물질에 의한 중독	메탄올 등
		조리기구·포장에 의한 중독	녹청(구리), 납, 비소 등

Table 2. 세균성 식중독 발생 빈도수

구분	살모넬라	황색포도상구균	장염비브리오균	바실러스 세레우스	클로스트리디움 퍼프린젠스	클로스트리디움 보툴리눔	캠필로박터 제조니	병원성 대장균	기타
발생건수(건)	262	184	201	60	80	1	68	339	25
환자수(명)	8,072	7,784	4,090	1,513	3,202	3	3,124	20,185	1,731

※ 2002년~2013년 식중독 발생현황 통계자료, 출처: 식품의약품안전처

Table 3. 본 연구에 사용된 식중독균 및 부패균(항균활성 지시균)

M/O	Indicator species	구분
곰팡이	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546 <i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	식중독 원인균
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918 <i>Aspergillus nidulans</i> PF-3 <i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	부패 미생물
효모	<i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	부패 미생물
세균	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 <i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624 <i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	식중독 원인균
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	부패 미생물

※ 저해대상: 식중독균/부패균(세균 7종, 곰팡이 5종, 효모 1종)

② 식중독균/부패균 생육 저해활성 GRAS 미생물 개발

- 분리유산균 및 고초균의 식중독균/부패균의 생육 저해활성을 조사하기 위하여 균체를 직접 가하는 direct method와 배양상징액 또는 농축상징액을 이용한 paper disc assay를 병행하여 항균활성이 우수한 균주를 선발함. Direct method는 항균활성균(유산균, 고초균)과 감수성균(곰팡이, 세균, 효모)이 둘 다 자랄 수 있도록 dual culture overlay assay를 시행함.

③ 생육저해활성

- Direct method: 고체배지(PDA, MEA, LB, Mac Conkey Sorbitol Agar 등)위에 지시균 1×10^6 CFU를 도말 → 분리균주 배양액 10 μ l를 3 cm 길이로 그어줌 → 각 지시균의 배양 온도에서 배양하면서 생육 저해 활성 관찰
- Paper disc assay: 분리균주의 배양상징액 준비 → 고체배지(PDA, MEA, LB, Mac Conkey Sorbitol Agar 등)위에 지시균 1×10^6 CFU를 도말 → paper disc를 올리고 배양상징액(농축) 100 μ l를 떨어뜨림 → 각 지시균의 배양 온도에서 배양 후 생육 저해환을 측정

(2) 항식중독균/항부패균 활성 균주 동정

(가) 형태학적 관찰: 그람염색, 현미경적 관찰

(나) 생리·생화학적 방법: 당대사능(유산균: API 50CHL, 고초균: API 50CHB system 사용)

(다) 분자생물학적 방법: 16S rRNA 서열결정

(3) 항균활성균주의 미생물학적 특성규명

(가) 생육곡선 및 생육에 따른 항균활성 측정

① 생육곡선: LB액체배지(고초균), MRS액체배지(유산균), 28°C ~37°C 에서 0~120시간 배양하면서 4시간 간격으로 흡광도(A₆₀₀) 및 생균수 측정

② 항균활성 측정: 배양 시간에 따른 균주의 배양상징액을 이용하여 지시균에 대한 Paper disc assay를 시행하여 생육에 따른 항균활성을 측정

③ 생육 최적 조건 설정

- 배양 배지: 유산균-MRS, 고초균-LB, TSB

- 배양 온도: 28°C, 30°C, 37°C 에서 생육 비교

- 배양 시간: 0~120 h

- 배지 초기 pH: pH 4.0~7.0

- 항균활성 측정(Paper disc assay): 생육에 따른 항진균활성 최적 배양 온도, 배지 초기 pH 및 배양시간 결정

(4) 항균활성 및 spectrum

(가) 항균물질 생산: 최적 배양조건에서 배양시간에 따라 최대 활성을 보이는 시점의 배양상징액 또는 농축상징액 사용

(나) 항균활성 측정방법: spot-on-the lawn test로 배양상징액 또는 농축상징액을 2-fold dilution하여 지시균 위에 점적하여 항균활성 AU/mL 단위로 표시

(5) 항균활성균주의 안전성 평가(*in vitro*)

(가) 평가내용

① 유산균: 용혈성, 효소활성, 항생제 내성 측정

② 고초균: 용혈성, 효소활성, 독성검사, 항생제 내성 측정

(나) 용혈성(hemolysis test): 용혈성배지(horse blood agar)에 획선도말하여 hemolysis음성/양성판정

(다) 효소활성: Zym kit의 cupule에 접종하여 배양한 후 ZYM와 ZYM B시약을 각각의 cupule에 떨어뜨리고 결과를 판독함.

(라) 독성검사(enterotoxin)

- ① PCR을 이용한 enterotoxin 유전자 검출
 - : enterotoxin 생산을 유도하는 유전자를 암호화하는 emetic primer(1 set)와 enterotoxin primer(10 set)를 사용하여 PCR를 시행함.
- ② 면역학적 방법에 의한 enterotoxin 검출(*in vivo*, kit 사용)
 - i) RPLA를 이용한 HBI 독소확인
 - : 고초균을 배양하여 얻은 배양상징액을 제균 하여 시료로 사용
 - ii) BDE-VIA를 이용한 NHE 독소확인
 - : 고초균의 배양상징액을 제균하여 pH 7.0~pH 8.0로 조정 후 시료로 사용

(마) 항생제 내성 측정

- ① 판정기준: European Food Safety Authority(EFSA)
- ② 항생제: 9종(ampicillin, vancomycin, chloramphenicol, kanamycin, clindamycin, tetracycline, streptomycin, gentamicin, erythromycin)
- ③ 측정방법: minimum inhibitory concentration(MIC)

나. 천연항균물질의 특성 규명

(1) 천연항균물질(조항균물질)의 분리

(가) 항균활성생산균주(1차년도 개발균주): 유산균 5종, 고초균 1종

(나) 항균활성 균주 배양: 1차년도 연구결과에 따른 최적 배양 조건(개발식용배지 사용)

(다) 배양상징액 준비: 최적 항균활성물질 생산 배양 조건에서 균주 배양 → 원심분리(9,500 ×g, 15 min, 4°C) → 제균(0.20~0.45 μm membrane filter) → cell free extract(배양상징액)

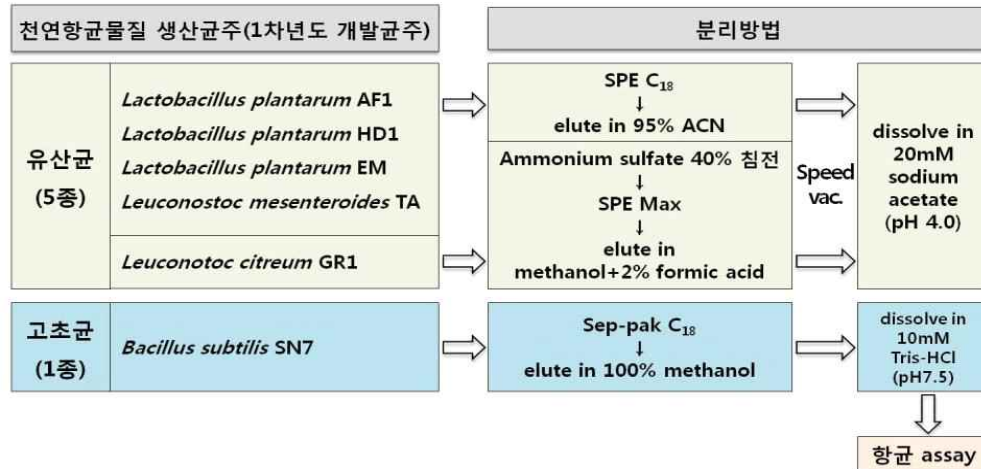
(라) 천연항균물질 생산균주(유산균 5종)의 조항균 물질 제조

① 배양상징액 → SPE C₁₈ cartridge에 loading → elution(95% ACN) → 용매제거(Speed vac.) → 20 mM sodium acetate(pH 4.0)에 녹임 → 항균 활성 측정

② 배양상징액 + 황산암모늄(%) → 단백질 물질 침전 → 원심분리(9,500×g, 30 min 4°C) → dialysis → SPE MAX cartridge에 loading → elution(methanol+2% formic acid) → 용매제거(Speed vac.) → 20 mM sodium acetate(pH 4.0)에 녹임 → 항균활성 측정

(마) 천연항균물질 생산균주(고초균1종)의 조항균 물질 제조

: 배양상징액 → Sep-pak C₁₈ cartridge에 loading → elution(100% methanol) → 용매제거(Speed vac.) → 10 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 녹임 → 항균 활성 측정



(2) 천연항균물질(조항균물질)의 항균 spectrum

(가) 천연 항균 물질

- 유산균 5종(AF1, HD1, EM, GR1, TA): A-4 배지배양	
- 고초균 1종(SN7): D-3 배지배양	
i) 배양상징액 (개발식용배지 A-4, D-3 : 식품원료 기준 규격)	ii) 조항균 물질 (column 분리정제)

(나) 지시균(식중독균/부패균: 총 13종)

M/O	지시균	구분
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	식중독 원인균
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	부패균
	<i>A. nidulans</i> PF-3	
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	부패균
세균	<i>S. enterica</i> serovar. Typhi ATCC 19430	식중독 원인균
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	부패균
<i>M. luteus</i> ATCC 13513		

(다) 지시균 농도: 곰팡이의 경우 1.0×10^6 spore/plate

효모, 세균의 경우 $1.0 \times 10^4 \sim 10^6$ CFU/mL

(라) 항균활성 측정 방법: spot-on-the lawn test로 조항균물질을 2-fold dilution하여 지시균 위에 점적하여 항균활성 AU/mL 단위로 표기

(마) 항균활성의 정의 (AU/mL)=(1000/*d*)×D (D: dilution factor, *d* amount of sample loading)

(3) 천연항균물질(조항균물질)의 안정성 실험

(가) pH 안정성

: 항균물질을 pH 2.5(50 mM glycine-HCl), pH 4.5(50 mM sodium-acetate), pH 6.0(50 mM sodium-acetate), pH 7.0(50 mM Tris-HCl), pH 8.0(50 mM Tris-HCl), pH 9.5(50 mM glycine-NaOH) 완충액에 녹인 후 4°C 에서 2시간 처리하여 잔존 항균활성 확인

(나) 온도 안정성

: 항균물질을 4°C ~70°C, 24시간/100°C, 30분/121°C, 15분 처리 후 잔존 항균활성 확인

(다) 효소 안정성

: 항균물질을 proteinase K, protease, α -chymotrypsin, α -amylase, lipase, trypsin, pepsin 효소로 처리한 후 잔존 항균활성 확인

(라) 용매 안정성

: 항균물질을 유기용매(ethanol, acetonitrile, acetone, methanol등)에 용해시켜 25°C 에서 1시간 처리 후 잔존 항균활성 확인

(마) 염 안정성

: 항균 물질을 염(3%, 7%, 15%; NaCl)에 용해시켜 25°C 에서 1시간 처리 후 잔존 항균활성 확인

(바) 항균활성 측정 방법: spot-on-the lawn test로 항균물질을 2-fold dilution하여 지시균 위에 점적하여 항균활성 AU/mL 단위로 표기

(사) 항균활성의 정의 $(AU/mL) = (1000/d) \times D$ (D: dilution factor, d amount of sample loading)

다. 식중독균 저해기작 규명

(1) 공동배양에 의한 식중독균/부패균의 생육 저해효과

(가) 천연항균물질 생산균주 + 식중독균/부패균의 공동배양

천연항균물질 생산균주	식중독균/부패균	접종초기균수 항균생산균 vs. 식중독균	대조구
<i>Lb. plantarum</i> AF1	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log spores/mL	단독배양(유산균/곰팡이) : MRS 배양
	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 2.0~3.0 log CFU/mL	단독배양(유산균/효모) : MRS 배양
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log CFU/mL	단독배양(유산균/세균) : MRS 배양
<i>Lb. plantarum</i> HD1	<i>A. ochraceus</i> PF-2	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log spores/mL	단독배양(유산균/곰팡이) : MRS 배양
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log CFU/mL	단독배양(유산균/세균) : MRS 배양
<i>Lb. plantarum</i> EM	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log spores/mL	단독배양(유산균/곰팡이) : MRS 배양
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log CFU/mL	단독배양(유산균/세균) : MRS 배양
<i>B. subtilis</i> SN7	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	6.0 log CFU/mL vs. 4.0~5.0 log CFU/mL	단독배양(고초균/세균) : TSB 배양

(나) 선별배지

식중독균/부패균	선별배지
<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	MEA
<i>P. kudriavzevii</i> GY1	YPD
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	SMAC/LB
<i>A. ochraceus</i> PF-2	MEA
<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	MAC/LB
<i>A. flavus</i> ATCC 22546	MEA
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	MSA/TSB
<i>B. cereus</i> KCTC 3624	PEMBA/LB

: 액체배지(유산균-MRS, 고초균-TSB)에 천연항균물질 생산균주+식중독균/부패균을 동시 접종 → 배양온도(유산균-30℃, 고초균-37℃)에서 0~48시간 배양 → 항균물질 생산균주와 식중독균/부패균을 각각의 선별배지에서 생균수 측정. 이때, 각 배지에 항균물질 생산균주와 식중독균/부패균을 각각 단독 배양한 것을 대조구로 삼음

(다) 천연항균물질 생산균주의 배양상징액에 식중독균/부패균의 처리

천연항균물질생산균주 배양상징액	식중독균 /부패균	식중독균의 접종초기균수	대조구 (항균물질 무처리)
<i>Lb. plantarum</i> AF1 배양상징액	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	4.0~7.0 log spores/mL	곰팡이/MRS배지
	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	2.0~3.0 log CFU/mL	효모/MRS배지
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	4.0~6.0 log CFU/mL	세균/MRS배지
<i>Lb. plantarum</i> HD1 배양상징액	<i>A. ochraceus</i> PF-2	4.0~7.0 log spores/mL	곰팡이/MRS배지
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	4.0~6.0 log CFU/mL	세균/MRS배지
<i>Lb. plantarum</i> EM 배양상징액	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	4.0~7.0 log spores/mL	곰팡이/MRS배지
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4.0~6.0 log CFU/mL	세균/MRS배지
<i>B. subtilis</i> SN7 배양상징액	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	4.0~5.0 log CFU/mL	세균/TSB배지

*곰팡이 균사는 A₆₀₀ ≒ 0.05로 접종

: 천연항균물질 생산균주 배양상징액(유산균: MRS, 고초균: TSB)에 식중독균/부패균 접종 → 배양온도(유산균-30℃, 고초균-37℃)에서 곰팡이 포자의 경우 0~15일, 곰팡이 균사의 경우 0~48시간, 효모의 경우 0~48시간, 세균의 경우 0~24시간 배양 → 흡광도 또는 생균수 측정. 이때 MRS와 TSB 배지에 식중독균/부패균을 실험구와 동일하게 접종한 것을 대조구로 삼음.

(2) 정균/사균 기전 확인(SEM/TEM)

(가) 천연항균물질처리에 의한 정균/사균 작용

천연항균물질생산균주 배양상징액	식중독균/부패균	항균물질처리
<i>Lb. plantarum</i> AF1 배양상징액	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	- 실험구 ① <u>식중독세균</u> : 6.0 log CFU/mL을 배양상징액에 접종 → 30°C, 24시간 처리 ② <u>식중독곰팡이 균사</u> : 곰팡이 균사를 A ₆₀₀ ≒0.05 농도로 배양상징액에 접종 → 30°C, 48시간 처리 ③ <u>식중독곰팡이 포자</u> : 6.0 log spores/mL을 배양상징액에 접종 → 30°C, 3일 처리
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	
<i>Lb. plantarum</i> HD1 배양상징액	<i>A. ochraceus</i> PF-2	- 대조구 : 항균물질 배양배지(MRS)에 식중독균/부패균을 실험구와 동일하게 접종한 것을 대조구로 삼음.
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	
<i>Lb. plantarum</i> EM 배양상징액	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	- 실험구 ① <u>식중독세균 영양세포</u> : 5.0 log CFU/mL을 배양상징액에 접종 → 37°C, 24시간 처리 ② <u>식중독세균 포자</u> : 5.0 log CFU /mL을 배양상징액에 접종 → 37°C, 24시간 처리 - 대조구 : 항균물질 배양배지(TSB)에 식중독균/부패균을 실험구와 동일하게 접종한 것을 대조구로 삼음.
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	
<i>B. subtilis</i> SN7 배양상징액	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	

(나) 정균 or 사균 작용의 확인: 항균물질 처리 후, 식중독균/부패균의 재접종

① 곰팡이:

i) 균사: 항균물질 처리 된 균사를 A₆₀₀≒0.05로 MEB에 접종 → 30°C, 48시간, 진탕배양 → 생육도 확인 → 사균/정균 결과 확인

ii) 포자: 항균물질 처리 된 포자를 6.0 log spores/mL로 MEB에 접종 → 30°C, 48시간, 진탕배양 → 생육도 확인 → 사균/정균 결과 확인

② 세균(포자): 항균물질 처리된 포자 5.0 log spores/mL로 TSB에 접종 → 37°C, 24시간, 진탕배양 → 생육도 확인 → 사균/정균 결과 확인

(다) 사균 작용 확인(형태학적 관찰): SEM/TEM 전처리 및 촬영

: 천연항균물질 생산균주의 배양상징액에 식중독균/부패균을 처리 후 → 균체 회수 → 수세 → 전고정(2.5% glutaldehyde) → 수세 → 후고정(1% OsO₄) → 수세 → 탈수 (50~100% ethanol) → 치환(tert-butanol) → 건조 → 세포벽 및 세포 형태 관찰

라. 천연항균물질의 정제 및 구조규명

(1) 천연 항균물질(항진균/항세균)의 정제

(가) 항진균/항세균 활성 유산균

① 항진균/항세균 활성 유산균이 생산하는 유기산 분석

- 시료: *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM, *Leu. mesenteroides* TA의 배양 상징액
- 분석: Ion Chromatography(Dionex Ultimate 3000, USA), Aminex HPX-87 column (7.8×300 mm, Bio-Rad, Hercules, California, USA), 0.01 N H₂SO₄, 0.5 mL/min

② 항진균/항세균 활성 유산균이 생산하는 유기산과 항진균/항세균 물질의 활성 비교

- 시료: 유산균 4종의 배양 상징액, 유기산 혼합물, 각각의 유기산 용액 준비 → 각각의 유기산은 MRS 액체배지에 녹이고 121°C에서 15분간 멸균, 유기산 혼합물은 MRS 액체배지에 녹이고 유산균의 배양 상징액 pH(AF1, HD1, EM: pH 3.8, TA: pH 4.4)로 조정 후 121°C에서 15분 멸균, 5배(AF1, HD1, EM) 또는 25배(TA) 농축물로 준비
- 항균 활성 측정: spot-on-the lawn test

③ *Lb. plantarum* EM으로부터 항미생물 활성 물질의 정제

- SPE(solid phase extraction): SPE C₁₈ column 사용 → Methanol로 활성화 → 10 mM sodium acetate(pH 4.0) 충전 → 배양 상징액 2.5 L 통과 → 5% acetonitrile washing → 95% acetonitrile 30 mL 용출 → Speed vac. drying
- Prep-HPLC: Recycling preparative LC9104 HPLC system, JAIGEL-W252 column, 3702 UV 검출기 사용, 용출 용매로는 50% acetonitrile(I, II 단계) 또는 40% acetonitrile(III, IV 단계)을 사용, flow rate는 3.0 mL/min(I, II, IV 단계) 또는 2.5 mL/min(III 단계)으로 사용.
- Anal-HPLC: Analytical HPLC(Younglin Acume HPLC, Younglin, Anyang, Korea), LUNA 5 μ C₁₈ column(4.6×250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), UV detector(UV730D, Younglin) 사용, 40% acetonitrile, 0.5 mL/min, 20 μ L injection
- 항균활성 측정: spot-on-the lawn test

(*A. fumigatus* ATCC 96918/MEA, *B. cereus* KCTC 3624/LB)

④ 정제 단계에 따른 항미생물 활성 물질의 항진균, 항세균 활성 역가 측정

- 시료: *Lb. plantarum* EM의 5배 농축 배양 상징액, SPE 전처리 물질, prep-HPLC I ~ IV 단계의 항미생물 활성 분획
- 항균활성 측정: spot-on-the lawn test

(*A. fumigatus* ATCC 96918/MEA, *B. cereus* KCTC 3624/LB)

(나) 항세균 활성 고초균

① *B. subtilis* SN7으로부터 항세균 물질의 정제

- C₁₈ Sep-Pak cartridge: Sep-Pak C₁₈ column 사용 → Methanol 100 mL와 3차 멸균수 100 mL로 활성화 → 배양 상정액 100 mL 통과 → Methanol 10 mL로 용출 → Speed vac. drying
- Prep-HPLC: Recycling preparative LC9104 HPLC system, JAIGEL-W252 column, 3702 UV 검출기 사용, 용출 용매로는 50% acetonitrile(I, II 단계) 또는 45% acetonitrile(III 단계)을 사용, flow rate는 I 단계 5 mL/min, II 단계 3 mL/min, III 단계 2.5 mL/min으로 사용.
- Anal-HPLC: Analytical HPLC(Younglin Acume HPLC, Younglin, Anyang, Korea), LUNA 5 μ C₁₈ column(4.6 \times 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA), UV detector(UV730D, Younglin) 사용, 45% acetonitrile, 0.4 mL/min, 20 μ L injection
- 항균활성 측정: spot-on-the lawn test(*B. cereus* KCTC 3624/LB)

② 정제 단계에 따른 항세균 물질의 항세균 활성 역가 측정

- 시료: *B. subtilis* SN7의 배양 상정액, C₁₈ Sep-Pak 전처리 물질, prep-HPLC I ~ III 단계의 항세균 활성 분획
- 항균활성 측정: spot-on-the lawn test(*B. cereus* KCTC 3624/LB)

(2) 천연 항균물질(항진균/항세균)의 구조규명

(가) 유산균의 항미생물 활성 물질

① 분자량 측정: LC/MS

- LC/MS system(LCQ, Thermo finnigan, USA) 사용, 시료는 용액(0.1% Trifluoroacetic acid)/45% acetonitrile)에 녹여 분석진행, 결과는 X-Caliber software v.2.0.7(Thermo fisher scientific, MA, USA)를 사용하여 분석

② 구조 규명: NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC)

- INOVA 600(600 MHz) NMR spectrometer(Varian Walnut Creek, CA, USA), 용매는 CD₃OD 사용, 1차원 NMR: ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 2차원 NMR: COSY, HSQC, HMBC

(나) 고초균의 항세균 활성 물질

① 분자량 측정: LC/MS

- LC/MS system(LCQ, Thermo finnigan, USA) 사용, 시료는 용액(0.1% Trifluoroacetic acid)/45% acetonitrile)에 녹여 분석진행, 결과는 X-Caliber software v.2.0.7(Thermo fisher scientific, MA, USA)를 사용하여 분석

② 구조 규명: A.A 서열 분석

- Procise 491 HT protein sequencer(Applied biosystems, Wilmington, DE, USA) 사용, 컬럼은 PTH analysis column(2.1 \times 220 mm, Applied biosystems, Wilmington, DE, USA)

사용, 용매는 A, 3.5% THF(tetrahydrofuran) in water B, 12% isopropanol in acetonitrile을 사용하여 다음의 gradient 조건으로 용출 : 0 min A 92% B 8%, 0.2 min A 89% B 11%, 0.4 min A 86% B 14%, 18 min A 54% B 46%, 18.5 min A 10% B 90%, 용출속도는 325 μ L/min를 유지

2. 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발

가. 천연항균물질 생산용 식용배지 개발

(1) 배추폐기물(김치 가공시 파생되는 폐배추와 폐절임배추)의 처리공정 개발

- 배추폐기물의 특성 조사
 - 이화학적 특성: 당도, 염도, 산도, pH
 - 일반성분: 수분, 조단백, 조지방, 조섬유, 조회분
 - 유리당: Glucose, Sucrose 등
 - 유리아미노산: 필수 및 비필수 아미노산 32종

(2) 식용성분을 이용한 식용배지 개발

- 대상 균주: 개발 유산균 및 고초균
- 조사 항목: 생균수 및 항세균/항곰팡이 활성 측정
- 배지 조성: 폐배추/폐절임배추즙, 옥수수 추출물, 쌀가루

(3) 개발 식용배지에서 GRAS 미생물 생육 및 항세균/항곰팡이 활성 최적화

- 영양원의 최적화: 탄소원, 질소원, 무기염
- 배양 pH의 최적화: pH 4.0~pH 9.0
- 배양 시간의 최적화: 0h~48h
- 배양 온도의 최적화: 28 $^{\circ}$ C, 30 $^{\circ}$ C, 37 $^{\circ}$ C

나. 개발 식용배지에서 천연항균소재 개발

(1) 개발 식용배지에서 천연항균소재 생산 및 특성 조사

(가) 균주: 개발 유산균 5종 및 고초균 1종

GRAS미생물	개발식용배지	
유산균용	i) 폐배추즙 배지(A-4)	ii) 폐절임배추즙 배지(B-4)
고초균용	i) 폐배추즙 배지(C-3)	ii) 폐절임배추즙 배지(D-3)

(나) 사용배지: 총 6종

구분	배지		
유산균용	A-4*	B-4**	MRS(대조구)
고초균용	C-3*	D-3**	TSB(대조구)

* 폐배추즙 배지, ** 폐절임배추 배지

(다) 항균 spectrum 지시균 (식중독균/부패균)

M/O	지시균	구분
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546 <i>A. ochraceus</i> PF-2	식중독 원인균
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918 <i>A. nidulans</i> PF-3 <i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	부패균
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	부패균
세균	<i>S. enterica</i> serovar. Typhi ATCC 19430 <i>S. aureus</i> ATCC 29213 <i>B. cereus</i> KCTC 3624 <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895 <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	식중독 원인균
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 <i>M. luteus</i> ATCC 13513	부패균

(라) 생육곡선 및 이에 따른 항균 활성 측정

항목	유산균	고초균
배양 조건	30℃, 48시간, 정치배양	37℃, 48시간, 진탕배양
생육곡선	생균수 계수 : log CFU/mL	
항균 활성	$(1000/d) \times D$: AU/mL (D: dilution factor, d : amount of sample loading)	

(마) 개발배지에서 생산된 항균물질의 특성 규명

: 사용배지에 따른 항균물질의 안정성 실험

- ① pH 안정성: pH 3.0~pH 10.0
- ② 열 안정성: 4℃ ~70℃/24시간, 100℃/30분, 121℃/15분
- ③ 효소 안정성: proteinase K, protease, α -amylase, α -chymotrypsin, lipase, trypsin, pepsin

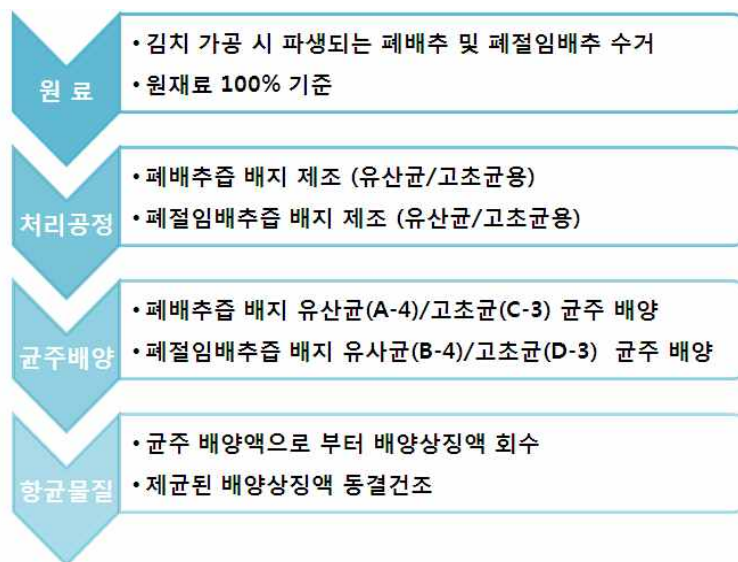
(2) 개발 식용배지에서 항균활성 균주의 보존 및 안정성 보존 유지기술 개발

(가) 개발식용배지에서 배양된 균주의 항균활성 및 생균수 유지 최적화를 위한 안정화 조건 결정

- ① 적용 균주: *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM, *B. subtilis* SN7
- ② 안정제: glucose, sucrose, glycerol 등 총 10종 사용
- ③ 안정제 첨가 농도: 2.5%, 5%
- ④ 안정제 첨가에 따른 유지기간 결정: 각 안정제 첨가조건에서 4℃ 보관 → 1주 간격으로 4주간 생균수 및 항세균·항곰팡이 활성 측정 → 최적 보존 조건 결정

(나) 최적 조건 설정에 따른 항균물질의 생산 수율

: 원료 대비 최종 항균물질의 생산 수율 계산



(3) 천연항균소재의 활용 검증

(가) 신규 천연항균소재 vs. 기존천연보존제 대비 항균 활성

- ① 기존 천연 보존제: 총 4종 사용
(미생물 유래) ϵ -폴리리신/(식물 유래)자몽종자 추출물/(기타)발효주정 95%, 크린콜
- ② 신규 천연항균소재:
Lb. plantarum AF1, HD1, EM의 폐배추즙 배지(A-4) 배양상징액/*B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙 배지(D-3) 배양상징액
- ③ 지시균: 식중독균/부패균 13종
- ④ 항균활성 측정 방법: spot-on-the lawn test로 항균 물질을 2-fold dilution 하여 지시균 위에 점적하여 항균활성 AU/mL 단위로 표기

(나) 식중독균/부패균을 저해하는 항균소재의 사용농도결정

- ① 신규개발 천연항균소재(총 8종)의 식중독 및 부패 세균(7종), 효모(1종), 곰팡이(5종)에 대한 최소 저해 농도(MIC) 측정

사용배지	
유산균	폐배추즙 배지(A-4)
고초균	폐절임배추즙 배지(D-3)

- i) 배양상징액: 배양액 원심분리(9,500×g, 15 min, 4°C) → 동결건조 → 무게 측정 → 유산균: 20 mM sodium acetate(pH 4.0), 고초균: 20 mM Tris-HCl(pH 7.5) buffer에 녹임 → MIC 측정 항균 assay
- ii) 조항균물질: 배양상징액 → column 부착 → column 용출 → 원심증발농축 → 무게 측정 → 유산균: 10 mM sodium acetate(pH 4.0), 고초균: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer에 녹임 → MIC 측정 항균 assay
- iii) MIC 측정(spot-on-the lawn test): 지시균이 첨가된 고체배지(MEA, PDA, LB 등) → 시료 10 μL씩 spotting → 배양 후 지시균에 대한 최소 저해 농도 측정
- ② MIC 측정에 따른 항균소재 유효 농도 결정

다. 천연항균소재의 식품 적용 기술 개발(Lab scale)

(1) 천연항균소재의 식품 적용

(가) 김치

① 시판 포기김치(반찬집 포기김치)

- 목적: 김치 내 존재하는 변패미생물(산막효모) 제어 검증
- 시료: 광주 남구에 위치한 반찬집 담금 직후 김치
- 저장 용기 i) 개봉: 산소 차단 없이 600 mL 멸균 비커
ii) 밀봉: 레토르트 파우치
- 저장 온도 및 기간 i) 개봉: 25°C(20일), 15°C(20일), 4°C(30일)
ii) 밀봉: 25°C(20일), 15°C(120일), 4°C(120일), -1°C(120일)
- 실험구
 - i) *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 1%, 3%, 5%
 - ii) *Lb. plantarum* AF1 MRS(실험실 배지) 배양상징액 1%, 3%, 5%
- 대조구
 - i) 자몽종자추출물 0.03%
 - ii) 유카추출물 0.2%
 - iii) 무처리구
- 처리방법: 천연항균소재/기존 천연보존제 김치 표면에 살포

② 협동기관 수출김치

- 목적: 최근 10년간 김치의 식중독 발생·적발 사례 중 가장 많은 건수로 나타난 식중독 미생물(*E. coli* O157:H7) 제어 검증
- 시료: 협동기관 대상FNF(주)이 생산하는 수출용 김치
+ 인위적으로 *E. coli* O157:H7(10^1 또는 10^2 CFU/g) 접종
- 저장 용기: 밀폐 용기
- 저장 온도 및 기간: 25°C(3일), 15°C(7일), 4°C(30일), -1°C(30일)
- 실험구
 - i) *Lb. plantarum* AF1 페배추즙배지 배양상징액 1%
- 대조구
 - i) 자몽종자추출물 0.03%
 - ii) 유카추출물 0.2%
 - iii) 무처리구
- 처리방법: 천연항균소재/기존 천연보존제 김치 표면에 살포

(나) 청국장

① 협동기관 청국장

- 목적: 청국장내 존재하는 식중독 미생물(*Bacillus cereus*) 제어 검증
- 시료: 협동기관 대상FNF(주)의 기존 보존제가 처리되지 않는 무처리 청국장
- 저장 용기: 일반 파우치
- 저장 온도 및 기간: 37°C(7일), 15°C(80일), 4°C(80일)
- 실험구
 - i) *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%, 2%
 - ii) *B. subtilis* SN7 TSB(실험실 배지) 배양상징액 1%, 2%
- 대조구
 - i) 주정 2.5%
 - ii) 무처리구
- 처리방법: 천연항균소재/기존 천연보존제 시료에 혼합

② 실험실 제조 청국장

- 목적: *B. subtilis* SN7을 직접 종균으로 사용하여 별도의 보존제나 항균제 처리없이 식중독 미생물인 *B. cereus*의 생균과 포자의 제어 효과 검증
- 시료 제조: 콩 20°C, 15시간 침수 → 121°C, 30분간 삶기 → *B. subtilis* SN7과 *B. cereus* 접종 → 40°C, 24시간 발효 → 4°C, 6개월 저장
- 저장 온도 및 기간: 4°C(6개월)
- 실험구

- i) *B. subtilis* SN7 영양세포 10^6 CFU/g
+ *B. cereus* KCTC 3624 영양세포 10^3 또는 10^4 CFU/g 접종
- ii) *B. subtilis* SN7 영양세포 10^6 CFU/g
+ *B. cereus* KCTC 3624 포자 10^3 또는 10^4 CFU/g 접종
- 대조구
 - i) *B. subtilis* SN7 10^6 CFU/g 단독 접종
 - ii) *B. cereus* KCTC 3624 10^3 또는 10^4 CFU/g 단독 접종

(다) 샐러드

① 시판 샐러드

- 목적: 신선편의식품 중 식중독 발생 사례가 높은 식중독 미생물(*E.coli* O157:H7) 생육저해 검증
- 시료: 광주 남구에 위치한 대형 마트 구입 샐러드(유통 직후, 제조 1일차)
+ 인위적으로 *E. coli* O157:H7(10^1 또는 10^2 CFU/g) 접종
- 저장 용기: 밀폐 용기
- 저장 온도 및 기간: 밀봉 : 37°C(1일), 15°C(2일), 4°C(3일)
- 실험구
 - i) *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%
 - ii) *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%
 - iii) *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%
+ *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%
- 대조구
 - i) 주정 1%
 - ii) 무처리구
- 처리방법: 천연항균소재/기존 천연보존제 샐러드 표면에 살포

(라) 막걸리

① 시판 막걸리

- 목적: 생막걸리의 변패미생물(산막효모) 제어 검증
- 시료: 광주 남구에 위치한 대형 마트 구입 막걸리(유통 직후, 제조 1일차)
- 저장 용기: 개봉 보관
- 저장 온도 및 기간: 10°C(30일)
- 실험구
 - i) *Lb. plantarum* HD1 조항균물질(SPE 부분정제물) 0.05%
- 대조구
 - i) 무처리구

- 처리방법: 천연항균소재(*Lb. plantarum* HD1의 SPE 부분정제물)을 막걸리에 혼합

(2) 천연항균소재 적용 식품의 특성 조사

(가) 김치

① 반찬집 포기김치

- 산막효모 발생 여부 및 시점 관찰
- 저장기간에 따른 미생물 균총 조사

: 유산균수, 효모수, 식중독균 10종; *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, 대장균군

- 적용 식품의 관능적 특성 조사

i) 실험구: *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 1% 첨가구

ii) 대조구: 무처리구/자몽종자추출물 0.03% 첨가구/유카추출물 0.2% 첨가구

iii) 관능항목: 비적용 식품 대비 천연항균소재 처리에 의한 이미, 이취, 외관상의 변화에 영향 여부 및 정도를 측정

(-2점: 매우 나쁘다, -1점: 나쁘다, 0점: 차이가 없다, 1점: 좋다, 2점: 매우 좋다)

※ 비적용 식품 대비 천연항균소재 처리에 따른 이미, 이취, 외관상의 변화에 영향을 주는지 여부를 검증

- 신규 천연항균소재 적용 식품의 유통기한 설정

② 대상FNF(주) 수출김치

- 저장기간에 따른 미생물 균총 조사

: 상기 방법과 동일(p. 19) 단 효모수는 제외

(나) 청국장

① 대상FNF(주) 청국장

- 저장기간에 따른 미생물 균총 조사

: 총균수, *B. cereus* 외 식중독균 9종; *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, 대장균군

- 적용 식품의 관능적 특성 조사

i) 실험구: *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액 1% 첨가구

ii) 대조구: 무처리구/발효주정 2.5% 첨가구

iii) 관능항목: 상기 방법과 동일(p. 19)

- 신규 천연항균소재 적용 식품의 유통기한 설정

② 실험실 제조 청국장

- 저장기간에 따른 미생물 균총 조사: 총균수, *B. cereus* 수

(다) 샐러드

① 대형마트 구입 샐러드

- 무치리구 미생물조사

: 식중독균 6종; *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, 대장균

- 저장기간에 따른 미생물 조사

: *E. coli* O157:H7 외 식중독균 5종; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, 대장균

- 적용 식품의 관능적 특성 조사

i) 실험구: 신규 천연항균소재 적용 최적농도결정에 따라 적용한 식품

ii) 대조구: 무치리구(비적용 식품)/발효주정 첨가구(기존보존제 적용 식품)

iii) 관능항목: 상기 방법과 동일(p. 19)

(라) 막걸리

① 대형마트 구입 막걸리

- 무첨가구 미생물 조사

- 천연항균소재에 의한 생막걸리의 산막효모 저해 효과

- 관능적 특성 조사

※ 식중독 미생물 검출 방법(Ref. 식품공전 미생물 시험법에 따름)

식중독 미생물	식중독 미생물 검출 배지
<i>Salmonella</i> spp.	XLD 한천배지
<i>Staphylococcus aureus</i>	난황첨가 만니톨 식염한천배지
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TCBS(thiosulfate citrate bile salt sucrose)한천배지
<i>Listeria monocytogenes</i>	Oxford 한천배지
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	TC-SMAC 한천배지
<i>Campylobacter jejuni/colii</i>	Modified Campy blood free 한천배지
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIN 한천배지
<i>Bacillus cereus</i>	MYP(mannitol egg yolk polymyxin) 한천배지
<i>Clostridium perfringens</i>	난황첨가 TSC 한천배지
대장균	대장균 건조필름배지 I

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발

가. 식중독균/부패균의 저해활성을 지닌 GRAS 미생물의 개발

(1) 식중독균/부패균 생육 저해활성 GRAS 미생물의 분리·동정

(가) 식중독균/부패균 생육 저해활성 GRAS 미생물의 분리(유산균, 고초균)

① 식중독균/부패균 선정

- 본 과제에서 저해하고자 하는 유해미생물의 범위는 Table 1과 Table 2에서 제시된 바와 같이 미생물유래 식중독(세균성+곰팡이성)과 우리나라에서 최근 12년간 발생 빈도가 높은 식중독 및 비가열식품의 주된 유해 식중독세균을 대상으로 함. 이와 더불어 식품유통과정 중 다빈도로 발생하는 부패미생물을 생육저해 유해 미생물(식중독/부패균) 대상으로 삼았으며 이를 Table 3에 정리하여 제시함.

② GRAS 미생물 분리 및 식중독균/부패균 생육 저해활성 GRAS 미생물 개발

- 분리유산균 및 고초균의 식중독균/부패균의 생육 저해활성을 조사하기 위하여 균체를 직접 가하는 direct method와 배양상징액 또는 농축상징액을 이용한 paper disc assay를 병행하여 항균활성이 우수한 균주를 선발함. Direct method는 항균활성균(유산균, 고초균)과 감수성균(곰팡이, 세균, 효모)이 둘 다 자랄 수 있도록 dual culture overlay assay를 시행함.
- 본 연구에서 김치유래 유산균 약 450여종을 대상으로 Table 3의 식중독균/부패균에 대한 항균활성을 측정된 결과, 분리된 유산균의 종류에 따라 생육저해 활성은 다르게 나타남. 이 중 가장 강력한 항균활성과 항균 spectrum이 넓은 5종의 유산균을 선발함. 즉, 유산균 AF1, HD1, EM은 지시균으로 사용한 곰팡이, 효모, 세균의 속 및 종의 종류에 관계없이 활성범위가 넓고 항균활성이 가장 우수한 것으로 관찰됨. 또한 GR1과 TA 2종의 유산균은 AF1, HD1, EM에 비하여는 항균활성이 약하고 항효모 활성은 없었으나, 항세균 및 항곰팡이 활성을 보였으며, 대상 지시균에 따라서 다른 항균 spectrum을 나타내어 이들 분리유산균주들을 혼합사용 시 항균 spectrum 및 그 활성이 넓고 강해질 것임(Table 4, Figure 1~3).
- 장류로부터 분리한 고초균 100여종 중 SN7은 저해대상 *A. ochraceus* PF-2, *P. roqueforti* ATCC 10110와 *B. cereus* KCTC 3463에 대해 특이적으로 가장 강력한 항균활성을 나타내었음. 또한 그 외 식중독/부패 원인 세균에 대해서도 항균활성을 나타내었음(Table 4, Figure 1~3).
- 이에 김치 및 장류로부터 분리한 GRAS 미생물들 중 식중독균/부패균 저해활성을 보이는 균주로 유산균 5종(AF1, HD1, EM, GR1, TA)과 고초균 1종(SN7)을 최종 선발하였음.

☞ **식중독균/부패균 생육 저해 항균활성균주 선정: 유산균 5종(AF1, HD1, EM, GR1,**

TA) 및 고초균 1종(SN7)

(나) 분리 균주의 동정

① 식중독균/부패균 생육저해 활성 유산균 5종

- AF1: *Lactobacillus plantarum* AF1(기동정)
- HD1: *Lactobacillus plantarum* HD1(기동정)
- GR1: *Leuconostoc citreum* GR1(기동정)

→ 강력한 항균활성(항진균/항세균)을 보이는 유산균 5종 중 AF1은 본 연구실에서 선행연구를 통하여 항곰팡이 활성을 가진 김치유산균으로서 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었으며, 그 항진균물질을 규명한 바 있음(Ref. 4). 또한 HD1과 GR1도 선행연구(Ref. 5)를 통하여 동정된바 있음.

Ref. 4) E.J. Yang, H.C. Chang. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 139:46-63

Ref. 5) 농림축산식품부 지원 기획과제. 2013 「김치발효조절 및 품질균일화를 위한 미생물 천이조절 기술 개발」, 발간등록번호: 11-1543000-000180-01

- EM, TA: 형태학적 관찰, 생화학적 동정 및 분자생물학적 동정을 시행함.

- 식중독균/부패균 생육저해 활성 고초균 1종

- SN7: 형태학적 관찰, 생화학적 동정 및 분자생물학적 동정을 시행함.

i) 형태학적 관찰

- 신규 분리한 항균활성을 지니는 유산균 2종 및 고초균 1종에 대한 그람염색 (Figure 4) 및 형태학적 관찰을 시행함(Table 5). 분리균주 3종 모두 그람양성이었고, 유산균 EM과 고초균 SN7은 간균, TA는 구균의 형태를 나타냄. Colony의 모양은 유산균 2종은 모두 매끈하고 둥근 형태를 지녔고, colony 색은 모두 밝은 상아색에 불투명하였으며, 고초균 SN7은 표면은 뾰족하면서 둥근 형태를 지녔고, colony 색은 어두운 상아색에 투명하였음.

ii) 생화학적 동정(당대사능)

- 생화학적 동정방법으로 유산균(EM, TA)은 API 50CHL system(Table 6), 고초균(SN7)은 API 50CHB system을 이용하여 C-화합물 대사능을 조사한 결과(Table 7), EM은 *Lactobacillus plantarum*과 상동성 99.9%, TA는 *Leuconostoc mesenteroides*와 상동성 99.9%, SN7은 *Bacillus subtilis*와 상동성 99.9%를 나타냄.

iii) 분자생물학적 동정(16S rRNA sequencing)

- 유산균 2종(EM, TA)과 고초균 1종(SN7)으로부터 genomic DNA를 추출하여 이로부터 16S rRNA gene의 염기서열을 결정하였음.
- 유산균 EM은 1,881 bp의 16S rRNA gene 염기서열을 결정하였고, 결정된 염기서열로 Genbank에 등록된 다른 균주들과 상동성을 분석한 결과 type strain *Lactobacillus plantarum* JCM 1149와 99.9%의 상동성을 나타내어 EM은 *Lb.*

*plantarum*으로 최종 동정되었고 이를 *Lb. plantarum* EM으로 명함.

- 유산균 TA는 1,549 bp의 16S rRNA gene 염기서열을 결정하였고, 결정된 염기서열로 Genbank에 등록된 다른 균주들과 상동성을 분석한 결과 type strain *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293과 100%의 상동성을 나타냄. 그러나 ATCC에서 분양 받은 8293과 본 과제에서 분리한 TA의 생화학적 특성(당대사능) 조사 비교에서 두 균주간의 대사적 차이가(cellobiose, lactose, β -gentibiose, gluconate) 관찰되었음. 이는 두 균주가 서로 다른 기원(ATCC 8293: 올리브, TA: 김치)에서 분리되었고 이로 인하여 계통학적인 유전자는 동일하여도 당대사능이 다르게 나타나는 것으로 추정됨. 이에 TA는 *Leu. mesenteroides*으로 동정하였고 이를 *Leu. mesenteroides* TA으로 명함.
- 고초균 SN7은 1,371 bp의 16S rRNA 염기서열을 결정하였고, 결정된 염기서열로 Genbank에 등록된 다른 균주들과 상동성을 분석한 결과 type strain *Bacillus subtilis* DSM 10과 99.9%의 상동성을 나타내어 SN7은 *B. subtilis*로 최종 동정되었고 이를 *B. subtilis* SN7으로 명함.
- 본 16S rRNA gene 염기서열을 기초로 하여 분리 유산균주와 고초균의 다른 세균과의 계통 발생론적 관계를 Figure 5~6에 나타냄.

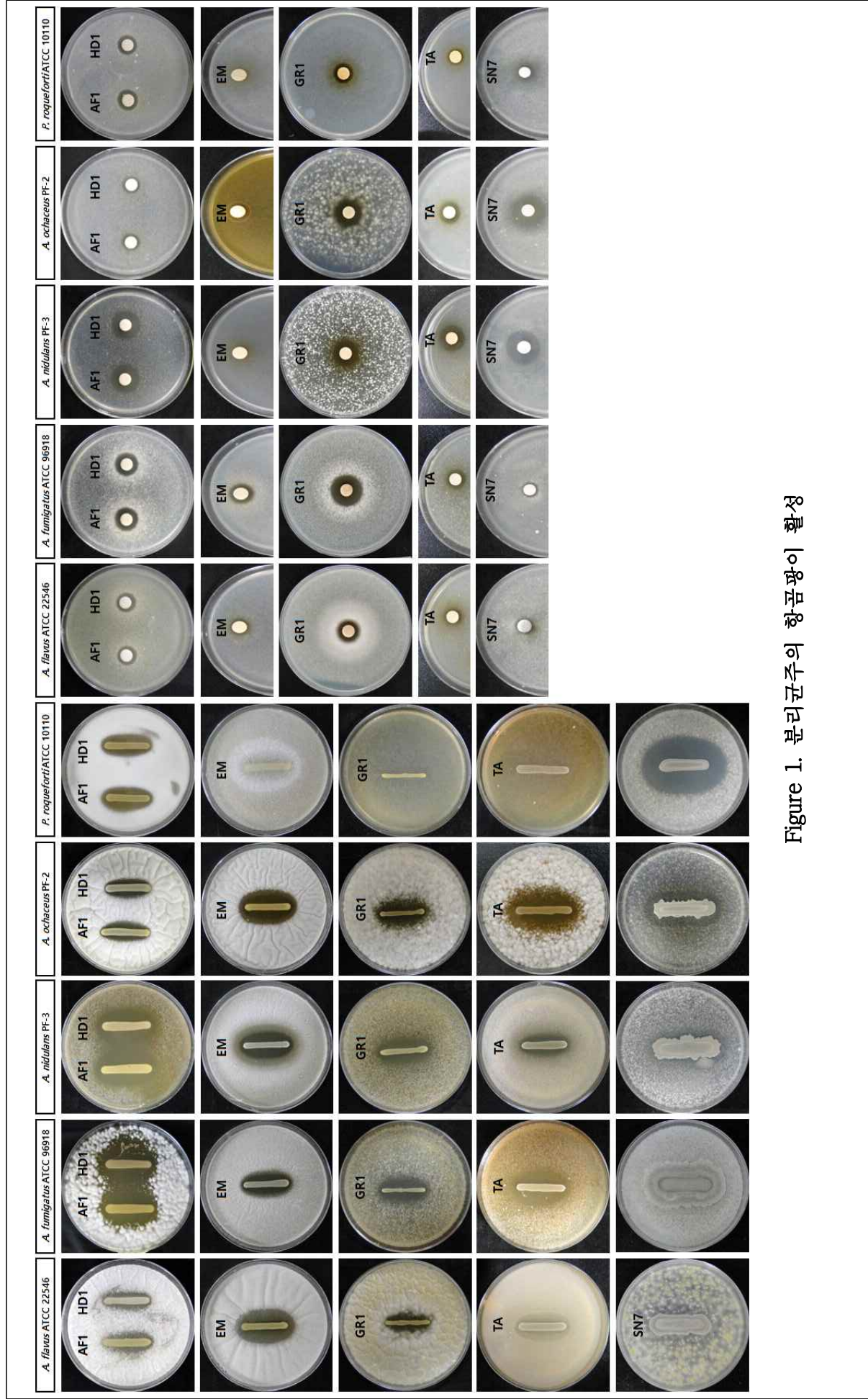


Figure 1. 분리균주의 항곰팡이 활성

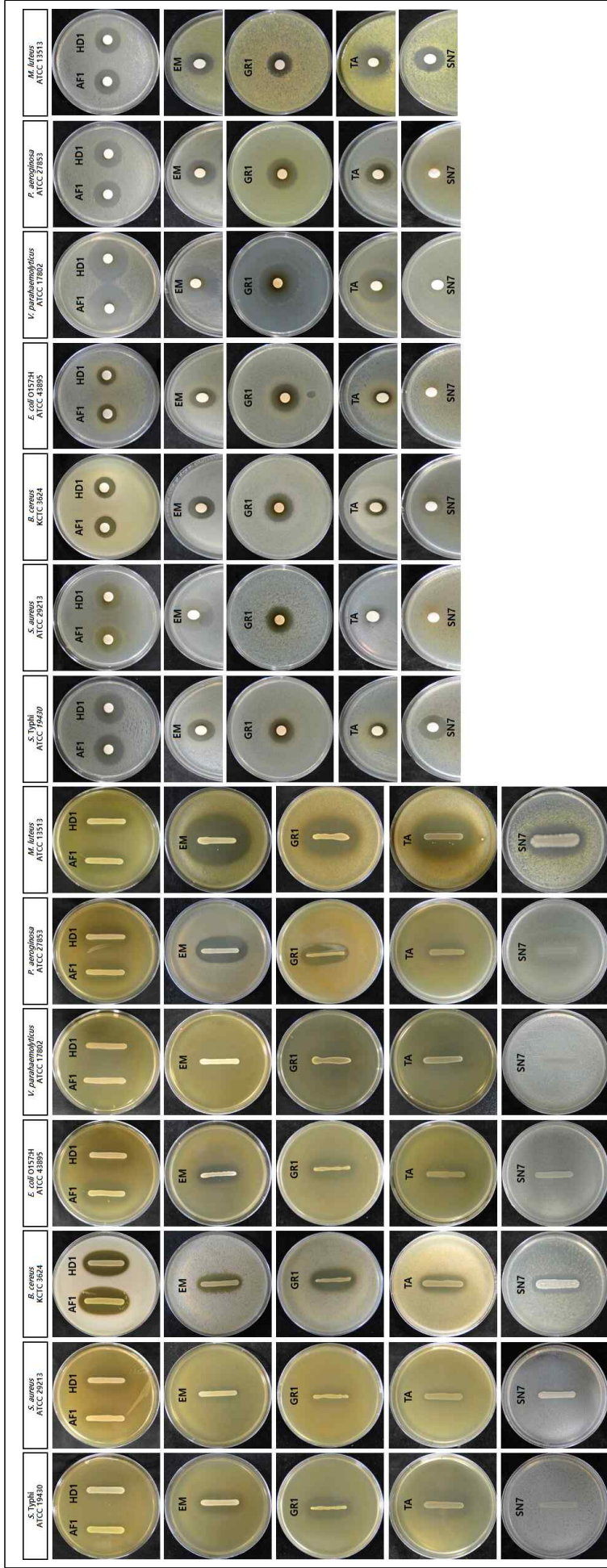


Figure 2. 분리균주의 항세균 활성

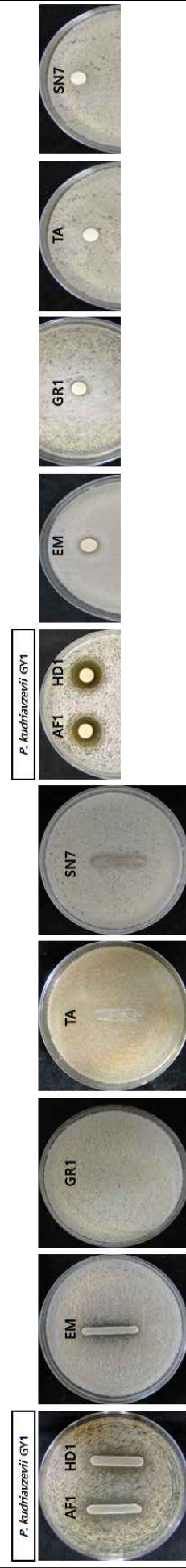


Figure 3. 분리균주의 항효모 활성

Table 4. 항균활성균주의 식중독균/부패균 생육 저해활성

Microorganisms	Direct assay (Inhibition zone: mm)							Paper disc assay (Inhibition zone: mm)										
	AFI	HD1	EM	GRI	TA	SN7	AFI*	HD1*	EM*	GRI**	TA**	SN7*	AFI**	HD1**	EM**	GRI**	TA**	SN7*
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	13.49	12.56	26.82	8.77	8.49	turbid	13.55	13.32	13.93	10.15	9.36	12.84						
<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	12.54	12.60	12.96	13.28	11.37	25.35	13.23	12.93	turbid	10.74	12.68	16.57						
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	18.90	18.20	16.32	14.30	9.96	13.63	15.11	15.71	14.75	13.65	14.27	turbid						
<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	18.52	18.49	18.54	13.20	18.79	turbid	21.42	21.31	15.83	10.67	13.86	18.32						
<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	13.24	13.26	turbid	0.00	0.00	36.41	13.40	13.21	turbid	10.07	9.28	12.13						
<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhi</i> ATCC 19430	15.13	15.28	16.01	20.17	19.63	0.00	17.68	17.06	20.39	21.31	14.88	0.00						
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	15.49	15.18	9.28	13.77	turbid	turbid	22.81	22.46	28.96	22.58	turbid	12.19						
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	22.63	22.25	15.15	17.41	11.28	7.25	21.13	21.15	17.23	23.78	13.55	17.89						
<i>E. coli</i> O157:H ATCC 43895	14.29	14.43	14.42	17.98	12.30	turbid	19.15	19.24	19.91	23.79	12.23	0.00						
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	ND	ND	ND	21.66	19.65	0.00	44.85	44.81	33.59	35.07	28.38	0.00						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	22.93	22.43	21.40	17.31	10.85	0.00	21.26	21.34	24.02	24.91	23.76	0.00						
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	22.72	22.45	30.24	21.74	22.30	18.69	16.45	16.79	21.81	19.31	13.65	22.31						
Yeast <i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	11.98	11.79	11.35	0.00	0.00	0.00	13.54	13.47	turbid	0.00	0.00	0.00						

*배양상징액 5배 농축, **배양상징액 25배 농축
2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

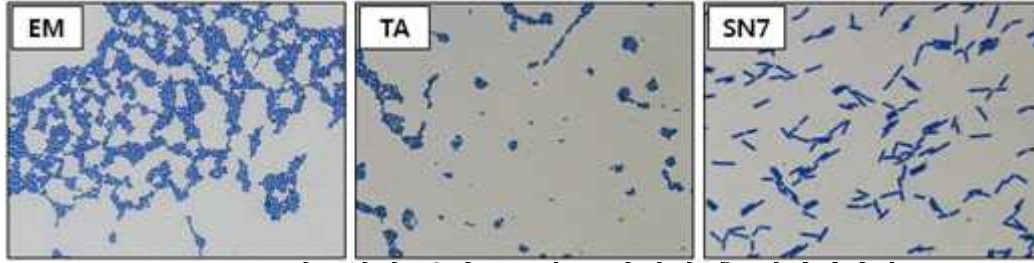


Figure 4. 항균활성 분리균주의 그람염색 후 현미경관찰

Table 5. 분리균주의 배양학적 형태관찰

Strains	EM	TA	SN7
Gram-stain	+	+	+
Morphology	rod	coccus	rod
Colony	circular	circular	circular
Colony surface	smooth	smooth	sharp
Colony color	ivory	ivory	dark ivory
Colony opacity	opaque	opaque	clarity

Table 6. 분리유산균의 당대사능(API 50CHL system)

Sugar	Metabolism			Sugar	Metabolism			Sugar	Metabolism		
	EM	TA	8293		EM	TA	8293		EM	TA	8293
Glycerol	-	-	-	Manitol	+	+	+	D-Raffinose	-	+	+
Erythritol	-	-	-	Sorbitol	-	-	-	Amidon	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	α -Methyl-D-mannoside	+	+	+	Glycogene	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	α -Methyl-D-Glucoside	-	+	+	Xylitol	-	-	-
Ribose	+	+	+	N-Acetyl glucosamine	+	-	-	β -Gentiobiose	+	-	+
D-Xylose	-	+	+	Amygdaline	+	-	-	D-Turanose	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	Arbutin	+	-	-	D-Lyxose	-	-	-
Adonitol	-	-	-	Esculine	+	-	-	D-Tagatose	-	-	-
β -Methyl-xyloside	-	-	-	Salicine	+	+	+	D-Fucose	-	-	-
Galactose	+	+	+	Cellobiose	+	-	+	L-Fucose	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	Maltose	+	+	+	D-Arabitol	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	Lactose	+	-	+	L-Arabitol	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	Melibiose	-	+	+	Gluconate	+	+	-
L-Sorbose	-	-	-	Sucrose	+	+	+	2 keto-gluconate	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	Trehalose	+	+	+	5 keto-gluconate	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	Inuline	-	-	-				
Inositol	-	-	-	Melezitose	+	-	-				

Table 7. 분리고초균의 당대사능(API 50CHB system)

Sugar	Metabolism	Sugar	Metabolism	Sugar	Metabolism
	SN7		SN7		SN7
control	-	Inositol	+	Melezitose	-
Glycerol	-	Mannitol	+	D-Raffinose	-
Erythritol	-	Sorbitol	+	Amidon	+
D-Arabinose	-	α -Methyl-D-mannoside	-	Glycogene	+
L-Arabinose	-	α -Methyl-D-Glucoside	+	xylitol	-
Ribose	-	N-Acetyl glucosamine	-	β -Gentiobiose	+
D-xylose	-	Amygdaline	+	D-Turanose	-
L-xylose	-	Arbutine	+	D-Lyxose	-
Adonitol	-	Esculine	+	D-Tagatose	-
β -Methyl-xyloside	-	Salicine	+	D-Fucose	-
Galactose	-	Cellobiose	+	L-Fucose	-
D-Glucose	+	Maltose	+	D-Arabitol	-
D-Fructose	+	Lactose	-	L-Arabitol	-
D-Mannose	+	Melibiose	-	Gluconate	-
L-Sorbose	-	Saccharose	+	2 keto-gluconate	-
Rhamnose	-	Trehalose	+	5 keto-gluconate	-
Dulcitol	-	Inuline	-		

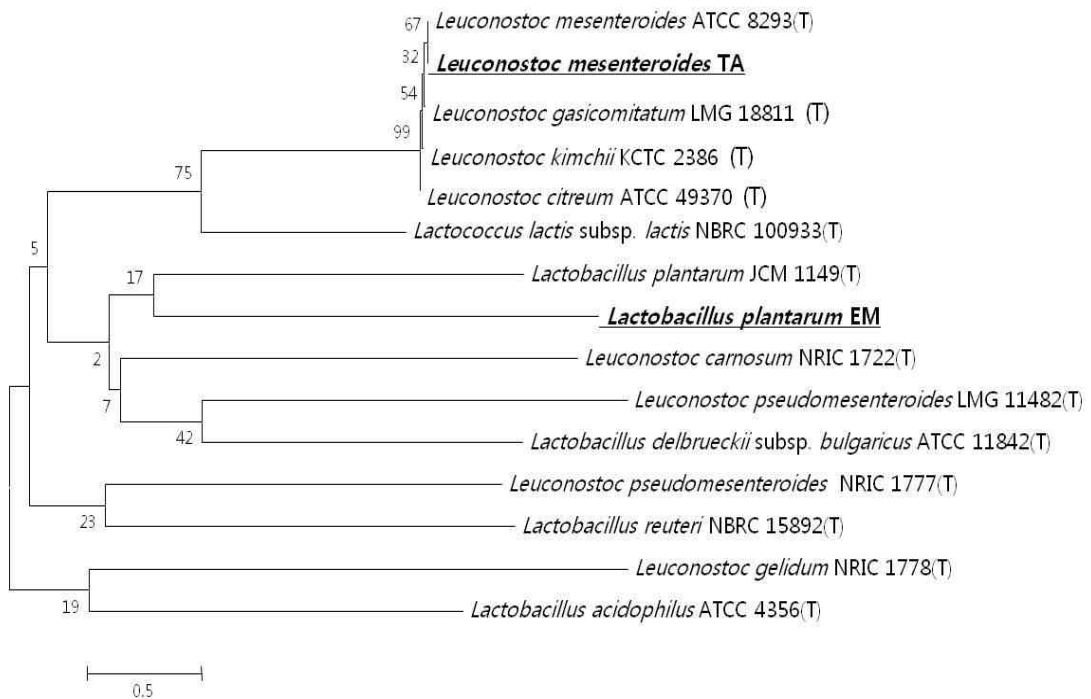


Figure 5. 분리유산균의 다른 유연관계미생물과의 계통발생론적 관계

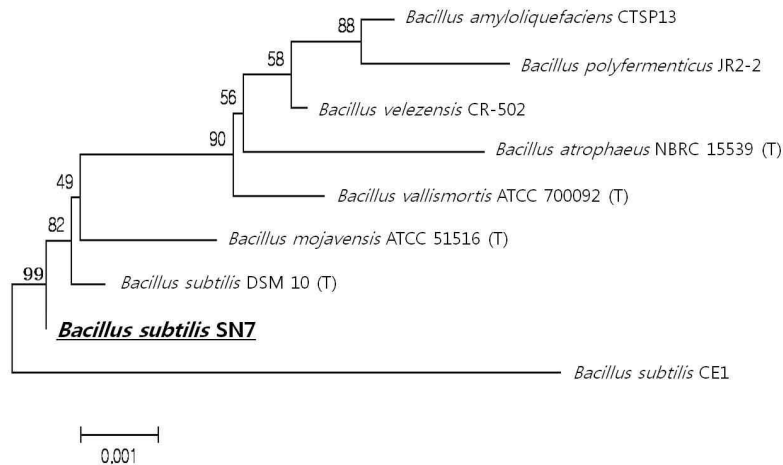


Figure 6. 분리고초균의 다른 유연관계미생물과의 계통발생론적 관계

☞ 식중독균/부패균 생육저해 활성 유산균 5종 + 고초균 1종

- AF1: *Lactobacillus plantarum* AF1(기동정)
- HD1: *Lactobacillus plantarum* HD1(기동정)
- GR1: *Leuconostoc citreum* GR1(기동정)
- EM: *Lactobacillus plantarum* EM(신규동정)
- TA: *Leuconostoc mesenteroides* TA(신규동정)
- SN7: *Bacillus subtilis* SN7(신규동정)

(2) 항균활성균주의 미생물학적 특성규명

(가) 항균활성균주의 생육 최적 조건 설정

- 항균활성 측정을 위한 지시균으로 유산균 AF1, HD1, EM, TA는 *A. fumigatus* ATCC 96918을 사용하였고, 유산균 GR1과 고초균 SN7은 *B. cereus* KCTC 3624를 사용함.

① 배양 배지

- 항균활성 유산균 5종(AF1, HD1, EM, GR1, TA)의 배양배지로 MRS 배지를 선정함.
- 항균활성 고초균 1종(SN7)은 항균활성 물질 분리를 위한 최적 배양 배지조건을 결정하기 위하여 LB와 TSB 배지에서 각각 배양함. *B. subtilis* SN7의 배양상징액으로 지시균 *B. cereus* KCTC 3624에 대해 paper disc assay를 시행하여 항균활성을 측정된 결과, LB배지에서 배양한 배양상징액보다는 TSB에서 배양한 배양상징액이 더 강한 항균활성을 나타냄(Figure 7). 이에 *B. subtilis* SN7의 최적 배양 배지는 TSB로 선정함.

☞ 최적 배양배지: 유산균 5종-MRS, 고초균 1종-TSB로 함.

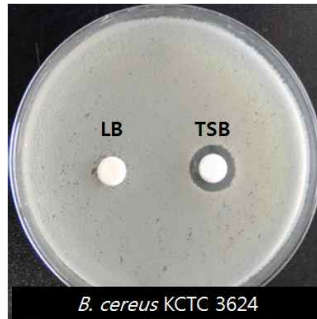


Figure 7. *B. subtilis* SN7의 배양배지에 따른 항균활성

② 배양 온도

- 식중독균/부패균 저해활성을 지닌 유산균 5종 및 고초균 1종으로부터 항균활성물질 분리를 위한 최적 배양 온도를 설정하기 위하여 28℃, 30℃, 37℃로 배양 온도를 달리하여 24시간, 48시간 또는 72시간(고초균)까지 배양한 후 생육도 및 항균활성을 측정함(Figure 8).
- *Lb. plantarum* AF1과 HD1은 37℃에서 배양 시보다 28℃와 30℃에서 배양시 생육도가 더 높게 나타났으며, 항균활성은 모든 배양온도(28℃~37℃)에서 배양 24시간부터 48시간까지 640 AU/mL를 유지함.
- *Lb. plantarum* EM은 28℃와 37℃에서 배양 시보다는 30℃에서 배양시 생육도가 높게 나타났으며, 항균활성은 모든 배양온도(28℃~37℃)에서 배양 24시간부터 48시간까지 640 AU/mL를 유지함.
- *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA는 28℃와 37℃에서 배양시보다 30℃에서 배양시 생육도가 가장 높게 나왔으며, 항균활성은 28℃와 30℃에서 배양 24시간부터 48시간까지 *Leu. citreum* GR1은 64 AU/mL, *Leu. mesenteroides* TA의 항균활성은 32 AU/mL를 유지함.
- *B. subtilis* SN7은 28℃와 30℃에서 배양 시보다는 37℃에서 배양시 생육도 및 항균활성이 확연히 높았으며, 배양 24시간부터 배양 48시간까지 1,600 AU/mL의 항균활성을 유지하다가 배양 72시간에는 800 AU/mL로 감소되었음.

☞ 항균활성물질 생산 최적 배양온도: 유산균 3종(AF1, HD1, EM)-28℃~37℃; 유산균 2종(GR1, TA)-28℃~30℃; 고초균 1종-37℃

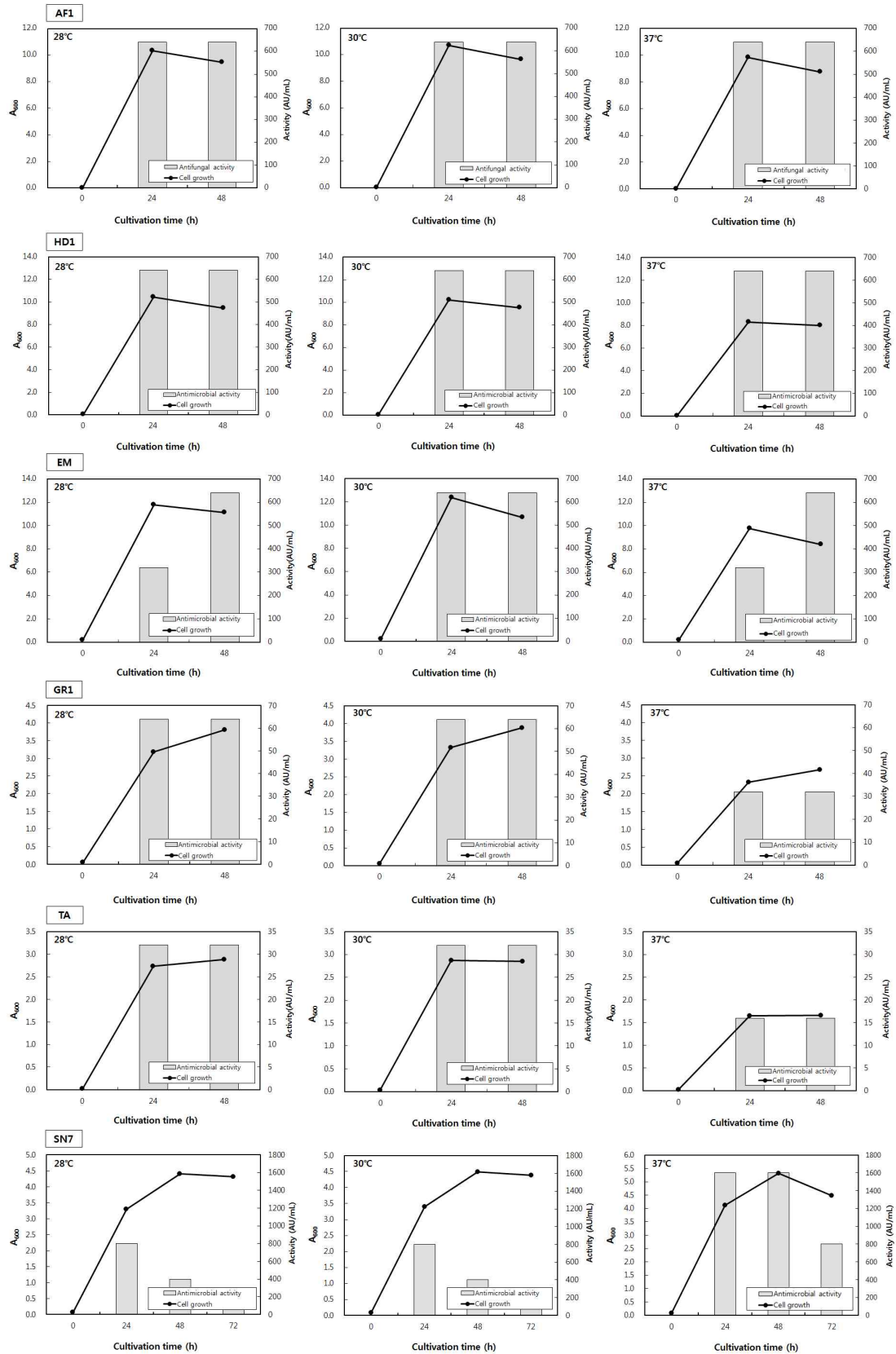


Figure 8. 배양온도에 따른 항균활성균주의 생육 및 항균활성
2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

③ 배양 초기 pH

- 배양 초기 pH에 따른 항균활성균주의 항균활성을 조사하기 위하여, 선정된 배지(유산균-MRS, 고초균-TSB)의 pH를 유산균은 pH 4.0~7.0의 범위로, 고초균은 pH 4.0~8.0의 범위로 0.1 N NaCl 또는 0.1 N NaOH를 사용하여 조정하였으며, 배양 최적 온도 범위로 유산균 5종은 30°C에서 고초균 1종은 37°C에서 배양하였음 (Figure 9).
- 유산균 중 *Lb. plantarum*인 AF1, HD1의 항균활성은 배양 초기 pH 5.0과 pH 6.0에서 배양 24시간부터 배양 48시간까지 640 AU/mL로 가장 높게 나타남.
- 유산균 중 *Lb. plantarum* EM의 항균활성은 배양 초기 pH 6.0과 pH 7.0에서 배양 24시간부터 배양 48시간까지 640 AU/mL로 가장 높게 나타남.
- *Leu. citreum* GR1의 항균활성은 배양 초기 pH 7.0에서 배양 24시간부터 배양 48시간까지 64 AU/mL로 가장 높게 나타남.
- *Leu. mesenteroides* TA의 항균활성은 배양 초기 pH 6.0과 pH 7.0에서 배양 24시간부터 배양 48시간까지 32 AU/mL로 가장 높게 나타남.
- *B. subtilis* SN7은 배양 초기 pH 7.0에서 배양 24시간부터 배양 48시간까지 1,600 AU/mL로 가장 높게 나타남.

☞ 최적 배지 초기 pH: 유산균 2종(AF1, HD1)-배양 초기 pH 5.0~6.0; 유산균 2종(EM, TA)-배양 초기 pH 6.0~7.0; 유산균 1종(GR1)-배양 초기 pH 7.0; 고초균 1종(SN7)-배양 초기 pH 7.0

④ 최적 배양조건에서 항균활성균주의 생육곡선 및 항균활성

- 선정된 최적 배양배지, 배양온도, 배양 초기 pH의 조건에서 항균활성균주의 배양시간에 따른 생육곡선 및 항균활성을 측정함(Figure 10).
 - 최적 배양배지: 유산균 5종-MRS, 고초균 1종-TSB
 - 최적 배양온도: 유산균 5종-30°C, 고초균 1종-37°C
 - 최적 배양 초기pH: 유산균 3종(AF1, HD1, EM)-배양 초기 pH 6.0; 유산균 2종(TA, GR1)-배양 초기 pH 7.0; 고초균 1종(SN7)-배양 초기 pH 7.0
- *Lb. plantarum* AF1 균주를 최적 배양조건에서 배양한 결과, 배양 20시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며 항균활성도 20시간에 최대 활성(640 AU/mL)을 나타내었고 배양 48시간까지 그 항균활성을 유지함.
- *Lb. plantarum* HD1 균주를 최적 배양조건에서 배양한 결과, 배양 20시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며 항균활성은 배양 16시간에 최대 활성(640 AU/mL)을 나타내었고 배양 48시간까지 그 항균활성을 유지함.
- *Lb. plantarum* EM 균주를 최적 배양조건에서 배양한 결과, 배양 24시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며 항균활성은 배양 20시간에 최대 활성(640 AU/mL)을 나

타내었고 배양 48시간까지 그 항균활성을 유지함.

- *Leu. citreum* GR1 균주를 최적 배양조건에서 배양한 결과, 배양 36시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며 항균활성은 배양 24시간에 최대 활성(64 AU/mL)을 나타내었고 배양 48시간까지 그 항균활성을 유지함.
- *Leu. mesenteroides* TA 균주를 최적 배양조건에서 배양한 결과, 배양 16시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며 항균활성은 배양 12시간에 최대 활성(32 AU/mL)을 나타내었고 배양 48시간까지 그 항균활성을 유지함.
- *B. subtilis* SN7 균주를 최적 배양조건에서 배양한 결과, 배양 36시간 정도에 생육 정지기에 이르렀으며 항균활성은 배양 24시간부터 48시간까지 최대 활성(1,600 AU/mL)을 나타내었고 이후 감소하여 배양 64시간에 800 AU/mL, 배양 120시간에 400 AU/mL를 나타냄.

※ 항균활성물질 생산 최적 배양 조건

배양조건	GRAS 항균활성* 균주					
	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7
배지	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	TSB
배양온도	28℃ ~ 37℃	28℃ ~ 37℃	28℃ ~ 37℃	28℃ ~ 30℃	28℃ ~ 30℃	37℃
배양 초기 pH	5.0~6.0	5.0~6.0	6.0~7.0	7.0	6.0~7.0	7.0
최대 항균활성 배양시간	20h~48h	16h~48h	20h~48h	24h~48h	12h~48h	24h~48h
최대 항균활성 (AU/mL)	640	640	640	64	32	1,600

*AF1, HD1, EM, TA: 감수성균주 *A. fumigatus* ATCC 96918 사용
GR1, SN7: 감수성균주 *B. cereus* KCTC 3624 사용

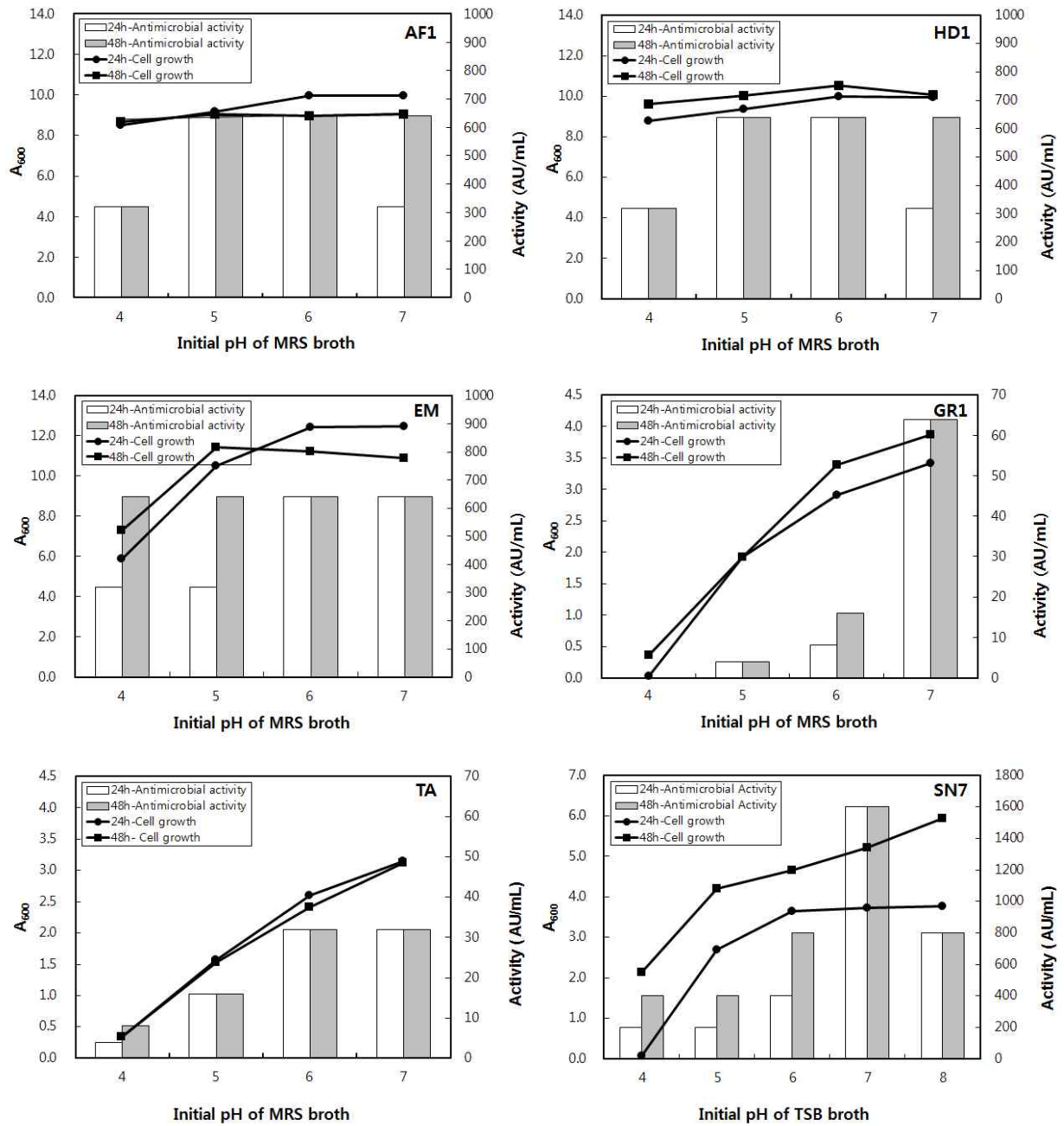


Figure 9. 배양 초기 pH에 따른 항균활성균주의 생육 및 항균활성

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

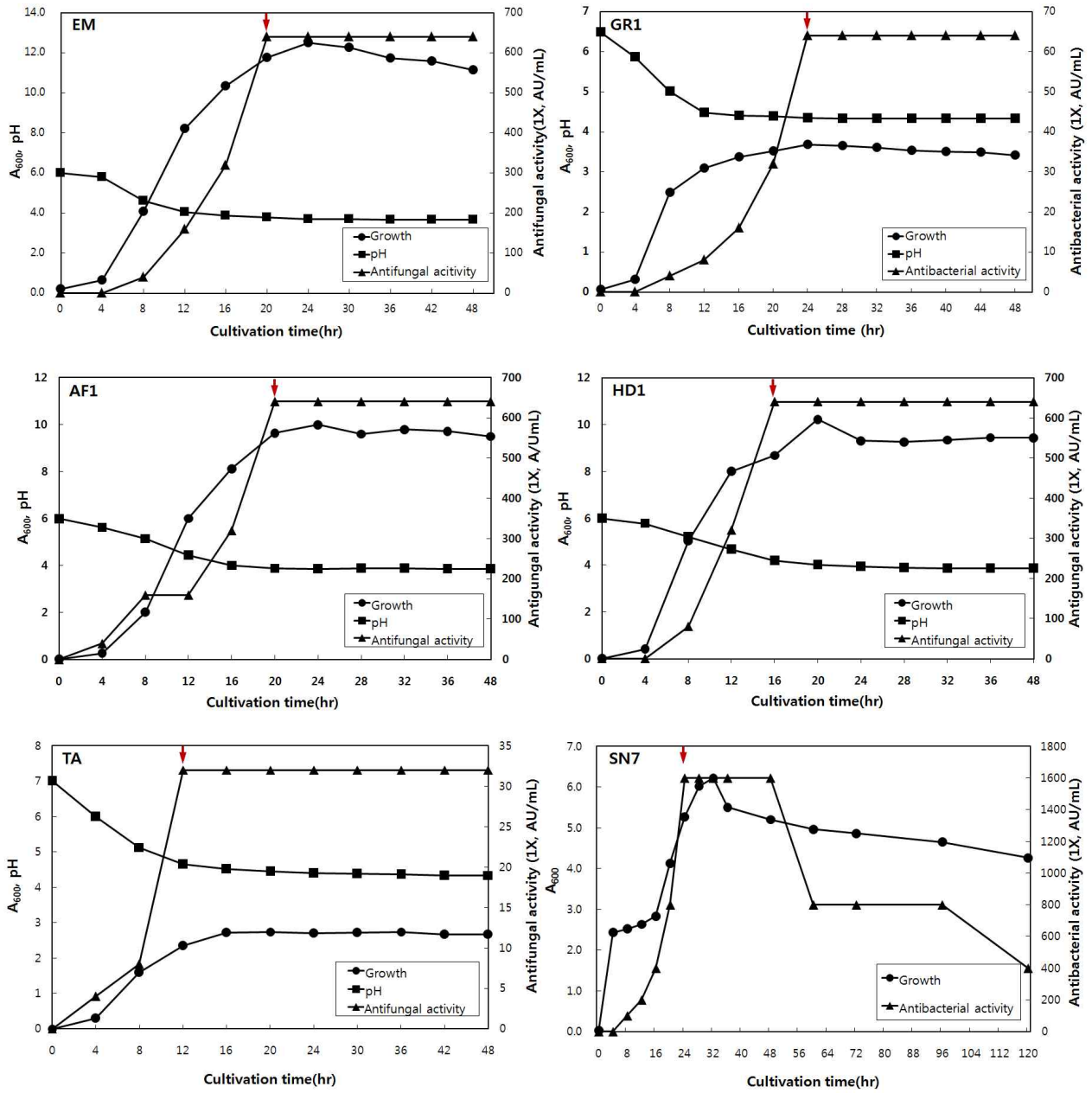


Figure 10. 최적 배양조건에서 항균활성 균주의 생육시간에 따른 생육곡선 및 항균활성
2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

(3) 항균활성 및 항균 spectrum 조사

(가) 항균활성 물질 준비 및 사용 지시균

- 김치 또는 장류에서 유래한 GRAS 균주들이 생산하는 항균물질의 항균활성 spectrum을 조사하기 위하여, 최적 배양조건에서 생산된 항균활성균주의 농축상징액을 사용함. 유산균 AF1, HD1, EM 그리고 고초균 SN7은 5배 농축상징액을 사용하였고, 유산균 GR1과 TA는 25배 농축상징액을 사용함. 이 때 동배지(MRS 또는 TSB)의 농축상징액(5배 또는 25배)을 대조구로 사용하였으며, 사용 지시균에 대한 대조구의 항균활성은 관찰되지 않았음.
- 항균활성 측정은 spot-on-the lawn test 방법으로, 지시균을 도말한 배지위에 항균활성균주의 농축상징액을 2-fold dilution하여 10 μ L씩 점적하였음. 활성역가는 항균물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU(Arbitrary Unit)/mL로 나타냄. 농축상징액을 사용한 경우 항균활성은 농축배율로 나누어주어 1 \times 로 환산한 후 AU/mL로 표시하였음.

(나) 항균 spectrum 및 그 활성(Table 8)

- *Lb. plantarum* AF1은 항곰팡이 저해활성이 곰팡이의 종류에 따라 160~640 AU/mL를 나타내었으며, *A. fumigatus* ATCC 96918에 대해 항진균활성이 가장 높게 나옴. 지시균으로 사용한 세균에 대한 항세균활성은 40~5,120 AU/mL를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802에 대해 항세균활성이 가장 높게 나옴. 지시균으로 사용된 산막효모인 *P. kudriavzevii* GY1에 대한 항효모활성은 10 AU/mL를 나타냄.
- *Lb. plantarum* HD1은 항곰팡이 저해활성이 곰팡이의 종류에 따라 160~640 AU/mL를 나타내었으며, *A. fumigatus* ATCC 96918에 대해 항진균활성이 가장 높게 나옴. 지시균으로 사용한 세균에 대한 항세균활성은 40~5,120 AU/mL를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802에 대해 항세균활성이 가장 높게 나옴. 지시균으로 사용된 산막효모인 *P. kudriavzevii* GY1에 대한 항효모활성은 20 AU/mL를 나타냄.
- *Lb. plantarum* EM은 항곰팡이 저해활성이 곰팡이의 종류에 따라 40~640 AU/mL를 나타내었으며, *A. fumigatus* ATCC 96918와 *A. flavus* ATCC 22546에 대해 항진균활성이 가장 높게 나옴. 지시균으로 사용한 세균에 대한 항세균활성은 40~5,120 AU/mL를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802에 대해 항세균활성이 가장 높게 나옴. 그러나 지시균으로 사용된 산막효모인 *P. kudriavzevii* GY1에 대한 항효모활성은 10 AU/mL로 나타남.
- *Leu. citreum* GR1은 항곰팡이 저해활성이 곰팡이의 종류에 따라 8~32 AU/mL를 나타

내었으며, *A. fumigatus* ATCC 96918, *A. flavus* ATCC 22546, *A. nidulans* PF-3에 대해 항진균활성이 가장 높게 나옴. 지시균으로 사용한 세균에 대한 항세균활성은 4~512 AU/mL를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802에 대해 항세균활성이 가장 높게 나왔으며, 지시균 *S. aureus* ATCC 29213와 산막효모인 *P. kudriavzevii* GY1에 대해서는 항균활성은 없는 것으로 나타남.

- *Leu. mesenteroides* TA는 항곰팡이 저해활성이 곰팡이의 종류에 따라 4~32 AU/mL를 나타내었으며, *A. fumigatus* ATCC 96918에 대해 항진균활성이 가장 높게 나옴. 지시균으로 사용한 세균에 대한 항세균활성은 8~128 AU/mL를 나타내었으며, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802에 대해 항세균활성이 가장 높게 나왔으며, 지시균 *S. aureus* ATCC 29213과 산막효모인 *P. kudriavzevii* GY1에 대해서는 항균활성은 없는 것으로 나타남.
- *B. subtilis* SN7은 항곰팡이 저해활성이 *A. ochraceus* PF-2에 대해서 640 AU/mL의 항진균활성을 나타내었으며, 세균지시균 중 *B. cereus* KCTC 3624에 대해 1,600 AU/mL의 강한 항세균활성을 나타내었으며, *M. luteus* ATCC 15307에 20 AU/mL의 항세균활성을 나타냄. 그 외 세균 및 산막효모에 대해서는 항균활성이 없는 것으로 나타남.

Table 8. 김치 및 장류 유래균주의 식중독균/부패균에 대한 항균활성 spectrum

Microorganisms	Spot-on-the lawn test (2-fold dilution, AU/mL)					
	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7
Mold						
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	160	160	160	32	8	0
<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	160	160	80	8	16	640
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	640	640	640	32	32	0
<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	320	320	320	32	16	0
<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	160	160	40	8	8	0
Bacteria						
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	320	320	160	8	16	0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	80	40	80	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	160	160	160	32	32	1,600
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	160	160	320	4	8	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	5,120	5,120	5,120	512	128	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	320	320	320	16	16	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	40	40	40	4	4	20
Yeast						
<i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	10	20	10	0	0	0

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험(n=6)

☞ 개발된 5종의 유산균과 1종의 고초균의 항균활성과 그 항균 spectrum이 서로 달라 목적에 따라 단용 또는 혼용사용 가능

※ 최적배양조건에서 생산된 항균활성물질의 spectrum 및 항균활성

식중독균/부패균 저해대상	항균활성(AU/mL)					
	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7
곰팡이	160~640	160~640	40~640	8~32	160~640	0~640
세균	80~5,120	40~5,120	160~5,120	4~512	8~128	20~1,600
효모	32	32	0	0	0	0

(4) 항균활성균주의 안전성 평가(*in vitro*)

• 평가내용

- 유산균: 용혈성, 효소활성, 항생제 내성 측정
- 고초균: 용혈성, 효소활성, 항생제 내성, 독소 생성능(enterotoxin) 검사

(가) 용혈성(hemolysis test)

- 항균활성 유산균 및 고초균이 생균 활성제 또는 프로바이오틱 미생물로 활용되기 위해서는 인체에 대한 용혈성 독성이 없는 안전성이 요구됨. 용혈작용은 적혈구가 파괴되는 정상적인 작용과 적혈구의 유전적인 결함이나 화학물질, 뱀 등의 독액, 미생물이 생성하는 독성물질에 의해서 형성되는 비정상적인 작용임.
- 항균활성 유산균 및 고초균의 인체에 대한 용혈성 독성이 없음을 확인하기 위하여 용혈성 여부를 검사함. 7% horse blood(Oxoid, England)가 첨가된 blood 고체배지에 분리유산균 5종과 고초균 1종을 그어 균체 주위에 투명한 생성 여부로 용혈성을 판단함. 대조구로는 용혈현상을 일으키는 것으로 알려진 *B. cereus* KCTC 3624를 사용함.
- 유산균 5종과 고초균 1종에 대한 용혈성 검사에서 균체 주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명한 생성을 생성하지 않아 용혈반응이 일어나지 않음(Figure 11). 그러나 대조구로 사용한 *B. cereus* KCTC 3624는 균체 주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명한 생성을 생성하여 용혈반응을 일으켜 유해균주임을 나타냄. 본 실험으로 김치 및 장류에서 분리된 유산균 및 고초균 6종은 모두 유해균주에 대해 항균작용은 있으나 용혈성과 같은 인체에 대한 유해 작용이 전혀 없음이 검증됨.

☞ 항균활성균주 6종 모두 용혈성 없음 → 안전함.

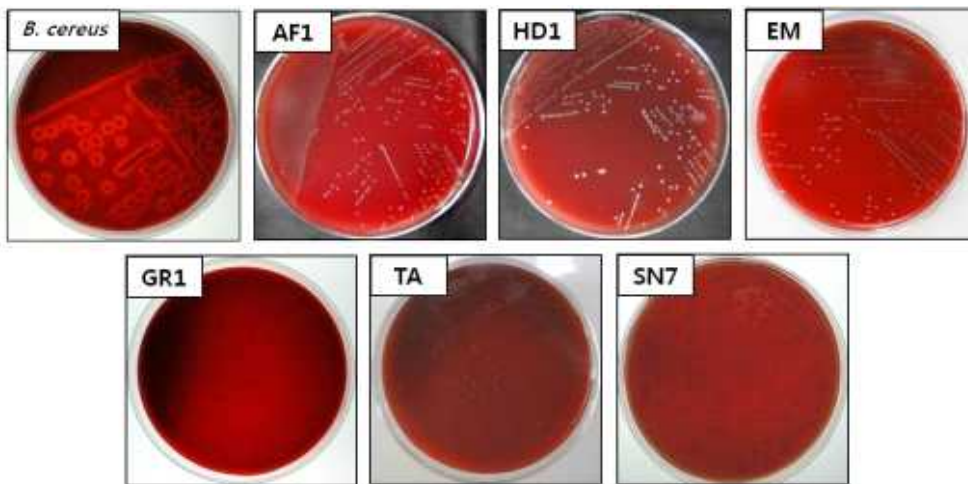


Figure 11. 항균활성균주의 용혈성 검사

(나) 효소활성 검사

- 개발 유산균 및 고초균을 식품발효의 종균으로 사용하거나 probiotics 미생물로 사용 시 이들 균이 생산하는 효소는 중요한 부분을 차지함.
- 예를 들어 β -glucosidase는 식물, 곰팡이, 효모, 세균 및 동물의 조직 등에 분포하며 cellulose나 β -1,4 당쇄결합을 지니는 기질로부터 포도당을 유리시키는 효소임. β -glucosidase는 폭넓은 기질특이성으로 인하여 식품 및 화학산업 분야에서 이용되고 있으며, 특히 와인 생산공정에 유용하게 사용되고 있고, 이소플라본 배당체의 가수분해(대두로부터 생체이용률이 향상된 비배당체의 생산)에도 이용되어지고 있음.
- 반면 β -glucuronidase는 주로 대장균, 클로스트리디움, 박테로이드 등의 장내 유해세균에 의해 생성되어지며, 이들이 장내 증식시 benzo(a)pyrene 등의 물질이 체내 유입되면 이들이 생성한 β -glucuronidase에 의해 탈포합되어 발암물질로 전환됨으로써 인체 건강에 악영향을 줌.
- 개발 유산균 5종 및 고초균 1종의 효소 활성을 조사하기 위해서 API ZYM kit (BioMerieux Co., France)을 사용함.
- 개발 유산균 5종 및 고초균 1종의 효소 활성을 확인해 본 결과, Table 9와 같이 GR1은 모든 효소에 대한 활성반응이 없었으며, AF1은 β -galactosidase와 β -glucosidase에 대한 활성을 나타내었으며, HD1은 leucine arylamidase, valine arylamidase, β -galactosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase에 대하여, EM은 leucine arylamidase, valine arylamidase, β -galactosidase, β -glucosidase에 대하여, TA는 β -glucosidaseacid에 대하여, SN7은 esterase에 대하여 활성을 나타냄. 그러나 6종의 항균활성 균주 모두 benzopyrene 등의 물질이 체내 유입시 발암물질로 전환하는 효소인 β -glucuronidase에 대한 활성이 없는 것으로 나타남. 이에 항균활성 균주 6종은 β -glucuronidase에 대한 활성이 없어 발암 유발의 위험성이 없는 것으로 보여지며, AF1, HD1, EM, TA는 β -glucosidase를 이용한 고부가가치 기능성 물질 생산을 위한 생물 전환공정에 응용될 수 있음.

Table 9. 항균활성균주의 효소활성

Enzyme	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7
Control	-	-	-	-	-	-
Alkaline phosphate	-	-	-	-	-	-
Esterase(C4)	-	-	-	-	-	+
Esterase lipase(C8)	-	-	-	-	-	-
Lipase(C14)	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	-	+	+	-	-	-
Valine arylamidase	-	+	+	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-	-	-
α -Chymotrypsin	-	-	-	-	-	-
Acid phosphatase	-	-	-	-	-	-
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	-	-	-	-	-	-
α -Galactosidase	-	-	-	-	-	-
β -Galactosidase	+	+	+	-	-	-
β -Glucuronidase	-	-	-	-	-	-
α -Glucosidase	-	-	-	-	-	-
β -Glucosidase	+	+	+	-	+	-
N-Acetyl- β -glucosaminidase	-	+	-	-	-	-
α -Mannosidase	-	-	-	-	-	-
α -Fucosidase	-	-	-	-	-	-

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험(n=6)

☞ 항균활성균주 6종 모두 발암물질로 전환하는 효소인 β -glucuronidase에 대한 활성이 없는 것으로 나타남 → 안전함.

(다) 항생제 내성 측정

- 항생제 내성을 지닌 균주는 항생제 저항성 유전자(horizontal transfer)를 플라스미드에 보유하는 경우가 있고, 이럴 경우 항생제 저항성 유전자의 수평이동이 가능함. 즉, 항생제 저항성을 가지는 유전자를 보유한 균주를 식품발효의 종균이나 생균활성제, probiotics으로 사용시 항생제 저항성 유전자가 인간에게 이동되거나, 또는 저항성 유전자가 숙주내의 병원성균에게 전달되어 숙주의 건강에 해로운 영향을 미치게 된다는 보고에 따라, 최근에는 GRAS 등급의 유산균이라 하더라도 신규 개발균주의

경우 항생제 내성 특성 조사가 요구되고 있음.

- 이에 본 항균활성균주 6종에 대해 항생제 종류별로 MIC(minimum inhibitory concentration)를 측정하여 항생제 내성을 조사하였음. 항생제 내성 기준은 EFSA (European Food Safety Authority)의 breakpoint를 기준으로 여러 항생제에 대한 분리균주 6종의 감수성 또는 내성을 판정함.
- 항균활성균주 6종의 항생제에 대한 감수성 또는 내성을 EFSA에서 제시한 *Lb. plantarum*, *Leuconostoc* spp., *Bacillus* spp.에 대한 break point를 기준으로 판정한 결과, 항생제 9종에 대하여 감수성을 나타내는 농도는 서로 다르게 나타났으나 EFSA breakpoint보다 낮거나 또는 같은 농도에서 감수성을 보이므로 숙주의 건강에 위험을 나타내지 않는 기준의 항생제 저항성을 나타내었음(Table 10).

☞ 항균활성균주 6종 모두 EFSA breakpoint 기준보다 낮거나 또는 동일한 농도에서 항생제 감수성을 나타냄 → 숙주내 내성 없음으로 안전함.

(라) 독소생성능 검사

- *Bacillus* strain 중에는 종에 따라 독소를 생성하는 균주가 있으며, 독소를 생성하는 *B. cereus* group에는 *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. mycooides*, *B. thuringiensis*, *B. pseudomycooides*, *B. weihenstephanesis*가 있으며, 이 그룹은 16S와 23S 유전자가 서로 매우 유사하여 대부분의 균주가 enterotoxin 유전자를 가지고 있음. *B. cereus* 가 생산하는 독소로는 6종류의 설사형 enterotoxin과 구토형 emetictoxin이 있으며, 설사형 enterotoxin은 포자가 식품에 혼입되어 섭취시 위장관에서 발아되어 Hemolysin BL(HBL), Non-hemolytic enterotoxin(NHE), enterotoxin T, enterotoxin FM, 그리고 cytotoxin K의 6종류의 enterotoxin을 분비함. *Bacillus starin* 중에는 한 개 또는 그 이상의 entertoxin 유전자를 갖는 것들도 있고, 한 개도 가지고 있지 않는 균주들도 있으므로, 본 연구에서 분리된 고초균 SN7도 *B. subtilis* 균주이긴 하나 생물활성제 또는 probiotics로 이용되기 위해서는 먼저 독성 인자 보유 유무를 평가해야 함.

Table 10. 항균활성균주의 항생제 내성

Antibiotics	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/mL}$) ^b									
	Breakpoint for <i>Lactobacillus plantarum</i> ^f	AF1	HD1	EM	Breakpoint for <i>Leuconostoc</i> ^a	GR1	TA	Breakpoint for <i>Bacillus</i> ^g	SN7	
Ampicillin	2	1	2	2	2	0.5	2	n.r.	4	
Vancomycin	n.r. ^c	>512	>512	>512	n.r.	>512	>512	4	0.5	
Gentamycin	16	0.03	0.5	0.5	16	2	0.125	4	0.5	
Kanamycin	64	1	16	16	16	16	1	8	2	
Streptomycin	n.r.	0.5	4	4	64	32	2	8	8	
Erythromycin	1	0.03	0.125	0.125	1	0.06	0.06	4	1	
Clindamycin	1	0.06	1	1	1	0.015	1	8	4	
Tetracyclin	32	4	16	16	8	1	4	8	4	
Chloroamphenicol	8	2	4	4	4	4	4	8	4	

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험(n=6)

^aBreakpoints were according to the guidelines of the EFSA(EFSA 2008).

^bStrains with MICs lower than or equal to the breakpoints are considered susceptible.

^cNot required.

① PCR을 이용한 enterotoxin 유전자 검출

- *B. subtilis* SN7에 대해 *B. cereus*가 생산하는 5종의 enterotoxin과 11개의 enterotoxin 유전자 유무를 PCR을 이용하여 확인함. *B. subtilis* SN7은 Hbl complex를 encoding하는 4종의 유전자인 *hblA*, *hblB*, *hblC*, *hblD*와 *Nhe* complex를 encoding하는 3종의 유전자인 *nheA*, *nheB*, *nheC* 그리고 *cytK*, *bceT*, *entFM* 등의 총 11개의 enterotoxin 유전자가 검출되지 않음. 그러나 양성반응 균주인 *B. cereus* KCTC 3624 균주는 11개의 enterotoxin 유전자가 모두 검출되어 enterotoxin을 생성함을 알 수 있음(Figure 12).

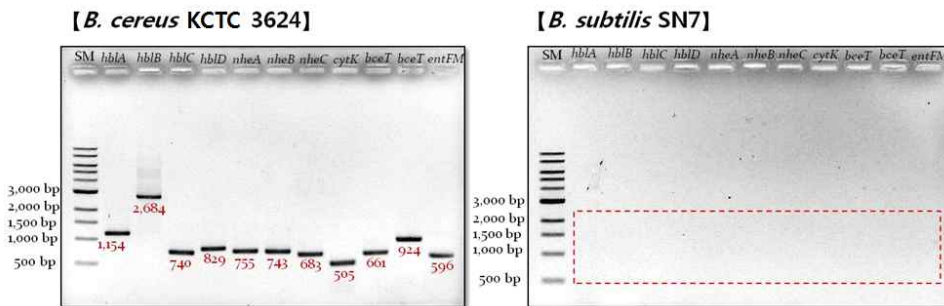


Figure 12. PCR을 이용한 enterotoxin 유전자 검출

② 면역학적 방법을 이용한 enterotoxin 유전자 검출(*in vivo*)

- *B. subtilis* SN7의 enterotoxin 독소 생성 여부를 항원·항체 반응을 이용한 2가지의 상용 kit으로 확인함. Enterotoxin 검출 kit는 hemolysin BL의 L₂ subunit를 검출하는 BCET-RPLA kit와 nonhemolytic enterotoxin의 A subunit를 검출하는 BDE-VIA kit을 사용함.
- 응집반응을 이용하여 용해성 항원인 hemolysin BL(Hbl) enterotoxin 생성여부를 확인하는 BCET-RPLA를 수행한 결과, *B. subtilis* SN7은 응집반응을 일으키지 않는 음성반응을 나타내었으며, *B. cereus* KCTC 3624 균주는 강한 응집반응을 나타내는 양성반응을 보임(Table 11).
- Non-hemolytic enterotoxin(Nhe)을 확인하기 위한 BDE-VIA kit의 반응 종료 후 color card와 육안 비교에서 *B. subtilis* SN7은 음성반응을 나타내었으며, 410 nm에서 흡광도를 측정한 결과 양성 판정기준치인 0.2보다 낮은 0.127을 나타냄. 그러나 *B. cereus* KCTC 3624는 color card와 육안 비교에서 명확하게 양성반응으로 판정할 수 있었으며, 410 nm에서 흡광도를 측정한 결과 0.681의 높은 수치를 나타내며 양성반응을 나타냄(Table 11).

☞ 본 개발균주인 *B. subtilis* SN7은 독성인자(enterotoxin)를 보유하지 않음
→ 안전함.

Table 11. BCET-RPLA kit과 BDE-VIA kit을 이용한 enterotoxin 생성

Enterotoxin	<i>B. subtilis</i> SN7	<i>B. cereus</i> KCTC 3624
Hbl enterotoxin ^{a)}	0	128
Nhe enterotoxin ^{b)}	0	5

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

^{a)}Production of the hemolytic BL(Hbl) enterotoxin in growing cells was determined using the BCET-RPLA kit. For the BCET-RPLA test, the indices from 0 to 128 corresponded to the last supernatant dilution rate (among 1/2 serial dilutions) for which enterotoxin remained detectable. According to the manufacturer's instructions, strains with an index of 0 were considered negative

^{b)}Production of the non-hemolytic enterotoxin(Nhe) in growing cells was measured the BDE-VIA kit. For the BDE-VIA test, indexed from 1 to 5 corresponded to the coloration intensity. According to the manufacturer's instructions, strains with an index of <3 were considered negative

나. 천연항균물질의 특성 규명

(1) 천연항균물질(조항균 물질)의 분리

(가) 항균활성물질 생산균주(1차년도 개발 균주)

Screening	GRAS균주 (1차년 개발 균주)
<ul style="list-style-type: none"> ○ 시료수집장소: 광주/전남 포함 전국 가정집, 명가, 식당, 사찰 등 - 80여곳 김치시료 → 유산균 분리 - 20여곳 장류시료 → 고초균 분리 ○ 항균활성균주 screening - 유산균 450종 → 5종 선정 - 고초균 100종 → 1종 선정 	<ul style="list-style-type: none"> - 유산균(5종) <li style="padding-left: 20px;">: <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 <li style="padding-left: 20px;"><i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 <li style="padding-left: 20px;"><i>Lactobacillus plantarum</i> EM <li style="padding-left: 20px;"><i>Leuconostoc citreum</i> GR1 <li style="padding-left: 20px;"><i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA - 고초균(1종) <li style="padding-left: 20px;">: <i>Bacillus subtilis</i> SN7

(나) 항균활성 균주 배양 조건

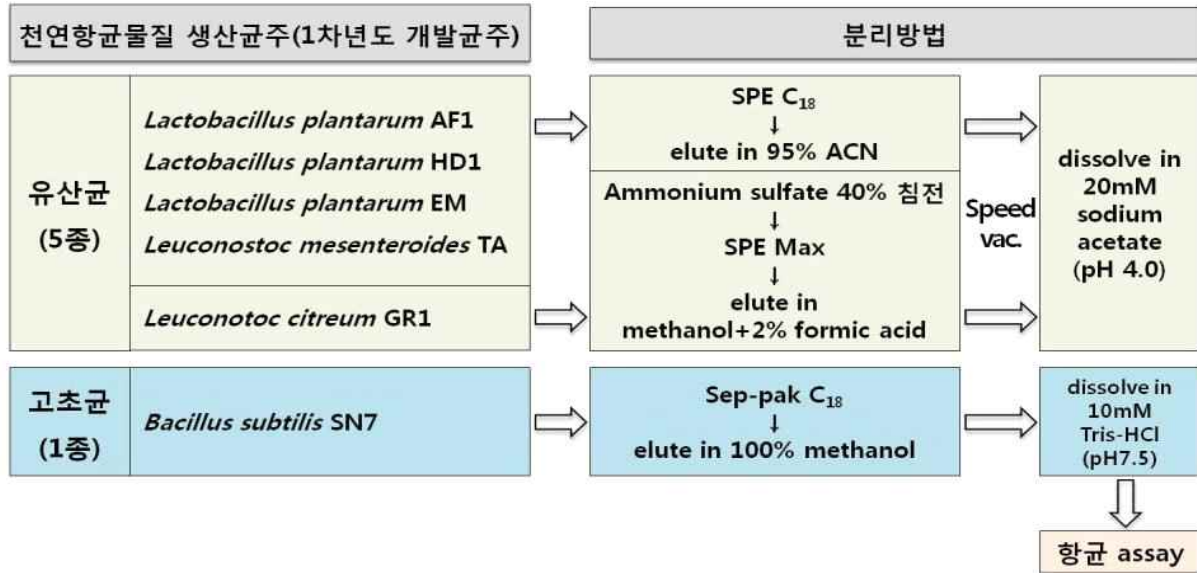
- 항균활성물질 생산 최적 배양 조건에서 각각의 균주 배양

배양조건	항균활성* GRAS 균주					
	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7
배지**	폐배추즙배지 A-4	폐배추즙배지 A-4	폐배추즙배지 A-4	폐배추즙배지 A-4	폐배추즙배지 A-4	폐절임배추즙배지 D-3
배양온도	30℃	28℃	30℃	30℃	30℃	37℃
배양 초기 pH	5.5	5.5	5.5	5.5	6.0	7.0
배양시간	24h	18h	24h	24h	24h	24h

* 1차년도 개발 균주

**1차년도 개발된 배지 총 4종 중, 1차년도 결과에 따라 유산균은 A-4, 고초균은 D-3 배지 사용

(다) 천연항균물질(조항균물질)의 분리: 부분정제



(2) 천연항균물질(조항균 물질)의 활성 및 항균 spectrum 측정

(가) 식중독균/부패균

① 식중독균/부패균 선정

- 미생물에 의한 식중독은 세균형/곰팡이형으로 나눌 수 있으며(Table 1), 식품의약품 안전처 통계자료(Table 2)에 따르면 2002년부터 2013년 동안 세균성식중독 발생건수 및 환자수는 대장균>살모넬라>황색포도상구균>장염비브리오>퍼프린젠스>캠필로박터>바실러스가 가장 높은 빈도로 발생하는 식중독균으로 나타남. 또한 비가열식품, 신선식품 중 위해미생물을 모니터링 한 결과 *E. coli*, *Salmonella* spp., *B. cereus* 등이 가장 많이 나타난 것으로 보고된 바 있음(Ref. 6-8).

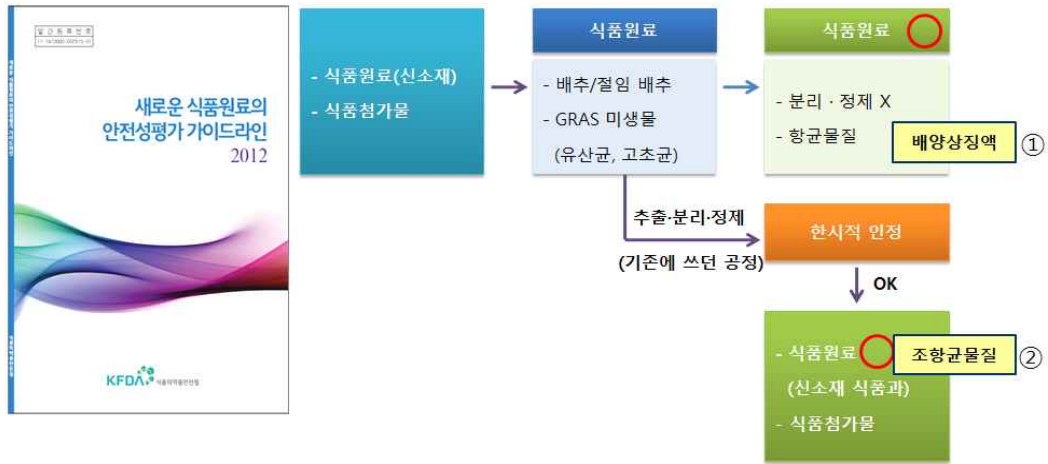
Ref. 6) 식품의약품안전평가원 지원, 「비가열 고위해식품의 미생물 저감화 연구, 2011, 이민석」
 Ref. 7) 식품의약품안전청 지원, 「비가열처리식품 중 위해미생물 저감화 방법 연구, 2002, 박지용」
 Ref. 8) 식품의약품안전청 지원, 「신선식품 중 위해미생물 저감화 방법 연구, 2002, 박지용」

- 본 과제에서 저해하고자 하는 유해미생물의 범위는 Table 1과 Table 2에서 제시된 바와 같이 미생물유래 식중독(세균성+곰팡이성)과 우리나라에서 최근 12년간 발생빈도가 높은 식중독 및 비가열식품의 주된 유해 식중독세균을 대상으로 함. 이와 더불어 식품유통과정 중 다빈도로 발생하는 부패미생물을 생육저해 유해 미생물(식중독/부패균) 대상으로 삼았으며, 이에 본 연구에서 사용된 식중독균 및 부패균을 Table 3에 정리하여 제시함.

(나) 항균활성 시료

- 현재 식약처(KFDA)에서 허용된 미생물유래 천연항균제 중 GRAS(Generally Recognized As Safe) 등급 미생물 유래는 니신 1건에 불과하며, 이 경우도 치즈에 한정하여 사용하도록 함. 나머지 3건은 non-GRAS 미생물(방선균) 유래이므로 항균물질을 완전 정제하여 권장량 범위에서만 사용 가능.
- 식중독 원인 미생물이나 부패 미생물을 제어하여 식품을 안전하게 장기간 저장하기 위한 수단으로 식품에 적용 가능한 천연항균물질에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있음. 그러나 이들 중에는 특유의 맛과 냄새, 자극성으로 인하여 식품에 적용하기 위해서는 관능적 측면에서 해결되어야 할 문제가 있는 것들도 있고, 또는 항균력이 약하거나 항균 spectrum이 좁아 아직까지 천연 항균제로 개발되어 상품화 된 제품은 극히 일부임.
- 그러므로 천연성, 안전성 및 복합적인 건강유효성이 겸비된 항균소재의 개발이 비가열식품에서의 식중독제어를 위해 기술개발이 필요한 실정임. 더욱이 천연항균소재 중 GRAS 미생물 유래의 항균소재는 이와 같은 요건을 완벽히 충족시키고 동시에 타첨가물에 비해 고부가가치임.
- 새로운 천연항균소재가 개발된 후, 이를 실제 산업현장에서 사용하고자 할 때, 대한민국의약품안전처에서 제시한 관련 허가 사항에 의거하여야 함. 즉 가장 경제적으로 생산가능하며, 동시에 관련 규정의 장벽없이 가장 빠른 시간 내 개발제품을 실용화하고자 할 때, Figure 35에 제시한 흐름도와 같이 두가지 방법이 제안됨. **첫째**, 식품원료(신소재)로 접근하며 식용가능한 성분(식품원료)에서 GRAS등급 항균 미생물(식품원료기준)을 배양 후, 분리·정제 없이 항균물질 생산균주의 「**배양상징액**」을 그대로 이용하는 경우임(Figure 35-①). 이 경우는 관련 허가사항 없이 「식품원료」 기준 규격에 의거하여 바로 실용화가 가능함. **둘째**, 첫째과정과 동일하나 기존에 쓰던 공정으로 추출·분리·정제하는 과정을 거치게 되는 「**조항균물질**」은 한시적 인정으로(Figure 35-②) 제시된 식품원료에 해당하는 자료 제출시 식품원료 또는 식품첨가물로 활용이 가능함.

① 관련 허가 사항



② 한시적 인정 신청 대상의 범위

< 고시 제2조 >

- 국내에서 새로 원료로 사용하려는 농산물·축산물·수산물 및 미생물 등
- 농산물·축산물·수산물 등으로부터 추출·농축·분리·배양 등의 방법으로 얻은 것으로서 식품으로 사용하려는 원료

③ 제출 자료

식품원료	식품첨가물
<ul style="list-style-type: none"> • 제출자료의 요약본 • 기원 및 개발경위 • 국내·외 인정 및 허가 현황 • 국내·외 사용 현황 • 제조방법에 관한 자료 • 원료의 특성에 관한 자료 (성상 및 물성, 주요 성분 등) • 안전성에 관한 자료 <ul style="list-style-type: none"> - 우수실험실운영규정 (Good Laboratory Practice, GLP) - 독성시험자료 (단회투여독성, 반복투여독성, 유전독성) 	<ul style="list-style-type: none"> • 제품명, 기준 및 규격, 성상, 확인시험, 순도 시험, 용도, 용법, 사용량, 포장단위 등 • 첨부자료 <ol style="list-style-type: none"> ① 명칭 ② 화학구조 ③ 제조방법 ④ 이화학적 성질 및 순도 ⑤ 사용목적 또는 용도, 사용량 및 사용방법 ⑥ 효과 ⑦ 독성시험 (단회투여독성, 반복투여독성, 유전독성) ⑧ 외국의 사용 예

Figure 35. 관련 허가규정 흐름도(대한민국 식품의약품안전처)

- 이에 따라 본 연구에서는 1차년도에 개발된 식품원료기준 규격을 충족하는 식용배지에서 항균활성 GRAS균주를 배양한 ①배양상징액과 column추출에 의한 부분분리·정제된 시료인 ②조항균물질을 각각 신규 천연항균물질로 활용하고자 함. 이에 이들 시료를 사용하여 그 특성을 규명함. 또한 「조항균물질」의 경우 GLP기관인 한국화학융합시험연구원(제2협동기관)에서 독성시험을 동시에 수행함. 이는 Figure 1에서 제시된 바와 같이 개발 천연항균물질이 실제 식품산업에서 활용되기 위해서는 반드시 수행되어야 할 기초기반 실험임.

① 천연항균물질 시료

구분	식품원료	식품원료(한시적인정)
내용	<p>①배양상징액:</p> <ul style="list-style-type: none"> - 배지 <ul style="list-style-type: none"> •유산균용: 폐배추배지 A-4 •고초균용: 절임배추배지 D-3 - GRAS균: 항균활성 유산균 5종 항균활성 고초균 1종 	<p>②조항균물질*:</p> <p>개발 배지에서 GRAS 등급 미생물 배양액 → column정제</p> <p>*KTR(GLP기관): 안전성(독성)평가 시행</p>

(다) 항균활성 및 항균 spectrum(Table 12, Figure 13, 14)

① 배양상징액

- 유산균 *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM은 본 실험에 사용된 모든 식중독균/부패균 (곰팡이 5종, 세균 7종, 효모 1종)에 대하여 강한 항균활성 나타냄. *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA도 AF1, HD1, EM 보다는 다소 항균활성이 떨어지지만 식중독세균 *S. aureus*와 김치 산막효모 *P. kudriavzevii*에 대한 항균활성을 제외한 모든 사용균주에 대해 항균활성을 나타내어, 개발 유산균 5종 모두 넓은 항균 spectrum 나타냄.
- 고초균 *B. subtilis* SN7은 유산균에 비하여는 항균 spectrum이 확연히 좁음. 그러나 *B. cereus*와 *A. ochraceus*에 대해서는 가장 강한 항균활성 나타남.

② 조항균물질

- 유산균 5종의 조항균물질의 항균활성은 배양상징액 보다 분리·정제에 효과에 따라 항균활성이 더 증가됨. 특히 항진균 활성은 그 항균 spectrum이 그대로 유지되면서 20~100배 항균활성이 증가됨. 그러나 항세균 활성은 분리·정제에 의해 그 항균 spectrum이 확연히 좁아짐. 즉 이로부터 column정제에 의하여 준비된 조항균 물질은 항진균 활성물질로 분리·농축되었음을 알 수 있음.
- 고초균 SN7의 column정제에 의한 조항균물질은 항진균 활성은 없고, 항세균 활성만 나타나므로 항세균 물질이 분리·농축됨.

Table 12. 천연항균물질(조항균물질)의 식중독균/부패균에 대한 항균활성 및 항균 spectrum

항균 물질	식중독균/부패균	항균활성 (AU/mL)*						
		AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7	
개발배지배양상징액	곰팡이	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	160	160	160	32	8	0
		<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	160	160	80	8	16	2,560
		<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	640	640	640	32	32	40
		<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	320	320	320	32	16	0
		<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	160	160	40	8	8	80
	세균	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	320	320	160	8	16	0
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	80	40	80	0	0	0
		<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	160	160	160	32	32	1,600
		<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	160	160	320	4	8	0
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	5,120	5,120	5,120	512	128	0
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	320	320	320	16	16	0
		<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	40	40	40	4	4	20
	효모	<i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	10	20	10	0	0	0
	조항균물질	곰팡이	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	3,200	6,400	1,600	100	200
<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2			3,200	6,400	1,600	400	800	0
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918			25,600	25,600	25,600	800	800	0
<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3			6,400	3,200	1,600	400	1,600	0
<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110			3,200	3,200	800	200	400	0
세균		<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	0	0	0	turbid	0	0
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	0	200
		<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	800	800	200	400	800	6,400
		<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	0
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	25,600	25,600	12,800	1,600	1,600	0
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	100	100	0	100	200	0
		<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	0	100	0	0	0	400
효모		<i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	200	400	200	0	turbid	0

* spot-on-the lawn test에 의한 측정

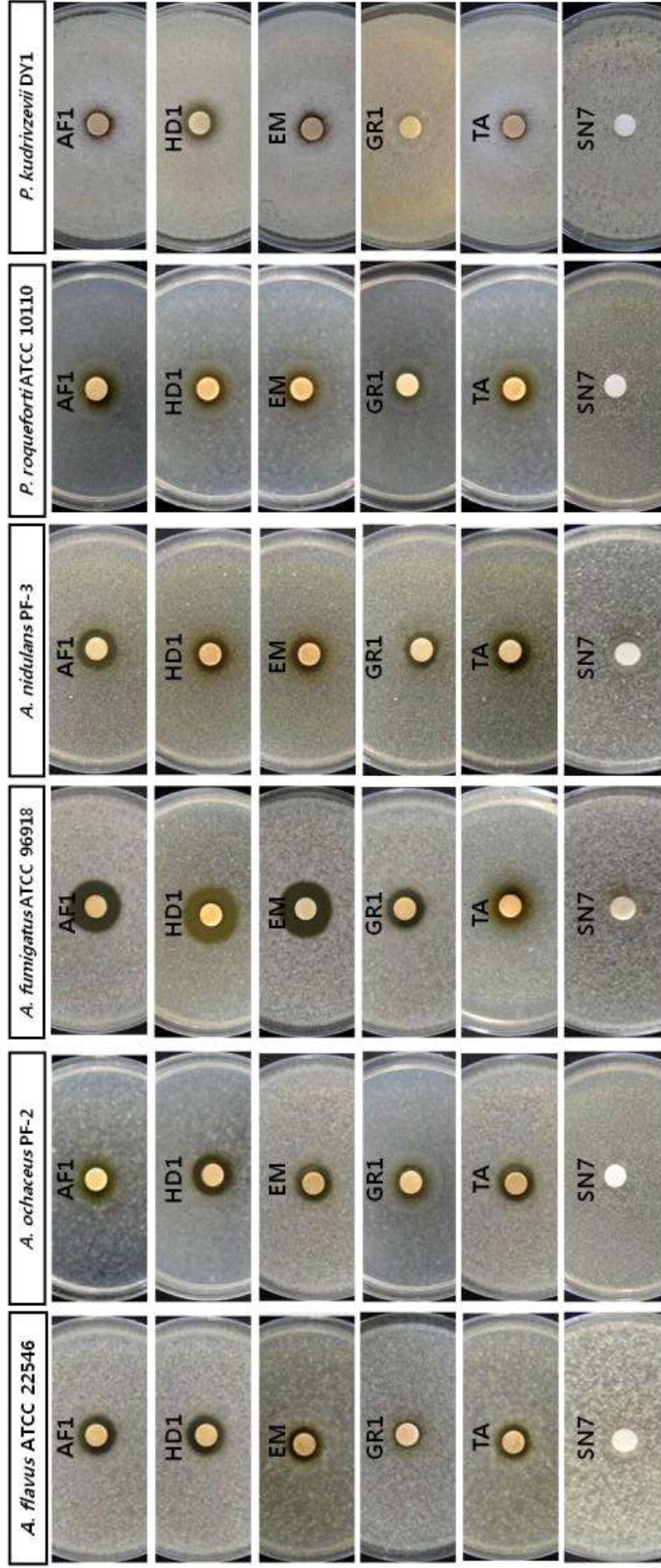


Figure 13. 친연항균물질(조항균물질)의 식중독균/부패균에 대한 항진균 활성

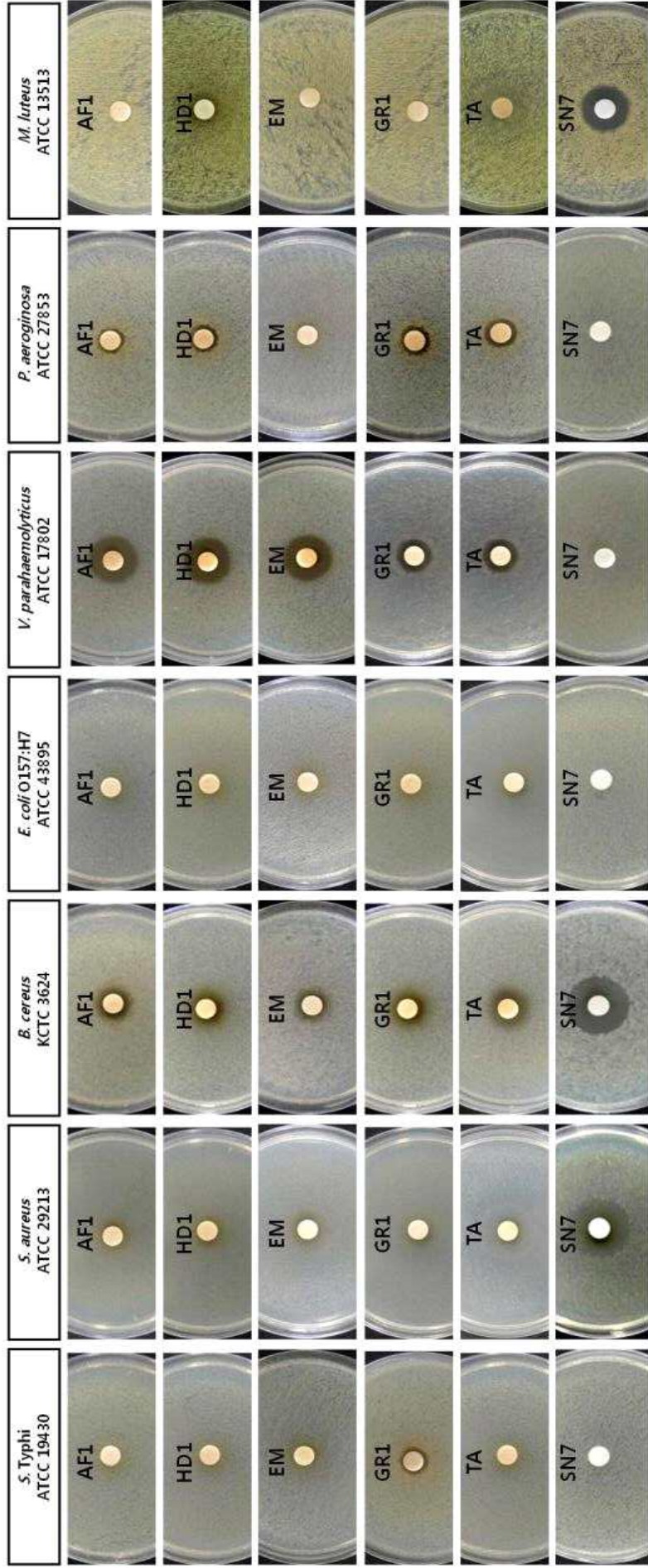


Figure 14. 천연항균물질(조항균물질)의 식중독균/부패균에 대한 항세균 활성

(3) 천연항균물질(조항균 물질) 안정성 실험

(가) pH 안정성(Table 13)

① 배양상징액

- 균체 배양후 배양상징액의 pH: AF1; pH 3.8, HD1; pH 3.8, EM; pH 3.8, GR1; pH 4.3, TA; pH 4.3, SN7; pH 7.2(대조구; Table 13의 비처리구).
- 유산균 5종 모두 pH 3.0~4.0 구간에는 항세균/항진균활성 모두 안정됨. pH 5.0이상에서 이후 그 역가가 급격히 감소하여, AF1 항세균 활성은 pH 6.0, 항진균활성은 pH 7.0까지, HD1 항세균 활성은 pH 5.0, 항진균활성은 pH 7.0까지, TA 항세균 활성은 pH 6.0, 항진균활성은 pH 5.0까지, EM과 GR1은 항세균/항진균활성은 모두 pH 5.0까지만 그 활성을 나타냄. 이로부터 유산균 5종 중 항세균활성은 AF1과 TA가, 항진균활성은 AF1과 HD1가 가장 넓은 범위의 pH에서 안정됨을 알 수 있음.
- 고초균 SN7의 항세균활성은 pH 3.0~10.0 전구간에서 안정됨. 항진균활성은 pH 3.0~4.0에서는 대조구 대비 50~75% 활성 저하됨. pH 5.0~10.0에서는 안정함.

② 조항균물질(Table 13)

- 유산균 5종의 항진균활성은 전 pH 구간(3.0~10.0)에서 안정함. 항세균활성은 유산균 5종 모두 pH 5.0부터 항세균활성 감소되기 시작하여 pH 8.0보다 높은 pH에는 그 활성이 완전히 소실됨. 특히 유산균 EM의 조항균물질의 항세균활성은 pH 6.0이상부터 완전히 소실됨.
- 고초균 SN7의 조항균물질의 항세균 활성은 pH 3.0~10.0 전 구간에서 안정함. Column을 통하여 부분정제된 조항균물질은 Table 36에서 보여진 바와 같이 항진균활성은 검출되지 않아, 항진균 활성물질의 안정성(pH, 온도, 효소, 용매, 열) 실험은 수행하지 않음.

Table 13. 천연항균물질(조항균물질)의 pH, 온도 안정성

항균 물질		항균활성 (AU/mL)*											
		AF1		HD1		EM		GR1		TA		SN7	
		항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
개발배지배양상징액	대조구 (비처리구)	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
	pH												
	3.0	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	640
	4.0	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	1,280
	5.0	40	160	20	80	20	80	4	8	16	16	1,600	2,560
	6.0	20	40	0	40	0	0	0	0	4	0	1,600	2,560
	7.0	0	20	0	20	0	0	0	0	0	0	1,600	2,560
	8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,600	2,560
	9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,600	2,560
	10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,600	2,560
	온도												
	4°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
	25°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
	30°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
	37°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
50°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	800	2,560	
70°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	16	32	32	32	0	2,560	
100°C, 30min	160	640	160	640	160	640	16	32	32	32	0	1,280	
121°C, 15min	160	640	160	640	160	640	16	32	32	32	0	640	
조항균물질	대조구 (비처리구)	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	N.D.
	pH												
	3.0	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	
	4.0	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	
	5.0	400	25,600	400	25,600	100	25,600	200	800	400	800	6,400	
	6.0	200	25,600	200	25,600	0	25,600	100	800	200	800	6,400	
	7.0	100	25,600	100	25,600	0	25,600	100	800	100	800	6,400	
	8.0	0	25,600	0	25,600	0	25,600	0	800	0	800	6,400	
	9.0	0	25,600	0	25,600	0	25,600	0	800	0	800	6,400	
	10.0	0	25,600	0	25,600	0	25,600	0	800	0	800	6,400	
	온도												
	4°C, 24hr	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	
	25°C, 24hr	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	
	30°C, 24hr	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	
	37°C, 24hr	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	
50°C, 24hr	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400		
70°C, 24hr	800	25,600	800	25,600	200	25,600	200	800	800	800	3,200		
100°C, 30min	800	25,600	800	25,600	200	25,600	200	800	800	800	3,200		
121°C, 15min	800	25,600	800	25,600	200	25,600	100	800	800	800	1,600		

* 항진균 활성 측정용 감수성균주: *A. fumigatus* ATCC 96918 사용 단, SN7: *A. ochraceus* PF-2 사용

* 항세균 활성 측정용 감수성균주: *B. cereus* KCTC 3624 사용

* spot-on-the lawn test에 의한 측정

* SN7항진균 활성(N.D.): 조항균물질의 항진균 활성이 0 AU/mL이므로 항세균 활성만 측정

(나) 온도 안정성(Table 14)

① 배양상징액

- 유산균 GR1과 고초균 SN7의 배양상징액의 항세균활성은 각각 4~50℃와 4~37℃ 구간에서는 안정하나, 점차 역가가 감소함. 유산균 GR1은 70~121℃에서 최대역가의 50%를 유지하고, 고초균 SN7은 50℃에 50% 역가 손실, 70~121℃에서는 역가 완전 실패됨. GR1의 항진활성은 4~121℃ 구간에서 안정하고, SN7의 항진활성은 4~70℃까지 100% 유지되나 100℃ 이상에서 급격히 그 활성이 저하됨.

② 조항균물질

- 유산균 4종(AF1, HD1, EM, TA)의 항균활성(항세균/항진균)과 유산균 GR1의 항진활성은 4~121℃ 열처리에 안정함.
- 유산균 GR1과 고초균 SN7의 항세균활성은 70℃ 이상의 온도처리부터 그 활성이 감소되어 고온 처리에 불안정함. 그러나 4~50℃에서는 항세균활성 안정함.

(다) 효소 안정성(Table 14)

① 배양상징액

- 유산균 4종(AF1, HD1, EM, TA)의 항균활성(항세균/항진균)은 다양한 효소처리에 안정함.
- 유산균 GR1의 항세균활성은 proteinase K, protease, trypsin 처리에 그 활성이 4~8배 저하됨. 항진활성은 효소처리에 안정함. 고초균 SN7의 항세균 활성은 proteinase K, protease, α -chymotrypsin에 의해 완전히 소실됨. 항진활성은 protease, trypsin, α -chymotrypsin에 의해 그 활성이 50% 저하됨.

② 조항균물질

- 배양상징액에서와 같이 유산균 4종(AF1, HD1, EM, TA)의 항균활성(항세균/항진균)은 다양한 효소처리에 안정함.
- 유산균 GR1의 항세균활성은 배양상징액의 효소처리에서와 같이 proteinase K, protease, trypsin에 의해 소실됨. 단, 배양상징액과 조항균물질 차이는 조항균물질의 단백질 분해 효소처리시는 항세균활성이 완전히 소실됨.
- 고초균 SN7의 조항균물질 항세균활성은 배양상징액의 효소처리에서와 같이 proteinase K, protease, α -chymotrypsin에 의해 완전히 소실되고 pepsin에 의해 87.5% 저하됨.

※ 유산균 GR1과 고초균 SN7의 항세균활성물질은 단백질성 박테리오신임을 시사함.

Table 14. 천연항균물질(조항균물질)의 효소, 용매, 염 안정성

항균 물질		항균활성 (AU/mL)*												
		AF1		HD1		EM		GR1		TA		SN7		
		항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	
개발배지배양상징액	대조구 (비치리구)	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560	
	효소	proteinase K	160	640	160	640	160	640	4	32	32	32	0	2,560
		protease	160	640	160	640	160	640	4	32	32	32	0	1,280
		pepsin	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
		trypsin	160	640	160	640	160	640	8	32	32	32	1,600	1,280
		α -chymotrypsin	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	0	1,280
		lipase	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
		α -amylase	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
	용매	Ethanol	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
		ACN	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
		Acetone	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
		Methanol	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
	염	3% NaCl	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
		7% NaCl	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	1,600	2,560
		15% NaCl	160	600	160	600	160	600	32	32	32	32	1,600	2,560
조항균물질	대조구 (비치리구)	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800	6,400	N.D.	
	효소	proteinase K	800	25,600	800	25,600	200	25,600	0	800	800	800		0
		protease	800	25,600	800	25,600	200	25,600	0	800	800	800		0
		pepsin	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		800
		trypsin	800	25,600	800	25,600	200	25,600	0	800	800	800		6,400
		α -chymotrypsin	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		0
		lipase	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
		α -amylase	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
	용매	Ethanol	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
		ACN	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
		Acetone	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
		Methanol	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
	염	3% NaCl	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
		7% NaCl	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400
		15% NaCl	800	25,600	800	25,600	200	25,600	400	800	800	800		6,400

* 항진균 활성 측정용 감수성균주: *A. fumigatus* ATCC 96918 사용 단, SN7: *A. ochraceus* PF-2 사용

* 항세균 활성 측정용 감수성균주: *B. cereus* KCTC 3624 사용

* spot-on-the lawn test에 의한 측정

* SN7항진균 활성(N.D.): 조항균물질의 항진균 활성이 0 AU/mL이므로 항세균 활성만 측정

(라) 용매 및 염안정성(Table 14)

① 배양상징액과 조항균물질

- 유산균 5종, 고초균 1종 모두 용매 및 염처리에 항균활성(항세균/항진균) 안정됨.

다. 식중독균 저해 기작 규명

(1) 공동배양에 의한 식중독균/부패균의 생육저해 효과

(가) 천연항균물질 균주의 선정

- 유산균 5종, 고초균 1종 중 항균활성 및 항균 spectrum 실험결과, 항균활성이 낮아 항균물질로서 실제 산업적으로 활용할 수 있는 가능성이 크게 떨어지는 유산균 *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenterides* TA는, 이후 실험부터 항균물질 생산균주 대 상에서 제외함.
- 항균물질 생산균주

GRAS균주 (1차년 개발 균주)	2차년도 최종선정 균주
<ul style="list-style-type: none"> - 유산균(5종) : <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 <i>Lactobacillus plantarum</i> EM <i>Leuconostoc citreum</i> GR1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA - 고초균(1종) : <i>Bacillus subtilis</i> SN7 	<ul style="list-style-type: none"> - 유산균(3종) : <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 <i>Lactobacillus plantarum</i> EM - 고초균(1종) : <i>Bacillus subtilis</i> SN7

(나) 공동배양에 사용한 식중독균/부패균 선정

- 곰팡이: 곰팡이 독소를 생산하는 균주(Table 1) 위주로 공동배양에 사용(3종)
A. fumigatus ATCC 96918, *A. ochraceus* PF-2, *A. flavus* ATCC 22546
- 세균: 우리나라 식중독 발생빈도가 높은 식중독세균(Table 2) 위주로 공동배양에 사용(5종)
V. parahaemolyticus ATCC 17802, *S. enterica* serovar. Typhi ATCC 19430,
E. coli O157:H7 ATCC 43895, *S. aureus* ATCC 29213, *B. cereus* KCTC 3624

(다) 식중독균/부패균 접종 농도 설정 기준

- Figure 15에서 나타내는 바와 같이 식중독균/부패균의 초기균수가 10^6 CFU/mL 이상부터는 식품에서 이취·이미 발생으로 이미 변패된 식품이므로, 식중독균/부패균의 초기균수는 최대 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL로 조정하여 실험 수행함. 즉, 관능적으로는 표시가 나지 않지만 식중독균/부패균이 오염되어 향후 문제를 일으킬 수 있는 부분을 제어하기 위한 수단으로 식중독균/부패균의 초기 균수가 $10^4 \sim 10^6$ 또는 $10^4 \sim 10^7$ CFU/mL 범위에서 실험 시행함. (단 산막효모의 경우만 초기균수 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL)

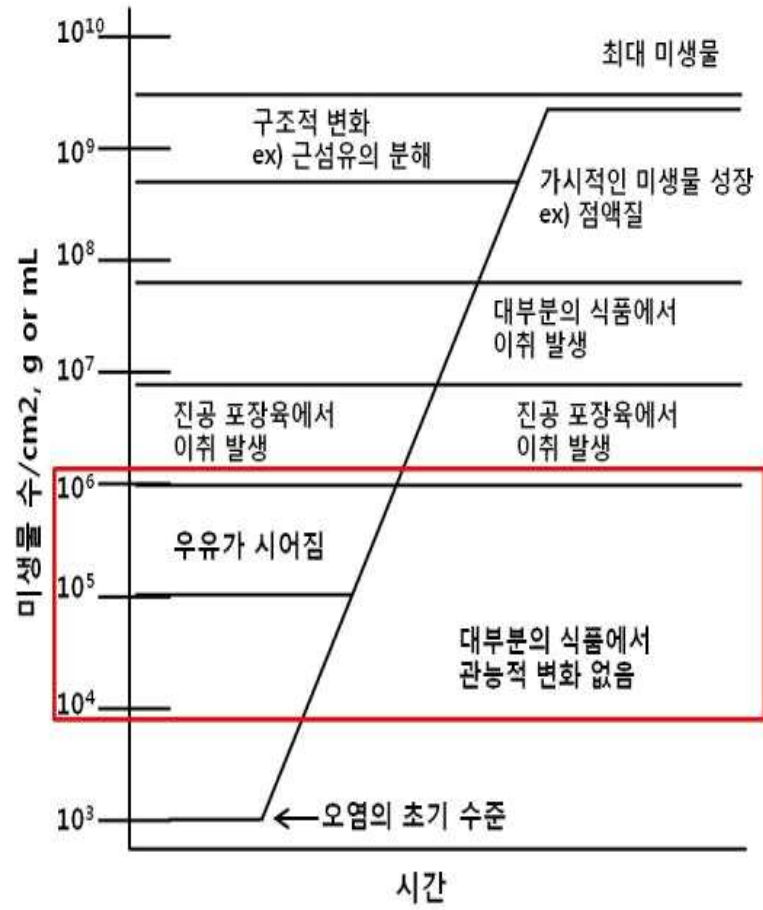


Figure 15. 부패 세균의 성장과 부패현상(참고문헌: 필수 식품미생물학, 광문각, 2014)

(라) 천연항균물질 생산균주와 식중독균/부패균의 공동배양

① 공동배양 조건

- Table 15과 같이 액체배지에 천연항균물질 생산균주를 약 $10^6 \sim 10^7$ log CFU/mL 로 접종 하고 여기에 식중독균/부패균을 약 $10^2 \sim 10^6$ log CFU/mL 접종하여, 30 ~37°C 에서 0~48시간동안 배양 후, 각각의 항균물질 생산균주와 식중독균/부패균을 각 선별배지에서(Table 16) 생균수 측정함. 각 선별배지에서의 배양 후 집락형성과 집락의 형태학적 차이로 항균물질 생산균주와 식중독/부패균을 계수함.
- 항균물질생산균주와 *V. parahaemolyticus*의 공동배양은 대조구로 사용 되어야 하는 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802가 MRS에서 단독 배양이 이루어지지 않아 *Lb. plantarum* AF1 + *V. parahaemolyticus* ATCC 17802의 공동배양을 시행하지 못함.
- *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 외, 모든 식중독균/부패균은 MRS에서 단독 배양시(대조구) 8.0 log CFU/mL 이상 생육 가능성을 확인 후 실험 시행.

Table 15. 천연항균물질 생산 균주와 식중독/부패균의 공동배양 조건

천연항균물질 생산균주	식중독균/부패균	접종초기균수 항균생산균 vs. 식중독균	대조구
<i>Lb. plantarum</i> AF1	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log spores/mL	단독배양 (유산균/곰팡이) : MRS 배양
	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 2.0~3.0 log CFU/mL	단독배양 (유산균/효모) : MRS 배양
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log CFU/mL	단독배양 (유산균/세균) : MRS 배양
<i>Lb. plantarum</i> HD1	<i>A. ochraceus</i> PF-2	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log spores/mL	단독배양 (유산균/곰팡이) : MRS 배양
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log CFU/mL	단독배양 (유산균/세균) : MRS 배양
<i>Lb. plantarum</i> EM	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log spores/mL	단독배양 (유산균/곰팡이) : MRS 배양
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	6.0~7.0 log CFU/mL vs. 4.0~6.0 log CFU/mL	단독배양 (유산균/세균) : MRS 배양
<i>B. subtilis</i> SN7	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	6.0 log CFU/mL vs. 4.0~5.0 log CFU/mL	단독배양 (고초균/세균) : TSB 배양

Table 16. 항균물질 생산균주와 식중독균/부패균 사용한 선별배지

균주		사용선별배지
항균물질 생산균주	유산균	<i>Lb. plantarum</i> AF1
		<i>Lb. plantarum</i> HD1
		<i>Lb. plantarum</i> EM
	고초균	<i>B. subtilis</i> SN7
식중독균/ 부패균	곰팡이	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918
		<i>A. ochraceus</i> PF-2
		<i>A. flavus</i> ATCC 22546
	세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430
		<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895
		<i>S. aureus</i> ATCC 29213
		<i>B. cereus</i> KCTC 3624
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	

② **공동배양에 의한 식중독균/부패균 생육저해 효과**

i) 항균물질 생산균주와 **식중독균/부패 곰팡이**의 공동배양(Figure 16)

- 곰팡이와의 공동배양에 의해 항균물질 생산 유산균(*Lb. plantarum* AF1, HD1, EM)의 생육은 식중독/부패 곰팡이의 영향을 받지 않음. 즉 유산균 단독배양과 유산균과 곰팡이의 공동배양에서의 유산균 생육은 차이 없음(Figure 16-◇,◆)

- *A. fumigatus*의 유산균 AF1의 공동배양

*A. fumigatus*과 유산균 AF1과의 공동배양에서는 *A. fumigatus*는 24시간($10^4 \sim 10^5$ spores/mL)~36시간(10^6 spores/mL)에 완전히 생육이 저해됨. 그러나 *A. fumigatus*만 MRS에 단독배양시 배양시간 경과에 따라 꾸준히 생육도 증가함.

- *A. ochraceus*와 유산균 HD1의 공동배양

*A. ochraceus*는 유산균 HD1과의 공동배양에서 12시간($10^4 \sim 10^5$ spores/mL)~24시간(10^6 spores/mL)에 완전히 생육 저해됨. *A. ochraceus*만 MRS에 단독배양시 배양시간 경과에 따라 꾸준히 생육도 증가함.

- *A. flavus*와 유산균 EM의 공동배양

*A. flavus*는 유산균 EM과의 공동배양에서 24시간($10^4 \sim 10^5$ spores/mL)~36시간(10^6 spores/mL)에 완전히 생육 저해됨. *A. flavus*만 MRS에 단독배양시 배양시간 경과에 따라 꾸준히 생육도 증가함.

※ 유산균과 곰팡이 공동배양에서 최대 36시간 이내 식중독/부패 곰팡이의 생육저해됨.

ii) 항균물질 생산균주와 **식중독균/부패 효모 또는 세균과**의 공동배양(Figure 17)

- 공동배양에서 항균물질 생산균주의(유산균 AF1, HD1, EM, 고초균 SN7) 생육은 식중독/부패 효모 또는 세균에 영향 받지 않음.

- 산막효모 *P. kudriavzevii*와 유산균 AF1과의 공동배양

유산균 AF1과의 공동배양에서 *P. kudriavzevii*는 유산균 AF1에 의하여 생육 48시간 만에 완전히 생육이 저해됨. 산막효모 *P. kudriavzevii*는 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL로 접종하여 MRS에서 단독배양시 배양 48시간에 10^7 CFU/mL에 도달함.

* 산막효모 접종농도 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL의 근거는 국내 시판 김치의 담금직 후 초기 산막효모의 농도가 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL로 검출됨에 근거함. 산막효모 농도가 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL 일때는 이미 표면에서 산막효모 집락이 관찰되어 이 시점은 상품김치인 경우 클레임 대상임. (참고문헌. *Food Sci. Biotechnol.* 23:489-497, 2014/한국식품저장유통학회지 18:786-794, 2011)

- *E. coli* O157과 유산균 AF1의 공동배양

E. coli O157은 유산균 AF1과의 공동배양에서 배양 20시간(*E. coli* O157 접종농도: $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL)~24시간(*E. coli* O157 접종농도: 10^6 CFU/mL)에 완전히 생육 저해됨.

- S. Typhi와 유산균 HD1의 공동배양

유산균 HD1과 공동배양에 의하여 S. Typhi는 배양 20시간(10^4 CFU/mL S. Typhi 접종시)~24시간($10^5 \sim 10^6$ CFU/mL S. Typhi 접종시)만에 완전히 생육저해됨. 그러나 S. Typhi만 MRS에서 단독배양시는 배양 20~24시간에 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL 접종 전구간 10^8 CFU/mL에 도달함.

- S. aureus와 유산균 EM의 공동배양

S. aureus는 유산균 EM과 공동배양에 의하여 배양 16시간(접종농도 10^4 CFU/mL)~24시간(접종농도 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL)에 완전히 생육저해됨. S. aureus를 MRS에서 단독배양시는 배양 16시간만에 10^8 CFU/mL에 도달함.

- B. cereus 영양세포와 고초균 SN7과의 공동배양

식중독균 B. cereus 세포는 고초균 SN7과의 공동배양 5시간(B. cereus 10^4 CFU/mL 접종시)~6시간(B. cereus 10^5 CFU/mL)만에 완전히 생육저해됨.

* B. cereus $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL 접종근거는 식약처 식품위생규격 기준 B. cereus는 장류식품에서 10^4 CFU/mL 이상 검출되어서는 안되는 기준에 준함.

- B. cereus 포자와 SN7과의 공동배양

B. subtilis SN7과의 공동배양에서 B. cereus 포자는 10^4 spores/mL로 접종시 배양시간 12시간 만에, 10^5 spores/mL로 접종시는 배양 18시간 만에 아예 검출되지 않음. 즉, SN7에 의하여 포자가 12~18시간 만에 아예 발아가 되지 않음을 알 수 있음.

※ 유산균, 고초균과 식중독/부패 효모 또는 세균과의 공동배양에서 효모는 최대 48시간에, 세균은 최대 24시간 이내 식중독/부패균의 생육저해됨.

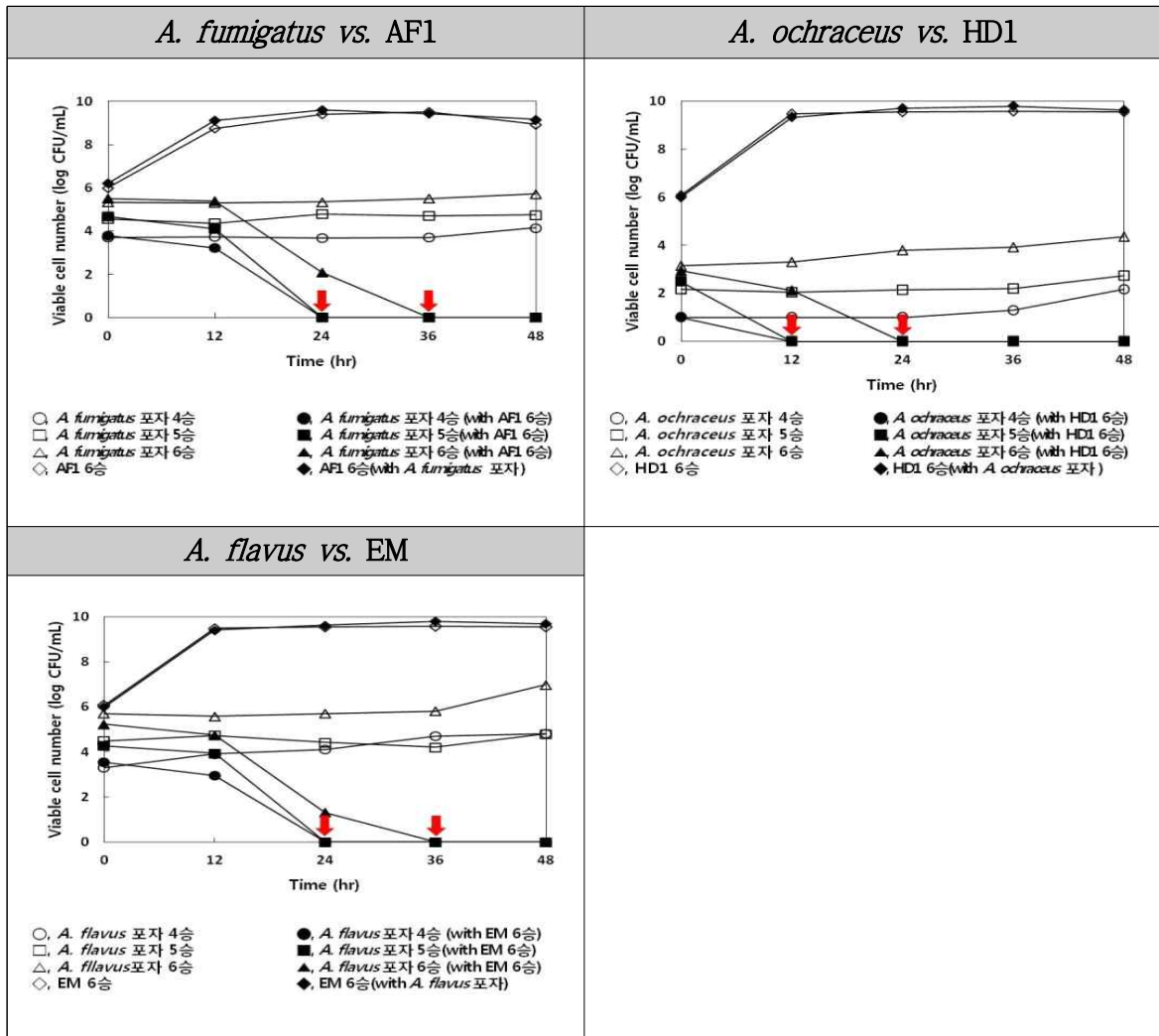


Figure 16. 천연항균물질 생산균주와 식중독/부패 곰팡이의 공동배양에 의한 생육 저해 효과

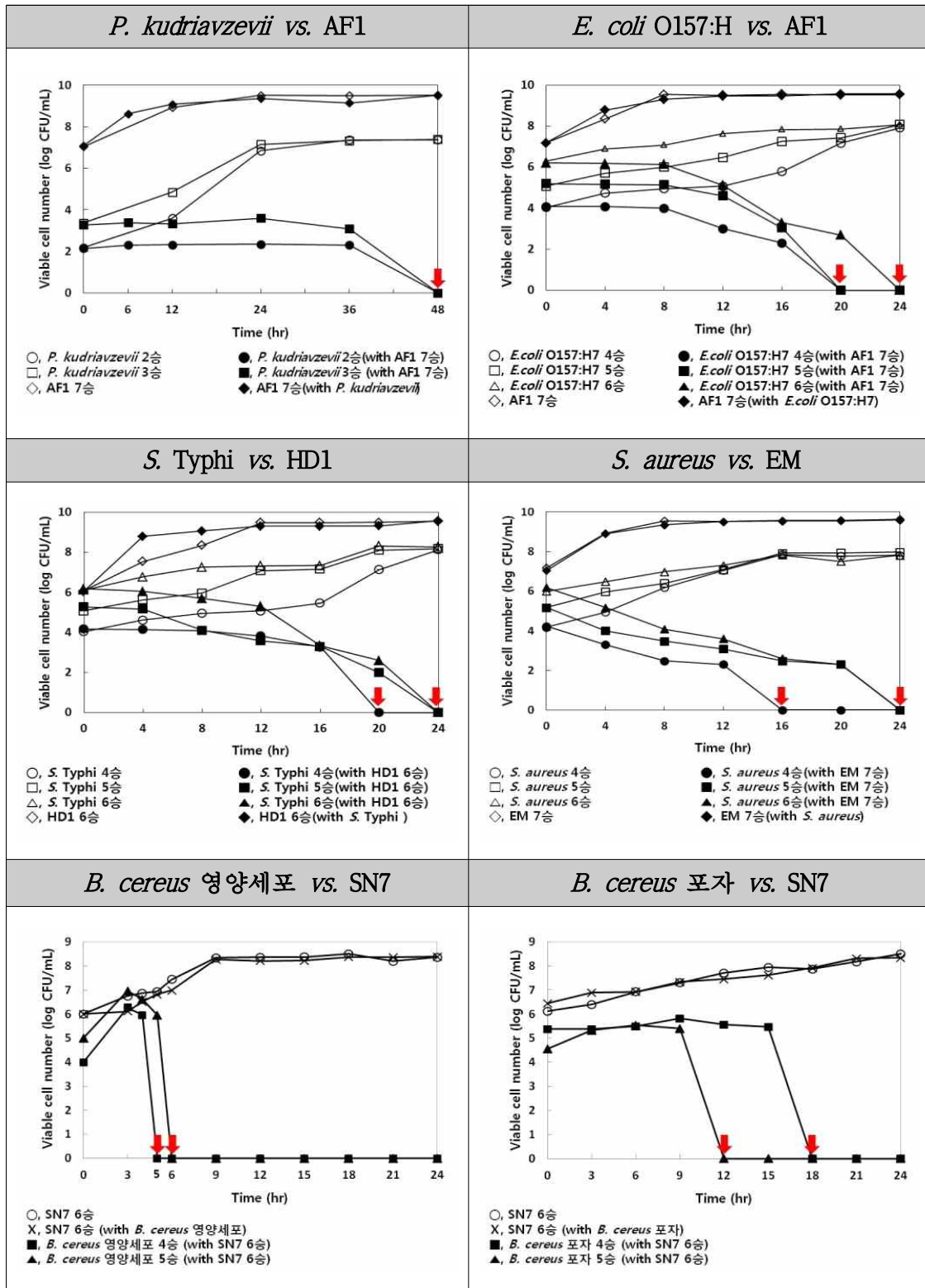


Figure 17. 천연항균물질 생산균주 + 식중독/부패 효모/세균의 공동배양에 의한 생육 저해 효과

(마) 천연항균물질 생산균주의 배양상징액에 식중독균/부패균의 처리

① 항균물질 처리 조건

- 항균물질 배양상징액(유산균 AF1, HD1, EM, 고초균 SN7)에 식중독/부패균을 $10^2 \sim 10^7$ CFU/mL 범위내에서 접종한 후, 30~37°C 에서 곰팡이 균사는 48시간, 곰팡이 포자는 15일, 효모는 48시간, 세균은 24시간 동안 배양함. 항균물질처리(배양상징액)에 따른 부패균/식중독균의 생육도를 곰팡이는 탁도(A_{600})로, 효모와 세균은 생균수로 측정함.

Table 17. 천연항균물질 생산 균주의 배양상징액에 식중독/부패균의 처리 조건

천연항균물질생산균주 배양상징액	식중독균/부패균	식중독균/부패균의 접종초기균수	항균물질 무처리 (대조구)
<i>Lb. plantarum</i> AF1 배양상징액	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	4.0~7.0 log spores/mL	곰팡이/MRS 배지
	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	2.0~3.0 log CFU/mL	효모/MRS or 개발배지(A-4)
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	4.0~6.0 log CFU/mL	세균/MRS 배지
<i>Lb. plantarum</i> HD1 배양상징액	<i>A. ochraceus</i> PF-2	4.0~7.0 log spores/mL	곰팡이/MRS 배지
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	4.0~6.0 log CFU/mL	세균/MRS 배지
<i>Lb. plantarum</i> EM 배양상징액	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	4.0~7.0 log spores/mL	곰팡이/MRS 배지
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	4.0~6.0 log CFU/mL	세균/MRS 배지
<i>B. subtilis</i> SN7 배양상징액	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	4.0~5.0 log CFU/mL	세균/TSB 배지

→ 식중독/부패 곰팡이(*A. fumigatus* ATCC 96918, *A. ochraceus* PF-2, *A. flavus* ATCC 22546)는 포자와 균사로 각각 접종함.

- 포자는 상기표와 같은 농도로 접종함.
- 균사는 천연항균물질생산균주 배양상징액에 곰팡이 균사($A_{600} \approx 0.05$)로 접종하였고, MRS 배지에 곰팡이 균사를 실험구와 동일하게 접종한 것을 대조구로 삼음.

② 항균물질(배양상징액) 처리에 의한 식중독균/부패균 생육저지 효과

i) 식중독/부패 곰팡이의 균사와 포자에 대한 생육저해 효과(Figure 18, 19)

- 균사: *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. ochraceus* 균사를 유산균 배양상징액 처리시 배양 36시간 이후는 생육도 증가 없음. 대조구인 곰팡이의 MRS 접종구는 배양시간 경과에 따라 꾸준히 지속적으로 증가함. 특히 *A. flavus*는 배양 24시간 이후 급격히 생육도 증가함.
- 포자: 곰팡이 3종의 포자를 각각 유산균 배양상징액에 처리시 3종 모두 거의 발

아 일어나지 않음. 이에 반하여 대조구인 곰팡이 3종을 각각 MRS에 배양한 것은 배양시간 경과에 따라 급격히 생육도 증가됨.

- 이와 같은 곰팡이균사의 생육저해 및 포자발아 저해 현상은 Figure 19에 나타낸 바와 같이 균사인 경우 배양 48시간 후, 포자인 경우 배양 3일 후 항균물질(유산균 배양상징액) 처리구에서는 곰팡이의 생육정도가 관찰되지 않으나 항균물질 비처리구(대조구)에서는 왕성한 곰팡이의 생육이 잘 관찰됨이 육안으로도 확인되어 항균물질 처리에 의한 곰팡이 균사의 생육저해 및 포자 발아 저해 효과를 뚜렷이 확인할 수 있음.

※ 즉 항균물질 처리(유산균 배양상징액)에 의하여 식중독/부패 곰팡이의 균사를 생육 저해할 뿐만 아니라, 그 포자도 발아하지 못하도록 하는 생육저해 작용이 확인됨.

ii) 식중독/부패 효모 및 세균에 대한 생육저해 효과(Figure 20)

- 산막효모 *P. kudriavzevii*는 유산균 AF1의 MRS 배양상징액 처리에 의하여 완전히 생육저해는 되지 않고 생육도 $\approx 10^2$ CFU/mL 정도 저해됨. 반면 유산균 AF1의 개발 배지(A-4) 배양상징액 처리에 의하여 생육도 $\approx 10^4$ CFU/mL 정도 저해됨으로써 MRS에서 보다 약 10^2 CFU/mL 더 저해효과를 보임.
- *E. coli* O157은 유산균 AF1 배양상징액 처리에 의하여 초기 *E. coli* O157 접종 농도 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL 구간 모두에서 배양 4시간 이내에 완전히 생육저해됨. 대조구인 *E. coli* O157을 MRS 배지에 접종시 접종 농도에 따라 다소 차이가 있으나 배양 16시간 내 모두 10^8 CFU/mL에 도달함.
- *S. Typhi*는 유산균 HD1 배양상징액 처리에 의하여 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL 접종구간 모두 배양 4시간 이내 완전히 생육저해됨. 대조구인 *S. Typhi*을 MRS 배지에 접종시 접종 농도에 따라 다소 차이가 있으나 배양 16시간 내 모두 10^8 CFU/mL에 도달함.
- *S. aureus*는 유산균 EM 배양상징액 처리에 의하여 $10^4 \sim 10^6$ CFU/mL 접종구간 모두 배양 8시간에 완전히 생육저해됨. 대조구인 항균물질 비처리구는 배양 8시간에 10^8 CFU/mL에 도달함.
- *B. cereus* 영양세포는 *B. subtilis* SN7의 배양상징액 처리에 의해 16시간(10^4 CFU/mL 접종)~18시간(10^5 CFU/mL 접종)에 완전히 생육저해됨.
- *B. cereus* 포자는 21시간(10^4 spores/mL 접종)~24시간(10^5 spores/mL)에 완전히 발아능 상실됨.

※ 항균물질(유산균/고초균 배양상징액) 처리에 의해 다양한 식중독 세균(*B. cereus* 경우 포자 포함)을 배양 4~24시간에 완전히 생육 저해함. 단 효모는 완전 생육저해는 안되고 10^4 CFU/mL 정도 생육저해 효과 보임.

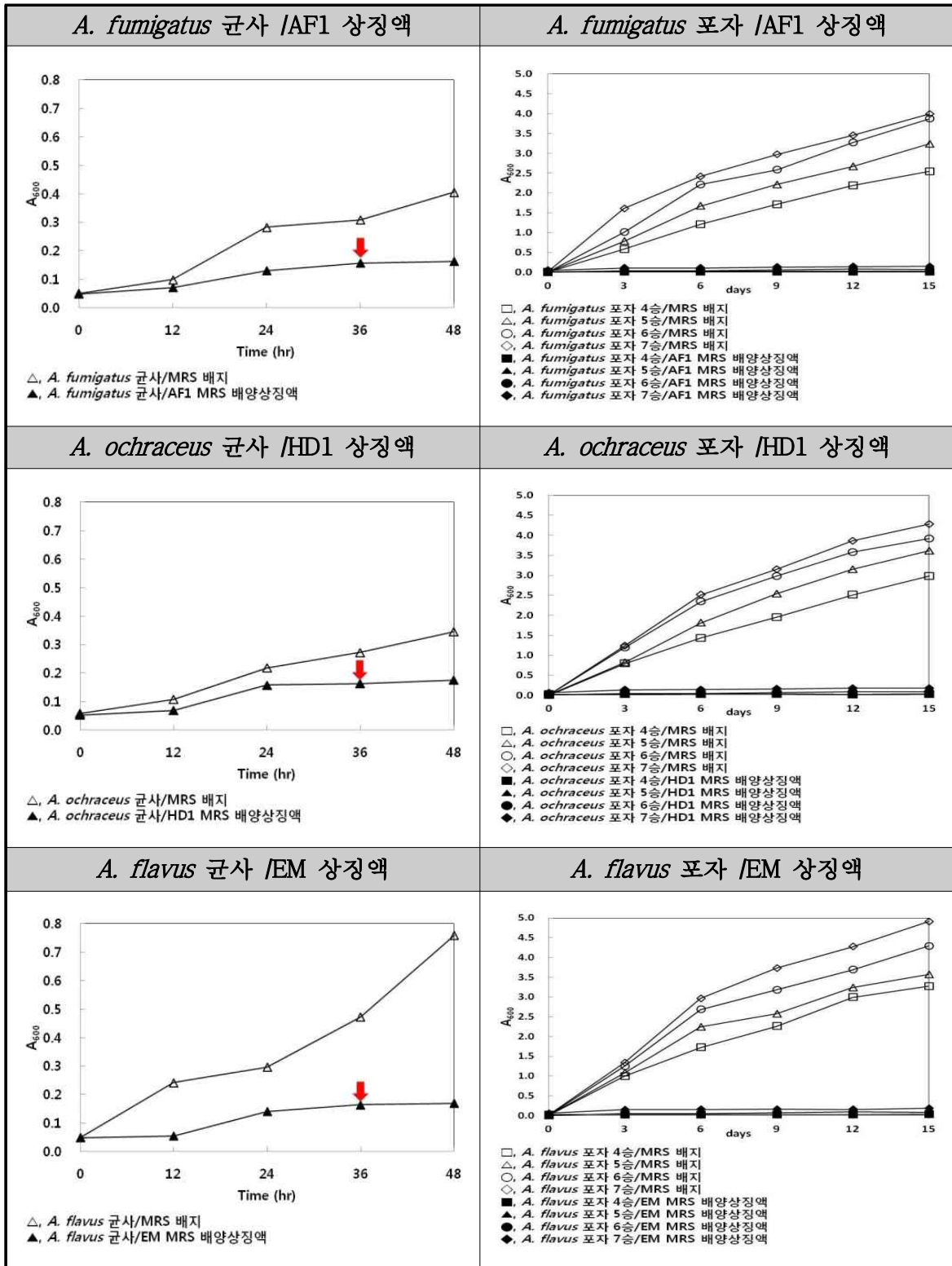


Figure 18. 천연항균물질 생산균주의 배양상징액 처리에 의한 식중독/부패 곰팡이 균사/포자의 생육 저해 효과

항균물질 처리		<i>Lb. plantarum</i> AF1 상정액 + <i>Asp. fumigatus</i> ATCC 96918		<i>Lb. plantarum</i> HD1 상정액 + <i>Asp. ochraceus</i> PF-2		<i>Lb. plantarum</i> EM 상정액 + <i>Asp. flavus</i> ATCC 22546	
곰팡이포자 접종농도	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**	배양 48h 대조구* 항균물질처리구**	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**	배양 48h 대조구* 항균물질처리구**	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**	배양 48h 대조구* 항균물질처리구**	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**
$A_{600} \approx 0.05$ hypha							
곰팡이포자 접종농도	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**	배양 3일 대조구* 항균물질처리구**	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**	배양 3일 대조구* 항균물질처리구**	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**	배양 3일 대조구* 항균물질처리구**	접종당일(0일) 대조구* 항균물질처리구**
4.0 log spores /mL							
5.0 log spores /mL							
6.0 log spores /mL							
7.0 log spores /mL							

Figure 19. 천연항균물질 생산균주의 배양상정액 처리에 의한 식중독/부패 곰팡이의 생육 저해 효과

*대조구: MRS에 곰팡이 균사($A_{600} \approx 0.05$) 또는 포자($4.0 \sim 7.0$ log spores/mL) 접종

**항균물질처리구: 유산균 AF1, HD1 또는 EM 배양상정액에 균사($A_{600} \approx 0.05$) 또는 포자($4.0 \sim 7.0$ log spores/mL)로 접종 후 30°C 에서 2~3일 배양.

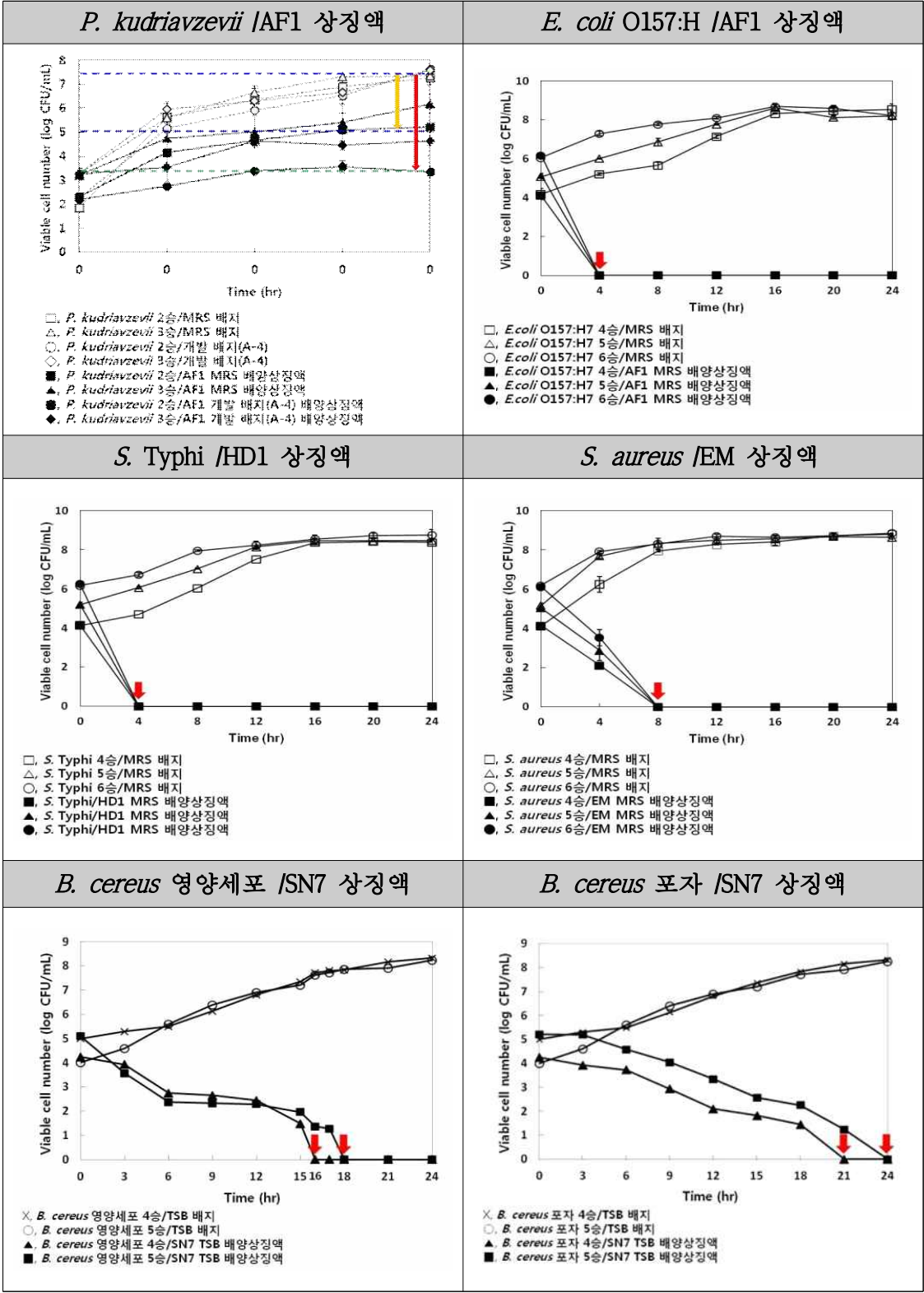


Figure 20. 천연항균물질 생산균주의 배양상징액 처리에 의한 식중독/부패 효모/세균의 생육 저해 효과

(2) 정균/사균 기전 확인: 천연 항균물질 처리에 의한 정균/사균 작용

- 식중독 세균 5종, 곰팡이 3종에 대해 천연항균물질(유산균, 고초균 배양상징액) 처리 후, 그 형태학적 차이를 SEM과 TEM을 사용하여 관찰

(가) **곰팡이**의 형태변화 및 정균/사균/기전

① 형태변화(SEM/TEM 관찰)

- Figure 21에 보여지는 바와 같이 항균물질 처리 전에는 곰팡이 포자 3종은 SEM에서 동그스런 각각의 포자 모양이 관찰되고, TEM에서 포자의 외벽이 또렷이 잘 형성되어 있음이 관찰됨. 그러나 항균물질(유산균 배양상징액) 처리에 의해 3종의 포자 모두 그 형태가 찌그러지고 허물어져 있음을 확인함(SEM). TEM에 의한 포자 내부 관찰시 항균물질 처리전에는 포자벽 내부 물질이 딱 차 있던 것이, 처리 후에는 포자벽이 찌그러짐과 더불어 포자 외벽이 붕괴되어 포자 내용물이 일부 빠져나가 포자 속이 일부 비어 있음이 관찰됨.

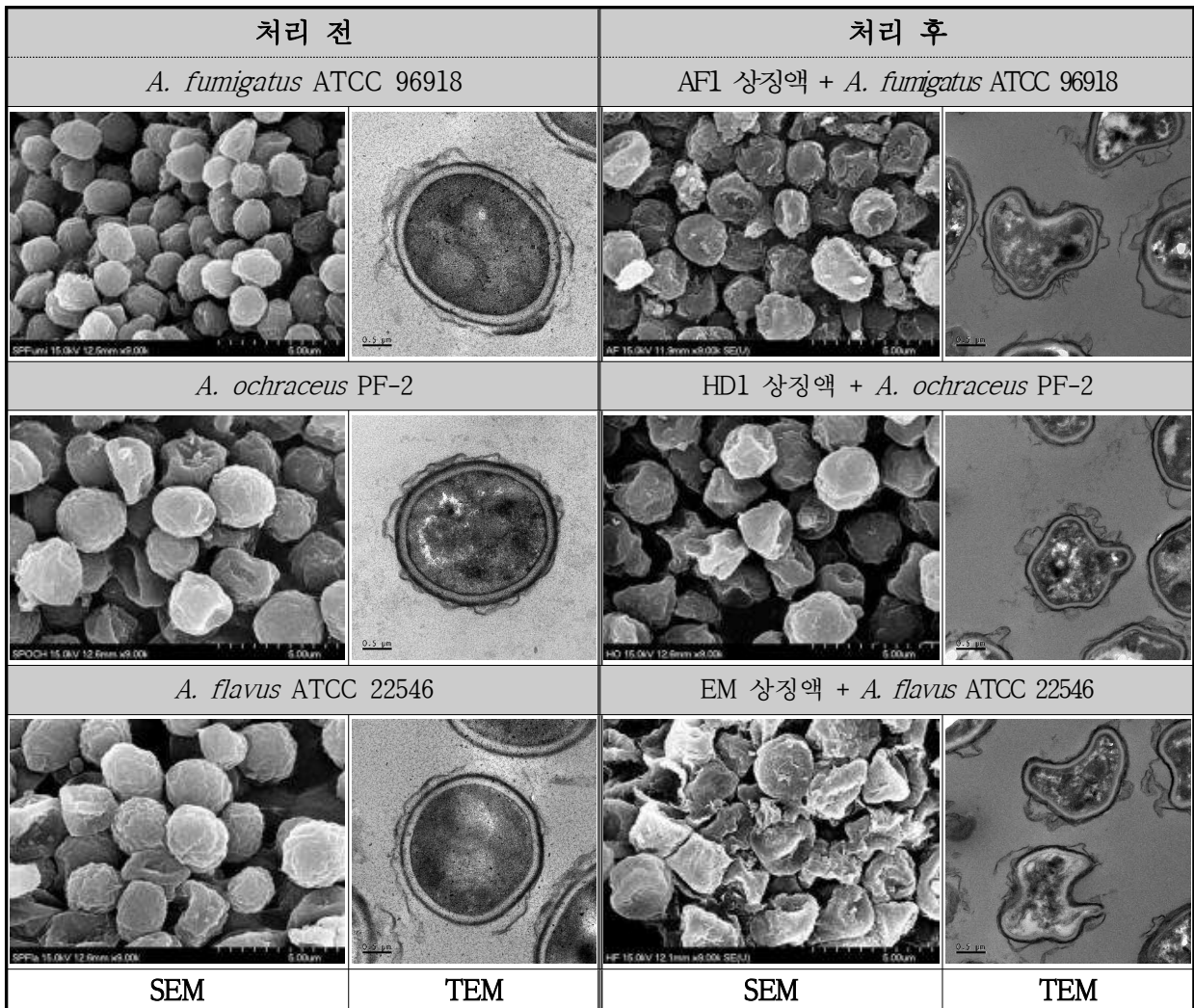


Figure 21. 천연항균물질 처리에 의한 식중독/부패 곰팡이 생육 저해 효과 SEM/TEM 관찰

② 정균/사균작용

- Figure 19의 배양 후, 항균물질(유산균 배양상징액)이 처리된 *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. flavus*의 균사 및 포자를 회수하여 곰팡이 전용배지인 MEB에 접종함. 이때 균사는 회수된 전량, 포자는 Figure 19에서 항균물질에 곰팡이 포자를 6.0 log CFU/mL로 접종하여 배양된 처리구에서 회수된 포자 전량을 MEB에 접종 후 30°C에서 48시간 진탕배양 하여 그 생육도를 관찰함. 이때 대조구는 항균물질이 처리되지 않은 곰팡이 균사($A_{600} \approx 0.05$)와 포자(6.0 log CFU/mL)를 MEB에 접종한 것으로 삼음.
- Figure 22에 보여지는 바와 같이 3종의 곰팡이 모두 항균물질을 처리하지 않은 대조구에서는 잘 생육되지만(Figure 22-대조구), 항균물질 처리 후 MEB에 접종된 곰팡이 균사와 곰팡이 포자는 전혀 생육이 관찰되지 않음(Figure 22-유산균 배양액 상징액 처리 후 재접종). 이로부터 본 연구의 천연항균물질은(유산균 AF1, HD1, EM의 배양상징액) 곰팡이 *A. fumigatus*, *A. ochraceus*, *A. flavus*의 균사 및 포자에 대해 정균작용이 아닌 사균작용을 나타냄을 규명함.

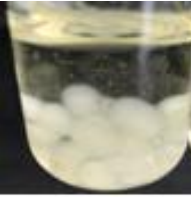

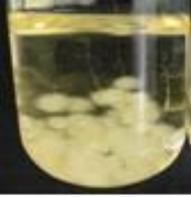
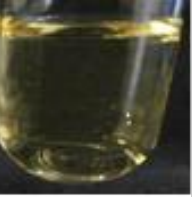
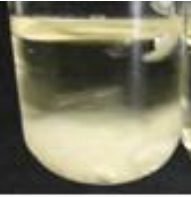
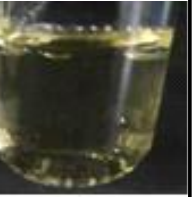
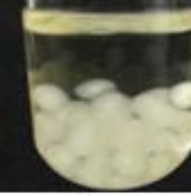
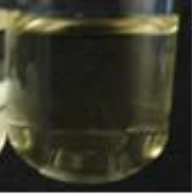


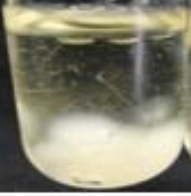

	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918		<i>A. ochraceus</i> PF-2		<i>A. flavus</i> ATCC 22546	
	대조구	AF1 상징액 처리 후 재접종	대조구	HD1 상징액 처리 후 재접종	대조구	EM 상징액 처리 후 재접종
균사						
포자						

Figure 22. 항균물질 처리 후 곰팡이의 생육

(나) 세균의 형태 변화 및 정균/사균 기전(Figure 23)

- *V. parahaemolyticus*는 유산균 AF1 배양상징액처리에 의해 세포벽에 구멍이 무수히 뚫리고(SEM), 세포벽이 허물어지며 세포가 와해됨(TEM).
- *E. coli* O157은 유산균 AF1 배양상징액 처리에 의해 세포가 찢그라들고(SEM), 세포벽이 붕괴되면서 세포내용물이 모두 빠져 버림(TEM).
- *S. Typhi*는 유산균 HD1 배양상징액 처리에 의해 세포벽이 손상되고 이에 따라 세포가 심하게 찢그라들고 세포 내용물이 손실됨을 확인함(SEM/TEM).

- *S. aureus*는 유산균 EM 배양상징액 처리에 의해 세포가 완전히 터져버리고(SEM), 그 내용물도 완전히 다 튀어나올 정도로 세포가 완전히 찢어지고 붕괴됨(TEM).
- *B. cereus* 영양세포는 *B. subtilis* SN7이 배양상징액 처리로 온전한 세포모양이 모두 사라질 정도로 세포 표면이 모두 찌그러지도록 파괴됨(SEM). 또한 세포 외벽의 붕괴로 세포 내용물이 모두 빠져 버림(TEM).
- *B. cereus* 포자는 *B. subtilis* SN7이 배양상징액 처리로 포자의 외형에는 차이가 없어 보이나(SEM), TEM 관찰을 통해 그 속을 살펴보면 포자외벽이 일부 붕괴되면서 그 내용물이 거의 빠져나가 버림.

(다) 천연항균물질 처리에 의한 최종 정균/사균 기전 규명

- 항균물질 생산균주와 식중독/부패균의 공동배양 및 항균물질 배양상징액 처리에 의한 식중독/부패균의 생육저해 작용과 이의 형태학적 관찰(SEM/TEM) 실험결과로부터, 유산균 3종(AF1, HD1, EM)과 고초균 1종이 생산하는 항균물질은 식중독/부패 세균과 곰팡이의 사멸을 초래함을 최종 확인함(Figure 23). 이와 같은 사균 작용은 영양세포(vegetative cell) 상태뿐만 아니라 곰팡이나 *Bacillus*의 포자에 대해서도 단순한 정균작용이 아닌 사균 작용임을 규명함(Table 18).

Table 18. 정균/사균 기전 최종 규명

천연항균물질 생산균주	식중독균/부패균주	정균/사균 효과
<i>Lb. plantarum</i> AF1	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	균사, 포자: 사균
	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	사균/정균
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	사균
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	사균
<i>Lb. plantarum</i> HD1	<i>A. ochraceus</i> PF-2	균사, 포자: 사균
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	사균
<i>Lb. plantarum</i> EM	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	균사, 포자: 사균
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	사균
<i>B. subtilis</i> SN7	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	영양세포, 포자: 사균

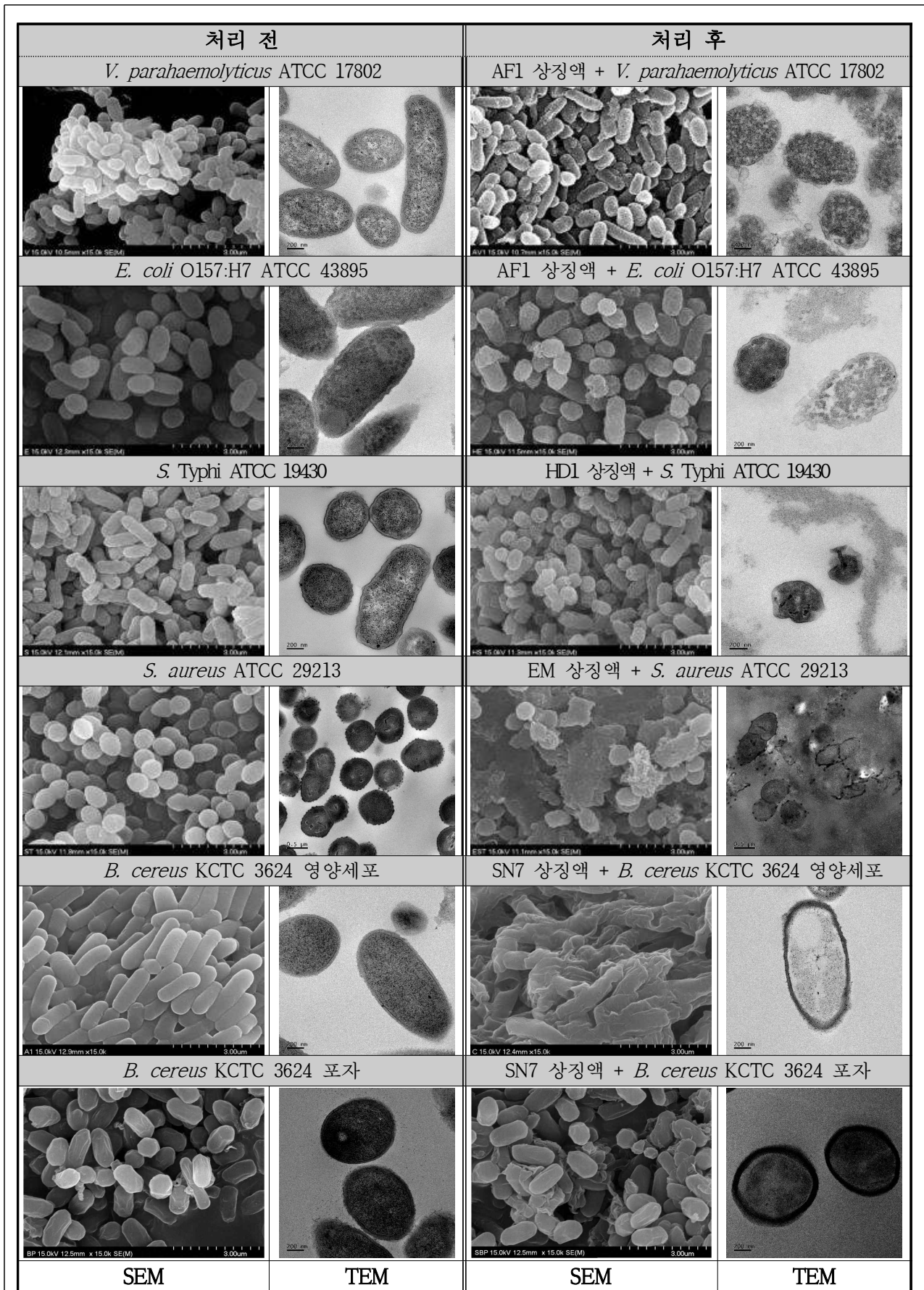


Figure 23. 천연항균물질 처리에 의한 식중독/부패 세균 생육 저해 효과 SEM/TEM 촬영

라. 천연 항균물질의 정제 및 구조규명

(1) 천연 항균물질(항진균/항세균)의 정제

(가) 항진균/항세균 활성 유산균

① 항진균/항세균 활성 유산균이 생산하는 유기산과 항진균/항세균 물질의 활성 비교

- 항진균/항세균 활성 유산균의 활성이 유기산에 의한 pH 저하 및 lactic acid 등에 의한 저해활성에 의존하는지, 아니면 다른 항진균/항세균 물질을 생산하는지 조사하기 위하여 1차년도 개발균주 5종 중 항진균 활성이 가장 약한 *Leu. citreum* GR1을 제외한 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM, *Leu. mesenteroides* TA가 생산하는 유기산을 분석하고, 배양 상징액과 유기산의 항균 활성을 spot-on-the lawn test로 비교함(Table 19).
- 항진균/항세균 활성 유산균이 생산하는 유기산의 종류 및 농도를 분석한 결과 (Table 19) 4종의 유산균 모두 citric acid, lactic acid, acetic acid, phenyllactic acid를 생산하는 것으로 나타남. 그 중 *Lactobacillus* 속인 AF1, HD1, EM이 *Leuconostoc* 속인 TA에 비해 많은 양의 lactic acid와 phenyllactic acid를 생산하며, *Lb. plantarum* EM의 lactic acid 생성량이 가장 많았음(Table 19).

Table 19. 항진균/항세균 활성 유산균이 생산하는 유기산

유기산	유산균	mg/L			
		AF1	HD1	EM	TA
Citric acid		632.169	1337.868	1654.786	1729.163
Lactic acid		17804.549	18049.720	18988.086	8041.466
Acetic acid		4914.431	4696.367	4444.096	6606.233
Phenyllactic acid		82.528	64.788	88.945	13.313
Total		23433.677	24148.743	25175.913	16390.176

- 항진균/항세균 활성 유산균이 생산하는 유기산과 항진균/항세균 물질의 항균 활성을 비교하기 위하여 각 유산균의 배양 상징액과 유기산 혼합물, 그리고 각각의 유기산 시료를 5배(AF1, HD1, EM) 또는 25배(TA) 농축물로 제조하여 10 μ L를 지시균이 접종된 배지 위에 떨어뜨림(Table 20).
- 실험 결과 일부 지시균에 대하여 유기산 혼합물보다 유산균의 배양 상징액에서 최대 8배 더 큰 활성이 나타났으며, 이는 항진균/항세균 활성 유산균의 항균활성은 유기산에 의한 작용 외에도 항진균/항세균 활성을 나타내는 다른 물질에 의한 작용임을 알 수 있음(Table 20).

Table 20. 항균활성균주의 유기산에 의한 항균활성 및 spectrum

식중독균/부패균	항균활성 (AU/mL)*																			
	AFI					HD1					EM					TA				
	배양 상징액	Total 유기산	Lactic acid	Acetic acid	배양 상징액	Total 유기산	Lactic acid	Acetic acid	배양 상징액	Total 유기산	Lactic acid	Acetic acid	배양 상징액	Total 유기산	Lactic acid	Acetic acid				
세균	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	160	160	160	0	160	160	160	0	160	160	80	0	40	40	32	4			
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	40	40	40	0	40	40	40	0	40	40	40	0	8	8	4	0			
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	80	40	40	0	40	40	40	0	40	40	40	0	0	0	0	0			
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	160	80	80	0	160	80	80	0	160	160	80	0	8	8	4	0			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	320	320	160	20	320	320	160	20	320	320	160	0	16	16	8	0			
	<i>Salmonella enterica</i> Typhi ATCC 19430	320	160	160	0	320	160	160	0	160	160	80	0	16	16	8	0			
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	5,120	5,120	2,560	20	5,120	2,560	20	5,120	5,120	80	20	128	64	64	16	16			
	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	160	160	80	40	160	160	80	40	320	160	80	40	12	12	8	4			
곰팡이	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	640	80	80	40	640	80	80	40	640	160	80	40	40	32	16	12			
	<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	160	160	80	40	160	160	80	40	80	80	20	28	24	20	4	4			
	<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	320	320	160	40	320	160	40	320	160	80	40	24	16	16	0	0			
	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	160	40	20	0	160	40	20	0	80	40	20	8	8	4	4	4			

* spot-on-the lawn test에 의한 측정

- Lactic acid, Acetic acid를 제외한 Citric acid와 Phenyllactic acid의 항균활성은 0 AU/mL로 측정됨.

② *Lb. plantarum* EM으로부터 항미생물(항세균/항진균) 활성 물질의 정제

- 항균활성이 약하고 배양 상정액과 유기산의 항균활성 간에 차이가 적은 *Leu. mesenteroides* TA를 제외한 총 3종의 유산균(*Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM)의 천연항균물질 정제 및 구조규명을 진행함.
- 선행 연구를 통하여 항진균/항세균 활성 유산균 3종 중 *Lb. plantarum* AF1의 항진균 물질은 3,6-bis(2-methylpropyl)-2,5-piperazinedion과 δ -dodecalactone, *Lb. plantarum* HD1의 항진균 물질은 5-oxododecanoic acid, 3-hydroxy decanoic acid, 3-hydroxy-5-dodecenoic acid로 규명되었음. 이에 본 연구에서 *Lb. plantarum* EM으로부터 항진균/항세균 물질의 분리·정제를 시행함.
- 분리된 항균활성 물질의 항세균과 항진균을 동시에 측정함(spot-on-the lawn test).
항진활성 지시균 = *A. fumigatus* ATCC 96918
항세균활성 지시균 = *B. cereus* KCTC 3624

i) SPE(solid phase extraction)

- *Lb. plantarum* EM으로부터 항미생물 활성 물질의 정제를 위하여 전처리 단계로 solid phase extraction(SPE)를 시행함. C₁₈ SPE column(Isolute, C₁₈ EC, 10g; International Sorbent Technology, Hengoed, UK)을 사용하여 항진균 활성을 나타내는 hydrophobic compounds만을 흡착한 후 95% aqueous acetonitrile로 용출함. 용출 분획은 용매를 휘발시킨 후 prep-HPLC 정제 시료로 사용함.

ii) Prep-HPLC → recycling prep-HPLC

- 항미생물 활성 물질을 분리하기 위한 prep-HPLC는 recycling preparative LC9104 HPLC system(Japan Analytical Industry, Japan)을 이용하였음. 컬럼은 JAIGLE-W gel permeation chromatography(W252, 20×500 mm, Japan Analytical Industry)을 사용하였으며, 검출기로는 3702 UV 검출기(Japan Analytical Industry)를 사용함.

• Prep-HPLC

- Prep-HPLC I 단계: Solid phase extraction으로 전처리한 항진균 물질을 시료로 prep-HPLC I 단계 정제를 시행하였음. 50% acetonitrile 용매로 용출한 결과 18개의 주요한 분획을 얻을 수 있었으며(Figure 24-A), *A. fumigatus* ATCC 96918과 *B. cereus* KCTC 3624에 대한 항진균, 항세균 활성을 spot-on-the lawn test로 확인한 결과 7~12번 분획에서 곰팡이에 대한 저해활성을 확인하였고, 7~9번, 14번 분획에서 세균에 대한 저해활성을 확인하였음(Figure 24-a). 항진균 활성 7~12번 분획은 prep-HPLC II 단계 정제 시료로 사용함.
- Prep-HPLC II 단계: Prep-HPLC I 단계에서 분리된 항진균 활성 7~12번 분획을 컬럼에 주입한 후 50% acetonitrile로 용출하여 13개의 분획을 수집하였음(Figure

24-B). 각 분획의 곰팡이와 세균에 대한 저해활성을 측정된 결과 10번 분획에서 항진균 활성과 강한 항세균 활성이 확인됨(Figure 24-b). 항진균, 항세균 활성 10번 분획은 prep-HPLC III단계 정제 시료로 사용함.

- Prep-HPLC III단계: Prep-HPLC II 단계에서 분리된 항진균, 항세균 활성 10번 분획을 컬럼에 주입한 후 40% acetonitrile로 용출하여 7개의 분획을 수집하였음(Figure 24-C). 각 분획의 곰팡이와 세균에 대한 저해활성을 측정된 결과 피크가 단일해 보이고 곰팡이와 세균에 대한 저해활성이 뚜렷한 5번 분획을 prep-HPLC IV단계 정제 시료로 사용함(Figure 24-c).

• Recycling-prep HPLC

- Prep-HPLC IV단계(recycling): Prep-HPLC III단계에서 분리된 항진균, 항세균 활성이 강한 5번 분획을 컬럼에 주입한 후 40% acetonitrile로 용출하여 3차례의 recycling HPLC 과정으로 4개의 분획을 수집하였음(Figure 24-D). 각 분획의 곰팡이와 세균에 대한 저해활성을 측정된 결과 피크가 단일해 보이고 곰팡이와 세균에 대한 저해활성이 강한 4번 분획을 확보함(Figure 24-d).

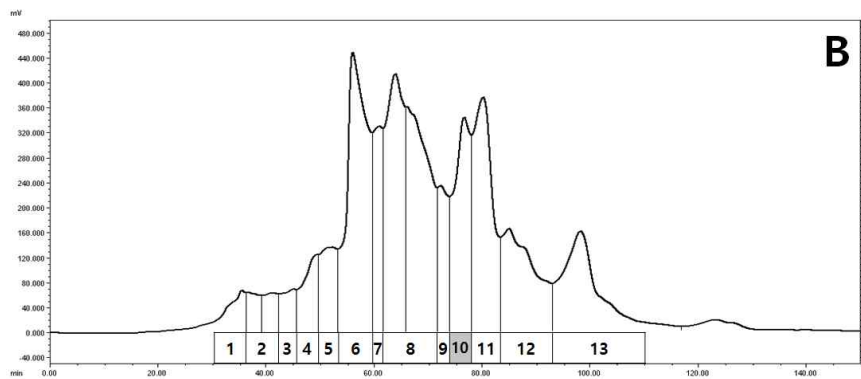
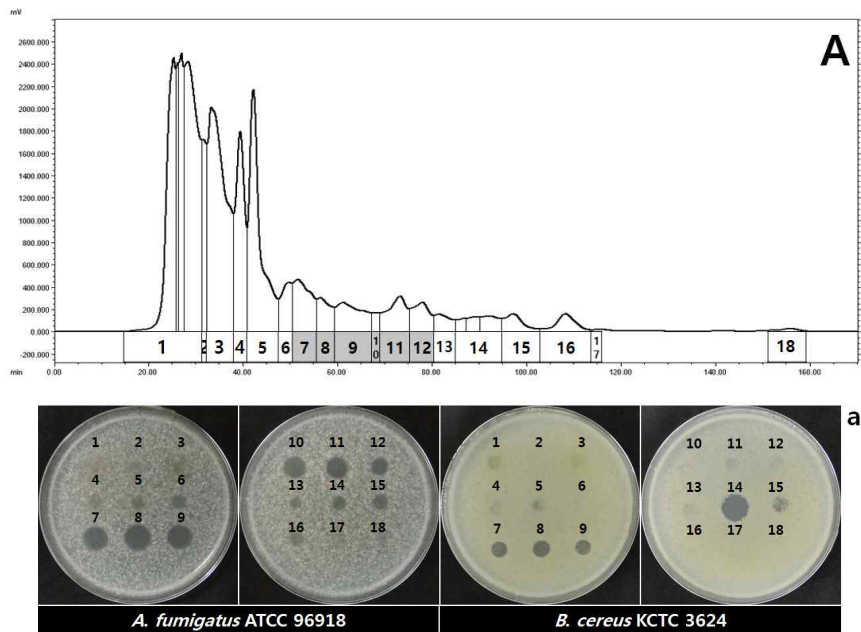


Figure 24. 이어서

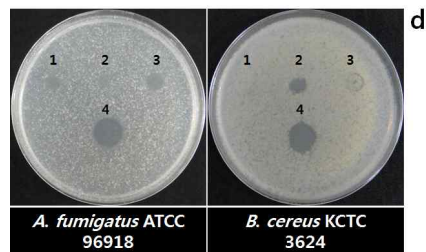
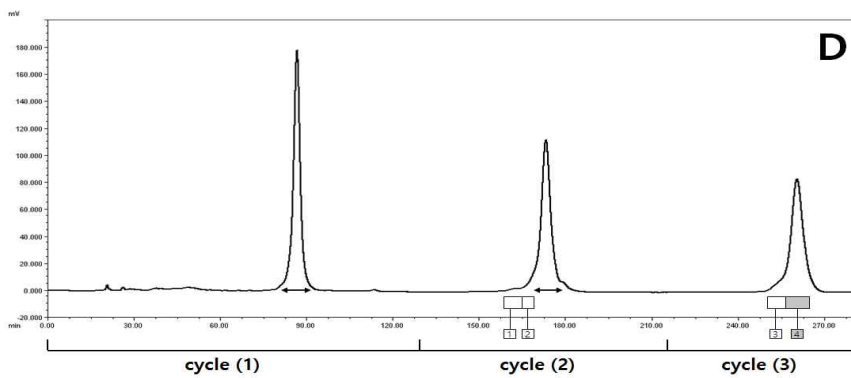
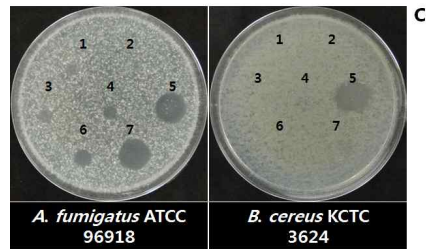
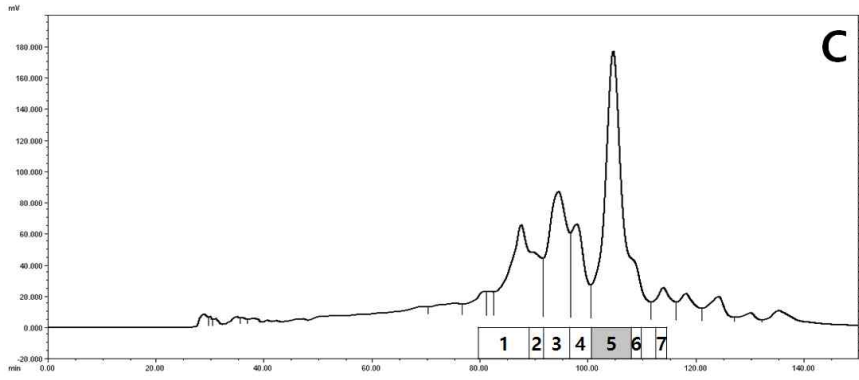
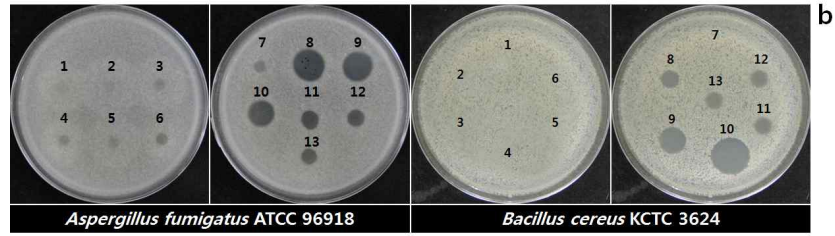


Figure 24. 항진균, 항세균 물질 분리를 위한 prep-HPLC
(Gray boxes, 항진균, 항세균 활성 분획)

iii) Anal-HPLC

- Prep-HPLC에서 분리된 항진균, 항세균 활성 분획의 단일 peak를 확인하기 위한 anal-HPLC는 Analytical HPLC(Younglin Acume HPLC, Younglin, Anyang, Korea)를 이용하였음. 컬럼은 LUNA 5 μ C₁₈ column(4.6 \times 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며, 검출기로는 UV detector (UV730D, Younglin)을 사용함.
- Recycling-prep HPLC에서 분리된 항진균, 항세균 활성 분획 F4를 40% acetonitrile에 완전히 녹인 후 0.45 μ L membrane filter(Advantec MFS, Dublin, CA, USA)로 여과시킨 다음 시료로 사용함.
- F4의 peak를 확인한 결과 단일 peak로 확인되었으며, 곰팡이와 세균에 대한 저해활성을 나타내어 항미생물 활성 물질 규명을 위한 분석시료로 사용함(Figure 25).

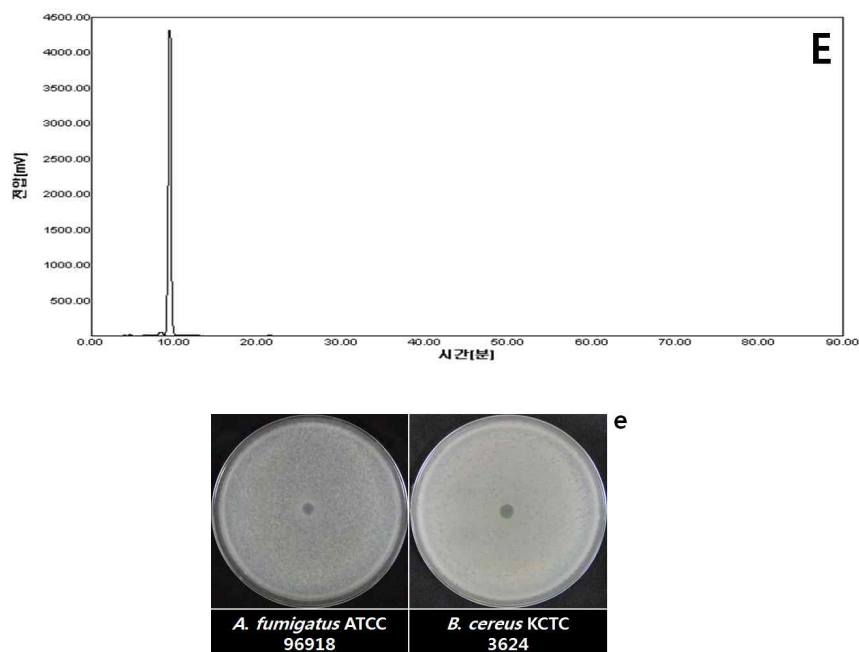


Figure 25. 항진균, 항세균 물질 분리를 위한 analytical HPLC

③ 정제 단계에 따른 항미생물 활성 물질의 항진균, 항세균 활성 역가 측정

- *Lb. plantarum* EM이 생산하는 항미생물 활성 물질의 항진균, 항세균 활성 역가를 정제 단계별로 측정하기 위하여 배양 상징액, solid phase extraction 정제물, prep-HPLC의 각 단계별 항진균, 항세균 활성 분획을 2-fold dilution 방법으로 준비하여 spot-on-the lawn test를 시행함. 지시균으로는 *A. fumigatus* ATCC

96918과 *B. cereus* KCTC 3624를 사용하였음.

- 최종 정제된 항미생물 활성 물질인 10-5-4의 항진균, 항세균 활성 역가는 9.6×10^2 AU를 나타내었으며(Table 21), 정제에 사용된 배양 상징액의 전체 활성을 100%로 하였을 때, 회수율은 항진균 활성의 경우 0.0030%, 항세균 활성의 경우 0.0120%를 나타내었음(Table 21).

Table 21. *Lb. plantarum* EM이 생산하는 항미생물 활성 물질의 정제 단계별 항진균, 항세균활성

Purification stage	Vol. (mL)	Activity (AU/mL)		Total activity (AU)		Recovery (%)	
		Antifungal	Antibacterial	Antifungal	Antibacterial	Antifungal	Antibacterial
Culture supernatant	50,000	640	160	3.2×10^7	8.0×10^6	100.0000	100.0000
Solid phase extract	100	25,600	200	2.6×10^6	2.0×10^4	8.0000	0.2500
1st HPLC fraction 7-12	80	6,400	3,100	5.1×10^5	2.5×10^5	1.6000	3.1000
2nd HPLC							
Fraction 10	8	6,400	3,100	5.2×10^4	2.5×10^4	0.1600	0.3100
3rd HPLC							
Fraction 10-5	3	800	800	2.4×10^3	2.4×10^3	0.0075	0.0300
4th HPLC (recycling)							
Fraction 10-5-4	0.6	1,600	1,600	9.6×10^2	9.6×10^2	0.0030	0.0120

(나) 항진균/항세균 활성 고초균

① *B. subtilis* SN7으로부터 항세균 물질의 정제

i) C₁₈ Sep-Pak cartridge 정제

- *B. subtilis* SN7으로부터 항세균 물질의 정제를 위하여 전처리 단계로 C₁₈ Sep-Pak cartridge를 시행함. C₁₈ Sep-Pak cartridge(Waters, MA, USA)에 항세균 활성을 나타내는 hydrophobic compounds만을 흡착한 후 100% methanol로 용출함. 용출 분획은 용매를 휘발시킨 후 prep-HPLC 정제 시료로 사용함.

ii) Prep-HPLC → recycling prep-HPLC

- 항세균 물질을 분리하기 위한 Prep-HPLC는 Recycling preparative LC9104 HPLC system(Japan Analytical Industry, Japan)을 이용하였음. 컬럼은 JAIGLE-W gel permeation chromatography(W252, 20×500 mm, Japan Analytical Industry)을 사용하였으며, 검출기로는 3702 UV 검출기(Japan Analytical Industry)를 사용함.

• Prep-HPLC

- Prep-HPLC I 단계: C₁₈ Sep-Pak cartridge로 전처리한 항세균 물질을 시료로 prep-HPLC I 단계 정제를 시행하였음. 50% acetonitrile 용매로 용출한 결과 6개의 주요한 분획을 얻을 수 있었으며(Figure 26-A), *B. cereus* KCTC 3624에 대한 항세

균 활성을 spot-on-the lawn test로 확인한 결과 1-2번 분획에서 세균에 대한 저해 활성을 확인하였음(Figure 26-a). 항세균 활성 1-2번 분획은 prep-HPLC II 단계 정제 시료로 사용함.

- Prep-HPLC II 단계: Prep-HPLC I 단계에서 분리된 항세균 활성 1-2번 분획을 컬럼에 주입한 후 50% acetonitrile로 용출하여 3개의 분획을 수집하였음. 각 분획의 세균에 대한 저해활성을 측정한 결과 2-2번 분획에서 항세균 활성이 확인됨(Figure 26-B,b). 항세균 활성 2-2번 분획은 prep-HPLC III 단계 정제 시료로 사용함.

- Recycling-prep HPLC

- Prep-HPLC III 단계(recycling): Prep-HPLC II 단계에서 분리된 항세균 활성이 강한 2-2번 분획을 컬럼에 주입한 후 45% acetonitrile로 용출하여 10차례의 recycling HPLC 과정으로 3개의 분획을 수집하였음(Figure 26-C). 각 분획의 세균에 대한 저해활성을 측정한 결과 세균에 대한 저해활성이 강한 3-3번 분획을 확보함(Figure 26-c).

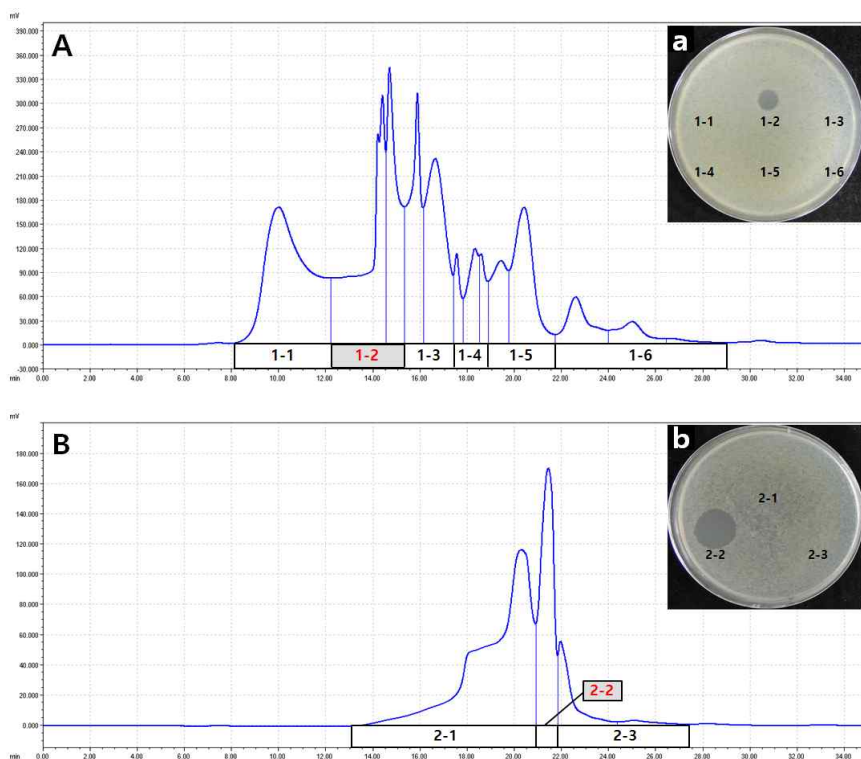


Figure 26. 이어서

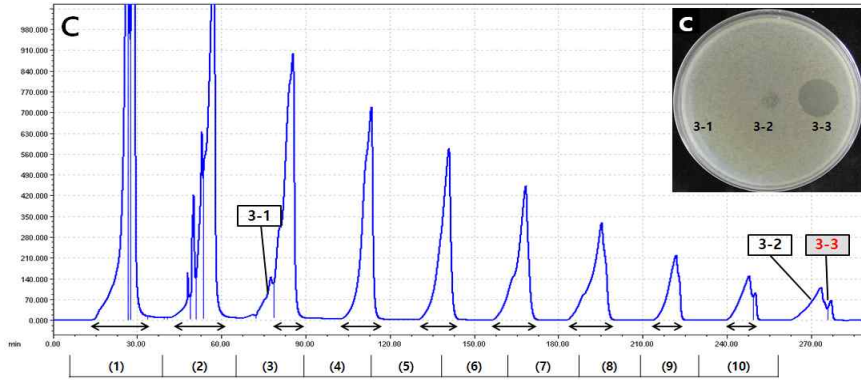


Figure 26. 항세균 물질 분리를 위한 prep-HPLC
(Gray boxes, 항세균 활성 분획)

iii) Anal-HPLC

- Prep-HPLC에서 분리된 항세균 활성 분획의 단일 peak를 확인하기 위한 anal-HPLC는 Analytical HPLC(Younglin Acume HPLC, Younglin, Anyang, Korea)를 이용하였음. 컬럼은 LUNA 5 μ C₁₈ column(4.6×250 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 사용하였으며, 검출기로는 UV detector (UV730D, Younglin)을 사용함.
- Recycling-prep HPLC에서 분리된 항세균 활성 분획 F3-3을 45% acetonitrile에 완전히 녹인 후 0.20 μ L membrane filter(Advantec)로 여과시킨 다음 시료로 사용함.
- Anal-HPLC를 통해 F3-3의 peak을 확인하였으며(Figure 27-E) 항세균 활성을 나타내어 항세균 활성 물질 규명을 위한 분석시료로 사용함(Figure 27-e).

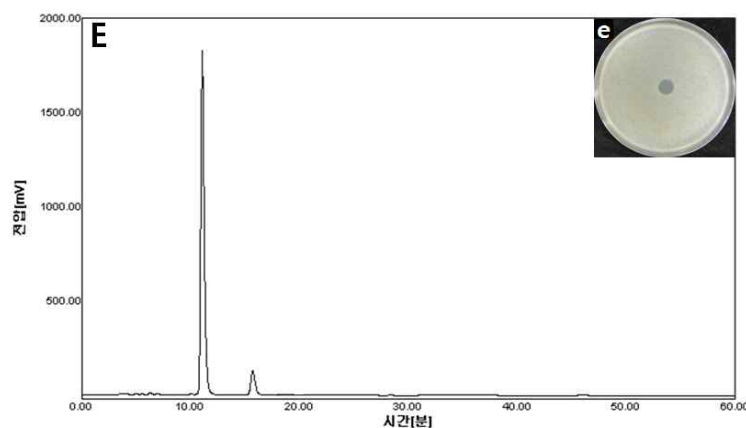


Figure 27. 항진균, 항세균 물질 분리를 위한 analytical HPLC

② 정제 단계에 따른 항세균 활성 역가 측정

- *B. subtilis* SN7이 생산하는 항세균 물질의 활성 역가를 정제 단계별로 측정하기 위하여 배양 상징액, C₁₈ Sep-Pak cartridge 정제물, prep-HPLC의 각 단계별 항세균 활성 분획을 2-fold dilution 방법으로 준비하여 spot-on-the lawn test를 시행함. 지시균으로는 *B. cereus* KCTC 3624를 사용하였음.
- 최종 정제된 항세균 물질인 3-3의 항세균 활성 역가는 4.0×10^2 AU를 나타내었으며, 정제에 사용된 배양 상징액의 전체 활성을 100%로 하였을 때, 회수율은 0.313%를 나타내었음(Table 22).

Table 22. *B. subtilis* SN7이 생산하는 항세균 물질의 정제 단계별 항세균 활성

Purification stage	Vol (mL)	Activity (AU/mL)	Total activity (AU)	Recovery (%)
Culture supernatant	800	1,600	1.28×10^6	100.000
C ₁₈ Sep-pak	80	6,400	5.12×10^5	40.000
1st HPLC fraction 1-2	20	3,200	6.40×10^4	5.000
2nd HPLC fraction 2-2	4	1,600	6.40×10^3	0.500
3rd HPLC fraction 3-3	1	400	4.00×10^2	0.313

(2) 천연 항균물질(항진균/항세균)의 구조규명

(가) 유산균의 항미생물 활성 물질

① LC/MS

- 항미생물 활성 물질의 질량 분석 및 구조 예측을 위한 LC/MS는 LC/MS system (LCQ, Thermo finnigan, USA)을 사용하였으며, 시료는 용액(0.1% Trifluoroacetic acid)/45% acetonitrile)에 녹여 분석하였음. 분석 결과는 X-Caliber software v.2.0.7 (Thermo fisher scientific, MA, USA)를 사용하여 분석하였음.
- LC/MS 분석 결과 항미생물 활성 물질 10-5-4 분획은 분자량 214.15를 나타냄 (Figure 28).

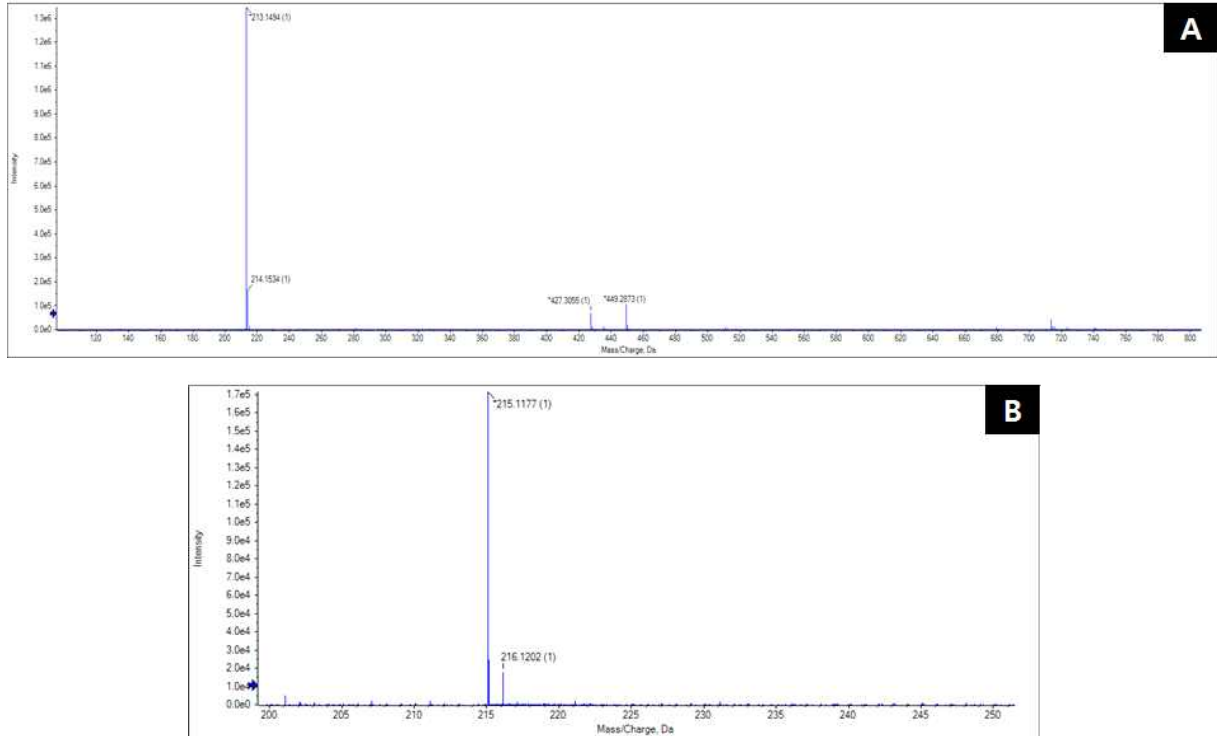


Figure 28. 향미생물 활성 물질 10-5-4의 LC/MS 분석
(A; negative mode, B; positive mode)

② NMR(¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HSQC, HMBC): 핵자기공명분광분석

- LC/MS 분석을 통해 분자량이 확인된 향미생물 활성 분획 10-5-4의 정확한 구조를 규명하기 위하여 NMR을 시행함.
- LC/MS 분석에 따른 질량 값 및 NMR 구조 분석에 근거하여 향진균 물질의 구조를 해석한 결과, 향미생물 활성 물질 10-5-4는 3-hydroxy-5-dodecenoic acid ($C_{12}H_{22}O_3$)로 규명됨(Figure 29).

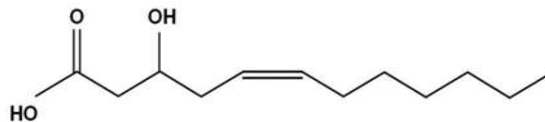


Figure 29. LC/MS와 NMR 분석에 의한 향미생물 활성 물질의 구조 규명

(나) 고초균의 항세균 활성 물질

① LC/MS

- 항세균 물질의 질량 분석 및 구조 예측을 위한 LC/MS는 LC/MS system(LCQ, Thermo finnigan, USA)을 사용하였으며, 시료는 용액(0.1% Trifluoroacetic

acid)/45% acetonitrile)에 녹여 분석하였음. 분석 결과는 X-Caliber software v.2.0.7 (Thermo fisher scientific, MA, USA)를 사용하여 분석하였음.

- LC/MS 분석 결과 항세균 물질 3-3 분석은 분자량 3401.5666을 나타냄(Figure 30).

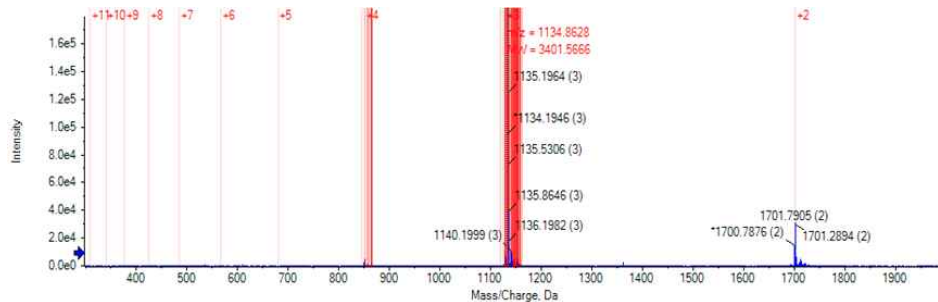


Figure 30. 항진균, 항세균 물질 10-5-4의 LC/MS 분석

② A.A 서열 분석

- LC/MS 분석을 통해 분자량이 확인된 항세균 활성 분획의 N'말단 아미노산 서열을 분석하기 위해 정제한 물질을 45% acetonitrile에 녹인 후, 아미노산 분석기 Procise 491 HT protein sequencer(Applied biosystems, Wilmington, DE, USA)로 분석하였으며, 컬럼은 PTH analysis column(2.1×220 mm, Applied biosystems, Wilmington, DE, USA)을 사용하였고, 용매는 A, 3.5% THF(tetrahydrofuran) in water B, 12% isopropanol in acetonitrile을 사용하여 다음의 gradient 조건으로 용출하였음 : 0 min A 92% B 8%, 0.2 min A 89% B 11%, 0.4 min A 86% B 14%, 18 min A 54% B 46%, 18.5 min A 10% B 90%, 용출속도는 325 μ L/min를 유지
- N'말단 아미노산 서열 분석 결과, 총 30개의 아미노산 서열을 확인하였음(Figure 31).
- 기존 연구에서 발표된 단백질성 항균물질인 Bacteriocin과의 상동성을 비교하기 위하여 NCBI와 Multiple Sequence Alignment by CLUSTALW에서 protein blast한 결과(Figure 32), *Bacillus subtilis*가 생산하는 항균펩타이드인 Subtilosin A (분자량 4,000 Da)와 83%의 Query coverage와 더불어 73.33%의 아미노산 서열의 상동성을 보임(Figure 33).
- *B. subtilis* SN7의 항세균 물질은 분자량 3,401.5666이며, 30개의 아미노산으로 이루어진 새로운 항균성 펩타이드임을 규명함. 이에 본 연구결과인 신규한(novel) 박테리오신은 Mejucin으로 명명함.
- 또한 본 연구의 신규한 아미노산 서열의 박테리오신은 NCBI에 그 서열을 등록하여 Accession No. PRJNA309888를 부여받음.

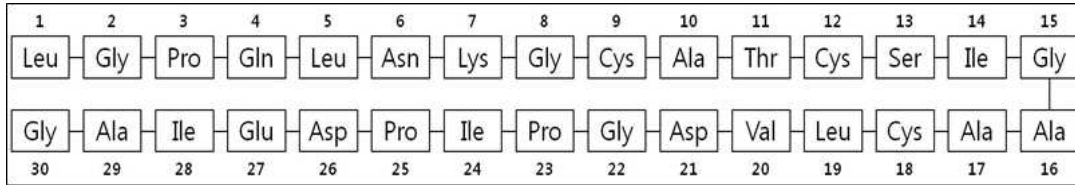


Figure 31. N'말단 아미노산 서열 분석

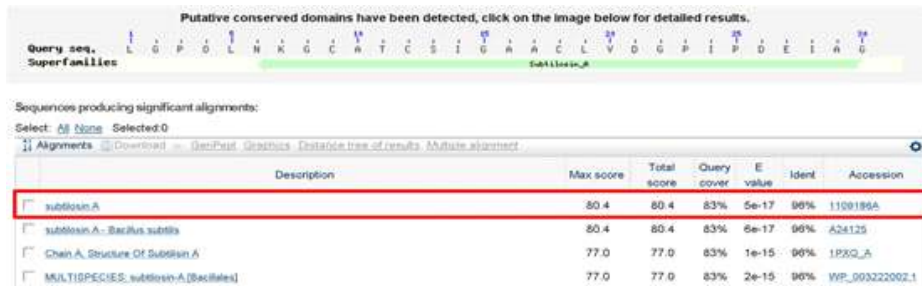


Figure 32. NCBI blast 결과

```

Sequence type explicitly set to Protein
Sequence format is Pearson
Sequence 1: subtilisin      43 aa
Sequence 2: SN7           30 aa
Start of Pairwise alignments
Aligning...

Sequences (1:2) Aligned. Score: 73.3333
Guide tree file created: [clustalw.dnd]

clustalw.align

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment
subtilisin  MKKAVIVENKGCATCSIGAACLVDGPIPDPFEIAGATGLFGLWG ← 43개 아미노산
SN7         ---LGPOLNKGATCSIGAACLVDGPIPDEIAG----- ← 30개 아미노산
*****

```

Figure 33. *B. subtilis* SN7의 항세균 물질과 subtilisin A의 상동성 비교

2. 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발

가. 천연항균물질 생산용 식용배지 개발

(1) 배추폐기물의 처리 공정 개발

(가) 배추폐기물

- ① 시료 : 김치 가공 시 파생되는 i) 폐배추, ii) 폐절임배추
- ② 수거장소 : i) 가내 수공업(전남에 위치한 가정집)
ii) 중소기업(화원 농협)
iii) 대기업(대상 FNF(주))

③ 분석항목

- 이화학적 특성(염도, 당도, pH, 산도)
- 일반성분(수분, 조단백, 조지방, 조회분, 조섬유)
- 유리당(Glucose, Fructose, Sucrose 등)
- 유리아미노산(필수/비필수 아미노산 32종)

④ 수거시기

- 봄(3월~5월: 2014.03.31 수집)
- 여름(6월~8월: 2014.07.30 수집)
- 가을(9월~11월: 2014.09.03 수집)
- 겨울(12월~2월: 2013.12.11 수집)

(나) 수거방식에 따른 배추폐기물의 성분조성 비교

① 폐배추와 폐절임배추의 이화학적 특성

- 폐배추 : 수거방식에 따른 배추폐기물의 이화학적 특성을 조사하기 위하여 겨울철 i) 가정집과 ii) 농협, iii) 대기업(대상 FNF(주))으로부터 김치 제조 후 파생되는 폐배추와 폐절임배추를 수거하였음. 수거한 폐배추와 폐절임배추는 미생물용 배지를 제조하기 위해 착즙기를 이용하여 착즙하였으며 멸균 가아제를 이용해 고형물을 제거하였음. 폐배추 착즙액의 이화학적 특성 조사 결과 염도는 0.5~0.6%, 당도는 4~5 brix, pH와 산도는 각각 pH 6.0 내외, 0.13~0.16%으로 나타났으며, 수거장소에 따른 시료 간 이화학적 특성에는 큰 차이가 없음을 확인하였음. 이에 이후 계절별 폐배추즙의 이화학적 특성 분석 실험을 위한 폐배추 수거는 제 1협동인 대상 FNF(주)로부터 수거된 시료만으로 실험을 수행함. 봄과 여름, 가을에 수거된 폐배추즙의 이화학적 특성을 분석한 결과 겨울철 폐배추즙과 비슷한 값을 나타냄(Table 23).

Table 23. 수거방식에 따른 폐배추의 이화학적 특성 분석

특성	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
염도(%)	0.65±0.04	0.67±0.01	0.54±0.02	0.65±0.01	0.64±0.02	0.64±0.03
당도(brix)	5.36±0.15	4.10±0.10	4.01±0.15	3.98±0.09	3.69±0.10	4.15±0.16
pH	6.12±0.01	5.95±0.02	6.10±0.01	6.16±0.03	6.13±0.02	6.13±0.01
산도(%)	0.13±0.02	0.16±0.01	0.15±0.01	0.12±0.01	0.11±0.03	0.12±0.02

- 폐절임배추 : 폐절임배추는 겨울철 세 곳 i) 가정집과 ii) 농협, iii) 대기업으로부터 수거한 시료 모두에서 폐배추에서의 결과와 같이 수거장소에 따른 차이는 관찰되지 않았으며 수거된 3곳의 시료 모두 비슷한 값의 염도, 당도, pH, 산도를 나타내었음. 이에 이후 폐절임배추는 대상 FNF(주)로부터 수거된 시료로 실험함. 봄, 여름, 가을에 수거한 시료를 분석한 결과, 염도 3.0% 내외, 당도 약 9 brix, pH 5.7 내외, 산도 0.21% 부근으로 모두 비슷한 분석결과를 가짐으로써 계절별, 수거장소에 따른 시료 간 큰 차이가 없음을 확인하였음(Table 24).

Table 24. 수거방식에 따른 폐절임배추의 이화학적 특성 분석

특성	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
염도(%)	2.57±0.02	2.49±0.06	3.27±0.15	3.20±0.40	3.50±0.60	3.35±0.15
당도(brix)	8.47±0.06	6.93±0.15	9.33±0.21	10.30±0.05	8.06±0.13	8.64±0.13
pH	5.84±0.07	5.76±0.04	5.79±0.02	5.71±0.03	5.68±0.05	5.80±0.09
산도(%)	0.20±0.02	0.21±0.01	0.18±0.01	0.21±0.01	0.22±0.02	0.18±0.12

② 폐배추와 폐절임배추의 일반성분 분석

- 폐배추 : 겨울철 세 곳으로부터 수거한 폐배추즙의 수분 함량은 95% 이상으로 나타났으며 조단백 함량은 0.50~0.68%, 조지방 함량은 0.01 g/100 mL로 비슷한 수준을 나타냄. 조회분 함량 또한 0.4 g/100 mL 범위 내에서 크게 벗어나지 않음을 확인하였음. 봄과 여름, 가을에 수거한 폐배추즙 또한 겨울철 수집된 세 시료와 비슷한 값을 나타냄을 확인하였음(Table 25).

Table 25. 수거방식에 따른 폐배추의 일반성분 분석

일반성분	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
수분(%)	95.64	97.04	97.75	97.61	98.38	98.09
조단백(%)	0.68	0.61	0.50	0.58	0.73	0.59
조지방(g/100 mL)	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
조회분(g/100 mL)	0.45	0.45	0.47	0.39	0.52	0.44

- 폐절임배추 : 폐절임배추즙의 수분 함량은 약 92% 내외로 나타났으며 조단백 함량은 0.72~0.93% 범위로 폐배추즙의 조단백 함량보다 조금 높거나 비슷하게 나타남. 조회분 함량(2.38~3.99 g/100 mL)은 폐배추즙의 조회분 함량보다 약 6배~7배 정도 높게 측정되었음. 조지방 함량 또한 약 0.04 g/100 mL 정도로 폐배추즙보다 약 4배 정도 높게 측정되었음. 폐절임배추 또한 수거장소 및 계절에 따른 시료 간 차이가 크게 나타나지 않음을 확인하였음(Table 26).

Table 26. 수거방식에 따른 폐절임배추의 일반성분 분석

일반성분	겨울		봄	여름	가을
	가정집	화원 농협			
수분(%)	92.94	94.60	92.55	90.46	94.39
조단백(%)	0.93	0.72	0.87	0.88	0.89
조지방(g/100 mL)	0.04	0.03	0.04	0.05	0.03
조회분(g/100 mL)	2.54	2.38	3.99	2.32	2.83

③ 폐배추와 폐절임배추의 유리당 분석

- 폐배추 : 겨울철 세 개의 시료 내 유리당의 함량 분석 결과, 세 시료 모두 Glucose, Fructose, Sucrose순으로 많이 함유하고 있었으며, Glucose(7,977.28~9,628.69 mg/L) 와 Fructose(4,863.69~6,090.05 mg/L)가 다량 검출되었음. 또한 봄과 여름, 가을에 수거된 폐배추즙에서도 Glucose와 Fructose의 함량이 가장 높게 검출됨을 알 수 있었음(Table 27).

Table 27. 수거방식에 따른 폐배추의 유리당 분석

유리당 (단위 : mg/L)	겨울		봄	여름	가을
	가정집	화원 농협			
Glucose	9,628.69	8,756.50	7,977.28	6,705.50	6,830.42
Fructose	6,090.05	4,863.69	7,963.73	6,901.14	5,765.65
Sucrose	0.00	101.53	0.00	108.25	102.04
합계	15,718.74	13,721.72	15,941.01	13,714.89	12,698.11

- 폐절임배추 : 폐절임배추즙의 유리당 함량 분석 결과, 가정집 시료에서는 glucose (16,099 mg/L)가 가장 높게 검출되었으며 화원 농협과 대상 FNF(주)의 시료 또한 각각 12,822 mg/L, 17,222 mg/L로 가장 높게 검출되었음. 또한 봄과 여름, 가을에 수거된 폐절임배추즙에서도 glucose 함량이 가장 높게 검출됨을 알 수 있었음(Table 28).

Table 28. 수거방식에 따른 폐절임배추의 유리당 분석

유리당 (단위 : mg/L)	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
Glucose	16,099.33	12,822.78	17,222.56	13,636.37	17,026.12	16,062.72
Fructose	12,435.94	9,103.91	15,256.79	11,299.05	12,472.77	13,554.07
Sucrose	302.25	101.53	1,630.57	776.95	848.02	1,684.90
합계	28,837.52	22,028.22	34,109.92	25,712.37	30,346.91	31,615.02

④ 폐배추와 폐절임배추의 유리아미노산 분석

- 폐배추 : 폐배추즙으로부터 유리아미노산 함량을 측정된 결과, 폐배추즙 내 가장 많은 양을 차지하고 있는 유리아미노산으로는 Aspartic acid, Serine, Glutamic acid, Alanine, Valine, Leucine, Lysine, Arginine, Phenylalanine 등으로 세 시료 모두 비슷한 결과를 보였음(Table 29).
- 폐절임배추 : Table 19에서 보이는 바와 같이 겨울철 수거한 시료 내 유리아미노산 함량을 분석한 결과, Aspartic acid, Serine, Gluctamic acid, Alanine, Valine, Leucine, Lysine 등이 폐배추즙과 동일하게 다량 검출되었으며 그 외 Threonine, Isoleucine, Tyrosine, Histidine 등이 높게 나타남. 이는 세 시료 모두 비슷한 결과를 보였으며 봄과 여름, 가을에 수거된 폐절임배추즙 또한 위와 같은 결과를 보임 (Table 30).

Table 29. 수거방식에 따른 폐배추의 유리아미노산 분석

유리아미노산 (단위 : mg/L)	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
P-Ser	211.015	230.775	95.525	0.000	289.766	216.585
Tau	107.230	71.810	32.925	0.000	0.000	0.000
PEA	143.265	0.000	0.000	105.862	114.010	0.000
Urea	3,252.300	1,028.045	614.995	2,686.215	3,041.434	2,027.832
Asp	1,848.650	1,026.575	1,603.530	3,169.430	2,067.974	4,380.741
Thr	770.945	568.065	744	1,409.368	1,493.904	1,147.242
Ser	1,077.305	543.905	861.275	2,257.963	1,715.102	1,923.495
Glu	1,710.475	2,849.135	3,453.870	4,834.768	3,713.140	2,271.393
Sar	0.000	0.000	0.000	0.000	22.244	50.487
a-AAA	63.930	42.390	0.000	0.000	93.050	54.162
Gly	518.745	190.975	268.200	362.527	392.544	619.230
Ala	1,936.950	1,260.490	1,484.935	4,275.888	2,992.316	3,198.699
Cit	5.350	25.910	0.000	0.000	0.000	0.000
Val	1,161.545	803.390	523.450	2,009.180	1,613.956	1,706.154
Cys	377.570	187.375	0.000	0.000	0.000	0.000
Met	490.455	131.110	249.060	167.035	158.320	466.308
Cysthi	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ile	678.540	284.755	367.300	821.205	552.138	819.537
Leu	1,109.700	432.335	413.080	399.595	363.390	1,017.051
Tyr	613.440	288.310	223.925	288.522	451.436	757.011
Phe	922.620	524.210	370.900	1,143.033	1,402.982	1,007.181
b-Ala	130.845	114.780	4.885	20.565	24.830	158.082
b-AiBA	210.175	152.500	0.000	0.000	20.468	280.572
g-ABA	4,607.550	1,395.630	518.020	149.310	1,436.622	2,078.385
EOH ₂ NH	548.490	383.140	345.940	359.750	296.988	581.574
NH ₃	549.415	834.160	793.130	1,196.953	1,733.990	1,652.817
Hylys	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Orn	55.035	33.880	8.995	33.245	116.378	73,329
Lys	1,018.910	519.945	438.030	468.287	580.750	1,218.306
lMethis	0.000	0.000	0.000	75.220	0.000	44.835
His	189.115	154.150	186.760	543.810	608.376	343.782
Arg	1,206.355	1,418.665	2,793.575	5,057.018	4,049.108	3,009.084
합계	25,515.920	15,496.410	16,396.305	31,834.750	29,345.220	31,103.874

Table 30. 수거방식에 따른 폐절임배추의 유리아미노산 분석

유리아미노산 (단위 : mg/L)	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
P-Ser	277.050	182.795	172.215	195.960	511.386	173.755
Tau	271.535	100.350	154.365	112.282	0.000	86.977
PEA	352.160	169.835	119.665	175.897	111.564	0.000
Urea	5,947.840	2,959.970	3,578.395	2,835.510	5,018.793	3,679.377
Asp	2,907.575	1,188.285	1,491.965	867.502	1,453.605	2,120.357
Thr	1,672.855	1,364.165	1,583.350	2,032.160	3,638.481	1,920.805
Ser	3,652.590	1,991.810	2,223.965	3,058.298	4,205.037	2,863.812
Glu	4,241.490	1,944.665	1,668.005	8,624.893	1,931.757	3,813.920
Sar	127.890	0.000	0.000	38.442	98.550	0.000
a-AAA	90.985	39.740	67.230	123.482	93.852	76.937
Gly	878.350	772.885	1,042.230	677.815	1,654.101	902.887
Ala	9,620.490	6,585.535	6,064.405	9,121.405	8,873.559	6,457.925
Cit	16.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Val	1,909.765	1,740.240	1,481.920	2,523.115	3,859.920	2,807.092
Cys	405.700	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Met	564.825	456.060	516.195	367.320	879.789	419.200
Cysthi	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ile	1,432.595	996.730	1,123.585	1,108.788	2,174.307	1,468.590
Leu	1,683.460	1,254.275	1,644.310	1,258.740	2,965.725	1,568.587
Tyr	1,010.575	805.700	1,003.530	648.205	1,838.997	923.077
Phe	1,455.630	1,101.295	1,304.140	1,303.610	2,212.672	1,459.382
b-Ala	337.315	168.885	292.640	173.467	324.207	169.197
b-AiBA	286.300	171.725	267.140	343.325	408.48	201.435
g-ABA	7,989.165	5,346.150	7,453.430	1,740.143	11,901.800	5,745.645
EOH ₂ NH	877.685	555.485	709.560	647.165	903.327	522.585
NH ₃	2,030.780	1,791.540	1,714.735	823.092	2,119.785	1,462.69
Hylys	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Orn	64.105	36.005	59.100	48.907	278.142	110.69
Lys	1,764.030	1,267.895	1,666.975	1,091.960	2,765.481	1,324.415
lMethis	24.505	31.885	25.680	136.817	0.000	83.380
His	594.315	407.995	557.725	473.252	1,022.220	802.220
Arg	4,453.690	2,848.930	2,999.765	3,750.765	6,112.563	4,755.482
합계	56,941.255	36,280.830	40,986.220	44,302.320	67,358.120	45,920.430

(다) 수거방식에 따른 오염도 측정

- 폐배추와 폐절임배추에 대한 유해균주 여부를 확인하기 위하여 수거된 시료를 착즙기에 착즙 후 멸균가아제로 고형물을 제거한 착즙액을 멸균수에 희석하여 배양 배지(일반 세균: Plate count agar, LB agar, 대장균: Mac Conkey sorbitol agar, 황색 포도상 구균: Mannitol salt agar, 대장균균: Chromocult agar, 진균: Potato dextrose agar)에 도말, 배양 후 형성된 colony의 특성과 현미경을 통한 형태학적 특성 관찰.

① 폐배추 : 수거된 폐배추즙의 오염도 측정 결과, 겨울철 3종의 시료와 봄, 여름, 가을 각각 1종의 시료 모두에서 일반 세균 약 10^5 CFU/mL, 대장균 10^3 CFU/mL, 황색 포도상구균 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL, 대장균균 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL으로 비슷한 검출 결과를 보여줌. 진균류의 경우 봄과 가을을 제외한 모든 시료에서 10^2 CFU/mL가 검출되었음(Table 31).

Table 31. 폐배추의 오염도 측정 결과

분석항목 (단위 : CFU/mL)	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
일반 세균	8.4×10^5	2.5×10^5	7.4×10^5	3.9×10^5	5.4×10^5	5.1×10^5
대장균	1.8×10^3	6.0×10^3	1.0×10^3	2.7×10^3	6.3×10^3	8.1×10^2
황색 포도상구균	2.4×10^3	1.9×10^3	6.0×10^2	9.0×10^2	9.8×10^2	1.0×10^2
대장균균	4.2×10^3	2.5×10^3	1.9×10^3	1.2×10^4	5.6×10^4	2.0×10^4
진균	2.0×10^2	1.0×10^2	2.0×10^2	N.D	5.0×10^2	N.D

N.D: not detected

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

② 폐절임배추 : 폐절임배추즙의 오염도 측정 결과, 일반 세균 약 10^5 CFU/mL, 대장균 및 간상세균 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL, 장내 세균 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL, 포도상 구균 $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL, 대장균 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL, 진균 10^2 CFU/mL로 검출되었음(Table 32).

Table 32. 폐절임배추의 오염도 측정 결과

분석항목 (단위 : CFU/mL)	겨울		봄	여름	가을	
	가정집	화원 농협				대상 FNF(주)
일반 세균	3.4×10^5	5.1×10^5	7.4×10^5	4.2×10^5	4.0×10^5	5.8×10^5
대장균	2.9×10^4	3.0×10^4	1.0×10^3	2.3×10^3	4.2×10^3	2.0×10^2
황색 포도상구균	1.1×10^3	2.4×10^3	6.0×10^2	5.0×10^3	2.9×10^4	3.5×10^3
대장균균	2.5×10^4	4.0×10^4	1.9×10^3	2.0×10^3	2.6×10^3	6.9×10^2
진균	1.0×10^2	4.0×10^2	2.0×10^2	1.0×10^2	2.0×10^2	1.0×10^2

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

(라) 배추폐기물의 물리적 처리과정 최적화

- (나),(다)의 실험결과에 따라, 폐배추와 폐절임배추를 이용한 GRAS 미생물 배지를 제조하기 위하여 미생물 배지 조성에 적합한 물리적 처리공정을 개발함.
- 수거한 폐배추는 수거 당일 흙과 먼지를 제거하기 위해 1차 증류수를 이용하여 1회 수세 후 착즙하였으며, 폐절임배추의 경우 절임과정에서 품질 등의 문제로 상품화가 될 수 없는 절임상태의 배추 혹은 절임 및 수세과정에서 잘려진 배춧잎으로 수거 상태 그대로 수세 과정 없이 바로 착즙하였음. 착즙 후 멸균 가아제를 이용하여 고형물을 제거하였으며, 121°C 에서 15분간 가압 멸균하였음. 열로 인해 변성된 고형물은 원심분리(10,000 ×g, 15 min, 4°C)하여 제거하였음. 이때 시료수거부터 멸균 후 고형물 제거단계까지 수획량을 기록하여 수율 계산하였음(평균 수율: 폐배추즙 68%, 폐절임 배추즙 43%). 이후 이렇게 처리된 폐배추즙(배지A) 및 폐절임 배추즙(배지B)을 기본배지로 하고 이에 식용성분, 탄소원, 질소원 등을 첨가하거나 pH 등의 조정을 통해 천연항균물질 생산용 식용배지 개발함(Figure 34).

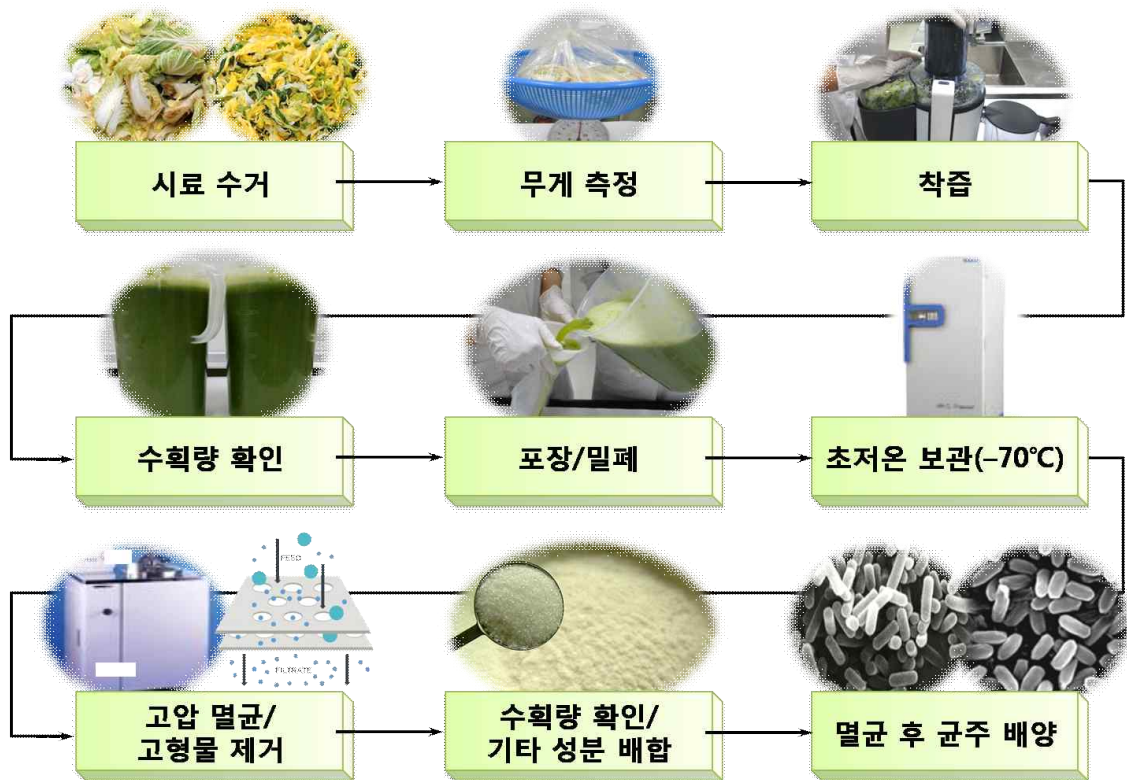


Figure 34. 배추폐기물의 물리적 처리과정 최적화

(2) 식용성분을 이용한 식용배지 개발

(가) 배추폐기물을 활용한 GRAS 미생물 배지조성 개발

- 성분 및 조성
 - 폐배추즙(원액 및 1/5 희석액) or 폐절임배추즙(원액 및 1/5 희석액)
 - 쌀가루: 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%
 - 옥수수 추출물: 0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%

(나) 균주의 생육 및 항균활성 측정

- 2회 각각의 시료준비 후 각 3반복 실험수행: 평균값 표기(n=6)

① 유산균 전용 배지

- 배지: 폐배추즙, 폐절임배추즙
- 대상 균주: *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM
(개발 유산균주 5종 중 가장 항균 spectrum이 넓고 그 활성이 강하게 나타난 3종을 우선 대상으로 전용배지 개발 실험 수행)
- 배양 조건: 30°C, 24시간 정지 배양
- 생균수 측정: 배양액을 serial dilution(10^n)에 의해 희석한 후 MRS agar에 도말하여 30°C에서 배양한 후 형성된 colony 수를 계측하여 배양액 1 mL에 해당하는 콜로니 형성단위(colony forming unit, CFU)의 상용로그 값으로 환산하여 표시
- 항균 활성 측정: spot-on-the lawn test 방법으로, 지시균을 도말한 배지위에 항균활성 균주의 농축상징액을 2-fold dilution하여 10 μ L씩 점적. 활성역가는 항균물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU(Arbitrary Unit)/mL로 표시. 농축상징액을 사용한 경우 항균활성은 농축배율에 나누어주어 1×로 환산한 후 AU/mL로 표시
- 지시균: *B. cereus* KCTC 3624(항세균활성), *A. fumigatus* ATCC 96918(항곰팡이활성)
 - 폐배추즙 : 폐배추즙 원액(100%)과 폐배추즙을 1/5로 희석한 희석액(20%)에서 유산균을 배양한 결과 3종의 균주 모두 희석 전·후 동일한 생균수와 항세균/항곰팡이 활성을 보임(Table 33). *Lb. plantarum* AF1의 경우 폐배추즙 원액과 희석액에서 각각 1.0×10^7 CFU/mL, 2.8×10^7 CFU/mL, *Lb. plantarum* HD1의 경우 4.5×10^7 CFU/mL, 3.4×10^7 CFU/mL, *Lb. plantarum* EM의 경우 1.2×10^7 CFU/mL, 1.8×10^7 CFU/mL로 측정됨. 항세균 및 항곰팡이 활성 또한 희석 전·후 모두 80 AU/mL, 20 AU/mL로 동일하게 나타남으로써 폐배추즙 1/5 희석액(20%)을

폐배추즙 배지A-1로 함.

☞ 폐배추즙 1/5 희석액을 폐배추즙 배지A-1로 함.

- 폐배추즙 배지A-1에 옥수수 추출물(corn steep liquor; C.S.L)를 1~2% 첨가했을 때 *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM 모두 10^7 CFU/mL에서 10^8 CFU/mL로 생균수가 증가하였으며 항세균 활성 및 항곰팡이 활성 또한 160 AU/mL, 40 AU/mL로 첨가전보다 2배 상승하였음(Table 34). 이에 옥수수 추출물(C.S.L) 1% 첨가한 배지를 폐배추즙 배지A-2로 선정하였음. 배지A-2는 유산균용 배지(MRS)와 동일한 항세균 활성을 나타내지만 생균수와 항곰팡이 활성은 낮음.

☞ 폐배추즙 배지A-1 + 옥수수 추출물(C.S.L, 1%)를 폐배추즙 배지A-2로 함.

- 폐절임배추즙 : 폐절임배추즙의 경우 착즙 후 원액의 염도가 약 3.0%으로 유산균용 실험실 배지(MRS)의 염도인 0.6%보다 5배 높은 염도를 나타내었음. 이에 폐절임 배추즙을 증류수를 이용하여 1/5로 희석하여 사용하였음. 폐절임배추즙 원액과 희석액에 *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM을 배양 후 생균수 측정 결과, 모두 10^8 CFU/mL를 나타내었음. 항세균 활성 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1과 EM은 80 AU/mL, *Lb. plantarum* HD1은 160 AU/mL로 희석 전과 동일한 활성을 나타냄(Table 33). 항곰팡이 활성 측정 결과, 세 균주 모두 희석전과 희석후의 동일한 활성(20 AU/mL)을 나타냄. 이에 폐절임배추즙 또한 1/5 희석액을 폐절임배추즙 배지B-1로 함.

☞ 폐절임배추즙 1/5 희석액을 폐절임배추즙 배지B-1로 함.

- 폐절임배추즙 배지B-1에 옥수수 추출물(C.S.L)을 0.5~2% 첨가한 배지에서 3종의 유산균 모두 첨가전과 동일한 생균수(10^8 CFU/mL)를 나타냄(Table 23). *Lb. plantarum* AF1, EM의 경우 C.S.L 1% 첨가구간에서 항세균 활성이 80 AU/mL에서 160 AU/mL로 2배 증가하였으며, 항곰팡이 활성은 각각 4배(80 AU/mL), 8배(160 AU/mL) 증가하였음. *Lb. plantarum* HD1 또한 C.S.L 1% 첨가구간에서 항곰팡이 활성이 20 AU/mL에서 80 AU/mL로 4배 상승하였음(Table 34). 이에 최적 식용성분 첨가 농도를 옥수수 추출물(C.S.L) 1%로 설정하고 이를 폐절임배추즙 배지B-2로 함.

☞ 폐절임배추즙 배지B-1 + 옥수수 추출물(C.S.L, 1%)를 폐절임배추즙 배지B-2로 함.

Table 33. 배추폐기물의 회석에 따른 유산균의 생균수 및 항균 활성

배지	성분	AFI		HDI		EM			
		생균수*	항세균**	항곰팡이	항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	
기본배지A	폐배추즙 원액	7.01±0.40	80	20	7.56±0.38	80	7.06±0.10	80	20
		7.45±0.04	80	20	7.51±0.19	80	7.25±0.07	80	20
		8.73±0.20	80	20	8.38±0.23	160	8.75±0.11	80	20
기본배지B	폐절임배추즙 원액	8.35±0.04	80	20	8.71±0.22	160	8.66±0.06	80	20
		9.34±0.07	160	640	9.29±0.20	160	9.30±0.08	160	640
Control	MRS(유산균용 배지)								

*생균수: log CFU/mL, **항세균/항곰팡이 활성: AU/mL
2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

Table 34. 식용성분별 함량에 따른 유산균의 생균수 및 항균 활성

성분	AFI		HDI		EM		배지	
	생균수*	항세균**	항곰팡이	항세균	항곰팡이	항세균		
폐배추즙 1/5 회석액	+ C.S.L 0.5%	7.62±0.21	80	7.66±0.37	80	7.82±0.56	160	20
	+ C.S.L 1.0%	8.35±0.12	160	8.01±0.35	160	8.26±0.40	160	40
	+ C.S.L 2.0%	8.44±0.21	160	8.11±0.09	160	8.49±0.49	160	40
	+ 쌀가루 0.5%	8.04±0.09	80	7.91±0.13	80	8.02±0.20	160	20
	+ 쌀가루 1.0%	8.19±0.31	80	7.43±0.41	80	8.02±0.14	160	20
	+ 쌀가루 2.0%	8.35±0.05	80	8.02±0.05	80	8.47±0.46	160	20
폐절임배추즙 1/5 회석액	+ C.S.L 0.5%	8.38±0.31	160	8.64±0.28	160	8.75±0.10	80	80
	+ C.S.L 1.0%	8.73±0.07	160	8.65±0.14	160	8.88±0.06	160	160
	+ C.S.L 2.0%	8.43±0.21	160	8.58±0.32	160	8.69±0.27	160	160
	+ 쌀가루 0.5%	8.39±0.10	80	8.36±0.11	160	8.57±0.23	80	40
	+ 쌀가루 1.0%	8.55±0.33	80	8.48±0.34	160	8.47±0.10	80	40
	+ 쌀가루 2.0%	8.43±0.06	80	8.42±0.06	160	8.37±0.13	80	40

*생균수: log CFU/mL, **항세균/항곰팡이 활성: AU/mL
2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

② 고초균 전용 배지

- 배지: 폐배추즙, 폐절임배추즙

- 대상 균주: *B. subtilis* SN7

- 배양 조건: 37°C, 24시간 진탕 배양

- 생균수 측정: 배양액을 serial dilution(10^n)에 의해 희석한 후 TSB agar에 도말하여 30°C에서 배양하여 형성된 colony 수를 계측하여 배양액 1 mL에 해당하는 콜로니 형성단위(colony forming unit, CFU)의 상용로그 값으로 환산하여 표시

- 항균 활성 측정: spot-on-the lawn test 방법으로, 지시균을 도말한 배지위에 항균활성 균주의 농축상징액을 2-fold dilution하여 10 μ L 씩 점적. 활성역가는 항균물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 mL에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU(Arbitrary Unit)/mL로 표시. 농축상징액을 사용한 경우 항균활성은 농축배율에 나누어주어 1×로 환산한 후 AU/mL로 표시.

- 지시균: *B. cereus* KCTC 3624(항세균 활성), *A. ochraceus* PF-2(항곰팡이 활성)

- 폐배추즙 : 폐배추즙 원액과 1/5 희석액에 *B. subtilis* SN7을 각각 배양한 결과, 원액과 희석액 모두 10^7 CFU/mL의 생균수를 나타냈으며 항세균 활성(200 AU/mL)과 항곰팡이 활성(0 AU/mL) 또한 폐배추즙 원액과 1/5 희석액에서 동일한 활성을 보였음(Table 35). 이에 폐배추즙 희석액을 고초균용 폐배추즙 배지C-1로 함.

☞ 폐배추즙 1/5 희석액을 폐배추즙 배지C-1로 함.

- 폐배추즙 배지C-1에 옥수수 추출물(C.S.L)를 첨가한 결과, 첨가 전과 동일하거나 더 낮은 생균수를 나타냈으며 항세균 활성과 항곰팡이 활성 또한 동일하거나 더 낮은 활성을 나타냄. 쌀가루를 첨가한 구간에서도 생육 및 항균활성(항세균/항곰팡이 활성)에 상승효과가 나타나지 않음(Table 36). 그러므로 배지C-1에 옥수수 추출물(C.S.L)과 쌀가루를 첨가하지 않기로 함.

- 폐절임배추즙 : 폐절임배추즙에서의 배양 결과, 원액과 희석액 모두 10^8 CFU/mL로 고초균용 배지(TSB)와 동일한 균수를 나타내었고(Table 35) 이는 폐배추즙 배지보다 10배 높은 생균수임. 그러나 이때 항세균 활성은 전혀 나타나지 않았으며, 항곰팡이 활성은 40 AU/mL으로 측정됨. 희석액과 원액과의 생균수 및 항균활성에 차이가 없었으므로 희석액을 폐절임배추즙 배지D-1으로 함.

☞ 폐절임배추즙 1/5 희석액을 폐절임배추즙 배지D-1로 함.

- 폐절임배추즙 배지D-1에 옥수수 추출물(C.S.L)를 첨가한 배지에서는 첨가 전

생균수(10^8 CFU/mL)보다 100배 낮은 생균수(10^6 CFU/mL)를 나타냈으며 항세균 활성과 항곰팡이 활성에도 영향을 주지 않음. 쌀가루를 첨가한 배지 또한 생육 및 항균활성에 상승효과가 나타나지 않음(Table 36). 그러므로 배지D-1에 옥수수 추출물(C.S.L)과 쌀가루를 첨가하지 않기로 함.

Table 35. 배추폐기물의 희석에 따른 고초균의 생균수 및 항균 활성

배지	성분	생균수 (log CFU/mL)	항세균 활성 (AU/mL)	항곰팡이 활성 (AU/mL)
개발배지C	폐배추즙 원액	7.21±0.15	200	0
C-1	폐배추즙 1/5희석액	7.59±0.26	200	0
개발배지D	폐절임배추즙 원액	8.15±0.15	0	40
D-1	폐절임배추즙 1/5희석액	8.20±0.07	0	40
Control	TSB(고초균용 배지)	8.43±0.20	1,600	640

Table 36. 식용성분별 함량에 따른 고초균의 생균수 및 항균 활성

성분		생균수 (log CFU/mL)	항세균 활성 (AU/mL)	항곰팡이 활성 (AU/mL)
폐배추즙 1/5 희석액	+ C.S.L 0.5%	6.54±0.28	100	0
	+ C.S.L 1.0%	7.21±0.11	200	0
	+ C.S.L 2.0%	7.14±0.24	200	0
	+ 쌀가루 0.5%	6.78±0.26	100	0
	+ 쌀가루 1.0%	7.72±0.09	200	0
	+ 쌀가루 2.0%	7.33±0.11	200	0
폐절임배추즙 1/5 희석액	+ C.S.L 0.5%	6.40±0.26	0	40
	+ C.S.L 1.0%	6.31±0.17	0	40
	+ C.S.L 2.0%	6.32±0.13	0	40
	+ 쌀가루 0.5%	6.97±0.07	0	40
	+ 쌀가루 1.0%	7.41±0.06	0	40
	+ 쌀가루 2.0%	7.32±0.13	0	40

(3) 개발 식용배지에서 항균활성 최적화 및 GRAS 미생물 생육

- 2회 각각의 시료준비 후 각 3반복 실험수행: 평균값 표기(n=6)

(가) 유산균 전용 배지

① 탄소원, 질소원 및 무기염의 최적화

i) 탄소원의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지A-2, 폐절임배추즙 배지B-2
- 조성: 전 단계 개발 배지인 폐배추즙 배지A-2와 폐절임배추즙 배지B-2에 Glucose, Maltose, Fructose, Sucrose를 각각 1~5%(w/v)의 농도로 첨가
- 배양 조건: 30°C, 24시간 정치 배양
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)
- **폐배추즙** : 배지A-2에 탄소원 4종을 1~5% 첨가 후 생균수 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1은 2.3×10^8 CFU/mL~ 4.4×10^8 CFU/mL, HD1은 3.5×10^8 CFU/mL~ 8.4×10^8 CFU/mL, EM은 3.1×10^8 CFU/mL~ 7.6×10^8 CFU/mL로 비슷한 균수를 나타내었음(Figure 35). 항균활성의 경우 Glucose 첨가 구간에서 3 균주(AF1, HD1, EM) 모두 항곰팡이 활성이 160 AU/mL로 첨가전보다 4배 높게 측정되었으며 첨가 농도에 따른(1~5%) 영향은 나타나지 않았음. *Lb. plantarum* AF1의 경우 Sucrose 첨가구에서 Glucose 첨가구간과 동일한 항곰팡이 활성(160 AU/mL)을 나타냄. 항세균 활성은 Fructose, Maltose, Sucrose 첨가 후 세 균주 모두 오히려 더 낮은 역가(80 AU/mL)를 나타내었으며, Glucose(1~5%) 첨가구간에서만 첨가전과 동일한 역가(160 AU/mL)를 나타냄. 이에 Glucose 1%가 가장 적합한 탄소원 농도임을 알 수 있음(Table 37).

☞ **최적 탄소원 농도는 Glucose 1% 첨가구로 이를 폐배추즙 배지A-3로 함.**

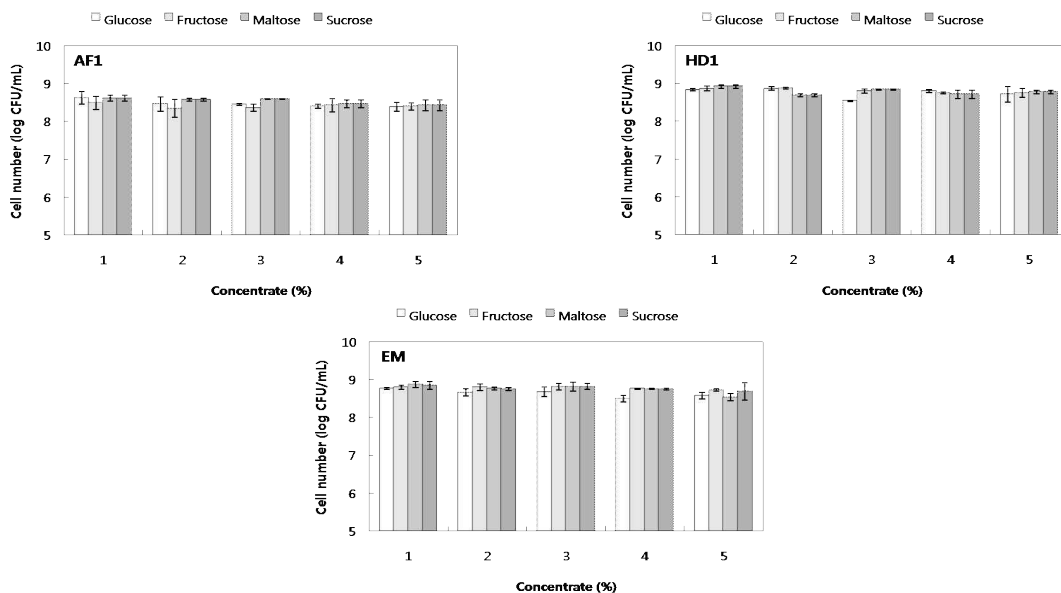


Figure 35. 폐배추즙에 첨가한 탄소원의 종류 및 농도에 따른 유산균의 생육

Table 37. 탄소원의 종류 및 농도에 따른 유산균의 항세균 및 항곰팡이 활성

단위 : AU/mL

		AF1		HD1		EM		배지
		항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	
폐쇄추출 배지A-2		160	40	160	40	160	40	
Glucose	1 %	160	160	160	160	160	160	A-3
	2 %	160	160	160	160	160	160	
	3 %	160	160	160	160	160	160	
	4 %	160	160	160	160	160	160	
	5 %	160	160	160	160	160	160	
Fructose	1 %	80	80	80	80	80	80	
	2 %	80	80	80	80	80	80	
	3 %	80	80	80	80	80	80	
	4 %	80	80	80	80	80	80	
	5 %	80	80	80	80	80	80	
Maltose	1 %	80	80	80	80	80	80	
	2 %	80	80	80	80	80	80	
	3 %	80	80	80	80	80	80	
	4 %	80	80	80	80	80	80	
	5 %	80	80	80	80	80	80	
Sucrose	1 %	80	160	80	80	80	80	
	2 %	80	160	80	80	80	80	
	3 %	80	160	80	80	80	80	
	4 %	80	160	80	80	80	80	
	5 %	80	160	80	80	80	80	
MRS 배지		160	640	160	640	160	640	Con.

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

- 폐쇄추출 : 배지B-2에 탄소원 4종을 1~5%농도로 첨가한 결과, *Lb. plantarum* AF1은 2.6×10^8 CFU/mL~ 6.3×10^8 CFU/mL로, *Lb. plantarum* HD1과 EM은 각각 2.4×10^8 CFU/mL~ 8.3×10^8 CFU/mL, 3.2×10^8 CFU/mL~ 8.0×10^8 CFU/mL로 탄소원의 종류 및 농도에 따른 유산균의 생육효과에는 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었음(Figure 36). 항균활성에서 항곰팡이 활성 확인 결과, 세 균주 모두 Glucose 첨가 후 항곰팡이 활성이 160 AU/mL로 나타났으며 첨가 농도(1-5%)에 따른 차이는 없는 것으로 나타남. 항세균 활성 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1은 Fructose, Maltose, Sucrose(1-5%) 첨가구에서 높은 활성(160 AU/mL)를 나타냈으며 *Lb. plantarum* HD1은 Maltose(1-5%) 첨가구에서 높은 활성(160 AU/mL)를 나타내었음. 그러나 항세균 활성은 4종의 당원 첨가가 배지B-2(160 AU/mL)에서 보다 더 낮거나(80 AU/mL) 같은 정도(160 AU/mL)로 나타남. 즉 당원의 첨가가 기본배지(B-2) 에서보다 더 높은 활성을 나타내지 못함을 알 수 있음(Table 38). 따라서 배지B-2에 Glucose 1%를 첨가한 농도를 항균활성(항곰팡이/항세균)에 최적 농도로 선정함.

☞ 최적 탄소원 농도는 Glucose 1%첨가구로 이를 폐쇄추출 배지B-3로 함.

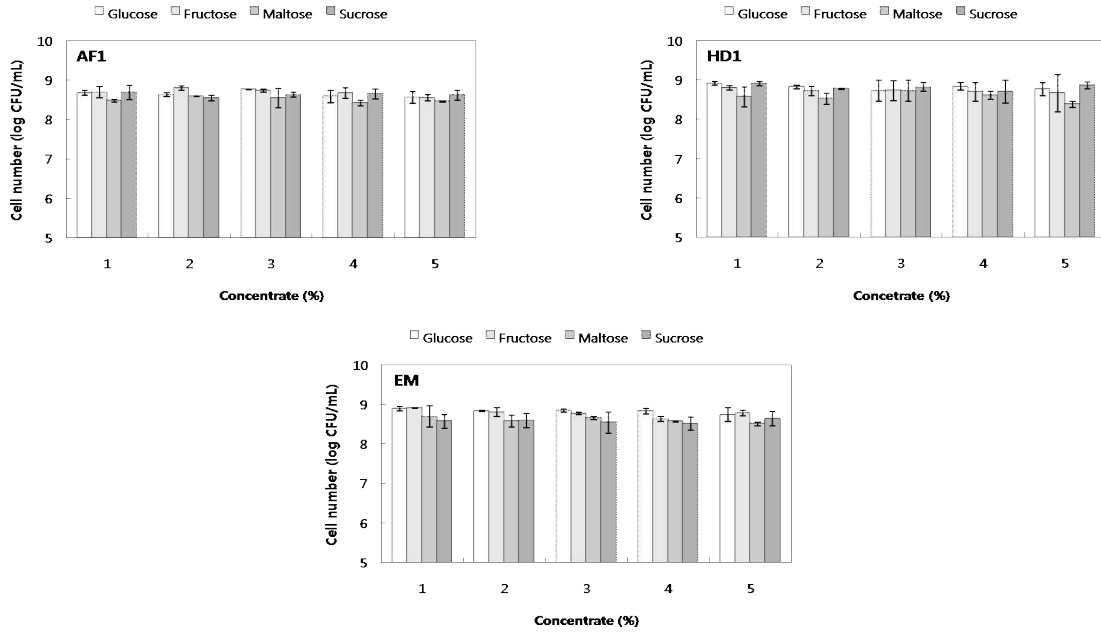


Figure 36. 폐절임배추즙에 첨가한 탄소원의 종류 및 농도에 따른 유산균의 생육

Table 38. 탄소원의 종류 및 농도에 따른 유산균의 항세균 및 항곰팡이 활성

단위 : AU/mL

		AF1		HD1		EM		배지
		항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	
폐절임배추즙 배지 A-2		160	80	160	80	160	160	
Glucose	1 %	160	160	160	160	160	160	B-3
	2 %	160	160	160	160	160	160	
	3 %	160	160	160	160	160	160	
	4 %	160	160	160	160	160	160	
	5 %	160	160	160	160	160	160	
Fructose	1 %	80	160	80	80	80	80	
	2 %	80	160	80	80	80	80	
	3 %	80	160	80	80	80	80	
	4 %	80	160	80	80	80	80	
	5 %	80	160	80	80	80	80	
Maltose	1 %	160	160	80	160	80	80	
	2 %	160	160	80	160	80	80	
	3 %	160	160	80	160	80	80	
	4 %	160	160	80	160	80	80	
	5 %	160	160	80	160	80	80	
Sucrose	1 %	80	160	80	80	80	80	
	2 %	80	160	80	80	80	80	
	3 %	80	160	80	80	80	80	
	4 %	80	160	80	80	80	80	
	5 %	80	160	80	80	80	80	
MRS 배지		160	640	160	640	160	640	Con.

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

② 질소원의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지A-3, 폐절임배추즙 배지B-3
 - 조성: 전 단계 개발배지 폐배추즙 배지A-3과 폐절임배추즙 배지B-3에 질소원으로 소고기 분말, 닭고기분말, 액젓, Tryptone, Peptone, Soytone 등을 1~3%의 농도로 첨가
 - 배양 조건: 30°C, 24시간 정지 배양
 - 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
 - 향균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)
 - **폐배추즙** : 생균수 측정 결과, 세 균주 모두 질소원 첨가에 의한 생균수의 증가는 나타나지 않았음(Figure 37-A). 향균 활성 측정 결과, 질소원의 종류에 따라 첨가 전과 같거나 낮은 활성을 나타냄(Table 39). 본 결과로부터 폐배추즙 배지A-3에 질소원 첨가가 생균수 및 향균 활성에 상승효과를 미치지 않음을 알 수 있음.
 - **폐절임배추즙** : 생균수 측정 결과, 첨가된 질소원의 종류 및 농도와 상관없이 모든 구간에서 동일한 생육활성(약 10^8 CFU/mL)를 나타냄(Figure 37-B). 항세균 활성 측정 결과, 질소원 첨가로 인한 상승효과가 나타나지 않았으며 향균활성이 활성 역시 질소원 첨가로 인한 상승효과가 나타나지 않았음(Table 39).
- ☞ 따라서 이후 개발 배지에 질소원은 첨가하지 않기로 함.

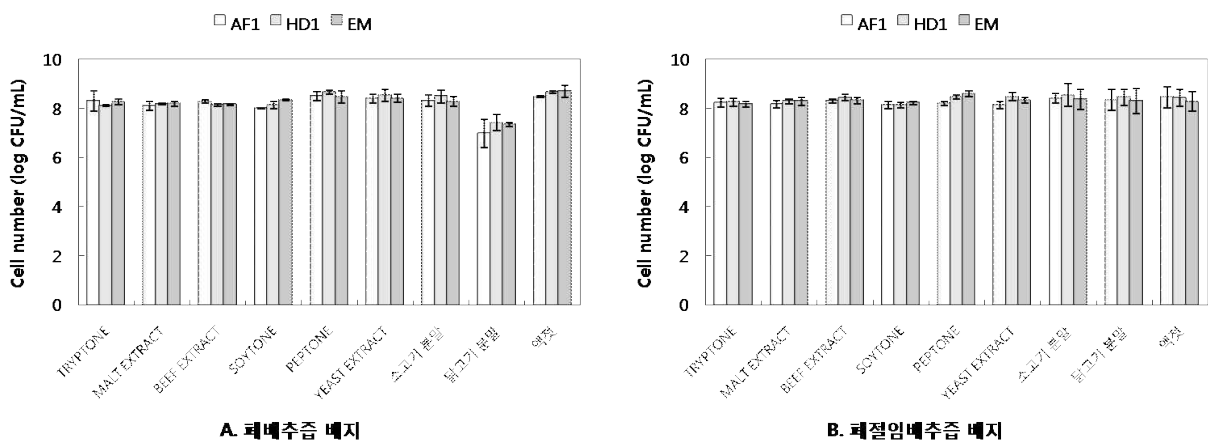


Figure 37. 질소원 첨가에 따른 유산균의 생육

Table 39. 질소원 첨가에 따른 유산균의 항세균 및 항곰팡이 활성

단위 : AU/mL

		AF1		HD1		EM	
		항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이
폐배추즙 배지 A-3		160	160	160	160	160	160
Tryptone	1~2.5%	160	160	160	160	160	160
Malt extract	1~2.5%	80	160	80	160	80	160
Beef extract	1~2.5%	80	80	160	80	80	160
Soytone	1~2.5%	160	160	80	80	160	80
Peptone	1~2.5%	80	80	80	80	80	80
Yeast extract	1~2.5%	160	160	160	80	160	80
소고기 분말	1~2.5%	20	80	20	80	20	80
닭고기 분말	1~2.5%	20	80	20	80	20	80
액젓	1~2.5%	20	80	20	80	20	80
폐절임배추즙 배지 B-3		160	160	160	160	160	160
Tryptone	1~2.5%	160	160	160	160	160	160
Malt extract	1~2.5%	160	160	160	160	160	160
Beef extract	1~2.5%	160	160	160	160	160	160
Soytone	1~2.5%	160	160	80	160	160	160
Peptone	1~2.5%	80	160	160	160	160	160
Yeast extract	1~2.5%	160	160	160	80	160	160
쇠고기 분말	1~2.5%	20	80	40	80	20	80
혼다시	1~2.5%	20	80	20	80	20	80
액젓	1~2.5%	20	80	20	80	20	80
MRS 배지		160	640	160	640	160	640

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

③ 무기염의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지A-3, 폐절임배추즙 배지B-3
- 조성: 전 단계 개발배지인 폐배추즙 배지A-3와 폐절임배추즙 배지B-3에 무기질 Mg (0.005~0.05%), Mn(0.005~0.05%), K(0.005~0.2%), Na-1(0.1~0.5%), Na-2(0.1~0.2%)를 단일 혹은 조합하여 첨가
- 배양 조건: 30°C, 24시간 정지 배양
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 폐배추즙 : 첨가된 5종의 무기질 중 배지A-3에 Mn을 첨가한 배지에서 세 균주 모두 10⁹ CFU/mL로 배지A-3에 비해 10배 높은 생균수를 나타냈으며, 이는 유산균용 배지인 MRS와 동등한 생균수임(Figure 38-A). 또한 항곰팡이 활성 측정 결과, Na-1을 단독으로 첨가한 배지에서 320 AU/mL로 나타났고 Mn과 Na-1를 함께

첨가한 배지에서 640 AU/mL의 항곰팡이 활성을 나타내어 MRS와 동일한 역가를 나타냄. 한편 항세균 활성 측정 결과, 모든 무기질 첨가구간에서 160 AU/mL로 측정되었으며 이는 무기질 첨가전과 동일한 활성임(Table 40).

☞ **최적 무기염은 배지A-3에 Mn+Na-1첨가구로 이를 배지A-4로 함.**

- **폐절임배추즙** : 배지B-3에 Mg, K, Na-1, Na-2를 첨가한 배지에서는 10^9 CFU/mL에 미치지 못하는 생균수가 측정되었으나, Mn을 첨가한 배지에서는 세 균주 모두 10^9 CFU/mL를 나타냄(Figure 38-B). 항곰팡이 활성 측정 결과, Mn과 Na-1을 모두 첨가한 배지에서 640 AU/mL로 가장 높은 활성을 나타냄(Table 40).

☞ **최적 무기염은 배지B-3에 Mn+Na-1첨가구로 이를 배지B-4로 함.**

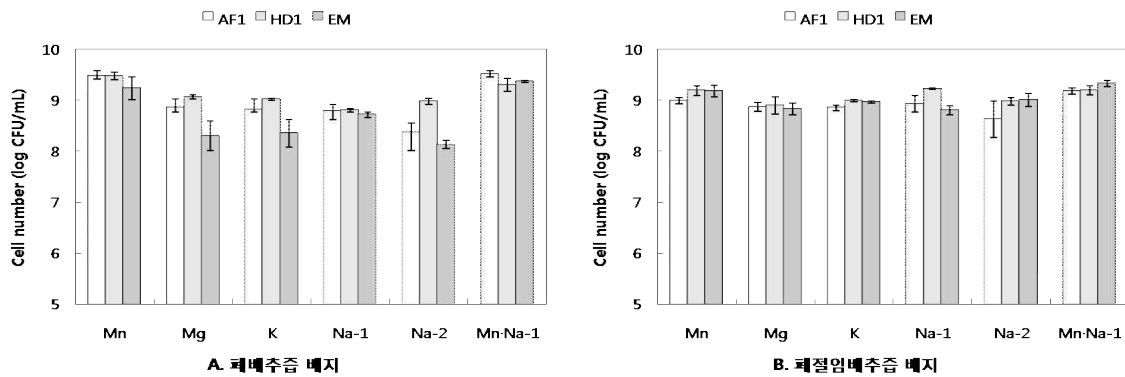


Figure 38. 무기염 첨가에 따른 유산균의 생육 효과

Table 40. 무기염 첨가에 따른 유산균의 항세균 및 항곰팡이 활성

단위 : AU/mL

		AF1		HD1		EM		배지
		항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	항세균	항곰팡이	
폐배추즙 배지 A-3		160	160	160	160	160	160	
Mn	0.005~0.05%	160	160	160	160	160	160	
Mg	0.005~0.05%	160	160	160	160	160	160	
K	0.005~0.2%	160	80	160	80	160	160	
Na-1	0.1~0.5%	160	320	160	320	160	320	
Na-2	0.1~0.2%	160	80	160	80	160	80	
Mn+Na-1	0.005~0.5%	160	640	160	640	160	640	A-4
폐절임배추즙 배지 B-3		160	160	160	160	160	160	
Mn	0.005~0.05%	160	160-320	160	320	160	160-320	
Mg	0.005~0.05%	160	160	160	160	160	160	
K	0.005~0.2%	160	160	160	160	160	160	
Na-1	0.1~0.5%	160	320	160	160	160	320	
Na-2	0.1~0.2%	160	160	160	320	160	160	
Mn+Na-1	0.005~0.5%	160	640	160	640	160	640	B-4
MRS 배지		160	640	160	640	160	640	Control

2회 각각 시료준비로 각 3회 반복 실험: 평균값 표기(n=6)

② 최적화된 개발배지에서 유산균의 생육 및 항균 활성

: 당해연도 개발 유산균주 5종 중 유산균전용 배지 개발에서 우선 적용 대상으로 삼은 3종의 유산균주 외, 당해연도 개발 균주인 2종의 배양 및 항균 활성 측정

- 배지: 폐배추즙 배지A-4, 폐절임배추즙 배지B-4

- 적용 균주: *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM, *Leu. citreum* GR1, *Leu. mesenteroides* TA

- 배양 조건: 30°C, 24시간 정지 배양

- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)































- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)

• 폐배추즙 배지A-4: *Lb. plantarum*은 strain에 관계없이 모두 MRS에서와 동등한 생균수 및 항균활성을 나타냄(Figure 38-A, Table 40). *Leu. citreum* GR1의 배양 결과, MRS와 동일한 생균수(약 10⁹ CFU/mL)와 항곰팡이 활성(32 AU/mL)을 나타냈으나 항세균 활성 (32 AU/mL)은 2배 낮게 나타남. *Leu. mesenteroides* TA의 배양 결과, 약 10⁹ CFU/mL의 생균수를 나타냈으며 이는 MRS 배양 결과 동일한 수치임. 항균 활성 측정 결과, 항세균 활성과 항곰팡이 활성 모두 MRS와 동일한 활성을 나타냄.

• 폐절임배추즙 배지B-4: *Lb. plantarum*은 strain에 관계없이 모두 MRS에서와 동등한 생균수 및 항균활성을 나타냄(Figure 38-B, Table 40). *Leu. citreum* GR1의 배양

결과, MRS와 동일한 생균수(약 10^9 CFU/mL)를 나타냈으나 향균활성은 2배 낮은 역가를 보임. *Leu. mesenteroides* TA의 배양 결과, 생균수(약 10^9 CFU/mL)를 비롯한 항세균 활성(32 AU/mL)과 항곰팡이 활성(32 AU/mL) 모두 MRS와 동일한 수치를 나타냄.

※ 본 연구 개발배지(A-4/B-4)에서 유산균의 생육 및 향균(항세균/항곰팡이)활성

균주	배지	생균수	항세균 활성* (AU/mL)	항곰팡이 활성** (AU/mL)
<i>Lb. plantarum</i> AF1	MRS	2.19×10^9	 160	 640
	A-4	3.36×10^9	 160	 640
	B-4	1.53×10^9	 160	 640
<i>Lb. plantarum</i> HD1	MRS	1.95×10^9	 160	 640
	A-4	2.06×10^9	 160	 640
	B-4	1.58×10^9	 160	 640
<i>Lb. plantarum</i> EM	MRS	2.03×10^9	 160	 640
	A-4	2.37×10^9	 160	 640
	B-4	2.13×10^9	 160	 640
<i>Leu. citreum</i> GR1	MRS	5.00×10^9	 32	 32
	A-4	5.20×10^9	 32	 32
	B-4	5.30×10^9	 32	 16
<i>Leu. mesenteroides</i> TA	MRS	4.50×10^9	 32	 32
	A-4	4.70×10^9	 32	 32
	B-4	5.00×10^9	 32	 32

* 항세균활성 지시균: *Bacillus cereus* KCTC 3624

** 항곰팡이활성 지시균: *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918

☞ 본 연구를 통해 폐배추와 폐절임배추를 이용하여 개발된 유산균용 배지가 *Lactobacillus* 속 뿐만 아니라 *Leuconostoc* 속의 배양과 그 향균활성 물질 생산에도 유효함을 알 수 있음.

③ 배지 pH, 온도 및 시간의 최적화: 향균물질(항세균/항진균) 생산 최적 배양 조건

i) 배지 pH의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지A-4, 폐절임배추즙 배지B-4
- 대상 균주: *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM
Leu. citreum GR1, *Leu. mesenteroides* TA
- pH 범위: pH 4.0~pH 8.0
- 배양 조건: 30°C, 24시간 정치 배양
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 향균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)

- 폐배추즙 배지A-4 : pH 4.0에서 *Lb. plantarum* AF1(7.2×10^8 CFU/mL)과 HD1(4.6×10^8 CFU/mL), EM(7.1×10^8 CFU/mL)은 약 10^8 CFU/mL를 나타내었고 *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA는 약 10^7 CFU/mL를 나타냄. pH 5.0~pH 7.0에서는 5종의 유산균 모두 10^9 CFU/mL 이상의 생균수를 나타냄(Figure 39). 항세균 활성 측정 결과, pH 5.0, 6.0, 7.0구간에서 가장 높은 활성(AF1, HD1, EM: 160 AU/mL, GR1, TA: 32 AU/mL)을 나타내었으며 pH 4.0과 8.0구간에서는 다소 낮아졌음. 항곰팡이 활성 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1과 HD1, EM은 pH 5.0과 pH 6.0구간에서 가장 높은 활성(640 AU/mL)을 나타내었으며 *Leu. citreum* GR1(64 AU/mL)과 *Leu. mesenteroides* TA(32 AU/mL) 또한 동일한 구간에서 가장 높은 항진 활성을 보임. 이로써 5종의 유산균 모두에서 항세균 활성과 항곰팡이 활성이 동시에 최적의 역가를 나타낸 배양 초기 pH 범위는 pH 5.0~6.0으로 보여짐 (Figure 39).

☞ 폐배추즙 배지A-4에 최적 생육 pH를 pH 5.0~pH 6.0으로 결정함.

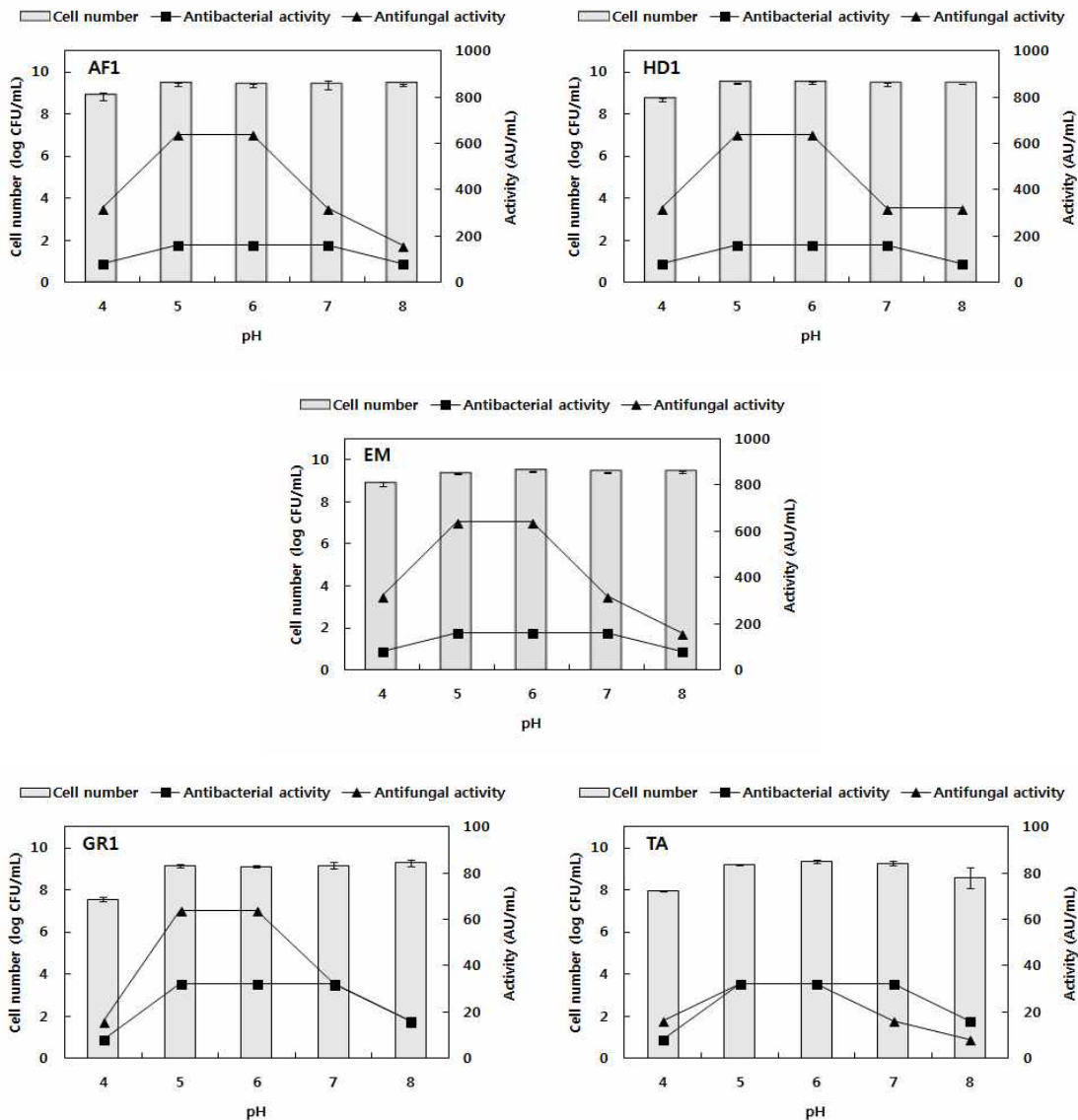


Figure 39. 배지A-4의 초기 pH에 따른 유산균의 생육 효과 및 항균 활성

- 폐절임배추즙 배지B-4 : pH 4.0에서 *Lb. plantarum* AF1(5.0×10^8 CFU/mL)과 HD1 (5.5×10^8 CFU/mL), EM(4.8×10^8 CFU/mL), *Leu. citreum* GR1(3.1×10^8 CFU/mL), *Leu. mesenteroides* TA(5.1×10^7 CFU/mL) 모두 가장 낮은 생균수를 나타내었으며 pH 5.0, pH 6.0에서는 모두 10^9 CFU/mL 이상의 생균수를 나타내었음. 항세균 활성 측정 결과, pH 5.0, 6.0구간에서 유산균 모두 가장 높은 활성(AF1, HD1, EM: 160 AU/mL, GR1, TA: 32 AU/mL)을 나타내었고 항곰팡이 활성 또한 가장 높은 활성(AF1, HD1, EM: 640 AU/mL, GR1: 64 AU/mL, TA: 32 AU/mL)을 나타냄(Figure 40). 이로써 생육 효과 및 항균활성에 최적인 초기 pH 범위는 pH 5.0~ pH 6.0으로 보여짐(Figure 40).

☞ 폐절임배추즙 배지B-4에 최적 생육 pH를 pH 5.0~pH 6.0으로 결정함.

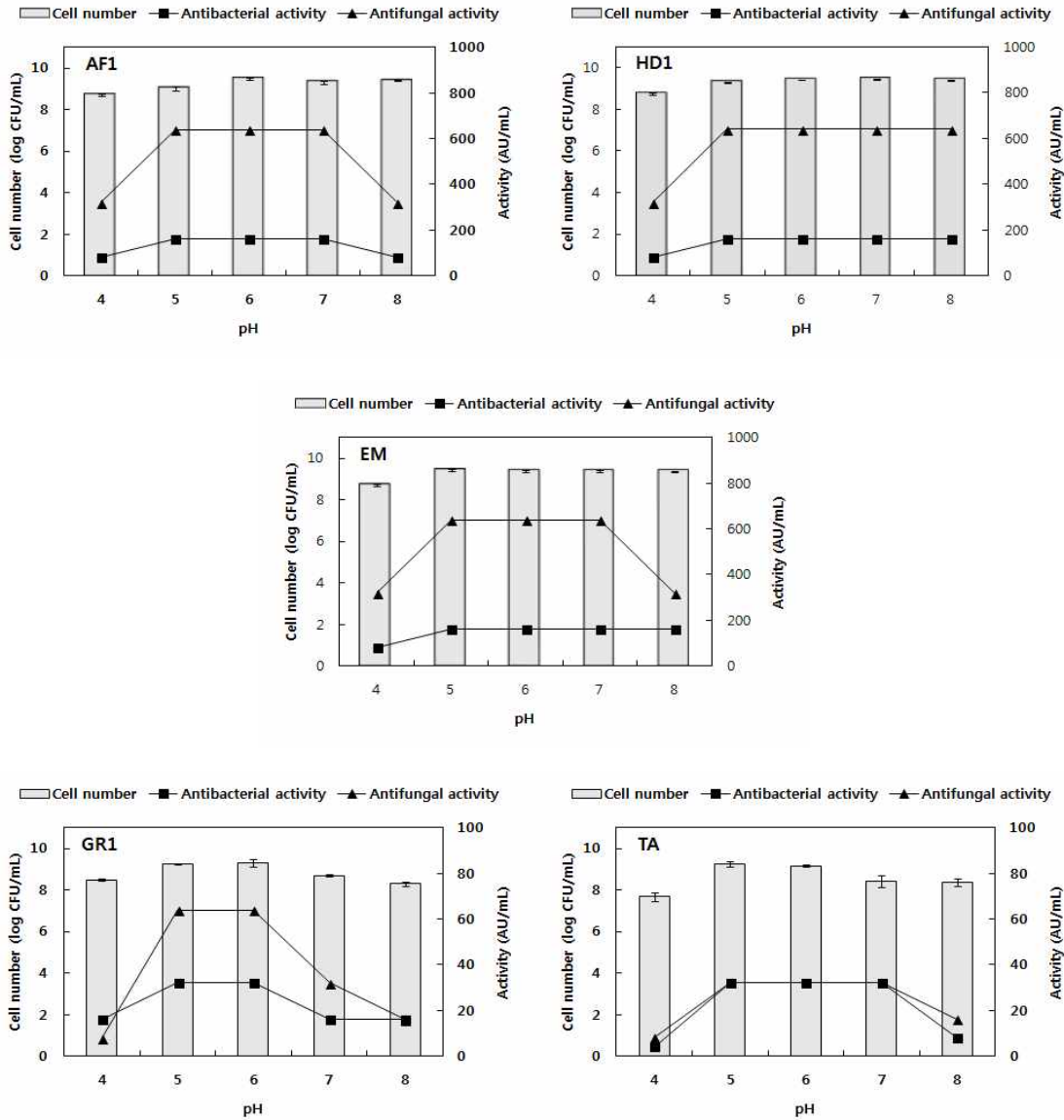


Figure 40. 배지B-4의 초기 pH에 따른 유산균의 생육 효과 및 항균 활성

ii) 배지 온도 및 시간의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지A-4(pH 5.5 ± 0.5), 폐절임배추즙 배지B-4(pH 6.0 ± 1.0)
- 대상 균주: *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM
Leu. citreum GR1, *Leu. mesenteroides* TA
- 배양 온도 및 시간: 28°C, 30°C, 37°C / 0~48시간(6시간 간격으로 측정)
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 폐배추즙 배지A-4 : *Lb. plantarum* AF1은 30°C 배양 결과 24시간에서 생육 정지기에 이르러 최대 항세균 활성(160 AU/mL)과 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를

나타냈으며 48시간까지 유지되었음. 28℃ 배양 시 항세균 활성은 30시간에 160 AU/mL, 항곰팡이 활성은 24시간에 640 AU/mL로 나타남. 37℃ 배양 시 항세균 활성은 18시간에 80 AU/mL, 항곰팡이 활성은 30시간에 640 AU/mL로 나타남(Figure 41).

☞ 이에 *Lb. plantarum* AF1의 최적 배양 온도 및 시간은 30℃, 24시간으로 함.

- *Lb. plantarum* HD1은 28℃ 배양 결과 18시간에 생육정지기에 이르러 최대 항세균 활성(160 AU/mL)과 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타냄. 30℃ 배양 시 18시간에 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타내지만 항세균 활성은 24시간에 최대 활성(160 AU/mL)을 나타냄. 37℃에서는 24시간에 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)을 나타냈으며 항세균 활성은 24시간 이후 80 AU/mL로 유지되었음(Figure 42).

☞ 이에 *Lb. plantarum* HD1의 최적 배양 온도 및 시간은 28℃, 18시간으로 함.

- *Lb. plantarum* EM은 28℃ 배양 결과 24시간에 생육정지기에 이르렀으며 최대 항세균 활성(160 AU/mL)과 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타냄. 30℃ 배양에서도 28℃와 비슷한 패턴의 생육도와 항균(항세균/항곰팡이)활성을 나타냄. 37℃에서는 18시간에 생육정지기에 이르렀으며 30시간에 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타냈으나 항세균 활성은 배양 48시간까지 20 AU/mL 이상 증가하지 않음(Figure 43).

☞ 이에 *Lb. plantarum* EM의 최적 배양 온도 및 시간은 28~30℃, 24시간으로 함.

- *Leu. citreum* GR1은 28℃ 배양 결과 18시간에 생육정지기에 이르렀으며 항균활성 측정 결과, 항세균 활성을 24시간에 최대 활성(32 AU/mL)을 나타내었고 항곰팡이 활성은 30시간에 최대 활성(64 AU/mL)을 나타냄. 30℃ 배양에서는 24시간에 최대 항곰팡이(64 AU/mL)활성과 항세균(32 AU/mL)활성을 나타냄. 37℃에서는 생균수가 최대 4.6×10^7 CFU/mL로 생육이 정상적으로 이루어지지 않음(Figure 44).

☞ 이에 *Leu. citreum* GR1의 최적 배양 온도 및 시간은 30℃, 24시간으로 함.

- *Leu. mesenteroides* TA는 28℃ 배양 결과 약 18시간에 생육정지기에 이르러 48시간 후에는 약 10^7 CFU/mL로 나타남. 항세균 활성과 항곰팡이 활성 측정 결과, 28℃에서는 각각 24시간, 18시간에 최대가 되었으며 30℃에서는 각각 24시간, 12시간에 최대 활성을 나타냄. 37℃에서는 24시간에 생육이 정상적으로

이루어지지 않아 항세균 활성과 항곰팡이 활성이 최대치에 이르지 못함(Figure 45).

☞ 이에 *Leu. mesenteroides* TA의 최적 배양 온도 및 시간은 30°C, 24시간으로 함.

※ 개발배지 A-4에서의 유산균(AF1, HD1, EM)의 최적 배양 조건

적용 균주	최적 배양 온도	최적 배양 시간	최적 배양 pH
<i>Lb. plantarum</i> AF1	30°C	24시간	pH 5.0~pH 6.0
<i>Lb. plantarum</i> HD1	28°C	18시간	pH 5.0~pH 6.0
<i>Lb. plantarum</i> EM	28~30°C	24시간	pH 5.0~pH 6.0
<i>Leu. citreum</i> GR1	30°C	24시간	pH 5.0~pH 6.0
<i>Leu. mesenteroides</i> TA	30°C	24시간	pH 5.0~pH 6.0

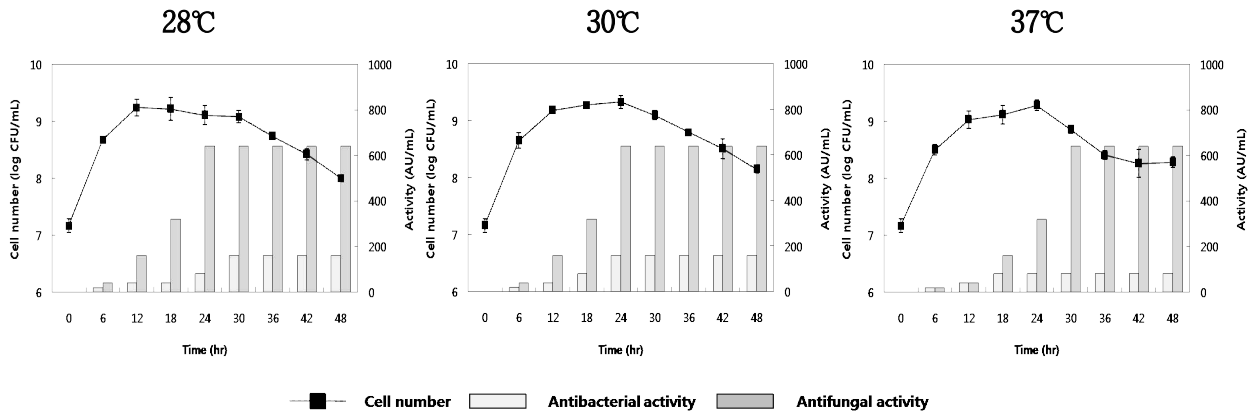


Figure 41. 배지A-4에서 *Lb. plantarum* AF1의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

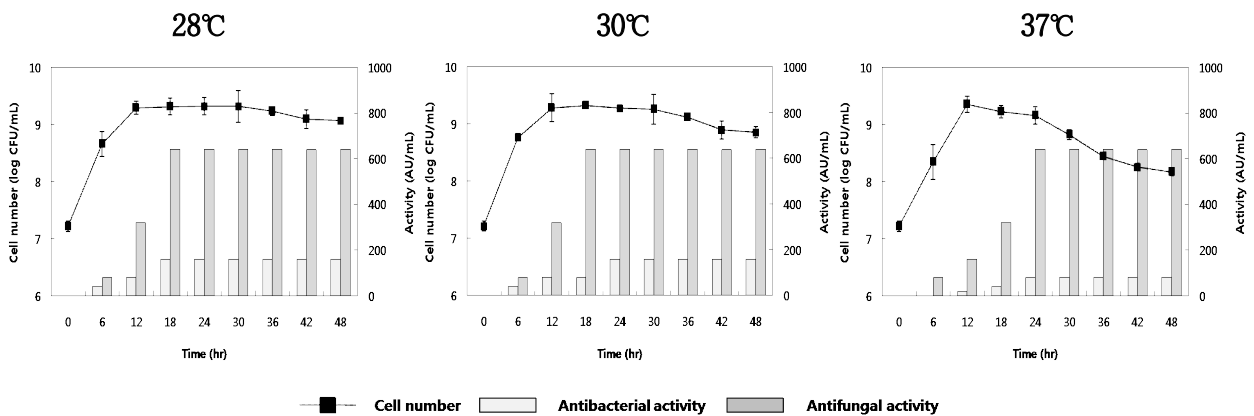


Figure 42. 배지A-4에서 *Lb. plantarum* HD1의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

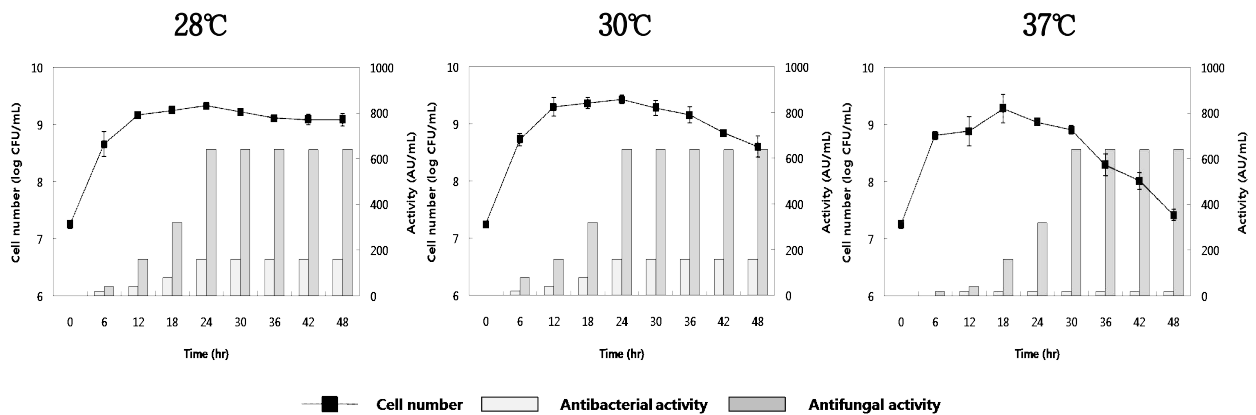


Figure 43. 배지A-4에서 *Lb. plantarum* EM의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

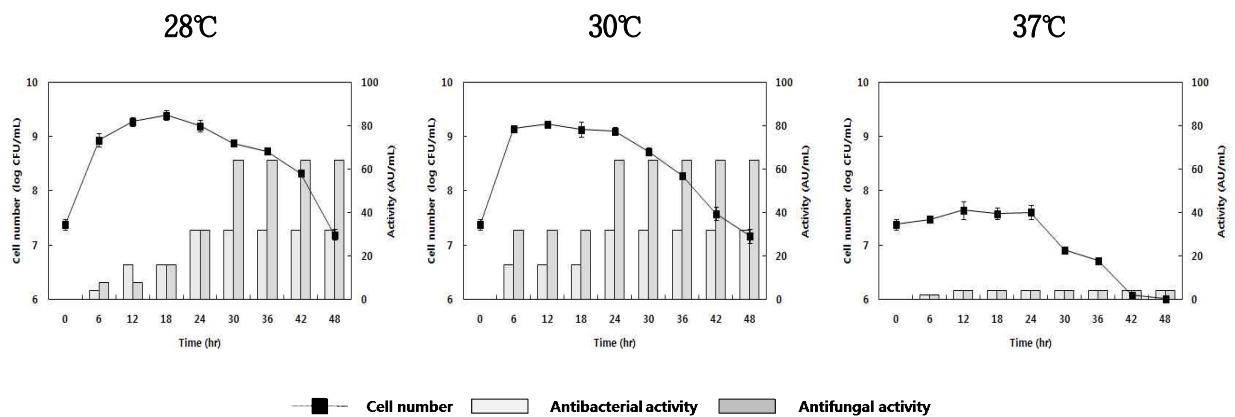


Figure 44. 배지A-4에서 *Leu. citreum* GR1의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

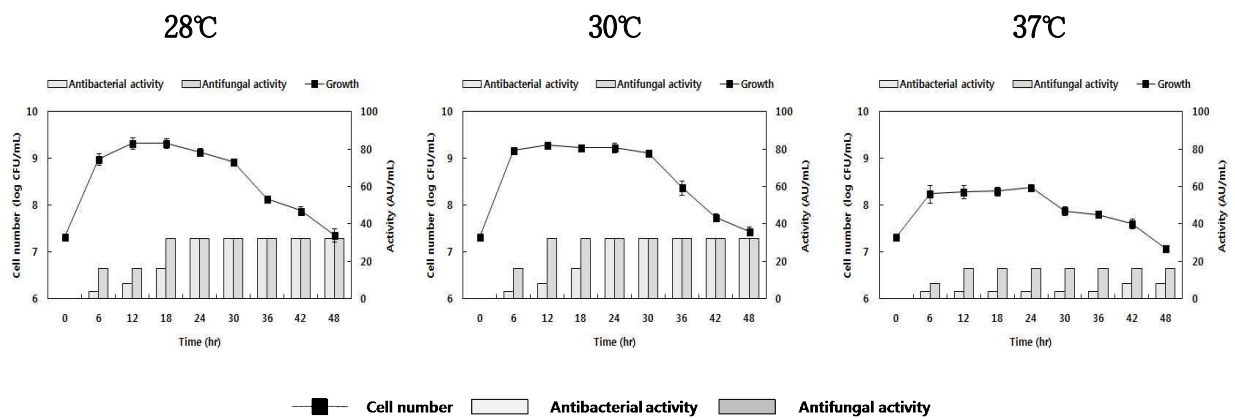


Figure 45. 배지A-4에서 *Leu. mesenteroides* TA의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

- 폐절임배추즙 배지B-4 : *Lb. plantarum* AF1은 30℃ 배양 결과, 24시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성은 18시간(160 AU/mL)에 항곰팡이 활성은 24시간(640 AU/mL)에 최대에 이르러 48시간까지 유지되었음. 28℃ 배양 시에는 항세균 활성과 항곰팡이 활성 모두 24시간(160 AU/mL, 640 AU/mL)에 최대를 나타냄. 37℃ 배양 시 18시간에 생육정지기에 이르러 30시간 이후 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)을 나타냈으나 항세균 활성은 40 AU/mL에 머뭇 (Figure 46).

☞ 이에 *Lb. plantarum* AF1의 최적 배양 온도 및 시간은 28~30℃, 24시간으로 함.
- *Lb. plantarum* HD1은 28℃ 배양 결과, 18시간에 생육정지기에 이르렀으며 항세균 활성은 24시간(160 AU/mL)에 항곰팡이 활성은 18시간(640 AU/mL)에 최대를 나타냄. 30℃ 배양 시에도 28℃와 비슷한 패턴의 생육도 및 항균활성을 나타내었음(Figure 26). 37℃ 배양 시 6시간에 최대 생육도(9.1×10^8 CFU/mL)를 나타낸 뒤 점차 감소하였고 항곰팡이 활성은 24시간(640 AU/mL)에 최대 활성을 나타냄. 그러나 항세균 활성은 배양 48시간 이내에 최대 활성인 160 AU/mL에 미치지 못함(Figure 47).

☞ 이에 *Lb. plantarum* HD1의 최적 배양 온도 및 시간은 28~30℃, 24시간으로 함.
- *Lb. plantarum* EM은 30℃ 배양 결과, 18시간에 생육정지기에 이르러 최대 항균활성(항곰팡이 활성: 640 AU/mL, 항세균 활성: 160 AU/mL)을 나타냄. 28℃ 배양 시 18시간에 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)을 나타냈으나 항세균 활성은 24시간(160 AU/mL)이 되어서야 최대 활성을 나타냄. 37℃ 배양 시에는 12시간에 생육정지기에 이르러 30시간(640 AU/mL)에 최대 항곰팡이 활성을 보임. 그러나 항세균활성은 배양 48시간까지 최대 활성(160 AU/mL)에 미치지 못함(Figure 48).

☞ 이에 *Lb. plantarum* EM의 최적 배양 온도 및 시간은 30℃, 24시간으로 함.
- *Leu. citreum* GR1은 30℃ 배양 결과, 18시간에 생육정지기에 이르렀으며 배양 24시간만에 최대 항세균 활성(32 AU/mL)과 항곰팡이 활성(64 AU/mL)를 나타냄. 28℃ 배양 결과, 30시간만에 최대 항균활성을 나타내었으며 37℃ 배양 결과, 항세균 활성과 항곰팡이 활성이 각각 4 AU/mL, 8 AU/mL로 최대값에 이르지 못함(Figure 49).

☞ 이에 *Leu. citreum* GR1의 최적 배양 온도 및 시간은 30℃, 24시간으로 함.
- *Leu. mesenteroides* TA는 30℃ 배양 결과, 18시간에 생육정지기에 이르렀으며 최대 항세균 활성(32 AU/mL)와 최대 항곰팡이 활성(32 AU/mL)를 나타냄. 28℃ 배양시에는 저장 24시간만에 최대 항세균 활성과 항곰팡이 활성을 나타내었으며 37℃ 배양시에는 저장 48시간까지 항세균 활성과 항곰팡이 활성이 각각 8

AU/mL로 최대값이 이르지 못함(Figure 50).

☞ 이에 *Leu. mesenteroides* TA의 최적 배양 온도 및 시간은 30°C, 18시간으로 함.

※ 개발배지 B-4에서의 유산균(AF1, HD1, EM)의 최적 배양 조건

적용 균주	최적 배양 온도	최적 배양 시간	최적 배양 pH
<i>Lb. plantarum</i> AF1	28~30°C	24시간	pH 5.0~pH 7.0
<i>Lb. plantarum</i> HD1	28~30°C	18시간	pH 5.0~pH 7.0
<i>Lb. plantarum</i> EM	30°C	24시간	pH 5.0~pH 7.0
<i>Leu. citreum</i> GR1	30°C	24시간	pH 5.0~pH 7.0
<i>Leu. mesenteroides</i> TA	30°C	18시간	pH 5.0~pH 7.0

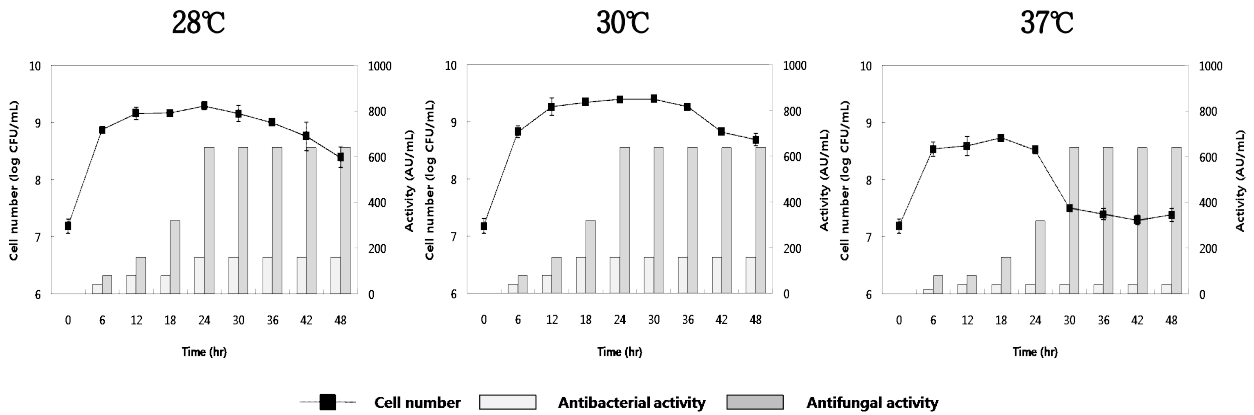


Figure 46. 배지B-4에서 *Lb. plantarum* AF1의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

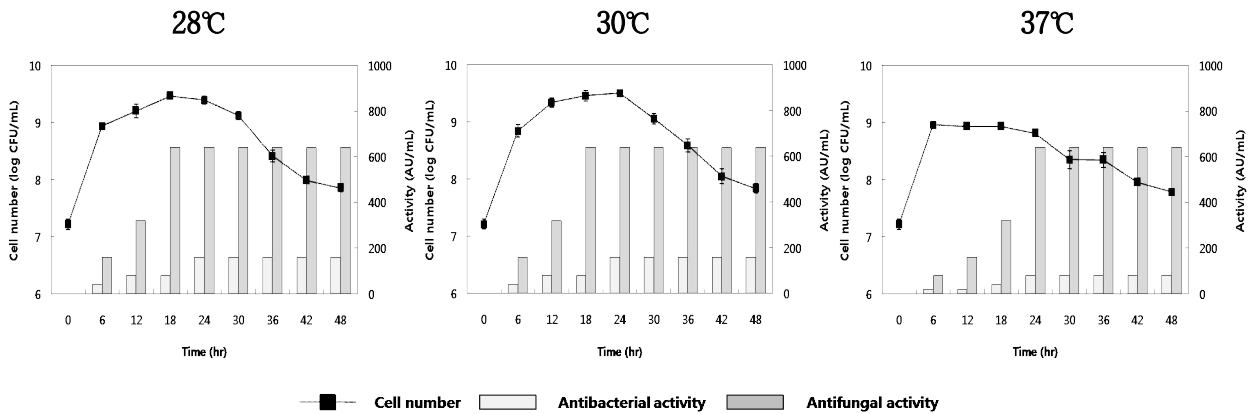


Figure 47. 배지B-4에서 *Lb. plantarum* HD1의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

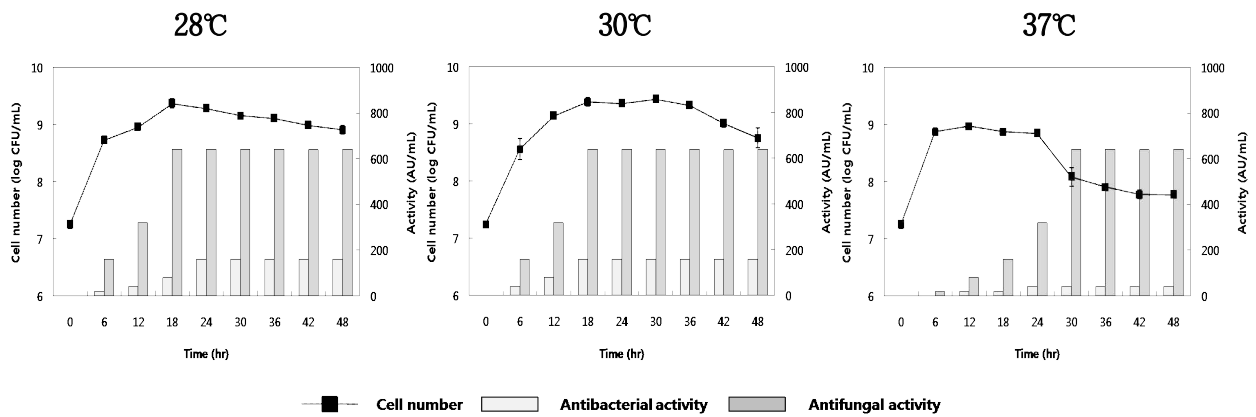


Figure 48. 배지B-4에서 *Lb. plantarum* EM의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

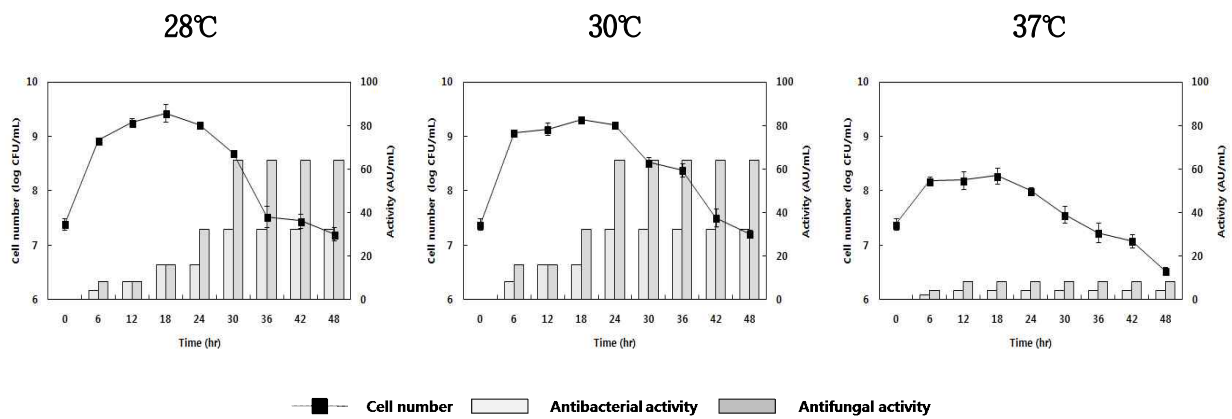


Figure 49. 배지B-4에서 *Leu. citreum* GR1의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

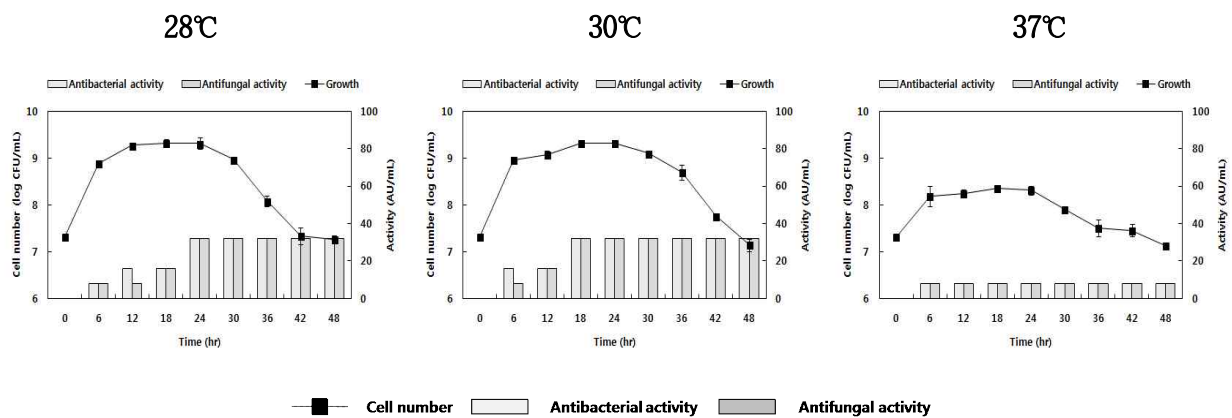


Figure 50. 배지B-4에서 *Leu. mesenteroides* TA의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

(나) 고초균 전용 배지

① 탄소원, 질소원 및 무기염의 최적화

i) 탄소원의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지C-1, 폐절임배추즙 배지D-1
- 조성: 전 단계 개발배지 폐배추즙 배지C-1과 폐절임배추즙 배지D-1에 Glucose, Maltose, Fructose, Sucrose를 각각 1~5%(w/v)의 농도로 첨가
- 배양 조건: 37°C, 24시간 진탕 배양
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)

• **폐배추즙** : 생균수 측정 결과, Fructose(1~5%)첨가구에서는 1.5×10^6 CFU/mL ~ 1.9×10^6 CFU/mL, Sucrose(1~5%)첨가구에서는 3.0×10^7 CFU/mL ~ 9.6×10^7 CFU/mL, Maltose(1~5%)첨가구에서는 3.3×10^5 CFU/mL ~ 9.0×10^5 CFU/mL로 나타났으며 Glucose(1~5%)첨가구에서는 1.3×10^8 CFU/mL ~ 2.9×10^8 CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타냄(Figure 51-A). 이는 고초균 전용 배지인 TSB와 동일한 균수이며 전 단계의 개발 배지C-1보다 10배 많은 생균수임. 항세균 활성 측정 결과, Glucose(1~5%) 첨가구에서 800 AU/mL로 가장 높은 활성을 나타냄(Table 41).

☞ **최적 탄소원 농도는 Glucose 1%첨가구로 이를 폐배추즙 배지C-2로 함.**

• **폐절임배추즙** : 생균수 측정 결과, 탄소원의 종류나 농도에 상관없이 모두 약 10^8 CFU/mL로 나타남(Figure 51-B). 항세균 활성은 Glucose(1~5%)와 Sucrose(1~5%) 첨가시 세 균주 모두 가장 높은 활성(800 AU/mL)를 나타냈으며 항곰팡이 활성은 Glucose(1~5%) 첨가 시 TSB(640 AU/mL)와 동일한 활성을 보임(Table 41).

☞ **최적 탄소원 농도는 Glucose 1%첨가구로 이를 폐절임배추즙 배지D-2로 함.**

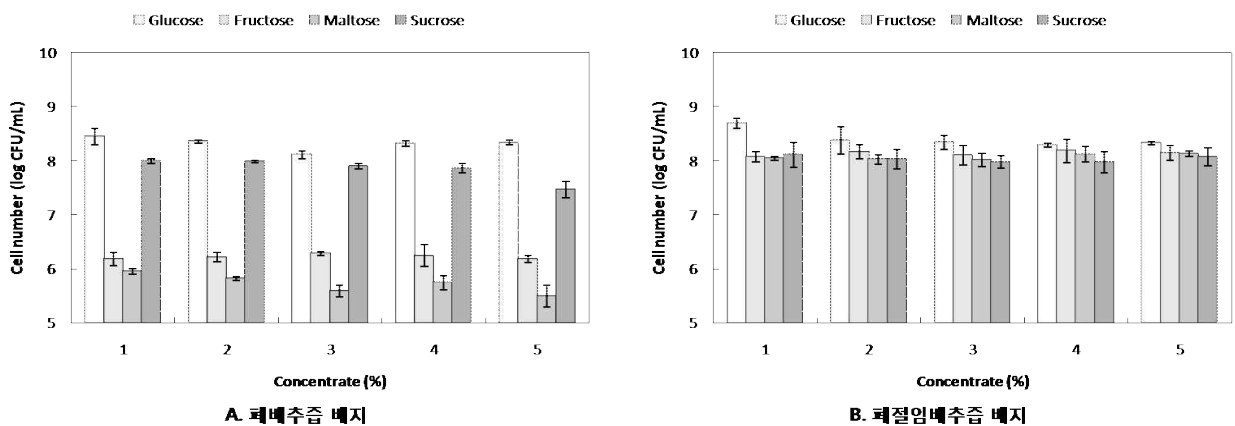


Figure 51. 탄소원의 종류 및 농도에 따른 *B. subtilis* SN7의 생육 효과

Table 41. 탄소원의 종류 및 농도에 따른 *B. subtilis* SN7의 항세균 및 항곰팡이 활성

단위 : AU/mL

		항세균 활성	항곰팡이 활성	배지
폐배추즙 배지 C-1		200	0	
Glucose	1~5 %	800	320	C-2
Fructose	1~5 %	400	160	
Maltose	1~5 %	200	160	
Sucrose	1~5 %	800	320	
폐절임배추즙 배지 D-1		0	40	
Glucose	1~5 %	800	640	D-2
Fructose	1~5 %	200	320	
Maltose	1~5 %	400	320	
Sucrose	1~5 %	800	320	
TSB 배지		1,600	640	Control

ii) 질소원의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지C-2, 폐절임배추즙 배지D-2
- 조성: 전 단계 개발배지 폐배추즙 배지C-2와 폐절임배추즙 배지D-2에 질소원으로 Malt extract, Peptone, Tryptone, Yeast extract 등을 1~2% 농도로 첨가
- 배양 조건: 37°C, 24시간 진탕 배양
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)
- **폐배추즙:** 질소원 첨가에 따른 생육의 증가는 나타나지 않았으며(Figure 52-A), 소고기 분말(약 1.6×10^6 CFU/mL)이나 닭고기 분말(약 2.4×10^6 CFU/mL)시 오히려 감소하였음. 항세균 활성 측정 결과, Soytone을 첨가한 배지에서 1,600 AU/mL로 가장 높은 증가율을 나타냈으며 Tryptone, Peptone, Yeast extract, 소고기 분말, 닭고기 분말을 첨가한 배지에서는 활성을 나타내지 않음(Table 42). 한편 항곰팡이 활성은 Malt extract 첨가구에서 640 AU/mL로 가장 높은 증가율을 나타내었고, Soytone과 Tryptone은 첨가 전·후 동일한 역가(320 AU/mL)를 나타냈지만, 이를 제외한 나머지 질소원 첨가구에서는 항곰팡이 활성이 다소 감소하는 경향을 보임.
- **폐절임배추즙:** 폐절임배추즙 배지 또한 질소원에 의한 생육 증가 효과는 나타나지 않았으며(Figure 52-B), 항균 활성 역시 활성이 완전히 사라지거나 감소하는 경향을 나타냄(Table 42). 이에 폐절임배추즙 배지D-2에는 질소원을 첨가하지 않기로 함.

배지C-2와 배지D-2에 질소원 첨가에 따라 항세균 활성, 항곰팡이 활성이 동시에 상승하는 질소원 조성물이 없어 질소원은 첨가하지 않기로 함.

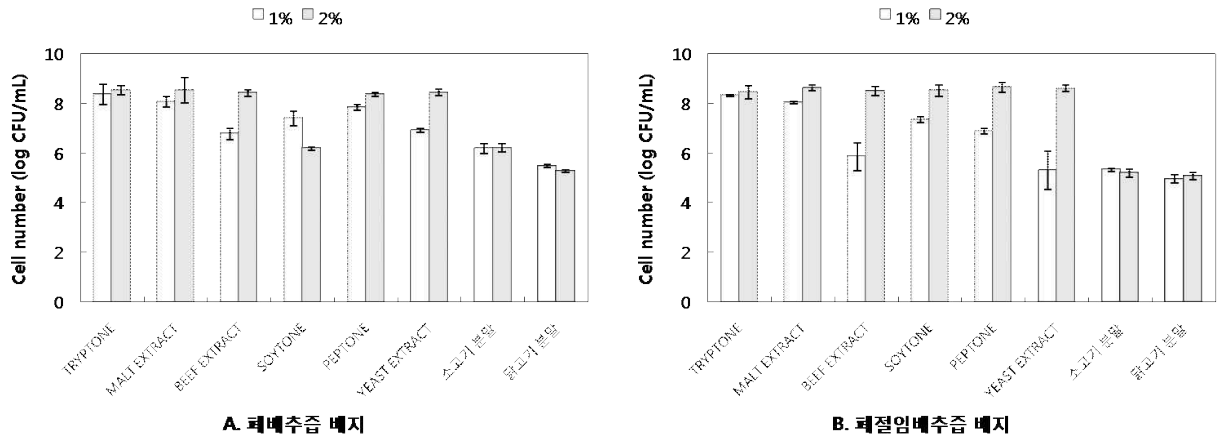


Figure 52. 질소원의 종류 및 농도에 따른 *B. subtilis* SN7의 생육 효과

Table 42. 질소원의 종류 및 농도에 따른 *B. subtilis* SN7의 항세균 및 항곰팡이 활성

단위 : AU/mL

		항세균 활성	항곰팡이 활성
폐배추즙 배지 C-2		800	320
Tryptone	1~2%	0	320
Malt extract	1~2%	200	640
Beef extract	1~2%	100	0
Soytone	1~2%	1,600	320
Peptone	1~2%	0	160
Yeast extract	1~2%	0	0
소고기 분말	1~2%	0	0
닭고기 분말	1~2%	0	0
폐절임배추즙 배지 D-2		800	640
Tryptone	1~2%	0	0
Malt extract	1~2%	0	640
Beef extract	1~2%	200	20
Soytone	1~2%	0	0
Peptone	1~2%	200	160
Yeast extract	1~2%	0	0
소고기 분말	1~2%	0	0
닭고기 분말	1~2%	0	0
TSB 배지		1,600	640

iii) 무기염의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지C-2, 폐절임배추즙 배지D-2
- 조성: 전 단계 개발배지인 폐배추즙 배지A-3와 폐절임배추즙 배지B-3에 무기질 Mg(0.005~0.05%), Mn(0.005~0.05%), K(0.005~0.2%), Na-1(0.1~0.5%), Na-2(0.1~0.2%) 를 단일 혹은 조합하여 첨가
- 배양 조건: 37°C, 24시간 진탕 배양
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 폐배추즙: 무기염을 첨가한 모든 구간에서 약 10^8 CFU/mL의 생균수를 나타냈으며 그중 Mn 첨가구에서 가장 높은 생균수(5.6×10^8 CFU/mL)를 나타냄. 항곰팡이 활성 측정 결과, Mn과 Na-1 단독 첨가구에서 640~1,280 AU/mL를 나타냄. 항세균 활성 측정 결과, Na-1 첨가구에서 800~1,600 AU/mL로 나타냄. Mn+Na-1 첨가구에서 가장 높은 항세균 활성(1,600 AU/mL)과 항곰팡이 활성(1,280 AU/mL)을 나타냈으며 이는 고초균용 배지(TSB)와 동등한 항세균 활성, 2배 강한 항곰팡이 활성임(Table 43).

☞ 최적 무기염은 배지C-2에 Mn+Na-1첨가구로 배지C-3으로 함.

- 폐절임배추즙: 무기염 첨가구간에서 모두 약 10^8 CFU/mL의 생균수를 나타냈으며 Mn과 Na-2의 단독 첨가구간에서 1,280~2,560 AU/mL의 항곰팡이 활성을 나타냄. Mn과 Na-2를 함께 첨가구간에서 항세균 활성 1,600 AU/mL, 항곰팡이 활성 2,560 AU/mL로 TSB에서 나타난 활성과 동등한 항세균 활성을 나타냈으며, 4배 강한 항곰팡이 활성을 나타냄(Table 43).

☞ 최적 무기염은 배지D-2에 Mn+Na-2첨가구로 배지D-3으로 함.

Table 43. 무기염 첨가에 따른 *B. subtilis* SN7의 생균수, 항세균 및 항곰팡이 활성

		생균수 (CFU/mL)	항세균 활성 (AU/mL)	항곰팡이 활성 (AU/mL)	배지
폐배추즙 배지 C-2		2.93×10^8	800	640	
Mn	0.005~0.05%	5.56×10^8	800	640~1,280	
Mg	0.005~0.05%	2.30×10^8	400	640	
K	0.005~0.05%	2.70×10^8	200	640	
Na-1	0.03~0.5%	2.20×10^8	800~1,600	640~1,280	
Na-2	0.03~0.2%	1.56×10^8	800	640	
Mn+Na-1	0.005~0.5%	3.50×10^8	1,600	1,280	C-3
폐절임배추즙 배지 D-2		5.00×10^8	800	640	
Mn	0.005~0.05%	4.00×10^8	800	1,280~2,560	
Mg	0.005~0.05%	2.60×10^8	800	1,280	
K	0.005~0.05%	2.50×10^8	400	1,280	
Na-1	0.03~0.5%	2.20×10^8	200	640	
Na-2	0.03~0.2%	2.40×10^8	200	1,280~2,560	
Mn+Na-2	0.005~0.5%	4.03×10^8	1,600	2,560	D-3
TSB 배지		2.50×10^8	1,600	640	Control

② 배지 pH, 온도 및 시간의 최적화: 항균물질(항세균/항진균) 생산 최적 배양 조건

i) 배지 pH의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지C-3, 폐절임배추즙 배지D-3
- 대상 균주: *B. subtilis* SN7
- pH 범위: pH 5.0~pH 9.0
- 배양 조건: 37°C, 24시간 진탕 배양
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 폐배추즙 배지C-3: pH 5.0에서 1.8×10^5 CFU/mL로 가장 낮은 생육 활성을 나타냈으며 그 외 구간에서는 약 10^8 CFU/mL으로 나타남. 항세균 활성 측정 결과, pH 5.0에서는 활성을 나타내지 않았고 pH 6.0~pH 8.0에서 가장 높은 활성(1,600 AU/mL)을 나타냄. 항곰팡이 활성 측정 결과, pH 6.0과 pH 7.0에서 가장 높은 활성(1,280 AU/mL)을 나타냄(Figure 53-A).

☞ 폐배추즙 배지C-3에 최적 생육 pH를 pH 6.0~pH 7.0으로 결정함.

- 폐절임배추즙 배지D-3: 초기 pH에 따른 생균수를 측정한 결과, 전 구간에서 10^8 CFU/mL로 비슷한 수치를 보임(Figure 53-B). 항세균 활성 측정 결과, pH 6.0과 pH 7.0 구간에서 가장 높은 항세균 활성(1,600 AU/mL)을 보여주었으며 항곰팡이 활성 또한 이 구간에서 가장 높게 측정됨(2,560 AU/mL).

☞ 폐절임배추즙 배지D-4에 최적 생육 pH를 pH 6.0~pH 7.0으로 결정함.

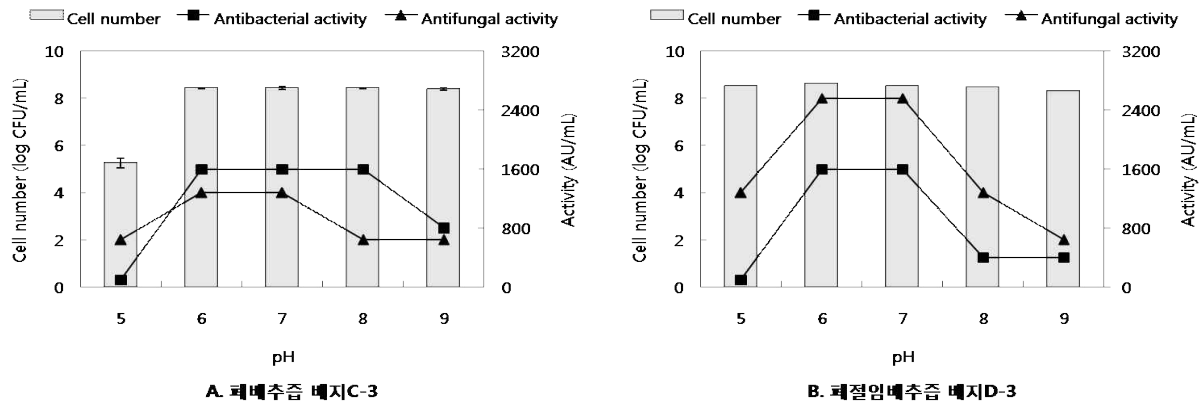


Figure 53. 초기 pH에 따른 *B. subtilis* SN7의 생육 효과 및 항균 활성

ii) 배지 온도 및 시간의 최적화

- 배지: 폐배추즙 배지C-3(pH 6.5 ± 0.5), 폐절임배추즙 배지D-3(pH 6.5 ± 0.5)
- 대상 균주: *B. subtilis* SN7
- 배양 온도 및 시간: 30°C, 37°C / 0~48시간(6시간 간격으로 측정)
- 생균수 측정: 상기 방법과 동일(p. 94)
- 항균 활성 지시균: 상기 방법과 동일(p. 94)

- 폐배추즙 배지C-3: 30°C 배양 결과, 12시간에 10^8 CFU/mL에 도달하였으나 항균활성은 48시간 이내 최대 활성에 도달하지 못함(Figure 54). 37°C 배양 결과, 12시간에 10^8 CFU/mL의 생균수를 나타내었으며 항세균 활성은 배양 24시간에 최대 활성인 1,600 AU/mL를 나타냄. 항곰팡이 활성은 배양 18시간에 640 AU/mL로 TSB와 동일한 역가를 나타내었으며 이후 감소하였음.

☞ 이에 *B. subtilis* SN7의 최적 배양 온도와 시간은 37°C, 24시간으로 함.

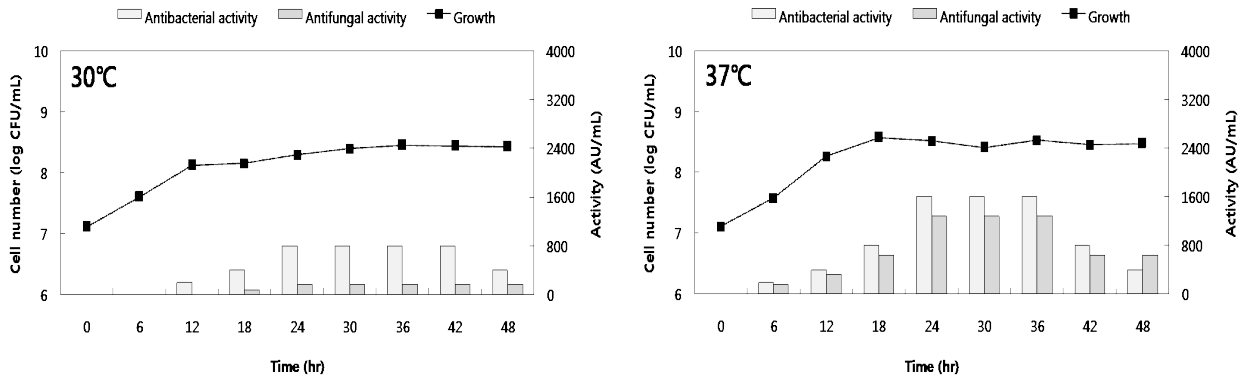


Figure 54. 배지C-3에서 *B. subtilis* SN7의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

- 폐절임배추즙 배지D-3: 30°C 배양 시 24시간에 최대 생균수인 10^8 CFU/mL에 도달하였으며 항세균 활성은 400 AU/mL(30시간) 이상 증가하지 않음. 항곰팡이 활성 또한 640 AU/mL(30~48시간) 이상 증가하지 않음(Figure 55). 37°C 배양 결과, 배양 12시간에 최대 생균수를 나타냈으며 항세균 활성은 배양 24시간에 1,600 AU/mL를 나타내었고 48시간 이후 800 AU/mL로 감소함. 항곰팡이 활성은 배양 12시간에 TSB와 동일한 역가(640 AU/mL)를 나타냈으며 배양 24시간 이후에는 TSB에서의 4배에 달하는 역가(2,560 AU/mL)을 나타냄.

☞ 이에 *B. subtilis* SN7의 최적 배양 온도 및 시간은 37°C, 24시간으로 함.

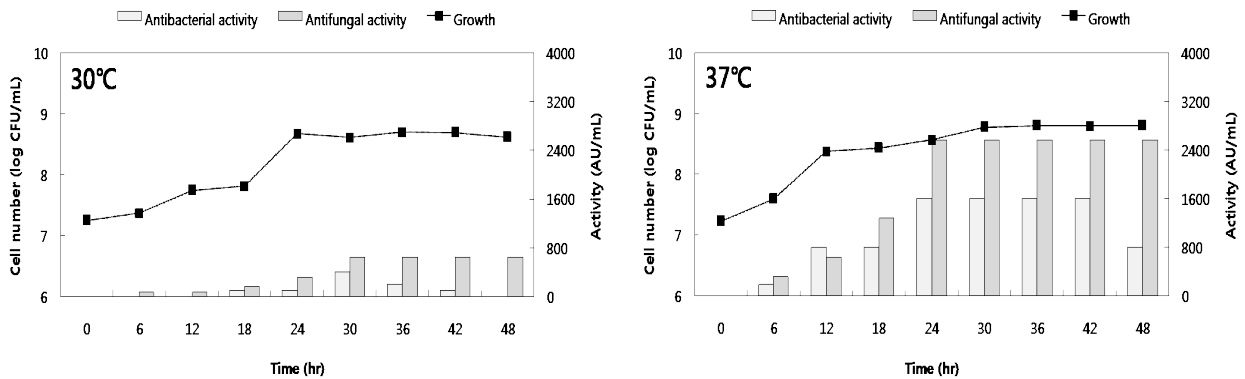


Figure 55. 배지D-3에서 *B. subtilis* SN7의 온도에 따른 생육 곡선 및 항균 활성

※ 개발배지 C-3, D-3에서의 고초균(SN7)의 최적 배양 조건

배 지	최적 배양 온도	최적 배양 시간	최적 배양 pH
폐배추즙 배지C-3	37°C	24시간	pH 6.0~pH 7.0
폐절임배추즙 배지D-3	37°C	24시간	pH 6.0~pH 7.0

나. 개발 식용배지에서 천연항균소재 개발

(1) 개발 식용배지에서 천연항균소재의 생산 및 특성조사

(가) 사용배지: 개발 식용배지(1차년도 결과)

배 지	개발식용배지 구성 성분
유산균 배지	i) A-4 : 폐배추즙+CSL* 1%+glucose 1%+Mn+Na ii) B-4 : 폐절임배추즙+CSL 1%+glucose 1%+Mn+Na iii) 대조구: MRS(실험실용 유산균 전용 배지)
고초균 배지	i) C-3 : 폐배추즙+glucose 1%+Mn+Na ii) D-3 : 폐절임배추즙+glucose 1%+Mn+Na iii) 대조구: TSB(실험실용 고초균 전용 배지)

* CSL: corn steep liquor

(나) 생육곡선 및 이에 따른 항균활성 측정

항 목	내 용
생육곡선 측정	- 유산균 5종: 30℃, 48시간 정치배양 - 고초균 1종: 37℃, 48시간 진탕배양 - 측정방법: 생균수 측정, log CFU/mL 표기
항균활성 측정	- 항세균 활성 지시균: <i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624 - 항곰팡이 활성 지시균: <i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918 단, 고초균의 경우 지시균으로 <i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2 사용 - 역가: AU/mL = (1000/d) X D (D: dilution factor, d : amount of sample loading)

- 배양배지에 따른 생육곡선과 이때의 항균활성(항세균/항진균활성)을 상기조건에서 측정함.

① 생육곡선(Figure 56)

- 사용배지에 따른 생육곡선과 이에 따른 생육도의 차이는 관찰되지 않음.

유산균 5종 모두 사용배지 3종(MRS, A-4, B-4)에서 모두 약 9 log CFU/mL를 나타냄. 고초균 SN7은 사용배지 3종(TSB, C-3, D-3)에서 모두 약 8 log CFU/mL를 나타냄. 최대 생육도에 도달하는 시간도 사용배지에 따른 차이 없이 동일한 시간대를 나타냄.

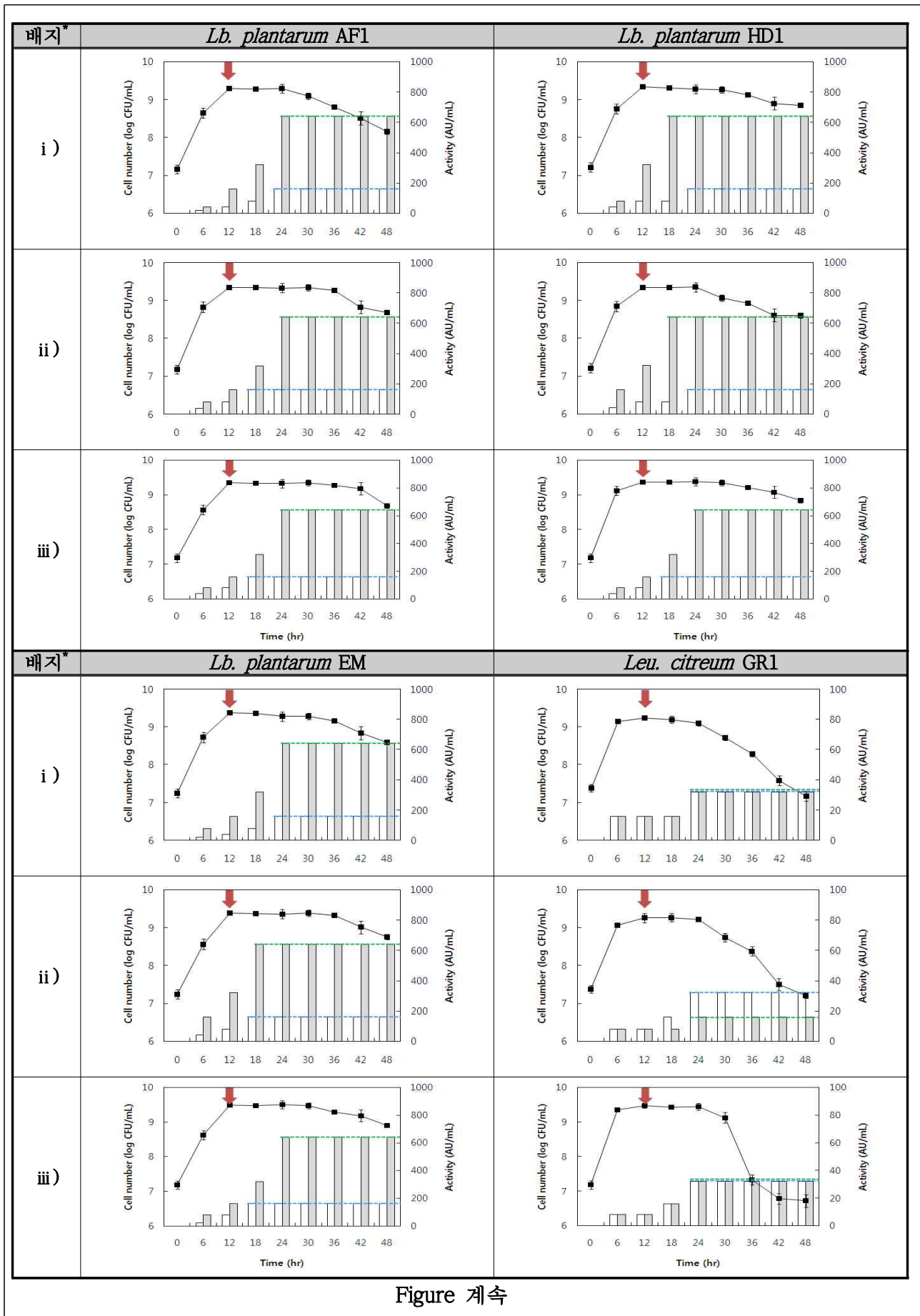


Figure 계속

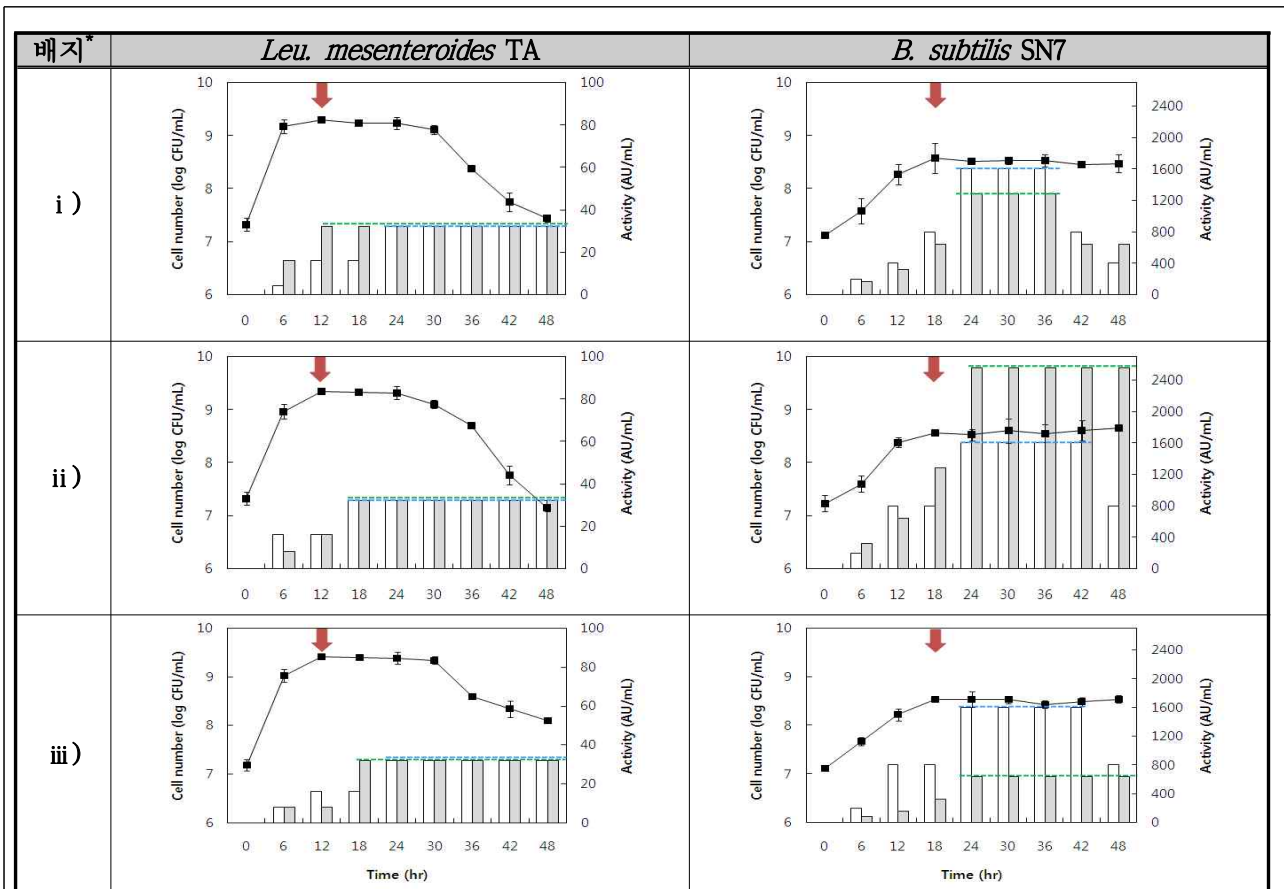


Figure 56. 배양배지에 따른 생육곡선 및 항균 활성(유산균 5종 및 고초균 1종)

* 유산균 5종 i) 폐배추즙 배지(A-4), ii) 폐절임배추즙 배지(B-4), iii) 대조구(MRS)
고초균 1종 i) 폐배추즙 배지(C-3), ii) 폐절임배추즙 배지(D-3), iii) 대조구(TSB)

■, Growth; □, Antibacterial activity; ▨, Antifungal activity

항세균 활성 지시균: *B. cereus* KCTC 3624

항진균 활성 지시균: *A. fumigatus* ATCC 96918, 단 고초균의 항진균 활성 지시균: *A. ochraceus* PF-2

② 항세균활성

- 유산균 5종의 최대 항세균 활성값은 사용배지에 따라 차이 없으나, 최대 활성에 도달하는 시간은 18~24시간으로 사용배지에 따라 다소 차이 있음. 최대 항세균활성은 최대 생육도를 나타낸 후 6~12시간 경과 후 나타남.
- 고초균 SN7의 항세균활성은 최대 활성값과 최대활성에 도달하는 시간 모두 사용배지간 차이 없음. 고초균의 항세균활성의 특이점은 배양 후 36~42시간부터 항세균 활성이 소실되기 시작함. 이러한 현상은 개발배지에서 보다 TSB배지에서 더 빨리 소실되기 시작하고 항균 활성 소실률도 더 높음.

③ 항진균활성

- 유산균 5종의 최대 활성에 도달하는 시간은 18~24시간으로 최대 배양 후 6~12시간 경과 후 최대 항진활성을 나타냄. 사용 배지에 따라 최대 활성값에 도달하는 시간은 다소 차이 있음. 최대 활성값은 유산균 4종은 사용배지에 따른 차이가 없었으

나 유산균 배지의 경우 항진 최대 활성값은 A-4 = MRS > B-4 순으로 사용배지에 따라 다소 차이남.

- 고초균 SN7의 최대 항진활성은 최대 생육도 보인 후, 약 6시간 경과 후에 나타남. 이러한 경향은 사용배지 3종 모두에서 동일하게 나타남. 그러나 그 최대 활성값은 D-3 > C-3 > TSB 배지에 배양순으로 크게 차이남.

※ 사용배지에 따른 최대 생육도를 나타내는 배양시간

사용배지	항균미생물	배양시간
A-4	<i>Lb. plantarum</i> 3종(AF1, HD1, EM)	12시간
B-4	<i>Leu. citreum</i> GR1	12시간
MRS	<i>Leu. mesenteroides</i> TA	12시간
C-3	<i>B. subtilis</i> SN7	18시간
D-3		
TSB		

→ 사용배지에 따른 생육도는 차이 없음(최대 생육도: 8~9 log CFU/mL).

※ 사용배지에 따른 최대 항세균/항진균 활성에 도달하는 시간과 그 항균 활성

항균 미생물	사용배지	최대 항세균활성/시간 (AU/mL) (h)	최대 항진균활성/시간 (AU/mL) (h)
AF1	A-4	160 / 24	640 / 24
	B-4	160 / 18	640 / 24
	MRS	160 / 18	640 / 24
HD1	A-4	160 / 24	640 / 18
	B-4	160 / 24	640 / 18
	MRS	160 / 18	640 / 24
EM	A-4	160 / 24	640 / 24
	B-4	160 / 18	640 / 18
	MRS	160 / 18	640 / 24
GR1	A-4	32 / 24	32 / 24
	✓ B-4	32 / 24	16 / 24
	MRS	32 / 24	32 / 24
TA	A-4	32 / 24	32 / 12
	B-4	32 / 18	32 / 18
	MRS	32 / 24	32 / 18
SN7	C-3	1,600 / 24	1,280 / 24
	✓ D-3	1,600 / 24	2,560 / 24
	TSB	1,600 / 24	640 / 24

항세균 활성 지시균: *B. cereus* KCTC 3624

항진균 활성 지시균: *A. fumigatus* ATCC 96918, 단 고초균의 항진균 활성 지시균: *A. ochraceus* PF-2

→ 사용배지에 따른 최대 항진균 활성값이 SN7은 D-3에서 GR1은 B-4에서 타배지와 차이남.

(다) 사용배지에 따른 항균활성 및 항균 spectrum(Table 44)

: 개발식용배지 vs. 실험실배지(MRS or TSB)에서 생산된 항균물질의 활성 및 spectrum

- 항균 spectrum: 식중독균 및 부패균 대상(세균 7종, 효모 1종, 곰팡이 5종: 총 13종)
- 유산균 5종 모두 폐배추를 활용한 개발배지 A-4에서 유산균전용 배지인 MRS 대비 동등한 항균활성과 동일한 항균 spectrum을 나타냄. 그러나 폐절임배추를 활용한 식용배지 B-4에서는 항균 spectrum은 MRS, A-4, B-4 모두 동일하나, *Leu. citreum* GR1의 경우 곰팡이(*A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *P. roqueforti*)에 대한 항진균활성이 타배지에서(MRS & A-4)의 배양에서 보다 낮게 측정됨. GR1을 제외한 *Lb. plantarum* 3종(AF1, HD1, EM)과 *Leu. mesenteroides* TA에서는 B-4 배양에서도 MRS 배양에서와 동등한 항균활성 나타냄.
- 고초균인 SN7은 본 연구의 개발 배지에서 항균활성도 증가하고 항진균 spectrum도 더 넓어져, TSB배양에서는 *A. ochraceus*에 대해서만 항균활성을 나타내었으나 C-3와 D-3에서는 이 곰팡이 이외에도 *A. fumigatus*와 *P. roqueforti*에 대해서도 항진균활성을 나타내어 항균 spectrum이 더 넓어짐. 특히 유산균에서는 폐배추 활용배지인 A-4에서 보다 우수하게 항균활성을 나타냄에 비해 SN7에서는 폐절임배추 활용 배지인 D-3에서 가장 항진균활성이 높게 나타남.

※ 이상의 결과로부터 유산균용 식용배지는 폐배추를 활용한 ‘A-4 배지’, 고초균용 식용배지는 폐절임배추를 활용한 ‘D-3 배지’가 가장 적합함을 알 수 있음.

(라) 사용배지에 따른 항균활성의 안정성: pH, 온도, 효소 안정성

① pH 안정성(Table 45)

- 항세균활성: 유산균 5종, 고초균 1종 항균물질 생산균주 모두 유산균 5종, 고초균 1종 배양배지에 따른 항세균활성의 pH 안정성은 차이가 없음.
- 항진균활성: 유산균 5종, 고초균 1종의 배양배지에 따른 항진균활성의 pH 안정성은 차이가 없음. 단 pH 3.0에서 고초균 SN7의 배양배지에 따른 항진균활성 소실정도는 TSB는 50%, 개발배지 C-3와 D-3는 75%임. 그러나 pH 3.0에서 항진균활성이 TSB보다 개발배지에서 더 많이 실행됨에도 불구하고, 개발배지에서의 항진역가가 TSB에서의 역가보다 더 높아, 그 최종 잔존 역가는 개발배지(D-3)에서 더 높음.

② 온도 안정성(Table 46)

- 항세균활성: 6종의 항균활성생산균주 모두 배양배지에 따른 온도 안정성은 차이 없음.

- 항진균활성: 유산균 5종의 항균활성은 배양배지에 따라 온도 안정성 차이 없음. 고초균 SN7의 항진활성은 3종의 배지에서 모두 100℃~121℃ 처리로 그 활성이 일부 소실되나, 소실율에 다소 차이가 있어, TSB와 C-3는 50% 소실되나 D-3는 100℃에서 50%, 121℃에서 대조구 대비 75% 소실됨. 그럼에도 불구하고 121℃ 처리후 최종 잔존 항진활성은 C-3, D-3 배지에서 배양이 대조구(TSB)에서 배양보다 2배 높게 나타남.

③ 효소 안정성(Table 47)

- 항세균활성: 6종의 항균활성균주 모두 배양배지에 따른 효소 안정성은 차이 없음.
- 항진균활성: 6종의 항균활성균주 모두 배양배지에 따른 효소 안정성은 차이 없음.

Table 44. 배지에 따른 항균 물질 생성균주가 생산하는 항균 활성 역가

지시균	항균활성(AU/mL)									
	AF1			HD1			EM			
	MRS	A-4	B-4	MRS	A-4	B-4	MRS	A-4	B-4	
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	160	160	160	160	160	160	320	320	320
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	160	160	160	160	160	160	80	80	80
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	640	640	640	640	640	640	640	640	640
	<i>A. nidulans</i> PF-3	320	320	320	320	320	320	320	320	320
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	160	160	160	160	160	160	40	40	40
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	320	320	320	320	320	320	160	160	160
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	80	80	80	40	40	40	80	80	80
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	160	160	160	160	160	160	160	160	160
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	160	160	160	160	160	160	320	320	320
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	5,120	5,120	5,120	5,120	5,120	5,120	5,120	5,120	5,120
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	320	320	320	320	320	320	320	320	320
<i>M. luteus</i> ATCC 13513	40	40	40	40	40	40	40	40	40	
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	10	10	10	20	20	20	10	10	10

지시균	항균활성(AU/mL)									
	GRI			TA			SN7			
	MRS	A-4	B-4	MRS	A-4	B-4	TSB	C-3	D-3	
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	32	32	16	8	8	8	0	0	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	8	8	4	16	16	16	640	1,280	2,560
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	32	32	16	32	32	32	0	20	40
	<i>A. nidulans</i> PF-3	32	32	4	16	16	16	0	0	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	8	8	4	8	8	8	0	40	80
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	8	8	4	16	16	16	0	0	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	32	32	32	32	32	32	1,600	1,600	1,600
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	4	4	4	8	8	8	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	512	512	512	128	128	128	0	0	0
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	16	16	16	16	16	16	0	0	0
<i>M. luteus</i> ATCC 13513	4	4	4	4	4	4	20	20	20	
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 45. 배지에 따른 항균 물질 생성균주가 생산하는 항균 물질에 대한 pH의 영향

pH	항균활성(AU/mL)											
	AF1						HD1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
대조구	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
3.0	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
4.0	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
5.0	40	160	40	160	40	160	20	80	20	80	20	80
6.0	20	40	20	40	20	40	0	40	0	40	0	40
7.0	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20
8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	EM						GR1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
	대조구	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32
3.0	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
4.0	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
5.0	20	80	20	80	20	80	4	8	4	8	4	4
6.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
pH	TA						SN7					
	MRS		A-4		B-4		TSB		C-3		D-3	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
	대조구	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600
3.0	32	32	32	32	32	32	1,600	320	1,600	320	1,600	640
4.0	32	32	32	32	32	32	1,600	320	1,600	640	1,600	1,280
5.0	16	8	16	8	16	8	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
6.0	4	0	4	0	4	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
7.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
8.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
9.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
10.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560

항세균: *B. cereus* KCTC 3624/항곰팡이 *A. fumigatus* ATCC 96918 단, 고초균의 경우 *A. ochraceus* PF-2

Table 46. 배지에 따른 항균 물질 생성균주가 생산하는 항균 물질에 대한 온도의 영향

온도	항균활성(AU/mL)											
	AF1						HD1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
대조구	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
4°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
30°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
37°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
50°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
70°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
100°C, 30min	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
121°C, 15min	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
온도	EM						GR1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
	대조구	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32
4°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
30°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
37°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
50°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
70°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	16	32	16	32	16	16
100°C, 30min	160	640	160	640	160	640	16	32	16	32	16	16
121°C, 15min	160	640	160	640	160	640	16	32	16	32	16	16
온도	TA						SN7					
	MRS		A-4		B-4		TSB		C-3		D-3	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
	대조구	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600
4°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
30°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
37°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
50°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	800	640	800	1,280	800	2,560
70°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	0	640	0	1,280	0	2,560
100°C, 30min	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	1,280
121°C, 15min	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	640

항세균: *B. cereus* KCTC 3624/항곰팡이 *A. fumigatus* ATCC 96918 단, 고초균의 경우 *A. ochraceus* PF-2

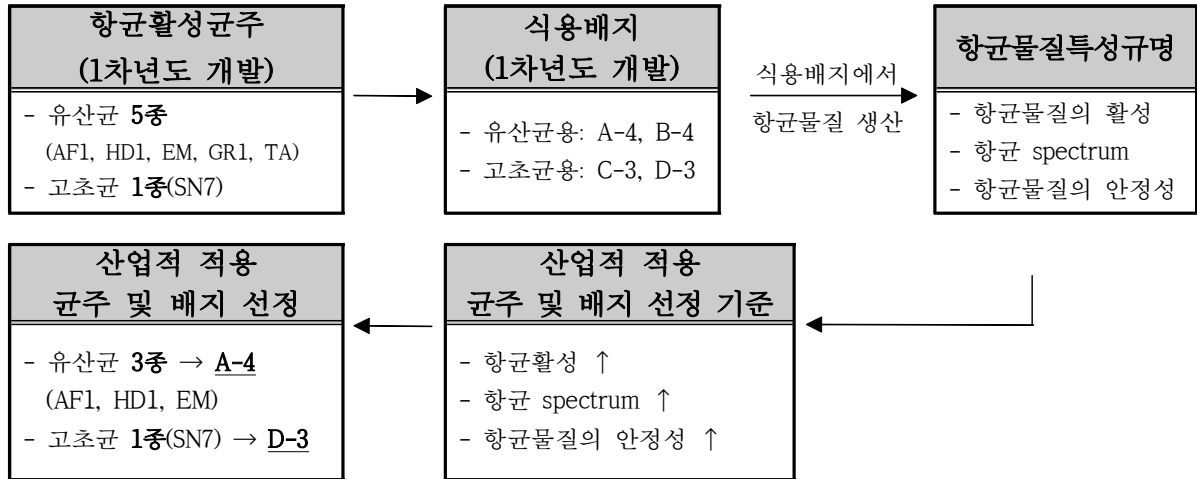
Table 47. 배지에 따른 항균 물질 생성균주가 생산하는 항균 물질에 대한 효소의 영향

각종 효소	항균활성(AU/mL)											
	AF1						HD1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
대조구	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
proteinase K	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
protease	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
pepsin	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
trypsin	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
α -chymotrypsin	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
lipase	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
α -amylase	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
각종 효소	EM						GR1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
	대조구	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32
proteinase K	160	640	160	640	160	640	4	32	4	32	4	16
protease	160	640	160	640	160	640	4	32	4	32	4	16
pepsin	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
trypsin	160	640	160	640	160	640	8	32	8	32	8	16
α -chymotrypsin	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
lipase	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
α -amylase	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
각종 효소	TA						SN7					
	MRS		A-4		B-4		TSB		C-3		D-3	
	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균	항세균	항진균
	대조구	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600
proteinase K	32	32	32	32	32	32	0	640	0	1,280	0	2,560
protease	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	1,280
pepsin	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
trypsin	32	32	32	32	32	32	1,600	320	1,600	640	1,600	1,280
α -chymotrypsin	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	1,280
lipase	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
α -amylase	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560

항세균: *B. cereus* KCTC 3624/항곰팡이 *A. fumigatus* ATCC 96918 단, 고초균의 경우 *A. ochraceus* PF-2

(2) 개발 식용배지에서 항균활성 균주의 보존 및 안정성 보존 유지 기술 개발

(가) 항균활성 균주로부터 항균물질 특성규명 및 식용배지에서 천연항균소재 생산 연구 결과 요약



※ 이에 실용화를 위한 **항균물질 생산균주**로 유산균 3종(AF1, HD1, EM)과 고초균 1종(SN7)을 결정함. **산업화를 위한 식용배지**는 유산균용은 폐배추활용 배지인 A-4 배지를, 고초균용은 폐절임배추활용 배지인 D-3 배지를 사용하기로 함.

(나) 생육활성 유지를 위한 안정화 최적조건 확립

- 개발식용배지에서 배양되어 회수된 균주의 항균활성 및 생균수 유지 최적 조건을 결정하기 위해 당, 미네랄, 산 등의 조합을 통해 가장 활성을 유지할 수 있는 최적의 안정화 조건 결정(총 10종 사용)
- 안정제 첨가 농도 및 활성유지 기간 설정
: 안정제 0~5%첨가, 4℃ 저온저장하면서 4주 동안 생균수 및 항균활성 측정
- 저온(4℃)에서 4주간 보관에서 사용된 10종의 안정제 중 개발배지인 A-4, MRS, glycerol 2.5~5.0% 사용시, 유산균 *Lb. plantarum* AF1은 생균수 생존율 100%, 항세균/항진균활성도 100% 유지함을 확인함(Table 48).
- 이에 *Lb. plantarum*으로 같은 속과 종인 HD1과 EM은 AF1의 저온 보관중 안정화 실험에 사용되었던 10종의 안정제 중 AF1에서 좋은 결과를 나타낸 4종에 대해서만 실험 수행함. *Lb. plantarum* HD1과 EM도 4종의 안정제 처리시 4℃에서 4주간 보존시에 생존율 100%, 항세균/항진균활성 100% 유지됨을 확인함(Table 49,50).
- 고초균 SN7은 모든 안정제처리에 심지어는 물 처리만으로도 생존율 100% 유지하고, 항균활성(항세균/항진균)도 100% 유지됨. 이는 포자형성에 의해 이와 같은 생존율 결과를 보이는 것으로 사료됨(Table 51).

Table 48. 저장 중 안정제 종류에 따른 *Lb. plantarum* AF1의 생균수 및 항균활성

안정제	생존율(%)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
MRS (대조구-1)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Water (대조구-2)	100.0	100.0	92.2	90.7	82.9
Glucose 5%	100.0	100.0	100.0	97.7	97.5
Glucose 2.5%	100.0	100.0	100.0	98.0	96.6
Sucrose 5%	100.0	100.0	100.0	99.1	96.3
Sucrose 2.5%	100.0	100.0	100.0	99.0	97.6
Lactose 5%	100.0	100.0	100.0	97.3	91.2
Lactose 2.5%	100.0	100.0	100.0	96.5	90.4
Skim milk 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	98.4
Skim milk 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	98.4
Corn steep liquor 5%	100.0	100.0	100.0	92.8	93.1
Corn steep liquor 2.5%	100.0	100.0	100.0	97.2	97.0
Tween 20 5%	100.0	98.8	100.0	90.1	84.4
Tween 20 2.5%	100.0	98.4	100.0	89.0	86.9
Tween 80 5%	100.0	99.5	100.0	89.2	82.7
Tween 80 2.5%	100.0	99.9	100.0	91.5	84.7
Glycerol 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glycerol 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
안정제	항세균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	160	160	160	160	160
MRS (대조구-1)	160	160	160	160	160
Water (대조구-2)	160	160	80	40	0
Glucose 5%	160	160	160	160	160
Glucose 2.5%	160	160	160	160	160
Sucrose 5%	160	160	160	160	160
Sucrose 2.5%	160	160	160	160	160
Lactose 5%	160	160	160	160	80
Lactose 2.5%	160	160	160	160	80
Skim milk 5%	160	160	160	160	160
Skim milk 2.5%	160	160	160	160	160
Corn steep liquor 5%	160	160	160	80	80
Corn steep liquor 2.5%	160	160	160	80	80
Tween 20 5%	160	160	160	40	20
Tween 20 2.5%	160	160	160	40	20
Tween 80 5%	160	160	160	80	20
Tween 80 2.5%	160	160	160	80	20
Glycerol 5%	160	160	160	160	160
Glycerol 2.5%	160	160	160	160	160
안정제	항진균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	640	640	640	640	640
MRS (대조구-1)	640	640	640	640	640
Water (대조구-2)	640	640	640	320	320
Glucose 5%	640	640	640	640	640
Glucose 2.5%	640	640	640	640	640
Sucrose 5%	640	640	640	640	640
Sucrose 2.5%	640	640	640	640	640
Lactose 5%	640	640	640	640	640
Lactose 2.5%	640	640	640	640	640
Skim milk 5%	640	640	640	640	640
Skim milk 2.5%	640	640	640	640	640
Corn steep liquor 5%	640	640	640	640	640
Corn steep liquor 2.5%	640	640	640	640	640
Tween 20 5%	640	640	640	640	320
Tween 20 2.5%	640	640	640	640	320
Tween 80 5%	640	640	640	640	320
Tween 80 2.5%	640	640	640	640	320
Glycerol 5%	640	640	640	640	640
Glycerol 2.5%	640	640	640	640	640

항세균: *B. cereus* KCTC 3624/항곰팡이 *A. fumigatus* ATCC 96918

Table 49. 저장 중 안정제 종류에 따른 *Lb. plantarum* HD1의 생균수 및 항균활성

안정제	생존율(%)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
MRS (대조구-1)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glycerol 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glycerol 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
안정제	항세균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	160	160	160	160	160
MRS (대조구-1)	160	160	160	160	160
Glycerol 5%	160	160	160	160	160
Glycerol 2.5%	160	160	160	160	160
안정제	항진균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	640	640	640	640	640
MRS (대조구-1)	640	640	640	640	640
Glycerol 5%	640	640	640	640	640
Glycerol 2.5%	640	640	640	640	640

항세균: *B. cereus* KCTC 3624, 항곰팡이: *A. fumigatus* ATCC 96918

Table 50. 저장 중 안정제 종류에 따른 *Lb. plantarum* EM의 생균수 및 항균활성

안정제	생존율(%)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
MRS (대조구-1)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glycerol 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glycerol 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
안정제	항세균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	160	160	160	160	160
MRS (대조구-1)	160	160	160	160	160
Glycerol 5%	160	160	160	160	160
Glycerol 2.5%	160	160	160	160	160
안정제	항진균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
A-4 배지	640	640	640	640	640
MRS (대조구-1)	640	640	640	640	640
Glycerol 5%	640	640	640	640	640
Glycerol 2.5%	640	640	640	640	640

항세균: *B. cereus* KCTC 3624, 항곰팡이: *A. fumigatus* ATCC 96918

Table 51. 저장 중 안정제 종류에 따른 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균활성

안정제	생존율(%)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
D-3 배지	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
TSB (대조구-1)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Water (대조구-2)	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glucose 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glucose 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Sucrose 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Sucrose 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Lactose 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Lactose 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Skim milk 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Skim milk 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Tween 20 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Tween 20 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Tween 80 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Tween 80 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glycerol 5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
Glycerol 2.5%	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
안정제	항세균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
D-3 배지	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
TSB (대조구-1)	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Water (대조구-2)	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Glucose 5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Glucose 2.5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Sucrose 5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Sucrose 2.5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Lactose 5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Lactose 2.5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Skim milk 5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Skim milk 2.5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Tween 20 5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Tween 20 2.5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Tween 80 5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Tween 80 2.5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Glycerol 5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
Glycerol 2.5%	1,600	1,600	1,600	1,600	1,600
안정제	항진균 활성(AU/mL)				
	초기	1 주	2 주	3 주	4 주
D-3 배지	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
TSB (대조구-1)	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Water (대조구-2)	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Glucose 5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Glucose 2.5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Sucrose 5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Sucrose 2.5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Lactose 5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Lactose 2.5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Skim milk 5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Skim milk 2.5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Tween 20 5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Tween 20 2.5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Tween 80 5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Tween 80 2.5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Glycerol 5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560
Glycerol 2.5%	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560

항세균: *B. cereus* KCTC 3624, 항곰팡이: *A. ochraceus* PF-2

(다) 최적생산조건에서 항균물질 생산 수율

① 원료

- 김치가공 시 파생되는 폐배추
- 김치가공 시 파생되는 폐절임배추

② 처리 공정

- 원료로부터 폐배추즙, 폐절임배추즙을 착즙하여 항균활성 균주를 배양하기 위한 배지 제조(유산균용: A-4, 고초균용: D-3)

③ 생산조건

사용균주	배양배지 및 조건
- <i>Lb. plantarum</i> AF1	- A-4, 30°C 12시간 정치배양
- <i>B. subtilis</i> SN7	- D-3, 37°C 18시간 정치배양

④ 신규천연항균물질 생산 및 생산수율

- 천연 항균소재 생산용 식용배지는 폐배추와 폐절임배추를 원료로 사용함. 원료무게를 100%로 하였을 때 이를 가공처리하여 개발된 배지는 중량으로 환산시 원료무게의 약 45~68%를 차지하고, 이 배지에 항균활성 균주를 접종하여 배양 후 원심분리와 여과를 통한 제균과정 후 배양상징액(항균물질: 식품원료기준규격충족)은 원료중량대비 유산균 항균물질은 약 64%, 고초균 항균물질은 약 38% 수율로 생산됨(Figure 57).



Figure 57. 원료에서부터 최종 산물까지의 생산 수율

(3) 천연항균소재의 활용화 검증

(가) 신규 천연항균소재 vs. 기존 천연보존제 대비 항균활성 비교

① 시료

- 신규 천연항균소재

i) 유산균 3종(*Lb. plantarum* AF1, HD1, EM)

: A-4(폐배추 활용 식용배지) 배양상징액 및 배양상징액 5배 농축물

ii) 고초균 1종(*B. subtilis* SN7)

: D-3(폐절임배추 활용 식용배지) 배양상징액 및 배양상징액 5배 농축물

- 기존 천연보존제

: 식물유래 보존제, 미생물유래 보존제 등 2종 이상의 농축원액 및 사용권장량

i) 식물유래 보존제: 자몽종자추출물(grapefruit seed extract)

ii) 미생물유래 보존제: ε-폴리리신(제품명: Epolylly)





iii) 주정: 식음용 발효주정 95%

iv) 혼합제제: 자몽종자추출물+주정 형태의 식품첨가물(제품명: 크린콜)

② 사용기준

- 기존 천연보존제의 사용기준은 아래 Table 52와 같음

Table 52. 기존 천연 보존제의 사용기준 및 특징

연번	보존제	특징 및 사용기준
①	 자몽종자추출물	- 식품첨가물로 등재 - 사용기준 없음 - FDA 사용권장량: 최대 0.08% - 강한 쓴맛 - 특이한 냄새 - 낮은 pH, 높은 점성
②	 폴리리신	- 식품첨가물로 등재 - 사용기준 없음 - FDA 사용권장량: 최대 0.025% (단, 적용식품 제한) - 세균, 효모, 곰팡이에 대한 항균 활성 - 제품명: Epolylly - 유래미생물: <i>Streptomyces albulus</i>
③	 주정 (발효주정)	- 주세법(식음용) - 발효주정 95% - 실제 비가열 식품에 가장 많이 사용되고 있는 보존제 - 식품에 약 1~3% 첨가
④	 혼합제제	- 자몽종자추출물+주정 형태의 식품첨가물 - 식품에 직접 첨가시 원재료와 부재료에 약 2~3% 첨가 - 제품명: 크린콜

③ 항균활성 및 항균 spectrum

i) Table 52에 제시된 바와 같이 기존 천연보존제인 자몽종자추출물, 폴리리신, 주정, 크린콜 등은 식품에 사용시 사용권장량이 제시되고 있음.

ii) 농축원액 기준:

- 우선 사용권장량과 상관없이 Table 52의 기존 천연보존제를 농축원액 상태에서 그 항균활성 및 spectrum을 조사함. 본 연구개발의 GRAS 미생물유래 항균물질은 균체 배양상징액을 5배 농축하여 기존의 천연보존제와의 항균활성 및 항균 spectrum 차이를 비교 조사함(Table 53).
- Table 53에서 보여지는 바와 같이 자몽종자추출원액 100%는 *Streptomyces* 유래 폴리리신 1:1 원액과 더불어 가장 강력한 항균 spectrum과 항균활성 나타냄.
- 주정(95% 원액)과 크린콜(100% 원액)은 항진균활성을 전혀 나타나지 않음. 항세균활성도 100% 원액임을 감안할 때 매우 낮게 나타남.
- 식약처 식품원료기준으로 제조된 본 연구개발 천연항균물질 5배 농축액 중 유산균 3종의 항균물질은 실험에 사용된 모든 식중독균/부패균에 대하여 항진균/항세균활성이 있고, 그 활성도 뛰어남. 고초균 SN7의 항균물질은 *A. ochraceus*와 *B. cereus*에 특이적으로 항균활성이 뛰어남. 이에 유산균 3종의 항균물질에 혼합사용시 유산균 3종의 넓은 항균 spectrum에 더불어 *A. ochraceus*와 *B. cereus*에 대한 항균활성을 보다 더 높일 수 있는 항균소재로 여겨짐.

iii) 사용권장량 기준:

- Table 52에 제시된 사용권장량 기준에 따라 최대허용 용량까지의 농도구배별 항균활성 및 항균 spectrum을 조사함. 이때 본 연구과제에서 개발된 천연 항균소재는 식용배지(식약처 원료기준 충족)에서 균체 배양상징액을 농축없이 그대로 사용하여 기존의 천연보존제와 비교함(Table 54).
- Table 54에서 보여지는 바와 같이 기존 천연보존제는 사용 권장량을 준용하였을 때 최대 허용량의 농도에서조차 항균활성이 크게 저하되고 항균 spectrum도 크게 좁아짐. 기존 천연보존제 중에서는 식물유래 보존제인 자몽종자추출물이 가장 효과적으로 식중독균 및 부패균을 저해하였으면 미생물 유래 폴리리신은 항진활성은 전혀 나타나지 않았고, 항세균활성도 *B. cereus*와 *V. parahaemolyticus*에만 약하게 나타남. 발효주정과 크린콜은 본 실험에 사용된 식중독균 및 부패균에는 전혀 항균활성 없음.
- 본 연구개발 천연 항균소재는 어떠한 농축과정없이 단지 유산균 및 고초균 배양상징액만으로도 강력한 항균활성과 넓은 항균 spectrum을 나타냄. 본 개발 천연 항균소재는 식약처 기준 식품원료기준을 충족하는 배지와 GRAS등급 미생물을 사용하

여 배양한 배양상징액이므로 그대로 식품에 사용가능 할 수 있음이 강점임.

- 식품에 실제 보존제로 사용되려면 식품에 분포하는 식중독/부패미생물이 각 식품마다 다를 수 있으므로, 강한 항균력과 더불어 넓은 항균 spectrum은 식품보존제의 요건 중 가장 중요한 항목임. 본 연구개발의 GRAS등급 유래 미생물로부터 식용배지에서 생산된 천연항균제는 식품원료수준을 충족하여 안전함과 동시에 강력한 항균활성과 넓은 항균 spectrum을 나타내어 식품보존제로서의 요건을 완벽히 충족함.

※ 본 연구에 사용된 식중독/부패균에 대해 ‘기존 천연보존제’는 4종 모두 사용 권장량을 준용하였을 때 최대 허용량의 농도에서조차 항균 spectrum은 매우 좁고 항균활성도 거의 없거나 극히 낮음. 이에 반해 본 ‘연구개발 천연 항균소재’는 어떠한 농축과정없이 단지 유산균 3종(AF1, HD1, EM) 배양상징액만으로도 강력한 항균활성과 넓은 항균 spectrum을 나타냄. 또한 고초균(SN7) 배양상징액은 항균 spectrum은 넓지 않지만 *A. ochraceus*와 *B. cereus*에 대해 특이적으로 매우 강한 항균 활성 나타냄.

Table 53. 기존 천연 보존제 및 신규 천연 항균 소재의 항균활성 및 항균 spectrum

항균소재		DF-100	Epolyly	주정	크린콜
원료		자몽종자추출물	ε-폴리리신	발효주정	주정+자몽종자
지시균	농도	100% 원액	1:1 원액	95% 원액	100% 원액
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	6,400	1,600	0	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	12,800	25,600	0	0
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	12,800	1,600	0	0
	<i>A. nidulans</i> PF-3	51,200	102,400	0	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	12,800	12,800	0	0
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	6,400	12,800	100	100
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	102,400	12,800	100	200
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	51,200	102,400	100	400
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	25,600	12,800	100	100
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	102,400	12,800	100	100
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25,600	12,800	100	100
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	3,200	6,400	100	100
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	204,800	204,800	200	100
항균소재		AF1	HD1	EM	SN7
원료		A-4*	A-4	A-4	D-3**
지시균	농도	5×***	5×	5×	5×
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	800	800	1,600	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	800	800	400	12,800
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	3,200	3,200	3,200	200
	<i>A. nidulans</i> PF-3	1,600	1,600	1,600	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	800	800	200	400
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	1,600	1,600	800	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	400	200	400	0
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	800	800	800	1,600
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	800	800	800	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	25,600	25,600	25,600	0
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,600	1,600	1,600	0
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	800	800	800	100
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	50	100	50	0

* A-4: 페배추즙 활용 식용배지

** D-3: 폐절임배추즙 활용 식용배지

*** 5×: 균체 배양상징액 5배 농축물(식약처 식품원료 기준)

Table 54. 기존 천연 보존제의 및 신규 천연 항균소재의 사용권장량에 따른 항균활성 및 항균 spectrum

항균소재		DF-100					Epolyly		
원료		자몽종자추출물					ε-폴리리신		
지시균	농도 (%)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.01	0.02	0.025
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	0	100	0	0	0
	<i>A. nidulans</i> PF-3	0	100	100	100	100	0	0	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	0	0	0	0	0	0	0	0
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	100	100	100	0	0	0
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	0	0	0	0	100	0	100	100
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0	0	0	0	100	0	0	100
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	0	0	0	0	0	0	0	0
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	0	0	100	100	100	0	0	0

항균소재		주정			크린콜		AF1	HD1	EM	SN7
원료		발효주정			자몽+주정		A-4*	A-4	A-4	D-3**
지시균	농도 (%)	1	2	3	2	3	1×***	1×	1×	1×
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	0	0	0	0	0	160	160	320	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	0	0	0	0	0	160	160	80	2,560
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	0	0	640	640	640	40
	<i>A. nidulans</i> PF-3	0	0	0	0	0	320	320	320	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	0	0	0	0	0	160	160	40	80
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	0	0	0	0	0	320	320	160	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	0	80	40	80	0
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	0	0	0	0	0	160	160	160	1,600
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	160	160	320	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0	0	0	0	0	5,120	5,120	5,120	0
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	320	320	320	0
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	0	0	0	0	0	40	40	40	20
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	0	0	0	0	0	10	20	10	0

* A-4: 페메추즙 활용 식용배지

** D-3: 페절임배추즙 활용 식용배지

*** 1×: 배양상징액(식약처 식품원료 기준)

(나) 항균소재 유효농도 결정

① MIC test용 항균물질 시료 준비

- 배양상징액:

유산균 배양상징액 100 mL → 동결진공건조(Speed vac.) → 건물칭량 → 2000 mg → MIC test(0.002~2,000 mg)

고초균 배양상징액 100 mL → 동결진공건조(Speed vac.) → 건물칭량 → 1000 mg → MIC test(0.002~1,000 mg)

- 조항균물질:

유산균 배양액 830 mL → SPE 흡착 → 10 mL ACN 용출 → 진공건조(Speed vac.) → 칭량 → 90 mg → MIC test(0.002~90 mg)

고초균 배양액 100 mL → Sep-pak 흡착 → 10 mL MeOH 용출 → 칭량 → 58 mg → MIC test(0.002~100 mg)

② 최소저해 농도(Minimal Inhibition Concentration; MIC)(Table 55)

- 배양상징액:

유산균 3종(AF1, HD1, EM)의 배양상징액의 MIC는 사용된 지시균의(식중독/부패균) 종류에 따라 달라 0.42~216.00 mg/mL까지 다양하며 산막효모를 제외하면 최대 MIC가 60.00 mg/mL를 나타내었음. 고초균 SN7은 *A. ochraceus*에 대해 MIC 0.97 mg/mL, *B. cereus*에 대해 1.56 mg/mL를 타나냄.

- 조항균물질:

유산균의 조항균물질은 항균활성 중 항세균 활성이 없어지고 항진균 활성만 나타내지만, 그 항진활성은 배양상징액에서 보다 강력하여져 MIC 0.22~28.00 mg/mL를 나타냄. 산막효모를 제외시 최대 MIC가 *Lb. plantarum* AF1과 HD1 항균물질은 불과 1.78 mg/mL를 나타냄. 고초균 SN7의 조항균물질은 항세균 활성만 나타내어 *B. cereus*에 대해서 MIC 0.09 mg/mL를 타나냄.

- 이로부터 일반적인 식중독/부패 미생물을 제어하기 위한 수단으로 본 항균물질을 사용시, 고초균 SN7과 유산균 AF1, HD1, EM을 2~3종 혼합하여 배양상징액 상태에서 60 mg/mL까지 사용가능. 식중독/부패곰팡이 생육저해용일 경우는 유산균 AF1과 HD1의 조항균물질을 단종 또는 2종 혼합물 형태로 1.78 mg/mL 사용가능함. 산막효모제어용으로는 HD1의 조항균물질로 14.25 mg/mL 사용 권장. 또한 1, 2차년도 제2협동기관인 KTR(GLP기관)의 조항균물질의 독성시험 결과 *Lb. plantarum* AF1과 HD1 그리고 *B. subtilis* SN7의 조항균 물질은 쥐에 투여시 2000 mg/kg(쥐몸무게)까지도 무독성인 것으로 나타남. 이에 본 연구에서 제시된 식중독균/부패균 제어용 항균물질의 유효농도 구간은 동물 독성실험구간의 농도보다 훨씬 낮은 농도로서 안전하게 사용가능함.

Table 55. 신규 천연 항균소재의 최소 저해 농도(MIC)

단위: mg/mL

지시균	AF1		HD1	
	A-4*		A-4	
	배양상징액	조항균물질	배양상징액	조항균물질
<i>A. flavus</i> ATCC 22546	13.50	1.75	15.00	0.89
<i>A. ochraceus</i> PF-2	13.50	1.75	12.00	0.89
곰팡이 <i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	3.38	0.22	3.75	0.22
<i>A. nidulans</i> PF-3	6.75	0.88	7.50	1.78
<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	13.50	1.75	15.00	1.78
<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	6.75	-*	7.50	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27.00	-	30.00	-
<i>B. cereus</i> KCTC 3624	13.50	7.00	15.00	7.13
세균 <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	13.50	-	15.00	-
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.42	0.22	0.47	0.22
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.75	-	7.50	-
<i>M. luteus</i> ATCC 13513	54.00	-	60.00	-
효모 <i>P. kudriavzevii</i> GY1	216.00	28.00	120.00	14.25

지시균	EM		SN7	
	A-4*		D-3	
	배양상징액	조항균물질	배양상징액	조항균물질
<i>A. flavus</i> ATCC 22546	13.75	3.59	-	-
<i>A. ochraceus</i> PF-2	27.50	3.59	0.97	-
곰팡이 <i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	3.44	0.22	62.20	-
<i>A. nidulans</i> PF-3	6.88	3.59	-	-
<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	55.00	7.19	31.10	-
<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	13.75	-	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	19.25	-	-	2.90
<i>B. cereus</i> KCTC 3624	13.75	-	1.56	0.09
세균 <i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	5.50	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.43	0.45	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.88	-	-	-
<i>M. luteus</i> ATCC 13513	55.00	-	-	1.45
효모 <i>P. kudriavzevii</i> GY1	220.00	28.75	-	-

*- : No activity or Not determined

- 그러나 본 MIC test 결과는 *in vitro* 실험결과로서 식품에 적용시 대상식품의 성분이 서로 다르고 그 성분이 항균활성에 대해 완충 또는 시너지 작용을 일으킬 수 있으므로, 3차년도 식품적용 실험을 통해서 최종 유효농도 결정이 이루어져야 할 것임.

※ 항균 소재 유효농도

적용대상미생물	유효농도(MIC)
식중독/부패 전체 미생물대상 (세균/효모/곰팡이)	- 배양상징액: 60.00 mg/mL (AF1, HD1, EM, SN7: 2~3종 혼합)
곰팡이	- 배양상징액: 15.00 mg/mL (AF1, HD1: 1~2종 혼용 or 단용) - 조항균물질: 1.78 mg/mL (AF1, HD1: 1~2종 혼용 or 단용)
효모	- 조항균물질(HD1): 15.00 mg/mL

다. 천연항균소재의 식품 적용 기술 개발(Lab scale)

(1) 천연항균소재의 식품 적용

- 비가열 식품/신선 식품/반조리 · 최소 가공식품은 특성상 가열과 같은 살균 공정이 없거나 충분하지 않기 때문에 다양한 미생물이 식품 내 존재이 높음. 때문에 이들 중 식중독을 일으키는 식중독균이나 이미나 이취 등을 일으키는 부패균으로 인해 유통기한이 제한되어 있을 뿐만 아니라 끊임없는 식중독 사고의 원인 식품으로 지목됨.
- **적용 식품 선정:** 본 연구에서는 참여기업의 제품 비가열 식품/신선 식품/반조리 · 최소 가공식품 중 김치와 청국장 그리고 시판되는 타사의 비가열 식품인 샐러드와 막걸리를 선정하여 천연항균소재를 이용한 식중독균 제어 효과를 살펴보고자 함.

(가) 김치

- 식품공전 상 “김치류” 는 배추 등 채소류를 주원료로 하여 절임, 양념혼합공정을 거쳐 그대로 또는 발효시켜 가공한 것으로 김치속, 배추김치 등을 말함. 관련 규격을 살펴보면 김치류는 보존료가 검출되지 않아야 하며 식품일반의 기준 및 규격에 따라 식중독균 9종(*Salmonella* spp., Enterohemorrhagic *Escherichia coli* 등)에 대해 음성이어야 함(Ref. 9). 김치로 인한 식중독 적발 · 발생 건수를 조사한 결과, 지난 2005년 이후 약 11건의 식중독 사고가 발생하였으며 발생 원인으로 밝혀진 원인균으로는 병원성 대장균이 4건으로 가장 많이 차지하였으며 다음으로는 바실러스 세레우스, 리스테리아 등이 보고됨.
- 한편 김치의 저장기간 중 발생하는 부패원인균인 산막효모로 인한 균덕내와 연부현상 등은 유통과정 중 발생하는 가장 큰 문제이며 이로 인한 수출 등에 큰 어려움을 겪고 있음. 하지만 기존 산막효모제어제로 사용되는 자몽종자추출물과 유카추출물은 식물로부터 유래된 천연보존제로 특유의 향과 맛으로 인해 사용하는데 제한이 따를 뿐만 아니라 가격이 비싼 단점을 가지고 있음. 이에 본 연구에서 개발된 김치로부터 분리된 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액을 천연항균소재로 적용하여 김치의 산막효모 제어 및 병원성 대장균 제어 효과를 조사함. 동시에 본 연구에서 개발된 이 항균제가 김치발효에 관여하는 유산균에 생육에 미치는 영향을 함께 조사함.

(나) 청국장

- 식품공전 상 “청국장” 은 장류에 속하며 대두를 주원료로 하여 바실러스(*Bacillus*)속 균으로 발효시켜 제조한 것이거나, 이를 고춧가루, 마늘 등으로 조미한 것으로 페이스트, 환, 분말 등을 말함.
- 관련 규격을 살펴보면 청국장에 허용되는 보존료는 소르빈산류, 안식향산류, 파라옥시안식향산류가 있으며 이외의 보존료는 검출되어서는 아니되며 이들 또한 정해진 정량 외에 사용이 금지되어 있음(Ref. 9). 하지만 소비자들은 화학적 합성 보존료의 체내 잔류로 인한 부작용, 독성 등으로 인해 거부감을 나타냄으로 인해 사용에 제한적임. 이에 본 연구에서 개발된 메주로부터 분리된 *B. subtilis* SN7의 폐절입배추즙(D-3) 배양상징액을 천연항균소재로 적용하여 청국장의 *B. cereus* 제어 효과를 조사함.

Ref. 9) 식품공전 中 제 2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격

4) 식중독균

: *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni/colii*, *Yersinia enterocolitica* 음성

(1) 바실러스 세레우스

① 장류(메주 제외) 및 소스류, 복합조미식품, 김치류, 젓갈류, 절임식품, 조림식품

: g 당 10,000 이하(평균제품은 음성이어야 한다)

(2) 클로스트리디움 퍼프린젠스

① 장류(메주 제외), 고춧가루 또는 실고추, 김치류, 젓갈류, 절임식품, 조림식품, 복합조미식품, 향신료가공

품, 식초, 카레분 및 카레(액상제품 제외) : g 당 100 이하(평균제품은 음성이어야 한다)

(다) 샐러드

- 식품공전 상 “샐러드” 는 즉석섭취·편의식품류에 속하며 소비자가 별도의 조리과정 없이 그대로 또는 단순조리과정을 거쳐 섭취할 수 있도록 제조·가공·포장한 즉석섭취 식품, 즉석조리 식품, 신선편의 식품을 말함. 샐러드로 인한 식중독 사고 발생은 우리나라를 포함한 미국, 유럽 등에서 끊임없이 일어나며 대표적인 식중독 발생 원인 균으로는 병원성 대장균과 리스테리아, 살모넬라 등을 들 수 있음.
- 본 연구에서는 천연항균제로 *Lb. plantarum* AF1과 *B. subtilis* SN7의 개발배지 배양상징액 혼합 적용하여 샐러드의 *E. coli* O157:H7 제어 효과를 조사함.

Ref. 9) 식품공전 中 제 2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격

29-18 즉석섭취·편의식품류

① 대장균: 1 g 당 10 이하(신선편의식품에 한하여 즉석섭취식품은 음성이어야 한다)

② 세균수: 1 g 당 100,000 이하(즉석조리식품에 한한다)

③ 황색포도상구균: 1 g 당 100 이하

④ 살모넬라: n=5, c=0, m=0/25 g

⑤ 장염비브리오균: 1 g 당 100 이하

(즉석섭취식품, 신선편의식품 중 해산물 함유제품에 한한다)

⑥ 바실러스 세레우스: 1 g 당 1,000 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다)

⑦ 장출혈성 대장균: n=5, c=0, m=0/25 g(신선편의식품에 한한다)

⑧ 클로스트리디움 퍼프린젠스: 1 g 당 100 이하(즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다)

(라) 막걸리

- 막걸리는 식품공전 상 “주류” 중 탁주에 속하며 전분질 원료와 국을 주원료로 하여 발효시킨 술덧(주요)을 혼탁하게 제성한 것으로 정의됨.
- 관련 규격을 살펴보면 막걸리는 보존료가 허용되지 않으며 살균 유무에 따라 대장균 균이나 대장균이 검출되어서는 안됨. 막걸리는 살균 여부에 따라 생막걸리와 살균 막걸리로 나뉘며 생막걸리의 경우 살균과정을 거치지 않아 부패균으로부터 오염이 문제가 되어 유통기한이 짧고 냉장보관을 하여야 함. 본 연구에서는 개발된 김치로부터 분리된 *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물)을 천연항균소재로 적용하여 막걸리의 부패 효모인 산막효모 제어 효과를 조사함.

Ref. 9) 식품공전 中 제 2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격







27 주류, 27-1 탁주

- ① 에탄올(v/v%): 주세법의 규정에 의한다
- ② 총산(w/v%): 0.5% 이하(조산으로서)
- ③ 메탄올(mg/mL): 0.5 이하
- ④ 보존료: 검출되어서는 아니 된다
- ⑤ 대장균군: n=5, c=2, m=0, M=10(살균제품에 한한다)
- ⑥ 대장균: n=5, c=2, m=0, M=10(살균제품은 제외한다)

※ 식중독 미생물 검출 방법(Ref. 식품공전 미생물 시험법)

식중독 미생물	식중독 미생물 검출 배지
<i>Salmonella</i> spp.	XLD 한천배지
<i>Staphylococcus aureus</i>	난황첨가 만니톨 식염한천배지
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	TCBS(thiosulfate citrate bile salt sucrose)한천배지
<i>Listeria monocytogenes</i>	Oxford 한천배지
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	TC-SMAC 한천배지
<i>Campylobacter jejuni/colii</i>	Modified Campy blood free 한천배지
<i>Yersinia enterocolitica</i>	CIN 한천배지
<i>Bacillus cereus</i>	MYP(mannitol egg yolk polymyxin) 한천배지
<i>Clostridium perfringens</i>	난황첨가 TSC 한천배지
대장균	대장균 건조필름배지 I

※ 본 연구에서 천연항균소재의 식품 적용 방법 요약

적용 식품	개발천연식품보존제	보관형태	
김치	<i>Lb. plantarum</i> AF1 배양상징액 (식용배지 A-4 사용)	<p>밀봉 보관</p>  <p>① 시판 포기김치 ② 협력업체 수출김치</p>	<p>개봉 보관</p>  <p>① 시판 포기김치</p>
청국장	<i>B. subtilis</i> SN7 종균 혹은 배양상징액 (식용배지 D-3 사용)	<p>밀봉 보관</p>  <p>① 협력업체 청국장</p>	<p>개봉 보관</p>  <p>② 실험실 제조 청국장</p>
샐러드	<i>Lb. plantarum</i> AF1 배양상징액 (식용배지 A-4 사용) + <i>B. subtilis</i> SN7 배양상징액 (식용배지 D-3 사용)	<p>밀봉 보관</p> 	
막걸리	<i>Lb. plantarum</i> HD1 조항균물질 (SPE 부분정제물)	<p>개봉 보관</p> 	

(2) 천연항균소재 적용 식품의 특성 조사

(가) 김치

- 시료 ①: 시판 포기김치(반찬집 포기김치)

- 목적: 김치의 연부현상, 균덕내 등과 연관된 주요 변패 원인균인 산막효모 제어능 검증

- 대조구

① 무처리구

② 기존천연보존제 처리구 (자몽종자추출물 0.03%, 유카추출물 0.2%)

- 실험구

① *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 1%, 3%, 5%

② *Lb. plantarum* AF1 MRS(실험실 배지) 배양상징액 1%, 3%, 5%

- 보관 형태 및 온도

① 개봉 보관: 25°C, 15°C, 4°C

② 밀봉 보관: 25°C, 15°C, 4°C, -1°C

- 조사항목

① 산막효모 발생 여부 및 시점 관찰

i) 개봉 보관(Table 56)

○ 25°C: 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액을 첨가구에서는 저장 4~6일 만에 가장 먼저 김치의 표면에서 흰색의 산막 효모 집락이 관찰됨. 기존 천연보존제(유카추출물, 자몽종자추출물)를 첨가한 김치는 저장 6~8일 만에 산막효모가 관찰됨. 저장 약 10일 이후에는 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액, 그리고 자몽종자추출물과 유카추출물 첨가구의 김치 표면이 산막효모가 표면을 덮을 정도로 부패가 진행된 반면, *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액을 첨가구는 저장 11~12일 만에 부분적으로 작은 크기의 산막효모가 관찰됨(Figure 58).

○ 15°C: 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액을 첨가구는 저장 5~7일만에 산막효모가 관찰됨. 기존천연보존제(유카추출물, 자몽종자추출물)를 첨가한 김치는 저장 6~9일에 산막효모가 관찰되기 시작함. 이후 저장 약 13~16일 이후로는 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액, 그리고 자몽종자추출물 첨가구, 유카추출물 첨가구의 김치 표면에 산막효모로 인해 완전히 덮히는 것을 확인함. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구는 저장 16~17일에 부분적으로 산막효모가 검출되어 약 10일 연장하는 효과를 보임(Figure 59).

○ 4°C: 25°C와 15°C 저장과는 달리 산막효모의 거친 형태가 완전히 눈에 띄게 나타나진 않지만 김치의 표면에 얇은 막과 같은 형태로 산막효모로 인한 부패가

진행됨. *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구는 저장 15~17일 만에 산막효모가 관찰되었으며 무처리구는 18~20일 만에 산막효모가 관찰됨. 유카추출물, 자몽종자추출물 첨가구는 23~25일만에 김치의 표면으로부터 산막효모가 관찰됨. *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액을 첨가구는 저장 30~32일 만에 산막효모가 관찰됨(Figure 60).

☞ *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구에서 무처리구 대비 25℃에서 약 6~7일, 15℃에서 약 10일, 4℃에서 약 12일 연장효과를 나타냄.

Table 56. 개봉 보관시 온도별 김치 표면에서 산막효모 발생 시점

항균제 처리 \ 보관온도	25℃	15℃	4℃
무처리구	4~6일	6~7일	18~20일
자몽종자추출물	7~8일	8~9일	23~25일
유카추출물	6~7일	6~7일	23~25일
AF1 MRS 1%	4~6일	6~7일	15~17일
AF1 MRS 3%	4~6일	5~7일	15~17일
AF1 MRS 5%	4~6일	5~7일	15~17일
AF1 A-4 1%	11~12일	16~17일	30~32일
AF1 A-4 3%	11~12일	16~17일	30~32일
AF1 A-4 5%	11~12일	16~17일	30~32일

자몽종자추출물: 자몽종자추출물 0.03% 첨가구

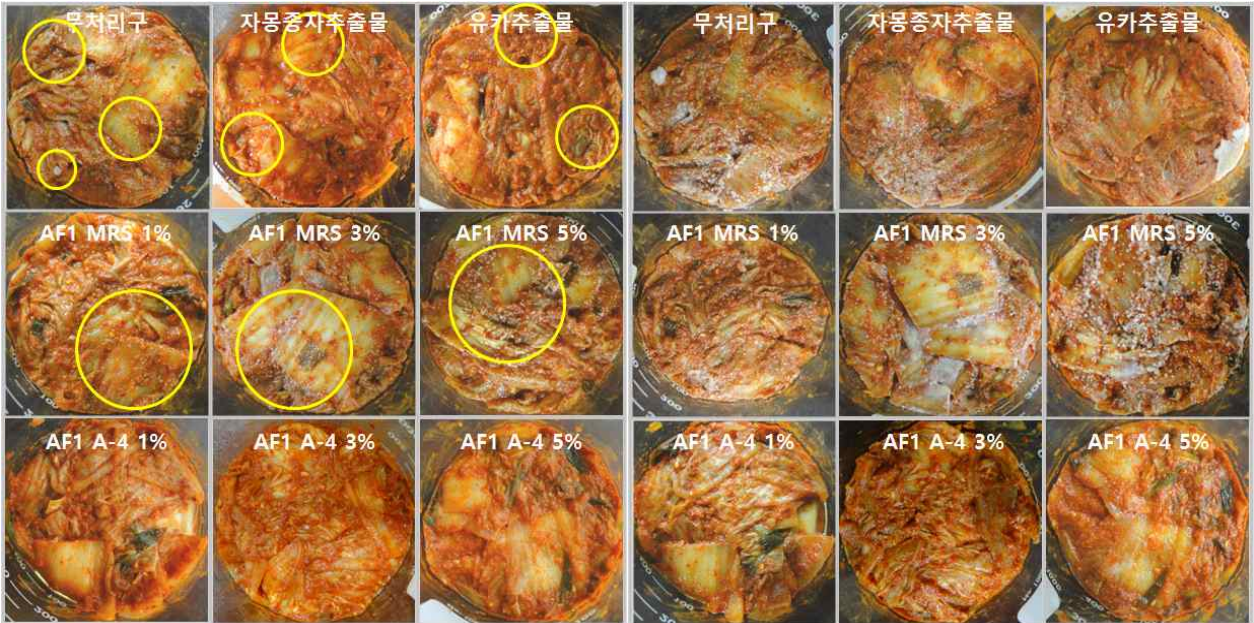
유카추출물: 유카추출물 0.2% 첨가구

AF1 MRS: *Lb. plantarum* AF1 MRS 배양상징액 첨가구

AF1 A-4 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구

A. 저장 7일차

B. 저장 10일차



C. 저장 13일차

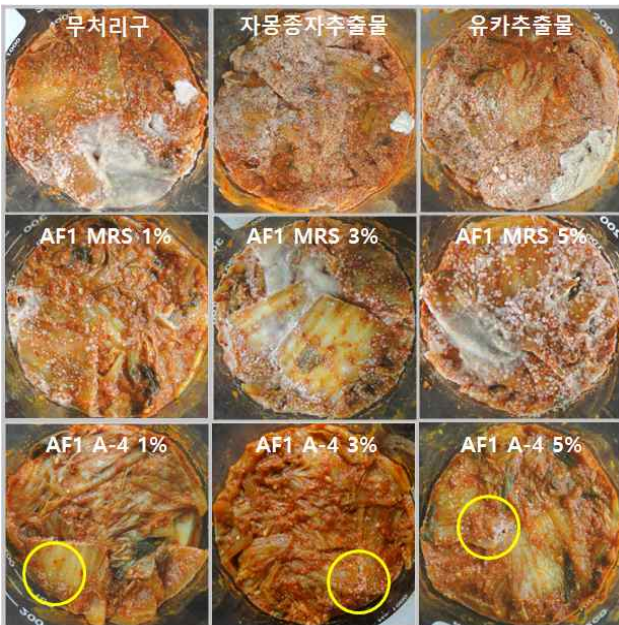
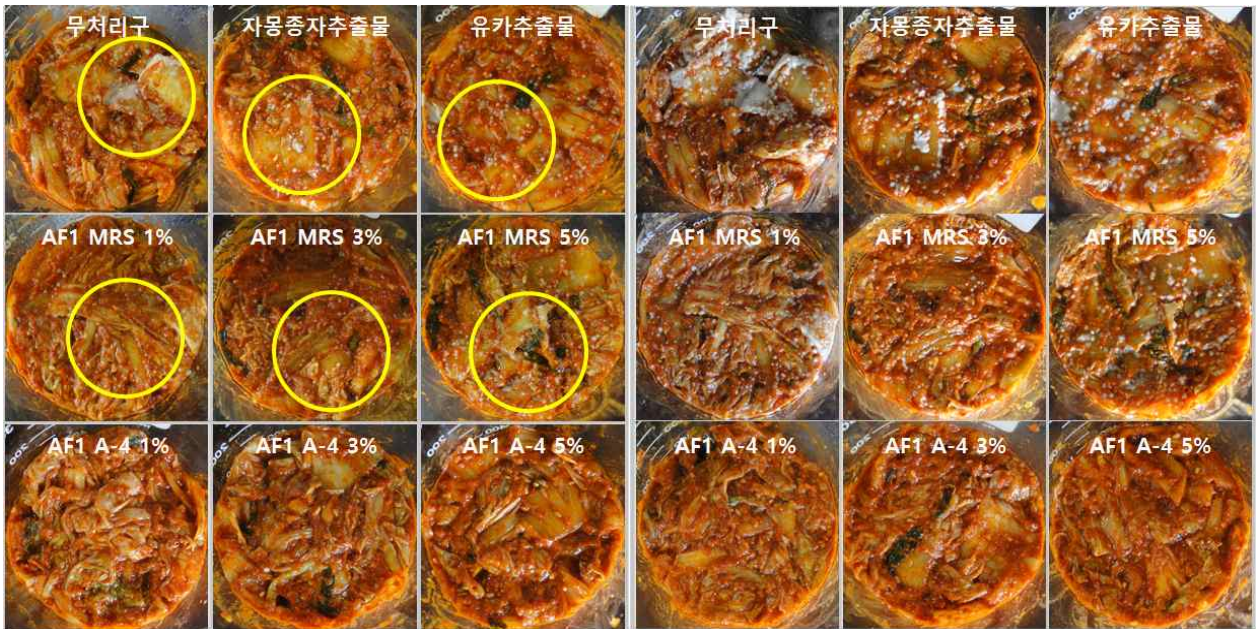


Figure 58. 각 첨가구별 25°C 저장 중 김치의 표면 변화

A. 저장 10일차

B. 저장 13일차



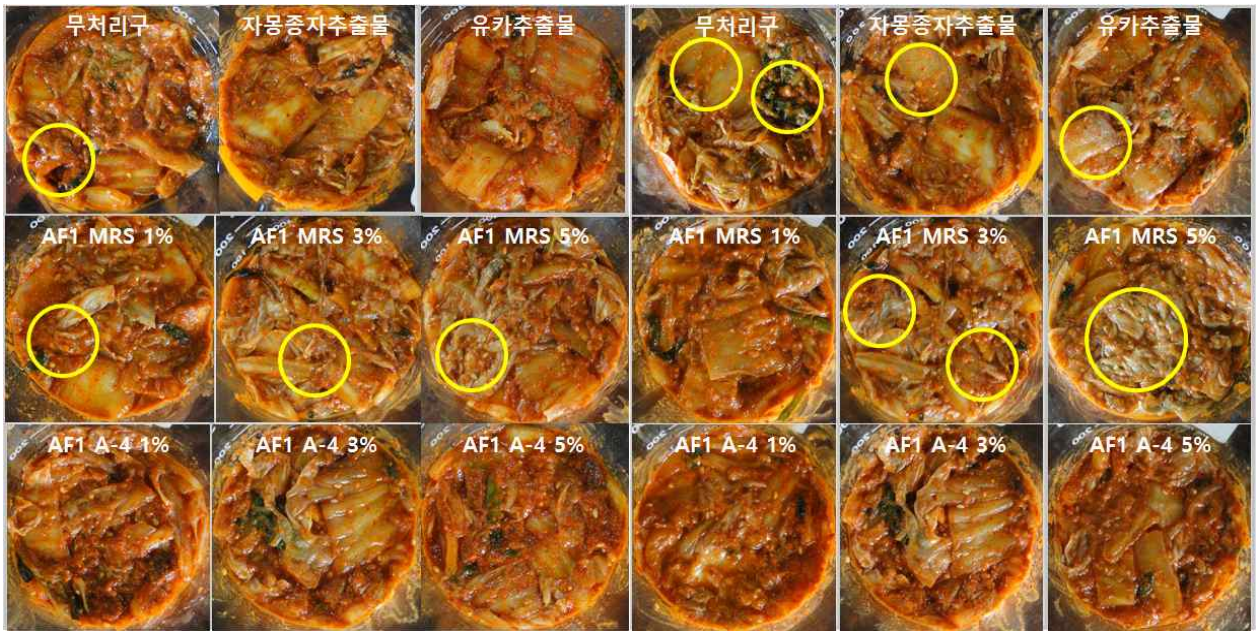
C. 저장 16일차



Figure 59. 각 첨가구별 15°C 저장 중 김치의 표면 변화

A. 저장 20일차

B. 저장 25일차



C. 저장 30일차

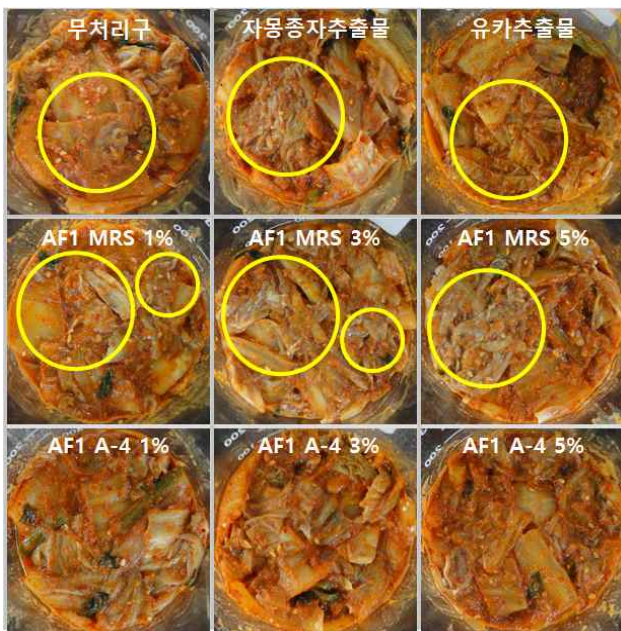


Figure 60. 각 첨가구별 4℃ 저장 중 김치의 표면 변화

- ii) 밀봉 보관(Table 57)
- 25℃: 무처리구 김치와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구는 저장 7~8일 만에 김치 표면에 산막효모가 관찰되었으며 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구는 저장 19~20일 만에 산막효모가 관찰되어 약 12일 연장 효과를 보임.
 - 15℃: 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구는 저장 18~20일 만에 산막효모가 관찰되었고 기존 천연보존제인 유카추출물과 자몽종자추출물을 첨가한 김치는 각각 저장 22~23일, 25~27일 만에 산막효모가 관찰됨. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구는 저장 120일까지 김치 표면에 산막효모가 검출되지 않음.
 - 4℃: *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구는 저장 40~42일 만에 산막효모가 가장 먼저 관찰되기 시작하였으며 무처리구는 42~43일 만에 산막효모가 관찰됨. 기존 천연보존제(유카추출물, 자몽종자추출물) 첨가구는 저장 50~53일 만에 산막효모가 관찰되는 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구는 저장 120일까지 산막효모가 관찰되지 않음.
 - -1℃: *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구는 저장 60~62일 만에 산막효모가 관찰되기 시작하였으며 무처리구는 62~63일 만에 산막효모가 관찰됨. 기존 천연보존제 유카추출물과 자몽종자추출물을 첨가한 김치는 각각 저장 75~76일, 90~91일 만에 산막효모가 관찰됨. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구는 저장 120일까지 산막효모가 관찰되지 않음.
- ☞ *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구에서 무처리구 대비 25℃에서 약 12일, 15℃에서 약 100일, 4℃에서 약 77~78일, -1℃에서 57~58일 연장효과를 나타냄.

Table 57. 밀봉 보관시 온도별 김치 표면에서 산막효모 발생 시점

항균제 처리 \ 보관온도	25℃	15℃	4℃	-1℃
무처리구	7~8일	19~20일	42~43일	62~63일
자몽종자추출물	9~10일	25~27일	52~53일	90~91일
유카추출물	8~9일	22~23일	50~51일	75~76일
AF1 MRS 1%	7~8일	18~20일	40~42일	60~62일
AF1 MRS 3%	7~8일	18~20일	40~42일	60~62일
AF1 MRS 5%	7~8일	18~20일	40~42일	60~62일
AF1 A-4 1%	19~20일	불검출	불검출	불검출
AF1 A-4 3%	19~20일	불검출	불검출	불검출
AF1 A-4 5%	19~20일	불검출	불검출	불검출

② 저장기간에 따른 미생물 균총 조사(효모, 유산균, 식중독균)

i) 개봉 저장

o 25°C

- **산막효모:** 저장 4일차에 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구의 김치의 표면에서 산막효모가 관찰되었으며 균덕내와 이취가 형성되었음. 저장 4일차 무처리구는 매끄러운 효모가 5.39 log CFU/mL, 거친 효모가 2.46 log CFU/mL로 나타났으며 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구(1, 3, 5%)는 매끄러운 효모가 약 5 log CFU/mL, 거친 효모가 2 log CFU/mL로 나타남. 또한, 기존 천연보존제인 자몽종자추출물, 유카추출물 첨가구는 저장 8일차에 매끄러운 효모가 약 2~6 log CFU/mL 거친 효모는 약 2~4 log CFU/mL 검출됨(Figure 61).
- **유산균:** 저장기간 동안의 유산균수를 측정 한 결과, 25°C 저장 2일 만에 모든 시료에서 약 8 log CFU/mL에 도달하였으며 이는 저장 20일까지 약 7 log CFU/mL로 유지됨(data not shown). 이에 따라 천연항균소재 처리는 김치의 발효와 연관된 유산균에 대한 영향이 전혀 없음을 알 수 있음.
- **식중독균:** 식품공전 규격에 따라 총 10종의 식중독균(*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, 대장균군) 검출 여부를 확인한 결과, 25°C 저장 20일간 모든 시료에서 식중독균이 검출되지 않음(data not shown).

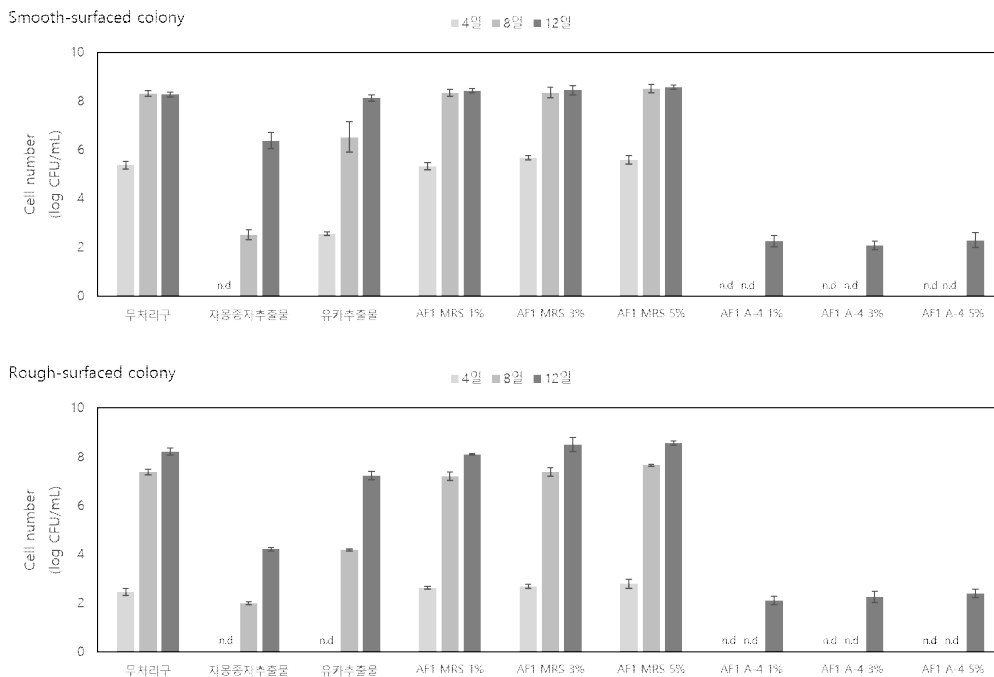


Figure 61. 각 첨가구별 25°C 저장 중 김치의 산막효모수 변화
n.d.: not detected

○ 15°C

- **산막효모:** 저장 6일차에 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구 (1, 3, 5%)의 효모수를 측정 한 결과, 매끄러운 효모는 약 2.2~2.24 log CFU/mL, 거친 효모는 약 2.00~2.02 log CFU/mL로 나타났으며 꾸준히 증가하여 저장 16일차에는 매끄러운 효모가 약 8.03~8.11 log CFU/mL, 거친효모가 약 6.05~6.22 log CFU/mL로 나타남. 자몽종자추출물 첨가구와 유카추출물 첨가구 또한 저장 8일차에 각각 매끄러운 효모와 거친 효모가 약 2~3 log CFU/mL 검출되었으며 저장 16일차에는 약 6~8 log CFU/mL까지 증가하였음. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구(1, 3, 5%)는 저장 16일차에 매끄러운 효모와 거친 효모가 약 2 log CFU/mL 검출됨을 확인하였음(Figure 62).
- **유산균:** 저장기간 동안 유산균 수의 변화를 측정한 결과, 15°C 저장 8일 만에 모든 시료의 유산균 수가 약 8 log CFU/mL에 도달하였으며 저장 20일까지 유지되는 것을 확인하였음(data not shown).
- **식중독균:** 15°C 저장 20일 동안 10종의 식중독균 검출여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 식중독균이 검출되지 않았음(data not shown).

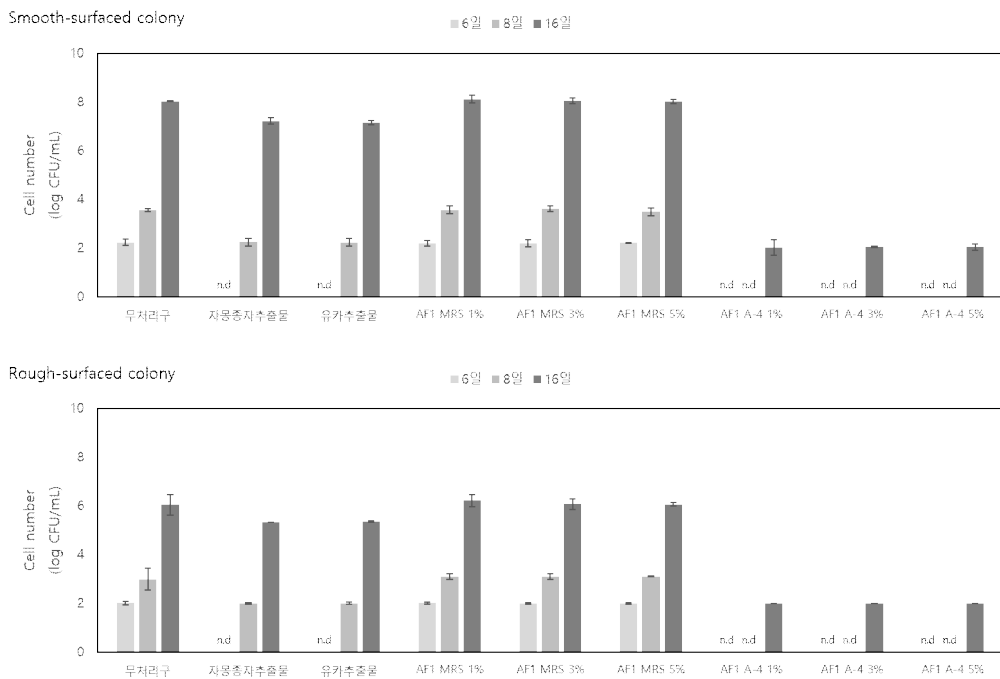


Figure 62. 각 첨가구별 15°C 저장 중 김치의 산막효모수 변화
n.d: not detected

○ 4℃

- **산막효모:** 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구(1, 3, 5%)는 저장 15일차에 산막효모가 관찰되기 시작하였으며 이때의 효모수를 측정한 결과, 매끄러운 효모가 약 2~3 log CFU/mL, 거친 효모가 약 2 log CFU/mL 검출됨. 저장 25일차에 자몽종자추출물 첨가구와 유카추출물 첨가구에서도 산막효모가 관찰되지 시작하였으며 이때의 효모수를 측정한 결과, 매끄러운 효모와 거친 효모가 각각 약 2 log CFU/mL로 검출됨을 확인하였음. 한편, *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가구(1, 3, 5%)는 저장 30일차에 산막효모가 관찰되었으며 이때의 매끄러운 효모와 거친 효모수를 측정한 결과 약 2 log CFU/mL로 나타남(Figure 63).
- **유산균:** 저장기간 동안의 유산균 수를 측정한 결과, 4℃ 저장 15일 만에 모든 시료의 유산균수는 약 8 log CFU/mL에 도달하여 저장 50일까지 유지되는 것을 확인하였음(data not shown).
- **식중독균:** 4℃ 저장 30일 동안 10종의 식중독균 검출여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 식중독균이 검출되지 않았음(data not shown).

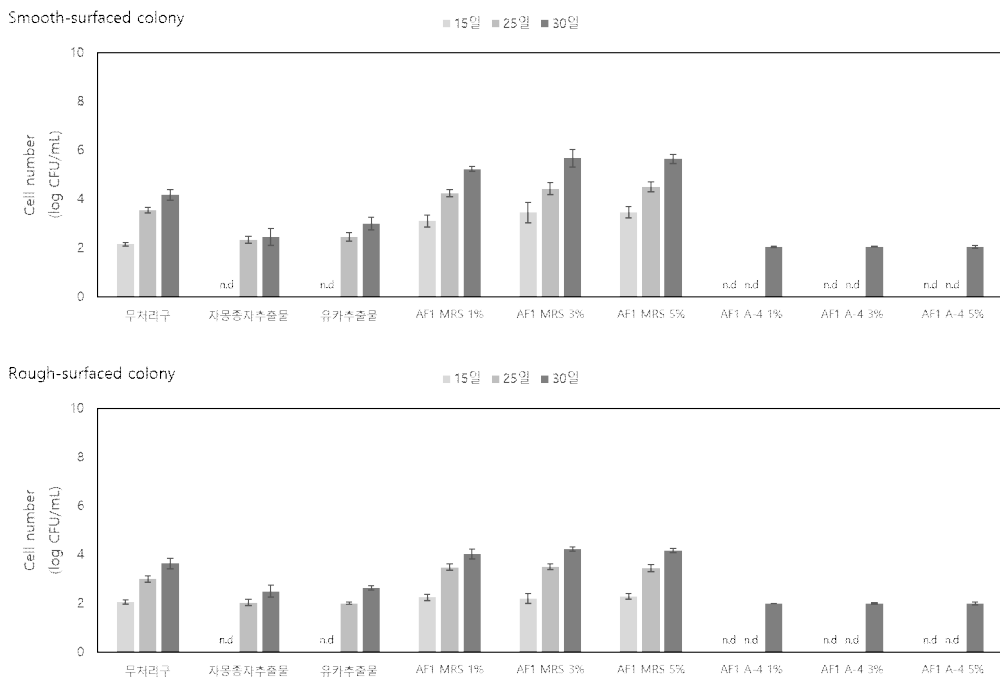


Figure 63. 각 첨가구별 4℃ 저장 중 김치의 산막효모수 변화

n.d: not detected

ii) 밀봉 저장

o 25°C

- **산막효모:** 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액(1, 3, 5%) 첨가구는 개봉 저장시 결과와 비슷하게 가장 먼저 산막효모가 관찰되기 시작하여 저장 7일 차에 매끄러운 효모가 약 5 log CFU/mL, 거친 효모가 약 3 log CFU/mL로 검출됨. 그 다음으로 자몽종자추출물과 유카추출물 첨가구가 각각 매끄러운 효모 약 2 log CFU/mL, 거친효모 약 0~2 log CFU/mL로 검출됨. *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 배지(A-4) 배양상징액 첨가구(1, 3, 5%)는 처리 농도와 상관없이 모두 저장 20일차에 산막효모가 관찰되기 시작하였으며 이때의 매끄러운 효모와 거친 효모는 각각 약 2 log CFU/mL로 검출됨을 확인하였음(Figure 64).
- **유산균:** 저장기간 동안의 유산균 수를 측정한 결과, 25°C 저장 2일 만에 모든 시료의 유산균수는 약 8 log CFU/mL에 도달함. 이후 저장 20일까지 유산균수는 약 8 log CFU/mL로 유지됨(data not shown).
- **식중독균:** 식품공전 규격에 따라 총 10종의 식중독균 검출 여부를 확인한 결과, 25°C 저장 20일간 모든 시료에서 식중독균이 검출되지 않음(data not shown).

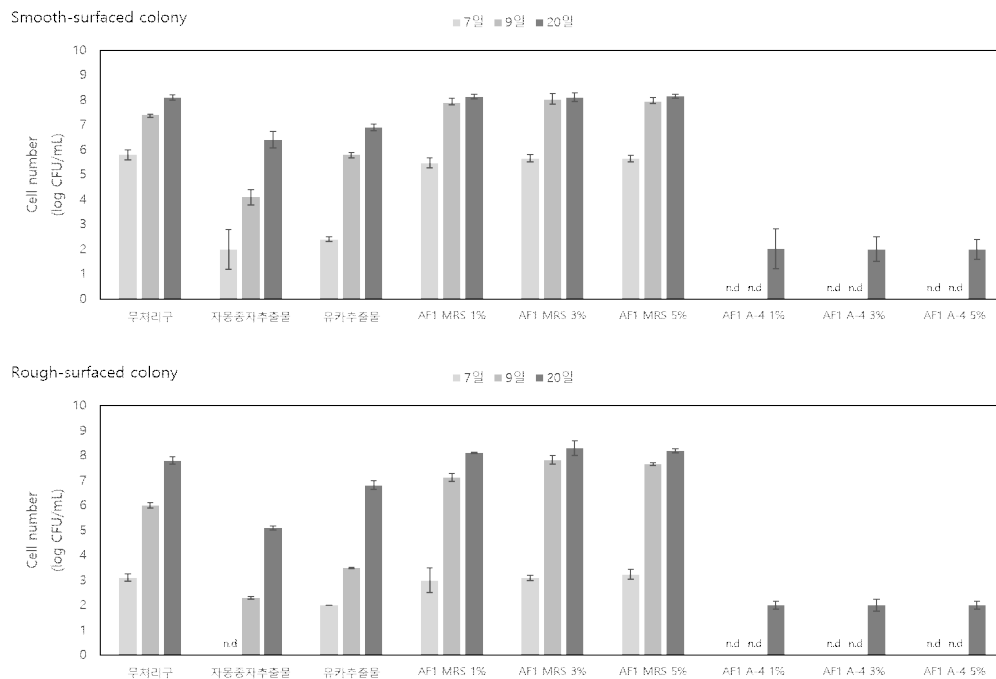


Figure 64. 각 첨가구별 25°C 저장 중 김치의 산막효모수 변화

n.d: not detected

○ 15°C

- **산막효모:** 저장 20일차에 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액(1, 3, 5%) 첨가구에 각각 매끄러운 효모가 약 2~4 log CFU/mL, 거친 효모가 약 2 log CFU/mL 검출되었으며 저장 25일차에는 자몽종자추출물과 유카추출물 첨가구에서 각각 매끄러운 효모가 약 3 log CFU/mL, 거친 효모가 약 2 log CFU/mL 검출됨. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액(1, 3, 5%)을 처리한 시료에서는 저장 120일까지 매끄러운 형태의 효모와 거친 형태의 효모가 검출되지 않았음(Figure 65).
- **유산균:** 15°C 저장 약 15~17일 만에 모든 시료의 유산균수는 약 8 log CFU/mL에 도달하였으며 저장 120일까지 약 7~8 log CFU/mL가 유지됨을 확인하였음(data not shown).
- **식중독균:** 15°C 저장 120일 동안 10종의 식중독균 검출여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 식중독균이 검출되지 않았음(data not shown).

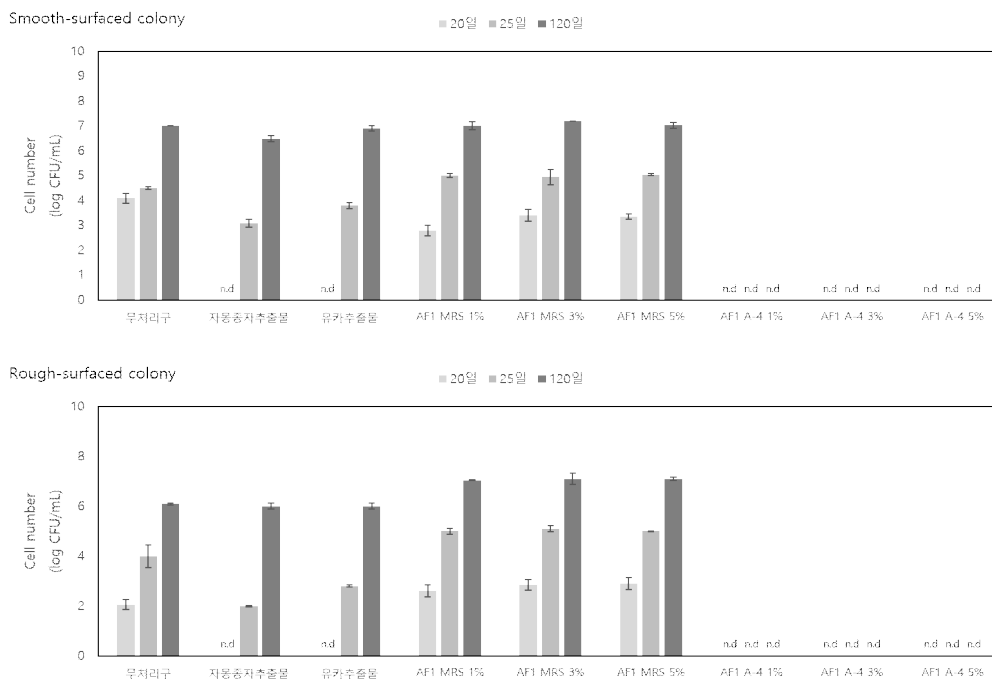


Figure 65. 각 첨가구별 15°C 저장 중 김치의 산막효모수 변화

n.d: not detected

○ 4°C

- **산막효모:** 저장 45일차 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액 첨가구 (1, 3, 5%)는 매끄러운 효모와 거친 효모가 각각 약 2~3 log CFU/mL가 검출되었으며 자몽종자추출물과 유카추출물은 저장 55일차에 매끄러운 효모와 거친 효모가 각각 약 2 log CFU/mL 검출됨을 확인하였음. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 배지(A-4) 배양상징액을 처리한 시료에서는 저장 120일까지 산막효모가 관찰되지 않았으며 미생물 분석 결과, 매끄러운 형태의 효모와 거친 형태의 효모가 검출되지 않음을 확인하였음(Figure 66).
- **유산균:** 저장기간에 따른 유산균 수의 변화를 측정한 결과, 4°C 저장 약 21~24일 만에 모든 시료의 유산균수가 약 8 log CFU/mL에 도달하였음. 이는 저장 120일까지 약 7~8 log CFU/mL로 유지됨(data not shown).
- **식중독균:** 4°C 저장 120일 동안 총 10종의 식중독균 검출여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 식중독균이 검출되지 않았음(data not shown).

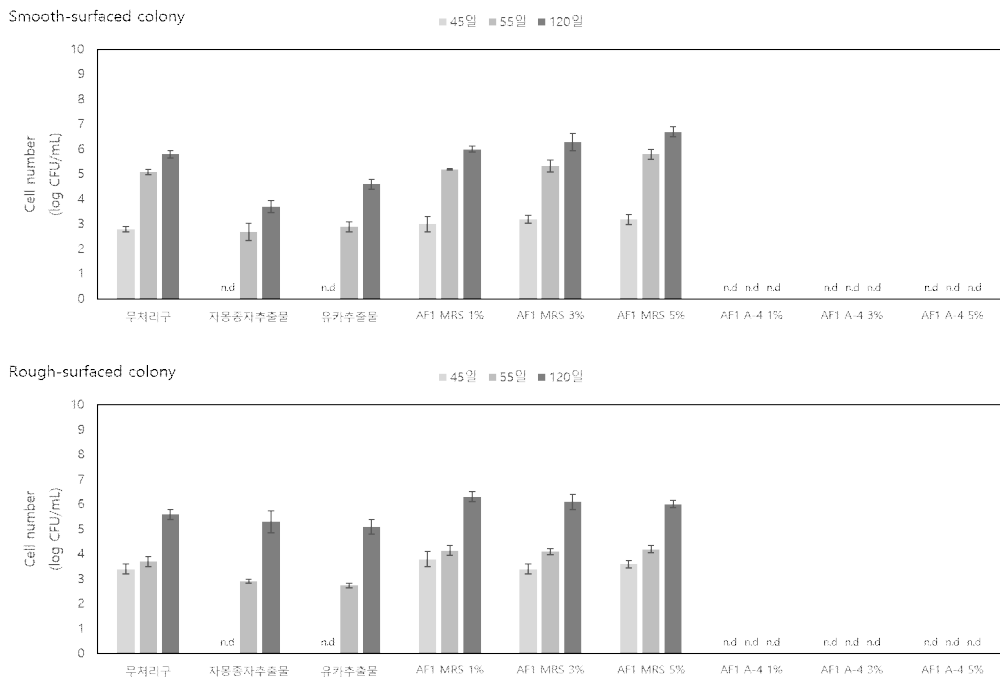


Figure 66. 각 첨가구별 4°C 저장 중 김치의 산막효모수 변화

n.d: not detected

○ -1℃

- 산막효모: 시판 김치냉장고의 온도인 영하 1℃ 저장 65일차의 무처리구와 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액(1, 3, 5%) 첨가구의 효모수를 측정된 결과, 각각 매끄러운 효모와 거친 효모가 약 2~3 log CFU/mL 검출되었으며 자몽종자추출물과 유카추출물을 처리한 시료는 저장 90일차에 각각 매끄러운 효모와 거친 효모가 약 3~4 log CFU/mL 검출되었음. 한편 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액(1, 3, 5%)를 처리한 시료는 저장 120일까지 효모가 검출되지 않음(Figure 67).
- 유산균: 저장기간에 따라 유산균의 수를 측정된 결과, -1℃ 저장 약 42~50일 만에 모든 시료의 유산균수가 약 8 log CFU/mL에 도달함. 이후 저장 120일까지 약 7~8 log CFU/mL의 유산균이 유지됨(data not shown).
- 식중독균: -1℃ 저장 120일 동안 총 10종의 식중독균 검출여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 식중독균이 검출되지 않았음(data not shown).

☞ 본 연구에서 개발천연항균제인 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액은 식중독균의 제어 뿐만 아니라 김치 내 존재하는 부패균인 산막효모를 기존보존제(자몽종자추출물, 유카추출물)보다 훨씬 효과적으로 제어함. 그러나 김치 발효와 관련된 유산균의 생육에는 영향을 주지 않음을 확인함.

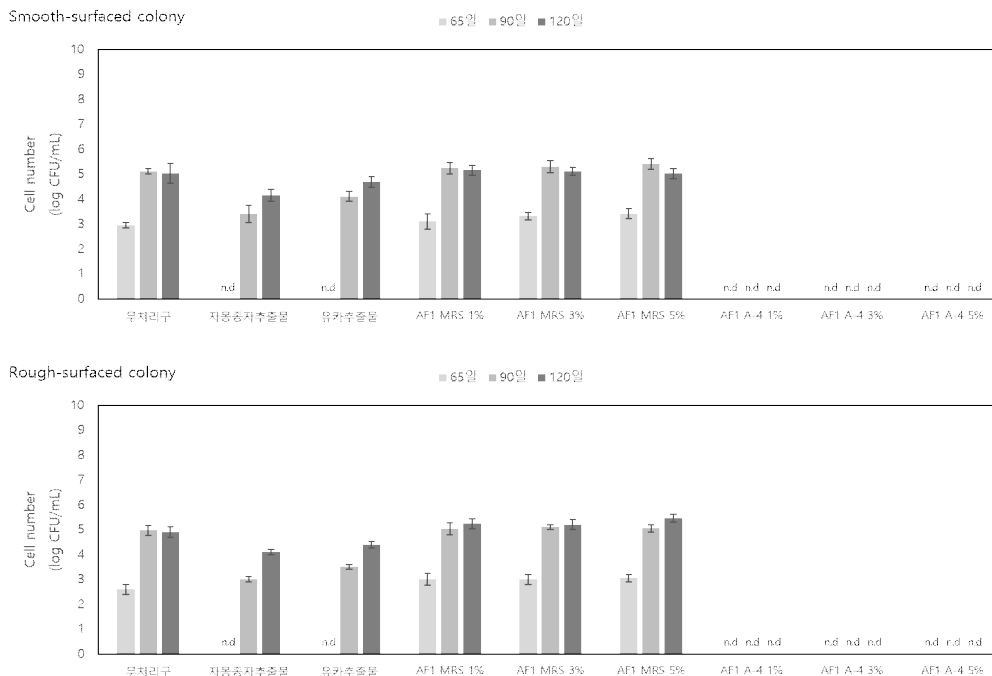


Figure 67. 각 첨가구별 -1℃ 저장 중 김치의 산막효모수 변화

n.d: not detected

③ 관능적 특성 조사

- 담금 직후: 담금 직후 김치에 기존천연보존제인 자몽종자추출물과 유카추출물을 첨가한 김치의 관능 결과는 대조구 대비 이미나 이취, 외관상에 변화에 차이가 없는 것으로 조사됨. 개발 천연항균소재인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 1% 첨가구 또한 대조구와 비교하였을시 이미, 이취, 외관상에 차이가 없음을 확인함(Table 58).
- -1℃, 45일: 담금 직후 항균제를 처리한 김치를 -1℃에서 저장 45일 저장 후 관능을 실시한 결과, 기존천연보존제인 자몽종자추출물 첨가구에서 부정적인 이미나 이취(이미: -0.88점, 이취: -0.63점)가 느껴졌으며, 유카추출물 첨가구와 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 1% 첨가구에서는 대조구 대비 이미나 이취, 외관상 차이가 없음을 확인함(Table 58).

☞ 본 연구의 개발천연항균제인 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액은 담금 직후 혹은 저장 후 김치에 관능적 이미나 이취, 외관상 영향을 주지 않음.

Table 58. 첨가구별 김치의 관능평가

관능 시기	평가 항목	대조구 (기준)	자몽종자 추출물	유카추출물	AF1 A-4 1%
담금 직후	이 미	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	이 취	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
-1℃, 저장 45일	이 미	0.00±0.00	-0.88±0.35	0.00±0.00	0.00±0.00
	이 취	0.00±0.00	-0.63±0.52	0.00±0.00	0.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

* -2점: 매우 나쁘다, -1점: 나쁘다, 0점: 차이가 없다, 1점: 좋다, 2점: 매우 좋다

④ 신규 천연항균소재 적용식품(김치)의 유통기한 설정

- 김치를 구입 후 소비하는 기간을 고려한 개봉 보관 실험시, 4℃ 냉장보관 중 대조구 대비 약 12일의 산막효모생육 저해 효과를 보여주었으며 밀봉 보관 실험시, 25℃를 제외한 15℃, 4℃, -1℃에서 120일간 산막효모가 검출되지 않았음. 이로써 4℃ 기준 2개월 이상 저장에서도 산막효모가 불검출되어 산막효모제어제로써 뛰어난 효과를 나타냄. 특히 기존 산막효모제어제인 자몽종자추출물이나 유카추출물 보다는 가장 강력한 산막효모제임을 알 수 있음.
- 이는 관능 평가를 통하여 개발천연항균제인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지

(A-4) 배양상징액이 김치 자체의 맛과 향 등에는 영향을 주지 않음을 확인하였고 저장 후 관능시에도 김치 본래의 발효에 영향을 주지 않아 대조구와 차이가 없음을 확인하였음. 반면 자몽종자추출물은 저장 후 이미나 이취로 인해 김치자체의 관능에 영향을 줌.

- 시료의 보관상태가 개봉 보관과 밀봉 보관 모두에서 개발 천연항균제에서 산막효모 제어 효과가 가장 높음.
- ☞ 본 개발항균제 적용에 따른 상품김치의 유통기한은 15℃ 이하 온도에서 120일 이상으로 확인됨.

※ 천연항균소재 처리에 의한 산막효모 제어 연장 효과

< 개봉 보관시 >

저장 온도	무처리구 대비 산막효모 제어 연장 효과(일)			
	자몽종자추출물 첨가구	유카추출물 첨가구	AF1 MRS 첨가구	AF1 A-4 첨가구
25℃	+2	+1.5	0	+6.5
15℃	+2	0	-0.5	+10
4℃	+5	+5	-3	+12

< 밀봉 보관시 >

저장 온도	무처리구 대비 산막효모 제어 연장 효과(일)			
	자몽종자추출물 첨가구	유카추출물 첨가구	AF1 MRS 첨가구	AF1 A-4 첨가구
25℃	+2	+1	0	+12
15℃	+6.5	+3	-0.5	+100.5
4℃	+10	+8	-1.5	+77.5
-1℃	+28	+13	-1.5	+57.5

- 시료 ②: 협동기관 수출김치 + *E. coli* O157:H7 1승 혹은 2승 첨가
- 목적: 김치로 인한 식중독 사고 발생·적발 건수를 조사한 결과, 10년 간 약 11건의 식중독 사고가 발생하거나 적발된 바 있으며 이때 *E. coli* O157:H7에 의한 식중독 발생·적발이 가장 높게 나타남. 이에 김치 내 *E. coli* O157:H7를 인위적으로 접종하여 천연항균소재인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액을 처리함으로써 *E. coli* O157:H7 제어 효과를 확인하고자 함.
- 대조구
 - ① 무처리구
 - ② 기존천연보존제 처리구 (자몽종자추출물 0.03%, 유카추출물 0.2%)
- 실험구
 - ① *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 1%
- 보관 형태 및 온도: 밀봉 보관, 25°C, 15°C, 4°C
- 조사항목
 - ① 저장기간에 따른 미생물 조사: 유산균, *E. coli* O157:H7, 식중독균 8종(p. 162)
 - i) 25°C
 - *E. coli* O157:H7: 김치 내 초기 *E. coli* O157:H7을 1 log CFU/mL와 2 log CFU/mL로 접종하여 25°C 저장하여 1일 간격으로 *E. coli* O157:H7 균수를 측정된 결과, 저장 1일차에 모든 시료에서 *E. coli* O157:H7이 완전히 제어됨을 확인함(data not shown). 이는 김치가 발효됨에 따라 pH가 내려감으로써(약 pH 4.0) *E. coli* O157:H7이 생육할 수 없게 됨을 나타내며 이는 실제 김치로 인한 식중독 사고의 경우 덜 익은 김치나 생김치에서 발생하는 것과 같음.
 - 유산균: 0일차 김치의 유산균수는 약 5 log CFU/mL로 나타났으며 25°C 저장 1일차에 모든 시료의 유산균수는 약 8 log CFU/mL에 도달하였으며 저장 3일간 유지됨(data not shown). 이로써 천연항균소재인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액의 처리가 김치 자체의 발효와 관련된 유산균에 영향을 주지 않음을 확인함.
 - 식중독균: 식품공전 상 김치류 규격에 해당되는 *E. coli* O157:H7을 제외한 식중독균 9종의 검출 여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 25°C 저장기간 3일 동안 검출되지 않음을 확인하였음(data not shown).
 - ii) 15°C
 - *E. coli* O157:H7: 김치를 15°C 저장하여 1일 간격으로 *E. coli* O157:H7의 균수를 측정된 결과, 저장 5일 만에 모든 시료에서 *E. coli* O157:H7이 완전히 제어됨(data not shown). 이 또한 빠른 속도로 발효가 진행됨에 따라 pH가 낮아져(약 pH 4.0) 모든 시료에서 *E. coli* O157:H7이 모두 제어됨을 의미함.

- 유산균: 모든 시료가 15°C 저장 3일 만에 유산균가 약 8 log CFU/mL에 도달하였으며 저장 7일간 유지가 되는 것을 확인함(data not shown).
 - 식중독균: 식품공전 상 *E. coli* O157:H7를 제외한 총 9종의 식중독균 검출 결과, 모든 시료에서 15°C 저장 7일간 식중독균이 검출되지 않음(data not shown).
- iii) 4°C
- *E. coli* O157:H7: *E. coli* O157:H7을 2승 접종한 대조구와 기존 천연보존제인 자몽종자추출물, 유카추출물을 처리한 시료에서는 저장 15일까지 *E. coli* O157:H7이 검출되었으나 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액을 처리한 시료에서는 *E. coli* O157:H7 2승 접종시 저장 9일만에 3승 접종시 저장 15일 만에 완전히 제어됨. 저장 17일 이후에는 김치 자체의 pH가 pH 4.0 이하로 낮아짐에 따라 모든 시료에서 *E. coli* O157:H7이 검출되지 않음(Table 59).
 - 유산균: 4°C 저장시 모든 김치 시료의 유산균수는 13일 만에 약 8 log CFU/mL에 도달하였으며 저장 17일동안 유지됨(data not shown).
 - 식중독균: 식품공전 상 *E. coli* O157:H7를 제외한 총 9종의 식중독균 검출 결과, 모든 시료에서 4°C 저장 30일간 식중독균이 검출되지 않음(data not shown).

Table 59. 각 첨가구별 4°C 저장 중 김치의 *E. coli* 수 변화

항균제 처리		보관일수		생균수 (log CFU/mL)					
		0일	3일	9일	11일	15일	19일		
무처리구		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	
<i>E. coli</i> 2승	대조구	2.09±0.09	2.41±0.38	1.87±0.51	1.71±0.61	1.59±0.58	n.d		
	GSE 1%	2.07±0.02	2.26±0.24	1.46±0.15	1.16±0.28	0.67±0.58	n.d		
	YE 1%	2.05±0.08	2.33±0.25	1.36±0.10	1.26±0.24	0.67±0.58	n.d		
	AF1 1%	2.05±0.08	1.63±0.65	n.d	n.d	n.d	n.d		
<i>E. coli</i> 3승	대조구	3.03±0.05	3.38±0.13	2.67±0.35	2.09±0.82	1.76±0.15	n.d		
	GSE 1%	3.03±0.05	3.11±0.12	2.22±0.81	1.99±0.04	1.46±0.15	n.d		
	YE 1%	3.07±0.02	3.22±0.22	2.26±0.71	1.57±0.53	1.69±0.09	n.d		
	AF1 1%	3.04±0.04	2.98±0.02	1.67±1.44	1.13±1.00	n.d	n.d		

n.d: not detected

GSE: 자몽종자추출물 처리구, YE: 유카추출물 처리구

AF1: *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 처리구

iv) -1°C

- *E. coli* O157:H7: *E. coli* O157:H7을 2승과 3승으로 각각 접종한 김치의 대조구는 약 저장 30일까지 *E. coli* O157:H7이 검출됨. 기존 천연보존제(자몽종자추출물, 유카추출물)를 처리한 시료에서도 저장 30일까지 *E. coli* O157:H7가 검출됨. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액을 처리한 시료에서는 *E. coli* O157:H7 접종 김치 2승, 3승에서 각각 15일, 20일 만에 완전히 제어되는 것을 확인함.

-1°C 저장 김치 또한 저장 35일 이후 김치 자체의 pH가 낮아짐에 따라 모든 시료에서 *E. coli* O157:H7가 완전히 제어됨을 확인하였음(Table 60).

- 유산균: -1°C 저장 시 30일만에 모든 김치 시료의 유산균수가 약 8 log CFU/mL에 도달하였으며 이는 저장 기간 동안 유지되었으며 시료 간에 차이가 없음을 확인하였음(data not shown). 식중독균 검출 결과, 모든 시료에서 저장 기간 동안 식중독균이 검출되지 않음(data not shown).
- 식중독균: 식품공전 상 *E. coli* O157:H7를 제외한 총 9종의 식중독균 검출 결과, 모든 시료에서 -1°C 저장 30일간 식중독균이 검출되지 않음(data not shown).
- ☞ 본 연구에서 개발천연항균제인 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액은 김치 내 인위적으로 접종한 식중독 미생물인 *E. coli* O157:H7와 더불어 식품공전상 김치류 규격에 해당하는 9종의 식중독균의 생육을 완전히 제어함을 검증함. 그러나 김치발효유산균의 생육에는 영향을 미치지 않음을 확인함.

Table 60. 각 첨가구별 -1°C 저장 중 김치의 *E. coli* 수 변화

항균제 처리		보관일수		생균수 (log CFU/mL)			
		0일	10일	15일	20일	25일	40일
무처리구		n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>E. coli</i> 2승	대조구	2.09±0.09	1.97±0.06	1.65±0.56	1.34±0.19	1.22±0.24	n.d
	GSE 1%	2.05±0.08	1.44±0.13	1.10±0.17	1.06±0.10	0.90±0.15	n.d
	YE 1%	2.05±0.08	1.72±0.16	1.10±0.17	1.10±0.17	0.90±0.17	n.d
	AF1 1%	2.07±0.02	0.88±0.83	n.d	n.d	n.d	n.d
<i>E. coli</i> 3승	대조구	3.03±0.05	2.17±0.11	2.20±0.17	1.90±0.05	1.76±0.06	n.d
	GSE 1%	3.07±0.02	1.75±0.37	1.70±0.17	1.74±0.13	1.52±0.31	n.d
	YE 1%	3.04±0.04	1.89±0.21	1.76±0.10	1.59±0.11	1.47±0.07	n.d
	AF1 1%	3.03±0.05	1.09±0.13	1.10±0.17	n.d	n.d	n.d

n.d: not detected

GSE: 자몽종자추출물 처리구, YE: 유카추출물 처리구

AF1: *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 처리구

(나) 청국장

- 시료 ①: 협동기관 청국장

- 목적: 식중독균인 *B. cereus*는 청국장 가공 과정 중 콩을 삶기 위한 가열 공정이 있음에도 불구하고 포자를 형성하여 잔존하여 청국장 등 장류의 식중독 원인균으로 손꼽힘. 이에 기존 천연보존제를 사용하지 않은 청국장에 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액을 처리함으로써 *B. cereus* 제어 효과를 확인하고자 함.

- 대조구

- ① 무처리구
- ② 기존보존제 처리구 (발효주정)

- 실험구

- ① *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액 1%, 2%
- ② *B. subtilis* SN7 TSB(실험실 배지) 배양상징액 1%, 2%

- 보관 형태 및 온도: 밀봉 보관, 37°C, 15°C, 4°C

- 조사항목

- ① 저장기간에 따른 미생물 균총 조사: 총균수, *B. cereus*, 식중독균 8종(p. 162)

○ 37°C

- *B. cereus*: 저장 0일차 청국장내 *B. cereus*수를 측정한 결과, 모든 시료에서 약 3 log CFU/mL가 자연적으로 존재함. 이는 청국장 원료에 존재하는 *B. cereus*의 포자일 것으로 추정됨. 무처리구의 경우 37°C 저장 1일 이후 약 4 log CFU/mL 이상의 *B. cereus*가 검출됨으로써 식품 규격에서 벗어나는 것을 확인할 수 있었음. 기존 시판 청국장에서 가장 많이 사용되고 있는 천연보존제 역할의 주정을 2.5%로 첨가한 청국장은 37°C 저장 7일 이후 *B. cereus*가 완전히 제어되었으며 *B. subtilis* SN7의 TSB(실험실용 배지), 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액을 처리한 시료는 모두 저장 2일 만에 *B. cereus*가 완전히 제어됨(Table 61).
- 총균수: 저장 기간 동안 청국장내 총균수를 측정한 결과, 저장 0일차에 모든 시료에서 약 7 log CFU/mL로 나타났으며 이는 저장 7일까지 유지됨을 확인하였으며 이는 시료 간에 차이가 없음(Table 61). 따라서 천연항균소재인 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙(D-3) 배양상징액은 청국장 자체에 발효에 관련된 미생물에는 영향을 주지 않음.
- 식중독균: 식품공전 상 장류 규격에 해당되는 식중독 미생물 중 *B. cereus*를 제외한 9종의 식중독 미생물(*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium perfringens*, 대장균

군) 검출 여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 저장기간 동안 검출되지 않음을 확인하였음(data not shown).

Table 61. 각 첨가구별 37°C 저장 중 청국장의 미생물 변화

< *Bacillus cereus* >

보관일수 항균제 처리	생균수 (log CFU/mL)					
	0일	1일	2일	3일	5일	7일
무처리구	3.09±0.02	4.14±0.29	4.27±0.18	4.34±0.12	4.28±0.17	4.24±0.15
주정 2.5%	3.10±0.04	3.36±0.10	3.06±0.05	2.88±0.09	2.10±0.17	n.d
SN7 TSB 1%	3.08±0.05	2.89±0.12	n.d	n.d	n.d	n.d
SN7 TSB 2%	3.10±0.02	2.84±0.15	n.d	n.d	n.d	n.d
SN7 D-3 1%	3.10±0.03	2.84±0.10	n.d	n.d	n.d	n.d
SN7 D-3 2%	3.09±0.04	2.88±0.09	n.d	n.d	n.d	n.d

< 총균수 >

보관일수 항균제 처리	생균수 (log CFU/mL)					
	0일	1일	2일	3일	5일	7일
무처리구	7.40±0.14	7.73±0.10	7.98±0.16	7.81±0.24	7.67±0.14	7.63±0.06
주정 2.5%	7.48±0.10	7.78±0.08	8.01±0.20	7.85±0.11	7.60±0.08	7.60±0.04
SN7 TSB 1%	7.32±0.09	7.76±0.12	7.94±0.10	7.88±0.03	7.61±0.14	7.59±0.11
SN7 TSB 2%	7.33±0.15	7.69±0.25	7.93±0.05	7.81±0.14	7.62±0.06	7.50±0.16
SN7 D-3 1%	7.30±0.13	7.74±0.10	7.95±0.12	7.83±0.13	7.68±0.06	7.58±0.09
SN7 D-3 2%	7.43±0.17	7.77±0.02	7.99±0.05	7.81±0.16	7.68±0.04	7.58±0.01

n.d: not detected

주정 2.5%: 주정 처리구

SN7 TSB: *B. subtilis* SN7 TSB 배양상징액 처리구

SN7 D-3: *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙(D-3) 배양상징액 처리구

○ 15°C

- *B. cereus*: 무처리구의 청국장은 15°C 저장 10일 이후 약 4 log CFU/mL 이상의 *B. cereus*가 검출되었으며 주정 처리구는 저장 50일까지 약 1 log CFU/mL 의 *B. cereus*가 검출됨. 반면 *B. subtilis* SN7의 TSB, 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액 처리구는 각각 저장 30일 이후 *B. cereus*가 완전히 제어되는 것을 확인함(Table 62).
- 총균수: 저장 기간 동안에 청국장내 총균수를 측정된 결과는 Table 62에 보이는 바와 같이 저장 0일차 약 7 log CFU/mL의 미생물이 검출되었으며 이는 저장 50일 까지 유지되었으며 천연항균소재의 처리에 따른 시료 간에 차이는 없음을 확인함.
- 식중독균: *B. cereus*를 제외한 9종의 식중독 미생물 검출 여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 저장기간 동안 검출되지 않음을 확인하였음(data not shown).

Table 62. 각 첨가구별 15°C 저장 중 청국장의 미생물 변화

< *Bacillus cereus* >

보관일수 항균제 처리	생균수 (log CFU/mL)					
	0일	10일	20일	30일	40일	50일
무처리구	3.09±0.02	4.05±0.20	4.13±0.08	4.20±0.02	4.51±0.06	4.43±0.08
주정 2.5%	3.10±0.04	2.20±0.11	1.58±0.11	1.30±0.13	1.09±0.01	0.68±0.12
SN7 TSB 1%	3.15±0.08	2.01±0.04	1.28±0.02	n.d	n.d	n.d
SN7 TSB 2%	3.11±0.02	2.02±0.08	1.20±0.05	n.d	n.d	n.d
SN7 D-3 1%	3.10±0.03	2.01±0.03	1.27±0.03	n.d	n.d	n.d
SN7 D-3 2%	3.09±0.04	2.01±0.17	1.18±0.05	n.d	n.d	n.d

< 총균수 >

보관일수 항균제 처리	생균수 (log CFU/mL)					
	0일	10일	20일	30일	40일	50일
무처리구	7.40±0.14	7.60±0.02	7.71±0.01	7.72±0.01	7.65±0.13	7.59±0.01
주정 2.5%	7.48±0.10	7.53±0.06	7.75±0.03	7.81±0.02	7.76±0.02	7.51±0.12
SN7 TSB 1%	7.35±0.12	7.59±0.03	7.37±0.14	7.80±0.10	7.61±0.15	7.49±0.15
SN7 TSB 2%	7.32±0.18	7.58±0.11	7.47±0.08	7.80±0.08	7.66±0.08	7.44±0.13
SN7 D-3 1%	7.30±0.13	7.60±0.01	7.72±0.15	7.75±0.16	7.69±0.19	7.40±0.15
SN7 D-3 2%	7.43±0.17	7.59±0.11	7.52±0.08	7.79±0.05	7.71±0.06	7.54±0.18

n.d: not detected

주정 2.5%: 주정 처리구

SN7 TSB: *B. subtilis* SN7 TSB 배양상징액 처리구

SN7 D-3: *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙(D-3) 배양상징액 처리구

○ 4°C

- *B. cereus*: 무처리구의 청국장은 4°C 저장 15일 이후 약 4 log CFU/mL 이상의 *B. cereus*가 검출되었으며 주정 처리구는 저장 55일까지 약 1~2 log CFU/mL 의 *B. cereus*가 검출됨. *B. subtilis* SN7의 TSB, 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액을 처리한 실험구에서는 각각 저장 35일 이후 *B. cereus*가 완전히 제어됨(Table 63).
- 총균수: 청국장의 총균수 측정 결과, 모든 시료에서 약 7 log CFU/mL로 저장 기간 50일 동안 유지되는 것을 확인하였음. 한편 *B. cereus* 외 다른 식중독은 검출되지 않음(Table 63).
- 식중독균: *B. cereus*를 제외한 9종의 식중독 미생물 검출 여부를 확인한 결과, 모든 시료에서 저장기간 동안 검출되지 않음을 확인하였음(data not shown).

☞ 본 연구의 개발천연항균제인 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙(D-3) 배양상징액은 청국장내 식중독 미생물인 *B. cereus*를 완전히 제어함을 검증함. 그러나 청국장 내 자체 발효 미생물에는 영향을 주지 않음을 확인함.

Table 63. 각 첨가구별 4℃ 저장 중 청국장의 미생물 변화

< *Bacillus cereus* >

보관일수 항균제 처리	생균수 (log CFU/mL)					
	0일	15일	25일	35일	45일	55일
무처리구	3.09±0.02	4.03±0.18	4.18±0.03	4.25±0.15	4.37±0.35	4.28±0.15
주정 2.5%	3.10±0.04	2.42±0.38	2.02±0.12	1.66±0.32	1.56±0.49	1.65±0.30
SN7 TSB 1%	3.11±0.02	2.09±0.01	1.55±0.07	n.d	n.d	n.d
SN7 TSB 2%	3.14±0.10	2.15±0.14	1.38±0.23	n.d	n.d	n.d
SN7 D-3 1%	3.10±0.03	2.10±0.17	1.36±0.10	n.d	n.d	n.d
SN7 D-3 2%	3.09±0.04	2.00±0.01	1.42±0.10	n.d	n.d	n.d

< 총균수 >

보관일수 항균제 처리	생균수 (log CFU/mL)					
	0일	15일	25일	35일	45일	55일
무처리구	7.40±0.14	7.49±0.10	7.25±0.13	7.16±0.22	7.24±0.05	7.20±0.15
주정 2.5%	7.47±0.10	7.37±0.19	7.30±0.16	7.17±0.23	7.25±0.26	7.15±0.13
SN7 TSB 1%	7.45±0.03	7.35±0.01	7.38±0.11	7.15±0.01	7.19±0.03	7.08±0.12
SN7 TSB 2%	7.38±0.15	7.38±0.10	7.25±0.03	7.18±0.06	7.18±0.01	7.22±0.19
SN7 D-3 1%	7.30±0.13	7.34±0.20	7.41±0.08	7.20±0.13	7.16±0.08	7.20±0.20
SN7 D-3 2%	7.43±0.17	7.40±0.09	7.11±0.23	7.24±0.19	7.14±0.13	7.18±0.10

n.d: not detected

주정 2.5%: 주정 처리구

SN7 TSB: *B. subtilis* SN7 TSB 배양상징액 처리구

SN7 D-3: *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙(D-3) 배양상징액 처리구

② 관능적 특성 조사

- 청국장의 관능 검사는 본래 청국장 그대로 관능하는 것과 청국장에 10배 가수한 뒤 소금간을 한 청국장 국물 관능 하는 것으로 나누어 관능을 진행함.
- 담금 직후: 담금 직후 청국장에 기존천연보존제인 주정을 첨가한 청국장의 관능 결과, 대조구 대비 외관상에는 별다른 차이가 없었으나 부정적인 이미나 이취(이미: -0.25점, 이취: -0.25점)가 느껴지는 것으로 나타남. 이는 청국장 국물의 형태로 관능 했을 때에도 주정을 첨가한 청국장 국물에서 이미나 이취가 느껴지는 것으로 나타남. 반면, 개발천연항균제인 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액을 첨가한 청국장의 관능 결과, 대조구 대비 이미나 이취, 외관상에 차이가 없었으며 청국장 국물 관능시에도 동일한 관능 결과를 나타냄.
- 4℃, 45일: 담금 직후 항균제를 처리한 청국장을 4℃에서 45일간 저장 후 관능을 실시한 결과, 청국장을 그대로 관능 하였을 경우 개발천연항균제인 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액을 처리한 청국장에서

청국장 특유의 쿼퀴한 향과 같은 이미나 이취가 덜 느껴짐으로써 관능적으로 우수함을 확인함.

Table 64. 첨가구별 청국장 및 청국장 국물의 관능평가

< 청국장 >

관능 시기	평가 항목	대조구 (기준)	주정 2.5%	SN7 D-3 1%
담금 직후	이 미	0.00±0.00	-0.25±0.46	0.00±0.00
	이 취	0.00±0.00	-0.25±0.46	0.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
4℃, 저장 45일	이 미	0.00±0.00	0.00±0.00	0.13±0.35
	이 취	0.00±0.00	0.00±0.00	1.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

< 청국장 국물 >

관능 시기	평가 항목	대조구 (기준)	주정 2.5%	SN7 D-3 1%
담금 직후	이 미	0.00±0.00	-0.13±0.35	0.00±0.00
	이 취	0.00±0.00	-0.13±0.35	0.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
4℃, 저장 45일	이 미	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	이 취	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

* -2점: 매우 나쁘다, -1점: 나쁘다, 0점: 차이가 없다, 1점: 좋다, 2점: 매우 좋다

☞ 본 연구의 개발천연항균제인 *B. subtilis* SN7의 폐절입배추즙배지(D-3) 배양상징액은 담금 직후 청국장에는 이미나 이취, 외관상에 영향을 주지 않으며 냉장보관 후(저장 45일) 오히려 대조구 대비 이미나 이취가 향상되는 결과를 보여줌.

- 시료 ②: 실험실 제조 청국장

- 목적: *B. subtilis* SN7의 종균에 의한 청국장 발효 및 유해 식중독균 저해

- 대조구

① *B. cereus* KCTC 3624 영양세포 단독 접종: 3 또는 4 log CFU/g

② *B. cereus* KCTC 3624 포자 단독 접종: 3 또는 4 log CFU/g

- 실험구

① *B. subtilis* SN7 영양세포 단독 접종: 6 log CFU/g

② *B. subtilis* SN7 영양세포 6 log CFU/g

+ *B. cereus* KCTC 3624 영양세포 3 또는 4 log CFU/g

③ *B. subtilis* SN7 영양세포 6 log CFU/g

+ *B. cereus* KCTC 3624 포자 3 또는 4 log CFU/g

- 보관 형태 및 온도: 개봉 보관, 4℃

- 조사항목

① 저장기간에 따른 미생물 조사: *B. subtilis* SN7, *B. cereus* KCTC 3624

○ *B. subtilis* SN7 + *B. cereus* KCTC 3624 영양세포

- *B. subtilis* SN7을 단독으로 접종한 청국장의 경우, 40℃ 발효 후 약 8 log CFU/mL에 도달하여 4℃ 저장 180일간 유지되었으며 *B. cereus*의 영양세포를 단독으로 접종한 청국장 또한 발효 후 저장 기간 동안 약 8 log CFU/mL를 유지함. 하지만 *B. subtilis* SN7과 *B. cereus*의 영양세포를 함께 접종한 청국장의 경우, 발효 후 *B. subtilis* SN7은 약 8 log CFU/mL에 도달하여 유지가 되는 반면 *B. cereus*는 발효 후 완전히 제어되는 것을 확인할 수 있었음(Figure 68).

○ *B. subtilis* SN7 + *B. cereus* KCTC 3624 포자

- *B. cereus*의 포자를 단독으로 접종한 청국장의 경우, 발효 후 약 8 log CFU/mL로 유지되었지만 *B. subtilis* SN7과 *B. cereus*의 포자를 함께 접종한 청국장의 경우, *B. subtilis* SN7은 약 8 log CFU/mL에 도달하여 유지되는 반면 *B. cereus*는 발효 후 완전히 제어되어 저장 180일까지 검출되지 않음(Figure 69).

☞ *B. subtilis* SN7은 청국장 발효 종균으로써 사용이 가능함과 동시에 *B. subtilis* SN7이 생산하는 항균물질 작용에 의해 유해 식중독균 *B. cereus*의 생육을 완벽히 제어함을 확인함.

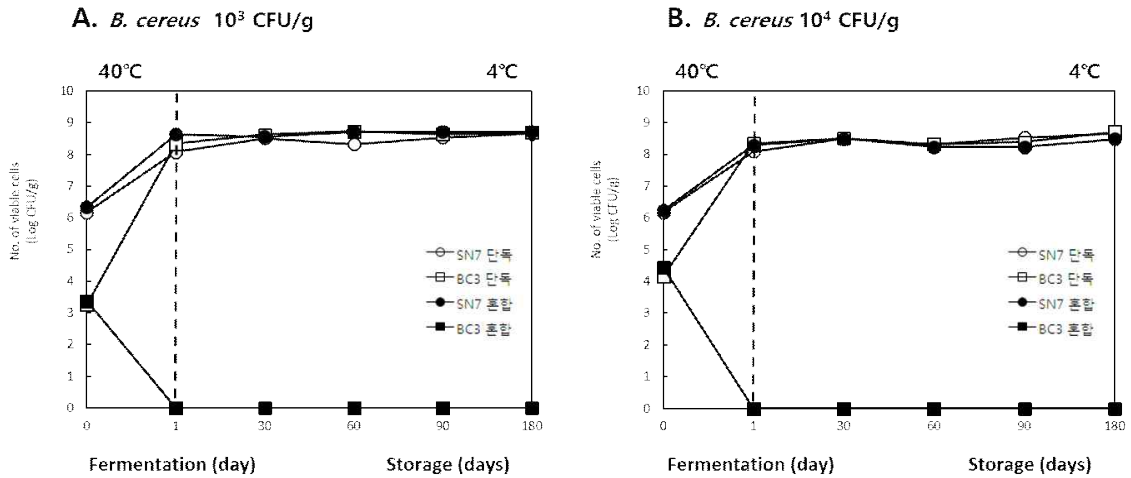


Figure 68. *Bacillus subtilis* SN7과 *Bacillus cereus* 영양세포를 공동 접종한 청국장의 균수 변화
 SN7 단독: *B. subtilis* SN7 단독배양 / BC3 단독: *B. cereus* 단독배양
 SN7 혼합: *B. subtilis* SN7 혼합배양 / BC3 혼합: *B. cereus* 혼합배양

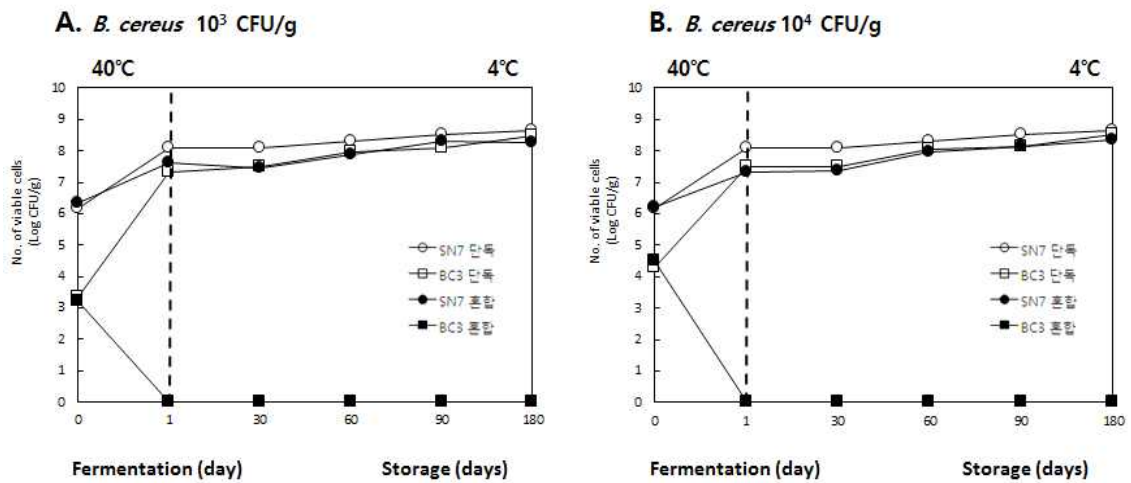


Figure 69. *Bacillus subtilis* SN7과 *Bacillus cereus* 포자를 공동 접종한 청국장의 균수 변화
 SN7 단독: *B. subtilis* SN7 단독배양 / BC3 단독: *B. cereus* 단독배양
 SN7 혼합: *B. subtilis* SN7 혼합배양 / BC3 혼합: *B. cereus* 혼합배양

(다) 샐러드

- 시료: 시판 샐러드 + *E. coli* O157:H7 1 또는 2 log CFU/g
- 목적: 신선식품으로 인한 식중독 사례를 조사한 결과 *E. coli* O157:H7로 인한 식중독이 다수 보고되고 있음. 따라서 샐러드 내 *E. coli* O157:H7를 인위적으로 접종하여 천연항균소재인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지 배양상징액과 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액을 처리함으로써 *E. coli* O157:H7 제어 효과를 확인하고자 함.

- 대조구

- ① 무처리구
- ② 기존보존제 처리구(주정)

- 실험구

- ① *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%
- ② *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%
- ③ *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%
+ *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%

- 보관 형태 및 온도: 밀폐 보관, 37°C, 15°C, 4°C

- 조사항목

① 무침가구 미생물 조사(식중독균 6종)

- 4°C, 15°C, 37°C 저장시 식품공전 상 즉석섭취식품 규격에 해당되는 식중독 미생물 중 *Bacillus cereus*를 제외한 식중독균(*E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, 대장균)은 검출되지 않음. 0일차에 관찰되는 *B. cereus*는 식품공전의 규격보다 낮은 검출률을 보이므로 문제되지 않음 (data not shown). 때문에 *E. coli* O157:H7을 인위적으로 1 또는 2 log CFU/g을 접종하여 실험을 진행하기로 함.

② 저장온도 및 기간에 따른 미생물 균총 조사(*E. coli* O157:H7)

○ 37°C

- *E. coli* O157:H7 1승 접종구: 셸러드에 초기 *E. coli* O157:H7을 1 log CFU/g으로 접종하여 37°C에서 1일 저장 후 *E. coli* O157:H7의 균수를 측정한 결과, 저장 1일차에 무처리구와 주정을 1% 처리한 대조구, *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%를 처리한 구간, *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%를 처리한 구간에서는 *E. coli* O157:H7의 생균수가 높게 나타남. 반면 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%를 혼합하여 처리한 구간에서는 *E. coli* O157:H7의 균수가 대조구에 비해 약 1 log CFU/g 정도 감소하는 것으로 나타남(Figure 70).
- 37°C 저장 2일 이후 모든 시료의 셸러드 걸 표면이 마르거나 연부현상이 일어나 더 이상 식품으로서 섭취가 불가능함을 판정하여 실험을 1일까지 진행하기로 함 (Figure 72).
- *E. coli* O157:H7 2승 접종구: 셸러드에 초기 *E. coli* O157:H7을 2 log CFU/g으로 접종하여 37°C에서 저장 1일 차에 무처리구에서 생균수가 높게 나타났고, 주정을 1% 처리한 대조구, *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%를 처리한 구간, *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%를 처리한 구간은 대조구에 비해

생균수가 약 0.5 log CFU/g 감소함. 반면 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%를 혼합하여 처리한 구간에서는 대조구에 비해 약 1.3 log CFU/g 감소하는 것으로 나타남(Figure 71).

○ 15°C

- *E. coli* O157:H7 1승 접종구: 저장 2일차에 무처리구와 주정 1% 처리구, *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3% 처리구, *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1% 처리구의 *E. coli* O157:H7 생균수가 유사하게 나타남. 반면 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%를 혼합처리한 경우 대조구에 비해 약 0.7 log CFU/g 생육저해가 나타남(Figure 70).
- 15°C 저장 3일 이후 모든 시료의 셀러드 겉 표면이 마르거나 연부현상이 일어나 더 이상 식품으로서 섭취가 불가능함을 판정하여 실험을 2일까지 진행하기로 함(Figure 72).
- *E. coli* O157:H7 2승 접종구: 저장 2일차에 *E. coli* O157:H7 1승 접종구와 마찬가지로 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%를 혼합 처리구를 제외한 모든 처리구는 무처리구와 유사한 생균수가 나타남. 반면 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%를 혼합 처리구에서는 약 1.0 log CFU/g 생육저해가 나타남(Figure 71).

○ 4°C

- *E. coli* O157:H7 1승 접종구: 저장 3일차에 주정 1% 처리구, *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3% 처리구는 무처리구와 유사하게 *E. coli* O157:H7 생균수가 나타남. 반면 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1% 처리구에서는 대조구보다 *E. coli* O157:H7의 생육저해가 관찰되었으며, *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지 배양상징액 1%의 혼합 처리구에서는 *E. coli* O157:H7의 생육저해가 가장 크게 나타나 초기 접종 균수보다 낮은 생균수를 나타냄. 시판셀러드의 섭취 요령에 따라 세척 후 *E. coli* O157:H7의 검출 여부를 확인해본 결과, 검출되지 않는 것을 확인함(Figure 70).
- 4°C 저장 4일 이후 모든 시료의 셀러드 겉 표면이 마르거나 연부현상이 일어나 더 이상 식품으로서 섭취가 불가능함을 판정하여 실험을 1일까지 진행하기로 함(Figure 72).
- *E. coli* O157:H7 2승 접종구: 저장 3일차에 주정 1% 처리구, *Lb. plantarum* AF1 폐

배추즙배지 배양 상징액 3% 처리구, *B. subtilis* SN7 절입폐배추즙배지는 무처리구와 유사하게 *E. coli* O157:H7 생균수가 증가함. 반면 *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지 배양상징액 3%와 *B. subtilis* SN7 폐절입배추즙배지 배양상징액 1%의 혼합 처리구에서는 *E. coli* O157:H7의 생육저해가 가장 크게 나타나 초기 균수보다 낮은 생균수를 나타냄. 셀러드 섭취 방법에 따라 세척 후 *E. coli* O157:H7의 생균수를 측정 한 결과, 검출되지 않음을 확인함(Figure 71).

☞ 낮은 저장온도와 천연항균소재를 병행하여 처리하면 huddle technology 효과에 의해 대조구(무처리구) 대비 *E. coli* O157:H7의 제어효과가 높아지는 것으로 나타남. 또한 *Lb. plantarum* AF1 항균제와 *B. subtilis* SN7 항균제를 단독 사용시보다 혼합 사용에 의해 *E. coli* O157:H7의 생육 저해 효과가 뛰어남을 알 수 있음.

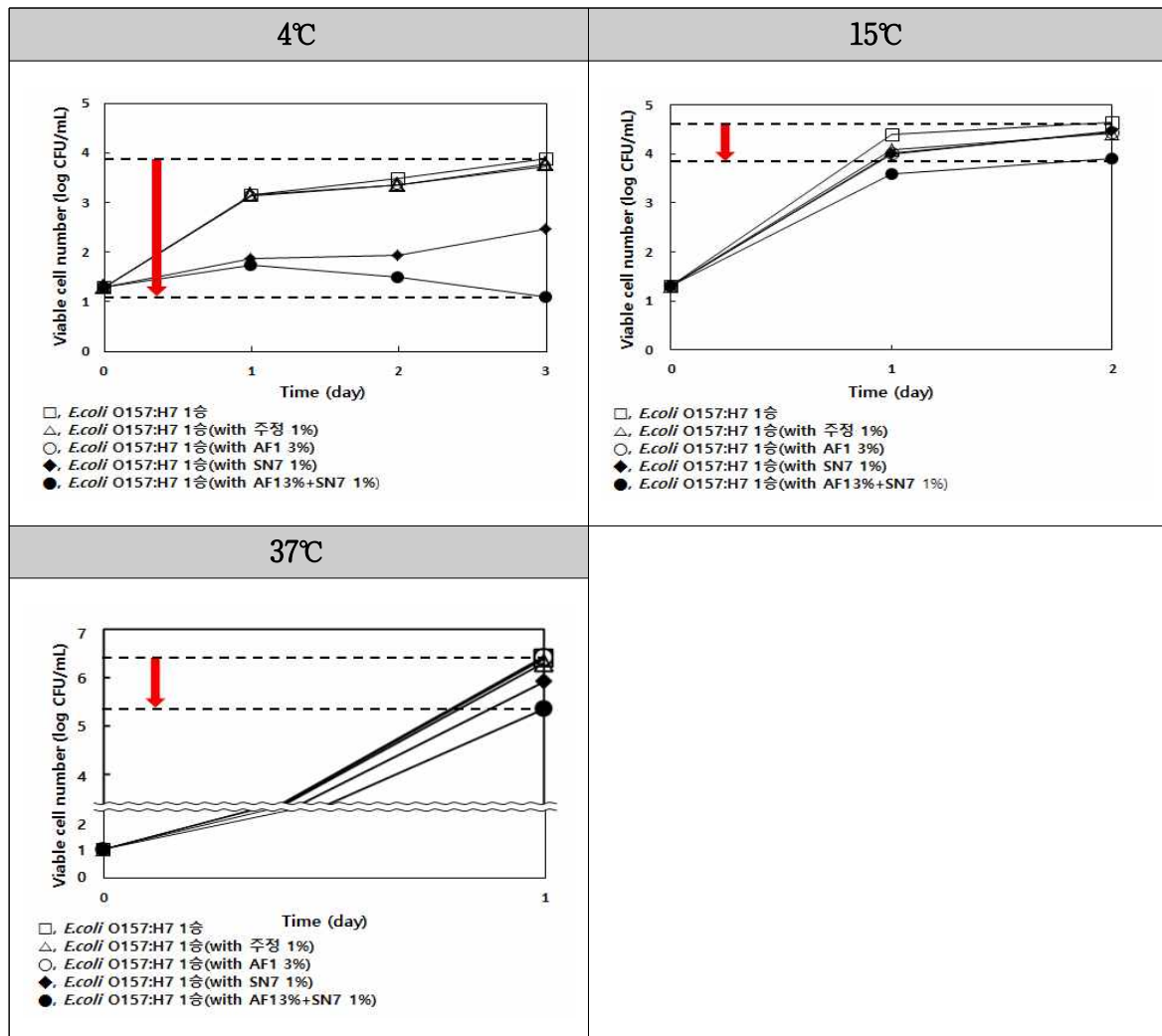


Figure 70. 접종 농도에 따른 온도별 셀러드의 *E. coli* 수 변화(*E. coli* 1승 접종구)

AF1: *Lb. plantarum* AF1 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 처리구
 SN7: *B. subtilis* SN7 폐절입배추즙배지(D-3) 배양상징액 처리구

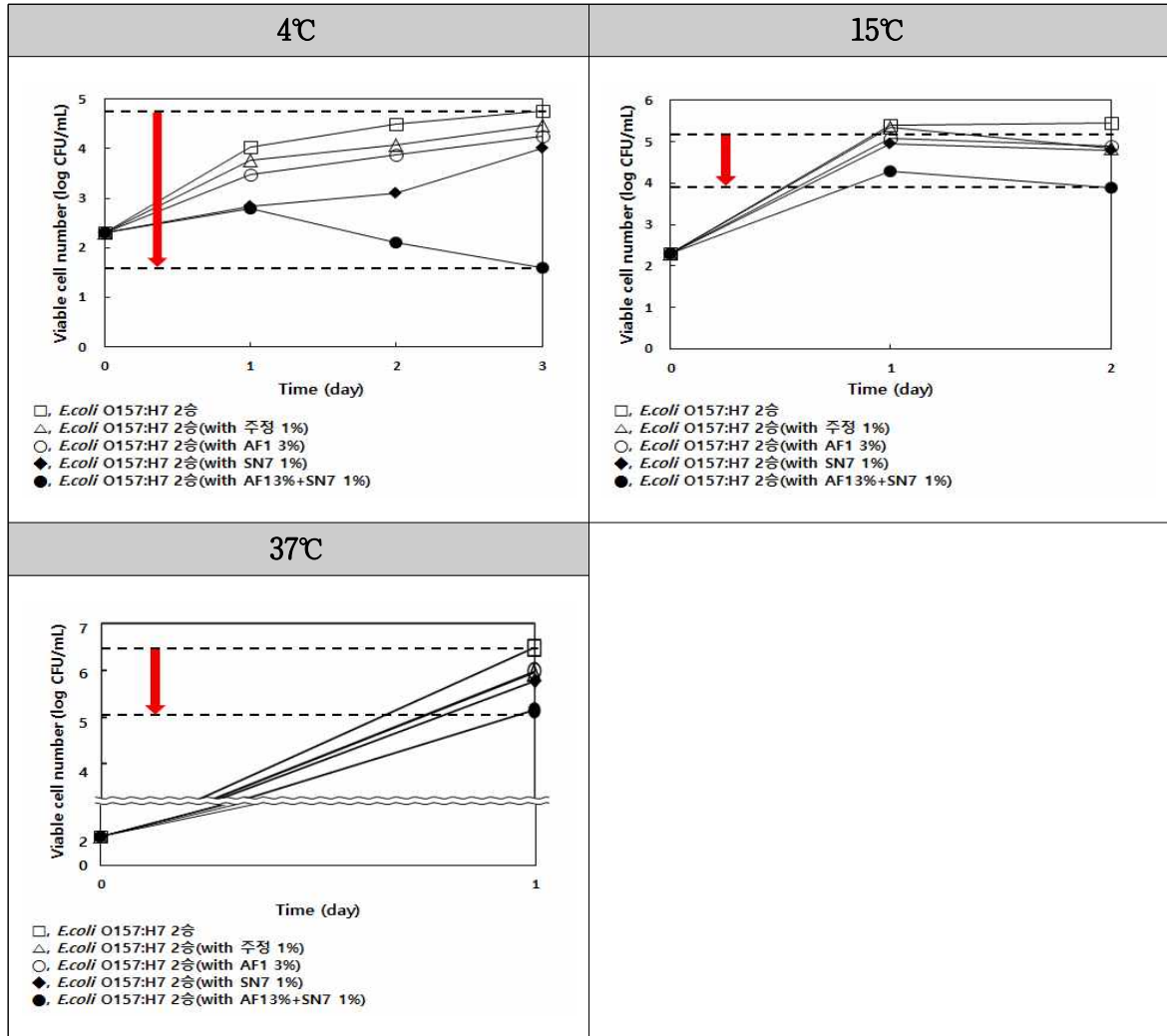











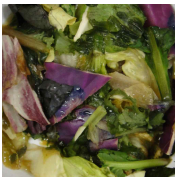





Figure 71. 접종 농도에 따른 온도별 샐러드의 *E. coli* 수 변화(*E. coli* 2승 접종구)

AF1: *Lb. plantarum* AF1 페배추즙배지(A-4) 배양상징액 처리구

SN7: *B. subtilis* SN7 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액 처리구

<37℃>

저장기간 \ 처리구	<i>E. coli</i> 2승	<i>E. coli</i> 2승 + 주정 1%	<i>E. coli</i> 2승 + AF1 3%	<i>E. coli</i> 2승 + SN7 1%	<i>E. coli</i> 2승 + AF1 3%/SN7 1%
0일					
1일					
2일					

<15℃>




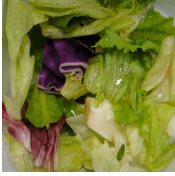














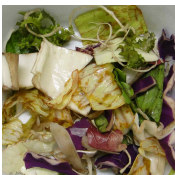
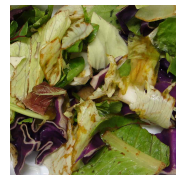
저장기간 \ 처리구	<i>E. coli</i> 2승	<i>E. coli</i> 2승 + 주정 1%	<i>E. coli</i> 2승 + AF1 3%	<i>E. coli</i> 2승 + SN7 1%	<i>E. coli</i> 2승 + AF1 3%/SN7 1%
0일					
1일					
2일					
3일					

Figure 계속

<4℃>

처리구 저장기간	<i>E. coli</i> 2승	<i>E. coli</i> 2승 + 주정 1%	<i>E. coli</i> 2승 + AF1 3%	<i>E. coli</i> 2승 + SN7 1%	<i>E. coli</i> 2승 + AF1 3%/SN7 1%
0일					
1일					
2일					
3일					
5일					
7일					

Figure 72. 각 온도별 저장 기간에 따른 샐러드 표면 변화

③ 관능적 특성 조사

- 셀러드의 관능 검사는 셀러드 섭취 요령에 따라 1회 세척 후 드레싱 없이 셀러드 그대로를 사용하여 관능을 진행함.
- 셀러드에 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 처리구 및 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액 처리구 모두에서 대조구 대비 이미나 이취, 외관상에 변화가 없었으며 이 둘을 함께 처리한 셀러드 또한 이미나 이취, 외관상에 변화가 없음을 확인하였음.

Table 65. 첨가구별 셀러드의 관능평가

관능 시기	평가 항목	대조구 (기준)	주정 2.5%	AF1 A-4 3%	SN7 D-3 1%	AF1 A-4 3% + SN7 D-3 1%
유통 직후	이 미	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	이 취	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

(라) 막걸리

- 시료: 시판 막걸리

- 목적: 시판 생막걸리의 변패미생물(산막효모)제어능 검증

- 대조구

① 무처리구

- 실험구

① *Lb. plantarum* HD1 조항균물질(SPE 부분정제물) 0.05%

- 보관 형태 및 온도: 밀폐 보관, 10℃

- 조사항목

① 무첨가구 미생물 조사

- 30℃에서 저장하며 생막걸리의 변패효모 검출여부를 관찰한 결과, Figure 71-A과 같이 저장 9일 이후 생막걸리 표면에 막이 형성되며 악취가 나는 것을 확인함. 이에 변패미생물 확인을 위해 효모용 실험실 배지인 YPD에 생막걸리를 희석하여 도말한 결과 Figure 71-B와 같이 거친 형태의 효모와 매끄러운 형태의 효모로 나뉘는 것을 확인함. 거친 형태의 효모는 악취가 나는 반면 매끄러운 형태의 효모는 알코올 발효취가 나는 것으로 보아 발효균주임을 알 수 있었음. 이에 거친 형태의 효모를 16S rRNA를 통해 동정한 결과, *Pichia membranifaciens*임을 확인함. 이에 유통되는 냉장온도인 10℃에서 30일간 저장하며 천연항균소재로 *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물)을 첨가한 생막걸리의 변패효모인 산막효모 검출여부를

확인하고자 함.

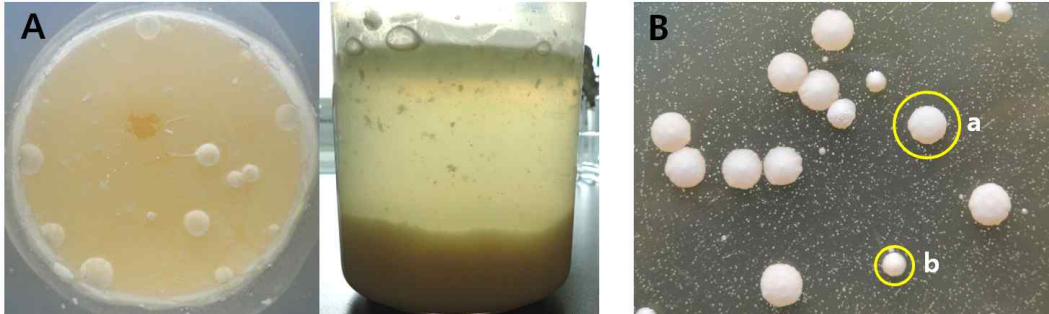


Figure 73. 30°C 저장 9일차 생막걸리(무처리구)의 표면(A)과 이로부터 분리된 효모 2종(B-a: 거친 효모, b: 매끄러운 효모)

② 천연항균소재에 의한 생막걸리의 산막효모 저해 효과

- 생막걸리의 유통기한 일반적으로 냉장보관(10°C 이하)에서 10일 이내로 제한되어 있음. 이에 생막걸리에 *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물)을 0.05% 처리하여 생막걸리 표면에서 관찰되는 산막효모의 형성 유무를 확인해 봄. Figure 71에 보여지는 바와 같이 무처리구의 생막걸리는 저장 11일 이후 생막걸리의 표면을 포함한 저장 용기의 벽면에도 산막효모가 관찰되기 시작하는 것을 확인할 수 있었음. 이후 저장 30일에는 완전히 산막효모에 의해 생막걸리의 표면을 비롯한 저장 용기의 입구까지 산막효모에 뒤덮였으며 관능적으로 심한 악취가 나는 것을 확인함. 반면 *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물)을 처리한 생막걸리는 저장 30일까지도 산막효모가 검출되지 않음을 확인함.

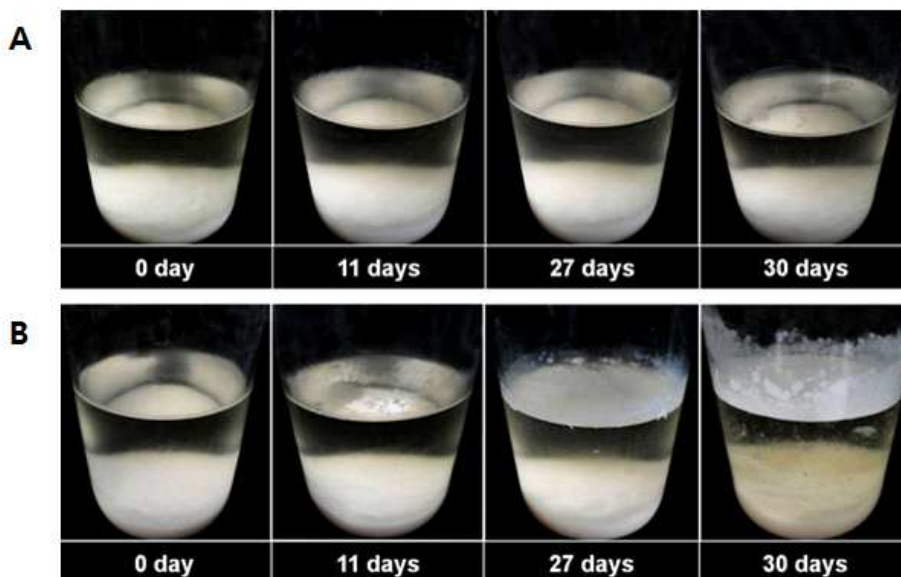


Figure 74. 10°C 저장 기간에 따른 생막걸리의 표면 관찰 (A: *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물) 첨가구, B: 무처리구)

③ 관능적 특성 조사

- 유통 직후 생막걸리를 구입하여 *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물)을 2.5% 첨가하여 대조구에 비해 이미나 이취, 외관상에 변화가 있는지 살펴봄. 관능 검사 결과, 개발천연항균소재인 *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물) 첨가로 인한 이미나 이취, 외관상에 변화가 없는 것으로 확인됨.
- ☞ 본 연구의 개발천연항균제인 *Lb. plantarum* HD1 조항균물질(SPE 부분정제물)은 생막걸리에 관능적 이미나 이취, 외관상 영향을 주지 않음.

Table 66. 첨가구별 막걸리의 관능평가

관능 시기	평가 항목	대조구 (기준)	HD1 SPE 0.05%
유통 직후	이 미	0.00±0.00	0.00±0.00
	이 취	0.00±0.00	0.00±0.00
	외 관	0.00±0.00	0.00±0.00

④ 신규 천연항균소재 적용식품의 유통기한 설정

- 본 개발항균제 적용에 따른 상품 생막걸리의 유통기한은 10℃ 이하 저온 저장에서 30일 이상임을 확인함(현재 수준: 10℃, 10일 이내)

제 2 장 [제1협동] 천연항균소재의 산업화 및 상품화

제 1 절 연구수행 방법

1. 천연항균소재의 산업화 및 상품화

가. 산업화를 위한 비가열 제품별 가공표준의 설정

(1) 비가열 제품의 제조 공정 확립

(가) 대량 생산 라인을 적용한 제품 제조 방법 설계

① 비가열 제품(김치)의 표준 제조 방법 설계

(나) 비가열 제품 기준 규격 설정

① 제품: 살균 제품 이외의 제품(김치, 젓갈류)을 선정

② 규격: 염도, 당도, pH, 산도 등

(2) 가공표준 적용 비가열 제품의 식중독 미생물 균총 확인

(가) 초기 식중독 미생물: 식중독 미생물 균총 및 정량 분석

① 제품: 김치류(포기김치 및 별미김치), 젓갈류 4종, 절임류 2종

② 식품공전 병원성 미생물 실험법에 의거하여 배지법으로 식중독 미생물 분석

나. 천연항균소재의 대량 생산 및 정제 기술 개발

(1) 대량 생산 기술 개발

(가) Lab scale 제조 공정 셋팅

① 항균활성생산균주(조선대 개발) 배양 후 농축

- i) 유산균 1종(*Lb. plantarum* AF1), 고초균 1종(*B. subtilis* SN7)

(나) 항균소재 항균력 확인

① 배양액과 농축액의 항균활성 확인

- i) Paper disc assay

- ii) 지시균으로 식중독/부패 미생물 세균 1종, 곰팡이 2종 사용

- 세균: *B. cereus* KCTC 3624

- 곰팡이: *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918, *Aspergillus ochraceus* PF-2

(다) 최적 배양 조건 확립

① 조건: 배양 시간, 배지, 온도

(라) Pilot scale 항균소재 제조 및 항균활성 확인

① Pilot scale 항균제 제조

- i) Pilot scale 제조 공정도 확립

- 배지 원료 혼합 → 유산균 접종 → 정제 → 농축

② 활성 확인 및 품질 안정성 확인

- i) 배양액과 농축액의 항균활성 확인

- ii) 지시균으로 식중독/부패 미생물 세균 1종, 곰팡이 2종 사용

(2) 정제를 통한 활성물질 농축

(가) 발효를 통한 산업화

① 식물성원료 사용 발효 진행, 발효 후 여과공정 및 농축

- i) 조선대 개발 식용 배지 사용 발효(A-4배지, D-3배지)

- ii) 확립된 pilot scale 공정도에 맞게 가공(여과, 농축)

(나) 활성확인 및 품질 안정성 확인

① 활성 확인 및 품질 안정성 확인

- i) 배양액과 농축액의 항균활성 확인

- ii) 지시균으로 식중독/부패 미생물 세균 1종, 곰팡이 2종 사용

다. 천연항균소재의 비가열 식품 적용 기술 개발(산업적 scale)

(1) 항균소재 식품 적용, 미생물 제어능 확인

(가) 대량생산 식품 유형별 적용 방법 설정

① 비가열 식품: 김치

- ② 적용 농도 결정: 항균소재 농도별 침가 후 미생물 수 확인
- ③ 분석 항목: 미생물(일반세균수, 식중독균, 부패균), 이화학(pH, 산도), 외관(팽창, 수분리 등), 관능평가

(나) 대량 생산 식품 내에서의 기존 천연 항균제와 활성 비교 검사

- ① 식품 적용 미생물 제어능 비교 확인
 - i) 신규 천연항균소재 적용균, 기존 천연보존제 적용 식품
 - ii) 분석 항목: 미생물(일반미생물, 식중독균, 부패균), 이화학(산도, pH 등), 외관(팽창, 수분리 등), 관능평가

라. 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발

(1) Data base 구축: 기존 천연 보존제 대체

(가) 기존 항균제 대체를 위한 활성 비교 검사

- ① 실험 방법: Agar diffusion method, 최소 저해 농도(MIC test)
- ② 저해 대상: 식중독균(세균, 곰팡이)/부패균(세균, 효모, 곰팡이)
- ③ 기존 항균제: 자몽종자추출물, 비타젠B, 안티크로DM

(2) Data base 구축: 식중독균 취약 제품군 적용 사례 구축

(가) 즉석 조리 제품, 단체 급식 제안

- ① 대상: 즉석 조리, 단체급식 등
- ② 샘플 수거, 초기 미생물 분석: 일반세균, 식중독균/부패균
- ③ 적용 공정 또는 방법 탐색: 혼입 단계, 적용 방법에 따른 미생물 확인

(3) 가열살균 방법 대체 기술 개발

(가) 가열로 인한 식감 저하 문제 등의 관능 품질 개선

- ① 가열 공정 완화 후 항균소재 적용
- ② 적용 대상: 가열 살균 공정이 있는 제품(소스류, 절임류, 찬류 등)
- ③ 실험 방법: 항균소재 적용 후 제품 비교 품질 모니터링
- ④ 분석 항목: 미생물(일반미생물, 식중독균, 부패균), 외관(팽창, 수분리 등), 관능평가

(4) 유통기한 연장 기술 개발

(가) 비가열 제품 안정화 기간 설정

- ① 항균소재 식품 적용 후 유통 모니터링 통해 유통기한 설정
- ② 적용 제품: 김치, 즉석 조리 식품 등 비가열 식품
- ③ 실험 방법: 일정 온도에 보관하면서 분석
- ④ 분석 항목: 미생물(일반미생물, 식중독균, 부패균), 이화학(산도, 염도 등), 외관(팽창, 수분리 등), 관능평가

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 천연항균소재의 산업화 및 상품화

가. 산업화를 위한 비가열 제품별 가공표준의 설정

(1) 비가열 제품의 제조 공정 확립

(가) 대량 생산 라인을 적용한 제품 제조 방법 설계

① 김치의 표준 제조 방법 설계

i) 원부재료 미생물 검사

- 김치의 원부재료는 대부분 농산물로 선별, 세척 공정이 제대로 이루어지지 않으면 토양미생물 등에 의해 위생적이지 못한 제품이 제조될 수 있음.
- 발효 과정을 거치면서 유산균에 의해 일부 병원성 미생물들이 제거되기는 하지만, 실제로 제대로 공정이 잡히지 못한 곳에서 생산된 김치에서 식중독이 일어난 사건은 종종 일어나고 있음.
- 따라서, 김치의 원부재료인 절임배추, 마늘, 생강의 세척 전, 후의 일반세균, 대장균군, 효모를 분석한 결과(Table 1), 김치 원부재료의 미생물 수는 세척 전에 비해 세척 후 감소됨을 확인하였음.

Table 1. 김치 원부재료의 세척 전, 후 미생물 변화

샘플	항목	세척 전	세척 후
마늘	일반세균	4.40E+09	2.38E+05
	대장균군	6.00E+02	1.00E+01
	효모	7.00E+05	1.50E+01
생강	일반세균	2.42E+09	2.16E+06
	대장균군	2.20E+01	5.00E+00
	효모	5.00E+08	1.39E+06
절임배추	일반세균	1.01E+06	2.70E+05
	대장균군	4.10E+03	1.80E+02
	효모	3.20E+04	3.00E+03

ii) 제조 공정 설계

- 배추, 무, 마늘 등의 여러 원료 입고, 선별함.
- 염수에 절임 후 탈수함(염 농도, 시간 및 온도 확인).
- 부원료 세척 및 정선하여 선별함(세척 횟수, 세척수 교환시기, 원물 투입 시기 확인).
- 선별된 부원료를 배합비에 맞게 계량하여 혼합기에서 혼합함.
- 절임배추와 양념의 비율을 일정하게 하여 속냉기를 함.
- 단량에 맞게 포장 후 냉장 상태를 유지함.

② 장아찌류 제조 방법 설계

i) 조건에 따른 제품 안전성 및 안정성 실험

- 제품: 고추장 모듬 마늘장아찌
- 고추장 모듬 마늘장아찌의 열 살균 조건에 따른 조직감을 확인하였음.
- 조직감 확인 결과(Table 2), 열 살균 공정 삽입 후 조직감이 물러지는 것을 확인하였고, 살균 온도가 높을수록, 살균 시간이 길어질수록 관능에 안 좋은 영향을 미치는 것을 확인함.

Table 2. 고추장모듬마늘장아찌의 열 살균 조건에 따른 관능

온도(℃)	처리시간(min)	관능
		조직감(무름정도:5점)
미처리	-	5
65	20	4.3
75	20	4.2
85	20	3.3
95	20	2
85	10	4.2
85	15	4

- 고추장모듬마늘장아찌의 살균 전, 후 미생물 변화 확인 결과(Table 3), 살균 전에 비해 살균 후 일반세균 10^2 CFU/g 감소 됨을 확인함. *B. cereus*, 효모, 곰팡이의 경우도 살균 후 감소함을 확인함.

Table 3. 고추장모듬마늘장아찌의 살균 전, 후 미생물 변화

	살균 전	살균 후
일반세균	4.85E+06	2.25E+04
대장균군	6.50E+02	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	6.50E+02	5.00E+01
효모	2.80E+06	1.34E+04
곰팡이	6.00E+01	0.00E+00

ii) 제조 공정 설계

- 원료 입고, 선별함.
- 원료 세척(세척 횟수, 세척수 교환시기 확인).
- 원료를 식염에 절임(염 농도, 시간 및 온도 확인).
- 정해진 크기로 절단함.
- 배합비에 맞게 계량하여 혼합함.

- 단량에 맞게 포장 후 저온 창고에서 숙성(온도 및 시간 확인).
- 열 살균 후 냉각함(온도 확인).

③ 절임류 제조 방법 설계

i) 조건에 따른 제품 안전성 및 안정성 실험

- 제품: 오이지무침
- 조건에 따른 제품 안전성 및 안정성을 확인하기 위해 살균 조건별 샘플을 제조하여 유통 모니터링을 진행하였음.
- 살균 조건에 따른 오이지 무침의 25 °C 유통 모니터링 결과(Table 4), 살균 샘플에서 비살균 샘플에 비해 일반 세균수가 10² 정도 낮게 나타났으며, 초기 샘플에서 대장균군 불검출됨. 비살균 샘플 14일차 시 팽창과 이미가 발생하여 유통기한이 확보 부적합이라고 판단됨. 과살균이 되면 오이지의 조직감이 물러져 관능상 좋지 않음을 확인하였음.

Table 4. 오이지무침의 조건에 따른 미생물 결과 및 관능

항목	샘플명	0일차	7일차	14일차
일반세균	비살균	1.00E+06	1.12E+06	3.10E+06
	75°C 20분살균	1.00E+04	1.60E+05	7.75E+05
	75°C 30분살균	1.00E+04	9.90E+04	7.30E+04
	80°C 20분살균	5.00E+04	4.65E+04	8.25E+04
대장균군	비살균	2.0E+01	1.0E+01	2.0E+00
	75°C 20분살균	불검출	불검출	불검출
	75°C 30분살균	불검출	불검출	불검출
	80°C 20분살균	불검출	불검출	불검출
<i>B. cereus</i>	비살균	불검출	불검출	불검출
	75°C 20분살균	불검출	불검출	불검출
	75°C 30분살균	불검출	불검출	불검출
	80°C 20분살균	불검출	불검출	불검출
효모	비살균	9.00E+05	8.85E+05	9.90E+05
	75°C 20분살균	2.00E+04	5.65E+04	3.45E+04
	75°C 30분살균	1.60E+04	7.50E+04	5.00E+04
	80°C 20분살균	3.00E+04	3.30E+04	3.85E+04
관능	비살균	변화 없음	변화 없음	팽창발생(50%), 이미
	75°C 20분살균	변화 없음	변화 없음	변화 없음
	75°C 30분살균	변화 없음	변화 없음	변화 없음
	80°C 20분살균	변화 없음	조직감 무름	조직감 무름

ii) 제조 공정 설계

- 원료를 입고, 선별함.
- 염절임 된 오이를 세척함(염 농도, 세척 시간 확인).
- 오이지를 정해진 크기로 절단함.
- 절단된 오이지를 탈염기에 넣고 탈염시험(rpm, 시간 확인).
- 양념을 배합비에 맞게 계량하여 혼합.
- 단량에 맞게 포장하여 열탕살균함(온도, 시간 확인).
- 출하 전까지 냉장 보관함(온도 확인).

(나) 비가열 제품 기준 규격 설정

① 김치 기준 규격 설정

i) 배추김치 기준 규격

Table 5. 배추김치 기준규격

법적 규격	개별 규격	성상	고유의 색택과 향미를 가지며, 이미•이취가 없어야함
		납	0.3 mg/kg 이하
	카드뮴	0.2 mg/kg 이하	
	타르색소	불검출	
	보존료	불검출	
법적 규격	공통 규격	<i>L. monocytogenes</i>	음성
		<i>Salmonellaspp.</i>	음성
		장출혈성 대장균	음성
		<i>S. aureus</i>	음성
		<i>C. perfringens</i>	100 이하 / g
		<i>V. parahaemolyticus</i>	음성
	<i>B. cereus</i>	10,000 이하 / 1g	
품질규격	산도	대외비	
	염도	대외비	
	Brix	대외비	

② 장아찌 기준 규격 설정

i) 고추장모듬마늘장아찌 기준 규격

Table 6. 고추장모듬마늘장아찌 기준규격

법적 규격	개별 규격	성상	고유의 색택과 향미를 가지며, 이미•이취가 없어야함
		대장균군	n=5, c=1, m=0, M=10
		타르색소	불검출
		보존료	0.2 g/kg 이하
	공통 규격	<i>L. monocytogenes</i>	음성
		<i>Salmonella</i> spp.	음성
		장출혈성 대장균	음성
		<i>S. aureus</i>	음성
		<i>C. perfringens</i>	100 이하 / g
		<i>V. parahaemolyticus</i>	음성
품질규격		<i>B. cereus</i>	10,000 이하 / 1g
	품질규격	산도	대외비
		염도	대외비
Brix		대외비	

③ 절임류 기준 규격 설정

i) 오이지무침 기준 규격

Table 7. 오이지무침 기준규격

법적 규격	개별 규격	성상	고유의 색택과 향미를 가지며, 이미•이취가 없어야함
		대장균군	n=5, c=1, m=0, M=10
		타르색소	불검출
		보존료	0.2 g/kg 이하
	공통 규격	<i>L. monocytogenes</i>	음성
		<i>Salmonella</i> spp.	음성
		장출혈성 대장균	음성
		<i>S. aureus</i>	음성
		<i>C. perfringens</i>	100 이하 / g
		<i>V. parahaemolyticus</i>	음성
품질규격		<i>B. cereus</i>	10,000 이하 / 1g
	품질규격	산도	대외비
		염도	대외비
Brix		대외비	

(2) 가공표준 적용 비가열 제품의 식중독 미생물 균총 확인

(가) 초기 식중독 미생물: 식중독 미생물 균총 및 정량 분석

① 김치류(포기김치 및 별미김치) 초기 식중독 미생물 분석

i) 샘플 준비

- 김치 샘플은 배추김치, 남도배추김치, 총각김치, 열무김치, 백김치, 통얼갈이김치, 모듬 맛김치, 배추고갱이, 나박김치, 돌산갓김치, 오이소박이, 고들빼기, 파김치, 부추김치로 총14종을 분석하였음.
- 실험에 사용된 포기김치 및 별미김치는 봄철 제조된 샘플로 제조 직후(24시간 이내) 실험에 사용하였음.
- 각 샘플들은 미생물 분석 후 착즙하여 각각의 산도, pH를 측정하였음.

ii) 일반세균 분석

- 일반세균수는 식품공전법에 따라 시료 25 g(김치 국물 10g, 고형물 15 g) 에 멸균된 완충 희석액 225ml를 가하여 균질기를 이용하여 2분간 균질화 시킨 후 9ml의 단계희석하였음. 각 단계 희석액 0.1 ml을 plate count agar plate에 분주하여 spreader를 이용하여 도말하였다. 37 °C, 24~28시간 배양 후 성장 집락수를 측정하였음.
- 김치류 초기 식중독 미생물 분석 결과(Table 8), 대부분의 김치에서 초기 유산균은 $10^5 \sim 10^6$ CFU/g 검출됨.

Table 8. 김치류 14종의 초기 유산균수 및 이화학 분석 결과

NO.	샘플명	총유산균수	pH	산도
1	포기김치	3.0E+05	6.65	0.27
2	남도김치	1.6E+05	6.84	0.31
3	총각김치	1.8E+05	6.48	0.37
4	열무김치	1.2E+06	6.40	0.41
5	백김치	1.1E+05	6.17	0.39
6	통얼갈이	2.6E+06	6.29	0.39
7	모듬맛김치	1.6E+05	7.03	0.39
8	배추고갱이	3.3E+05	7.11	0.36
9	나박김치	1.2E+05	6.46	0.32
10	돌산갓김치	7.0E+05	6.43	0.4
11	오이소박이	1.1E+05	6.66	0.35
12	고들빼기	1.2E+06	5.07	0.44
13	파김치	4.0E+05	5.45	0.37
14	부추김치	1.1E+05	6.17	0.38

iii) 대장균, 대장균군 분석

- 대장균군은 일반세균수와 동일한 시험액을 튜립관을 넣은 BGLB에 접종하여 37 °C 에서 48시간 배양하여 가스의 발생이 확인되면 endo agar에 획선 도말하였다. 성장 집락의 그림 유형, 모양 등을 확인하고 음성인지 양성인지를 확인하였음.
- 대장균은 대장균군 시험시 가스 발생한 시험관에서 1 백금이를 취하여 chromocult

coliform agar에 획선 도말하여 37°C, 24시간 배양하여 전형적인 파란색을 띄는 집락을 선택하였음.

- 실험 결과(Table 9), 모든 실험 샘플에서 대장균은 검출되지 않았으며, 대장균군은 포기김치, 남도김치, 총각김치, 열무김치, 백김치, 통얼갈이김치, 모듬 맛김치, 배추고갱이, 나박김치, 돌산갓김치, 오이소박이, 고들빼기에서 10¹ CFU/g 이상 검출되었으며, 파김치, 부추김치에서 10² CFU/g 이상 검출되었음.

iv) *Bacillus cereus* 분석

- *B. cereus* 분석은 식품공전에 따라 시료 회석액으로 균질화된 샘플을 10배수 단계 희석하여 단계 희석액을 0.2 ml 씩 5장 MEYP(Mannitol egg yolk polymyxine agar)에 접종하였다. 30°C, 24시간 배양하여 혼탁환이 생긴 분홍색 집락을 계수하였음.
- 실험 결과(Table 9), 고들빼기, 파김치, 부추김치에서 각각 2 x 10¹ CFU/g, 4 x 10¹ CFU/g, 6 x 10¹ CFU/g 로 검출되었음.

v) *Staphylococcus aureus* 분석

- 일반세균수와 동일한 시험액 1ml를 취하여 10배수 단계 희석하여 Baird-parker agar에 도말하여 35°C, 45~48시간 배양하였음. 배양된 집락 주변에 투명 띠가 있으며 광택이 있는 검은색 둥근 집락을 계수하고 의심집락은 동정하였음.
- 실험 결과(Table 9), 14종 샘플에서 *St. aureus* 불검출로 확인되었음.

vi) *Salmonella* spp. 분석

- 시료 25g에 225ml의 peptone water를 가하고 균질화 시켜 35°C, 18~20시간 배양하였음. 배양액 0.1ml를 10ml의 Rapaport-Vassiliadis broth에 접종하고 42 °C에서 24시간 2차 증균배양하였다. 증균 배양액을 다시 XLD agar에 도말하여 의심집락을 계수하였음.
- 실험결과(Table 9), 14종 샘플에서 *Salmonella* spp. 불검출로 확인되었음.

vii) *Listeria monocytogenens* 분석

- 식품공전에 따라 정성분석을 실시하였음. 시료 25g에 225ml의 *Listeria* enrichment broth를 가하여 균질화 한 후 30°C, 24~28시간 배양하여 의심 집락을 분리배양 하였음.
- 실험결과(Table 9), 14종 샘플에서 *Listeria monocytogenens* 불검출로 확인되었음.

viii) *Clostridium perfringens* 분석

- 일반세균수와 동일한 시험액 0.5ml을 취하여 TSC agar 배지에 도말하였음. 도말한 배지 위에 다시 동일한 배지를 가하여 중첩시킨 후 CO₂ gas pack과 anaerobic chamber를 이용하여 36°C에서 24~28시간 혐기 배양하였음.
- 실험결과(Table 9), 14종 샘플에서 *Clostridium perfringens* 불검출로 확인되었음.

Table 9. 김치류 14종의 초기 병원성 미생물 분석 결과

NO.	샘플명	병원성 미생물					
		대장균군	대장균	<i>B.cereus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Cl. perfringens</i>
1	포기김치	1.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
2	남도김치	1.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
3	총각김치	1.5E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
4	열무김치	2.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
5	백김치	1.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
6	통얼갈이	1.5E+01	0.0E+00	2.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
7	모듬맛김치	1.3E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
8	배추고갱이	1.8E+01	0.0E+00	2.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
9	나박김치	1.5E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
10	돌산갓김치	1.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
11	오이소박이	2.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
12	고들빼기	1.6E+01	0.0E+00	2.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
13	파김치	1.3E+02	0.0E+00	4.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
14	부추김치	1.5E+02	0.0E+00	6.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

ix) 효모

- 효모 분석은 일반세균수 분석과 같은 희석액을 10배 단계 희석하여 YPD에 도말하여 25°C, 30~48시간 배양하여 계수하였음.
- 실험 결과(Table 10), 김치류 14종의 초기 효모는 10¹~10² CFU/g 검출됨.

x) 곰팡이

- 곰팡이 분석은 일반세균수 분석과 같은 희석액을 10배 단계 희석하여 PDA에 도말하여 25°C, 48~60시간 배양하여 계수하였음.
- 실험 결과(Table 10), 배추고갱이, 돌산갓김치, 고들빼기 샘플에서 곰팡이가 10¹ CFU/g이상 검출되었음.

Table 10. 김치류 14종의 초기 효모 및 곰팡이 분석 결과

NO.	샘플명	효모	곰팡이
1	포기김치	1.2E+02	0.0E+00
2	남도김치	1.0E+02	0.0E+00
3	총각김치	1.4E+02	0.0E+00
4	열무김치	1.0E+02	0.0E+00
5	백김치	2.4E+02	0.0E+00
6	통얼갈이	3.2E+02	0.0E+00
7	모듬맛김치	8.0E+01	0.0E+00
8	배추고갱이	1.0E+02	6.0E+01
9	나박김치	4.0E+01	0.0E+00
10	돌산갓김치	1.0E+02	2.0E+01
11	오이소박이	4.0E+02	0.0E+00
12	고들빼기	6.0E+01	2.0E+01
13	파김치	1.0E+02	0.0E+00
14	부추김치	1.0E+02	0.0E+00

② 젓갈류(4종)의 초기 식중독 미생물 분석

i) 샘플 준비

- 샘플은 오징어 젓갈, 창난 젓갈, 낙지 젓갈, 명란젓갈 총 4종을 분석하였음.
- 제조 직후 제품(24시간 이내)을 분석하여 제품 초기 병원성 미생물의 분포를 확인하였음.

ii) 초기 미생물 분석

- 초기 식중독 미생물 분석은 위에 명시한 방법과 동일하게 진행하였음.

iii) 실험결과

- 젓갈 4종의 초기 식중독 미생물 분석 결과(Table 11), 대장균, *B. cereus*, *St. aureus*, *Sal. spp.*, *Vibrio*, *Cl. perfringens*는 불검출되었으며, 오징어 젓갈, 명란 젓갈에서 대장균군이 검출되었음.

Table 11. 젓갈류 4종의 초기 식중독 미생물 분석 결과

No.	실험 샘플	분석 항목							
		일반세균	대장균군	대장균	<i>B. cereus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Cl. perfringens</i>
1	창난젓갈	4.8E+05	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
2	오징어 젓갈	1.8E+05	1.7E+02	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
3	낙지젓갈	2.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
4	명란젓갈	7.4E+04	8.2E+02	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

③ 절임류(2종) 초기 식중독 미생물 분석

i) 샘플 준비

- 샘플은 비가열 절임류 반찬인 양념 깻잎지, 무말랭이 2종을 분석하였음.
- 제조 직후 제품(24시간 이내)을 분석하여 제품 초기 병원성 미생물의 분포를 확인하였음.

ii) 초기 미생물 분석

- 초기 식중독 미생물 분석은 위 명시한 방법과 동일하게 진행하였음.

iii) 실험결과

- 절임반찬 2종의 초기 식중독 미생물 분석 결과(Table 12), 옛맛 깻잎지 일반세균수 7×10^5 CFU/g, 효모 6.1×10^5 CFU/g으로 확인되었고 무말랭이 일반세균수 4.7×10^5 CFU/g, 효모 1.3×10^5 CFU/g 로 확인되었음.

Table 12. 절임류 2종의 초기 식중독 미생물 분석 결과

No.	실험 샘플	분석 항목										
		일반 세균	대장 균	대장 균	<i>B. cereus</i>	<i>St. spp.</i>	<i>Sal. spp.</i>	<i>Vibrio</i>	<i>Cl. perfringens</i>	<i>Lis. monocytogenes</i>	효모	곰팡이
1	옛맛 깻잎지	2.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	1.3E+05	0.0E+00
2	무 말랭이	1.0E+05	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	2.1E+05	0.0E+00

④ 시장의 비가열 식품 초기 식중독 미생물 및 이화학 분석

i) 샘플 준비

- 샘플은 경기도 이천시 재래시장에서 김치 4종, 젓갈 3종, 반찬 3종과 경기도 여주시 재래시장에서 김치 5종, 젓갈 3종, 반찬 2종을 구입하여 분석하였음.
- 제조 직후 제품(24시간 이내)을 분석하여 제품 초기 병원성 미생물의 분포를 확인하였음.

ii) 초기 미생물 분석

- 초기 식중독 미생물 분석은 위 명시한 방법과 동일하게 진행하였음.

iii) 실험결과

- 이천시 재래시장 샘플 10종의 초기 식중독 미생물 분석 결과(Table 13), *B. cereus* 경우 걸절이, 열무김치, 오징어 젓갈, 낙지젓갈, 창난젓갈에서 10^1 CFU/g 이상 검출되었으며, 우영조림, 콩자반, 깻잎지를 제외한 모든 샘플에서 대장균군이 확인되었음.

Table 13. 재래시장 김치 및 반찬류 초기 식중독 미생물 분석 결과

No.	실험 샘플	분석 항목(cfu/g)									효모
		일반 세균	대장 균군	대장 균	<i>B. cereus</i>	<i>St. aureus</i>	<i>Sal. spp.</i>	<i>Vibrio parah aemolyticus</i>	<i>Cl. perfringens</i>	<i>Lis. monocytogenes</i>	
1	겉절이	1.46E+07	4.10E+03	0.00E+00	1.24E+03	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	2.10E+03
2	열무김치	1.06E+08	5.00E+05	0.00E+00	3.60E+02	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	2.10E+06
3	오이소박이	1.61E+08	1.70E+04	0.00E+00	0.00E+00	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	4.00E+04
4	총각김치	3.20E+07	2.60E+03	0.00E+00	0.00E+00	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	1.25E+05
5	오징어젓갈	6.10E+04	4.00E+01	0.00E+00	8.00E+01	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	3.93E+05
6	낙지젓갈	4.20E+04	1.00E+01	0.00E+00	6.00E+01	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	2.30E+04
7	창난젓갈	7.30E+04	2.00E+01	0.00E+00	6.00E+01	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	5.10E+04
8	우영조림	1.00E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	6.06E+05
9	콩자반	4.10E+02	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	2.00E+02
10	깻잎지	3.00E+04	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	음성	음성	음성	0.00E+00	음성	2.20E+04

- 여주시 재래시장 샘플 10종의 초기 식중독 미생물 분석 결과(Table 14), 겉절이 샘플에서 *St. aureus* 정성분석 결과 양성으로 판단되며 선택배지인 Baird-Parker 한천 배지에 전형적인 집락 형태로 확인하였음.

Table 14. 재래시장 김치 및 반찬류 초기 식중독 미생물 분석 결과

No.	실험 샘플	분석 항목(cfu/g)									
		일반 세균	대장 균군	대장 균	<i>B. cereu s</i>	<i>St. aureu s</i>	<i>Sal. spp.</i>	<i>Vibrio parah aemol yticus</i>	<i>Cl. perfri ngens</i>	<i>Lis. monoc ytoge nes</i>	효모
1	겉절이	1.08E+09	3.40E+03	0.0E+00	0.0E+00	양성	음성	음성	2.00E+01	음성	2.30E+05
2	총각김치	5.40E+08	1.30E+03	0.0E+00	0.0E+00	음성	음성	음성	0.0E+00	음성	4.90E+05
3	열무김치	1.52E+09	4.00E+02	0.0E+00	0.0E+00	음성	음성	음성	0.0E+00	음성	1.00E+05
4	오이소박이	1.06E+09	3.00E+02	0.0E+00	0.0E+00	음성	음성	음성	0.0E+00	음성	5.00E+04
5	고들빼기	1.89E+09	1.40E+03	0.0E+00	0.0E+00	음성	음성	음성	3.20E+01	음성	1.43E+08
6	낙지젓갈	7.20E+05	3.80E+03	0.0E+00	1.80E+02	음성	음성	음성	2.00E+01	음성	1.00E+04
7	창난젓갈	2.70E+05	1.40E+03	0.0E+00	2.00E+01	음성	음성	음성	6.00E+01	음성	2.80E+05
8	조개젓갈	1.10E+04	1.20E+02	0.0E+00	2.00E+02	음성	음성	음성	2.00E+01	음성	1.03E+05
9	콩자반	1.30E+03	3.10E+02	0.0E+00	0.0E+00	음성	음성	음성	0.0E+00	음성	1.29E+04
10	깻잎지	1.01E+04	2.60E+02	0.0E+00	6.00E+01	음성	음성	음성	0.0E+00	음성	8.10E+04

(나) 식중독 미생물 균총 변화 조사

① 김치

i) 샘플 준비

- 샘플은 가장 많이 소비되고 있는 포기김치를 선택하여 실험을 진행하였음.

ii) 미생물 균총 변화

- 10℃ 저온배양기에 샘플을 보관하면서 28일차까지 유통 모니터링을 하였음.

- 샘플 반복수는 2반복으로 진행하였으며 식중독 미생물 균총 검사는 위에 명시한 방법과 동일하게 진행하였음.

iii) 실험 결과

- 포기김치의 식중독 미생물 균총변화 분석 결과(Table 15), 일반세균수와 유산균수는 유사하게 확인되었으며, 초기 대장균군 3×10^2 CFU/g 으로 검출되었으나 발효가 진행되면서 감소됨을 확인하였음.

Table 15. 포기김치 유통 중 미생물 변화

	미생물분석(cfu/g)							이화학 분석	
	일반세균	유산균	대장균군	대장균	<i>B.cereus</i>	<i>Cl. perfringens</i>	효모	산도 (%)	pH
1일차	1.3.E+06	1.1.E+06	3.0.E+02	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.25	5.74
3일차	3.5.E+07	2.5.E+07	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.33	5.51
7일차	2.6.E+08	5.0.E+07	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.56	4.48
14일차	1.3.E+08	3.4.E+08	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.92	4.04
21일차	7.0.E+07	1.6.E+08	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	1.3.E+02	1.02	4.04
28일차	5.3.E+07	5.7.E+07	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	0.0.E+00	2.3.E+02	1.06	3.90

② 젓갈 4종

i) 샘플 준비

- 샘플은 오징어 젓갈, 창난 젓갈, 낙지 젓갈, 명란젓갈 총 4종을 분석하였음.

ii) 미생물 균총 변화

- 10°C 저온배양기에 샘플을 보관하면서 45일차까지 유통 모니터링을 하였음.

- 샘플 반복수는 2반복으로 진행하였으며 식중독 미생물 균총 검사는 위에 명시한 방법과 동일하게 진행하였음.

iii) 실험 결과

- 오징어 젓갈의 식중독 미생물 균총 변화 분석 결과(Table 16), 초기 검출된 대장균군이 40일차까지 유지되었고 효모는 초기에 비해 약 10² CFU/g 증가됨을 확인하였음.

Table 16. 오징어 젓갈 유통 중 미생물 변화

항목	미생물 (CFU/g)					
	0일차	10일차	20일차	30일차	40일차	45일차
일반세균	1.85E+05	9.90E+05	6.00E+06	9.45E+06	1.06E+07	6.75E+07
대장균군	1.70E+02	2.50E+02	2.85E+03	2.50E+02	2.14E+02	0.00E+00
대장균	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>Cl. perfringens</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
효모	6.05E+04	7.30E+05	5.95E+05	8.50E+05	7.35E+06	8.65E+06

- 창난 젓갈의 식중독 미생물 균총 변화 분석 결과(Table 17), 일반세균의 경우 초기에 비해 45일차 약 10² CFU/g 증가되었으며 효모 또한 약 10² CFU/g 증가됨을 확인하였음.

Table 17. 창난 젓갈 유통 중 미생물 변화

항목	미생물 (CFU/g)					
	0일차	10일차	20일차	30일차	40일차	45일차
일반세균	6.80E+05	5.55E+05	1.40E+06	7.10E+06	4.35E+06	5.75E+07
대장균군	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
대장균	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>Cl. perfringens</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
효모	2.55E+04	2.25E+05	3.95E+05	4.80E+05	8.60E+05	3.60E+06

- 낙지 젓갈의 식중독 미생물 균총 변화 분석 결과(Table 18), 유통 중 효모가 약 10^2 CFU/g 증가되었으며, 이에 의해 가스가 생성됨을 확인하였음.

Table 18. 낙지 젓갈 유통 중 미생물 변화

항목	미생물 (CFU/g)					
	0일차	10일차	20일차	30일차	40일차	45일차
일반세균	6.10E+05	5.95E+05	7.20E+05	7.35E+06	5.58E+07	2.49E+07
대장균군	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
대장균	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>Cl. perfringens</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
효모	2.80E+05	2.20E+05	2.90E+05	2.15E+06	5.65E+06	1.05E+07

- 명란 젓갈의 식중독 미생물 균총 변화 분석 결과(Table 19), 초기 검출된 대장균군이 45일차까지 유지되었으며, 효모의 경우 초기 4.9×10^4 CFU/g에서 3.4×10^6 CFU/g으로 증가됨을 확인하였음.

Table 19. 명란 젓갈 유통 중 미생물 변화

항목	미생물 (CFU/g)					
	0일차	10일차	20일차	30일차	40일차	45일차
일반세균	6.80E+04	5.90E+04	6.90E+05	5.25E+04	9.85E+05	7.80E+06
대장균군	8.20E+02	4.40E+02	5.60E+02	2.30E+02	2.40E+02	2.05E+02
대장균	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>B. cereus</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
<i>Cl. perfringens</i>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
효모	4.90E+04	2.70E+04	2.00E+04	1.05E+05	1.60E+05	3.40E+06

③ 절임류 2종

i) 샘플 준비

- 샘플은 비가열 절임류 반찬인 양념 깻잎지, 무말랭이 2종을 분석하였음.

ii) 미생물 균총 변화

- 10°C 저온배양기에 샘플을 보관하면서 양념깻잎지 40일, 무말랭이 50일차까지 유통 모니터링을 하였음.

- 샘플 반복수는 2반복으로 진행하였으며 식중독 미생물 균총 검사는 위에 명시한 방법과 동일하게 진행하였음.

iii) 실험 결과

- 양념 깻잎지의 식중독 미생물 균총변화 분석 결과(Table 20), 일반세균수가 40일차 까지 유지됨을 확인하였음.

Table 20. 양념 깻잎지 유통 중 미생물 변화

항목	미생물 (CFU/g)				
	0일차	10일차	20일차	30일차	40일차
일반세균	2.7E+05	3.6E+05	8.5E+05	3.1E+06	4.4E+06
대장균군	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
대장균	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
<i>B. cereus</i>	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
<i>Cl. perfringenes</i>	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
효모	1.3E+05	3.7E+05	6.1E+05	3.5E+06	1.0E+06
곰팡이	0.0E+00	1.0E+01	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

- 무말랭이의 식중독 미생물 균총 변화 분석 결과(Table 21), 대장균군이 50일차 5.5×10^1 CFU/g 으로 확인되었음.

Table 21. 무말랭이 유통 중 미생물 변화

항목	미생물 (CFU/g)					
	0일차	10일차	20일차	30일차	40일차	50일차
일반세균	1.0E+05	3.5E+05	5.1E+05	5.20E+05	4.5E+06	7.5E+06
대장균군	0.0E+00	5.0E+00	1.5E+01	1.40E+01	5.4E+01	5.5E+01
대장균	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
<i>B. cereus</i>	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
<i>Cl. perfringenes</i>	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
효모	2.1E+05	2.3E+05	4.8E+05	3.7E+05	8.8E+05	5.9E+06
곰팡이	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00

나. 천연항균소재의 대량 생산 및 정제 기술 개발

(1) 대량 생산 기술 개발

(가) Lab scale 제조 공정 확립

① 항균활성 생성 균주 배양 및 농축

i) 균주 배양

- 조선대학교로부터 항균활성 생성 유산균(*Lactobacillus plantarum* AF1)을 전달 받아 MRS 액체 배지에서 3차 계대배양하고, 원심분리(10,000xg, 4℃, 15분)한 상등액을 0.45μm membrane filtration하여 배양액을 취하였음.
- 조선대학교로부터 항균활성 생성 고초균(*Bacillus subtilis* SN7)을 전달 받아 TSB 액체 배지에서 3차 계대배양하고, 원심분리(10,000xg, 4℃, 15분)한 상등액을 0.2μm membrane filtration하여 배양액을 취하였음.

※ 2차년도: 조선대와 대상FNF(주) 간 비밀유지계약서 작성 후, 항균활성균주 2종(*Lb. plantarum* AF1, *B. subtilis* SN7)과 배지 2종(식용가능 식물성 원료배지 A-4, D-3)을 인수함. 이후 실험은 주관기관(조선대)로부터 받은 균주를 사용하여 실험함.

ii) 배양액 농축

- 균이 제거된 유산균과 고초균의 배양액을 각각 Figure 1의 감압 농축기(65℃)로 배양액 brix 기준 약 5배 농축하였음.





Figure 1. 감압농축기

(나) 배양액과 농축액의 항균활성 확인

- ① 항균활성 균주 2종의 배양액과 농축액의 항균활성을 paper disc assay로 확인하였음. 유산균의 경우 식중독/부패 미생물인 *Bacillus cereus* KCTC 3624와 *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918를 감수성 균주로 사용하였으며, 고초균의 경우 식중독/부패 미생물인 *Bacillus cereus* KCTC 3624와 부패미생물인 *Aspergillus ochraceus* PF-2를 감수성 균주로 사용하였음. LB broth에 3차 계대배양한 *Bacillus cereus* KCTC 3624

를 LB agar 배지에 1×10^6 CFU/plate 가 되도록 도말하고 멸균된 paper disc를 올린 뒤 두 번에 나눠 항균력 샘플(배양액, 농축액)을 각각 100 μ l 떨어뜨리고 35°C에서 하루 배양하여 항균력을 확인하였음. 3차 계대배양한 *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918, *Aspergillus ochraceus* PF-2의 포자를 PDA 배지에 1×10^6 spore/plate가 되도록 접종하여 pouring 하고 30°C에서 12시간 선배양하였음. 선배양 된 plate에 멸균된 paper disc를 올린 뒤 두 번에 나눠 항균력 샘플(배양액, 농축액)을 각각 100 μ l 떨어뜨리고 30°C에서 배양하여 항균력을 확인하였음.


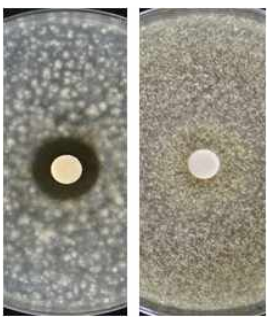
Table 22. *Lb. plantarum* AF1의 항균활성(항세균/항진균) 결과

샘플	감수성 세균	샘플	감수성 곰팡이
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624		<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918
<i>L. plantarum</i> AF1의 MRS 배양액	14.71 mm ¹⁾	<i>L. plantarum</i> AF1의 MRS 배양액 5배 농축물	14.57 mm ¹⁾
			

¹⁾ clear zone

② *Lb. plantarum* AF1의 항균활성: 항균활성 확인 결과 감수성 균주인 *B. cereus* KCTC 3624에 대해서는 14.71 mm의 항균력을 나타냈으며, 5배 농축액에서는 *A. fumigatus* ATCC 96918에 대해 14.57 mm의 항균력을 확인하였음(Table 22).

Table 23. *B. subtilis* SN7의 항균활성(항세균/항진균) 결과

샘플	감수성 세균	샘플	감수성 곰팡이	
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624		<i>A. ochraceus</i> PF-2	
<i>B. subtilis</i> SN7의 TSB 배양액	20.01 mm ¹⁾	<i>B. subtilis</i> SN7의 TSB 배양액 5배 농축물	16.19 mm	0 mm ¹⁾
			12 h	36 h
				

¹⁾ clear zone

- ③ *B. subtilis* SN7의 항균활성: 항균활성 확인 결과 감수성 균주인 *B. cereus* KCTC 3624에 대해서는 20.01 mm의 항균력을 나타냈으며, *A. ochraceus* PF-2에 대해 16.19 mm(12h), 0 mm(36h)의 항균력을 확인하였음(Table 23).

(다) 대량 생산 기술개발(1톤배양): 최적 배양 조건 확립

① 온도

- i) 두 균주의 최적 배양 조건을 알아보기 위해 온도별로 6시간 마다 생육 곡선을 확인하였음.
- ii) 유산균은 MRS 배지에서 배양하면서 생육 곡선을 확인하였고, 고초균은 TSB 배지에서 배양하면서 생육 곡선을 확인하였음.

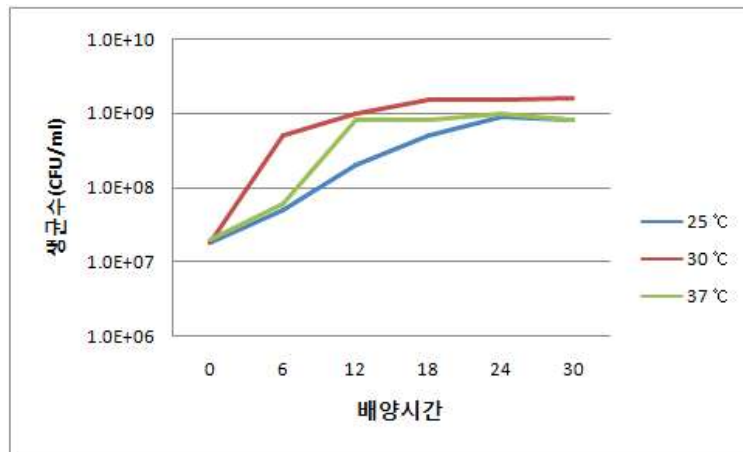


Figure 2. 온도에 따른 *L. plantarum* AF1 생육 곡선

- iii) 유산균 *L. plantarum* AF1을 25°C, 30°C, 37°C 에서 배양하면서 생육 곡선 확인 결과, 30°C에서 가장 먼저 log phase에 도달하였고 최고 생균수를 나타내는 것을 확인하여, 최적 배양 온도를 30°C로 확립하였음(Fig. 2).

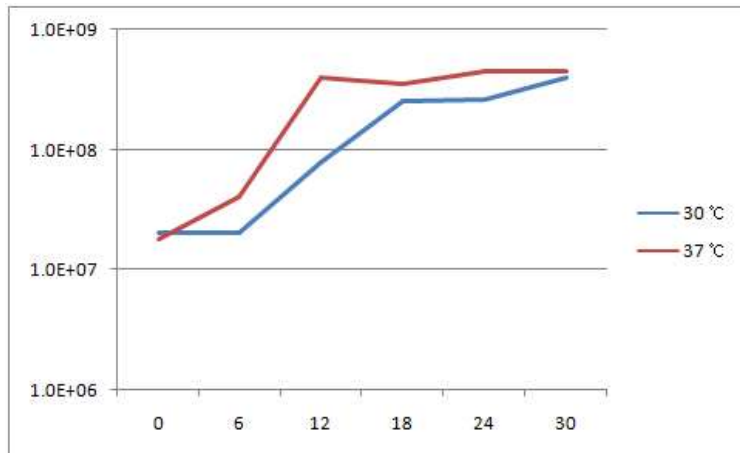


Figure 3. 온도에 따른 *B. subtilis* SN7 생육 곡선

iv) 고초균 *B. subtilis* SN7을 30°C, 37°C 에서 배양하면서 생육 곡선 확인 결과, 37°C 에서 가장 먼저 log phase에 도달하였고 최고 생균수를 나타내는 것을 확인하여, 최적 배양 온도를 37°C로 확립하였음(Fig. 3).

v) 항균활성 균주 2종의 최적배양 온도를 생육 곡선 실험을 통해 확립하였음. 실험 결과, 유산균은 30°C, 고초균은 37°C 에서 생육이 가장 빨라 최적 배양 온도로 확립하였음.

(라) Pilot scale 항균제 제조 및 항균활성 확인

① Pilot scale 제조 공정도 확립

i) 1톤 이상의 대량 생산을 위해 pilot scale의 제조 공정도를 확립하였음(Table 24).

ii) 3차 계대배양 된 seed culture를 1톤의 멸균된 배지에 접종함(배양 온도, 시간 준수).

iii) 유산균은 30°C 에서, 고초균은 37°C 에서 발효하고(온도, 시간 준수), 발효가 끝난 배양액의 규격을 확인함.

iv) 농축기로 배양액을 농축하고 규격을 확인함.

v) 단량에 맞게 포장함.

Table 24. Pilot scale 제조 공정도


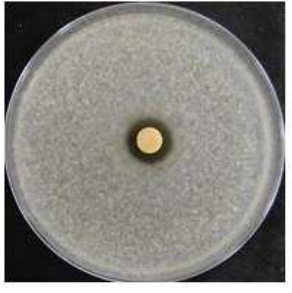
분류	순서	제조 공정	공정 내용	관리점
Seed culture	1	균주 배양	균주는 3차 계대배양하여 사용	온도, 시간 준수
				균수 및 이화학 규격 확인(pH, 산도)
본발효	2	원료준비	배합비에 맞게 원료 준비 및 계량	
	3	배합 및 살균	30분 교반 후 살균	살균 온도, 시간 준수
	4	냉각 및 균주 접종	살균 후 냉각하여 균 접종	냉각 온도 준수
	5	발효	균주 접종 된 배지는 30 ~ 37°C(유산균, 고초균) 에서 발효	발효 온도, 시간 준수
			발효 후 배양액 스펙 확인	균수 및 이화학 규격 확인(pH, 산도)
여과, 농축, 살균 및 포장	6	농축	N.C.E 농축기로 발효액 농축	산도 및 Brix 규격 확인
	7	살균	처리공정 후 살균	살균 온도, 시간 준수
	8	포장	단량에 맞게 포장	

② 활성 확인 및 품질 안정성 확인

i) 배양액과 농축액의 항균활성 확인

- 배양액과 농축액의 항균활성을 paper disc assay로 확인하였음. 유산균의 경우 식중독/부패 미생물인 *B. cereus* KCTC 3624와 *A. fumigatus* ATCC 96918를 감수성 균주로 사용하였으며, 고초균의 경우 식중독/부패 미생물인 *B. cereus* KCTC 3624와 *A. ochraceus* PF-2를 감수성 균주로 사용하였음. LB broth에 3차 계대배양한 *B. cereus* KCTC 3624를 LB agar 배지에 1×10^6 CFU/plate 가 되도록 도말하고 멸균된 paper disc를 올린 뒤 두 번에 나눠 항균력 샘플(배양액, 농축액)을 각각 100 μ l 떨어뜨리고 35°C 에서 하루 배양하여 항균력을 확인하였음. 3차 계대배양한 *A. fumigatus* ATCC 96918, *A. ochraceus* PF-2의 포자를 PDA 배지에 1×10^6 spore/plate 가 되도록 접종하여 pouring하고 30°C 에서 12시간 선배양하였음. 선배양 된 plate에 멸균된 paper disc를 올린 뒤 두 번에 나눠 항균력 샘플(배양액, 농축액)을 각각 100 μ l 떨어뜨리고 30°C 에서 배양하여 항균력을 확인하였음.



Table 25. Pilot scale *L. plantarum* AF1의 항균활성(항세균/항진균) 결과

샘플	감수성 세균	샘플	감수성 곰팡이
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624		<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918
Pilot scale <i>L. plantarum</i> AF1의 MRS 배양액	14.62 mm ¹⁾	Pilot scale <i>L. plantarum</i> AF1의 MRS 배양액 5배 농축 물	14.39 mm ¹⁾
			

¹⁾ clear zone

- *Lb. plantarum* AF1의 항균활성: 항균활성 확인 결과 감수성 균주인 *B. cereus* KCTC 3624에 대해서는 14.62 mm의 항균력을 나타냈으며, 5배 농축액에서는 *A. fumigatus* ATCC 96918에 대해 14.39 mm의 항균력을 확인하였음. Pilot 제조 한 샘플에서도 lab scale 결과와 큰 차이 없는 항균력 결과를 확인하였음(Table 25).

Table 26. Pilot scale *B. subtilis* SN7의 항균활성(항세균/항진균) 결과

샘플	감수성 세균	샘플	감수성 곰팡이
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624		<i>A. ochraceus</i> PF-2
Pilot scale <i>B. subtilis</i> SN7의 TSB 배양액	19.72 mm ¹⁾	Pilot scale <i>B. subtilis</i> SN7의 TSB 배양액 5배 농축 물	15.99 mm 0 mm ¹⁾ 12 h 36 h
			

¹⁾ clear zone

- *B. subtilis* SN7의 항균활성: 항균활성 확인 결과 감수성 균주인 *B. cereus* KCTC 3624에 대해서는 19.72 mm의 항균력을 나타냈으며, *A. ochraceus* PF-2에 대해 15.99 mm(12h), 0 mm(36h)의 항균력을 확인하였음. Pilot 제조 한 샘플에서도 lab scale 결과와 큰 차이 없는 항균력 결과를 확인하였음(Table 26).

ii) 품질 안정성 확인

- 식중독/부패 미생물과 곰팡이에 동시에 항균력을 갖는 5배 농축액 제품의 온도별 품질 안정성을 확인하였음.
- 온도는 4~35 °C로 설정하여 다양한 온도 상황에서의 안정성을 확인하였음.

Table 27. Pilot scale *L. plantarum* AF1 5배 농축액 유통 모니터링 결과

온도	항목	0일	30일	60일	90일	120일
4°C	성상 및 물성	양호	양호	응고	응고	응고
	pH	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
	산도	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
	대장균군	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
25°C	성상 및 물성	양호	양호	양호	양호	양호
	pH	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
	산도	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
	대장균군	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
35°C	성상 및 물성	양호	양호	양호	양호	양호
	pH	3.13	3.13	3.13	3.13	3.13
	산도	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음	변화없음
	대장균군	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출

- *L. plantarum* AF1 5배 농축액의 품질안정성을 4 ~ 35 °C 분석 결과, 이화학 항목과 대장균군 항목에서 안정한 것으로 확인 되었으나, 낮은 온도에서 당성분이 응고되는 현상이 있었음. 항균력 실험 결과 항균력도 유지되는 것으로 확인됨(Table 27).

Table 28. Pilot scale *B. subtilis* SN7 5배 농축액 유통 모니터링 결과

온도	항목	0일	30일	60일	90일	120일
4℃	성상 및 물성	양호	양호	양호	응고	응고
	대장균군	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	항균력	양호	양호	양호	양호	양호
25℃	성상 및 물성	양호	양호	양호	양호	양호
	대장균군	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	항균력	양호	양호	양호	양호	양호
35℃	성상 및 물성	양호	양호	양호	양호	양호
	대장균군	불검출	불검출	불검출	불검출	불검출
	항균력	양호	양호	양호	양호	양호

- *B. subtilis* SN7의 5배 농축액의 품질안정성을 4 ~ 35 ℃ 분석 결과, 이화학 항목과 대장균군 항목에서 안정한 것으로 확인 되었으며 항균력도 유지되는 것으로 확인 됨(Table 28).

iii) 규격 설정

- Pilot scale 생산 제품의 규격을 Table 29과 같이 설정하였음.

Table 29. 생산 제품 규격

항 목	규격	검사 방식	조건	시험 및 검사방법	검사주기
1. 성상	고유의 색택과 향미를 가지고 있음	체크 검사	로트 별 N=3 이상	육안/관능검사	생산시
2. 이물	불검출				
3. 일반품질 규격					
- pH	대외비			pH meter	
- 산도	대외비			산도측정계	
4. 식품공전 규격	기타가공품(살균)	외부 의뢰			
- 타르색소	불검출	체크 검사	N=1	식품공전 시험법	6개월
- 보존료	불검출				
- 대장균군	음성				N=3
5. 날인 및 포장불량	없어야한다	전수 검사		자체 검사 기준	생산시

- 식품에 광범위하게 사용 가능하게하기 위해 기타가공식품으로 유형을 설정하여 그에 맞는 식품공전 규격을 설정하였으며, 이 제품만의 품질을 확인할 수 있는 pH, 산도를 일반품질 규격으로 설정하였음.

(3) 정제 기술 개발: 정제를 통한 활성 물질 농축

- 당초 연구계획에서는 정제를 통한 항균활성 물질 농축과정이 예정되어 있었으나, 본 연구개발에서 본 연구팀(제1협동)의 연구결과와 제1세부기관인 조선대 연구결과 모두에서 배양상징액 또는 배양액의 5배 농축물에 의해서 만으로도 충분히 항균활성이 높고 spectrum도 넓다고 도출되어, 정제 과정 없이 여과와 농축과정만 도입하기로 함.
- 본 연구결과인 천연항균제는 식품에 광범위하게 사용 가능하게하기 위해 기타가공식품으로 설정하였으며, 컬럼 등의 정제 장치를 추가 설치할 경우 제조원가 등의 비용 상승 원인이 될 수 있음. 이에 본 연구에서는 정제공정이 생략되어 제조원가는 낮추면서, 식품에 광범위하게 사용가능할 만큼의 항균활성이 확보된 천연항균제에 대해 고형분을 제거하는 필터 공정과 항균활성을 보다 더 높이기 위한 농축공정을 다음과 같이 수행함.

(가) 식물성 원료 배지 발효를 통한 산업화 가능성 확인

① 식물성 원료 사용 발효 : 식용배지에서 발효

- i) 산업화를 위해서 식물성 원료 배지를 균주로 발효하여 샘플을 제조하였음.
- ii) 식물성 원료 배지는 조선대학교로부터 전달받아 진행되었음.
(유산균용 A-4 배지, 고초균용 D-3 배지: 2종)
- iii) 확립된 공정에 따라 발효 진행하면서 균주의 생육곡선을 확인하였음.

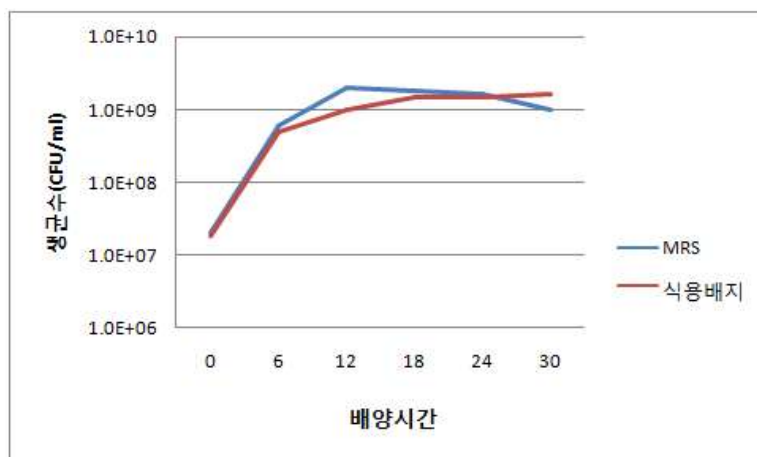


Figure 4. 배지에 따른 *Lb. plantarum* AF1 생육 곡선

iv) *L. plantarum* AF1을 MRS와 식용배지 A-4에서 배양하여 6시간마다 생균수를 확인 하였을 때, 상업화 배지(MRS)와 개발 식용배지(A-4)에서의 생균수 차이가 없는 것으로 확인되었음. 이에 따라 천연 항균제 개발 시, 식용배지 사용이 가능할 것으로 보임(Fig. 4).

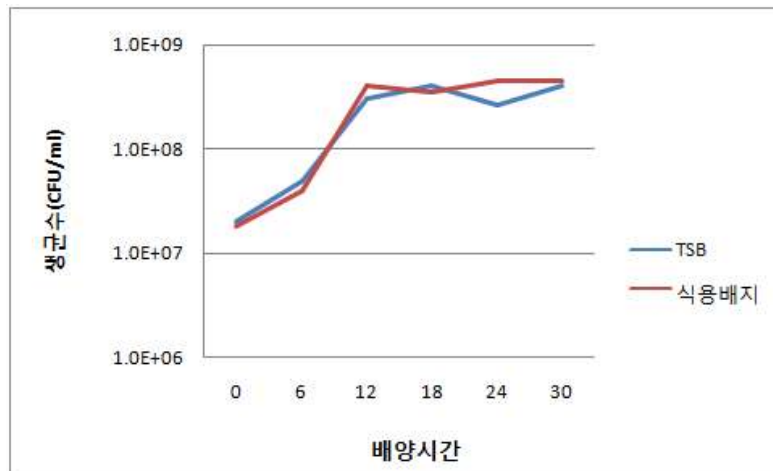


Figure 5. 배지에 따른 *B. subtilis* SN7 생육 곡선

v) *B. subtilis* SN7을 TSB와 식용배지 D-3에서 배양하여 6시간마다 생균수를 확인 하였을 때, 상업화 배지(TSB)와 개발 식용배지(D-3)에서의 생균수 차이가 없는 것으로 확인되었음. 이에 따라 천연 항균제 개발 시, 식용배지 사용이 가능할 것으로 보임(Fig. 5).

vi) 조선대학교에서 전달받은 식용배지(A-4, D-3)를 사용하여 확립된 공정에 따라 항균활성 균주 2종을 각각 배양하였을 때, 균주 생육에는 문제가 없었으며 천연 항균제 개발 시 발효 배지로 사용이 가능할 것으로 보임.

(나) 필터 및 농축 공정 적용

① 필터 공정 적용

i) 폐배추와 균체 제거를 위해 필터 공정을 설정하였음. 1차 데칸타를 이용하여 큰 크기의 고형분을 제거하고, 원심분리기를 이용하여 2차 필터 공정을 설정하였음. 탈색, 탈취를 위해 규조토, 활성탄 처리 후 필터프레스에서 필터링한 후 O.D값 규격을 확인하였음.

② 농축 공정 적용

i) 항균활성 물질을 농축하여 항균력을 강화시키기 위해 농축 공정을 설정하였음. 고형분을 제거 후 농축 공정을 삽입하였으며, 당도 기준으로 농축을 진행하였음.
ii) 필터 공정과 농축 공정이 추가된 제조 공정도는 Figure 6, 7과 같음.

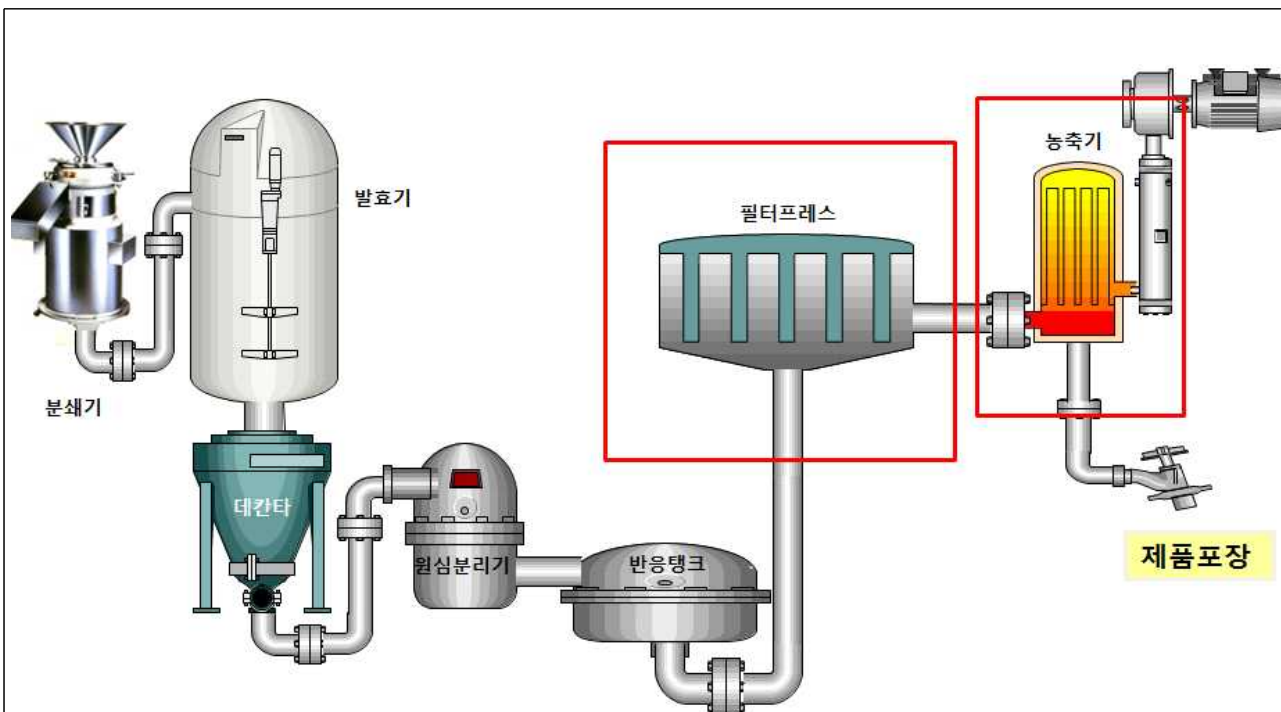


Figure 6. Pilot scale 제조 공정도(개발항균제)





Figure 7. Pilot scale 제조 공정(개발항균제)

③ 활성 확인 및 품질 안정성 확인

i) 항균활성 확인

- Pilot scale 생산 제품의 항균활성을 paper disc assay로 확인하였음. 유산균의 경우 식중독/부패 미생물인 *B. cereus* KCTC 3624와 *A. fumigatus* ATCC 96918를 감수성 균주로 사용하였으며, 고초균의 경우 식중독/부패 미생물인 *B. cereus* KCTC 3624와 *A. ochraceus* PF-2를 감수성 균주로 사용하였음. TSB broth에 3차 계대배양한 *B. cereus* KCTC 3624를 LB agar 배지에 1×10^6 CFU/plate 가 되도록 도말하고 멸균된 paper disc를 올린 뒤 두 번에 나눠 항균력 샘플(배양액, 농축액)을 각각 100 μ l 떨어뜨리고 35°C에서 하루 배양하여 항균력을 확인하였음. 3차 계대배양한 *A. fumigatus* ATCC 96918, *A. ochraceus* PF-2의 포자를 PDA 배지에 1×10^6 spore/plate 가 되도록 접종하여 pouring하고 30°C에서 12시간 선배양하였음. 선배양된 plate에 멸균된 paper disc를 올린 뒤 두 번에 나눠 항균력 샘플(배양액, 농축액)을 각각 100 μ l 떨어뜨리고 30°C에서 배양하여 항균력을 확인하였음.

Table 30. Pilot scale *Lb. plantarum* AF1의 항균활성(항세균/항진균) 결과

샘플	감수성 세균	샘플	감수성 곰팡이
	<i>B. cereus</i> KCTC3624		<i>A. fumigatus</i> ATCC96918
Pilot scale <i>L. plantarum</i> AF1의 식용배지(A-4) 배양액	14.71 mm ¹⁾	Pilot scale <i>L. plantarum</i> AF1의 식용배지(A-4) 배양액 5배 농축물	14.37 mm ¹⁾
			

¹⁾ clear zone

- *Lb. plantarum* AF1의 항균활성: 식용배지 A-4에서 pilot scale로 생산한 *Lb. plantarum* AF1의 항균활성 확인 결과 감수성 균주인 *B. cereus* KCTC 3624에 대해서는 14.71 mm의 항균력을 나타냈으며, 5배 농축액에서는 *A. fumigatus* ATCC 96918에 대해 14.37 mm의 항균력을 확인하였음(Table 30). 이는 Table 1과 4의 상업화 배지 MRS를 사용하여 lab scale 및 pilot scale로 생산하여 제조한 샘플에서의 항균활성과 큰 차이 없는 항균력 결과를 확인하였음.

Table 31. Pilot scale *B. subtilis* SN7의 항균활성(항세균/항진균) 결과

샘플	감수성 세균	샘플	감수성 곰팡이	
	<i>B. cereus</i> KCTC3624		<i>A. ochraceus</i> PF-2	
Pilot scale <i>B. subtilis</i> SN7의 식용배지(D-3) 배양액	20.20 mm ¹⁾	Pilot scale <i>B. subtilis</i> SN7의 식용배지(D-3) 배양액 5배 농축물	16.68 mm	15.35 mm ¹⁾
			12 h	36 h
				

¹⁾ clear zone

- *B. subtilis* SN7의 항균활성: 항균활성 확인 결과 감수성 균주인 *B. cereus* KCTC 3624에 대해서는 20.20 mm의 항균력을 나타냈으며, *A. ochraceus* PF-2에 대해 16.68 mm(12h), 15.35 mm(36h)의 항균력을 확인하였음(Table 10). 이와 같은 결과는 상업화 배지 TSB에서 *B. subtilis* SN7을 lab scale 및 pilot scale로 배양하여 제조한 샘플의 항균활성(Table 23, 26) 보다 항세균 활성은 큰 차이가 없으나 항진균 활성은 훨씬 더 높아짐(Table 31). 즉 *A. ochraceus* PF-2 36시간 배양으로 균사에 이은 포자 형성 단계에서 Table 23와 26에서는 항진균 활성이 0 mm이었으나 D-3 식용배지에서 pilot scale 생산된 Table 31에서의 결과는 15.35 mm의 뚜렷한 생육저지 환이 관찰됨.

- 이상과 같은 항균활성 확인 결과(Table 31), 식용배지를 사용하여 대량생산된 항균 샘플에서도 산업화 배지인 MRS와 TSB를 사용하여 lab scale 또는 pilot scale로 대량생산하여 제조한 항균물질시료(Table 22, 23, 25, 26)와 유사한 항균력 또는 더 증강된 항균력이 나타났으며, 필터공정적용에 의한 여과와 농축을 통해서 고형분만 제거되고 항균력은 유지됨을 확인하였음.

ii) 품질 안정성 확인

- 식용배지에서 Pilot scale 생산 제품의 품질 안정성 확인결과, 37 °C에서 120일간 미생물 및 이화학 결과 안정하였음.

- 식용배지에 항균활성 균주 2종을 각각 발효하고 확립된 제조공정에 따라 샘플을 제조하여 항균력을 확인하였을 때, 항균력이 유지됨을 확인하였으며 품질 안정성

실험에서도 미생물 및 이화학적으로 안정함을 확인하였음.

다. 천연항균소재의 비가열 식품 적용 기술 개발(산업적 scale)

※ 이 전 과제 수행 내용은 조선대학교 균주 *L. plantarum* AF1, *B. subtilis* SN7을 수령받아 항균 활성 확인 및 대량생산 실험을 진행하였으나, 실제로 항균소재 제품화하기에는 마케팅이나 기술영업 활동이 용이하다고 판단되는 AF1 균주를 제품화하기로 결정하여 AF1을 발효, 제조한 항균소재로 이후 식품 적용 실험을 진행하였음.

(1) 항균소재 식품 적용, 미생물 제어능 확인

(가) 대량생산 식품 유형별 적용 방법 설정

① 샘플 준비

- i) 비가열 식품인 김치를 대상으로 적용 방법 설정 실험을 진행하였음.
- ii) 김치 중에서도 유통기한이 국내 제품보다 길고 유통 환경의 변수가 많은 수출 김치를 대상으로 하였음.
- iii) 적용 농도 결정을 위해 항균제 적용하지 않은 대조구와 개발항균소재 0.2% 적용한 실험구1, 0.5% 적용한 실험구2로 샘플 제조하여 모니터링 하였음.

※ 개발항균소재는 유산균 *L. plantarum* AF1을 대량배양한(Fig 6,7)것으로 사용하기로 함.

- iv) 현재 김치에서 산막 효모가 검출되지 않기 때문에, 앞서 소재 항균력 검증에 사용한 지시균인 *Pichia kudriavzevii* GY1을 10^1 CFU/g으로 spiking 하였음.

② 유통모니터링

- i) 모니터링은 25°C에서 외관은 매일 관찰하였으며, 미생물 분석은 일정 기간(0일차, 10일차, 14일차, 17일차 28일차) 간격으로 분석하였음.

③ 실험 결과

i) 외관 산막효모 관찰

- 대조구에서는 10일차부터 외관 산막효모를 관찰할 수 있었으며, 16일차 경과 시 모든 샘플에서 산막효모가 발현되었음. 실험구 1과 실험구2에서는 16일차까지 산막효모가 관찰되지 않았음.

ii) 관능

- 대조구에서 10일차부터 산막효모의 군덕내가 나기 시작하였고 시간 경과에 따라 심해졌으나 실험구1과 실험구2에서는 군덕내가 전혀 나지 않았음.

iii) 미생물 결과

- 미생물 결과(Table 32), 개발된 항균소재 0.5% 적용한 실험구2에서는 10일차부터 28일차까지 산막효모가 검출되지 않았으며, 0.2% 적용한 실험구1에서는 10일차까지 산막효모가 검출되었음. 하지만 외관에 발현되지는 않았으며 14일차에서

산막효모가 검출되지 않았음.

Table 32. 김치 항균소재 적용 미생물 결과

샘플명	0일차	10일차	14일차	17일차	28일차
대조구	1.0.E+01	1.2.E+03	8.9.E+04	1.3.E+07	2.4.E+08
실험구1: 항균소재*, 0.2%	3.0.E+01	2.0.E+01	ND	ND	ND
실험구2: 항균소재*, 0.5%	2.0.E+01	ND	ND	ND	ND

* *Lb. plantarum* AF1 대량배양액(Fig 6,7)

(나) 대량 생산 식품 내에서의 기존 천연 항균제와 활성 비교 검사

① 샘플 준비

- i) 수출김치의 산막효모 제어효과를 기존 항균제와 개발 항균소재를 적용하여 비교 검사 하였음.
- ii) 현재 김치에서 산막 효모가 검출되지 않기 때문에, 앞서 소재 항균력 검증에 사용한 지시균인 *Pichia kudriavzevii* GY1을 10¹ CFU/g으로 spiking 하였음.
- iii) **항균 소재 적용하지 않은 대조구와 개발항균소재 0.5% 사용한 실험구1, 자몽종 자추출물 0.03% 적용한 실험구 2**로 샘플을 제조하여 모니터링 하였음.

② 유통모니터링

- i) 모니터링은 25°C 에서 외관은 매일 관찰하였으며, 미생물 분석은 일정 기간(0일차, 10일차, 14일차, 17일차 28일차) 간격으로 분석하였음.

③ 실험 결과

i) 외관 산막효모 관찰

- 대조구에서는 10일차부터 외관 산막효모를 관찰할 수 있었으며, 16일차 경과시 모든 샘플에서 산막효모가 발현되었음. 개발항균소재 적용구인 실험구1에서는 16일차까지 산막효모가 관찰되지 않았으며, 자몽종자추출물 적용구인 실험구2에서는 12일차부터 산막효모를 관찰할 수 있었으며, 16일차 경과시 75% 산막효모가 발현되었음.

ii) 관능

- 대조구와 실험구 2(자몽종자추출물 적용구)에서 10일차부터 산막효모의 군덕내가 나기 시작하였고 시간 경과에 따라 심해졌으나 실험구1에서는 군덕내가 전혀 나지 않았음.

iii) 미생물 결과

- 미생물 결과(Table 33), 개발된 항균소재 적용한 실험구1에서는 10일차부터 28일차까지 산막효모가 검출되지 않았으며, 자몽종자추출물 처리구인 실험구2에서는

대조구 대비해서는 효모 억제 효과를 보였으나 28일차 7.1×10^6 CFU/g의 효모가 검출되었음.

Table 33. 김치 적용 항균소재 활성 비교 미생물 결과

샘플명	0일차	10일차	14일차	17일차	28일차
대조구	1.0.E+01	1.2.E+03	8.9.E+04	1.3.E+07	2.4.E+08
실험구1: 개발항균소재, 0.5%	2.0.E+01	ND	ND	ND	ND
실험구2: 자몽종자추출물, 0.03%	2.0.E+01	9.8.E+02	4.4.E+03	7.9.E+04	7.1.E+06

라. 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발

(1) Data base 구축: 기존 천연 보존제 대체

(가) 기존 항균제 대체를 위한 항균 소재 활성 비교 검사

- ① 기존 항균제와 개발된 항균 소재의 항균활성 실험은 paper disc assay로 확인하였으며 기존 항균제는 자몽종자추출물, 안티크로DM, 락토소스, 복합황금추출물로 실험하였음.
- ② 실험 결과(Table 34), 개발된 항균소재는 병원성미생물 및 곰팡이에 항균활성을 가장 크게 나타냈으며, 자몽종자추출물과 안티크로DM은 병원성미생물에 대해서는 개발된 항균소재와 유사한 항균활성을 나타내었으나 곰팡이에 대한 항균활성은 약하게 나타났음. 유산균발효로 만든 락토소스 제품과 복합황금추출물 소재는 병원성미생물과 곰팡이에 대해 개발된 항균소재보다 낮은 항균력을 나타내었음.

Table 34. 기존 항균소재 항균력 확인

No.	소재명	병원성미생물	곰팡이
		<i>B. cereus</i> KCCM 11774	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918
1	개발된 항균소재	+++ ¹⁾	++
2	자몽종자추출물	+++	+
3	안티크로DM	+++	-
4	락토소스	+	-
5	복합황금추출물	++	++

¹⁾- : 없음, +: 9~15mm, ++: 16~25mm, +++: 26~35mm

(2) Data base 구축: 식중독균 취약 제품군 적용 사례 구축

(가) 즉석 조리 제품 제안

① 샘플 준비

- i) 식중독균 취약한 제품군인 즉석 제품 중, 걸절이 김치 제품으로 적용 실험 진

행하였음.

ii) **대조구**는 즉석 매대에서 샘플 수거하여 분석하였으며, **개발항균소재를 적용한 실험구**는 같은 생산일자에 항균소재를 첨가하여 제조한 뒤, 즉석 매대까지 함께 유통되게 하였으며 대조구와 함께 수거하여 분석하였음.

iii) 유통모니터링

- 모니터링은 10℃, 10일차 간격으로 미생물(대장균군, *B. cereus*), 이화학(산도) 및 관능평가를 진행하였음.

iv) 실험 결과

- 모니터링 결과(Table 35), 대조구와 실험구 모두에서 병원성 미생물은 검출되지 않았으며, 적용구에서 산도가 완만하게 증가하는 것을 확인하였음.

Table 35. 결절이 항균소재 적용 유통모니터링 결과

구분	항목	실험	0일	10일	20일	30일
이화학	산도	대조구	0.25	0.68	0.80	1.10
		적용구	0.22	0.59	0.75	0.91
미생물	대장균군	대조구	1.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
		적용구	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	<i>B. cereus</i>	대조구	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
		적용구	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
외관 및 관능		대조구	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음
		적용구	이상없음	이상없음	이상없음	이상없음

(3) 가열살균 방법 대체 기술 개발

(가) 가열로 인한 식감 저하 문제 등의 관능 품질 개선

① 항균소재 적용으로 살균 공정 완화

i) 샘플 준비

- 적용 식품은 가열 공정이 있는 찜무 제품으로 진행하였음.

- **항균 소재 적용하지 않은 대조구와 항균 소재 적용하여 가열 살균 공정 조건을 완화한 실험구**를 공장에서 제조하여 시료로 사용하였음.

- 가열 살균 공정은 처리 시간 10분 단축하여 샘플 제조하였음.

ii) 유통모니터링

- 모니터링은 10℃, 4주차 간격으로 미생물(일반세균, 대장균군), 관능(조직감: 5점 척도, 0: 아삭, 5: 무름) 및 외관 분석을 하였음.

iii) 실험 결과

- 유통모니터링 결과(Table 36), 일반세균, 대장균군, 효모의 미생물 결과는 대조구와 실험구의 큰 차이가 없었으며, 살균 조건을 완화한 실험구의 팽창 정도도 양호한 수준으로 확인 되었음.
- 조직감의 경우 대조구 대비 살균 조건을 완화한 실험구에서 유통기한 내 더 아삭함을 나타내었음.

Table 36. 짬무 항균소재 적용 유통모니터링 결과

항목	실험	0일차	4주차	8주차
일반세균	대조구	6.7E+01	4.3E+01	5.7E+02
	실험구	7.8E+01	4.3E+02	8.1E+02
대장균군	대조구	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	실험구	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
효모	대조구	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
	실험구	0.0E+00	0.0E+00	0.0E+00
조직감	대조구	2.8	3.5	4
	실험구	1.8	2	2.5
외관 및 관능	대조구	이상없음	이상없음	이상없음
	실험구	이상없음	이상없음	이상없음

(4) 유통기한 연장 기술 개발

(가) 비가열 제품 안정화 기간 설정

① 개발항균소재를 식품 적용 후 유통 모니터링 통해 유통기한 설정

i) 샘플 준비

- 적용 식품은 비가열 제품인 고들빼기로 진행하였음.
- 항균 소재 적용하지 않은 대조구와 개발항균소재를 0.5 % 적용한 실험구를 공장에서 제조하여 시료로 사용하였음.

ii) 유통모니터링

- 모니터링은 10℃, 10일 간격으로 이화학(산도), 미생물(일반세균, 대장균군, 효모, 곰팡이, *B. cereus*, *Cl. perfringenes*, 유산균), 관능 및 외관 분석을 하였음.

iii) 실험 결과

- 유통모니터링 결과(Table 37), 개발항균소재 적용구의 산도가 대조구 대비 완만하게 증가하는 것을 확인하였음.
- 대조구는 50일차에서 팽창 현상이 관찰된 반면, 적용구는 60일차까지 특이사항 없었음.
- 따라서 고들빼기 제품의 유통기한을 현재 30일에서 45일 까지 연장 가능할 것

으로 판단됨(안전계수 0.8 고려).

Table 37. 고들빼기 항균소재 적용 유통모니터링 결과

구분	항목	실험	0일	10일	20일	27일	30일	32일	45일	50일	55일	60일
이화학	산도	대조구	0.35	0.53	0.84	1.12	1.26	1.38	1.48	1.59	1.66	1.72
		적용구	0.35	0.44	0.71	0.80	0.89	1.15	1.30	1.41	1.54	1.51
미생물	일반세균	대조구	5.3E +05	3.3E +05	1.9E +05	4.2E +06	1.3E +07	1.6E +06	1.3E +07	6.1E +05	2.5E +05	1.3E +07
		적용구	5.3E +05	4.5E +05	1.6E +05	4.4E +05	2.4E +05	2.4E +05	1.2E +06	4.8E +05	5.5E +05	1.1E +06
	대장균군	대조구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
		적용구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
	효모	대조구	9.3E +04	6.4E +04	1.7E +04	4.0E +03	2.9E +04	1.3E +04	1.3E +04	1.3E +05	6.8E +05	9.8E +05
		적용구	9.3E +04	6.4E +04	2.2E +03	2.0E +03	1.3E +04	1.0E +04	1.0E +04	2.3E +04	1.7E +04	1.9E +04
	곰팡이	대조구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
		적용구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
	<i>B. cereus</i>	대조구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	2.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
		적용구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	2.0E +01	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
	<i>C. perfringens</i>	대조구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
		적용구	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00	0.0E +00
	유산균	대조구	2.2E +02	4.7E +03	6.8E +04	4.5E +06	3.1E +06	2.2E +05	2.5E +04	1.8E +03	2.2E +03	1.7E +03
		적용구	2.2E +02	2.5E +03	5.4E +04	1.6E +06	1.8E +06	1.2E +05	1.0E +04	4.0E +03	1.8E +03	1.4E +03
	외관 및 관능	대조구	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	팽창 (30%)	팽창 (50%)/ 군내	팽창 (75%)/ 군내
		적용구	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음	특이 사항 없음

제 3 장 [제2협동] 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제의 독성평가

제 1 절 연구수행 방법

1. 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* AF1+*Lactobacillus plantarum* HD1)의 조항균 물질의 독성평가

가. SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험

- (1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)
- (2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.
- (3) 투여방법 : 경구 / 단회
- (4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제
- (5) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 부검

나. SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험(Non-GLP)

- (1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)
- (2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.
- (3) 투여방법 : 경구 / 4주동안 1일 1회
- (4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제
- (5) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료 섭취량 측정, 부검, 장기중량 측정, 혈액학적검사, 혈액생화학검사, 병리조직학적 검사

다. 유전독성학적 안전성 평가(*in vitro* 및 *in vivo*)

- (1) 세균을 이용한 복귀돌연변이시험
 - (가) 부형제 : 멸균증류수
 - (나) 용량설정시험의 농도 : 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL
 - (다) 분시험의 농도 : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 mg/mL
→ 각 처리군별로 시험물질을 처리한 후 균의 생육저해 및 콜로니수의 변화를 관찰.
- (2) 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험
 - (가) 부형제 : 멸균증류수
 - (나) 염색체이상시험 : 1250, 2500, 5000 μ g/mL의 농도로 시험물질을 처리한 후 콜세미드를 처리하여 증기세포를 유도한 후 표본을 제작하여 표본의 구조적이상 및 수적이상을 관찰

(3) ICR 마우스에 대한 소핵시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 예비시험 : 시험물질 투여군 4 군 및 음성대조군 1 군의 총 5 군으로 구성하고 각 군당 3 마리의 동물을 사용하였음.

(다) 본시험 : 예비시험 결과, 최고 용량인 2000 mg/kg B.W.군에서도 사망 예가 보이지 않았으므로, 본 시험에서 최고 용량은 2000 mg/kg/ B.W.로 하였음.

2. 부분정제한 고초균 (*Bacillus subtilis* SN7)의 조항균물질의 독성평가

가. SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험

(1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)

(2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.

(3) 투여방법 : 경구 / 단회

(4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제

(5) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 부검

나. SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험(Non-GLP)

(1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)

(2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.

(3) 투여방법 : 경구 / 4주동안 1일 1회

(4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제

(5) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료 섭취량 측정, 부검, 장기중량 측정, 혈액학적검사, 혈액생화학검사, 병리조직학적 검사

다. 유전독성학적 안전성 평가(*in vitro* 및 *in vivo*)

(1) 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 용량설정시험의 농도 : 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL

(다) 본시험의 농도 : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 mg/mL

→ 각 처리군별로 시험물질을 처리한 후 균의 생육저해 및 콜로니수의 변화를 관찰.

(2) 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 염색체이상시험 : 1250, 2500, 5000 μ g/mL의 농도로 시험물질을 처리한 후 콜세

미드를 처리하여 중기세포를 유도한 후 표본을 제작하여 표본의 구조적이상 및 수적이상을 관찰

(3) ICR 마우스에 대한 소핵시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 예비시험 : 시험물질 투여군 4 군 및 음성대조군 1 군의 총 5 군으로 구성하고 각 군당 3 마리의 동물을 사용하였음.

(다) 본시험 : 예비시험 결과, 최고 용량인 2000 mg/kg B.W.군에서도 사망 예가 보이지 않았으므로, 본 시험에서 최고 용량은 2000 mg/kg/ B.W.로 하였음.

3. 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* EM)의 조항균물질의 독성평가

가. SD 랫드에 대한 단회경구투여 독성시험

(1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)

(2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.

(3) 투여방법 : 경구 / 단회

(4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제

(5) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 부검

나. SD 랫드에 대한 4주 반복용량결정시험(Non-GLP)

(1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)

(2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.

(3) 투여방법 : 경구 / 4주동안 1일 1회

(4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제

(5) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료 섭취량 측정, 부검, 장기중량 측정, 혈액학적검사, 혈액생화학검사, 병리조직학적 검사

다. 유전독성학적 안전성 평가(*in vitro* 및 *in vivo*)

(1) 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 용량설정시험의 농도 : 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL

(다) 본시험의 농도 : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 mg/mL

→ 각 처리군별로 시험물질을 처리한 후 균의 생육저해 및 콜로니수의 변화를 관찰.

(2) 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 염색체이상시험 : 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시험물질을 처리한 후 콜세미드를 처리하여 증기세포를 유도한 후 표본을 제작하여 표본의 구조적이상 및 수적이상을 관찰

(3) ICR 마우스에 대한 소핵시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 예비시험 : 시험물질 투여군 4 군 및 음성대조군 1 군의 총 5 군으로 구성하고 각 군당 3 마리의 동물을 사용하였음.

(다) 본시험 : 예비시험 결과, 최고 용량인 2000 mg/kg B.W.군에서도 사망 예가 보이지 않았으므로, 본 시험에서 최고 용량은 2000 mg/kg/ B.W.로 하였음.

제 2 절 연구내용 및 결과

1. 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* AF1+*Lactobacillus plantarum* HD1)의 조항균 물질의 독성평가

가. 단회투여 독성평가(*in vivo*)

(1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)

(2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.

(3) 투여방법 : 경구 / 단회

(4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제

(5) 시험군의 구성

시험군	시험물질	성	마리수	동물번호	투여용량 (mg/kg B.W.)
1군 (G1)	멸균증류수 (대조군)	수컷	5	1101 ~ 1105	0
		암컷	5	2101 ~ 2105	
2군 (G2)		수컷	5	1201 ~ 1205	500
		암컷	5	2201 ~ 2205	
3군 (G3)	시험물질 (투여군)	수컷	5	1301 ~ 1305	1000
		암컷	5	2301 ~ 2305	
4군 (G4)		수컷	5	1401 ~ 1405	2000
		암컷	5	2401 ~ 2405	

(6) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 부검

(7) 결과

(가) 사망률 및 일반증상 : 실험 기간 동안 일반증상 관찰 결과(Table 1, 2), 시험물질 투여에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았음.

Table 1. Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality	
		Male	Female
G1	0	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G2	500	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G3	1000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G4	2000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)

Table 2. Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animal	Clinical signs
G1	0	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G2	500	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G3	1000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G4	2000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal

(나) 체중변화 : 체중 측정 결과(Table 3), 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 시험물질 투여군과 부형제 대조군간 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음.

Table 3. Body weight

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days after administration (g)			
			0	7	14	
G1	0	Male	Mean	160.8	242.4	300.9
			S.D.	8.5	16.2	29.3
			N	5	5	5
		Female	Mean	126.4	175.0	198.5
			S.D.	5.0	2.0	9.6
			N	5	5	5
G2	500	Male	Mean	157.9	241.0	300.2
			S.D.	4.4	7.1	11.2
			N	5	5	5
		Female	Mean	124.7	176.5	200.3
			S.D.	8.0	4.7	11.9
			N	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	157.1	239.5	298.3
			S.D.	3.9	9.1	16.9
			N	5	5	4
		Female	Mean	124.0	174.3	202.3
			S.D.	7.4	8.2	16.4
			N	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	158.0	237.3	290.0
			S.D.	8.4	9.8	12.5
			N	5	5	5
		Female	Mean	124.6	175.0	198.4
			S.D.	3.6	9.5	10.6
			N	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(다) 부검소견 : 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았음.

나. 4주 용량결정 독성시험(*in vivo*)

- (1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)
- (2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.
- (3) 투여방법 : 경구 / 4주동안 1일 1회
- (4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제
- (5) 시험군의 구성

시험군	시험물질	성	마리수	동물번호	투여용량 (mg/kg B.W.)
1군 (G1)	멸균증류수 (대조군)	수컷	5	1101 ~ 1105	0
		암컷	5	2101 ~ 2105	
2군 (G2)		수컷	5	1201 ~ 1205	500
		암컷	5	2201 ~ 2205	
3군 (G3)	시험물질 (투여군)	수컷	5	1301 ~ 1305	1000
		암컷	5	2301 ~ 2305	
4군 (G4)		수컷	5	1401 ~ 1405	2000
		암컷	5	2401 ~ 2405	

(6) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료 섭취량 측정, 부검, 장기중량 측정, 혈액학적 검사, 혈액생화학검사, 병리조직학적 검사

(7) 결과

(가) 사망률 및 일반증상 : 시험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 특이한 이상증상을 보인 동물은 관찰되지 않았음.

(나) 체중변화 : 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 시험물질 투여군과 부형제 대조군간 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음(Table 4).

Table 4. Body weight

Sex	Dose (mg/kg)	Body weight (g) on day					
		1	8	15	22	28	
Male	G1 (0)	Mean	197.2	269.5	309.1	342.6	372.0
		S.D.	±4.7	±6.4	±19.7	±27.9	±32.7
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	197.9	263.9	301.4	330.5	362.3
		S.D.	±4.3	±12.1	±9.2	±14.3	±12.3
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	198.6	263.2	295.0	326.1	349.2
		S.D.	±6.8	±5.6	±6.9	±10.7	±14.8
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	197.9	266.4	303.9	341.7	368.7
		S.D.	±5.1	±9.7	±10.5	±11.6	±12.5
		N	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	151.1	185.4	206.5	224.8	238.2
		S.D.	±6.1	±6.1	±9.1	±12.5	±10.2
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	151.0	185.8	205.6	222.6	238.9
		S.D.	±6.9	±12.3	±12.0	±12.3	±19.3
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	149.9	187.3	210.6	230.9	246.0
		S.D.	±10.1	±10.9	±10.7	±12.6	±13.0
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	152.3	179.6	198.3	220.3	230.3
		S.D.	±8.6	±8.0	±8.9	±7.7	±7.4
		N	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(다) 사료섭취량 : 시험기간 동안 사료 섭취량에서는 투여 2주차에 수컷 1000 mg/kg 군에서 대조군에 비해 유의하게($p<0.05$) 감소하였고, 수컷에서는 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 관찰되지 않았음(Table 5).

Table 5. Food consumption

Sex	Dose (mg/kg)		Food consumption (g) on week			
			1	2	3	4
Male	G1 (0)	Mean	26.8	31.0	30.9	29.9
		S.D.	±2.0	±2.4	±2.1	±0.8
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	26.1	29.7	30.5	30.7
		S.D.	±0.1	±0.2	±1.5	±1.8
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	25.8	25.0*	28.9	29.3
		S.D.	±0.2	±1.9	±0.2	±1.6
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	28.3	30.5	34.1	29.6
		S.D.	±0.1	±1.6	±2.4	±0.4
		N	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	20.6	20.1	22.8	21.2
		S.D.	±2.3	±0.9	±0.6	±0.6
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	20.0	19.3	25.1	22.5
		S.D.	±1.9	±0.3	±1.1	±4.1
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	20.6	20.3	23.3	22.4
		S.D.	±0.8	±0.7	±3.8	±1.0
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	17.9	20.9	23.6	22.1
		S.D.	±1.0	±1.1	±1.2	±1.4
		N	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Significant differences as compared with control : * $P<0.05$

(라) 부검소견 : 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았음(Table 6)

Table 6. Necropsy finding

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal examined	Removal reason	Submitted	Necropsy findings	
					External	Internal
Male	G1 (0)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G2 (500)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G3 (1000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G4 (2000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
Female	G1 (0)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G2 (500)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G3 (1000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G4 (2000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)

(마) 장기중량 : 절대장기중량 및 상대장기중량 모두 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이는 관찰되지 않았음(Table 7)

Table 7. organ weight

Dose (mg/kg)		Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Testis / Ovary (g)	Brain (g)	Lung (g)	Heart (g)	Thymus (g)	Prostate /Uterus(g)	Adrenal gland(g)	pituitary gland(g)
G1 (0)	Mean	10.29	2.59	0.70	3.02	2.10	1.40	1.27	0.47	0.45	0.067	0.024
	S.D.	±0.91	±0.16	±0.16	±0.22	±0.13	±0.10	±0.19	±0.10	±0.07	±0.011	±0.009
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	9.69	2.49	0.67	3.07	1.98	1.39	1.17	0.46	0.54	0.068	0.018
	S.D.	±0.67	±0.07	±0.05	±0.18	±0.07	±0.11	±0.05	±0.09	±0.07	±0.008	±0.008
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

G3 (1000)	Mean	8.95	2.41	0.59	3.20	2.00	1.32	1.16	0.41	0.49	0.064	0.024
	S.D.	±0.65	±0.15	±0.04	±0.30	±0.06	±0.05	±0.08	±0.05	±0.07	±0.009	±0.007
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (2000)	Mean	9.83	2.41	0.74	2.86	2.07	1.54	1.25	0.42	0.54	0.064	0.018
	S.D.	±0.25	±0.12	±0.12	±0.33	±0.07	±0.18	±0.02	±0.08	±0.12	±0.014	±0.009
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G1 (0)	Mean	6.42	1.82	0.54	0.12	1.94	1.16	0.88	0.48	0.640	0.082	0.019
	S.D.	±0.36	±0.17	±0.05	±0.01	±0.06	±0.09	±0.05	±0.11	±0.234	±0.005	±0.002
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	6.54	1.84	0.49	0.11	2.04	1.16	0.91	0.45	0.654	0.080	0.026
	S.D.	±0.60	±0.15	±0.07	±0.03	±0.10	±0.06	±0.08	±0.08	±0.238	±0.006	±0.008
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (1000)	Mean	6.80	1.93	0.53	0.14	1.94	1.20	0.99	0.51	0.736	0.085	0.022
	S.D.	±0.57	±0.15	±0.06	±0.01	±0.09	±0.09	±0.05	±0.05	±0.248	±0.009	±0.010
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (2000)	Mean	6.37	1.75	0.49	0.11	1.95	1.14	0.84	0.44	0.506	0.074	0.019
	S.D.	±0.17	±0.07	±0.07	±0.02	±0.09	±0.09	±0.07	±0.10	±0.085	±0.013	±0.008
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dose (mg/kg)	Body weight (g)	Liver (%)	Kidney (%)	Spleen (%)	Testis / Ovary (%)	Brain (%)	Lung (%)	Heart (%)	Thymus (%)	Prostate /Uterus(g)	Adrenal gland(%)	pituitary gland (%)
G1 (0)	Mean	337.2	3.06	0.77	0.21	0.45	0.62	0.42	0.37	0.14	0.13	0.020
	S.D.	±30.8	±0.23	±0.05	±0.04	±0.04	±0.02	±0.02	±0.03	±0.02	±0.02	±0.003
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	329.5	2.94	0.76	0.20	0.47	0.60	0.42	0.35	0.14	0.16	0.021
	S.D.	±9.6	±0.21	±0.03	±0.02	±0.04	±0.02	±0.04	±0.01	±0.02	±0.02	±0.002
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (1000)	Mean	321.6	2.79	0.75	0.18	0.50	0.62	0.41	0.36	0.13	0.15	0.020
	S.D.	±11.5	±0.20	±0.04	±0.02	±0.05	±0.03	±0.01	±0.02	±0.02	±0.02	±0.003
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (2000)	Mean	334.7	2.94	0.72	0.22	0.43	0.62	0.46	0.38	0.13	0.16	0.019
	S.D.	±10.9	±0.15	±0.04	±0.03	±0.05	±0.02	±0.05	±0.02	±0.02	±0.04	±0.005
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G1 (0)	Mean	217.2	2.96	0.84	0.25	0.055	0.89	0.53	0.41	0.22	0.299	0.038
	S.D.	±10.6	±0.04	±0.04	±0.02	±0.006	±0.03	±0.04	±0.03	±0.05	±0.122	±0.001
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	216.4	3.02	0.85	0.23	0.049	0.95	0.54	0.42	0.21	0.299	0.037
	S.D.	±17.4	±0.13	±0.07	±0.03	±0.013	±0.08	±0.04	±0.05	±0.04	±0.097	±0.003
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (1000)	Mean	224.8	3.02	0.86	0.24	0.061	0.87	0.54	0.44	0.23	0.327	0.038
	S.D.	±12.7	±0.16	±0.04	±0.03	±0.003	±0.08	±0.04	±0.03	±0.02	±0.106	±0.004
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (2000)	Mean	209.1	3.05	0.84	0.23	0.051	0.93	0.55	0.40	0.21	0.242	0.035
	S.D.	±5.6	±0.06	±0.05	±0.03	±0.008	±0.05	±0.04	±0.04	±0.04	±0.039	±0.005
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(바) 혈액학적 검사 : 압, 수 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았음(Table 8).

Table 8. Hematocrit

Sex	Dose (mg/kg)		WBC (10 ³ /uL)	RBC (10 ⁶ /uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RETIC (%)	PLT (10 ³ /uL)	PT (sec)	APTT (sec)
Male	G1 (0)	Mean	4.39	7.42	14.4	42.0	56.6	19.4	34.2	3.04	1154	13.2	20.4
		S.D.	±1.28	±0.30	±0.5	±1.3	±0.9	±0.2	±0.4	±0.59	±185	±1.1	±1.3
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	4.55	7.65	14.8	43.5	56.9	19.3	33.9	3.34	1030	14.0	20.1
		S.D.	±0.50	±0.35	±0.6	±1.8	±1.1	±0.4	±0.4	±0.35	±172	±0.7	±1.9
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	4.60	7.74	14.7	43.6	56.4	19.1	33.8	2.92	1062	13.8	20.0
		S.D.	±1.27	±0.49	±0.6	±2.0	±2.0	±0.8	±0.5	±0.41	±107	±0.5	±1.2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	5.35	7.62	15.0	44.4	58.4	19.8	33.9	3.45	1093	13.5	19.7
		S.D.	±2.44	±0.59	±0.8	±2.4	±2.3	±0.8	±0.3	±0.55	±127	±0.2	±2.2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	5.25	7.47	14.6	42.4	56.9	19.6	34.5	2.62	1198	13.6	16.9
		S.D.	±1.37	±0.26	±0.4	±1.0	±1.3	±0.4	±0.3	±0.45	±83	±0.2	±1.8
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	5.51	7.67	14.9	42.9	56.0	19.4	34.6	2.25	1182	13.3	17.8
		S.D.	±1.11	±0.28	±0.2	±0.5	±1.7	±0.6	±0.1	±0.42	±171	±0.3	±1.4
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	4.48	7.45	14.8	43.0	57.7	19.9	34.4	2.70	1119	13.3	19.2
		S.D.	±2.05	±0.45	±0.8	±2.4	±1.2	±0.3	±0.4	±0.27	±73	±0.6	±1.4
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	4.29	7.92	15.4	44.1	55.8	19.4	34.9	2.10	1022	13.3	17.0
		S.D.	±2.14	±0.45	±0.6	±2.1	±1.8	±0.6	±0.5	±0.45	±131	±0.2	±1.6
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex	Dose (mg/kg)		Differential leukocyte count				
			Ne (%)	Ly (%)	Mo (%)	Eo (%)	Ba (%)
Male	G1 (0)	Mean	18.4	76.3	2.2	2.5	0.1
		S.D.	±4.1	±4.7	±0.5	±0.7	±0.0
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	18.5	76.0	3.1	1.8	0.2
		S.D.	±3.1	±3.4	±1.2	±0.5	±0.1
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	20.3	75.0	2.0	2.3	0.1
		S.D.	±6.4	±6.4	±0.4	±0.7	±0.1
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	18.2	77.3	2.1	1.9	0.1
		S.D.	±6.6	±7.1	±0.8	±0.8	±0.1
		N	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	15.0	80.5	1.7	2.0	0.1
		S.D.	±7.9	±8.0	±0.5	±0.6	±0.1
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	11.3	83.5	2.2	1.9	0.1
		S.D.	±4.0	±4.1	±1.0	±0.3	±0.1
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	13.7	80.3	2.8	2.1	0.1
		S.D.	±2.3	±1.4	±1.2	±0.5	±0.1
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	13.8	80.6	2.0	2.8	0.1
		S.D.	±5.0	±5.5	±0.7	±1.4	±0.1
		N	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(사) 혈액생화학적 검사 : 암, 수 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았음(Table 9).

Table 9. Bio chemistry

Sex	Dose (mg/kg)	TP	ALB	A/G	T-BIL	ALP	AST	ALT	GGT	CRE A	BUN	T-CH O	HDL-C	LDL-C	TG	GLU	CA	IP	CK	Na	K	Cl	
		(g/dL)	(g/dL)	-	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)	(mmol/L)	(mmol/L)	(mmol/L)
Male	G1 (0)	Mean	6.0	3.8	1.8	0.11	609	108	35	0.8	0.4	14.3	64	43	12	33	143	9.9	7.1	552	143.0	4.50	104.6
		S.D.	±0.2	±0.1	±0.2	±0.01	±92	±23	±10	±1.3	±0.1	±3.7	±25	±15	±6	±11	±9	±0.3	±0.6	±301	±0.9	±0.30	±1.4
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	5.8	3.8	1.8	0.11	557	99	28	0.5	0.4	14.5	57	39	10	32	153	9.8	7.2	474	142.9	4.54	103.8
		S.D.	±0.1	±0.1	±0.1	±0.02	±35	±22	±3	±0.8	±0.1	±3.0	±9	±6	±2	±14	±15	±0.2	±0.4	±253	±0.9	±0.32	±1.6
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	6.0	3.8	1.7	0.10	566	102	33	0.5	0.4	15.1	55	37	12	24	160	9.7	7.5	559	143.8	4.58	104.5
		S.D.	±0.1	±0.1	±0.1	±0.01	±99	±25	±3	±0.5	±0.0	±2.8	±10	±7	±3	±11	±47	±0.3	±0.4	±341	±1.0	±0.29	±1.1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	5.9	3.8	1.8	0.12	636	100	31	0.2	0.4	15.6	54	37	11	23	167	9.7	7.5	483	143.5	4.71	104.2
		S.D.	±0.2	±0.1	±0.1	±0.03	±152	±26	±4	±0.4	±0.0	±3.1	±11	±6	±4	±8	±22	±0.2	±0.2	±352	±1.5	±0.18	±0.8
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Fe-male	G1 (0)	Mean	6.3	4.1	1.8	0.09	345	81	22	1.0	0.5	17.9	75	49	11	12	138	10.0	7.3	231	142.1	4.23	106.0
		S.D.	±0.4	±0.2	±0.1	±0.01	±76	±23	±4	±1.5	±0.1	±5.0	±11	±10	±3	±3	±19	±0.3	±0.9	±144	±0.6	±0.30	±1.2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	6.4	4.2	2.0	0.11	336	77	22	0.5	0.5	20.4	81	51	11	19	139	10.2	7.4	251	142.0	4.31	105.5
		S.D.	±0.3	±0.2	±0.1	±0.01	±50	±17	±3	±0.5	±0.1	±6.4	±12	±3	±2	±6	±20	±0.1	±0.8	±171	±0.9	±0.34	±0.4
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	6.3	4.1	1.9	0.11	410	86	21	1.1	0.4	16.6	76	48	10	15	144	10.1	7.5	308	142.2	4.21	105.1
		S.D.	±0.2	±0.1	±0.1	±0.02	±102	±16	±1	±1.0	±0.1	±1.9	±8	±8	±2	±3	±24	±0.3	±0.5	±193	±0.8	±0.31	±1.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	6.1	4.0	1.9	0.11	335	86	18	1.8	0.4	16.9	72	48	10	11	135	10.0	7.7	431	142.1	4.22	105.3
		S.D.	±0.3	±0.2	±0.1	±0.02	±68	±30	±3	±1.5	±0.1	±7.1	±7	±3	±2	±2	±15	±0.3	±0.5	±278	±0.5	±0.32	±1.9
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(아) 병리조직학적 검사 : 독성학적 변화가 관찰되지 않았음

다. 유전독성학적 안전성 평가(in vitro 및 in vivo)

(1) 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 용량설정시험의 농도 : 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL

(다) 본시험의 농도 : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 mg/mL

→ 각 처리군별로 시험물질을 처리한 후 균의 생육저해 및 콜로니수의 변화를 관찰.

(라) 결과

① 용량설정시험

- i) 용량설정시험 결과를 Table 10 에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았다.
- ii) 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 군주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 침전은 확인되지 않았다.

② 분시험

- i) 분시험 결과를 Table 11 에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았다. 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 군주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았다. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 침전은 확인되지 않았다.

③ 무균시험

- i) 용량설정시험, 분시험 모두 최고용량의 시험물질 조제액 및 S9 mix는 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않았다.

Table 10 . Result of concentration range-finding test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)(Factor) ^a							
			Without S9 mix				With S9 mix			
TA98	Test solution	0	18	\pm	1		26	\pm	5	
		50	17	\pm	1	[0.9]	27	\pm	3	[1.0]
		100	17	\pm	0	[1.0]	26	\pm	1	[1.0]
		500	16	\pm	1	[0.9]	28	\pm	1	[1.1]
		1000	17	\pm	1	[0.9]	26	\pm	1	[1.0]
		5000	17	\pm	1	[0.9]	26	\pm	3	[1.0]
TA100	Test solution	0	83	\pm	3		77	\pm	9	
		50	86	\pm	1	[1.0]	84	\pm	7	[1.1]
		100	87	\pm	1	[1.0]	72	\pm	24	[0.9]
		500	94	\pm	13	[1.1]	78	\pm	6	[1.0]
		1000	90	\pm	4	[1.1]	78	\pm	11	[1.0]
		5000	104	\pm	13	[1.3]	74	\pm	9	[1.0]
TA1535	Test solution	0	11	\pm	1		11	\pm	1	
		50	12	\pm	1	[1.1]	11	\pm	1	[1.0]
		100	11	\pm	1	[1.0]	11	\pm	1	[1.0]
		500	10	\pm	0	[0.9]	11	\pm	1	[1.0]
		1000	12	\pm	1	[1.1]	12	\pm	1	[1.1]
		5000	11	\pm	1	[1.0]	8	\pm	2	[0.8]

		0	7	±	2		9	±	2	
		50	7	±	1	[1.0]	9	±	1	[1.0]
TA1537	Test solution	100	7	±	2	[1.0]	11	±	1	[1.2]
		500	8	±	1	[1.0]	9	±	1	[1.0]
		1000	6	±	0	[0.8]	8	±	1	[0.9]
		5000	7	±	2	[0.9]	8	±	1	[0.9]
		0	35	±	4		38	±	4	
		50	35	±	2	[1.0]	38	±	8	[1.0]
WP2uvrA	Test solution	100	34	±	2	[1.0]	35	±	3	[0.9]
		500	37	±	3	[1.0]	32	±	3	[0.8]
		1000	34	±	3	[1.0]	41	±	3	[1.1]
		5000	36	±	1	[1.0]	42	±	4	[1.1]
Positive controls										
TA98	AF-2	0.1	534	±	26	[30.5]				
TA100	AF-2	0.01	385	±	6	[4.7]				
TA1535	NaN3	0.5	352	±	25	[32.0]				
TA1537	9-AA	40.0	227	±	78	[31.0]				
WP2uvrA	AF-2	0.01	427	±	14	[12.2]				
TA98	2-AA	0.5					216	±	6	[8.2]
TA100	2-AA	1.0					423	±	12	[5.5]
TA1535	2-AA	2.0					142	±	6	[13.3]
TA1537	2-AA	2.0					170	±	11	[18.9]
WP2uvrA	2-AA	10.0					317	±	13	[8.4]

Table 11. Result of main test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g/p}$ late)	Colonies/plate (Mean \pm S.D.) [Factor] a)							
			Without S9 mix				With S9 mix			
		0	19	±	1		25	±	1	
		312.5	20	±	1	[1.0]	24	±	2	[0.9]
TA98	Test solution	625	18	±	1	[0.9]	25	±	2	[1.0]
		1250	16	±	1	[0.9]	26	±	1	[1.1]
		2500	16	±	2	[0.9]	25	±	3	[1.0]
		5000	18	±	1	[0.9]	23	±	1	[0.9]
		0	100	±	1		115	±	3	
		312.5	100	±	2	[1.0]	115	±	2	[1.0]
TA100	Test solution	625	102	±	2	[1.0]	115	±	1	[1.0]
		1250	101	±	2	[1.0]	113	±	2	[1.0]
		2500	104	±	4	[1.0]	110	±	3	[1.0]
		5000	102	±	3	[1.0]	107	±	5	[0.9]
		0	9	±	1		10	±	3	
		312.5	8	±	1	[0.9]	11	±	1	[1.1]
TA1535	Test solution	625	8	±	1	[0.9]	11	±	1	[1.1]
		1250	7	±	1	[0.7]	12	±	2	[1.2]
		2500	8	±	1	[0.9]	9	±	1	[0.9]
		5000	8	±	1	[0.9]	8	±	1	[0.8]
TA1537	Test	0	9	±	1		9	±	1	

		312.5	8	±	1	[0.9]	8	±	1	[0.8]
		625	8	±	2	[0.9]	9	±	1	[1.0]
	solution	1250	10	±	1	[1.1]	10	±	1	[1.1]
		2500	9	±	2	[1.0]	9	±	1	[1.0]
		5000	10	±	2	[1.1]	11	±	1	[1.1]
		0	44	±	4		57	±	2	
		312.5	44	±	3	[1.0]	58	±	1	[1.0]
	Test solution	625	43	±	2	[1.0]	53	±	2	[0.9]
		1250	44	±	2	[1.0]	55	±	3	[1.0]
		2500	43	±	1	[1.0]	58	±	1	[1.0]
		5000	45	±	2	[1.0]	57	±	1	[1.0]
Positive controls										
TA98	AF-2	0.1	326	±	34	[17.2]				
TA100	AF-2	0.01	417	±	7	[4.2]				
TA1535	NaN ₃	0.5	325	±	11	[36.1]				
TA1537	9-AA	40.0	255	±	12	[28.4]				
WP2uvrA	AF-2	0.01	240	±	24	[5.4]				
TA98	2-AA	0.5					175	±	9	[7.0]
TA100	2-AA	1.0					427	±	23	[3.7]
TA1535	2-AA	2.0					143	±	20	[13.8]
TA1537	2-AA	2.0					130	±	8	[14.0]
WP2uvrA	2-AA	10.0					304	±	8.5	[5.4]

(2) 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 염색체이상시험 : 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시험물질을 처리한 후 콜세미드를 처리하여 증기세포를 유도한 후 표본을 제작하여 표본의 구조적이상 및 수적이상을 관찰

(다) 결과

① 농도결정시험(Table 12)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았다.

ii) S9 mix 미적용(이하, -S9 mix으로 칭함), S9 mix 적용(이하, +S9 mix으로 칭함) 및 연속처리법 24 시간처리(이하, 24 시간처리로 칭함)에서 각각 156, 313, 625, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 를 설정하며 실시한 시험결과 50 % 이상의 세포증식억제용량은 관찰되지 않았다.

② 염색체이상시험(단시간처리법, Table 13, 14)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았다.

ii) 표본관찰 결과, -S9 mix의 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.5, 0.0 및 0.5 %, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 % 로 관찰되었다. 그리고, +S9 mix의 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의

염색체구조이상세포의 출현빈도는 0.5, 0.5 및 0.5 %, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.5 %로 관찰되었다.

iii) 각 처리조건의 음성대조군 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5 % 미만이었으며, 양성대조군의 경우 구조이상 세포의 출현빈도는 10 % 이상이었다.

③ 염색체이상시험(연속처리법, Table 15)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았다.

ii) 표본관찰 결과, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.5 % 이었고 염색체수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 % 이었다.

iii) 음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5 % 미만이었으며 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10 % 이상이었다.

Table 12. Results of cell growth inhibition test

Cell growth index (%)			
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Short-term treatment test		Continuous treatment test
	-S9 mix	+S9 mix	24 hours exposure
Negative control	100.0	100.0	100.0
156	105.82	103.20	96.43
313	101.76	98.46	104.27
625	97.76	100.00	97.15
1250	100.88	102.72	102.09
2500	99.51	102.25	101.06
5000	100.38	100.59	104.27
IC50	- $\mu\text{g/mL}$	- $\mu\text{g/mL}$	- $\mu\text{g/mL}$

- : 50 % 이상의 세포증식억제용량은 관찰되지 않았기 때문에 IC50은 산출하지 않음

Table 13. Result of chromosomal aberration test (Short-term treatment test, -S9 mix)

Treatment • recovery period (h)	S9 mix	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)					
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)		
6-18	-	Negativecontrol (별균증류수)	100	0	1	0	0	0	0	1	0	95.0	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	105.0	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	88.9	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	0	1	0	0	102.5	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	0	95.7	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	118.9	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	2	0	99.9	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2	0	109.4	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	2	97.1	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	0	1	1	0	99.0	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	3	0	98.1	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	Positivecontrol (MMC0.1)	100	3	31	1	1	3	28	2	/	/	100	0	1	1	
			100	2	29	0	1	2	25	2			100	0	0	0	
			200	5 (2.5)	60 (30.0)	1 (0.5)	2 (1.0)	5 (2.5)	53 (26.5)	4			200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	

MMC: Mitomycin C

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

Table 14. Result of chromosomal aberration test (Short-term treatment test, +S9 mix)

Treatment • recovery period (h)	S9 mix	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)					
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)		
6-18	+	Negativecontrol (별균증류수)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	116.2	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83.8	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250	100	1	0	0	0	0	1	0	0	99.3	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	125.2	100	0	0	0
			200	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	0	103.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	2500	100	0	1	0	0	0	1	0	0	95.9	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	0	104.1	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	0	91.8	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	5000	100	0	1	0	0	0	1	0	0	101.0	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	116.4	100	1	0	1
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	0	99.7	200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)
6-18	+	Positivecontrol (CPA5)	100	2	39	1	2	4	32	1	/	/	100	0	1	1	
			100	2	29	2	1	2	25	1			100	0	1	1	
			200	4 (2.0)	68 (34.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	6 (3.0)	57 (28.5)	2			200	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	

CPA : cyclophosphamide

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

Table 15. Result of chromosomal aberration test (Continuous treatment test, -S9 mix)

Treatment · recovery period (h)	S9 mix	Concentration (μ g/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
24-0	-	Negativecontrol (멸균증류수)	100	0	0	0	0	0	0	0	1	98.9	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	0	1	0	101.1	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	95.6	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	96.6	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	96.1	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	2500	100	0	0	0	0	0	0	0	0	95.5	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	97.0	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	96.2	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	0	95.3	100	0	0	0
			100	0	1	0	0	0	0	1	0	93.0	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	94.1	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	Positivecontrol (MMC0.05)	100	2	36	0	1	3	31	0	/	100	0	0	0	
			100	3	29	0	0	2	26	0		100	0	0	0	
			200	5 (2.5)	65 (32.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	5 (2.5)	57 (28.5)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

MMC: Mitomycin C

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

(3) ICR 마우스에 대한 소핵시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 예비시험 : 시험물질 투여군 4 군 및 음성대조군 1 군의 총 5 군으로 구성하고 각 군당 3 마리의 동물을 사용하였음.

(다) 본시험 : 예비시험 결과, 최고 용량인 2000 mg/kg B.W.군에서도 사망 예가 보이지 않았으므로, 본 시험에서 최고 용량은 2000 mg/kg/ B.W.로 하였음.

(라) 결과

① 예비시험 결과

i) 예비시험 결과, 시험물질 투여 후 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았음.

ii) 예비시험 결과를 토대로 본시험에서 최고용량은 2000 mg/kg B.W.으로 설정하였음.

② 본시험 결과

i) 체중 : 부검 시 체중을 비교한 결과 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적인 유의성이 관찰되지 않았음.

ii) 일반증상 : 본시험의 시험군 중 사망동물은 관찰되지 않았음(Table 16).

Table 16. Clinical signs and mortalities

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kgB.W.)	Clinical signs	Mortality (dead/total)
	Negative control	0	N	0% (0/5) ^a
	Test substance	500	N	0% (0/5) ^a
Male	Test substance	1000	N	0% (0/5) ^a
	Test substance	2000	N	0% (0/5) ^a
	Positivecontrol (CPA)	70	N	0% (0/5) ^a

N : Normal, a : No. of dead animals/No. of tested animals

SDW : Sterile Distilled Water, CPA : Cyclophosphamide monohydrate

iii) 소핵출현빈도 및 총적혈구 비율

- 부검 후 개체 당 2000개 이상의 다염성적혈구 관찰 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 (0.06 ± 0.02) %이었으며, 500 mg/kg B.W. 투여군의 소핵출현빈도는 (0.06 ± 0.07) %, 1000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 (0.10 ± 0.06) %, 2000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 (0.08 ± 0.04) %, 양성대조군의 빈도는 (3.98 ± 0.48) %를 나타내었음. 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군에 비해 증가하는 경향이 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 차이도 나타나지 않았음. 한편 양성대조군의 소핵 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났음($P < 0.01$)(Table 18).
- 세포독성의 지표인 $[PCE/(PCE+NCE)]$ 비율은 위와 같은 순서로 평균 (60.07 ± 2.54) %, (56.32 ± 3.14) %, (58.52 ± 1.75) %, (58.98 ± 4.77) % 및 (41.58 ± 1.68) % 이었으며 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 한편 양성대조군의 $[PCE/(PCE+NCE)]$ 비율은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타났음($P < 0.01$)(Table 17).

Table 17. Micronucleus test in ICR mice (Group summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kgB.W.)	No. of animal	MNPCE/2000PCEs (Mean±S.D.,%)			PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D.,%)		
	Negative control	0	5	0.06	±	0.02	60.07	±	2.54
	Test substance	500	5	0.06	±	0.07	58.32	±	3.14
Male	Test substance	1000	5	0.10	±	0.06	58.52	±	1.75
	Test substance	2000	5	0.08	±	0.04	58.98	±	4.77
	Positivecontrol (CPA)	70	5	3.98	±	0.48 *	41.58	±	1.68 *

* P<0.01

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide monohydrate (positive control)

2. 부분정제한 고초균 (*Bacillus subtilis* SN7)의 조항균물질의 독성평가

가. 단회투여 독성평가(*in vivo*)

- (1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)
- (2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.
- (3) 투여방법 : 경구 / 단회
- (4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제
- (5) 시험군의 구성

시험군	시험물질	성	마리수	동물번호	투여용량 (mg/kg B.W.)
1군 (G1)	멸균증류수 (대조군)	수컷	5	1101 ~ 1105	0
		암컷	5	2101 ~ 2105	
2군 (G2)		수컷	5	1201 ~ 1205	500
		암컷	5	2201 ~ 2205	
3군 (G3)	시험물질 (투여군)	수컷	5	1301 ~ 1305	1000
		암컷	5	2301 ~ 2305	
4군 (G4)		수컷	5	1401 ~ 1405	2000
		암컷	5	2401 ~ 2405	

(6) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 부검

(7) 결과

(가) 사망률 및 일반증상 : 실험기간 동안 일반증상 관찰 결과(Table 18, 19) 시험물질 투여에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았음.

Table 18. Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality	
		Male	Female
G1	0	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G2	500	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G3	1000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G4	2000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)

Table 19. Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animal	Clinical signs
G1	0	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G2	500	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G3	1000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G4	2000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal

(나) 체중변화 : 체중 측정 결과(Table 20), 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 시험물질 투여군과 부형제 대조군간 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음.

Table 20. Body weight

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days after administration (g)			
			0	7	14	
G1	0	Male	Mean	176.4	267.2	314.9
			S.D.	4.4	9.3	13.1
			N	5	5	5
		Female	Mean	137.2	190.1	211.4
			S.D.	6.2	10.4	15.0
			N	5	5	5
G2	500	Male	Mean	176.6	258.9	299.1
			S.D.	5.1	16.9	29.4
			N	5	5	5
		Female	Mean	140.3	191.3	210.4
			S.D.	5.1	7.1	9.1
			N	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	174.2	258.4	302.2
			S.D.	4.9	11.5	14.5
			N	5	5	5
		Female	Mean	141.5	194.4	217.0
			S.D.	7.6	17.2	20.5
			N	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	173.1	260.0	303.1
			S.D.	7.0	6.6	12.2
			N	5	5	5
		Female	Mean	139.2	196.0	214.7
			S.D.	5.9	5.2	4.3
			N	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(다) 부검소견 : 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았음.

나. 4주 용량결정 독성시험(*in vivo*)

- (1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)
- (2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.
- (3) 투여방법 : 경구 / 4주동안 1일 1회
- (4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제
- (5) 시험군의 구성

시험군	시험물질	성	마리수	동물번호	투여용량 (mg/kg B.W.)
1군 (G1)	멸균증류수 (대조군)	수컷	5	1101 ~ 1105	0
		암컷	5	2101 ~ 2105	
2군 (G2)		수컷	5	1201 ~ 1205	500
		암컷	5	2201 ~ 2205	
3군 (G3)	시험물질 (투여군)	수컷	5	1301 ~ 1305	1000
		암컷	5	2301 ~ 2305	
4군 (G4)		수컷	5	1401 ~ 1405	2000
		암컷	5	2401 ~ 2405	

- (6) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료 섭취량 측정, 부검, 장기중량 측정, 혈액학적 검사, 혈액생화학검사, 병리조직학적 검사

(7) 결과

- (가) 사망률 및 일반증상 : 시험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 특이한 이상증상을 보인 동물은 관찰되지 않았음.

(나) 체중변화 : 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 시험물질 투여군과 부형제 대조군간 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음(Table 21)

Table 21. Body weight

Sex	Dose (mg/kg)		Body weight (g) on week			
			1	2	3	4
Male	G1 (0)	Mean	262.6	322.2	368.7	402.6
		S.D.	12.3	18.9	25.2	27.1
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	268.8	330.4	374.3	404.0
		S.D.	12.4	21.5	32.2	35.8
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	263.0	318.8	356.4	378.8
		S.D.	12.3	20.6	24.6	24.4
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	265.8	325.9	371.8	404.2
		S.D.	13.1	26.8	37.7	45.3
		N	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	178.3	206.7	226.3	238.1
		S.D.	17.5	15.5	16.2	13.5
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	179.7	205.7	230.0	240.7
		S.D.	11.4	15.0	17.4	16.4
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	184.1	211.7	234.6	245.8
		S.D.	9.5	17.5	21.0	24.5
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	175.6	205.4	225.0	236.4
		S.D.	9.2	7.7	6.9	10.2
		N	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(다) 사료섭취량 : 시험기간 동안 사료 섭취량에서는 투여 4주차에 암컷 1000 mg/kg 군에서 대조군에 비해 유의하게($p<0.05$) 증가하였고, 수컷에서는 대조군과 비교하여 유의적인 변화가 관찰되지 않았음(Table 22).

Table 22. Food consumption

Sex	Dose (mg/kg)		Food consumption (g) on week			
			1	2	3	4
Male	G1 (0)	Mean	29.68	30.62	36.76	36.52
		S.D.	0.61	0.06	2.61	3.72
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	47.06	30.36	37.10	34.16
		S.D.	13.25	0.33	3.93	2.27
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	30.40	30.16	34.34	31.20
		S.D.	1.00	0.33	0.26	0.27
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	30.52	30.66	38.10	35.02
		S.D.	0.94	0.65	4.29	3.04
		N	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	23.26	21.20	27.50	22.16
		S.D.	1.63	1.00	0.59	2.46
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	21.44	21.48	26.04	21.26
		S.D.	0.90	2.07	1.10	0.37
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	24.40	20.84	24.80	28.80*
		S.D.	0.68	2.25	2.15	1.64
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	21.54	22.70	26.44	20.42
		S.D.	0.51	1.23	0.15	1.94
		N	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Significant differences as compared with control : * $P<0.05$

(라) 부검소견 : 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았음(Table 23).

Table 23. Necropsy finding

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal examined	Removal reason	Submitted	Necropsy findings	
					External	Internal
Male	G1 (0)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G2 (500)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G3 (1000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G4 (2000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
Female	G1 (0)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G2 (500)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G3 (1000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G4 (2000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)

(마) 장기중량 : 절대장기중량 및 상대장기중량 모두 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이는 관찰되지 않았음(Table 24).

Table 24. 이어서

Dose (mg/kg)		Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Adrenal gland(g)	Testis (g)/Ovary (g)	Brain (g)	Heart (g)	Lung (g)	Thymus (g)	Prostate (g)/Uterus(g)	epididymis(g)
G1 (0)	Mean	10.93	2.98	0.74	0.068	2.90	2.06	1.28	1.46	0.53	0.57	1.00
	S.D.	0.68	0.34	0.11	0.008	0.19	0.08	0.07	0.12	0.12	0.08	0.09
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	10.96	2.97	0.78	0.081	3.01	2.10	1.32	1.56	0.61	0.61	1.09
	S.D.	1.40	0.43	0.08	0.016	0.16	0.05	0.17	0.27	0.10	0.09	0.09
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (1000)	Mean	10.38	2.79	0.68	0.066	2.99	2.02	1.25	1.48	0.52	0.58	1.08
	S.D.	1.02	0.26	0.07	0.010	0.22	0.07	0.04	0.25	0.07	0.15	0.09
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (2000)	Mean	10.80	2.89	0.69	0.070	3.15	2.05	1.31	1.52	0.55	0.56	1.07
	S.D.	2.11	0.32	0.14	0.011	0.30	0.10	0.08	0.13	0.10	0.09	0.05
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G1 (0)	Mean	6.58	1.81	0.46	0.092	0.137	1.92	0.83	1.20	0.51	0.60	-
	S.D.	0.84	0.19	0.06	0.012	0.027	0.04	0.07	0.13	0.11	0.13	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G2 (500)	Mean	6.61	1.79	0.53	0.102	0.135	1.87	0.84	1.21	0.57	0.58	-
	S.D.	0.76	0.21	0.08	0.019	0.022	0.06	0.07	0.11	0.07	0.25	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G3 (1000)	Mean	7.24	1.88	0.52	0.098	0.142	1.97	0.89	1.28	0.57	0.63	-
	S.D.	0.71	0.16	0.14	0.012	0.021	0.10	0.12	0.20	0.12	0.15	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G4 (2000)	Mean	6.27	1.80	0.46	0.087	0.124	1.91	0.82	1.15	0.52	0.55	-
	S.D.	0.43	0.23	0.05	0.015	0.015	0.06	0.03	0.10	0.11	0.17	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-

Table 24. organ weight

Dose (mg/kg)		Body weight(g)	Liver (%)	Kidney (%)	Spleen (%)	Adrenal gland(%)	Testis (%)/Ovary (%)	Brain (%)	Heart (%)	Lung (%)	Thymus (%)	Prostate (%)/Uterus(%)	epididymis(%)
G1 (0)	Mean	373.2	2.93	0.80	0.20	0.018	0.78	0.55	0.34	0.39	0.14	0.15	0.27
	S.D.	26.2	0.05	0.04	0.02	0.002	0.05	0.03	0.02	0.03	0.04	0.02	0.03
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	375.2	2.91	0.79	0.21	0.022	0.81	0.56	0.35	0.41	0.16	0.16	0.29
	S.D.	32.9	0.18	0.06	0.01	0.003	0.08	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.02
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (1000)	Mean	354.8	2.92	0.79	0.19	0.019	0.85	0.57	0.35	0.41	0.15	0.16	0.31
	S.D.	25.2	0.15	0.04	0.01	0.004	0.10	0.02	0.03	0.04	0.01	0.04	0.03
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (2000)	Mean	375.7	2.85	0.77	0.18	0.019	0.84	0.55	0.35	0.41	0.15	0.15	0.29
	S.D.	40.2	0.26	0.02	0.02	0.003	0.09	0.08	0.03	0.01	0.01	0.03	0.03
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G1 (0)	Mean	218.7	3.00	0.83	0.21	0.042	0.062	0.88	0.38	0.55	0.23	0.28	-
	S.D.	15.7	0.20	0.07	0.02	0.005	0.009	0.05	0.02	0.03	0.04	0.04	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G2 (500)	Mean	222.6	2.97	0.80	0.24	0.046	0.061	0.84	0.38	0.54	0.26	0.26	-
	S.D.	16.7	0.15	0.06	0.03	0.009	0.013	0.08	0.04	0.02	0.03	0.09	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G3 (1000)	Mean	225.7	3.21	0.83	0.23	0.044	0.063	0.88	0.40	0.56	0.25	0.28	-
	S.D.	22.7	0.16	0.05	0.05	0.005	0.009	0.05	0.02	0.05	0.03	0.07	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G4 (2000)	Mean	216.4	2.90	0.83	0.21	0.040	0.057	0.89	0.38	0.53	0.24	0.25	-
	S.D.	10.2	0.11	0.08	0.02	0.007	0.007	0.04	0.01	0.04	0.05	0.07	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(바) 혈액학적 검사 : 압, 수 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았음(Table 25).

Table 25. Hematocrit

Sex	Dose (mg/kg)		WBC (10 ³ /uL)	RBC (10 ⁶ /uL)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RETIC (%)	PLT (10 ³ /uL)	PT (sec)	APTT (sec)
Male	G1 (0)	Mean	5.55	7.20	14.1	41.4	57.5	19.7	34.2	3.01	936	12.9	17.0
		S.D.	1.43	0.21	0.3	1.0	1.9	0.6	0.3	0.39	71	1.1	4.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	5.06	7.49	14.4	42.1	56.4	19.3	34.2	2.68	1058	12.4	15.0
		S.D.	1.22	0.41	0.5	1.2	2.4	0.9	0.3	0.27	94	0.5	2.4
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	4.62	7.49	14.9	43.6	58.2	19.9	34.2	2.46	962	12.7	15.7
		S.D.	0.54	0.38	0.6	1.6	2.6	1.0	0.3	0.16	67	0.3	2.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	4.11	7.37	14.5	42.5	57.6	19.7	34.2	2.70	1007	12.4	14.9
		S.D.	1.08	0.33	0.8	2.0	1.6	0.7	0.8	0.63	146	0.3	2.3
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	3.75	7.75	15.1	43.0	55.5	19.5	35.2	2.15	1023	13.0	16.8
		S.D.	1.52	0.35	0.4	1.3	1.9	0.7	0.2	0.25	135	0.3	1.5
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	4.85	7.55	15.0	42.6	56.4	19.8	35.2	2.26	957	13.3	14.4
		S.D.	0.87	0.37	0.6	2.0	1.0	0.4	0.6	0.63	230	1.0	3.5
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	5.40	7.63	15.4	43.7	57.3	20.2	35.2	2.49	1060	12.7	17.3
		S.D.	2.71	0.31	0.4	1.0	1.9	0.7	0.2	0.66	137	0.4	0.7
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	5.07	7.91	15.4	43.8	55.4	19.5	35.3	2.01	1116	13.1	16.7
		S.D.	1.02	0.24	0.3	1.2	0.6	0.3	0.5	0.36	67	0.5	2.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex	Dose (mg/kg)		Differential leukocyte count				
			Ne (%)	Ly (%)	Mo (%)	Eo (%)	Ba (%)
Male	G1 (0)	Mean	16.2	79.1	2.0	1.6	0.2
		S.D.	6.8	7.4	0.5	0.7	0.1
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	12.3	83.9	1.6	1.2	0.2
		S.D.	6.4	6.9	0.6	0.3	0.1
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	17.1	77.9	2.1	1.7	0.1
		S.D.	3.3	3.5	0.8	0.6	0.1
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	13.3	82.3	1.8	1.3	0.1
		S.D.	4.1	3.9	0.2	0.5	0.1
		N	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	10.4	83.8	2.6	1.8	0.2
		S.D.	3.1	4.9	1.3	0.8	0.1
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	10.9	84.3	2.1	1.4	0.1
		S.D.	5.9	5.6	0.2	0.5	0.1
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	10.0	84.2	2.6	1.6	0.2
		S.D.	3.2	3.7	0.4	0.5	0.1
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	8.7	86.2	2.4	1.2	0.1
		S.D.	1.7	1.6	0.4	0.4	0.0
		N	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(사) 혈액생화학적 검사 : 암, 수 모든 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았음(Table 26).

Table 26. Bio chemistry

Sex	Dose (mg/kg)		TP	ALB	A/G	T-BIL	ALP	AST	ALT	CREA	BUN	T-CHO	TG	GLU	CA	IP	Na	K	Cl
			(g/dL)	(g/dL)	-	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mmol/L)	(mmol/L)
Male	G1 (0)	Mean	5.9	3.8	1.8	0.03	675	111	33	0.4	12.2	61	24	154	9.0	7.8	145.7	4.35	106.7
		S.D.	0.2	0.1	0.1	0.02	185	26	3	0.1	2.0	19	11	13	0.3	0.8	0.7	0.35	1.2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	5.8	3.8	1.9	0.02	690	114	30	0.5	12.4	61	26	159	8.9	7.4	146.6	4.37	106.8
		S.D.	0.1	0.0	0.1	0.01	73	26	5	0.0	3.1	15	22	17	0.4	1.0	0.9	0.35	1.5
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	5.7	3.8	2.0	0.02	691	114	30	0.5	12.5	52	34	151	8.0*	7.5	146.5	4.32	107.4
		S.D.	0.2	0.1	0.1	0.02	118	23	5	0.1	1.9	11	5	10	0.4	0.4	1.4	0.35	1.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	5.8	3.8	1.9	0.02	534	115	29	0.5	13.3	68	31	150	8.2	7.3	145.9	4.56	106.4
		S.D.	0.4	0.2	0.1	0.01	76	25	1	0.1	1.6	10	13	23	0.6	0.6	1.2	0.34	0.9
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	5.9	3.9	2.0	0.03	428	102	21	0.5	15.2	51	14	121	8.6	7.3	144.9	4.11	105.1
		S.D.	0.2	0.1	0.1	0.01	80	16	4	0.0	1.3	7	5	14	0.6	0.1	0.8	0.22	0.9
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	6.0	4.0	2.0	0.03	436	102	21	0.6	18.1	43	13	124	8.8	7.4	144.1	4.05	104.7
		S.D.	0.2	0.1	0.1	0.02	83	9	4	0.1	4.4	12	7	18	0.6	0.4	1.2	0.39	1.3
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	6.1	4.0	1.9	0.04	448	94	21	0.5	15.4	58	14	132	8.8	7.2	144.8	3.80	106.1
		S.D.	0.1	0.1	0.1	0.01	88	26	1	0.1	2.2	20	5	11	0.6	0.7	1.3	0.07	1.3
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	6.0	3.9	1.9	0.03	388	92	22	0.5	16.0	51	9	130	8.6	7.5	144.3	4.04	106.0
		S.D.	0.1	0.1	0.1	0.02	76	20	2	0.0	1.6	10	3	8	0.5	0.3	0.4	0.19	1.4
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(아) 병리조직학적 검사 : 수컷 및 암컷에서 관찰된 검사 소견은 대조군의 경우, 신장 수질부의 원주 (medullary cast)이 각각 1 레 및 0 레, 수질부의 낭포 (medullary cyst)가 각각 0 레 및 1 레가 관찰되었음. 고용량 투여군의 경우, 신장 수질부의 광물질 침착 (medullary \ mineralization)은 각각 0 레 및 1 레가 관찰되었음.

다. 유전독성학적 안전성 평가(*in vitro* 및 *in vivo*)

(1) 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 용량설정시험의 농도 : 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL

(다) 분시험의 농도 : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 mg/mL

→ 각 처리군별로 시험물질을 처리한 후 균의 생육저해 및 콜로니수의 변화를 관찰.

(라) 결과

① 용량설정시험

i) 용량설정시험 결과를 Table 27 에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았음.

ii) 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 군주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았음. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 침전은 확인되지 않았음.

② 분시험

i) 분시험 결과를 Table 28 에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았음. 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 군주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았음. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 침전은 확인되지 않았음.

③ 무균시험

i) 용량설정시험, 분시험 모두 최고용량의 시험물질 조제액 및 S9 mix는 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않았음.

Table 27. Result of concentration range-finding test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)(Factor)a)							
			Without S9 mix				With S9 mix			
TA98	Test solution	0	32	\pm	5		39	\pm	3	
		50	31	\pm	2	[1.0]	38	\pm	2	[1.0]
		100	33	\pm	2	[1.0]	39	\pm	4	[1.0]
		500	30	\pm	3	[0.9]	40	\pm	3	[1.0]
		1000	32	\pm	2	[1.0]	39	\pm	3	[1.0]
		5000	32	\pm	4	[1.0]	39	\pm	3	[1.0]
TA100	Test solution	0	119	\pm	4		127	\pm	3	
		50	119	\pm	2	[1.0]	127	\pm	4	[1.0]
		100	120	\pm	3	[1.0]	129	\pm	3	[1.0]

		500	118	±	2	[1.0]	128	±	3	[1.0]
		1000	117	±	3	[1.0]	129	±	5	[1.0]
		5000	119	±	2	[1.0]	131	±	2	[1.0]
TA1535	Test solution	0	13	±	2		15	±	1	
		50	13	±	2	[1.0]	14	±	1	[0.9]
		100	13	±	2	[1.0]	14	±	2	[0.9]
		500	13	±	3	[1.0]	14	±	3	[0.9]
		1000	13	±	1	[1.0]	14	±	2	[0.9]
		5000	14	±	1	[1.0]	14	±	1	[0.9]
TA1537	Test solution	0	10	±	1		13	±	1	
		50	10	±	2	[1.0]	13	±	2	[1.0]
		100	10	±	2	[1.0]	14	±	3	[1.1]
		500	10	±	1	[1.0]	13	±	3	[1.0]
		1000	11	±	3	[1.1]	14	±	2	[1.1]
		5000	10	±	2	[1.0]	13	±	3	[1.0]
WP2uvrA	Test solution	0	50	±	3		57	±	2	
		50	50	±	3	[1.0]	54	±	2	[0.9]
		100	50	±	2	[1.0]	57	±	2	[1.0]
		500	49	±	4	[1.0]	56	±	2	[1.0]
		1000	50	±	3	[1.0]	56	±	2	[1.0]
		5000	50	±	3	[1.0]	57	±	2	[1.0]
Positive controls										
TA98	AF-2	0.1	493	±	18	[15.6]				
TA100	AF-2	0.01	425	±	21	[3.6]				
TA1535	NaN3	0.5	326	±	17	[24.5]				
TA1537	9-AA	40.0	224	±	17	[22.4]				
WP2uvrA	AF-2	0.01	384	±	18	[7.7]				
TA98	2-AA	0.5					253	±	13	[6.6]
TA100	2-AA	1.0					492	±	12	[3.9]
TA1535	2-AA	2.0					170	±	16	[11.1]
TA1537	2-AA	2.0					173	±	8	[13.3]
WP2uvrA	2-AA	10.0					350	±	12	[6.2]

Table 28. Result of main test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)(Factor)a)							
			Without S9 mix				With S9 mix			
TA98	Test solution	0	24	±	3		34	±	3	
		313	24	±	1	[1.0]	32	±	3	[0.9]
		625	23	±	4	[1.0]	34	±	3	[1.0]
		1250	23	±	3	[1.0]	33	±	3	[1.0]

		2500	24	±	3	[1.0]	31	±	3	[0.9]
		5000	23	±	3	[1.0]	33	±	3	[1.0]
TA100	Test solution	0	111	±	2		128	±	5	
		313	111	±	4	[1.0]	127	±	2	[1.0]
		625	106	±	6	[1.0]	123	±	2	[1.0]
		1250	113	±	3	[1.0]	127	±	2	[1.0]
		2500	107	±	7	[1.0]	123	±	2	[1.0]
		5000	116	±	1	[1.0]	126	±	2	[1.0]
TA1535	Test solution	0	15	±	2		17	±	3	
		313	14	±	2	[1.0]	18	±	3	[1.1]
		625	14	±	1	[0.9]	17	±	2	[1.0]
		1250	15	±	3	[1.0]	18	±	2	[1.1]
		2500	15	±	3	[1.0]	17	±	2	[1.0]
		5000	16	±	2	[1.1]	18	±	3	[1.1]
TA1537	Test solution	0	11	±	2		16	±	2	
		313	11	±	2	[0.9]	15	±	2	[0.9]
		625	12	±	3	[1.0]	17	±	2	[1.1]
		1250	11	±	1	[0.9]	16	±	1	[1.0]
		2500	11	±	1	[1.0]	16	±	3	[1.0]
		5000	11	±	2	[0.9]	16	±	3	[1.0]
WP2 <i>uvrA</i>	Test solution	0	48	±	4		56	±	3	
		313	47	±	2	[1.0]	57	±	4	[1.0]
		625	47	±	1	[1.0]	57	±	2	[1.0]
		1250	46	±	2	[1.0]	56	±	4	[1.0]
		2500	45	±	2	[0.9]	54	±	3	[1.0]
		5000	46	±	3	[1.0]	57	±	1	[1.0]
Positive controls										
TA98	AF-2	0.1	474	±	21	[19.8]				
TA100	AF-2	0.01	408	±	14	[3.7]				
TA1535	NaN ₃	0.5	352	±	15	[24.0]				
TA1537	9-AA	40.0	253	±	7	[22.4]				
WP2 <i>uvrA</i>	AF-2	0.01	368	±	14	[7.7]				
TA98	2-AA	0.5					234	±	8	[6.8]
TA100	2-AA	1.0					482	±	13	[3.8]
TA1535	2-AA	2.0					162	±	5	[9.5]
TA1537	2-AA	2.0					178	±	7	[11.1]
WP2 <i>uvrA</i>	2-AA	10.0					339	±	11	[6.1]

(2) 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 염색체이상시험 : 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시험물질을 처리한 후 콜세미드를 처리하여 중기세포를 유도한 후 표본을 제작하여 표본의 구조적 이상 및 수적이상을 관찰

(다) 결과

① 농도결정시험(Table 29)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았음.

ii) S9 mix 미적용(이하, -S9 mix으로 칭함), S9 mix 적용(이하, +S9 mix으로 칭함) 및 연속처리법 24 시간처리(이하, 24 시간처리로 칭함)에서 각각 156, 313, 625, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 를 설정하며 실시한 시험결과 50 % 이상의 세포증식억제용량은 관찰되지 않았음.

② 염색체이상시험(단시간처리법, Table 30, 31)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았음.

ii) 표본관찰 결과, -S9 mix의 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.5 및 0.5 %, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.5, 0.0 및 0.0 %로 관찰되었음. 그리고, +S9 mix의 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 0.0, 0.5 및 0.5 %, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 %로 관찰되었음.

iii) 각 처리조건의 음성대조군 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5 % 미만이었음, 양성대조군의 경우 구조이상 세포의 출현빈도는 10 % 이상이었음.

③ 염색체이상시험(연속처리법, Table 32)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았음.

ii) 표본관찰 결과, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0, 및 0.5 % 이었고 염색체수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 % 이었음.

iii) 음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5 % 미만이었음, 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10 % 이상이었음.

Table 29. Results of cell growth inhibition test

Cell growth index (%)			
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Short-term treatment test		Continuous treatment test
	- S9 mix	+S9 mix	24 hours exposure
Negative control	100.0	100.0	100.0
156	97.76	99.75	97.17
313	87.31	102.48	103.74
625	91.11	104.09	97.78
1250	92.75	100.37	100.20
2500	88.95	96.03	103.44
5000	84.03	95.04	95.96
IC ₅₀	- $\mu\text{g/mL}$	- $\mu\text{g/mL}$	- $\mu\text{g/mL}$

- : 50 % 이상의 세포증식억제용량은 관찰되지 않았기 때문에 IC₅₀은 산출하지 않음

Table 30. Result of chromosomal aberration test (Short-term treatment test, -S9 mix)

Treatment recovery period (h)	S9 mix	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
6-18	-	Negativecontrol (별관증류수)	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99.7	100	0	0	0
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	100.3	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	0	99.7	100	0	1	1
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	93.6	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	96.6	200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)
6-18	-	2500	100	0	0	0	0	0	0	1	112.3	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	1	0	105.0	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	1	108.6	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	5000	100	0	1	0	0	0	1	0	108.5	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	97.1	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	102.8	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	-	Positivecontrol (MMC0.1)	100	1	29	1	2	0	33	1	/	100	1	0	1	
			100	2	26	1	1	0	30	1		100	0	0	0	
			200	3 (1.5)	55 (27.5)	2 (1.0)	3 (1.5)	0 (0.0)	63 (31.5)	2		200	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (0.5)	

MMC: Mitomycin C

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

Table 31. Result of chromosomal aberration test (Short-term treatment test, +S9 mix)

Treatment ·recovery period (h)	S9 mix	Concentration (µg/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
6-18	+	Negativecontrol (별균증류수)	100	0	0	0	0	0	0	0	98.9	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	101.1	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	100.0	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	102.1	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	1	91.1	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	96.6	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	2500	100	0	0	0	0	0	0	0	108.2	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	1	0	99.6	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	103.9	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	5000	100	0	0	0	0	0	0	0	92.6	100	0	0	0	
			100	0	1	0	0	0	1	0	83.7	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	88.1	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
6-18	+	Positivecontrol (CPA5)	100	2	24	2	1	0	29	2	/	100	0	2	2	
			100	1	27	2	1	0	31	1		100	0	1	1	
			200	3 (1.5)	51 (25.5)	4 (2.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	60 (30.0)	3		200	0 (0.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	

CPA : cyclophosphamide

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

Table 32. Result of chromosomal aberration test (Continuous treatment test, -S9 mix)

Treatment ·recovery period (h)	S9 mix	Concentration (µg/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
24-0	-	Negativecontrol (별균증류수)	100	0	1	0	0	0	1	0	104.4	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	95.6	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	100	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
24-0	-	1250	100	0	0	0	0	0	0	0	88.2	100	0	1	1	
			100	0	1	0	0	0	1	0	102.2	100	0	1	1	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	95.18	200	0 (0.0)	2 (1.0)	2 (1.0)	
24-0	-	2500	100	0	1	0	0	0	1	1	93.4	100	0	0	0	
			100	0	0	0	0	0	0	1	95.2	100	0	0	0	
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	2	94.3	200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
24-0	-	5000	100	0	1	0	0	0	1	0	96.5	100	0	1	1	
			100	0	0	0	0	0	0	0	0	92.1	100	0	0	0
			200	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	94.3	200	0 (0.0)	1 (0.5)	1 (0.5)	
24-0	-	Positivecontrol (MMC0.05)	100	2	28	0	1	0	31	0	/	100	0	0	0	
			100	1	26	0	1	0	28	0		100	0	0	0	
			200	3 (1.5)	54 (27.0)	0 (0.0)	2 (1.0)	0 (0.0)	59 (29.5)	0		200	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

MMC: Mitomycin C

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

(3) ICR 마우스에 대한 소핵시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 예비시험 : 시험물질 투여군 4 군 및 음성대조군 1 군의 총 5 군으로 구성하고 각 군당 3 마리의 동물을 사용하였음.

(다) 본시험 : 예비시험 결과, 최고 용량인 2000 mg/kg B.W.군에서도 사망 예가 보이지 않았으므로, 본 시험에서 최고 용량은 2000 mg/kg/ B.W.로 하였음.

(라) 결과

① 예비시험 결과

i) 예비시험 결과, 시험물질 투여 후 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았음.

ii) 예비시험 결과를 토대로 본시험에서 최고용량은 2000 mg/kg B.W.으로 설정하였음.

② 본시험 결과

i) 체중 :부검 시 체중을 비교한 결과 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적인 유의성이 관찰되지 않았음.

ii) 일반증상 : 본시험의 시험군 중 사망동물은 관찰되지 않았음(Table 33).

Table 33. Clinical signs and mortalities

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kgB.W.)	Clinical signs	Mortality (dead/total)
Male	Negative control	0	N	0% (0/3) ^a
	Test substance	500	N	0% (0/3) ^a
	Test substance	1000	N	0% (0/3) ^a
	Test substance	2000	N	0% (0/3) ^a

N : Normal, a : No. of dead animals/No. of tested animals

iii) 소핵출현빈도 및 총적혈구 비율

- 부검 후 개체 당 2000개 이상의 다염성적혈구 관찰 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 (0.06 ± 0.04) %이었으며, 500 mg/kg B.W. 투여군의 소핵출현빈도는 (0.02 ± 0.03) %, 1000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 (0.02 ± 0.03) %, 2000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 (0.05 ± 0.04) %, 양성대조군의 빈도는 (3.88 ± 0.43) %를 나타내었음. 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군에 비해

증가하는 경향이 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 차이도 나타나지 않았음. 한편 양성대조군의 소핵빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났음(P<0.01).

- 세포독성의 지표인 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 위와 같은 순서로 평균 (56.01 ± 1.61) %, (56.78 ± 1.02) %, (55.31 ± 1.48) %, (57.35 ± 2.25) % 및 (45.58 ± 0.94) % 이었으며 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 한편 양성대조군의 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타났음(P<0.01)(Table 34).

Table 34. Micronucleus test in ICR mice (Group summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kgB.W.)	No.of animal	MNPCE/2000PCEs (Mean±S.D.,%)			PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D.,%)		
	Negative control	0	5	0.06	±	0.04	56.01	±	1.61
	Test substance	500	5	0.02	±	0.03	56.78	±	1.02
Male	Test substance	1000	5	0.02	±	0.03	55.31	±	1.48
	Test substance	2000	5	0.05	±	0.04	57.35	±	2.25
	Positivecontrol (CPA)	70	5	3.88	±	0.43	* 45.58	±	0.94 *

* P<0.01

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide monohydrate (positive control) 식용매지 개발

3. 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* EM)의 조항균물질의 독성평가

가. 단회투여 독성평가(*in vivo*)

- (1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)
- (2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.
- (3) 투여방법 : 경구 / 단회
- (4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제

(5) 시험군의 구성

시험군	시험물질	성	마리수	동물번호	투여용량 (mg/kg B.W.)
1군 (G1)	멸균증류수 (대조군)	수컷	5	1101 ~ 1105	0
		암컷	5	2101 ~ 2105	
2군 (G2)		수컷	5	1201 ~ 1205	500
		암컷	5	2201 ~ 2205	
3군 (G3)	시험물질 (투여군)	수컷	5	1301 ~ 1305	1000
		암컷	5	2301 ~ 2305	
4군 (G4)		수컷	5	1401 ~ 1405	2000
		암컷	5	2401 ~ 2405	

(6) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 부검

(7) 결과

(가) 사망률 및 일반증상 : 실험기간 동안 일반증상 관찰 결과(Table 35, 36) 시험물질 투여에 의한 사망동물 및 이상소견은 관찰되지 않았음.

Table 35. Mortality

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Mortality	
		Male	Female
G1	0	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G2	500	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G3	1000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)
G4	2000	0% (0 / 5)	0% (0 / 5)

Table 36. Clinical signs

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Number of animal	Clinical signs
G1	0	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G2	500	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G3	1000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal
G4	2000	Male	5	Normal
		Female	5	Normal

(나) 체중변화 : 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 시험물질 투여군과 부형제 대조군간 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음. 체중 측정 결과(Table 37), 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 시험물질 투여군과 부형제 대조군간 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음.

Table 37. Body weight

Group	Dose (mg/kg B.W.)	Sex	Days after administration (g)			
			0	7	14	
G1	0	Male	Mean	192.8	281.3	321.8
			S.D.	5.4	10.6	19.2
			N	5	5	5
		Female	Mean	140.3	190.8	211.0
			S.D.	5.7	13.0	19.2
			N	5	5	5
G2	500	Male	Mean	188.3	274.3	314.5
			S.D.	2.2	8.8	20.3
			N	5	5	5
		Female	Mean	137.3	190.8	213.1
			S.D.	7.7	11.0	9.9
			N	5	5	5
G3	1000	Male	Mean	188.8	278.5	326.8
			S.D.	3.7	7.0	13.3
			N	5	5	5
		Female	Mean	143.0	199.6	226.4
			S.D.	5.4	12.6	12.0
			N	5	5	5
G4	2000	Male	Mean	188.3	269.1	323.9
			S.D.	1.5	12.8	19.9
			N	5	5	5
		Female	Mean	142.1	197.7	222.5
			S.D.	6.6	11.2	14.8
			N	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(다) 부검소견 : 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았음.

나. 4주 용량결정 독성시험(*in vivo*)

- (1) 부형제 : 멸균증류수(주사용수)
- (2) 투여액량 : 10 mL/kg B.W.
- (3) 투여방법 : 경구 / 4주동안 1일 1회
- (4) 조제방법 : 시험물질을 칭량한 후 부형제를 사용하여 투여농도 50 mg/mL, 100 mg/mL, 200 mg/mL 농도로 조제
- (5) 시험군의 구성

시험군	시험물질	성	마리수	동물번호	투여용량 (mg/kg B.W.)
1군 (G1)	멸균증류수 (대조군)	수컷	5	1101 ~ 1105	0
		암컷	5	2101 ~ 2105	
2군 (G2)		수컷	5	1201 ~ 1205	500
		암컷	5	2201 ~ 2205	
3군 (G3)	시험물질 (투여군)	수컷	5	1301 ~ 1305	1000
		암컷	5	2301 ~ 2305	
4군 (G4)		수컷	5	1401 ~ 1405	2000
		암컷	5	2401 ~ 2405	

- (6) 관찰항목 : 일반증상관찰, 체중측정, 사료 섭취량 측정, 부검, 장기중량 측정, 혈액학적검사, 혈액생화학검사, 병리조직학적 검사
- (7) 결과
 - (가) 사망률 및 일반증상 : 시험기간 동안 암·수 모든 시험군에서 빈사 및 폐사 동물은 관찰되지 않았고, 일반증상 관찰결과, 특이한 이상증상을 보인동물은 관찰되지 않았음.

(나) 체중변화 : 모든 투여군에서 정상적인 체중증가가 관찰되었고, 시험물질 투여군과 부형제 대조군간 통계학적으로 유의성 있는 차이는 관찰되지 않았음(Table 38).

Table 38. Body weight

Sex	Dose (mg/kg)		Body weight (g) on week			
			1	2	3	4
Male	G1 (0)	Mean	262.9	313.3	352.6	378.5
		S.D.	14.4	18.4	24.6	24.9
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	264.0	319.0	360.9	391.7
		S.D.	11.3	17.8	20.8	19.6
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	262.5	316.3	354.9	386.1
		S.D.	9.4	15.3	21.1	24.6
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	260.9	313.8	349.7	386.1
		S.D.	9.0	16.9	20.7	26.5
		N	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	185.1	214.7	235.7	250.1
		S.D.	9.5	11.9	15.6	21.2
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	186.6	212.5	231.2	244.5
		S.D.	6.8	10.8	13.4	16.8
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	185.9	206.3	220.4	239.2
		S.D.	10.8	17.5	20.9	23.3
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	186.3	208.2	225.9	239.8
		S.D.	9.8	12.8	12.9	13.2
		N	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(다) 사료섭취량 : 시험기간 동안 수컷 500 mg/kg 투여군에서 2 주차, 2000 mg/kg 투여군에서는 1, 2, 4 주차에 대조군과 비교하여 유의적인 증가(P<0.05)가 관찰되었음. 1000 mg/kg 투여군에서는 1 주차에 대조군과 비교하여 유의적인 감소(P<0.05)가 관찰되었음. 암컷 1000 mg/kg 및 2000 mg/kg 투여군에서는 3 주차에 대조군과 비교하여 유의적인 감소(p<0.05)가 관찰되었음. 그 밖에 대조군과 비교하여 유의적인 차이가 관찰되지 않았음(Table 39).

Table 39. Food consumption

Sex	Dose (mg/kg)		Food consumption (g) on week			
			1	2	3	4
Male	G1 (0)	Mean	31.4	31.8	32.2	31.8
		S.D.	0.0	1.1	3.9	1.9
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	31.0	*33.9	36.1	33.9
		S.D.	1.0	0.6	0.7	1.2
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	*29.6	33.7	32.0	32.4
		S.D.	0.1	0.3	0.4	0.7
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	*34.3	*36.2	35.2	*36.8
		S.D.	1.0	0.2	0.8	0.7
		N	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	21.7	23.8	23.7	24.7
		S.D.	2.1	0.8	0.4	0.0
		N	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	21.1	24.0	25.4	23.4
		S.D.	1.3	0.2	2.0	2.0
		N	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	22.6	22.9	*22.1	23.3
		S.D.	0.4	3.3	0.0	4.4
		N	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	22.7	22.6	*22.7	23.9
		S.D.	1.6	0.2	0.2	0.1
		N	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(라) 부검소견 : 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 특이할 만한 이상소견은 관찰되지 않았음(Table 40).

Table 40. Necropsy finding

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animal examined	Removal reason	Submitted	Necropsy findings	
					External	Internal
Male	G1 (0)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G2 (500)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G3 (1000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G4 (2000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
Female	G1 (0)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G2 (500)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G3 (1000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)
	G4 (2000)	5	Terminal sacrifice	5	No abnormalities detected (5)	No abnormalities detected (5)

(마) 장기중량 : 절대장기중량 및 상대장기중량 모두 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적인 차이는 관찰되지 않았음(Table 41).

Table 41. organ weight

Dose (mg/kg)		Liver (g)	Kidney (g)	Spleen (g)	Adrenal gland(g)	Testis (g)/ Ovary (g)	Brain (g)	Heart (g)	Lung (g)	Thymus (g)	Prostate (g)/Uterus(g)	epididymis(g)
G1 (0)	Mean	10.29	2.99	0.70	0.059	3.23	2.20	1.34	1.60	0.58	0.52	1.16
	S.D.	0.65	0.24	0.08	0.005	0.40	0.05	0.05	0.05	0.10	0.17	0.15
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	10.85	2.88	0.79	0.068	3.19	2.14	1.41	1.70	0.62	0.52	1.05
	S.D.	0.80	0.21	0.13	0.013	0.27	0.11	0.18	0.15	0.10	0.08	0.07
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (1000)	Mean	10.95	2.92	0.77	0.066	3.15	2.23	1.42	1.72	0.56	0.47	1.20
	S.D.	1.08	0.28	0.12	0.010	0.32	0.05	0.12	0.16	0.11	0.23	0.11
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

G4 (2000)	Mean	10.28	3.00	0.73	0.068	3.53	2.15	1.35	1.83	0.60	0.55	1.20
	S.D.	0.87	0.22	0.10	0.015	0.35	0.11	0.13	0.23	0.08	0.17	0.13
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G1 (0)	Mean	7.16	1.90	0.51	0.075	0.100	2.05	0.92	1.46	0.53	0.72	-
	S.D.	0.63	0.17	0.06	0.009	0.007	0.07	0.06	0.17	0.07	0.20	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G2 (500)	Mean	7.03	2.02	0.53	0.076	0.117	2.01	0.92	1.34	0.42	0.59	-
	S.D.	0.81	0.18	0.06	0.009	0.004	0.07	0.10	0.09	0.22	0.14	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G3 (1000)	Mean	6.95	1.87	0.50	0.074	0.109	1.95	0.94	1.30	0.52	0.71	-
	S.D.	0.83	0.23	0.02	0.007	0.013	0.10	0.06	0.19	0.09	0.29	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G4 (2000)	Mean	6.72	1.93	0.49	0.073	0.107	2.02	0.89	1.26	0.55	0.75	-
	S.D.	0.69	0.17	0.07	0.010	0.015	0.06	0.07	0.13	0.13	0.29	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-

Dose (mg/kg)		Body weight(g)	Liver (%)	Kidney (%)	Spleen (%)	Adrenal gland(%)	Testis (%)/ Ovary (%)	Brain (%)	Heart (%)	Lung (%)	Thymus (%)	Prostate (%)/Uterus (%)	epididymi s(%)
G1 (0)	Mean	327.6	3.17	0.92	0.22	0.018	1.00	0.68	0.41	0.49	0.18	0.16	0.36
	S.D.	32.4	0.45	0.06	0.04	0.002	0.18	0.07	0.05	0.04	0.04	0.07	0.08
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G2 (500)	Mean	339.1	3.21	0.85	0.23	0.020	0.94	0.63	0.42	0.50	0.18	0.15	0.31
	S.D.	13.4	0.36	0.09	0.05	0.004	0.11	0.05	0.06	0.05	0.03	0.03	0.02
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G3 (1000)	Mean	333.6	3.28	0.88	0.23	0.020	0.95	0.67	0.43	0.52	0.17	0.14	0.36
	S.D.	13.1	0.27	0.09	0.04	0.003	0.10	0.03	0.04	0.06	0.03	0.07	0.03
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G4 (2000)	Mean	351.4	2.93	0.85	0.21	0.019	1.00	0.61	0.39	0.52	0.17	0.16	0.34
	S.D.	13.0	0.27	0.05	0.02	0.005	0.09	0.04	0.04	0.06	0.02	0.05	0.04
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
G1 (0)	Mean	212.6	3.36	0.89	0.24	0.035	0.047	0.97	0.43	0.69	0.25	0.34	-
	S.D.	10.0	0.14	0.05	0.02	0.003	0.004	0.07	0.02	0.06	0.03	0.09	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G2 (500)	Mean	207.5	3.39	0.98	0.25	0.037	0.056	0.97	0.44	0.65	0.21	0.28	-
	S.D.	14.5	0.36	0.13	0.01	0.004	0.003	0.07	0.03	0.04	0.11	0.06	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G3 (1000)	Mean	214.5	3.26	0.88	0.24	0.035	0.051	0.91	0.44	0.61	0.24	0.33	-
	S.D.	13.0	0.51	0.15	0.01	0.005	0.007	0.08	0.03	0.11	0.03	0.15	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-
G4 (2000)	Mean	207.4	3.25	0.94	0.24	0.035	0.052	0.98	0.43	0.62	0.27	0.36	-
	S.D.	19.5	0.26	0.09	0.02	0.004	0.008	0.12	0.05	0.10	0.08	0.14	-
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	-

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(바) 혈액학적 검사 : 2000 mg/kg 암컷 투여군에서 Monocytes(%) 항목이 대조군과 비교하여 유의적으로 감소 ($p < 0.05$) 하였고, 수컷 투여군은 대조군에 비해 유의적인 변화는 관찰되지 않았음.(Table 42).

Table 42. Hematocrit

Sex	Dose (mg/kg)		WBC ($10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($10^6/\mu\text{L}$)	Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	RETIC (%)	PLT ($10^3/\mu\text{L}$)	PT (sec)	APTT (sec)
Male	G1 (0)	Mean	8.14	7.41	14.4	42.8	57.9	19.5	33.7	2.54	1072	14.0	16.6
		S.D.	1.24	0.59	0.7	2.2	2.2	0.7	0.1	0.69	61	0.5	2.2
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	6.51	7.67	14.8	43.8	57.2	19.3	33.7	2.39	1131	13.9	16.2
		S.D.	1.95	0.36	0.3	1.1	1.7	0.7	0.3	0.43	102	0.4	1.9
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	6.15	7.38	14.5	43.1	58.5	19.7	33.7	2.68	1062	14.6	17.1
		S.D.	1.96	0.57	0.7	2.3	2.9	1.1	0.7	0.49	71	1.1	3.1
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	6.27	7.36	14.6	43.3	58.9	19.8	33.7	2.72	999	14.7	17.4
		S.D.	1.50	0.22	0.4	1.4	1.5	0.5	0.5	0.35	108	0.7	1.6
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	3.40	7.32	14.6	42.8	58.5	20.0	34.2	2.29	1089	13.7	15.6
		S.D.	1.28	0.35	0.7	2.3	1.4	0.5	0.3	0.40	132	0.4	3.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	4.74	7.23	14.7	42.4	58.6	20.3	34.6	2.12	979	14.0	15.3
		S.D.	1.09	0.47	1.0	2.5	1.0	0.5	0.5	0.24	209	0.7	3.5
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	4.08	7.47	14.5	42.6	57.1	19.4	34.0	2.19	1092	14.1	16.1
		S.D.	1.25	0.25	0.4	1.3	0.4	0.2	0.2	0.18	52	0.6	1.4
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	5.58	7.69	15.0	44.0	57.2	19.5	34.0	2.14	1086	13.9	15.5
		S.D.	3.23	0.24	0.3	0.9	1.4	0.4	0.1	0.33	80	0.4	2.3
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Sex	Dose (mg/kg)		Differential leukocyte count				
			Ne (%)	Ly (%)	Mo (%)	Eo (%)	Ba (%)
Male	G1 (0)	Mean	18.82	77.82	1.68	1.04	0.12
		S.D.	7.95	7.88	0.29	0.43	0.08
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	11.60	85.64	1.40	0.84	0.08
		S.D.	2.96	2.96	0.34	0.47	0.04
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	15.36	81.26	1.70	0.80	0.14
		S.D.	3.29	3.92	0.60	0.58	0.05
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	16.18	80.38	1.80	0.94	0.10
		S.D.	4.79	4.24	0.79	0.26	0.00
		N	5	5	5	5	5
Female	G1 (0)	Mean	14.62	80.20	2.40	1.56	0.10
		S.D.	2.71	3.30	0.37	0.40	0.00
		N	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	14.96	80.92	1.88	1.34	0.10
		S.D.	6.32	6.11	0.47	0.92	0.07
		N	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	12.24	83.72	1.70	1.20	0.10
		S.D.	3.84	3.50	0.24	0.50	0.07
		N	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	16.96	79.50	*1.36	1.20	0.10
		S.D.	7.43	7.66	0.39	0.76	0.07
		N	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(사) 혈액생화학적 검사 : 암컷 투여군 1000 및 2000 mg/kg 군에서 T-CHO 항목이 유의적으로 감소 ($p < 0.05$) 하였고, 수컷 투여군은 대조군에 비해 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(Table 43).

Table 43. Bio chemistry

Sex	Dose (mg/kg)		TP	ALB	A/G	T-BIL	ALP	AST	ALT	CREA	BUN	T-CHO	TG	GLU	CA	IP	Na	K	Cl
			(g/dL)	(g/dL)	-	(mg/dL)	(U/L)	(U/L)	(U/L)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mmol/L)	(mmol/L)
Male	G1 (0)	Mean	5.4	3.6	2.1	0.04	605	89	36	0.4	14.8	49	24	149	9.3	7.5	145.3	4.34	105.8
		S.D.	0.1	0.1	0.1	0.02	161	14	5	0.1	2.1	13	15	12	0.3	0.5	0.6	0.34	2.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	5.4	3.6	2.0	0.04	509	80	32	0.4	13.4	50	28	156	9.4	7.5	146.1	4.24	105.5
		S.D.	0.1	0.1	0.1	0.02	66	16	3	0.0	1.8	4	7	11	0.2	0.6	0.5	0.37	1.0
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	5.6	3.7	2.0	0.04	558	79	35	0.4	13.8	59	30	150	9.3	7.6	146.3	4.25	105.9
		S.D.	0.1	0.1	0.1	0.01	58	13	2	0.0	2.5	25	8	20	0.1	0.4	1.3	0.23	1.6
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	5.4	3.7	2.1	0.04	543	83	32	0.4	13.6	52	23	145	9.2	7.8	145.8	4.24	105.7
		S.D.	0.1	0.1	0.2	0.01	147	7	2	0.0	1.3	14	9	10	0.2	0.2	0.4	0.22	1.3
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Fe-male	G1 (0)	Mean	5.9	4.0	2.1	0.05	329	91	25	0.5	15.6	74	21	140	9.4	7.2	144.9	4.33	105.2
		S.D.	0.3	0.2	0.1	0.01	66	16	4	0.0	3.3	9	8	13	0.3	0.3	1.7	0.10	0.7
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G2 (500)	Mean	6.0	4.1	2.1	0.04	345	89	27	0.5	18.1	59	19	130	9.4	7.2	143.5	4.26	104.9
		S.D.	0.2	0.1	0.1	0.02	64	12	2	0.1	2.6	14	4	8	0.2	0.6	1.1	0.21	0.8
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G3 (1000)	Mean	5.9	4.0	2.1	0.04	406	85	27	0.5	17.4	*53	14	137	9.3	7.2	144.6	4.17	107.1
		S.D.	0.1	0.1	0.1	0.01	59	23	1	0.0	3.4	10	4	6	0.2	0.3	0.4	0.22	0.3
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	G4 (2000)	Mean	5.9	4.0	2.1	0.05	337	100	27	0.5	16.3	*55	14	144	9.3	7.2	144.3	4.53	106.2
		S.D.	0.3	0.2	0.1	0.01	86	15	2	0.0	3.5	4	3	10	0.1	0.9	0.7	0.58	1.7
		N	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

S.D. : Standard deviation, Not significantly different from control

(아) 병리조직학적 검사 : 독성학적 변화가 관찰되지 않았음

다. 유전독성학적 안전성 평가(in vitro 및 in vivo)

(1) 세균을 이용한 복귀돌연변이시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 용량설정시험의 농도 : 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 mg/mL

(다) 본시험의 농도 : 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 mg/mL

→ 각 처리군별로 시험물질을 처리한 후 균의 생육저해 및 콜로니수의 변화를 관찰.

(라) 결과

① 용량설정시험

- i) 용량설정시험 결과를 Table 44 에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았음.
- ii) 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 균주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았음. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 plate 위에 침전은 확인되지 않았음.

② 본시험

- i) 본시험 결과를 Table 45 에 나타내었다. 대사활성계 미적용(S9-) 및 대사활성계 적용(S9+)의 모든 처리 조건에서 생육저해가 확인되지 않았음. 시험물질 처리군에서 복귀돌연변이 콜로니수는 모든 조건에서 각각의 균주에 대해 음성대조군과 비교하였을 때 증가 양상을 나타내지 않았음. 또한 대사활성계의 적용 유무에 관계없이 모든 시험물질 처리군에서 침전은 확인되지 않았음.

③ 무균시험

- i) 용량설정시험, 본시험 모두 최고용량의 시험물질 조제액 및 S9 mix는 세균과 곰팡이의 오염이 관찰되지 않았음.

Table 44. Result of concentration range-finding test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)(Factor)a)							
			Without S9 mix				With S9 mix			
TA98	Test solution	0	26	\pm	5		29	\pm	3	
		50	26	\pm	4	[1.0]	30	\pm	3	[1.0]
		150	28	\pm	3	[1.1]	28	\pm	3	[1.0]
		500	30	\pm	4	[1.1]	27	\pm	3	[0.9]
		1500	27	\pm	2	[1.0]	28	\pm	2	[1.0]
		5000	27	\pm	3	[1.0]	29	\pm	3	[1.0]
TA100	Test solution	0	125	\pm	2		128	\pm	6	
		50	117	\pm	8	[0.9]	123	\pm	6	[1.0]
		150	111	\pm	6	[0.9]	120	\pm	8	[0.9]
		500	115	\pm	4	[0.9]	123	\pm	6	[1.0]
		1500	121	\pm	6	[1.0]	122	\pm	7	[1.0]
		5000	121	\pm	2	[1.0]	127	\pm	6	[1.0]
TA1535	Test solution	0	9	\pm	2		12	\pm	2	
		50	11	\pm	2	[1.1]	11	\pm	3	[0.9]
		150	10	\pm	3	[1.1]	11	\pm	2	[1.0]
		500	9	\pm	2	[1.0]	11	\pm	2	[0.9]
		1500	9	\pm	3	[1.0]	10	\pm	3	[0.8]
		5000	10	\pm	2	[1.1]	11	\pm	1	[0.9]
TA1537	Test solution	0	9	\pm	1		10	\pm	2	
		50	9	\pm	2	[1.0]	9	\pm	2	[0.9]
		150	10	\pm	2	[1.1]	11	\pm	2	[1.0]
		500	9	\pm	3	[1.0]	10	\pm	2	[1.0]
		1500	9	\pm	2	[1.0]	10	\pm	2	[1.0]
		5000	9	\pm	1	[1.0]	10	\pm	2	[0.9]
WP2uvrA	Test solution	0	42	\pm	2		48	\pm	4	
		50	41	\pm	2	[1.0]	51	\pm	2	[1.1]
		150	43	\pm	3	[1.0]	53	\pm	4	[1.1]
		500	39	\pm	3	[0.9]	49	\pm	3	[1.0]
		1500	41	\pm	2	[1.0]	50	\pm	3	[1.1]
		5000	40	\pm	4	[1.0]	49	\pm	3	[1.0]
Positive controls										
TA98	AF-2	0.1	369	\pm	32	[14.0]				
TA100	AF-2	0.01	437	\pm	19	[3.5]				
TA1535	NaN3	0.5	357	\pm	16	[38.3]				
TA1537	9-AA	40.0	280	\pm	16	[31.1]				
WP2uvrA	AF-2	0.01	457	\pm	36	[11.0]				
TA98	2-AA	0.5					303	\pm	43	[10.5]
TA100	2-AA	1.0					503	\pm	39	[3.9]
TA1535	2-AA	2.0					179	\pm	9	[15.3]
TA1537	2-AA	2.0					211	\pm	9	[20.4]
WP2uvrA	2-AA	10.0					352	\pm	30	[7.4]

Table 45. Result of main test (Group summary)

Tester strain	Chemical treated	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Colonies/plate(Mean \pm S.D.)(Factor)a)							
			Without S9 mix				With S9 mix			
TA98	Test solution	0	26	\pm	4		33	\pm	2	
		313	26	\pm	3	[1.0]	32	\pm	2	[1.0]
		625	24	\pm	1	[0.9]	32	\pm	3	[1.0]
		1250	25	\pm	4	[0.9]	31	\pm	3	[0.9]
		2500	24	\pm	3	[0.9]	34	\pm	4	[1.0]
		5000	25	\pm	3	[1.0]	27	\pm	5	[0.8]
TA100	Test solution	0	120	\pm	10		125	\pm	1	
		313	116	\pm	6	[1.0]	132	\pm	3	[1.1]
		625	121	\pm	9	[1.0]	120	\pm	6	[1.0]
		1250	116	\pm	9	[1.0]	117	\pm	7	[0.9]
		2500	126	\pm	2	[1.1]	126	\pm	2	[1.0]
		5000	126	\pm	3	[1.1]	121	\pm	3	[1.0]
TA1535	Test solution	0	11	\pm	1		12	\pm	2	
		313	13	\pm	1	[1.2]	12	\pm	1	[1.0]
		625	11	\pm	1	[1.0]	11	\pm	2	[1.0]
		1250	11	\pm	3	[1.0]	12	\pm	1	[1.0]
		2500	11	\pm	3	[1.0]	12	\pm	2	[1.0]
		5000	8	\pm	1	[0.7]	9	\pm	1	[0.8]
TA1537	Test solution	0	9	\pm	1		11	\pm	1	
		313	7	\pm	1	[0.8]	11	\pm	2	[1.0]
		625	7	\pm	1	[0.8]	13	\pm	2	[1.1]
		1250	9	\pm	1	[1.0]	13	\pm	2	[1.1]
		2500	7	\pm	1	[0.8]	12	\pm	2	[1.0]
		5000	7	\pm	2	[0.8]	12	\pm	2	[1.0]
WP2uvrA	Test solution	0	42	\pm	2		50	\pm	4	
		313	42	\pm	1	[1.0]	52	\pm	1	[1.1]
		625	38	\pm	4	[0.9]	43	\pm	4	[0.9]
		1250	43	\pm	2	[1.0]	44	\pm	2	[0.9]
		2500	40	\pm	1	[1.0]	42	\pm	2	[0.8]
		5000	43	\pm	1	[1.0]	44	\pm	4	[0.9]
Positive controls										
TA98	AF-2	0.1	495	\pm	22	[18.8]				
TA100	AF-2	0.01	427	\pm	9	[3.6]				
TA1535	NaN ₃	0.5	350	\pm	23	[32.8]				
TA1537	9-AA	40.0	309	\pm	16	[33.1]				
WP2uvrA	AF-2	0.01	324	\pm	9	[7.8]				
TA98	2-AA	0.5					327	\pm	44	[9.8]
TA100	2-AA	1.0					550	\pm	31	[4.4]
TA1535	2-AA	2.0					189	\pm	4	[16.2]
TA1537	2-AA	2.0					219	\pm	14	[19.3]
WP2uvrA	2-AA	10.0					349	\pm	22	[7.0]

(2) 포유류배양세포를 이용한 염색체이상시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 염색체이상시험 : 1250, 2500, 5000 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시험물질을 처리한 후 콜세미드를 처리하여 중기세포를 유도한 후 표본을 제작하여 표본의 구조적 이상 및 수적이상을 관찰

(다) 결과

① 농도결정시험(Table 46)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았음.

ii) S9 mix 미적용(이하, -S9 mix으로 칭함), S9 mix 적용(이하, +S9 mix으로 칭함) 및 연속처리법 24 시간처리(이하, 24 시간처리로 칭함)에서 각각 156, 313, 625, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 를 설정하며 실시한 시험결과 50 % 이상의 세포증식억제용량은 관찰되지 않았음.

② 염색체이상시험(단시간처리법, Table 47, 48)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았음.

ii) 표본관찰 결과, -S9 mix의 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.5 및 0.0 %, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 %로 관찰되었음. 그리고, +S9 mix의 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 0.0, 0.0 및 0.5 %, 수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 %로 관찰되었음.

iii) 각 처리조건의 음성대조군 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5 % 미만이었음, 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10 % 이상이었음.

③ 염색체이상시험(연속처리법, Table 49)

i) 시험물질 처리시 전체 용량에서 침전이 확인되지 않았음.

ii) 표본관찰 결과, 1250, 2500 및 5000 $\mu\text{g/mL}$ 에 있어서의 염색체구조이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 % 이었고 염색체수적이상세포의 출현빈도는 각각 0.0, 0.0 및 0.0 % 이었음.

iii) 음성대조군의 경우 구조이상세포 및 수적이상세포의 출현빈도는 5 % 미만이었음, 양성대조군의 경우 구조이상세포의 출현빈도는 10 % 이상이었음.

Table 46. Results of cell growth inhibition test

Cell growth index (%)			
Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Short-term treatment test		Continuous treatment test
	-S9 mix	+S9 mix	24 hours exposure
Negative control	100.0	100.0	100.0
156	99.48	95.58	111.90
313	96.61	82.68	114.03
625	96.61	98.76	115.16
1250	90.73	107.78	102.55
2500	98.43	92.22	97.73
5000	90.08	105.48	101.42
IC ₅₀	- $\mu\text{g/mL}$	- $\mu\text{g/mL}$	- $\mu\text{g/mL}$

- : 50 % 이상의 세포증식억제용량은 관찰되지 않았기 때문에 IC₅₀은 산출하지 않음.

Table 47. Result of chromosomal aberration test (Short-term treatment test, -S9 mix)

Treatment · recovery period (h)	S9 mix	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
6-18	-	Negative control (별 균종류수)	150	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.0	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250	150	0	0	0	0	0	0	0	0	95.87	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	94.16	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	95.02	300	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	2500	150	0	1	0	0	0	1	0	0	101.85	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	111.82	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	106.83	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	5000	150	0	0	0	0	0	0	1	0	94.16	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	1	88.75	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2	91.46	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	-	Positive control (MMC0.1)	150	1	29	3	1	0	34	0	/	150	0	0	0	
			150	2	31	2	0	0	35	0		150	0	0	0	
			300	3 (1.5)	60 (30.0)	5 (2.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	69 (34.5)	0		300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	

MMC: Mitomycin C

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

Table 48. Result of chromosomal aberration test (Short-term treatment test, +S9 mix)

Treatment · recovery period (h)	S9 mix	Concentration (μg/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
6-18	+	Negative control (별균종류수)	150	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	100.0	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.0	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	1250	150	0	0	0	0	0	0	0	0	113.01	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	1	94.01	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1	103.51	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	2500	150	0	0	0	0	0	0	0	0	106.40	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	95.25	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100.83	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	5000	150	0	0	0	0	0	0	0	0	104.34	150	0	0	0
			150	0	1	0	0	0	0	1	0	111.35	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	1 (0.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.5)	0	107.84	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
6-18	+	Positive control (CPA5)	150	2	28	2	2	0	34	0			150	0	0	0
			150	1	28	1	1	0	31	0			150	0	0	0
			300	3 (1.5)	56 (28.0)	3 (1.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	65 (32.5)	0			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

CPA : cyclophosphamide

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

Table 49. Result of chromosomal aberration test (Continuous treatment test, -S9 mix)

Treatment · recovery period (h)	S9 mix	Concentration (μg/mL)	Number of cells showing structural chromosome (Frequencies %)							g	Cell growth index (%)	Number of cells showing numerical aberrations (Frequencies %)				
			Number of observed	ctb	cte	csb	cse	other	Total (%)			Number of observed	Polyploids	Endo	Total (%)	
24-0	-	Negative control (별균종류수)	150	0	0	0	0	0	0	0	0	104.4	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	95.6	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	100	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	1250	150	0	0	0	0	0	0	0	0	88.2	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	102.2	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	95.18	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	2500	150	0	0	0	0	0	0	0	0	93.4	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	95.2	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	94.3	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	5000	150	0	0	0	0	0	0	0	0	96.5	150	0	0	0
			150	0	0	0	0	0	0	0	0	92.1	150	0	0	0
			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0	94.3	300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
24-0	-	Positive control (MMC0.05)	150	1	28	2	2	0	33	0			150	0	0	0
			150	2	26	3	1	0	32	0			150	0	0	0
			300	3 (1.5)	54 (27.0)	5 (2.5)	3 (1.5)	0 (0.0)	65 (32.5)	0			300	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

MMC: Mitomycin C

ctb: chromatid type break, cte: chromatid type exchange, csb: chromoso-type break, cse: chromosome type exchange, other: fragmentation etc., Endo: endoreduplication

(3) ICR 마우스에 대한 소핵시험

(가) 부형제 : 멸균증류수

(나) 예비시험 : 시험물질 투여군 4 군 및 음성대조군 1 군의 총 5 군으로 구성하고 각 군 당 3 마리의 동물을 사용하였음.

(다) 본시험 : 예비시험 결과, 최고 용량인 2000 mg/kg B.W.군에서도 사망 예가 보이지 않았으므로, 본 시험에서 최고 용량은 2000 mg/kg/ B.W.로 하였음.

(라) 결과

① 예비시험 결과

i) 예비시험 결과, 시험물질 투여 후 모든 투여군에서 사망동물은 관찰되지 않았음.

ii) 예비시험 결과를 토대로 본시험에서 최고용량은 2000 mg/kg B.W.으로 설정하였음.

② 본시험 결과

i) 체중 : 부검 시 체중을 비교한 결과 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적인 유의성이 관찰되지 않았음.

ii) 일반증상 : 본시험의 시험군 중 사망동물은 관찰되지 않았음(Table 50).

Table 50. Clinical signs and mortalities

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kgB.W.)	Clinical signs	Mortality (dead/total)
	Negative control	0	N	0% (0/5) ^a
	Test substance	500	N	0% (0/5) ^a
Male	Test substance	1000	N	0% (0/5) ^a
	Test substance	2000	N	0% (0/5) ^a
	Positive contril (CPA)	70	N	0% (0/5) ^a

N : Normal, a : No. of dead animals/No. of tested animals

iii) 소핵출현빈도 및 총적혈구 비율

- 부검 후 개체 당 4000개 이상의 다염성적혈구 관찰 결과, 음성대조군의 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 (0.06 ± 0.06) %이었으며, 500 mg/kgB.W. 투여군의 소핵출현빈도는 (0.05 ± 0.05) %, 1000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 (0.09 ± 0.04) %, 2000 mg/kg B.W. 투여군의 빈도는 (0.11 ± 0.03) %, 양성대조군의 빈도

는 (7.73 ± 0.47) %를 나타내었음. 시험물질을 투여한 각 군에 있어서 다염성 적혈구 중 소핵을 갖는 적혈구의 출현빈도는 음성대조군에 비해 증가하는 경향이 관찰되지 않았으며, 통계적으로 유의한 차이도 나타나지 않았음. 한편 양성대조군의 소핵 빈도는 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의하며 현저한 증가가 나타났음(P<0.01).

- 세포독성의 지표인 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 위와 같은 순서로 평균 (51.33 ± 1.36) %, (51.31 ± 1.61) %, (50.92 ± 2.73) %, (48.42 ± 2.43) % 및 (40.51 ± 1.82) % 이었으며 모든 투여군에서 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았음. 한편 양성대조군의 [PCE/(PCE+NCE)] 비율은 음성대조군에 비해 통계학적으로 유의한 차이가 나타났음(P<0.01)(Table 51).

Table 51. Micronucleus test in ICR mice (Group summary)

Sex	Chemical treated	Dose (mg/kgB.W.)	No.of animal	MNPCE/2000PCEs (Mean±S.D.,%)		PCE/(PCE+NCE) (Mean±S.D.,%)	
	Negative control	0	5	0.06	± 0.06	51.33	± 1.36
	Test substance	500	5	0.05	± 0.05	51.31	± 1.61
Male	Test substance	1000	5	0.09	± 0.04	50.92	± 2.73
	Test substance	2000	5	0.11	± 0.03	48.42	± 2.43
	Positivecontrol (CPA)	70	5	7.73	± 0.47	* 40.51	± 1.82 *

* P<0.01

MNPCE : PCE with one or more micronuclei

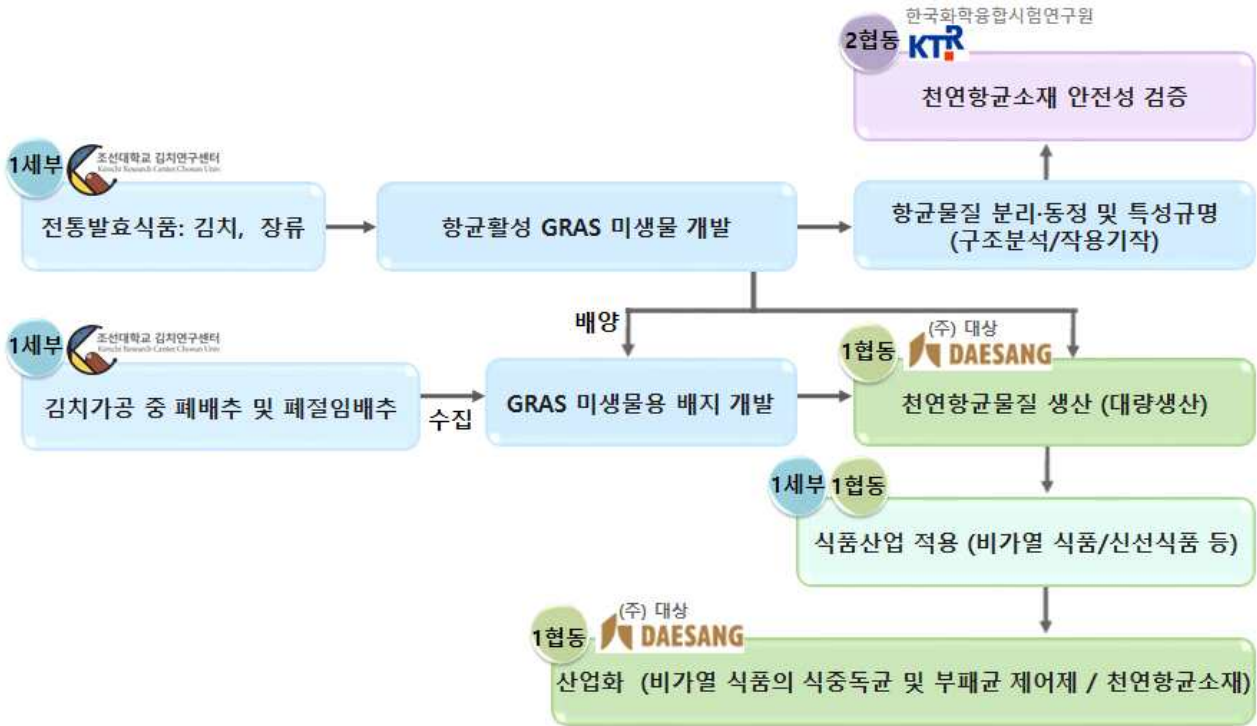
PCE : Polychromatic erythrocyte

NCE : Normochromatic erythrocyte

CPA : Cyclophosphamide monohydrate (positive control) 식용배지

제 4 장. 종합 분석 및 고찰

제 1 절. 연구결과 종합 요약



< 기술개발 흐름도 및 연구수행 종합 요약 >

1. 제1세부: 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연 항균소재 적용 기술 개발

가. 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발

(1) 항균활성 GRAS 미생물의 개발

(가) 항균활성물질 생산균주 분리·동정

Screening	*항균활성 GRAS균주
<ul style="list-style-type: none"> ○ 시료수집장소: 광주/전남 포함 전국 가정집, 명가, 식당, 사찰 등 - 80여곳 김치시료 → 유산균 분리 - 20여곳 장류시료 → 고초균 분리 ○ 항균활성균주 screening - 유산균 450종 → 5종 선정 - 고초균 100종 → 1종 선정 	<ul style="list-style-type: none"> - 유산균(5종) : <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 : <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 : <i>Lactobacillus plantarum</i> EM : <i>Leuconostoc citreum</i> GR1 : <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA - 고초균(1종) : <i>Bacillus subtilis</i> SN7

※ 식중독균/부패균 생육 저해활성을 지닌 균주의 개발

- 기동정 균주: *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Leu. citreum* GR1

- 신규동정 균주: *Lb. plantarum* EM, *Leu. mesenteroides* TA, *B. subtilis* SN7

☞ 식중독균/부패균 생육 저해활성균주: 유산균 5종, 고초균 1종 개발

(나) 항균활성 및 항균 spectrum 조사

① 항균활성물질 생산 최적 배양 조건

배양조건	GRAS 항균활성 균주*					
	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7
배지	MRS	MRS	MRS	MRS	MRS	TSB
배양온도	28°C ~ 37°C	28°C ~ 37°C	28°C ~ 37°C	28°C ~ 30°C	28°C ~ 30°C	37°C
배양 초기 pH	5.0~6.0	5.0~6.0	6.0~7.0	7.0	6.0~7.0	7.0
최대 항균활성 배양시간	20h~48h	16h~48h	20h~48h	24h~48h	12h~48h	24h~48h
최대 항균활성 (AU/mL)	640	640	640	64	32	1,600

*AF1, HD1, EM, TA: 감수성균주 *A. fumigatus* ATCC 96918 사용

GR1, SN7: 감수성균주 *B. cereus* KCTC 3624 사용

② 항균물질 생산 최적조건에서 생산된 항균물질을 이용하여 spectrum 측정

Microorganisms	Spot-on-the lawn test (2-fold dilution, AU/mL)						
	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7	
Mold	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	160	160	160	32	8	0
	<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	160	160	80	8	16	640
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	640	640	640	32	32	0
	<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	320	320	320	32	16	0
	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	160	160	40	8	8	0
Bacteria	<i>Salmonella enterica</i> serovar. Typhi ATCC 19430	320	320	160	8	16	0
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	80	40	80	0	0	0
	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	160	160	160	32	32	1,600
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	160	160	320	4	8	0
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	5,120	5,120	5,120	512	128	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	320	320	320	16	16	0
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	40	40	40	4	4	20	
Yeast	<i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	10	20	10	0	0	0

☞ 개발된 5종의 유산균과 1종의 고초균의 항균활성과 그 항균 spectrum이 서로 달라 목적에 따라 단용 또는 혼용사용 가능

③ 최적배양조건에서 생산된 항균활성물질의 항균 spectrum 및 항균활성

식중독균/부패균 저해대상	항균활성(AU/mL)					
	AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7
곰팡이	160~640	160~640	40~640	8~32	160~640	0~640
세균	40~5,120	40~5,120	40~5,120	4~512	4~128	20~1,600
효모	10	20	10	0	0	0

(다) 항균활성균주의 안전성 평가

① 평가내용: i) 유산균 5종: 용혈성, 효소활성, 항생제 내성

ii) 고초균: 용혈성, 효소활성, 항생제 내성, 독성(enterotoxin) 검사

☞ 항균활성 균주 6종 모두 안전함

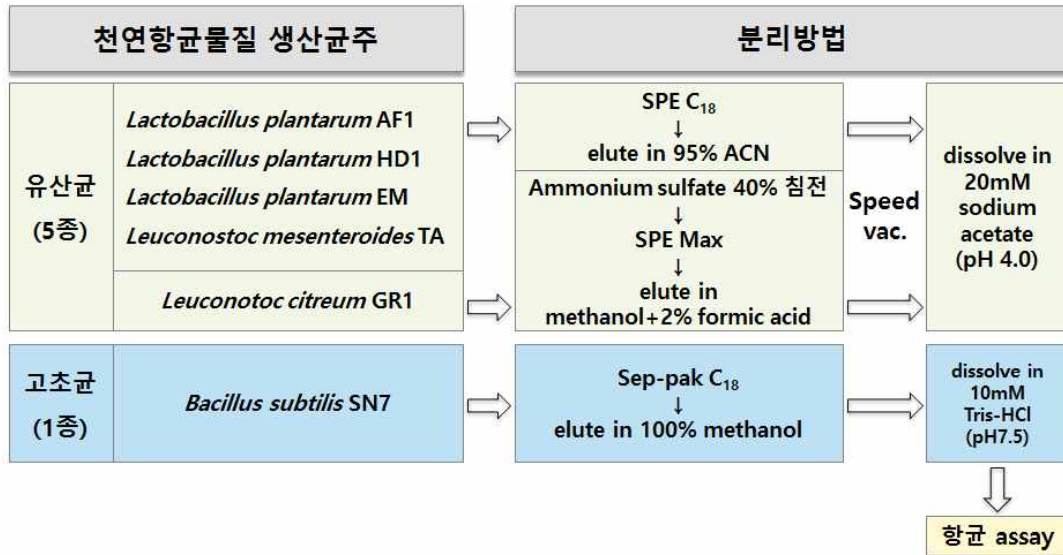
※ 안전성 평가항목 및 평가결과(in vitro)

평가항목	안전성 평가 결과
용혈성	항균활성 6종 모두 용혈성 없음
효소활성	항균활성 6종 모두 발암물질로 전환하는 효소인 β -glucuronidase에 대한 활성 없음
항생제 내성	항균활성 6종 모두 EFSA breakpoint보다 낮거나 같은 농도에서 항생제 감수성 지님
독성 검사	<i>B. subtilis</i> SN7은 <i>B. cereus</i> 가 생산하는 독소(enterotoxin) 및 독소생성 유전자 없음

※ 김치 및 장류로부터 분리한 유산균 및 고초균으로부터 식중독균/부패균의 생육 저해활성을 지닌 항균활성균주를 선발하였고, 이들의 항균물질 생산 최적 조건 설정, 항균 spectrum, 균주 안전성 평가를 통하여 항균활성균주 유산균 5종, 고초균 1종을 최종 개발함.

(2) 천연항균소재의 특성규명

(가) 천연항균물질(조항균물질)의 분리



(나) 항균활성 시료

구분	식품원료	식품원료(한시적인정)
내용	①배양상징액: - 배지 •유산균용: 폐배추배지 A-4 •고초균용: 절임배추배지 D-3 - GRAS균: 항균활성 유산균 5종 항균활성 고초균 1종	②조항균물질*: 개발 배지에서 GRAS 등급 미생물 배양액 → column정제 *KTR(GLP기관): 안전성(독성)평가 시행

(다) 항균활성 및 항균 spectrum

- 5종의 유산균, 1종의 고초균 중 유산균 *Lb. plantarum*(AF1, HD1, EM)의 항균활성 가장 높고 항균 spectrum도 가장 넓음 → 곰팡이 중에는 *A. fumigatus*, 세균 중에는 *V. parahaemolyticus*에 대해 가장 항균활성 강함.
- 고초균 SN7은 *A. ochraceus*와 *B. cereus*에 대해 특이적으로 항균활성 매우 강하나 항균 spectrum은 유산균에 비해 좁음.
- Column에 의한 분리·정제: 조항균물질
→ 유산균(5종)의 항균물질: 주로 항진균 활성물질이 분리·농축되는 효과 ↑
고초균(SN7)의 항균물질: 주로 항세균 활성물질이 분리·농축되는 효과 ↑

(라) 천연항균물질(조항균물질)의 안정성

- *Leu. citreum* GR1과 *B. subtilis* SN7의 항균물질(배양상징액/조항균물질)은 효소안정성 실

협결과로부터 단백질성 물질의 박테리오신임을 알 수 있음.

- 유산균 4종(AF1, HD1, EM, TA)의 조항균물질(특징: 소수성, 항진활성)은 단백질성물질이 나 유기산은 아니며 저분자의 항진물질임을 추측함.
- 유산균 5종의 항균물질(배양상징액/조항균물질)은 pH 안정성만 다소 산성에서(pH 3.0 ~6.0/7.0) 중성범위에서 안정성을 나타내고, 이외 온도, 용매 및 염 등의 처리에는 뛰어난 안정성을 나타냄. 고초균 SN7의 항균물질은 단백질 분해 효소 처리를 제외한 모든 처리에 대체로 안정함. 이와 같은 특징들은 식품 적용시 산업적 process에 대한 내구성이 뛰어나므로 그 활용가치가 높은 것으로 사료됨.

<천연항균물질(조항균물질)의 식중독균/부패균에 대한 항균활성 및 항균 spectrum>

항균 물질	식중독균/부패균	항균활성 (AU/mL)*						
		AF1	HD1	EM	GR1	TA	SN7	
개발배지배양상징액	곰팡이	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	160	160	160	32	8	0
		<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	160	160	80	8	16	2,560
		<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	640	640	640	32	32	40
		<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	320	320	320	32	16	0
		<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	160	160	40	8	8	80
	세균	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	320	320	160	8	16	0
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	80	40	80	0	0	0
		<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	160	160	160	32	32	1,600
		<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	160	160	320	4	8	0
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	5,120	5,120	5,120	512	128	0
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	320	320	320	16	16	0
	효모	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	40	40	40	4	4	20
	효모	<i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	10	20	10	0	0	0
조항균물질	곰팡이	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	3,200	6,400	1,600	100	200	0
		<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	3,200	6,400	1,600	400	800	0
		<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	25,600	25,600	25,600	800	800	0
		<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	6,400	3,200	1,600	400	1,600	0
		<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	3,200	3,200	800	200	400	0
	세균	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	0	0	0	turbid	0	0
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	0	200
		<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	800	800	200	400	800	6,400
		<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	0
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	25,600	25,600	12,800	1,600	1,600	0
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	100	100	0	100	200	0
	효모	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	0	100	0	0	0	400
	효모	<i>Pichia kudriavzevii</i> GY1	200	400	200	0	turbid	0

* spot-on-the lawn test에 의한 측정

(3) 식중독균 저해 기작 규명

(가) 항균물질 생산균주와 식중독/부패균의 공동배양

- 유산균과 곰팡이 공동배양에서 최대 36시간 이내 식중독/부패 곰팡이의 생육저해됨.
- 유산균, 고초균과 식중독/부패 효모 또는 세균과의 공동배양에서 효모는 최대 48시간에, 세균은 최대 24시간 이내 식중독/부패균의 생육저해됨.

(나) 천연항균물질 생산균주의 배양상징액에 식중독/부패균의 처리

- 항균물질(유산균/고초균 배양상징액) 처리에 의해 다양한 식중독 세균(*B. cereus* 경우 포자 포함)을 배양 4~24시간에 완전히 생육저해함. 단 효모는 완전 생육저해는 안되고, 10² CFU/mL 정도 생육저해 효과 보임.
- 항균물질 처리(유산균 배양상징액)에 의하여 식중독/부패 곰팡이의 균사를 생육저해할 뿐만 아니라, 그 포자도 발아하지 못하도록 하는 생육저해 작용이 확인됨.

(다) 천연항균물질 처리에 의한 정균/사균 기전 규명

천연항균물질 생산균주	식중독균/부패균주	정균/사균 효과
<i>Lb. plantarum</i> AF1	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	균사, 포자: 사균
	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	사균/정균
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	사균
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	사균
<i>Lb. plantarum</i> HD1	<i>A. ochraceus</i> PF-2	균사, 포자: 사균
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	사균
<i>Lb. plantarum</i> EM	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	균사, 포자: 사균
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	사균
<i>B. subtilis</i> SN7	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	영양세포, 포자: 사균

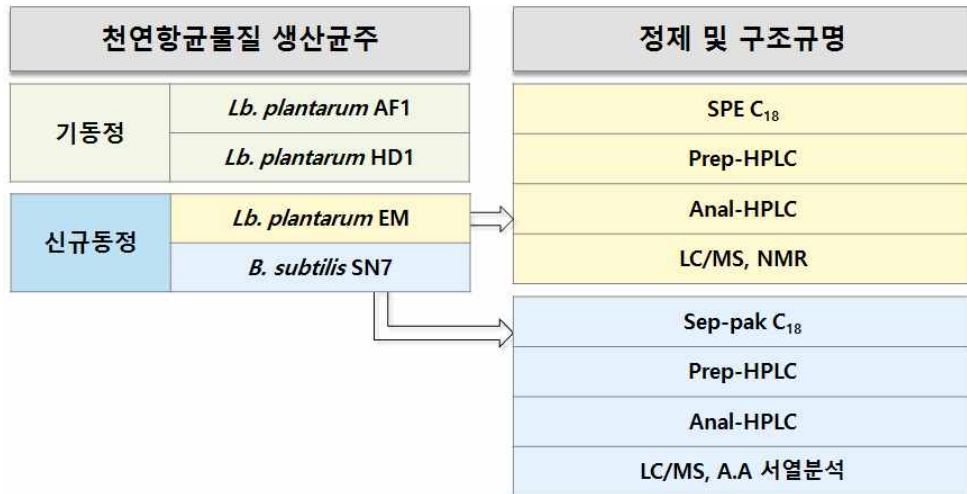
(4) 천연 항균물질의 정제 및 구조 규명

① 천연 항균물질(항진균/항세균)의 정제 및 구조규명

항균활성 GRAS 균주	*항균물질 정제 및 구조규명 균주
- 유산균(5종) : <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 <i>Lactobacillus plantarum</i> EM <i>Leuconostoc citreum</i> GR1 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA - 고초균(1종) : <i>Bacillus subtilis</i> SN7	- 유산균(3종) · <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 · <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 · <i>Lactobacillus plantarum</i> EM - 고초균(1종) · <i>Bacillus subtilis</i> SN7

*GR1은 타 4종의 유산균에 비해 항진균활성이 크게 약함. TA는 항진/항세균 활성이 타 3종 (AF1, HD1, EM)에 비해 약하고 생산된 유기산에 의한 활성과 배양상징액의 항균활성간 차이가 거의 없음.

→ 이에 유산균은 AF1, HD1, EM을 향균물질 정제 및 구조규명 대상균주로 삼음.



<항균물질의 구조규명과 본 과제에서 비가열 식품에 적용>

분류	천연항균물질 생산균주	항균물질 구조규명	항균물질의 식품적용
기동정	<i>Lb. plantarum</i> AF1	cyclo(Leu-Leu), δ-dodecalactone	김치, 샐러드
	<i>Lb. plantarum</i> HD1	5-oxododecanoic acid, 3-hydroxydecanoic acid, 3-hydroxy-5-dodecenoic acid	생막걸리
신규동정	<i>Lb. plantarum</i> EM	3-hydroxy-5-dodecenoic acid	-
	<i>B. subtilis</i> SN7	LGPQLNKGCATCSIGAACLVDGP IPDEIAG (M.W 3,401.55 Da) → Mejucin(신물질)	청국장, 샐러드

나. 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용기술 개발

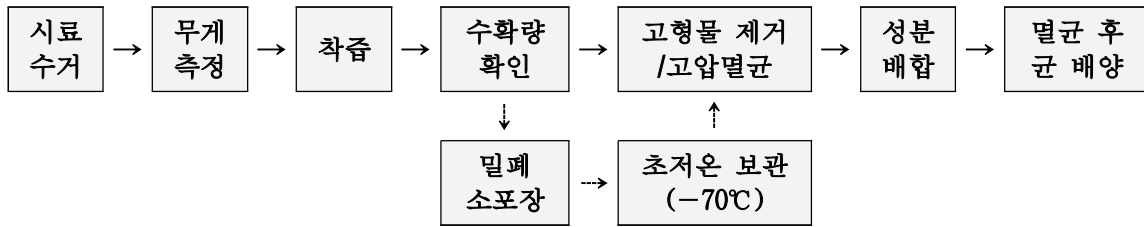
(1) 천연항균물질 생산용 식용배지 개발

(가) 배추폐기물의 처리공정개발

- ① 배추폐기물: 김치 가공시 파생되는 i) 폐배추와 ii) 폐절임배추
- ② 배추폐기물의 성분 조성 비교
 - i) 이화학적 특성: pH, 산도, 염도, 당도
 - ii) 일반 성분: 수분, 조회분, 조단백, 조지방
 - iii) 유리당: Glucose, Fructose, Sucrose
 - iv) 유리 아미노산: 필수/비필수 아미노산 32종

☞ 수거 장소 및 수거 시기(계절별)에 따른 배추폐기물의 성분 함량 차이가 없음.

• 배추폐기물의 물리적 처리과정 최적화



(나) 식용성분을 이용한 식용배지 개발: 폐배추즙/폐절임배추즙, 옥수수 추출물(C.S.L)

- ① 폐배추활용배지: A-1, A-2, A-3, A-4 4종
- ② 폐절임배추활용배지: B-1, B-2, B-3, B-4 4종

(다) 개발 배지에서 GRAS 미생물 생육 및 항균활성 최적화

- ① 유산균 전용 배지
 - i) 적용 균주 : *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM
 - ii) 기본 배지 : 폐배추즙 배지A, 폐절임배추즙 배지B

배 지	성 분	AF1			HD1			EM		
		균수	항세균	항진균	균수	항세균	항진균	균수	항세균	항진균
A-1	폐배추즙 1/5 희석액	10 ⁷	80	20	10 ⁷	80	20	10 ⁷	80	20
A-2	A-1 + 옥수수 추출물 1%	10 ⁸	160	40	10 ⁷	160	40	10 ⁸	160	40
A-3	A-2 + Glucose 1%	10 ⁸	160	160	10 ⁸	160	160	10 ⁸	160	160
A-4	A-3 + (Mn+Na-1) 0.005~0.5%	10 ⁹	160	640	10 ⁹	160	640	10 ⁹	160	640
B-1	폐절임배추즙 1/5 희석액	10 ⁸	80	20	10 ⁸	80	20	10 ⁸	80	20
B-2	B-1 + 옥수수 추출물 1%	10 ⁸	160	80	10 ⁸	160	80	10 ⁸	160	160
B-3	B-2 + Glucose 1%	10 ⁸	160	160	10 ⁸	160	160	10 ⁸	160	160
B-4	B-3 + (Mn+Na-1) 0.005~0.5%	10 ⁹	160	640	10 ⁹	160	640	10 ⁹	160	640
MRS 배지		10 ⁹	160	640	10 ⁹	160	640	10 ⁹	160	640

☞ 최종 개발배지 A-4, B-4에서 MRS 대비 동등한 균수 및 항균활성을 나타냄.

iii) 최종 개발배지(A-4, B-4)에서 유산균의 배양

- 적용 균주 : *Lb. plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM,
Leu. citreum GR1, *Leu. mesenteroides* TA

적용 균주	배 지	생균수 (CFU/mL)	항세균 (AU/mL)	항곰팡이 (AU/mL)
AF1	A-4	3.36×10^9	160	640
	B-4	1.53×10^9	160	640
	MRS	2.19×10^9	160	640
HD1	A-4	2.06×10^9	160	640
	B-4	1.58×10^9	160	640
	MRS	1.95×10^9	160	640
EM	A-4	2.37×10^9	160	640
	B-4	2.13×10^9	160	640
	MRS	2.03×10^9	160	640
GR1	A-4	5.00×10^9	32	32
	B-4	5.40×10^9	32	16
	MRS	5.30×10^9	32	32
TA	A-4	4.50×10^9	32	32
	B-4	4.70×10^9	32	32
	MRS	5.00×10^9	32	32

☞ 본 연구를 통해 폐배추와 폐절임배추를 이용하여 개발된 유산균용 배지가 *Lactobacillus* 속 뿐만 아니라 *Leuconostoc* 속의 배양과 그 항균활성 물질 생산에도 유효함을 알 수 있음.

② 고초균 전용 배지

i) 적용 균주 : *B. subtilis* SN7

ii) 기본 배지 : 폐배추즙 배지C, 폐절임배추즙 배지D

배 지	성 분	균수	항세균	항진균
C-1	폐배추즙 1/5 희석액	10^7	200	0
C-2	C-1 + Glucose 1%	10^8	800	640
C-3	C-2 + (Mn+Na-1) 0.005~0.5%	10^8	1,600	1,280
D-1	폐절임배추즙 1/5 희석액	10^8	0	40
D-2	D-1 + Glucose 1%	10^8	800	640
D-3	D-2 + (Mn+Na-2) 0.005~0.5%	10^8	1,600	2,560
TSB 배지		10^8	1,600	640

☞ 최종 개발배지 C-3, D-3에서 TSB 대비 동등한 균수와 항세균 활성을 나타냄. 항곰팡이 활성의 경우는 TSB대비 2배(C-3), 4배(D-3) 더 강한 활성을 나타냄.

(라) 개발 식용배지의 pH, 시간, 온도의 최적화: 항균물질(항세균/항진균) 생산 최적 배양 조건

① 유산균 전용 배지: *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM

적용 균주	개발 배지	최적 배양 온도	최적 배양 시간	최적 배양 pH
AF1	A-4	30℃	24 시간	pH 5.0~pH 6.0
	B-4	28~30℃	24 시간	pH 5.0~pH 7.0
HD1	A-4	28℃	18 시간	pH 5.0~pH 6.0
	B-4	28~30℃	24 시간	pH 5.0~pH 7.0
EM	A-4	28~30℃	24 시간	pH 5.0~pH 6.0
	B-4	30℃	24 시간	pH 5.0~pH 7.0

② 고초균 전용 배지: *B. subtilis* SN7

적용 균주	개발 배지	최적 배양 온도	최적 배양 시간	최적 배양 pH
SN7	C-3	37℃	24 시간	pH 6.0~pH 7.0
	D-3	37℃	24 시간	pH 6.0~pH 7.0

※ 천연항균물질 생산용 미생물 배지를 개발하기 위한 배추폐기물(폐배추/폐절임배추)의 처리공정을 개발하였고, 이를 이용하여 GRAS 미생물(유산균/고초균)용 배지를 개발하였음. 개발배지(유산균용: A-4, B-4/고초균용: C-3, D-3)에서 항균활성 유산균과 고초균을 배양 시 실험실용 배지(MRS: 유산균용, TSB: 고초균용)에서와 동등한 생균수를, 항균활성의 경우는 동등 또는 2배 이상(2~4배)의 활성을 나타냄.

(2) 개발 식용배지에서 천연항균소재 생산

(가) 개발 식용배지에서 천연항균소재의 생산 및 특성조사

① 최대 생육도를 나타내는 시간

사용배지	항균미생물	배양시간
A-4	<i>Lb. plantarum</i> 3종(AF1, HD1, EM)	12시간
B-4	<i>Leu. citreum</i> GR1	12시간
MRS	<i>Leu. mesenteroides</i> TA	12시간
C-3	<i>B. subtilis</i> SN7	18시간
D-3		
TSB		

→ 사용배지에 따른 생육도는 차이 없음(최대 생육도: 8~9 log CFU/mL).

② 사용배지에 따른 최대 항세균/항진균 활성에 도달하는 시간과 그 항균 활성

항균 미생물	사용배지	최대 항세균활성/시간 (AU/mL) (h)	최대 항진균활성/시간 (AU/mL) (h)
AF1	A-4	160 / 24	640 / 24
	B-4	160 / 18	640 / 24
	MRS	160 / 18	640 / 24
HD1	A-4	160 / 24	640 / 18
	B-4	160 / 24	640 / 18
	MRS	160 / 18	640 / 24
EM	A-4	160 / 24	640 / 24
	B-4	160 / 18	640 / 18
	MRS	160 / 18	640 / 24
GR1	A-4	32 / 24	32 / 24
	✓ B-4	32 / 24	16 / 24
	MRS	32 / 24	32 / 24
TA	A-4	32 / 24	32 / 12
	B-4	32 / 18	32 / 18
	MRS	32 / 24	32 / 18
SN7	C-3	1,600 / 24	1,280 / 24
	✓ D-3	1,600 / 24	2,560 / 24
	TSB	1,600 / 24	640 / 24

항세균 활성 지시균: *B. cereus* KCTC 3624

항진균 활성 지시균: *A. fumigatus* ATCC 96918, 단 고초균의 항진균 활성 지시균: *A. ochraceus* PF-2

→ 사용배지에 따른 최대 항진균 활성값이 SN7은 D-3에서 GR1은 B-4에서 타배지와 차이남.

③ 사용배지에 따른 항균활성의 안정성: pH, 온도, 효소

: 사용배지에 따른 항균활성의 안정성은 차이 없음.

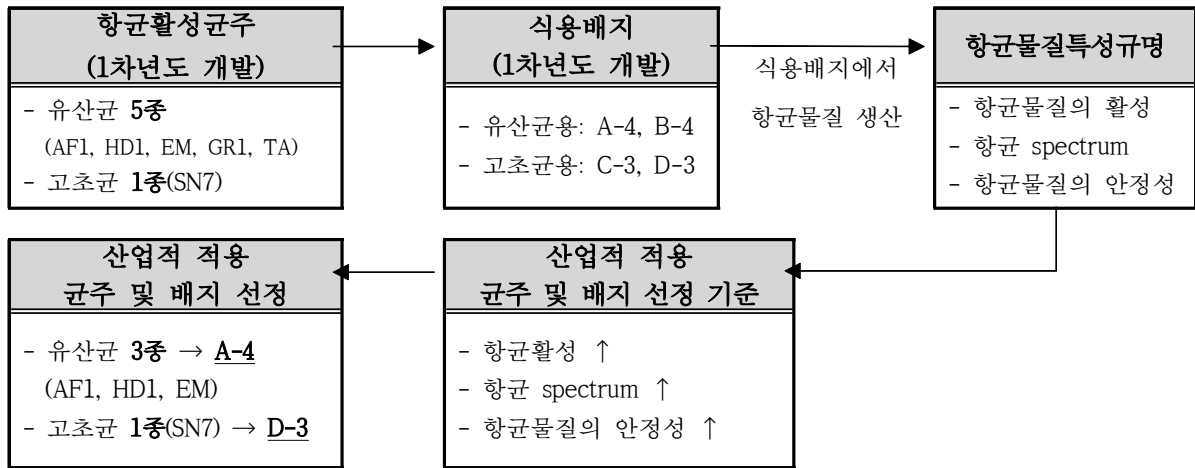
- 이상의 결과로부터 유산균용 식용배지는 폐배추를 활용한 「A-4」 배지, 고초균용 식용배지는 폐절임배추를 활용한 「D-3」 배지가 가장 적합함을 알 수 있음.
- 또한 위 두종의 개발배지는 유산균용 및 고초균용 실험배지인 MRS와 TSB 대비 동등 또는 그 이상의 활성을 나타내는 항균물질 생산용 배지임.

→ 유산균용 식용배지: A-4 배지(MRS대비 동등 항균활성)

고초균용 식용배지: D-3 배지(TSB대비 4배 높은 항균활성)

(나) 개발 식용배지에서 항균활성 균주의 보존 및 안정성 보존 유지 기술 개발

: 항균활성 균주로부터 항균물질 특성규명 및 식용배지에서 천연항균소재 생산 연구 결과 요약



→ 이에 실용화를 위한 항균물질 생산균주로 유산균 3종(AF1, HD1, EM)과 고초균 1종(SN7)을 결정함. 산업화를 위한 식용배지는 유산균용은 폐배추활용 배지인 A-4 배지를, 고초균용은 폐절임배추활용 배지인 D-3 배지를 사용하기로 함.

① 생육활성 유지를 위한 안정화 최적조건 확립

- i) 유산균: A-4배지, MRS, Glycerol 2.5~5.0%에서 4℃, 4주간 생균수, 항균활성 100% 유지
- ii) 고초균: 모든 처리구간에서 4℃, 4주간 생균수, 항균활성 100% 유지

② 최적 생산조건에서 항균물질 생산 수율

- 원료무게를 100%로 하였을 때 이를 가공처리하여 개발된 배지는 중량으로 환산시 원료무게의 약 45~68%를 차지하고, 이 배지에 항균활성 균주를 접종하여 배양 후 원심분리와 여과를 통한 제균과정 후 배양상징액(항균물질: 식품원료기준규격충족)은 원료중량대비 유산균 항균물질은 약 64%, 고초균 항균물질은 약 38% 수율로 생산됨.

(다) 천연항균소재의 활용화 검증

① 신규 천연항균소재 vs. 기존 천연보존제 대비 항균활성 비교

- 본 연구에 사용된 식중독/부패균에 대해 ‘기존 천연보존제’는 4종 모두 사용 권장량을 준용하였을 때 최대 허용량의 농도에서 조차 항균 spectrum은 매우 좁고 항균

활성도 거의 없거나 극히 낮음. 이에 반해 본 ‘연구개발 천연 항균소재’는 어떠한 농축과정 없이 단지 유산균 3종(AF1, HD1, EM) 배양상징액만으로도 강력한 항균활성과 넓은 항균 spectrum을 나타냄. 또한 고초균(SN7) 배양상징액은 항균 spectrum은 넓지 않지만 *A. ochraceus*와 *B. cereus*에 대해 특이적으로 매우 강한 항균 활성 나타냄.

- 본 연구에 사용된 식중독/부패균에 대해 기존 천연보존제는 사용 권장량을 준용하였을 때, 최대 허용량의 농도에서 조차 항균 spectrum은 매우 좁고 항균활성도 거의 없거나 극히 낮음. 이에 반해 본 연구개발 천연 항균소재는 어떠한 농축과정없이 단지 유산균 및 고초균 배양상징액만으로도 강력한 항균활성과 넓은 항균 spectrum을 나타냄.
- 본 연구개발 천연 항균소재는 어떠한 농축과정 없이 단지 유산균 및 고초균 배양상징액만으로도 강력한 항균활성과 넓은 항균 spectrum을 나타냄. 본 개발 천연 항균소재는 식약처 기준 식품원료기준을 충족하는 배지와 GRAS등급 미생물을 사용하여 배양한 배양상징액이므로 그대로 식품에 사용가능 할 수 있음이 강점임.
- 식품에 실제 보존제로 사용되려면 식품에 분포하는 식중독/부패미생물이 각 식품마다 다를 수 있으므로, 강한 항균력과 더불어 넓은 항균 spectrum은 식품보존제의 요건 중 가장 중요한 항목임. 본 연구개발의 GRAS등급 유래 미생물로부터 식용배지에서 생산된 천연항균제는 식품원료수준을 충족하여 안전함과 동시에 강력한 항균활성과 넓은 항균 spectrum을 나타내어 식품보존제로서의 요건을 완벽히 충족함.

**<기존 천연 보존제의 및 신규 천연 항균소재의 사용권장량에 따른
항균활성 및 항균 spectrum>**

항균소재		DF-100					Epolyly			
원료		자몽종자추출물					ε-폴리리신			
지시균	농도 (%)	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.01	0.02	0.025	
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	0	100	0	0	0	
	<i>A. nidulans</i> PF-3	0	100	100	100	100	0	0	0	
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	0	0	0	0	0	0	0	0	
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	100	100	100	0	0	0	
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	0	0	0	0	100	0	100	100	
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0	0	0	0	100	0	0	100	
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	0	0	0	0	0	0	0	0	
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	0	0	100	100	100	0	0	0	
항균소재		주정			크린콜		AF1	HD1	EM	SN7
원료		발효주정			자몽+주정		A-4*	A-4	A-4	D-3**
지시균	농도 (%)	1	2	3	2	3	1×***	1×	1×	1×
곰팡이	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	0	0	0	0	0	160	160	320	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	0	0	0	0	0	160	160	80	2,560
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	0	0	640	640	640	40
	<i>A. nidulans</i> PF-3	0	0	0	0	0	320	320	320	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	0	0	0	0	0	160	160	40	80
세균	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	0	0	0	0	0	320	320	160	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	0	80	40	80	0
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	0	0	0	0	0	160	160	160	1,600
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	160	160	320	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0	0	0	0	0	5,120	5,120	5,120	0
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	320	320	320	0
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	0	0	0	0	0	40	40	40	20
효모	<i>P. kudriavzevii</i> GY1	0	0	0	0	0	10	20	10	0

* A-4: 페베추즙 활용 식용배지

** D-3: 페절임배추즙 활용 식용배지

*** 1×: 배양상징액(식약처 식품원료 기준)

② 항균소재 유효농도(MIC 측정에 따른 결과)

- 항균 소재 유효농도

적용대상미생물	유효농도(MIC)
식중독/부패 전체 미생물대상 (세균/효모/곰팡이)	- 배양상징액: 60.00 mg/mL (AF1, HD1, EM, SN7 2~3종 혼합)
곰팡이	- 배양상징액: 15.00 mg/mL (AF1, HD1: 1~2종 혼용 or 단용) - 조항균물질: 1.78 mg/mL (AF1, HD1: 1~2종 혼용 or 단용)
효모	- 조항균물질(HD1): 15.00 mg/mL

- 그러나 본 MIC test 결과는 *in vitro* 실험결과로서 식품에 적용시 대상식품의 성분이 서로 다르고 그 성분이 항균활성에 대해 완충 또는 시너지 작용을 일으킬 수 있으므로, 식품적용 실험을 통해서 최종 유효농도 결정이 이루어져야 할 것임.

③ 천연 항균소재의 식품에 적용(Lab scale)

- 식중독 미생물의 오염으로부터 취약한 비가열 식품/신선 식품/반조리·최소가공 식품 중 김치, 청국장, 샐러드, 막걸리를 선정하여 부패균·식중독균 제어 효과 검증

i) 김치

- 시판 포기김치: 산막효모 제어

: 본 연구 개발 천연항균소재인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액은 개봉 보관 및 밀봉 보관시 대조구 김치에 비해 모든 처리 온도구간에서 산막효모 생육 저해 효과를 보여주었으며 기존에 사용되는 산막효모제어제인 유카추출물과 자몽종자추출물에 비해서도 뛰어난 효과를 나타냄. 또한, *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액 첨가는 김치의 관능적인 영향을 주지 않음과 동시에 김치 자체의 발효(유산균의 생육)에는 영향을 주지 않음.

- 협력업체 수출김치: *E. coli* O157:H7 제어

: 본 연구 개발 천연항균소재인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액은 대조구 김치에 비해 모든 처리 온도구간에서 *E. coli* O157:H7 생육 저해 효과를 나타냄. 반면 기존에 사용되는 천연항균제인 유카추출물과 자몽종자추출물은 *E. coli* O157:H7 생육 저해 효과를 나타내지 못함.

ii) 청국장

- 협력업체 청국장: *B. cereus* 제어

: 본 연구 개발 천연항균소재인 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액은 대조구 청국장에 비해 모든 처리 온도구간에서 *B. cereus* 생육 저해 효과를 나타내었으며 이는 기존보존제인 발효주정보다 더 강력한 효과임. 또한, *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙(D-3) 배양상징액은 청국장의 관능적인 영향을 주지 않음을 확인함.

- 실험실 제조 청국장: 종균 및 *B. cereus* 제어

: *B. subtilis* SN7의 청국장 종균으로써의 활용 가능성을 나타내었으며 동시에 *B. subtilis* SN7이 생산하는 항균물질에 의한 유해 식중독 원인균인 *B. cereus*의 생육 저해 효과를 나타냄.

iii) 샐러드

- 시판 샐러드: *E. coli* O157:H7 제어

: 본 연구 개발 천연항균소재인 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액과 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액을 혼합 처리한 샐러드에서 *E. coli* O157:H7의 생육 저해 효과가 나타났으며 이는 기존보존제인 발효주정에 비해 효과적인 제어효과를 보임. 또한, *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙배지(A-4) 배양상징액과 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙배지(D-3) 배양상징액 혼합처리하는 샐러드의 관능적인 영향을 주지 않음을 확인함.

iv) 막걸리

- 시판 막걸리: 산막효모 제어

: 본 연구 개발 천연항균소재인 *Lb. plantarum* HD1의 조항균물질(SPE 부분정제물)은 생막걸리의 변패효모인 산막효모를 제어하는 효과를 나타내었으며 생막걸리 자체의 관능에는 영향을 주지 않음.

④ 비가열 식품에서 현재 사용되는 천연보존제와 비교우위 검증

적용 식품		천연보존제와 비교우위
김치	i) 시판 포기김치	< 개봉 보관시 산막효모 검출시기 > - 25℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 6일 연장 - 15℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 10일 연장 - 4℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 12일 연장 < 밀봉 보관시 산막효모 검출시기 > - 25℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 10일 연장 - 15℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 95일 연장 - 4℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 68일 연장 - -1℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 36일 연장
	ii) 협력업체 수출김치	- -1℃ 저장: 자몽종자추출물/유카추출물보다 약 25일 앞당겨 <i>E. coli</i> O157:H7 제어
청국장: 협력업체 청국장		- 37℃ 저장: 주정보다 5일 앞당겨 <i>B. cereus</i> 제어 - 15℃ 저장: 주정보다 10일 앞당겨 <i>B. cereus</i> 제어 - 4℃ 저장: 주정보다 10일 앞당겨 <i>B. cereus</i> 제어
샐러드		- 주정보다 약 10 ¹ ~10 ³ CFU/g 이상 <i>E. coli</i> O157:H7 제어

※ 막걸리: 현재 막걸리는 가열살균함. 가열처리 막걸리는 비열처리된 생막걸리보다 풍미가 떨어짐.

2. 제1협동: 천연 항균소재의 산업화 및 상품화

가. 산업화를 위한 비가열 제품별 가공표준의 설정

(1) 비가열 제품의 제조 공정 확립

- 김치, 장아찌류(고추장모듬마늘장아찌), 절임류(오이지무침) 3종의 제품의 안전성 및 안정성을 위한 제조 공정을 확립하였음.
- 김치의 원부재료는 대부분 농산물로 선별, 세척 공정이 제대로 이루어지지 않으면 토양미생물 등에 의해 위생적이지 못한 제품이 제조될 수 있음.
- 발효 과정을 거치면서 유산균에 의해 일부 병원성 미생물들이 제거되기는 하지만, 실제로 제대로 공정이 잡히지 못한 곳에서 생산된 김치에서 식중독이 일어난 사건은 종종 일어나고 있음.
- 미생물적 안전성을 확보하기 위해 열 살균 공정을 확정하였음.
- 살균 공정은 최대한 관능에 영향이 적은 온도와 시간을 실험하여 확정하였지만, 관능적으로 비살균 제품에 비해 조직감(무름) 및 갈변이 심화됨을 확인하였음.
- 천연항균제가 개발되어 이러한 제품에 적용된다면 관능적 측면까지 만족시키면서 미생물적 안전성까지 확보할 수 있을 것이라 기대됨.

(2) 가공표준 적용 비가열 제품의 식중독 미생물 균총 확인

(가) 김치류

- 살모넬라, 황색포도상구균 등의 병원성 미생물 불검출
제조 직후 김치, 별미 김치에서 *B. cereus*, 대장균군 검출로 확인하였음.
- 발효 진행되면서 병원성 미생물 감소하긴 하지만, 천연 항균제 적용으로 초기부터 제품 안전성 높일 필요가 있음.

(나) 젓갈류

- 법적 미생물 규격은 적합하나 효모로 인한 제품 팽창 발생함.
- 천연 항균제 적용으로 제품 안전성 및 유통기한 연장 효과를 기대할 수 있음.

(다) 절임류

- 법적 미생물 규격은 적합하나 효모로 인한 제품 팽창 및 숙성으로 인한 맛 변질
- 천연항균제 적용으로 제품 안전성 및 유통기한 연장 효과를 기대할 수 있음.

(라) 시장 조사 샘플

- 유통되고 있는 시장의 김치류, 젓갈류 및 반찬류의 식중독 미생물 분석 결과, 몇몇 샘플에서 대장균군, *B. cereus*, *Cl. perfringens* 및 효모가 검출되었음.

- 곶절이(이천)의 경우 *B. cereus* 가 1.24×10^3 CFU/g 검출 되었으며, 낙지젓갈(여주)의 경우 대장균군 3.8×10^3 CFU/g, *B.cereus* 1.8×10^2 CFU/g, *Cl. perfringens* 2.0×10^3 CFU/g 검출되었음.
- 구매 후 다른 조리과정 없이 바로 먹는 김치 및 반찬류에서 초기 식중독 미생물 관리가 이루어지지 않는다면, 식중독 사고로 이어질 수 있음.
- 최근까지도 비가열 식품의 식중독 사고는 계속 발생하고 있음.
- : 배추김치에서 여시니아 엔테로콜리티카 검출(2014)
- : 학교 급식 열무김치에서 대장균 검출(2014)
- : 천연항균제 적용으로 작업환경 관리가 미흡한 소기업이나 재래시장 등의 제품에서도 안전성 확보를 기대할 수 있음.

나. 천연항균소재 대량 생산 및 정제 기술 개발

(1) 천연항균물질 생성 미생물 대량 배양 기술 개발

- 조선대학교로부터 항균활성 생성 유산균(*Lactobacillus plantarum* AF1)와 고초균(*Bacillus subtilis* SN7)을 전달 받아 각각 식중독/부패 미생물 세균 1종과 곰팡이 1종에 대한 항균력을 paper disc assay로 확인하였음.
- 1톤 이상의 대량 생산을 위해 균주의 최적 배양 조건을 설정하고, pilot scale 제조 공정을 확립하여 균주를 적용, 샘플을 제조하였음.
- 제조된 샘플의 항균력을 paper disc assay로 확인하였으며, 그 결과 lab scale로 준비된 샘플과 pilot scale로 준비된 샘플에서 유사한 항균 활성을 갖는 것을 확인하였음.
- 제조된 샘플의 온도별 품질 안정성을 확인하였으며, 유통 120일차까지 이화학, 미생물적으로 안정한 것을 확인하였음.

(2) 정제 기술 개발: 정제를 통한 활성 물질 농축

- 조선대학교로 전달 받은 식용배지(A-4, D-3)를 이용하여 균주를 pilot scale로 발효하였으며 발효 후 여과공정 및 농축 공정을 확립하여 항균 물질을 농축하였음.
- 고형분을 제거 후 농축 공정을 삽입하였으며, 당도 기준으로 농축을 진행하였음.
- 제조된 샘플의 온도별 품질 안정성을 확인하였으며, 유통 120일차까지 이화학, 미생물적으로 안정한 것을 확인하였음(계속 모니터링 중).
- 조선대학교로부터 받은 균주 2종(*Lb. plantarum* AF1과 *B. subtilis* SN7)의 항균력이 유지될 수 있는 대량생산 공정을 확립하였음.
- 균주 배양 배지를 식물성 식용배지로 변형이 성공적으로 이루어져, 기존 유산균과 고초균용 상업화 배지인 MRS와 TSB배지 대비 동등 또는 그 이상의 항균활성을 나타내는 항균물질을 식용배지에서 대량생산함이 가능해짐에 따라 천연 항균제로서 산업

화가 가능하게 되었음.

- 본 연구성과에 따른 천연항균제는 비가열 식품에 적용하여 유통기한 연장, 식중독 및 부패 미생물 억제효과를 얻을 수 있을 것으로 예상됨.

다. 천연항균소재의 비가열 식품 적용 기술 개발(산업적 scale)

(1) 항균소재 식품 적용, 미생물 제어능 확인

(가) 대량 생산 식품 유형별 적용방법 설정

- 비가열 식품인 김치에서 천연항균소재의 항균효과를 확인하기 위해 적용 실험을 진행하였고, 대조구 대비 소재 적용구에서 산막효모가 발생되지 않아 항균효과가 있음을 확인하였음.

(나) 대량 생산 식품 내에서의 기존 천연 항균제와 활성 비교 검사

- 비가열 식품인 김치에서 기존 항균소재와 본 과제 개발 천연항균소재 항균효과를 확인하기 위해 비교 적용 실험을 진행하였고, 기존 항균소재 대비 개발 천연항균소재 적용구에서 산막효모가 발생되지 않아 기존 항균소재의 대체 가능성을 확인하였음.

라. 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발

(1) Data base 구축: 기존 천연 보존제 대체

(가) 기존 항균제 대체를 위한 항균 소재 활성 비교 검사

- 기존 항균제와 본 과제 개발 천연항균소재 항균활성실험을 Paper disc assay로 확인하였으며, 개발된 천연항균소재가 병원성미생물(*B. cereus*KCCM11774)와 곰팡이(*A. fumigatus* ATCC96918)에 대해 더 강한 항균력을 갖고 있음을 확인하였음.

(2) Data base 구축: 식중독균 취약 제품군 적용 사례 구축

(가) 즉석조리 제품 제안

- 식중독균에 취약한 제품군인 즉석제품 중 겉절이 김치 제품으로 적용 실험을 진행하였고, 모니터링 결과 대조구와 실험구 모두에서 병원성 미생물은 검출되지 않았으며, 적용구에서 산도가 완만하게 증가하는 것을 확인하였음.

(3) 가열살균 방법 대체 기술 개발

(가) 가열로 인한 식감 저하 문제 등의 관능 품질 개선

- 항균 소재 적용하지 않은 대조구와 항균 소재 적용하여 가열 살균 공정 조건을 완화한 실험구를 공장에서 제조하여 모니터링을 진행하였고, 모니터링 결과 일반세균, 대장균군, 효모의 미생물 결과는 대조구와 실험구의 큰 차이가 없었으며, 살균 조건을 완화한 실험구의 팽창 정도도 양호한 수준으로 확인 되었음. 조직감의 경우 대조구 대

- 비 살균 조건을 완화한 실험구에서 유통기한 내 더 아삭함을 나타내었음.
- 천연항균소재 적용으로 살균 공정 조건을 완화하여 공정비 절약 및 관능 품질 개선의 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨.

(4) 유통기한 연장 기술 개발

(가) 비가열 제품 안정화 기간 설정

- 비가열식품인 고들빼기 제품에 개발된 천연항균소재를 적용하여 모니터링을 진행하였고, 그 결과 유통기한을 현재 30일에서 45일로 연장 가능함을 확인하였음.
- 천연항균소재 적용으로 제품의 신선도를 오래 유지 할 수 있으며, 유통기한을 연장하여 경제적 효과를 얻을 수 있을 것으로 판단됨.

3. 제2협동: 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제의 독성평가

가. 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제 3종[부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* AF1+*Lactobacillus plantarum* HD1), 부분정제한 고초균(*Bacillus subtilis* SN7), 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* EM)]의 독성시험 결과

시험	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1+ <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	<i>Bacillus subtilis</i> SN7	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM
단회경구투여 독성시험	개략의 치사량은 2000 mg/kg B.W.이상	개략의 치사량은 2000 mg/kg B.W.이상	개략의 치사량은 2000 mg/kg B.W.이상
복귀돌연변이시험	음성	음성	음성
염색체이상시험	음성	음성	음성
소핵시험	음성	음성	음성
4주 용량결정시험	13 주 반복경구투여 독성시험의 용량은 0, 500, 1000, 및 2000 mg/kg의 군으로 설정	13 주 반복경구투여 독성시험의 용량은 0, 500, 1000, 및 2000 mg/kg의 군으로 설정	13 주 반복경구투여 독성시험의 용량은 0, 500, 1000, 및 2000 mg/kg의 군으로 설정

※ 이 결과는 미생물 유래 천연항균제 3종[부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum* AF1+*Lactobacillus plantarum* HD1), 부분정제한 고초균(*Bacillus subtilis* SN7), 부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum* EM)]의 임상시험 및 13 주 반복경구투여 독성시험 진행을 진행하는 자료로 사용할 수 있을 것임.

4. 연구목표대비 성과

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용-홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비 SCI						
최종목표	6			2		2						6		9	3	7	1	1	
연간내 달성실적	6	2		2		3						6	4	17	8	27	1	6	
달성율(%)	100	초과 달성		100		150						100	초과 달성	188	266	385	100	600	

제 2 절. 기술적 성과

1. 논문 게재 성과

번호	논문명	소속 기관	저자	논문게재지	게재일	특기사항
1	Purification and characterization of antifungal compounds from <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 isolated from kimchi	조선대학교	류은혜, 양은주, 우은란, 장해춘	Food Microbiology (41:19-26)	2014.01.25	SCI (IF 비율 상위 6.5%)
2	<i>Pichia kudriavzevii</i> is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened Kimchi	조선대학교	문송희, 장 미, 김혜영, 장해춘	Food science and biotechnology (23(2):489-497)	2014.04.30	SCI (IF 비율 상위 71.5%)
3	Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain <i>Lactobacillus plantarum</i> EM isolated from kimchi	조선대학교	최은아, 장해춘	LWT - Food Science and Technology (62(1):210-217)	2015.06.30	SCI (IF 비율 상위 19.5%)
4	Characterization of starter kimchi fermented with <i>Leuconostoc kimchii</i> GJ2 and its cholesterol-lowering effects in rats fed a high -fat and high	조선대학교	조세연, 최은아, 이재준, 장해춘	Journal of the science of food and agriculture (95(13):2750-2756)	2015.10.31	SCI (IF 비율 상위 12.5%)

	-cholesterol diet					
5	Ioslation of Antifungal Activity of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA from Kimchi and Characterization of Its Antifungal Compounds	조선대학교	이설화, 장해춘	Food Science and Biotechnology (25(1):213-219)	2016.02.29	SCI (IF 비율 상위 77.4%)
6	Assessment of <i>Bacillus subtilis</i> SN7 as a starter culture for Cheonggukjang, a Korean traditional fermented soybean food, and its capability to control <i>Bacillus cereus</i> in Cheonggukjang	조선대학교	이슬기, 장해춘	Food Control (73(2):946-953)	2017.03.31	SCI (IF 비율 상위 11.2%)
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1과 <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1이 생성한 조항균 물질의 독성평가	조선대학교, KTR	장해춘, 고상범, 이재준	한국지역사회 생활과학회지 (26(3):511-522)	2015.08.31	학진 등재지
8	Acute and Subacute Oral Toxicity Evaluation of Crude Antifungal Compounds Produced by <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 in Rats	조선대학교	손희경, 장해춘, 이재준	한국식품영양 과학회 (20(3):633-645)	2015.09.30	학진 등재지
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> AF1와 <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1이 생성한 조항균 물질의 유전학적 독성평가	조선대학교, KTR	장해춘, 고상범, 이재준	한국지역사회 생활과학회지 (26(4):633-645)	2015.11.30	학진 등재지
10	<i>Bacillus subtilis</i> SN7이 생성한 조항균 물질의 단회 경구투여 독성 시험 및 4주 반복 경구투여 용량 결정 시험	조선대학교, KTR	장해춘, 고상범, 이재준	한국지역사회 생활과학회지 (27(3):439-449)	2016.08.31	학진 등재지

2. 특허 성과

번호	특허명	출원(등록)기관	발명자	출원번호 /등록번호	출원일 /등록일	특기 사항
1	메주로부터 분리된 바실러스 서브틸리스 및 이를 포함하는 항균 조성물	조선대학교 산학협력단	장해춘, 이슬기	10-2014-0053724 /10-1575878	2014.05.03 /2015.12.02	등록
2	김치로부터 분리된 콜레스테롤 저하능을 갖는 유산균 및 그의 용도	조선대학교 산학협력단	장해춘, 최은아	10-2014-0117262 /10-1566989	2014.09.03. /2015.11.02	등록
3	김치에서 분리한 항진균	대상에프	최혜영,	10-2014-0159005	2014.11.14	

	활성을 갖는 유산균 및 이를 포함하는 조성물	엔에프 주식회사	류병희, 최정호			
4	신선유지를 위한 항균 및 항진균 활성을 갖는 식물성 유산균 락토바실러스 플란타룸 DSR KF15 및 이의 용도	대상에프 엔에프 주식회사	최혜영, 류병희, 최정호	10-2015-0152170	2015.10.30	
5	김치 유래 젖산균을 유효성분으로 포함하는 항헬리코박터 파이로리 조성물	조선대학교 산학협력단	장해춘, 문송희, 김성경	10-2015-0179275	2015.12.15	
6	항균 활성을 가지는 펩타이드 및 이를 유효성분으로 함유하는 항균 조성물	조선대학교 산학협력단	장해춘, 이슬기	10-2016-0043515	2016.04.08	

제 3 절. 경제적 성과

1. 기술 이전 및 상품화

가. 기술이전

- 대상FNF(주)는 2차년도 과제 수행 중 비밀유지계약서 작성 하에 본 과제에서 개발된 항균 활성을 갖는 유산균을 조선대학교로부터 제공받아 항균활성 및 대량 생산 가능성을 확인 하였음. 3차년도 과제 수행으로 대량생산을 진행하고 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균물질 식품 적용 기술을 이전 받아 식품 적용 실험을 진행하였 음. 이 실험 결과 미생물 제어 및 유통기한 연장 등의 긍정적 효과를 확인하여 대상FNF 는 천연항균소재로 제품화하였음. 항세균, 항진균 효능까지 강화된 식물성유산균발효액 ENT는 비가열 식품인 김치 및 반찬에 적용되어 보다 안전성이 강화된 제품을 출시하였 음. 조선대로부터 제공받은 균주 (*Lb. plantarum* AF1) 및 식품 적용기술을 적용하여 본 과제를 3차년에 수행하였으며, 이에 따라 본건 관련 기술이전 2건 계약 절차는 현재 진 행 예정임.

나. 사업화 및 상품화

- 본 과제에서 식품 기술 선진화에 기여할 수 있는 천연항균소재를 확보하였으며 이를 대 량생산 하여 소재로 상품화 1건(식물성유산균발효액ENT)과 소재 적용 제품(김치, 반찬) 2 건을 상품화 하였음. 기존 사용되고 있는 항균소재들에 비해 효능은 우월한 반면, 항균물 질이 안정하여 정제와 같은 공정 없이도 목표하고자하는 항균력을 나타내기때문에 원재 료비 절감 효과를 얻을 수 있었음. 개발된 천연항균소재는 현재 김치, 반찬류의 비가열

식품에 적용하여 사용되고 있음. 상품화된 식물성유산균발효액ENT는 ‘16년 기준 매출액 80,000천원을 달성하였고 ENT 적용된 김치, 반찬류 ’ 16년도 기준 매출액은 2,800,000천원임. 향후 적용 식품의 범위를 넓히고자 꾸준한 기술 영업 활동을 진행하고자 함. 기술영업에 필요한 브로셔 제작 및 TS 등의 활동도 계획하고 있으며, 현과제에서 다루지 않은 식품군에 대한 항균효능도 검증하고 Data를 축적하여 영업활동에 활용하고자 함. 식품이외의 생활용품이나 화장품에도 적용 할 수 있어 용도 및 적용 제품 다양화함으로써 천연항균제 시장 확대를 이를 계획임.

- 개발제품의 경제성 분석

기존 제품(A)	기술 적용 제품(B)
- 개발 제품 가격: 15,000원/kg - 관련 제품 생산계획: 1500kg/일 - 관련 제품 제조원가: 3,048원/kg	- 개발 제품 가격: 15,000원/kg - 관련 제품 생산계획: 1500kg/일 - 관련 제품 제조원가: 2,048원/kg - 제조원가 인하(유통기한 연장): 210원/kg ↓
- 계(A) : 165천만원/년(538ton)	- 계(B) : 154천만원/년(538ton)
- 추정이익발생비용(A-B) = 11천만원/년	

2. 사업화 성과

항목	세부항목		성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.8 억원
			향후 3년간 매출	2.9 억원
		관련제품	개발후 현재까지	36 억원
			향후 3년간 매출	131 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 1.2 % 국외 : 0.1 %
			향후 3년간 매출	국내 : 1.5 % 국외 : 0.3 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 60 % 국외 : 30 %
			향후 3년간 매출	국내 : 70 % 국외 : 40 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		14위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		10위

3. 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	810			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		0.8	1.06	1.29	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	1.2	1.5	2
국외		0.1	0.3	0.5	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	장류, 야채가공품 등에 적용 계획 식품 외 생활용품 또는 화장품 적용 계획			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	0.55	0.7	0.9	
	수 출	0.3	0.4	0.5	

제 4 절. 교육지도·홍보 성과

1. 기술지도(산업체 교육지도) 성과

프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
연구 수행 관련 기술 협의 및 교육 지도	유산균 전용 개발배지 제조 및 이를 이용한 천연항균소재 개발	조선대학교	1	2	1
연구 수행 관련 기술 협의 및 교육 지도	고초균 전용 개발배지 제조 및 이를 이용한 천연항균소재 개발	조선대학교	1	2	1
김치전문인력양성 교육/ 김치산업 전문리더 과정	김치의 기능성 연구를 통한 산업화 방향	(사)대한민국 김치협회, aT, 농림축산식품부	1	2	20
연구 수행 관련 기술 협의 및 교육 지도	GRAS 미생물을 이용한 천연항균소재의 식품 적용	조선대학교	1	2	2
연구 수행 관련 기술 협의 및 교육 지도	Paper disc assay를 통한 항세균 및 항곰팡이 활성 확인	조선대학교	1	10	1
대상FNF(주) 수출김치 산막효모 제어 현장 적용 실험 교육지도(1차)	대상FNF(주) 수출김치 산막효모 제어 현장 적용 실험	조선대학교	1	4	2

대상FNF(주) 수출김치 산막효모 제어 현장 적용 실험 교육지도(2차)	대상FNF(주) 수출김치 산막효모 제어 현장 적용 실험	조선대학교	1	4	3
대상FNF(주) 수출김치 산막효모 제어 현장 적용 실험 교육지도(3차)	대상FNF(주) 수출김치 산막효모 제어 현장 적용 실험	조선대학교	1	3	1

2. 홍보 및 기타(수상) 성과

성과	내용	일시	주관기관/매체명
홍보	농식품 R&D로 미래 먹거리 키운다	2016.08.07	서울경제
홍보	조선대 장해춘 교수, 농기평 ‘농식품 유망기술발표회’ 서 유망기술 발표	2016.08.09	nsp통신
홍보	농식품 R&D로 미래 먹거리 키운다	2016.08.09	전남매일
홍보	장해춘 조선대 교수 ‘김치 유망기술’ 발표	2016.08.10	광주매일신문
홍보	농기평, 농식품 유망기술발표회 농식품부 R&D성과 사업화 촉진	2016.08.11	농수축산신문
전시	2016 농식품 유망기술 발표회 (“김치로부터 분리된 콜레스테롤 저하능을 갖는 유산균 및 그의 용도” 기술 발표)	2016.08.09	농림축산식품부, 농림수산식품기술 기획평가원
수상	2014년도 학술대회 우수포스터발표상 수상 - 발표제목 : Characterization of <i>Bacillus subtilis</i> SN7 Isolated from <i>Meju</i> and Its Application to <i>Cheonggukjang</i> as a Starter - 발표자 : 이슬기, 장해춘	2014.06.27	(사)한국미생물생명공학회
수상	2014년도 (사)한국미생물생명공학회 호남지부 학술대회 우수포스터논문상 수상 - 발표제목 : Development of a novel medium using Chinese cabbage waste for <i>Bacillus</i> sp. with antimicrobial activity - 발표자 : 문송희, 장해춘	2014.09.19	(사)한국미생물생명공학회 호남지부 학술대회
수상	2015년도 학술대회 우수포스터상 수상 - 발표제목 : Characterization of <i>Bacillus subtilis</i> SN7 Harboring Anti- <i>B. cereus</i> Activity Isolated from <i>Meju</i> and Its Application to <i>Cheonggukjang</i> - 발표자 : 이슬기, 장해춘	2015.06.05	(사)한국식품과학회

제 5 절. 학술발표·인력양성 성과

1. 학술발표 성과

발표제목	발표자	발표일시	학술회의명	국내외 구분
Characterization of Antifungal Lactic Acid Bacterium Isolated from Kimchi	이설화, 장해춘	2014.06.25	한국미생물생명공학회	국내
Antibacterial and Antifungal Activities of Lactic Acid Bacteria (LAB) Isolated from <i>Kimchi</i>	문송희, 장해춘	2014.06.25	한국미생물생명공학회	국내
Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Kimchi	김은지, 장해춘	2014.06.25	한국미생물생명공학회	국내
Characterization of <i>Bacillus subtilis</i> SN7 Isolated from <i>Meju</i> and Its Application to <i>Cheongkukjang</i> as a Starter	이슬기, 장해춘	2014.06.25	한국미생물생명공학회	국내
Development of a novel medium using Chinese cabbage waste for <i>Bacillus</i> sp. with antimicrobial activity	문송희, 장해춘	2014.09.19	한국미생물생명공학회 호남지부	국내
Characterization of antimicrobial lactic acid bacteria isolated from kimchi	김성경, 장해춘	2014.09.19	한국미생물생명공학회 호남지부	국내
Potential of Antimicrobial Compounds from GRAS Microorganisms in Food Bio-preservation	장해춘	2015.06.04	한국식품과학회	국내
Characterization of antimicrobial compounds from <i>Lactobacillus</i> sp. Isolated from Kimchi	김성경, 장해춘	2015.06.04	한국식품과학회	국내
Antimicrobial Activity of Bacterium <i>Bacillus</i> sp. Is Enhanced in the Presence of Mold Hyphae	윤해비, 장해춘	2015.06.04	한국식품과학회	국내
Characterization of <i>Bacillus subtilis</i> SN7 Harboring Anti- <i>B. cereus</i> Activity Isolated from <i>Meju</i> and Its Application to <i>Cheonggukjang</i>	이슬기, 장해춘	2015.06.04	한국식품과학회	국내
Development of Food Grade Medium using Chinese Cabbage Waste for Lactic Acid Bacteria Harboring Antimicrobial Activity	문송희, 장해춘	2015.06.04	한국식품과학회	국내
Microorganisms as Novel Probiotic Stains Isolated from Traditional Fermented Foods	장해춘	2015.08.25	한국식품영양과학회	국내
Acute and Subacute Toxicities of Crude Antifungal Compounds Produced by <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 and <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	장해춘, 고상범, 이재준	2015.08.25	한국식품영양과학회	국내
Genotoxicological Safety Evaluation of Crude Antifungal Compounds Produced by <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 and <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	장해춘, 고상범, 이재준	2015.08.25	한국식품영양과학회	국내
Effect of Temperature on Growth of Lactic Acid Bacteria	김초롱, 김은지, 장해춘	2016.06.22	한국미생물생명공학회	국내

Development of Culture Media for GRAS Microorganisms and Antimicrobial Activities of GRAS Microorganisms Grown in the Developed Media	문송희, 장해춘	2016.06.23	한국미생물생명공학회	국내
The Growth Inhibitory Effect of Lactic Acid Bacteria on Food Pathogenic Microorganisms and Identification of Mechanisms	권혜란, 이슬기, 문송희, 윤해비, 장해춘	2016.06.23	한국미생물생명공학회	국내

2. 인력 양성 성과

차년도	지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자*)				성별		지역별		
		박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
1	11		4	5	2		11			11
2	8		3	4	1		8			8
3	8	1	2	4	1		8			8

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

		코드번호	D-06
제 1 절 목표달성도			
1. 연도별 연구목표 및 평가착안점			
구분	연구목표	평가착안점 및 달성도	
1차 년도	○우수한 항식중독활성 미생물 개발	- GRAS등급 우량미생물 2종 이상 개발하였는가? (18점) → GRAS 등급 우량미생물 4종 개발 : <i>Lb. plantarum</i> AF1 <i>Lb. plantarum</i> HD1 <i>Lb. plantarum</i> EM <i>B. subtilis</i> SN7	
	○GRAS 등급 미생물용 식용배지	- 식용배지 개발 1건 이상, 식용배지에서 기존 실험실배지 대비 동등한 균수 및 항균활성 성과를 이루었는가? (17점) → ① 식용배지 4종 개발 : - 유산균 전용 식용배지(A-4, B-4) 2종 - 고초균 전용 식용배지(C-3, D-3) 2종 ② 기존 실험실배지 대비 균수 및 항균 활성 : - MRS (유산균용 실험실배지) 대비 동등한 균수 및 항균 활성을 나타냄 - TSB (고초균용 실험실배지) 대비 동등한 균수와 4배 더 높은 항진 활성을 나타냄	
	○산업화를 위한 비가열 제품별 가공표준의 설정	- 대량 제조 공정 라인이 적용된 제품의 가공 표준설정이 이루어졌는가? : 2건 이상 (55점) → 제품 기준규격 설정 3건 : 김치, 장아찌류, 절임류	
	○부분정제한 유산균의 조항균물질의 독성평가	- 부분정제한 유산균(<i>Lb. plantarum</i> AF1 + HD1)의 조항균 물질 독성시험시 나타난 임상증상과 독성병리 결과를 통한 안전성 평가방법이 적절한가? (10점) → GLP(Good laboratory practice)기관에서 해당 고시에 따라 신뢰성 보증팀 감독 하에 진행하였으며 안전성 평가방법이 매우 적절함. (음성판정)	
2차 년도	○천연항균물질 일반특성 규명	- 천연항균물질 2종 이상 확보 및 일반특성 규명이 이루어졌는가? (18점) → ① GRAS 미생물 유래 천연항균물질 : 6종 확보 ② 일반특성 규명 : pH 안정성, 열 안정성, 효소 안정성, 용매 안정성, 염 안정성, 항균 활성 및 항균 spectrum	

	<p>○개발 배지에서 천연항균제의 생산</p>	<p>- 현재 사용되는 천연보존료 대비 동등 또는 우월한 항균활성이 확보되었는가? (17점) → ① 개발 천연항균제 : 유산균 3종(AF1, HD1, EM)의 폐배추배지 배양상징액, 고초균 1종(SN7)의 폐절임배추즙 배지 배양상징액 ② 기존 천연보존제 : 자몽종자추출물, ε-폴리리신, 주정, 혼합제제(크린콜) 총 4종 ☞ 개발 천연항균제는 균체 배양상징액만으로도 기존 천연보존제(4종)의 사용권장량 최대 허용치의 농도에서의 항균 활성 및 항균 spectrum 보다 동등 또는 우월함을 확인함.</p>
	<p>○천연항균소재 대량 생산 및 정제 기술 개발</p>	<p>- 정제 기술 확립 및 적용이 수립되었는가? (20점) → 발효 후 여과 공정 및 농축공정 확립함. - 1톤 이상 대량 생산 공정 확립 하였는가? (35점) → 1톤 이상 대량 생산 공정 확립 : 공장 발효 탱크 Capa. 3톤으로 확립함.</p>
	<p>○부분정제한 <u>고초균</u>의 조항균물질의 독성평가</p>	<p>- 부분정제한 고초균(<i>B. subtilis</i> SN7)의 조항균물질 독성시험시 나타난 임상 증상과 독성병리 결과를 통한 안전성 평가 방법이 적절한가? (10점) → GLP(Good laboratory practice)기관에서 해당 고시에 따라 신뢰성 보증팀 감독 하에 진행하였으며 안전성 평가방법이 매우 적절함. (음성판정)</p>
<p>3차 년도</p>	<p>○천연항균물질의 구조규명</p>	<p>- GRAS 등급 미생물 유래 천연항균물질 분리 정제 및 구조 규명 2건 이상 달성하였는가? (18점) → GRAS 등급 미생물 유래 천연항균물질 구조 2종 규명 : - <i>Lb. plantarum</i> EM (3-hydroxy-5-dodecenoic acid) - <i>B. subtilis</i> SN7 (신규 항균성 펩타이드 - Mejucin)</p>
	<p>○천연항균소재의 식품적용 (Lab scale)</p>	<p>- 비가열 식품, 신선식품 등에서 개발 천연항균소재가 적용되어 식중독균제어가 이루어졌는가? : 식품적용기술 2건 이상 (17점) → ① 식품 4건 적용 : 김치, 청국장, 샐러드, 막걸리 ② 적용식품 모두에서 개발 천연항균소재 적용으로 식중독균/부패균 제어 확인</p>

		→ 기존 시판식품보존제보다 뛰어난 제어능 확인
○ 천연항균소재의 비가열식품 적용 (산업적 scale)		- 산업적 scale로 비가열식품 적용사례 구축 2건 이상 달성하였는가? (25점) → 비가열 식품 적용사례 4건 : 김치, 겉절이, 쌈무, 고들빼기
○ 신규 천연항균소재를 활용한 수익 창출 모델 개발		- 천연항균소재를 활용한 수익 창출 5,000만원 이상 달성하였는가? (30점) → 천연항균소재 16년 기준 8,000만원 매출달성
○ 부분정제한 신규 유산균의 조항균 물질의 독성평가		- 부분정제한 신규 유산균(<i>Lb. plantarum</i> EM)의 조항균물질 독성시험시 나타난 임상 증상과 독성병리 결과를 통한 안전성 평가 방법이 적절한가? (10점) → GLP(Good laboratory practice)기관에서 해당 고시에 따라 신뢰성 보증팀 감독 하에 진행하였으며 안전성 평가방법이 매우 적절함. (음성판정)
총점수	-	300 점

제 2 절 관련분야 기여도

1. 기술명: 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용미생물의 개발 기술

- 항균활성 GRAS미생물에 대한 보고는 <표 7>, <표 7-1>, <표 7-2>와 같이 요약됨.
- 고초균 유래 항균물질은 그 활성 및 항균spectrum은 우수하지만 대부분이 항생물질로서 항생제내성 및 체내잔류성으로 인하여 식품 적용이 불가함. 그러나 단백질성 항균 물질은 체내 소화기 단백질분해효소에 분해되므로 내성 및 잔류성 문제가 해결되어 식품산업적용이 가능하지만, 단백질효소에 완전히 분해되는 고초균 유래 항균물질에 대한 보고는 전세계적으로 현재까지 단 8건의 보고에 불과함.
- GRAS 미생물 중 유산균 유래 항세균활성 물질에 관한 보고는 상대적으로 많지만 그 활성 spectrum이 극히 제한되어 일부균주에만 작용하여 광범위한 식품에 적용이 불가함. 항진균활성 유산균의 경우는 그 항균 spectrum이 항세균을 포함하는 경우가 대부분이어서 상대적으로 유리하지만 현재까지 보고된 유산균 항진/항세균활성은 그 활성이 식품산업에 적용하기에는 너무 약해서 아직 산업적 활용이 이루어지지 못함.

〈표 7. GRAS 등급 미생물의 항균활성〉

유산균이 생산하는 항세균, 항진균 물질에 관한 논문 : 총 10,824건		고초균이 생산하는 항세균, 항진균 물질에 관한 논문 : 총 5,737건	
항세균 물질 구명	항진균 물질 구명	비단백질성 물질	단백질성 물질
142건	25건	200건	18건

〈표 7-1. 고초균 유래 단백질성 항균물질〉

연번	M/O	Source	name	Compound(s)	Inhibition spectrum
1	<i>Bacillus cereus</i> BC7	Soil	Cerein7B	GWWNSWGKCVAGTIGG AGTGGLGGAAAGSAVPVI GTGIGGAIGGVSGGLTGAATFC	<i>Micrococcusluteus</i> , <i>Listeriainnocua</i>
2	<i>Bacillus circulans</i> B-30644	Poultry	Bacillocin 1580	VNYGNGVSCSKTKCSVNW GIITHQAFRVTSQVVASG	<i>Campylobacter</i> sp.
3	<i>Bacillus coagulans</i> I4	Cattle faces	Coagulin A	KYYGNGVTCGKHSCSVDW GKATTCIINNGAMAWATG GHQGTHKC	<i>Enterococcus</i> sp., <i>Leuconostoc</i> sp., <i>Listeria</i> sp., <i>Pediococcus</i> sp.
4	<i>Bacillus licheniformis</i> 26 L-10/3RA	Buffalo rumen	Lichenin	ISLEICXIFHDN	Strictly anaerobic rumen bacteria
5	<i>Bacillus subtilis</i> JM4	Soil	SubpeptinJM4-B	XXKEIXHIFHDN	<i>Salmonella</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Micrococcusflavus</i> , <i>Corynebacteriumglutamicu</i> <i>m</i> , <i>Cosmariumcrenatum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
6	<i>Bacillus subtilis</i> 168	Soil	Subtilosin	MKLPVQQVYSVYGGKDLP KGHSHSTMPFLSKLQFLTK IYLLDIHTQPFFI	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> , <i>Porphyromon</i> <i>nasgingivalis</i>
7	<i>Bacillus subtilis</i> A014	Various fields in China	LCI	AIKLVQSPNGNFAASFVLDG TKWIFKSKYYDSSKGYWVG YYEVWDRK	<i>Xanthionias</i> sp., <i>Pseudomonassolanacearum</i>
8	<i>Bacillus thuringiensis</i> NEB17	Soya bean root tissue	Thuricin 17	METPVVQPRDWTCSCLVC AACSVEL LNLVTAATGASTAS	<i>Bacillus</i> sp., <i>Escherichia</i> <i>coli</i> , <i>Brevibacillus brevis</i> , <i>Geobacillusstearothermophil</i> <i>us</i> etc

9	<i>Bacillus thuringiensis</i> SF361	Honey	Thurincin H	DWTCWSCLVCAACSV ELLNLVTAATGASTAS	<i>Bacillus</i> sp., <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Listeria</i> sp., <i>Staphylococcus</i> sp., <i>Carnobacterium piscicola</i>
10	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>entomodius</i>	-	Thuricin-S	DWTXWSXLVXAACSVELL	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus acidolactici</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
11	<i>Bacillus thuringiensis</i> B439	Dairy product	Thuricin439A	GWVAXVGAXGTVVLASGGVV	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>
12	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-30507	Soil	SRCAM 37	FVYGNVTSILVQAQFLV NGQRFFFTYTPDK	<i>Campylobacter jejuni</i>
13	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-30509	Soil	SRCAM 602	ATYYGNGLYCNKQKHWTWV DWNKASREIGKITVNGWVQH	<i>Campylobacter jejuni</i>
14	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-30644	Soil	SRCAM 1580	VNYGNVSCSKTKCSVNW GIITHQAFRVTSQVAVSG	<i>Campylobacter jejuni</i>
15	<i>Bacillus cereus</i> MRX1	-	CereinMRX1	DWTCWSCLVCAACSVELL	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i>
16	<i>Bacillus cereus</i>	Soil	Cerein7A	GWGDVL	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Listeria innocua</i>
17	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Tunisian soil litter	BacthuricinF4	DWTXWSXL	<i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
18	<i>B. subtilis</i> SN7	Meju	Mejucin	LGPQLNKGATCSIGA ACLVDGPIPDEIAG (3.4 kDa)	<i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i>

※ shadow: 과제 협약시(2013)의 현황, 연번 18 은 과제협약(2013) 이후부터 현재까지의 현황

☞ 현재(2016년)까지 전세계적으로 고초균 유래 박테리오신은 18건의 보고가 있음. 특히 과제 협약 시점인 2013년 이후 현재까지 고초균 유래 박테리오신 구조 규명에 관한 보고는 본 연구개발의 Mejucin 이외에는 전무함.

〈표 7-2. 유산균 유래 항진균 활성 물질〉

Class	연번	M/O	Source	Compound(s)	Inhibition spectrum
Protein	1	<i>Lb. pentosus</i>	Vagina	Pentocin TV35b (3.9kDa)	<i>Candida</i>
	2	<i>Lb. coryniformis</i> Si3	Sour-dough	Proteinaceous compound (approximately 3kDa)	<i>Aspergillus, Penicillium, Talaromyces, Fusarium, Debaryomyces, Mucor, Kluyveromyces</i>
	3	<i>Lb. paracasei subsp. paracasei</i> M3	Cheese	Proteinaceous compound (43kDa)	<i>Candida, Saccharomyces</i>
	4	<i>Leu. mesenteroides</i> DU15	-	Five novel peptides : GPFPL, YVPLF, LLHGVPLP, GPFPLEMTLGPT, TVYFPFGPL	<i>Aspergillus</i>
Other compound	5	<i>Lb. reuteri</i>	Pig intestine	Reuterin	<i>Aspergillus, Fusarium, Saccharomyces, Candida, Torulopsis</i>
	6	<i>Lb. sanfrancisco</i> CB1	Sour-dough	Caproic acid, Propionic acid, Butyric acid, Valeric acid	<i>Fusarium, Penicillium, Aspergillus, Monilia</i>
	7	<i>Lb. plantarum</i> VTTE78076	Beer	Benzoic acid, Methylhydantoin, Mevalonolactone, Cyclo(Gly-Leu)	<i>Fusarium</i>
	8	<i>Lb. plantarum</i> 21B	Sour-dough	Phenyllactic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid	<i>Aspergillus, Eurotium, Endomyces, Penicillium, Manilla</i>
	9	<i>Lb. plantarum</i> MiLAB 393	Grass silage	Phenyllactic acid, Cyclo(Phe-Pro), Cyclo(Phe-OH-Pro)	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Debaryomyces, Pichia, Kluyveromyces, Rhodotorula, Candida, Saccharomyces</i>
	10	<i>Lb. plantarum</i> MiLAB 14	Lilac-flowers	Hydroxy fatty acids (3-hydroxy-5-cis-dodecanoic acid, 3-hydroxydecanoic acid, 3-hydroxytetradecanoic acid, 3-hydroxydodecanoic acid)	<i>Aspergillus, Penicillium, Kluyveromyces, Pichia, Rhodotorula</i>
	11	<i>Lb. plantarum</i> FST 1.7	Malted barely	Phenyllactic acid, Cyclo(Leu-Pro), Cyclo(Phe-Pro)	<i>Aspergillus, Fusarium</i>
	12	<i>Lb. plantarum</i>	Grass silage	Phenyllactic acid	<i>Aspergillus, Penicillium, Rhodotorula,</i>
	13*	<i>Lb. plantarum</i> AF1	Kimchi	Cyclo(Leu-Leu), unidentified compounds	<i>Penicillium, Aspergillus, Epicoccum, Cladosporium</i>
	14*	<i>Lb. plantarum</i> AF1	Kimchi	δ -Dodecalactone	<i>Aspergillus, Penicillium, Candida, Cladosporium</i>
	15	<i>Lb. amylovorus</i> DSM19280	Cereal	Carboxylic acids derivatives, Fatty acid(Sodium decanoate), Nucleosides(Cytidine, 2'-deoxycytidine), Cyclic-dipeptides(cyclo(L-His-L-Pro), cyclo(L-Pro-L-Pro), cyclo(L-Met-L-Pro), cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Tyr-L-Pro))	<i>Aspergillus, Fusarium, Penicillium</i>

Other compound	16	<i>Lb. plantarum</i> IMAU10014	Koumiss	Benzeneacetic acid, 2-propenyl ester, Phenyllactic acid	<i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium</i>
	17	<i>Lb. casei</i> AST18	Chinese food	Cyclo-(Leu-Pro), 2,6-diphenyl-piperidine, 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-dipyrrrolo[1,2-a;1',2'-d]pyrazine	<i>Penicillium</i>
	18	<i>Lb. reuteri</i> eelp	porcine	(S)-(-)-2-hydroxyisocaproic acid, hydrocinnamic acid, PLA, decanoic acid, azelaic acid, 4-hydroxy benzoic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, DL-p-hydroxy phenyllactic acid, 3-hydroxy decanoic acid	<i>Microsporum, Epidermophyton</i>
	19	<i>Lb. hammesii</i> DSM 16381	sourdough	Mono-hydroxy C ₁₈ :1 fatty acid	<i>Penicillium</i>
	20	<i>Lb. plantarum</i> KCC-10	Italian rye grass forage silage	3-phenyllactic acid	<i>Aspergillus, Botrytis, Scytalidium, Trichophyton</i>
	21	<i>Lb. plantarum</i> K35	Thai food	lactic acid, 2-butyl-4-hexyl octahydro-1H-indene, oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, 2,4-di-tertbutylphenol, stearic acid, 3-phenyllactic acid, pyroglutamic acid, 5-Methyl-1-phenylbicyclo[3.2.0]heptane	<i>Aspergillus</i>
	22	<i>Lb. reuteri</i> R29	Human	4-Hydroxy benzoic acid, benzoic acid, caffeic acid, catechol, coumaric acid, ferulic acid, hydrocaffeic acid, hydrocinnamic acid, hydroferullic acid, OH-phenyllactic acid, PLA, phloretic acid, vanillic acid	<i>Fusarium</i>
	23	<i>Lactococcus</i> sp. BSN307	fermented dough	2,4-Di-tert-butyl phenol	<i>Aspergillus, Fusarium, Penicillium</i>
	24*	<i>Lb. plantarum</i> HD1	Kimchi	5-oxododecanoic acid, 3-hydroxy decanoic acid, 3-hydroxy-5-dodecenoic acid	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, kazachstania, Pichia</i>
	25*	<i>Lb. plantarum</i> EM	Kimchi	3-hydroxy-5-dodecenoic acid	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Kazachstania, Pichia, Zygosaccharomyces, Candida, Salmonella, Staphylococcus, B. cereus, E. coli O157:H7, Vibrio parahaemolyticus</i>

※ 본 연구진 연구 실적

☞ 현재까지 전세계적으로 유산균 유래 향진물질 규명은 총 25건에 불과하며, 이 중 4건이 본 연구진 보고이며 국내 연구진에 의한 김치유래 향진물질 규명은 본 연구진이 유일함.

- 본 연구에서는 천연항균제재로 사용가능한(항균력, 안전성, 식품적용능등) 강력하고 넓은 항균 spectrum을 지닌 GRAS 등급(유산균) 유용 미생물 3종(AF1, HD1, EM)을 개발함. 또한 이로부터 생산되는 항균물질의 구조규명과 식품적용 실험을 통하여 실용화 기술을 개발함.
- 본 연구 성과로 고초균 유래 단백질성 물질을 국내 최초로 규명함. 또한 본 연구의 개발 고초균은 안전성 관련 연구를 통하여 유럽의 QPS(Qualified Presumption of Safety) 기준을 충족하는 안전한 균주임을 규명함.

2. 기술명: 신규 천연항균소재 개발

- <표 8>에서 보여지는 바와 같이 현재까지 개발되어 사용되는 미생물유래 천연 항균제는 총 4건으로 이 중 GRAS등급 미생물이 아닌 경우가 3건임. 이러한 경우에는 반드시 완전히 정제하여 사용하여야 하므로 생산단가가 올라감. GRAS 등급 미생물인 경우 1건에 불과하고, 이 경우에도 모든 식품에 적용이 불가하여 치즈에서만 제한적으로 사용하고 있음.

<표 8. 천연식품첨가물(미생물 유래) 중 항균활성을 가진 첨가물>

연번	첨가물명	유래 미생물	사용기준	시판제품	특징
1	리소짐	<i>Streptomyces</i> sp.	- ¹⁾	- 제품명: Lysoch®G4 - 회사명: Handary - 단가: 49~12,000천 원/kg - 원산지: 네덜란드	- 그람양성, 음성세균에 대한 항균작용 - 무향, pH 4~10에서 안정함 - 곰팡이, 효모에 대한 항균효과는 없음 - 다당류 존재하에서는 작용이 저하됨
2	폴리리신	<i>Streptomyces albulus</i>	-	- 제품명: Epolyly™ - 회사명: Handary - 단가: 560천 원/kg - 원산지: 벨기에	- 세균, 효모, 곰팡이에 대한 항균작용 - 무향, 무취, pH 4~10에서 안정함
3	나타마이신	<i>Streptomyces natalensis</i>	1 mg/dm ² 이하	- 제품명: Natap® - 회사명: Handary - 단가: 625천 원/kg - 원산지: 벨기에	- 항진균(효모,곰팡이)작용 - 알러지반응(-), pH에 안정 - 다른첨가물에 비해 비싼 단가 - 식품표면에 사용 불가
4	니신	<i>Lactococcus lactis</i>	250 mg/kg 이하	- 제품명: NisinA®P - 회사명: Handary - 단가: 387천 원/kg - 원산지: 벨기에	- 항세균작용, 치즈에만 사용가능(제한) - pH 3~6에서 안정함 - 당성분을 부패시켜 작용 저하

¹⁾ 사용기준: 식품첨가물 일반사용기준에 적용 받음

- 일반적으로 유산균 유래 항균물질은 활성이 낮고 고초균 유래 항균물질은 활성은 높으나 항생물질인경우가 대부분임. 본 연구에서의 고초균 항균물질은 항균활성이

매우 우수한 단백질성 물질로서 체내 분해가 가능한 항균물질 중 천연식품보존제로 활용 가능한 물질을 개발하였음. 더 나아가 본 연구성과물은 기존의 고초균 박테리오신과는 그 아미노산 서열이 다른 신규한 물질(novel compound)로 규명됨.

○ 본 연구에서는 다양한 항균활성 유산균을 분리·동정하고 그 항균소재를 대량생산하여 산업화하고자 시도하였음. 또한 고초균 유래 항균소재와 유산균 항균물질을 병행하여 사용함으로써 그 활성 및 항균 spectrum을 넓혀 식품산업에 적용 폭을 넓힘.

○ 우수한 항균소재라 하더라도 실용화를 위해서는 저렴한 생산 단가가 가장 중요한 사항임. 이에 본 연구개발에서는 폐배추 및 폐절임배추를 사용한 항균소재생산으로 생산 단가 낮춤. 이와 같은 추진방향은 폐농산자원으로부터 고부가가치제품 생산과 동시에 산업폐기물처리방안의 문제를 동시에 해결할 수 있는 방안임. 또한 개발 천연항균제를 식품첨가물 규격이 아닌 식품원료 규격에 부합하도록 추진하여 개발 제품이 바로 실용화 할 수 있음.

☞ 이와 같은 성과는 원천적으로 항균물질이 배양상징역 상태만으로 강력한 항균 활성을 지니기 때문에 분리·정제 없이(농축) 바로 사용가능하기 때문에 가능한 것임.

: 우수한 항균활성 GRAS 미생물의 개발(원천 개발 기술)

3. 기술명: 천연항균소재의 산업화 및 상품화

○ 천연 항균제를 생산하는 업체로, 에프에이뱅크, 바이오스킨테크, 에스엔텍이 있으며, 이들 업체는 각각 자몽종자추출물, 복합황금추출물, 식물정유를 이용한 천연항균제를 생산하여 약 70억 원 정도의 매출을 올리고 있음.

○ 미국의 Bio/Chem Research사와 Grotec사, 일본의 Chisso사에서 천연항균제인 자몽종자추출물, 아미노산 제제인 폴리리신을 생산하고 있음.

○ 현재까지 식품에 사용되고 있는 천연항균제품으로 자몽종자추출물이 주를 이루고 있으나, 식품 내에서 미생물 제어 효과가 완벽하지 못하여 가열살균법과 병용되고 있는 실정임.

○ 또한 국내 식품 유래 미생물을 이용한 천연항균소재가 상품화되어 판매되고 있는 제품은 식물성유산균발효액ENT가 유일하나, 항진균 활성의 보완이 필요함.

○ 국내 천연보존제 시장은 최근 몇 년간 천연물질로부터 추출한 항균제의 개발이 활

발해지고, 보존제의 안전성 및 소비자들의 합성물질에 대한 의식 변화로 인해 천연 물질에 대한 관심이 증가하여 시장의 성장세는 증가할 것으로 예상됨.

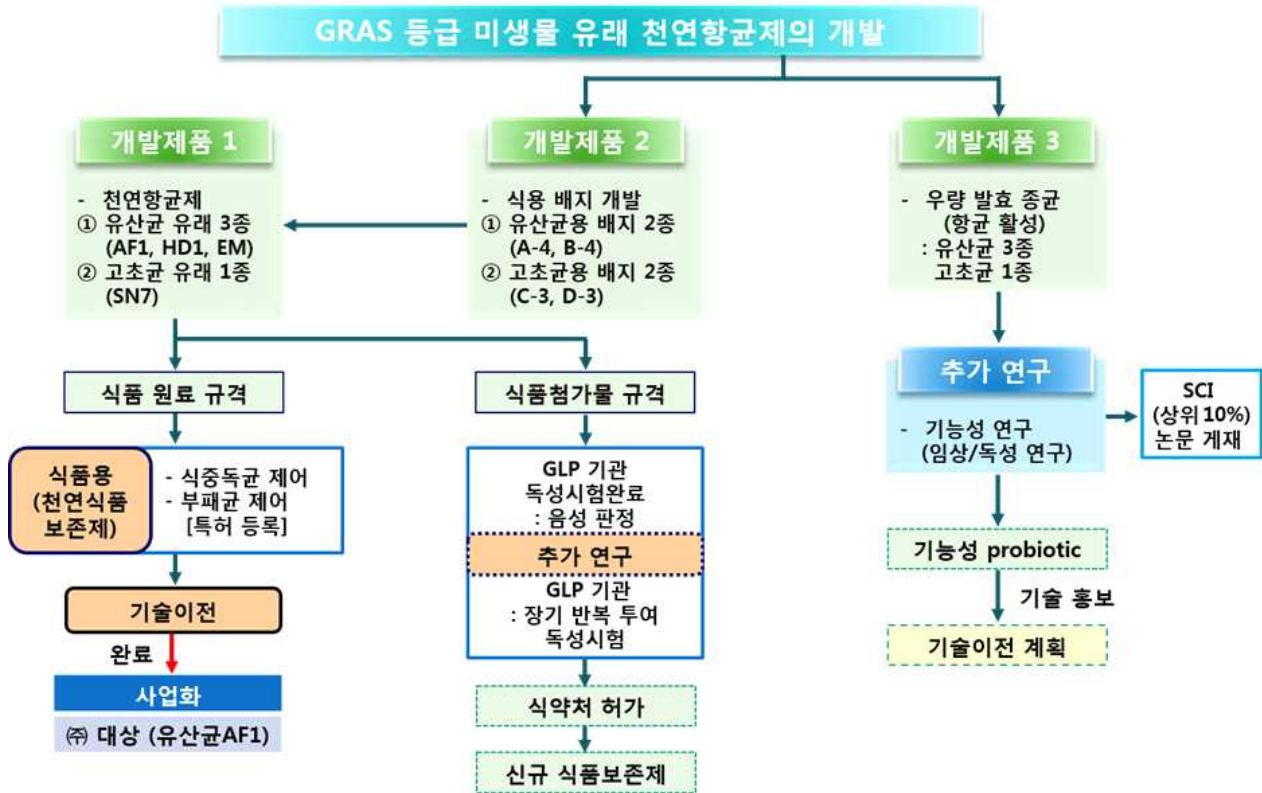
- 식품 안전성이 대두되는 현시점에서 식품에서 분리한 GRAS 유산균을 이용하여 대량생산 배양기술 등을 확보하였고, 다양한 식품군에 적용할 수 있는 천연항균소재를 상품화하고자함.
- 기존에 사용하고 있는 항균소재 대비 우수한 항균력이 있음을 확인하였으며 상품화된 천연항균소재를 이용하여 수익 창출 모델 개발하였음. 이를 이용하여 식품 식중독 사고 예방 및 그에 따라 발생하는 경제적 손실 등을 감소시키는데 기여할 수 있음.
- ☞ 본 연구에서는 항세균/항진균 활성을 가진 천연항균소재의 식품원료 기준규격 대량생산 기술 개발 및 생산 원가 절감 공정 개발함. 또한 신규 천연항균소재의 비가열제품 적용에 필요한 공정 설계 및 사용 기준 규격 확립함. 기존 천연항균제 대체 및 새로운 적용 제품 발굴을 통한 신규 천연 항균소재 상품화 및 판매 전략 수립함. 이와 같은 기술 개발과 성과로 「미생물(GRAS등급) 유래 천연항균소재 생산 기술」 분야에서 본 연구진은 국내 최고 기술을 보유함. 또한 실제 이를 실용화하여 고가의 외국 천연보존제 수입 대체 상품으로서, 더 나아가 국가 브랜드 향상에 기여할 수 있는 국가 경쟁력 상품으로 매출증대 및 폐농산자원의 부가가치 향상에 기여할 것임.

4. 기술명: 미생물 유래 천연항균제의 독성평가

- 본 연구에서 천연항균제 3종[부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum* AF1+HD1), 부분정제한 고초균(*Bacillus subtilis* SN7), 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* EM)]의 단회 경구 투여시 개략의 치사량은 2000 mg/kg B.W.이상으로 사료되었고 복귀돌연변이, 염색체이상, 소핵시험 결과 음성으로 판단되어 임상시험 진행을 진행하는 자료로 사용가능함.
- 본 연구에서 천연항균제 3종[부분정제한 유산균(*Lactobacillus plantarum* AF1+HD1), 부분정제한 고초균(*Bacillus subtilis* SN7), 부분정제한 유산균 (*Lactobacillus plantarum* EM)]의 13주 반복경구투여 독성시험 용량을 결정하기 위한 4주 반복용량결정시험결과 13주 반복경구투여 독성시험의 용량은 0, 500, 1000, 및 2000 mg/kg의 균으로 설정할 수 있을 것으로 사료되어 13주 반복경구투여 독성시험을 진행 할 수 있음.

5. 연구결과의 활용계획

제 1 절 실용화·산업화 계획



<그림 2. 연구개발 성과물과 상품화 계획>

1. 기술이전 및 산업화

- 기술명: 항진균 활성을 지니는 유산균 *Lb. plantarum* AF1과 그로부터 생산된 천연 항균소재의 식품적용 기술(2건)
- 실시기업: (주)대상FNF 및 관심업체
- 실시내용: 전용실시
- 이론회망 기술내용 및 향후조치: 본 과제에서 식품 기술 선진화에 기여할 수 있는 천연항균소재를 확보하였으며 이를 대량생산하여 소재로 상품화하였음. 기존 사용되고 있는 항균소재들에 비해 효능은 우월한 반면, 항균물질이 안정하여 정제와 같은 공정 없이도 목표하고자하는 항균력을 나타내기 때문에 원재료비 절감 효과를 얻을 수 있었음. 개발된 천연항균소재는 현재 김치, 젓갈, 절임류 등의 비가열 식품에 적용하여 사용되고 있으며, 향후 적용 식품의 범위를 넓히고자 꾸준한 기술 영업 활동을 진행하고자 함. 기술영업에 필요한 브로셔 제작 및 TS 등의 활동도 계획하고 있으며, 현 과제에서 다루지 않은 식품군에 대한 항균효능도 검증하고

Data를 축적하여 영업활동에 활용하고자 함. 식품이외의 생활용품이나 화장품에도 적용 할 수 있어 용도 및 적용 제품 다양화함으로써 천연항균제 시장 확대를 이룰 계획임.

2. 기타

- 기술명1: GRAS 미생물 유래 항진/항세균 활성 식품보존제(식품첨가물)
- 추가연구: 본 연구개발 성과물을 분리·정제하여 고순도 물질을 제조 후 식품첨가물로 산업화 가능. 이 경우 식품용뿐만 아니라 의약용으로 활용 가능한 고부가가치 물질임. 이 경우 본 연구성과(제2협동: KTR)에 더불어 13주 장기 투여 실험 결과를 시행하여야함.

- 기술명2: 기능성 probiotic
- 기술이전계획: 본 연구성과물 GRAS 유산균은 항균활성 이외에 콜레스테롤 저하능, 장내부착능, 장내생존성 등의 기능성 지님. 천연항균제 생산 균주로 뿐만 아니라 기능성 probiotic으로 산업화 가능성이 높아 추후 기술이전 설명회 등을 통하여 기술이전계획.

10	<i>Bacillusthuringiensis</i> subsp. <i>entomodius</i>	-	Thuricin-S	DWTXWSXLVXAACSVELL	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Pediococcus acidolactici</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
11	<i>Bacillusthuringiensis</i> B439	Dairy product	Thuricin439A	GWVAXVGAXGTVVVLASGGVV	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>
12	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-30507	Soil	SRCAM 37	FVYGNVTSILVQAQFLV NGQRRFFYTPDK	<i>Campylobacter jejuni</i>
13	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-30509	Soil	SRCAM 602	ATYYGNGLYCNKQKHWTWV DWNKASREIGKITVNGWVQH	<i>Campylobacter jejuni</i>
14	<i>Paenibacillus polymyxa</i> NRRL B-30644	Soil	SRCAM 1580	VNYGNVSCSKTKCSVNW GIITHQAFRVTSQVAVSG	<i>Campylobacter jejuni</i>
15	<i>Bacillus cereus</i> MRX1	-	CereinMRX1	DWTCWSCLVCAACSVELL	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Listeria innocua</i>
16	<i>Bacillus cereus</i>	Soil	Cerein7A	GWGDVL	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Listeria innocua</i>
17	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Tunisian soil litter	BacthuricinF4	DWTXWSXL	<i>Bacillus</i> sp., <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Brevibacterium flavum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>
18	<i>B. subtilis</i> SN7	Meju	Mejucin	LGPQLNKGCATCSIGA ACLVDGPIPDEIAG (3.4 kDa)	<i>B. cereus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus luteus</i>

※ shadow: 과제 협약시(2013)의 현황, 연번 18은 과제협약(2013) 이후부터 현재까지의 현황

☞ 2013~2016년까지 보고된 타 연구 보고를 살펴보면, 고초균 유래 박테리오신 규명은 신규 보고 없음. 전세계적으로 본 연구진의 신규 박테리오신(Mejucin) 규명이 2013~2016년 사이 보고된 것으로는 유일함.

〈표 9-2. 유산균 유래 항진균 활성 물질〉

Class	연번	M/O	Source	Compound(s)	Inhibition spectrum
Protein	1	<i>Lb. pentosus</i>	Vagina	Pentocin TV35b (3.9kDa)	<i>Candida</i>
	2	<i>Lb. coryniformis</i> Si3	Sour-dough	Proteinaceous compound (approximately 3kDa)	<i>Aspergillus, Penicillium, Talaromyces, Fusarium, Debaryomyces, Mucor, Kluyveromyces</i>
	3	<i>Lb. paracasei subsp. paracasei</i> M3	Cheese	Proteinaceous compound (43kDa)	<i>Candida, Saccharomyces</i>
	4	<i>Leu. mesenteroides</i> DU15	-	Five novel peptides : GPFPL, YVPLF, LLHGVPLP, GPFPLEMTLGPT, TVYFPFGPL	<i>Aspergillus</i>
Other compound	5	<i>Lb. reuteri</i>	Pig intestine	Reuterin	<i>Aspergillus, Fusarium, Saccharomyces, Candida, Torulopsis</i>
	6	<i>Lb. sanfrancisco</i> CB1	Sour-dough	Caproic acid, Propionic acid, Butyric acid, Valeric acid	<i>Fusarium, Penicillium, Aspergillus, Monilia</i>
	7	<i>Lb. plantarum</i> VTTE78076	Beer	Benzoic acid, Methylhydantoin, Mevalonolactone, Cyclo(Gly-Leu)	<i>Fusarium</i>
	8	<i>Lb. plantarum</i> 21B	Sour-dough	Phenyllactic acid, 4-hydroxyphenyllactic acid	<i>Aspergillus, Eurotium, Endomyces, Penicillium, Manilla</i>
	9	<i>Lb. plantarum</i> MiLAB 393	Grass silage	Phenyllactic acid, Cyclo(Phe-Pro), Cyclo(Phe-OH-Pro)	<i>Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Debaryomyces, Pichia, Kluyveromyces, Rhodotorula, Candida, Saccharomyces</i>
	10	<i>Lb. plantarum</i> MiLAB 14	Lilac-flowers	Hydroxy fatty acids (3-hydroxy-5-cis-decanoic acid, 3-hydroxydecanoic acid, 3-hydroxytetradecanoic acid, 3-hydroxydodecanoic acid)	<i>Aspergillus, Penicillium, Kluyveromyces, Pichia, Rhodotorula</i>
	11	<i>Lb. plantarum</i> FST 1.7	Malted barely	Phenyllactic acid, Cyclo(Leu-Pro), Cyclo(Phe-Pro)	<i>Aspergillus, Fusarium</i>
	12	<i>Lb. plantarum</i>	Grass silage	Phenyllactic acid	<i>Aspergillus, Penicillium, Rhodotorula,</i>
	13*	<i>Lb. plantarum</i> AF1	Kimchi	Cyclo(Leu-Leu), unidentified compounds	<i>Penicillium, Aspergillus, Epicoccum, Cladosporium</i>
	14*	<i>Lb. plantarum</i> AF1	Kimchi	δ -Dodecalactone	<i>Aspergillus, Penicillium, Candida, Cladosporium</i>
	15	<i>Lb. amylovorus</i> DSM19280	Cereal	Carboxylic acids derivatives, Fatty acid(Sodium decanoate), Nucleosides(Cytidine, 2'-deoxycytidine),	<i>Aspergillus, Fusarium, Penicillium</i>

				Cyclic-dipeptides(cyclo(L-His-L-Pro), cyclo(L-Pro-L-Pro), cyclo(L-Met-L-Pro), cyclo(L-Leu-L-Pro), cyclo(L-Tyr-L-Pro))	
16	<i>Lb. plantarum</i> IMAU10014	Koumiss		Benzeneacetic acid, 2-propenyl ester, Phenyllactic acid	<i>Penicillium, Aspergillus, Fusarium</i>
17	<i>Lb. casei</i> AST18	Chinese food		Cyclo-(Leu-Pro), 2,6-diphenyl-piperidine, 5,10-diethoxy-2,3,7,8-tetrahydro-1H,6H-di pyrrolo[1,2-a:1',2'-d]pyrazine	<i>Penicillium</i>
18	<i>Lb. reuteri</i> eelp	porcine		(S)-(-)-2-hydroxyisocaproic acid, hydrocinnamic acid, PLA, decanoic acid, azelaic acid, 4-hydroxy benzoic acid, p-coumaric acid, vanillic acid, DL-p-hydroxy phenyllactic acid, 3-hydroxy decanoic acid	<i>Microsporum, Epidermophyton</i>
19	<i>Lb. hammesii</i> DSM 16381	sourdough		Mono-hydroxy C ₁₈ :1 fatty acid	<i>Penicillium</i>
20	<i>Lb. plantarum</i> KCC-10	Italian rye grass forage silage		3-phenyllactic acid	<i>Aspergillus, Botrytis, Scytalidium, Trichophyton</i>
21	<i>Lb. plantarum</i> K35	Thai food		lactic acid, 2-butyl-4-hexyl octahydro-1H-indene, oleic acid, palmitic acid, linoleic acid, 2,4-di-tertbutylphenol, stearic acid, 3-phenyllactic acid, pyroglutamic acid, 5-Methyl-1-phenylbicyclo[3.2.0]heptane	<i>Aspergillus</i>
22	<i>Lb. reuteri</i> R29	Human		4-Hydroxy benzoic acid, benzoic acid, caffeic acid, catechol, coumaric acid, ferulic acid, hydrocaffeic acid, hydrocinnamic acid, hydroferullic acid, OH-phenyllactic acid, PLA, phloretic acid, vanillic acid	<i>Fusarium</i>
23	<i>Lactococcus</i> sp. BSN307	fermented dough		2,4-Di-tert-butyl phenol	<i>Aspergillus, Fusarium, Penicillium</i>
24**	<i>Lb. plantarum</i> HD1	Kimchi		5-oxododecanoic acid, 3-hydroxy decanoic acid, 3-hydroxy-5-dodecenoic acid	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, kazachstania, Pichia</i>
25**	<i>Lb. plantarum</i> EM	Kimchi		3-hydroxy-5-dodecenoic acid	<i>Aspergillus, Penicillium, Cladosporium, Kazachstania, Pichia, Zygosaccharomyces, Candida, Salmonella, Staphylococcus, B. cereus, E. coli O157:H7, Vibrio parahaemolyticus</i>

※ shadow: 과제 협약시(2013)의 현황, 연번 4와 18-25는 과제협약(2013) 이후부터 현재까지의 현황
 ※ 본 연구진 연구 실적

☞ 유산균 유래 항세균 물질 보고는 수없이 많아 검색에서 제외함. 유산균 유래 항진균 물질의 경우 2013년 이후 현재까지 단백질성 물질 1건, 기타물질 8건이 추가로 더 보고됨. 이 중 기타물질 8건 중 2건은 본 연구진 보고임.

2. 천연항균제의 식품산업에의 응용

- 최근 소비자의 건강 지향적 성향과 함께 천연물에 대한 요구가 높아지고 있고 합성보존료가 첨가된 식품의 사용을 꺼리고 있음. 이와 같은 경향으로 인하여 식품산업계에서도 인공 합성보존제의 사용을 될 수 있는 한 제한하려는 추세이고, 안전성이 확보된 천연항균성 물질을 식품의 보존에 이용하고자 하는 연구가 집중적으로 이루어지고 있음. 일반적으로 인간이 장기간 식용으로 사용했던 천연물을 그대로 이용하거나 추출하여 보존제로 사용하는 경우, 미국에서는 이를 generally recognized as safe(GRAS) list로 분류하여 관리하고 있음.
- 미생물이 다른 미생물에 대해 저해 작용을 나타내는 항균물질을 생산해 내는 경우가 많은데, 이 중 유산균이 생성해낸 항균성 peptide 또는 단백질인 박테리오신(bacteriocin)이 가장 대표적이며, 생체 내에서 안전하다고 알려져 있음. 이것이 인체에 섭취되면 소화기관 내에 존재하는 단백질 가수분해 효소에 의해 분해되므로 장내 유익균에 영향을 주지 않고, 잔류성이 없어 식품 등의 천연보존제로 각광 받고 있음. 그러나 대부분의 박테리오신은 항균작용의 범위가 좁기 때문에 천연보존제로서의 사용에 제한이 있음.
- 다양한 박테리오신 중 유일하게 그 사용이 허가된 nisin은 합성보존료를 대체할 수 있는 천연보존료이긴 하지만 국내사용이 제한적이어서 다양한 제품에 적용하기 어려움. 또한 organic acid, lysozyme, lauricidin, lactoperoxidase 등의 다른 항균제와의 병합처리에 대한 연구도 활발하게 진행 중임.
- ϵ -Polylysine은 안전하며 실제 식품에 사용되는 농도 범위에서는 식품의 풍미에 영향을 주지 않기 때문에 국수 등의 면류, 소스류를 비롯한 다양한 식품에 폭넓게 이용가능하며 최근 ϵ -polylysine에 자몽종자 추출물(grapefruit seed extract), glyceride, organic acid 등의 항균제를 병합처리하여 식품부패균에 대한 항균작용의 상승효과를 보는 연구가 진행되고 있음. 현재 ϵ -polylysine은 화학합성품 이외의 식품첨가물 제제로 허가되어 사용되고 있음.

7. 연구개발결과의 보안등급

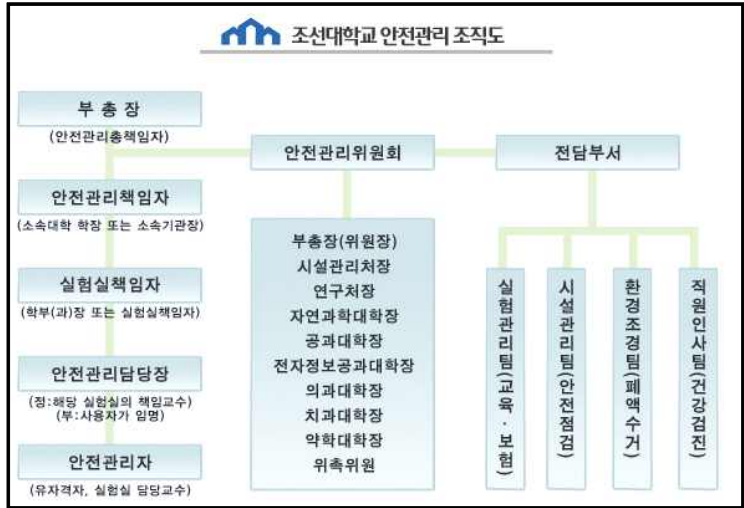
코드번호	D-09
해당사항 없음.	

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

1. 연구실 안전관리 및 실험실 안전진단 실시 가. 실험실 안전관리 조직도



- ※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리
- ※ 관리위험등급의 지정
- ※ 실험실 분류
 - A등급: 미생물 동물, 방사성동위원소 물질 등을 사용하는 실험실
 - B등급: 화학약품 등을 사용하는 실험실
 - C등급: 기계 전기/전자/통신 설비 등을 사용하는 실험실
 - D등급: 실험 실습을 수행하지 않는 설계 컴퓨터 관련 등의 실험실
 - LMO 1등급: 건강한 성인에게는 질병을 일으키지 아니하는 것으로 알려진 유전자변형생물체와 환경에 대한 위해를 일으키지 아니하는 것으로 알려진 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실
 - LMO 2등급: 사람에게 발병하더라도 치료가 용이한 질병을 일으킬 수 있는 유전자변형생물체와 환경에 방출되더라도 위해가 경미하고 치유가 용이한 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실
 - LMO 3등급: 사람에게 발병하였을 경우 증세가 심각할 수 있으나 치료가 가능한 유전자변형생물체와 환경에 방출되었을 경우 위해가 상당할 수 있으나 치유가 가능한 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실
 - LMO 4등급: 사람에게 발병하였을 경우 증세가 치명적이며 치료가 어려운 유전자변형생물체와 환경에 방출되었을 경우 위해가 막대하고 치유가 곤란한 유전자변형생물체를 개발하거나 이를 이용하는 실험실
 - 방사선: 방사선을 사용하는 실험실

나. 실험실 정밀안전진단 실시

- 진단목적: 우리대학의 안전관리 활동 및 실험·실습실에 대한 분야별 안전관리상태를

점검하여 위험요인을 발견하고 연구실 안전 환경조성에 관한 법률 및 산업안전보건법, 각종 규정 등과 비교/분석하여 실험실에 적합한 개선대책을 수립/제시함으로써 각종 재해를 예방하고자 함.

- 대상: 조선대학교 실험·실습실 397개소
- 실시: 2년마다 1회, 10월 ~ 12월경 실시하여 교육과학기술부에 보고

다. 실험실 정기점검 실시

- 점검목적: 실험실 내에 발생할 수 있는 위험요소를 예측하여 보완함으로써 실험실 안전사고를 미연에 방지하고 쾌적한 연구 환경을 조성하여 연구활동종사자의 건강을 증진하고 연구성과를 높이기 위함.
- 대상: 조선대학교 실험·실습실 397개소
- 실시: 매년마다 1회, 10월 ~ 12월경 실시

2. 교육 훈련

가. 개요: 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

나. 교육대상: 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등

다. 교육안내: <http://safetylabs.chosun.ac.kr/>

The screenshot displays the '교육안내' (Education Guide) page. At the top, it states '안전교육은 법정의무교육입니다.' (Safety education is a mandatory education by law). It provides information about the course, including that it covers safety information for various facilities and is required for lab entry. A flowchart outlines the four steps: 1. 교육대상자확인 (Confirmation of Education Targets), 2. 안전교육수강 (Safety Education Course), 3. 평가문제풀이 (Solving Evaluation Questions), and 4. 수료증출력 (Certificate Issuance). Below the flowchart is a sample '수료증' (Certificate of Completion) for a safety course, issued by Chosun University Safety Education Center.

라. 안전교육콘텐츠: 4개 과정 20차시

○ 연구활동종사자가 전공특성에 따라 차시를 선택하여 이수할 수 있도록 함.

과정	차시명	세부내용
연구실안전 및 안전일반과정	연구실 안전법 및 규정	1) 일반적인 법의 이해 2) 연구실안전환경 조성에 관한 법률 3) 안전관리 규정
	연구실 관리와 MSDS	1) 연구실의 위험성 2) 안전표지 3) 물질안전 보건자료(MSDS)
	안전관 심리	1) 불안정한 행동과 불안정한 상태 2) 인간의 심리 3) 휴먼에러
	캠퍼스 안전	1) 캠퍼스 내 상해사고 발생사례 및 예방법 2) 교통안전 3) 보안
화재 및 폭발	화재 및 폭발	1) 화재의 정의, 발생원인 및 대책 2) 소화의 원리 3) 폭발정의와 원인 및 폭발의 분류 4) 폭발예방 및 방지대책 5) 정전기에 의한 화재폭발 사례
	화재로 인한 신체피해	1) 화재의 특성 2) 화재 시의 연소생성물 3) 열과 화상
	소방안전설비 사용요령	1) 소화기 2) 옥내소화전 설비
	화재 시 행동요령	1) 화재 시 행동요령 2) 응급처치 요령 3) 화재발생 후 조치사항
연구실내 위험요인	전기안전	1) 전기 안전사고 및 예방 2) 전기작업 안전수칙 3) 전기화재 예방
	가스안전	1) 가스의 분류 및 유해성 2) 가스의 안전한 취급 3) 독성가스 제독설비
	기계안전	1) 기계재해 발생원인 2) 기계설비 안전의 기본 3) 기계설비의 안전한 사용 4) 전동공구 안전
	건설안전	1) 사고사례 2) 건축/토목 실험의 위험요인 3) 안전사고예방을 위한 조치 4) 보호장비 및 사고시 대응법
	화학안전	1) 연소와 화재 2) 소화와 대피 3) 생활화재
	화학사고 시 대응요령	1) 사고사례 2) 사고시 대응법 3) 보호장비 및 폐액처리법
	생물학안전	1) 생물학안전이란 2) 위해성평가능력이란 3) 물리적밀폐란 4) 생물안전 관리 조직 및 운영 5) 생물학 실험실 안전수칙 6) 유전자 변형 생물체란 7) LMO법이란 8) 연구시설 운영기준 9) 소독, 멸균 및 폐기처리 10) 생물 안전사고 및 응급처치
	사고대응 및 처리	1) 사고대응 방법 2) 보험처리
생물/방사선 안전	유해화학물질 취급 및 관리방법	1) 유해화학물질의 운반 2) 유해화학물질의 취급 시 요령 3) 유해화학물질의 성상별 취급 4) 유해화학물질의 저장
	시험연구용 LMO안전 관리	1) LMO 개요 2) 바이오안전성의정서 3) LMO법 4) LMO법 시행에 따른 절차 5) LMO 운영기준 6) 폐기물 처리
	방사선 안전	1) 방사선 개요 2) 방사선 안전관리 3) 방사선 시설의 안전관리 4) 방사선 발생장치의 안전관리 5) 방사선이 인체에 미치는 영향 6) 사고시 대응법 7) 방사선 안전수칙
	사고사례	1) 황산사용에 의한 화상사고 2) 폐놀 시약용기 파열 흡입 사고전 3) 열기구에 의한 파열 사고

마. 단계별 교육 이수과정

- 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시

3. 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
연구실 안전 공제 (교육시설재난공제회)	가입대상: 국적, 소속, 전공, 신분, 연령 등과 관계없이 조선대학교가 인정하는 연구활동종사자	피보험자	실험관리팀
	사망·질병 사망·치료 중 사망 보장한도: 1억원	“	“
	후유장해 보장한도: 1억원, 상해 보장한도: 1천만원	“	“
	가입인원: 11,327명(학부 및 대학원: 자연, 이공계)		“
학생단체 상해보험	상해사망, 후유장해: 2억원 의사상자 상해위험: 1억원 상해, 후유정도에 따른 보상: 약관보상	학부생, 대학원생	학생지원팀
교직원 보험	상해사망, 상해후유장해: 3천만원/인 질병사망: 1천만원/인 암진단비 - 일반암: 1천만원/인 - 갑상샘암, 경계성종양: 3백만원/인 - 상피내암, 기타피부암: 2백만원/인 노출중/급성심근경색: 5백만원/인 입원비: 2만원/1일당	정규교직원 및 계약직원	직원인사팀

4. 추가 이행 계획

1) 실험실 비상 장비 세트 구입 및 설치	실험실 집중 건물 중심으로 비상장비 세트 설치(화재대피용 산소공급기 외11종)
2) 실험실내 시약장 안전바 설치	시약장 낙하방지를 위한 안전바 설치 계획
3) 연구활동종사자 안전교육 강화	1. 연중 사이버 안전교육 실시 2. 집체식 안전교육 실시 계획
4) 실험실내 소방시설물 점검 및 수리	노후 소화기 교체 및 압력미달 재충전
5) 실험실 안전점검 강화	1. 실험실내 일상점검 수시 확인 2. 점검후 결함, 위험발생 가능 실험실 사용금지
6) 실험실 환경안전지침 작성	보완작성
7) 고압가스 안전관리	전도방지조치를 실시하여 보관/사용
8) 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Purification and characterization of antifungal compounds from <i>Lactobacillus plantarum</i> HD1 isolated from kimchi	조선 대학교	(교신 저자) 장해춘	Food Microbiology (41:19-26)	3.374	2014.01.25	단독사사	SCI (IF 비율 상위 6.5%)
2	논문	Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain <i>Lactobacillus plantarum</i> EM isolated from kimchi	조선 대학교	(교신 저자) 장해춘	LWT - Food Science and Technology (62(1):210-217)	2.416	2015.06.30	단독사사	SCI (IF 비율 상위 19.5%)
3	논문	Characterization of starter kimchi fermented with <i>Leuconostoc kimchii</i> GJ2 and its cholesterol-lowering effects in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet	조선 대학교	(교신 저자) 장해춘	Journal of the science of food and agriculture (95(13):2750- 2756)	1.714	2015.10.31	단독사사	SCI (IF 비율 상위 12.5%)
4	논문	Isolation of Antifungal Activity of <i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA from Kimchi and Characterization of Its Antifungal Compounds	조선 대학교	(교신 저자) 장해춘	Food Science and Biotechnology (25(1):213-219)	0.699	2016.02.29	단독사사	SCI (IF 비율 상위 77.4%)

5	논문	Assessment of <i>Bacillus subtilis</i> SN7 as a starter culture for Cheonggukjang, a Korean traditional fermented soybean food, and its capability to control <i>Bacillus cereus</i> in Cheonggukjang	조선대학교	(교신저자) 장해춘	Food Control (73(2):946-953)	3.388	2017.03.31	단독사사	SCI (IF 비율 상위 11.2%)
---	----	---	-------	---------------	------------------------------	-------	------------	------	----------------------

○ 대표연구실적은 총 연구기간 중 발표(게재확정 포함)된 대표적 연구실적(논문, 특허 등)을 5건 이내로 기재

11. 기타사항

코드번호	D-13
해당사항 없음.	

12. 참고문헌

코드번호	D-14
제 1 장 [제1세부] 항식중독 미생물 활성을 지닌 유용 미생물의 개발 및 비가열 식품에 신규 천연항균소재 적용 기술 개발	
<ol style="list-style-type: none"> 1. 식품의약품안전평가원 지원, 「비가열 고위해식품의 미생물 저감화 연구, 2011, 이민석」 2. 식품의약품안전청 지원, 「비가열처리식품 중 위해미생물 저감화 방법 연구, 2002, 박지용」 3. 식품의약품안전청 지원, 「신선식품 중 위해미생물 저감화 방법 연구, 2002, 박지용」 4. Yang EJ, Chang HC. Purification of a new antifungal compound produced by <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 isolated from kimchi. <i>Int. J. Food Microbiol.</i>, 139(1):56-63 (2010) 5. 농림축산식품부 지원 기획과제. 2013 「김치발효조절 및 품질균일화를 위한 미생물 천이조절 기술 개발」, 발간등록번호: 11-1543000-000180-01 6. 식품공전 中 제 2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격 7. 식품공전 中 제 3. 일반 시험법 8. 식품의약품 안전처 식중독 통계시스템. 2002~2013년 식중독 발생현황 9. European food safety authority (EFSA). Update of the criteria used in the assessment of bacterial resistance to antibiotics of human and veterinary importance. <i>The EFSA Journal.</i> 732:1-15 (2008) 10. Svetoch EA, Stern NJ, Eruslanov BV, Kovalev YN, Volodina LI, Perelygin VV, Levchuk VP. Isolation of <i>Bacillus circulans</i> and <i>Paenibacillus polymyxa</i> strains inhibitory to <i>Campylobacter jejuni</i> and characterization of associated bacteriocins. <i>J. Food Prot.</i>, 68(1):11-17 (2005) 11. Le Marrec C, Hyronimus B, Bressollier P, Verneuil B, Urdaci MC. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by <i>Bacillus coagulans</i> I4. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i>, 66(12):5213-5220 (2000) 12. Hyronimus B, Le Marrec C, Urdaci MC. Coagulin, a bacteriocin-like-inhibitory substance produced by <i>Bacillus coagulans</i> I. <i>J. Appl. Microbiol.</i>, 85(1):42-50 (1998) 13. McClerren AL, Cooper LE, Quan C, Thomas PM, Kelleher NL, van der Donk, WA. Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i>, 103(46):17243-17248 (2006) 	

14. Begley M, Cotter PD, Hill C, Ross RP. Identification of a novel two-peptide lantibiotic, lichenicidin, following rational genome mining for LanM proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(17):5451-5460 (2009)
15. Banerjee SHARMILA, Hansen JN. Structure and expression of a gene encoding the precursor of subtilin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.*, 263(19):9508-9514 (1988)
16. Zheng G, Yan LZ, Vederas JC, Zuber P. Genes of the sbo-alb Locus of *Bacillus subtilis* Are Required for Production of the Antilisterial Bacteriocin Subtilosin. *J BACTERIOL.*, 181(23):7346-7355 (1999)
17. Paik SH, Chakicherla A, Hansen JN. Identification and characterization of the structural and transporter genes for, and the chemical and biological properties of, sublancin 168, a novel lantibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. *J. Biol. Chem.*, 273(36):23134-23142 (1998)
18. Okkers DJ, Dicks LMT, Siverster M, Joubert JJ, Odendaal HJ. Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.*, 87(5):726-734 (1999)
19. Magnusson J, Schnürer J. *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(1):1-5 (2001)
20. Atanassova M, Choiset Y, Dalgalarrrondo M, Chobert JM, Dousset X, Ivanova I, Haertle T. Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3. *Int. J. Food Microbiol.*, 87(1):63-73 (2003)
21. Muhialdin BJ, Hassan Z, Abu Bakar F, Algboory HL, Saari N. Novel Antifungal Peptides Produced by *Leuconostoc mesenteroides* DU15 Effectively Inhibit Growth of *Aspergillus niger*. *J. Food Sci.*, 80(5):M1026-M1030 (2015)
22. Talarico TL, Casas IA, Chung TC, Dobrogosz WJ. Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 32(12):1854-1858 (1988)
23. Corsetti A, Gobbetti M, Rossi J, Damiani P. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CBl. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50(2):253-256 (1998)
24. Niku-Paavola ML, Laitila A, Mattila-Sandholm T, Haikara A. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 86(1):29-35 (1999)
25. Lavermicocca P, Valerio F, Evidente A, Lazzaroni S, Corsetti A, Gobbetti M.

- Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Appl. Environ. Microbiol., 66(9):4084-4090 (2000)
26. Ström K, Sjögren J, Broberg A, Schnürer J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Appl. Environ. Microbiol., 68(9):4322-4327 (2002)
 27. Magnusson J, Ström K, Roos S, Sjögren J, Schnürer J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 219(1):129-135 (2003)
 28. Dal Bello F, Clarke CI, Ryan LAM, Ulmer H, Schober TJ, Ström K, Arendt EK, Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. J. Cereal Sci., 45(3):309-318 (2007)
 29. Prema P, Smila D, Palavesam A, Immanuel G. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. FOOD BIOPROCESS TECH., 3(3):379-386. (2010)
 30. Yang EJ, Kim YS, Chang HC. Purification and characterization of antifungal δ -dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. J. Food Prot., 74(4):651-657 (2011)
 31. Ryan LA, Zannini E, Dal Bello F, Pawlowska A, Koehler P, Arendt EK. *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products. Int. J. Food Microbiol., 146(3):276-283 (2011)
 32. Wang H, Yan Y, Wang J, Zhang H, Qi W. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. PloS one, 7(1):e29452 (2012)
 33. Li H, Liu L, Zhang S, Cui W, Lv J. Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. Curr. Microbiol., 65(2):156-161 (2012)
 34. Guo J, Brosnan B, Furey A, Arendt E, Murphy P, Coffey A. Antifungal activity of *Lactobacillus* against *Microsporium canis*, *Microsporium gypseum* and *Epidermophyton floccosum*. Bioengineered, 3(2):104-113 (2012)
 35. Valan Arasu M, Jung MW, Ilavenil S, Jane M, Kim DH, Lee KD, Al-Dhabi NA. Isolation and characterization of antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* KCC-10 from forage silage with potential beneficial properties. J. Appl. Microbiol., 115(5):1172-1185 (2013)
 36. Sangmanee P, Hongpattarakere T. Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and

- ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. Food Control, 40:224-233 (2014)
37. Oliveira PM, Brosnan B, Furey A, Coffey A, Zannini E, Arendt EK. Lactic acid bacteria bioprotection applied to the malting process. Part I: strain characterization and identification of antifungal compounds. Food Control, 51:433-443 (2015)
 38. Varsha KK, Devendra L, Shilpa G, Priya S, Pandey A, Nampoothiri KM. 2, 4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. Int. J. Food Microbiol., 211:44-50 (2015)
 39. Ryu EH, Yang EJ, Woo ER, Chang HC. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. Food Microbiol., 41:19-26 (2014)

제 2 장 [제1협동] 천연항균소재의 산업화 및 상품화

1. Cho M, Bae EK, Ha SD, Park J. Application of Natural Antimicrobials to Food Industry. J Agric Food Chem.. 22:5987-6000 (2009)
2. Eswaranandam S, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Antimicrobial Activity of Citric, Lactic, Malic, or Tartaric Acids and Nisin-incorporated Soy Protein Film Against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella gaminara*. J. Food Science. 69(3) (2004)
3. Dufour M, Simmonds RS, Bremer PJ. Development of a method to quantify in vitro the synergistic activity of natural antimicrobials. International Journal of Food Microbiology. 85: 249-258 (2003)
4. Kahar P, Iwata T, Hiraki J, Park EY, Okebe M. Enhancement of ϵ -polylysine production by *Streptomyces albulus* strain 410 using pH control. J. Biosci. Bioeng. 91: 190-194 (2001)
5. Kito M, Onji Y, Yoshida T, Nagasawa T. Occurrence of ϵ -poly-L-lysine-degrading enzyme in ϵ -poly-L-lysine-tolerant *Sphingobacterium multivorum* OJ10: purification and characterization. FEMS Microbiol Lett. 207: 147-151 (2002)
6. Heo CY, Cho SH. Antimicrobial Activity of Polylysine Produced by *Streptomyces* sp. J. Agriculture and Life Sci. 36(1): 47-52 (2002)
7. Choi OK, Noh YC, Hwang SY. Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed Extracts and Polylysine Mixture Against Food-borne Pathogens. Kor. J. Dietary Culture. 15(1): 9-15 (2000)
8. Ko EM, Kim BY. Antimicrobial Activity of ϵ -Polylysine Mixtures against Food-borne

제 3 장 [제2협동] 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제의 독성평가

1. 식품의약품안전처 고시 제2014-136호 (2014-07-30) “의약품등의 독성시험기준”
2. Pathology of the Fischer rat. Gary A. Boorman et al. 1990. Academic Press, Inc.
3. Histopathology of preclinical toxicity studies. Peter Greaves. 2000. ELSEVIER.
4. Covance Glossary Version 5. 2001.
5. OECD guidelines for the testing of chemicals, Section 4, TG. No. 474 ‘Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test’ (2014).
6. OECD Principles of Good Laboratory Practice, ENV/MC/CHEM (98)17 (as revised in 1997).
7. Lovell, D.P., D. Anderson, R. Albanese, G.E. Amphlett, G. Clare, R. Ferguson, M. Richold, D.G. Papworth, and J.R.K. Savage (1989): Statistical analysis on in vivo cytogenetic assays, In: Statistical evaluation of mutagenicity test data (Kirkland, D.J. ed.), Cambridge University Press, Cambridge, U.K., pp. 184-232.
8. Ishidate, M. Jr., T. Sofuni, and K.Yohsikawa, Chromosomal aberration tests in vitro as a primary screening tool for environmental mutagens and/or carcinogens, GANN Monograph on cancer Res., 27:95-107, 1981
9. Ishidate. M. Jr, Data book of chromosomal aberration test in vitro, revised edition, Life-Science Information Center, pp31-46, 1987
10. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. No. 473 ‘In Vitro Mammalian Chromosome Aberration Test’ (1997)
11. Maron, D.M. and Ames, B.N (1983) Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutation Res. 113, 173-215
12. OECD Guidelines for the testing of chemicals, Section 4, TG. No. 471 ‘Bacterial Reverse Mutation Test’

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.