



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](#)

2011年 2月

碩士學位 論文

숙성에 따른 상품김치의 미생물 군총
변화와 김치 유산균이 생산하는
항진균 물질의 김치산막효모 저해효과

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

崔有利

숙성에 따른 상품김치의 미생물 군총
변화와 김치 유산균이 생산하는
항진균 물질의 김치산막효모 저해효과

Microbiota profiles of manufactured-kimchi depending on
fermentation and growth inhibition of film-forming yeasts
by kimchi lactic acid bacteria

2011年 2月 25日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

崔有利

숙성에 따른 상품김치의 미생물 균총
변화와 김치 유산균이 생산하는
항진균 물질의 김치산막효모 저해효과

指導教授 張 海 春

이 論文을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함.

2010年 10月

朝 鮮 大 學 校 大 學 院

食 品 營 養 學 科

崔 有 利

崔有利의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 이명렬 印

委 員 조선대학교 교수 김복희 印

委 員 조선대학교 교수 장해춘 印

2010年 11月

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	VII
LIST OF TABLE	IV
LIST OF FIGURE	V

제 1 장 서 론	1
-----------------	---

제 2 장 실험 재료 및 방법	6
------------------------	---

제 1절 시판 김치의 발효 시간별 발효 특성과 미생물 균총 변화	6
--	---

1. 시료의 준비	6
-----------------	---

2. 일반 분석	6
----------------	---

1) pH 및 산도의 측정	6
----------------------	---

2) 염농도의 측정	7
------------------	---

3) 당도의 측정	7
-----------------	---

4) 색도의 측정	7
-----------------	---

5) 물성의 측정	7
-----------------	---

3. 미생물 균수의 측정	8
---------------------	---

1) 총균수의 측정	8
------------------	---

2) 유산균수의 측정	8
-------------------	---

3) 유산균 외 Gram-positive 세균수의 측정	8
--------------------------------------	---

4) 대장균 및 대장균군 Gram-negative 세균수의 측정	8
---	---

5) 효모수의 측정	9
------------------	---

4. 미생물의 분리 및 동정	9
-----------------------	---

제 2절 김치에서 <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 균주의 향진균 물질에 의한 김치 산막 효모 성장 저해 효과	11
1. 김치에서 산막효모의 분리	11
2. <i>Lb. plantarum</i> AF1 균주의 향진균 활성 측정	12
1) 사용한 균주	12
(1) 향진균 물질 생성균 <i>Lb. plantarum</i> AF1	12
(2) 감수성균	12
2) 조항균 물질의 준비	12
3) SPE (Solid Phase Extraction) 정제	13
4) 항균 활성 측정 방법	13
3. <i>Lb. plantarum</i> AF1 향진균 물질의 김치에의 적용	14
1) 김치 내 미생물 균수의 측정	14
(1) 유산균수의 측정	14
(2) 효모수의 측정	14
2) 김치 여액의 저장	14

제 3 장 결과 및 고찰 15

제 1절 시판 김치의 발효 시간별 발효 특성과 미생물 균총 변화 15

1. 일반 분석	15
1) pH 및 산도의 변화	15
2) 염농도	15
3) 당도	18
4) 색도의 변화	18
5) 물성의 변화	18

2. 미생물 균수의 변화	23
1) 총균수의 변화	23
2) 유산균수의 변화	23
3) 유산균 외 Gram-positive 세균수의 변화 및 동정 결과	24
4) 대장균 및 대장균군 Gram-negative 세균수의 변화 및 동정 결과	30
5) 효모수의 변화	30

제 2절 김치에서 <i>Lactobacillus plantarum</i> AF1 균주의 항진균물질에 의한 김치 산막 효모 성장 저해 효과	36
1. 김치에서 산막효모의 분리	36
2. <i>Lb. plantarum</i> AF1 균주의 항진균 활성	36
3. <i>Lb. plantarum</i> AF1 항진균 물질의 김치에의 적용	43
1) 김치 내 미생물 균수의 변화	43
(1) 유산균수의 변화	43
(2) 효모수의 변화	43
2) 김치 여액의 저장	47
제 4 장 결 론	49
제 5 장 참고문헌	51

LIST OF TABLE

Table 1. Bacteriocins vs. antibiotics	5
Table 2. Kimchi samples and relevant information	10
Table 3. Characteristic of the Kimchi fermentation of the grocery store	20
Table 4. Characteristic of the Kimchi fermentation of the small and medium enterprises	21
Table 5. Characteristic of the Kimchi fermentation of the large company	22
Table 6. List of detected strains from Kimchi	29

LIST OF FIGURE

Figure 1. Changes of pH of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C	16
Figure 2. Changes of Titratable acidity of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C	17
Figure 3. Changes of the total viable cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C	25
Figure 4. Changes of the lactic acid bacteria cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C	26
Figure 5. Detected lactic acid bacteria grown on MRS medium	27
Figure 6. Changes of the gram-positive bacteria cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C	28
Figure 7. Changes of the total coliforms & gram-negative cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C	32
Figure 8. Detected Coliform & gram-negative bacteria grown on Chromocult medium	33
Figure 9. Changes of the film-forming yeasts cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C	34
Figure 10. Detected film-forming yeasts grown on YPD medium	35
Figure 11. Film-forming yeasts on the surface of the kimchi	37

Figure 12. Isolation of film-forming yeast in Kimchi	38
Figure 13. Microscopic observation of the isolated strains	39
Figure 14. Antifungal activity of Supernatant from <i>Lb. plantarum</i> AF1	40
Figure 15. Antiyeast activity of Supernatant from <i>Lb. plantarum</i> AF1	41
Figure 16. Antiyeast activity of partially purified compounds from <i>Lb. plantarum</i> AF1 using solid phase extraction (SPE)	42
Figure 17. Changes of lactic acid bacteria cell number in kimchi containing partially purified compounds from <i>Lb. plantarum</i> AF1 using solid phase extraction (SPE)	45
Figure 18. Inhibition effect of partially purified compounds from <i>Lb. plantarum</i> AF1 using solid phase extraction (SPE) on the growth of film-forming yeast in kimchi	46
Figure 19. Storage of the kimchi juice during 5 days at 25°C	48

ABSTRACT

Microbiota profiles of manufactured-kimchi depending on fermentation and growth inhibition of film-forming yeasts by kimchi lactic acid bacteria

Choi, Yu Ri

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

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

Microbiota patterns of commercial kimchis were investigated. The three different commercial kimchis-grocery store kimchi, small and medium enterprises kimchi and large company kimchi-were used as samples, which were fermented at 10°C for 10days. pHs of all kimchi samples were decreased from 5.87 to 4.13 and their total acidities increased from 0.32% to 1.09% as the fermentation continued. The numbers of total viable cell and lactic acid bacteria were increased gradually during the fermentation. The number of Gram-positive bacteria existed consistently. The number of total coliforms decreased from day 4 and not detected from day 8-10 except grocery store kimchi. The numbers of film-forming yeast increased gradually during the fermentation. To inhibit the growth of film-forming yeast, the partially purified antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* AF1 were added to kimchi with concentration of 0, 1, 3, 5% (v/wt). The antifungal compounds were partially purified by solid phase extraction (C₁₈ SPE column). The growth of film-forming yeast in kimchi was decreased from log 3.82 CFU/ml to log 2.88 CFU/ml by addition of the 1% antifungal compounds through incubation at 25°C for 3days. The result suggest that *Lb. plantarum* AF1 can be used as biopreservative in the kimchi industry to prevent fungal growth.

제 1 장 서 론

유산균(lactic acid bacteria : LAB)은 자연계에 널리 분포하고 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 유제품, 육류, 야채 등의 다양한 발효 가공에 종균으로 사용되어지고 있으며, 식품의 보존성 향상뿐만 아니라 관능적 특성 및 영양적 가치에도 기여하고 있다. 식품에서 유산균에 의한 젖산발효는 상큼한 향과 맛을 내게 하고 나아가 당, 유기산, 단백질 및 지방성분을 이용하여 독특한 향과 풍미성분으로 전환시키어 제품의 질 향상에 바람직한 역할을 하게 한다(34). 유산균은 장내의 바람직한 미생물이고, 발효식품의 제조에 오래 전부터 사용되어 왔으며 보편적으로 안전한 GRAS (generally recognized as safe) 미생물로 인식되고 있다. 일반적으로 Gram 양성, 무아포, G+C 조성 50mol% 이하, 구균 혹은 간균 형태이고, 통성 혐기적 배양특성, 까다로운 영양 요구성, 내산성의 특징을 가진다(2). 유산균의 식품보존 효과는 유산균 발효에 있어서 pH 저하가 제 1요인이지만, 그 외에 유산균이 생산하는 다양한 증식 저해물질이 식품 오염균, 병원성균 또는 부패균의 생육을 억제 또는 저해하기 때문이다. 이들 증식 저해물질에는 젖산 등의 유기산(43), 과산화수소(6, 10), diacetyl(17), ammonia 및 저분자의 단백질성 물질인 박테리오신 등(26, 42)이 있으며, 이들 물질이 발효 식품중의 안정된 군총(microflora) 형성에 관여하고 있다(30, 23). 특히 김치발효 과정에 관여하는 유산균은 항균작용을 하는 여러 물질을 생산하는데, 유산과 단백질 분해효소에 의해 쉽게 분해되지만 안정성이 높은 bacteriocin과 H₂O₂ 및 diacetyl생성으로 인한 항균작용을 나타낸다(36). 또한 면역기능 강화(38), 혈중 cholesterol저하(19), 간 기능 항진작용(3), 항암작용(21), 항산화작용(22) 등의 다양한 건강 증진 기능이 보고되고 있다.

Bacteriocin은 많은 그람 양성, 그람 음성 세균에서 발견될 수 있지만(35), 유산균에 의해 생성되는 bacteriocin은 식품산업에서 천연보존제로서 적용 가능성 때문에 최근 몇 년간 특히 주목을 받아왔다(12). 유산균이 생산하는 bacteriocin에 대한 연구는 cheese starter 균주인 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*가 생산하는 nisin이 Mattick과 Hirsch(31)에 의하여 보고되면서부터 유산균 속으로 알려진 *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 및 *Carnobacterium* 속에서 많은 bacteriocin이 분리 및 보고되었다.

세균이 생산하는 항균 물질인 bacteriocin은 세포 외로 분비되는 peptide나 단백질로

써 생산균주와 근연관계의 미생물을 죽이거나 생육을 저해하는 물질이라 알려지고 있다(16, 35). Table 1에 정리된 바와 같이 기존의 항생제가 2차 대사산물인데 반하여 bacteriocin은 자신의 유전자로부터 직접 생합성되며, 단백질이나 peptide분자로 이루어져 인체의 소화기관 내의 단백질분해효소에 의해 분해됨으로써 인체에 무독성이고 잔류성이 없다는 특징(41, 45)이 있기 때문에 생물학적 보존제(biopreservative)로서 식품이나 사료에 적용될 수 있다.

유산균은 다양한 항균 물질들을 생산하며, 물질들 간에 복합적으로 작용하면서 항균 작용에서 상승효과를 나타낸다. 지금까지 유산균의 항균 작용과 항균 물질들은 대부분 항세균 작용에만 집중되어 왔으며 항진균 활성 유산균에 대한 보고는 많지 않다. 지금까지 보고된 유산균이 생산하는 항진균 활성 물질로는 유기산, H_2O_2 , diacetyl 등의 발효 대사산물, 단백질성 물질, reuterin, 지방산, phenyllactic acid, cyclic dipeptides 등의 저분자 물질들이 있다(18).

김치는 배추나 무를 주원료로 마늘, 생강, 파, 고춧가루, 젓갈 등 다양한 향신료를 첨가하여 일정기간 발효시킨 우리나라 고유의 발효식품이며, 이들 원료와 미생물의 작용에서 유래되는 성분이 잘 조화되어 고유의 맛을 나타내게 된다(36, 39). 최근에는 김치의 식이섬유소와 김치속의 재료인 마늘, 생강, 고추 등의 항돌연변이 활성이 알려져 대장암, 빈혈, 동맥경화 등을 예방할 수 있는 등(8, 25) 중요한 영양생리학적 작용에 대한 연구결과가 보고됨에 따라 우리나라 전통적인 고유의 식품에서 김치의 세계화라는 슬로건 아래 세계적인 식품으로 부각되고 있으며 국제적으로도 관심이 높아져 중요한 수출 품목이 되고 있다.

김치의 발효에 관여하는 젖산균은 크게 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Pediococcus*속, *Streptococcus*속 등의 유산균들을 포함하여 효모 등 200여종 이상으로 매우 다양하게 경시적으로 존재한다(14, 28). 김치발효에 관여하는 호기성 미생물로는 *Achromobacter butyri*, *Flavobacterium ferugineum*, *Flavobacterium fucatum*, *Bacillus megaterium* 등의 발견됨이 보고되었다(37). 김치 발효과정에 관여하는 유산균들의 경시적 변화에 의해 발효초기에는 *Leuconostoc*속 등과 같은 이상젖산균(heterofermentative lactic acid bacteria)의 번식에 의하여 발효가 시작되며 발효중기 이후 pH가 4.0 이하로 낮아지면 내산성이 강한 정상젖산균(homofermentative lactic acid bacteria)인 *Lactobacillus* 속 등이 빨리 증식하면서 많은 유기산을 생성하여 김치의 산패를 일으키며 효모에 의하여 이취가 나고 연부현상이 나타난다(20, 30).

김치의 산패와 연부현상은 소금에 의해 손상된 세포벽에서 이탈된 세포벽 다당류 분

해효소의 작용과 김치의 숙성과 관련된 미생물에 의한 세포벽 분해효소 작용(7) 외에 조직이나 미생물중 주로 효모류가 분비하는 펙틴 분해 효소인 pectinesterase와 polygalacturonase에 의해 세포벽과 펙틴물질이 분해되는 것으로 김치의 관능적 특성이 감소한다(13). 김치 발효중의 효모의 영향은 종류에 따라 alcohol 생성과 방향 및 풍미를 생성하는 경우도 있으나 막을 형성하고 젖산, alcohol을 산화 분해하여 젖산에 의해 억제되었던 산패균의 증식을 유발하게 되어 보존성에 악영향을 주는 것으로 알려져 있다(9).

최(9)에 의해 겨울 배추김치로부터 *Brettanomyces*속, *Candida*속, *Citeromyces*속, *Kluyveromyces*속, *Pichia*속, *Rhodotorula*속, *Saccharomyces*속, *Torulopsis*속이 분리 보고된바 있으며, 특히 *Candida*속, *Pichia*속, *Hansenula*속 같은 산막효모는 김치의 외관을 손상시킬 뿐만 아니라 젖산을 비롯한 유기산을 산화 분해하여 맛을 저하시키고 김치 조직의 연부현상을 가져오는 것으로 알려져 있다.

김치의 보존 기간을 연장하고 신선도를 오랫동안 유지하기 위하여 pH 저하를 억제시키는 목적으로 sodium malate buffer 등의 완충제(23)나 Na-acetate, Na-malate, K-sorbate, Na-benzoate와 같은 염 혼합물을 사용하거나(33, 40), sorbic acid(1) 등의 합성보존제 사용이 연구되었으나 최근에 합성보존제에 대한 안전성의 문제가 제기되면서 김치의 산패억제를 위하여 안전성에 문제가 없는 천연보존제의 사용에 관심이 집중되고 있으며, 식품과 사료에서 소비자들의 요구가 화학 첨가물이나 보존료를 지양하는 방향으로 향하고 있고, 대신 신선하고 천연 그대로이며 화학 보존료가 들어있지 않으면서 저장기간이 연장된 식품이 요구되고 있다(5). 생물학적보존(biopreservation)은 자연 균총과(또는) 그들의 항박테리아 생산물을 이용하여 식품의 저장기간을 연장하고 식품의 안전을 높이는 것을 말한다(32).

Lactobacillus plantarum AF1은 숙성된 김치로부터 분리된 김치유산균으로서, *Lb. plantarum* AF1의 항진균 활성 실험결과 식품 부패 곰팡이 및 병원성 곰팡이인 *A. ochraceus*, *A. fumigatus*, *C. gossypiiicola* 등에 강한 생육 저해 활성을 나타내었으며 항진균 활성 외에도 식중독 균주를 포함한 그람 양성 및 음성 세균들에 강한 저해 활성을 나타내는 *Lb. plantarum* AF1은 넓은 항미생물 활성 범위를 가지는 균주이다(44). *Lb. plantarum* AF1의 항진균 물질의 활성은 배양 20시간부터 최대 활성(3,200 AU/mL)을 나타내어 120시간까지 활성이 감소되지 않으며, 산성의 pH(pH 3.0~4.0)와 열에 안정한 물질이며, 단백분해효소 처리에 영향을 받지 않는 물질이며, 분자량 3,000 Da 미만의 물질이다(44).

본 연구는 김치가 다양한 유통망을 통하여 판매됨에 따라 시판 김치의 소비량이 늘어가는 추세이고, 세계적인 식품으로 부각되어 국제적으로 관심이 높아져 중요한 수출품목이 되고 있으므로, 이에 시판 김치의 발효 속성에 따른 일반 성분의 변화와 미생물 군총의 변화를 분석하여 시판김치의 위생 상태를 파악하고, 김치로부터 분리된 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물인 김치유산균 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항진균 물질을 김치에 처리하여 김치의 수송 및 유통과정 중 효모에 의해 발생하는 산패와 김치 연부현상을 억제할 수 있는 생물학적보존제(biopreservative)로서의 이용 가능성을 검토하기 위하여 실시하였다.

Table 1. Bacteriocins vs. antibiotics

Characteristic	Bacteriocins	Antibiotics
Application	Food	Clinical
Synthesis	Ribosomal	Secondary metabolite
Activity	Narrow spectrum	Varying spectrum
Host cell immunity	Yes	No
Mechanism of target cell	Usually adaptation affecting cell	Usually a genetically transferable
Resistance or tolerance	membrane composition	determinant affecting different sites depending the mode of action
Interaction requirements	Sometimes docking molecules	Specific target
Mode of action	Mostly pore formation, but in a few cases possibly cell wall targets biosynthesis	Cell membrane or intracellular
Toxicity/side effects	None known	Yes

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1 절. 시판김치의 발효시간별 발효특성과 미생물 군총 변화

1. 시료의 준비

본 연구에 사용한 김치는 시중에 판매되는 반찬마트 김치 1종류, 중소기업 김치 1종류 그리고 대기업 김치 1종류로 총 3종류를 시료로 사용하였다(Table 2).

제조회사별 시판김치는 당일 제조된 김치로서 구입해온 즉시 500 g씩 플라스틱용기 (1 L, Nalgene, U.S.A.)에 나누어 담아 10℃에서 10일간 발효시키며 2일 간격으로 pH, 산도, 염농도, 당농도, 색도, 물성 및 미생물 군총의 변화 양상을 분석하였다.

2. 일반 분석

1) pH 및 산도의 측정

김치의 pH 및 산도의 측정은 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액으로 pH와 산도를 측정하였다. pH는 pH meter(Corning, NY14831, U.S.A.)로 측정하였으며, 산도는 A.O.A.C방법에 의하여 김치여액 10 mL를 0.1N NaOH용액으로 pH 8.3이 될 때까지의 NaOH용액 소비량으로 정의하였으며, 이것을 아래 식에 의하여 젖산함량으로 환산하여 총산함량(%)으로 표시하였다.

$$\text{총산(\%)} = a \times f \times F \times 10$$

a : 0.1N NaOH용액의 소비 mL수

f : 0.1N NaOH용액의 factor (1.001)

F : 0.1N NaOH용액의 1 mL에 상당하는 유기산 계수 (젖산인 경우 0.009)

2) 염농도의 측정

김치의 염농도 측정은 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액으로 염도계 (ES-421, ATAGO, Japan)를 사용하여 김치의 염농도를 측정하였다.

3) 당도의 측정

김치의 당도 측정은 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액으로 당도계 (Digital probe refractometer, Misco, U.S.A.)를 사용하여 김치의 당농도를 측정하였다.

4) 색도의 측정

김치의 색도 측정은 김치를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액으로 색차계 (CM-3500d, KONICA MINOLTA, Japan)를 사용하여 3회 이상 반복 측정하였으며, Hunter system 에 의해서 L값(명도), a값(적색도), b값(황색도)으로 나타내었다.

5) 물성의 측정

김치의 물성 측정은 두께가 4-5 mm의 김치 줄기부분을 선별하여 3×3 cm의 크기로 자른 후, 물성분석기(TA-XT Plus, Stable Microsystem Co., Godalming, U.K)로 3회 이상 반복하여 측정하였다. 물성분석의 조작조건은 TPA program을 이용하여Pre-Test speed : 1.00 mm/sec, Test speed : 1.00 mm/sec, Post-test speed : 1.00 mm/sec, strain : 80%, Time : 2.00 sec, Trigger force : 1 kg로 하였고, Hardness(경도), Fracturability(부서짐성), Gumminess(겉성), Chewiness(씹힘성)으로 나타내었다.

2. 미생물 균수의 측정

1) 총균수의 측정

김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 PCA (Plate count agar, Difco Laboratories, U.S.A) 배지에 도말한 후 37℃에서 48시간 평판배양한 후 형성된 colony를 계수하였다.

2) 유산균수의 측정

김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe), CaCO₃가 2%(w/v) 첨가된 MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI., U.S.A) 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후 30℃에서 48시간 평판 배양한 후, 투명한을 형성한 colony를 그람염색 및 현미경(ECLIPSE 55i, NIKON, Japan)으로 관찰한 후 계수하였다.

3) 유산균 외 Gram-positive 세균수의 측정

김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 LB (Luria-Bertani) 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말하여 37℃에서 48시간 평판배양한 후 형성된 colony를 그람염색 및 현미경으로 관찰한 후 계수하였다.

4) 대장균 및 대장균군 Gram-negative 세균수의 측정

김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 Chromocult agar (Coliform Agar, Merck, Germany)에 도말하여 37℃에서 48시간 평판배양한 후 형성된 colony를 그람염색 및 현미경으로 관찰한 후 계수하였다.

5) 효모수의 측정

김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 YPD (yeast extract-peptone-dextrose) 한천 배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후 30℃에서 48시간 평판배양한 후 형성된 colony를 그람염색 및 현미경으로 관찰한 후 계수하였다.

3. 미생물의 분리 및 동정

김치의 발효 숙성 과정 중 나타나는 유산균 외 Gram-positive 세균과 대장균 및 대장균군 Gram-negative 세균의 분리 및 동정을 위하여 일차적으로 그람 염색 및 현미경 관찰을 통한 형태학적 특성을 조사하여 분리한 후 최종적인 동정을 위하여 분리균주의 16S rDNA 염기서열을 결정하여 이미 알려진 균주들과 비교하였다. 분리균주의 16S ribosomal DNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 분리균주의 Chromosomal DNA를 DNA 분리 Kit (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN Pte. Ltd., Germany)를 이용하여 분리한 후에 염기서열을 결정하였다. Ribosomal DNA sequence의 상동성 검사는 GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program(15)에 의해 실행하였다.

Table 2. Kimchi samples and relevant information

샘플명	제조사	품명	포장단위 및 포장재질	회사명	제조사 소재지	재료
A	반찬마트	배추김치	4kg 투명비닐	M사	광주	배추,고춧가루,무채,새우액젓,멸치액젓,마늘,생강,대파,당근,참쌀,소금 등
B	중소기업	후코이 김치	4kg 폴리에틸렌(PE)	(주) D사	광주	배추70%(국산),고춧가루(국산),무채,새우젓(국산),통고추(국산),백설탕,실과,마늘(국산),양파,멸치액젓(국산),멸치젓(국산),저당물엿,사과,대파,생강,배,홍갓,참쌀,복음깨,국멸치,당근,다시마추출다시액0.2%(후코이단함유)
C	대기업	포기김치	4.5kg 폴리에틸렌(PE)	(주) D사	강원도	절임배추68.1%[배추(국산),무(국산)],중부식김치양념[멸치액젓(국산),새우액젓(국산),순한다시마베이스(국산)],고춧가루(국산),마늘(국산),생강(국산),대파(국산),양파(국산),부추[또는갓](국산),류코노스톡DRC0211,김치전용폴,정제염(국산)

제 2 절 김치에서 *Lactobacillus plantarum* AF1 균주의 항진균 물질에 의한 김치산막효모 성장 저해 효과

1. 김치에서 산막효모의 분리

당일 제조된 김치를 반찬마트에서 구입해온 즉시 500 g씩 잘라 플라스틱용기(1 L, Nalgene, U.S.A.)에 담아 25℃에서 김치의 표면에 산막효모가 육안으로 관찰될 때까지 저장하였다. 산막효모는 25℃에서 3~5일 사이에 관찰되었으며, 산막효모가 낀 김치는 500 g 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치 여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 YPD 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말하여 30℃에서 48시간 평판배양하였다. YPD 고체배지에 형성된 colony를 그람 염색 및 Haemocytometer를 이용하여 현미경으로 생균 관찰 한 후 분리하였다.

분리 균주는 YPD 액체 배지에 접종하여 30℃에서 12시간동안 진탕배양 한 후에 25% (w/v) glycerol stock 으로 제조하여 -70℃에서 보관하였다. 실험에 사용할 경우에는 5 mL YPD 액체배지에 1%를 접종하여 30℃에서 12시간 진탕배양 한 후에 본배양 할 배지에 1%을 접종하여 사용하였다.

2. *Lb. plantarum* AF1 균주의 항진균 활성 측정

1) 사용한 균주

(1) 항진균 물질 생성균 *Lb. plantarum* AF1

Lb. plantarum AF1은 5 mL MRS 액체배지에 1%를 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치하면서 전배양 한 후 100 mL MRS 액체배지에 1%의 전배양액을 접종하여 30℃에서 24시간 동안 본배양하여 준비하였다.

(2) 감수성균

항진균 활성 실험을 위하여 지시균으로 사용한 곰팡이는 다음과 같이 준비하였다. *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918를 MEA (malt extract agar, Difco Laboratories, U.S.A.)배지에 접종하여 30℃에서 3~4일 동안 배양한 후 MEA 배지 20 mL를 멸균하여 식힌 후에 곰팡이 포자를 5×10^4 cfu/mL로 첨가하여 petri dish에 부은 후에 균으면 실험에 사용하였으며, 샘플 A로부터 분리된 효모 2종 (GY1, GY2)는 YPD 액체배지에 1%를 접종하여 30℃에서 하룻밤 진탕배양 한 후 YPD 고체배지에 1×10^6 cfu/plate로 도말하여 준비하였다.

2) 조항균 물질의 준비

본 실험에 사용된 항균 물질은 다음의 방법에 의하여 준비하였다. *Lb. plantarum* AF1을 5 mL MRS 액체 배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치하면서 전배양 한 후 100 mL MRS 액체 배지에 1%의 전배양액을 접종하고, 다시 30℃에서 24시간 동안 본배양하였다. 본배양액을 원심분리 ($9,500 \times g$, 15 min, 4℃)하여 얻은 상정액을 0.45 μ m membrane filter (Advantec MFS, Inc., Japan)로 제균하였다. 제균된 상정액을 동결건조 (Freeze dry system, SFDSM12, Samwon, Co., Korea)한 후에 20 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충액에 녹여 항균 활성 실험에 사용하였다.

4) SPE (solid phase extraction) 정제

항진균 물질을 얻기 위하여 SPE 정제를 시행하였다. *Lb. plantarum* AF1를 2.5 L MRS 액체 배지에 1%를 접종하여 30℃, 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 원심분리 (9,500 × g, 15 min, 4℃)하여 얻은 상정액을 0.45 µm membrane filter로 제균하여 준비하였다. SPE column (Isolute, C₁₈ EC, 10g; International Sorbent Technology Ltd., Hengoed, United Kingdom)은 methanol 200 mL로 활성화시킨 후에 10 mM sodium acetate (pH 4.0) 완충액 200 mL을 흘려 equilibration 상태로 준비하였다. 제균된 상정액 2.5 L을 SPE column에 통과시킨 후에 5% aqueous acetonitrile (HPLC-grade, Fisher Scientific, Fair Lawn, Njm U.S.A.)로 column을 세척하고 95% aqueous acetonitrile로 항진균 활성이 나타난 35-40 mL를 수집하였다. 그 후 진공원심농축기 (VS-802, Vision, Korea)를 이용하여 용매를 휘발시킨 후에 10 mM sodium acetate(pH 4.0) 5 mL에 녹여 사용하였다.

5) 항균 활성 측정 방법

항균 활성은 paper disk method(24)를 사용하여 측정하였다. 효모가 도말된 평판배지 위에 직경 8 mm의 paper disk (Advantec, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 놓고 항균 물질을 0.1 mL씩 일정하게 가하여 지시균에 대한 생육 저해 활성을 측정하였다. 생육 저지환은 digimatic caliper (CD-15CPX, Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 지름을 측정하였다.

3. *Lb. plantarum* AF1 항진균 물질의 김치에의 적용

본 실험에 사용된 김치는 샘플 A로 당일 제조된 김치를 구입하여 사용하였다. *Lb. plantarum* AF1 배양상징액의 SPE 정제물을 4×4 cm로 자른 배추김치 500 g에 0, 1, 3, 5% (v/wt)를 첨가하여 고르게 잘 섞일 수 있도록 혼합한 후 멸균된 저장용기 (1.8 L, Lock&Lock, Korea)에 넣은 후 김치산패 억제효과에 대한 신속한 결과를 얻기 위하여 25℃ incubator에서 3일 동안 김치의 표면에 산막효모가 나타날 때까지 저장하였다.

1) 김치 내 미생물 군수의 측정

(1) 유산균수의 측정

김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 MRS, CaCO₃가 2%(w/v) 첨가된 MRS 한천 배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후 30℃에서 48시간 평판 배양한 후 투명환을 나타내며 집락을 형성한 colony를 그람염색 및 현미경으로 관찰한 후 계수하였다.

(2) 효모수의 측정

김치 내용물 전체를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에 0.1 mL를 취하여 YPD (yeast extract-peptone-dextrose) 한천 배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후 30℃에서 48시간 평판배양한 후 형성된 colony를 현미경으로 관찰한 후 계수하였다.

2) 김치 여액의 저장

Lb. plantarum AF1 균주의 SPE 정제물 0, 1, 3, 5%(v/wt)를 김치에 첨가하여 25℃에서 3일 동안 김치의 표면에 산막효모가 나타날 때까지 저장한 김치를 마쇄하여 얻은 여액을 다시 25℃에서 7일 동안 저장하면서 상태를 관찰하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절. 시판김치의 발효시간별 발효특성과 미생물 군총 변화

1. 일반 분석

1) pH 및 산도의 변화

제조회사별 시판 김치를 10℃에서 저장하면서 김치의 pH의 변화를 Fig. 1에 나타내었다. 샘플 C (대기업 김치)의 경우 구입당일 pH는 5.96으로 가장 높았고 샘플 A (동네 반찬마트 김치)와 샘플 B (중소기업 김치)의 pH는 각각 5.84와 5.82로 비슷한 수치를 보였다.

각 김치는 10℃에서 발효가 진행되는 동안 모두 pH가 감소되었으며, 구입당일부터 10℃에서 숙성 4일까지 급격히 감소하였고 그 후로는 완만하게 감소되었다.

샘플 A는 10℃에서 숙성 10일째에 4.23으로 가장 높은 pH를 나타내었고, 샘플 B와 샘플 C는 10℃에서 숙성 10일째에 4.08까지 감소하였다.

시판 김치의 제조회사별 10℃에서 숙성하는 과정 중 산도의 변화는 Fig. 2에 나타내었다. 구입 당일의 산도는 샘플 C가 0.27%로 가장 낮았고 샘플 A는 0.36%으로 가장 높았다. 샘플 A는 숙성 10일에 1.12%으로 가장 높은 산도를 나타내었고 샘플 C는 1.04%으로 가장 낮은 산도를 나타내었다. 이러한 pH의 변화는 젖산균의 증가와 관련되는 것으로 보여진다.

2) 염농도

제조회사별 시판 김치의 염농도 측정 결과 샘플 A, 샘플 B 그리고 샘플 C의 염농도는 각각 2.62~2.86%, 2.78~3.10%, 2.55~2.76%을 나타내었다. 샘플 B의 염농도는 시판 김치 중에서 가장 높은 수치를 나타내었다(Table 3~5).

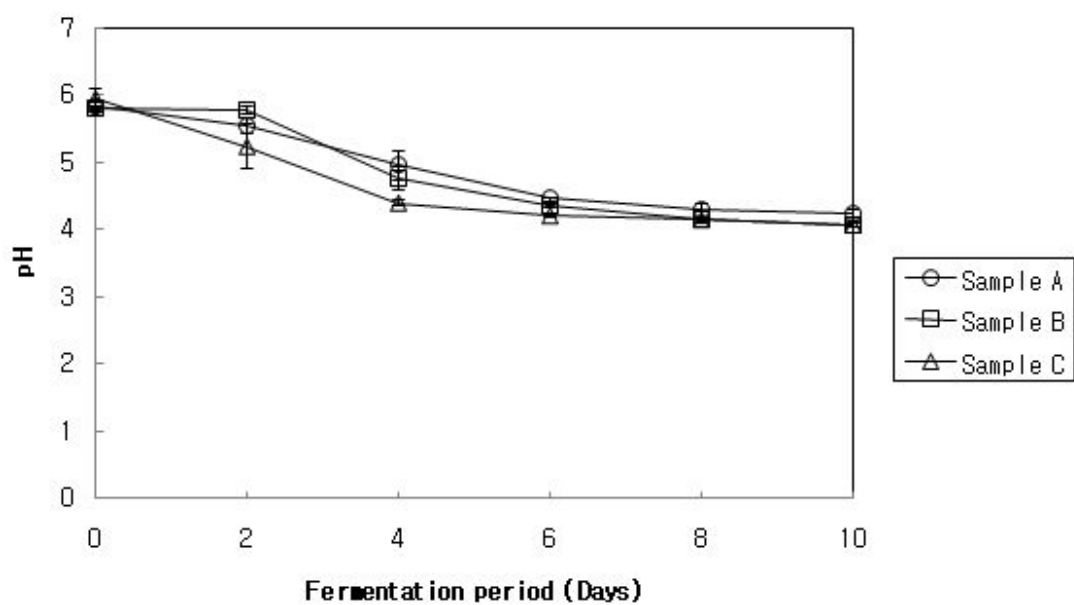


Figure 1. Changes of pH of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C.

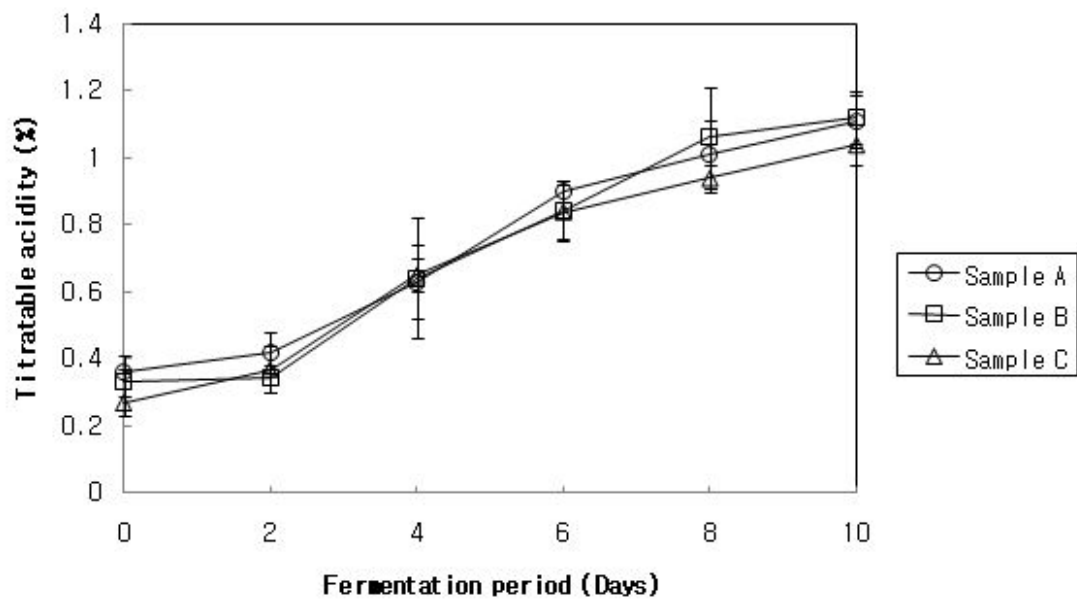


Figure 2. Changes of titratable acidity of the commercial kimchi during fermentation at 10°C.

3) 당도

제조회사별 시판 김치의 당도를 측정한 결과 샘플 A, 샘플 B 그리고 샘플 C의 당도는 각각 13.42~16.25 brix , 10.63~13.38 brix, 12.50~14.17 brix를 나타내었다(Table 3~5).

4) 색도의 변화

제조회사별 시판 김치의 색도 측정 결과는 Table 3~5와 같다. 김치여액의 밝고 어두운 정도를 나타내는 L값은 샘플 A, 샘플 B, 샘플 C 모두 10℃에서 저장 10일 동안 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었다.

김치 국물의 붉은 정도를 나타내는 a값은 샘플 A의 경우 제조 당일 24.56의 가장 낮은 값을 나타내었고 숙성 기간 동안 조금씩 증가하여 숙성 10일째에 32.24의 증가된 값을 나타내었다. 샘플 B의 경우 제조 당일 32.46의 값을 나타낸 후 숙성 기간 동안 점차적으로 증가하여 숙성 10일에 36.82의 가장 높은 a값을 나타내었다. 샘플 C의 경우 제조 당일부터 숙성 10일까지 a값이 조금씩의 증가와 감소를 보였지만 큰 차이를 나타내지는 않았고 숙성 10일에 31.30의 가장 낮은 값을 나타내어 붉은 정도가 가장 약하게 평가되었다. 김치 여액의 노란정도를 나타내는 b값은 샘플 A를 제외한 샘플 B와 샘플 C의 김치여액은 10℃에서 저장 10일 동안 증가하는 경향을 나타내었다. 샘플 B의 b값은 제조 당일 38.75의 값을 나타내었고 저장 2일부터 값이 증가하여 숙성 10일째에 51.34의 증가된 값을 나타내었고, 샘플 C의 김치여액의 b값은 제조 당일 44.43의 값을 나타내었고 그 후 점차적으로 증가하여 숙성 10일째에는 49.58의 증가된 값을 나타내었다. 김치의 숙성이 진행될수록 황색도의 증가와 고형분의 분해로 인한 투명도의 증가로 L, b값이 증가한다고 하였는데(26), 본 실험 또한 같은 결과를 나타내었다.

5) 물성의 변화

제조회사별 시판 김치의 줄기를 물성분석기를 이용하여 물성을 측정한 결과는 Table 3~5에 나타내었다. 김치의 경도를 나타내는 Hardness는 샘플 B의 경우 제조 당일 2243.371의 수치를 나타내었지만 10℃에서 저장 10일 동안 점차 감소하여

1890.337의 수치를 나타내었으며, 샘플 C도 마찬가지로 제조 당일 2235.223의 수치를 나타내었지만 10℃에서 저장 10일 동안 점차 감소하여 1836.614의 수치를 나타내었다. 하지만 샘플 A의 경우 제조 당일부터 10℃에서 저장 10일 동안 일정하지 않은 수치를 보였다. 나머지 Fracturability, Gumminess, Chewiness는 저장 기간과는 상관없이 일정하지 않은 수치를 나타내었다.

Table 3. Characteristic of the Kimchi manufactured by Sample A

Period(days)		0	2	4	6	8	10
Salinity (%)		2.86±0.39	2.68±0.23	2.62±0.16	2.81±0.25	2.71±0.12	2.65±0.34
Sugar contents (brix)		13.42±2.18	16.25±3.47	14.58±3.83	15.67±2.13	16.25±1.95	14.75±1.09
Chromaticity	L	30.87±0.27	31.84±0.13	32.79±0.03	33.22±0.46	34.41±0.41	35.12±0.40
	a	24.56±0.23	29.06±0.19	31.66±0.02	27.45±0.37	30.76±0.41	32.24±0.41
	b	41.95±1.30	42.99±1.18	47.20±0.07	37.54±1.70	40.80±1.77	41.67±1.78
Texture	Hardness	2118.905±40.898	2172.321±29.522	2329.521±331.830	3018.384±294.236	2739.253±417.129	2593.148±722.207
	Fracturability	2058.949±547.433	1904.652±397.749	2106.157±121.276	3294.393±871.263	2299.175±153.593	2898.253±334.480
	Gumminess	231.020±27.478	220.315±35.550	225.265±51.884	311.404±24.947	281.485±50.082	271.746±75.273
	Chewiness	224.446±24.864	217.555±38.550	267.393±81.993	308.537±21.680	256.885±56.499	273.379±67.294

Table 4. Characteristic of the Kimchi manufactured by Sample B

Period(days)		0	2	4	6	8	10
Salinity (%)		3.00±0.29	2.78±0.04	2.78±0.08	3.10±0.00	2.81±0.06	2.96±0.49
Sugar contents (brix)		12.88±1.59	13.38±3.01	12.38±1.24	12.13±1.59	12.88±0.53	10.63±1.24
Chromaticity	L	31.16±0.44	31.75±0.04	32.66±0.03	34.06±0.04	33.93±0.04	35.00±0.03
	a	32.46±0.60	33.32±0.02	34.59±0.01	35.20±0.01	36.06±0.02	36.82±0.03
	b	38.75±2.22	49.97±0.05	48.25±0.01	49.92±0.06	50.15±0.08	51.34±0.05
Texture	Hardness	2243.371±456.620	2135.997±345.887	2028.751±391.335	2046.036±486.845	1987.789±388.513	1890.337±157.654
	Fracturability	2430.677±423.404	1978.201±310.498	2620.959±379.372	2566.624±310.475	1980.148±436.279	1914.608±210.567
	Gumminess	225.883±41.976	246.559±30.574	235.978±44.273	256.358±84.021	243.588±65.848	219.308±75.659
	Chewiness	202.744±61.469	247.680±29.450	237.231±49.949	261.885±78.683	232.165±70.102	215.425±64.744

Table 5. Characteristic of the Kimchi manufactured by Sample C

Period(days)		0	2	4	6	8	10
Salinity (%)		2.70±0.19	2.69±0.23	2.60±0.16	2.55±0.19	2.71±0.34	2.76±0.28
Sugar contents (brix)		12.50±0.66	13.25±0.66	13.83±2.01	14.08±2.18	14.17±2.50	13.17±1.44
Chromaticity	L	30.05±0.03	29.49±0.0	33.06±0.11	32.57±0.01	33.98±0.04	34.32±0.04
	a	31.28±0.0	27.79±0.02	32.08±0.18	32.25±0.01	30.68±0.05	31.30±0.07
	b	44.43±0.08	42.40±0.03	47.74±0.36	47.57±0.04	48.79±0.05	49.58±0.18
Texture	Hardness	2235.223±158.456	2156.028±40.135	2077.612±594.601	1827.375±155.630	1765.491±201.890	1836.614±186.508
	Fracturability	2201.421±253.125	2121.146±466.656	1688.379±710.925	1774.198±170.671	1887.536±356.715	1799.950±237.327
	Gumminess	245.687±32.152	215.752±13.235	268.174±44.304	189.608±28.166	174.197±98.595	170.385±30.235
	Chewiness	236.354±29.452	212.455±12.027	253.237±29.726	201.461±41.881	185.118±14.255	176.777±91.241

2. 미생물 군수의 변화

1) 총 군수의 변화

제조회사별 시판 김치를 10℃에서 10일간 저장하는 동안 김치 내 총 군수의 변화는 Fig. 3에 나타내었다.

샘플 A의 총 군수는 제조 당일 3.7×10^5 cfu/mL가 검출되었고, 10℃에서 숙성 2일과 4일에는 각각 6.2×10^5 cfu/mL와 3.2×10^8 cfu/mL가 검출되어 숙성 2일부터 4일 사이 가장 급격하게 증가함을 보였으며, 숙성 6일에는 최고 군수인 9.58×10^8 cfu/mL에 도달한 후 서서히 감소하여 숙성 10일에는 4.87×10^8 cfu/mL가 검출되었다. 샘플 B의 총 군수는 제조 당일 8.55×10^5 cfu/mL가 검출되었고, 10℃에서 숙성 4일에는 수가 매우 급격히 증가하여 7.25×10^8 cfu/mL가 검출되었으며, 숙성 8일에는 최고 군수인 1.3×10^9 cfu/mL에 도달한 후 숙성 10일에는 6.78×10^8 cfu/mL의 감소된 수치를 나타내었다. 샘플 C의 총 군수는 제조 당일 8.9×10^6 cfu/mL가 검출되었고, 10℃에서 숙성 2일까지 수가 급격히 증가하여 2.48×10^8 cfu/mL가 검출이 되었다. 그 후에는 서서히 증가하여 숙성 6일에 최고 군수인 8.68×10^8 cfu/mL에 도달한 후 서서히 감소하여 숙성 10일에는 6.65×10^8 cfu/mL가 검출되었다. 김치의 숙성 중 총 군수의 증가는 여러 가지 복합 군총에 의한 것으로 보여진다.

2) 유산균 수의 변화

제조회사별 시판 김치를 10℃에서 10일간 저장하는 동안 김치 내 유산균 수의 변화를 Fig. 4에 나타내었다. MRS, CaCO_3 가 2%(w/v) 첨가된 MRS 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도달한 후 30℃에서 48시간 평판 배양한 후 투명환을 나타내며 집락을 형성한 colony를 계수하였다(Fig. 5).

샘플 A의 경우 제조 당일에는 6.90×10^5 cfu/mL가 검출되었고, 10℃에서 숙성 2일까지 서서히 증가하여 4.51×10^6 cfu/mL가 검출되었으며, 그 후 숙성 4일까지 급격히 증가하여 8.72×10^7 cfu/mL에 도달한 후 숙성 6일부터 10일까지 $3.43 \sim 3.45 \times 10^8$ cfu/mL로 비슷한 수치로 유지됨을 나타내었다. 샘플 B는 제조 당일에는 3종류의 시판김치 중 가장 낮은 군수인 6.0×10^4 cfu/mL가 검출되었고, 숙성 2~4일에 걸쳐 급격히 수가 증가

하여 숙성 4일에는 4.18×10^8 cfu/mL가 검출된 후 숙성 8일에 최고 균수인 7.18×10^8 cfu/mL에 도달하여 8일부터 그 수가 감소하였다. 샘플 C는 제조 당일부터 유산균 수가 8.90×10^6 cfu/mL로 3종류의 시판김치 중 가장 높은 수를 보였으며, 10°C에서 숙성 2일까지 급격히 증가하여 7.05×10^7 cfu/mL이 검출된 후, 숙성 6일째에 최고 균수인 6.43×10^8 cfu/mL에 도달한 후에는 감소하는 경향을 보였다. 샘플 B가 제조 당일부터 2일까지 가장 낮은 유산균 수를 나타내었지만 숙성 6일부터 10일까지 가장 높은 유산균 수를 나타내었다. 앞에서 배추김치의 숙성 2일째부터 pH가 급격히 감소하고 동시에 산도가 급격히 증가한 것은 이러한 결과를 뒷받침하는 것으로 보여진다.

3) 유산균 외 Gram-positive 세균수의 변화 및 동정 결과

김치에 존재하는 Gram-positive 세균의 분리 및 동정을 위하여 LB media에서 자란 colony를 일차적으로 그람 염색 및 현미경 관찰을 통한 형태학적 특성을 조사하여 그람 양성인 colony를 분리한 후 계수하였고, 16S rDNA 염기서열을 결정하여 GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 이미 알려진 균주들과 비교하여 동정하였다.

제조회사별 시판 김치를 10°C에서 10일간 저장하는 동안 김치 내 유산균 외 Gram-positive 세균수의 변화는 Fig. 6에 나타내었다. 샘플 A의 경우 제조 당일과 10°C에서 숙성 2일에 각각 1.48×10^6 cfu/mL와 1.22×10^6 cfu/mL로 가장 높은 수가 검출된 후 숙성 4일부터 점차 감소하여 숙성 10일에는 2.61×10^5 cfu/mL가 검출되었다. 샘플 B에서 3종류의 시판김치 중 가장 높은 수의 유산균 외 Gram-positive 세균수가 검출되었다. 제조 당일과 10°C에서 숙성 2일에 각각 7.28×10^5 cfu/mL와 9.8×10^5 cfu/mL가 검출되었으며, 숙성 4일에 최고 균수인 6.83×10^6 cfu/mL가 검출되었다. 샘플 C에서 3종류의 시판김치 중 가장 낮은 수의 유산균 외 Gram-positive 세균수가 검출되었다. 제조 당일 4.1×10^4 cfu/mL이 검출되었으며, 10°C에서 숙성 10일 동안 큰 변화 없이 약 10^4 cfu/mL의 수가 검출이 되었다.

제조회사별 시료에 상관없이 김치에 존재하는 Gram-positive 세균은 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* 의 4종이 분리 및 동정이 되었다(Table 6).

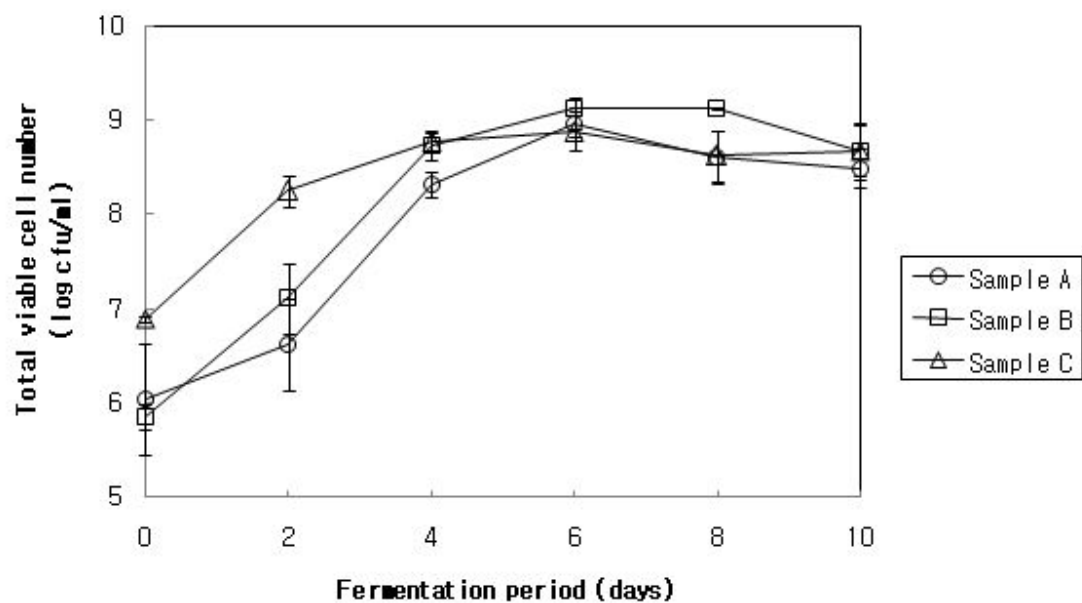


Figure 3. Changes of the total viable cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C.

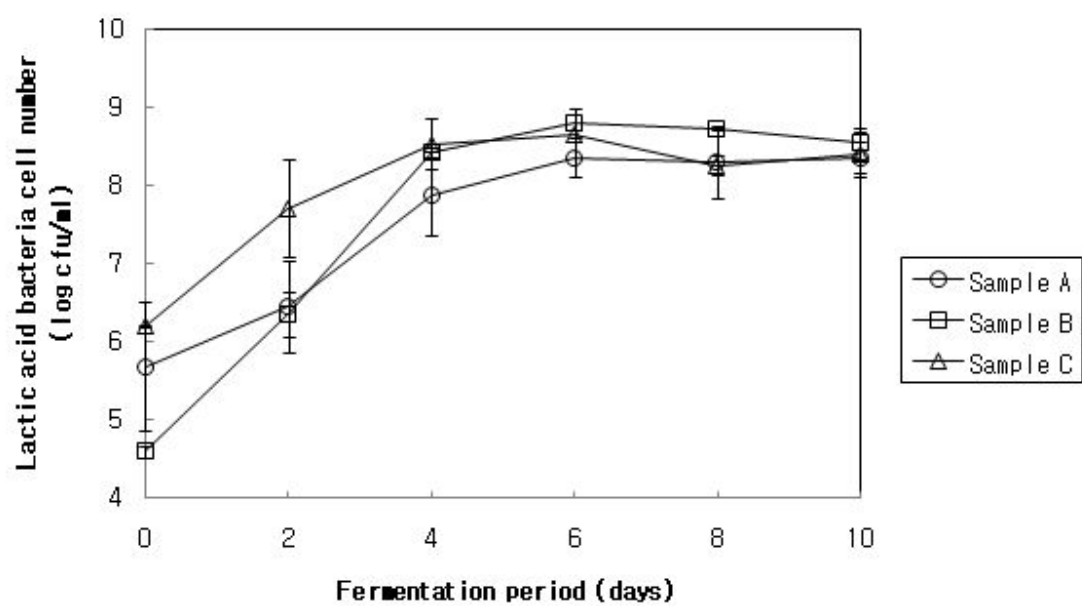


Figure 4. Changes of the lactic acid bacteria cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C.

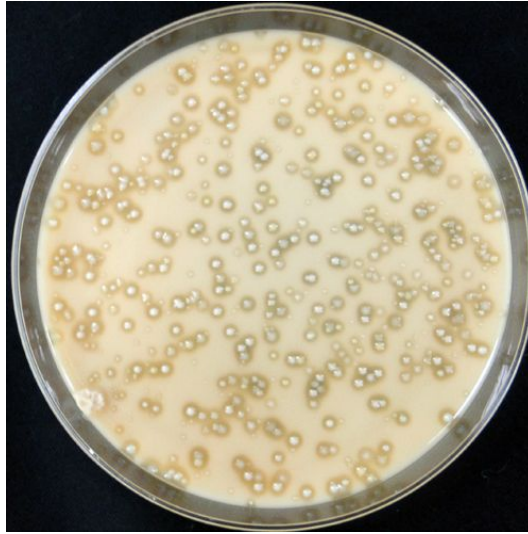


Figure 5. Detected lactic acid bacteria grown on MRS medium.

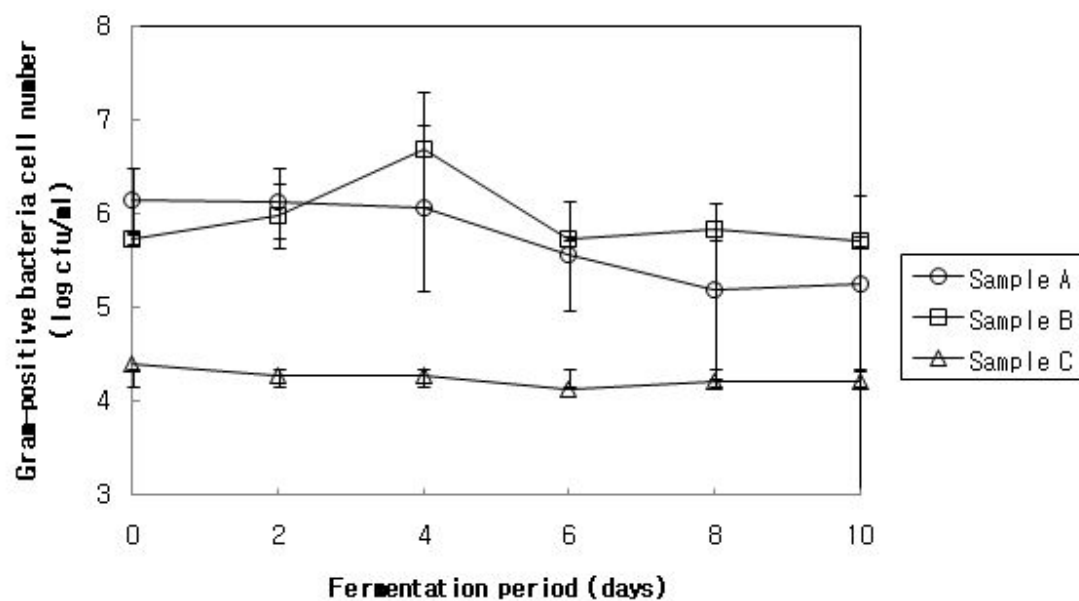


Figure 6. Changes of the gram-positive bacteria cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C.

Table 6. List of Detected strains from Kimchi

Class	Strains
Gram(+) bacteria	<i>Bacillus licheniformis</i>
	<i>Bacillus subtilis</i>
	<i>Bacillus altitudinis</i>
	<i>Bacillus pumilus</i>
Total coliforms & Gram(-) bacteria	<i>Spingomonas SP.</i>
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Rahnella aquatilis</i>
	<i>Enterobacter amnigenus</i>

4) 대장균 및 대장균군 Gram-negative 세균수의 변화 및 동정 결과

김치에 존재하는 Gram-negative 세균의 분리 및 동정을 위하여 일차적으로 Chromocult agar에서 자란 colony를 그람 염색 및 현미경 관찰을 통한 형태학적 특성을 조사하여 분리한 후 계수하였고, 16S rDNA 염기서열을 결정하여 GenBank database에 등록된 정보를 대상으로 이미 알려진 균주들과 비교하여 동정하였다.

제조회사별 시판 김치를 10℃에서 10일간 저장하는 동안 김치 내 대장균 및 대장균군 Gram-negative 세균수의 변화는 Fig. 7에 나타내었다. 제조 당일에는 샘플 A에서 6.69×10^5 cfu/mL의 가장 많은 수가 검출되었고, 샘플 B와 샘플 C에서는 각각 5.24×10^4 cfu/mL, 4.45×10^4 cfu/mL로 비슷한 수가 검출이 되었다.

샘플 A는 10℃에서 숙성 4일째에 최고 균수인 8.37×10^5 cfu/mL에 도달한 후 6일까지 급격히 감소하여 7.44×10^4 cfu/mL의 수가 검출되어 10일까지 비슷한 수치가 유지되는 경향을 나타내었다. 샘플 B는 10℃에서 숙성 4일까지 완만히 증가하여 최고 균수인 2.95×10^5 cfu/mL에 도달한 후 매우 급격히 감소하여 숙성 8일째부터 검출이 되지 않았다. 샘플 C는 제조 당일에 최고 균수인 4.45×10^4 cfu/mL가 검출된 후 6일까지 점진적으로 감소하여 6.88×10^3 cfu/mL의 수치를 나타내었고 8일까지 급격히 감소하여 숙성 10일째는 검출되지 않았다. 이와 같은 결과는 김치의 숙성 중 유산균의 수가 증가함에 따라 pH의 감소, 산도의 증가로 인해 일어나는 발효현상에 의하여 대장균군의 생육이 억제되는 것으로 판단되어 진다.

제조회사별 시료에 상관없이 김치에 존재하는 Gram-negative 의 세균은 *Spingomonas* SP., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Rahnella aquatilis*, *Enterobacter amnigenus* 의 5종의 균이 분리 및 동정되었다(Fig. 8)

5) 효모수의 변화

제조회사별 시판 김치를 10℃에서 10일간 저장하는 동안 김치 내 효모수의 변화는 Fig. 9에 나타내었다. YPD 한천배지(1.5% agar, w/v)에서 자란 colony를 현미경으로 관찰하여 효모임을 확인한 후 계수하였다(Fig. 10).

샘플 A의 효모수는 제조 당일에 3.7×10^1 cfu/mL로 3 군데의 시판 김치 중 가장 높은 수가 검출되었으며 10℃에서 숙성 전 기간에 걸쳐서 계속 증가하여 숙성 10일째에

최고 균수인 5.24×10^5 cfu/mL의 수가 검출 되었다. 샘플 B의 경우 제조 당일에는 효모가 검출되지 않았으나, 10℃에서 숙성 2일에 7.95×10^1 cfu/mL이 검출된 후 급격히 증가하여 숙성 10일에 4.65×10^5 cfu/mL의 가장 높은 수가 검출되었다. 샘플 C는 제조 당일에 0.75×10^1 cfu/mL의 효모수가 검출되었고, 10℃에서 숙성 6일까지 비슷한 수준으로 검출이 되다가 8일에 2.25×10^2 cfu/mL으로 조금 증가 하였다가 숙성 10일에 다시 1.5×10^1 cfu/mL의 감소된 수치를 나타내었다.

이는 김치 발효과정 중에 유산균이 젖산을 생산함에 따른 pH의 감소와 산도의 증가도 효모의 생육을 억제시키지 못하는 것으로 보여진다.

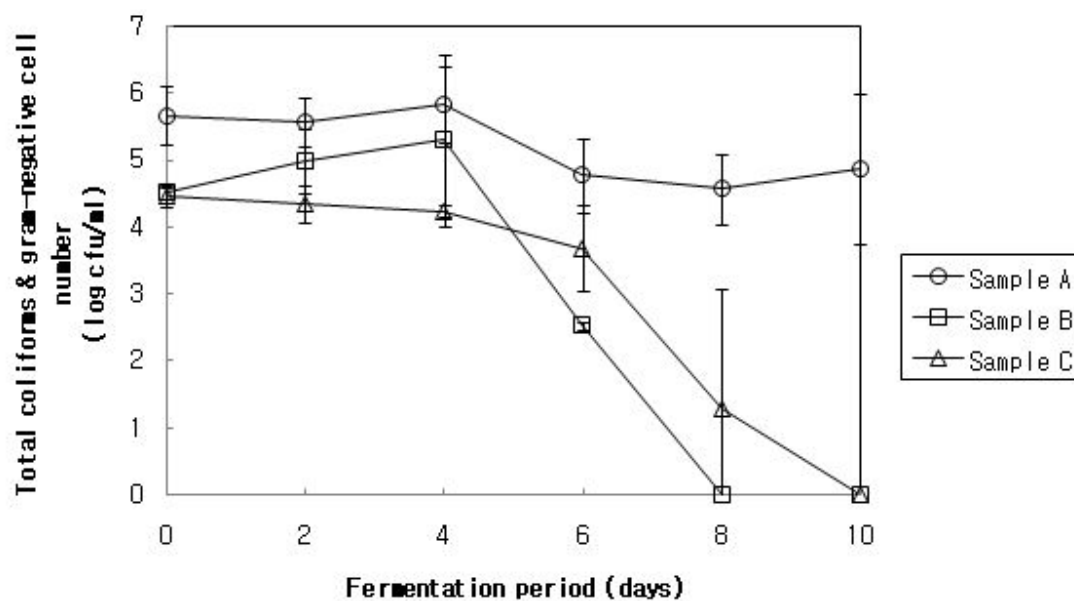


Figure 7. Changes of the total coliforms & gram-negative cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C.

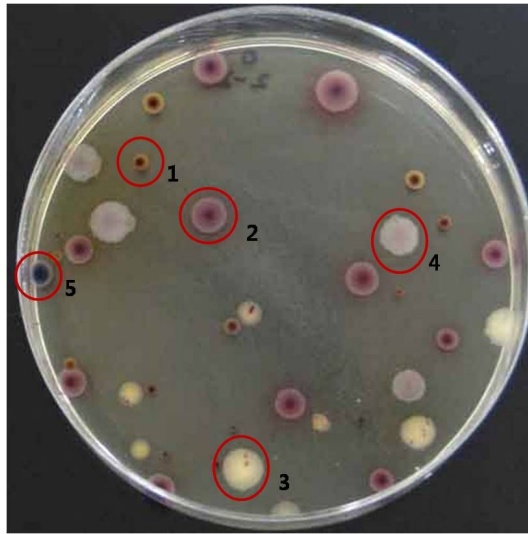


Figure 8. Detected Coliform & gram-negative bacteria grown on Chromocult medium.

- 1 : *Spingomonas SP.*
- 2 : *Escherichia coli*
- 3 : *Stenotrophomonas maltophilia*
- 4 : *Rahnella aquatilis*
- 5 : *Enterobacter amnigenus*

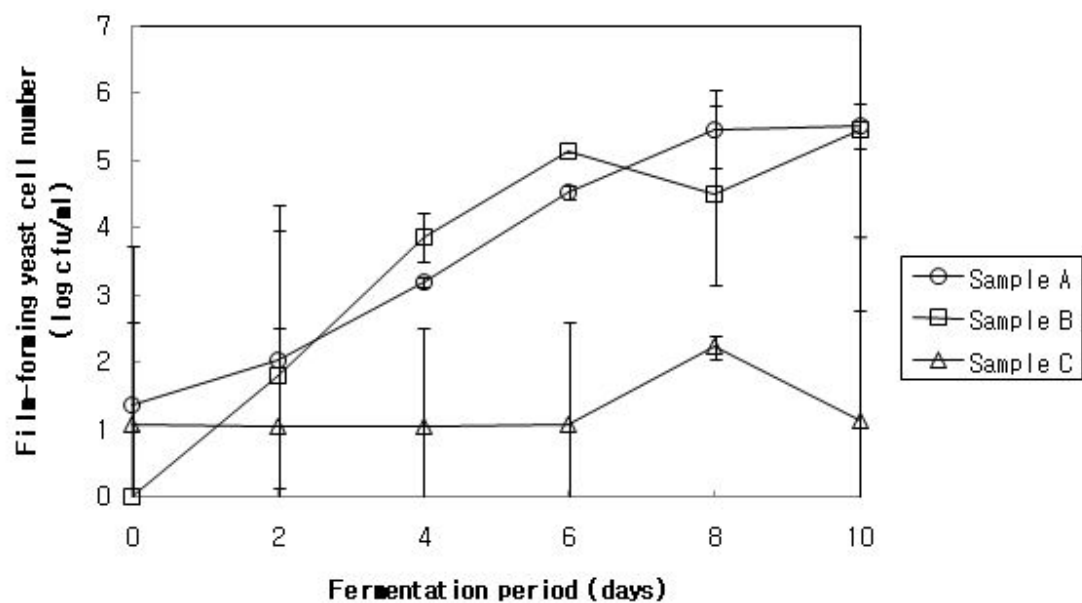


Figure 9. Changes of the film-forming yeast cell number of the commercial kimchi during the fermentation at 10°C.

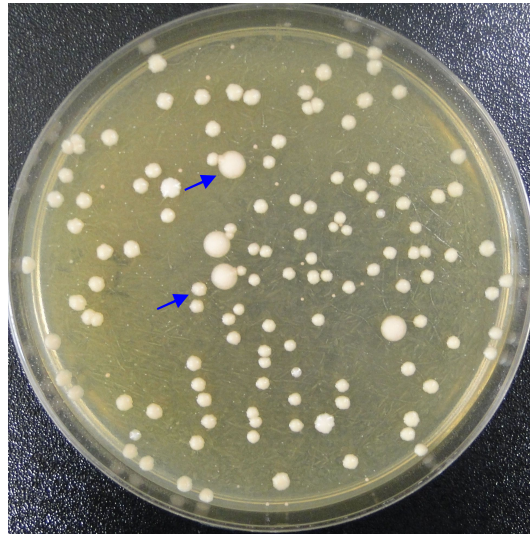


Figure 10. Detected film-forming yeast grown on YPD medium.

제 2 절 *Lactobacillus plantarum* AF1 균주의 김치산막효모 성장 저해 효과

1. 김치에서 효모의 분리

당일 제조된 반찬마트 김치를 25℃에서 산막효모가 육안으로 확인될 때 까지 저장하였다(Fig. 11). 산막효모가 낀 김치에서 분리된 김치산막효모는 총 2종류였으며(Fig. 12, 13), 분리한 2종의 효모는 편의상 GY1, GY2 이라 명칭하였다.

2. *Lb. plantarum* AF1 균주의 항진균 활성

곰팡이 1종, 김치 분리 효모 2종을 대상으로 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항진균 물질에 의한 항균 활성을 paper disk method를 통하여 조사하였다. 곰팡이에 대한 실험에서는 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항균 물질의 2배 농축액부터 곰팡이의 포자 형성 저해 활성을 나타내었다(Fig. 14). 김치 분리 효모들에 대한 실험에서는 GY2에 대한 저해 활성은 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항균 물질의 20배 농축액만으로도 나타난 반면 GY1은 50배 농축액에서 저해 활성을 나타내었으며(Fig. 15), SPE (solid phase extraction)정제물을 가하였을 때 뚜렷한 저해 활성을 나타내었다(Fig. 16). 이는 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항균 물질이 GY1보다 GY2의 세포막에 더 민감하게 작용을 하는 것을 나타낸다.



Figure 11. Film-forming yeasts on the surface of the kimchi.

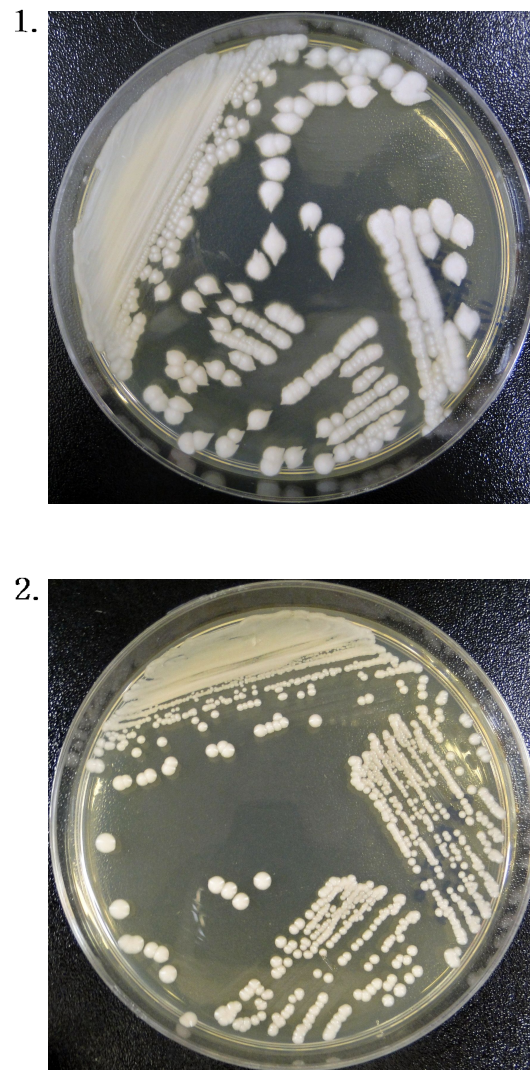


Figure 12. Isolation of film-forming yeasts in Kimchi.

1. Isolate GY1 grown on YPD medium.
2. Isolate GY2 grown on YPD medium.

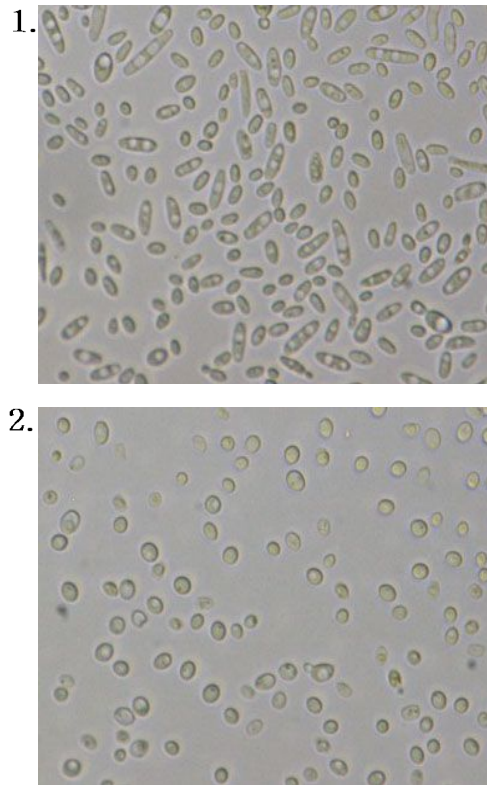


Figure 13. Microscopic observation of the isolated strains.

1. Isolate GY1, 2. Isolated GY2

magnification : $\times 400$

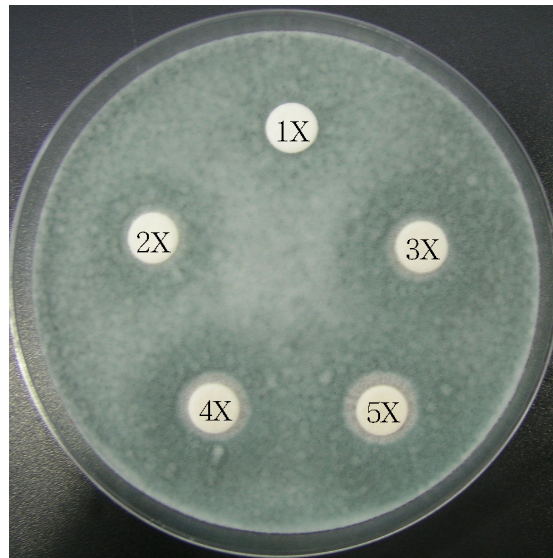


Figure 14. Antifungal activity of supernatant from *Lb. plantarum* AF1.
Sensitive lawn ; *Aspergillus fumigatus* ATCC 96918

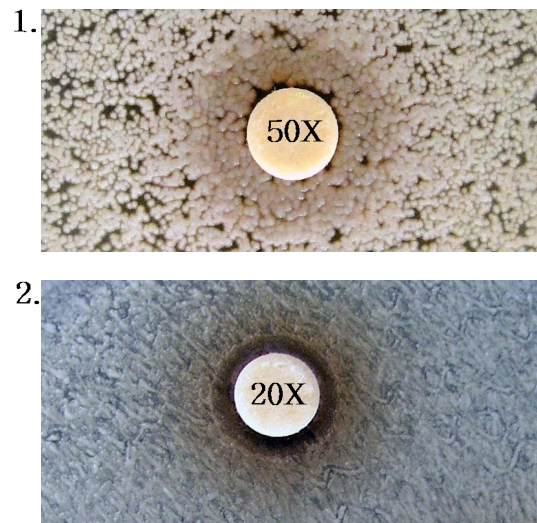


Figure 15. Antiyeast activity of supernatant from *Lb. plantarum* AF1.

Sensitive lawn ; 1 : GY1, 2 : GY2



Figure 16. Antiyeast activity of partially purified compounds from *Lb. plantarum* AF1 using solid phase extraction (SPE). GY1 was used as a sensitive strain.

3. *Lb. plantarum* AF1 항진균 물질의 김치에의 적용

Lb. plantarum AF1이 생산하는 항진균 물질의 김치에서의 적용 가능성을 알아보기 위한 실험을 실시하였다.

우선 AF1균주의 조항균 물질을 첨가하지 않은 대조구 김치와 실험구인 조항균 물질을 김치 500 g에 5, 10, 20% (v/wt)를 농도별로 각각 첨가한 김치에서의 김치 산막 효모 억제 효과를 비교한 결과 오히려 실험구에서 김치 산막 효모가 더 많이 검출된 결과가 나타났다. 이는 *Lb. plantarum* AF1의 배양 배지인 MRS가 김치 산막 효모의 영양물로서 작용한 것으로 보여 진다. 따라서 MRS 배지를 최소화하기 위하여 부분 정제로서 SPE 정제를 실시하여 0, 1, 3, 5% (v/wt)를 김치 500 g에 첨가하여 25°C incubator에서 3일 동안 저장 후 실험을 실시하였다.

1) 김치 미생물 군수의 변화

(1) 유산균수의 변화

유산균수의 변화는 Fig. 17에 나타낸 것과 같이 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 첨가하지 않은 대조구 김치와 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 1, 3, 5 % (v/wt) 첨가한 김치에서 큰 차이를 보이지 않고 비슷한 경향을 나타내었다.

이 결과 *Lb. plantarum* AF1이 생산하는 항진균 물질이 유산균의 생육에 영향을 주지 않는 것으로 보여진다.

(2) 효모수의 변화

효모수의 변화는 GY2의 경우 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 첨가하지 않은 대조구 김치와 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 1, 3, 5% (v/wt) 첨가한 김치에서 큰 차이를 보이지 않았으나, 효모 GY1의 경우 대조구 김치에 비해 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 첨가한 김치에서 전반적으로 GY1에 대한 생육억제 효과가 나타났다. GY1은 대조구 김치에서 8.23×10^3

cfu/mL가 검출된 반면, *Lb. plantarum* AF1의 배양 상징액 SPE 정제물을 1% 첨가한 김치에서는 8.75×10^2 cfu/mL가 검출이 되었고, 3% 첨가한 김치에서는 1.8×10^3 cfu/mL가 검출이 되었으며, 5% 첨가한 김치에서는 3.2×10^3 cfu/mL가 검출이 되었다.

각 효모를 순수 분리하여 paper disk method방법을 이용해서 확인한 생육 저해 효과와 정반대의 결과가 나왔는데, 이는 실제 김치 모델 시스템에서 AF1 항진균 물질과 김치 내 존재하는 200여 가지 이상의 미생물이나 그들이 생산하는 각종 대사산물 그리고 김치 재료 등의 복합적인 상호작용에 의한 결과임을 예측할 수 있다. 또한 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상징액 SPE 정제물을 1% 첨가했을 시 김치산막효모에 대한 생육 억제 효과가 가장 효과적인 것으로 보여진다(Fig. 18).

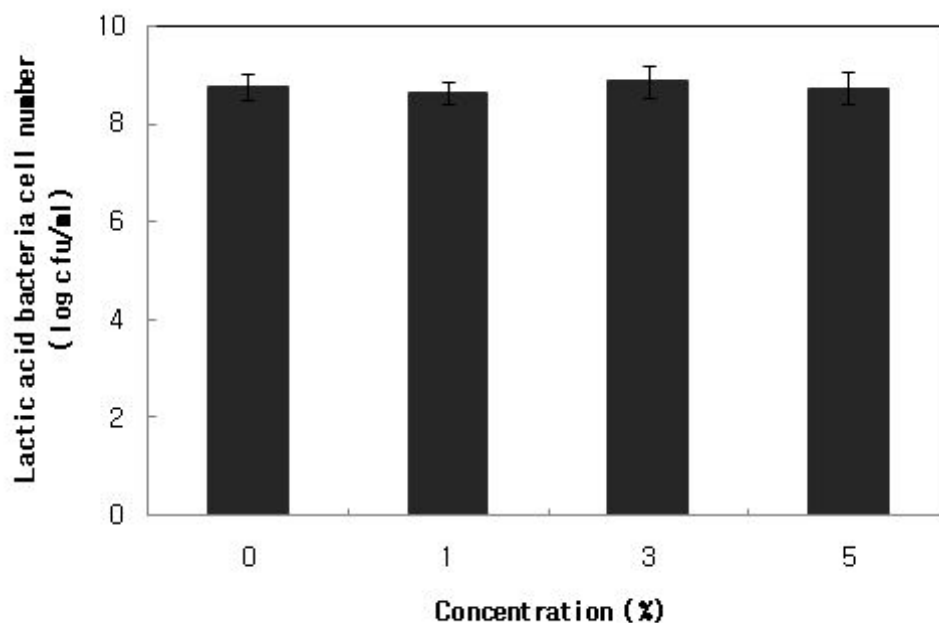


Figure 17. Changes of lactic acid bacteria cell number in kimchi containing partially purified compounds from *Lb. plantarum* AF1 using solid phase extraction (SPE).

The partially purified antifungal compounds 0, 1, 3, 5 %(v/wt) from *Lactobacillus plantarum* AF1 were added to kimchi.

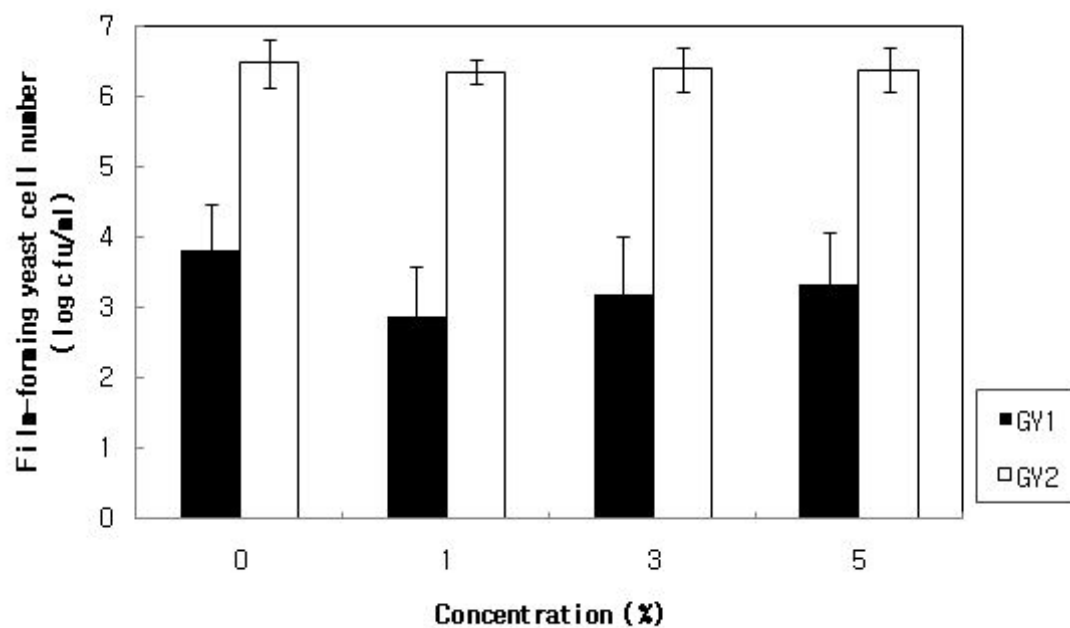


Figure 18. Inhibition effect of partially purified compounds from *Lb. plantarum* AF1 using solid phase extraction (SPE) on the growth of film-forming yeasts in kimchi.

The partially purified antifungal compounds 0, 1, 3, 5 %(v/wt) from *Lactobacillus plantarum* AF1 were added to kimchi.

2) 김치 여액의 저장

Lb. plantarum AF1 의 SPE 정제물 0, 1, 3, 5% (v/wt)을 김치에 첨가하여 25℃ incubator에서 3일 동안 김치의 표면에 산막효모가 나타날 때까지 저장한 김치를 마쇄하여 얻은 김치여액을 25℃ incubator에 저장 7일 동안 상태를 관찰한 결과 저장 3일차에 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 1% 첨가한 김치의 김치여액에서 가장 먼저 산막효모 film이 형성 되었고 저장 5일차에 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 첨가하지 않은 김치의 김치여액에서도 film이 두껍게 형성이 되었으나, *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 3, 5% 첨가 김치의 김치여액은 film이 형성되지 않다가(Fig 19), 저장 7일차에 film이 형성 되는 현상을 관찰하였다. 이는 AF1 균주가 생산하는 항진균 물질이 김치 산막효모를 사멸시키지 않고 증식만을 억제하는 fungistatic action을 가지는 것을 알 수 있다.

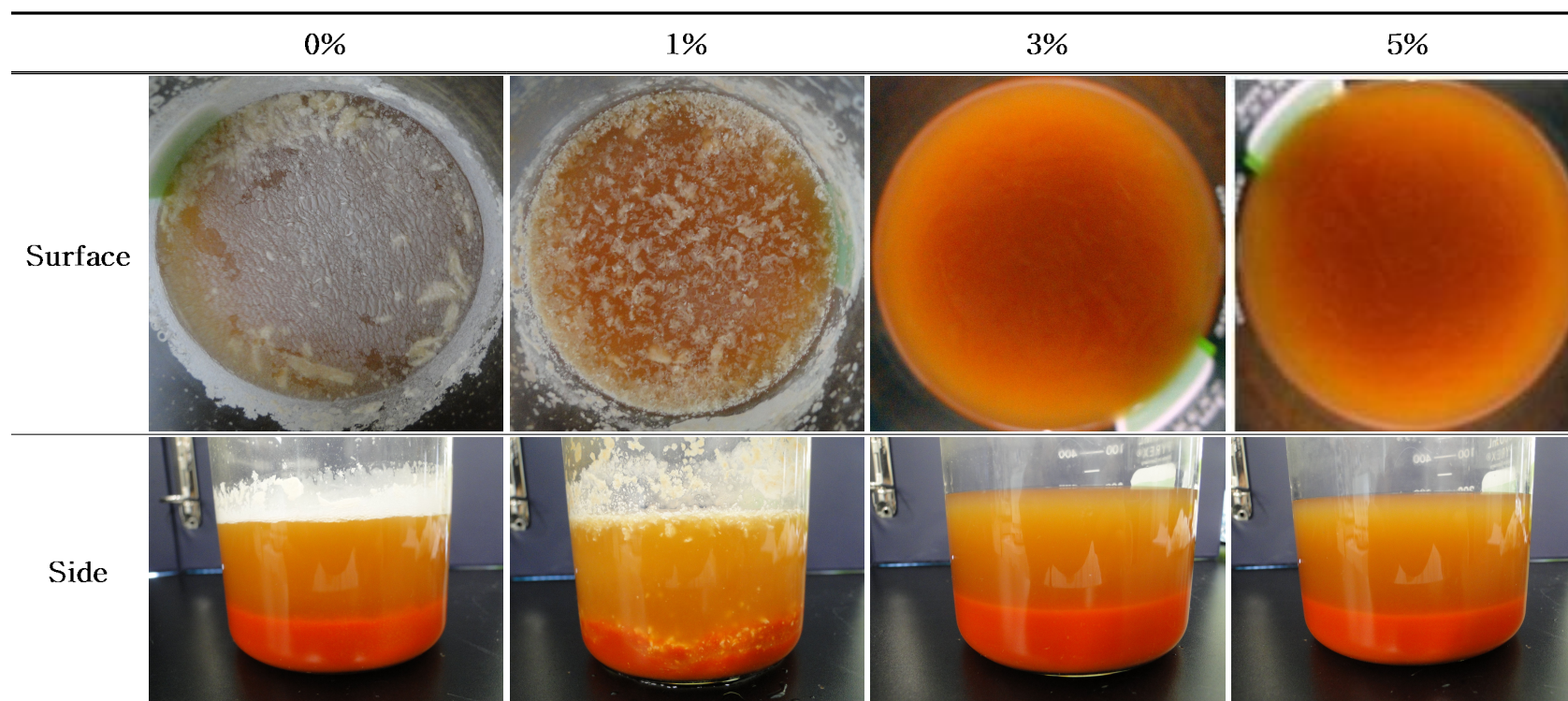


Figure 19. Storage of the kimchi juice during 5 days at 25°C.

제 4 장 결 론

현재 식품에서 유해 미생물을 억제하기 위한 여러 가지 보존 방법으로 크게 물리적인 방법과 보존료로 화학첨가물을 사용하는 화학적인 방법이 있다. 하지만 열처리, 동결건조 등의 물리적 방법은 식품의 질이 저하되거나 영양적인 손실을 가져올 수 있으며, 최근 항생제나 화학 보존료에 대한 소비자들의 거부감과 함께 내성을 나타내는 미생물들이 점점 증가하는 추세로 대신 신선하고 천연 그대로이며 화학 보존료가 들어있지 않으면서 저장기간이 연장된 식품이 요구되고 있다.

최근에는 김치의 식이섬유소와 김치숙의 재료인 마늘, 생강, 고추 등의 향 돌연변이 활성이 알려져 대장암, 빈혈, 동맥경화 등을 예방할 수 있는 등 중요한 영양생리학적 작용에 대한 연구결과가 보고됨에 따라 우리나라 전통적인 고유의 식품에서 김치의 세계화라는 슬로건 아래 세계적인 식품으로 부각되고 있으며 국제적으로도 관심이 높아져 중요한 수출 품목이 되고 있으나 유통 기간 중의 산패와 연부현상이 큰 문제점이 되고 있다.

따라서 본 연구에서는 시판김치의 품질특성을 조사하기 위하여 3곳의 제조 회사별 시판김치의 일반 성분 및 미생물 군수를 10℃에서 10일 동안 저장하여 2일 간격으로 측정하여 비교 분석하였다. 또한 김치의 숙성 중 외관을 손상시킬 뿐만 아니라 젖산을 비롯한 유기산을 산화 분해하여 맛을 저하시키고 김치 조직의 연부현상을 가져오는 것으로 알려져 있는 산막효모를 저해하기 위한 목적으로 *Lb. planatarum* AF1의 항진균 물질을 부분 정제하여 산막효모에 대한 항진균 활성을 조사한 후, 김치에 첨가하여 산막효모 저해 효과를 알아보았다.

10℃에서 10일 동안 저장중의 시판김치의 품질 특성 변화의 결과는 다음과 같다. 3곳의 김치의 숙성중의 pH는 평균 5.87에서 4.13으로 감소하였고, 숙성중의 산도는 평균 0.32%에서 1.09%로 증가하였다. 김치 내의 총 군수와 유산균의 수는 숙성 기간 동안 점차적으로 증가하여 숙성 10일 째 각각 $4.87 \sim 6.78 \times 10^8$ cfu/mL, $3.45 \sim 5.4 \times 10^8$ cfu/mL의 수가 검출이 되었으며, gram-positive 세균의 수는 숙성 기간 동안 꾸준히 존재하는 것으로 보여 졌다. 대장균 및 대장균군 gram-negative 세균의 수는 숙성 4일부터 감소하기 시작하여 샘플 B는 숙성 8일째부터, 샘플 C는 숙성 10일째 검출 되지 않았으나 샘플 A는 숙성 10일까지 8.64×10^4 cfu/mL의 수가 검출이 되었다. 효모수의 변화는 샘플 A와 샘플 B는 숙성 10일 동안 꾸준히 증가하여 각각 5.24×10^5 ,

4.65×10⁵ cfu/mL의 수가 검출된 반면, 샘플 C는 1.50×10¹ cfu/mL의 적은 수가 검출되었다.

제조회사별 시료에 상관없이 김치에 존재하는 Gram-positive 세균은 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* 의 4종이, Gram-negative 의 세균은 *Spingomonas SP.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*, *Rahnella aquatilis*, *Enterobacter amnigenus* 의 5종의 균이 분리 및 동정되었다.

Lb. plantarum AF1이 생산하는 항진균 물질에 의한 항진균 활성을 paper disk method를 이용한 assay를 시행하여 관찰한 결과, 식품오염 곰팡이인 *Aspergillus fumigatus*와 김치 위에 산막을 형성한 효모 2종에 대한 생육 저해 활성을 나타내었다.

Lb. plantarum AF1이 생산하는 항진균 물질의 식품에서의 적용을 위한 실험으로 AF1 균주의 배양 상정액 SPE 정제물을 김치에 0, 1, 3, 5% (v/wt) 적용하여 김치 산막효모의 생육 저해 여부를 관찰한 결과 GY2의 수의 경우 대조(무첨가)구 김치와 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물 첨가 김치에서 큰 차이를 보이지 않았으나 GY1의 수에서는 대조구 김치에 비해 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물을 첨가한 김치에서 전반적으로 효모에 대한 생육억제 효과가 나타났다. 대조구 김치에서 8.23×10³ cfu/mL 검출된 반면 1% 첨가 김치에서는 8.75×10² cfu/mL 가 검출이 되어 가장 효과적으로 김치산막효모 생육 억제 효과를 나타내었다.

김치에 존재하는 미생물은 약 200여 가지로 쉽게 제어할 수 없고, 김치 반찬마트는 균일화된 제품의 김치를 생산해내는 시스템이 구축되어 있지 않기 때문에 항상 같은 상태의 김치로 실험할 수 없는 어려움이 있었으며, 김치에 첨가되는 *Lb. plantarum* AF1의 배양 상정액 SPE 정제물의 양은 매우 소량으로 김치 전체에 고르게 첨가되지 못할 경우 효모성장을 효과적으로 저해 할 수 없게 된다. 그러므로 식용 가능하고, 오직 *Lb. plantarum* AF1의 영양원이 되며, MRS 배지에서 배양했을 때 만큼의 활성을 나타내는 항진균 물질을 생산해 낼 수 있는 배지개발이 필요하다.

생물학적보존(Biopreservation)이란 자연 균총과 또는 그들의 항박테리아 생산물을 이용하여 식품의 저장기간을 연장하고 식품의 안전을 높이는 것을 말한다. 따라서 김치에서 분리된 유산균인 *Lb. plantarum* AF1 균주는 GRAS (generally recognized as safe) 미생물로서 인체에 무해하며 유익한 특성을 가지므로 *Lb. plantarum* AF1균주가 생산하는 항진균 물질은 김치 산막 효모를 포함한 김치에 존재하는 유해균을 억제 할 수 있는 생물학적 보존제 (Biopreservative)로서의 활용 가능성을 기대할 수 있다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Ahn, S.J. 1985. The effect of sorbic acid on the kimchi fermentation and stability of ascorbic acid. *Korean J. Soc. Food Sci.* 1(1)
2. Axelsson, Lb.T. 1998. Lactic acid bacteria : Classification and physiology. *Marcel Dekker. New york.* PP 1-63.
3. Bae k YJ. 1993. Lactic acid bacteria and human health. *Korean J. Food Nutr.* 6:53-65
4. Barnby-Smith, F.M., Roller, S.D., Woods, Lb.F., Bager, M., Nightingle, M. and Gibbs, P.A. 1989. Production of antimicrobial compounds by lactic acid bacteria. The British Food Manufacturing Industrie Research Association. Research Reports no. 662. Leatherhead Food RA.
5. Brul, S. and P. Coote. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and Microbial resistance mechanisms. *Int. J Food MicrobioLb.* 50:1-17
6. Chang, I.S., Kim, B.H. and Shin, P.K. 1997. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol production. *AppLb. Environ. MicrobioLb.* 63:1
7. Chang, K.S., Kim, M.J. and Kim, S.D. 1995. Effect of ginseng on the preservability an quality of chiness cabbage kimchi. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24(2):313-322
8. Cheigh, H. S., and Hwang, J. H. 2000. Antioxidative characteristics of kimchi. *Food Industry and Nutrition.* 6:52-59
9. Choi, K.J. 1978. The study of yeast isolated from kimchi. *Kor. Jour. MicrobioLb.* 16(1):1-10
10. Collins, E.B. and Aramaki, K. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 63:353-357

11. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food technology*. 44:100
12. Ennahar S, Sonomoto K, Ishizaki A. 1999. Class 2 a bacteriocins from lactic acid bacteria : antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87:705-716
13. Etchells, J.Lb., Bell, T.A., Monroe, R.J., Masley, P.M. and Demain, A.Lb. 1958. Population and softening enzyme activity of filamentous fungi on flowers, ovaries and fruits of pickling cucumbers. *AppLb. MicrobiaLb.* 6:427
14. Han, H.U., Lim, C.R., Park, H.K. 1990. Determination of microbial community as an indicator of kimchi fermentation. *Kor. J. Food. Sci. TechnoLb.* 22:26-32
15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>
16. Jack, R. W., J.R. Tagg, and B.Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. *MicrobioLb. Rev.* 57:171-200
17. Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *AppLb. Environ. MicrobioLb.* 44:525
18. Johan Schnurer and Jesper Magnusson. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & technology*. 16:70-78
19. Jung HK, Kim ER, Yae HS, Choi SJ, Jung JY, Juhn SLb. 2000. Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milks as probiotic functional foods. *Food Ind. Nutr.* 5:29-35
20. Kang, S.M., Yung, W.S., Kim, Y.C., Joung, E.Y. and Han. 1995. Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for kimchi fermentation and effect of starter. *Kor. J. AppLb. MicrobioLb. BiotechnoLb.* 23:461-471
21. Kato I, Endo K, Yokokura T. 1994. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor resection in mice. *Int. J. ImmuniPharmacoLb.* 16:29-36

22. Kim HS, Ham JS. 2003. Antioxidative ability of lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 23:186-192
23. Kim, S.D., Lee, S.H. 1988. Effect of sodium malate buffer as pH adjuster on the fermentation of kimchi. *J. Korean soc. Food Nutr.* 17(4):358-364
24. Kim, S.I., Kim, I.C. and Chang, H.C. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food sci. Nutr.* 28:526-533
25. Kim, Y. J. 1999. Physiological properties of kimchi. *Food Industry and Nutrition.* 4:59-65
26. Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochemie.* 70:337-349
27. Ku, K.H., Kang, J.O. and Kim, W.J. 1988. Some quality changes during fermentation of kimchi. *Korean J. Food Sci. TechnoLb.* 20(4):476-482
28. Lee, M.K., Nam, T.J., Park, W.S., Hong, S.I., and Kim, I.H. 1998. Research Report : Control of kimchi fermentation by regulating microbial succession. *Korea Food Research Institute, Songnam, Korea*, E 1421-0898
29. Lee, Y.H. and Lee, H.S. 1986. The changes of pectin substance in kimchi during fermentation. *Korean J. Food & Cookery Sci.* 2(1):54-58
30. Lew, C.W., Chang, Y.K. and Ha, D.M. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of isolates. *Kor. J. AppLb. MicrobioLb. BiotechnoLb.* 20:102-109
31. Mattick, A.T.R. and Hirsch, A. 1947. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *The Lancet.* 5:5-8
32. Michael E. Stiles. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70:331-345

33. Park, K.J., Woo, S.J. 1988. Effect of Na-Acetate, Na-Malate and K-Sorbate on the pH, acidity and sourness during kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. TechnoLb.* 20(1):40-44
34. Patricia Ruas-Madiedo, Jeroen Hugenholtz, pietermela zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International dairy JournaLb.* 12:163-171
35. Riley MA, Wertz JE. 2002. Bacteriocins : evolution, ecology, and application. *Annu Rev MicrobioLb.* 56:117-137
36. Seon-Jae Kim. 2005. Physiochemical characteristic of Yogurt prepared with Lactic acid Bacteria Isolated from Kimchi. *Korean J.Food Culture.* 20(3):337-340
37. Shin, D.H., Kim, M.S., Han, J.S., Lim, D.K. and Bak, W.S. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean J. Food Sci. TechnoLb.* 28:137
38. Shinda K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimuras, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S, Kaminogawas. 1998. *Lactobacillus Casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch. Allergy ImmunoLb.* 115:278-287
39. Shin-Ho Lee, Myung-Ja No.1997. Viability in Artificial Gastric and Bile Juice and Antimicrobial Activity of Some Lactic acid bacteria Isolated from Kimchi. *Kor.J.AppLb. MicrobioLb. BiotechnoLb.* 25(6):617-622
40. Son, Y.M., Kim, K.O., Jeon, D.W. and Kyung, K.H. 1996. The effect of low molecular weight chitosan with and without other preservatives on the characteristic of kimchi during fermentation. *Korean J. Food Sci. TechnoLb.* 28(5):888-896
41. Tagg, G.R., A.S. Dajani, and Lb.W.Wannamarker. 1976. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. 1976. *BacterioLb. Rev.* 40:772-756

42. Tagg, T.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, Lb.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria
43. Tramer, J. and Foeler, G.G. 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. Food Agric.*, 15:522
44. Yang, E.J., Chang, H.C. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Kimchi. *Kor. J. MicrobioLb. BiotechnoLb.* 36(4)276-284
45. Zuber, P., M.M. Nakano, and M.A. MarahieLb. 1993. Peptide antibiotics, pp. 896-916. In sonenshein, A.C., J.A. Hoch, and R. Losick.(eds.), *Bacillus subtilis and other gram-positive bacteria : biochemistry, physiology and molecular genetics*. American society for Microbiology, Washington, D.C., U.S.A.

저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20097039	과 정	석사
성 명	한글 최유리 한문 崔 有 利 영문 Choi yuri				
주 소	광주 광역시 광산구 하남동 부영3차 304동 1201호				
연락처	e-mail : choiyuri14@hanmail.net				
논문제목	한글 숙성에 따른 상품김치의 미생물 군총 변화와 김치유산균이 생산하는 항진균물질의 김치산막효모 저해효과				
	영문 Microbiota profiles of manufactured-kimchi depending on fermentation and growth inhibition of film-forming yeasts by kimchi lactic acid bacteria				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함(다만, 저작물의 내용변경은 금지함)
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함

동의여부 : 동의(○) 반대()

2010 년 11 월

저작자 : 최유리 (인)

조선대학교 총장 귀하