



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2016年 8月

博士學位 論文

GRAS 등급 미생물용 식용배지의
개발과 이를 활용한
천연식품보존제의 개발과 응용

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

文 愼 熙

GRAS 등급 미생물용 식용배지의 개발과 이를 활용한 천연식품보존제의 개발과 응용

Development of edible-media for GRAS
microorganisms and its application as a
bio-preservative

2016年 8月 25日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

文 愼 熙

GRAS 등급 미생물용 식용배지의
개발과 이를 활용한
천연식품보존제의 개발과 응용

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學博士學位申請 論文으로 提出함

2016年 4月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

文 慇 熙

文愾熙의 博士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 이 명 렬 印

委員 목포대학교 교수 김 인 철 印

委員 조선대학교 교수 이 중 현 印

委員 조선대학교 교수 이 주 민 印

委員 조선대학교 교수 장 해 춘 印

2016年 6月

朝鮮大學校 大學院

목 차

LIST OF TABLES	VII
LIST OF FIGURES	X III
ABSTRACT	X VI
제 1 장 서 론	1
제 1 절 식품 미생물	1
1. 국가별 식품 미생물 평가 제도	2
가. 미국의 GRAS 제도	2
나. 유럽연합의 QPS 제도	4
다. 대한민국의 식품공전	5
2. GRAS 미생물의 활용	11
가. 유산균	11
나. 고초균	14
제 2 절 미생물용 배지	16
1. 유산균용 배지	16
가. 유산균용 시판 배지	16
나. 유산균용 개발 배지	18
2. 고초균용 배지	22
가. 고초균용 시판 배지	22
나. 고초균용 개발 배지	22
제 3 절 식품 보존제	25
1. 합성 보존제	30

2. 천연 보존제	33
제 4 절 연구의 목적	36
제 2 장 실험재료 및 방법	38
제 1 절 천연항균물질 생산용 식용배지 개발	38
1. 배추폐기물의 처리공정 개발	38
가. 시료 수집	38
2. 수거방식에 따른 배추폐기물의 성분조성 비교	38
가. 계절별 폐배추와 절임폐배추의 일반성분 분석	39
나. 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리당 분석	39
다. 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리아미노산 분석	39
3. 수거방식에 따른 배추폐기물의 오염도 측정	40
4. 배추폐기물의 처리공정 최적화	40
5. 식용성분을 이용한 식용배지 개발	42
가. 식용성분을 이용한 유산균 전용 배지 조성 개발	42
(1) 사용 균주	42
(2) 생균수 측정 방법	42
(3) 항균활성 측정 방법	42
나. 식용성분을 이용한 고초균 전용 배지 조성 개발	43
(1) 사용 균주	43
(2) 생균수 측정 방법	43
(3) 항균활성 측정 방법	43
제 2 절 식용배지에서 GRAS 미생물 생육 및 항균활성의 최적화	44
1. 유산균 전용 식용배지 개발	44

가. 영양원의 최적화	44
(1) 탄소원의 최적화	44
(2) 질소원의 최적화	44
(3) 무기원의 최적화	45
나. 배양 pH의 최적화	45
다. 배양 온도 및 시간의 최적화	45
2. 고초균 전용 식용배지 개발	46
가. 영양원의 최적화	46
(1) 탄소원의 최적화	46
(2) 질소원의 최적화	46
(3) 무기원의 최적화	46
나. 배양 pH의 최적화	47
다. 배양 온도 및 시간의 최적화	47
제 3 절 천연항균물질의 이용한 식품적용기술 개발 ..	47
1. 배지에 따른 천연항균물질의 안정성	47
가. pH 안정성	47
나. 온도 안정성	48
다. 효소 안정성	48
2. 기존 천연 보존제와의 항균활성 비교	48
가. 기존 천연 보존제	48
나. 항균활성 측정 방법	50
3. 항균소재 유효농도 설정	50
4. 유산균 유래 천연항균물질의 식품적용기술 개발	53
가. 저장기간에 따른 특성 조사	53
(1) 이화학적 특성 조사	53
(2) 미생물학적 특성 조사	53

나. 식중독균/부패균 발생여부 및 시점 관찰	53
다. 천연항균물질의 적용 최적 농도 설정	54
5. 고초균 유래 천연항균물질의 식품적용기술 개발	54
가. 저장기간에 따른 특성 조사	54
(1) 이화학적 특성 조사	54
(2) 미생물학적 특성 조사	55
나. 식중독균/부패균 발생여부 및 시점 관찰	55
다. 천연항균물질의 적용 최적 농도 설정	55
제 3 장 결과 및 고찰	56
제 1 절 천연항균물질 생산용 식용배지 개발	56
1. 배추폐기물의 처리공정 개발	56
가. 수거방식에 따른 배추폐기물의 성분조성 비교	56
(1) 계절별 폐배추와 절임폐배추의 일반성분 분석	56
(2) 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리당 분석	60
(3) 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리아미노산 분석	62
나. 수거방식에 따른 배추폐기물의 오염도 측정	65
다. 배추폐기물의 처리공정 최적화	65
2. 식용성분을 이용한 식용배지 개발	67
가. 식용성분을 이용한 유산균 전용 배지 조성 개발	67
나. 식용성분을 이용한 고초균 전용 배지 조성 개발	74
제 2 절 식용배지에서 GRAS 미생물 생육 및 항균활성의 최적화	80
1. 유산균 전용 식용배지 개발	80
가. 영양원의 최적화	80

(1) 탄소원의 최적화	80
(2) 질소원의 최적화	86
(3) 무기원의 최적화	89
나. 배양 pH의 최적화	92
다. 배양 온도 및 시간의 최적화	95
2. 고초균 전용 식용배지 개발	109
가. 영양원의 최적화	109
(1) 탄소원의 최적화	109
(2) 질소원의 최적화	112
(3) 무기원의 최적화	115
나. 배양 pH의 최적화	117
다. 배양 온도 및 시간의 최적화	119
제 3 절 천연항균물질을 이용한 식품적용기술 개발	122
1. 천연항균물질의 안정성	122
가. pH 안정성	122
나. 온도 안정성	124
다. 효소 안정성	126
2. 기존 천연 보존제와의 항균 활성 비교	128
3. 항균소재 유효농도 결정	131
4. 유산균 유래 천연항균물질의 식품적용기술 개발	133
가. 이화학적 특성 조사	133
나. 미생물학적 특성 조사	138
5. 고초균 유래 천연항균물질의 식품적용기술 개발	146
가. 이화학적 특성 조사	146
나. 미생물학적 특성 조사	150

제 4 장 결 론	158
제 5 장 참고문헌	162

LIST OF TABLES

Table 1. Food poisoning incidents and cases, by pathogenic bacterium, 2011-2015, Korea	3
Table 2. Food microbial substances of prior sanction in 21 CFR	6
Table 3. Bacteria in the GRAS notice inventory	7
Table 4. The 2013 updated list of QPS Status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA Scientific Panels and Units, 3 rd revision	8
Table 5. The list of possible microorganisms used in the domestic food ingredients	9
Table 6. Raw materials of probiotics microorganisms in the Health Functional Food Code (2014-204)	15
Table 7. List of commercially available media for lactic acid bacteria	17
Table 8. List of development media for lactic acid bacteria	20
Table 9. List of commercially available media for <i>Bacillus</i> sp.	23
Table 10. List of development media for <i>Bacillus</i> sp.	24
Table 11. Definition of food additives	27

Table 12. Classification purpose in food additives	28
Table 13. List of synthetic chemical food preservatives	31
Table 14. Regional designation for synthetic chemical food preservatives ..	32
Table 15. Derived from microorganisms food preservatives	34
Table 16. Derived from plant or animal food preservatives	35
Table 17. Natural preservatives used in this study	49
Table 18. Microorganism used in antimicrobial activity	51
Table 19. List of microorganism and culture conditions used in this study	52
Table 20. Properties of collected cabbage wastes	58
Table 21. Properties of collected salts cabbage wastes	59
Table 22. Free sugar contents of cabbage wastes (CW) and salted cabbage wastes (SCW)	61
Table 23. Free amino acid contents of cabbage wastes	63
Table 24. Free amino acid contents of salted cabbage wastes	64
Table 25. Sanitary indicative bacteria detected from cabbage wastes (CW) and salted cabbage wastes (SCW)	66

Table 26. Effect of concentration of cabbage waste juice (CW media) or salted cabbage waste (SCW media) dilution on viable cell count and antimicrobial activity of LAB	68
Table 27. Effect of corn steep liquor on viable cell count and antimicrobial activity by LAB grown in CW media A-1	70
Table 28. Effect of corn steep liquor on viable cell count and antimicrobial activity by LAB grown in SCW media B-1	71
Table 29. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity by LAB grown in CW media A-1	72
Table 30. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity by LAB in SCW media B-1	73
Table 31. Effect of concentration of cabbage waste juice (CW media) or salted cabbage waste juice (SCW media) dilution on viable cell count and antimicrobial activity of <i>B. subtilis</i> SN7	75
Table 32. Effect of corn steep liquor on viable cell count and antimicrobial activity by <i>B. subtilis</i> SN7 grown in CW media C-1	76
Table 33. Effect of corn steep liquor on viable cell count and antimicrobial activity by <i>B. subtilis</i> SN7 grown in SCW media D-1	77
Table 34. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity by <i>B. subtilis</i> SN7 grown in CW media C-1	78

Table 35. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity by <i>B. subtilis</i> SN7 grown in SCW media D-1	79
Table 36. Effect of carbon source on antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-2	83
Table 37. Effect of carbon source on antimicrobial activity of LAB grown in SCW media B-2	85
Table 38. Effect of nitrogen source on antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3	88
Table 39. Effect of inorganic source on antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3	91
Table 40. Effect of carbon source on antimicrobial activity of <i>B. subtilis</i> SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1	111
Table 41. Effect of nitrogen source on antimicrobial activity of <i>B. subtilis</i> SN7 grown in CW media C-2 or SCW media D-2	114
Table 42. Effect of inorganic source on viable cell count and antimicrobial activity of <i>B. subtilis</i> SN7 grown in CW media C-2 or SCW media D-2	116
Table 43. Effect of pH on antimicrobial activities of GRAS microorganism grown in the developed media	123

Table 44. Effect of temperature on antimicrobial activities of GRAS microorganism grown in the developed media	125
Table 45. Effect of enzyme on antimicrobial activities of GRAS microorganism grown in the developed media	127
Table 46. Antimicrobial spectrum and activities of bio-preservatives developed in this study	129
Table 47. Antimicrobial spectrum and activities of conventional and newly developed bio-preservatives	130
Table 48. The minimum inhibitory concentration of the developed bio-preservatives in this study	132
Table 49. LAB in kimchi during storage at 25°C	140
Table 50. Smooth-shaped yeast (S) and rough-shaped yeast (R) in kimchi during storage at 25°C	141
Table 51. LAB in kimchi during storage at 15°C	142
Table 52. Smooth-shaped yeast (S) and rough-shaped yeast (R) in kimchi during storage at 15°C	143
Table 53. LAB in kimchi during storage at 4°C	144
Table 54. Smooth-shaped yeast (S) and rough-shaped yeast (R) in kimchi during storage at 4°C	145

Table 55. Total viable cells in <i>chungkukjang</i> during storage at 37°C	152
Table 56. <i>B. cereus</i> in <i>chungkukjang</i> during storage at 37°C	153
Table 57. Total viable cells in <i>chungkukjang</i> during storage at 15°C	154
Table 58. <i>B. cereus</i> in <i>chungkukjang</i> during storage at 15°C	155
Table 59. Total viable cells in <i>chungkukjang</i> during storage at 4°C	156
Table 62. of <i>B. cereus</i> in <i>chungkukjang</i> during storage at 4°C	157

LIST OF FIGURES

Figure 1. Food microbiology related fields	12
Figure 2. Optimization of physical process of cabbage waste and salted cabbage waste	41
Figure 3. Effect of carbon source on viable cell count of LAB grown in CW media A-2	82
Figure 4. Effect of carbon source on viable cell count of LAB grown in SCW media B-2	84
Figure 5. Effect of nitrogen source on viable cell count of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3	87
Figure 6. Effect of inorganic source on viable cell count of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3	90
Figure 7. Effect of initial pH of media on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-4	93
Figure 8. Effect of initial pH of media on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in SCW media B-4	94
Figure 9. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Lb.</i> <i>plantarum</i> AF1 grown in CW media	97
Figure 10. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Lb.</i>	

<i>plantarum</i> HD1 grown in CW media	98
Figure 11. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Lb. plantarum</i> EM grown in CW media	99
Figure 12. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Leu. citreum</i> GR1 grown in CW media	100
Figure 13. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Leu. mesenteroides</i> TA grown in CW media	101
Figure 14. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Lb. plantarum</i> AF1 grown in SCW media	104
Figure 15. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Lb. plantarum</i> HD1 grown in SCW media	105
Figure 16. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Lb. plantarum</i> EM grown in SCW media	106
Figure 17. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Leu. citreum</i> GR1 grown in SCW media	107
Figure 18. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of <i>Leu. mesenteroides</i> TA grown in SCW media	108
Figure 19. Effect of carbon source on viable cell count of <i>B. subtilis</i> SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1	110

Figure 20. Effect of nitrogen source on viable cell count of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1 113

Figure 21. Effect of initial pH of media on viable cell count and antimicrobial activities of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-3 or SCW media D-3 118

Figure 22. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *B. subtilis* SN7 grown in CW media 120

Figure 23. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *B. subtilis* SN7 grown in SCW media 121

Figure 24. Total pH and acidity changes of kimchi during storage at 25°C 135

Figure 25. Total pH and acidity changes of kimchi during storage at 15°C 136

Figure 26. Total pH and acidity changes of kimchi during storage at 4°C 137

Figure 27. Total pH and acidity changes of *chungkukjang* during storage at 37°C 147

Figure 28. Total pH and acidity changes of *chungkukjang* during storage at 15°C 148

Figure 29. Total pH and acidity changes of *chungkukjang* during storage at 4°C 149

ABSTRACT

Development of edible-media for GRAS microorganisms and its application as a bio-preservative

Moon, Song Hee

Adviser : Prof. Chang, Hae Choon, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

This study was investigated to develop edible-media for GRAS microorganisms (*Lactobacillus plantarum* AF1, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. plantarum* EM, *Leuconostoc citreum* GR1, *Leu. mesenteroides* TA, and *Bacillus subtilis* SN7) using Chinese cabbage waste (CW) and salted Chinese cabbage waste (SCW) produced during the kimchi making process at homes, small businesses, and conglomerates. The collected CW and SCW were analyzed for their characteristics such as pH, titratable acidity, crude proteins, and free amino acids. As a result, there was no significant difference between the CW and SCW collected in accordance with location and season.

The prepared CW and SCW juices were used as medium for GRAS microorganisms. After addition of corn steep liquor, glucose, and inorganic salts to the CW and SCW juices, pH levels were adjusted to the optimum pH for the strain. When *Lb. plantarum* AF1 was cultured in CW medium at 30°C for 24 hr, growth was 9 log CFU/mL, antibacterial activity was 160 AU/mL, and antifungal activity was 640 AU/mL. These values are almost the same as the values observed in MRS medium. Under SCW medium, viable

cell number and antimicrobial activities of *Lb. plantarum* AF1 were the same in MRS medium. The four lactic acid bacteria strains also showed the same viable cell numbers and antimicrobial activities under CW or SCW medium. When *B. subtilis* SN7 was cultured under CW medium, viable cell number (10^8 CFU/mL) and antibacterial activity against *B. cereus* (1,600 AU/mL) were the same values in TSB medium. Antifungal activity against *A. ochraceus* (2,560 AU/mL) was higher than that in TSB medium (640 AU/mL). The pH stability (pH 3.0~9.0) and thermal ($37^\circ\text{C} \sim 121^\circ\text{C}$) and enzyme stabilities of the antimicrobial materials were investigated in accordance with the respective medium. As a result, it was confirmed that there was no difference in antimicrobial materials produced in the laboratory and edible medium (CW and SCW medium).

Natural antimicrobial materials derived from GRAS microorganisms in edible medium (CW and SCW medium) were investigated to control film-forming yeast of kimchi. Yeast colonies could be observed on the surface of control kimchi (not treated), grapefruit seed extract-treated kimchi, and *Lb. plantarum* AF1 culture supernatant of CW medium after 15, 20, and 30 days of incubation at 4°C , respectively. This result demonstrates that the anti-yeast compounds from *Lb. plantarum* AF1 could be used as a bio-preservative, which can prevent film-forming yeasts in kimchi. In order to control *B. cereus* in *chungkukjang*, culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in SCW medium was added. As a result, *B. cereus* was completely controlled after 2 days of incubation at 37°C .

This study developed a low-cost food grade medium for GRAS microorganisms using CW and SCW, which was confirmed as a food bio-preservative.

제 1 장 서 론

제 1 절 식품 미생물

식품 미생물이란, 식품의 발효, 저장, 위생 등에 관여하는 미생물로 인류의 역사만큼이나 오랜 역사를 가지고 있다[75,81]. 김치와 요구르트는 대표적인 유산균 발효 식품으로 그 영양학적 가치와 기능성은 여러 연구를 통해 밝혀졌다 [11,51,75]. 청국장과 같은 장류 또한 메주를 만들 때 사용되는 지푸라기로부터 접종된 고초균 또는 곰팡이에 의한 우리나라 전통 발효식품 중 하나이다[81,137,138].

이러한 식품 미생물은 식품의 발효에 관여할 뿐만 아니라 부패 미생물이나 식중독균과 같은 유해미생물로부터 식품을 보호하는 역할을 한다. 김치의 경우 발효가 진행됨에 따라 김치 내 유산균에 의해 생성된 각종 유기산과 박테리옌에 의해 식중독균과 같은 병원성 균의 오염으로부터 안전할 수 있다[79,116,125,136]. 이처럼 식품에는 다양한 미생물이 존재하는데 식품의 원재료에 있는 영양물을 대사하여 식품으로 하여금 좋은 풍미와 맛을 주는 유용한 미생물이 있는 반면 식품에 정착하여 식품을 변패시키거나 식중독을 유발하는 유해한 미생물도 있다. 식중독이란, 식품의 섭취로 인하여 인체에 유해한 미생물 또는 유독 물질에 의하여 발생하였거나 발생한 것으로 판단되는 감염성 또는 독소형 질환을 말한다 [61]. 식중독의 경우, 그 오염경로에 따라서 크게 3개로 나눌 수 있는데 첫 번째로 자연독 식중독은 동물성 자연독(복어독 등)에 의한 중독, 식물성 자연독(감자독, 버섯 등)에 의한 중독, 곰팡이 독소(황변미독 등)에 의한 중독을 의미하며, 두 번째로 화학적 식중독은 식품첨가물 등 고의로 첨가되는 유해물질 혹은 잔류 농약, 납, 비소 등과 같이 잔류, 혼입, 제조 및 가공 저장 중 생성되는 각종 유해물질에 의한 식중독을 말한다. 세 번째로 미생물에 의한 식중독은 세균성, 바이러스성, 원충성으로 나뉘며 이중 세균에 의한 식중독은 다시 감염형과 독소형으로 나눌 수 있다. 먼저 감염형 식중독은 살모넬라, 장염비브리오, 병원성대장균 (EPEC; enteropathogenic *E. coli*, EHEC; enterohemorrhagic *E. coli*, ETEC; enterotoxigenic *E. coli*, EAEC; enteroadherent *E. coli*) 등에 의한 식중독으로 식품에 증식된 다량의 균에 의해 발생한다. 독소형 식중독은 황색포도상구균, 클

로스트리디움 퍼프린젠스, 클로스트리디움 보툴리눔에 의한 식중독으로 식품에 오염된 균이 증식하며 생성하는 독소에 의해 일어난다[61]. 국내에서는 매년 식중독 사례가 끊임없이 발생하고 있으며, 그 발생원인물질을 살펴보면 병원성 대장균, 살모넬라 등 미생물에 의한 식중독 빈도수가 압도적으로 많다(Table 1). 2002년부터 2016년 4월까지 발생한 식중독 사례를 살펴보면 발생빈도수가 가장 많은 발생원인물질은 병원성 대장균으로 총 417건의 발생건수와 총 24,111명의 환자가 발생하였다. 그 다음으로는 살모넬라로 총 300건의 발생건수와 총 9,731명의 환자가 발생하였다[61]. 반면 자연독에 의한 식중독은 총 35건의 발생건수와 총 348명의 환자수가 발생했으며 화학물질에 의한 식중독은 총 5건의 발생건수와 총 59명의 환자가 발생하였다. 이와 같이 식중독 균에 의한 식중독 발생이 대부분이며 이러한 식중독 사고는 국내뿐만 아니라 전 세계 각지에서 일어나고 있다[50,74]. 식품에서 이러한 유해 미생물을 제어하기 위해 주로 식품첨가물인 합성보존제가 사용되는데 이는 화학적 합성품으로 강력한 항균력을 가지지만 체내 잔류로 인한 독성 등의 이유로 그 사용량이 제한되어 있다[47,85,124,132].

1. 국가별 식품 미생물 평가 제도

식품에서 유래된 다양한 미생물 중 식품에 사용할 수 있는 미생물 원료에 대해 미국의 GRAS 제도[30], 유럽연합의 QPS 제도[25] 등이 발표되었으며 우리나라 또한 식품공전[65]에 식품원재료로서 사용이 가능한 미생물이 명시되어 있다.

가. 미국의 GRAS 제도

GRAS (Generally Recognized as Safe)란 미국 식품의약국(Food and Drug Administration; FDA)에서 지정한 일반적으로 안전하다고 인정되는 물질로, 1958년 12월 9일 연방 관보(Federal Register)를 통해 처음 GRAS 목록이 발표되었다. 이는 안전하게 사용되어왔던 오랜 역사를 기초로 하여 그 안전성이 판단된 물질로서 1997년 이전까지는 “GRAS Affirmation Petition” 절차에 따른 승인을 거쳐야만 사용할 수 있었다. 하지만 복잡한 절차와 시간상의 문제로 현재는

Table 1. Food poisoning incidents and cases, by pathogenic bacterium, 2011–2015, Korea

	Causative microorganism of food poisoning				
	2011	2012	2013	2014	2015
1	Pathogenic <i>E. coli</i>	Pathogenic <i>E. coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Pathogenic <i>E. coli</i>	Pathogenic <i>E. coli</i>
2	<i>Salmonella</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	Pathogenic <i>E. coli</i>	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Campylobacter</i>
3	<i>Campylobacter</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
4	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Bacillus cereue</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Salmonella</i>
5	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
6	<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Bacillus cereue</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereue</i>	<i>Bacillus cereue</i>
7	<i>Bacillus cereue</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>
8	Other microorganisms	Other microorganisms	Other microorganisms	Other microorganisms	Other microorganisms

Reference: [61]

“GRAS Notification Process” 제도에 따라 제조업자 스스로 식품 전문가들의 안전성 review를 통해 안정성이 입증된 소재를 결정하고, 안전성을 뒷받침할 수 있는 증거를 FDA에 제시함으로써 승인받을 수 있는 절차가 마련되어 있다[30]. GRAS 등재 조건을 살펴보면 다음과 같다. 첫째, 식품에 자연적으로 이미 존재하는 성분, 둘째, 체내에서 쉽게 신진대사 될 수 있는 성분, 셋째, 안전하다고 알려진 것과 구조가 매우 유사한 성분, 넷째, 광범위하게 다년간 사용되어 안전성이 경험적으로 확립된 성분, 다섯째, 두개 이상의 식품 회사에서 10년 이상 사용했고, 가공식품에 함유된 평균 최고 사용량이 10 ppm을 넘지 않으며 연간 소비량이 1,000 파운드 미만이고 안전성에 의심이 가는 징후를 가지지 않는 것이다 [22,128]. 현재까지 약 450 여개의 물질이 GRAS로 등록되어 있으며 그 중 21 CFR 172 및 173에는 식품에 사용가능한 미생물 및 미생물 유래 성분이 제시되어 있다(Table 2). 미국 연방법상(CFR, Title 21, Part 131) 식품에 사용가능한 미생물 및 미생물 유래 성분으로는 49건에 달한다. 그 중 식품보존제로서 항균 물질과 관련된 GRAS 등급 미생물 또는 미생물 유래 성분으로는 regulation §172.155에서의 *Streptococcus natalensis*와 *S. chattanoogensis*의 natamycin과 regulation §184.1538에서의 *Lactococcus lactis*는 nisin으로 총 2건이 불과하다.

한편 GRAS 식품 원료로의 요청에 의한 GRAS로 인정받은 물질 중 미생물에 해당하는 것은 약 28건에 달하며, 이 중 식품보존제와 관련하여 항균 물질 생산을 목적으로 한 항목은 총 5건에 달한다(Table 3). GRN number 159에 따르면 즉석 섭취 식품(육류)에 *Listeria monocytogene*를 제어하기 위한 목적으로 *Carnobacterium maltaromaticum* CB1의 사용이 가능하고, GRN number 378에 따라 유제품, 곡물 등을 기본으로 한 *S. thermophilus*, *Bacillus coagulans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* 등에 의한 발효물질은 항균 활성 물질로써 다양한 식품 분야에 적용이 가능하다.

나. 유럽연합의 QPS 제도

유럽연합(EU, European Union)은 1997년부터 Novel Food Regulation (NFR)에 따라 식품 제조를 위해 첨가할 수 있는 미생물을 제한하기 시작하였다. 현재

는 European Food Safety Agency (EFSA)의 Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN), Scientific Committee on Food (SCF), Scientific Committee on Plants (SCP)의 의견에 따라 식품이나 사료에 사용가능한 미생물의 안전성 평가를 위한 QPS (Qualified Presumption of Safety)를 제안하였다. QPS는 미생물 단위의 일반적인 안전성을 정의한 것으로 이 목록은 매년 업데이트 되고 있다. QPS 목록에 등록된 미생물은 개별적인 안전성 평가 없이 균주 수준에서의 특이적 문제가 없다면 식품 사용이 가능하다. QPS의 등재 조건은 분류(taxonomy), 정량적 정보의 양(familiarity), 병원성 여부(pathogenicity), 적용 상황(end use)의 항목을 중심으로 평가된다. 현재까지 총 85종의 미생물이 QPS로 등록되어 있으며 이중 유산균에 속하는 미생물은 *Bifidobacterium* sp. 5종, *Lactobacillus* sp. 35종, *Lactococcus* sp. 1종, *Leuconostoc* sp. 4종 그리고 *Pediococcus* sp. 3종으로 총 48종이 등록되어있다[25]. 한편 *Bacillus* sp.는 총 12종이 등록되어 있는데 이때의 해당 균주는 항생제 내성 유전자를 포함한 독소 활성 유무검사를 마친 후 사용이 가능하다(Table 4).

다. 대한민국의 식품공전

국내에서는 식품공전 “제2. 식품일반에 대한 공통기준 및 규격 2. 식품원료기준 2) 식품원료판단기준”에 의거하여 국내·외에서 식용근거가 있는 미생물에 한하여 식품원료로 허용하고 있다. 여기에는 총 69종에 달하는 미생물을 식품 원료로서 제시하고 있으며 세균 56종, 효모 7종, 곰팡이 6종이 포함된다(Table 5). 이중 유산균에 속하는 미생물은 *Bifidobacterium* sp. 8종, *Lactobacillus* sp. 26종, *Lactococcus* sp. 2종, *Leuconostoc* sp. 4종과 *Pediococcus* sp. 3종로 총 43종이며 *Bacillus* sp. 속하는 미생물로는 *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. natto*, *B. polyfermenticus*, *B. subtilis*는 식품 원료로서 사용이 가능하고 *B. licheniformis*는 제한적으로 식용이 가능하지만 *B. cereus*와 *B. clausii*는 식품 원료로의 사용이 금지되어 있다[65].

Table 2. Food microbial substances of prior sanction in 21 CFR

Regulation	Strain	Ingredient of Food
§172.155	<i>Streptomyces natalensis</i> <i>Streptomyces chattanoogensis</i>	natamycin
§173.135	<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	catalase
§184.1005	Acetic acid produced by fermentation	acetic acid
§184.1012	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	alpha-amylase
§184.1027	<i>Bacillus licheniformis</i>	carbohydrase, protease
§184.1061	Lactic acid produced by fermentation	lactic acid
§184.1081	Propionic acid from bacterial fermentation	propionic acid
§184.1372	<i>Streptomyces rubiginosus</i> <i>Actinoplane missouriensis</i> <i>Streptomyces olivaceus</i> <i>Streptomyces olivochromogenes</i> <i>Bacillus coagulans</i>	insoluble glucose isomerase
§184.1538	<i>Lactococcus lactis</i>	nisin
§184.1685	<i>Escherichia coli</i> K-12 <i>Kluyveromyces marxianus</i> var. <i>lactis</i> <i>Aspergillus niger</i> var. <i>auamori</i>	rennet
§184.1848	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc citovororum</i> <i>Leuconostoc dextranicum</i>	butter starter
§184.1924	<i>Lactobacillus fermentum</i>	urease
§184.1945	<i>Streptomyces griseus</i>	vitamin B12
§184.1985	<i>Lactococcus lactis</i>	aminopeptidase
§186.1275	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> NRRL B-512	dextran
§186.1839	<i>Acetobacter xylinum</i> <i>Acetobacter suboxydans</i>	sorbose
§131.111	Characterizing microbial organisms lactic acid producing bacteria	acidified milk
§131.200	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	yogurt
§131.113	lactic acid producing bacteria	cheddar cheese
§136.110	lactic acid producing bacteria	bread, rolls, buns

Reference: [30]

Table 3. Bacteria in the GRAS notice inventory

GRN No.	Strain	Use
49	<i>Bifidobacterium lactis</i> strain Bb12 and <i>Streptococcus thermophilus</i> strain Th4	Ingredients in milk-based infant formula
159	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain CB1	Inhibitor of <i>Listeria monocytogenes</i> in ready-to-eat meat products
171	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> and <i>Pediococcus acidilactici</i>	Antimicrobial to control pathogenic bacteria in meat and poultry products
305	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> strain CB1 (viable and heat-treated)	Inhibitor of <i>Listeria monocytogenes</i> in a variety of foods including meat and poultry
378	Cultured dairy sources, sugars, wheat, malt, and fruit- and vegetable-based sources fermented by <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bacillus coagulans</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> and <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i> or mixtures of these strains	Antimicrobial agents in a variety of food categories
526	<i>Bacillus coagulans</i> strain Unique IS2 spores preparation	Probiotic in baked goods and baking mixes
597	<i>Bacillus coagulans</i> SNZ1969 spores preparation	Intended for use as a probiotic in various foods

Reference: [30]

Table 4. The 2013 updated list of QPS Status recommended biological agents for safety risk assessments carried out by EFSA Scientific Panels and Units, 3rd revision

Bacteria		Qualifications
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>		
<i>Bifidobacterium animalis</i>		
<i>Bifidobacterium bifidum</i>		
<i>Bifidobacterium breve</i>		
<i>Bifidobacterium longum</i>		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	
<i>Lactobacillus amylolyticus</i>	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	<i>Lactobacillus kefir</i>	
<i>Lactobacillus aviaries</i>	<i>Lactobacillus mucosae</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Lactobacillus panis</i>	
<i>Lactobacillus buchneri</i>	<i>Lactobacillus collinoides</i>	
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
<i>Lactobacillus cellobiosus</i>	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	<i>Lactobacillus pentosus</i>	
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Lactobacillus pontis</i>	
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
<i>Lactobacillus farciminis</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Lactobacillus sakei</i>	
<i>Lactobacillus gallinarum</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	
<i>Lactobacillus helveticus</i>		
<i>Lactococcus lactis</i>		
<i>Leuconostoc citreum</i>		
<i>Leuconostoc lactis</i>		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>		
<i>Pediococcus acidilactici</i>		
<i>Pediococcus dextrinicus</i>		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>		
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>	Absence of toxigenic activity and acquired antibiotic resistance genes
<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	
<i>Bacillus clausii</i>	<i>Bacillus mojavensis</i>	
<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	
<i>Bacillus fusiformis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Bacillus lentus</i>	<i>Bacillus vallismortis</i>	

Reference: [25]

Table 5. The list of possible microorganisms used in the domestic food ingredients

Ingredients	Food availability		
	possible	limited	impossible
<i>Acetobacter pasteurianus</i>		○	
<i>Acetobacter xylinum</i>		○	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	○		
<i>Bacillus cereus</i>			○
<i>Bacillus clausii</i>			○
<i>Bacillus coagulans</i>	○		
<i>Bacillus licheniformis</i>		○	
<i>Bacillus natto</i>	○		
<i>Bacillus polyfermenticus</i>	○		
<i>Bacillus subtilis</i>	○		
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	○		
<i>Bifidobacterium animalis</i>	○		
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	○		
<i>Bifidobacterium breve</i>	○		
<i>Bifidobacterium infantis</i>	○		
<i>Bifidobacterium lactis</i>	○		
<i>Bifidobacterium longum</i>	○		
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	○		
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	○		
<i>Lactobacillus brevis</i>	○		
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	○		
<i>Lactobacillus casei</i>	○		
<i>Lactobacillus caucasicus</i>	○		
<i>Lactobacillus crispatus</i>	○		
<i>Lactobacillus curvatus</i>	○		
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	○		
<i>Lactobacillus fermentum</i>	○		
<i>Lactobacillus gasseri</i>	○		
<i>Lactobacillus helveticus</i>	○		
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		○	
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	○		
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefiranofaciens</i>	○		
<i>Lactobacillus kefiranofaciens</i> subsp. <i>kefirgranum</i>	○		

Ingredients	Food availability		
	possible	limited	impossible
<i>Lactobacillus kefir</i>	○		
<i>Lactobacillus lactis</i>	○		
<i>Lactobacillus leichmannii</i>	○		
<i>Lactobacillus paracasei</i>	○		
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	○		
<i>Lactobacillus pentosus</i>	○		
<i>Lactobacillus perolens</i>	○		
<i>Lactobacillus plantarum</i>	○		
<i>Lactobacillus reuteri</i>	○		
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	○		
<i>Lactobacillus sakei</i>	○		
<i>Lactobacillus salivarius</i>	○		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	○		
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	○		
<i>Leuconostoc citreum</i>	○		
<i>Leuconostoc kimchii</i>	○		
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	○		
<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	○		
<i>Pediococcus acidilactici</i>	○		
<i>Pediococcus halophilus</i>	○		
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	○		
<i>Weissella confusa</i>	○		
<i>Weissella koreensis</i>	○		

Reference: [65]

2. GRAS 미생물의 활용

GRAS 미생물의 활용은 굉장히 광범위하게 이루어지고 있다(Figure 1). 식품 분야뿐만 아니라 준의약품, 화장품, 농약에 이르기까지 화학 소재가 아닌 천연물에 대한 소비자의 관심과 요구도가 높아짐에 따라 다방면에서의 활용이 이루어지고 있다. 먼저 식품 분야에서는 종균, 식품 첨가물(보존료, 효소제제 등), 건강기능식품(다이어트 보조제 등) 등에 활용되고 있다[17,29,32,78,79,125]. 또한 동물의 사료에도 사료의 보존성을 높이거나 유용 성분 활용을 위한 사료첨가물로서의 다양한 연구가 진행되었다[36,90,134]. 한편 화학농약을 대체할 수 있는 생물농약(biopesticide)으로도 활용이 가능하다. 생물농약이란, 자연계에 존재하는 물질이나 생물체 및 그로부터 유래한 소재를 이용하여 병원균, 해충, 잡초 등을 방제하는 작물보호제로 화학농약이 가지는 체내 잔류 위험과 이로 인한 독성 등을 보완하기 위해 개발되었다. 2001년 미국 Eden bioscience사의 Harpin(미생물 추출 단백질)을 시작으로 2003년 미국 Agraquest사의 Triatum(곰팡이) 등 다양한 생물농약이 개발되고 있다[35,53]. 그 외에도 준의약품 분야의 항생제 대체제나 생균제[126,131], 화장품과 위생청결제 등에 사용되는 천연방부제 등이 있다 [72,110].

가. 유산균

일반적으로 유산균이란 당류를 발효하여 에너지를 획득하고 대사산물로 젖산을 생성하는 세균을 총칭하는 말로 1919년 Orla-Jenson에 의해 최초로 보고되었다[100]. 유산균은 일반적으로 포자를 형성하지 않으며 카탈라아제 음성에 미호기성 Gram (+) 간균 혹은 구균으로, 현재까지 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Weissella* 등 약 20 여종의 속(genus)이 유산균에 속하는 것으로 알려져 있다[1].

유산균의 효능으로는 정장 작용[122], 면역 증강 작용[22,34], 혈중 콜레스테롤 저하 작용 및 다이어트 효과[18,45,52,104], 피부 미용 효과[72,123,131]와 항암작용[24,26]에 이르기까지 다양한 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 이러한 효능을 바탕으로 유산균은 다양한 분야에서 활용되고 있다.

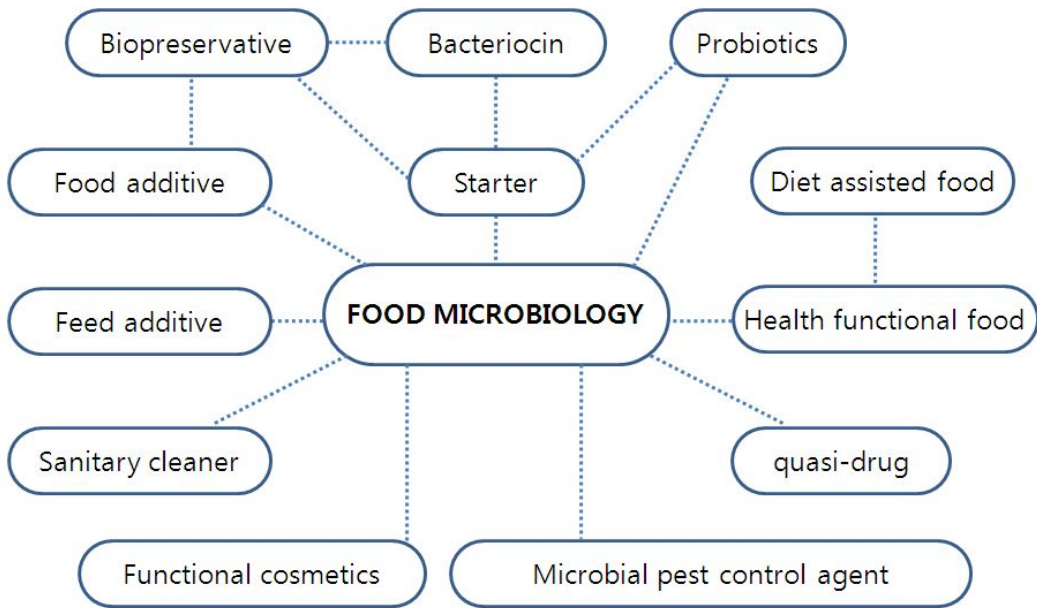


Figure 1. Food microbiology related fields

식품 분야에서의 유산균의 대표적인 활용으로는 한국의 김치[51,75], 중국의 Suan-tsai[84]를 비롯한 아시아의 전통발효식품[40,101,109]과 유럽의 발효 올리브[10,46,107,108,112,116]에 이르기까지 전 세계 다양한 식품을 대상으로 한 종균(starter)화 시도이다. 이러한 발효식품의 종균화는 식품의 특정 기능성 성분을 향상시키거나 품질의 안정화, 또는 부패균 및 식중독균을 제어하기 위함이다. 이탈리아 Campania 지역 전통발효 소시지로부터 분리·동정된 *Lb. curvatus* 54M16은 sakacin X, T, P를 생산하며 이는 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*와 육제품 부패 주요 원인 미생물인 *Brochotrix thermosphacta*에 대한 항균 활성을 가진다. 이에 발효소시지 종균으로 적용 시 발효 소시지내 *Staphylococci*, *Enterobacteriaceae* 외 곰팡이와 효모를 제어하는 결과를 보여주었다[12].

또한 프로바이오틱스는 대표적인 유산균 유래 건강기능식품으로 건강기능식품 공전의 기준 및 규격에 따르면 프로바이오틱스란 “프로바이오틱스는 다음의 미생물(Table 6) 또는 이를 혼합한 균과 균 또는 배양체를 배양시키기 위한 배지 및 보호제”라 정의되어 있다[56]. 프로바이오틱스의 기능적인 면을 살펴보면 장내 미생물의 균형, 체내 유해균 억제, 배변활동의 원활 등을 들 수 있으며 이외에도 개별인정원료로 피부보습, 면역과민반응에 의한 피부상태개선, 체지방 감소와 같은 다양한 효능을 지닌 유산균이 국내·외에서 개발되고 있다[64,73,106].

이러한 유산균은 분리된 식품에 따라 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 이는 유산균의 대표적인 발효식품인 유제품 유래 유산균과 김치 유래 유산균이다. 이 두 부류의 유산균은 각각 서로 다른 원료와 환경 하에 생육하지만 분자생물학적으로 매우 가깝다. 유제품의 주원료가 되는 우유는 유단백과 유지방, 유당(lactose)를 함유하고 있으며, 김치의 주원료는 배추로 포도당, 과당 외 소량의 아미노산과 지방이 함유되어 두 식품의 구성 성분의 차이에 따라 이 둘로부터 분리된 유산균의 대사가 다르다. 즉 유제품 유산균의 경우, 유당을 중심으로 대사하여 만들어진 산에 의해 발효되며 김치 유산균의 경우 포도당과 과당을 중심으로 대사되어 산이 생성되는 차이점이 있다. Lee[79]에 따르면 김치로부터 분리된 *Leu. mesenteroides* TA의 ITS, 16S, 18S rRNA sequence로 살펴본 분자생물학적 동정 결과, *Leu. mesenteroides* ATCC 8293과 100% 일치하였다. 하지만 API 50 CHL를 이용한 당대사능 검사 결과, lactose를 포함한 5개의 탄수화물 대사능이

다른 것을 확인할 수 있었다. 이 외에 김치 유래 유산균의 경우 lactose 대사능이 없다는 보고가 대다수였으며[15,69,136], 반면 유제품 유래 유산균의 경우 lactose 대사능이 대부분 있는 것으로 나타났다. Ashmaig[5]에 따르면 염소의 것으로부터 분리한 유산균 24종 중 lactose 대사능이 없는 유산균은 단 1종에 불과하였으며 반면 김치로부터 분리된 유산균 *Lb. paraplantarum* KNUC25[69], *Leu. inhae*[68], *Leu. citreum* GJ7[15] 등은 lactose 대사능이 없었다.

이처럼 유제품 유래 유산균에게는 lactose 대사능이 필수적이지만 김치 내 lactose가 존재하지 않음으로 인해 김치 내 존재하는 유산균에게는 lactose 대사능이 요구되지 않았고 이러한 환경적 영향에 따른 미생물의 진화가 이루어진 것으로 사료된다.

나. 고초균

고초균은 균을 고(固), 풀 초(草), 세 균(菌)의 한자어로 *Bacillus subtilis*를 의미한다. *B. subtilis*는 진정세균목(Eubacterials)에 속하며 단막구조의 Gram 양성균으로 간균의 형태를 갖으며 카탈라아제 양성에 호기성이며 편모가 있어 운동성을 가진다. 또한 균체의 중앙에 원형 또는 난원형의 아포를 형성하는 특징을 지니고 있다. 이들은 공기나 마른 풀, 물, 토양 속 등 자연계에 널리 퍼져있으며 30~37℃에서 가장 잘 증식하며 50~57℃의 고온에서도 증식한다. 또한 탄수화물을 분해하고 산을 생성하는 특징을 갖으며 amylase, protease 등의 각종 효소를 생산하기도 한다. 고초균은 내생포자를 형성하기 때문에 산이나 위액, 담즙산과 같은 각종 체내 소화 효소에 대한 저항성을 지니며 생균제 제조 과정 중 생기는 열과 압력과 같은 물리적 자극에 대한 저항성을 가지고 있어 프로바이오틱스로 주목 받고 있다[126]. 초기 유산균을 중심으로 발전하던 프로바이오틱스 시장은 점점 *Bacillus* sp. 유래 프로바이오틱스 제품이 생산되며 그 생산량은 증가하고 있는 추세이다[20,43,117]. 현재까지 다양한 종류의 *Bacillus* sp. 유래 프로바이오틱스가 개발되었으며 이들의 효능 또한 다양하다[7,39,41,43,76,102,120,121,126].

Table 6. Raw materials of probiotic microorganisms in the Health Functional Food Code (2014-204)

	Species
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>L. gasseri</i> <i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus</i> <i>L. helveticus</i> <i>L. fermentum</i> <i>L. paracasei</i> <i>L. plantarum</i> <i>L. reuteri</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. salivarius</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. thermophilus</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> <i>B. breve</i> <i>B. longum</i> <i>B. animalis ssp. lactis</i>

Reference: [56]

제 2 절 미생물용 배지

일반적으로 미생물이 생육하는 데에 있어서는 수분, 영양분, 온도, 산소, pH, 생리적 삼투압 등 미생물의 종류에 따라 필요로 하는 요인이 있다. 이 중 배양배지는 미생물이 자라는 영양적 환경을 의미하며 이러한 배지 성분으로는 탄소원과 질소원, 미네랄, 미량원소들을 포함한다[92].

1. 유산균용 배지

가. 유산균용 시판 배지

유산균은 영양요구성이 까다로운 미생물 중 하나로 유산균 배양을 위한 대표적인 실험실용 배지로는 MRS[114]를 들 수 있다. MRS는 포도당과 peptone, 소고기 추출물 및 효모 추출물, 각종 미네랄에 이르기까지 영양분이 풍부한 배지로 (Table 7) 이 배지의 가격은 2016년 기준 g당 242원이며 일반적인 세균 배양용 배지인 PCA(g당 160원)과 비교해보았을 때 약 1.5배 정도 비싸다. 유산균 배양을 위한 배지들에는 공통적으로 단백질원이 첨가되며 이러한 단백질원에는 그 종류에 따라 다양하다. Peptone[7]은 육류나 우유의 단백질을 pepsin 등의 효소로 소화시켜 만든 영양분으로 폴리펩티드와 아미노산 등이 혼재되어 있고 beef extract[7]의 경우 쇠고기의 근육부분에서 수용성 침전물을 추출하여 농축시킨 것으로 엽류, 발육소, 핵산, 기타 당분 및 아미노산까지 다양한 영양성분을 제공한다. yeast extract[7]는 효모에서 추출한 수용성의 침출 물질로 엽류, 발육소, 핵산 등이 혼재되어 있는 것이다. 이 외 malt extract, soytone, tryptone 등의 질소원은 그 단가가 고가이며 특유의 색과 향으로 식품산업에 적용이 어렵다. 또한 이와 같은 시판 배지의 경우 대부분 유제품 유래 유산균의 분리와 배양을 위해 개발된 제품으로 김치 유산균 배양에 적합한 배지의 개발이 필요하다. 이 외 유산균은 sodium acetate와 같은 엽류와 calcium carbonate과 같은 무기질을 필요로 한다. 이러한 시판배지는 대부분 국외 연구를 통해 사용화된 것으로써 유제품 혹은 발효육제품 유산균을 배양하기 위한 배지임을 알 수 있다.

Table 7. List of commercially available media for lactic acid bacteria

No.	Medium	Ingredients*	Ref
1	APT	Yeast extract..... 7.5 g Pancreatic digest of casein..... 12.5 g Dextrose..... 10.0 g Sodium citrate..... 5.0 g Thiamine hydrochloride..... 1.0 mg Sodium chloride..... 5.0 g Dipotassium phosphate..... 5.0 g Manganese chloride..... 0.14 g Magnesium sulfate..... 0.8 g Ferrous sulfate..... 0.04 g Polysorbate 80..... 0.2 g	[28]
2	Chalmers ,Modified	Soya peptone..... 5.0 g Beef extract..... 5.0 g Yeast extract..... 5.0 g Glucose..... 20.0 g Lactose..... 20.0 g Calcium carbonate..... 10.0 g Neutral red..... 0.05 g	[13]
3	Elliker	Pancreatic digest of casein..... 20.0 g Yeast extract..... 5.0 g Gelatin..... 2.5 g Dextrose..... 5.0 g Lactose..... 5.0 g Saccharose..... 5.0 g Sodium chloride..... 4.0 g Sodium acetate..... 1.5 g Ascorbic acid..... 0.5 g	[88]
4	Lactobacilli MRS	Proteose peptone No. 3..... 10.0 g Beef extract..... 10.0 g Yeast extract..... 5.0 g Dextrose..... 20.0 g Polysorbate 80..... 1.0 g Ammonium citrate..... 2.0 g Sodium acetate..... 5.0 g Magnesium sulfate..... 0.1 g Manganese sulfate..... 0.05 g Dipotassium phosphate..... 2.0 g	[114]
5	LBS	Pancreatic digest of Casein..... 10.0 g Yeast extract..... 5.0 g Monopotassium phosphate..... 6.0 g Ammonium citrate..... 2.0 g Dextrose..... 20.0 g Polysorbate 80..... 1.0 g Sodium acetate hydrate..... 25.0 g Magnesium sulfate..... 575.0 mg Manganese sulfate..... 0.12 g Ferrous sulfate..... 34.0 mg	[87]
6	M17	Pancreatic digest of casein..... 5.0 g Soy peptone..... 5.0 g Beef extract..... 5.0 g Yeast extract..... 2.5 g Ascorbic acid..... 0.5 g Magnesium sulfate..... 0.25 g Disodium-β-glycerophosphate..... 19.0 g	[23]

* Approximate Formula Per Liter

나. 유산균용 개발 배지

실험실용 유산균 배지의 단점을 보완하고 산업화를 위해 단가를 낮추기 위한 유산균 전용 배지를 개발은 유산균의 효능이 밝혀짐과 동시에 요구되어 왔다. 현재까지 세계적인 유산균 원료사인 덴마크의 크리스 한센, 미국의 듀퐁 다니스코, 스위스의 DSM 등 약 5개의 업체에서 유산균 산업을 주도하고 있으며[93] 이들의 유산균 배양 기술은 그들만의 노하우로 노출되지 않고 있다. 근래 쉐바이오텍이라는 국내 유산균 전문 업체의 등장으로 과거 전량 수입에 의존하던 유산균 원료의 국내 생산이 가능해졌지만 쉐바이오텍 역시 유산균의 다중 코팅 기술의 개발 등 그 가능성이 중심이 되어 완제품에 의한 마진율이 높은 편이며 단가의 저감화를 필요로 한다. 유산균을 배양하고 그 유효 성분을 생산하기 위한 여러 연구들이 진행되었다(Table 8). Kimmel[70]은 exopolysaccharide(EPS) 생산에 적합한 *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* RR의 최적배지 조건을 연구하였다. MRS배지 조성에서 yeast extract를 제외한 배지에서의 EPS 생산량은 63% 감소하였고 yeast extract와 beef extract 둘다 제외한 배지에서의 EPS 생산량은 74% 감소하였다. Yeast extract와 peptone을 제외한 배지에서는 EPS 생산량이 84% 감소함으로써 *Lb. delbruekii* ssp. *bulgaricus* RR의 최적 EPS 생산용 배지의 조성은 maltose 2%, yeast nitrogen base 0.5%, bacto casitone 1%, tween 80 0.1% 등 질소원을 포함한 다양한 무기염의 첨가된다. Moon[94]은 폐배추 추출물을 이용하여 종균 배양용 최적 배지를 개발하였다. *Leu. citreum* GR1은 폐배추 잎 30%와 maltose 2%, yeast extract 0.25%, sodium acetate 2%, disodium hydrogen phosphate 외 4종의 무기염을 혼합한 결과 최대 생육도를 보여주었다. Halami[38]는 pediocin C20 생산을 위한 *P. acidilactici* C20의 식용배지를 개발하였다. Whey(유청) 폐수의 일종인 whey permeate와 yeast extract 2.0%, tween 80 0.1%를 첨가하여 배지를 제조한 결과 최대 생육도(OD₆₀₀ 3.5)와 최대 pediocin 생산량(150×10³ AU/mL)을 보였다.

이처럼 다양한 유산균에 대한 배지 개발 실험의 결과, 대부분 단백질성 물질을 대체하기 위한 새로운 질소원을 개발하거나 yeast extract와 peptone 같은 단백질원을 소량 사용하여 유산균의 배양 조건을 만족시켰다. 이에 단백질성 물질을

대처할 수 있는 대안 책으로 어려운 공정과 원료의 희귀성을 배제한 유산균용 저가 배지의 개발이 필요하다. 또한 *Leu. citreum* GR1[94], *Lb. plantarum* NRIC 0380[119]을 제외한 대부분의 유산균은 유제품 유래 유산균으로 앞서 말한 바와 같이 유제품 유래 유산균과 김치 유래 유산균의 대사적 차이에 따라 김치 유래 유산균을 위한 배지 개발이 필요하다.

한편 런던 협약에 의해 2014년 이후, 산업폐기물의 해양 투기가 금지됨에 따라 김치 제조 시 파생되는 폐배추와 절임폐배추의 해양 투기가 법적으로 금지되었다. 이는 김치의 산업화로 인해 김치의 가공량이 증가함에 따라 파생되는 배추 폐기물의 양 또한 증가하는 시점에 더 이상 바다에 투척할 수 없게 됨으로서 이를 처리하기 위한 방안이 모색되어야 한다. 또한 배추의 과잉 생산으로 인한 폐기가 2004년 이후 해마다 반복되고 있으며 이를 해결하기 위한 정부의 노력에도 불구하고 배추 값 폭락과 이로 인한 대량 산지 폐기는 계속해서 반복되고 있다. 이에 배추폐기물(폐배추, 절임폐배추)을 이용하여 김치로부터 분리된 강력한 항균 활성을 지닌 GRAS 미생물용 저가 배지를 개발함으로써 배추 폐기물 처리방안을 도출하고 폐자원의 자원화를 통해 고부가가치 창출을 기대하고자 한다. 이러한 배추 폐기물의 이용이 가능한 이유는 김치 유래 유산균을 사용하기 때문이며 이는 유제품 유래 유산균과 달리 김치에서 생육이 가능하며 이는 대사적인 진화로 인한 김치 유산균의 영양요구성의 변화를 말한다.

Table 8. List of development media for lactic acid bacteria

No.	Strain	Source	Ingredients*	Ref
1	• <i>Lactobacillus plantarum</i> NCIM 2084	National Collection of Industrial Microorganisms	Glucose..... 50 g Yeast extract..... 10 g K ₂ HPO ₄ 0.25 g KH ₂ PO ₄ 0.25 g Sodium citrate..... 1.0 g MgSO ₄ ·7H ₂ O..... 0.005 g MnSO ₄ ·7H ₂ O..... 0.003 g FeSO ₄ ·7H ₂ O..... 0.002 g Ascorbic acid..... 0.005 g	[129]
2	• <i>Lactobacillus delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> RR	-**	Dextrose..... 20 g Tween 80..... 1 g Ammonium citrate..... 2 g Sodium acetate..... 5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O..... 0.1 g MnSO ₄ 0.05 g K ₂ HPO ₄ 2 g Yeast nitrogen base..... 5 g Bacto casitone..... 10 g	[70]
3	• <i>Lactobacillus fermentum</i> LDTM CG1	Dairy product	Corn steep liquor..... 70 g Glucose..... 20 g Yeast extract..... 50 g KH ₂ PO ₄ 1 g K ₂ HPO ₄ 2 g Tween 80..... 10 g	[2]
	• <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> LDTM PP1	Dairy product	Corn steep liquor..... 70 g Glucose..... 20 g β-Glycerophosphate disodium salt..... 19 g	
4	• <i>Lactobacillus rhamnosus</i> RW-9595M	-	Whey permeate..... 97.5 g Yeast extract..... 5 g Tween 80..... 1 g Vitamins Amino acids Salts	[86]
5	• <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT-288	-	Corn steep liquor..... 10 g <i>Debaryomyces hansenii</i> biomass grown in synthetic xylose medium..... 10 g MnSO ₄ ·H ₂ O..... 0.12 g FeSO ₄ ·7H ₂ O..... 0.05 g	[111]
6	• <i>Lactobacillus amylophilus</i> GV6	Starch industry waste	Wheat bran..... 10 g Peptone..... 10 g Yeast extract..... 10 g Tri-ammonium citrate..... 2 g NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O..... 0.1~1 g Tween 80..... 2 g	[98]
7	• <i>Pediococcus acidilactici</i> C20	Fowl intestine	Whey permeate..... 600 g Yeast extract..... 20 g Tween 80..... 1 g	[38]

No.	Strain	Source	Ingredients*	Ref
8	<ul style="list-style-type: none"> <i>Lactobacillus plantarum</i> NRIC 0380 	Pickles	Table sugar..... 20 g Yeast peptone standard type F..... 25 g Sunsoft Q-17S..... 0.75 g Sodium acetate..... 5 g Trisodium citrate..... 2.1 g MnSO ₄ ·4-5H ₂ O..... 0.05 g	[119]
9	<ul style="list-style-type: none"> <i>Carnobacterium divergens</i> M35 	Commercial samples of frozen smoked mussels	Snow crab hepatopancreas extract 65 g Dextrose..... 25 g K ₂ HPO ₄ 2 g Tween 80..... 1 g Di-ammonium citrate..... 2 g Sodium acetate..... 5 g	[128]
10	<ul style="list-style-type: none"> <i>Lactobacillus curvatus</i> DPPMA10 	Sourdough	Wheat flour hydrolysate glucose 20 g Sucrose..... 100 g Fresh yeast extract..... 333 g K ₂ HPO ₄ 2 g Sodium acetate..... 5 g Triammonium citrate..... 2 g MgSO ₄ 0.2 g MnSO ₄ 0.05 g	[91]
11	<ul style="list-style-type: none"> <i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 7469 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> O236 <i>Lactobacillus</i> sp. L46 	Ovine or Caprine	Lettuce..... 37.5 g Potato peels..... 75.0 g Cooked meat..... 25.0 g Pumpkin peel..... 25.0 g Tomato..... 25.0 g Eggshells..... 12.5 g Bread..... 50.0 g	[103]
12	<ul style="list-style-type: none"> <i>Leuconostoc citreum</i> GR1 	Kimchi	Chinese cabbage extract.... 300 g Maltose..... 20 g Yeast extract..... 2.5 g Sodium acetate trihydrate.... 20 g Disodium hydrogen phosphate 8 g Sodium citrate..... 8 g (NH ₄) ₂ SO ₄ 8 g MgSO ₄ 0.4 g MnSO ₄ 0.2 g	[14]
13	<ul style="list-style-type: none"> <i>Lactobacillus johnsonii</i> NRRL B-2178 	-	Sweet whey powder..... 80 g Yeast extract..... 30 g Inulin..... 10 g	[94]

* Approximate Formula Per Liter

** Not shown

2. 고초균용 배지

가. 고초균용 시판 배지

고초균용 시판 배지는 다음과 같다(Table 9). 1종을 제외한 모든 배지에 1개 이상의 질소원이 포함되어 있으며 bacillus medium은 L-glutamic acid를 0.4%(w/v), nutrient medium은 beef extract를 0.3%(w/v), tryptic soy medium은 casein과 soybean meal이 각각 1.7%(w/v), 0.3%(w/v) 포함한다.

이들은 대부분 *Bacillus* sp.의 분리 및 증균에 사용되는 배지로 타 연구들에서 bacteriocin 생산이나 효소를 생산하기 위한 공정에 사용되기도 한다. 하지만 고가의 단백질성 물질을 포함하며 이러한 부분은 산업화의 어려움을 가져온다.

나. 고초균용 개발 배지

시판배지의 단점을 보완하거나 특정 유용성분 생산의 최적화를 위한 배지의 개발은 여러 차례 진행되어 왔다(Table 10). *B. subtilis* DM-04는 알칼리성 단백질분해효소를 생산하기 위해 모근(imperata cylindrica) 8.9%와 maltose 10%, beef extract 0.1%로 최적화 하였다[96]. 명게로 부터 분리·동정된 *B. subtilis* NPU 001은 반응표면분석을 통해 땅콩 유박(groundnut oil cake)과 casein, 양배추 잎, MgSO₄를 조합하여 단백질분해효소생산을 최적화하였다[16]. 이 외에도 수산 폐기물에 속하는 새우 껍질 가루(shrimp shell powder)를 기본으로 하여 내열성 및 내염성을 지닌 알칼리성 단백질분해효소를 생산하였다[3]. 하지만 이들은 공통적으로 고가의 단백질원을 포함하거나 조개껍질과 같은 단단한 물질을 가루화 하는 등 공정상의 어려움을 갖는다.

Table 9. List of commercially available media for *Bacillus* sp.

No.	Medium	Ingredients*	Ref
1	Bacillus	K ₂ HPO ₄ 0.5 g Ferric Ammonium citrate..... 0.5 g MgSO ₄ 0.5 g Glycerol..... 20.0 g Citric acid..... 2.0 g L-Glutamic acid..... 4.0 g	[6]
2	Nutrient	Enzymatic digest of gelatin 5 g Beef extract 3 g	[89]
3	Tryptic Soy (TSB)	Enzymatic digest of casein 17.0 g Enzymatic digest of soybean meal 3.0 g Sodium chloride 5.0 g Dipotassium phosphate 2.5 g Dextrose 2.5 g	[88]
4	Minimal medium Davis without Dextrose	Dipotassium phosphate..... 7.0 g Monopotassium phosphate..... 2.0 g Sodium citrate..... 0.5 g Magnesium sulfate..... 0.1 g Ammonium sulfate..... 1.0 g	[21]
5	Alkvisco	Beef extract 10.0 g Peptone 10.0 g NaCl 5.0 g Acrylonitrile 0.5 g Dextrose 2.5 g	[113]
6	Luria Bertani (LB)	Tryptone 10.0 g Yeast extract 5.0 g Sodium chloride 10.0 g	[9]

* Approximate Formula Per Liter

Table 10. List of developed media for *Bacillus* sp.

No.	Strain	Isolated	Ingredients*	Ref
1	• <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> BNS3	Tunisia regions	Hydrolyzed gruel..... 15 g Yeast extract..... 5 g Ammonium sulfate..... 5.4 g	[140]
2	• <i>Bacillus</i> sp. L21	By-products of a leather factory	Soybean meal..... 3.0 g Maltose50..... 30~40 g Tween 80..... 0.35 g	[129]
3	• <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> VCRC B-17	Soil, water, larvae, roots of aquatic weeds	Soybean flour..... 25 g MgCl ₂ 0.203 g CaCl ₂ 0.102 g MnCl ₂ 0.01 g	[105]
4	• <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar. <i>kurstaki</i> BNS3	Tunisia regions	Glucose..... 15 g Soya bean..... 25 g Sea water..... 250 g	[33]
5	• <i>Bacillus subtilis</i> DM-04	Soil of Assam	Imperata cylindrica grass 890 g Maltose..... 100 g Beef extract..... 10 g	[96]
6	• <i>Bacillus subtilis</i> NPU 001	Soil of Taiwan	Shrimp and crab shell powder 20 g K ₂ HPO ₄ 1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O..... 0.5 g	[16]
7	• <i>Bacillus mojavensis</i> A21	Marine water	Hulled grain of wheat 30 g Sardinella peptone..... 1 g NaCl..... 2 g KH ₂ PO ₄ 1 g K ₂ HPO ₄ 0.3 g CaCl ₂ 2.0 g MgSO ₄ 1.0 g	[37]
8	• <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XZ-173	Healthy tomato rhizosphere soil	Soybean flour..... 111.6 g Rice straw..... 73.4 g	[141]
9	• <i>Bacillus alveayuensis</i> CAS 5	Marine sediments of Parangipettai	Shrimp shell powder..... 10 g K ₂ HPO ₄ 1 g MgSO ₄ ·7H ₂ O..... 0.5 g	[3]
10	• <i>Bacillus subtilis</i> GA CAS 8	Ascidian	Groundnut oil cake..... 6.0 g Casein..... 5.72 g Cabbage leaf..... 5.73 g MgSO ₄ 2.91 g	[118]
11	• <i>Bacillus licheniformis</i> RO3	Traditional fermented food of fresh red oncom	Red oncom powder..... 10 g Tryptone..... 5 g Yeast extract..... 2.5 g NaCl..... 5 g	[1]
12	• <i>Bacillus mojavensis</i> UEB-FK	Tunisia sahara regions	Wheat bran..... 60 g NH ₄ Cl..... 4 g MgSO ₄ 0.38 g	[54]

* Approximate Formula Per Liter

제 3 절 식품 보존제

우리나라에서는 1962년 식품위생법이 제정·공포되며 총 217품목의 식품첨가물이 최초로 지정되었다. 이 후 매년 식품첨가물에 대한 기준과 규격이 지속적으로 제·개정하며 현재는 총 654품목(화학적 합성품 441품목과 천연첨가물 213품목)의 식품첨가물이 등록되어 있다. 식품첨가물에 대한 정의는 국가와 단체에 따라 조금씩 차이가 있으며 대한민국의 식품위생법 제 2조에 의하면 식품첨가물은 “식품의 제조, 가공 또는 보존을 함에 있어서 식품에 첨가, 혼합, 침윤 또는 기타의 방법에 의하여 사용되는 물질(기구 및 용기·포장의 살균·소독의 목적으로 사용되어 간접적으로 식품에 이행될 수 있는 물질을 포함한다)”이라 정의된다(Table 11). 이러한 식품 첨가물은 크게 제조공정과 사용목적에 따라 분류할 수 있다. 먼저 제조공정에 따른 분류로는 화학적 합성품과 천연첨가물, 혼합제제로 나눌 수 있다. 화학적 합성품은 화학적 수단을 통해 원소 또는 화합물에 분해반응 이외의 화학반응을 일으켜 얻은 물질을 말하며 천연첨가물은 동물, 식물, 광물 등으로부터 유용한 성분을 추출·농축·분리·정제 등의 방법으로 얻은 물질을 말한다. 혼합제제란 식품첨가물 두 가지 이상을 혼합하거나 한 가지 또는 두 가지 이상 혼합한 것을 희석제와 혼합 또는 희석한 것을 말한다. 사용목적에 따른 분류 [62]로는 식품 첨가물의 사용용도에 따른 분류로서 산미료, 산도조절제, 고결방지제, 소포제, 산화방지제, 보존제, 착색료 등으로 그 용도에 따라 약 30여 가지로 나눌 수 있다(Table 12). 그 중 식품 보존제(보존료)란, 식품의 품질변화를 방지하여 식품의 영양과 신선도를 유지하기 위해 사용하는 첨가물로 세균, 곰팡이, 효모 등의 증식을 억제하는 역할을 한다. 식품 보존제로는 화학적 합성품 중 안식향산류, 소르빈산류, 아황산류, 프로피온산류, 질산염류를 들 수 있으며 천연첨가물 중에서는 나타마이신, 니신, 자몽종자추출물, 폴리리신, 리소짐, 차추출물, 유카추출물, 나린진 등을 들 수 있다.

20세기에 이르러 웰빙, 로하스 등 건강한 삶이 중요한 사회적 이슈가 됨에 따라 소비자들은 화학적 합성품의 독성 및 체내 잔류 등의 위험으로부터 벗어나고자 하였고 이에 천연첨가물 시장은 점점 커져가고 있다. 2011년~2014년도 식품 및 식품첨가물 생산실적[57,58,59,60]에 따르면 2013년 화학적 합성품 생산능력은

11,507,785 톤에서 2014년 9,909,046 톤으로 감소한 반면 천연 첨가물은 2013년 2,140,407 톤에서 2014년 2,161,732 톤으로 증가하였다. 생산액의 변화를 살펴보면 화학적 합성품은 2013년에서 2014년 사이 13.9% 증가하였고 천연첨가물은 24.6% 증가하였다. 국내 판매액(출하액)의 변화로는 화학적 합성품은 2013년에서 2014년 사이 약 33조원이 감소하였고 수출액 또한 약 3조원 가량 감소하였다. 반면 천연첨가물의 수출액은 2013년 약 3조 4억원에서 2014년 약 3조 8억원으로 상승하였다. 또한 2006년 9월부터 개정된 식품위생법의 식품 등의 세부표시기준 [62]에 따라 식품의 제조와 가공에 사용된 모든 원재료와 성분명을 표시하여야 하며 인위적으로 첨가된 식품첨가물 또한 그 주용도와 명칭을 표시하도록 되어 있다. 이에 소비자는 화학적 합성품에 대한 소비의 선택까지도 가능해 짐으로써 더욱더 천연첨가물 시장이 활성화되고 있다.

이처럼 화학적 합성 보존제의 안전성과 천연 보존제의 단점을 보완한 다양한 보존제가 개발되고 있다. 그 중 단연 중심이 되는 것이 박테리오신이며 이는 미생물로 부터 생산되는 천연의 항균성 단백질로서 기존의 항생제가 2차 대사산물 인데 반해 박테리오신은 자신의 유전자로부터 직접 생합성 되는 것이 특징이다. 이는 분자가 단백질로 이루어져 있기 때문에 체내 섭취시 소화기관의 효소에 의해 분해되어 인체 무독하며 잔류성이 없는 장점을 가지게 된다. 반면 2차 대사산물은 생명유지에 필수적이지 않은 물질들로 주로 정지기에 생성되며 주로 방선균과 곰팡이로부터 유래한다. 또한 그 생성과정이 복잡하고 배양 조건에 따라 생산이 결정되며 여기에는 항생물질, 스테로이드, 알칼로이드, 독성 물질 등이 속한다. 이러한 측면에서 박테리오신은 식품 등과 같은 다양한 분야에 생물학적 보존제(biopreservative) 나 발효식품의 미생물 제어로서 연구가 활발히 진행 되고 있다[17,31,139].

Table 11. Definition of food additives

	Reference	Definition
South Korea	Food Sanitation ACT Article 2 [63]	The term “food additives” means materials added to or mixed with foods or materials used for wetting foods in the process of manufacturing, processing or preserving foods. In such cases, food additives shall include materials used in sterilizing or disinfecting apparatus, containers or packages, which may be transmitted to foods in an indirect manner
CODEX	CODEX STAN 192-1995 [19]	Food additive means any substance not normally consumed as a food by itself and not normally used as a typical ingredient of the food, whether or not it has nutritive value, the intentional addition of which to food for a technological (including organoleptic) purpose in the manufacture, processing, preparation, treatment, packing, packaging, transport or holding of such food results, or may be reasonably expected to result (directly or indirectly), in it or its by-products becoming a component of or otherwise affecting the characteristics of such foods. The term does not include contaminants or substances added to food for maintaining or improving nutritional qualities
USA	Federal FD&C 201(s) [130]	Any substance the intended use of which results or may reasonably be expected to result, directly or indirectly, in its becoming a component or otherwise affecting the characteristic of any food (including any substance intended for use in producing, manufacturing, packing, processing, preparing, treating, packaging, transporting, or holding food; and including any source of radiation intended for any such use); if such substance is not GRAS or sanctioned prior to 1958 or otherwise excluded from the definition of food additives
EU	Council Directive 89/107/EEC [27]	Any substance not normally consumed as a food in itself and not normally used as a characteristic ingredient of food whether or not it has nutritive value, the intentional addition of which to food for a technological purpose in the manufacture, processing, preparation, treatment, packaging, transport or storage of such food results, or may be reasonably expected to result, in it or its by-products becoming directly or indirectly a component of such foods
Japan	Food Sanitation ACT Article 4-2 [48]	(i) substances used in or on food in the process of manufacturing food, or (ii) substances used for the purpose of processing or preserving food. Consequently, “food additive” includes both substances remaining in the final products, such as food colors and preservatives, and substances not remaining in the final products, such as microorganism control agents and filtration aids.

Table 12. Classification purposes in food additives

No.	용도	정의	해당 품목
1	산미료	식품의 산도를 높이거나 신맛을 주기 위해 사용되는 식품첨가물	천연비타민 C, 디부틸히드록시톨루엔 등
2	산도조절제	식품의 산도 또는 알칼리도를 조절하는데 사용되는 식품첨가물	주석산, 푸마르산, 탄산칼륨, 탄산수소나트륨 등
3	고결방지제	식품의 입자 등이 서로 부착되어 고형화되는 것을 방지하는 식품첨가물	실리코알루미늄산나트륨, 결정셀룰로오스 등
4	소포제	거품생성을 방지하거나 감소시키는 식품첨가물	규소수지, 옥시스테아린
5	산화방지제	지방의 산패, 색상의 변화 등 산화로 인한 식품품질 저하를 방지하여 식품의 저장기간을 연장시키는 식품첨가물	비타민 E, 몰식자산, 로즈마리추출물 등
6	표백제	식품의 탈색에 사용되는 식품첨가물	고도표백분, 차아염소산나트륨 등
7	증량제	식품의 열량에 관계없이 식품의 증량에 기여하는 공기나 물 이외의 식품첨가물	프로필렌글리콜 등
8	착색료	식품에 색을 부여 또는 복원하는데 사용되는 식품첨가물	β -카로틴, 식용색소류, 가지색소, 감색소 등
9	발색제	식품의 색소를 유지, 강화시키는데 사용되는 식품첨가물	아질산나트륨, 질산나트륨, 질산칼륨
10	유화제	물과 기름 등 같이 섞이지 않는 두개 또는 그 이상의 물질을 균질하게 섞어주거나 이를 유지시켜주는 식품첨가물	스테아릴젖산칼슘, 구연산칼슘, 켈라야추출물 등
11	유화제 염류	가공치즈의 제조과정에서 지방이 분리되는 것을 방지하기 위해 단백질을 안정화시키는 식품첨가물	emulsifying salt, melding salt 등
12	응고제	과일이나 채소의 조직을 견고하게 유지되도록 하거나 겔화제와 상호작용하여 겔을 형성 또는 강화하는 식품첨가물	염화마그네슘, 염화칼슘, 황산마그네슘 등
13	향미증진제	식품의 맛이나 향미를 증진시키는 식품첨가물	L-글루타민산나트륨, 5'-이노신산이나트륨 등
14	밀가루개량제	제빵의 품질이나 색을 증진시키기 위해 밀가루나 반죽에 추가되는 식품첨가물	L-시스테인염산염, 아조디카르본아미드, 염소 등
15	기포제	액체 또는 고체 식품에 기포를 형성시키거나 균일하게 분산되도록 하는 식품첨가물	켈라야추출물, 베이킹파우더, 라우리루황산나트륨 등
16	겔화제	겔 형성으로 식품에 물성을 부여하는 식품첨가물	글리세린

No.	용도	정의	해당 품목
17	광택제	식품의 표면에 광택을 내고 보호막을 형성토록 하는 식품첨가물	액상 셀락, 몰포린지방산염 등
18	피막제	식품의 외형에 보호막을 만들거나 광택을 부여하기 위해 사용되는 식품첨가물	몰포린지방산염, 올레인산나트륨, 초산비닐수지 등
19	습윤제	식품이 건조되는 것을 방지하는 식품첨가물	폴리글리시톨시럽, 폴리덱스트로스, 에리스리톨 등
20	보존료	미생물에 의한 변질을 방지하여 식품의 보존기간을 연장시키는 식품첨가물	아황산나트륨, 안식향산, 자몽종자추출물 등
21	충진제	식품 용기로부터 식품에 주입하는 공기 이외의 가스	이산화탄소, 질소 등
22	팽창제	가스를 방출하여 반죽의 부피를 증가시키는 식품첨가물	아디핀산, 염화암모늄, 효모 등
23	안정제	두개 또는 그 이상의 섞이지 않는 성분이 균일한 분산상태를 유지하도록 하는 식품첨가물	히알루론산, 글리세린, 락티톨, 말티톨시럽 등
24	감미료	식품에 단맛을 부여하는 설탕 이외의 식품첨가물	아세설팜칼륨, 삭카린나트륨, 자일리톨 등
25	증점제	식품의 점성을 증가시키는 식품첨가물	카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 아라비아검 등
26	살균제	미생물을 단시간 내에 사멸시키는 작용을 하는 식품첨가물	차아염소산나트륨, 오존수, 차아염소산수 등
27	껌기초제	껌에 적당한 점성과 탄력성을 가지게 하여 풍미를 유지하기 위해 사용되는 식품첨가물	석유왁스, 에스테르검, 자당지방산에스테르 등
28	효소제	반응속도를 높여주는 촉매작용을 하는 식품첨가물	인베르타아제, 카탈라아제, 키토사나아제 등
29	영양강화제	식품의 영양을 강화시키기 위해 사용되는 식품첨가물	칼슘, L-아스코르빈산, 탄산마그네슘 등
30	착향료	식품 특유의 향을 첨가하거나 제조공정 중 손실된 향을 첨가하여 식품 본래의 향을 유지시키기 위해 사용되는 식품첨가물	개미게라닐, 계피산메틸, 스모크향 등

Reference: [62]

1. 합성 보존제

안식향산류는 안식향산, 안식향산 나트륨, 안식향산 칼륨 등을 말하며 안식향산 자체는 물에 대한 용해도가 거의 없으며 승화성과 흡습성을 가지고 금속과 결합하여 금속염을 형성하는 특징을 가지고 있다. 안식향산의 항균 작용은 pH 2.5-4.0에서 최적의 활성을 나타낸다고 알려져 있다. 안식향산은 백색의 작은 잎 모양이나 바늘 모양으로 값이 싸고 변색을 유발하지 않는 장점을 가지나 쓴맛과 특유의 냄새가 나고 사용 pH 범위가 산성 쪽으로 집중되는 단점을 가진다. 특히 안식향산나트륨은 과일음료의 부패균인 진균류를 제어하기 위해 사용되기도 하는데 이 안식향산나트륨과 비타민 C가 작용해 벤젠을 생성하기도 한다.

소르빈산류는 소르빈산과 소르빈산 칼륨, 소르빈산 칼슘을 말하며 1940년대부터 식품에 사용되기 시작하였다. 소르빈산은 물에 대한 용해도가 거의 없기 때문에 칼슘과 칼륨의 형태로 사용되어지고 무색 혹은 백색의 결정성 분말이며 약간 자극적인 냄새를 내는 특징이 있다.

아황산류는 무수아황산, 아황산 나트륨, 메타중아황산 나트륨 등을 말하며 예로부터 포도주통의 방부제로 사용되어 왔다. 아황산은 무색의 불연성 가스로 때운 냄새가 나는데 보통 식품에 사용할 때는 안정성과 용해도를 고려하여 염의 형태인 아황산 나트륨이나 차아황산 나트륨 등으로 사용된다.

프로피온산류는 프로피온산과 프로피온산 칼슘, 프로피온산 나트륨을 말하며 향곰팡이 활성을 가지는 특징이 있고 빵과 치즈, 잼에만 제한적으로 사용된다. 이들은 불쾌하거나 자극적인 냄새를 가지며 산성의 pH에서 향곰팡이 활성을 보인다.

질산염류는 아질산나트륨, 질산나트륨, 질산칼륨을 말하며 물에 쉽게 용해되거나 알코올이나 에테르에 대한 용해도는 거의 없으며 백색의 결정성 분말로 약간의 짠맛을 내는 특징을 가지고 있다.

Table 13. List of synthetic chemical food preservatives

	ADI*	Characteristics	Spectrum	Domestic use criteria
Benzoic acid and its salts	5.0	Small leaf-shaped or needle-shaped crystals White Characteristic odor In alkaline conditions the effect decreases	Antifungal/ Antiyeast/ Antibacterial activity	1. Fruit-vegetables beverages : less than 0.6 g/kg 2. Soda : less than 0.6 g/kg 3. Other beverage, ginseng and red ginseng beverage : less than 0.6 g/kg 4. Soy sauce, other kind : less than 0.6 g/kg 5. Aloe leaf, health functional food : less than 0.5 g/kg More limited to less than 0.25~2.0 g/kg depending on the food type
Sorbic acid and its salts	25.0	Needle-shaped crystals Colorless In alkaline conditions the effect decreases	Antifungal/ Antiyeast/ Antibacterial activity	1. Natural cheese, processed cheese : less than 3.0 g/kg 2. Processed meat products, others : less than 2.0 g/kg 3. Collagen casings : less than 0.1 g/kg 4. Salted fish, Soybean paste : less than 1.0 g/kg 5. Aloe leaf, health functional food : less than 1.0 g/kg More limited to less than 0.2~2.0 g/kg depending on the food type
Sulfurous acid and its salts	0.7	Nonflammable gas Colorless Odor (pungent smell)	Antibacterial activity	1. Groud product : less than 5.0 g/kg 2. Molasses : less than 0.3 g/kg 3. Syrup and others : less than 0.2 g/kg 4. Fruit wine : less than 0.35 g/kg 5. Fruit juices, concentrated practice : less than 0.15 g/kg 6. Dry fruits : less than 1.0 g/kg More limited to less than 0.02~1.0 g/kg depending on the food type
Propionic acid and its salts	-	Clear liquid Unpleasant odor Limited range	Antifungal activity	1. Bread : less than 25 g/kg 2. Natural cheese, processed cheese : less than 3.0 g/kg 3. Jam : less than 1.0 g/kg
Nitric acid, salts	0.2	Crystalline powder Saltiness Limited range	Antibacterial activity	1. Meat products, whale meat : 0.07 g/kg 2. Fish sausage : 0.05 g/kg 3. Salted cod roe, salted salmon roe : 0.005 g/kg

* ADI (Accetable Daily intake): mg/kg·body weight(bw)/day

Reference: [62]

Table 14. Regional designation for synthetic chemical food preservatives

	USA*	JAPAN**	EU***	CODEX****
Benzoic acid and its salts				
Benzoic acid	○	○	○	○
Sodium benzoate	○	○	○	○
Potassium benzoate	-	○	○	○
Calcium benzoate	-	-	○	○
Methyl p-hydroxy benzoate	-	○	○	○
Ethyl p-hydroxy benzoate	○	-	○	○
Sorbic acid and its salts				
Sorbic acid	○	○	○	○
Potassium sorbate	○	○	○	○
Calcium sorbate	○	○	○	○
Sulfurous acid and its salts				
Sulfur dioxide	○	○	○	○
Sodium sulfite	○	○	○	○
Sodium bisulfite	○	○	○	○
Sodium metabisulfite	○	○	○	○
Potassium metabisulfite	○	○	○	○
Sodium hydrosulfite	○	-	-	-
Propionic acid and its salts				
Propionic acid	○	○	○	○
Sodium propionate	○	○	○	○
Calcium propionate	○	○	○	○
Nitric acid, salts				
Sodium nitrate	○	○	○	○
Sodium nitrate	○	○	○	○
Potassium nitrate	○	○	○	○

* USA, FDA food additive status list, Food Chemical CODEX 7th edition, 2010

** JAPAN, Additives existing list item, the list item specified additives, food additives, the 8th edition book fair, 2007

*** EU, Commission regulation (EU) No. 231/2012, Commission regulation (EU) No. 1129/2011, Commission regulation (EU) No. 1925/2006

**** CODEX, Class names and the international numbering system for food additives (CODEX CAC/GL 36-1989), CODEX general standard for food additives (CODEX STAN 192-1995) inventory of processing aids (CODEX CAC/MISC 3)

2. 천연 보존제

천연보존제의 종류는 다음과 같다(Table 15,16). 미생물 천연 보존제로는 nisin 과 natamycin, ϵ -polylysine이 있으며 이들 중 GRAS 등급의 미생물로부터 유래 된 것은 nisin에 불과하다. Natamycin의 경우 방선균에 일종인 *Streptococcus natalensis*로 부터 유래되며 치즈 외 다른 식품에는 사용이 제한되어 있다. ϵ -Polylysine 또한 *Streptomyces albulus*로 부터 생산되며 그 사용량에는 제한되지 않았지만 대부분 수입되며 가격이 고가인 단점을 가지고 있다. Nisin은 유일 하게 GRAS 등급 미생물인 *Lactococcus lactis*로부터 생산되며 항세균 활성이 있는 것으로 알려졌다. 하지만 이 또한 치즈 외 다른 식품에서의 사용이 제한되어 있으며 가격 또한 고가인 것으로 알려졌다. 식물 유래 천연보존제로는 자몽종자 추출물, 나린진, 차추출물, 유카추출물 등이 있으며 이들은 식물로 부터 추출, 분리, 정제, 농축하여 만들어짐으로써 특유의 향과 맛 때문에 식품 첨가물로서의 사용이 어렵다. 동물 유래 천연보존제로는 이리 단백질, 리소짐 등이 있으며 이들 또한 특유의 향, 맛을 가지고 있어 사용에 어려움을 가지며 항균 활성 범위도 좁은 것으로 보인다.

Table 15. Derived from microorganisms food preservatives

	Origin microorganism	Characteristics	Spectrum	Domestic use criteria
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i>	White, Fine powder	Antibacterial activity	Natural cheese, processed cheese : less than 250 mg/kg
Natamycin	<i>Streptomyces natalensis</i>	(Yellowish) White, Crystalline powder	Antiyeast/ Antifungal activity	Natural cheese, processed cheese : less than 20 mg/kg The depth of 5mm or more from the surface should be not detected
ϵ -Polylysine	<i>Streptomyces albulus</i>	Pale yellow, Powder	Antibacterial/ Antiyeast/ Antifungal activity	-*

* -: Unspecified
Reference: [62]

Table 16. Derived from plant or animal food preservatives

	Characteristics	Spectrum	Domestic use criteria
Plant origin			
Grapefruit seed extract	High viscosity Bitterness	Antibacterial/ Antiyeast/ Antifungal activity	-*
Naringin	Brown crystalline powder Bitterness	Antibacterial/ Antiyeast/ Antifungal activity	-
Licorice extract	Brown crystalline powder	Antibacterial activity	-
Garden balsam extract	Unique odor Bitterness	Antibacterial activity	Liquor, snack, bread or rice cake, chocolate, and jam
Tea extract	Unique odor Sensitive to light	Antibacterial activity	-
Yucca extract	Unique odor Foaming	Antiyeast/ Antifungal activity	-
Gold leaf	Very thin, soft gold	Antifungal activity	
Animal origin			
Milt protein	Unique taste In acidic conditions the effect decreases	Antibacterial activity	-
Lysozyme	White powder Odorless	Antibacterial activity	-
Chitin	Unique taste/odor	Antibacterial activity	-
Chitosan	White, pale yellow, scaly solid Unique taste/odor	Antibacterial activity	-

* -: Unspecified
 Reference: [62]

제 4 절 연구의 목적

최근 소비자의 관심이 웰빙(well-being), 로하스(lohas)와 같이 건강하고 친환경적인 삶에 집중됨에 따라 식품 역시 유기농, 자연발효 등과 같은 건강하고 친환경적인 제품의 선호도가 계속해서 높아지고 있다. 더욱이 식품첨가물로서 화학적 합성품은 합성 화합물로서 체내 잔류로 인한 독성과 부작용과 같은 단점 때문에 날이 갈수록 소비자들의 기피현상이 심화되고 있다. 보존제는 가공식품의 발달과 함께 없어서는 안 될 중요한 식품첨가물로 유해 미생물의 증식을 억제하여 식품의 유통기한을 연장하는데 사용된다. 현재 식품산업에 사용되고 있는 합성 보존제는 강력한 항균력을 지녔지만 부작용과 체내 독성으로 인해 사용권장량에 따라서만 사용이 가능하며 적용 식품 또한 제한이 따른다.

한편 천연 보존제는 합성 보존제에 비해 상대적으로 독성은 없으나 항균 spectrum이 좁고 사용된 식물 특유의 맛과 향이 강하여 식품 본래의 품질을 손상시키는 관능적 문제점을 가지고 있다. 또한 식물 및 동물 유래의 천연보존제는 이들의 생육시기가 길어 시간적, 경제적으로 미생물 유래 천연보존제가 유리하다. 미생물 유래 천연보존제는 무향, 무취인 경우가 많아 식품첨가물로서 바람직하나 항균 활성이 약하고 항균 spectrum이 좁아 사용에 제한이 따른다. 미생물 유래 천연보존제 중 상업적 활용이 가능한 것은 현재 단 3종에 불과하며 이중 2종은 GRAS 등급 미생물이 아닌 일반 미생물로부터 유래한다. 그러므로 보다 안전성과 기능성을 지닌 GRAS 미생물로부터 강력한 천연항균물질의 개발이 필요하며 본 연구에서는 실험실에서 보유하고 있는 강력한 항균 활성을 지닌 GRAS 미생물을 이용하여 천연보존제를 개발하고자 한다.

본 연구에서는 강력한 항균 활성을 지닌 GRAS 등급 미생물로, 김치로부터 분리된 *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM, *Leu. citreum* GR1, *Leu. mesenteroides* TA와 메주로부터 분리된 *B. subtilis* SN7을 사용하여 GRAS 미생물용 배지를 개발하고자 한다. 이때 배지는 김치 제조 시 과생되는 폐배추와 절임폐배추를 이용하고 영양성분과 기타 배양 환경의 최적화를 통해 실험실용 배지와 생균수 및 항균 spectrum, 항균 활성 물질의 안정성을 비교하고자 한다.

한편 식품에서의 보존제 처리는 단순 항균 활성 실험과의 다른 환경이다. 즉

식품 자체의 pH, 염도, 수분 함량, 당 함량 등 다양한 요소가 보존제의 활성화에 미치는 영향을 고려하여 식품적용실험을 통해 실제 식품에 개발된 배지에서 배양한 배양상징액을 처리하여 보존제로서의 가능성을 확인하고자 한다.

이에 유산균 1종과 고초균 1종을 선정하여 식품 적용 실험을 진행하였다. *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 배양상징액을 김치에 처리하여 부패 미생물인 산막 효모 제어능을 확인하고자 하며 *B. subtilis* SN7의 절임폐배추즙 배양상징액을 청국장에 처리하여 식중독 원인균인 *B. cereus*를 제어능을 확인하고자 한다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 천연항균물질 생산용 식용배지 개발

1. 배추폐기물의 처리공정 개발

가. 시료 수집

시료는 김치 제조시 과생되는 폐배추와 절임폐배추를 수집하여 사용하였다. 수집 장소는 가정집과 중소기업, 대기업 중 각 1곳을 다음과 같이 선정하였다. 가정집 시료는 전라남도 화순시 도곡면에 위치한 가정집에서 수집하였으며, 중소기업 시료는 전라남도 해남군 화원면에 위치한 화원농협에서 수집하였다. 대기업 시료는 (주)D의 경기도 거창군 가조면에 위치한 거창공장으로부터 수집하였다. 수집 시기는 봄(2014년 03월), 여름(2014년 07월), 가을(2014년 09월), 겨울(2013년 12월)로 나누어 계절별로 수집하였으며 김장철인 겨울을 제외한 시료는 대기업 시료만을 수집하였다.

2. 수거방식에 따른 배추폐기물의 성분조성 비교

수집한 폐배추는 먼지와 흙 등을 제거하기 위해 1회 1차 증류수로 세척을 하여 물기를 말려주었다. 절임폐배추는 김치 제조시 배추절임 후 행균 등의 공정시 떨어져 나온 배추폐기물로 이미 이물질이 제거된 상태이므로 세척을 따로 하지 않았다. GRAS 미생물용 배지 제조에 적합하도록 착즙하기 위하여 준비된 시료는 착즙기(HR1861; Philips, Seoul, Korea)를 이용하여 착즙하고 멸균 가아제(DK 멸균거즈 3호; DK medical, Gwangju, Korea)를 이용해 고형물을 제거해 폐배추즙과 절임폐배추즙을 제조하여 사용하였다.

가. 계절별 폐배추와 절임폐배추의 일반성분 분석

시료의 염도와 당도는 염도계(ES-421; Atago, Japan)와 당도계(WM-7; Atago, Japan)를 이용하여 측정하였다.

pH는 pH meter (pH/Ion 510 bench pH meter; Fisher Science Education, Pittsburgh, PA, USA)를 사용하여 측정하였으며, 산도는 A.O.A.C (Association of official analytical chemists) 방법[4]에 의하여 시료 10 mL를 취하여 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3까지 적정한 후 NaOH 용액 소비량으로 정의하였다.

수분은 105°C 상압 건조법[4]으로, 조단백은 Kjeldahl법[4], 조지방은 soxhlet법 [4], 조회분은 550°C 직접 회화법[4]으로 측정하였다.

나. 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리당 분석

시료의 유리당 측정은 시료 1 mL를 취하여 0.45 μ m syringe filter (Millipore, Beverly, MA, USA)로 여과한 후, High Performance Liquid Chromatograph (HPLC) (Dionex ultimate 3000; Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 분석하였다. 용매는 3차 증류수를 사용하였으며 column은 Sugar-pak (Waters, 300 mm \times 6.5 mm)을 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 분석을 실시하였다.

다. 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리아미노산 분석

시료의 유리아미노산 측정은 시료 1 g을 취하여 70% ethanol 30 mL를 가하여 1시간 균질화한 후, 10분간 방치하였다. 그 다음 원심분리(21,000 \times g, 15 min)하여 상정액만을 취하고 이를 농축플라스크로 옮겨 70% ethanol 25 mL로 2회 반복 추출하였다. 이후 생성된 침전물을 다시 70% ethanol 25 mL를 넣고 2회 추출한 후 추출액을 합하여 rotary vacuum evaporator (Eyela N-1000SW; Tokyo, Japan)로 55°C하에 감압 농축하여 염산을 제거하였다. 이를 증류수 30 mL에 녹인 후 0.45 μ m syringe filter (Millipore)로 여과하여 아미노산 자동분석기 (L-8800 amino acid analyzer; Hitach, Tokyo, Japan)에 주입하여 분석하였다.

3. 수거방식에 따른 배추폐기물의 오염도 측정

시료의 미생물학적 오염도를 확인하기 위하여 식품공전 미생물 시험법에 준하여 실험을 실시하였다[66].

일반세균의 측정은 Plate Count Agar (PCA; Difco)에서 자란 모든 집락을 계수하였고, 대장균군의 측정은 대장균군 건조필름배지 I (3M, St. Paul, MN, USA)을 사용하여 붉은색의 집락 중 주위에 기포를 형성하는 집락을 계수하였다. *Staphylococcus aureus*의 측정은 난황첨가 만니톨 식염한천 배지(mannitol salt agar; Difco)에서 황색불투명 집락을 나타내며 주변에 혼탁한 백색환이 있는 집락을 계수하였다. 효모의 측정은 yeast extract peptone dextrose (YPD) 한천 배지에서 집락을 이룬 집락 중 현미경 관찰을 통해 효모의 집락수를 계수하였다.

각각의 폐배추액과 절임폐배추액 1 mL를 멸균 증류수 9 mL에 순차적으로 희석하여 100 μ L를 도말하여 배양하였다.

4. 배추폐기물의 처리공정 최적화

폐배추와 절임폐배추를 이용한 GRAS 미생물용 배지를 제조하기 위하여 미생물 배지 조성에 적합한 물리적 처리 공정을 개발하였다 (Figure 2). 먼저 폐배추는 수거 직후 흙과 먼지와 같은 불순물을 제거하기 위해 1차 증류수를 이용하여 1회 세척하고 착즙기(HR1861; Philips)를 이용하여 착즙하였으며 멸균 가아제(DK 멸균거즈 3호; DK medical)로 걸러 고형물을 제거하였다. 절임폐배추는 김치 제조 공정시 절임과정에서 품질 등의 문제로 상품화하기에 부적합한 절임상태의 배추 혹은 절임 및 수세과정에서 잘려진 배추로 수거 상태 그대로 수세 과정 없이 폐배추와 동일한 방법으로 착즙 후 고형물 제거를 실시하였다. 1차적으로 고형물이 제거된 폐배추 혹은 절임폐배추즙은 121 $^{\circ}$ C에서 15분간 가압 멸균하였으며 열에 의해 변성되어 생성된 고형물은 원심분리(8,000 \times g, 25 min, 4 $^{\circ}$ C)하여 제거하였다. 이후 이렇게 준비된 폐배추즙 및 절임폐배추즙을 기본배지로 하여 실험하였다.

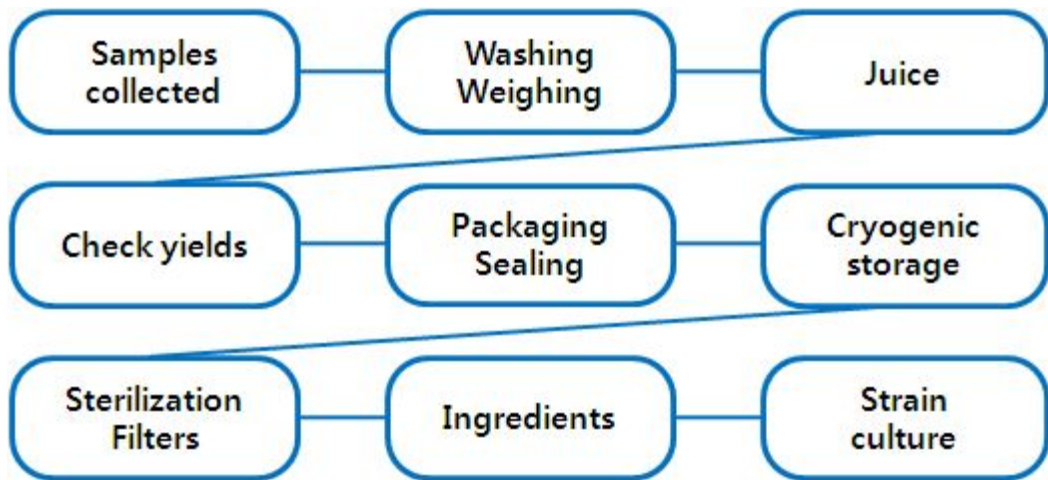


Figure 2. Optimization of physical process of cabbage waste and salted cabbage waste

5. 식용성분을 이용한 식용매지 개발

식용성분으로는 옥수수 침치액(corn steep liquor, C.S.L)은 옥수수로부터 전분 생산시 파생되는 주 부산물로써 (주)세진산업으로부터 지원받아 생산용 동결건조기(PVTFD50R; (주)일신바이오베이스, 경기도 동두천시, 대한민국)로 처리하여 냉동 보관하였다. 쌀가루는 쌀농부(<http://www.ssalnongbu.com>)로부터 구입하여 냉동 보관하였다.

폐배추즙 기본배지와 절임폐배추즙 기본배지에 C.S.L와 쌀가루를 농도별로 첨가하여 가압 멸균하여 GRAS 미생물용 배양 배지로 사용하였다.

가. 식용성분을 이용한 유산균 전용 배지 조성 개발

(1) 사용 균주

본 실험에 사용된 유산균은 김치로부터 분리·동정된 유산균으로, *Lb. plantarum* AF1[135,136], *Lb. plantarum* HD1[116], *Lb. plantarum* EM[18], *Leu. citreum* GR1[94], *Leu. mesenteroides* TA[79]로 총 5종의 유산균을 사용하였다.

(2) 생균수 측정 방법

생균수를 측정하기 위하여 -70℃에서 보관한 25%(w/v) glycerol stock을 5 mL Man Rogosa and Shape (MRS; Difco, Sparks, MD, USA) 액체 배지에 1% 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치 배양한 후, 다시 동일한 조건으로 계대 배양하여 본 배양에 사용하였다. 이를 개발배지에 본 배양하기 위해 계대배양액을 원심분리(10,000×g, 4℃, 15 min)하여 상등액을 제거하고 균체만을 3차 증류수에 혼탁하여 1% 접종하여 30℃에서 24시간 정치 배양하였다. 본 배양액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후, 0.1 mL를 취하여 MRS 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후 30℃에서 48시간 평판 배양하고 형성된 colony를 계수하였다.

(3) 항균 활성 측정 방법

지시균으로 사용한 곰팡이는 *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918으로 Malt extract Agar (MEA; Difco) 한천배지 20 mL를 멸균하여 곰팡이 포자 1.0×10^6 spore/mL를 첨가하여 petri dish에 부어 균힌 후 실험에 사용하였다.

지시균으로 사용한 세균은 *Bacillus cereus* KCTC 3624로 Luria-Bertani (LB; Difco) 한천배지에 1.0×10^6 CFU/mL로 도말하여 실험에 사용하였다.

항균 활성 측정은 spot-on-the lawn test[44]를 상기하여 상기된 방법으로 3회의 반복실험을 시행하였다.

나. 식용성분을 이용한 고초균 전용 배지 조성 개발

(1) 사용 균주

본 실험에 사용된 고초균은 메주로부터 분리·동정된 고초균으로, *B. subtilis* SN7[80]를 사용하였다.

(2) 생균수 측정 방법

생균수를 측정하기 위하여 -70°C 에서 보관한 25%(w/v) glycerol stock을 5 mL Tryptic Soy Broth (TSB; Difco) 액체 배지에 1% 접종하여 37°C 에서 24시간 동안 진탕 배양한 후, 다시 동일한 조건으로 계대 배양하여 본 배양에 사용하였다. 이를 개발배지에 본 배양하기 위해 계대배양액을 원심분리(10,000×g, 4°C , 15 min)하여 상등액을 제거하고 균체만을 3차 증류수에 혼탁하여 1% 접종하여 37°C 에서 24시간 진탕 배양하였다. 본 배양액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후, 0.1 mL를 취하여 TSB 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후 37°C 에서 48시간 평판 배양하고 형성된 colony를 계수하였다.

(3) 항균 활성 측정 방법

지시균으로 사용한 곰팡이는 *Asp. ochraceus* PF-2로 potato Dextrose Agar (PDA; Difco) 한천배지 20 mL를 멸균하여 곰팡이 포자 1.0×10^6 spore/20 mL를 첨가하여 petri dish에 부어 균화 후 실험에 사용하였다. 지시균으로 사용한 세균은 *B. cereus* KCTC 3624로 LB 한천배지에 1.0×10^6 CFU/plate로 도달하여 실험에 사용하였다.

항균 활성 측정은 spot-on-the lawn test[44]를 사용하여 측정하였으며 3회의 반복실험을 시행하였다.

제 2 절 식용배지에서 GRAS 미생물 생육 및 항균 활성의 최적화

1. 유산균 전용 식용배지 개발

가. 영양원의 최적화

(1) 탄소원의 최적화

유산균의 균체 생육 및 항균물질 생산을 위한 최적배지조건을 결정하기 위하여 탄소원의 종류 및 농도에 의한 균의 성장과 항균물질의 생산량을 조사하였다. 탄소원의 종류는 glucose (Duksan scientific corp, Seoul, Korea), fructose (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Switzerland), maltose (Sigma, St. Louis, MO, USA), sucrose (Junsei, Tokyo, Japan)로 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%가 되게 첨가한 다음 멸균(autoclave, 121°C, 15 min)하여 사용하였다. 이와 같은 조건하에 유산균을 30°C에서 24시간동안 분 배양 후, 생균수와 항균 활성을 측정하였다[44].

(2) 질소원의 최적화

유산균의 균체 생육 및 향균물질 생산을 위한 최적배지조건을 결정하기 위하여 질소원의 종류 및 농도에 의한 균의 성장과 향균물질의 생산량을 조사하였다. 질소원의 종류는 tryptone (Duchefa, Haarlem, The Netherlands), malt extract (Difco), beef extract (Sigma), soytone (Difco), peptone (Difco), yeast extract (Duchefa), beef powder (Sanmaul food Co., Lid., Seoul, Korea), chicken powder (Hon-dashi, Ainomoto, Japan), fish sauce (청정원 까나리액젓; 대상㈜, 충남 천안시, 대한민국)로 각각 1.0%, 2.0%가 되게 첨가한 다음 멸균(autoclave, 121°C, 15 min)하여 사용하였다. 이와 같은 조건하에 유산균을 30°C에서 24시간 동안 본 배양 후, 생균수와 향균 활성을 측정하였다[136].

(3) 무기원의 최적화

유산균의 균체 생육 및 향균물질 생산을 위한 최적배지조건을 결정하기 위하여 무기원의 종류 및 농도에 의한 균의 성장과 향균물질의 생산량을 조사하였다. 무기원의 종류로 A, B, C, D, E, A+E를 0.005%부터 0.5%까지 다양한 농도로 첨가한 다음 멸균(autoclave, 121°C, 15 min)하여 사용하였다. 이와 같은 조건하에 유산균을 30°C에서 24시간동안 본 배양 후, 생균수와 향균 활성을 측정하였다 [136].

나. 배양 pH의 최적화

영양원이 최적화된 배지의 pH를 5 N HCl과 5 N NaOH로 조절하여 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 조절하여 사용하였다. 이와 같은 조건하에 유산균을 30°C에서 24시간동안 본 배양 후, 생균수와 향균 활성을 측정하였다[136].

다. 배양 온도 및 시간의 최적화

배지의 영양원과 배양 pH의 최적화 실험 결과로부터 최종적으로 결정된 영양원 및 pH 조건하의 배양 온도 및 시간을 최적화 하였다. 상기의 영양원과 배양

pH가 최적화된 배지에 유산균을 1% 접종하여 28℃, 30℃, 37℃에서 0~48시간동안 정치배양하며 6시간 간격으로 생균수와 항균 활성을 측정하였다.

2. 고초균 전용 식용배지 개발

가. 영양원의 최적화

(1) 탄소원의 최적화

고초균의 균체 생육 및 항균물질 생산을 위한 최적배지조건을 결정하기 위하여 탄소원의 종류 및 농도에 의한 균의 성장과 항균물질의 생산량을 조사하였다. 탄소원의 종류는 glucose, fructose, maltose, sucrose로 각각 1.0%, 2.0%, 3.0%, 4.0%, 5.0%가 되게 첨가한 다음 멸균(autoclave, 121℃, 15 min)하여 사용하였다. 고초균은 37℃에서 24시간 진탕배양한 후, 생균수와 항균 활성을 측정하였다[80].

(2) 질소원의 최적화

고초균의 균체 생육 및 항균물질 생산을 위한 최적배지조건을 결정하기 위하여 질소원의 종류 및 농도에 의한 균의 성장과 항균물질의 생산량을 조사하였다. 질소원의 종류는 tryptone, malt extract, beef extract, soytone, peptone, yeast extract, beef powder, chicken powder로 각각 1.0%, 2.0%가 되게 첨가한 다음 멸균(autoclave, 121℃, 15 min)하여 사용하였다. 고초균은 37℃에서 24시간 진탕배양한 후, 생균수와 항균 활성을 측정하였다[80].

(3) 무기원의 최적화

고초균의 균체 생육 및 항균물질 생산을 위한 최적배지조건을 결정하기 위하여 무기원의 종류 및 농도에 의한 균의 성장과 항균물질의 생산량을 조사하였다. 무기원의 종류로 A, B, C, D, E, A+E를 0.005%부터 0.5%까지 다양한 농도로 첨

가한 다음 멸균(autoclave, 121 °C, 15 min)하여 사용하였다. 고초균은 37°C에서 24시간 진탕배양한 후, 생균수와 항균 활성을 측정하였다[80].

나. 배양 pH의 최적화

배지의 pH에 따른 생균수와 항균활성의 최적화를 위해 영양원이 최적화된 배지를 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조절하였다. pH가 조정된 배지에 고초균을 1% 접종하여 37°C에서 24시간 진탕배양하고 이후 생균수와 항균 활성을 측정하였다[80].

다. 배양 온도 및 시간의 최적화

최적화된 배지에 고초균을 1% 접종하여 30°C와 37°C에서 각각 0~48시간동안 진탕배양하며 6시간 간격으로 생균수와 항균 활성을 측정하였다.

제 3 절 천연항균물질을 이용한 식품적용기술 개발

1. 배지에 따른 천연항균물질의 안정성

가. pH 안정성

개발배지에서 생산된 항균물질의 pH 안정성을 알아보기 위하여 유산균 및 고초균의 배양상징액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 조정하고 37°C에서 2시간 처리하였다. pH-renaturation 실험은 pH 3.0~10.0으로 조정된 시료를 다시 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 원래의 유산균 혹은 고초균의 배양 직후 배양액 pH로 조정하고 37°C에서 2시간 처리하였다. 시료는 동결건조한 후 3차 증류수에 녹여 항균 활성을 측정하는데 사용하였다.

나. 온도 안정성

개발배지에서 생산된 향균물질의 온도 안정성을 알아보기 위하여 유산균 및 고초균의 배양상징액을 4℃, 30℃, 37℃, 50℃, 70℃에서 24시간, 100℃에서 30분, 121℃에서 15분간 처리한 후 향균 활성을 측정하였다.

다. 효소 안정성





개발배지에서 생산된 향균물질의 효소 안정성을 알아보기 위하여 다음의 효소를 준비하였다. Proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma), protease(type I, Sigma), trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma), α-chymotrypsin(EC 2.4.21.1, type I-S, Sigma)은 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ buffer (pH 7.5)에, pepsin(EC 3.4.23.1, Sigma)은 50 mM citrate buffer (pH 2.0)에, lipase(EC 3.1.1.3, type VII, Sigma)는 50 mM Tris-HCl, 10 mM CaCl₂ buffer (pH 7.0)에, α-amylase(EC 3.2.1.1, type VIII, Sigma)는 50 mM sodium phosphate, 10 mM NaCl buffer (pH 7.0)에 20 mg/mL의 농도로 준비하였다. 배양상징액에 효소들을 2 mg/mL의 농도로 37℃에서 6시간 처리한 후, 100℃에서 5분간 끓여 효소를 불활성화 시키고 향균 활성을 측정하였다. 대조구로는 배양상징액에 효소 대신 완충액을 사용하여 실험구와 동일한 조건으로 처리한 후 향균 활성을 측정하였다.

2. 기존 천연보존제와의 향균 활성 비교

가. 기존 천연 보존제

기존에 식품보존제로 사용되는 천연보존제인 발효 주정(95%, 대한주정판매주식회사, 서울, 대한민국), 자몽종자추출물(DF-100; ㈜에프에이뱅크, 경기도 안산시, 대한민국), 유카추출물(Biokeeper NE; 영에드에프아이, 경기도 화성시, 대한민국), 크린콜(㈜진로발효, 경기도 안산시, 대한민국)을 사용하였다(Table 17).

Table 17. Natural preservatives used in this study

Preservatives	Characteristics and standards
 <p>Grapefruit seed extract</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Food additive - Use the FDA recommended amount: <u>max 0.08%</u> - Strong bitter - Characteristic odor - Low pH, high viscosity
 <p>ϵ-Polylysine</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Food additive - Use the FDA recommended amount : <u>max 0.025%</u> (Limited to apply to foods) - Broad antimicrobial activity - Derived from a microorganism : <i>Streptomyces albulus</i>
 <p>Ethyl alcohol</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Liquor Tax - Ethanol Fermentation 95% - The actual ratio is the most widely used preservatives in non-thermal processed food - About 1~3% is added to the food
 <p>Cleancol</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Mixed formulation - Grapefruit seed extract + Ethyl alcohol - Approximately 2-3% of the raw materials and supplementary materials added when directly added to food

Reference: [62]

나. 항균 활성 측정 방법

각각의 식품 보존제를 원액과 실제 식품에 사용되는 최대 허용량에 맞춰 3차 증류수에 희석하여 실험하였다. 지시균으로는 식품의 식중독 및 부패를 일으키는 곰팡이, 효모, 세균에 대한 항균 활성을 측정하였다(Table 18). 항균 활성 측정 방법은 spot-on-the lawn test[44]을 상기하여 상된 방법으로 3회의 반복실험을 시행하였다.

3. 항균소재 유효농도 결정

최소저해 농도(Minimal Inhibition Concentration; MIC) test를 통한 유산균과 고초균이 생산하는 항균물질의 식중독균 및 부패균에 대한 최소저해 농도를 측정하였다.

시료는 배양상징액과 부분정제된 조항균물질을 준비하였다. 배양상징액은 유산균은 유산균 전용 개발배지에서의 배양상징액 100 mL를, 고초균은 고초균 전용 개발배지에서의 배양상징액 100 mL를 동결진공건조하여 건물을 칭량하였으며 조항균물질은 유산균의 경우 배양상징액 830 mL를 SPE (Isolute, C₁₈ EC, 10 g; International Sorbent Technology Ltd. Hengoed, UK)에 흡착하고 10 mL ACN (aqueous acetonitrile; HPLC grade, Fisher)으로 용출하여 이를 진공 건조하였고 고초균의 경우 배양상징액 100 mL를 Sep-pak (C₁₈ cartridge, Waters, MA, USA)에 흡착하여 10 mL MeOH (methanol; HPLC grade, Fisher)로 용출하여 이를 진공 건조하여 칭량하였다. 이렇게 준비된 항균물질 시료는 곰팡이 5종과 세균 7종, 효모 1종에 대한 최소저해 농도를 결정하였다(Table 18).

Table 18. List of microorganism used in antimicrobial activity

Group	Strain	Medium*	Incubation temperature
Mold	<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	MEA	30℃
	<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	PDA	30℃
	<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	MEA	30℃
	<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	MEA	30℃
	<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	PDA	25℃
Bacteria	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	LB	37℃
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	LB	37℃
	<i>Bacillus cereus</i> KCTC 3624	LB	37℃
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	LB	37℃
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC 17802	NA+ 2% NaCl	37℃
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	LB	37℃
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	LB	37℃
Yeast	<i>Pichia kudriavzevii</i> DY1	YPD	25℃

* MEA; Malt extract agar, PDA; Potato dextrose agar, LB; Luria-Bertani medium, NA; Nutrient agar

Table 19. Microorganism and cultural conditions used in this study

Strain	Medium	Incubation temperature
<i>Salmonella</i> spp.	MacConkey agar	35~37℃
<i>Staphylococcus aureus</i>	Mannitol salt agar with egg yolk	35~37℃
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar	35~37℃
<i>Listeria monocytogenes</i>	Oxford agar	30℃
Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide agar	35~37℃
<i>Campylobacter jejuni/colii</i>	Modified campy blood free agar	42℃
<i>Yersinia enterocolitica</i>	MacConkey agar	30℃
<i>Bacillus cereus</i>	Mannitol egg yolk polymyxin agar	30℃
Coliform	3M petrifilm Coliform Count Plate	35℃
<i>E. coli</i>	3M petrifilm <i>E. coli</i> Count Plate	35℃

4. 유산균 유래 천연항균물질의 식품적용기술 개발

본 실험에서 사용된 식품은 당일 제조된 김치를 사용하였다. 김치는 (주)D로부터 지원받은 수출김치(식품첨가물 무첨가)와 광주광역시 동구에 위치한 반찬집으로부터 구입하였다. 김치는 약 3×3 cm로 자른 후 멸균된 비이커에 200 g씩 나누어 담았으며 저장 온도는 4℃(냉장 온도), 15℃(여름철 판매대 온도), 25℃(실온)로 설정하였다. 각각의 시료에 천연항균물질 또는 기존보존제를 적용하거나 무처리하여 온도별로 저장하고, 저장 일에 따른 이화학적 특성, 미생물학적 특성 및 식중독균/부패균의 발생여부 조사를 통해 최적의 천연항균물질 농도를 설정한다.

가. 저장기간에 따른 특성 조사

(1) 이화학적 특성 조사

시료 전체를 hand blender (HHM-600, Hanil, Seoul, Korea)로 마쇄하여 멸균 거즈로 여과한 김치여액으로 pH와 산도, 당도와 염도를 측정하였다.

(2) 미생물학적 특성 조사

시료 내 미생물학 특성 조사 항목은 일반세균, 유산균, 효모, 곰팡이에 대한 실험을 실시하였다. 일반세균의 측정은 PCA배지를 사용하였으며 유산균의 측정은 MRS배지에 CaCO₃가 2%(w/v) 첨가된 배지를 사용하여 30℃에서 48시간 배양 후 투명환을 나타내는 집락을 계수하였다. 효모의 측정은 YPD배지, 곰팡이의 측정은 PDA배지를 사용하였다.

나. 식중독균/부패균 발생여부 및 시점 관찰

시료 내 식중독균의 발생여부를 알아보기 위해 식품일반에 대한 공통기준 및 규격에 따라[66] 총 10종(*Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio para-*

haemolyticus, *Listeria monocytogenes*, Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni/colii*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*, Coliform, *E. coli*의 식중독균 선별배지를 이용하여 식중독균의 발생여부를 살펴보았다(Table 19).

다. 천연항균물질의 적용 최적 농도 설정

실험구는 유산균 유래 천연항균물질로 *Lb. plantarum* AF1의 개발배지(폐배추즙 배지) 배양상징액과 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액을 1, 3, 5%(v/w)가 되도록 첨가하였으며 대조구는 무처리구와 기존 천연보존제인 자몽종자추출물 0.03%(v/w) 첨가구와 유카추출물 0.2%(v/w) 첨가하여 실험을 실시하였다.

5. 고초균 유래 천연항균물질의 식품적용기술 개발

본 실험에서 사용된 식품은 제조 직후 배송된 청국장으로, (주)D로부터 지원받았으며 배송 직후 실험에 사용하였다. 청국장은 포장 필름에 100 g씩 나누어 담아 4°C, 15°C, 37°C에서 저장하였다. 각각의 시료는 천연항균물질 또는 기존보존제를 적용하거나 무처리하여 온도별로 저장하고, 저장 일에 따른 이화학적 특성, 미생물학적 특성 및 식중독균/부패균의 발생여부 조사를 통해 최적의 천연항균물질 농도를 설정한다.

가. 저장기간에 따른 특성 조사

(1) 이화학적 특성 조사

시료 25 g을 취하여 멸균수 225 mL를 가한 후 mixer (EYELA cute mixer CM-1000; Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)을 이용해 균질화 시킨 후 멸균 가아제로 여과한 다음 여액으로 pH와 산도, 당도와 염도를 측정하였다.

(2) 미생물학적 특성 조사

시료 내 미생물학적 특성 조사는 일반세균, 효모, 곰팡이에 대한 실험을 실시하였다. 일반세균의 측정에는 PCA배지를 사용하였으며 효모의 측정에는 YPD배지, 곰팡이의 측정에는 PDA배지를 사용하였다.

나. 식중독균/부패균 발생여부 및 시점 관찰

시료 내 식중독균의 발생여부를 알아보기 위해 식품일반에 대한 공통기준 및 규격에 따라[66] 총 10종(*Salmonella* spp., *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, Enterohemorrhagic *E. coli*, *C. jejuni/colii*, *Y. enterocolitica*, *B. cereus*, Coliform, *E. coli*)의 식중독균 선별배지를 이용하여 식중독균의 발생여부를 살펴보았다(Table 19).

다. 천연항균물질의 적용 최적 농도 설정

실험구는 *B. subtilis* SN7의 개발배지(절임페배추즙 배지) 배양상징액과 *B. subtilis* SN7의 TSB 배양상징액을 1, 3, 5%(v/w)가 되도록 첨가하였으며 대조구로는 무처리구와 기존 천연보존제인 발효주정(95%, 대한주정판매주식회사) 2.5%(v/w) 첨가구를 사용하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 천연항균물질 생산용 식용배지 개발

1. 배추폐기물의 처리공정 개발

가. 수거방식에 따른 배추폐기물의 성분조성 비교

(1) 계절별 폐배추와 절임폐배추의 일반성분 분석

수거 방식에 따른 배추폐기물의 이화학적 특성을 조사하기 위해 김장시기인 겨울철 3곳(가정집, 중소기업, 대기업)으로부터 폐배추와 절임폐배추를 수거하였다. 폐배추의 이화학적 특성을 조사한 결과, Table 20과 같이 염도는 0.5~0.6%, 당도는 4~5 brix, pH와 산도는 pH 5.9~6.1, 0.13~0.16%로 나타났으며 수거장소에 따른 시료 간에 이화학적 특성에는 큰 차이 없음을 확인하였다. 이후 계절별 대기업으로부터 수거한 폐배추의 이화학적 특성을 조사한 결과 역시 겨울철 3곳으로부터 수집한 시료와 비슷한 값을 나타내었다.

폐배추의 일반성분 분석 결과(Table 20), 수분 함량은 95% 이상으로 나타났으며 조단백 함량은 0.50~0.73%, 조지방 함량은 0.01~0.02 g/100 mL로 비슷한 수준을 나타내었다. 조회분 함량은 0.4~0.5 g/100 mL로 계절별, 수거장소별 시료의 큰 차이가 없음을 확인하였다. Lee[77]는 봄 배추의 품종에 따른 품질특성을 비교한 결과, 봄 배추 5종의 수분 함량이 96.29±0.23~97.62±0.30%로 비슷한 수준을 나타내었다.

절임폐배추의 이화학적 특성을 조사한 결과(Table 21), 염도는 2.4~3.2, 당도는 6.9~9.3 brix, pH는 pH 5.7~5.8, 산도는 0.18~0.21로 나타났으며 수거장소에 따른 시료간 큰 차이가 없음을 확인하였다. 절임폐배추 또한 이후 계절별 수거된 시료에서도 겨울철 시료와 큰 차이가 없음을 확인하였다. Lim[83]은 해양심층수 염과 정제염, 천일염 등으로 절인 배추의 염도를 측정된 결과, 2.5%~2.6%의 염

도를 나타냈으며 pH는 pH 6.0~6.2로 비슷한 수준이었고 산도는 약 0.3%로 다소 높게 나타났다.

절임페배추의 일반성분 분석 결과(Table 21), 수분 함량은 90% 이상, 조단백 함량은 0.72~0.93%, 조지방 함량은 0.03~0.05 g/100 mL, 조회분 함량은 2.38~3.99 g/100 mL로 계절별, 수거장소별 시료간 큰 차이가 없음을 확인하였다. Lim[83]의 보고에 따르면 해양심층수, 정제염, 천일염으로 각각 절인 배추의 수분 함량은 $91.8 \pm 0.21 \sim 93.5 \pm 0.22\%$ 로 나타났으며 조단백 함량은 0.2~0.4%으로 다소 낮게 나타났고 조지방 함량은 1.4~1.9%로 다소 높게 나타났다. 조회분 함량은 1.5~2.7%로 비슷한 수준이었다.

Table 20. Properties of collected chinese cabbage wastes

	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
Salinity(%)	0.65±0.01	0.64±0.02	0.66±0.03	0.54±0.02	0.67±0.01	0.65±0.04
Sweetness(brix)	3.98±0.09	3.69±0.10	4.02±0.20	4.01±0.15	4.10±0.10	5.36±0.15
pH	6.16±0.03	6.13±0.02	6.12±0.02	6.10±0.01	5.95±0.02	6.12±0.01
Acidity(%)	0.12±0.01	0.11±0.03	0.11±0.04	0.15±0.01	0.16±0.01	0.13±0.02
Moisture(%)	97.61	98.38	97.56	97.75	97.04	95.64
Crude protein(%)	0.58	0.73	0.64	0.50	0.61	0.68
Crude fat(g/100 mL)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
Ash(g/100 mL)	0.39	0.52	0.49	0.47	0.45	0.45

* A: from large company

** B: from small & medium-sized enterprises

*** C: from home

All values were mean ±SD. (n=3)

Table 21. Properties of collected salted chinese cabbage wastes

	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
Salinity(%)	3.20±0.40	3.50±0.60	3.01±0.51	3.27±0.15	2.49±0.06	2.57±0.02
Sweetness(brix)	10.30±0.05	8.06±0.13	9.16±0.20	9.33±0.21	6.93±0.15	8.47±0.06
pH	5.71±0.03	5.68±0.05	5.70±0.06	5.79±0.02	5.76±0.04	5.84±0.07
Acidity(%)	0.21±0.01	0.22±0.02	0.20±0.03	0.18±0.01	0.21±0.01	0.20±0.02
Moisture(%)	90.46	93.83	92.50	92.55	94.60	92.94
Crude protein(%)	0.88	0.79	0.82	0.87	0.72	0.93
Crude fat(g/100 mL)	0.05	0.05	0.04	0.04	0.03	0.04
Ash(g/100 mL)	2.32	3.82	3.45	3.99	2.38	2.54

* A: from large company

** B: from small & medium-sized enterprises

*** C: from home

All values were mean ±SD. (n=3)

(2) 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리당 분석

폐배추의 유리당 함량 분석 결과(Table 22), 겨울철 3곳의 시료와 봄과 여름, 가을에 수거된 시료 모두 glucose(9,628.69~6,666.54 mg/L)의 함량이 가장 높게 나타났으며 그 다음은 fructose(4,863.69~7,963.73 mg/L)와 sucrose(0.00~178.28 mg/L)순으로 검출되었다. 봄배추 5종에서의 유리당 분석 결과에서는 봄 배추 5종 모두 glucose와 fructose만이 검출되었으며 각각 0.99~1.23%, 0.83~1.08%로 나타났다[77]. 월동배추인 ‘동풍’ 품종의 유리당 분석 결과, glucose와 fructose, sucrose가 검출되었으며 2℃ 저장 중 배추의 glucose 함량과 fructose 함량이 0일 이후 절반으로 감소하여 이후 60일간 비슷한 수준을 유지하였다[55]. Hong[42]의 연구에서도 배추를 4℃ 저장하며 저장 기간 동안 유리당 함량 변화를 살펴본 결과, glucose와 fructose, sucrose 함량이 크게 차이 나지 않는 것으로 나타났다.

절임폐배추의 유리당 함량 분석 결과(Table 22), 폐배추와 마찬가지로 계절별, 수거장소별 시료 모두 glucose(12,822.78~17,222.56 mg/L)의 함량이 가장 높게 나타났으며 fructose(9,103.91~15,256.79 mg/L)와 sucrose(101.53~1,684.90 mg/L) 또한 모두 시료에서 검출되었다. 이는 폐배추즙보다 다소 높은 양의 유리당 함량이나 시판 미생물용 배지의 유리당 함량에 미치지 못하는 양이기 때문에 GRAS 미생물용 배지를 만들기 위해 탄소원의 보충이 필요할 것으로 사료된다.

Table 22. Free sugar contents of cabbage wastes (CW) and salted cabbage wastes (SCW)

unit: mg/L

Sugar \ CW	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
Glucose	6,705.50	6,666.54	9,107.23	7,977.28	8,756.50	9,628.69
Fructose	6,901.14	5,912.78	7,687.53	7,963.73	4,863.69	6,090.05
Sucrose	108.25	178.28	136.06	0.00	101.53	0.00
Total	13,714.89	12,757.60	17,097.65	15,941.01	13,721.72	15,718.74
Sugar \ SCW	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
Glucose	13,636.37	17,026.12	16,062.72	17,222.56	12,822.78	16,099.33
Fructose	11,299.05	12,472.77	13,554.07	15,256.79	9,103.91	12,435.94
Sucrose	776.95	848.02	1,684.90	1,630.57	101.53	302.25
Total	25,712.37	30,346.91	31,615.02	34,109.92	22,028.22	28,837.52

* A: from large company

** B: from small & medium-sized enterprises

*** C: from home

(3) 계절별 폐배추와 절임폐배추의 유리아미노산 분석

폐배추의 유리아미노산 함량 분석 결과(Table 23), aspartic acid(1,026.575~3,252.300 mg/L), glutamine(1,710.475~4,834.768 mg/L), alanine(1,260.490~4,275.888 mg/L)과 arginine(1,206.355~5,057.018 mg/L)이 모든 시료에서 다량 검출되었으며 그 외 다수의 유리아미노산이 검출되었다. 봄배추 5종(K-파워, 매력, 정상, 봄맛노랑, 춘광 등)의 유리아미노산 분석 결과에 따르면 serine(12.46~22.86 mg%)과 glutamic acid(16.34~29.49 mg%), alanine(35.41~59.91 mg%)의 함량이 높게 나타났으며 그 외 valine, arginine 등의 측정되었다. Hong[42]의 연구에 따르면 배추의 주요 유리아미노산은 alanine, glutamic acid, proline, threonine으로 4℃ 4개월간의 저장기간 동안 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

절임폐배추의 유리아미노산 함량 분석 결과(Table 24), threonine(1,364.165~3,638.481 mg/L), serine(1,991.810~4,205.037 mg/L), glutamine(1,668.005~8,624.893 mg/L), alanine(6,064.405~9,121.405 mg/L), valine(1,481.920~3,859.920 mg/L), leucine(1,254.275~2,965.725 mg/L), phenylalanine(1,101.295~2,212.672 mg/L), γ -aminobutyric acid(1,740.143~11,910.800 mg/L), lysine(1,091.960~2,765.481 mg/L), arginine(2,848.930~6,112.563 mg/L)의 함량이 모든 시료에서 가장 높게 나타났으며 다수의 유리아미노산이 검출됨을 확인하였다. Lim[83]의 연구에 따르면 절임배추의 주요 아미노산은 serine, glutamic acid, alanine, valine, arginine 등으로 비슷한 결과를 보여주었다.

Table 23. Free amino acid contents of cabbage waste

unit: mg/L

	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
p-Ser	0.000	289.766	180.488	95.525	230.775	211.015
Tau	0.000	0.000	0.000	32.925	71.810	107.230
PEA	105.862	114.010	0.000	0.000	0.000	143.265
Urea	2,686.215	3,041.434	1,689.860	614.995	1,028.045	3,252.300
Asp	3,169.430	2,067.974	3,650.618	1,603.530	1,026.575	1,848.650
Thr	1,409.368	1,493.904	956.035	744	568.065	770.945
Ser	2,257.963	1,715.102	1,602.913	861.275	543.905	1,077.305
Glu	4,834.768	3,713.140	1,892.828	3,453.870	2,849.135	1,710.475
Sar	0.000	22.244	42.073	0.000	0.000	0.000
α-AAA	0.000	93.050	42.135	0.000	42.390	63.930
Gly	362.527	392.544	516.025	268.200	190.975	518.745
Ala	4,275.888	2,992.316	2,665.583	1,484.935	1,260.490	1,936.950
Cit	0.000	0.000	0.000	0.000	25.910	5.350
Val	2,009.180	1,613.956	1,421.795	523.450	803.390	1,161.545
Cys	0.000	0.000	0.000	0.000	187.375	377.570
Met	167.035	158.320	388.590	249.060	131.110	490.455
Cysthi	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ile	821.205	552.138	682.948	367.300	284.755	678.540
Leu	399.595	363.390	847.542	413.080	432.335	1,109.700
Tyr	288.522	451.436	630.843	223.925	288.310	613.440
Phe	1,143.033	1,402.982	839.318	370.900	524.210	922.620
β-Ala	20.565	24.830	131.735	4.885	114.780	130.845
β-AiBA	0.000	20.468	233.810	0.000	152.500	210.175
γ-ABA	149.310	1,436.622	1,731.988	518.020	1,395.630	4,607.550
EOH ₂ NH	359.750	296.988	484.645	345.940	383.140	548.490
NH ₃	1,196.953	1,733.990	1,377.348	793.130	834.160	549.415
Hyllys	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Orn	33.245	116.378	61.108	8.995	33.880	55.035
Lys	468.287	580.750	1,015.255	438.030	519.945	1,018.910
1Methis	75.220	0.000	37.363	0.000	0.000	0.000
His	543.810	608.376	286.485	186.760	154.150	189.115
Arg	5,057.018	4,049.108	2,507.570	2,793.575	1,418.665	1,206.355
Total	31,834.750	29,345.220	25,919.900	16,396.305	15,496.410	25,515.920

* A: from large company

** B: from small & medium-sized enterprises

*** C: from home

Table 24. Free amino acid contents of salted cabbage waste

unit: mg/L

	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
p-Ser	195.960	511.386	173.755	172.215	182.795	277.050
Tau	112.282	0.000	86.978	154.365	100.350	271.535
PEA	175.897	111.564	0.000	119.665	169.835	352.160
Urea	2,835.510	5,018.793	3,679.378	3,578.395	2,959.970	5,947.840
Asp	867.502	1,453.605	2,120.358	1,491.965	1,188.285	2,907.575
Thr	2,032.160	3,638.481	1,920.805	1,583.350	1,364.165	1,672.855
Ser	3,058.298	4,205.037	2,863.813	2,223.965	1,991.810	3,652.590
Glu	8,624.893	1,931.757	3,813.920	1,668.005	1,944.665	4,241.490
Sar	38.442	98.550	0.000	0.000	0.000	127.890
α-AAA	123.482	93.852	76.938	67.230	39.740	90.985
Gly	677.815	1,654.101	902.888	1,042.230	772.885	878.350
Ala	9,121.405	8,873.559	6,457.925	6,064.405	6,585.535	9,620.490
Cit	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	16.005
Val	2,523.115	3,859.920	2,807.093	1,481.920	1,740.240	1,909.765
Cys	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	405.700
Met	367.320	879.789	419.200	516.195	456.060	564.825
Cysthi	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ile	1,108.788	2,174.307	1,468.590	1,123.585	996.730	1,432.595
Leu	1,258.740	2,965.725	1,568.588	1,644.310	1,254.275	1,683.460
Tyr	648.205	1,838.997	923.078	1,003.530	805.700	1,010.575
Phe	1,303.610	2,212.672	1,459.383	1,304.140	1,101.295	1,455.630
β-Ala	173.467	324.207	169.198	292.640	168.885	337.315
β-AiBA	343.325	408.48	201.435	267.140	171.725	286.300
γ-ABA	1,740.143	11,901.800	5,745.645	7,453.430	5,346.150	7,989.165
EOHNH2	647.165	903.327	522.585	709.560	555.485	877.685
NH3	823.092	2,119.785	1,462.690	1,714.735	1,791.540	2,030.780
Hyllys	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Orn	48.907	278.142	110.690	59.100	36.005	64.105
Lys	1,091.960	2,765.481	1,324.415	1,666.975	1,267.895	1,764.030
1Methis	136.817	0.000	83.380	25.680	31.885	24.505
His	473.252	1,022.220	802.220	557.725	407.995	594.315
Arg	3,750.765	6,112.563	4,755.483	2,999.765	2,848.930	4,453.690
Total	44,302.320	67,358.120	45,920.430	40,986.220	36,280.830	56,941.255

* A: from large company

** B: from small & medium-sized enterprises

*** C: from home

나. 수거방식에 따른 배추폐기물의 오염도 측정

수거된 폐배추의 미생물학적 오염도 측정 결과(Table 25), 겨울철 3곳의 시료와 봄, 여름, 가을 수거된 각각의 시료 모두에서 일반세균 약 10^5 CFU/mL, 대장균 10^3 CFU/mL, 황색포도상구균 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL, 대장균군 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL로 비슷한 검출 결과를 보여주었다. 효모의 경우 봄을 제외한 모든 시료에서 10^2 CFU/mL가 검출되었다.

수거된 절임폐배추의 미생물학적 오염도 측정 결과(Table 25), 모든 시료에서 일반세균 약 10^5 CFU/mL, 대장균 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL, 황색포도상구균 $10^2 \sim 10^4$ CFU/mL, 대장균군 $10^3 \sim 10^4$ CFU/mL로 검출되었다. 효모 또한 모든 시료에서 10^2 CFU/mL로 검출되었다. Lim[83]의 해양심층수와 정제염, 천일염으로 절인 배추의 총균수 측정 결과에 따르면 절임 후 총균수는 약 4.75 log CFU/mL로 나타났다으며 비슷한 수준이었다.

다. 배추폐기물의 처리공정 최적화

수집한 시료(폐배추와 절임폐배추)의 GRAS 미생물용 배지 제조를 위해서 폐배추즙과 절임폐배추즙을 제조하였다. 먼저 시료수거에서부터 멸균 후 고형물 제거 단계까지 마친 상태에서 수확량을 기록하여 수율을 계산하였다. 그 결과 폐배추는 약 68%, 절임폐배추는 약 43%의 수율을 나타내었다. 이 후 이렇게 제조된 폐배추즙과 절임폐배추즙을 기본배지로 하고 이에 식용성분 및 탄소원, 질소원 등을 최적화한 후 pH, 시간, 온도를 조정하여 천연항균물질을 생산하기로 하였다.

Table 25. Sanitary indicative bacteria detected from cabbage wastes (CW) and salted cabbage waste (SCW)
 unit: CFU/mL

CW	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
Total viable cell	3.9×10^5	5.4×10^5	4.5×10^5	7.4×10^5	2.5×10^5	8.4×10^5
<i>E. coli</i>	2.7×10^3	6.3×10^3	3.0×10^3	1.0×10^3	6.0×10^3	1.8×10^3
<i>Staphylococcus</i> sp.	9.0×10^2	9.8×10^2	7.1×10^2	6.0×10^2	1.9×10^3	2.4×10^3
Coliform bacteria	1.2×10^4	5.6×10^4	5.0×10^3	1.9×10^3	2.5×10^3	4.2×10^3
Yeast	N.D	5.0×10^2	1.0×10^2	2.0×10^2	1.0×10^2	2.0×10^2
SCW	Spring	Summer	Fall	Winter		
	A*			A	B**	C***
Total viable cell	4.2×10^5	4.0×10^5	3.4×10^5	7.4×10^5	5.1×10^5	3.4×10^5
<i>E. coli</i>	2.3×10^3	4.2×10^3	1.7×10^3	1.0×10^3	3.0×10^4	2.9×10^4
<i>Staphylococcus</i> sp.	5.0×10^3	2.9×10^4	3.8×10^3	6.0×10^2	2.4×10^3	1.1×10^3
Coliform bacteria	2.0×10^3	2.6×10^3	4.2×10^3	1.9×10^3	4.0×10^4	2.5×10^4
Yeast	1.0×10^2	2.0×10^2	1.0×10^2	2.0×10^2	4.0×10^2	1.0×10^2

N.D : not detected

2. 식용성분을 이용한 식용배지 개발

가. 식용성분을 이용한 유산균 전용 배지 조성 개발

폐배추즙 원액(CW media A)과 폐배추즙 희석액(20%, CW media A-1)에서 유산균 5종(*Lb. plantarum* AF1, HD1, EM과 *Leu. citreum* GR1, *Leu. mesenteroides* TA)의 생균수 및 항균 활성을 측정하였다. 생균수 측정 결과 (Table 26), *Lb. plantarum* AF1의 경우, 폐배추즙 원액과 희석액에서 각각 7.01 log CFU/mL, 7.45 log CFU/mL의 생균수를 나타내었고 *Lb. plantarum* HD1의 경우, 7.56 log CFU/mL, 7.51 log CFU/mL, *Lb. plantarum* EM의 경우, 7.06 log CFU/mL, 7.25 log CFU/mL의 생균수를 나타내었다. *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA 또한 약 7.00 log CFU/mL의 생균수로 원액과 희석액에서의 생균수 측정 결과 큰 차이가 없음을 확인하였다. 또한 항세균 및 항곰팡이 활성을 측정한 결과 희석 전과 후의 활성이 동일하게 나타남을 확인하였다. 이에 폐배추즙의 희석 전과 후의 생균수와 항세균 및 항곰팡이 활성이 동일하게 나타남으로써 폐배추즙 희석액(CW media A-1)을 기본 배지로 선정하였다.

절임폐배추즙 또한 원액(SCW media B)와 희석액(20%, SCW media B-1)을 사용하여 유산균 5종의 생균수 및 항균 활성을 측정하였다. 생균수 측정 결과 (Table 26), *Lb. plantarum* AF1은 원액과 희석액에서 8.73 log CFU/mL, 8.53 log CFU/mL를 나타냈으며 *Lb. plantarum* HD1은 8.37 log CFU/mL, 8.71 log CFU/mL을, *Lb. plantarum* EM은 8.75 log CFU/mL, 8.66 log CFU/mL를 나타내었다. *Leu. citreum* GR1의 경우, 원액과 희석액 모두 7.03 log CFU/mL를 나타내었고, *Leu. mesenteroides* TA의 경우, 7.51 log CFU/mL, 7.55 log CFU/mL를 나타내었다. 항세균 및 항곰팡이 활성 측정 결과, *Lb. plantarum* HD1은 절임폐배추즙 원액과 희석액 모두에서 최대 항세균 활성(160 AU/mL)을 나타내었으며, *Lb. plantarum* AF1과 EM, *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA는 원액과 희석액에서의 항세균 및 항곰팡이 활성이 동일하게 나타났다. 따라서 절임폐배추즙의 희석 전과 후의 생균수와 항세균 및 항곰팡이 활성이 동일하게 나타남으로 절임폐배추즙 희석액(SCW media B-1)을 기존 배지로 선정하였다.

Table 26. Effect of concentration of cabbage waste juice (CW media) or salted cabbage waste juice (SCW media) on viable cell count and antimicrobial activity of LAB

	AF1	HD1	EM	GR1	TA
Viable cell number (log CFU/mL)					
CW media A	7.01±0.40	7.56±0.38	7.06±0.10	6.96±0.12	7.01±0.08
CW media A-1	7.45±0.04	7.51±0.19	7.25±0.07	7.02±0.11	7.05±0.12
SCW media B	8.73±0.20	8.38±0.23	8.75±0.11	7.03±0.09	7.51±0.20
SCW media B-1	8.53±0.04	8.71±0.22	8.66±0.06	7.03±0.07	7.55±0.21
Control (MRS)	9.34±0.07	9.29±0.20	9.30±0.08	9.74±0.07	9.70±0.02
Antibacterial activity (AU/mL)					
CW media A	80	80	80	4	4
CW media A-1	80	80	80	4	4
SCW media B	80	160	80	4	4
SCW media B-1	80	160	80	4	4
Control (MRS)	160	160	160	32	32
Antifungal activity (AU/mL)					
CW media A	20	20	20	4	4
CW media A-1	20	20	20	4	4
SCW media B	20	20	20	4	4
SCW media B-1	20	20	20	4	4
Control (MRS)	640	640	640	32	32

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

CW media A: 100% cabbage waste juice, CW media A-1: 20% cabbage waste juice

SCW media B: 100% salted cabbage waste juice, SCW media B-1: 20% cabbage waste juice

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

폐배추즙 기본배지(CW media A-1)에 옥수수 침지액(C.S.L)을 0.0~2.5%(w/v) 첨가하여 유산균 5종의 생균수 및 항균 활성을 측정하였다. C.S.L 1.0~2.5%(w/v) 첨가시 *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM의 생균수가 약 7.0 log CFU/mL에서 약 8.0 log CFU/mL로 증가하였으며 항세균 활성 및 항곰팡이 활성 또한 160 AU/mL, 40 AU/mL로 첨가전보다 2배 상승하였다. *Leu. citreum* GR1의 생균수와 항곰팡이 활성은 첨가 전과 후 변화가 없었으며 항세균 활성은 0.5% 이상 첨가시 8 AU/mL로 첨가전보다 2배 상승하였다. *Leu. mesenteroides* TA의 생균수는 1.0% 이상 첨가구에서 약 1 log CFU/mL 증가하였으며 항세균 활성(8 AU/mL) 또한 2배 증가하였다(Table 27). 이에 C.S.L 1% 첨가한 배지를 폐배추즙 배지 A-2 (CW media A-2)로 선정하였다.

절임폐배추즙 기본배지(SCW media B-1)에 C.S.L을 위와 동일한 양으로 첨가하여 유산균 5종의 생균수 및 항균 활성을 측정하였다. Table 28과 같이 *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM과 *Leu. citreum* GR1의 생균수에는 큰 변화가 없었으며 *Leu. mesenteroides* TA의 경우 0.5% 이상 첨가구에서 약 8 log CFU/mL로 증가함을 확인하였다. 항세균 활성은 *Lb. plantarum* AF1, EM, *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA 모두 1.0% 이상 첨가구에서 각각 2배 증가하였다. 항곰팡이 활성 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM은 1.0% 이상의 첨가구에서 4배 이상 증가하였고 그 외 2종의 유산균은 첨가전과 동일한 역가를 나타내었다. 이에 절임폐배추즙 배지 역시 C.S.L 1% 첨가한 배지를 절임폐배추즙 배지 B-2 (SCW media B-2)로 선정하였다.

한편 폐배추즙 기본배지(CW media A-1)과 절임폐배추즙 기본배지(SCW media B-1)에 쌀가루를 0.0~2.5%(w/v) 첨가하여 유산균 5종의 생균수 및 항균 활성을 측정한 결과(Table 29, 30), 생균수의 상승도 항균 활성을 증가도 없음을 확인하였다. 옥수수 침지액(C.S.L)은 탄수화물과 단백질, 아미노산, 비타민과 미네랄이 풍부하여 각종 발효산업에 단백질원, 비타민원으로 사용되는 물질이다. Ahn[2]의 연구에 따르면 반응표면분석을 통해 C.S.L 이용 가능성을 분석한 결과, *Lb. fermentum* LDTM CG1과 *Lc. lactis* ssp. *lactis*는 각각 10.77%와 3.5% C.S.L 요구성을 나타냈으며 이는 산의 생산량을 최대로 올리기 위함으로 생균수와 더불어 항균 활성을 최대로 올리기 위한 본 연구와 상의한 부분이 있다.

Table 27. Effect of corn steep liquor on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-1

	AF1	HD1	EM	GR1	TA
Viable cell number (log CFU/mL)					
Corn steep liquor 0.0%	7.45±0.04	7.51±0.19	7.25±0.07	7.02±0.11	7.05±0.12
Corn steep liquor 0.5%	7.62±0.21	7.66±0.37	7.82±0.56	7.11±0.23	7.62±0.21
Corn steep liquor 1.0%	8.28±0.23	8.01±0.40	8.32±0.41	7.32±0.16	8.28±0.23
Corn steep liquor 1.5%	8.13±0.18	8.05±0.11	8.37±0.67	7.11±0.20	8.13±0.18
Corn steep liquor 2.0%	8.44±0.21	8.11±0.12	8.49±0.49	6.98±0.03	8.44±0.21
Corn steep liquor 2.5%	8.40±0.44	8.19±0.19	8.65±0.56	6.88±0.03	8.40±0.44
Antibacterial activity (AU/mL)					
Corn steep liquor 0.0%	80	160	80	4	4
Corn steep liquor 0.5%	80	160	160	4	4
Corn steep liquor 1.0%	160	160	160	8	8
Corn steep liquor 1.5%	160	160	160	8	8
Corn steep liquor 2.0%	160	160	160	8	8
Corn steep liquor 2.5%	160	160	160	8	8
Antifungal activity (AU/mL)					
Corn steep liquor 0.0%	20	20	20	4	4
Corn steep liquor 0.5%	20	20	20	4	4
Corn steep liquor 1.0%	40	40	40	4	4
Corn steep liquor 1.5%	40	40	40	4	4
Corn steep liquor 2.0%	40	40	40	4	4
Corn steep liquor 2.5%	40	40	40	4	4

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

Table 28. Effect of corn steep liquor on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in SCW media B-1

	AF1	HD1	EM	GR1	TA
Viable cell number (log CFU/mL)					
Corn steep liquor 0.0%	8.35±0.04	8.71±0.22	8.66±0.06	7.01±0.06	7.74±0.01
Corn steep liquor 0.5%	8.38±0.31	8.64±0.28	8.75±0.10	7.38±0.02	8.19±0.01
Corn steep liquor 1.0%	8.73±0.07	8.65±0.14	8.88±0.06	7.74±0.04	8.36±0.05
Corn steep liquor 1.5%	8.43±0.28	8.57±0.32	8.62±0.26	7.70±0.06	8.34±0.05
Corn steep liquor 2.0%	8.43±0.21	8.58±0.32	8.69±0.27	7.51±0.03	8.16±0.11
Corn steep liquor 2.5%	8.38±0.20	8.41±0.35	8.50±0.27	7.51±0.01	8.13±0.05
Antibacterial activity (AU/mL)					
Corn steep liquor 0.0%	80	160	80	4	4
Corn steep liquor 0.5%	160	160	80	4	4
Corn steep liquor 1.0%	160	160	160	8	8
Corn steep liquor 1.5%	160	160	160	8	8
Corn steep liquor 2.0%	160	160	160	8	8
Corn steep liquor 2.5%	160	160	160	8	8
Antifungal activity (AU/mL)					
Corn steep liquor 0.0%	20	20	20	4	4
Corn steep liquor 0.5%	40	40	80	4	4
Corn steep liquor 1.0%	80	80	160	4	4
Corn steep liquor 1.5%	80	80	160	4	4
Corn steep liquor 2.0%	80	80	160	4	4
Corn steep liquor 2.5%	80	80	160	4	4

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

Table 29. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-1

	AF1	HD1	EM	GR1	TA
Viable cell number (log CFU/mL)					
Rice powder 0.0%	7.45±0.04	7.51±0.19	7.25±0.07	7.02±0.11	7.05±0.12
Rice powder 0.5%	7.93±0.07	7.91±0.13	8.02±0.20	6.92±0.03	7.46±0.08
Rice powder 1.0%	8.19±0.31	7.82±0.06	8.02±0.14	6.90±0.05	7.63±0.20
Rice powder 1.5%	8.21±0.04	7.69±0.43	8.18±0.03	6.90±0.04	7.84±0.16
Rice powder 2.0%	8.35±0.05	8.02±0.05	8.47±0.46	6.91±0.03	7.96±0.03
Rice powder 2.5%	8.37±0.19	8.12±0.06	8.54±0.57	6.91±0.03	7.88±0.11
Antibacterial activity (AU/mL)					
Rice powder 0.0%	80	160	80	4	4
Rice powder 0.5%	80	160	80	4	4
Rice powder 1.0%	80	160	80	4	4
Rice powder 1.5%	80	160	80	4	4
Rice powder 2.0%	80	160	80	4	4
Rice powder 2.5%	80	160	80	4	4
Antifungal activity (AU/mL)					
Rice powder 0.0%	20	20	20	4	4
Rice powder 0.5%	20	20	20	4	4
Rice powder 1.0%	20	20	20	4	4
Rice powder 1.5%	20	20	20	4	4
Rice powder 2.0%	20	20	20	4	4
Rice powder 2.5%	20	20	20	4	4

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

Table 30. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in SCW media B-1

	AF1	HD1	EM	GR1	TA
Viable cell number (log CFU/mL)					
Rice powder 0.0%	8.35±0.04	8.71±0.22	8.66±0.06	7.01±0.06	7.74±0.01
Rice powder 0.5%	8.39±0.10	8.36±0.11	8.57±0.23	6.93±0.03	7.77±0.07
Rice powder 1.0%	8.55±0.33	8.48±0.34	8.47±0.10	6.95±0.01	7.77±0.07
Rice powder 1.5%	8.33±0.06	8.32±0.16	8.45±0.24	6.96±0.05	7.84±0.06
Rice powder 2.0%	8.43±0.06	8.42±0.06	8.37±0.13	6.93±0.03	7.86±0.03
Rice powder 2.5%	8.41±0.17	8.44±0.19	8.41±0.14	6.91±0.12	7.78±0.11
Antibacterial activity (AU/mL)					
Rice powder 0.0%	80	160	80	4	4
Rice powder 0.5%	80	160	80	4	4
Rice powder 1.0%	80	160	80	4	4
Rice powder 1.5%	80	160	80	4	4
Rice powder 2.0%	80	160	80	4	4
Rice powder 2.5%	80	160	80	4	4
Antifungal activity (AU/mL)					
Rice powder 0.0%	20	20	20	4	4
Rice powder 0.5%	20	20	40	4	4
Rice powder 1.0%	40	40	40	4	4
Rice powder 1.5%	40	40	40	4	4
Rice powder 2.0%	40	40	40	4	4
Rice powder 2.5%	40	40	40	4	4

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

나. 식용성분을 이용한 고초균 전용 배지 조성 개발

폐배추즙 원액(CW media C)과 폐배추즙 희석액(20%, CW media C-1)에 *B. subtilis* SN7을 1% 접종하여 배양한 결과(Table 31), 모두 약 7 log CFU/mL의 생균수를 나타냈으며 항세균 활성은 200 AU/mL, 항곰팡이 활성은 0 AU/mL로 원액과 희석액에서 동일한 생균수와 항균활성을 나타내었다. 이에 폐배추즙 희석액(CW media C-1)을 기본배지로 선정하였다.

절임폐배추즙 원액(SCW media D)과 절임폐배추즙 희석액(20%, SCW media D-1)에서의 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균 활성 측정 결과(Table 31), 모두 약 8 log CFU/mL의 생균수를 나타냈으며 항세균 활성은 0 AU/mL, 항곰팡이 활성은 40 AU/mL로 원액과 희석액에서 차이가 없었다. 이에 절임폐배추즙 희석액(SCW media D-1)을 기본배지로 선정하였다.

폐배추즙 기본배지(CW media C-1)에 C.S.L와 쌀가루를 각각 0.0~2.5%(w/v) 첨가하여 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균 활성을 측정하였다(Table 32, 34). 그 결과, C.S.L를 첨가한 구간에서 생균수 약 6.0 log CFU/mL로 첨가전보다 오히려 감소함을 확인하였다. 또한 항세균 및 항곰팡이 활성의 변화가 없음을 확인하였다. 쌀가루를 첨가한 구간에서는 생균수와 항세균 및 항곰팡이 활성에 큰 변화가 없음을 확인하였다. 이에 폐배추즙 기본배지(CW media C-1)에 C.S.L와 쌀가루를 첨가하지 않기로 하였다.

절임폐배추즙 기본배지(SCW media D-1)에 C.S.L를 첨가한 구간에서 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균 활성 측정 결과(Table 33), 첨가 전 생균수(약 8 log CFU/mL)보다 100배 낮은 생균수(약 6 log CFU/mL)를 나타냈으며 항세균 활성과 항곰팡이 활성에도 영향을 주지 않았다. 쌀가루를 첨가한 구간 또한 생육과 항세균 및 항곰팡이 활성에 상승효과가 없음을 확인하였다(Table 35). 이에 절임폐배추즙 기본배지(SCW media D-1) 또한 C.S.L와 쌀가루를 첨가하지 않기로 하였다.

Table 31. Effect of concentration of cabbage waste juice (CW media) or salted cabbage waste juice (SCW media) on viable cell count and antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7

Type of medium	Viable cell number (log CFU/mL)	Antibacterial activity (AU/mL)	Antifungal activity (AU/mL)
CW media C	7.21±0.15	200	0
CW media C-1	7.59±0.26	200	0
SCW media D	8.15±0.15	0	40
SCW media D-1	8.20±0.07	0	40
Control (TSB)	8.43±0.20	1,600	640

CW media C: 100% cabbage waste juice

CW media C-1: 20% cabbage waste juice

SCW media D: 100% salted cabbage waste juice

SCW media D-1: 20% cabbage waste juice

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

Table 32. Effect of corn steep liquor on the viable cell count and antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1

Viable cell number (log CFU/mL)	
Corn steep liquor 0.0%	7.59±0.26
Corn steep liquor 0.5%	6.54±0.28
Corn steep liquor 1.0%	6.74±0.24
Corn steep liquor 1.5%	6.40±0.46
Corn steep liquor 2.0%	6.24±0.24
Corn steep liquor 2.5%	6.11±0.20
Antibacterial activity (AU/mL)	
Corn steep liquor 0.0%	200
Corn steep liquor 0.5%	200
Corn steep liquor 1.0%	200
Corn steep liquor 1.5%	200
Corn steep liquor 2.0%	200
Corn steep liquor 2.5%	200
Antifungal activity (AU/mL)	
Corn steep liquor 0.0%	0
Corn steep liquor 0.5%	0
Corn steep liquor 1.0%	0
Corn steep liquor 1.5%	0
Corn steep liquor 2.0%	0
Corn steep liquor 2.5%	0

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

Table 33. Effect of corn steep liquor on the viable cell count and antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7 grown in SCW media D-1

Viable cell number (log CFU/mL)	
Corn steep liquor 0.0%	8.20±0.07
Corn steep liquor 0.5%	6.40±0.26
Corn steep liquor 1.0%	6.31±0.17
Corn steep liquor 1.5%	6.40±0.18
Corn steep liquor 2.0%	6.32±0.13
Corn steep liquor 2.5%	6.25±0.22
Antibacterial activity (AU/mL)	
Corn steep liquor 0.0%	0
Corn steep liquor 0.5%	0
Corn steep liquor 1.0%	0
Corn steep liquor 1.5%	0
Corn steep liquor 2.0%	0
Corn steep liquor 2.5%	0
Antifungal activity (AU/mL)	
Corn steep liquor 0.0%	40
Corn steep liquor 0.5%	0
Corn steep liquor 1.0%	0
Corn steep liquor 1.5%	0
Corn steep liquor 2.0%	0
Corn steep liquor 2.5%	0

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

Table 34. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1

Viable cell number (log CFU/mL)	
Rice powder 0.0%	7.59±0.26
Rice powder 0.5%	6.78±0.26
Rice powder 1.0%	7.05±0.06
Rice powder 1.5%	7.22±0.11
Rice powder 2.0%	7.33±0.11
Rice powder 2.5%	7.67±0.37
Antibacterial activity (AU/mL)	
Rice powder 0.0%	200
Rice powder 0.5%	200
Rice powder 1.0%	200
Rice powder 1.5%	200
Rice powder 2.0%	200
Rice powder 2.5%	200
Antifungal activity (AU/mL)	
Rice powder 0.0%	0
Rice powder 0.5%	0
Rice powder 1.0%	0
Rice powder 1.5%	0
Rice powder 2.0%	0
Rice powder 2.5%	0

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

Table 35. Effect of rice powder on viable cell count and antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7 grown in SCW media D-1

Viable cell number (log CFU/mL)	
Rice powder 0.0%	8.20±0.07
Rice powder 0.5%	6.97±0.07
Rice powder 1.0%	7.41±0.06
Rice powder 1.5%	7.30±0.11
Rice powder 2.0%	7.32±0.02
Rice powder 2.5%	7.22±0.13
Antibacterial activity (AU/mL)	
Rice powder 0.0%	0
Rice powder 0.5%	0
Rice powder 1.0%	0
Rice powder 1.5%	0
Rice powder 2.0%	0
Rice powder 2.5%	0
Antifungal activity (AU/mL)	
Rice powder 0.0%	40
Rice powder 0.5%	0
Rice powder 1.0%	0
Rice powder 1.5%	0
Rice powder 2.0%	0
Rice powder 2.5%	0

Data are presented as the means (and standard deviations) of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

제 2 절 식용배지에서 GRAS 미생물 생육 및 항균활성의 최적화

1. 유산균 전용 식용배지 개발

가. 영양원의 최적화

(1) 탄소원

폐배추즙 20% 희석액과 C.S.L를 1% 첨가한 폐배추즙 배지 A-2(CW media A-2)에 탄소원의 최적화를 위해 glucose, fructose, maltose, sucrose를 0, 1, 2, 3, 4, 5%(w/v)로 첨가하여 유산균 5종의 생균수 및 항균 활성을 측정하였다. 24시간 정치 배양하여 생균수를 측정한 결과(Figure 3), *Lb. plantarum* AF1은 8.36~8.62 log CFU/mL, HD1은 8.54~8.92 log CFU/mL, EM은 8.50~8.88 log CFU/mL로 첨가 농도에 따라 큰 차이가 없었다. *Leu. citreum* GR1(8.61~8.86 log CFU/mL)과 *Leu. mesenteroides* TA(8.64~8.80 log CFU/mL) 또한 첨가 농도에 따른 생균수의 큰 차이 없음을 확인하였다. 항세균 활성을 측정한 결과(Table 36), *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM은 탄소원 종류와 농도와 상관없이 모든 구간에서 첨가 전과 동일한 활성(160 AU/mL)를 나타냈으며 *Leu. citreum* GR1은 glucose, fructose, sucrose 첨가구에서 16 AU/mL로 첨가전보다 2배 증가하였고 *Leu. mesenteroides* TA는 glucose 첨가구에서만 16 AU/mL로 첨가전보다 2배 증가하였다. 항곰팡이 활성을 측정한 결과(Table 36), *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM 모두 glucose 첨가구에서 160 AU/mL로 첨가 전 40 AU/mL에 비해 4배 증가하였다. 한편 *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA의 경우, glucose, fructose, sucrose 첨가구에서 항곰팡이 활성이 2배 증가함을 확인하였다. 이에 최적 탄소원 종류 및 농도는 glucose 1%임을 알 수 있었으며 이를 폐배추즙 배지 A-3으로 선정하였다. Moon[94]은 김치공장으로부터 배추 폐기물을 수거하고 이를 잎과 밑동 부분으로 구분하여 각각을 수돗물로 1:1(v/v) 혼합

하여 감압 추출하였다. 이에 yeast extract와 무기염을 첨가하여 CCM배지를 제조하였다. CCM배지에 탄소원을 달리하여 *Leu. citreum* GR1을 배양한 결과, maltose 2% 구간에서 가장 높은 생균수(6.0×10^9 CFU/mL)를 나타내었고 glucose는 6% 구간에서 가장 높은 생균수(4.5×10^9 CFU/mL)를 나타내었다. 본 연구에서는 탄소원의 종류와 농도에 상관없이 비슷한 생균수를 나타내었고 항균 활성에서의 차이가 나타난 glucose 1%를 최적 탄소원 구간을 선정하였다.

절임페배추즙 배지 B-2(SCW media B-2)의 탄소원 첨가에 따른 유산균 5종의 생균수를 살펴본 결과(Figure 4), *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM 모두 탄소원의 종류와 농도에 상관없이 모두 약 8 log CFU/mL를 나타냈으며 *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA 또한 약 8 log CFU/mL로 모든 구간에서 비슷한 생균수를 나타내었다. 항세균 활성 측정 결과(Table 37), *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM은 모든 탄소원 첨가구에서 첨가 전과 동일한 최대 항세균 활성인 160 AU/mL를 나타내었다. *Leu. citreum* GR1의 경우, Glucose와 Fructose, Sucrose 첨가구에서 첨가전보다 2배 높은 역가(16 AU/mL)를 나타내었으며 *Leu. mesenteroides* TA는 Glucose와 Fructose 첨가구에서 첨가 전보다 2배 높은 역가(16 AU/mL)를 나타내었다. 항곰팡이 활성 측정 결과(Table 37), *Lb. plantarum* AF1의 경우 탄소원의 종류 및 농도에 상관없이 모든 구간에서 첨가 전 활성(80 AU/mL)보다 2배 높은 역가(160 AU/mL)를 나타냈으며 HD1은 Glucose와 Maltose 첨가구에서, EM은 Glucose 첨가구에서 첨가 전보다 2배 높은 역가를 나타내었다. *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA는 모든 탄소원 구간에서 항곰팡이 활성의 증가를 나타내지 않았다. 이에 유산균 5종에 공통적으로 항세균 및 항곰팡이 활성 증가를 가져온 Glucose 1% 첨가구를 절임페배추즙 배지 B-3으로 선정하였다.

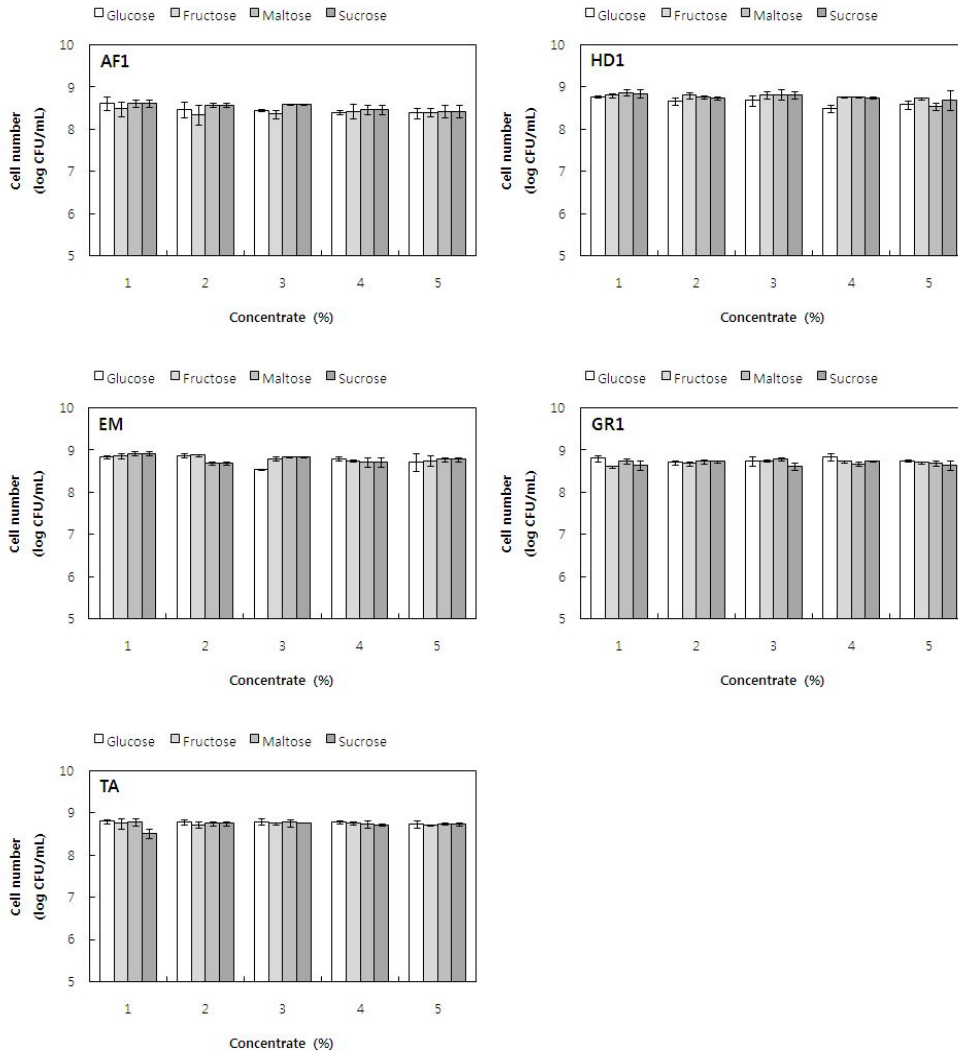


Figure 3. Effect of carbon source on viable cell count of LAB grown in CW media A-2

Table 36. Effect of carbon source on antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-2

unit : AU/mL

		AF1		HD1		EM		GR1		TA	
		AB*	AF**	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
CW media A-2		160	40	160	40	160	40	8	4	8	4
Glucose	1 %	160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
	2 %	160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
	3 %	160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
	4 %	160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
	5 %	160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
Fructose	1 %	160	80	160	80	160	80	16	8	8	8
	2 %	160	80	160	80	160	80	16	8	8	8
	3 %	160	80	160	80	160	80	16	8	8	8
	4 %	160	80	160	80	160	80	16	8	8	8
	5 %	160	80	160	80	160	80	16	8	8	8
Maltose	1 %	160	80	160	80	160	80	8	4	8	4
	2 %	160	80	160	80	160	80	8	4	8	4
	3 %	160	80	160	80	160	80	8	4	8	4
	4 %	160	80	160	80	160	80	8	4	8	4
	5 %	160	80	160	80	160	80	8	4	8	4
Sucrose	1 %	160	160	160	80	160	80	16	8	8	8
	2 %	160	160	160	80	160	80	16	8	8	8
	3 %	160	160	160	80	160	80	16	8	8	8
	4 %	160	160	160	80	160	80	16	8	8	8
	5 %	160	160	160	80	160	80	16	8	8	8
Control (MRS)		160	640	160	640	160	640	32	32	32	32

Data are presented as the means of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

*AB: Antibacterial activity, **AF: Antifungal activity

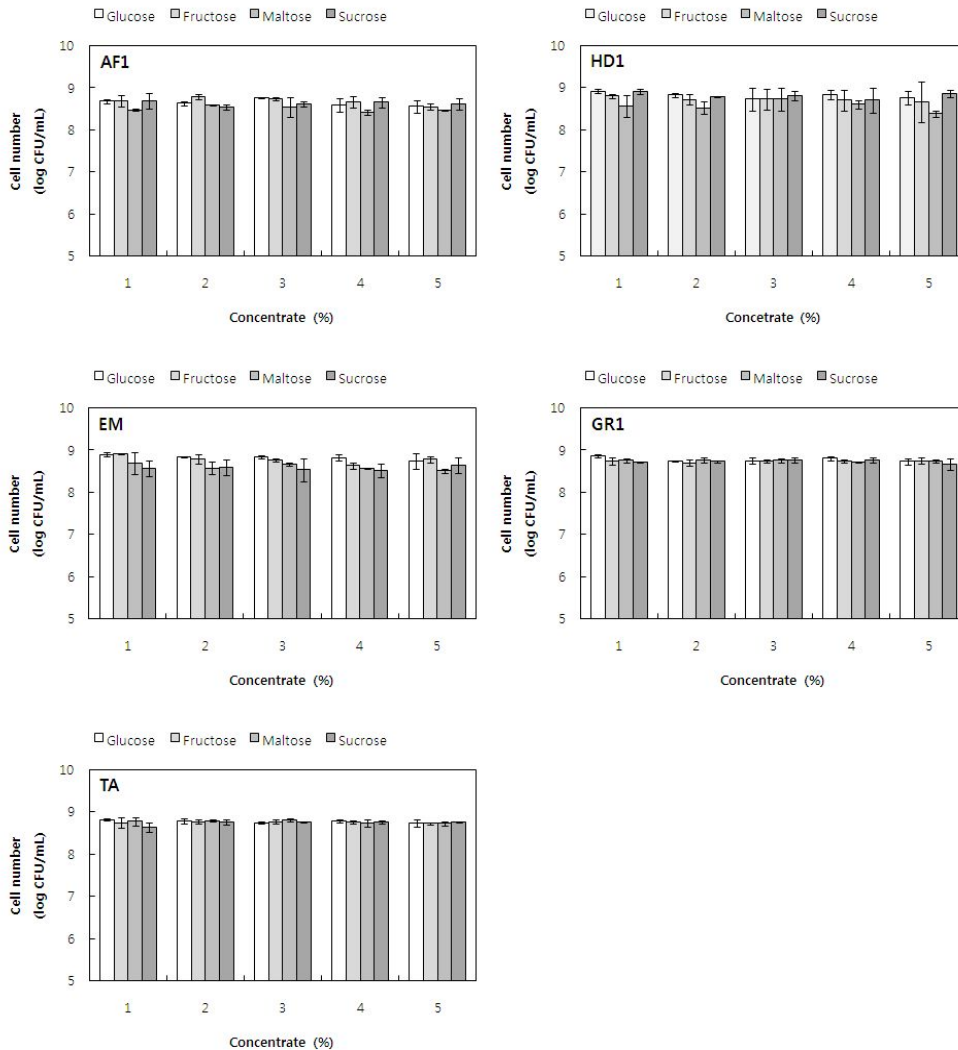


Figure 4. Effect of carbon source on viable cell count of LAB grown in SCW media B-2

Table 37. Effect of carbon source on antimicrobial activity of LAB grown in SCW media B-2

unit : AU/mL

		AF1		HD1		EM		GR1		TA	
		AB*	AF**	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
SCW media B-2		160	80	160	80	160	160	8	4	8	4
Glucose	1 %	160	160	160	160	160	160	16	4	16	4
	2 %	160	160	160	160	160	160	16	4	16	4
	3 %	160	160	160	160	160	160	16	4	16	4
	4 %	160	160	160	160	160	160	16	4	16	4
	5 %	160	160	160	160	160	160	16	4	16	4
Fructose	1 %	160	160	160	80	160	80	16	4	16	4
	2 %	160	160	160	80	160	80	16	4	16	4
	3 %	160	160	160	80	160	80	16	4	16	4
	4 %	160	160	160	80	160	80	16	4	16	4
	5 %	160	160	160	80	160	80	16	4	16	4
Maltose	1 %	160	160	160	160	160	80	8	4	8	4
	2 %	160	160	160	160	160	80	8	4	8	4
	3 %	160	160	160	160	160	80	8	4	8	4
	4 %	160	160	160	160	160	80	8	4	8	4
	5 %	160	160	160	160	160	80	8	4	8	4
Sucrose	1 %	160	160	160	80	160	80	16	4	8	4
	2 %	160	160	160	80	160	80	16	4	8	4
	3 %	160	160	160	80	160	80	16	4	8	4
	4 %	160	160	160	80	160	80	16	4	8	4
	5 %	160	160	160	80	160	80	16	4	8	4
Control (MRS)		160	640	160	640	160	640	32	32	32	32

Data are presented as the means of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

*AB: Antibacterial activity, **AF: Antifungal activity

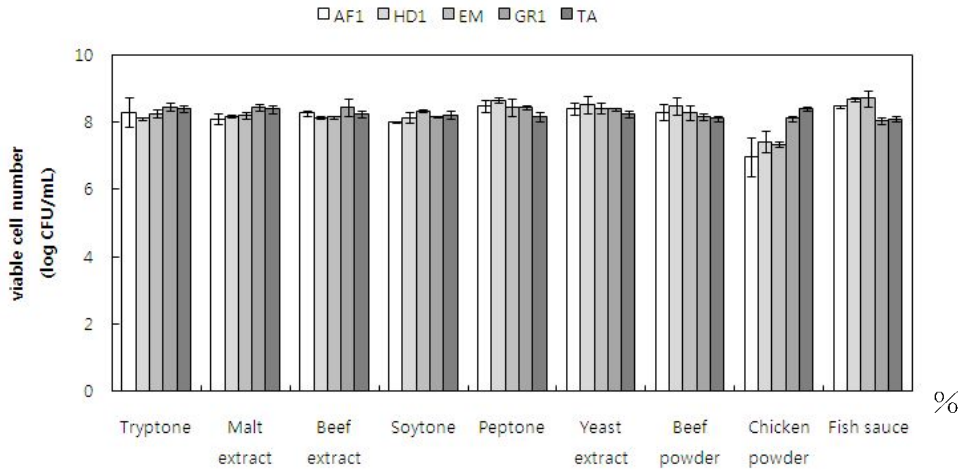
(2) 질소원

탄소원이 최적화된 폐배추즙 배지 A-3에 질소원 9종을 1~2.5%(w/v)의 농도로 첨가하여 유산균 5종의 생균수 및 향균 활성에 미치는 영향을 알아보았다. 생균수 측정 결과(Figure 5-A), 유산균 5종 모두 질소원 첨가에 의한 생균수 증가는 나타나지 않았다. 항세균 및 항곰팡이 활성 측정 결과, 질소원 종류에 따라 첨가전과 같거나 낮은 활성을 나타냄을 확인하였다(Table 38). 본 결과로부터 폐배추즙 배지 A-3에 질소원 첨가가 유산균의 생육 및 향균 활성에 상승효과를 미치지 않음을 알 수 있었다. 이에 폐배추즙 배지 A-3에 질소원을 첨가하지 않기로 하였다.

탄소원이 최적화된 절임폐배추즙 배지 B-3에 질소원 첨가에 따른 유산균 5종의 생균수 및 향균 활성 측정 결과(Figure 5-B, Table 38), 폐배추즙 배지에서와 마찬가지로 모든 질소원 첨가구에서 생균수의 증가는 나타나지 않았다. 항세균 및 항곰팡이 활성 측정 결과, 모든 질소원 첨가구간에서 상승효과가 없음을 확인하였다. 이에 절임폐배추즙 배지 B-3에 질소원을 첨가하지 않기로 하였다.

반면 Mu[97]의 연구에 따르면 *Lactobacillus* sp. SK007의 phenyllactic acid의 생산의 최적화하기 위해서는 glucose 3% 외 yeast powder 0.3% 등 다양한 영양분이 필요하다. Liew[82] 역시 *Lb. rhamnosus* ATCC 7469의 최대 생균수를 나타내기 위한 최적의 배지 조건은 glucose 5.01% 이외 yeast extract 6.0%를 필요로 한다. Oh[99]는 요구르트 제조에 사용되는 *Lb. casei* YIT 9018의 최대 생균수를 나타내는 배지 구성 성분비를 알아보기 위하여 반응표면분석을 통해 분석한 결과, tryptone, yeast extract, glucose이 각각 3.04%, 0.892%, 1.58%에서 가장 높은 생균수를 나타내었다. 이는 앞서 말한바와 같이 동일한 유산균 속이나 종이라고 하더라도 그 분리원이 어디인지에 따라 질소원의 영양요구성이 다를 수 있으며 이는 미생물의 대사작용이 환경에 따라 진화하기 때문이라고 여겨진다. 또한 C.S.L는 당을 포함한 단백질, 아미노산, 미네랄 등으로 구성된 물질로 C.S.L이 갖는 단백질원으로 충분히 김치 유산균 5종의 단백질 요구성을 만족하는 것으로 여겨진다.

A. CW media



B. SCW media

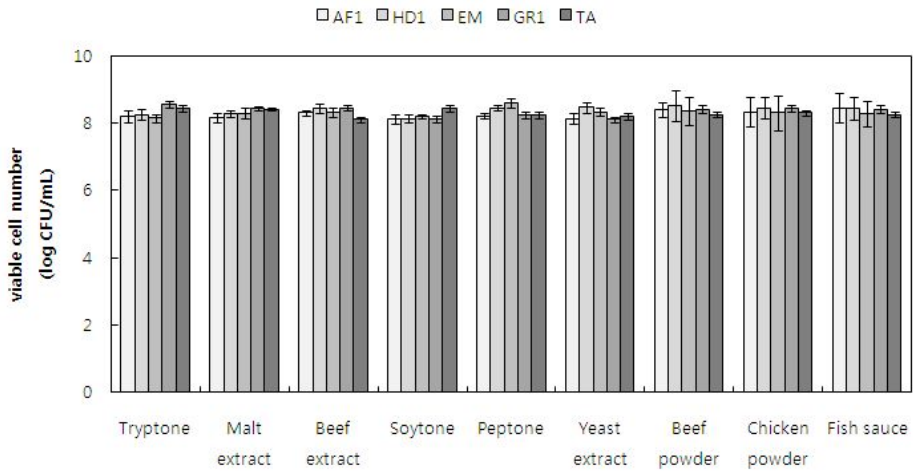


Figure 5. Effect of nitrogen source on viable cell count of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3

Table 38. Effect of nitrogen source on antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3

unit : AU/mL

		AF1		HD1		EM		GR1		TA	
		AB*	AF**	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
CW media A-3		160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
Tryptone	1~2.5%	160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
Malt extract	1~2.5%	80	160	80	160	80	160	8	4	8	8
Beef extract	1~2.5%	80	80	160	80	80	160	16	8	16	8
Soytone	1~2.5%	160	160	80	80	160	80	8	4	8	4
Peptone	1~2.5%	80	80	80	80	80	80	8	4	8	8
Yeast extract	1~2.5%	160	160	160	80	160	80	16	4	16	8
Beef powder	1~2.5%	20	80	20	80	20	80	8	4	8	4
Chicken powder	1~2.5%	20	80	20	80	20	80	8	4	8	4
Fish sauce	1~2.5%	20	80	20	80	20	80	8	4	8	4
SCW media B-3		160	160	160	160	160	160	16	4	16	4
Tryptone	1~2.5%	160	160	160	160	160	160	16	4	16	8
Malt extract	1~2.5%	160	160	160	160	160	160	8	4	8	8
Beef extract	1~2.5%	160	160	160	160	160	160	16	4	16	8
Soytone	1~2.5%	160	160	80	160	160	160	8	4	8	4
Peptone	1~2.5%	80	160	160	160	160	160	8	4	8	4
Yeast extract	1~2.5%	160	160	160	80	160	160	8	4	16	4
Beef powder	1~2.5%	20	80	40	80	20	80	8	4	8	4
Chicken powder	1~2.5%	20	80	20	80	20	80	8	4	8	4
Fish sauce	1~2.5%	20	80	20	80	20	80	8	4	8	4
Control (MRS)		160	640	160	640	160	640	32	32	32	32

Data are presented as the means of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

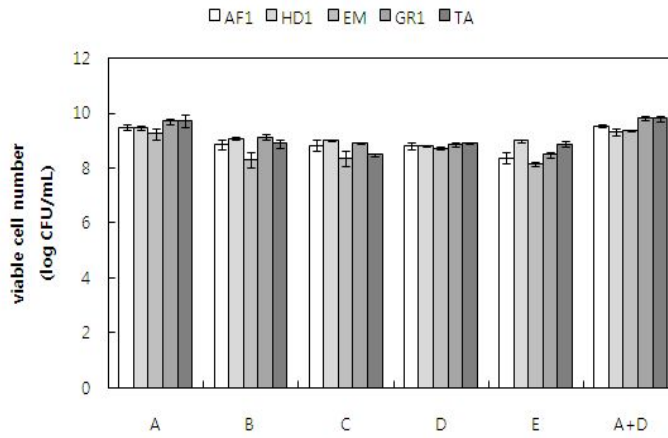
*AB: Antibacterial activity, **AF: Antifungal activity

(3) 무기원

폐배추즙 배지 A-3에 무기원 5종을 첨가하여 유산균 5종의 생균수 및 항균 활성에 미치는 영향을 살펴보았다. 유산균 5종 모두 무기원 A를 첨가한 구간에서 첨가전보다 10배 높은 생균수(약 9 log CFU/mL)를 나타내었으며 이는 유산균용 배지인 MRS와 동등한 생균수이다(Figure 6-A). 또한 항곰팡이 활성 측정 결과(Table 39), 무기원 D를 단독으로 첨가한 구간에서 *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM 모두 단독 첨가구 중 가장 높은 활성(320 AU/mL)를 나타내었다. 이에 A와 D를 함께 첨가한 결과, 유산균 5종 모두 최대 생균수, 최대 항세균 활성, 최대 항곰팡이 활성을 나타냄을 확인하였다. 이는 유산균용 배지인 MRS와 동등한 생균수 및 항균 활성이며 최적 무기원은 폐배추즙 배지 A-3에 무기원 A+D 첨가구로 이를 폐배추즙 배지 A-4로 선정하였다.

절임폐배추즙 배지 B-3에 무기원 5종을 첨가에 따른 유산균의 생균수 및 항균 활성 상승효과를 살펴보았다. 무기원 A를 첨가한 구간에서 유산균 5종 모두 약 9 log CFU/mL로 증가하였으며 *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA는 모든 무기원 첨가 구간에서 약 9 log CFU/mL의 생균수를 나타내었다(Figure 6-B). 항세균 활성 측정 결과(Table 39), *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM은 모든 첨가구간에서 최대 항세균 활성(160 AU/mL)를 나타내었으며 *Leu. citreum* GR1은 무기원 A, B를 단독으로 첨가한 구간에서 최대 항세균 활성인 32 AU/mL를 나타내었고, *Leu. mesenteroides* TA는 무기원 A를 첨가한 구간에서 최대 항세균 활성(32 AU/mL)를 나타내었다. 항곰팡이 활성 측정 결과(Table 39), *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM 모두 무기원 D를 첨가한 구간에서 단독 첨가구 중 가장 높은 활성(320 AU/mL)를 나타내었다. *Leu. citreum* GR1은 모든 첨구에서 첨가전보다 4배 상승한 16 AU/mL를 나타내었고 *Leu. mesenteroides* TA는 무기원 A 첨구에서 가장 높은 활성(32 AU/mL)를 나타내었다. 이에 생균수와 항균 활성을 최대로 높이고자 무기원 A와 D를 함께 첨가한 결과, AF1, HD1, EM, TA의 생균수와 항세균 활성, 항곰팡이 활성이 최대가 됨을 확인하였다. 본 결과로부터 절임폐배추즙 배지 B-3에 최적 무기원 A+D 첨가구를 절임폐배추즙 배지 B-4로 선정하였다.

A. CW media



B. SCW media

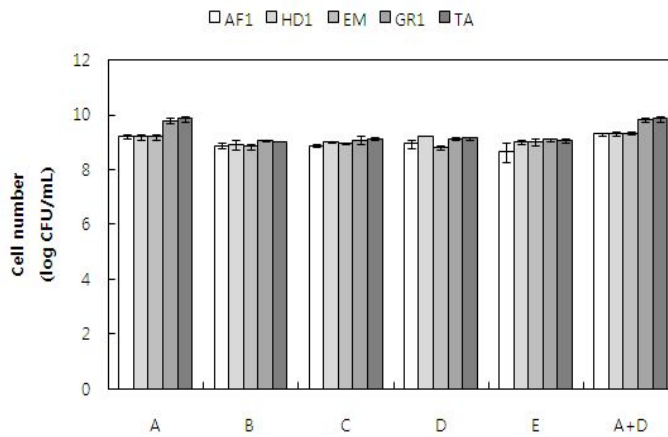


Figure 6. Effect of inorganic source on viable cell count of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3

Table 39. Effect of inorganic source on antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-3 or SCW media B-3

unit : AU/mL

		AF1		HD1		EM		GR1		TA	
		AB*	AF**	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
CW media A-3		160	160	160	160	160	160	16	8	16	8
A	0.005~0.05%	160	160	160	160	160	160	32	32	32	32
B	0.005~0.05%	160	160	160	160	160	160	32	16	16	16
C	0.005~0.2%	160	80	160	80	160	160	16	16	16	16
D	0.1~0.5%	160	320	160	320	160	320	16	16	16	16
E	0.1~0.2%	160	80	160	80	160	80	16	16	16	16
A+D	0.005~0.5%	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32
SCW media B-3		160	160	160	160	160	160	16	4	16	4
A	0.005~0.05%	160	200	160	320	160	200	32	16	32	32
B	0.005~0.05%	160	160	160	160	160	160	32	16	16	16
C	0.005~0.2%	160	160	160	160	160	160	16	16	16	16
D	0.1~0.5%	160	320	160	320	160	320	16	16	16	16
E	0.1~0.2%	160	160	160	320	160	160	16	16	16	16
A+D	0.005~0.5%	160	640	160	640	160	640	32	16	32	32
Control (MRS)		160	640	160	640	160	640	32	32	32	32

Data are presented as the means of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

*AB: Antibacterial activity, **AF: Antifungal activity

나. 배양 pH의 최적화

식용성분과 탄소원, 무기원으로 최적화된 폐배추즙 배지 A-4의 최적 pH를 살펴보기 위하여 배지의 초기 pH를 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 조정하여 유산균 5종의 생균수 및 향균 활성을 측정하였다. pH 4.0에서 *Lb. plantarum* AF1(8.84 log CFU/mL), HD1(8.67 log CFU/mL), EM(8.83 log CFU/mL), 그리고 *Leu. citreum* GR1(7.55 log CFU/mL), *Leu. mesenteroides* TA(7.93 log CFU/mL) 모두 약 8 log CFU/mL를 나타내었으며, pH 5.0 이상에서는 약 9 log CFU/mL 이상의 생균수를 나타내었다(Figure 7). 항세균 활성 측정 결과(Figure 7), 유산균 5종 모두 pH 5.0, 6.0 7.0에서 최대 항세균 활성을 나타내었다. 항곰팡이 활성 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM은 pH 5.0과 pH 6.0에서 최대 활성(640 AU/mL)를 나타내었고 *Leu. mesenteroides* TA 역시 pH 5.0과 pH 6.0에서 최대 활성(32 AU/mL)를 나타내었다. 이에 폐배추즙 배지 A-4의 최적 pH 구간은 pH 5.0~6.0으로 선정하였다.

절임폐배추즙 배지 B-4의 초기 pH에 따른 유산균 5종의 생균수 및 향균 활성을 측정한 결과(Figure 8), pH 4.0에서 *Lb. plantarum* AF1(8.70 log CFU/mL), HD1(8.74 log CFU/mL), EM(8.68 log CFU/mL), 그리고 *Leu. citreum* GR1(8.49 log CFU/mL), *Leu. mesenteroides* TA(7.67 log CFU/mL) 모두 가장 낮은 생균수를 나타내었으며 pH 5.0 이상의 구간에서는 모두 약 9 log CFU/mL로 최대 생균수를 나타내었다. 항세균 활성 측정 결과(Figure 8), pH 5.0과 pH 6.0에서 유산균 5종 모두 최대 항세균 활성을 나타냄을 확인하였다. 항곰팡이 활성 측정 결과(Figure 8), *Lb. plantarum* AF1은 pH 5.0~7.0에서 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타냈으며 HD1은 pH 5.0~8.0에서 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)을, EM은 pH 5.0~7.0에서 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타내었다. *Leu. citreum* GR1은 pH 5.0~7.0에서 높은 항곰팡이 활성(16 AU/mL)를 나타내었고 *Leu. mesenteroides* TA는 pH 5.0~7.0에서 최대 항곰팡이 활성(32 AU/mL)를 나타내었다. 이에 절임폐배추즙 배지 B-4의 최적 pH 구간은 pH 5.0~6.0으로 선정하였다.

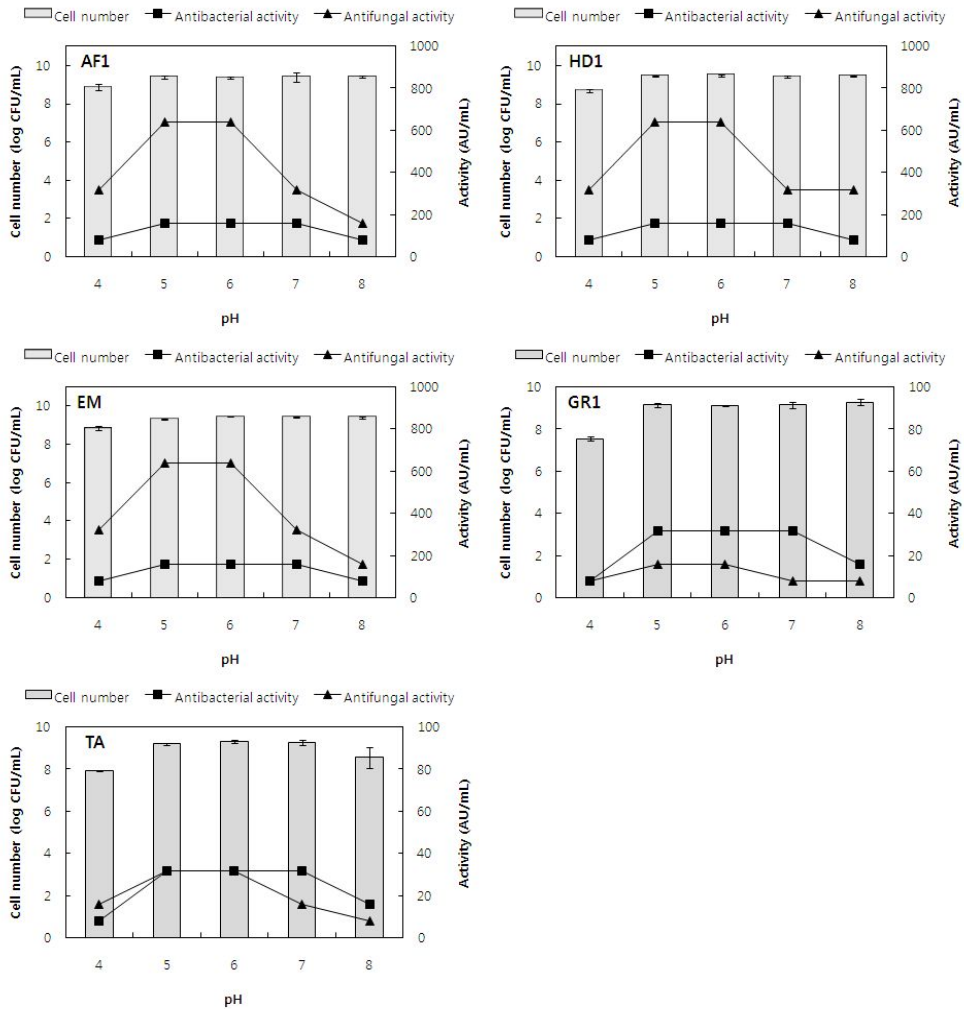


Figure 7. Effect of initial pH of media on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in CW media A-4

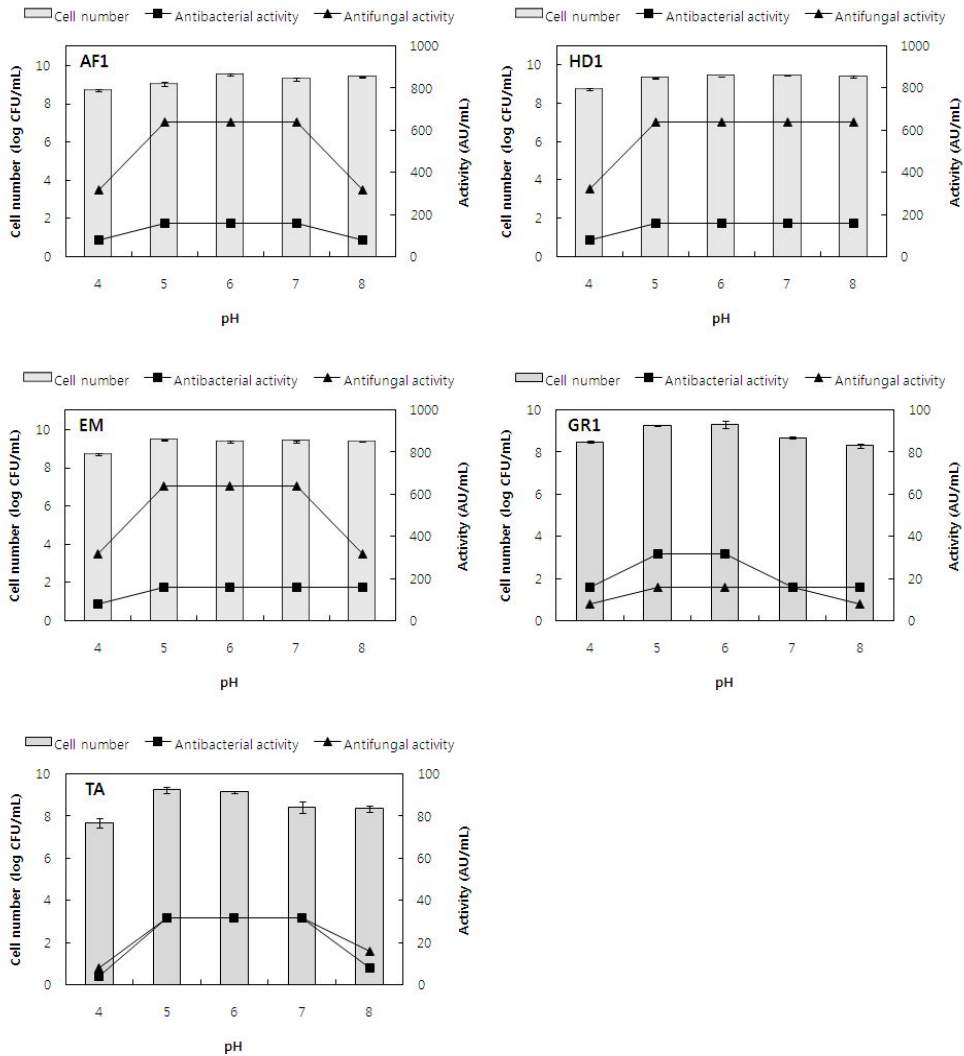


Figure 8. Effect of initial pH of media on viable cell count and antimicrobial activity of LAB grown in SCW media B-4

다. 배양 온도 및 시간의 최적화

최적화된 폐배추즙 배지 A-4에서의 배양 온도와 시간을 달리하여 유산균 5종의 생육곡선 및 항균 활성을 측정하였다.

Lb. plantarum AF1은 30°C 배양 결과 24시간에 생육 정지기에 이르러 최대 항세균 활성(160 AU/mL)과 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타내며 이는 48시간까지 유지되었다. 28°C 배양 시 12시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성은 30시간에 160 AU/mL을 나타냈으며 항곰팡이 활성은 20시간에 640 AU/mL를 나타내었다. 37°C 배양 시 24시간에 최대 생균수(9.28 log CFU/mL)를 나타냈으며 항세균 활성은 18시간에 80 AU/mL를 나타내며 더 이상 증가하지 않았고 항곰팡이 활성은 30시간에 640 AU/mL를 나타내었다(Figure 9).

Lb. plantarum HD1은 30°C 배양 결과 18시간에 생육 정지기에 이르러 최대 항곰팡이 활성(640 AU/mL)를 나타냈으며 항세균 활성은 24시간에 최대 활성(160 AU/mL)을 나타내었다. 28°C 배양 시 24시간에 생육 정지기에 이르렀으며 18시간에 최대 항세균 활성과 항곰팡이 활성을 나타내었다. 37°C 배양 시 12시간에 최대 생균수(9.35 log CFU/mL)를 나타냈고 항곰팡이 활성은 24시간 만에 최대가 되었지만 항세균 활성은 24시간 이후 증가하지 않았다(Figure 10).

Lb. plantarum EM은 28°C와 30°C에서 24시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균(160 AU/mL)과 항곰팡이 활성(640 AU/mL)이 최대가 되었다. 37°C 배양 시 18시간에 최대 생균수(9.28 log CFU/mL)를 나타냈으며 이 후 점차 감소하였다. 항세균 활성은 12시간 이후 20 AU/mL로 머물렀으며 항곰팡이 활성은 30시간 이후 최대가 되었다(Figure 11).

Leu. citreum GR1은 30°C 배양 결과 12시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성과 항곰팡이 활성 모두 24시간에 최대가 되었다. 28°C 배양 시 18시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성은 30시간에 항곰팡이 활성은 24시간에 최대가 되었다. 37°C 배양 시 24시간에 최대 생균수(7.69 log CFU/mL)를 나타냈으며 항세균 활성과 항곰팡이 활성 모두 12시간 이후 4 AU/mL에 그쳤다(Figure 12).

Leu. mesenteroides TA는 30°C 배양 결과 12시간에 생육 정지기에 이르렀으

며 12시간에 최대 향곰팡이 활성을 나타내었고 24시간에 최대 항세균 활성을 나타내었다. 28℃ 배양 시에도 12시간에 생육 정지기에 이르렀으며 향곰팡이 활성은 18시간에 항세균 활성은 24시간에 최대에 이르렀다. 37℃ 배양 시에는 24시간에 최대 생균수(8.37 log CFU/mL)를 나타내었으며 향곰팡이 활성은 12시간 이후 16 AU/mL에서 머물렀으며 항세균 활성은 6시간 이후 4 AU/mL에 머무는 결과를 보여주었다(Figure 13).

이로써 폐배추즙 배지 A-4에서의 유산균 5종의 최적 배양 온도 및 시간은 다음과 같다. *Lb. plantarum* AF1은 30℃, 24시간, *Lb. plantarum* HD1은 28~30℃, 24시간, *Lb. plantarum* EM은 28~30℃, 24시간, *Leu. citreum* GR1은 30℃, 24시간, *Leu. mesenteroides* TA는 28~30℃, 24시간에 최대 생균수와 최대 항세균·향곰팡이 활성을 나타내었다.

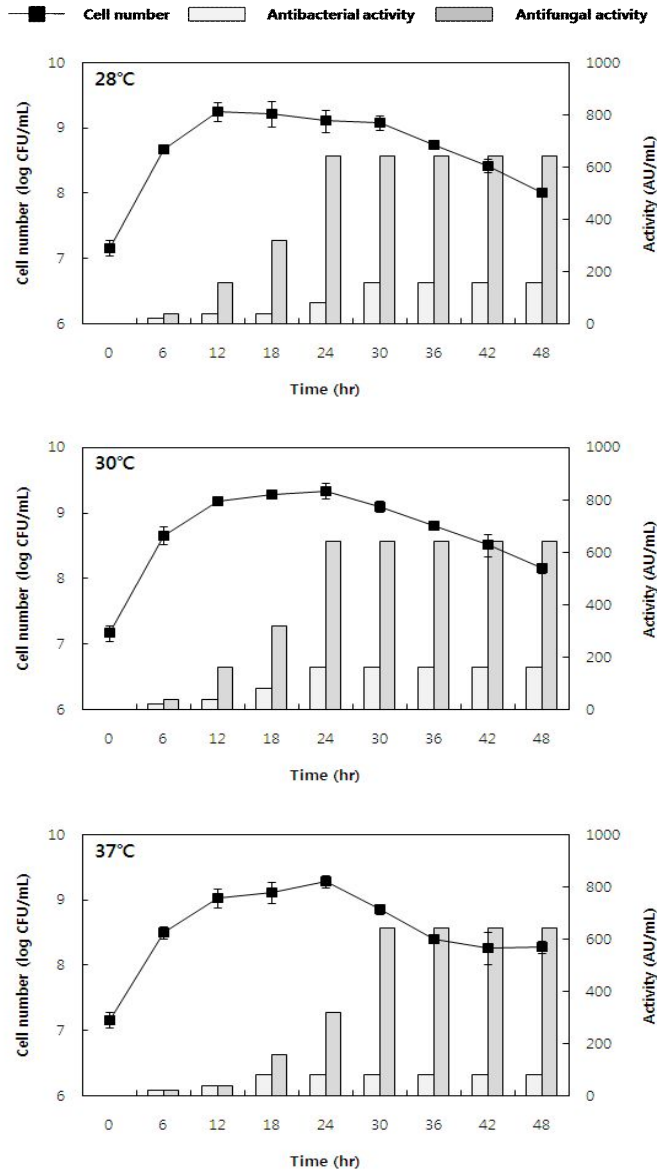


Figure 9. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Lb. plantarum* AF1 grown in CW media

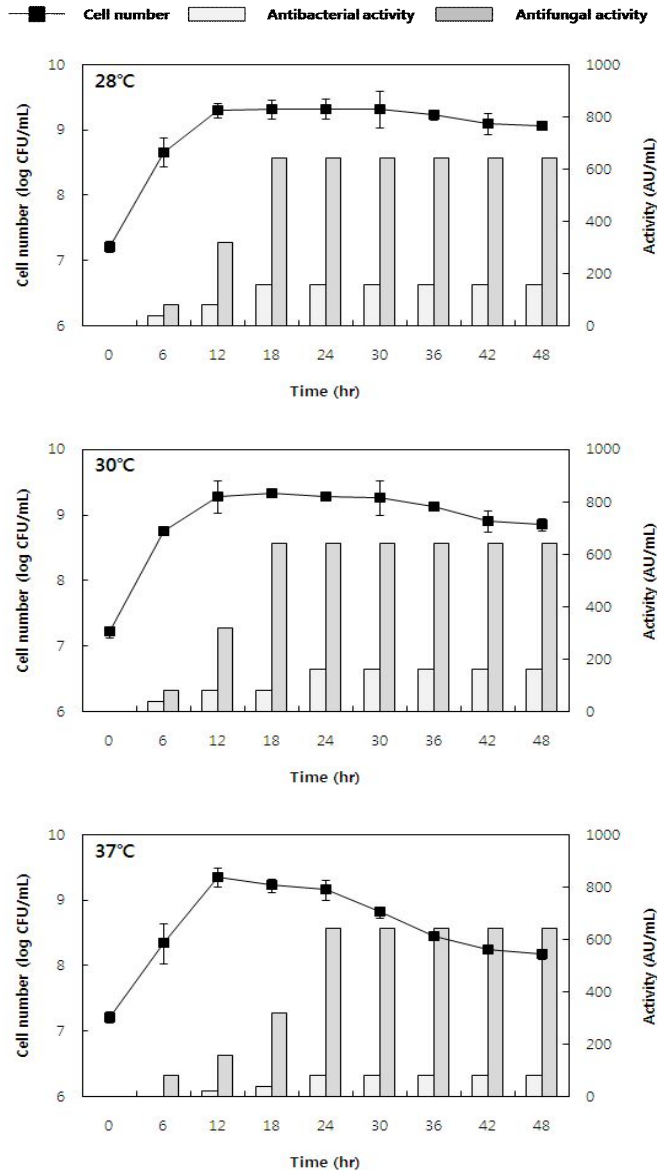


Figure 10. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Lb. plantarum* HD1 grown in CW media

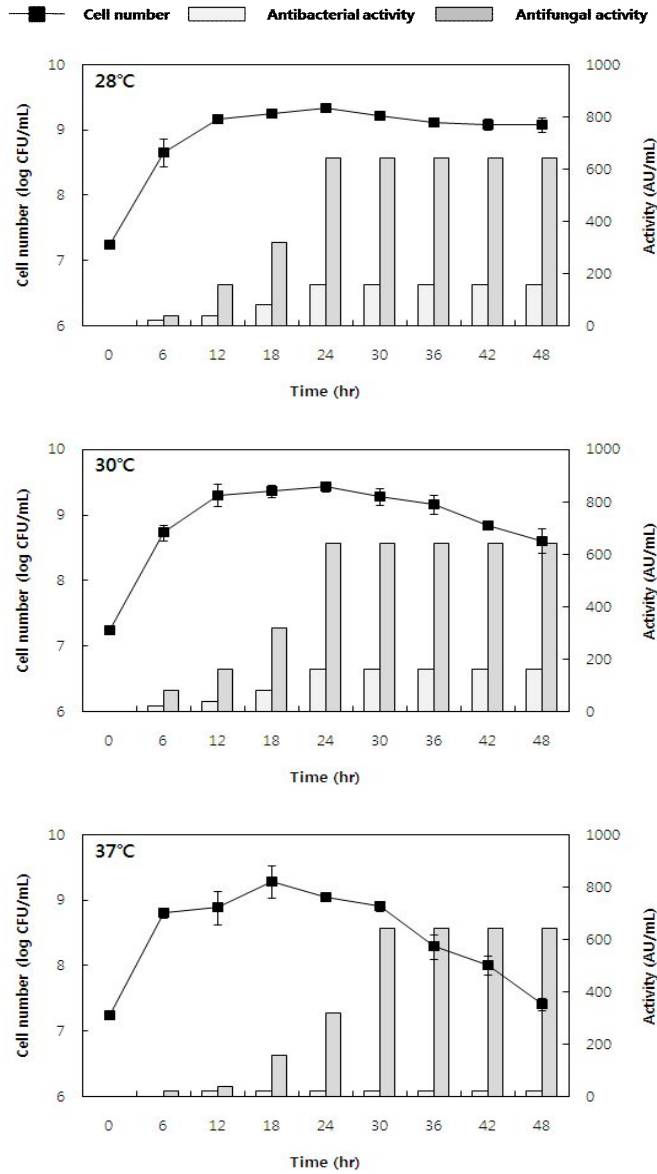


Figure 11. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Lb. plantarum* EM grown in CW media

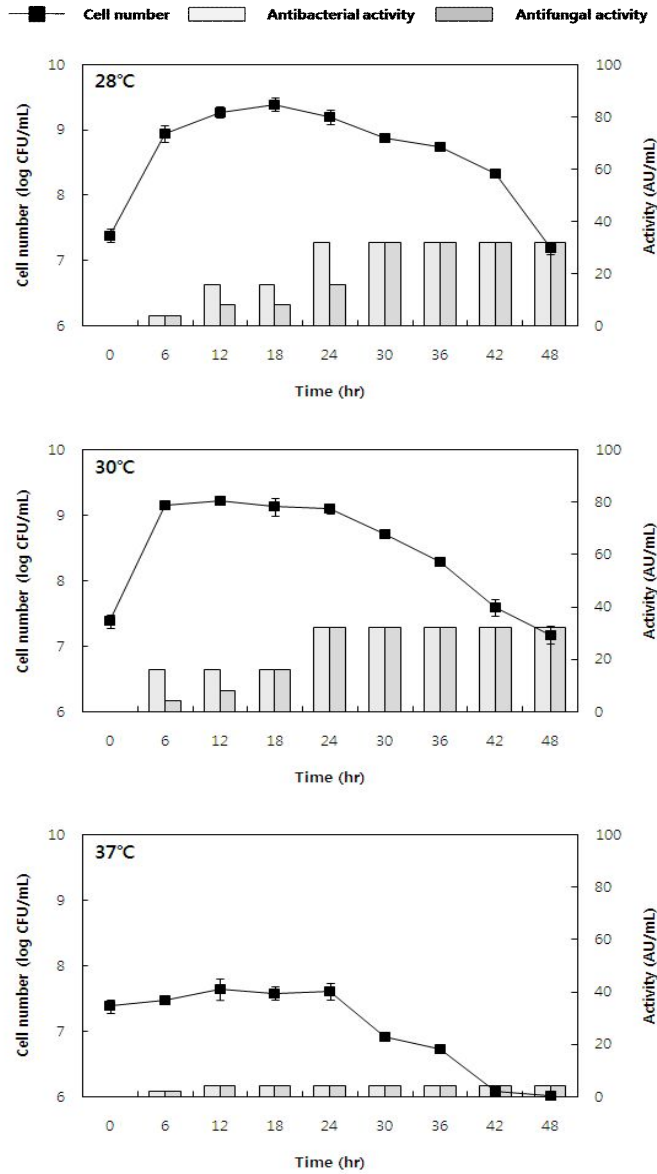


Figure 12. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Leu. citreum* GR1 grown in CW media

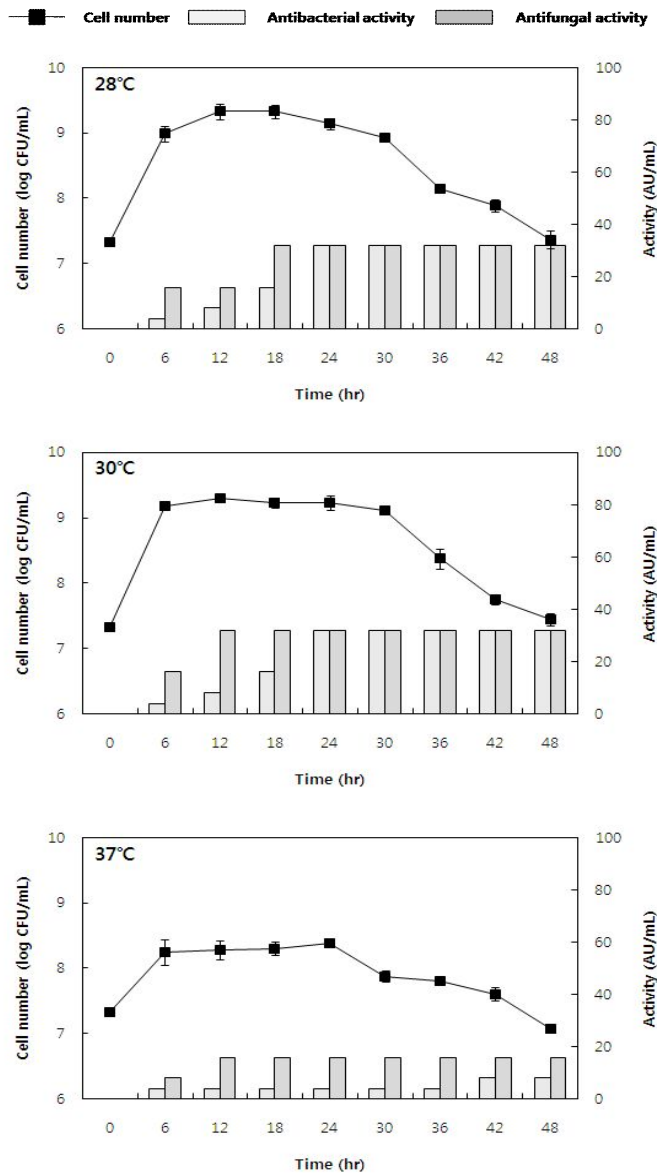


Figure 13. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Leu. mesenteroides* TA grown in CW media

최적화된 절임폐배추즙 배지 B-4에서의 최대 생균수와 항균활성을 나타내는 최적 배양 온도와 시간을 알아보기 위하여 유산균 5종의 생육곡선 및 항균 활성을 측정하였다.

Lb. plantarum AF1은 30℃ 배양 결과 24시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성(160 AU/mL)은 18시간만에, 항곰팡이 활성(640 AU/mL)은 24시간만에 최대 활성을 나타내었다. 28℃ 배양 시에도 24시간에 생육 정지기에 이르러 이때 최대 항세균 활성과 항곰팡이 활성을 나타내었다. 37℃ 배양 시 18시간에 최대 생균수(8.73 log CFU/mL)를 나타내었으며 항곰팡이 활성은 30시간에 640 AU/mL로 최대에 이르렀으나 항세균 활성은 12시간 이후로 40 AU/mL에 머무르는 결과를 보여주었다(Figure 14).

Lb. plantarum HD1은 30℃ 배양 결과 24시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성(160 AU/mL)은 24시간 만에 항곰팡이 활성(640 AU/mL)은 18시간 만에 최대가 되었다. 28℃ 배양 시 30℃에서와 비슷한 생육 곡선을 보였으며 항세균 활성과 항곰팡이 활성 역시 동일한 시간에 최대가 됨을 확인하였다. 37℃ 배양 시 6시간 최대 생균수(8.95 log CFU/mL)를 나타냈으며 항곰팡이 활성은 24시간에 최대를 나타냈지만 항세균 활성은 80 AU/mL에 머무르는 결과를 보여주었다(Figure 15).

Lb. plantarum EM은 30℃ 배양 결과 18시간에 생육 정지기에 이르러 이때 항세균 활성(160 AU/mL)과 항곰팡이 활성(640 AU/mL)이 최대를 나타내었다. 28℃ 배양 시에는 30℃에서와 마찬가지로 18시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성은 24시간 만에 항곰팡이 활성은 18시간 만에 최대를 나타내었다. 37℃ 배양 시 12시간에 최대 생균수(8.97 log CFU/mL)를 나타내었고 항세균 활성은 24시간 이후 40 AU/mL로 항곰팡이 활성은 30시간 이후 640 AU/mL를 나타내었다(Figure 16).

Leu. citreum GR1은 30℃ 배양 결과 18시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성(32 AU/mL)은 24시간 만에 최대 활성을 나타내었고 항곰팡이 활성은 18시간에 16 AU/mL를 나타내었다. 28℃ 배양 시 18시간에 생육 정지기에 이르러 항세균 활성은 30시간에 최대가 되었고 항곰팡이 활성은 24시간에 16

AU/mL를 나타내어 48시간까지 유지되었다. 37°C 배양 시에도 18시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성과 항곰팡이 활성 모두 12시간에 각각 8 AU/mL, 4 AU/mL를 나타낸 후 48시간까지 유지되었다(Figure 17).

Leu. mesenteroides TA는 30°C 배양 결과 18시간에 생육 정지기에 이르렀으며 항세균 활성(32 AU/mL)과 항곰팡이 활성(32 AU/mL) 모두 18시간 만에 최대 활성을 나타내었고 28°C 배양 시에는 24시간 만에 최대 활성을 나타내었다. 37°C에서는 배양 6시간 이후 항세균 활성과 항곰팡이 활성이 모두 8 AU/mL에 그치는 결과를 보여주었다(Figure 18).

이로써 절임페배추즙 배지 B-4에서의 유산균 5종의 최적 배양 온도 및 시간은 다음과 같다. *Lb. plantarum* AF1은 28~30°C, 24시간, *Lb. plantarum* HD1은 28~30°C, 18시간, *Lb. plantarum* EM은 30°C, 24시간, *Leu. citreum* GR1은 30°C, 24시간, *Leu. mesenteroides* TA는 30°C, 18시간에 최대 생균수와 최대 항세균·항곰팡이 활성을 나타내었다.

유산균이 생산하는 항세균 및 항진균 활성을 가지는 물질로는 lactic acid, acetic acid와 같은 유기산, diacetyl, acetoin, 박테리오신 등이 있으며 이들의 복합적인 작용으로 인해 항균 활성이 나타나는 것이다.

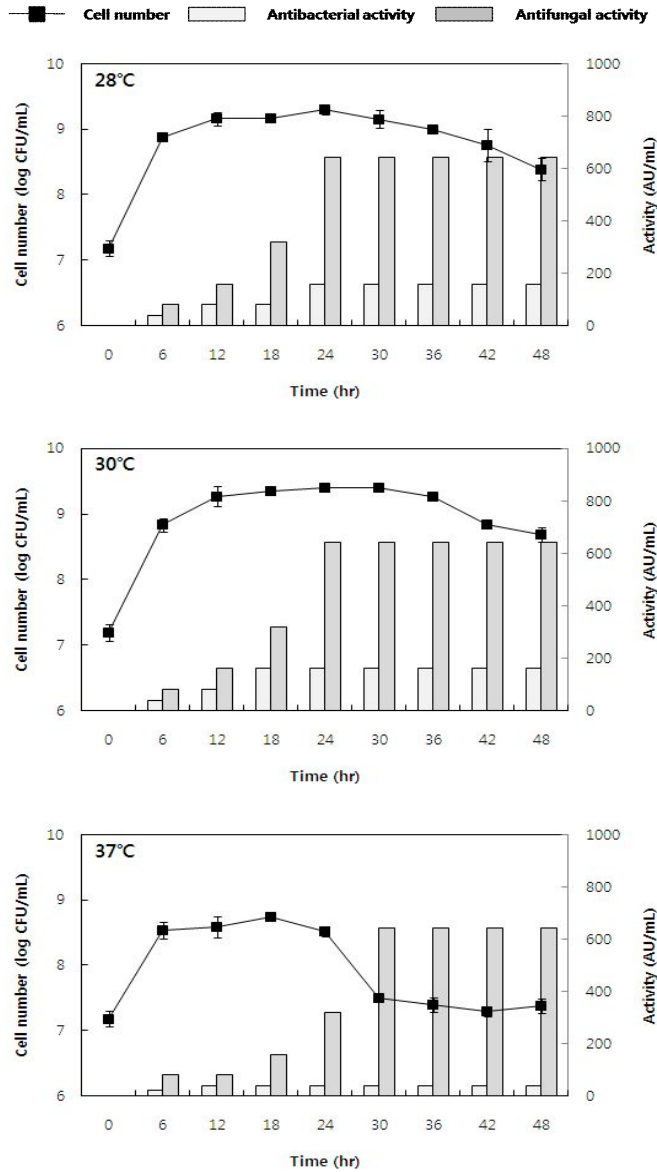


Figure 14. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Lb. plantarum* AF1 grown in SCW media

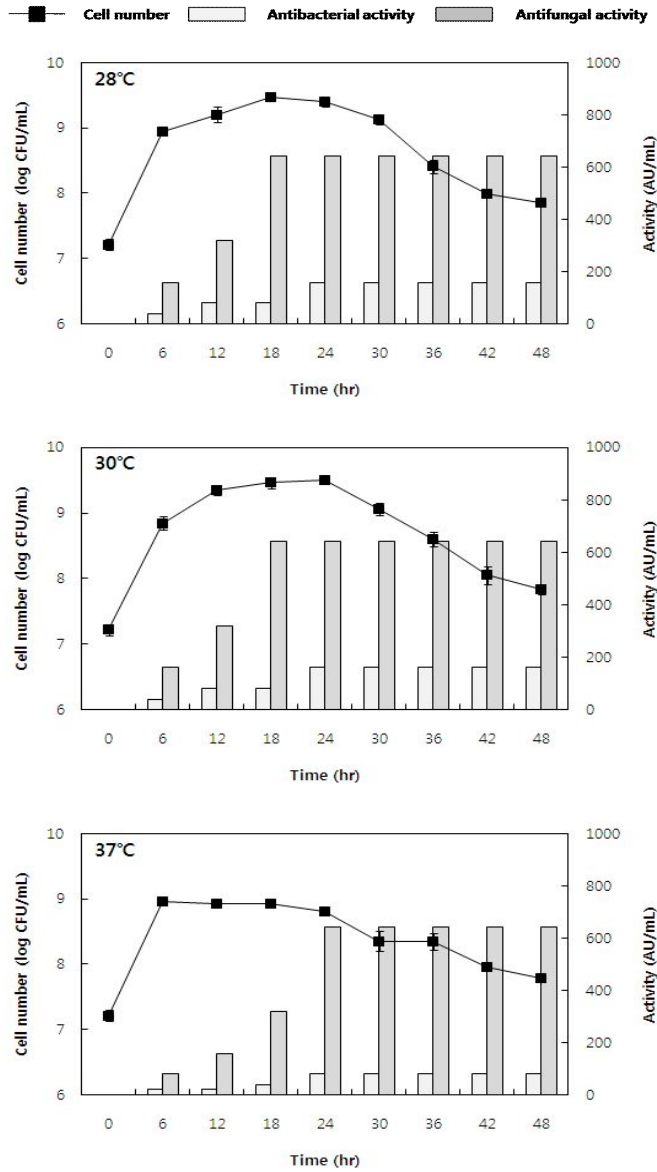


Figure 15. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Lb. plantarum* HD1 grown in SCW media

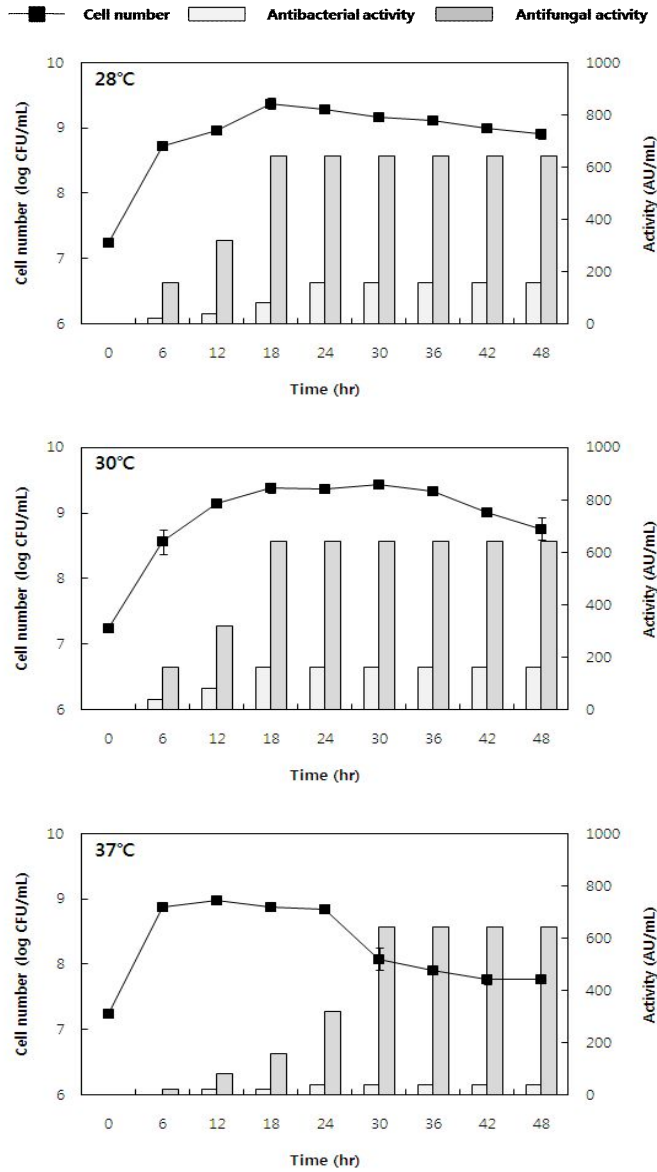


Figure 16. Effect of EM temperature on growth and antimicrobial activities of *Lb. plantarum* EM grown in SCW media

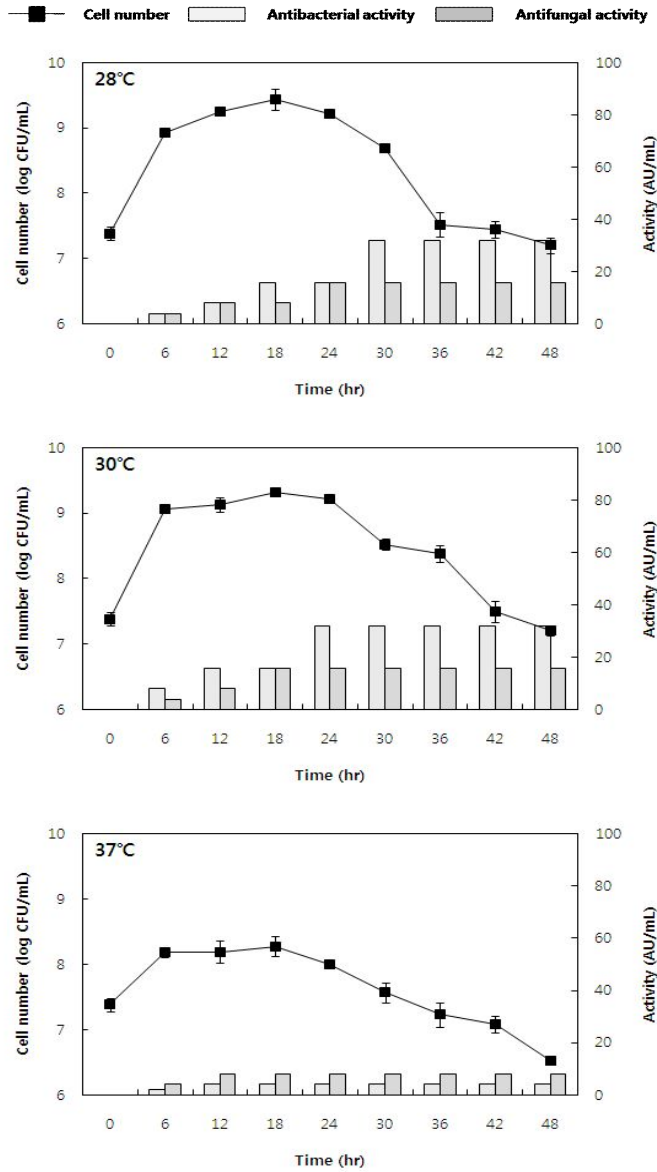


Figure 17. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Leu. citreum* GR1 grown in SCW media

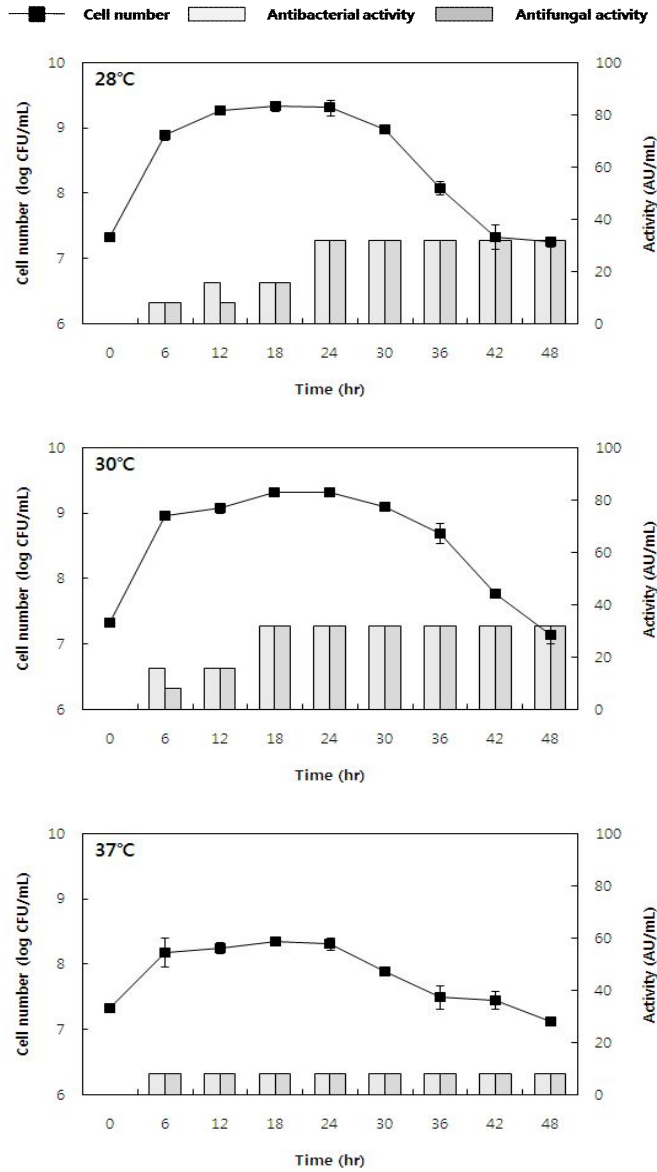


Figure 18. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *Leu. mesenteroides* TA grown in SCW media

2. 고초균 전용 식용매지 개발

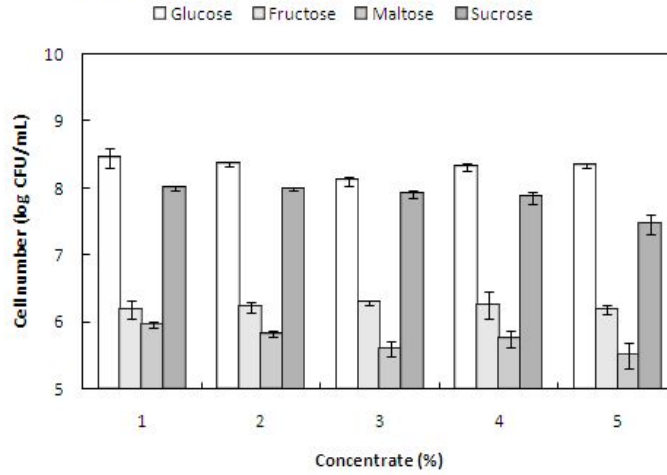
가. 영양원의 최적화

(1) 탄소원

폐배추즙 배지 C-1(CW media C-1)에서 탄소원의 최적화를 위해 glucose, fructose, maltose, sucrose를 각각 1~5%(w/v) 첨가하여 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 향균 활성을 측정하였다. 생균수 측정 결과(Figure 19-A), fructose 첨가구에서는 6.18~6.29 log CFU/mL, maltose 첨가구에서는 5.49~5.95 log CFU/mL, sucrose 첨가구에서는 7.46~7.98 log CFU/mL로 나타났으며 glucose 첨가구에서는 8.11~8.45 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내었다. 항세균 활성 측정 결과(Table 40), glucose 첨가구와 sucrose 첨가구에서 800 AU/mL로 가장 높은 활성을 나타냈으며 fructose 첨가구에서는 400 AU/mL, sucrose 첨가구에서는 200 AU/mL를 나타내었다. 항곰팡이 활성 측정 결과(Table 40), glucose 첨가구와 sucrose 첨가구에서 320 AU/mL, fructose 첨가구와 maltose 첨가구에서 160 AU/mL로 glucose 첨가구와 sucrose 첨가구에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이에 가장 높은 생균수와 항세균 및 항곰팡이 활성을 나타낸 glucose 1% 첨가구를 폐배추즙 배지 C-2로 선정하였다.

절임폐배추즙 배지 D-1(SCW media D-1)에 탄소원 첨가에 따른 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 향균 활성을 측정한 결과(Figure 19-B, Table 40), 탄소원의 종류나 농도에 관계없이 모든 구간에서 약 8 log CFU/mL를 나타내었다. 항세균 활성 측정 결과, glucose 첨가구와 sucrose 첨가구에서 800 AU/mL를 나타내었고 fructose 첨가구와 maltose 첨가구에서 각각 200 AU/mL, 400 AU/mL를 나타내었다. 항곰팡이 활성 측정 결과, glucose를 제외한 3종의 탄소원 첨가구에서 320 AU/mL를 나타내었고 glucose 첨가구에서는 640 AU/mL로 가장 높은 활성을 나타내었다. 이에 항세균 활성과 항곰팡이 활성의 가장 큰 활성 증가를 가져온 glucose 1% 첨가구를 절임폐배추즙 배지 D-2(SCW media D-2)로 선정하였다.

A. CW media



B. SCW media

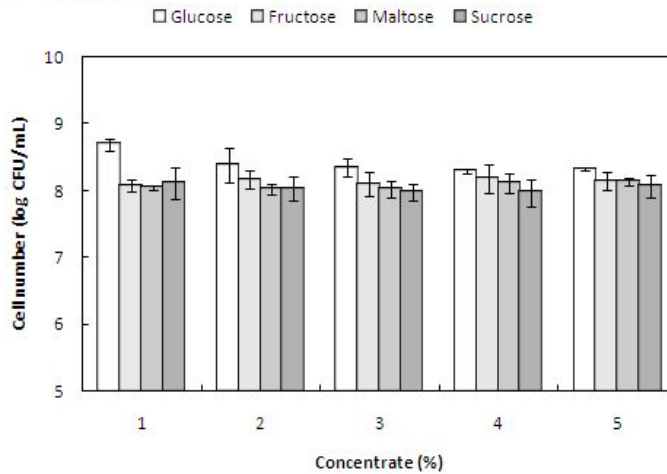


Figure 19. Effect of carbon source on viable cell count of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1

Table 40 Effect of carbon source on antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1

unit : AU/mL

		Antibacterial activity	Antifungal activity
CW media C-1		200	0
Glucose	1~5 %	800	320
Fructose	1~5 %	400	160
Maltose	1~5 %	200	160
Sucrose	1~5 %	800	320
SCW media D-1		0	40
Glucose	1~5 %	800	640
Fructose	1~5 %	200	320
Maltose	1~5 %	400	320
Sucrose	1~5 %	800	320
Control (TSB)		1,600	640

Data are presented as the means of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

(2) 질소원

폐배추즙 배지 C-2에 질소원 9종을 각각 1~2%(w/v)이 되도록 첨가하여 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균 활성을 살펴보았다. 생균수 측정 결과(Figure 20-A), beef powder 첨가구와 chicken powder 첨가구에서 약 6 log CFU/mL로 오히려 낮아지는 결과를 보였으며 그 외 다른 질소원 첨가구에서도 질소원에 첨가에 따른 생육의 증가는 나타나지 않았다. 항세균 활성 측정 결과(Table 41), soytone을 첨가한 구간에서는 800 AU/mL를 나타냈으나 tryptone, peptone, yeast extract, beef powder, chicken power 첨가구에서는 활성이 나타나지 않았다. 항곰팡이 활성 역시 일부 질소원 구간에서는 완전히 사라지는 결과를 보여주었다. 본 결과로부터 질소원 첨가에 따른 생균수 및 항균 활성의 증가는 나타나지 않았으므로 질소원의 첨가하지 않기로 하였다.

절임폐배추즙 배지 D-2에 질소원 첨가에 따른 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균 활성 측정 결과(Figure 20-B, Table 41), trptone과 malt extract, beef extract 첨가구를 제외한 모든 구간에서 약 7 log CFU/mL 이하의 생균수를 나타냈으며 항세균 활성 역시 beef extract와 peptone을 제외한 모든 첨가구에서 활성이 없음을 확인하였다. 항곰팡이 활성 측정 결과에서는 malt extract(640 AU/mL), beef extract (20 AU/mL), peptone(160 AU/mL)를 제외한 모든 구간에서 활성이 나타나지 않았다. 이에 절임폐배추즙 배지 D-2 또한 질소원을 첨가하지 않기로 하였다.

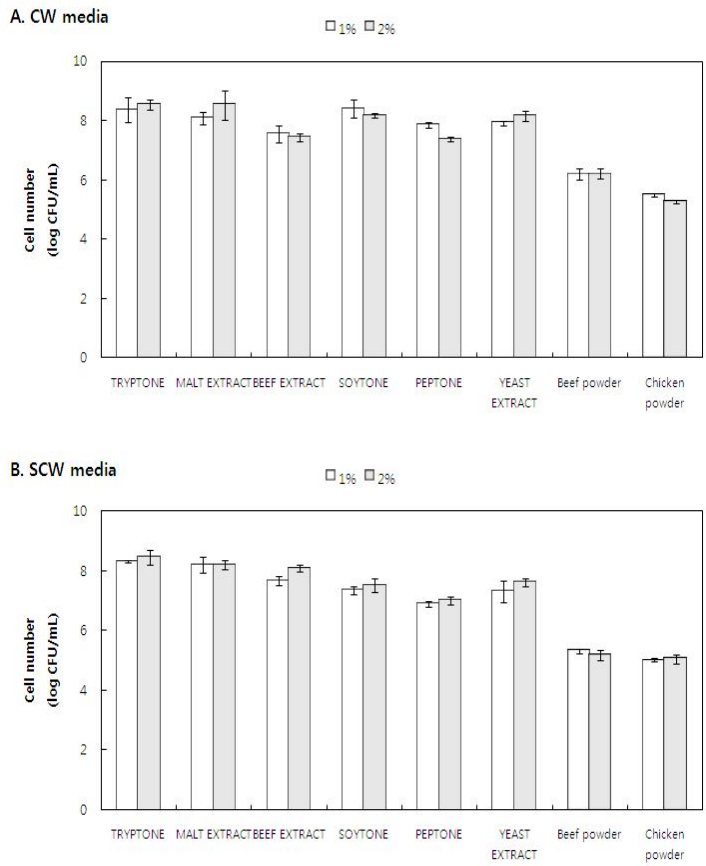


Figure 20. Effect of nitrogen source on viable cell count of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1

Table 41. Effect of nitrogen source on antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1

unit : AU/mL

		Antibacterial activity	Antifungal activity
CW media C-2		800	320
Tryptone	1~2%	0	320
Malt extract	1~2%	200	640
Beef extract	1~2%	100	0
Soytone	1~2%	800	320
Peptone	1~2%	0	160
Yeast extract	1~2%	0	0
Beef powder	1~2%	0	0
Chicken powder	1~2%	0	0
SCW media D-2		800	640
Tryptone	1~2%	0	0
Malt extract	1~2%	0	640
Beef extract	1~2%	200	20
Soytone	1~2%	0	0
Peptone	1~2%	200	160
Yeast extract	1~2%	0	0
Beef powder	1~2%	0	0
Chicken powder	1~2%	0	0
Control (TSB)		1,600	640

Data are presented as the means of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

(3) 무기원

폐배추즙 배지 C-2의 무기원 첨가에 따른 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균 활성을 측정해보았다. 5종의 무기원을 단독을 첨가한 결과(Table 42), 모든 첨가구에서 약 8 log CFU/mL 이상의 생균수를 나타내었고 그 중 무기원 A 단독 첨가구에서 가장 높은 생균수(8.59 log CFU/mL)를 나타내었다. 항세균 활성 측정 결과, 무기원 D 단독 첨가구에서 가장 높은 활성(800~1,600 AU/mL)를 나타내었고 항곰팡이 활성 역시 무기원 A와 D의 단독 첨가구에서 가장 높은 활성(640~1,280 AU/mL)를 나타내었다. 이에 무기원 A와 D를 동시에 첨가한 결과, 생균수 8.60 log CFU/mL, 항세균 활성 1,600 AU/mL, 항곰팡이 활성 1,280 AU/mL로 증가하였다. 이는 고초균용 배지인 TSB와 동등한 생균수이며 항세균 활성은 동등하고 항곰팡이 활성은 2배 높은 결과이다. 이에 폐배추즙 배지 C-2에 무기원 A+D 첨가구를 폐배추즙 배지 C-3으로 선정하였다.

절임폐배추즙 배지 D-2의 무기원 첨가에 따른 생균수를 측정한 결과(Table 42), 모든 첨가구에서 약 8 log CFU/mL 이상이 측정되었으며 항세균 활성 측정 결과, 무기원 A와 B 단독 첨가구에서 800 AU/mL로 가장 높게 나타났다. 항곰팡이 활성 측정 결과, 무기원 E 단독 첨가구에서 2,560 AU/mL로 고초균 전용 배지인 TSB에서보다 4배 높은 활성을 나타내었다. 이에 무기원 A와 E를 동시에 첨가한 결과, 생균수는 8.60 log CFU/mL, 항세균 활성은 1,600 AU/mL, 항곰팡이 활성은 2,560 AU/mL을 나타내었다. 본 결과로부터 절임폐배추즙 배지 D-2에 무기원 A+E 첨가하여 이를 절임폐배추즙 배지 D-3으로 선정하였다.

Table 42. Effect of inorganic source on viable cell count and antimicrobial activity of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-1 or SCW media D-1

		viable cell number (CFU/mL)	Antibacterial activity (AU/mL)	Antifungal activity (AU/mL)
CW media C-2		8.45±0.15	800	640
A	0.005~0.05%	8.59±0.19	800	640~1,280
B	0.005~0.05%	8.26±0.14	400	640
C	0.005~0.05%	8.28±0.15	200	640
D	0.03~0.5%	8.18±0.09	800~1,600	640~1,280
E	0.03~0.2%	8.26±0.06	800	640
A+D	0.005~0.5%	8.60±0.10	1,600	1,280
SCW media D-2		8.69±0.09	800	640
A	0.005~0.05%	8.41±0.12	800	1,280~2,560
B	0.005~0.05%	8.38±0.08	800	1,280
C	0.005~0.05%	8.39±0.01	400	1,280
D	0.03~0.5%	8.21±0.09	200	640
E	0.03~0.2%	8.28±0.20	200	1,280~2,560
A+E	0.005~0.5%	8.60±0.12	1,600	2,560
Control (TSB)		8.40±0.05	1,600	640

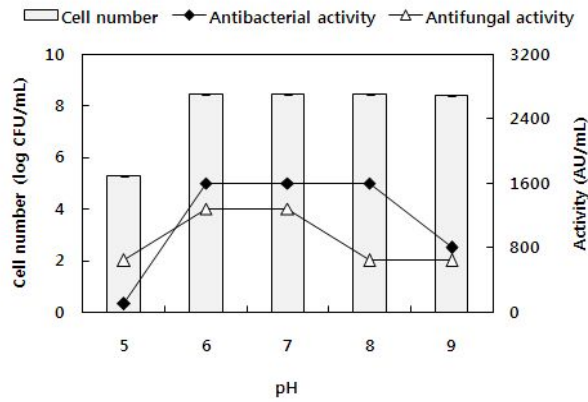
Data are presented as the means of two independent experiments performed in triplicate (n=6)

나. 배양 pH의 최적화

영양원이 최적화된 폐배추즙 배지 C-3의 최적 pH를 설정하기 위하여 배지의 초기 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 조정하여 *B. subtilis* SN7의 생균수 및 항균 활성을 측정하였다. 생균수 측정 결과(Figure 21-A), pH 5.0에서 5.26 log CFU/mL로 가장 낮은 생균수를 나타내었으며 이를 제외한 모든 구간에서 약 8 log CFU/mL 이상의 생균수를 나타내었다. 항세균 활성 측정 결과, pH 5.0에서 100 AU/mL, pH 6.0과 7.0, 8.0에서 각각 1,600 AU/mL, pH 9.0에서 800 AU/mL를 나타내었다. 항곰팡이 활성 측정 결과, pH 5.0과 8.0, 9.0에서 각각 640 AU/mL를 pH 6.0과 7.0에서 1,280 AU/mL를 나타내었다. 이에 폐배추즙 배지 C-3의 최적 pH 구간은 pH 6.0~7.0으로 선정하였다.

절임폐배추즙 배지 D-3의 초기 pH에 따른 생균수 측정 결과(Figure 21-B), pH 5.0~9.0 모든 구간에서 약 8 log CFU/mL 이상으로 측정되었으며 항세균 활성 측정 결과, pH 6.0과 7.0에서 최대 활성(1,600 AU/mL)을 나타내었다. 항곰팡이 활성 측정 결과 역시 pH 6.0과 7.0에서 가장 높은 활성(2,560 AU/mL)을 나타내었다. 이에 절임폐배추즙 배지 D-3의 최적 pH 구간은 pH 6.0~7.0으로 선정하였다.

A. CW media



B. SCW media

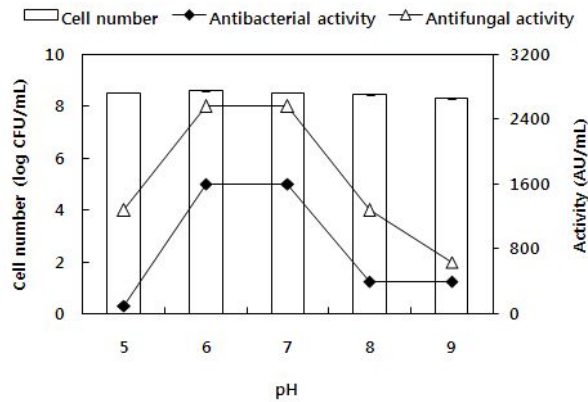


Figure 21. Effect of initial pH of media on viable cell count and antimicrobial activities of *B. subtilis* SN7 grown in CW media C-3 or SCW media D-3

다. 배양 온도 및 시간의 최적화

최적화된 폐배추즙 배지 C-3에서의 배양 온도와 시간에 따른 *B. subtilis* SN7의 생육곡선 및 항균 활성을 측정하였다.

30°C 배양 결과 24시간에 생육 정지기에 이르렀으며 이 때의 생균수는 8.35 log CFU/mL이다. 항세균 활성은 24시간에서 42시간까지 800 AU/mL를 나타냈으며 항곰팡이 활성은 24시간에서 48까지 160 AU/mL를 나타내었다.

37°C 배양 결과 18시간에 생육 정지기에 이르렀으며 이 때의 생균수는 8.57 log CFU/mL이다. 항세균 활성은 24시간에서 36시간까지 최대 활성인 1,600 AU/mL를 나타내었고 항곰팡이 활성은 24시간에서 36시간까지 1,280 AU/mL를 나타내었다. 이후 항세균 활성과 항곰팡이 활성이 조금씩 감소함을 확인하였다 (Figure 22).

이로써 폐배추즙 배지 C-3에서의 *B. subtilis* SN7의 최적 배양 온도 및 시간은 37°C, 24시간~36시간으로 이 때의 생균수는 약 8.0 log CFU/mL 이상, 항세균 활성은 1,600 AU/mL, 항곰팡이 활성은 1,280 AU/mL이다.

최적화된 절임폐배추즙 배지 D-3에서의 최적 배양 온도와 시간을 알아보았다.

30°C 배양 시 24시간에 최대 생균수(8.67 log CFU/mL)를 나타냈으며 항세균 활성은 30시간 400 AU/mL를 나타낸 후 점차 감소하여 48시간에는 완전히 사라지고, 항곰팡이 활성은 30시간 이후 640 AU/mL를 유지하였다.

37°C 배양 시 12시간 이후 약 8 log CFU/mL의 생균수를 유지하였고 항세균 활성은 24시간에서 42시간까지 최대 활성인 1,600 AU/mL를 나타내었다. 항곰팡이 활성은 24시간에서 48시간까지 2,560 AU/mL를 나타내었다(Figure 23).

이로써 절임폐배추즙 배지 D-3에서의 *B. subtilis* SN7의 최적 배양 온도 및 시간은 37°C, 24시간~42시간으로 이 때의 생균수는 약 8.0 log CFU/mL 이상, 항세균 활성은 1,600 AU/mL, 항곰팡이 활성은 2,560 AU/mL이다.

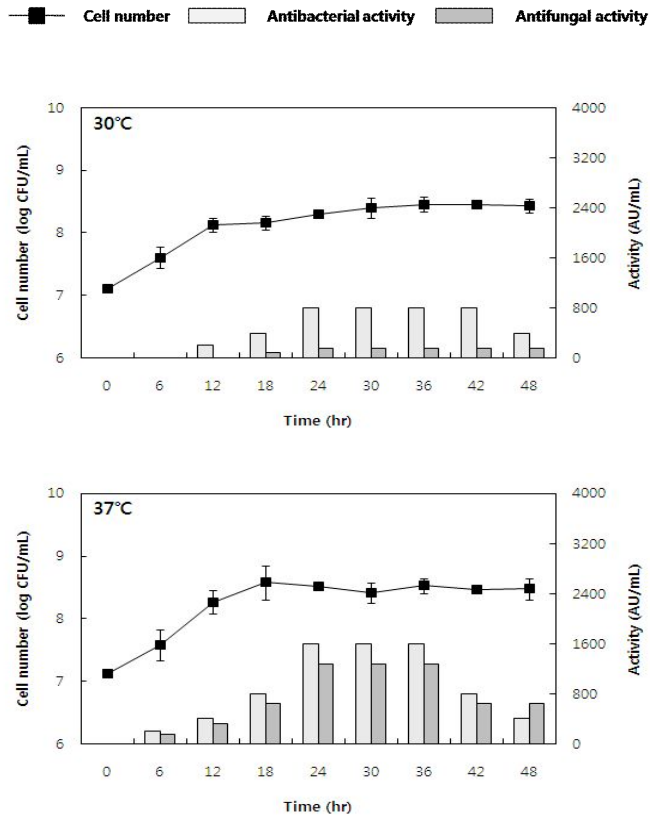


Figure 22. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *B. subtilis* SN7 grown in CW media

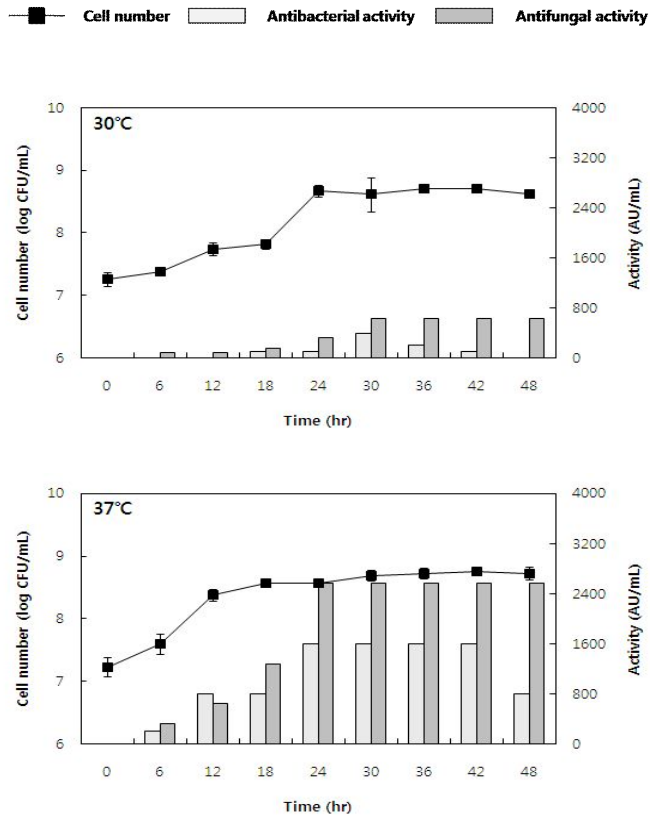


Figure 23. Effect of temperature on growth and antimicrobial activities of *B. subtilis* SN7 grown in SCW media

제 3 절 천연항균물질을 이용한 식품적용기술 개발

1. 천연항균물질의 안정성

가. pH 안정성

유산균 5종과 고초균 1종의 배양배지에 따른 항균 물질의 pH 안정성을 살펴 보았다. *Lb. plantarum* AF1는 MRS 배지와 개발배지 A-4, B-4 모두에서 pH 3.0 과 pH 4.0 구간에서 항세균 활성과 항곰팡이 활성이 안정하였으며 HD1과 EM 또한 pH 3.0과 pH 4.0 구간에서 배양배지에 따른 차이가 없음을 확인하였다. *Leu. citreum* GR1과 *Leu. mesenteroides* TA 역시 배양배지에 따른 항균 활성의 pH 안정성에는 차이가 없었다. *B. subtilis* SN7은 TSB배지와 개발배지 C-3, D-3에서 생산된 항세균 물질 모두 pH 3.0에서 pH 10.0까지 안정된 활성을 나타 내었다. 항곰팡이 활성은 pH 5.0부터 pH 10.0까지 처리전과 동일한 활성을 나타 내었다(Table 43).

Table 43. Effect of pH on antimicrobial activities of GRAS microorganism grown in the developed media

unit : AU/mL

pH	AF1						HD1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	AB*	AF**	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
con	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
3.0	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
4.0	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
5.0	40	160	40	160	40	160	20	80	20	80	20	80
6.0	20	40	20	40	20	40	0	40	0	40	0	40
7.0	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20	0	20
8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

pH	EM						GR1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
con	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
3.0	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
4.0	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
5.0	20	80	20	80	20	80	4	8	4	8	4	4
6.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

pH	TA						SN7					
	MRS		A-4		B-4		TSB		C-3		D-3	
	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
con	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
3.0	32	32	32	32	32	32	1,600	320	1,600	320	1,600	640
4.0	32	32	32	32	32	32	1,600	320	1,600	640	1,600	1,280
5.0	16	8	16	8	16	8	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
6.0	4	0	4	0	4	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
7.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
8.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
9.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
10.0	0	0	0	0	0	0	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560

* AB: Antibacterial activity; *B. cereus* KCTC 3624 was used as an indicator

** AF: Antifungal activity; *A. fumigatus* ATCC 96918 was used as an indicator for assay of LAB, *A. ochraceus* PF-2 was used as a indicator for assay of *B. subtilis* SN7

나. 온도 안정성

유산균 5종과 고초균 1종의 배양배지에 따른 항균 물질의 온도 안정성을 살펴 보았다. *Lb. plantarum* AF1과 HD1, EM 그리고 *Leu. mesenteroides* TA의 경우 MRS배지와 개발배지 A-4, B-4에서 생산된 항균물질 모두, 모든 온도 처리구간에서 동일한 항세균 및 항곰팡이 활성을 나타내었으며 *Leu. citreum* GR1의 경우 항곰팡이 활성은 모든 온도 처리구간에서 안정된 결과를 보였으나 70℃, 24시간 처리구와 100℃, 30분 처리구, 121℃, 15분 처리구에서 항세균 활성이 절반으로 줄어드는 결과를 나타내었다. *B. subtilis* SN7은 TSB배지와 개발배지 C-3, D-3에서 생산된 항균물질 모두 항세균 활성은 70℃ 이상의 온도 처리구간에서 활성이 완전히 소실되었으며 항곰팡이 활성은 100℃ 이상의 온도 처리구간에서 절반이상 소실되는 것을 확인하였다(Table 44).

Table 44. Effect of temperature on antimicrobial activities of GRAS microorganism grown in the developed media

unit : AU/mL

Temp.	AF1						HD1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	AB*	AF**	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
control	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
4°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
30°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
37°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
50°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
70°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
100°C, 30min	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
121°C, 15min	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
Temp.	EM						GR1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
control	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
4°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
30°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
37°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
50°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
70°C, 24hr	160	640	160	640	160	640	16	32	16	32	16	16
100°C, 30min	160	640	160	640	160	640	16	32	16	32	16	16
121°C, 15min	160	640	160	640	160	640	16	32	16	32	16	16
Temp.	TA						SN7					
	MRS		A-4		B-4		TSB		C-3		D-3	
	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
control	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
4°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
30°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
37°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
50°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	800	640	800	1,280	800	2,560
70°C, 24hr	32	32	32	32	32	32	0	640	0	1,280	0	2,560
100°C, 30min	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	1,280
121°C, 15min	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	640

* AB: Antibacterial activity; *B. cereus* KCTC 3624 was used as an indicator

** AF: Antifungal activity; *A. fumigatus* ATCC 96918 was used as an indicator for assay of LAB, *A. ochraceus* PF-2 was used as a indicator for assay of *B. subtilis* SN7

다. 효소 안정성

유산균 5종과 고초균 1종의 배양배지에 따른 항균 물질의 온도 안정성을 살펴 보았다. *Lb. plantarum* AF1과 HD1, EM 그리고 *Leu. mesenteroides* TA의 경우 MRS배지와 개발배지 A-4, B-4에서 생산된 항균물질이 모든 효소 처리구간에서 안정됨을 확인하였다. *Leu. citreum* GR1의 경우 proteinase K, protease, trypsin 처리구간에서 항세균 활성이 줄어들음을 확인하였으며 *B. subtilis* SN7은 proteinase K, protease, α -chymotrypsin 처리구간에서 항세균 활성이 완전히 소실되었으며 protease, trypsin, α -chymotrypsin 처리구간에서 항곰팡이 활성이 절반으로 줄어드는 것을 확인하였다(Table 45). Lee[80] 역시 *B. subtilis* SN7을 TSB 배지에서 배양하여 얻은 배양상징액이 갖는 *B. cereus*에 대한 항균 물질의 효소 안정성 측정한 결과, proteinase K, α -chymotrypsin, protease 처리에 역가가 완전히 소실하였다. 본 연구 결과로부터 *B. subtilis* SN7의 항세균 및 항진균 활성 물질이 일부 단백 분해 효소에 영향을 받는 단백질성 물질임을 추측할 수 있다. *Leu. citreum* GR1 역시 항세균 활성 물질이 일부 단백 분해 효소에 대한 영향을 받음으로써 *Leu. citreum* GR1이 생산하는 항세균 물질 역시 단백질성 물질임을 추측할 수 있다.

Table 45 Effect of enzyme on antimicrobial activities of GRAS microorganism grown in the developed media

unit : AU/mL

enzyme	AF1						HD1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	AB*	AF**	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
control	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
proteinase K	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
protease	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
pepsin	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
trypsin	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
α-chymotrypsin	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
lipase	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
α-amylase	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640	160	640
enzyme	EM						GR1					
	MRS		A-4		B-4		MRS		A-4		B-4	
	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
control	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
proteinase K	160	640	160	640	160	640	4	32	4	32	4	16
protease	160	640	160	640	160	640	4	32	4	32	4	16
pepsin	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
trypsin	160	640	160	640	160	640	8	32	8	32	8	16
α-chymotrypsin	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
lipase	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
α-amylase	160	640	160	640	160	640	32	32	32	32	32	16
enzyme	TA						SN7					
	MRS		A-4		B-4		TSB		C-3		D-3	
	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF	AB	AF
control	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
proteinase K	32	32	32	32	32	32	0	640	0	1,280	0	2,560
protease	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	1,280
pepsin	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
trypsin	32	32	32	32	32	32	1,600	320	1,600	640	1,600	1,280
α-chymotrypsin	32	32	32	32	32	32	0	320	0	640	0	1,280
lipase	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560
α-amylase	32	32	32	32	32	32	1,600	640	1,600	1,280	1,600	2,560

* AB: Antibacterial activity; *B. cereus* KCTC 3624 was used as an indicator

** AF: Antifungal activity; *A. fumigatus* ATCC 96918 was used as an indicator for assay of LAB, *A. ochraceus* PF-2 was used as a indicator for assay of *B. subtilis* SN7

2. 기존 천연 보존제와의 항균 활성 비교

기존 천연 보존제와의 항균 활성을 비교하기 위하여 식물유래 보존제인 자몽종자추출물(grapefruit seed extract)과 미생물유래 보존제인 ϵ -폴리리신(ϵ -polylysine), 현재 가장 많은 장류에 보존제로 사용되고 있는 발효주정, 혼합제제 형태의 크린콜을 준비하였다.

농축원액 그대로의 항균활성을 측정된 결과, Table 46와 같이 자몽종자추출물 원액과 ϵ -폴리리신 원액에서 세균과 곰팡이, 효모에서 강력한 활성을 나타내었으며 발효 주정과 크린콜은 항곰팡이 활성이 없음을 확인하였다. 이는 식약처 식품 원료기준을 고려하지 않은 원액의 항균 활성 spectrum으로 식품에 이를 원액 그대로 사용 시 강한 쓴맛이나 이미, 이취로 인해 식품 본래의 품질을 해칠 수 있다. 이에 FDA에서 권장한 최대 사용권장량이 가지는 항균 활성을 측정하였다.

자몽종자추출물의 최대 사용권장량인 0.08%에서 가장 넓은 항균 spectrum을 보여주었으나 이는 원액에 비해 크게 저하되었다. ϵ -폴리리신 또한 최대 사용권장량인 0.025%에서 *B. cereus* KCTC 3624와 *V. parahaemolyticus*를 제외한 모든 지시균에 대한 활성이 없음을 확인하였다. 발효주정과 혼합제제인 크린콜의 경우 최대 사용권장량인 3%에서도 활성이 전혀 나타나지 않음을 확인하였다 (Table 47).

Table 46. Antimicrobial spectrum and activities of bio-preservatives developed in this study

unit : AU/mL

		DF-100	Epolyly	Ethyl alcohol	Cleancohol
Strain	Concentration	100%	100%	95%	100%
Mold	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	6,400	1,600	0	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	12,800	25,600	0	0
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	12,800	1,600	0	0
	<i>A. nidulans</i> PF-3	51,200	102,400	0	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	12,800	12,800	0	0
Bac- teria	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	6,400	12,800	100	100
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	102,400	12,800	100	200
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	51,200	102,400	100	400
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	25,600	12,800	100	100
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	102,400	12,800	100	100
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	25,600	12,800	100	100
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	3,200	6,400	100	100
Yeast	<i>P. kudriavzevii</i> DY1	204,800	204,800	200	100
		AF1	HD1	EM	SN7
Strain	Concentration	5X	5X	5X	5X
Mold	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	800	800	1,600	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	800	800	400	12,800
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	3,200	3,200	3,200	200
	<i>A. nidulans</i> PF-3	1,600	1,600	1,600	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	800	800	200	400
Bac- teria	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	1,600	1,600	800	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	400	200	400	0
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	800	800	800	1,600
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	800	800	800	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	25,600	25,600	25,600	0
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,600	1,600	1,600	0
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	800	800	800	100
Yeast	<i>P. kudriavzevii</i> DY1	50	100	100	0

DF-100: graftfruit seed extract

Epolyly: ϵ -polylysine

cleancohol: graftfruit seed extract + ethyl alcohol

AF1,HD1,EM: culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1,HD1, and EM grown in A-4 medium

SN7: culture supernatant of *B. subtilis* SN7 grown in D-3 medium

Table 47. Antimicrobial spectrum and activities of conventional and newly developed bio-preservatives

unit : AU/mL

		DF-100					Epolyly			
Strain	Concentration	0.01%	0.02%	0.04%	0.06%	0.08%	0.01%	0.02%	0.025%	
Mold	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	0	100	0	0	0	
	<i>A. nidulans</i> PF-3	0	100	100	100	100	0	0	0	
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	0	0	0	0	0	0	0	0	
Bacteria	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	100	100	100	0	0	0	
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	0	0	0	0	100	0	100	100	
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0	0	0	0	100	0	0	100	
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	0	0	0	
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	0	0	0	0	0	0	0	0	
Yeast	<i>P. kudriavzevii</i> DY1	0	0	100	100	100	0	0	0	
		Ethyl alcohol			Cleansohol		AF1	HD1	EM	SN7
Strain	Concentration	1%	2%	3%	2%	3%	1X	1X	1X	1X
Mold	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	0	0	0	0	0	160	160	320	0
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	0	0	0	0	0	160	160	80	2,560
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	0	0	640	640	640	40
	<i>A. nidulans</i> PF-3	0	0	0	0	0	320	320	320	0
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	0	0	0	0	0	160	160	40	80
Bacteria	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	0	0	0	0	0	320	320	160	0
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0	0	0	0	0	80	40	80	0
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	0	0	0	0	0	160	160	160	1,600
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	160	160	320	0
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0	0	0	0	0	5,120	5,120	5,120	0
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0	0	0	0	0	320	320	320	0
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	0	0	0	0	0	40	40	40	20
Yeast	<i>P. kudriavzevii</i> DY1	0	0	0	0	0	10	20	20	0

DF-100: grafftuit seed extract / Epolyly: ε-polylysine / cleansohol: grafftuit seed extract + ethyl alcohol

 AF1, HD1, EM: culture superntatnt of *Lb. plantarum* AF1, HD1, and EM grown in A-4 medium

 SN7: culture superntant of *B. subtilis* SN7 grown in D-3 medium

3. 향균소재 유효농도 결정

최소저해 농도(Minimal Inhibition Concentration; MIC) test를 통하여 유산균과 고초균이 생산하는 향균물질의 식중독균 및 부패균에 대한 최소저해 농도를 측정하였다.

Lb. plantarum AF1의 배양상징액은 곰팡이에 종류에 따라 3.38~13.50 mg/mL로 나타났으며 세균은 0.42~27.00 mg/mL, 효모는 216.00 mg/mL로 나타났다. *Lb. plantarum* HD1과 EM 역시 지시균의 종류에 따라 최대 120 mg/mL의 최소저해 농도를 나타내었다. *B. subtilis* SN7의 배양상징액은 *A. ochraceus* PF-2에 대해서 0.97 mg/mL, *A. fumigatus* ATCC 96918과 *P. roqueforti* ATCC 10110에 대해서 각각 62.20 mg/mL, 31.10 mg/mL의 최소저해 농도를 나타내었다(Table 48).

Lb. plantarum AF1의 조향균물질은 일부 항세균에 대한 활성이 없어지고 향곰팡이에 대한 활성만 나타내지만, 그 활성이 보다 강력하여 0.22~28.00 mg/mL의 최소저해 농도를 나타내었다. *Lb. plantarum* HD1과 EM 역시 향곰팡이에 대한 MIC 측정 결과, 0.22~7.19 mg/mL로 나타남을 확인하였다. *B. subtilis* SN7의 조향균물질은 세균에 대한 활성만이 나타났으며 0.09~2.90 mg/mL로 보다 강력한 항세균 활성을 보여주었다(Table 48).

Table 48. The minimum inhibitory concentration of the developed bio-preservatives in this study

unit : mg/mL

	AF1 A-4		HD1 A-4		
	CS	PP	CS	PP	
	Mold				
	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	13.50	1.75	15.00	0.89
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	13.50	1.75	12.00	0.89
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	3.38	0.22	3.75	0.22
	<i>A. nidulans</i> PF-3	6.75	0.88	7.50	1.78
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	13.50	1.75	15.00	1.78
Bacteria					
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	6.75	-*	7.50	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	27.00	-	60.00	-
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	13.50	7.00	15.00	7.13
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	13.50	-	15.00	-
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.42	0.22	0.47	0.22
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.75	-	7.50	-
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	54.00	-	60.00	-
Yeast	<i>P. kudriavzevii</i> DY1	216.00	28.00	120.00	14.25
	EM A-4		SN7 D-3		
	CS	PP	CS	PP	
	Mold				
	<i>A. flavus</i> ATCC 22546	13.75	3.59	-	-
	<i>A. ochraceus</i> PF-2	27.50	3.59	0.97	-
	<i>A. fumigatus</i> ATCC 96918	3.44	0.22	62.20	-
	<i>A. nidulans</i> PF-3	6.88	3.59	-	-
	<i>P. roqueforti</i> ATCC 10110	55.00	7.19	31.10	-
Bacteria					
	<i>S. Typhi</i> ATCC 19430	13.75	-	-	-
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	19.25	-	-	2.90
	<i>B. cereus</i> KCTC 3624	13.75	-	1.56	0.09
	<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	5.50	-	-	-
	<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	0.43	0.45	-	-
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	6.88	-	-	-
	<i>M. luteus</i> ATCC 13513	55.00	-	-	1.45
Yeast	<i>P. kudriavzevii</i> DY1	110.00	28.75	-	-

AF1, HD1, EM: *Lb. plantarum* AF1, HD1, and EM

SN7: *B. subtilis* SN7

A-4: CW medium A-4 for LAB

D-3: SCW medium D-3 for *B. subtilis* SN7

CS: culture supernatant / PP: partial purified antimicrobial compound using SPE for LAB and sep-pak for *B. subtilis* SN7

4. 유산균 유래 천연항균물질의 식품 적용 기술 개발

식품공전에 따르면 “김치류”에 허용되는 식품첨가물의 사용기준은 삭카린 나트륨(0.2 g/kg)으로 설정되어 있으며 수용성안나토, 식용타르색소, 이산화티타늄, β-아포-8'-카로티날, 칠클로로필린나트륨, β-카로틴, 카르민 등은 사용이 금지되어 있다. 그 외 천연첨가물(천연색소류 등 제외)에 대한 항목에 한해서는 효과를 위한 최소량으로 제한되어 있다. 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius Commission)에서는 산도조절제(초산, 젖산, 구연산), 향미증진제(L-글루타민산나트륨, 5'-구아닐산이나트륨, 5'-이노신산이나트륨), 향료(천연향료 또는 이에 준하는 향료), 품질개량제(솔비톨), 증점 및 안정제(카리기난, 잔탄검)을 개별국의 우량제조기준(GMP)에 따라 사용할 수 있도록 규정되어 있다. 따라서 김치의 부패 미생물을 억제하기 위한 보존료로써 다양한 천연보존제에 관한 연구가 이루어지고 있으며, 그중 실제 사용되고 있는 자몽종자추출물, 유카추출물 등은 김치의 산막효모를 제어하기 위한 보존료로 사용되어지고 있다. 김치의 부패와 관련된 부패균으로는 *Pichia kudriavzevii*를 들 수 있으며 이는 김치 표면에 산막을 형성함으로써 김치의 부패균으로 알려져 있다[95]. 이에 실제 식품산업에서 산막효모를 제어하기 위해 사용되고 있는 자몽종자추출물(0.03%)와 유카추출물(0.2%)를 첨가하여 김치의 저장기간 중 품질특성을 조사하였다. 또한 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 천연항균물질로는 폐배추즙을 이용한 개발배지와 실험실용 배지인 MRS에서 각각 배양하여 얻은 배양상징액을 1, 3, 5% 처리하였으며 대조구로는 아무것도 처리하지 않은 무처리구로 하였다.

가. 이화학적 특성 조사

25℃에서 김치를 저장하며 pH와 산도를 조사한 결과, Figure 24와 같이 아무것도 처리하지 않은 무처리구, 자몽종자추출물 0.03% 처리구, 유카추출물 0.2% 처리구, 그리고 *Lb. plantarum* AF1 개발배지 배양상징액과 MRS 배양상징액 처리구 모두에서 큰 차이가 나지 않았다. 저장 1일만에 무처리구 김치는 pH 4.04, 산도 1.19로 나타났으며 자몽종자추출물 처리구는 pH 4.08, 산도 1.12, 유카추출

물 처리구는 pH 4.02, 산도 1.15, *Lb. plantarum* AF1 개발배지 배양상징액 처리구는 pH 4.13~4.16, 산도 1.07~1.09, *Lb. plantarum* AF1 MRS 배양상징액 처리구는 pH 4.01~4.06, 산도 1.15~1.18로 큰 차이가 나지 않았다. 당도와 염도 또한 실험 구간별, 저장 기간별 큰 차이가 없음을 확인하였다(data not shown).

15°C 저장 김치의 pH와 산도를 조사한 결과 또한 처리에 따른 큰 차이가 나지 않았으며 4°C 저장 김치 또한 처리에 따른 큰 차이가 없음을 확인할 수 있었다 (Figure 25, 26). 이는 김치의 숙성이 진행됨에 있어서는 천연항균물질인 *Lb. plantarum* AF1의 배양상징액에 따른 영향이 없음을 시사 할 수 있으며 유산균 수의 측정을 통해 김치 본연의 숙성에 끼치는 영향을 확인할 수 있었다.

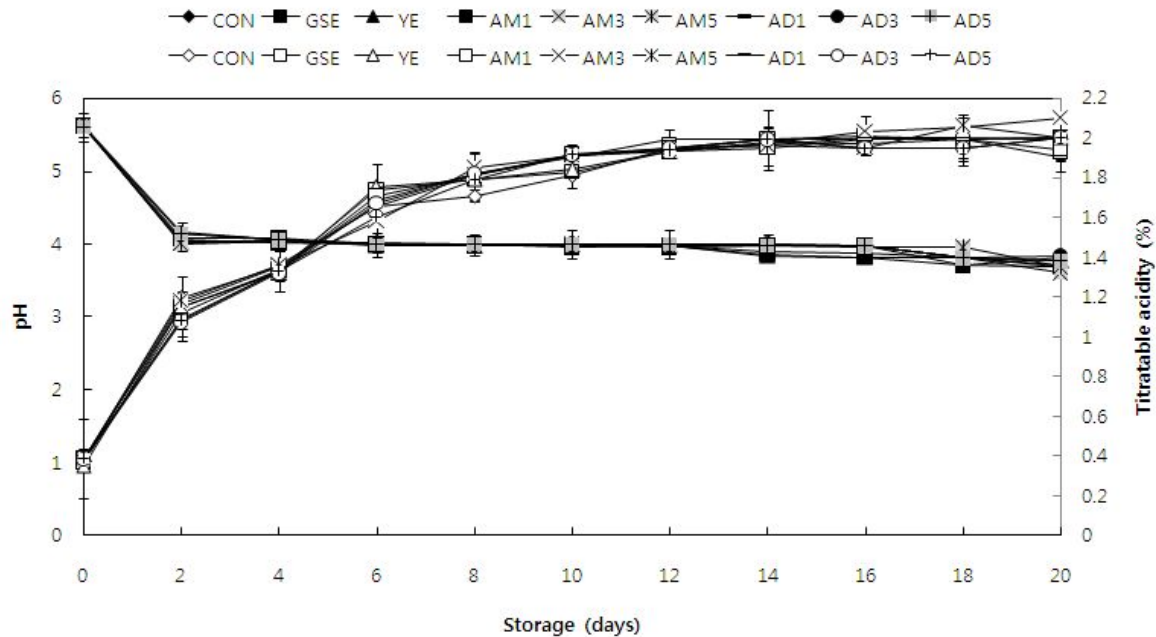


Figure 24. Total pH and acidity changes of kimchi during storage at 25°C

CON: control kimchi, GSE: grapefruit seed extract treated kimchi, YE: yucca extract treated kimchi,
 AM1, 3, 5: A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in MRS, 1%, 3%, 5%,
 AD1, 3, 5: A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in development media A-4, 1%, 3%, 5%

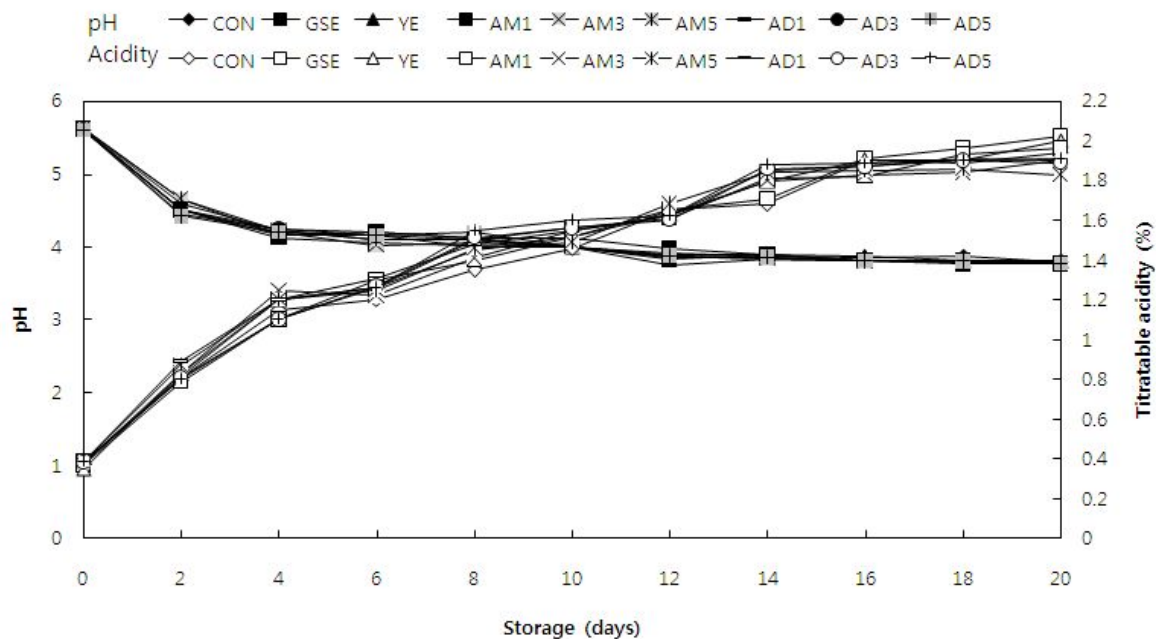


Figure 25. Total pH and acidity changes of kimchi during storage at 15°C

CON: control kimchi, GSE: grapefruit seed extract treated kimchi, YE: yucca extract treated kimchi,
 AM1, 3, 5: A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in MRS, 1%, 3%, 5%,
 AD1, 3, 5: A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in development media A-4, 1%, 3%, 5%

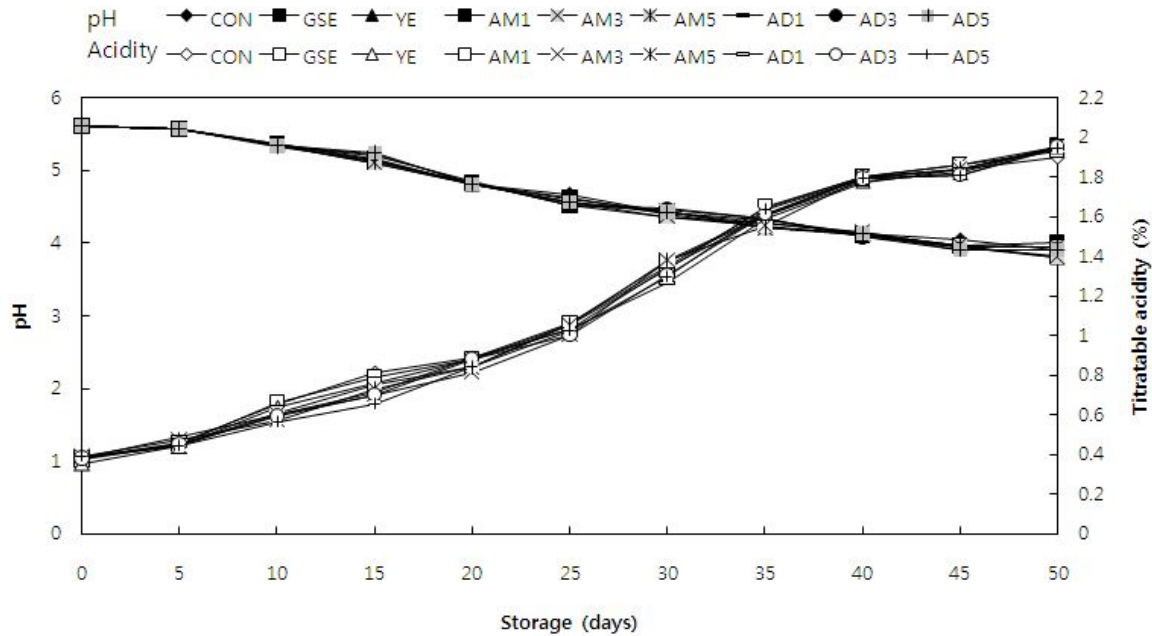


Figure 26. Total pH and acidity changes of kimchi during storage at 4°C

CON: control kimchi, GSE: grapefruit seed extract treated kimchi, YE: yucca extract treated kimchi,
 AM1, 3, 5: A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in MRS, 1%, 3%, 5%,
 AD1, 3, 5: A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in development media A-4, 1%, 3%, 5%

나. 미생물학적 특성 조사

김치는 저장기간에 따라 자연적으로 유산균수가 증가하며 발효가 되는 식품으로써 발효에 따라 유기산 등이 생성된다. 김치의 발효와 관련된 유산균의 수와 김치의 부패에 주요한 인자인 산막효모의 수를 조사하여 천연항균물질에 따른 김치의 발효 정도와 부패정도를 살펴보았다.

25℃에서 저장한 김치는 2일 만에 유산균수가 10^8 CFU/mL로 증가하였으며 이는 20일까지 유지되었다. 이는 무처리구와 기존천연보존제(자몽종자추출물, 유카추출), *Lb. plantarum* AF1의 천연항균물질의 처리에 따른 큰 차이 없이 김치의 발효가 진행되는 것을 알 수 있었다(Table 49). 반면 김치의 부패와 관련된 효모의 수를 측정된 결과, Table 50과 같이 아무것도 처리하지 않은 무처리구에서는 저장 2일부터 매끈한 형태의 효모가 검출되기 시작하여 저장 4일부터는 거친 형태의 효모가 검출되는 것을 확인하였다. 특히 저장 4일부터는 김치의 표면에 육안상으로도 확인이 가능한 효모 군락이 발견되었으며 이는 시간이 지날수록 김치의 표면을 완전히 덮는 것을 확인할 수 있었다. 자몽종자추출물의 처리구에서는 저장 8일부터 매끈한 형태의 효모와 거친 형태의 효모가 함께 검출되기 시작하였으며 육안상으로도 김치의 표면에서 효모 군락을 발견할 수 있었다. 유카추출물의 처리구에서는 저장 4일부터 매끈한 형태의 효모가 검출되어 저장 6일부터는 거친 형태의 효모가 함께 검출되었다. *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액을 처리한 구간에서는 대조구와 동일한 저장 2일부터 매끈한 형태의 효모가 검출되었으며 저장 4일부터 거친 형태의 효모가 검출되었고 빠른 속도로 증가하여 저장 10일에는 10^8 CFU/mL 이상의 효모가 검출되었으며 육안 상으로도 관찰이 가능하였다. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 개발배지 배양상징액을 처리한 구간에서는 대조구보다 8일 뒤인 저장 12일부터 매끈한 효모와 거친 효모가 검출되었으며 대조구와 다르게 서서히 증가하여 20일에는 10^6 CFU/mL를 나타내었다.

15℃에서 저장한 김치는 8일 만에 유산균수가 10^8 CFU/mL로 증가하였으며 이는 처리에 따른 차이가 없음을 확인하였다(Table 51). 효모수의 변화를 관찰한 결과, 무처리구에서는 저장 6일 만에 매끈한 형태와 거친 형태의 효모가 검출되기 시작하였으며 이는 빠른 속도로 증가였고 육안상의 효모 군락도 발견할 수 있었다. 자몽종자추출물과 유카추출물 처리구 또한 저장 8일 만에 매끈한 형태와

거친 형태의 효모가 동시에 검출되기 시작하였으며 이는 점차 증가하는 것으로 나타났다. *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액을 처리한 구간에서는 대조구와 동일한 저장 6일부터 효모 군락이 육상으로 관찰되기 시작하였으며 이때 매끈한 형태와 거친 형태의 효모가 모두 발견되었다. 반면 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 개발배지 배양상징액을 처리한 구간에서는 대조구보다 12일 후인 저장 16일만에 효모가 검출되었으며 육안 상으로도 관찰이 가능하였다(Table 52).

4°C에서 저장한 김치의 경우 저장 기간에 따라 무처리와 처리구 모두 유산균 수 증가하는 것을 확인하였으며 이는 비슷한 속도로 증가하였다 (Table 53). 효모의 수를 조사한 결과, 무처리구는 저장 15일부터 매끈한 형태의 효모가 검출되기 시작하여 저장 20일부터는 매끈한 형태와 거친 형태의 효모가 함께 검출되었고 육안상의 효모 군락도 관찰할 수 있었다. 자몽종자추출물과 유카추출물 처리구는 저장 20일부터 매끈한 형태의 효모가 검출되기 시작하였고 저장 25일부터는 거친 형태의 효모 또한 검출되었다. *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액을 처리한 구간에서는 대조구보다 5일 앞선 저장 10일부터 매끈한 형태의 효모가 검출되기 시작하였으며 저장 15일부터는 거친 형태의 효모도 함께 검출되었다. 한편 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 개발배지 배양상징액을 처리한 구간에서는 저장 30일부터 매끈한 형태와 거친 형태의 효모가 동시에 검출되기 시작하였다(Table 54).

이러한 결과를 통해 *Lb. plantarum* AF1의 MRS 배양상징액은 MRS 성분에 함유된 다양한 영양물질로 인해 식품 적용시 오히려 부패 효모를 성장하는데 도움이 되는 것으로 여겨지며 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 개발배지 배양상징액의 최소화된 영양성분과 항균물질이 식품 적용시 적합함을 확인할 수 있었다.

Ko[71]은 *Lc. lactis*를 corn syrup에 발효하여 건조한 분말화한 bacteriocin을 김치에 1.0%, 3.0%, 5.0% 첨가한 결과 pH 4.0~4.2에 도달하는 시간이 지연되는 효과를 보여주었다. Zhang[139]은 *Lb. pentosus* 31-1이 생산하는 pentocin 31-1을 냉장포장육에 80 AU/mL의 농도로 처리한 결과, *Listeria*와 *Pseudomonas*의 수가 100배 이상 감소하였다. Wilson[133]의 연구에 따르면 anti-listeria 활성을 가진 *Lb. plantarum* SK1을 처리한 무를 5°C에 보관 시 *L. monocytogenes* UMCC98의 수가 대조구 대비 약 1 log CFU/mL 감소하는 것을 보여주었다.

Table 49. LAB in kimchi during storage at 25°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)										
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
CON*	4.31±0.05	8.24±0.06	8.56±0.14	8.52±0.23	8.43±0.25	8.65±0.01	8.33±0.26	8.58±0.14	8.39±0.24	8.01±0.11	7.68±0.20
GSE**	4.28±0.09	8.15±0.07	8.36±0.02	8.34±0.13	8.51±0.14	8.36±0.16	8.39±0.17	8.41±0.18	8.37±0.10	8.01±0.14	7.66±0.31
YE***	4.27±0.08	8.35±0.27	8.44±0.17	8.30±0.20	8.57±0.07	8.28±0.15	8.44±0.09	8.25±0.15	8.33±0.14	8.00±0.14	7.58±0.16
AM-1****	4.21±0.08	8.38±0.20	8.47±0.26	8.42±0.10	8.43±0.20	8.34±0.14	8.35±0.03	8.27±0.16	8.49±0.07	8.04±0.08	7.60±0.12
AM-3	4.29±0.20	8.21±0.12	8.45±0.18	8.35±0.17	8.44±0.20	8.38±0.17	8.40±0.12	8.37±0.06	8.31±0.14	8.02±0.12	7.62±0.15
AM-5	4.20±0.10	8.34±0.26	8.34±0.04	8.49±0.09	8.55±0.09	8.39±0.05	8.37±0.02	8.33±0.11	8.29±0.11	8.02±0.08	7.65±0.14
AD-1*****	4.28±0.12	8.42±0.18	8.45±0.13	8.45±0.08	8.45±0.11	8.36±0.07	8.32±0.17	8.46±0.05	8.46±0.06	8.04±0.04	7.66±0.08
AD-3	4.29±0.20	8.21±0.2	8.42±0.20	8.38±0.13	8.47±0.12	8.32±0.20	8.39±0.25	8.49±0.15	8.47±0.26	8.06±0.21	7.65±0.12
AD-5	4.31±0.29	8.24±0.14	8.39±0.21	8.36±0.18	8.46±0.30	8.35±0.08	8.42±0.10	8.49±0.07	8.35±0.19	8.05±0.17	7.66±0.30

* CON : Control kimchi

** GSE : Grapefruit seed extract 0.03% treated kimchi

*** YE : Yucca extract 0.2% treated kimchi

**** AM : A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in MRS, 1%, 3%, 5%

***** AF : A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in development media A-4, 1%, 3%, 5%

Table 50. Smooth-shaped yeast (S) and rough-shaped yeast (R) in kimchi during storage at 25°C

unit : Log CFU/mL

		Storage (days)										
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
CON*	S	n.d	2.59±0.11	5.39±0.16	7.34±0.15	8.31±0.12	8.24±0.13	8.28±0.10	8.25±0.10	8.27±0.10	8.24±0.21	8.37±0.29
	R	n.d	n.d	2.46±0.15	5.35±0.14	7.38±0.11	8.35±0.05	8.22±0.14	8.17±0.13	8.24±0.09	8.11±0.09	8.15±0.20
GSE**	S	n.d	n.d	n.d	n.d	2.53±0.21	4.28±0.12	6.38±0.33	7.30±0.24	7.40±0.24	8.21±0.72	8.44±0.25
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.05	2.30±0.30	4.21±0.08	6.30±0.30	7.19±0.15	7.24±0.12	7.27±0.09
YE***	S	n.d	n.d	2.56±0.07	5.05±0.40	6.53±0.62	7.60±0.53	8.34±0.14	8.34±0.15	8.52±0.12	8.44±0.11	8.78±0.04
	R	n.d	n.d	n.d	2.30±0.30	4.18±0.03	6.26±0.31	7.24±0.17	7.29±0.10	7.31±0.01	7.29±0.19	7.45±0.06
AM-1****	S	n.d	2.73±0.15	5.33±0.15	7.17±0.13	8.34±0.15	8.21±0.15	8.43±0.09	8.32±0.19	8.47±0.08	8.47±0.08	8.49±0.15
	R	n.d	n.d	2.63±0.06	5.39±0.12	7.21±0.17	8.20±0.10	8.11±0.03	8.37±0.03	8.43±0.05	8.47±0.08	8.36±0.31
AM-3	S	n.d	2.79±0.10	5.69±0.09	7.54±0.16	8.36±0.22	8.49±0.26	8.45±0.18	8.52±0.11	8.50±0.18	8.54±0.07	8.54±0.08
	R	n.d	n.d	2.69±0.09	5.52±0.27	7.38±0.17	8.42±0.12	8.50±0.29	8.46±0.17	8.55±0.17	8.51±0.17	8.53±0.13
AM-5	S	n.d	2.87±0.15	5.59±0.18	7.54±0.32	8.52±0.16	8.58±0.09	8.57±0.08	8.41±0.35	8.38±0.17	8.48±0.18	8.49±0.15
	R	n.d	n.d	2.79±0.20	5.66±0.11	7.66±0.05	8.55±0.03	8.56±0.08	8.54±0.04	8.50±0.03	8.47±0.02	8.50±0.14
AD-1*****	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.26±0.24	3.13±0.16	4.20±0.10	5.39±0.27	6.40±0.13
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.10±0.17	3.13±0.31	4.16±0.15	5.30±0.18	6.19±0.20
AD-3	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.10±0.17	3.15±0.30	4.18±0.10	5.26±0.24	6.33±0.06
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.26±0.24	3.12±0.33	4.23±0.07	5.39±0.09	6.29±0.11
AD-5	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.30±0.30	3.03±0.05	4.24±0.11	5.20±0.10	6.27±0.09
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.40±0.17	3.19±0.26	4.20±0.10	5.22±0.14	6.31±0.12

Table 51. LAB in kimchi during storage at 15°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)										
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
CON*	4.31±0.05	5.66±0.16	6.52±0.15	7.24±0.16	8.20±0.16	8.12±0.13	8.22±0.10	8.15±0.06	8.20±0.40	8.19±0.20	8.22±0.09
GSE**	4.28±0.09	5.35±0.41	6.37±0.15	7.20±0.12	8.20±0.11	8.22±0.14	8.24±0.12	8.20±0.15	8.11±0.12	8.22±0.15	8.20±0.02
YE***	4.27±0.08	5.33±0.51	6.84±0.24	7.25±0.16	8.19±0.14	8.15±0.23	8.22±0.21	8.20±0.02	8.24±0.11	8.24±0.15	8.17±0.19
AM-1****	4.21±0.08	5.48±0.25	6.49±0.24	7.28±0.16	8.03±0.40	8.17±0.10	8.20±0.11	8.22±0.18	8.16±0.15	8.22±0.17	8.24±0.16
AM-3	4.29±0.20	5.47±0.15	6.49±0.06	7.09±0.65	8.16±0.11	8.11±0.15	8.16±0.14	8.13±0.30	8.10±0.01	8.32±0.22	8.27±0.01
8AM-5	4.20±0.10	5.49±0.16	6.52±0.19	7.27±0.19	8.16±0.10	8.14±0.08	8.18±0.01	8.11±0.04	8.01±0.12	8.19±0.13	8.21±0.05
AD-1*****	4.28±0.12	5.50±0.10	6.71±0.08	7.35±0.19	8.15±0.02	8.33±0.14	8.11±0.09	8.13±0.15	8.16±0.21	8.11±0.08	8.22±0.12
AD-3	4.29±0.20	5.49±0.12	6.61±0.06	7.33±0.06	8.17±0.06	8.14±0.24	8.17±0.18	8.14±0.06	8.24±0.03	8.27±0.01	8.35±0.04
AD-5	4.31±0.29	5.60±0.08	6.52±0.13	7.28±0.03	8.09±0.36	8.16±0.06	8.13±0.15	8.14±0.20	8.27±0.15	8.21±0.23	8.24±0.15

* CON : Control kimchi

** GSE : Grapefruit seed extract 0.03% treated kimchi

*** YE : Yucca extract 0.2% treated kimchi

**** AM : A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in MRS, 1%, 3%, 5%

***** AF : A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in development media A-4, 1%, 3%, 5%

Table 52. Smooth-shaped yeast (S) and rough-shaped yeast (R) in kimchi during storage at 15°C

unit : Log CFU/mL

		Storage (days)										
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
CON*	S	n.d	n.d	n.d	2.24±0.12	3.56±0.06	5.60±0.21	6.12±0.02	7.06±0.02	8.03±0.01	8.00±0.01	7.92±0.12
	R	n.d	n.d	n.d	2.02±0.06	3.00±0.45	3.46±0.01	4.15±0.16	5.00±0.49	6.05±0.42	6.03±0.15	6.13±0.15
GSE**	S	n.d	n.d	n.d	n.d	2.25±0.16	3.15±0.05	4.62±0.45	6.15±0.05	7.22±0.12	7.56±0.15	7.91±0.12
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.03	2.46±0.15	4.02±0.01	4.65±0.15	5.33±0.01	5.49±0.06	5.91±0.17
YE***	S	n.d	n.d	n.d	n.d	2.24±0.15	3.16±0.01	4.91±0.50	6.09±0.24	7.15±0.10	7.55±0.06	7.81±0.18
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	2.01±0.04	2.49±0.35	4.07±0.06	5.08±0.01	5.36±0.03	5.59±0.45	5.90±0.32
AM-1****	S	n.d	n.d	n.d	2.20±0.12	3.57±0.16	6.05±0.11	6.28±0.40	7.19±0.16	8.11±0.16	8.15±0.16	8.17±0.16
	R	n.d	n.d	n.d	2.02±0.04	3.11±0.12	3.54±0.16	4.22±0.10	5.24±0.46	6.22±0.24	6.28±0.14	6.22±0.16
AM-3	S	n.d	n.d	n.d	2.20±0.14	3.61±0.11	6.07±0.15	6.55±0.24	7.24±0.18	8.05±0.12	8.22±0.12	8.03±0.03
	R	n.d	n.d	n.d	2.00±0.03	3.10±0.12	3.48±0.15	4.21±0.18	5.44±0.12	6.08±0.22	6.22±0.02	6.27±0.08
AM-5	S	n.d	n.d	n.d	2.22±0.01	3.49±0.15	5.66±0.35	6.54±0.02	7.24±0.12	8.01±0.09	8.06±0.12	8.08±0.06
	R	n.d	n.d	n.d	2.01±0.03	3.11±0.01	3.38±0.12	4.19±0.06	5.26±0.16	6.07±0.07	6.19±0.34	6.19±0.03
AD-1*****	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.03±0.31	2.35±0.36	3.48±0.56
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.01	2.16±0.16	2.52±0.25
AD-3	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.06±0.03	2.27±0.15	3.61±0.16
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.01	2.27±0.02	2.66±0.07
AD-5	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.04±0.12	2.34±0.21	3.45±0.05
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.01	2.18±0.14	2.82±0.03

Table 53. LAB in kimchi during storage at 4°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)										
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
CON*	4.31±0.05	6.38±0.26	7.23±0.15	8.12±0.19	8.10±0.07	8.16±0.04	8.30±0.30	8.31±0.03	8.51±0.12	8.42±0.13	8.50±0.06
GSE**	4.28±0.09	6.43±0.19	7.11±0.07	7.99±0.04	8.05±0.06	8.24±0.14	8.17±0.13	8.27±0.07	8.29±0.07	8.33±0.01	8.31±0.02
YE***	4.27±0.08	6.32±0.21	7.14±0.06	8.00±0.05	8.09±0.08	8.23±0.08	8.39±0.20	8.34±0.03	8.32±0.33	8.35±0.05	8.33±0.09
AM-1****	4.21±0.08	6.49±0.35	7.17±0.13	8.05±0.11	8.14±0.08	8.29±0.03	8.31±0.27	8.40±0.22	8.35±0.03	8.37±0.01	8.38±0.04
AM-3	4.29±0.20	6.44±0.23	7.11±0.09	8.01±0.02	8.10±0.15	8.22±0.07	8.27±0.13	8.37±0.07	8.36±0.03	8.41±0.04	8.33±0.06
AM-5	4.20±0.10	6.46±0.18	7.20±0.11	8.07±0.12	8.12±0.05	8.26±0.05	8.41±0.21	8.32±0.20	8.42±0.10	8.36±0.13	8.40±0.09
AD-1*****	4.28±0.12	6.45±0.09	7.23±0.08	8.01±0.03	8.09±0.08	8.20±0.13	8.34±0.03	8.28±0.17	8.38±0.04	8.34±0.27	8.25±0.18
AD-3	4.29±0.20	6.32±0.16	7.19±0.17	8.04±0.07	8.12±0.05	8.28±0.07	8.28±0.13	8.31±0.06	8.36±0.14	8.27±0.09	8.29±0.05
AD-5	4.31±0.29	6.29±0.07	7.22±0.09	8.04±0.07	8.11±0.07	8.25±0.25	8.28±0.28	8.34±0.28	8.35±0.07	8.31±0.03	8.36±0.11

* CON : Control kimchi

** GSE : Grapefruit seed extract 0.03% treated kimchi

*** YE : Yucca extract 0.2% treated kimchi

**** AM : A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in MRS, 1%, 3%, 5%

***** AF : A culture supernatant of *Lb. plantarum* AF1 in development media A-4, 1%, 3%, 5%

Table 54. Smooth-shaped yeast (S) and rough-shaped yeast (R) in kimchi during storage at 4°C

unit : Log CFU/mL

		Storage (days)										
		0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
CON*	S	n.d	n.d	n.d	2.15±0.08	2.78±0.15	3.56±0.12	4.18±0.22	4.66±0.17	5.01±0.14	6.84±0.30	7.24±0.18
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	2.05±0.09	3.01±0.13	3.64±0.21	4.06±0.20	4.62±0.15	5.07±0.23	5.46±0.22
GSE**	S	n.d	n.d	n.d	n.d	2.06±0.11	2.34±0.15	2.45±0.35	3.05±0.24	4.08±0.54	5.15±0.15	6.27±0.22
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.04±0.13	2.50±0.24	2.79±0.20	3.49±0.13	4.82±0.11	5.06±0.13
YE***	S	n.d	n.d	n.d	n.d	2.04±0.17	2.45±0.18	3.00±0.26	3.56±0.34	4.21±0.71	5.36±0.14	6.46±0.18
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.01±0.05	2.64±0.08	3.09±0.01	3.66±0.16	4.80±0.12	5.01±0.25
AM-1****	S	n.d	n.d	2.20±0.25	3.11±0.24	3.27±0.04	4.25±0.14	5.24±0.11	5.84±0.21	6.55±0.16	7.15±0.44	8.04±0.23
	R	n.d	n.d	n.d	2.25±0.12	2.56±0.15	3.48±0.13	4.03±0.20	4.53±0.19	5.01±0.03	5.12±0.10	5.68±0.03
AM-3	S	n.d	n.d	2.22±0.18	3.45±0.42	4.06±0.07	4.43±0.24	5.68±0.35	5.94±0.13	6.72±0.11	7.13±0.05	8.10±0.13
	R	n.d	n.d	n.d	2.20±0.20	2.84±0.14	3.50±0.11	4.23±0.08	4.88±0.01	5.20±0.10	5.33±0.04	6.01±0.03
AM-5	S	n.d	n.d	2.13±0.22	3.46±0.24	4.02±0.18	4.51±0.21	5.65±0.20	5.94±0.27	6.68±0.02	7.24±0.10	8.11±0.10
	R	n.d	n.d	n.d	2.30±0.12	3.01±0.03	3.45±0.15	4.18±0.09	4.68±0.13	5.17±0.03	5.46±0.04	5.87±0.21
AD-1*****	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.05±0.03	2.33±0.54	3.05±0.21	4.22±0.10	4.48±0.21
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.01	2.16±0.21	2.45±0.06	3.44±0.02	3.52±0.03
AD-3	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.05±0.01	2.34±0.24	3.07±0.12	4.20±0.11	4.43±0.19
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.02	2.03±0.01	2.48±0.07	3.04±0.25	3.27±0.20
AD-5	S	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.04±0.06	2.38±0.16	3.00±0.11	4.18±0.23	4.44±0.10
	R	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	2.00±0.07	2.15±0.01	2.43±0.20	3.00±0.03	3.42±0.24

5. 고초균 유래 천연항균물질의 식품 적용 기술 개발

식품공전에 따르면 “장류”에 속하는 청국장의 경우, 식용타르색소 및 이산화티타늄의 사용이 금지되어 있다. 청국장은 콩을 주원료로 하는 속성 발효 식품으로서 찐 콩과 다양한 부재료를 혼합하여 먹는 식품이다. 이때 다양한 부재료의 위생 상태와 함께 찐 콩의 위생 상태에 따라 *Bacillus cereus*와 같은 식중독 균의 오염이 우려되며 이러한 콩을 주재료로 된장, 청국장 등은 이러한 식중독 균이나 부패 미생물의 제어를 위해 발효 주정이 사용되어 지고 있다. 이에 실제 식품산업에서 사용되고 있는 주정(2.5%) 처리구와 아무것도 처리하지 않은 구간을 대조구로 하고 *B. subtilis* SN7이 생산하는 천연항균물질(절임폐배추즙 개발배지 배양상징액)을 처리한 청국장의 이화학적 특성과 미생물학적 특성을 조사하여 식중독균인 *B. cereus*의 발생여부와 그 시점을 관찰하고 최적의 적용 농도를 설정하였다.

가. 이화학적 특성 조사

37℃에서 청국장을 저장하며 pH, 산도를 조사하였다(Figure 27). 아무것도 처리하지 않은 무처리구와 발효주정 처리구, *B. subtilis* SN7의 절임폐배추즙 개발배지 배양상징액 처리구 모두 큰 차이가 나지 않음을 확인하였다. 저장 0일에는 약 pH 7.00, 산도 0.09에서 저장 1일에는 대조구의 경우 pH 5.34, 산도 0.12를 나타내고 이 외 구간에서는 pH 6.11~6.29, 산도 0.10으로 비슷한 수준을 나타내었다. 저장 2일차에는 대조구의 경우 pH 4.93, 산도 0.14로 나타났으며 그 외 구간에서는 pH 5.5~5.7, 산도 0.12로 비슷한 수준이었다. 이 후 저장 3일차부터는 처리에 따른 차이 없이 처리구와 대조구 모두 비슷한 수준의 pH와 산도를 나타내었다.

15℃와 4℃에서 청국장을 저장한 결과, 모든 구간에서 큰 차이 없이 pH는 점점 낮아졌으며 산도는 점차 오르는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 28, 29).

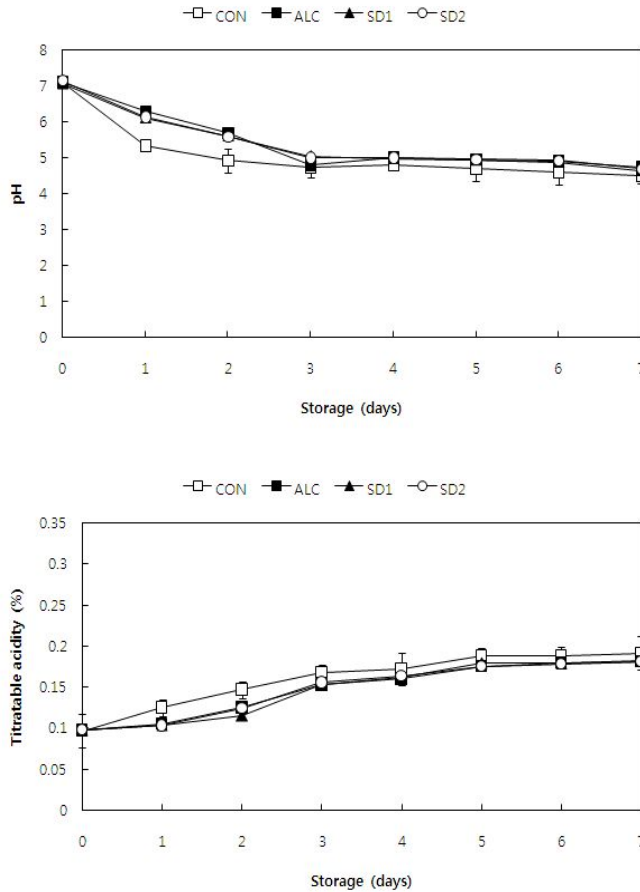


Figure 27. Total pH and acidity changes of *chungkukjang* during storage at 37°C

CON: control *chungkukjang*

ALC: ethyl alcohol 2.5% treated *chungkukjang*

SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in D-3, 1% treated *chungkukjang*

SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in D-3, 2% treated *chungkukjang*

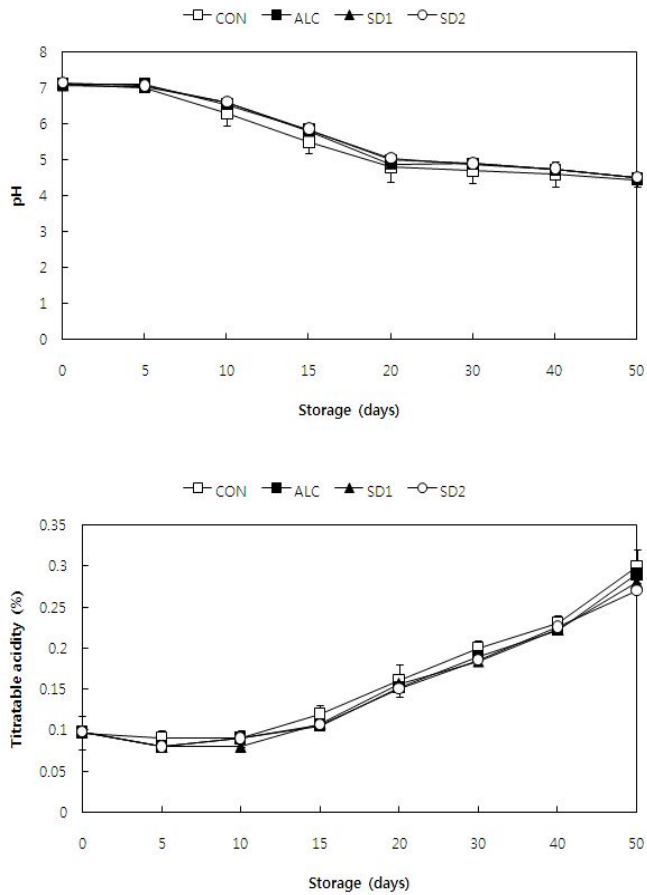


Figure 28. Total pH and acidity changes of *chungkukjang* during storage at 15°C

CON: control *chungkukjang*

ALC: ethyl alcohol 2.5% treated *chungkukjang*

SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in D-3, 1% treated *chungkukjang*

SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in D-3, 2% treated *chungkukjang*

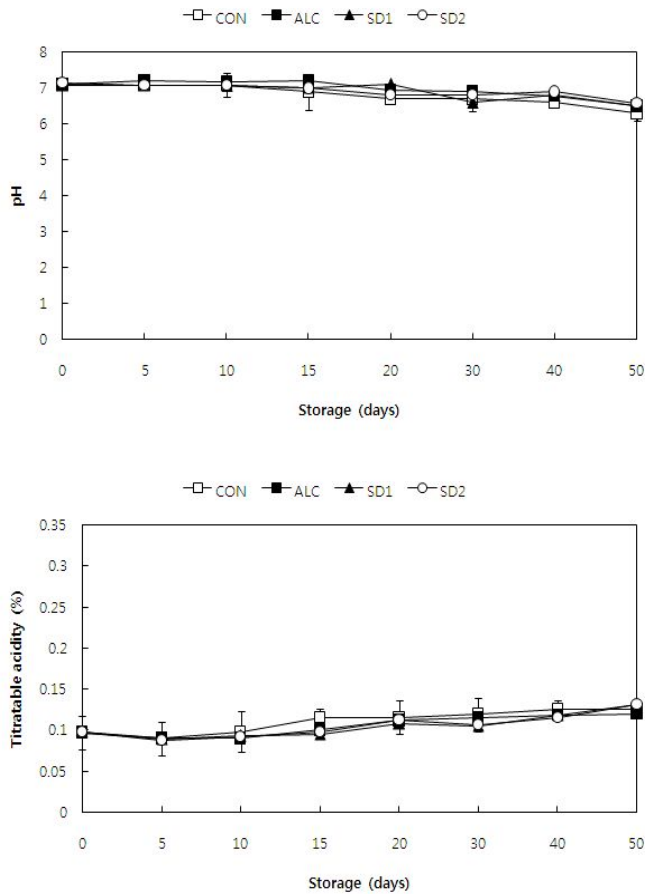


Figure 29. Total pH and acidity changes of *chungkukjang* during storage at 4°C

CON: control *chungkukjang*

ALC: ethyl alcohol 2.5% treated *chungkukjang*

SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in D-3, 1% treated *chungkukjang*

SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in D-3, 2% treated *chungkukjang*

나. 미생물학적 특성 조사

청국장은 *B. subtilis*에 의한 속성 발효 식품으로 저장 시간에 따라 자연적으로 *Bacillus* sp.의 수가 증가하며 이러한 발효를 통해 맛과 풍미가 증가한다. 이에 청국장의 발효 미생물인 *B. subtilis* sp.의 수(total viable cell)와 식중독균인 *B. cereus*의 수를 조사하여 천연항균물질에 의한 청국장 발효와 부패 정도에 끼치는 영향을 살펴보았다.

37°C에서 저장한 청국장은 초기 균수인 약 10^7 CFU/mL가 저장기간에 상관없이 유지가 되는 것을 확인할 수 있었으며 이는 무처리구와 처리구에서 차이가 나지 않음을 확인하였다(Table 55). 이는 *B. subtilis* SN7의 천연항균물질(절임페배추즙 개발배지 배양상징액)이 청국장 본연의 발효에 영향을 끼치지 않음을 여겨진다. *B. cereus*의 검출여부를 확인한 결과(Table 56), 초기 *B. cereus*는 약 10^3 CFU/mL로 이는 청국장의 식품규격인 10^4 CFU/mL로 낮은 수치이다. 하지만 저장 1일 만에 무처리구에서는 10^4 CFU/mL이상의 *B. cereus*가 검출되기 시작하였으며 이는 저장 7일까지 유지되는 것을 확인하였다. 반면 발효주정 처리구에서는 서서히 그 수가 감소하기 시작하여 저장 7일 만에 완전히 제어되는 것을 확인할 수 있었으며 *B. subtilis* SN7의 폐절임배추즙 개발배지 배양상징액의 처리구에서는 저장 2일 만에 완전히 제어되고 그 이후 전혀 검출되지 않았다(Table 58). 한편 *B. subtilis* SN7의 실험실용 배지인 TSB 배양상징액 또한 절임페배추즙 개발배지 배양상징액과 비슷한 결과를 나타내었다(data not shown).

15°C에서 저장한 청국장의 경우, 37°C와 마찬가지로 저장 기간과 처리에 따른 *Bacillus* sp. 수의 차이는 나타나지 않았다(Table 57). 한편 *B. cereus*의 수는 초기 10^3 CFU/mL에서 저장 10일 만에 10^4 CFU/mL 이상으로 식품규격에 적합하지 않은 수치로 이는 저장 45일까지 유지되는 확인하였다. 발효주정 처리구는 저장 15일까지 10^2 CFU/mL를 나타내다가 이 후 10^1 CFU/mL를 나타내었으며 *B. subtilis* SN7의 천연항균물질 처리구는 저장 15일 이후 10^1 CFU/mL를 나타내었다가 저장 30일 이후 10^1 CFU/mL까지 감소하였다(Table 58).

4°C에서 *Bacillus* sp. 수 변화 또한 저장 기간과 처리에 따른 차이가 없음을 확인하였다(Table 59). 반면 대조구의 경우 저장 15일 만에 *B. cereus*의 수가

10^4 CFU/mL 이상으로 증가하였으며 발효 주정과 *B. subtilis* SN7의 절임페배추즙 개발배지 배양상징액에서는 점차 감소하는 것을 확인 할 수 있었다(Table 60).

이때의 고온(37°C)의 결과와 저온(15°C, 4°C)에서의 결과를 함께 살펴보았을 때 검출되는 *B. cereus*는 영양세포의 상태가 아닌 포자의 상태로 예상되며 그 이유는 콩을 찌고 으개는 동안 영양세포의 *B. cereus*가 포자의 형태로 변했을 가능성과 고온(37°C)저장 시 그 포자가 발아함에 따라 천연항균물질(*B. subtilis* SN7의 절임페배추즙 개발배지 배양상징액)의 영향으로 저온 저장시보다 빨리 *B. cereus*가 제어된다는 점이다.

Kilani-Feki[67]는 항곰팡이 활성을 지닌 *B. subtilis* V26의 생균, 배양상징액, 그리고 배양액을 토마토에 처리하여 잿빛곰팡이병을 유발하는 *Botrytis cinerea* 제어정도를 확인하였다. 그 결과 *B. cinerea*에 의한 수확 후 부패율을 79% 감소 시킴으로써 토마토 보호를 위한 잠재적인 미생물 농약으로서의 가능성을 제시하였다. Jiang[49]은 항곰팡이 활성을 지닌 *B. subtilis*의 배양상징액을 식용 포도에 처리가 포도의 무름병과 독소를 생성하는 *A. carbonarius*를 제어하는 결과를 보여주었다.

Table 55. Total viable cells in *chungkukjang* during storage at 37°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
CON*	7.40±0.14	7.73±0.10	7.98±0.16	7.81±0.24	7.72±0.06	7.67±0.14	7.65±0.18	7.63±0.06
ALC**	7.48±0.10	7.78±0.08	8.01±0.20	7.85±0.11	7.68±0.08	7.60±0.08	7.58±0.10	7.60±0.04
SD-1***	7.30±0.13	7.74±0.10	7.95±0.12	7.83±0.13	7.70±0.18	7.68±0.06	7.64±0.14	7.58±0.09
SD-2	7.43±0.17	7.77±0.02	7.99±0.05	7.81±0.16	7.72±0.05	7.68±0.04	7.63±0.03	7.58±0.01

* CON: control *chungkukjang*

** ALC: ethyl alcohol 2.5% treated *chungkukjang*

*** SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 1% treated *chungkukjang*
 SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 2% treated *chungkukjang*

Table 56. *B. cereus* in chungkukjang during storage at 37°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
CON*	3.09±0.02	4.14±0.29	4.27±0.18	4.34±0.12	4.36±0.08	4.28±0.17	4.29±0.20	4.24±0.15
ALC**	3.10±0.04	3.36±0.10	3.06±0.05	2.88±0.09	2.43±0.23	2.10±0.17	0.87±0.75	n.d
SD-1***	3.10±0.03	2.84±0.10	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
SD-2	3.09±0.04	2.88±0.09	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

* CON: control chungkukjang

** ALC: ethyl alcohol 2.5% treated chungkukjang

*** SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 1% treated chungkukjang

SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 2% treated chungkukjang

Table 57. Total viable cells in *chungkukjang* during storage at 15°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
CON*	7.40±0.14	7.55±0.10	7.60±0.02	7.75±0.02	7.71±0.01	7.83±0.01	7.72±0.01	7.66±0.15	7.65±0.13	7.55±0.20
ALC**	7.48±0.10	7.51±0.12	7.53±0.06	7.68±0.19	7.75±0.03	7.76±0.02	7.81±0.02	7.81±0.02	7.76±0.02	7.75±0.12
SD-1***	7.30±0.13	7.50±0.03	7.60±0.01	7.71±0.15	7.72±0.16	7.81±0.11	7.75±0.16	7.68±0.13	7.69±0.19	7.65±0.06
SD-2	7.43±0.17	7.50±0.16	7.59±0.11	7.70±0.03	7.72±0.08	7.78±0.12	7.79±0.05	7.76±0.05	7.71±0.06	7.68±0.16

* CON: control *chungkukjang*

** ALC: ethyl alcohol 2.5% treated *chungkukjang*

*** SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 1% treated *chungkukjang*
 SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 2% treated *chungkukjang*

Table 58. *B. cereus* in *chungkukjang* during storage at 15°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
CON*	3.09±0.02	3.84±0.21	4.05±0.20	4.10±0.15	4.13±0.08	4.18±0.16	4.20±0.02	4.30±0.11	4.51±0.06	4.40±0.03
ALC**	3.10±0.04	2.36±0.24	2.20±0.11	2.13±0.10	1.58±0.11	1.53±0.09	1.30±0.13	1.21±0.15	1.09±0.01	0.67±0.58
SD-1***	3.10±0.03	2.10±0.22	2.01±0.03	1.61±0.08	1.27±0.03	1.08±0.03	0.68±0.58	0.68±0.58	0.33±0.28	0.33±0.28
SD-2	3.09±0.04	2.09±0.23	2.01±0.17	1.62±0.18	1.18±0.05	1.02±0.12	0.68±0.58	0.68±0.28	0.33±0.28	0.33±0.28

* CON: control *chungkukjang*

** ALC: ethyl alcohol 2.5% treated *chungkukjang*

*** SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 1% treated *chungkukjang*
SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 2% treated *chungkukjang*

Table 59. Total viable cells in *chungkukjang* during storage at 4°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
CON*	7.40±0.14	7.35±0.12	7.33±0.21	7.49±0.10	7.30±0.22	7.25±0.13	7.16±0.22	7.20±0.11	7.24±0.04	7.20±0.16
ALC**	7.48±0.10	7.33±0.15	7.35±0.02	7.37±0.19	7.35±0.16	7.30±0.20	7.17±0.23	7.20±0.09	7.25±0.26	7.03±0.20
SD-1***	7.30±0.13	7.45±0.11	7.34±0.16	7.34±0.20	7.41±0.08	7.18±0.30	7.20±0.13	7.24±0.09	7.30±0.04	7.16±0.08
SD-2	7.43±0.17	7.11±0.12	7.44±0.22	7.40±0.09	7.11±0.23	7.19±0.28	7.24±0.19	7.27±0.03	7.30±0.03	7.14±0.13

* CON: control *chungkukjang*

** ALC: ethyl alcohol 2.5% treated *chungkukjang*

*** SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 1% treated *chungkukjang*

SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 2% treated *chungkukjang*

Table 60. *B. cereus* in chungkukjang during storage at 4°C

unit : Log CFU/mL

	Storage (days)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
CON*	3.09±0.02	3.60±0.08	3.88±0.09	4.03±0.18	4.12±0.05	4.18±0.03	4.17±0.13	4.25±0.15	4.47±0.46	4.37±0.35
ALC**	3.10±0.04	2.56±0.24	2.43±0.23	2.42±0.38	1.98±0.30	2.02±0.12	1.89±0.11	1.66±0.32	1.66±0.32	1.56±0.49
SD-1***	3.10±0.03	2.16±0.28	2.36±0.10	2.10±0.17	1.73±0.15	1.36±0.10	1.20±0.17	0.68±0.58	0.67±0.58	0.33±0.28
SD-2	3.09±0.04	2.25±0.05	2.10±0.17	2.00±0.00	1.53±0.21	1.42±0.10	1.20±0.17	0.67±0.58	0.68±0.58	0.33±0.28

* CON: control chungkukjang

** ALC: ethyl alcohol 2.5% treated chungkukjang

*** SD-1: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 1% treated chungkukjang
 SD-2: A culture supernatant of *B. subtilis* SN7 in development media D-3, 2% treated chungkukjang

제 4 장 결 론

식품 미생물은 인류의 역사와 함께 발전해온 문화이자 과학이다. 식품의 저장
 을 목적으로 때로는 식품의 맛과 향을 좋게 하기 위해 인류는 끊임없는 시도와
 노력으로 발효 식품이라는 하나의 새로운 음식 문화를 만들어왔고 이는 후대 우
 리에게 하나의 학문이자 생활 속 없어서는 안 될 일부분이 되어 자리 잡고 있다.
 식품 미생물의 활용은 오랜 역사를 바탕으로 그 안전성이 증명되어 왔고 식품
 미생물이 생산하는 각종 유용한 성분들에 대한 연구가 진행되어 왔다. 이를 바탕
 으로 하여 식품 미생물의 활용이 식품에만 한정되지 않고 다양한 분야에 적용되
 며 발전되어 가고 있다.

식품보존제로서 GRAS 등급의 미생물이 갖춰야할 조건으로는 안전성과 더불어
 강력한 항균물질의 생산이다. 하지만 현재 사용 가능한 천연보존제 중 미생물
 유래의 천연보존제는 단 3건에 불과하며 이중 2건은 방선균 유래의 항균물질로
 강력한 항균활성을 나타내지만 GRAS 등급의 미생물이 아니며 그 일부는 사용
 가능한 식품에도 제한이 따른다. 이는 안전성이 확립된 GRAS 등급의 미생물 중
 강력한 항균 활성을 나타내는 미생물을 찾기란 쉽지 않음을 의미하며 이러한
 GRAS 등급의 미생물유래 물질로써 유일하게 천연보존제로 사용되는 nisin의 경
 우, 그가 갖는 항균 spectrum이 항세균으로 한정되어 있다. 따라서 넓은 항균
 spectrum과 강력한 항균 활성을 나타내는 GRAS 등급의 미생물이 요구된다. 또
 한 천연항균소재의 원료가 되는 GRAS 등급 미생물용 배지가 고가라면 산업화
 하는데 있어 큰 걸림돌이 될 것이다.

이에 본 연구에서는 우리나라 대표 발효식품인 김치와 메주로부터 분리된 강
 령한 항균 활성을 가지는 GRAS 등급의 미생물을 이용하여 천연식품보존제를
 개발하고자 하며 이때 원료가 되는 미생물용 배지를 저가의 식용이 가능한 원료
 를 조합하여 최적의 항균 활성을 내하고자 한다.

봄, 여름, 가을, 겨울에 나눠 수집한 가내수공업, 중소기업, 대기업의 폐배추 및
 절임폐배추는 일반성분 분석 및 유리당, 유리아미노산 등을 조사하여 시료의 성
 분을 확인한 결과, 계절과 지역에 따른 큰 차이 없음을 확인하였다. 따라서 수집
 된 시료 모두 배지 제조에 적합함을 알 수 있었다. 또한 유산균의 경우, corn

steep liquor 첨가시 생균수의 증가와 함께 항세균 및 항진균의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 고초균의 경우, corn steep liquor 및 쌀가루 첨가에 의한 생균수와 항균 활성의 증가는 나타나지 않았다. 유산균은 폐배추즙 배지와 절임폐배추즙 배지에 옥수수 침지액을 첨가한 배지에 glucose 1%와 무기염 A와 D의 첨가를 통해 최대 생균수와 최대 항세균 및 항진균 활성을 나타내었다. 이때의 배지 최적 pH는 pH 5.0~6.0으로 각각의 유산균에 따라 최적 배양 온도 및 시간을 설정하였다. 최적화된 폐배추즙 배지에서의 유산균 5종의 최적 배양 조건은 다음과 같다. *Lb. plantarum* AF1은 30°C 24시간 배양 시 최대 항세균(160 AU/mL) 및 항진균(640 AU/mL) 활성을 나타내었고 *Lb. plantarum* HD1은 28°C 18시간 배양 시 최대 항세균(160 AU/mL) 및 항진균(640 AU/mL) 활성을 *Lb. plantarum* EM은 28°C와 30°C 24시간 배양 시 최대 항세균(160 AU/mL) 및 항진균(640 AU/mL) 활성을 나타내었다. *Leu. citreum* GR1은 30°C 24시간 배양 시 최대 항세균(32 AU/mL)과 항진균(32 AU/mL)를 나타내었으며 *Leu. mesenteroides* TA의 경우 28°C와 30°C 24시간 배양 시 최대 항세균(16 AU/mL) 및 항진균(32 AU/mL)를 나타내었다. 최적화된 절임폐배추즙 배지에서의 유산균 5종의 최적 배양 조건은 다음과 같다. *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM은 28°C와 30°C 24시에 최대 생균수와 항세균·항진균 활성을 나타내었고 *Leu. citreum* GR1은 30°C 24시간만에 최대 생균수와 항세균·항진균 활성을 *Leu. mesenteroides* TA는 30°C 18시간만에 최대 생균수와 항세균·항진균 활성을 나타내었다.

고초균은 폐배추즙 배지에는 glucose 1%와 무기염 A와 D를 첨가하고 절임폐배추즙 배지에는 glucose 1%와 무기염 A와 E를 첨가하여 최대 생균수와 최대 항세균 및 항진균 활성을 나타냈으며 최적 pH는 pH 6.0~7.0으로 나타났다. 최적화된 폐배추즙 배지에서의 최적 배양 조건은 37°C 24~36시간이며 최적화된 절임폐배추즙 배지에서의 최적 배양 조건은 37°C 24~42시간이다.

천연항균물질을 이용한 식품적용기술 개발을 위해 천연항균물질의 안정성을 확인하였다. pH 안정성 측정 결과, 유산균 5종은 pH 3.0과 4.0에서 안정하였고 이 이상의 pH에서는 항균 활성이 소멸하는 것을 확인하였다. 고초균의 경우, pH 3.0과 4.0에서 항진균 활성이 2배 감소하였으나 pH 5.0 이상으로는 안정한 것으로

로 나타났으며 항세균 활성은 pH 3.0~10.0까지 모든 구간에서 안정하였다. 온도 안정성 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM과 *Leu. mesenteroides* TA의 항세균 활성과 곰팡이 활성은 모든 온도처리 구간에서 안정한 것으로 나타났으며 *Leu. citreum* GR1은 70°C이상의 처리에 의해 항세균 활성이 2배 감소하였고 *B. subtilis* SN7의 항세균 활성은 70°C이상의 처리구간에서 완전히 소멸하였으며 항진균 활성 또한 70°C이상의 처리구간에서 활성이 감소하였다. 효소 안정성 측정 결과, *Lb. plantarum* AF1, HD1, EM과 *Leu. mesenteroides* TA는 모든 효소 처리구간에서 안정한 것으로 나타났으며 *Leu. citreum* GR1은 proteinase K, protease, trypsin 처리구간에서 항세균 활성과 항진균 활성이 감소하였으며 *B. subtilis* SN7의 경우 항세균 활성은 proteinase K, protease, α -chymotrypsin에 의해 완전히 소멸되었고 항진균 활성은 protease, trypsin, α -chymotrypsin에 의해 활성이 감소하였다.

기존 천연 보존제인 자몽종자추출물, ϵ -폴리리신, 발효주정, 크린콜과 항균 spectrum을 비교한 결과, 기존 천연 보존제의 사용권장량 하에 항균 활성보다 신규 천연항균물질의 활성이 강력하며 그 항균 spectrum 또한 넓은 것을 확인할 수 있었다. 항균소재 유효농도를 결정하기 위해 최소저해 농도를 측정한 결과, *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 배지 배양상징액의 최소 저해 농도는 세균 종류에 따라 0.42~54.00 mg/mL를 곰팡이는 3.38~13.50 mg/mL를 나타냈으며 *Lb. plantarum* HD1과 EM은 세균 종류에 따라 각각 0.47~60.00 mg/mL, 0.43~55.00 mg/mL, 곰팡이 종류에 따라 각각 3.75~15.00 mg/mL, 3.44~55.00 mg/mL를 나타내었다. *B. subtilis* SN7의 절임폐배추즙 배지 배양상징액의 경우, *B. cereus* KCTC 3624에 대해 최소 저해 농도 1.56 mg/mL를 나타냈으며 *A. ochraceus* PF-2에 대해 최소 저해 농도 0.97 mg/mL를 나타내었다.

유산균 유래 천연항균물질을 식품에 적용하여 기존 보존제와의 산막효모 제어능을 비교하기 위해 *Lb. plantarum* AF1의 폐배추즙 배양상징액을 1% 처리한 결과, 온도에 따라 대조구(무처리구)보다 약 10일정도 산막효모의 출현을 제어하였으며 김치 발효와 연관된 유산균의 수에는 영향을 주지 않음을 확인하였다.

고초균 유래 천연항균물질로 *B. subtilis* SN7의 절임폐배추즙 배양상징액 1%를 처리하여 청국장 내 *B. cereus* 제어능을 조사한 결과, 37°C 저장 2일만에 완

전히 제어하는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구는 천연식품보존제 개발을 위하여 항균 활성을 지닌 GRAS 등급의 미생물로 유산균 5종과 고초균 1종을 이용하여 식용배지에서 배양한 배양상징액을 천연보존제로 개발하였다. 강력한 항균 활성을 지닌 GRAS 등급 미생물을 배양할 수 있도록 배추 폐기물을 이용하여 최적 생육과 항균 활성을 나타내는 영양성분을 최적화가 이루어졌다. 이와 함께 배지의 초기 pH, 배양 시간과 온도의 최적화를 통하여 기존 실험실용 배지와 동등하거나 그 이상의 생육과 항세균 및 항진균 활성을 나타내었다. 또한 이와 같이 개발된 배지에서 생산된 천연항균물질을 식품에 적용하여 보존제로서의 가능성을 확인하였으며 시판 보존제보다 뛰어난 효능을 나타내며 그 가능성을 검증하였다.

배추폐기물을 이용한 GRAS 등급의 미생물용 배지의 개발은 폐기물의 자원화와 더불어 배지원료의 저감화를 가능하도록 하였으며 이로부터 생산된 GRAS 등급의 미생물은 그 생균 자체와 배양상징액으로 나누어 각각을 종균 및 천연항균물질 등 다양한 분야에서의 활용 또한 가능할 것이다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Afifah DN, Sulchan M, Syah D, Yanti, and Suhartono MT. 2015. The use of red oncom powder as potential production media for fibrinogenolytic protease derived from *Bacillus licheniformis* RO3. *Procedia Food Science*. **3**: 453-464.
2. Ahn YT, Kim GB, In YM, Jeong SG, Ham JS, Kim DW, Lee KU, Kim SK, and Kim HU. 2000. A study on the production medium of lactic acid bacterial cells by using corn steep liquor. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*. **20**: 181-191.
3. Annamalai N, Rajeswari MV, and Balasbramanian T. 2014. Extraction, purification and application of thermostable and halostable alkaline protease from *Bacillus alveayuensis* CAS 5 using marine wastes. *Food and Bioproducts Processing*. **92**: 335-342.
4. AOAC (2016) Official methods of analysis 20th edition. Association of official analytical chemists, Washington, DC, USA.
5. Ashmaig A, Hasan A, and Gaali EE. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (*Gariss*). *African Journal of Microbiology Research*. **3**: 451-457.
6. Atlas RM. 2004. Handbook of microbiological media. Park LC(Ed). CRC press, Boca Raton, Fla, USA.
7. BaoZyme-Aqua. Sino-Aqua Corp., Kaohsiung, Taiwan.
www.sino-aqua.com
8. BD (Becton, Dickinson and Company). BD Bionutrients™ technical manual advanced bioprocessing. third edition. USA.
9. Bertani G. 1951. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **62**: 293-300.
10. Campus M, Sedda P, Cauli E, Piras F, Comunian R, Paba A, Daga E, Schirru S, Angioni A, Zurru R, and Bandino G. 2015. Evaluation of a

- single starter culture, a selected inoculum enrichment, and natural microflora in the processing of *Tonda di Cagliari* natural table olives: Impact on chemical, microbiological, sensory and texture quality. *LWT-Food Science and Technology*. **64**: 671-677.
11. Carr FJ, Chill D, and Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: a literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. **28**: 281-370.
 12. Casaburi A, Martino VD, Ferranti P, Picariello L, and Villani F. 2016. Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*. **26**: 31-45.
 13. Chalmers CH. 1955. Bacteria in relation to the milk supply. A practical guide for the commercial bacteriologist. Edward Arnold Publishers Ltd, London
 14. Chalón MC, Terán V, Arena ME, Oliszewki R, and González SN. 2013. Microbiological culture broth designed from food waste. *Journal of Environmental Management*. **115**: 1-4.
 15. Chang JY, Lee HJ, and Chang HC. 2007. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. *Journal of Applied Microbiology*. **103**: 2504-2515.
 16. Chang WT, Chen ML, and Wang SL. 2010. An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **26**: 945-950.
 17. Chen H and Hoover DG. 2003. Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**: 82-100.
 18. Choi EA and Chang HC. 2015. Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Tehcnology*. **62**: 210-217.
 19. CODEX, class names and the international numbering system for food

- additives (CODEX CAC/GL 36-1989), CODEX general standard for food additives (CODEX STAN 192-1995) inventory of processing aids (CODEX CAC/MISC 3)
20. Coppi F, Ruoppolo M, Mandressi A, Bellorofonte C, Gonnella G, and Trinchieri A. 1985. Results of treatment with *Bacillus subtilis* spores (Enterogermina) after antibiotic therapy in 95 patient with infection calculosis. *Chemioterapia*. **4**: 467-470.
 21. Davis BD. 1949. The isolation of biochemically deficient mutants by means of penicillin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **35**: 1-10.
 22. Dawood Mahmoud AO, Koshio S, Ishikawa M, Yokoyama S, Basuini Mohammed FEL, Sakhawat Hossain MD, Nhu TH, Dossou S, and Moss AS. 2016. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus rhamnosus* or/and *Lactococcus lactis* on the growth, gut microbiota and immune responses of red sea bream, *Pagrus major*. *Fish & Shellfish Immunology*. **49**: 275-285.
 23. Downes FP and Ito K. 2001. Compendium of Methods for Microbiological of Food, 4th edition, APHA, Washington, D.C USA.
 24. Dubey V, Ghosh AR, Bishayee K, and Khuda-Bukhsh AR. 2016. Appraisal of the anti-cancer potential of probiotic *Pediococcus pentosaceus* GS4 against colon cancer: *in vitro* and *in vivo* approaches. *Journal of Funtional Foods*. **23**: 66-79.
 25. EFSA (European Food Safety Authority). 2015. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 3: suitability of taxonomic units notified to EFSA until september 2015. *EFSA Journal*. **13**: 4331.
 26. Elfahri KR, Vasiljevic T, Yeager T, and Donkor ON. 2016. Anti-colon cancer and antioxidant activities of bovine skim milk fermented by selected *Lactobacillus helveticus* strains. *Journal of Dairy Science*. **99**: 31-40.

27. EU(European Union), Commission regulation (EU) No. 231/2012, Commission regulation (EU) No. 1129/2911, Commission regulation (EU) No. 1925/2006
28. Evans JB and Niven CF. 1951. Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *Journal of Bacteriology*. **62**: 599-603.
29. Favaro L, Lúcia A, Penna B, and Todorov SD. 2015. Bacteriocinogenic LAB from cheeses - Application in biopreservation?. *Trends in Food Science & Technology*. **41**: 37-48.
30. FDA (Food and Drug Administration). Generally Recognized as Safe (GRAS). 21 CFR 182 Substances GRAS in food. Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List). <http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>
31. Gao YR, Li DP, and Liu XY. 2014. Bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* C2 as starter culture in fermented sausages. *Food Control*. **35**: 1-6.
32. Ghanbari M, Jami M, Domig KJ, and Kneifel W. 2013. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *LWT-Food Science and Technology*. **54**: 315-324.
33. Ghribi D, Zouari N, Trigui W, and Jaoua S. 2007. Use of sea water as salts source in starch- and soya bean-based media, for the production of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides. *Process Biochemistry*. **42**: 374-378.
34. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, and Gopal PK. 2000. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *British Journal of Nutrition*. **83**: 167-176.
35. Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, and Stewart A. 2012. Have biopesticides come of age?. *Trends in Biotechnology*. **30**: 250-258.

36. Guo X, Chen DD, Peng KS, Cui ZW, Zhang XJ, Li S, and Zhang YA. 2016. Identification and characterization of *Bacillus subtilis* from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) for use as probiotic additives in aquatic feed. *Fish & Shellfish Immunology*. **52**: 74-84.
37. Haddar A, Fakhfakh-Zouari N, Hmidet N, Frikha F, Nasri M, and Kamoun AS. 2010. Low-cost fermentation medium for alkaline protease production by *Bacillus mojavensis* A21 using hulled grain of wheat and sardinella peptone. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **110**: 288-294.
38. Halami PM and Chandrashekar A. 2005. Enhanced production of pediocin C20 by a native strain of *Pediococcus acidilactici* C20 in an optimized food-grade medium. *Process Biochemistry*. **40**: 1835-1840.
39. Han B, Long WQ, He JY, Liu YJ, Si YQ, and Tian LX. 2015. Effects of dietary *Bacillus licheniformis* on growth performance, immunological parameters, intestinal morphology and resistance of juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology*. **46**: 225-231.
40. Han X, Yi H, Zhang L, Huang W, Zhang Y, Zhang L, and Du M. 2014. Improvement of fermented chinese cabbage characteristics by selected starter cultures. *Journal of Food Science*. **79**: M1387-M1392.
41. Hoa HT, Baccigalupi L, Huxham A, Smertenko A, Van PH, Ammendola S, Ricca E, and Cutting SM. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophylaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**: 5241-5247.
42. Hong E and Kim GH. 2006. Changes in vitamin U, amino acid and sugar levels in chinese cabbage during storage. *The Korean Society of Food Preservation*. **13**: 589-595.
43. Hong HA, Duc LH, and Cutting SM. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiology Reviews*. **29**: 813-835.

44. Hoover, DG and Harlander SK. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. pp. 23-39. In Hoover DG and Steenson LR edition. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press. San Diego, USA.
45. Hosono A and Tono-oka T. 1995. Binding of cholesterol with lactic acid bacteria cells. *Milchwissenschaft*. **50**: 556-560.
46. Hurtado A, Reguant C, Bordons A, and Rozés N. 2010. Evaluation of a single and combined inoculation of a *Lactobacillus pentosus* starter for processing *cv. Arbequina* natural green olives. *Food Microbiology*. **27**: 731-740.
47. Jain A and Mathur P. 2015. Evaluating hazards posed by additives in food: A review of studies adopting a risk assessment approach. *Current Research in Nutrition and Food Science*. **3**: 243-255.
48. Japan, Additives existing list item, the list item specified additives, food additives, the 8th edition book, fair, 2007
49. Jiang C, Shi J, Liu Y, and Zhu. 2014. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis*. *Food Control*. **35**: 41-48.
50. Joob B and Wiwanitkit. 2015. Food poisoning outbreak in Thailand: A review on situations. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. **5**: S187-S189.
51. Jung JY, Lee SH, and Jeon CO. 2014. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Application of Microbiology and Biotechnology*. **98**: 2385-2393.
52. Jung S, Lee YJ, Kim M, Kim J, Kwak JH, Lee JW, Ahn YT, Sim JH, and Lee JH. 2015. Supplementation with two probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, reduced body adiposity and Lp-PLA2 activity in overweight subjects. *Journal of Functional Food*. **19**: 744-752.
53. Kabaluk JT, Svircev AM, Goettel MS, and Woo SG. 2010. The use

- and regulation of microbial pesticides in representative jurisdictions worldwide. IOBC Global.
54. Kallel F, Driss D, Chaari F, Zouari-Ellouzi S, Chaabouni M, Chorbelle R, and Chaabouni SE. 2016. Statistical optimization of low-cost production of an acidic xylanase by *Bacillus mojavensis* UEB-FK: Its potential applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **5**: 1-10.
 55. Kang EJ, Jeong ST, Lim BS, and Jo JS. 1999. Quality changes in winter chinese cabbage with various storage methods. *Korean Journal of Postharvest Science Technology*. **6**: 173-178.
 56. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). English Version of Health Functional Food Acts and Subordinate Statutes, Notifications, etc.
 57. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Food and food additives production performance statistics. 2011.
 58. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Food and food additives production performance statistics. 2012.
 59. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Food and food additives production performance statistics. 2013.
 60. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Food and food additives production performance statistics. 2014.
 61. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Food poisoning food safety information portals statistics. <https://www.foodsafetykorea.go.kr/>
 62. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Food Sanitation Law. Details such as food labeling standards. 2009.
 63. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Korean Food Standards Codex.
 64. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). Search for Health Functional Food <https://www.foodsafetykorea.go.kr/>
 65. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). 2. Common standards and specifications for food ingredients Food General 2. Criterion 2)

- Food Ingredients criteria.
66. KFDA (Ministry of Food and Drug Safety). 2. Common standards and specifications for food ingredients Food General 10. General testing methods. 3. Microbiological test.
 67. Kilani-Feki O, Khedher SB, Dammak M, Kamoun A, Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M, and Tounsi S. 2016. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. *Biological Control*. **95**: 73-82.
 68. Kim BJ, Lee JH, Jang JC, Kim JH, and Han HG. 2003. *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**: 1123-1126.
 69. Kim M, Lee SJ, Seul KJ, Park YM, and Ghim SY. 2009. Characterization of antimicrobial substance produced by *Lactobacillus paraplantarum* KNUC25 isolated from kimchi. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. **37**: 24-32.
 70. Kimmel SA and Roberts RF. 1998. Development of a growth medium suitable for exopolysaccharide production by *Lactobacillus debruekii* ssp. *bulgaricus* RR. *International Journal of Food Microbiology*. **40**: 87-92.
 71. Ko SN, Kim WJ, and Choi HS. 2000. Effect of bacteriocin on some quality changes during fermentation of kimchi. *The Korean Journal of Food and Nutrition*. **13**: 83-87.
 72. Krutmann J. 2012. Pre- and probiotics for human skin. *Clinics in Plastic Surgery*. **39**: 59-64.
 73. Im KS, Jeong JW, Oh SJ, Moon YI, and Ko JH. 2015. Current Topic in Lactic Acid Bacteria and Probiotics. *International Journal of Oral Biology*. **3**: 46-53.
 74. Lawrence DT, Dobmerier SG, Bechter LK, and Holstege CP. 2007. Food Poisoning. *Emergency Medicine Clinics of North America*. **25**:

- 357-373.
75. Lee CH. 1997. Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. *Food Control*. **8**: 259-269.
 76. Lee KH, Jun KD, Kim WS, and Paik HD. 2001. Partial characterization of polyfermenticin SCD, a newly identified bacteriocin of *Bacillus polyfermenticus*. *Letter in Applied Microbiology*. **32**: 146-151.
 77. Lee KH, Kuack HS, Jung JW, Lee EJ, Jeong DM, Kang KY, Chae KI, Yun SH, Jang MR, Cho SD, Kim GH, and Oh JY. 2013. Comparison of the quality characteristics between spring cultivars of kimchi cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *The Korean Society of Food Preservation*. **20**: 182-190.
 78. Lee ME, Jang JY, Lee JH, Park HW, Choi HJ, and Kim TW. 2015. Starter cultures for kimchi fermentaton. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **25**: 559-568.
 79. Lee SH and Chang HC. 2016. Isolation of antifungal activity of *Leuconostoc mesenteroides* TA from kimchi and characterization of its antifungal compounds. *Food Science and Biotechnology*. **25**: 213-219.
 80. Lee SG. 2014. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* harboring anti-*Bacillus cereus* activity from Meju and purification of its antimicrobial compound. Chosun University. Gwangju, Korea.
 81. Lee SR. 1997. The fermented foods of Korea. Ewha Womans University Press, Seoul, Korea.
 82. Liew SL, Ariff AB, Raha AR, and Ho YW. 2005. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganisms, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. *International Journal of Food Microbiology*. **102**: 137-142.
 83. Lim JH, Jung JH, Kim DS, Kim YM, and Kim BM. 2014. Comparison of quality changes in brined cabbage with deep sea water salt and a

- commercial brined cabbage product. *The Korean Society of Food Preservation*. **21**: 676-687.
84. Liu SN, Han Y, and Zhou ZJ. 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*. **44**: 643-651.
85. Li Z, Sun Y, Yan X, and Meng F. 2010. Study on QSTR of benzoic acid compounds with MCI. *International Journal of Molecular Sciences*. **11**: 1228-1235.
86. Macedo MG, Lacroix C, Gardner NJ, and Champagne CP. 2002. Effect of medium supplementation on exopolysaccharide production by *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M in whey permeate. *International Dairy Journal*. **12**: 419-426.
87. Mac F. 1985. Media for isolation cultivation identification maintenance of medical bacteria, vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, Md. USA.
88. Marshall R. 1993. Standard Methods for the Examination of Dairy Products, 16th Ed., American Public Health Association, Washington, D.C. USA.
89. Marth EH. 1978. Standard methods for the examination of dairy products. 14th edition. American public health association. Washington, DC, USA
90. Manhar AK, Bashir Y, Saikia D, Nath D, Gupta K, Konwar BK, Kumar R, Namsa ND, and Mandal M. 2016. Cellulolytic potential of probiotic *Bacillus subtilis* AMS6 isolated from traditional fermented soybean (Churpi): An in-vitro study with regards to application as an animal feed additive. *Microbiological Research*. **186-187**: 62-70.
91. Minervini F, Angelis MD, Surico RF, Cagno RD, Gänzle M, and Gobbetti M. 2010. Highly efficient synthesis of exopolysaccharides by *Lactobacillus curvatus* DPPMA10 during growth in hydrolyzed wheat flour agar. *International Journal of Food Microbiology*. **141**: 130-135.
92. Min GC, Jeong HJ, Jeong SY, Kim JG, Son GM, and Kim EY. 2005. Food microbiology. Kwangmoonkag, Seoul, Korea.

93. Min TI. Development and market trend of probiotics and prebiotics. Ministry of Science and Technology, Korea Institute of Science and Technology Information
94. Moon SH, Chang HC, and Kim IC. 2013. Development of a novel medium with chinese cabbage extract and optimized fermentation condition for the cultivation of *Leuconostoc citreum* GR1. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **42**: 1125-1132.
95. Moon SH, Chang M, Kim HY, and Chang HC. 2014. *Pichia kudriavzevii* is the major yeast involved in film-formation, off-odor production, and texture-softening in over-ripened kimchi. *Food Science and Biotechnology*. **23**: 489-497.
96. Mukherjee AK, Adhikari H, and Rai SK. 2008. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid-state fermentation (SSF) condition using Imperata cylindrica grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation. *Biochemical Engineering Journal*. **37**: 353-361.
97. Mu W, Chen C, Li X, Zhang T, and Jiang B. 2009. Optimization of culture medium for the production of phenyllactic acid by *Lactobacillus* sp. SK007. *Bioresource Technology*. **100**: 1366-1370.
98. Naveena BJ, Altaf MD, Bhadriah K, and Reddy G. 2005. Selection of medium components by Plackett-Burman design for production of L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. *Bioresource Technology*. **96**: 485-490.
99. Oh SJ, Rheem SS, Sim JH, Kim SK, and Baek YJ. 1995. Optimizing conditions for the growth of *Lactobaillus casei* YIT 9018 in tryptone-yeast extract-glucose medium by using response surface methodology. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 3809-3814.
100. Orla-Jensen S. 1919. The lactic acid bacteria. host and son.

Copenhagen.

101. Pan M, Wu Q, Tao X, Wan C, Shah NP, and Wei H. 2015. Fermentation of *Allium chinense* bulbs with *Lactobacillus plantarum* ZDY 2013 shows enhanced biofunctionalities, and nutritional and chemical properties. *Journal of Food Science*. **80**: M2272-M2278.
102. Park KY, Jung HY, Woo KL, Jun KD, Kang JS, and Paik HD. 2002. Effects of *Bacillus polyfermenticus* SCD administration on fecal microflora and putrefactive metabolites in healthy adults. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **12**: 657-663.
103. Park SL, Park S, Jang J, Yang HJ, Moon SW, and Lee MK. 2013. Edible culture media from cereals and soybeans for pre-cultivation of lactic acid bacteria. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **42**: 991-995.
104. Park SM and Bae JH. 2015. Probiotics for weight loss: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition Research*. **35**: 566-575.
105. Prabakaran G and Balaraman. 2006. Development of a cost-effective medium for the large scale production of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *Biological Control*. **36**: 288-292.
106. Quinto EJ, Jiménez P, Caro I, Tejero J, Mateo J, and Girbès T. 2014. Probiotic lactic acid bacteria: A review. *Food and Nutrition Sciences*. **5**: 1765-1775.
107. Randazzo CL, Fava G, Tomaselli F, Romeo FV, Pennino G, Vitello E, and Caggia C. 2011. Effect of kaolin and copper based products and of starter cultures on green table olive fermentation. *Food Microbiology*. **28**: 910-919.
108. Randazzo CL, Todaro A, Pitino I, Corona O, Mazzaglia A, and Caggia C. 2014. Giarrappa and Grossa di Spagna naturally fermented table olives: Effect of starter and probiotic cultures on chemical, microbiological and sensory traits. *Food Research International*. **62**: 1154-1164.

109. Rao Y, Chang W, Xiang W, Li M, Che Z, and Tang J. 2013. Screening and performance of *Lactobacillus plantarum* E11 with bacteriocin-like substance secretion as fermentation starter of sichuan pickle. *Journal of Food Safety*. **33**: 445-452.
110. Reid G. 2016. Probiotics : definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. **30**: 17-25.
111. Rivas B, Moldes AB, Domínguez JM, and Parajó JC. 2004. Development of culture media containing spent yeast cells of *Debaryomyces hansenii* and corn steep liquor for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus*. *International Journal of Food Microbiology*. **97**: 93-98.
112. Rodríguez-Gómez F, Romero-Gil V, Bautista-Gallego J, García-García P, Garrido-Fernández A, and Arroyo-López FN. 2014. Production of potential probiotic Spanish-style green table olives at pilot plant scale using multifunctional starters. *Food Microbiology*. **44**: 278-287.
113. Ronald MA. 2006. The handbook of microbiological of Food. 2nd edition. CRC press. Taylor & Frances Group. Boca Raton. Fla. USA.
114. deMan J, Rogosa M, and Sharpe M. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. **23**: 130-135.
115. Ruiz-Barba JL and Jiménez-Díaz R. 2012. A novel *Lactobacillus pentosus*-paired starter culture for Spanish-style green olive fermentation. *Food Microbiology*. **30**: 253-259.
116. Ryu EH, Yang EJ, Woo ER, and Chang HC. 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*. **41**: 19-26.
117. Sanders ME, Morelli L, and Tompkins TA. 2006. Sporeformers as human probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Breicibacillus*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. **2**: 101-110.

118. Sathishkumar R, Ananthan G, and Arun J. 2015. Production, purification and characterization of alkaline protease by ascidian associated *Bacillus subtilis* GA CAS8 using agricultural wastes. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **4**: 214-220.
119. Sawatari Y, Hirano T, and Yokota A. 2006. Development of food grade media for the preparation of *Lactobacillus plantarum* starter culture. *Journal of General and Applied Microbiology*. **52**: 349-356.
120. SCAN. 1999. Assessment by the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) of a microorganism product: Neoferm BS-10[®]. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General. (SCAN) Scientific Committee on Animal Nutrition. Available from: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out28_en.pdf
121. SCAN. 2002. Opinion of the Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN) on the use of *Bacillus licheniformis* NCTC 13123 in feeding stuffs for pigs (product AlCare[™]). European Commission, Health and Consumer Protection Directorate General. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scan/out79_en.pdf
122. Scholz-Ahrens KE, Adolphi B, Rochat F, Barclay DV, Vrese MD, Açil Y, and Scherzenmeir J. 2016. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on mineral metabolism in ovariectomized rats - impact of bacterial mass, intestinal absorptive area and reduction of bone turn-over. *NFS Journal*. **3**: 41-50.
123. Seoul Yonhap News. 2005.03.15. Development of functional cosmetics "Lactic acid bacteria isolated from kimchi". <http://legacy.www.hani.co.kr/section-005000000/2005/03/005000000200503150648040.html>
124. Sheftel VO. 2000. Indirect food additives and polymers: migration and toxicology. Lewis, c2000, Boca Raton, London.
125. Siles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **70**: 331-345.

126. Simon MC. 2011. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiology*. **28**: 214-220.
127. Suma K, Misra MC, and Varadaraj MC. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International Journal of Food Microbiology*. **40**: 17-25.
128. Tahiri I, Desbiens M, Lacroix C, Kheadr E, and Fliss I. 2009. Growth of *Carnobacterium divergens* M35 and production of divergicin M35 in snow crab by-product, a natural-grade medium. *LWT-Food Science and Technology*. **42**: 624-632.
129. Tari C, Genckal H, and Tokatili. 2006. Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*. **41**: 659-665.
130. USA, FDA food additive status list, Food Chemical CODEX 7th edition, 2010
131. Vanessa FT, María Fernanda MB, and Krichnan S. 2016. Probiotics in dermatologic practice. *Nutrition*. **32**: 289-295.
132. Walker R. 1990. Toxicology of sorbic acid and sorbates. *Food Additives & Contaminants*. **7**: 671-676.
133. Wilson AR, Sigee D, and Epton HAS. 2005. Anti-bacterial activity of *Lactobacillus plantarum* strain SK1 against *Listeria monocytogenes* is due to lactic acid production. *Journal of Applied Microbiology*. **99**: 1516-1522.
134. Xu YG, Yu H, Zhang L, Liu M, Qiao XY, Cui W, Jiang YP, Wang L, Li YJ, and Tang LJ. 2016. Probiotic properties of genetically engineered *Lactobacillus plantarum* producing porcine lactoferrin used as feed additive for piglets. *Process Biochemistry*. **51**: 719-724.
135. Yang EJ and Chang HC. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* isolated from kimchi. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*. **36**: 276-284.

136. Yang EJ and Chang HC. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*. **139**: 56-63.
137. Yang SH, Choi MR, Kim JK, and Chung YG. 1992. Characteristics of the taste in traditional korean soybean paste. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **21**: 443-448.
138. Yoo JY and Kim HG. 1998. Characteristics of traditional Mejus of nation-wide collection. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **27**: 259-267.
139. Zhang J, Liu G, Li P, and Qu Y. 2010. Pentocin 31-1, a novel meat-borne bacteriocin and its application as biopreservative in chill-stored tray-packaged pork meat. *Food Control*. **21**: 198-202.
140. Zouari N and Jaoua S. 1999. Production and characterization of metalloproteases synthesized concomitantly with δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain grown on gruel-based media. *Enzyme and Microbial Technology*. **25**: 364-371.
141. Zhu Z, Zhang G, Luo Y, Ran W, and Shen Q. 2012. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. *Bioresource Technology*. **112**: 254-260.

감사의 글

진심으로 감사합니다. 저를 낳아주시고 건강하게 잘 키워주신 어머니, 아버지. 사랑합니다. 항상 사랑으로 희생으로 배려해주시고 애지중지 아껴주신 어머니, 아버지의 말씀에 따라 초심을 잃지 않겠습니다. 제 인생의 가장 큰 행복인 나의 여보. 곁에서 항상 돌봐주고 이해해주고 너무도 부족한 나를 한없이 감싸준 여보에게 진심으로 감사하고 사랑합니다. 그리고 시어머니, 시아버지. 저에게 진심어린 애정과 관심으로 사랑해주시고 보살펴주셔서 감사합니다. 사랑합니다. 철없고 드센 누나 곁에서 항상 조용히 누나 곁을 지켜줬던 동생에게 고마움을 전합니다.

저의 인생에 큰 나무가 되어주신 장혜춘 교수님. 진심으로 존경하고 사랑합니다. 부족한 저를 지도해주시고 끊임없는 배려와 사랑으로 저를 보듬어주시고 저의 손을 끝까지 잡아주신 이 은혜 절대 잊지 않을 것입니다. 바쁘신 가운데 심사위원장님을 맡아주신 이명렬 교수님 감사합니다. 논문을 심사해주시기 위해 없는 시간도 만드셔서 열과 성으로 심사해주신 목포대학교 김인철 교수님 감사합니다. 항상 따뜻하고 세심한 조언을 아끼지 않으셨던 이중헌 교수님 감사합니다. 부족한 저에게 너무도 큰 관심과 도움을 주신 이주민 교수님 감사합니다. 학부시절부터 대학원 과정 동안 많은 가르침을 주신 조선대학교 식품영양학과 노희경 교수님, 김경수 교수님, 김복희 교수님, 이재준 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

저에게 너무나도 소중한 실험실 식구들. 철없고 겁 없던 저를 받아주시고 감싸주셔서 감사합니다. 저의 멘토이자 실험실의 전설 양은주 박사님. 옆집이모처럼 챙겨주시고 걱정해주신 장지운 박사님. 제 마음의 벽을 깨주신 장미박사님. 철없는 저를 잡아주었던 정지혜 박사님. 엄마처럼 안아주신 이율 선배님. 임은정 선배님. 이선미 선배님. 최유리. 고선영. 류은혜. 윤해훈. 모두에게 감사의 마음을 전하고 싶습니다. 특히 제 뒷바라지해준 우리 실험실 동생들. 울고 웃고 정이 너무 많이 든 우리 슬기. 가장 많이 잔소리 들었을 우리 은지. 정 많고 눈물 많은 우리 선경이. 조용히 곁에서 응원해준 우리 혜란이. 고개 숙인 나를 토닥여준 우리 초롱이. 엉뚱함과 즐거움으로 웃음을 선사해준 우리 유빈이. 씩씩하고 어른스럽게 자리를 지켜주는 우리 소영이. 진심으로 사랑하고 고맙습니다.

꾸준히 제 자리에서 최선을 다하도록 하겠습니다.

모든 분들께 진심으로 감사드립니다.