최 종
연구보고서

극호염성 및 호산성 유산균의 탐색을 통한 배추의 신가공 기술 개발

New process for Chinese cabbage fermentation by screening of halophilic and acid tolerant lactobacilli

연 구 기 관

생명공학연구소

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “극호염성 및 호산성 유산균의 탐색을 통한 배추의 신가공 기술 개발"연구의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 12. .

주관연구기관명 : 생명공학연구소
총괄연구책임자 : 오 태 광 (생명공학연구소 책임연구원)
연 구 원 : 김 형 권 (생명공학연구소 선임연구원)
연 구 원 : 최 경 숙
연 구 원 : 오 병 철
연 구 원 : 김 동 현
연 구 원 : 최 원 찬
위탁연구기관명(1) : 충북대학교 수의학과
위탁연구책임자(1) : 이 완 규
위탁연구기관명(2) : 대전대학교 미생물학과
위탁연구책임자(2) : 이 찬 용
위탁연구기관명(3) : 전남대학교 식품영양학과
위탁연구책임자(3) : 전 덕 영

요 약 문

I. 제목

극호염성 및 호산성 유산균의 탐색을 통한 배추의 신가공 기술 개발

Ⅲ 연구개발의 목적 및 중요성

김치는 한국인의 식생활에 있어서 년 중 빠질 수 없는 우리 고유한 발효 식품이며, 정상 장내 세균총에 많은 영향을 미치는 중요한 식품중의 하나이다. 사람의 장관 내에는 편성 혐기성 유산균인 *Bifidobacterium*이 통성 혐기성 유산균인 *Lactobacillus, Streptococcus, Leuconostoc* 등보다 약 100-1000배 이상 많이 존재하고 있으며, 생체에 미치는 생리활성 효과 또한 매우 높다. 김치의 경우는 발효 속도 조절이 힘들어 유통기간에 문제가 있어서 상품화에 난점이 있다. 김치 발효에 관련되는 미생물은 *pediococcus, Lactobacillus, Lactococcus* 및 *Leuconostoc* 속에 대한보고는 많이 되고 있지만, 미생물 종균을 이용한 김치 제조에 응용은 김치원료 자체의 다양함과 살균된 상태로 제조할 수 없는 단점 때문에 잘 이뤄지지 못하고 있다. 배추의 가공 기술 중 김치 이외에 배추의 발효가공 기술은 국내에서는 전무한 실정이다. 외국의 경우 양배추를 절여 발효시킨 Sauerkraut, Pickles등이 보고되지만 주로 초절임 후 발효쪽 보다는 숙성에 관한 보고가 대다수여서 배추의 신가공 기술이 필요하다. 배추를 극호염성 및 극호산성 유산균을 이용한 저장성과 풍미성이 있는 배추의 신 가공기술을 개발하고 이를 대량생산하는 체계를 구축하여 배추의 공급의 탄력성 부여와 1차 가공을 통한 고부가가치화로 농가 소득을 증대시키고, 아울러 이를 통한 수출상품화 기술을 구축함을 그 목적으로 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

인체에 유용한 극호염성 및 호산성 균주를 탐색하고 발효기술을 확립하며, 김치의 신가공기술을 개발하여 산업적 생산 김치의 품질향상과 수출증대를 위하여 다음과 같은 연

구를 수행하였다.

1. 극호염성, 그리고 호산성 균주의 탐색 및 발효 연구

2. 유용균주들을 이용한 김치 발효기술 연구

3. 젖산소금의 개발 및 각개 발효 김치의 연구

4. 김치의 품질관리 기법연구

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 극호염성, 그리고 극호산성 균주의 탐색 및 발효 연구

분리 및 동정: 김치 또는 배추가공용으로 사용될 유용균주는 식품으로 널리 사용되고 있는 FDA에 식품용으로 사용가능한 미생물인 Lactobacillus 등을 사용함이 타당할 것으로 결정하였다. 먼저, 염전, 바닷가, 김치류, 젓갈류 및 바다근처 토양 200여 점에서 총 4,000여개의 미생물을 순수분리 하였으며, 검토과정을 거쳐서 최종 1개의 호염성 유산균을 선정하였고, 건강한 유아 6명과 성인 6명의 장관에서 *Streptococcus* sp. 72균주, *Lactobacillus* sp. 98균주, *Bifidobacterium* sp. 84균주들을 분리한 후 이중 가장 내산성이 높은 1개 균주를 최종 선별하였다. 형태학적, api 유산균 kit을 이용한 생화학적 분석, GC함량 및 당이용성을 조사하여 동정한 결과, 호염성 균주는 *Lactobacillus* sp. HL-48의 신규 유산균으로 밝혀져서, 대한민국 균주기탁 기관인 유전자은행에 등록하고 기탁번호 KCTC 8808P(1997.6.12)를 부여받았으며, 호산성 균주는 *Bifidobacterium longum*으로 밝혀져 *Bifidobacterium longum* BO-11로 명명하였다.

특성: 선발된 호염성 유산균은 염분농도 12%까지의 농도에서는 균체의 생육과 증식이 가능하였고, 5%의 염분의 포함시 최적생육을 나타내었으며, 안정성 조사결과 병원성과 독성이 없는 안정한 균주로 식품첨가 미생물을 사용 가능한 것으로 결정하였다. 극호산성 균주의 내산성과 내 담즙성을 검토한 결과 두 가지의 특성을 모두 가지고 있으므로, 김치에 활용시 유통에 따른 생육 및 보존될 수 있음을 알았다.

발효 및 보존: *Lactobacillus* sp. HL-48의 최적 생산 배지조건은 질소원으로 Tryptone

0.1%, 탄소원으로 sucrose 1% 이었고, Fermenter 생산조건 공기공급량 1vvm, 교반속도 200rpm에서 15시간에 7.0×10/ ml을 생산할 수 있었다. *Bifidobacterium longum* BO-11의 최적배지조성은 skim milk 8%, yeast extract 0.3%, soytone 0.3%, dextrose 3%, L-cystein Hcl 0.05%, MgSO47H2O 0.01%, Tween 80 0.1%이며, 18시간 배양후 9.7X 109의 미생물수를 얻을 수 있었다. 또한 동결건조제도 7가지에 대해서 시험한 결과, 0.01M phosphate buffer 100ml에 lactose 5g, peptone 1g, MSG 0.1%를 사용하였을 때 93.1%의 생존율을 보였다. 이러한 유용균주의 높은 균체생산율 조건은 김치 및 배추 가공시의 이용성뿐만 아니라 의약품, 화장품, 다른 식품들에 다양하게 적용이 가능할 것으로 본다.

2. 김치의 신가공 기술

김치의 기능성을 향상시킬 수 있으며 인체에 유익한 유산균주들을 김치에 직접 적용하여 발효시 종균으로 작용시키는 신발효법을 시도하였다. 더불어 김치의 다양성과 저장성, 그리고 부가가치를 향상시키기 위한 목적으로 전통적인 김치제조 방법과는 달리 절임 배추와 김치 속을 제조하여 분리 저장하면서 필요에 따라 즉석에서 기호에 맞는 김치를 제조해서 섭취할 수 있는 방법을 자체 개발하였으며, 김치의 위생성을 도모할 수 있는 젖산 소금을 개발하였다. 이 젖산 소금은 자체 상품화함으로서 향미와 맛을 증진시키는 목적으로 다른 식품에도 적용이 가능할 것으로 본다.

3. 신발효 김치의 품질관리 기법연구

김치의 가장 안정적인 보존을 위해서 여러 가지 포장재를 이용한 유용균주 이용김치의 품질과 저장성을 조사한 결과, PET-JDSF에서 저장된 절임배추의 저장성이 더 좋았고, 특히 젖산균을 첨가한 것이 더 저장성이 좋았음을 알 수 있었다. 뿐 아니라 20대 젊은층을 대상으로 관능테스트를 실시한 결과, 신제조법에 의해 제조된 김치에 있어서 품질이 우수하였다.

SUMMARY

Kimchi is a traditional fermented food necessary to our food life and important as a food which affects the bacterial growth in intestine. But, this have disadvantage, short storage period, which is caused by over-ripeness as a result from fermentation of various microorganisms. To improve this, the halophilic and acid-resistant microorganisms were isolated from human intestine with screening , characterized and used for investigation of Kimchi-fermentation technology as a starter. We conducted the development of lactic acid-salt and fermented Kimchi with Chinese cabbage and seasoning. We obtained following results;

Isolates were identified and named as halophilic *Lactobacillus* sp. HL-48 and *Bifidobacterium longum* BO-11.

1. HL-48 grew in 12 % NaCl and BO-11 was acid and bile resistant.

2. We developed the new method for Kimchi manufacture, which is to make Kimchi fit for individual favor immediately using salted Chinese cabbage and seasoning stored separately.

3. We developed the lactic acid-salt improving sanitation of Kimchi with prevention of contaminants, numerous and various microorganisms in initial step of fermentation.

4. PEP-JDSF was the most effective package material for preservation of Kimchi.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서론

김치는 우리 식탁에서 가장 중요한 부식의 하나인 독특한 맛과 향을 가진 복합발효 식품으로서 세계에서 그 유례를 찾아볼 수 없는 우리의 독창적인 식품이다. 김치는 전래의 보편적인 방법으로 만들어져 상품화되고 있으나, 살아 있는 발효식품이므로 품질을 균질화 하는데 어려움이 있고 장기간 보관이 힘든 상태이다.

김치의 발효에 관한 연구는 1960년, 1970년대, KIST, 국방과학연구소, 원자력 연구소 등지에서 김치발효에 관계되는 *Leuconostoc, Lactobacillus* 및 *Streptococcus* 속에 대한 분리 동정을 기점으로 1980년대에 미생물과 김치의 품질에 관한 연구가 많이 보고되었고, 1988년 서울 올림픽을 전후하여 식품개발 연구원에서 김치 발효조절 (1995), 김치 품질 생산을 위한 스타터 개발 (1990), 김치의 품질 균일화 연구(1991), 김치제조의 자동화 (1992), 김치의 산업화 기술(1995)이 경희대학교를 중심으로 김치제조 공정개선 및 보존성증대 (1995) 및 부산대학교에서 기능성 김치개발 (1995)등에 대해서 다양하게 연구되었다. 김치 발효에 관련되는 미생물인 *pediococcus, Lactobacillus, Lactococcus* 및 *Leuconostoc* 속에 대한보고는 많이 되고 있지만, 미생물 종균을 이용한 김치제조에 응용은 김치원료자체의 다양함과 살균된 상태로 제조할 수 없는 단점 때문에 잘 이루어지지 못하고 있다. 김치의 소비량은 연간 150만 톤으로 시장규모가 1,500억 원으로 추정하면, 소금으로 탈수 한 것을 감안하면 배추 생산량의 70%를 김치로 소비하고 있고 1차 가공시 부가가치 상승률을 감안할 때 신규 배추가공 기술이 개발되어서 상품가치를 인정받는다면 적어도, 20% 이상의 추가 수요를 창출하여 600억 이상의 국내시장을 창출 할 수 있으리라 기대한다. 배추가격이 폭락할 때나 또는 배추의 생산량이 남아 돌 때, 김치의 신기술을 이용한다면 고부가가치의 제품 생산이 가능할 뿐만 아니라 출하시간을 자유롭게 조정할 수 있어서 농가의 안정적인 배추 생산 소득원을 보장할 수 있다. 국내의 경우는 무를 이용한 장아찌, 배추를 이용한 짠지 등 고염성 식품이 많이 존재하지만 현대의 건강적인 차원에서 저염성 식품을 원하는 가공 형태

에 부합되지 못할 뿐 아니라, 상품화를 위한 체계적인 연구가 이루어지지 않아서 대단위로 실용화되지 못한 실정이다. 김치의 저장성에 관한 연구로는 염 및 염혼합물의 첨가(2-4), 보존료 첨가(5-7), 완충제 첨가(8-9), 겨자유 첨가(10), 계피유, 산초유, 호프 추출물첨가(11), 키토산 첨가(12)등이 있으나 아직 뚜렷한 보존기간의 연장방법이 확립되어 있지는 않은 실정이다.

또한, 배추의 가공 기술 중 김치의 발효 가공 기술에 대해서 약 530여건의 연구자료 및 문헌이 보고되어 있어서 어느 정도 기술적인 축적이 이루어 졌지만, 김치 이외에 배추의 발효가공기술은 국내에서는 전무한 실정이다. 배추의 생산량은 연간 2,400,000 M/T 3,700,000 M/T 정도이고 가격추이는 도매의 경우는 출하하는 달에 따라 약 3배, 소매의 경우는 약 17배의 차를 가져서 농민의 입장에서는 가격이 생산가격에 미치지 못해서 노지에 방치하는 경우가 종종 있어서 막대한 손실을 발생시키는데, 이는 배추의 가공기술이 너무 한정적이어서 새로운 기술개발로 유통구조의 개선이 필요하다. 외국의 경우는 미국의 경우 Sauerkraut, Pickles에 대한 연구보고가 있고, 일본의 경우는 절임류외 제조에 대한 연구는 많이 있지만, 배추의 고염도에서 첨가물과 함께 발효하여 만든 제품에 대한 연구는 거의 없다. 배추는 생산되는 시기가 일년 중에 주로 여름철에 편중되어 있어 계절에 따라 가격 변동이 심하고 유통 과정 중 부패에 의한 손실이 많으므로 수송과 저장에 어려움이 많다. 이러한 배추의 저장성을 높이기 위한 연구는 거의 없다(1). 이등(1)의 염지 저장에 의한 저장 간 절임 배추의 품종별 저장성에 관한보고 외에는 그 예가 전무하다.

이러한 차원들에서, 배추를 이용한 신 발효기술은 기술적으로 중요한 의미를 갖고 특히 고농도의 소금이 존재하는 데에서의 발효는 새로운 발효기법일 뿐 아니라 김치 제조시 문제시되는 미생물 종균 처리는 고농도의 소금을 첨가한 발효를 함으로써 열로 발효하지 않고서도 살균 효과를 가질 뿐 아니라 발효조절 및 품질관리가 용이해서 상품화하는 기술로 중요한 의미를 갖는다. 아울러, 발효 후 장내 미생물에 유용한 유산균인 내산성 Bifidus 등의 유산균 첨가는 생산 품질의 향상에 큰 도움이 되는 중요한 기술로 평가된다. 우리나라 전통기술을 극한 첨단 제조 방법으로 집중시켜서 고부가가치의 신규 제품의 개발함과

유통기간의 신축성으로 인한 농민 소득원의 안정화를 기할 수 있을 것이다.

제 2 장 연구개발수행 방법

제 1 절 김치에 유용한 균주의 탐색

1. 균주의 선별

극호염성균주: 시료는 우리나라 바닷가의 염전지역에서 100점의 시료와 젖갈류 50여점 및 김치류 50여점으로 총 200여점의 시료를 Fig. 1에서의 탐색순서에 의거하여 1단계로 10% NaCl이 포함된 MRS(Difco) agar 배지에 도말하여 37에서 48시간 배양하여, colony를 형성하는 균주를 무작위로 1차 선발하였다. 1차 선발된 균주를 5%의 NaCl과 0.4% CaCO3가 포함된 MRS agar 배지에 Teeth picking 하여 37에서 48시간 배양했는데, colony 주위에 투명환이 형성된 경우 1차 선발된 미생물이 산을 생성한다고 판단하여 2차 산성용 균주를 선발하였다. 이때 투명환은 $CaCO_3 + 2H^+ \rightarrow Ca(OH)_2 + CO_2$로 산이 생성되면 불투명한 CaCO3가 투명한 Ca(OH)2로 변하는 성질을 이용하였다. 2차에서 선발된 균주는 3차 형태적 관측으로 Gram staining을 한 후 현미경으로 관측하여 Gram positive 및 rod 형태의 미생물만 선발하였다. 이렇게 3차에 걸쳐서 형성된 미생물은 과산화수소수를 이용한 catalase반응에서 negative 균만 선발하였고, L-, D- Lactic dehydrogenase을 이용한 L. D. Lactic acid 생산 유무를 판단하였다.

극호산성 균주: 본 실험에서 사용한 사람의 장내세균총 검색용 배지는 TS, EG, BL의 비선택배지(Non-selective medium) 3종류와 DHL, PEES, TATAC, LBS, BS, VS, NBGT, ES, NN의 선택배지(Selective medium) 9종류, 합계 12종류의 배지를 사용하였다. 각 사용 배지의 종류, 목적, 배양 방법 및 배양 시간은 Table 1에 나타내었다.

Fig. 2.에서와 같이 건강한 유아 6명과 성인 6명 합계 12명의 신선한 분변을 채취한 후, 즉시 수송배지(transport medium)인 BHI broth에 넣어, 실험실로 수송해온 뒤 O2-free CO2 gas로 치환시킨 후, 혐기적 희석액인 Diluent B로 10 배 단계 희석을 실시하였다. 각

단계 희석액을 무균적으로 0.05ml 씩 각각의 평판배지에 1/ 3-1/ 4 구획에 접종한 후, 멸균된 Spreader로 도말한다. TS, DHL, PEES 배지는 37oC 에서 호기배양(Aerobic culture)을 실시하며, EG, BL, BS, ES, VS, NN, LBS는 Anaerobic jar에 Steel wool method를 사용하여 혐기배양 (Anaerobic culture)(37oC, 48h)을 실시하였다.

배양 종료 후, 각각의 평판배지에서 배양된 colony의 Morphology를 기입한 후, 균수를 측정하고, 백금이로 colony를 띠어 내 slide glass에 도말표본을 만들고, Gram stain을 실시하였다. *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 속 세균은 BL 배지에 순수배양 (pure culture)시켜 당분해 성상검사에 사용한다. 그 후 현미경으로 1000배에서 cell morphology를 확인한 후 분변에 존재하는 균군을 확인하였다.

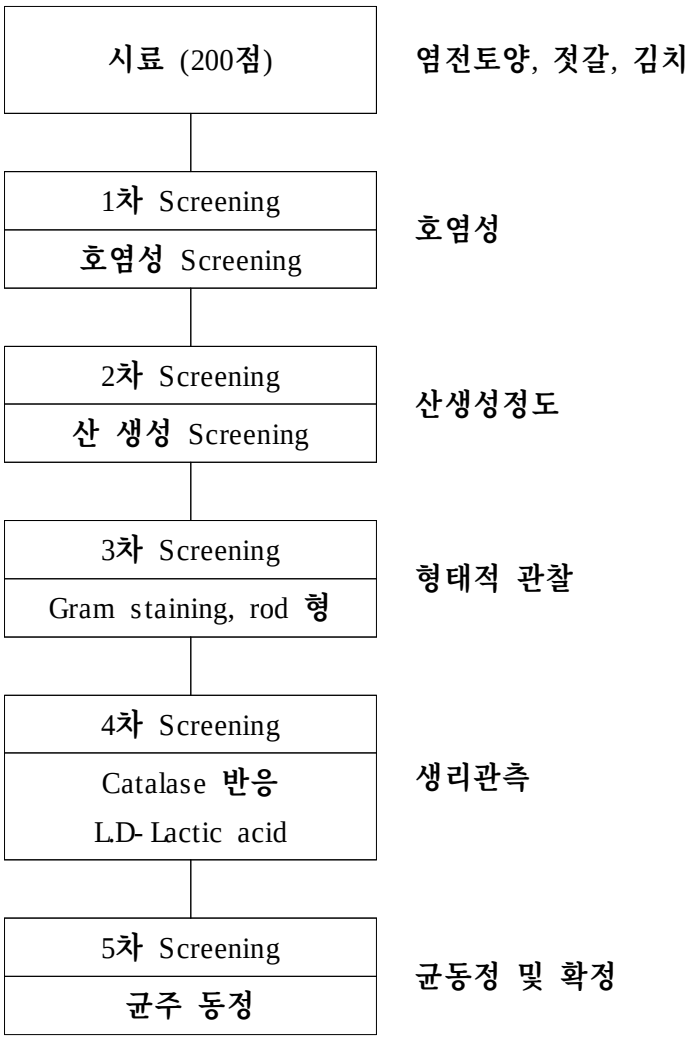


Fig. 1. **호염성 미생물의 탐색순서**

Table 1. The media and cultural method used in this study for comprehensive investigation of intestinal flora

Medium	Organisms usually enumerated	Incubation method	Incubation time(days)
Non-selective media			
EG agar	Anaerobes	Steel wool method	2
BL agar	Anaerobes	Steel wool method	2
TS agar	Aerobes	Aerobic culture	1
Selective media			
BS agar	*Bifidobacterium*	Steel wool method	2
ES agar	*Eubacterium*	Steel wool method	2
NBGT agar	Bacteroidaceae	Steel wool method	2
VS agar	Veillonella	Steel wool method	2
NN agar	*Clostridium*	Steel wool method	2
LBS agar	*Lactobacillus*	Steel wool method	2
DHL agar	Enterobacteriaceae	Aerobic culture	2
PEES agar	*Staphylococcus*	Aerobic culture	2
TATAC agar	*Streptococcus*	Aerobic culture	2

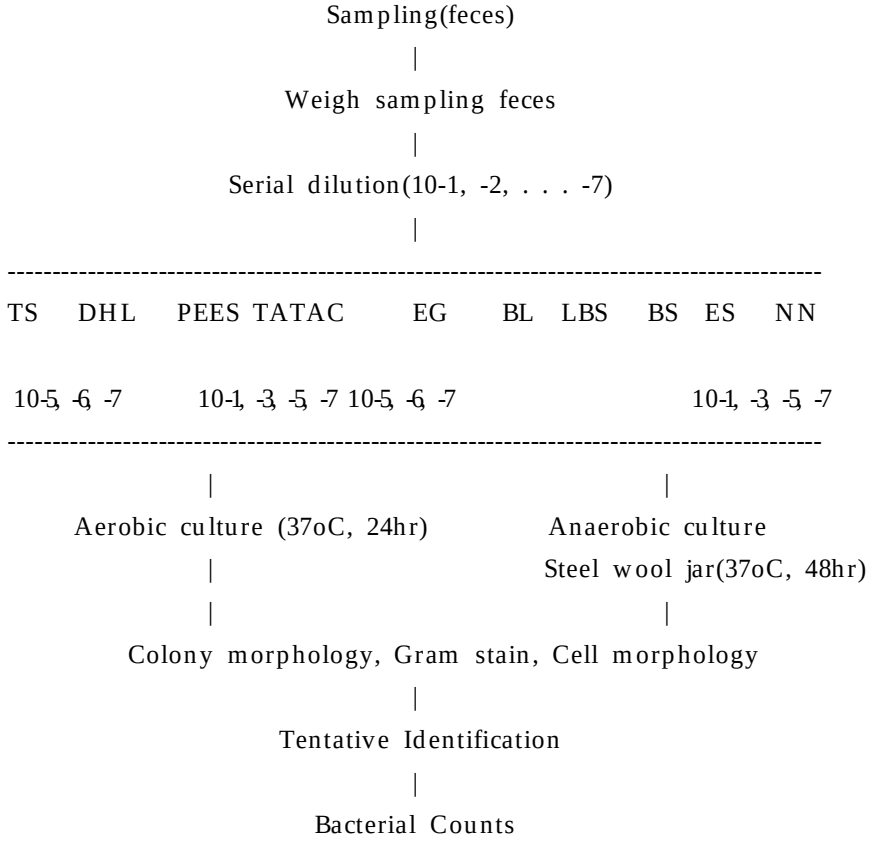


Fig. 2 Scheme for the isolation methods of the normal intestinal microflora from the feces of humans.

2. 균주의 동정

분리된 미생물은 순수배양한 후 형태적 관측과 api 유산균 kit을 이용해서 동정하였고, 동정된 결과는 Bergy's Manual을 이용하여 비교할 뿐 아니라, api의 computer data base를 이용하였다.

3. 분리된 유산균의 특성조사

분리균주의 내산성 검사는 선발된 *Streptococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium* 균주를 EGF broth에 48시간 계대 배양하여 접종균액을 제조하였다. 멸균된 Diluent A를 pH 3.0과 pH 4.0으로 조정하여 멸균 vial에 2 ml씩 분주한 후, 접종균액을 0.05 ml씩 접종한다. 37 ℃에서 3 hr 배양 후, 내산성 균주를 확인하기 위하여, 백금이로 배양균주를 BL 배지에 도말하고, 혐기배양 및 호기배양을 실시하여, Colony 형성 상태에 따라 내산성 균주로 판정하였다. 분리균주의 내담즙성 검사는 내산성 검사에서와 마찬가지로 선발된 *Streptococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium* 균주를 EGF broth에 48시간 계대 배양하여 접종균액을 제조한다. 멸균된 Diluent A에 0.15% oxgall(pH 7.0)을 첨가한 후, 멸균 vial에 2 ml씩 분주한 후, 접종균액을 0.05 ml씩 접종한다. 37 ℃에서 3 hr 배양 후, 백금이로 배양균주를 BL 배지에 도말하고, 혐기배양 및 호기배양을 실시하여, Colony 형성 상태에 따라 내담즙성 균주로 판정하였다. 선발된 미생물의 안정성시험은 *Lactobacillus* sp. HL-48과 *Bifidobacterium longum* BK11을 대상으로 실험하는데, *Bifidobacterium longum* BK-11은 이미 완전히, 동정되었고, *Bifidobacterium longum* 은 인체에 안전한 균주로 보고되어있기 때문에 균주명이 확실히 동정되지 않은 *Lactobacillus* sp. HL-48을 대상으로 시험하였다.

Lactobacillus sp. HL-48의 병원성시험에 사용한 동물은 임상적으로 건강한 마우스를 사용하였으며 병원성 시험의 경우 ICR 마우스 총 40 마 리(19.2 ± 1.5 g)를 사용하였다. 사육관리는 항온 (온도: 23 ± 2) 항습(상대습도: 55 ± 3%) 그리고 무진무균의 청정 공기가 공급되는 동물 환경 제어사육장치 (GOG Environmental Control Unit, 명진기계상사, 서울)에서 시험군에 따라 암수 각각 5마리씩 배치된 카보네이트 사육상자 (420W x 260D x 190H

mm)를 이용하여 2 주간의 순화기간을 거친 후 건강하고 피모 상태가 양호한 동물을 선별하여 시험에 사용하였다. 깔집은 칠레산 육송을 깎아 만든 실험동물 전용 깔집 (계룡엔지니어링, 대전)을 사육상자에 주 2회 교환하여 주었다. 시험군의 구성 및 투여방법은 미생물에 대한 병원성유무를 확인하기 위하여, 건강한 ICR 마우스를 10 마리씩 구성하여 대조군, 중용량군 (kg 당 107 CFU) 그리고 고용량군 (kg 당 109 CFU)으로 구분하여 군당 10 마리의 마우스를 배치하여 *Lactobacillus* sp. HL-48를 마리당 0.5ml씩 복강주사한 후 14 일 동안 관찰하였다. 급성독성시험에서의 시험군 구성 및 투여방법은 건강한 ICR 마우스를 10마리씩 구성하여 대조군, 중용량군 (kg 당 107 CFU), 고용량군 (kg 당 109CFU)으로 나누었다. 미생물을 현탁액으로 제조하여 용량에 맞게 제조한 후 0.5 ml씩 강제 경구투여를 실시하였다. 관찰 및 검사항목은 일반증상 및 치사율의 관찰, 체중 측정 그리고 각 군에서 시험시작전과 투여 후 체중의 변화를 관찰하였다. 체중 측정은 동물의 요동을 보정하여 평균체중을 측정하는 체중계인 AND Electronic Balance FA-6000 (일본)을 이용하였다. 혈액 화학적 검사는 각 군에서 시험 시작전과 시험 종료 후에 심장에서 채혈하여 Eppendorf tube에 옮겨 30분간 실온 방치한 후 5,000 rpm, 10 분간 원심분리하여 혈청을 얻어 혈액생화학적 검사의 시료로 하였다. 분리된 혈청은 deep freezer (-70'C)에 보관하였고, 측정은 Shimazu Automatic Biochemistry Analyzer (일본)를 이용하였으며, 측정항목은 AST, ALT, ALP, BUN, ALB. CREA, GLU, TBIL, TP, ALB, CPK, CA 이었으며 대조군, 저용량군과 고용량군에서 실시하였다. 마지막으로 요검사는 시험시작전과 시험 종료 후의 랫트의 복부를 마사지하여 나오는 요를 청결한 유리판에 흔적을 묻히고 이를 요검사용 스틱 (Combur 9 Test RL)을 이용하여 pH, 단백, 당, 잠혈 등을 조사하였다. NaCl에 대한 내성은 MRS broth에 NaCl이 5%, 10%, 15%가 되게 첨가한 후 시험균을 접종하고 30에서 배양하면서 균의 증식여부를 관찰하였다. 8시간 이내에 증식을 보이는 것은 positive로, 8시간 이후에 증식을 보이는 것은 weak positive로, 증식하지 못하는 것은 negative로 판정하였다.

4. 분리된 유산균주들의 발효특성

Lactobacillus sp. HL-48은 생산조건을 검토하기 위해서 영양 요구성중 탄소원에 대한 조사는 기존의 유산균 선택 배지인 MRS 배지의 조성에서 carbon source만을 뺀 c-source 기본 배지를 만든 후 test tube에 4.5ml씩 분주 한다. Glucose, Fructose, Galactose, Maltose, Sucrose, Lactose, Molasses, Cellobiose, Mannose, Trehalose. Xylose, Glycerol, Arabinose, Starch, Mannitol 등의 Carbon source들의 각각을 100mM 농도로 만들고, 이 용액을 test tube에 0.5ml씩 분주하고 24시간 액체 배양한 *Lactobacillus* sp. HL-48을 50㎕접종한다. 30 항온기에서 24시간 배양한 후 OD(600nm)에서 흡광도를 측정하였다. Nitrogen source는 carbon source 실험에서 생육도가 높게 나타난 Sucrose를 c-source 로 하여서 nitrogen source만을 뺀 n-source 기본 배지를 만든 후 100mM의 Beef extract, Bacto peptone, Casamino acid, Defated soybean, Polypeptone, Tryptone, Yeast extract, Ammonium sulfate, Ammonium phosphate, Ammonium chloride 등의 n-source에 대해서 생육도를 비교해 보았다. Mineral source는 황산마그네슘, 연화 마그네슘, 염화 망가네이트, 황산 망가네이트, 황산 아연, 염화 아연, 황산구리, 염화구리, 황산 철, 황산칼슘, 염화칼슘, 탄산칼슘, 염화알루미늄, 염화코발트, 염화 스트론튬 등의 m-source에 대해서 상기와 같은 방법으로 알아보았다. 내산성 *Bifidobacteria* 의 최적 생산조건을 검토하기 위해서 기본배지에 단백질원을 달리한 7가지의 배지, 기본배지에 효소를 처리한 5가지의 배지조성으로 총 12가지의 배지조성을 제조하여 시험하였다.

제 2 절. 김치의 신가공 기술

1. 김치의 품질개선을 위한 젖산소금개발

천일염으로 15% 염농도가 되도록 맞추어진 소금물에 젖산을 0.5 ㎖첨가한 후 잘 희석하여 실온과 30, 55의 온도에서 방치하거나 가열을 하여서 소금의 재 결정화를 관찰 해 보았으며, 재결정화 전과 후의 pH의 변화는 pH meter (Fisher Scientific AccumetR pH Meter 915)를 이용해서 조사하였다. 일반소금과 젖산 소금의 차이를 비교하고, 더 넓은 범위로의

젖산소금의 사용 가능성을 검토하기 위해서 관능 요원 12명을 대상으로 관능 실험을 수행하였다.

2. 김치의 신 절임조건

배추내 미생물수와 최적절임조건을 검토하기 위해서 배추는 크게 잎부분(UP)과 줄기부분(LP)으로 이등분하였으며, UP, LP 및 UP+LP 각각에 대해서 젖산소금으로 절임액의 및 염농도(5-25%)를 달리하여 절인 후 배추내의 염분농도, pH를 조사하였고, MRS, DHL 배지를 이용하여 미생물수의 변화를 알아보았다. 또한 젖산소금으로 절여진 배추의 관능성을 조사하기 위해서 먼저 절임액의 pH가 2.5가 되도록 젖산을 첨가한 후, 대조구의 절임액과 함께 일정량의 배추를 상온에서 5시간 절여서 배추의 맛, 텍스쳐, 그리고 전체적인 기호도를 평가하였다. 관능검사 요원의 구성은 본 실험에 흥미를 가지고 있으며 배추의 맛에 식별 능력이 있는 연구원 중 12명의 관능검사 요원을 선정하였다. 이들로 하여금 김치의 맛, 텍스쳐의 관능적 품질을 향미 묘사법에 의하여 묘사케 하였다. 향미 묘사법 (flavor profile method)에 의하여 선정된 묘사는 신맛 (acidic taste), 짠맛 (salt taste), 생배추맛 (fresh cabbage taste)과 질김 (chewiness), 부서짐성 (crispness)의 텍스쳐 등의 5가지 관능품질 묘사와 전체적 기호도 (overall eating quality)를 조사하였다. 관능테스트를 위해서 사용된 전단지는 Table 2.에서 보여주고 있다.

Table. 2. **젖산소금으로 절인 배추의 관능실험을 위해 사용되어진 전단지**

관능 테스트

성별 : **남, 여**
나이 :_____
일시 : 1999**년 월 일**
김치 제조를 위한 배추의 절임시 젖산 처리한 실험구 배추와 처리 안 한 대조구 배추에 있어서 맛의 차이를 알아보기 위한 3**점 만점의** scoring test **입니다**.

항 목	A	B
1. **신내** (acidic taste)		
2. **생배추맛** (fresh cabbage taste)		
3. **짠맛** (salt taste)		
4. **사각사각** (crispness)		
5. **질김** (chewiness)		
6. **군덕맛** (yeast moldy taste)		
7. overall earing quality		
8. Comments		

3. 김치의 호염성균주 적용연구

김치제조는 배추를 젖산과 소금으로 염분농도 15%, pH 2.5가 되게 한 젖산 제조하여 25 에서 4시간 절인 배추를 85%로 하고 여기에 새우젓 1%, 고춧가루 3.5%, 마늘 1.5%, 파 2%, 생강 0.5%, 무체 6%, 실시 예 4.에서 제조된 발명의 유산균 0.5%를 넣고서 김치를 제조하였고, 대조구로서 젖산을 포함하지 않고, 유산균 제제를 포함하지 않은 통상적인 김치 제조방법을 사용하여 25에서 김치발효를 시키면서 시료를 채취해서 분석하였다.

4. 김치의 호산성균주 적용연구

김치내의 생존능력: 생김치의 김치 적용 특성 조사를 위한 Bifidobacterium 최종 선발 균주의 접종 균액은 *Bifidobacterium longum* BK-11 균주를 MRS broth 9㎖ 접종하여, 37 에서 24시간, steel wool method를 이용한 혐기배양을 실시하여 본 실험의 접종균액으로 사용하였다. 용액상태에서 시험하기 위해서 김치용액을 제조하였는데, 김치용액은 신선한 김치 500g을 시중에서 구입하여 실험실로 신속하게 운반하였다. 분쇄기(mixer)를 이용하여 김치를 잘게 분쇄한 후, 멸균거즈로 고형분을 제거하고, 그 여과액을 1500 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 그 후 상층액을 여과지 (filter paper)를 통하여 4개의 test tube에 30 ㎖ 분주하고, 각각 pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0으로 조정한 후, membrane filter(0.45㎛pore size)로 여과 멸균하여 6㎖ 각각 멸균된 test tube에 분주하여 본 실험의 김치 용액으로 사용하였다. pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0으로 여과 멸균된 각각 4개의 김치 용액에 Bifidobacterium (4.8×109 cfu/ MRS broth 1㎖접종액을 0.3㎖ 접종하였으며, 1개의 김치 용액은 대조구로 사용하였다. 접종 후, 각 2개씩 4와 25에서 보관하면서 1일째, 3일째, 5일째, 7일째의 Bifidobacterium의 생존균수를 측정하기 위하여 비선택배지 (non-selective medium)인 BL 배지를 사용하였다. 김치 용액 0.1ml을 정량하여 멸균한 9.9ml diluent A를 사용하여 100 배 단계 희석하여 100, -2, -4, -6으로 BL 배지에 0.05㎖ 도말하였으며, 37 48시간 steel wool method를 이용한 혐기 배양을 실시하였다. 배양 후, colony의 숫자를 계측하고, 희석 배율을 환산하여 생존균수를 계산하였다.

비피도박테리아를 이용한 김치의 제조 및 평가 :건강한 성인의 분변에서 분리한 내산성의 *Bifidobacterium longum*을 김치 제조용 스타터로 이용하여 그 생존 능력과 김치 발효에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

가. 미생물

*Bifidobacterium longum*은 생명공학연구소 오태광 박사로부터 동결건조된 상태의 것을 제공받아 사용하였다. 선행 연구에서 선발된 내산성 *Bifidobacterium longum*을 0.05% cysteine이 첨가된 MRS broth에 seed 접종하여 37에서 48시간 배양한 후 원심분리하고 (7,000rpm, 40min) 균체를 생리식염수로 세척한 후 김치 제조에 사용하였다.

나. 비피도박테리아 첨가 김치의 제조

김치 제조법: 김치제조용 재료로는 배추(100g), 무(10g), 파(2g), 생강(0.6g), 마늘(1.4g), 마른 고추(2g), 고춧가루(1g), 까나리 액젓(2g), 새우젓(1g), 배(1.5g), 양파(1.5g), 찹쌀풀(0.5g), 설탕(0.5g), MSG(0.3g)를 사용하였다. 먼저 배추를 일정한 크기로 잘라서 오염된 미생물의 수를 줄이기 위하여 선행 연구에서 확립한 젖산-소금법(0.25% 젖산 +15% 소금)을 이용하여 15 에서 3시간 동안 배추를 절였다.

균주 혼합: 양념을 만들어 절인 배추와 함께 배추김치를 담갔다. 비피도박테리아는 김치를 담그기 직전에 양념에 첨가하였으며 균수를 10⁶/ g이 되도록 하였다. 대조 실험군은 김치에 비피도박테리움을 첨가하지 않은 상태로 제조하였다. 김치는 4±1에서 발효하였으며 이것을 5일 간격으로 시료를 취하였다.

다. 김치즙의 제조

위와 동일한 방법으로 김치를 제조한 후, 분쇄기로 마쇄하여 4겹 거즈로 즙을 냈다. 즙을 centrifugation(7,000rpm, 1hr)하고 ultracentrifugation(30,000rpm, 2hr)하여 제조하였다.

라. 발효과정 중 미생물 수의 측정

시료의 제조: 김치 100g을 멸균된 blender에 넣어 3분간 마쇄하고 멸균된 거즈를 이용하여 김치즙을 얻었다. 모든 과정들은 무균상자내에서 실시되었다. 발효과정중 미생물의 계수를 위한 배지로는 총생균수- Plate count agar; 효모- YM agar, 젖산균(*Lactobacillus sp.*): modified LBS agar, *Leuconostoc* sp- PES agar; 대장균- DHL agar를 사용하여 배지에 도말한 후 30에서 호기 배양하였다. 비피도박테리아의 숫자를 정확하게 계수하기 위하여 2가지 방법을 검토하였다. 즉, 김치즙 1ml을 채취하여 혐기성 희석액으로 순차적으로 희석하고 Blood-BL배지에 도말한 후, Anaerobic jar(BBL 社)에서 48시간 배양하였다. 김치즙내에 존재하고 있는 *Bifidobacterium*을 정량화하기 위해 Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) assay를 사용하였다.

총균수: 총균수를 측정에는 plate count agar(PCA, Difco Lab. U. S. A.; Bacto tryptone 5g, Bacto yeast extract 2.5g, Bacto dextrose 1g, Bacto agar 15g, 증류수 1,000ml, pH 7.0)를 사용하였다.

***Lactobacillus* spp.**: LBS(BBL Co. U.S.A.)배지를 개량한 m-LBS배지(Pancreatic digest of casein 10.0g, Yeast extract 5.0g, Dextrose 20.0g, KH_2PO_4 6.0g, Ammonium citrate 2.0g, Polysorbate 80 1.0g, Sodium acetate hydrate 25.0g, $MgSO_4 7H_2O$ 0.575g, $MnSO_4$ 0.12g, $FeSO_4 7H_2O$ 0.034g, Acetic acid 2.5ml, Bacto agar 15g, 증류수 1000ml)를 사용하였다.

***Leuconostoc* spp.:** Phenylethyl alcohol sucrose(PES, Bacto peptone 5.0 g , yeast extract 0.5 g, sucrose 20.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, $MgSO_4 7H_2O$ 0.5 g, KH_2PO_4 1.0g, agar 15g, phenylethyl alcohol 2.5ml, 증류수 1,000ml, pH 6.8) 배지를 사용하였다.

효모: 효모계수를 위한 배지는 YM agar(Difco Co. U.S.A.)배지를 개량한 m-YM 배지(modified YM agar ; Bacto yeast extract 3g, Bacto malt extract 3g, Bacto peptone 5g, Glucose 20g, Bacto agar 15g, Chloramphenical 100mg, 증류수 1,000ml)를 사용하였다.

***Bifidobacterium* :**

1) 평판 계수법

Bifidobacterium 계수를 위한 배지는 BL(glucose-blood-liver) 배지(Bacto beef extract 2.4g,

Bacto proteose peptone No.3 10g, Bacto tryptone 5g, Bacto soytone 3g, Bacto yeast extract 5g, Liver extract 3.2g, Dextrose 5g, Lactose 5g, Soluble starch 0.5g, Potassium phosphate monobasic 1g, Potassium phosphate dibasic 1g, Magnesium sulfate 0.2g, Ferrous sulfate 0.01g, Sodium chloride 0.01g, Manganese sulfate 0.007g, Antifoam A 0.2g, Polysorbate 80 1g, L-Cysteine hydrochloride 0.5g, Agar 15g, Distilled water 1,000ml)를 사용하였다.

2) F6PPK assay of *Bifidobacterium* cells

김치 시료를 Centrifugation(12,000rpm, 5min)한다. pellet을 0.05M phosphate buffer로 재현탁하여 세척(2회) buffer를 첨가하고 sonication한 후 NaF, K iodoacetate soln, fructose-6-phosphate를 첨가하여 37에서 30분간 반응을 시킨다. Hydroxylamine HCl(pH6.5)을 첨가하고 10분 정치하였다가 15% TCA, 4M HCl 첨가한다. 잠시 후 5% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 첨가하고 자줏빛 변색을 확인한다.

마. 발효과정 중 김치의 이화학적 검사

pH : 시료액의 pH는 pH meter(Jenco Electronics LTD Model 1671)를 이용하여 측정하였다.

환원당: 환원당 함량은 시료액을 4, 10,000rpm에서 10분간 고속 원심분리한 다음 DNS법을 이용하여 정량하였다. 20배 희석한 100㎕ 시료액과 200㎕ DNS 시약(Dinitrosalicylic acid ; NaOH 14g, DNS 7.5g, Potassium sodium tartrate 216g, Phenol 5.4ml, Sodium pyrosulfite 5.9g, 증류수 1,000ml)을 혼합한 후 끓는 물에서 5분간 가열하였다. 가열 후 바로 냉각하여 반응액 100㎕에 증류수 1,000㎕를 첨가한 뒤 200㎕를 취해 562nm 에서 흡광도를 측정하였다. 이 측정치들은 glucose 표준곡선에 적용하여glucose의 양으로 계산하고 이를 김치에 대해 환원당 함량(mg/ml)으로 나타내었다.

비타민 C: 비타민 C 함량은 시료액을 4, 14,000rpm에서 10분간 고속 원심분리한 후 DNP법으로 측정하였다. 시료액 200㎕에 5% metaphosphoric acid 용액을 1,800㎕첨가하여 추출하

고 추출액 2ml에 DCP(2,6-dichlorophenolindophenol)용액 1ml을 첨가하여 혼합한 후 약 1분간 방치해서 용액에 pink색이 잔존하는가를 확인했다. 여기에 thiourea metaphosphoric acid 용액을 2ml 첨가하여 pink색이 없어지면, DNP (2,4-dinitro phenylhydrazine)용액을 1ml 첨가하여 60의 수욕에서 90분간 방치한다. 반응이 끝나면 즉시 얼음물에 넣어, 진탕 혼합시키면서 85% H_2SO_4용액 5ml을 서서히 가하여 혼합시킨다. 얼음물로부터 꺼내어 실온에서 30분간 방치한 후 반응액 400㎚ 파장 562nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 비타민 C는 L-ascorbic acid (Sigma. Co.)를 사용하였다.

Acetic acid와 Lactic acid 생성량 조사 : 시료의 전처리는 시료 1ml를 증류수로 전체 10ml가 되도록 10배 희석한 후 1분간 vortexing을 실시하였다. 처리된 시료는 원심분리(12,000rpm, 1hr)하여 상층액만을 회수하고 0.45 ㎛멸균된 주사기와 C18 SEP-PAK cartridge(Millipore Co.)로 여과 후 사용하였다. 시료를 HPLC(Column : Aminex HPX-87H(300mm×7.8mm, Bio-Rad, Mobile phase : 4mM Sulfuric acid, Flow rate : 0.6㎖/min, Detector : UV detector at 206nm, Detector Temperature : 37)로 분석하여 acetic acid와 lactic acid의 생성량을 조사하였다.

바. 김치의 관능검사

김치 발효 후의 관능검사를 위해서 전남대학교 식품영양학과 대학원생 10명을 대상으로 발효된 김치의 향, 맛, 전체적인 기호도에 대해 9점 평가법으로 조사하였다.

5. 김치의 신발효법 개발

가. 젖산을 이용한 배추의 단독발효법 개발

배추의 발효는 발효액에 포기배추를 완전히 침지시켜 20 발효조에서 발효하는 방법으로 하였다. 발효액의 염과 젖산의 적합한 조건을 찾기 위해서 염농도는 정제된 염을 사용해서 0%15%로 염농도를 변화시키며 반복실험을 하였고, pH는 젖산을 첨가하여 발효액의 pH를 젖산을 사용해서 24.5로 변화시키며 반복실험 하였다. 최적 조건의 결정은 대장균과

유산균 그리고 총균수의 변화 양상과 pH, 염농도의 변화, 유기산 등을 조사하였다. 더불어 발효 시에 배추 색의 변화를 관찰하였다. 이러한 조사는 균주의 증식을 지연 시킬 수 있는 pH 2와, 5% 염농도로 맞춘 발효액을 실험군으로 5% 고염만을 첨가한 발효액을 대조군으로 하였다. 전통적인 김치제조법과는 달리 배추의 절임 저장과 함께 김치 속을 분리하여 발효 저장한 후에 소비 직전에 두 가지를 혼합하여 제조하는 변형된 김치의 저장법의 가능성을 위해서, 젖산균과 염, 젖산을 이용한 저장배추의 기호도를 조사하였다. 이를 위해서 먼저 저장기간에 따른 맛 , 색깔, 냄새 등의 변화를 관능검사를 통하여 2회 측정하였으며, hedonic scale 에 따라 측정에 참여한 관능검사요원의 기호도를 1(매우 싫음)에서부터 5(매우 좋음)까지 다섯 단계로 나누어 측정하여 측정된 값의 평균값으로 표시하였다.

나. 배추단독발효시 균주적용연구

Lactic acid를 사용하여 pH를 4.0 으로 조정하였으며 젖산균의 생육을 위해 glucose를 0.5%, 그리고 potassium phosphate를 0.01%첨가하였다. 젖산균의 접종은 미리 배양된 Lactobacillus sp. HL-48 항미생물질 생성 균주 BK-11 균주를 혈구계수기를 사용하여 균주의 농도를 측정한 다음 살균된 생리식염수로 세척하여 105/ ml 로 접종하였다. 장내세균의 수는 DHL 한천배지(Eiken Chemicals, Tokyo)에 희석 도말하여 생균수를 측정하였으며, 젖산균의 균수 측정은 Lactobacilli 한천배지 (Difco, Detroit)를 사용하여 생균수를 측정하였다. 이때 배양은 37 에서 48시간 동안 배양하였다. 모든 실험에서 대조구는 젖산균과 젖산의 첨가 없이 소금용액으로만 절인 배추로 하여 각각의 실험과 같은 온도로 저장하면서 비교하였다.

재료 및 시약: 배추는 품종을 가리지 않고 시장에서 구입하여 사용하였으며, 배추의 절임은 시판 천일염과 식용젖산, 분리된 젖산균을 목적에 맞게 첨가량을 달리하여 시행하였다. 세로로 절단한 배추 150 g을 용량 2 짜리 플라스틱 용기에 넣고, 여기에 5% 소금용액 500 ㎖ 가하여 염장하였으며 사용된 식용 Lactic acid는 PURACR 사의 제품을 사용하였다.

사용균주: 생명공학연구소 응용미생물그룹에서 분리한 극호산성 호염성 *Lactobacillus*

sp. HL-48 균주와 본 연구실에서 분리한 항미생물질 생성균주 BA-8균주를 사용하였다. 두 균주는 모두 10%의 소금농도에서도 잘 생육하는 호염성 균주이다. 균주들은 MRS 한천배지(Difco)에 접종하여 37 에서 2일간 배양하여 사용하였으며 보관은 vial에 넣어 -20 에서 보존제와 함께 냉동 보관하였다.

pH 의 조정과 젖산균의 접종: Lactic acid를 사용하여 pH를 4.0 으로 조정하였으며 젖산균의 생육을 위해 glucose를 0.5%, 그리고 potassium phosphate를 0.01%첨가하였다. 젖산균의 접종은 미리 배양된 *Lactobacillus* sp. HL-48 항미생물질 생성 균주 BA-8 균주를 혈구계수기를 사용하여 균주의 농도를 측정한 다음 살균된 생리식염수로 세척하여 10/ 로 접종하였다.

장내세균수 및 젖산균의 균수측정: 젖산 소금 절임 배추의 저장성을 판단하기 위하여 장내세균의 수는 DHL 한천배지 (Eiken Chemicals, Tokyo)에 희석 도말하여 생균수를 측정하였으며, 젖산균의 균수측정은 Lactobacilli 한천배지(Difco, Detroit)를 사용하여 생균수를 측정하였다. 이때 배양은 37 에서 48시간 동안 배양하였다. 모든 실험에서 대조구는 젖산균과 젖산의 첨가 없이 소금용액으로만 절인 배추로 하여 각각의 실험과 같은 온도로 저장하면서 비교하였다.

관능검사: 저장배추의 기호도 조사를 위하여 저장기간에 따른 맛, 색깔, 냄새 등의 변화를 관능검사를 통하여 2회 측정하였으며 hedonic scale 에 따라 측정에 참여한 10 명의 관능검사요원의 기호도를 1(매우 싫음)에서부터 5(매우 좋음)까지 다섯 단계로 나누어 측정하여 측정된 값의 평균값으로 표시하였다.

맛, 풍미, 색깔의 변화: 저장온도 20에서 식용젖산을 첨가하여 초기 pH를 4로 조정하여 *Lactobacillus* sp. HL-48 균주와 본 연구실에서 분리한 항미생물성 물질의 생성균주 BA-8 균주와 젖산균을 접종하지 않은 대조구에서의 저장기간에 따른 맛, 향미, 색깔의 변화를 관능검사를 하여 hedonic scale에 의한 5점 채점법으로 2 회 측정하였다. 배추의 발효는 발효액에 완전히 침지시켜서 20 로 맞추어진 B.O.D INCUBATOR(VISION SCIENTIFIC VS-1203P5N)에서 방치하면서 수행하였다. 발효액의 염농도와 pH의 적합한 조건을 찾기

위해서 염농도는 정제된 염을 사용해서 0%15%로 염농도를 변화시키며 반복해서 배추발효 실험을 하였고, pH는 젖산을 첨가하여 발효액의 pH를 24.5로 변화시키며 반복해서 발효 실험을 하였다. 균주의 증식을 지연시킬 수 있는 pH 2와, 5% 염농도로 맞춘 발효 액을 실험구로하고, 5% 염만을 첨가한 발효 액을 대조구로 하였다. 실험구 발효액은 1.5 용량의 용기를 여러 개 준비한 후 정제염으로 염농도 5%, 젖산으로 pH 2 로 맞추어 1 를 채우고, 배추 잎은 겉과 속의 배추 잎을 골고루 분배하여서 같은 양으로 각각의 발효액에 침지시킨 후 물을 채운 플라스틱 멸균콘으로 누름돌을 대신하였다. 대조구는 발효액에 젖산은 첨가하지 않고 염농도만을 조정한 것으로 하였다. 균수의 변화와 pH, 염농도의 변화, 유기산 분석 실험 시료는 배추를 발효시키면서 2시간 간격마다 하나의 발효용기에 배추를 모두 수거하여 깨끗한 물로 한번 세척하여 배추표면의 물기를 제거하고, warring blander로 2분간 마쇄 한 후 여과하여 얻은 배추즙액을 사용하였다. 최적 조건의 결정은 대장균과 유산균 그리고 총균수의 변화 양상과 pH, 염농도의 변화, 유기산 등을 조사함으로서 판단하였다. 더불어 발효 시에 배추 색의 변화를 Colorimeter (SPECTRO COLORIMETER JS555, TOKYO JAPAN)를 이용해서 관찰하였다.

다. 부원료의 단독발효연구

부원료들의 영향검토: 각기 다른 사람들의 기호성을 고려해서 새로 고안한 배추와 부원료의 각개발효 기법 연구에 있어서 김치 맛에 큰 영향을 주면서 다각도적인 연구의 수행 가능성이 많은 김치의 부원료에 대한 실험을 수행하였다. 김치 양념에 있어서 각각의 부원료가 미치는 영향을 알아보기 위해서 대조구와 실험구로 나누어 비교 검토하였으며, 기본 부재료는 무채와 고춧가루, 마늘, 생강으로 하고 여기에 아무것도 첨가하지 않은 것을 대조구로 보았다. Table 3 에서의 비율로 기본 부재료(S1)에 염을 첨가한 것(S2), 새우젓을 첨가한 것(S3), 당을 첨가한 것(S4), 스타터로서 Lactobacillus를 첨가한 것(S5) 이렇게 대조구 외에 네 가지의 실험구를 각기 일정한 온도에서 발효시키면서 균주 변화와 pH, 산도, 유기산 변화 등에 대해서 조사하였다. 발효는 100g의 양념을 비닐 팩으로 두 번 밀봉하여 다시

유리 팩에 넣어 25에서 발효시켰다. 일정한 시간 간격으로 각각의 양념을 두 겹의 멸균된 거즈로 즙을 짠 후에 그 즙액의 1㎖를 3차 증류수 9㎖로 희석하여 pH와 산도를 측정, 다시 단계적으로 희석하여 총균수 계수배지(TS medium)와 젖산균 분리용 배지(MRS medium), 대장균 분리용 배지(DHL medium)에 pouring culture method로 접종하여 균수의 변화를 살펴보았다.

유기산 변화는 HPLC 분석으로 조사하였으며, 분석조건은 Table 4 와 같다. 전처리는 solid phase extraction cartridge로 처리하여 양념의 색소를 제거한 후 0.2 ㎛pore disc-type filter로 여과하여 분석 시료로 사용하였다.

젖산첨가 농도 결정: 고춧가루 2%와 무채 10% 그리고 마늘 2%, 생강 1%, 소금 1%를 일정량 혼합한 양념을 대조구로 하고, lactic acid를 0, 0.4, 0.6, 0.8%씩 각각 첨가한 양념을 실험구로 하였다. 네 가지의 실험구를 20 항온실에서 발효 시키면서 균주 변화와 pH, 그리고 색의 변화 등에 대해서 조사하였다. 양념의 발효는 100g의 양념을 비닐 팩으로 두 번 밀봉하여 다시 유리 팩에 넣어 20에서 발효시켰다. 실험에 사용한 시료는 일정한 시간 간격으로 각각의 양념을 두 겹의 멸균된 거즈로 즙을 짠 후 그 즙액을 사용하였다. 시료 1 ml을 3차 증류수 9 ml로 희석하여 pH를 측정하였으며, 시료를 단계적으로 희석하여 젖산균 분리용 배지(MRS medium)에 pouring culture method로 접종하여 균주 변화를 살펴보았다. 색도의 비교는 Spectro colorimeter(color JS555, Japan)를 이용해서 측정하였다.

Table 3. Composition of Kimchi-seasoning

Materials	S* 1	S2	S3	S4	S5
Radish	10**	10	10	10	10
Red pepper powder	2	2	2	2	2
Garlic	2	2	2	2	2
Ginger	1	1	1	1	1
NaCl	-	1	-	-	-
S. shrimp***	-	-	1	-	-
sugar	-	-	-	1	-
Starter	-	-	-	-	0.5

* : Seasoning

** : Ratio (%)

*** : 새우 젖

Table 4. Conditions of liquid chromatography for organic acid analysis.

Instrument	Waters 501 HPLC Pump
	Waters 486 HPLC Detector
Column	Supelco TM C-610 column
	30 cm × 7.8 mm ID
Mobile phase	0.1% phosphoric acid
Flow rate	0.5 ml/ min.
Detector	Ultraviolet 210 nm
Injection volume	20 microliter

제 3 절. 김치의 품질관리 기법연구

1. 포장 방법에 따른 균주적용 발효배추의 저장성연구

시약 및 포장재: 실험에 사용된 배추는 품종을 가리지 않고 시장에서 구입하였으며, 배추의 절임은 시판 천일염과 식용젖산으로 하였으며 분리된 젖산균은 목적에 맞게 10⁶-10⁸/로 첨가하였다. 세로로 배추를 절단하고 각 150g의 배추에 5%소금용액을 150을 가하여 염장하고 식용 Lactic acid는 PURAC사의 제품 (Japan)을 사용하였다. 높은 염농도에 의한 저장성이 연장되는 것을 피하고 포장재에 의한 영향을 살펴보기 위해 5%로 하였다. 포장재는 일반시중에서 흔히 구입할 수 있으며 레토르트 파우치로서 주로 한약재 봉지로 사용되는 PET+JDSF와 시중에서 일반 소비자들이 간편하게 사용할 수 있는 포장재인 HDPE(high density polyethylene) 그리고 LDPE(low density polyethylene 의 세 종류의 포장재들을 사용하였다.

균주: 사용된 균주는 생명공학연구소에서 분리한 극호산성, 호염성 *Lactobacillus* sp. HL-48 균주를 사용하였다. *Lactobacillus* sp. HL-48은 glucose의 분해능력이 뛰어난 Gram양성의 간균이다. 이 균주는 10% 소금농도에서 잘 생육하는 호염성 균주이며 MRS 한천배지 (Difco)에 접종하여 30에서 2일간 배양하여 사용하였다. 보관은 vial에 넣어 -20에서 냉동보관을 하였다.

pH조정과 젖산균의 접종: Lactic acid를 사용하여 pH를 4.0으로 조정을 하고 젖산균의 생육을 위해서 potassium phosphate (K_2HPO_4 : ATP생성)를 0.01% 첨가하였다. 미리 배양된 *Lactobacillus* sp. HL-48의 균주의 농도를 혈구계수기 (hemocytometer)로 측정하고 살균된 생리식염수로 세척하여 실험목적에 맞게 10⁶-10⁸으로 접종하였다. 초기 pH를 4.0 이하로 낮추지 않은 이유는 김치의 pH가 4.0 이하가 되면 먹을 수 없을 정도로 기호도가 떨어진다고 알려져 있기 때문이다.

생균수의 측정과 사용배지조성: 젖산균의 생균수 측정을 위해서는 멸균 생리식염수를 사용하여 알맞게 희석한 후에 Table 5의 MRS 한천 배지에 도말하여 30에서 배양을 하였

고, 장내세균 (*E. coli*)의 생균수 측정을 위해서는 DHL 배지 (Eiken Chemical Tokyo) 를 사용하여 37에서 배양을 하였다. 살균된 0.85% 생리식염수를 이용해서 세척을 한 후 10-1, 10-2, 10-3, 10-4, 10-5, 10-6, 10-7으로 희석하여 접종 배양을 하였다.

발효온도와 포장: 대부분의 식품의 저장성은 저장온도가 낮을수록 저장에 좋지만 이 실험의 성격상 너무 낮은 온도에서 실험을 할 경우 이 실험의 목적인 포장재의 효과 때문이 아니고 단순히 저장온도에 의한 저장기간이 길어지므로 저장온도는 20로 하였다. 모두 다 20에서 발효를 하게 되고 김치통에서 3일 동안 발효시킨 후 종이 타월로 물기를 닦아내고 레토르트 파우치로서 주로 한약재 봉지로 사용되는 PET+JDSF와 시중에서 일반 소비자들이 간편하게 사용할 수 있는 포장재인 HDPE (high density polyethylene) 그리고 LDPE (low density polyethylene 의 세 종류의 포장재를 사용하여 포장을 하였으며 저장온도는 20로 하였다. 그리고 10일 동안 하루간격으로 시료를 채취하여 젖산균과 장내세균의 수, pH, 염도, 기호도(맛, 색깔, 냄새)를 측정하였다. 대조구는 젖산균을 첨가하여 3일 동안 발효시킨 후 물기를 닦아내고 김치통에 넣은 것과 젖산균은 첨가하지 않고 물기를 닦아낸 다음 포장재에 넣은 것을 같은 온도로 저장하면서 비교하였다.

염도측정 및 조직감 분석: 염도는 시판 염도계 (SEKISUI SS-31A, japan)를 구입하여 사용하였고, 배추조직에 염도계를 꽂아 측정한 것과 절여져 있는 상태의 배추를 homogenizer로 분쇄하여 염도를 측정한 것을 모두 표시하였다. 저장 중의 배추조직의 여러 가지 특성의 변화를 측정하기 위하여 TAXTei texture analyzer (MHK trading co, England)를 사용하였으며 그 중 조직의 경도 (hardness)만 표시하였다. 포장된 저장배추의 사진은 폴라로이드카메라를 사용하여 자연광하에서 촬영하였다.

Table 5. MRS 배지와 DHL 배지의 조성

M R S 배지		D H L 배지	
Bacto Proteose Peptone No.3	10g	Bacto Beef Extract	3g
Bacto Beef Extract	10g	Peptone	20g
Bacto Yeast Extrat	5g	Lactose	10g
Tween80	1g	Glucose	10g
Ammonium Citrate	2g	Bile Salt(No.2)	1g
Sodium Acetate	5g	Sodium thiosulfate	2.2g
Magnesium Sulfate	0.1g	Feric ammonium citrate	1g
Manganese Sulfate	0.05g	Sodium citrate	1g
Dipotassium Phosphate	2g	Neutral red (pH indicator)	0.03g
agar	1.5g	agar	15g

2. 단독 발효배추의 관능테스트

배추단독 발효시의 관능테스트에 이어 다양한 김치 제조법에 의한 김치(Table 8)들에 대한 최종 평가로서 발효배추와 마찬가지로 관능테스트를 실시하였다. 김치시료의 제조방법은 Table 8에서와 마찬가지로 배추는 절임배추와 발효배추로 나누고, 양념은 발효 된 것과 안 된 것으로 나누어서 이전 년도에서 조사결과 확인된 배추절임과 발효시의 염농도, 시간, 젖산 첨가량, 그리고 양념발효 시간, 젖산함유량 등의 최적처리 조건에 따라 처리를 하여 최종적으로 배추와 양념을 Table 8의 조합에 따라 혼합하여 제조하였다. 관능테스트시의 평가항목은 향미 (flavor), 맛 (taste), 조직감 (texture), 전체 기호도 (overall acceptability) 4가지 항목이며, 5점 만점 평점법 (scoring test)으로 채점하였다(Table 6).

3. 신발효법에 의해 제조된 김치의 관능성 비교

이 전년도의 김치 연구에서 기존의 절임방법과 발효방법과는 다른 새로운 신가공 김치 제조법을 개발하여 보다 높은 고효율의 기능성 김치를 만들고자 시도하였다. 전년도에 수행되어진 연구에서 개발된 젖산소금은 김치의 전처리 단계인 절임시에 적용한 후 양념과 혼합하여 김치를 제조하는 방법과 배추 단독 발효법에 따라 배추 발효시에 적용하여 완성된 김치 제조법, 그리고 양념의 단독 발효기법 등에 이용되어졌다. 다양한 김치 제조법에 의한 김치(Table 8)들의 최종 평가로서 발효배추와 마찬가지로 관능테스트를 실시하였다. 김치시료의 제조방법은 Table 8에서와 마찬가지로 배추는 절임배추와 발효배추로 나누고, 양념은 발효 된 것과 안 된 것으로 나누어서 이전 년도에서 조사결과 확인된 배추절임과 발효시의 염농도, 시간, 젖산 첨가량, 그리고 양념발효 시간, 젖산함유량 등의 최적처리 조건에 따라 처리를 하여 최종적으로 배추와 양념을 Table 8의 조합에 따라 혼합하여 제조하였다. 관능테스트시의 평가항목은 향미 (flavor), 맛 (taste), 조직감 (texture), 전체 기호도 (overall acceptability) 4가지 항목이며, 5점 만점 평점법 (scoring test)으로 채점하였다(Table 6).

Table 6. **김치 관능테스트 전단지**

이름: **성별:** **男, 女** **연령(만):**

일시: 2000**년** **월** **일**

시료의 종류: 김치

각각의 항목(향미, 맛, 조직감, 전체기호도)에 대해서 평가하시오. 각 시료에 대해 다음의 척도를 사용하여 점수를 지정하시오.

아주 싫다 1

싫다 2

그저 그렇다 3

좋다 4

아주 좋다 5

시료번호 / 평가 항목	a	b	c	d	e	f	g	h
향미 (flavor)								
맛 (taste)								
조직감 (Texture)								
전체 기호도 (Overall acceptability)								
Comments :								

Table 7. **발효배추의 관능실험을 위해 사용되어진 전단지**

관능 테스트

성별 : 남, 여

나이 :_____

일시 : 1999**년** 12 **월** 1 **일**

배추의 단독 발효후 젖산 처리한 실험구 배추와 처리 안 한 대조구

배추에 있어서 맛의 차이를 알아보기 위한 5**점 만점의** scoring test**입니다.**

감지 불가능하다 (1**점**)

약하게 감지할 수 있다 (2**점**)

보통정도로 감지할 수 있다 (3**점**)

강하게 감지할 수 있다 (4**점**)

극도로 강하게 감지할 수 있다 (5**점**)

항 목	365**번 시료**	375**번 시료**	385**번 시료**	395**번 시료**
1. **신내** (acidic taste)				
2. **생배추맛** (fresh cabbage taste)				
3. **짠맛** (salt taste)				
4. **사각사각** (crispness)				
5. **질김** (chewiness)				
6. **군덕맛** (yeast moldy taste)				
7.**전체 기호도** (overall eating quality)				
8. Comments				

Table 8. **관능 테스트 시료** (total 16**가지 시료**)

배추 (Chinese cabbage)	1. **절임배추**	A. 15% **소금용액** 3**시간 절임** B. 15% **젖산소금용액** 3**시간 절임**
	2. **발효배추**	A. 5% **염농도 발효액에서** 5**일 동안 발효** B. 5% **염농도**, 0.25% **식용젖산 첨가한 발효액에서** 5**일 동안 발효**
양념 (Seasoning)	1. **비발효양념**	A. **젖산첨가하지 않은 일반양념** B. 0.4% **젖산 첨가**
	2. **발효양념**	A. **젖산처리하지 않고** 10**일간 발효** B. 0.4% **젖산첨가 후** 10**일간 발효**

	Sample No.	
절임 배추 + 비발효양념	1	**배추**1,A - **양념**1,A
	2	**배추**1,A - **양념**1,B
	3	**배추**1,B - **양념**1,A
	4	**배추**1,B - **양념**1,B
발효 배추 + 비발효양념	5	**배추**2,A - **양념**1,A
	6	**배추**2,A - **양념**1,B
	7	**배추**2,B - **양념**1,A
	8	**배추**2,B - **양념**1,B
절임 배추 + 발효양념	9	**배추**1,A - **양념**2,A
	10	**배추**1,A - **양념**2,B
	11	**배추**1,B - **양념**2,A
	12	**배추**1,B - **양념**2,B
발효 배추 + 발효양념	13	**배추**2,A - **양념**2,A
	14	**배추**2,A - **양념**2,B
	15	**배추**2,B - **양념**2,A
	16	**배추**2,B - **양념**2,B

제 3 장 연구개발수행 결과 및 고찰

제 1 절. 김치에 유용한 균주의 탐색

1. 극호염성 균주 탐색

가. 균주의 분리

시료 200점에서 10% NaCl의 포함된 MRS 배지에서 colony를 형성하는 균주는 4,000여 균주를 선발할 수 있었고 이중 2차 5% NaCl과 0.4% $CaCO_3$가 포함된 MRS 배지에서 산을 생산하는 균주 500여개를 선발하여 3차 형태적 관찰과 4차 catalase 반응결과를 확인한 결과 Table 9와 같은 결과를 얻었다. 10% NaCl이 함유된 MRS배지에서 많이 발견되는 미생물은 주로 Coccus 형태의 미생물과 yeast 계통의 미생물임을 알 수 있고, 균형태가 rod형이고 catalase negative 균주는 4000여 균주에서 거의 찾아보기 힘들 정도로 희소했다.

나. 균주의 동정

4차에 걸쳐서 선발된 극호염성 유산균 2균주에 대해서 균주동정을 하기 위해서 API kit을 이용해서 당이용성을 조사한 결과 Table 10에서 보는 바와 같이 HL-48은 arabinose. ribose, galactose, glucose, fructose, mannose, N-acetyl glucosamin, melibiose, trehalose를 이용하는 것으로 나타나서 Lactic acid bacteria 중 *Lactobacillus fermentum, Leuconostoc lactis, Leuconostoc mesenteroides,* 및 *Lactobacillus brevis*와 비슷한 결과이고 이중 identification %가 35%이상 되는 것은 *Lactobacillus fermentum*과 *Leuconostoc lactis*로 나타났다. 하지만, 본 선발균주 HL-48은 lactic acid 생산에서 D. L. mixture를 생산하는 특성으로 보아 *Lactobacillus fermentum*임을 확정지을 수 있지만, identification percent가 Table 11에서 보는 바와 같이 낮은 이유는 본 선발 균주인 HL-48이 극호염성 조건에서 선발되어서

정상적인 상태의 *Lactobacillus fermentum*이 갖는 결과와 잘 일치하지 않아서 identification percent 가 38.5% 밖에 되지 않음을 알 수 있다. 따라서 HL-48은 *Lactobacillus fermentum*과 가장 가까운 *Lactobacillus* sp. HL-48로 명명할 수 있다.

다. 균주의 특성연구

NaCl 내성: 선발된 유산균의 염분의 농도에 따른 생육여부와 증식정도를 파악한 결과 Table 12의 결과에서와 같이 염분농도 12%까지의 농도에서는 균체의 생육과 증식이 가능하였지만, 5%의 염분의 포함시 최적생육을 하였다. 기존의 *Lactobacillus* sp. 의 경우는 5% 이상에서는 생존은 가능하지만, 전혀, 생육하지 않고 특히, 장시간, 방치 시는 사멸하는 결과를 보이는데, 이런 결과에서 선발된 유산균은 호염성임을 알 수 있다. 이런 결과에서 기존보다 약간 높은 염분을 배추발효에 사용하면 기존에 오염된 미생물을 상당히 제거할 수 있는 효과가 있다고 판단한다.

안정성: 신균주이기 때문에 안정성문제를 조사하기 위해서 마우스를 이용해서 식용하고 있는 야쿠르트 유산균과 *Pseudomonase aeroginosa*를 각각 positive, negative control로 하여 시험한 결과, 복강주사시 야쿠르트 유산균과 *Lactobacillus* sp. HL-48은 주사 후, 경시변화가 없어서 안정한 것으로 나타났고, *Pseudomonas aeroginosa* 는 주사 후, 1일에서 2일 상에 시험한 마우스가 모두 사멸하여, 선정된 균주는 안정성이 있음을 알 수 있었다. 또한, 마우스 경구로 음용시도 복강주사한 비슷하게 *Lactobacillus* sp. HL-48은 안전하게 나타나서 독성이 없음을 1차 확인 할 수가 있었다. 총 3군, 즉 대조군1 (*Lactobacillus bulgaricus*,야쿠르트 유산균), 대조군2 (*Pseudomonas maeroginosa*) 그리고 시험군 (*Lactobacillus* sp. HL-48, 10⁷,10⁹ CFU/)으로 구분하여 군당 10마리씩 배치후, 마리당 0.5씩 복강 주사후 14일 관찰한 결과, *Pseudomonas aeroginosa*를 주사한 대조군이외는 치사한 개체는 발견할 수 없었음을 알 수 있어서 병원성이 없었다. 또한 총 3군, 즉 대조군1, 대조군 2, 시험군으로 구분하여 경구투여 후 체중변화, 체온, 음수량, 사료소모량, 혈액화학치(Table 13), 뇨분석(Table 14)을 실시한 결과 모든 군에서 정상의 범위의 수치를 나타내어 독성에 대한 안정

성을 확보하였다.

Table 9. Distribution of microorganisms isolated from soil and Korea pickled food

Characterization / Cell morphology	Acid Secretion	Gram staining	Percentage from total population
Coccus shape	+/−	+	> 90%
Yeast	+/−	+	< 10%
Irregular shape	−	−	≒ 0.1%
Rod shape	+/−	+	rarely

Table 10. Carbon utilization of isolated strain HL-48

Factor	Result	Factor	Result
Glycerol	−	Esculine	−
Erythritol	−	Salicine	W
D-Arabinose	−	Cellobiose	−
L-Arabinose	+	Maltose	+
Ribose	+	Lactose	−
D-Xylose	−	Melibiose	+
L-Xylose	−	Saccharose	W
Adonitol	−	Trehalose	+
β Methyl-xyloside	−	Inuline	−
Galactose	+	Melezitose	−
D-Glucose	+	D-Raffinose	−
D-Fructose	+	Amidon	−
D-Mannose	+	Glycogene	−
L-Sorbose	−	Xylitol	−
Rhamnose	−	β Genitobiose	−
Dulcitol	−	D-Turanose	−
Inositol	−	D-Lyxose	−
Mannitol	−	D-Tagatose	−
Sorbitol	−	D-Fucose	−
α Methyl-D-mannoside	−	L-Fucose	−
α Methyl-D-glucosamin	−	D-Arabitol	−
N Acetyl glucosamin	+	Gluconate	−
Amygdaline	−	2 ceto-gluconate	W
Arbutine	−	5 ceto-gluconate	−

W : Green color

-, W : Redish green color

Table 11. Comparisons of taxomomic similarity of HL-48 and type strains

Type strains	identification percent(%)
Lactobacillus fermentum	38.5 ± 0.53
Leuconostoc lactis	36.2 ± 0.50
Leuconostoc mensenteroides	15.3 ± 0.47
Lactobacillus brevis	9.4 ± 0.45
Lactobacillus collinoides	0.2 ± 0.30

Table 12. Growth rate and resistance of *Lactobacillus* sp. HL-48 according to sodium chloride concentrations in media.

Concentration of NaCl	Growth rate	Resistance
0 %	+5	+
5 %	+8	+
10 %	+2	+
12 %	+1	+
15 %	0	+
18%	0	+

Table 13. Serum biochemistry in mice before and after 7-day treatment of *Lactobacillus* sp. HL-48.

Treatment	Group	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	ALP (IU/L)	BUN (mg/dL)	GLU (mg/dL)	ALB (g/dL)	PRO (g/dL)	CHO (mg/dL)	BIL (mg/dL)	CRN (mg/dL)
Before	Control	164.2 ±24.2	62.9 ±6.8	743.5 ±123.4	32.3 ±15	94.2 ±27.6	3.7 ±0.2	5.7 ±0.3	98.4 ±1.1	0.1 ±0.0	0.7 ±0.1
	Low	150.8 ±19.8	52.1 ±5.8	738.5 ±27.7	32.5 ±4.7	111.3 ±5.1	3.9 ±0.5	4.8 ±1.1	82.7 ±14.4	0.1 ±0.0	0.6 ±0.2
	High	168.8 ±25.8	61.9 ±23.0	728.5 ±13.7	33.6 ±2.8	102.2 ±20.0	3.5 ±0.3	4.5 ±0.4	84.4 ±1.3	0.0 ±0.0	0.5 ±0.2
Alter	Control	162.4 ±30.2	65.0 ±6.5	631.2 ±1.2	32.0 ±2.6	121.0 ±18.9	3.9 ±0.3	5.7 ±0.3	90.8 ±7.8	0.1 ±0.0	0.7 ±0.1
	Low	142.9 ±29.0	46.1 ±2.0	570.3 ±67.0	31.4 ±5.2	164.2 ±12.8	3.6 ±0.3	4.8 ±1.1	97.3 ±4.2	0.0 ±0.0	0.7 ±0.1
	High	135.5 ±36.2	65.3 ±21.8	572.9 ±72.5	41.5 ±8.5	138.2 ±16.6	3.7 ±0.4	4.5 ±0.4	87.2 ±16.7	0.1 ±0.0	0.7 ±0.1

GOT: glutamic oxaloacetic transaminase, GPT: glutamic pyruvic transaminase, ALk: alkaline phosphatase, BUN: blood urea nitrogen, GLU: glucose, ALB: albumin, CHO: cholesterol, BIL: bilirubin, PRO: protein, CRN: creatinine.

Table 14. Urinalysis in rats after 7-day exposure to *Lactobacillus* sp. HL-48.

(n=10 No. of animals)

Items +	Degree	Control		Low		High	
		Pre-exposure	1-week	Pre-exposure	1-week	Pre-exposure	1-week
pH	6.0	0	0	1	0	0	0
	6.5	0	0	0	1	1	0
	7.0	7	7	6	7	8	8
	7.5	2	1	2	2	1	1
	8.0	1	0	1	0	0	1
	8.5	0	0	0	0	0	0
Protein	negative	6	4	4	6	6	5
	30	4	6	6	4	4	5
	100	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0
Glucose	normal	8	10	10	10	10	10
	50	2	0	0	0	0	0
	100	0	0	0	0	0	0
	300	0	0	0	0	0	0
	1000	0	0	0	0	0	0
Ketone body	negative	7	6	9	8	8	9
	+	3	4	1	2	2	1
	++	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0
Bilirubin	negative	9	10	10	10	10	9
	+	1	0	0	0	0	1
	++	0	0	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0	0	0
Urobili-nogen	normal	10	10	10	10	10	10
	10	0	0	0	0	0	0
	40	0	0	0	0	0	0
	80	0	0	0	0	0	0
Occult blood	negative	9	10	10	9	10	10
	+/-	1	0	0	1	0	0
	+	0	0	0	0	0	0
	++	0	0	0	0	0	0

protein : mg/d urobilinogen : mg/L, glucose : mg/dL

라. 균주의 발효

생산용 배지조건을 검토하기 위해서, 우선 탄소원을 결정하기 위해서 질소원으로 Yeast extract**를** 0.1% **로 하고** Fig. 3**에서 보는 바와 같이 탄소원을 조사한 결과,** Sucrose**을 가장 잘 이용하였고 질소원은** Fig. 4**에서와 같이** Tryptone, **미량광물질은** Fig. 5**에서와 같이** Calcium sulfate**로 나타나서, 최종생산용 배지를** Sucrose 10g, Tryptone 1g, Calcium sulfate 0.1g, Disodium phosphate 0.05g, NaCl 5g**을** 1**리터의 물에 녹여서 사용하였다. 제품화를 위한 생산시험을 하기 위해서 퍼멘터** (Fermenter)**를 사용하여 균체 생산을 위해서 정해진 생산용 배지에 미리 배양된** *Lactobacillus* sp. HL-48**의 종배양** 1%l**을 접종하여 공기 공급량** 1 vvm, **교반속도** 200 rpm**의 조건에서** 30**에서 배양시켰다. 생산결과는** Table 15**에서와 같이 균 접종후** 15 **시간에 최대의 균수인** 7.0 x10^{9}/ ml**을 생산할 수 있었다. 생산된 유산균을 락토오스을 부용제로하여 건조한 분말을 유산균의 미생물제제로 하였다.**

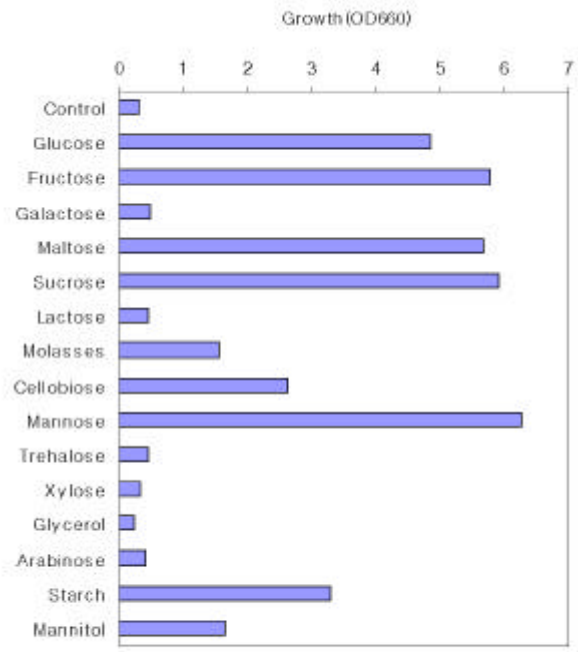


Fig. 3. Effect of carbon source on growth of *Lactobacillus* sp. HL-48

Fig. 4. Effect of nitrogen source of *Lactobacillus* sp. HL-48

Fig. 5. Effect of minerals on growth of *Lactobacillus* sp. HL-48

Table 15. Fermentation profiles of *Lactobacillus* sp. HL-48

Time(hr)	O.D(600nm)	c.f.u./ml
0	0.000	2.2x107
2	0.012	2.0x107
4	0.340	1.4x108
6	1.147	3.0x108
10	1.788	8.0x108
12	1.862	2.4x109
14	1.867	7.8x109
48	2.020	< 105

2. 극호산성 균주 *Bifidobacterium* sp.의 탐색

최근 건강과 장내세균과의 상관관계가 알려지고 장내 유용균인 Bifidobacterium의 중요성이 부각되어 우리나라에서도 상업적인 제품에 Bifidobacterium을 이용하는 추세이다. 그러나 Bifidobacterium은 절대 혐기적인 조건에서 생육하고 특수한 생육촉진물을 첨가하거나 다른 방법으로 생육조건을 조절하여야 하기 때문에 제품개발에 장애가 되고 있다. Bifidobacterium의 증식 및 생존성에 영향을 미치는 요인으로 pH, 산의 종류, 혐기적 조건, 생육인자의 특성, 탄소원, 질소원의 종류 등이 있다. 또 Bifidobacterium이 장기간 활성을 유지하기 위해서는 위액, 각종소화효소 등 미생물의 생존을 저해하는 요인들을 극복하여야 하므로 생균으로 이용하기 위해서는 저장시 생존력을 증진시키며 외부환경에 저항력을 가지는 배양조건이 필요하다.

*Bifidobacterium*은 장내에서 젖산과 초산을 2 : 3으로 특히 L(+) lactic acid를 생산하고, 생성된 산은 장내 pH를 낮춤으로써 장내 유해한 미생물의 생육을 억제하고, 장내에서 장관독소를 생산하는 균들의 이상증식에 의해 설사가 유발되었을 때, 이들의 증식을 억제하여 설사를 개선하고, *Bifidobacterium*이 생산하는 유기산에 의해 대장의 운동이 항진되어 변비가 개선된다. 장내 유해균은 미흡수의 단백질, 아미노산 및 요소 등으로부터 amine, phenol 류, ammonia, steroid metabolites, bacterial toxin, indole, skatole 등을 생산한다. 이와 같은 부패산물은 세포 독성을 가지며 발암에 관여하는데 *Bifidobacterium*은 부패산물의 생성과 발암물질의 형성을 억제한다. *Bifidobacterium*은 장내 암을 유발시키는 아미노산 대사 생성물(인돌, 페놀 등), 니트로 화합물(니트로소 아민), 담즙산 대사산물 등의 해독에 유리하게 작용한다. *Bifidobacterium* 세포 성분은 생체의 면역 기능을 자극하여 감염이나 암에 대하여 저항력을 높여주며, 장내에서의 유해물질을 무독화하는 효과가 있다. 세포벽의 glycopeptide 성분은 macrophage 활성화와 B 임파 세포의 활성화 등을 통하여 면역 활성을 증가시킨다. *Bifidobacterium*은 티아민, 리보플라빈, 비타민 B_1, B_2, B_6, B_{12}와 비타민 K 등을 합성한다. 또한 α-galactosidase를 생산하여 유당 불내증 개선 효과, 소화기 질환 예방 등을 통해 여러 건강 증진 효과를 나타내므로 여러 분야 등에서 활발하게 사용되고 있다.

가. 균주의 분리 및 동정

건강한 유아 6명과 성인 6명을 대상으로 장내 세균총을 검색한 결과, 호기성 세균군에서는 Enterobacteriaceae가 12명 모두에게서 100%의 분리율로 10^5-10^8의 균수로 분포하고 있었다. 이외에 *Bacillus*는 58%의 분리율, Staphylococcus는 33%, *Yeast*는 17%의 분리율을 나타내었다. 혐기성 세균군에서는 Bacteroidaceae, *Eubacterium*이 12명 모두에게서 109-1010의 높은 균수로 분리되었으며, *Clostridium*은 67%, Peptococcaceae는 42%, *Veillonella*는 33%, *Megasphaera*는 25%의 분리율로 분리되었다. 한편 검색한 12명의 장내세균총의 총균수(total counts)는 10^{10}-10^{11}을 나타내었다. 또한 *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* 속 유산균을 분리하기 위하여, 유산균의 선택배지(selective medium)인 TATAC, LBS, BS medium, 과 비선택배지(non-selective medium)인 BL, EG medium을 사용하여 유산균을 분리한 결과, *Streptococcus* 72균주, *Lactobacillus* 98균주, *Bifidobacterium* 84균주를 분리하였다. *Bifidobacterium*은 12명 중 11명에서 분리되었으며(분리율 92%), 균수도 10^7-10^{10}의 높은 균수로 분리되었다. *Lactobacillus*는 12명 모두에게서 100%의 분리율로 검출되었지만, 균수는 10^4-10^9으로 비교적 낮은 균수로 분리되었다. 한편 *Streptococcus*는 12명 중 10에게서 검출되었으며(분리율 83%), 균수는 10^5-10^8을 나타내었다. 따라서 건강한 유아와 성인의 유산균은 *Bifidobacterium*이 최우세 균총을 형성하고 있음을 확인할 수 있었다. 건강한 12인의 성인을 대상에서 얻은 분변에서 pH 4.0에서 생육이 가능한 15균주의 Bifidobacteria를 대상으로 pH 3.0에서 반응하여 생육가능한 균주를 최종적으로 선별한 결과 BK-11이 가장 양호한 결과를 가져서 최종 선발하였다.(Table 16)

최종 선발된 *Bifidobacterium* BK-11 균주의 세균학적 동정(identification)을 실시하기 위하여, 23종류의 당분해(Carbohydrate fermentation)성상 검사를 실시하여 균종(species)을 동정하였다. PYF broth에 23종류의 당(Carbohydrate)을 각각 0.5% 농도로 용해시킨 후, EGF에서 배양시킨 *Bifidobacterium* 접종 균액을 접종시킨 후, 37℃에서 7일간 혐기 배양 후, 당분해성상을 판정하였다(Table 17). 그 결과 최종 선발균주로 선정된 *Bifidobacterium* BK-11균주는 당분해성상과 GC content 60.2%로 나타내어 *Bifidobacterium longum*과 세균학적 성상이 유

사한 균주로 확인되었다. *Bifidobacterium longum* 은 인체에 유익한 균주이기 때문에 부가적인 독성 및 병원성시험은 필요하지 않았다.

내산성 유산균을 Screening하기 위하여, 분리된 *Streptococcus* 72균주, *Lactobacillus* 98균주, *Bifidobacterium* 84균주를 EGF broth에 계대 배양하여 접종균액을 제조하고, pH 3.0과 pH 4.0으로 조정한 Diluent A 접종한 후, 37 ℃에서 3 hr 배양하여, 내산성 균주를 확인하였다. 그 결과 Table 18에서와 같이 *Streptococcus* 72균주 중에서 32균주(44.5%)가, *Lactobacillus* 98균주 중에서 25균주(25.5%), *Bifidobacterium* 84균주 중 15균주(17.9%)가 내산성 균주로 확인되었다. 분리된 유산균 중에서 내산성 균주로 판명된 *Streptococcus* 32균주, *Lactobacillus* 25균주, *Bifidobacterium* 15균주를 대상으로 내담즙성 균주를 Screening하기 위하여, 내산성 균주를 EGF broth에 계대 배양하여 접종균액을 제조하고, 0.15% oxgall(pH 7.0)이 첨가된 Diluent A에 접종하고, 37 ℃에서 3 hr 배양하여, 내담즙성 검사를 실시하였다. 그 결과 Table 18에서와 같이 *Streptococcus* 32균주 중 12균주(37.5%), *Lactobacillus* 25균주 중 11균주(44.0%), *Bifidobacterium* 15균주 중 7균주(46.7%)에서 내담즙성이 확인되었다.

나. 균주의 발효 및 보존

Bifidobacteria의 생산은 fermenter를 이용해서 여러 가지 배지 조성을 시험한 결과 초기, 예비조건 및 배양조건을 검토하기 이전에 10^7 / ml의 수준에서 최종 10^9-10^{10}수준으로 100-1000배 수준으로 생산성을 높일 수 있었고, 이때의 배지조성은, skim milk 8%, yeast extract 0.3%, soytone 0.3%, dextrose 3%, L-cystein HCL 0.05%, $MgSO_4 7H_2O$ 0.01%, Tween 80 0.1%로 했을 때, 18시간 배양후 9.7×10^9의 미생물수를 얻을 수 있었다. 또한 동결건조제도 7가지에 대해서 시험한 결과, 0.01M phosphate buffer 100ml에 lactose 5g, peptone 1g, MSG 0.1%를 사용하였을 때 93.1%의 생존율을 보여서, 동결보존제를 결정할 수 있었다. 이를 근거로 호산성미생물의 생산공정은 아래와 같다.

Bifidobacteria 전배양(MRS broth 16hrs) ⇒ 본 배양 (fermenter, 1% 접종, N_2 gas 치환, 암모니아수(28%) pH 7.4) 37℃ , 17hrs⇒ 저온배양(30℃,4hrs) ⇒원심분리 12,580g/ 10 min

⇒ 동결 보존제 첨가 (배양액 2%)⇒ 냉장온도에서 10min방치 ⇒ -70℃ 급속동결 ⇒ 진공 동결건조 30 hrs (-40℃, 10 mHg) ⇒ 최종제품 이렇게, 제조된 제품 1g에는 3.0 X 1011의 미생물이 존재하였다.

Table 16. Characteristics of Bifidobacterium strains isolated from the intestine of humans.

No.	Isolated medium	Sample No.	Cella	Gram	AEb	Identification	pHc resistance	Biled resistance
BK-1	BL	1	Y	+	−	Bifidobacterium	+	+
BK-2	BS	1	Y	+	−	"	++	++
BK-3	BS	2	Y	+	−	"	+	+
BK-4	"	3	Y	+	−	"	+	+
BK-5	"	3	Y	+	−	"	+	+
BK-6	BL	3	Y	+	−	"	++	++
BK-7	"	6	Y	+	−	"	+	++
BK-8	BS	7	Y	+	−	"	+	+
BK-9	"	7	Y	+	−	"	+	+
BK-10	BL	8	Y	+	−	"	+	+
BK-11	"	10	Y	+	−	"	+++	++
BK-12	"	10	Y	+	−	"	+	+
BK-13	BS	11	Y	+	−	"	+	+
BK-14	BL	12	Y	+	−	"	+	+
BK-15	"	12	Y	+	−	"	+	+

a Cell morphology(Y: y-shaped rods).

b Aerobic growth.

c pH 3.0 resistance.

d 0.3%Oxgall resistance.

Table. 17. Carbon utilization of isolated *Bifidobacterium* sp. BK-11

Factors	Results	Factors	Results
Arabinose	Positive	Melibiose	Positive
Xylose	Positive	Raffinose	Positive
Ribose	Positive	Melitriotose	Positive
Glucose	Positive	Soluble starch	Negative
Mannose	Positive	Inulin	Negative
Fructose	Positive	Manitol	Negative
Galactose	Positive	Sorbitol	Negative
Sucrose	Positive	Inositol	Negative
Maltose	Positive	Esculin	Negative
Cellobiose	Negative	Salicin	Negative
Lactose	Positive	Amygdalin	Negative
Trehalose	Negative	Gluconate	Negative

Table 18. Number of resistant strains for pH 3.0 and bile(0.15% oxgall) treatment

No. isolated strains		pH 3.0	0.15% bile
Streptococcus	72	32/ 72 (44.5%)	12/ 32 (37.5%)
Lactobacillus	98	25/ 98 (25.5%)	11/ 25 (44.0%)
Bifidobacterium	84	15/ 84 (17.9%)	7/ 15 (46.7%)
Total	254	72/ 254 (28.4%)	30/ 72 (41.7%)

또 Bifidobacterium의 생장배지 중 Trypticase-phytone-glucose medium, Bifidobacterium medium, Oatmeal medium, BL(Glucose-blood-liver) medium, 그리고 GAM medium 등을 시험한 결과 기초배지로 생육이 양호한 BL medium을 선택하였다.

Bifidobacterium의 배양조건에서 혐기적 배양이 중요하다. Bifidobacterium의 배양에서 혐기적인 조건은 고순도의 N2 gas를 0.1 vvm의 flow rate로 공급하여 얻을 수 있었다. Bifidobacterium 배양조건에 혐기적 환경이 필요한 이유는 과산화수소(H_2O_2)의 축적을 방지하기 위해서인데, 과산화수소가 축적되면 fructose-6-phosphate phosphoketolase를 불활성화 시켜 발효과정의 경로가 저해되기 때문이다. 선택된 BL medium의 조성물 중 5탄당과 6탄당의 단당류, 이당류, 올리고당류, 그리고 다당류 등으로 탄소원을 선정한 결과 fructose와 lactose가 가장 적당한 것으로 나타났다. Bifidobacterium의 생장을 촉진하기 위해 생육촉진물 또는 growth factor를 첨가제로 사용하여 Bifidobacterium의 생육을 비교, 관찰한 결과 대조구에 비해 생장이 촉진되지 않았으며 오히려 첨가제의 농도가 높을 경우 생육이 저해되는 것을 알 수 있었다. BL medium의 조성 성분 중 생육에 중요한 영향을 미칠 것으로 생각되는 인자를 선별하기 위해 multifactorial screening method 중 Plackett-Burman design에 따른 연구를 수행하여 Bifidobacterium의 생육을 비교한 결과 yeast extract와 tween 80이 positive effect를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 또 두 가지 positive 성분을 surface response methodology를 통해 contour plotting한 결과 이들 두 성분의 농도를 결정하였다. 최종적으로 결정된 modified BL medium의 조성은 Table 22과 같다. Table 22와 같은 조성의 최적화배지를 사용하여 5리터급 발효조에서 발효를 수행한 결과 발효 후 15-20 시간 이내에 당 3.0×10^8개의 세포수를 얻었다.

Table 19. Plackett-Burman design에 따른 Bifidobacterium의 생육비교

Run	A	B	C	D	E	F	G	Growth (A610)	Cell (no./ml)
1	+	+	+	-	+	-	-	3.99	3.6E+08
2	-	+	+	+	-	+	-	4.23	3.8E+08
3	-	-	+	+	+	-	+	3.22	2.9E+08
4	+	-	-	+	+	+	-	4.22	3.8E+08
5	-	+	-	-	+	+	+	3.54	3.2E+08
6	+	-	+	-	-	+	+	3.39	3.1E+08
7	+	+	-	+	-	-	+	3.05	2.8E+08
8	-	-	-	-	-	-	-	3.97	3.6E+08
Effect	- 0.08	0.06	0.01	- 0.04	0.08	0.29	- 0.80		
MS	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.17	1.29		

Factors ; A:Lab-lamco powder, B:Proteose peptone No.3 (Difco 0122), C:Trypticase peptone (BBL 11920), D:Phytone (BBL 11906), E:Yeast extract, F:Tween 80, G:5% Cysteine

Table 20. Bifidobacterium의 생장에 대한 탄소원의 영향

Carbohydrate	Growth (A€1C)	Cell (no./ml)	Medium pH
Inulin	0.886	8.0E+07	5.02
Starch	1.962	1.8E+08	5.76
Dextrin	0.751	6.8E+07	5.39
Arabinose	0.809	7.3E+07	4.37
Xylose	0.940	8.5E+07	4.05
Ribose	1.339	1.2E+08	4.22
Glucose	0.955	8.6E+07	4.22
Galactose	0.629	5.7E+07	4.40
Mannose	0.553	5.0E+07	5.66
Fructose	3.225	2.9E+08	3.93
Maltose	1.280	1.2E+08	4.07
Sucrose	1.438	1.3E+08	4.27
Lactose	2.550	2.3E+08	3.73
Cellobiose	0.457	4.1E+07	5.70
Trehalose	1.484	1.3E+08	4.88
Mannitol	0.997	9.0E+07	4.16
myo-Inositol	0.457	4.1E+07	5.87
Sorbitol	1.604	1.4E+08	4.33
Arabitol	0.403	3.6E+07	5.92
Xylitol	0.509	4.6E+07	6.01

Table 21. Bifidobacterium의 생장에 대한 growth factor의 영향

	Growth factor	Concentration	Growth (A610)	Cell (no./ml)	Medium pH
1	Nicotinic acid	16.246mM	0.478	4.3E+07	6.01
2		1.6246mM	0.533	4.8E+07	5.92
3		97.5nM	0.575	5.2E+07	5.83
4	Pantothenic acid	100mM	-	-	-
5		20mM	0.538	4.9E+07	5.79
6		100nM	0.520	4.7E+07	5.87
7	Biotin	164nM	0.647	5.8E+07	5.83
8		16.4nM	0.590	5.3E+07	5.87
9		1.64nM	0.520	4.7E+07	5.81
10	Casamino acid	1%	0.480	4.3E+07	5.83
11		0.10%	0.714	6.5E+07	5.88
12		0.01%	0.458	4.1E+07	5.85
13	Menadione	11.62mM	-	-	-
14		116.2nM	0.529	4.8E+07	5.83
15		11.62nM	0.533	4.8E+07	5.87

Fig. 6. Yeast extract와 Tween 80의 농도에 따른 Bifidobacterium의 생육.

Table 22. Bifidobacterium의 생산을 위한 최적배지

Lab-lamco powder	2.4	g/L
Proteose peptone No.3 (Difco 0122)	10.0	g/L
Trypticase peptone (BBL 11920)	5.0	g/L
Phytone (BBL 11906)	3.0	g/L
Yeast extract	30.0	g/L
Liver extract	150.0	ml/L
Lactose	10.0	g/L
Soluble starch	0.5	g/L
K_2HPO_4	1.0	g/L
KH_2PO_4	1.0	g/L
$MgSO_4\ 7H_2O$	0.2	g/L
NaCl	0.01	g/L
$FeSO_3\ 7H_2O$	0.01	g/L
$MnSO_4\ xH_2O$	0.006	g/L
Tween 80	3.0	g/L
5% L-Cysteine HCl H_2O	10.0	ml/L

Fig. 7. 최적배지를 사용한 Bifidobacterium의 생산

제 2 절 김치의 신가공 기술

1. 김치의 품질 개선을 위한 젖산 소금 개발

김치의 제조에 있어서 전단계인 염절임 과정은 삼투압의 힘에 의해 배추의 조직을 파괴함으로서 염 침투를 가능하게 하여 간(幹)을 맞춰주고, 발효에 관련된 미생물들의 생육을 왕성하게 도와주며 부피를 줄여주는 효과가 있다. 김치 발효 미생물인 유산균의 생육이 너무 왕성하게 진행되면 김치 과숙의 원인이 되므로, 적절한 발효의 조절을 유도하기 위해서 유산균의 생산물이기도한 비휘발성 유기산(젖산)을 소금에 침투시켜 제조하는 젖산소금을 개발하였다. 일상적으로 배추는 절임시에 건염법(乾鹽法) 또는 습염법(習染法)과 같은 방법을 사용한다. 이때 일반적으로 사용하는 소금(천일염)을 사용하지 않고 젖산소금을 사용하면 손쉽게 배추 내에 존재하는 유해 미생물들을 제거해 줌으로서 위생적인 김치를 만들 수 있다. 더불어 젖산소금은 물에 녹게 되면 젖산이 분리되어 배추내 젖산의 침투로 인한 pH 저하로 속성김치의 효과를 볼 수 있으며, 발효 기간동안 유산균의 생육을 적절히 지연시켜 김치의 가식기간을 연장시키고, 김치에 보존성을 부여할 수 있으리라 본다. 젖산을 첨가한 소금물을 여러 온도에서 방치하면서 재결정화를 관찰하였을 때 30에서는 5일 이상, 55에서는 1일 정도의 시간이 소요되었고 실온에서는 약 5일이 소요되었고 결정의 형태는 온도가 높을수록 분말화 되었다. 재결정화 전과 후의 pH를 비교한 결과 젖산을 첨가하지 않은 대조구는 6.98에서 7.52, 그리고 실험구는 1.84에서 1.78로 pH의 변화에 대해서 알아본 결과는 소금물에 젖산으로 적정 pH로 조정 한 후의 pH와 소금으로 재결정화 시킨 후의 pH가 일치하였다. 이로서 젖산소금의 제조 가능성을 확인하면서, 젖산소금에 대해서 관능test의 수행시에 사용된 전단지 표는 Table 23에서 보여지고 있으며, 젖산소금과 일반 소금과의 차이점을 알아본 결과는 Fig. 8에서 보여주고 있다. 젖산으로 처리된 젖산소금의

관능실험 결과를 실선으로 표현하고 대조구로 일반소금의 결과를 점선으로 표현하였다. 젖산소금의 면적이 더 넓게 나타나 젖산을 처리하므로서 관능적 특성이 일반소금에 비해서 더 증가하는 것으로 보았다

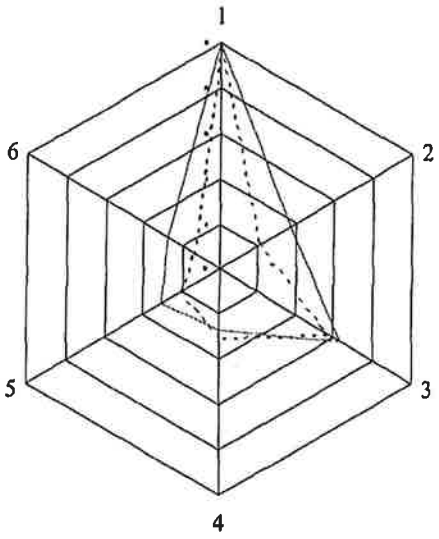


Fig. 8. A spider-web digram of difference between two salts

1, 짠맛; 2, 신맛; 3, 부드러운 맛; 4, 상쾌한 맛; 5, 신내; 6, 불쾌취

실선: salt treated lactic acid 점선: salt untreated lactic acid

Table 23. 젖산소금의 관능실험을 위해 사용되어진 전단지

젖산소금 관능 테스트

성명 : _____

일시 : 1988년 월 일

젖산 처리를 안한 소금과 젖산을 처리하여 재결정화를 거친 소금에 있어서 맛의 차이를 알아보기 위한 테스트입니다.
1번 항목에 있어서는 차이가 없으면 0, 미약한 차이가 있으면 1, 조금 차이가 나면 2, 많은 차이가 있으면 3의 숫자 위에 표를 하시고, 그 외는 해당 항목의 맛이나 냄새가 없으면 0, 맛의 정도에 따라 1(약), 2(중), 3(강)의 숫자 위에 표를 해주세요.

시료 / 항목	A	B
1. 짠맛		
2. 신맛		
3. 부드러운 맛		
4. 상쾌한 맛		
5. 신내		
6. 불쾌취		
7. COMMENTS		

2. 배추의 신절임 조건

가. 절임시 배추내의 세균 및 pH 변화

먼저 김치용 원재료인 배추의 미생물수는 배추를 잎부분과 줄기부분을 구분하고, 잎과 줄기를 다시, 속, 중간, 및 겉으로 구분했을 때, 속잎의 경우는 2 × 105 , 속줄기 5 × 104, 중간 잎은 6 × 105 , 중간줄기는 8 × 105 , 겉잎은 8 × 10€, 겉줄기는 1.5 × 10€으로 나타나서, 105-106 수준으로 오염되어 있고, 고춧가루는 1.5 × 10€, 파는 6 × 105 , 당근은 5.4 × 10€, 생강 6.5 × 10€, 마늘은 1 × 106 으로 미생물이 오염되어 있음을 확인하였다. 이에 선정된 유용균주들을 신기술에 적용하여 처리할 시 문제점이 있고 이를 극복하기 위해서는 새로운 가공기술이 필요하다.

염수의 염농도 15%, 20%, 25%로 조정하고 저장온도를 4℃, 실온 30℃로 환경을 만들어 배추의 특성을 조사한 결과 염수의 농도처리 농도에 따른 pH 및 미생물의 변화는 Table 24와 같다.

즉 NaCl의 농도가 높을수록 pH 및 미생물의 균주가 올라가지 않아서 5일까지의 침지로는 산도와 미생물 오염문제도 어느 정도 해결할 수 있으리라 전망한다. 저장온도는 4℃, 실온 및 30℃를 비교한 결과 예상한대로 온도가 낮을수록 산생성과 미생물 균체생성이 적어서 낮은 온도가 유리하지만 염농도를 줄이면 실온에서도 품질변화가 큰 것으로 나타났다. 염분농도를 20%로 맞추고 10시간 침외 한 후 4℃와 실온에서 10일까지 보관 시험을 한 결과 Table 25와 같이 나타났다. 즉 실온에서 침지시켜도 NaCl의 농도가 높을 때에는 배추가공상 품질의 변화가 크게 없음을 알 수 있어서 극호염성 유산균의 개발이 되면 고염도에서 처리하면 배추 품질상 큰 변화가 없을 것으로 생각된다.

Table 24. Effect of NaCl concentration on pH and microbial population of chinese cabbage.

NaCl concentration	pH			Microbial population (logN)		
	0 day	3 day	5 day	0 days	3 days	5 days
15%	5.7	5.0	5.0	6.30	7.20	7.98
20%	5.8	5.5	5.3	6.20	7.10	7.80
25%	5.9	5.8	5.4	6.20	6.80	7.10

* 4℃에서 저장

Table 25. Effect of preservation temperature on pH, texture, and microbial population of chinese cabbage treated 20% NaCl digestion.

Temperature	pH		texture*		Lactobacillus	
	0 days	10 days	0 days	10 days	0 days	10 days
4℃	5.87	5.51	5	4	1.92×107	2.65×108
Room Temperature	5.87	5.44	5	3	1.92×107	3.62×108

* Texture was determined by pannal test (5 is highest score)

나. 배추에 산처리 시험

배추에 15% NaCl**을 포함 식염액에 젖산을 이용해서** pH**를** pH 2.0**에서** pH 5**까지 조정한후** pH**의 변화를 조사한 결과,** pH 3.0**으로 처리 했을 때 배추내의** pH**의 유지가 초기** 6.1**에서** 5.4**로 변화하면서 미생물의 수를 젖산의 저해작용으로 초기 측정된 미생물수에 비해서 크게 올라가지 않아서 배추에 가공 기술중 극호염성 유산균의 개발도 배추를 식염액과 유산균 발효액을 동시 사용했을 시 배추처리에 확실한 효과를 얻을 수 있을 것으로 기대한다. 이와 같은 조건인 염분** 15%**와 젖산에 의한** pH**를** 3.0**으로 처리하고 시간에 따라 배추를 침지했을 때,** 4**시간에서** 16**시간까지 침지하면,** 4**시간 침지 이후의 효과는 비슷하지만, 배추에 포함되는 염도가** 5%**로 유지하기 위한** 8**시간 침지를 기준으로 했을 때, 대장균, 총균 및 효모가** Table 26**과 같이 현격히 떨어져서 신가공기술에서 미생물에 의한 오염을 해결할 수 있다고 판단하고 이런 방법에 의한 김치유사발효 방법을 개발하면 김치의 유통기간과 보존성 및 미생물에 의한 안정성이 해결된 고기능의 식품을 제조할 수 있다고 판단한다.**

Table 26. Change of microbial populations after salt-acid treatment of Chinese cabbage.

unit : log N/g

Items	Coliform bacteria				Total bacteria				Yeast			
	Non-treat*		Treat		Non-treat		Treat		Non-treat		Treat	
	leaf	stem	leaf	stem	leaf	stem	leaf	stem	leaf	stem	leaf	stem
0 hr	6.26	5.78	6.84	5.51	6.78	6.00	6.87	6.75	4.46	4.26	4.99	4.76
4 hr	5.60	5.45	-**	-	6.15	5.79	2.84	2.70	3.59	3.45	1.95	1.95
8 hr	5.40	5.38	-	-	5.90	5.42	2.48	2.70	3.48	3.45	1.77	1.85
12 hr	5.26	5.26	-	-	5.60	5.62	2.22	2.30	3.48	3.92	1.48	1.60
16 hr	5.08	5.00	-	-	5.40	5.38	2.00	2.00	3.14	3.09	1.25	1.60

다. 배추의 신절임법 개발

젖산소금을 이용한 배추의 절임조건을 확립하기 위해서 pH 변화, 절인 배추중의 염농도, 절인배추의 유해미생물 및 총미생물수를 시간에 따라서 측정한 결과 Fig. 9에서와 같이 대장균의 젖산을 첨가했을 때에 균수가 처리하지 않았을 때 보다 현저하게 감소됨을 알 수 있고, 특히, 15%의 염분에서 효과가 탁월하였다. Fig. 10에서는 총균의 변화를 조사하였는데 역시 대장균에서와 같은 경향을 보여서 절인 후에 김치 발효시 처리된 미생물에 의해서 효과를 볼 수가 있는 것을 알 수 있었다. Fig. 11에서는 처리시간에 따른 배추내의 소금의 농도로 2-3%의 수준은 3-5시간정도가 충분함을 알 수 있었는데, 배추의 줄기부분보다는 잎부분이 침지시 염분의 농도가 훨씬 높음을 알았다. 이상의 결과에서 젖산의 량을 물에 녹였을 때 pH가 2.5가 되고 염분농도가 15% 되게 한 20-25에서 3-5시간 침지 했을 때가 유해미생물 및 총미생물의 수가 가장 많이 감소했으며, 배추조직내의 염분농도도 잎과 줄기부분에 따라서 다르지만, 2-3%수준을 가져서 배추의 단독발효시는 접종할 *Lactobacillus* sp. HL-48 와 *Bifidobacterium longum* BK-11 의 접종시 잡균의 생육을 억제할 뿐만 아니라 배추절인 후 초기상태에서 생배추에서 느끼는 맛과 다른 숙성된 맛을 느낄 수 있었다

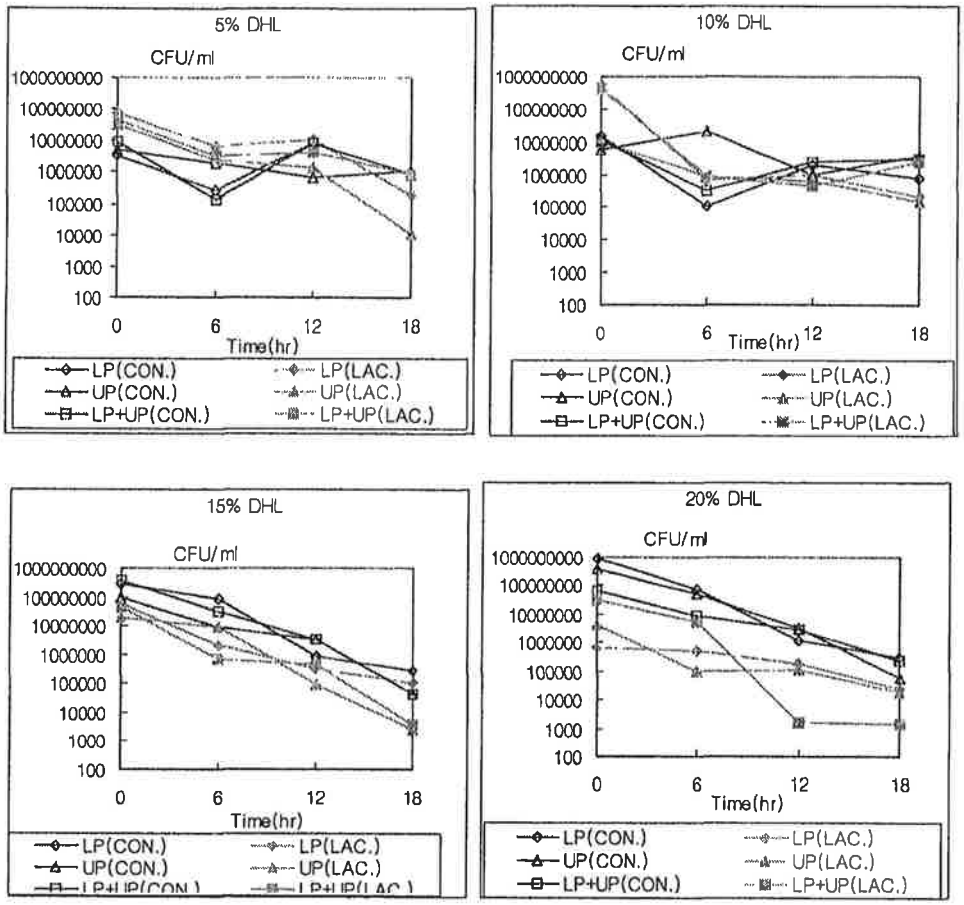


Fig. 9. Time profiles of coli-form bacteria in cabbage after treatment with lactated NaCl (LAC.) and NaCl only (CON.) according to NaCl concentration ; LP : Stem of cabbage, UP : Leaf of cabbage, LP+UP : Total cabbage

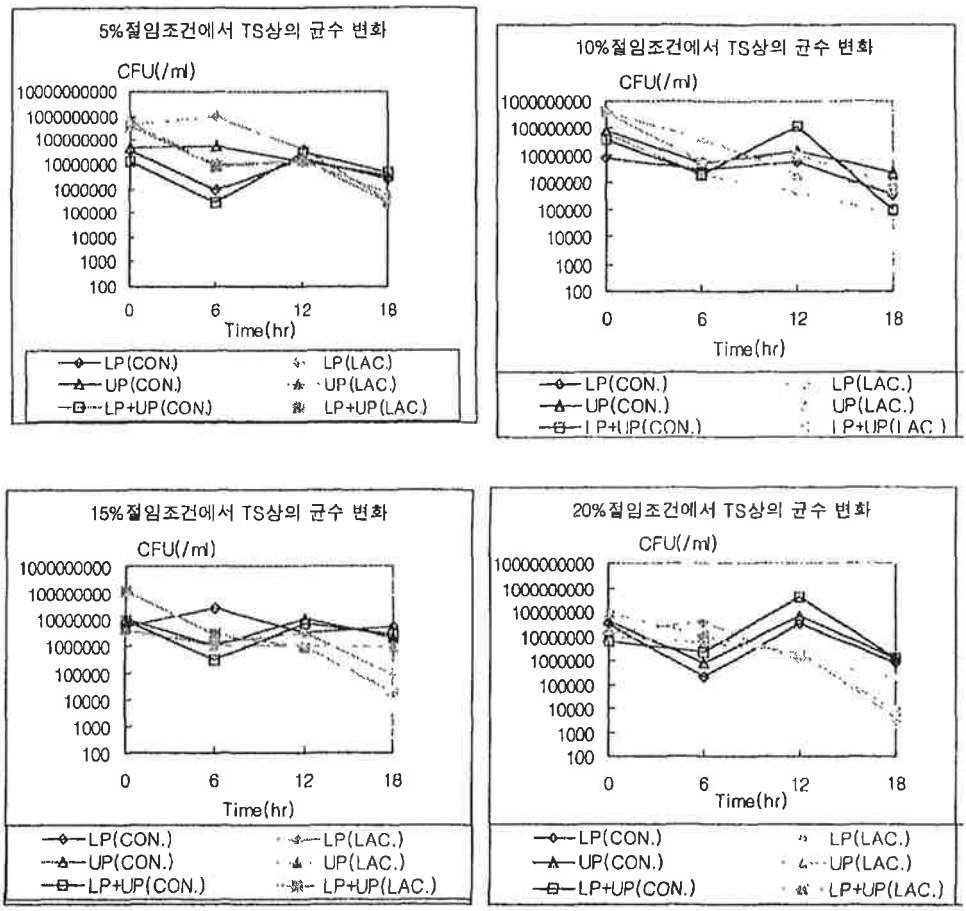


Fig. 10. Time profiles of total bacteria in cabbage after treatment with lactated NaCl (LAC.) and NaCl only (CON.) according to NaCl concentration ; LP : Stem of cabbage, UP : Leaf of cabbage, LP+UP : Total cabbage

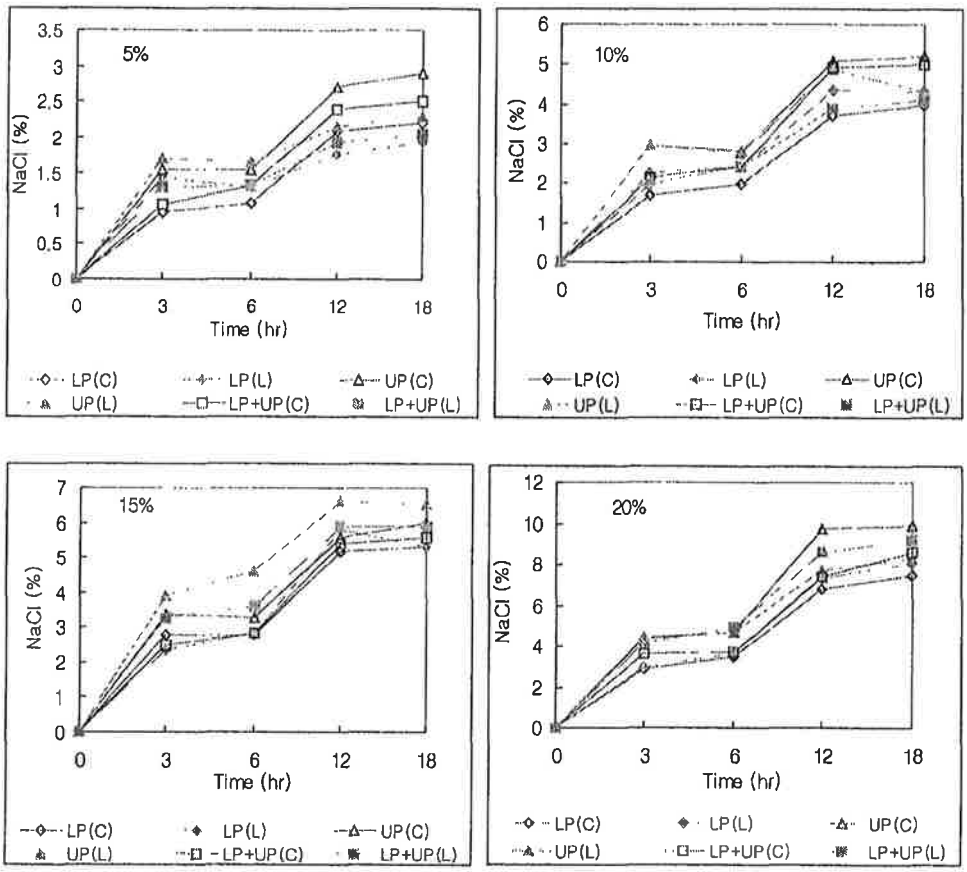


Fig. 11. Time profiles of NaCl concentration in cabbage after treatment with lactated NaCl (LAC.) and NaCl only (CON.) according to NaCl concentration ; LP : Stem of cabbage, UP : Leaf of cabbage, LP+UP : Total cabbage

라. 배추의 절임시 젖산 처리 효과

여러 미생물들에 의해 발효가 진행되어지는 김치는 최근 공장 단위로 대량 생산되어 외국으로 수출되고 있으며, 그 인기를 날로 더해가고 있는 실정이나 김치의 수송 및 유통 과정 중 발생되는 산패가 문제시되고 있다. 이에 김치의 절임시와 발효진행에 따른 위생적인 면을 개선하여 김치의 저장기간을 연장시키기 위한 방안으로 전년도에는 배추 절임시 젖산 처리와 김치 발효시 starter 처리에 따른 효과로서 김치의 숙성상태의 판단 지표인 pH 변화와 대장균 및 유산균 등의 변화 양상을 살펴보았다.

배추 절임시에 젖산을 처리 함으로 해서 15와 20% 염 농도에서 대조구의 대장균 수보다 실험구의 대장균 수가 현저하게 감소하는 경향을 보였으며, 또한 유산균에 있어서 실험구와 대조구 모두 절임 초기부터 서서히 감소하는 경향을 보이는 효과가 있었다. 김치의 품질로서 가장 중요한 것은 무엇보다 맛, 냄새, 텍스쳐, 색등 모든 관능적 특성을 포괄적으로 의미하는 맛이라고 여겨진다. 앞의 실험들에 이어지는 실험으로 젖산을 처리한 절임액에서 절인 배추의 관능 테스트를 수행하였다. 향미묘사 결과는 Fig. 12.에서 보여주고 있다. Fig. 12.에서 보여주듯이 젖산 처리구와 무처리구 배추 사이에서 산미의 차이가 거의 없었다. 이 결과로 인해 젖산의 처리를 하였을 때 우려한 산미의 특징이 보완됨을 알 수 있었다. 짠맛은 무처리구가 더 높게 나타났고, 전체적인 기호도가 월등히 높게 나타났다.

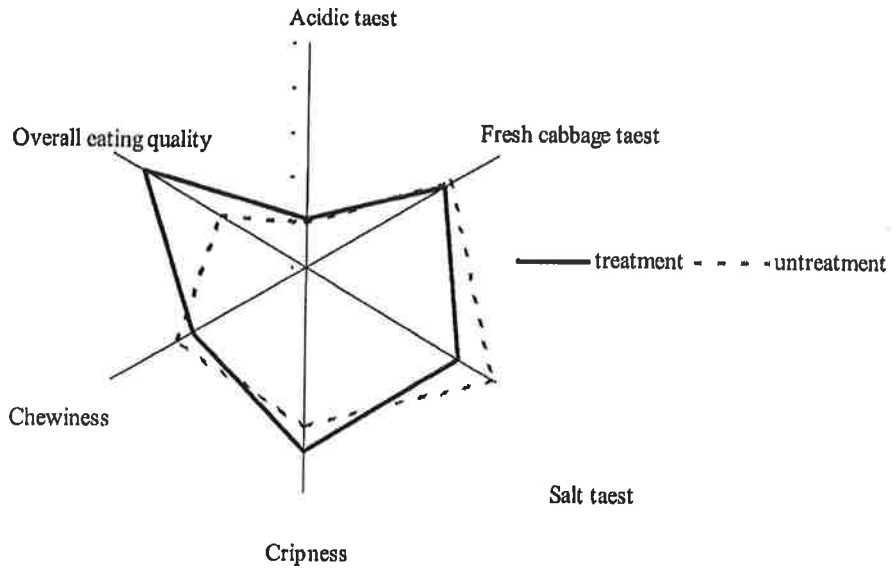


Fig. 12. Comparisons of the sensory evaluation of treated with lactic acid and untreatment that after salting time on Chinese cabbage.

3. 김치의 호염성 균주의 적용

김치발효를 시키면서, 시료 채취후 pH의 변화를 조사한 결과 Fig. 13 의 결과와 같이 처리한 개발한 신제조 방법이 김치의 품질에 가장 영향을 미치는 pH가 신제조 방법은 지속성에 있어서, 보존력이 충분히 확보됨을 알았다.

또한, 김치발효시 가장 맛이 있다고 판단되어 상품가치가 있는 pH 4.5에서 pH 3.7까지에 걸리는 시간을 조사한 결과 전통적인 방법은 42시간인데 비해서 개발된 방법에서는 시험한 시간인 140시간이상에서도 떨어지지 않아서, 개발된 방법은 유통시 보존성이 높은 방법으로 판단되었다. 대장균수는 DHL 배지, 유산균은 MRS 배지를 사용하여 조사한 결과 Fig. 14에 나타난 바와 같이 대장균수는 본 개발된 방법으로 제조시는 현저히 줄어듦을 알 수 있어서 김치의 식품으로서의 안정성을 보장할 수 있었고, 또한, 미생물중 유산균은 처리시 전통적인 방법에 의해서 제조된 김치에 비해서, 유산균의 수가 최고 발효점을 이루었을 때도 8-10배정도 적게 생산되어서, 김치가 너무 많이 발효되어 쉬어지는 현상을 막을 수 있어서 맛이 좋은 상태로 오랫동안 보장할 수 있다.

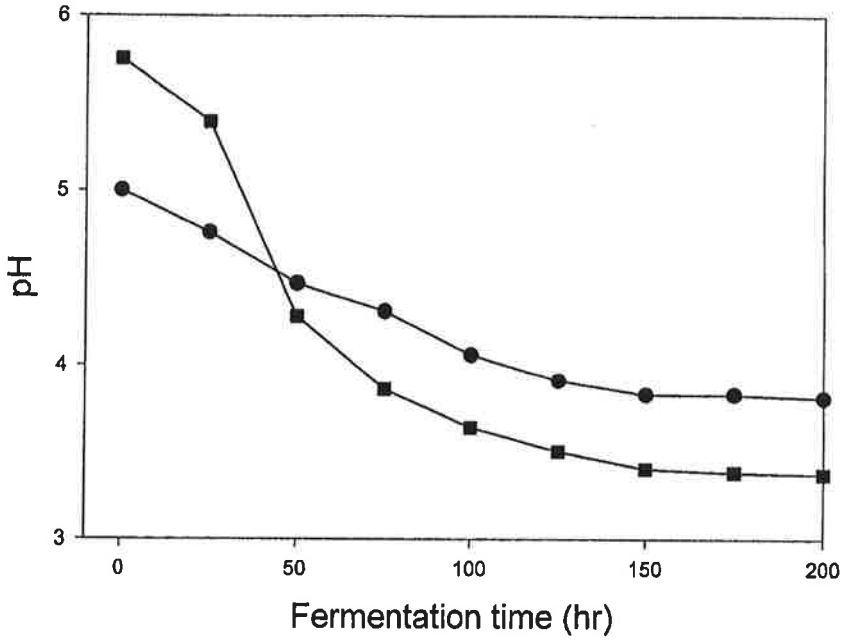


Fig. 13. Comparison of pH profile between control(■-■) and development (●-●) during Kimchi fermentation.

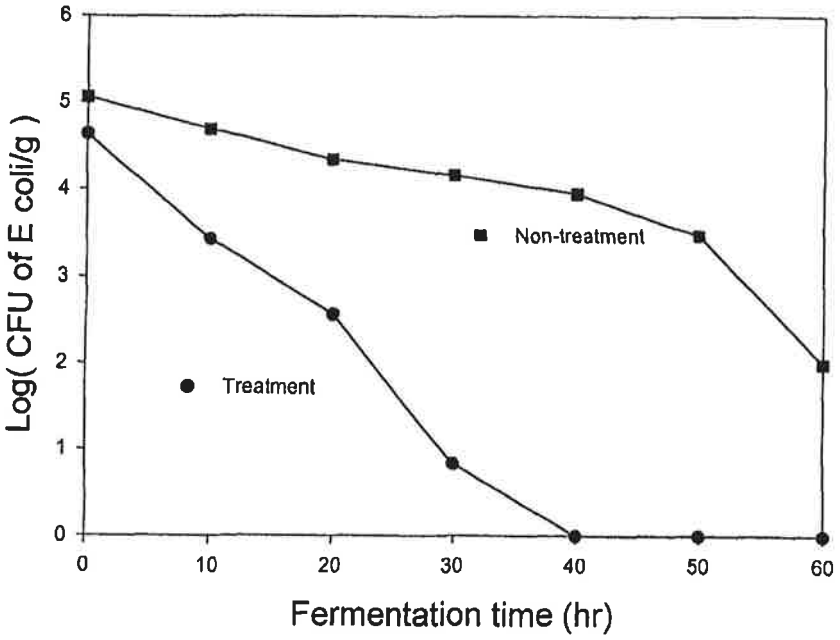


Fig. 14. Comparison of coli-form bacteria profile between control(■-■) and development (●-●) during Kimchi fermentation.

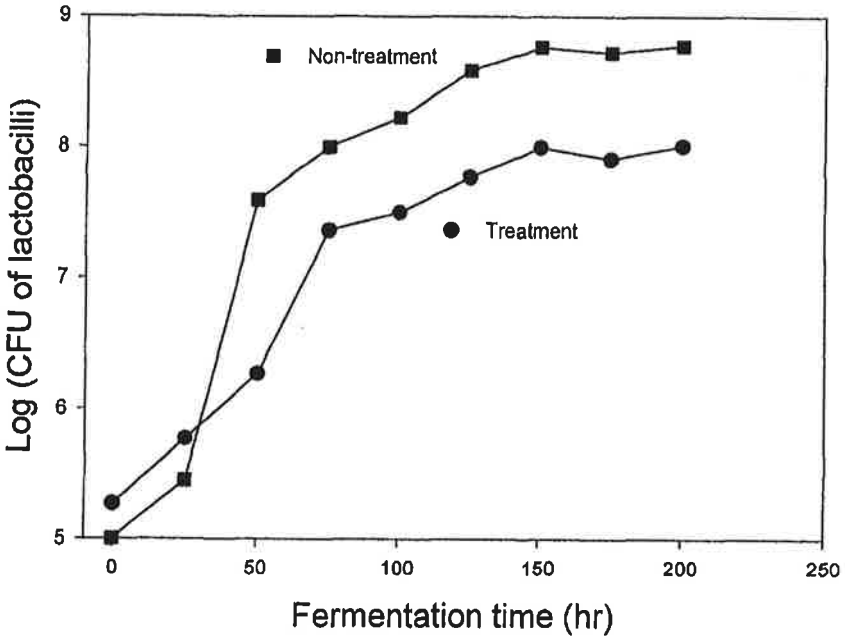


Fig. 15. Comparison of lactobacilli profile between control(■-■) and development (● ●) during Kimchi fermentation.

4. 김치의 호산성 균주의 적용 연구

가. 호산성 균주의 김치에의 생존력

김치첨가용 최종선발 균주로 선발된 Bifidobacterium BK-11 균주의 실제 김치용액에서의 생존성을 확인하기 위하여, MRS broth에서 배양된 접종균액을 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0으로 각각 조정된 멸균 김치용액에 접종하고, 4로 나누어 접종 후 1일째, 3일째, 5일째, 7일째의 생존율을 측정하였다. 냉장온도인 4에서의 시간별, pH별 생존균수 측정 결과를 상용 Log로 환산하여, Table 27에 나타내었다. 그 결과 접종전의 생균수는 8.4를 나타내었으며, pH 3.0의 김치용액에서의 생존율은 접종 후 1일째에 5.2, 5.3의 수치를 나타내었지만, 3일째에서는 검출되지 않았다. pH 4.0의 경우 접종 5일째까지 2.0, 2.6의 균수로 생존하였지만, 7일째에서는 모두 사멸하였다. pH 5.0 및 pH 6.0의 경우에는 7일째에서도 6.8-7.6의 높은 균수로 생존함을 확인하였다.

°CTable 27. Changes of Bifidobacterium counts by storage period and pH in Kimchi solution at 4℃

pH \ Days	0	1	2	3	4	5	6	7	8
3.0	8.41)	5.2	5.3	0	0	0	0	0	0
4.0	8.4	6.8	6.4	4.9	5.6	2.0	2.6	0	0
5.0	8.4	7.6	7.9	8.3	8.1	6.9	7.2	6.9	6.8
6.0	8.4	8.0	8.0	8.3	8.6	7.9	7.3	7.6	7.6

1) Log10 counts of Bifidobacterium / ml of Kimchi solution.

나. 비피도박테리아를 이용한 김치의 제조 및 평가

1) **김치배지에서의 생육 정도**

*Bifidobacterium longum*은 김치배지에서 약간 생육하는 것을 알 수 있었다. 따라서 김치제조 중에도 이 미생물이 생존 할 수 있을 것으로 생각되었다.

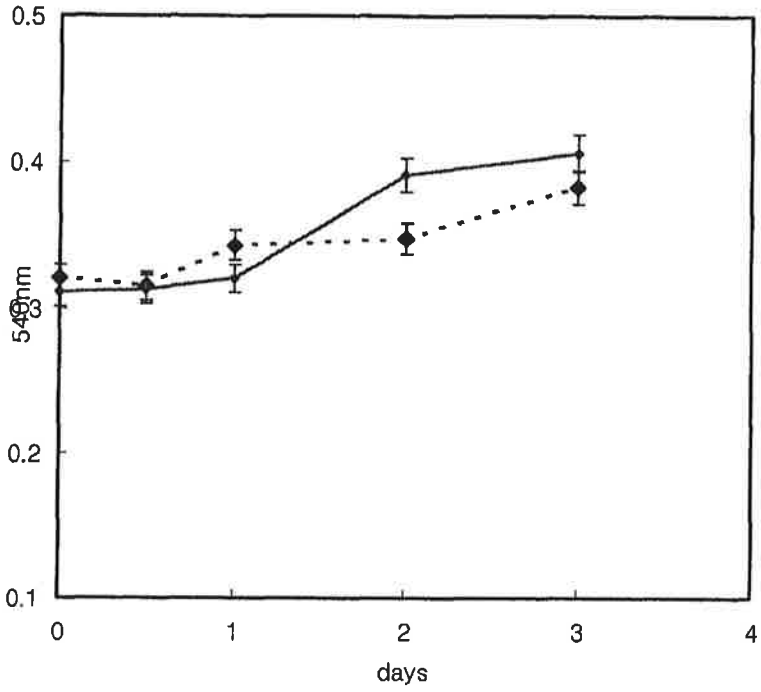


Fig. 16. Viability of *Bifidobacterium* in kimchi broth.

—◆— the growth of Bifidobacterium at 37℃
...◇... the growth of Bifidobacterium at 15℃

2) 발효과정 중 미생물학적인 분석

Bifidobacterium 첨가군(이하 첨가군)과 무첨가군의 발효 과정 중 총균수의 변화는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 초기에 101 cfu/g정도 첨가군의 총균수가 많으나, 약 20일 경과함에 따라 두 군 모두 약 3 ×1010 cfu/g로 증가하였다.

Lactobacillus 속은 발효 초기에, 첨가군과 무첨가군 모두 4×103 cfu/g 정도를 나타냈으며, 발효 15일경에 최대를 보인 후 점차적으로 감소하였다. 이러한 변화는 첨가군과 무첨가군 모두 비슷한 양상을 보였다. 이러한 결과는 김치 제조시 첨가된 *Bifidobacterium*이 *Lactobacillus* 속의 생육에 영향을 미치지 않았을 것이라고 사료된다.

발효 기간에 따른 *Leuconostoc* 속과 효모의 균수 변화 역시, 다른 미생물들의 변화와 마찬가지로 첨가군과 무첨가군 모두 비슷한 양상을 보이면서 변화하였다. 이들은 일반적인 김치에서 나타나는 미생물 변화와 유사하며, 그 숫자 역시 비슷한 정도를 나타내었다.

대장균군의 경우, 발효가 진행됨에 따라 감소하는 양상은 비슷하였지만, 무첨가군이 첨가군보다 약간 더 높은 균수를 나타내었다. 이는 *Bifidobacterium*이 성장하는 과정에서 생성해내는 여러 산에 의해 대장균군의 생장이 억제되었을 것이라고 사료된다.

김치중의 *Bifidobacterium*를 계수하기 위해서 BL-blood 배지와 F6PPK 방법을 이용하였다. 이때 F6PPK방법은 *Bifidobacterium* 배양을 위한 혐기성 조건이나 특정 시설을 필요로 하지 않고 신속하게 김치 중에 함유된 *Bifidobacterium*를 계수할 수 있었다. 김치에 *Bifidobacterium*을 이용시 고려해야 될 점은 *Bifidobacterium*의 내산소성과 내산성이다. *Bifidobacterium*은 편성 혐기성균으로 유산소 조건에서는 생육할 수 없으나, 계대 배양함에 따라 산소에 대한 내성이 생기며, 액체 배지에서 성장시 산화환원 전위를 낮추어주는 물질(ex. cysteine)이 존재시 완전 편성 혐기성 조건이 아닌 조건에서도 생장할 수 있다고 알려져 있다. 김치제조시 초기 pH는 약 4.9정도이며, 이는 발효 진행과정 중 *Lactobacillus* 등의 미생물이 생산하는 산에 의해 약 pH 4.0이하로 저하하게 된다. 그러므로 김치에 이용되기 위해서는 발효 과정 중 생산되는 산에 의한 균의 사멸을 막기 위해 내산성을 가지고 있어

야 한다. 본 실험에서 사용된 *Bifidobacterium*은 pH 4.0에서도 내성을 가지는 균이다. *Bifidobacterium*의 선택적 증식을 위해서 초기 배추절임 과정 중 젖산소금을 처리하여 cot에 부착된 미생물을 감소시킨 후, *Bifidobacterium*을 초기에 105 cfu/g으로 첨가하였다. 발효 진행에 따라 *Bifidobacterium*은 약 106 cfu/g 이상으로 증가하였다. 비록 *Bifidobacterium*의 활발한 증가가 나타나지 않았지만, 완전 혐기성 조건이 아닌 미호기적 조건에서도 *Bifidobacterium*은 증가하였고, 또한 김치의 발효과정 동안 pH 저하 동안에도 완만한 증가를 보였다. 이와 같은 결과로서 완전 혐기적 조건이 아닌 김치에서 *Bifidobacterium*의 이용이 가능하고 이는 기능성 있는 김치의 제조 가능성을 제시해 준다.

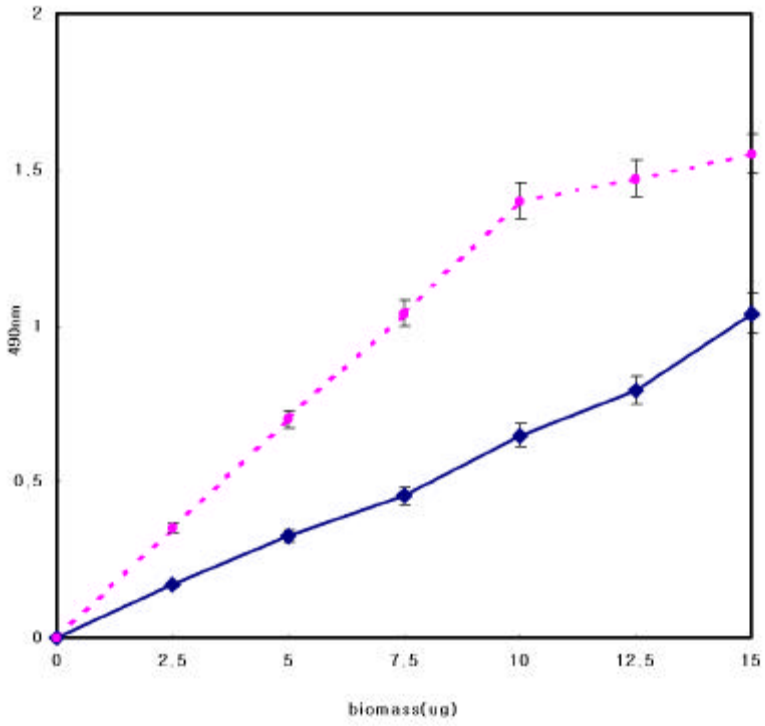


Fig. 17. A Standard curve for *B. longum* counts using Fructose-6-phosphate phosphoketolase.

···●··· : The Fructose-6-phosphate phosphoketolase of *B. longum* in kimchi juice

—◆— : The Fructose-6-phosphate phosphoketolase of *B. longum*

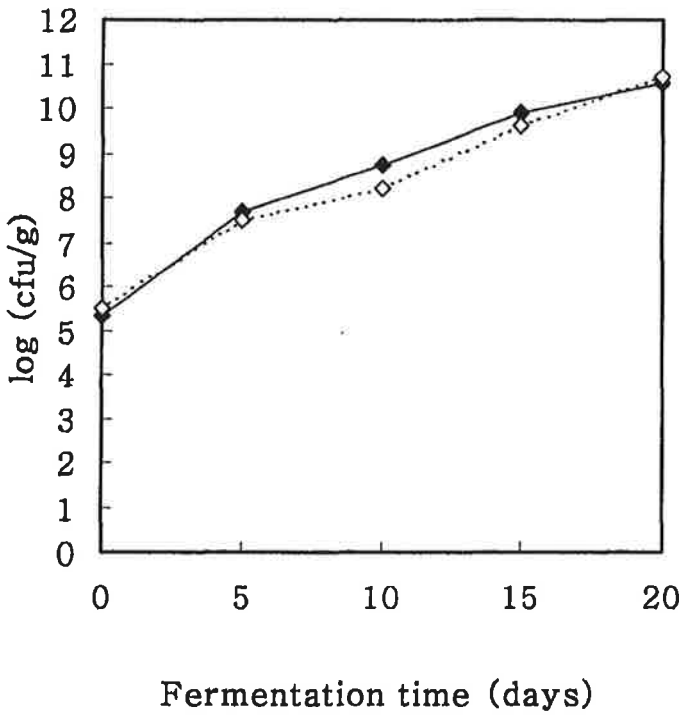


Fig. 18. Changes of total aerobes in kimchi during fermentation at 4℃

—◆— kimchi with Bifidobacterium

...◇... kimchi without Bifidobacterium

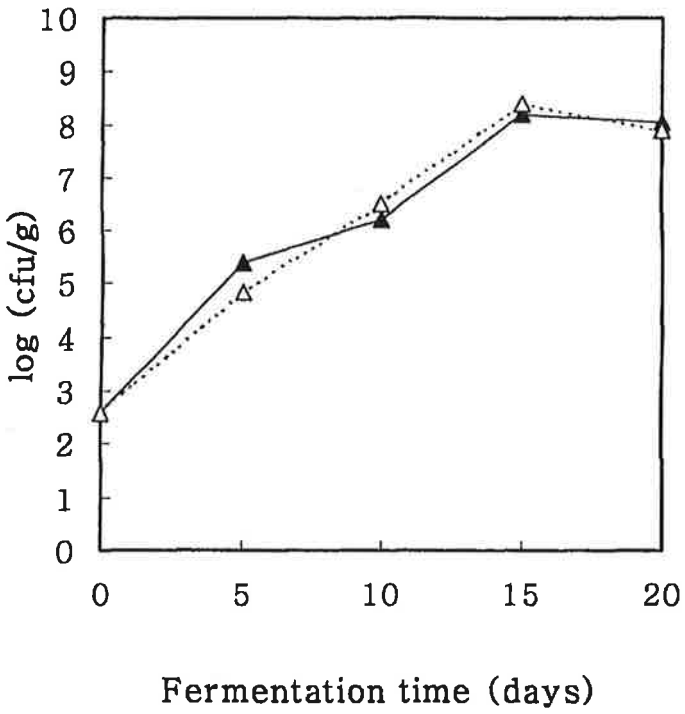


Fig. 19. Changes of Lactobacillus spp. in kimchi during fermentation at 4℃
—▲— kimchi with Bifidobacterium
...△... kimchi without Bifidobacterium

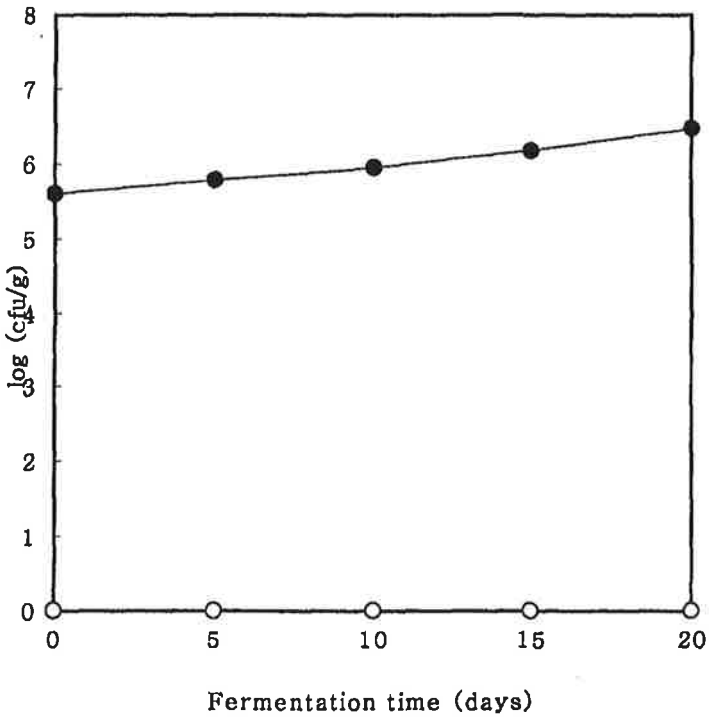


Fig. 20. Changes of *Bifidobacterium* in *kimchi* during fermentation at 4℃

—●— kimchi with Bifidobacterium

...○... kimchi without Bifidobacterium

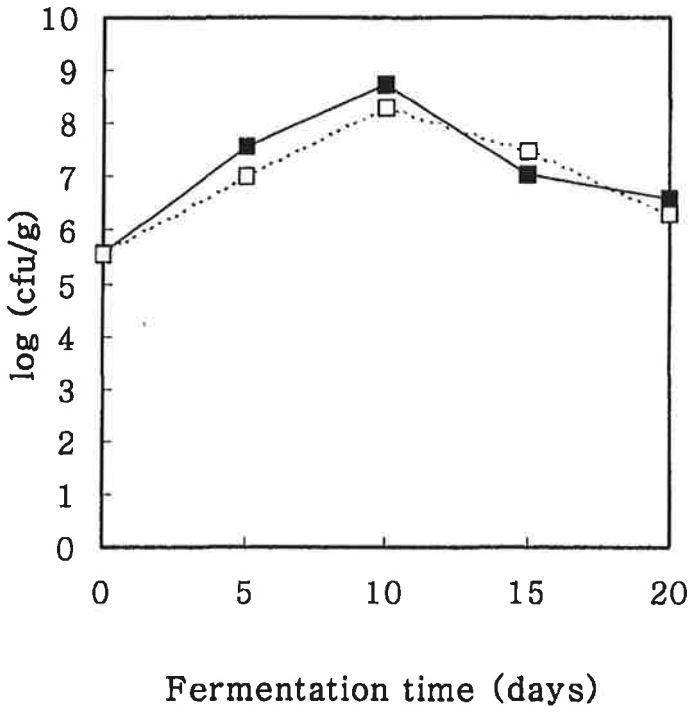


Fig. 21. Changes of Leuconostoc spp. in kimchi during fermentation at 4℃
—■— kimchi with Bifidobacterium
...□... kimchi without Bifidobacterium

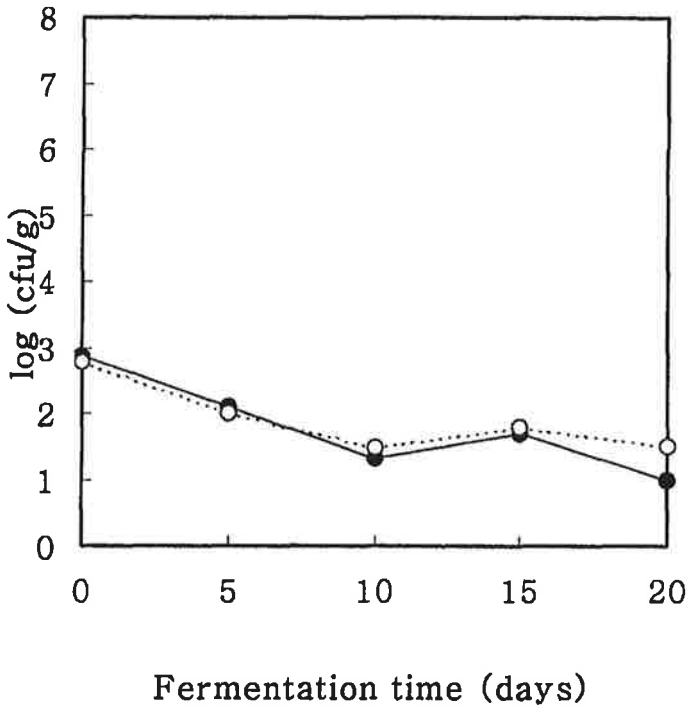


Fig. 22. Changes of yeasts in kimchi during fermentation at 4℃
—●— kimchi with Bifidobacterium
...○... kimchi without Bifidobacterium

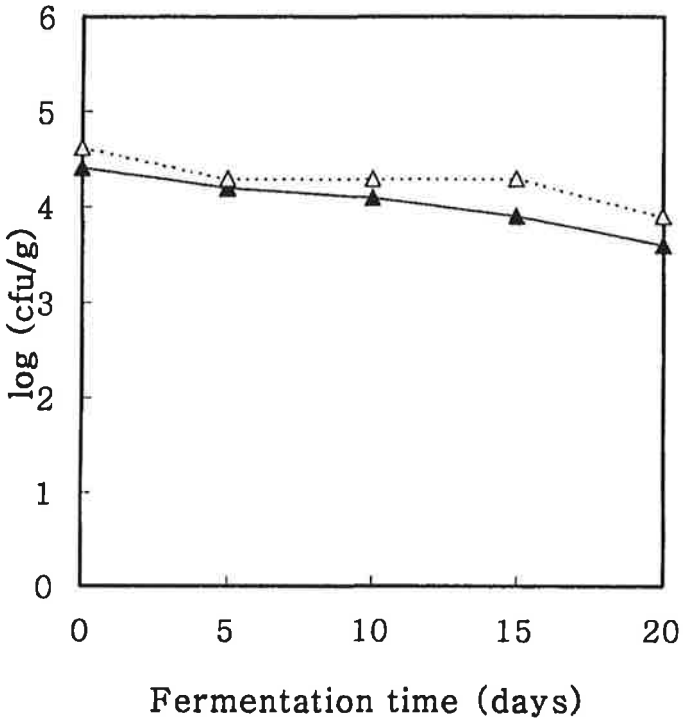


Fig. 23. Changes of coliforms in kimchi during fermentation at 4℃
—▲— kimchi with Bifidobacterium
...△... kimchi without Bifidobacterium

3) **발효과정 중 김치의 이화학적 검사**

김치 제조 초기 pH가 4.7로 김치 발효 초기부터 적숙기에 가까움을 보여주고 있다. 이는 두 시료에서 모두 발효 5일 경에 약간의 상승을 보였지만, 발효가 진행됨에 따라 서서히 감소됨을 알 수 있었다. 초기 pH는 일반 김치에 비해 낮았지만, 그 저하 속도가 둔화됨에 따라 확인할 수 있었으며, 초기에 낮은 pH는 본 실험에서 절임 과정에 이용한 젖산-소금에 의한 영향이라고 판단된다.

발효 과정 중 환원당의 변화는 두 군 모두 완만하게 감소하였지만, 전체적으로 무첨가군이 약간 더 높은 값을 유지하면서 변화하였다. 이는 첨가군에서 *Bifidobac- terium*에 의해 환원당이 더 많이 소모되었을 것이라고 사료된다.

두 군 간의 유기산 분석시 무첨가군보다 첨가군에서 lactic acid, acetic acid **생성이 더 두드러지게 나타났다. 일반적인 *Bifidobacterium*의 유기산**(A/ L) **생성비율은** 1.5 : 1**인데 본 실험의 결과에서는** 1 : 0**이하의 비율을 보이면서 전체적으로** lactic acid**의 생성이 두드러졌다. 이는 김치 발효시 *Bifidobacterium*에 의한 산생성이라기 보다는 일반 김치의 발효에 관여하는 *Lactobacillus*가 생산해낸 것이라고 생각된다.**

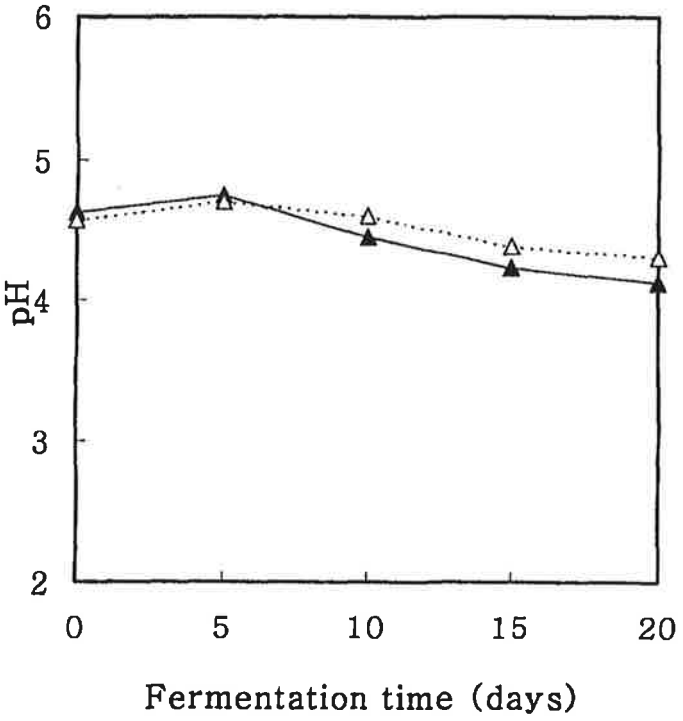


Fig. 24. pH changes of kimchi during fermentation at 4℃
—▲— kimchi with Bifidobacterium
...△... kimchi without Bifidobacterium

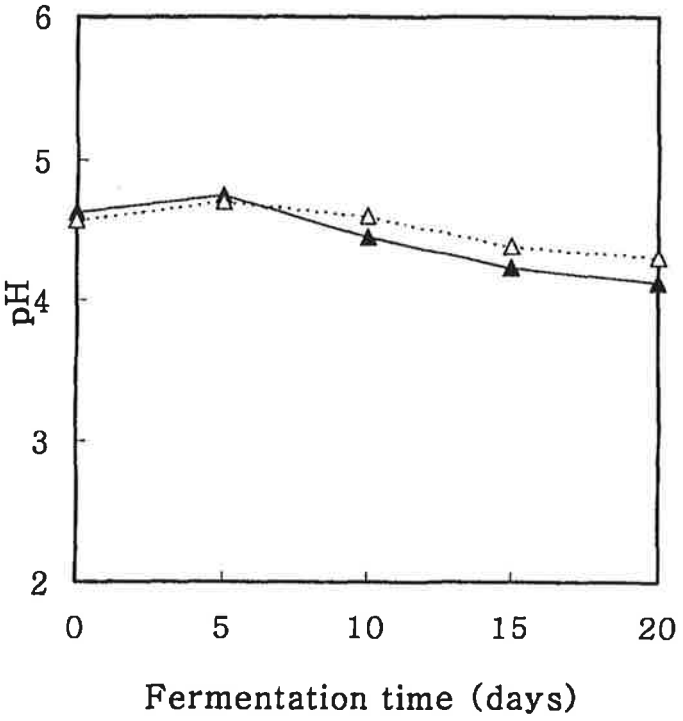


Fig. 24. pH changes of kimchi during fermentation at 4℃
—▲— kimchi with Bifidobacterium
...△... kimchi without Bifidobacterium

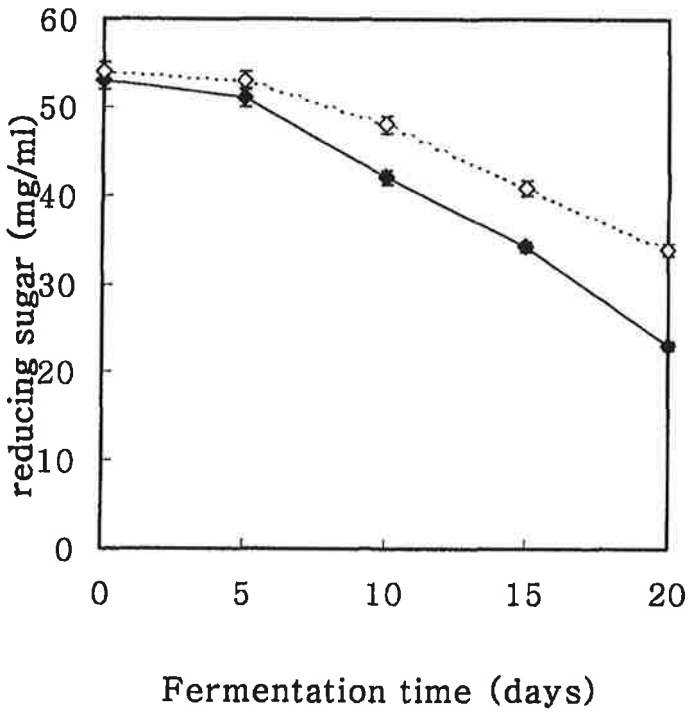


Fig. 25. Changes in reducing sugar content of kimchi during fermentation at 4℃

—◆— kimchi with Bifidobacterium

...◇... kimchi without Bifidobacterium

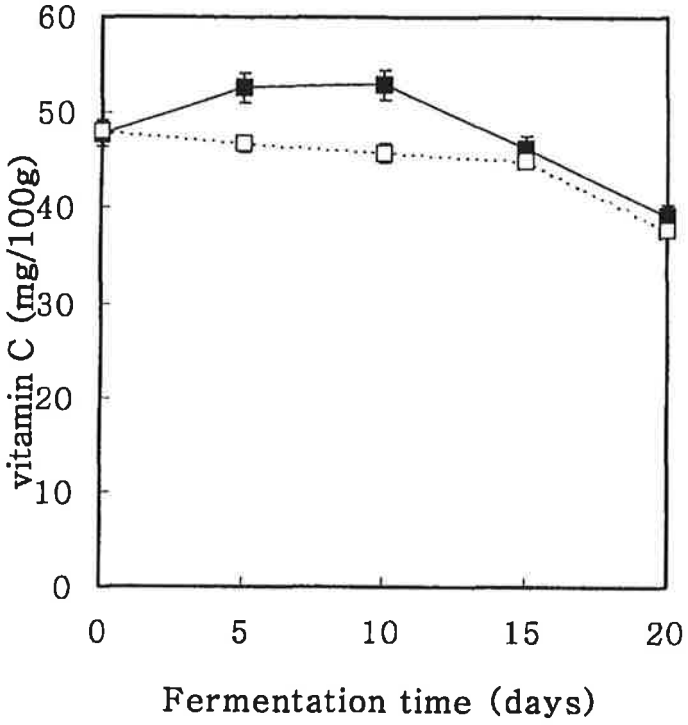


Fig. 26. Changes in vitamin C content of kimchi during fermentation at 4℃
—■— kimchi with Bifidobacterium
...□... kimchi without Bifidobacterium

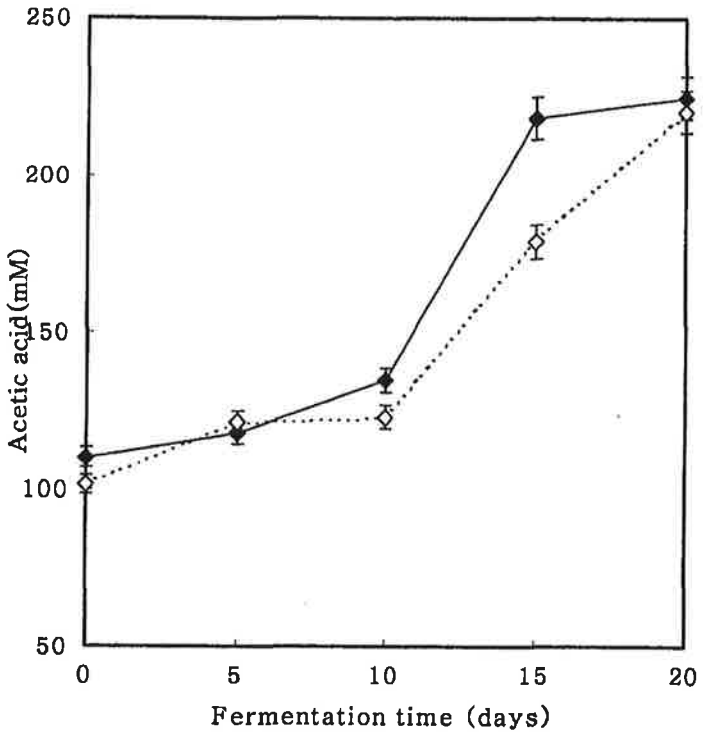


Fig. 27. Acetic acid content in kimchi during fermentation at 4℃

—◆— kimchi with Bifidobacterium

...◇... kimchi without Bifidobacterium

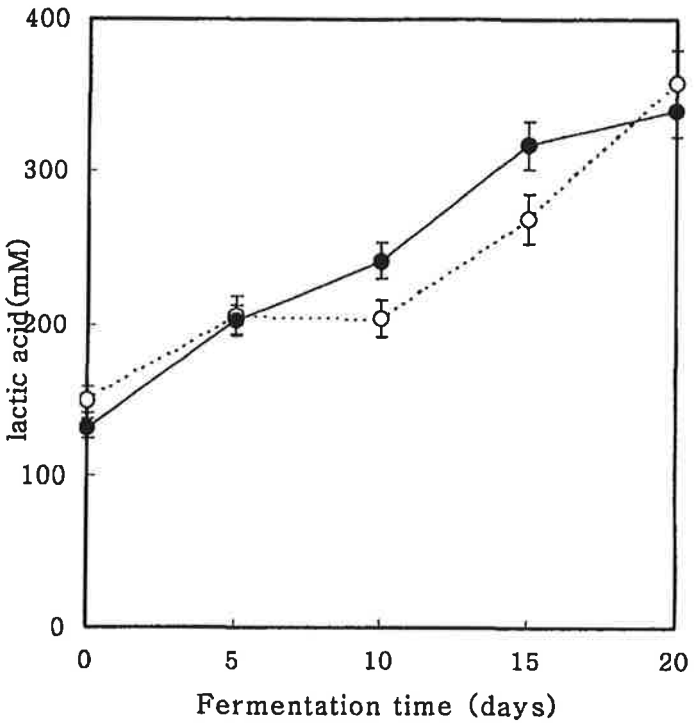


Fig. 28. Lactic acid content in kimchi during fermentation at 4℃

—◆— kimchi with Bifidobacterium

...◇... kimchi without Bifidobacterium

4) 김치의 관능검사

20일 발효 후 김치의 pH가 약 4.2가 되었을 때 냄새, 맛, 질감, 전체적인 기호도를 9점 평가법으로 평가하였다. 두 군 간의 색깔이나 매운맛에 있어서는 유의적인 차이를 보이지 않았으나, *Bifidobacterium* 첨가 군에서는 대조군보다 새콤한 맛냄새가 강하게 나타났고, 덜 익은 맛이나 풋내가 더 낮게 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 전체적인 기호도에서는 *Bifidobacterium* 무첨가 김치보다 첨가군이 더 높게 나타났다. 이는 첨가시킨 *Bifidobacterium* 이 발효과정 중 다량의 acetic acid를 생성하여 김치의 새콤한 맛에 영향을 주었다고 생각된다.

Table 28. Sensory sheet of score test of kimchi

관능검사 평가표

시료번호 :____ 일시 : 년 월 일 이름 :

앞에 제시된 각 시료를 색깔, 냄새, 맛, 질감, 종합적인 맛의 순서대로 평가하고 그 강도에 따라 해당하는 곳에 ○를 하시오.

색깔	**매우나쁨**		**조금나쁨**		**보통**		**조금좋음**		**매우좋음**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
냄새	**매우약함**		**조금약함**		**보통**		**조금강함**		**매우강함**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
신내									
풋내									
새콤한내									
맛	**매우약함**		**조금약함**		**보통**		**조금강함**		**매우강함**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
매운맛									
신맛									
덜익은맛									
새콤한 맛									
질감	**매우약함**		**조금약함**		**보통**		**조금강함**		**매우강함**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**
연함									
사각사각함									
질깃함									
종합적인 맛	**매우나쁨**		**조금나쁨**		**보통**		**조금좋음**		**매우좋음**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**

Table 29. Sensory score of kimchi with Bifidobacterium during fermentation at 4℃

Attributes	A	B
Color	5.38±2.13[1)]	6.00±1.00
Odor		
Acetic odor	3.25±1.03b[2)]	6.71±1.38a
Fresh cabbage odor	4.75±1.39a	3.00±2.16b
Fresh acidic odor	3.63±1.69b	6.57±1.52a
Taste		
Hot taste	3.63±1.19	4.71±1.25
Acidic taste	3.12±0.83b	6.00±1.73a
Fresh cabbage taste	4.50±2.33	4.86±2.79
Fresh sourness taste	2.88±0.99b	5.86±1.95a
Texture		
Softness	4.75±1.58	4.29±1.70
Fracturability	5.38±1.51	6.00±1.00
Chewiness	5.00±2.00	5.14±1.86
Overall acceptability	4.25±1.28b	5.71±0.49a

1) Mean±SD, Data were analyzed by independent t-test.

2) Different superscripts within a column indicate significant difference ($p<0.05$).

A : kimchi without *Bifidobacterium*

B : kimchi with *Bifidobacterium*

5) 위와 같은 결론을 요약하면 다음과 같다.

가) 김치 발효 과정 중 *Bifidobacterium*은 105 cfu/g에서 106 cfu/g 이상으로 증식하였고, *Bifidobacterium* 첨가군과 무첨가군에서 *Lactobacillus* 균수의 현저한 차이는 없었다.

나) 김치 발효과정 중 호기성 총균수는 *Bifidobacterium* 첨가군에서 약간 더 많았다.

다) 환원당은 *Bifidobacterium* 첨가군에서 발효 초기에 더 높았으나, 발효 15일 경과 후에는 더 낮은 경향이었다.

라) 김치 발효 초기에는 *Bifidobacterium* 첨가군의 pH가 더 높았으나, 발효가 진행됨에 따라 pH의 감소정도가 더 컸다.

마) 제조된 김치는 *Bifidobacterium* 첨가군이 종합적인 맛에서 더 좋게 평가되어 앞으로 산업화의 가능성이 있는 것으로 사료된다.

5. 김치의 신발효법 개발

새로운 김치의 발효방법은 전통적인 김치제조 방법과는 달리 절임 배추와 김치 속을 제조하여 분리 저장하면서 필요에 따라 즉석에서 기호에 맞는 김치를 제조하는 방법이다. 저장 배추가 저장 기간 중에 일어나는 변화는 유산균에 의해서 젖산이 만들어지면서 pH는 저하되고 산도는 증가하게 된다. 김치의 유통기한이 짧은 단점을 보완하면서 김치의 질적 향상을 위해서 배추와 김치 속의 각개 발효시 식용 젖산을 적용하였으며, *Lactobacillus*를 양념 발효 시에 스타터로 사용하여 그 영향을 검토하였다.

가. 배추의 각개 발효법 연구

실험군의 pH는 발효 0시간째에 pH 6부근에서 서서히 감소하여 발효 7일 정도에 적숙기로 생각되는 pH 4부근까지 감소하였으나 대조군에서는 발효 7일 정도에 pH 5까지 감소하다가 다시 증가하였다(Fig. 29). HPLC를 이용해서 배추내의 유기산을 분석한 결과 소량의 lactic acid와 oxalic acid가 존재할 뿐 유기산의 큰 변화나 특성은 관찰할 수 없었다(data not shown). 이에 의해서 김치의 유기산생성 발효는 양념발효에 의해 좌우됨을 예측하였다. 염농도(%)의 변화는 대조구와 실험구가 비슷하게 증가하였고, pH에서와 마찬가지로 발효 7일 정도에 김치의 적정 염농도로 잘 알려진 3%가 되었다(Fig. 30).

균수측정: 단계적으로 희석한 배추즙액을 총균수 계수배지(TS medium)와 젖산균 분리용 배지(MRS medium), 대장균 분리용 배지(DHL medium)에 pouring curture method로 접종하여 균주 변화를 살펴보았다. 총균수와 젖산균수의 변화 양상이 같은걸로 봐서 배추발효에 관여하는 균주는 거의가 젖산균임을 알 수 있었고, 대조군과 실험군의 비교에서 대조군보다 실험군에서 젖산균은 5일 가량 증식이 느려지는 효과가 있었다(Fig. 31, 32).
대장균의 변화에서 초기 배추내의 대장균수는 상용 log로 환산하여 4와 5 사이였으며, 대조구는 발효 5일째에 log 8까지 급격히 증가하는 경향을 보였고, 실험구는 발효초기부터 서서히 감소하는 경향을 보여 발효 7일째에 log 3까지 대장균수가 감소하였다(Fig. 33).

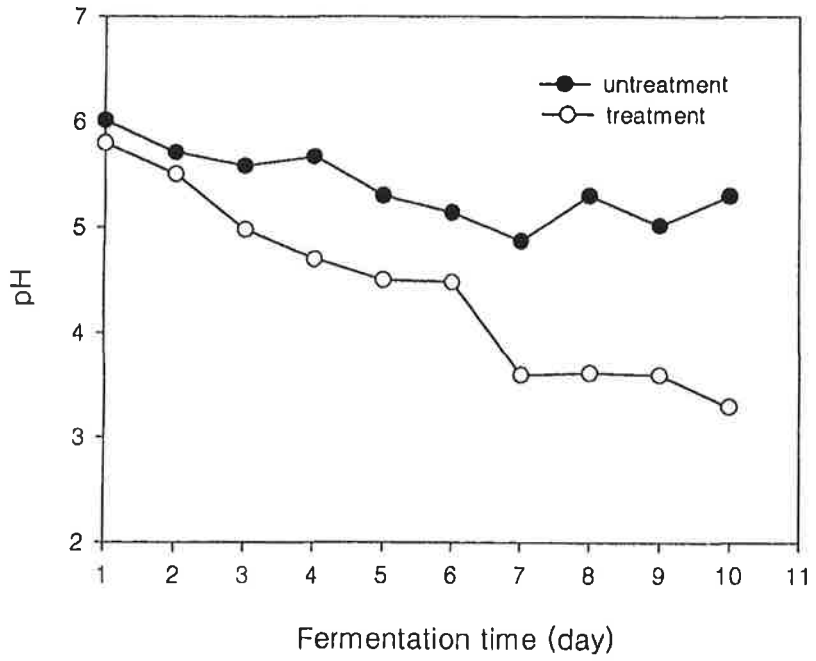


Fig. 29. The change of pH in cabbage during fermentation period.

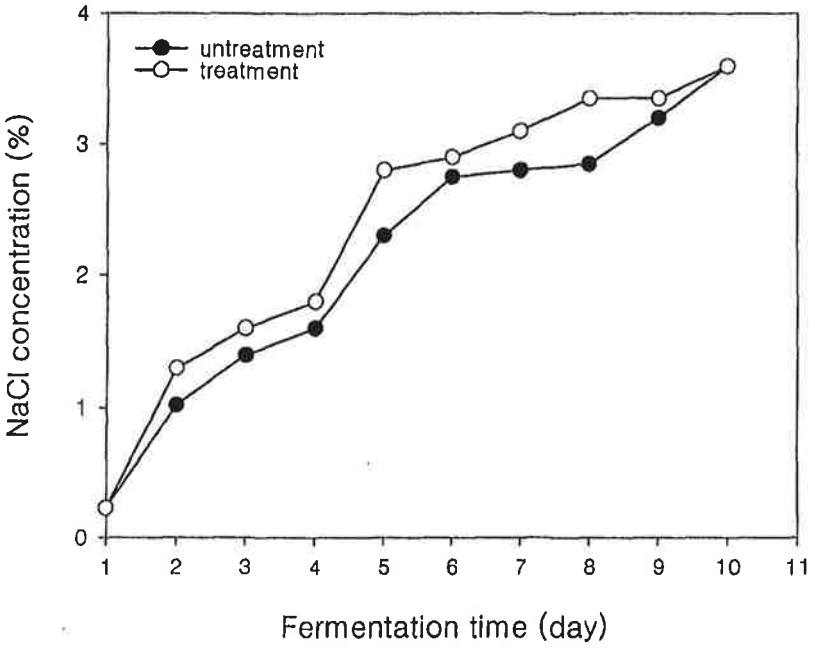


Fig. 30. The change of salt concentration in cabbage during fermentation period.

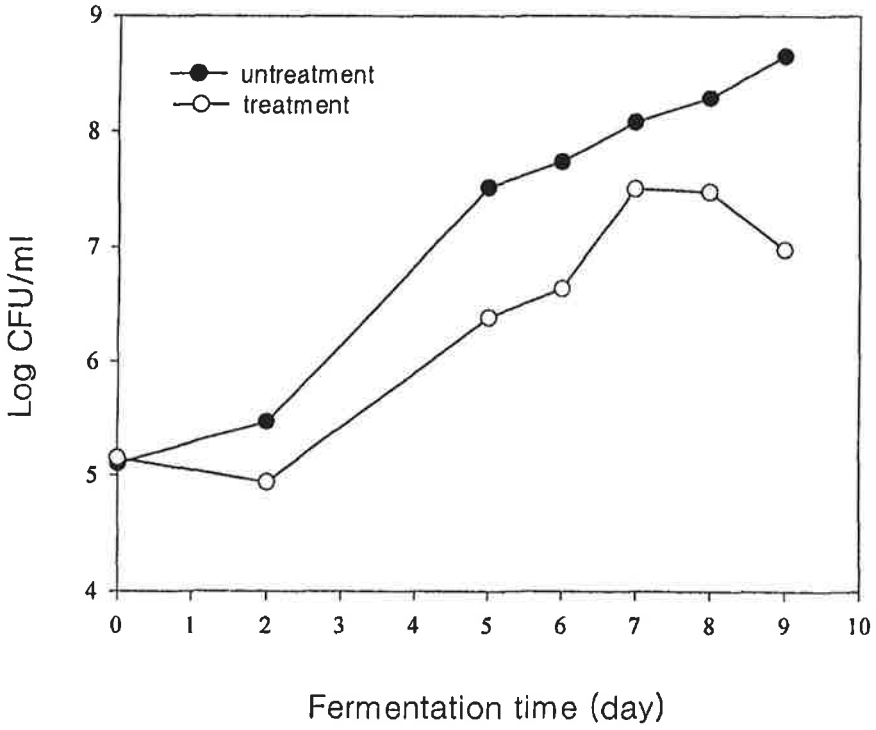


Fig. 31. Comparisons of total microbial profile between untreatment and treatment during cabbage fermentation

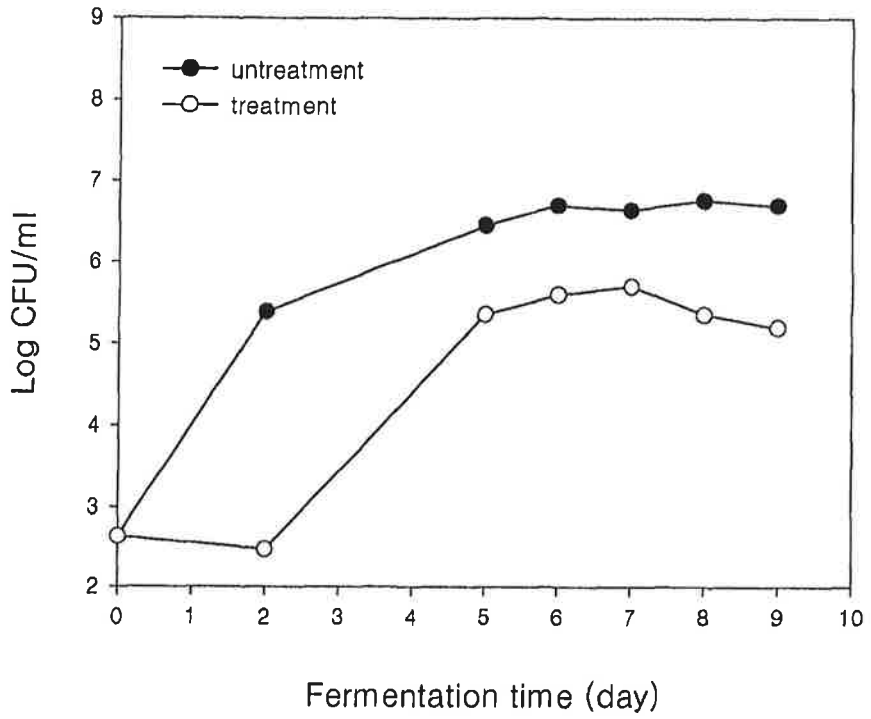


Fig. 32. Comparisons of *Lactobacillus* profile between untreatment and treatment during cabbage fermentation

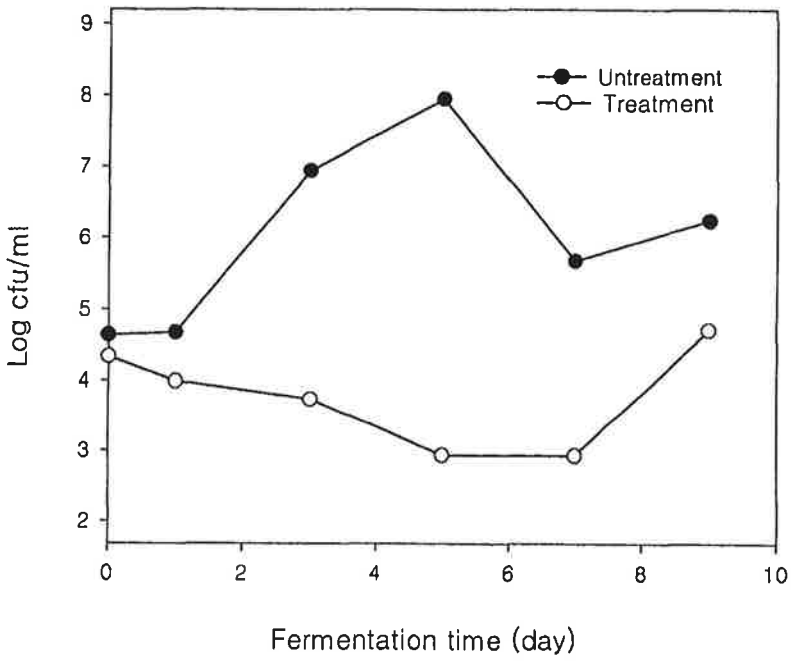


Fig. 33. Comparisons of *E. coli* profile between cabbage treated lactic acid and untreatment during cabbage fermentation.

배추의 색변화: 염으로만 처리한 배추 발효액과 염과 젖산을 동시에 처리한 발효액에서 배추의 단독 발효시 배추의 색을 관찰해 본 결과, 발효 경과 7일째 젖산을 처리한 실험구에서는 발효 액으로의 배추내 색소유출이 적어서 배추와 발효액의 색 변화가 거의 없었다. 이에 반해 대조구에서는 거의 모든 색소가 유출되어서 Photo. 1에서 보여 주듯이 미관상 좋지 않은 시들시들한 배추로 변했다. 발효 전반에 걸친 배추와 배추 발효액의 색 변화를 색도계 (Spectro colorimeter JS555 Tokyo, Japan)로 측정한 결과는 Fig. 35, 36에서 보여주고 있으며, 배추 발효액에 젖산을 첨가하지 않은 대조구를 untreatment라 하고 젖산을 처리한 실험구를 treatment라 하였다. 발효경과에 따른 배추 색의 변화를 보여주고 있는 Fig. 35에서 untreatment와 treatment 의 차이점을 살펴보았다. 발효 10일째에 색의 변화율을 나타내는 E값이 untreatment는 30이며 treatment는 10임을 보여주는데 이는 젖산을 배추 발효시에 첨가함으로 인해서 배추 색의 유지력을 높여줌을 말해준다. 밝기를 나타내는 'L'값이 발효 10일째 untreatment는 30으로 배추의 밝기가 급격히 높아졌고, treatment는 -10으로 큰 변화는 없었다. 이것은 젖산처리에 의해 조직이 연화되어 배추조직 외부로의 색소 유출을 느리게 함에 따라 treatment는 거의 밝기에 변화가 없으나, 대조구는 발효액으로의 색소 유출로 인해서 조직의 밀도가 떨어지면서 밝기가 급격히 증가하였다. 적색을 나타내는 'a'값의 차이는 거의 없었으며, 'b'값은 untreatment가 발효 10일째에 5였으며 treatment는 -5를 보였다. 이는 대조구에서 갈변화가 일어남을 가시적으로 보여줌을 확인할 수 있다. Fig. 36에서는 untreatment와 treatment 발효액의 색 변화를 보여 주고 있다. 밝기의 변화율에서는 untreatment가 40에 약간 못 미쳤으며 treatment는 45까지 증가하였고, 황색을 나타내는 'b'값의 변화에서는 untreatment가 20 까지 증가하는 반면 treatment 10에도 못 미치는 것을 볼 수 있다. 적색을 나타내는 'a'값은 untreatment와 treatment 모두 변화가 거의 없었다. Fig. 35와 36에서 보여주는 이러한 색 변화의 양상은 젖산이 발효액에 첨가됨으로 해서 pH를 저하시켜서 배추 자체에 가지고 있는 효소와 미생물에 의해 생성되는 조직을 연화시키는 효소의 작용을 억제하는 것에서 기인하는 것으로 생각 할 수 있다.

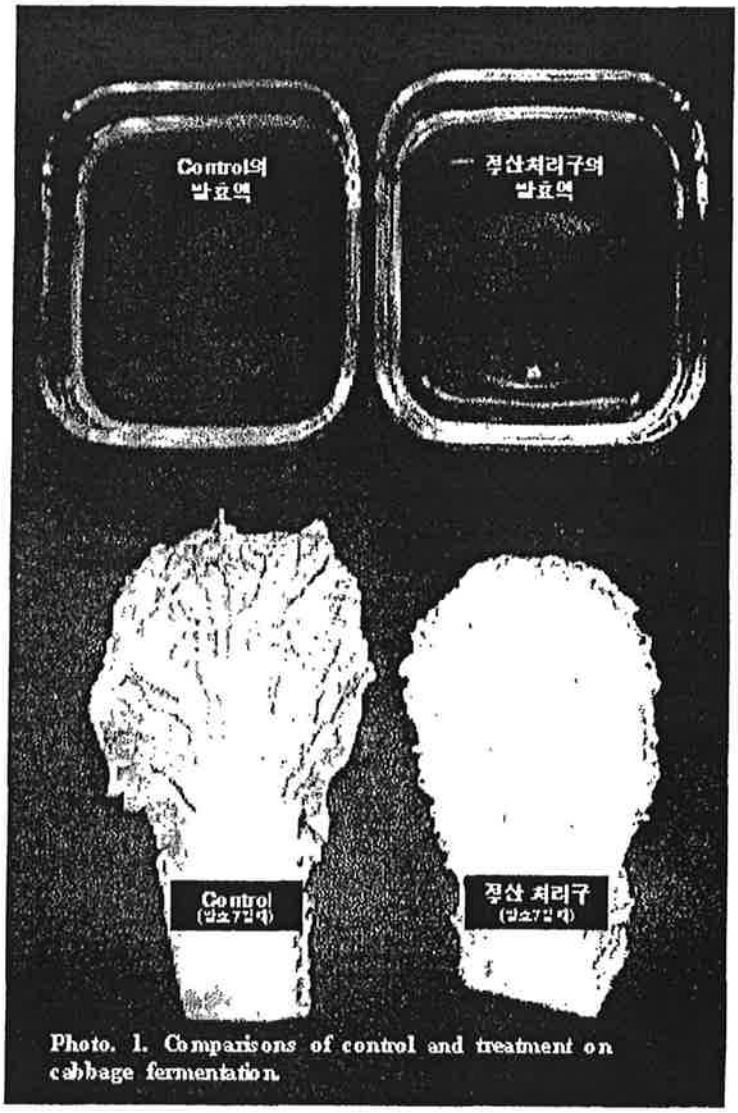


Fig. 34. Comparisons of control and treatment on cabbage fermentation

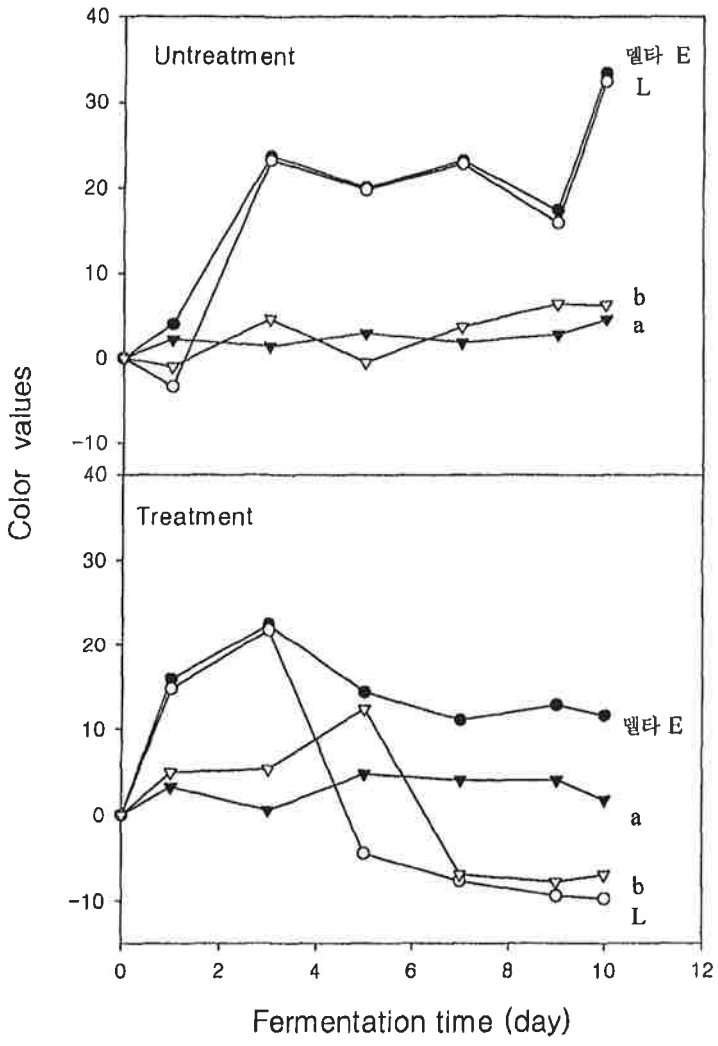


Fig. 35. Changes in color values of cabbage fermentation
델 타 E: 변화 율, 'L': 밝 기 , 'a': 적 색 -녹색 , 'b': 황 색 -청 색

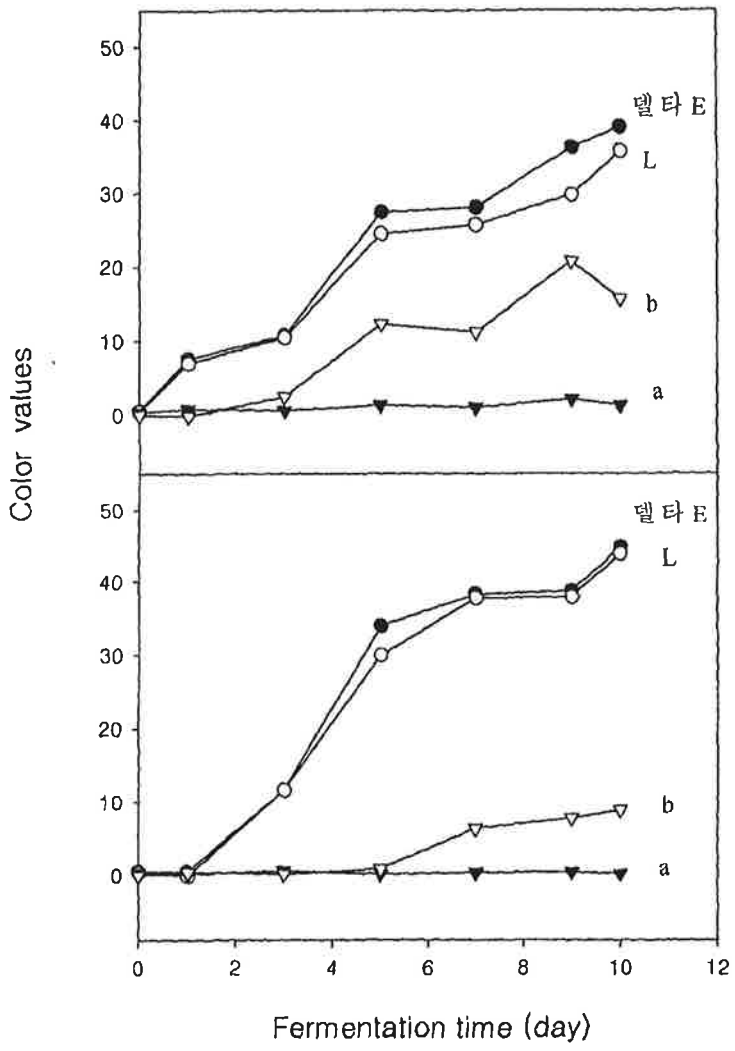


Fig. 36. Changes in color values of fermentation solutions on cabbage fermentation. 델타 E: 변화 율, 'L': 밝 기
'a': 적 색 - 녹색, 'b': 황 색 - 청 색

조직의 변화: 과채류의 조직을 결정하는 주요 구성물질은 주로 펙틴(pectin)과 목질소(lignin)이다. 펙틴은 다당류로서 methyl ester화정도, 사슬의 중합도 등에 따라 채소나 과실류의 전체적인 조직감이 달라진다. 따라서 펙틴물질은 과실, 채소의 조직에 매우 중요한 역할을 하며 품질결정에도 중요하게 취급되는 것이 바로 이 때문이다. 펙틴물질은 생화학적으로 변하여 재료의 조직감 특성에 크게 영향을 미치는데, 미숙(未熟)한 녹색과일의 상태일 때는 사슬의 중합체가 길고 불용성 protopectin이 많아 다소 딱딱하고 경고한 조직을 형성하지만 성숙(成熟)하면서 protopectinase 효소에 의해 protopectin이 가수분해되어 수용성 pectin 으로 변함으로서 조직의 연화가 일어난다. 만약 야채를 중성용액 중에서 가열하면 조직은 부드럽게 된다. 이것은 β-탈리 (transelimination)에 의해 펙틴의 glycoside 결합이 끊어지기 때문이다. 그러나 연근, 우엉, 감자 등을 식초에서 담가둘 경우 조직은 부드럽게 되지 않고 딱딱하게 씹히는 느낌을 가지게 되는데, 이것은 약산성에서 탈리현상에 의한 분해가 일어나지 않기 때문이다. 펙틴은 가열용액에서 pH 7.1에서는 빠르게 pH 6.3에서는 서서히 탈리 현상에 의해 분해되며 pH 4.1 에서는 반응이 나타나지 않는다. 이러한 발효시의 배추 조직의 안정성의 효율을 높이기 위한 방안으로 젖산을 처리하여 발효과정 중의 조직변화를 살펴보았다. 배추의 조직감을 알아보기 위하여 TAXT2i Texture Analyser (MHK Trading Co., English)를 이용하여 Compression test (압축시험)에 의해 TPA (Texture Profile Analysis) 분석을 하였다. 분석항목은 Fractuability (파괴강도), Hardness (경도), Chewiness (씹음성), Guminess(검성)의 4가지 항목에 대해서 조사하였다. 시료는 5% 염농도의 발효액 (untreatment)과 배추와 5% 염농도와 0.25%(pH 2.5) 젖산이 첨가된 발효액 (treatment)에서 각각 배추를 겉잎과 속잎을 제거한후 줄기 끝부분과 잎 부분을 제거한 나머지 부분만을 일정량씩 발효액에 침지시켜 20에서 발효하면서 2 일 간격으로 sampling 하여 TPA 분석을 하였다. 분석결과 Fig. 37에서 보여주듯이 배추의 발효시 젖산의 처리에 의한 pH의 저하로 인해서 배추조직을 연하게 만드는 효소의 작용을 억제함으로서 대조구에 비해서 경도의 완만한 감소를 볼 수 있었으며 발효 2일째에 파괴강도가 대조구는 1.5에서 5 Kg까지 증가했다가 감소하데 비해 실험구에서는 1,5에서 2 Kg의 완만한

증가 있었다. 이러한 결과에서 배추발효시 젖산 처리에 의해 발효초기의 급격한 조직의 변화를 막아주면서, 발효 전반적인 배추의 조직 연화를 지연 시킬 수 있으리라 예측할 수 있다.

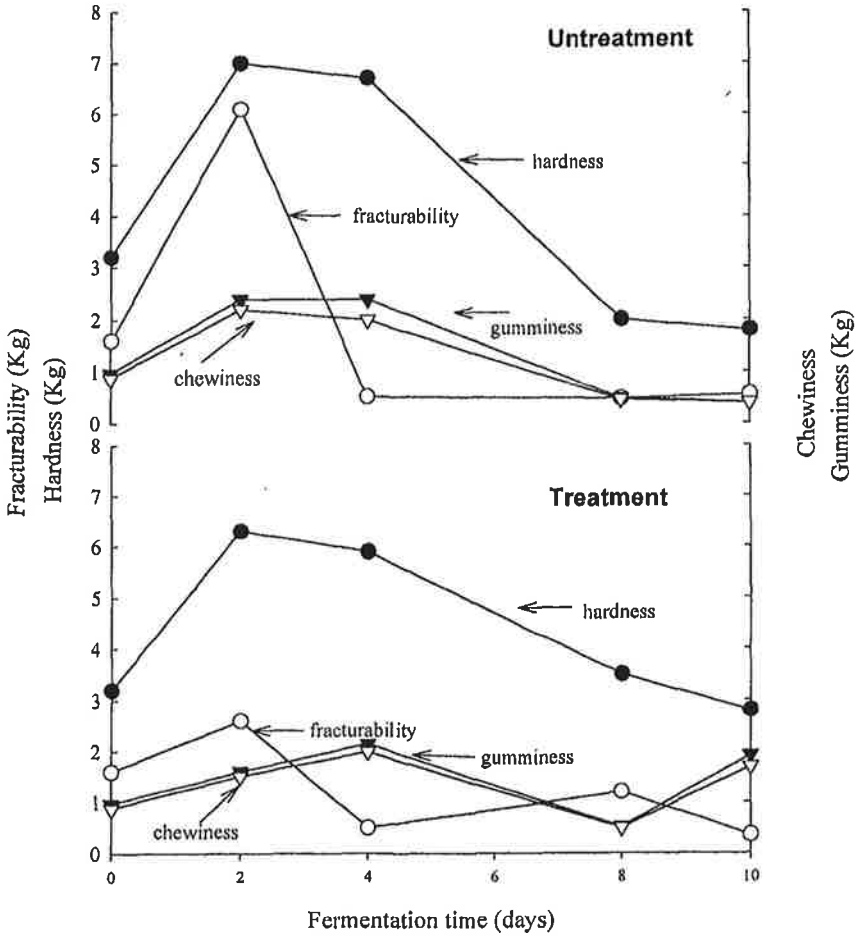


Fig. 37. Texture profile parameter of Chinese cabbage during fermentation in salt solution and lactic acid added solution fermentation solution is added 5% NaCl and adjusted pH 2.5 as lactic acid.

조직과 관련된 효소에 관한 연구: Pectin 또는 pectinic acid는 그 분자속의 유산기의 일부가 methyl ester로 되어 있는 polygalacturonic acid인데, 적당한 산과 당이 존재하면 겔을 형성하는 성질을 가진 물질이다. 또 펙틴물질은 펙틴분해효소에 의해 분해되어 조직의 연화를 가져오는 물질로 여기에 관여하는 주요 효소로는 polygalacturonase(poly-α-1,4-galacturonide glycanohydrolase)와 pectinesterase(pectin-pectyl hydrolase)가 있다. Pectinesterase는 펙틴의 methylester group을 가수분해하는 효소로 탈메틸화(deesterification)에 참여하는 효소이다. 이 효소의 특징은 다가 이온이 존재할 때는 과실이나 채소의 조직이 단단해진다. Polygalacturonase는 펙틴의 α-1,4 결합을 불규칙적으로 가수분해하여 펙틴분자, 즉 polygalacturonic acid 분자의 크기를 감소시킨다. 실제 식품가공에서는 과실이나 채소를 가열처리하는 경우가 많은데, 이 경우 protopectin과 pectin의 중간체의 분해 (depolymerization)가 촉진되어 조리에 따른 조직의 변화가 초래된다.

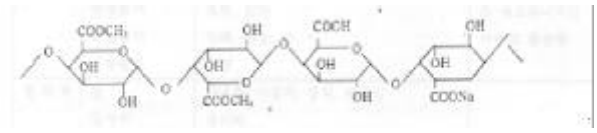


Fig. 38. Polygalacturonic acid의 구조

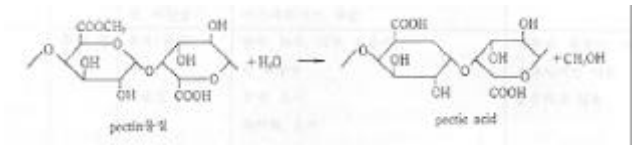


Fig. 39. 펙틴물질의 탈메틸화 반응

배추 맛의 중요한 요소인 조직의 변화를 완화하기 위한 방안의 일환으로 배추 발효시 젖산을 처리하여 조직 관련 효소인 PG와 PE의 변화 양상을 살펴보았다. PG의 추출은 1M NaCl과 함께 마쇄하여 24시간 침출한 후 황산암모늄으로 75%까지 포화시켜 투석하였고,

PE는 0.1M phosphate 완충용액(pH 8.0)과 함께 마쇄하여 24시간 침출하고, 원심분리한 후의 상등액을 효소액으로 하였다. PG의 활성은 dinitrosalicyclic acid (DNS)법에 의한 변색법으로 측정하였으며, PE는 titrimetric assay 법으로 활성을 측정하였다. 배추의 각개 발효를 수행 하여 Fig. 40.의 standard curve를 이용해서 PG의 역가를 측정한 결과는 Fig. 41.에서 보여주고 있다. 그림에서 보이듯이 젖산 처리구보다 젖산을 처리하지 않은 대조구의 PG 역가가 두배가량 높게 나타났다. 이 데이터에 의해 조직감 실험 결과에서와 마찬가지로 젖산처리에 의해 조직의 연화현상을 완화 시킬 수 있음을 확인 할 수 있었다.

이는 젖산에 의해서 조직 연화 관련 효소를 생성하는 미생물의 생육을 저해함으로서 나타나는 현상으로 생각된다.

Fig. 42, 43은 배추의 발효를 10일동안 수행하면서 2일 간격으로 PE와 PG의 역가를 측정하여 발효 전반적인 효소의 변화 양상을 비교한 그림이다. PE와 PG의 역가에 있어서 젖산 처리구가 무처리구보다 다소 낮게 나타남을 확인하였다.

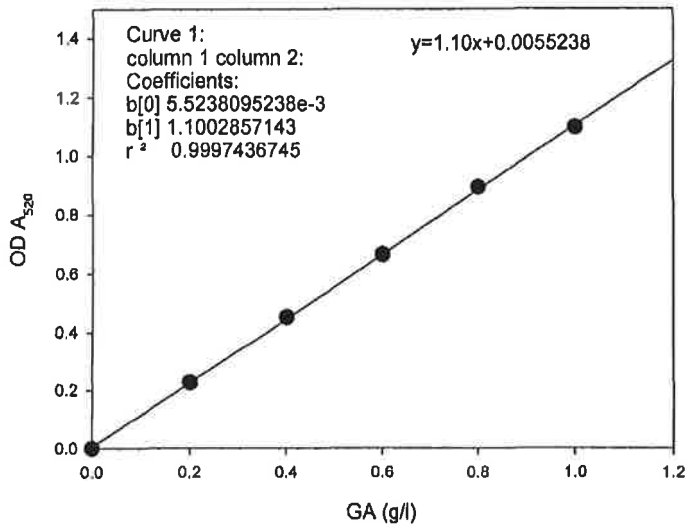
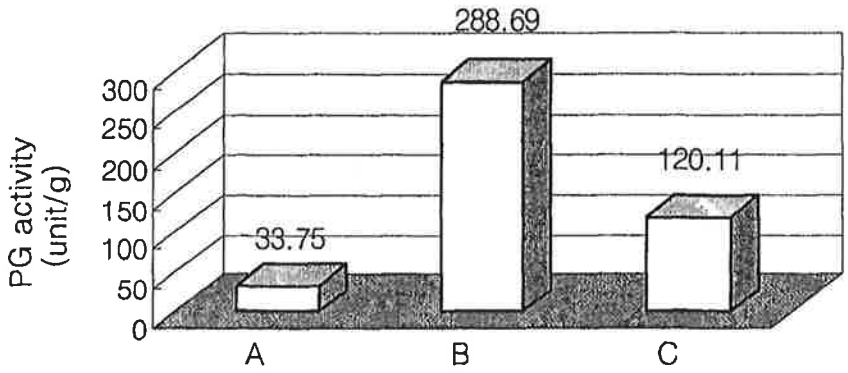


Fig. 40. Galacturonic acid standard curve



A: Law cabbage
B: Untreatment(10일발효)
C: Treatment(10일발효)

Fig. 41. 배추 단독 발효 후의 polygalacturonase의 역가측정.

나. 배추 단독 발효시의 균주 적용 연구

본 연구에서는 전통적인 김치제조법과는 달리 배추의 절임 저장과 함께 김치 속을 분리하여 발효 저장한 후에 소비 직전에 두 가지를 혼합하여 제조하는 변형된 김치의 저장법의 가능성을 위한 예비과정으로서, 젖산균과 염, 젖산을 이용한 저장배추의 기호도를 조사하였다. Table 30에서 보는 바와 같이 젖산균의 접종이 없이 절인 배추를 저장하는 경우 저장 4일 후부터 맛이 급격하게 나빠져 먹을 수 없는 상태가 되었으나 젖산균을 접종한 Table 31과 Table 32의 결과에서는 저장 4 일 후에도 맛이 나빠지지 않았으며 BA 균주를 접종한 경우 맛은 오히려 저장기간이 지날수록 향상되었다. flavor 역시 젖산균을 접종한 두 실험구에서 모두 좋았으나 color의 경우 대조구와 마찬가지로 *Lactobacillus* sp. HL-48 균주를 접종한 실험구에서도 3일 째부터 색이 안 좋게 변하였으나 향 미생물성 물질을 생산하는 BA-8 균주를 접종한 경우에는 산막효모(film yeast)나 곰팡이의 번식이 다른 실험구와는 달리 잘 자라지 못하여 저장 8일 후 까지도 색깔의 변화가 없었다. 맛이나 향미보다 색깔의 변화(Fig.44, Fig. 45, Fig. 46)는 저장배추의 상품성을 판단하게 하는 외관상의 기호도를 나타내주는 중요한 변수이므로 색깔의 변화 없이 가장 오랜 기간 품질을 유지하는 BA-8 균주를 이용한 배추의 저장에 관한 연구가 더욱 요청된다고 하겠다. 그러나 8일 이후에는 산막효모(film yeast)나 곰팡이의 번식으로 인하여 기호성이 저하되었다. 이것은 유산균들이 생산하는 bacteriocin이 장내세균들인 Gram 음성균과 곰팡이 등의 생육을 완전하게 억제하지 못한다고 한 하(13)의 보고와 일치하였으며, 또한 젖산균의 접종효과를 알아보기 위하여 10 이하의 저온이 아닌 20 에서 실험하여 저장기간이 길지 않았기 때문이다. 추후 더욱 낮은 온도에서의 실험도 필요하리라 여겨진다.

그러나 BA-8 균주를 사용한 경우에는 다른 실험구와는 달리 저장 8일 이후에도 절임 배추의 저장성을 해치는 산막 효모나 기타 곰팡이들의 포자가 가장 적게 나타나 맛과 향미(flavor), 색깔도 가장 우수하였으므로 이 BA-8 균주의 특성 및 이 균주가 생산하는 bacteriocin의 특성에 관한 연구가 필요하며 이 균주를 이용한 절임 배추의 저장성 증진에 관한 연구가 기대된다.

Table. 30 Sensory evaluation of salted cabbage without inoculation of Lactic Acid Bacteria by hedonic scale.(1)

parameter \ day	0	1	2	3	4	5	6	7	8
taste	3.00	2.80	3.33	2.78	2.38	2.40	2.60	2.48	2.23
flavor	3.00	2.55	2.90	3.08	3.15	3.18	3.30	2.98	2.73
color	3.00	2.88	2.75	2.72	2.70	2.60	2.35	2.31	2.28

1) Each value represented the mean of 10 observation using on hedonic scale of 1 (dislike very much) to 5 (like very much).

Table. 31 Sensory evaluation of salted cabbage with *Lactobacillus* sp. HL-48 by hedonic scale[1].

parameter \ day	0	1	2	3	4	5	6	7	8
taste	3.00	3.15	3.78	3.40	2.90	2.70	3.60	3.29	2.90
flavor	3.00	3.20	3.20	3.34	3.48	3.65	3.73	3.42	3.10
color	3.00	3.00	3.20	2.76	2.38	2.18	2.18	2.09	2.03

1) Each value represented the mean of 10 observation using on hedonic scale of 1 (dislike very much) to 5 (like very much).

Table 32. Sensory evaluation of salted cabbage with Lactobacillus strain BA-8 by hedonic scale.(1)

parameter \ day	0	1	2	3	4	5	6	7	8
taste	3.00	3.03	3.43	3.54	3.63	3.70	3.88	3.47	3.25
flavor	3.00	3.25	3.38	3.43	3.55	4.05	3.98	3.32	3.18
color	3.00	3.20	3.53	3.50	3.48	3.45	3.50	3.22	2.95

1) Each value represented the mean of 10 observation using on hedonic scale of 1 (dislike very much) to 5 (like very much).

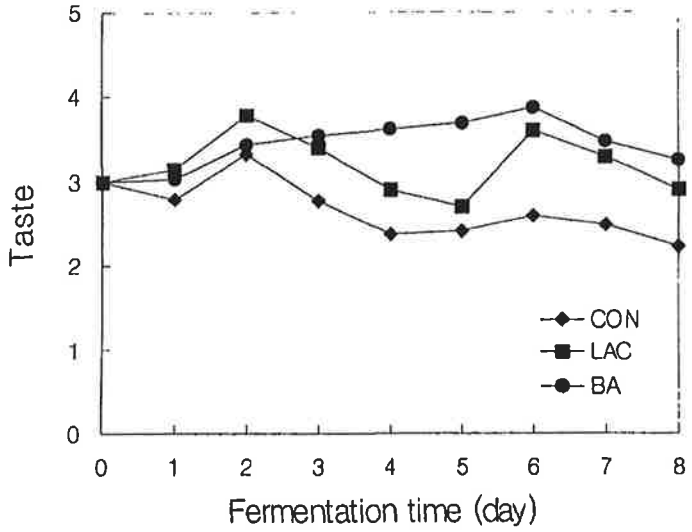


Fig. 44. Changes of taste of salted cabbage on the addition of lactic acid bacteria. (-◆ control ; -■- Lactobacillus sp. HL-1 ; -●- Lactobacillus strain BA)

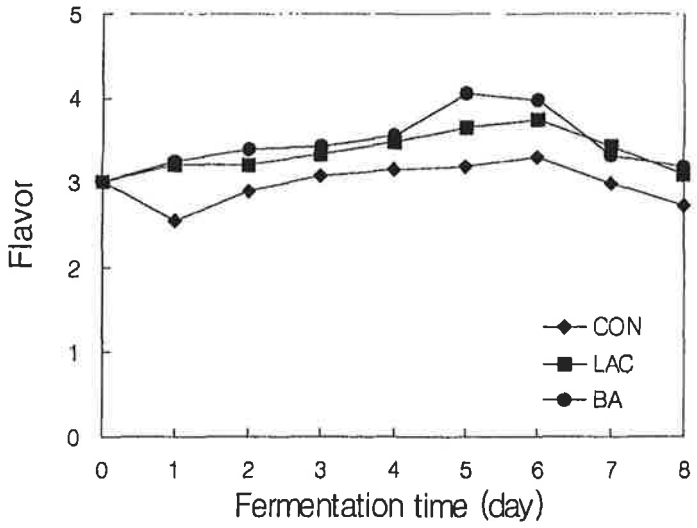


Fig. 45. Changes of flavor of salted cabbage on the addition of lactic acid bacteria (-◆- control ; -■- Lactobacillus sp. HL-1 ; -●- Lactobacillus strain BA)

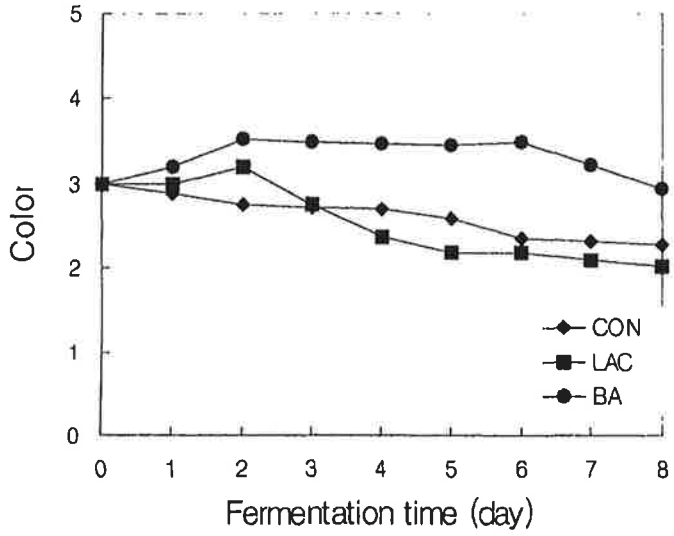


Fig. 46. Changes of color of salted cabbage on the addition of lactic acid bacteria. (-◆ control ; -■- Lactobacillus sp. HL-1 ; -●- Lactobacillus strain BA)

나. 부원료의 각개발효 기법 연구

부원료들의 영향: 각각의 부원들을 따로 발효시키면서 비교해본 결과 Fig. 47에서 보여주듯이 대조구에 비해서 새우젓과 당, 스타터 첨가구에서는 양념내 유산균의 증식이 높은데 반해 소금 첨가구에서는 증식이 낮았다. 이에 따라 소금 첨가구의 pH 변화는 다른 모든 양념구에 비해 서서히 pH도 낮아졌다. 유기산 변화는 HPLC로 조사하였으며, 전처리는 solid phase extraction cartridge로 처리하여 양념의 색소를 제거한 후 0.2 pore disk-type filter로 여과하여 분석 시료로 사용하였다. 그 결과 김치 양념은 lactic acid, malic acid, citric acid, succinic acid, oxalic acid를 포함하고 있었으며, citric acid는 발효 전반에 있어서 감소하였고, 그 외의 유기산들은 증가하는 경향을 보였다(Table 33).

Table 33. The change of other organic acids concentration during Kimchi-seasoning fermentation. (㎎/㎖)

유기산 / day / sample	Lactic acid						Acetic acid						Malic acid					
	0	3	6	9	12	15	0	3	6	9	12	15	0	3	6	9	12	15
1	39.15	38.33	280.5	455.2	524.6	861.7	-	-	6.176	13.52	18.29	40.83	16.56	2.596	14.93	27.11	32.17	37.39
2	123.2	68.52	68.45	135.9	161.4	314.4	-	-	-	-	-	-	10.49	2.500	18.33	23.47	21.55	19.33
3	156.8	197.0	478.7	447.4	587.7	587.3	-	9.26	18.15	13.24	21.81	34.04	11.12	6.666	26.84	18.66	25.18	23.45
4	29.52	60.13	305.4	163.7	402.7	598.3	-	-	8.16	1.86	3.89	19.93	2.388	6.795	31.11	9.418	16.80	23.08
5	251.4	165.2	322.3	328.1	549.8	723.0	-	14.03	13.67	15.12	16.88	18.38	13.12	3.436	16.76	14.53	18.49	26.69
6	261.7	519.1	264.6	426.9	428.4	411.4	-	-	-	-	-	-	21.68	29.92	21.44	24.86	32.52	23.26
7	782.8	172.1	260.3	301.9	406.4	327.6	-	-	-	-	-	-	24.73	9.039	25.14	29.00	19.63	20.51

유기산 / day / sample	Citric acid						Succinic acid						Oxalic acid					
	0	3	6	9	12	15	0	3	6	9	12	15	0	3	6	9	12	15
1	-	-	-	-	-	-	22.08	1.969	32.88	50.49	41.36	-	17.63	4.47	34.18	40.11	37.15	34.53
2	10.54	4.663	11.39	8.867	3.924	4.627	-	-	30.04	38.52	34.91	27.64	14.27	18.53	37.69	40.49	33.68	40.35
3	-	-	-	-	-	-	-	32.19	47.29	36.97	35.92	35.39	14.72	27.39	48.71	32.17	35.15	42.14
4	4.824	5.313	6.575	3.068	0.518	0.531	10.78	14.17	54.86	21.87	32.96	17.38	9.631	8.419	32.20	27.04	32.96	46.13
5	16.64	0.346	0.381	0.321	0.321	0.949	-	12.30	51.92	46.35	43.65	37.37	31.41	11.34	28.43	25.65	43.58	46.83
6	8.791	10.82	8.994	7.350	10.86	5.136	23.62	36.84	25.17	35.21	22.80	30.51	44.17	29.98	45.99	37.80	38.20	39.89
7	1.691	10.26	18.93	17.31	11.74	11.24	22.66	18.62	25.43	34.31	30.48	19.50	47.36	40.82	56.06	41.67	50.45	48.15

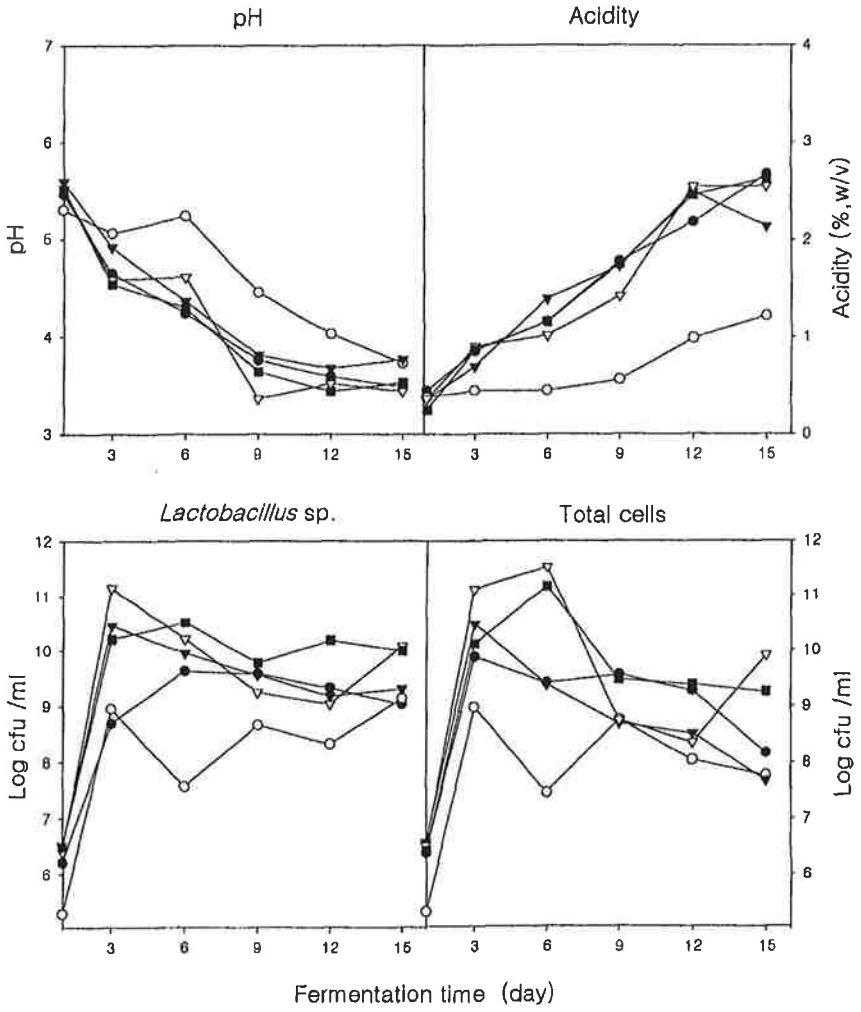


Fig. 47. The change of pH, acidity and microbials during kimchi seasoning fermentation. —●— basal seasoning —▼— added S. shrimp —▽— added sugar —■— added starter —○— added salt

젖산첨가농도결정: 김치의 양념의 각개발효법에 있어서 발효를 조절하고자 젖산의 적용시 적절한 첨가농도를 알아보았다. 먼저 양념의 각개 발효시 색도의 변화에 있어서 측정결과는 Table 34에서 보여주듯이 젖산 첨가구는 색의 변화율이 거의 없었으나, 대조구에서는 E 값이 0에서 6까지 큰 폭으로 변화하였다. 이는 양념 내에 효소적 갈변 현상에 의해서 적색이던 양념이 발효시간 경과에 따라 점차로 황색으로 바뀜에 따라 황색을 지시하는 color 'b' 값의 상승에서 기인하는 것이라 할 수 있겠다. pH의 변화에 있어서 대조구는 발효 초기 6에서 발효 40일째에 3.6부근까지 떨어졌으며, 젖산 0.4% 첨가구는 발효 초기 4.8에서 40일째 4.3까지 떨어졌다. 젖산 첨가구는 발효초기에서부터 발효 후기까지 김치의 적숙기 pH 범위 사이에 있음을 볼 수 있다(Fig. 48). 유산균수의 변화는 Fig. 49에서 보여지듯이 대조구는 발효 초기에 상용log로 환산하여 9까지 균수가 급격히 증가하였으며, 젖산 0.4% 첨가구에서는 감소하다가 완만히 증가하였고, 젖산 첨가량 이 높을수록 균수가 더 많이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 김치 발효에 있어서 김치의 풍미 향상과 김치를 부패시켜서 연부현상을 일으키는 효모와 같은 잡균의 번식을 지속적으로 저해하기 위해서는 유산균의 생육이 필요하므로 유산균이 어느 정도 생육을 유지하는 0.4%의 젖산 첨가량을 최적 젖산 첨가 농도로 결정하였다.

Table 34. Changes in color values of Kimchi-seasoning added various lactic acid con centration during fermentation at 20.techno system

Fermentation time	(days)	0	3	6	9	12	16	24	30	36	42
Control	▽E	0.05	2.19	2.53	2.43	0.92	1.43	4.75	4.33	3.74	6.69
	"L"	0.02	1.06	1.26	1.23	0.11	0.73	2.40	2.17	1.92	3.38
	"a"	-0.02	0.74	0.62	0.43	-0.90	0.14	0.92	1.00	-0.46	1.24
	"b"	0.03	1.77	2.10	2.05	0.16	1.22	4.00	3.61	3.18	5.63
0.4%	▽E	0.09	1.71	1.85	2.34	0.75	1.67	1.36	0.72	1.48	1.43
	"L"	-0.04	0.87	0.93	1.19	0.38	0.86	-0.52	0.34	0.74	0.71
	"a"	-0.04	0.24	0.36	0.39	-0.17	0.12	-0.90	-0.29	-0.38	-0.42
	"b"	-0.07	1.45	1.55	1.97	0.62	1.43	-0.88	0.56	1.22	1.17
0.6%	▽E	0.03	0.82	0.97	0.73	0.81	0.88	0.91	0.80	1.27	0.91
	"L"	-0.01	0.42	0.49	0.38	0.39	0.45	0.44	0.39	-0.15	0.31
	"a"	-0.03	0.15	0.17	-0.09	0.26	-0.17	-0.33	-0.27	-1.24	-0.71
	"b"	-0.01	0.69	0.82	0.62	0.66	0.74	0.73	0.64	-0.27	0.49
0.8%	▽E	0.06	0.72	0.84	0.59	1.16	0.35	0.55	0.46	1.29	0.87
	"L"	-0.03	0.37	0.43	0.30	-0.49	0.06	-0.13	-0.03	-0.41	0.03
	"a"	-0.03	0.08	0.13	-0.09	-0.64	-0.33	-0.48	-0.46	-1.01	-0.87
	"b"	-0.05	0.61	0.71	0.50	-0.83	0.09	-0.23	-0.05	-0.69	0.03

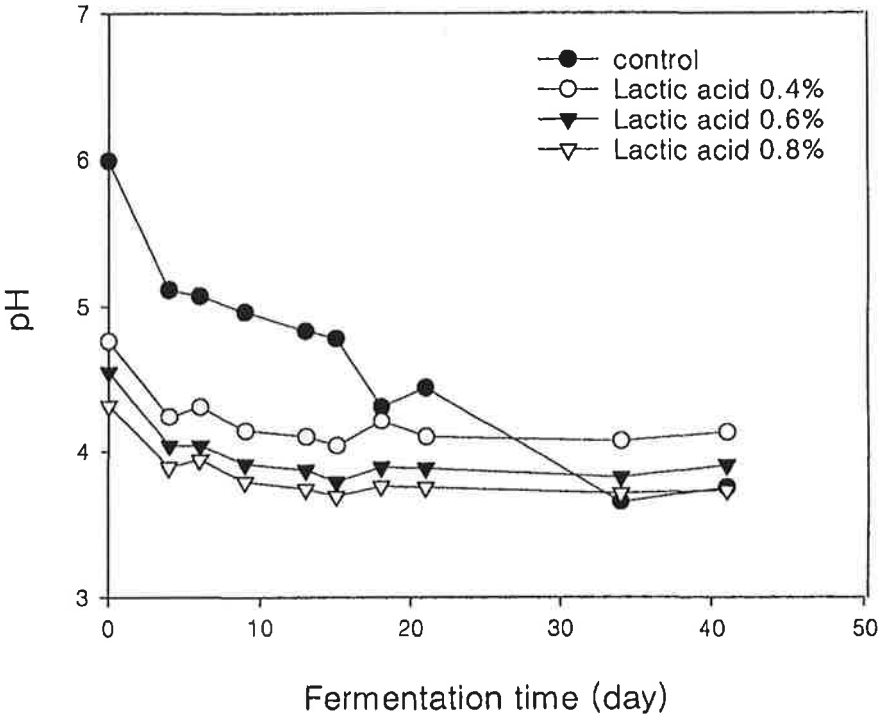


Fig. 48. Changes of pH on Kimchi-seasoning.

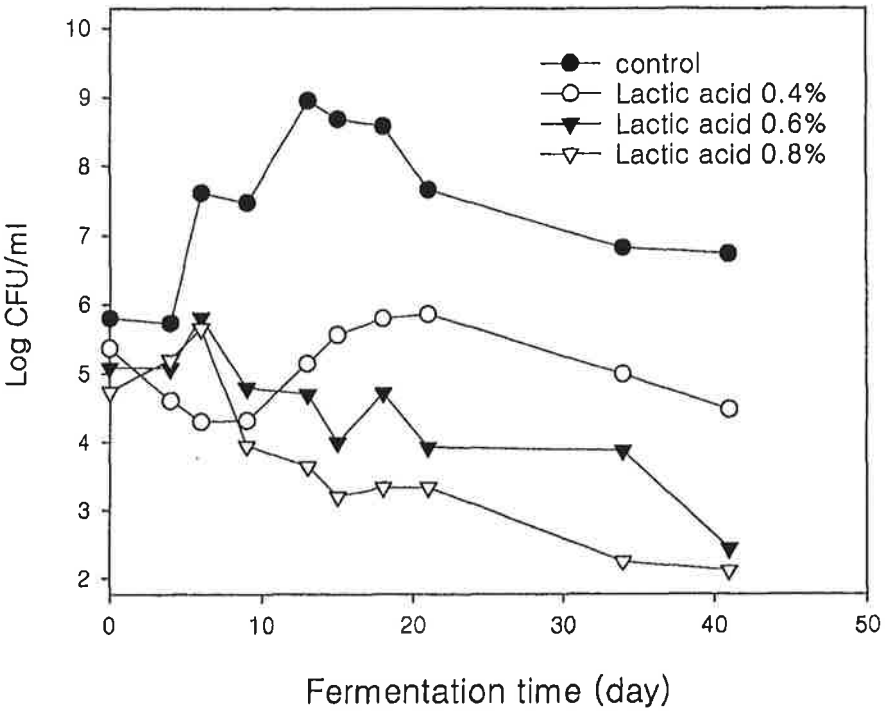


Fig. 49. Profiles of lactic acid bacteria on Kimchi-seasoning

제 3 절 김치의 품질관리 기법연구

1. 포장 방법에 따른 발효배추의 저장성 연구

본 연구에서는 전통적인 김치 제조법과는 달리 배추의 절임 저장과 함께 김치 속을 분리하여 발효 저장한 후에 소비 직전에 혼합하여 제조하는 변형된 김치의 제조법의 가능성을 타진하기 위한 과정으로써 젖산균과 염, 젖산을 이용한 절임배추의 저장성에 높이기 위하여 여러 가지 포장재를 이용한 포장방법에 따라서 저장중의 배추의 pH, 염도, 조직감, 색, 냄새 등의 변화와 장내세균과 젖산균의 수 변화를 조사하였다.

균수의 변화: 초기 젖산균의 수는 젖산균을 접종한 실험구가 높았으나 발효 3일 후부터는 젖산균의 수가 거의 같아졌다. 젖산균의 수는 5-6일까지 증가한 후에 9일까지 그 수가 감소했고, 다시 11일 까지 증가했다 감소했다. 배양 12일째는 젖산균을 접종한 포장재의 젖산균이 대조구보다 낮았다(Fig. 50). 대장균의 경우는 초기 대장균의 수가 젖산균을 첨가하지 않은 포장재의 것이 높았다. 그리고 다른 포장재의 경우는 대장균의 수가 증가와 감소를 반복하지만 PET-JDSF는 한번 증가한 다음 계속 감소하는 모양을 보여 주었고, 배양 12일에는 대장균이 거의 사멸하였다(Fig. 51).

pH의 변화: 배양 전 기간 동안 젖산균을 첨가하지 않은 포장재의 pH 값이 약간 높았고,(Fig. 52) 특히 배양 10일째 이후에는 곰팡이가 가장 많이 생긴 고밀도 포장재의 pH가 급격히 증가함을 보였다. 이 pH의 급격한 변화는 젖산균을 넣지 않은 고밀도 포장재가 더 심했다. 또한 젖산균을 첨가하지 않은 저밀도 포장재도 배양 11일째에서 급격한 pH의 변화를 보였다. 이에 반해 PET-JDSF는 배양 전 기간 동안젖산균을 넣은 것이나 넣지 않은 것 모두 다 일정하게 pH가 유지되었다.

염도의 변화: 염도가 배추의 부위별로 틀리기 때문에 배추를 갈아서 염도를 측정하였다. 그래서 초기 염도는 배추자체의 염도는 0이지만, 배양액을 첨가하여 염도를 측정하여 2% 의 초기 염도값을 얻었다. 배양 3일째의 젖산균을 첨가한 포장재와 첨가하지 않은 포

장재의 염도가 각각 2.8과 2.6으로 배양기간 중 가장 높았으며 4일째부터 배양 마지막 까지는 거의 일정한 수준의 염도를 보였다(Fig. 53).

맛과 향미의 변화: 포장재에 따른 절임 배추의 기호도를 조사하기 위하여 저장기간에 따른 맛, 향미, 색깔의 변화를 관능검사를 통해서 2회 측정하였으며 hedonic scale에 따라 측정에 참여한 관능검사요원의 기호도를 1 (매우 싫음)에서 5 (매우 좋음)까지 다섯 단계로 나누어 측정하였다. 배양 4일까지는 초기 배추 맛과 비슷하였고, 6일까지 맛이 급격하게 나빠졌다. LDPE 와 HDPE 포장재를 사용한 저장 배추는 맛이 일찍 나빠져서 배양 6일째부터는 거의 먹지 못할 정도였지만, PET-JDSF를 사용하여 포장 보관한 경우에는 배양이 끝나는 날까지 맛이 유지되었다. 그리고 배양 6일째에는 포장재 HDPE와 LDPE와 젖산균을 접종한 대조구에서는 곰팡이가 피기 시작했고, 특히 젖산균을 넣은 대조구가 특히 심해서 악취가 나기 시작했다. 배양 7일부터는 젖산균을 넣은 대조구에서는 전체적으로 곰팡이가 생겼고, HDPE와 LDPE에서도 표면은 곰팡이로 덮여 있었으나 조직감은 PET-JDSF 못지않았다. 특히 젖산균을 넣지 않은 HDPE가 연부 현상이 가장 심했다. PET-JDSF는 배양 마지막 날까지 곰팡이가 생기지 않았고, 6일째 이후 맛이 일정하게 유지되었지만 냄새는 갈수록 나빠졌다. PET-JDSF 포장 중에서도 젖산균을 넣은 쪽이 젖산균 접종 없이 저장된 경우보다 맛이 더 좋았으며 냄새도 좋았다.

경도의 비교: 경도는 배양 8일과 12일에 각각 측정하였는데, 8일째의 경도는 젖산균을 접종하지 않은 LDPE와 젖산균을 접종한 PET-JDSF가 가장 높았다(Fig. 56). 그리고 젖산균을 접종한 대조구와 포장재 HDPE의 경도는 상대적으로 낮았다. 배양 12일째의 경도는 PET-JDSF 포장재의 것이 높은 경도를 나타냈다. 특히 젖산균을 넣은 PET-JDSF의 경우는 경도의 변화가 거의 없었다. 그리고 젖산균을 접종하지 않은 LDPE는 경도의 차이가 가장 심하게 났다.

본 실험을 통해 사용된 세 가지의 포장재 중에서 PET-JDSF에서 저장된 절임배추의 저장성이 더 좋았고, 특히 젖산균을 첨가한 것이 더 저장성이 좋았음을 알 수 있었다. HDPE의 포장재 같은 경우 곰팡이가 일찍 생기고, 이로 인해 맛과 조직감이 현저하게 나

빠짐을 알 수 있었고 내부의 미생물의 변화도 심한 것을 볼 수 있었다. 이에 반해 PET-JDSF의 경우는 곰팡이가 생기지 않고 그로 인해 미생물 군집에 대한 영향이 작아서 대장균의 수의 변화가 일정했다. 그리고 pH의 변화에서 배양 10일째가 되었을 때 부패가 가장 심했던 HDPE와 젖산균을 접종하지 않은 LDPE에서 급격히 증가함을 보인데 반해 PET-JDSF는 일정한 pH의 변화를 보였다. 이러한 결과는 맛과 향미의 관능검사에서도 유사하게 나타나 PET-JDSF 포장재에서 저장된 배추가 가장 맛이 좋았고, 경도도 가장 높은 수준을 유지함을 알 수가 있었다. 이것은 PET-JDSF 포장재가 밀봉이 가장 잘 되어 공기와의 접촉이 생기지 않기 때문인 것으로 생각된다. 그러므로 현재가지 실험구에서의 결과는 젖산균을 첨가하여 저장한 것이 첨가하지 않은 것보다 더 좋은 저장성을 보였으며, 포장재 중에서는 PET-JDSF 가 HDPE 나 LDPE 보다 더 좋았다. 김치제조를 위하여 사용할 수 있는 저장기간은 12일 까지 맛과 향미의 변화 없이 유지되었다.

배양 4일째까지는 초기 배추 맛과 비슷하였고, 6일째까지 맛이 급격하게 나빠졌다. 다른 포장재의 맛을 일찍 나빠져서 배양 6일째부터는 거의 먹지 못할 정도였지만, PET-JDSF는 배양이 끝나는 날까지 그 맛이 유지되었다. 그리고 배양 6일째에는 포장재 HDPE와 LDPE와 젖산균을 접종한 대조구에서는 곰팡이가 피기 시작했고, 특히 젖산균을 넣은 대조구가 특히 심해서 악취가 나기 시작했다. 배양 7일부터는 젖산균을 넣은 대조구에서는 전체적으로 곰팡이가 생겼고, HDPE와 LDPE에서도 표면은 곰팡이로 덮여 있었으나 조직감은 PET-JDSF 못지않았다. 특히 젖산균을 넣지 않은 HDPE가 연부현상이 가장 심했다. PET-JDSF는 배양 마지막 날까지 곰팡이가 생기지 않았고, 6일째 이후 맛이 일정하게 유지되었지만 냄새는 갈수록 나빠졌다. PET-JDSF에서도 젖산균을 넣은 쪽이 맛이 약간 더 좋았으며 냄새도 더 좋았다.

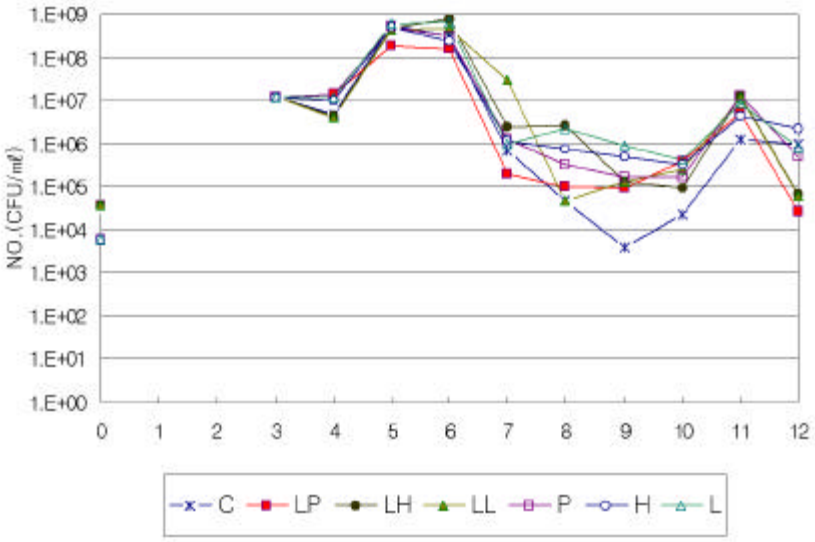


Fig. 50 Changes of *Lactobacillus* number of cabbage preservation in the various packaging materials.

C: control with *Lactobacillus* inoculation, LP: PET-JDSF with *Lactobacillus* inoculation, LH: HDPE with *Lactobacillus* inoculation, LL: LDPE with *Lactobacillus* inoculation, P: PET-JDSF, H: HDPE, L: LDPE

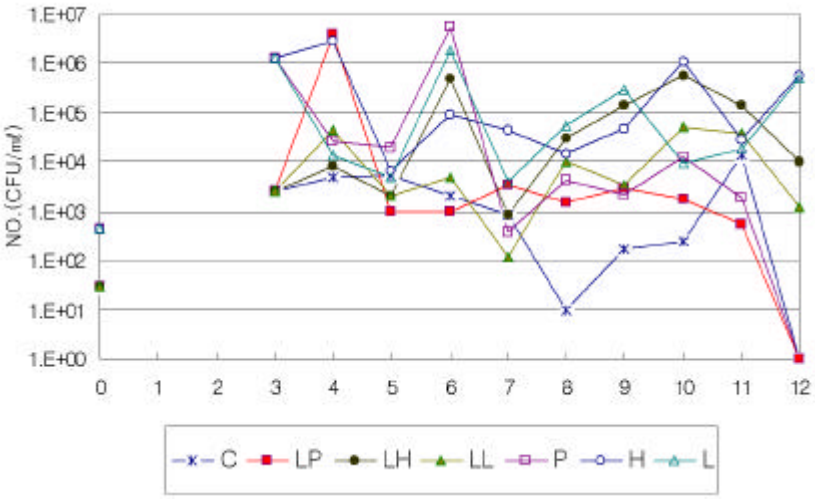


Fig. 51. Change of *E. coli* populations of cabbage during preservation in the various packaging materials.

C: control with *Lactobacillus* inoculation, LP: PET-JDSF with *Lactobacillus* inoculation, LH: HDPE with *Lactobacillus* inoculation, LL: LDPE with *Lactobacillus* inoculation, P: PET-JDSF, H: HDPE, L: LDPE

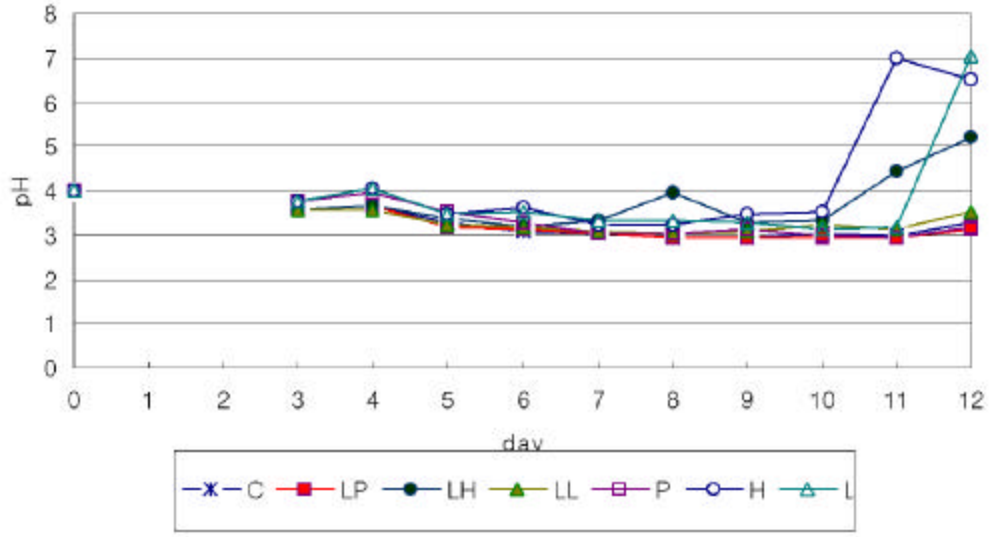


Fig. 52. Changes of pH of cabbage during preservation in the various packaging materials.

C: control with *Lactobacillus* inoculation, LP: PET-JDSF with *Lactobacillus* inoculation, LH: HDPE with *Lactobacillus* inoculation, LL: LDPE with *Lactobacillus* inoculation, P: PET-JDSF, H: HDPE, L: LDPE

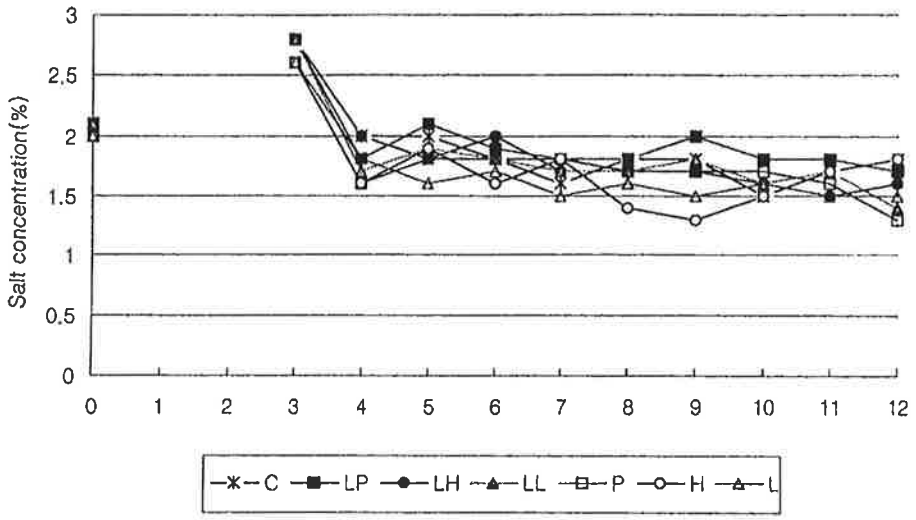


Fig. 53. Changes of salt concentrations of cabbage during preservation in the various packaging materials.

C: control with *Lactobacillus* inoculation, LP: PET-JDSF with *Lactobacillus* inoculation, LH: HDPE with *Lactobacillus* inoculation, LL: LDPE with *Lactobacillus* inoculation, P: PET-JDSF, H: HDPE, L: LDPE

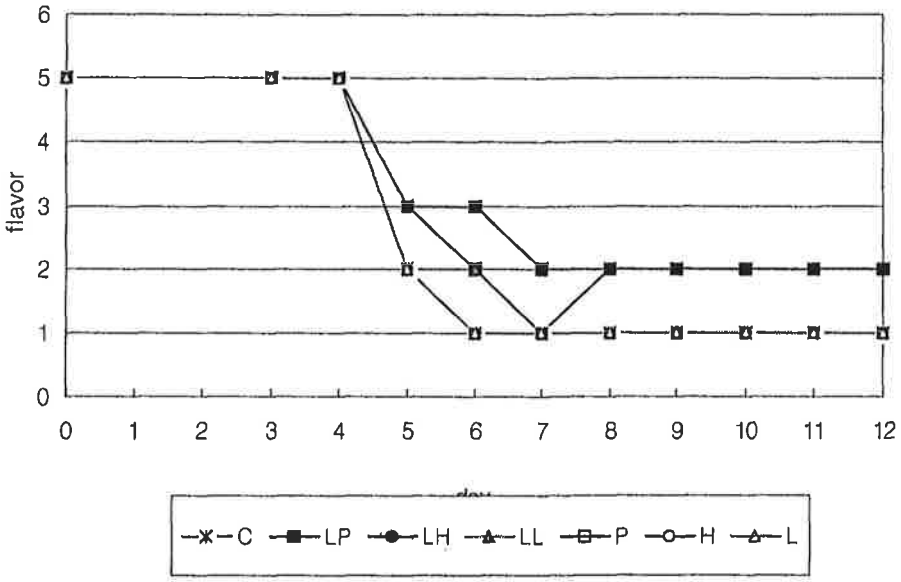


Fig. 54. Changes of tastes of cabbage during preservation in the various packaging materials.

C: control with *Lactobacillus* inoculation, LP: PET-JDSF with *Lactobacillus* inoculation, LH: HDPE with *Lactobacillus* inoculation, LL: LDPE with *Lactobacillus* inoculation, P: PET-JDSF, H: HDPE, L: LDPE

Table 35. Sensory evaluation of taste of salted cabbage with/ without inoculation of Lactic acid bacteria to the various packaging materials by hedonic scale

Sample \ day	0	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
control with *Lactobacillus* inoculation	5	5	4	2	1	1	1	1	1	1	1
PEP+JDSF with *Lactobacillus* inoculation	5	5	4	3	3	2	2	2	2	2	2
HDPE with *Lactobacillus* inoculation	5	5	4	2	2	1	1	1	1	1	1
LDPE with *Lactobacillus* inoculation	5	5	4	2	2	1	1	1	1	1	1
PEP+JDSF	5	5	4	3	2	2	2	2	2	2	2
HDPE	5	5	4	2	1	1	1	1	1	1	1
LDPE	5	5	4	2	1	1	1	1	1	1	1

* Indicated number is the most frequent number is chosen in the score made by panel.

Table 36. Sensory evaluation of flavor of salted cabbage with/ without inoculation of Lactic acid bacteria to the various packaging materials by hedonic scale

Sample \ day	0	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
control with *Lactobacillus* inoculation	5	5	5	3	1	1	1	1	1	1	1
PEP+JDSF with *Lactobacillus* inoculation	5	5	5	4	3	2	2	2	2	2	2
HDPE with *Lactobacillus* inoculation	5	5	5	3	2	1	1	1	1	1	1
LDPE with *Lactobacillus* inoculation	5	5	5	3	2	1	1	1	1	1	1
PEP+JDSF	5	5	5	3	2	2	2	2	2	2	2
HDPE	5	5	5	3	1	1	1	1	1	1	1
LDPE	5	5	5	3	1	1	1	1	1	1	1

*Indicated number is the most frequent number is chosen in the score made by panel.

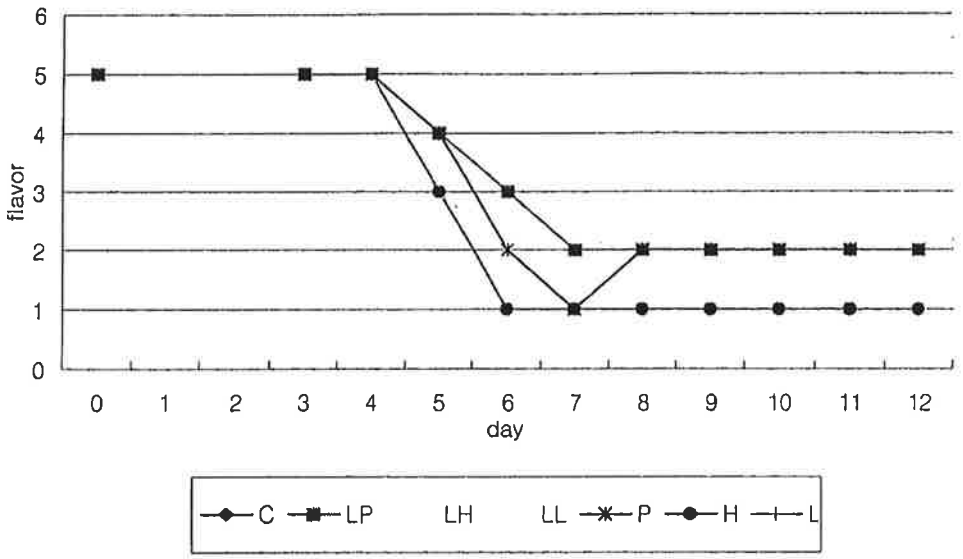


Fig. 55. Changes of flavor of cabbage during preservation in the various packaging materials.

C: control with *Lactobacillus* inoculation, LP: PET-JDSF with *Lactobacillus* inoculation, LH: HDPE with *Lactobacillus* inoculation, LL: LDPE with *Lactobacillus* inoculation, P: PET-JDSF, H: HDPE, L: LDPE

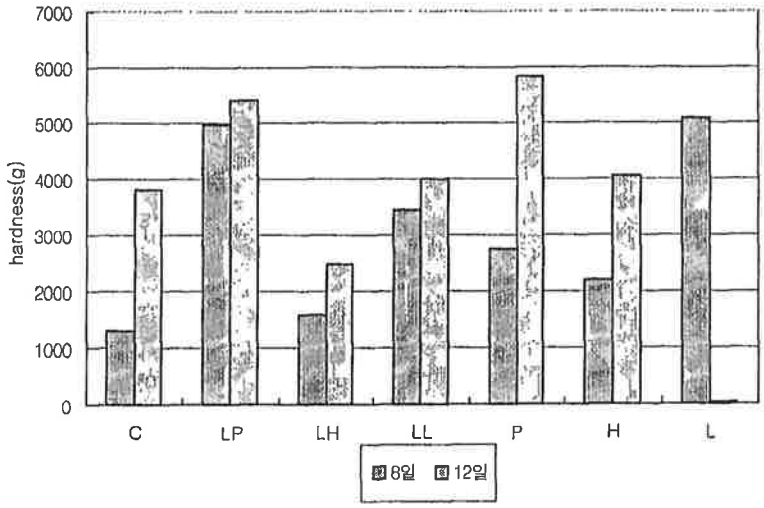


Fig. 56. Hardness of tastes of cabbage during preservation in the various packaging materials.

C: control with *Lactobacillus* inoculation, LP: PET-JDSF with *Lactobacillus* inoculation, LH: HDPE with *Lactobacillus* inoculation, LL: LDPE with *Lactobacillus* inoculation, P: PET-JDSF, H: HDPE, L: LDPE

2. 신가공법에 의한 김치의 최종평가

김치의 위생성과 보존성 증대의 일환으로 기존의 절임방법과 발효방법과는 다른 새로운 신가공 김치 제조법을 개발하여 보다 높은 고효율의 기능성 김치를 만들고자 시도하였다. 전년도에 수행되어진 연구에서 개발된 젖산소금은 김치의 전처리 단계인 절임시에 적용한 후 양념과 혼합하여 김치를 제조하는 방법과 배추 단독 발효법에 따라 배추 발효시에 적용하여 완성된 김치 제조법, 그리고 양념의 단독 발효기법 등에 이용되어졌다. 이러한 다양한 발효기법에 의해 제조된 김치의 품질과 맛을 평가하기 위해서 무 처리김치와 처리김치로 나누어 관능테스트를 실시하였다.

가. 단독 발효배추의 관능테스트

배추 발효액에 젖산소금을 첨가하여 염분 5%가 되도록 하고 pH 2.5부근이 되도록 만든 발효액에서 발효를 수행한 후에 신내 (acidic taste), 생배추맛 (fresh cabbage taste), 짠맛 (salt taste), 사각사각 (crispness), 질김 (chewiness), 군덕맛 (yeast moldy taste), 전체 기호도 (overall eating quality) 7가지 항목에 대해서 1013명의 관능테스트에 흥미를 가지고 있는 20-30대의 연구원들을 대상으로 관능테스트를 실시한 결과, Fig. 57에서 보여지듯이 전체적인 기호도가 무처리구에 비해 높아졌다.

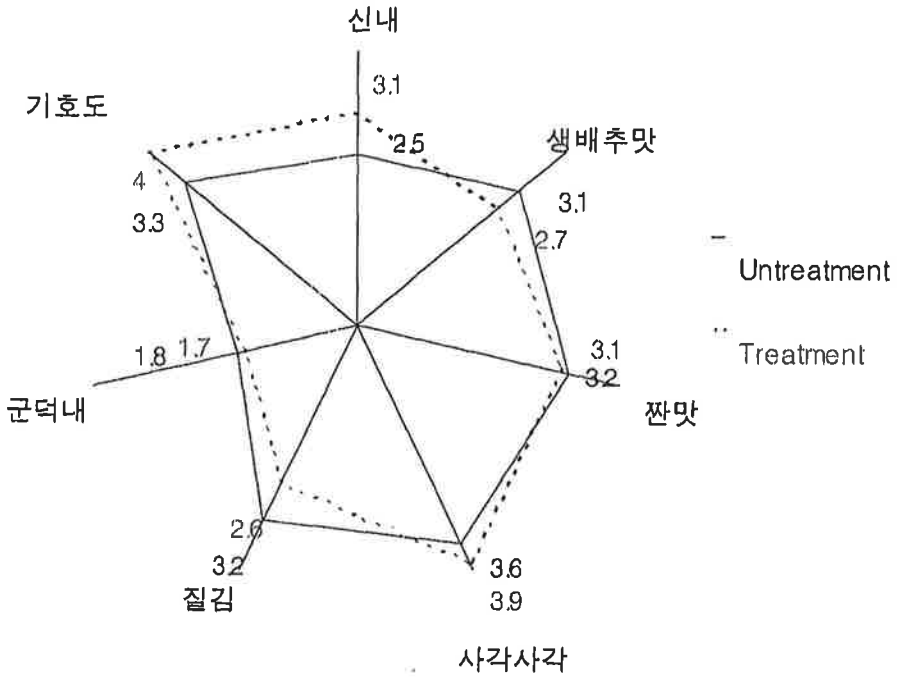


Fig. 57. A spider-web diagram of difference between treatment and untreatment with lactic acid on

나. 다양한 제조법에 의한 김치의 관능성 비교

배추단독 발효시의 관능테스트에 이어 다양한 김치 제조법에 의한 김치들에 대한 최종 평가로서 발효배추와 마찬가지로 관능테스트를 실시하였다. 김치시료의 제조방법은 Table 8에서와 마찬가지로 배추는 절임배추와 발효배추로 나누고, 양념은 발효 된 것과 안 된 것으로 나누어서 이전 년도에서 조사결과 확인된 배추절임과 발효시의 염농도, 시간, 젖산첨가량, 그리고 양념발효 시간, 젖산함유량 등의 최적처리 조건에 따라 처리를 하여 최종적으로 배추와 양념을 Table 8의 조합에 따라 혼합하여 제조하였다. 관능테스트시의 평가항목은 향미 (flavor), 맛 (taste), 조직감 (texture), 전체 기호도 (overall acceptability) 4가지 항목이며, 5점 만점 평점법 (scoring test)으로 채점하였다(Table 6).

그 결과 향미는 sample No. 9번(젖산처리 안된 절임배추와 젖산처리 안된 발효양념의 혼합 김치)과 sample No. 16번에서 3.5점으로 가장 높았고, 조직감은 대체적으로 비슷하게 나왔으며 맛은 sample No. 16번에서 3.3점으로 가장 높았다. 전체 기호도와 총 관능점수 또한 sample No. 16번 젖산 처리된 발효배추와 젖산 처리된 발효양념의 혼합 김치가 3.5점으로 가장 높게 채점되었다(Table 37). 이러한 결과들로 보아서 젊은층에서 김치에 대한 기호는 겉절이 김치보다 발효가 적절히 진행되어 향미가 풍부하고 신맛이 나는 김치를 선호함을 알 수 있었다. 전년도 연구결과에서는 김치의 젖산처리 결과 대장균 및 기타 유해미생물들을 저해시켜 주므로서 김치의 위생성을 향상시킴을 확인한 바가 있었고, 본 연구에서는 이러한 신김치 제조법의 장점과 더불어 기호성까지 향상시킬 수 있음을 본 연구에서 확인할 수 있었다.

Table 37. Palatability test score.

Sample No.	향미	조직감	맛	기호도	Total score
1	3.1	3.7	3.2	3.2	13.2
2	2.9	3.2	2.9	3.2	12.2
3	3.0	3.2	3.1	2.9	12.2
4	3.1	3.4	3.2	3.2	12.9
5	3.2	3.3	2.8	3.4	12.7
6	2.8	3.0	2.8	2.8	11.4
7	2.9	3.4	2.8	2.9	12.0
8	2.4	3.2	2.8	2.6	11.0
9	3.5	3.5	3.0	3.0	13.0
10	3.0	3.7	3.3	3.3	13.3
11	2.8	3.7	2.7	2.7	11.9
12	3.3	3.7	2.7	3.0	12.7
13	3.0	3.5	2.7	2.8	12.0
14	3.1	3.7	2.7	3.2	12.7
15	3.3	3.8	3.0	3.3	13.4
16	3.5	3.7	3.3	3.5	14.0

제 4 장. 참고문헌

1. 이인선, 박완수, 구영조, 강국희: 품종별 가을배추로 제조한 절임배추의 저장중 특성변화. 한국식품과학회지, 28, 888 (1996)

2. 박경자, 우순자: Na-acetate 및 Na-malate와 K-sorbate가 김치 발효 중 pH,산도 및 산미에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 20, 40 (1988)

3. 김우정, 강근욱, 경규항, 신재익: 김치의 저장성 향상을 위한 염 혼합물의 첨가,. 한국식품과학회지, 23, 188 (1991)

4. 강근옥, 구경형, 이형재, 김우정: 효소 및 염의 첨가와 순간열처리가 김치발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지 23, 183 (1991)

5. 권숙표, 최건우: 김치의 산패방지 보존방법. 한국특허, 305 (1967)

6. 안숙자: Sorbic acid가 김치발효와 ascorbic acid의 안정도에 미치는 영향. 한국조리과학회지, 1, 18 (1985)

7. 안숙자: 김치에서 분리한 유산균의 생육에 미치는 식염과 식품보존료의 영향. 한국조리과학회지, 4, 39 (1988)

8. 김순동, 이신호: pH 조정제 sodium malate buffer의 첨가가 김치의 숙성에 미치는 효과. 한국영양식량학회지, 17, 358 (1988)

9. 김순동: 김치숙성에 미치는 pH 조정제의 영향. 한국영양식량학회지, 14, 259 (1985)

10. 홍완수, 윤 선: 열처리 및 겨자유의 첨가가 김치발효에 미치는 영향. 한국식품과학회지, 21, 331 (1981)

11. 문광덕, 변정아, 김석중, 한대석: 김치의 선도유지를 위한 천연 보존제의 탐색. 한국식품과학회지, 27, 257 (1995)

12. 안선정, 이귀주: 김치의 발효과정 중 펙틴질과 조직감의 변화에 대한 젓갈과 Chitosan 첨가의 영향. 한국조리과학회지, 11, 309 (1995)

13. **하덕모** : **김치의 발효경과 및 산패억제**. **김치의 과학**, pp43-61, **한국식품과학회**(1994)

14. Pederson, C.S. : Lactic acid producing Bacteria im fermentations and Food Spoilage food research. Vol. 3, No.3(1938).

15. Pederson, C. S., and N. N. Albury : New York State Agr. Exp. Sta. Cornell Univ. Bul. No. 824(1969).

16. Fleming, H. P., McFeeters, R. F., Thomson, R. L. : *J. Food Sci*. 48:975-983(1983).

17. Fleming, H. P., Etchells, J. L., Costilaw, R. N. : *Appl. Microbiol*. 30:1040-1042(1975).

18. Karki, T., Okada, S., Baba, T., Kozaki, M. : **日食工誌** 30:357-367(1983).

19. Shaw, B. G., Harding , C. H. : *Internat. J. Systematic Bacteriol*. 39:217-213(1989).

20. Dicks, L. M., van Vuuren, H. J. J. : *Internat. J. Systematic Bacteriol*(in press).

21. Schmitt, P., Mathot, A. G., Davies, C. : Fatty acid composition of the genus *Leuconostoc. Michwissenschcft* 44:556-559(1989).

22. **최신양**, **이인선**, **유진영**, **정건섭**, **구영조** : **한국산업미생물학회지**, 18, 620(1990).

23. **최신양**, **이인선**, **유진영**, **정건섭**, **구영조** : **한국식품과학회지**, 22, 707(1990).

24. **박연희**, **류옥상**, **조도현** : **농화학회지**, 31, 33(1988).

25. **민태익**, **권태완** : **김치발효에 미치는 온도 및 식염농도의 영향**, **한국식품과학회지** 16:443-450(1984).

26. **임종락**, **박현근**, **한홍의** : **김치에 서식하는** Gram **양성세균의 분리 및 동정 체계의 재평가**, **한국미생물학회지** 27:404-414(1989).

27. **조재선** : **김치 숙성 중 미생물의 동태와 성분 변화**, **김치과학과 산업** 1:45-67(1992).

28. **민태익** : **전통발효식품의 과학화 연구산업**, **김치의 과학** 6-25, **한국식품과학회**(1994).

29. **구영조**, **최신량** : **김치과학 기술**, **기술신서** 2**집**, **한국식품개발원**(1990).

30. **이종갑**, **조의경** : **한국수산학회지**, 7(3), (1974).

31. **이계호** : **한국농화학회지**(1969).

32. **이계호**, **이응황**, **김무현**, **기주현**, **채주규**, **이양우**, **고경희** : **한국의 수산물 시품**, **유림문**

화사(1987).

33. **오태광**, **고영희등**: **한국특허** 50069 (1989)

34. **오태광**, **고영희**, **박용하**, **김용석**, **유대영**, **조기행** : **한국특허** 50070(1989).

35. **오태광**, **고영희**, **김용석**, **유대영**, **조개행** : **한국특허** 91-46250 (1991).

36. Barnes EM, Mead GC. Anaerobic bacteria in habitats other than man, Blackwell Scientific Publications. 1986 ; 303-331

37. Benno, Y., Mitsuoka, T. Development of intestinal microflora in humans and animals. Bifidobacteria Microflora. 1986; 5: 13-25

38. Benno, Y., Mitsuoka, T. Effect of diet and aging on human fecal microflora. Bifidobacteria Microflora. 1991; 10: 89-96

39. Fox SM. Probiotics; intestinal inoculants for production animals. V*et Med* 1988 ; 806-830

40. Fujisawa, T., Mizutani, H., Iwana, A., et al. Effects of culture condensate of Bifidobacterium longum(MB) on feed efficiency, morphology of intestinal epithelial cells, and fecal microflora of rats. Bifidobacteria Microflora. 1990; 9: 43-50

41. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-378

42. Holdeman LV, Cato EP, Moore WEC. Anaerobe laboratory manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg. 1977

43. Kaneuchi C, Watanabe K, Terada A, Benno Y, Mitsuoka K. Taxonomic study of *Bacteroides clostridiiformis* subsp.*clostridiiformis* (Burri and Ankersmit) Holdeman and Moore and of related organisms; proposal of *Clostridium clostridiiformis*(Burri and Ankersmit) comb. nov. and *Clostridium symbiosum*(Stevens) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1976 ; 26:195-204.

44. Lee WK, Fujisawa T, Kawamura S, Itoh K, Mitsuoka T. C*lostridium intestinalis* sp. nov., an aerotolerant species isolated from the feces of cattle

and pigs. *Int J Syst Bacteriol* 1989 ; 39: 334-336.

45. Lindgren S, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev* 1990 ; 87:149-164

46. Mitsuoka T. The World of Anaerobic Bacteria; A Color Atlas of Anaerobic Bacteria, 1 st ed., Sobun Press, Tokyo 1980

47. Mitsuoka T, Kaneuchi C. Ecology of the bifidobacteria. *Am J Clin Nut* 1977 ; 30:1799-1810

48. Mitsuoka T, Morishita Y, Terada A, Yamamoto S. A simple method("plate-in-bottle method") for the cultivation of fastidious anaerobes. *Jap J Microbiol* 1969 ; 13: 383-385.

49. Modler, H., McKellar, R., Yaguchi, M., Bifidobacteria and bifidogenic factors. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 1990; 23: 29-41.\

50. Parker CA. Anaerobiosis with iron wool. *Aust J Exp Biol Sci* 1955 ; 33: 33-38

주 의

1. **이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.**

2. **이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.**

3. **국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.**