

2013年 8月

碩士學位 論文

김치로부터 분리한 유산균의
특성규명 및 이를 적용한 속성
묵은지 제조

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

文 晶 宣

김치로부터 분리한 유산균의
특성규명 및 이를 적용한 속성
묵은지 제조

Characterization of lactic acid bacteria
isolated from kimchi and their application for *Mukeunji*

2013年 8月 23日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

文 晶 宣

김치로부터 분리한 유산균의
특성규명 및 이를 적용한 속성
묵은지 제조

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


2013年 8月


朝 鮮 大 學 校 大 學 院


食 品 營 養 學 科

文 晶 宣

文晶宜의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 이 명 렬 

委 員 조선대학교 교수 이 재 준 

委 員 조선대학교 교수 장 해 춘 

2013年 8月

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	VI
LIST OF TABLES	III
LIST OF FIGURES	IV
제 1 장 서 론	1
제 2 장 실험 재료 및 방법	4
제 1 절 starter 균주의 분리 · 동정 및 특성규명	4
1. 속성 묵은지 starter 균주의 분리	4
2. 균주의 동정	5
3. 균주의 특성	6
제 2 절 분리 균주를 이용한 속성 묵은지 제조와 발효특성	10
1. 속성 묵은지의 제조	10
1) 김치의 제조	10
2) 발효 온도 설정	11
2. 일반분석	12
1) pH 및 산도 측정	12
2) 염도 및 당도 측정	12
3. 미생물균수의 측정	13
4. 색도 및 물성 측정	13
5. 속성 묵은지의 관능 평가	13

제 3 장 결과 및 고찰	14
제 1 절 starter 균주의 분리 · 동정 및 특성규명	14
1. 속성 목은지 starter 균주의 분리	14
2. 균주의 동정	16
1) 형태 및 배양학적 동정	16
2) 당 대사능	16
3) 16S rRNA 염기서열 분석	17
3. 균주의 특성	25
1) 배양시간에 따른 생육도	25
2) 배지의 초기 pH에 따른 생육도	25
3) 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도	28
4) 내산성 측정	30
5) 균주의 D/L-lactic acid의 농도측정	32
6) 콜레스테롤 저하능	34
7) 향균 활성 조사	36
제 2 절 분리 균주를 이용한 김치 제조와 발효특성	39
1. 발효 온도 설정	39
2. 김치의 발효특성	42
1) 일반 양념 배합비를 이용하여 제조한 김치의 발효특성	42
2) 염도 3% 양념 배합비를 이용하여 제조한 김치의 발효특성	51
3. 색도 및 물성의 변화	59
1) 색도의 변화	59
2) 물성의 변화	62
3) 관능평가	65
제 4 장 결론	68
제 5 장 참고문헌	71

LIST OF TABLE

Table 1. Changes of pH and sensory evaluation on 29 selected <i>Lactobacillus</i> spp. strain applied to kimchi juice at 30°C for 48hr	15
Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated strains <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1 and <i>Lb. sakei</i> YY1 ..	18
Table 3. Sugar utilization characteristics of the isolated strains <i>Lb. sakei</i> WJ1, SC1, and YY1	20
Table 4. Quantitative analysis of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1	31
Table 5. Cholesterol assimilation of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1 in 30°C and 37°C for 24hr and 48h ..	33
Table 6. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the AF1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	45
Table 7. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the WJ1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	46
Table 8. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the SC1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	47
Table 9. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the YY1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	48
Table 10. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the 3% of salinity SC1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	54
Table 11. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the	

3% of salinity YY1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	55
Table 12. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the 3% of salinity control kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	56
Table 13. Changes of Hunter's color values of starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	58
Table 14. Changes of Hunter's color values of starter 3% salinity kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	59

LIST OF FIGURE

Figure 1. <i>O</i> - phthalaldehyde Method	9
Figure 2. Gram staining of the isolated strain	19
Figure 3. DNA sequence of the 16s rDNA from the isolated strain <i>Lb. sakei</i> WJ1	21
Figure 4. DNA sequence of the 16s rDNA from the isolated strain <i>Lb. sakei</i> SC1	22
Figure 5. DNA sequence of the 16s rDNA from the isolated strain <i>Lb. sakei</i> YY1	23
Figure 6. Phylogenetic relationship between <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1 and <i>Lb. sakei</i> YY1 and other related bacteria based on 16s rDNA sequence	24
Figure 7. Growth Curves of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1	26
Figure 8. Effects of NaCl of the growth media on the growth of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1	27
Figure 9. Effects of initial pH of the growth media on the growth of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1	29
Figure 10. Acid tolerance of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1	31
Figure 11. Antibacterial activity of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1 against <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	37

Figure 12. Effect of pH 4.0 treatment on the antibacterial activity of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1 against <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	38
Figure 13. Growth of <i>Lb. plantarum</i> AF1, <i>Lb. sakei</i> WJ1, <i>Lb. sakei</i> SC1, and <i>Lb. sakei</i> YY1 on 10, 12, 15, 18, and 20°C for setting the fermentation temperature on kimchi	41
Figure 14. Total pH and acidity changes of AF1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	43
Figure 15. Total pH and acidity changes of WJ1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	44
Figure 16. Total pH and acidity changes of SC1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	45
Figure 17. Total pH and acidity changes of YY1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	46
Figure 18. Total pH and acidity changes of 3% of salinity SC1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	53
Figure 19. Total pH and acidity changes of 3% of salinity YY1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	54
Figure 20. Total pH and acidity changes of 3% of salinity control kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	55
Figure 21. Changes in texture properties of AF1, WJ1, SC1, and YY1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	63
Figure 22. Changes of compression force of 3% of salinity kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C	64

ABSTRACT

Characterization of lactic acid bacteria isolated from Kimchi and their application for *Mukeunji*

Moon, Jeong Sun

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

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

Four homo fermentative lactic acid bacteria (LAB) were isolated from Kimchi. Based on morphological and biochemical properties and 16s rRNA gene sequence determination, they were identified as *Lactobacillus plantarum* AF1, *Lactobacillus sakei* WJ1, *Lactobacillus sakei* SC1, and *Lactobacillus sakei* YY1. Before applying the strains as a starter for kimchi, general characteristics of LAB were investigated. The growth of the LAB was measured; *Lb. plantarum* AF1 reached stationary phase at 36 h and *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1 and *Lb. sakei* YY1 reached stationary phase at 24 h. The effect of initial pH (pH 4, 5, 6, 6.5, 7, 10) and NaCl concentration (0, 1, 3, 5, 7%) of the growth medium on the growth was also observed. They can grow well at 3~5% of NaCl concentration and pH 5~pH 7. *Lb. plantarum* AF1 and *Lb. sakei* WJ1 was identified as D/L -lactic acid producing strains, respectively. Both *Lb. sakei* SC1 and *Lb. sakei* YY1 were identified as L(+) - lactic acid producer. *Lb. plantarum* AF1 showed about 69% of cholesterol assimilation ability in 24h and 62% in 48h at 30°C. Whereas, *Lb. plantarum* AF1 showed much higher cholesterol assimilation ability at 37°C; about 82% in 24 h and 97% in 48h. *Lb. sakei* WJ1 showed 52% of cholesterol reduction in 24 h and 56% in 48 h at 30°C. It showed 43% in 24h and 48% in 48 h at 37°C and it showed the lowest cholesterol assimilation ability among the four LAB. *Lb. sakei* SC1 and YY1

strains showed up to 57% of cholesterol reduction in 24 h and 59% in 48h at 30°C. However, their cholesterol assimilation was lower at 37°C as 50~55% in 24 h and 44~52% in 48 h. Antibacterial activity was found to be active for four LAB against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and its activity was stable at pH 4.0 and unstable over pH 5.0.

These four LAB were used as a starter for kimchi(AF1, WJ1, SC1, and YY1 kimchi). Kimchi was fermented at 15°C and stored for 240 days at -1°C. The pH of kimchi decreased up to pH 4.0 drastically in fermentation time and showed little change during the storage time. The acidity of kimchi went up rapidly along the low pH. and all 4 strain starter kimchi had lower acidity than general acidity of *Mukeunji* at the end of the storage. The dominance rate of the used starter in AF1 and WJ1 kimchi was over 90% in 210 days and over 80% in 240 days of storage at -1°C. The dominance rate of the used starter in SC1 and YY1 kimchi kept over 90% in 120 days of storage. But, its dominance rate started to fall down from 180 days and ended with 43~60%. In spite of their lower dominance rate, SC1 and YY1 kimchi showed more positive evaluation on sensory evaluation than the others. Especially, SC1 kimchi showed soft sweetness and it masked strong sour taste of kimchi. Also, the smell of SC1 kimchi was similar to *Mukeunji* over 60 days of storage. The color of SC1 kimchi was dark red based yellowish and the texture was crisp enough as *Mukeunji*.

The prepared kimchi with 3% salinity was taken 5 more fermented days to reach pH 4.0 than the starter kimchi. The starter dominance rate of the kimchi was over 90% 120 days of storage but, it started to fall down from 180 days and ended with 43~51%. SC1 kimchi had more positive assessment on sensory evaluation and showed the similar flavor and taste of *Mukeunji* when its 60 days of storage. Moreover, the texture of the kimchi was more crispy. However, control kimchi was very sour and showed bad smell when it stored longer time(more than 4 months). Moreover, the control kimchi showed softness of texture upon long-term storage. The above results, it is considered that *Lb. sakei* SC1 is the most suitable as a starter for *Mukeunji*.

제 1 장 서 론

김치는 우리나라 고유의 전통발효식품으로 채소절임과 발효의 특성을 동시에 지니며 배추나 무와 같은 재료 외에도 갓, 열무, 고들빼기, 오이, 파, 얼갈이 등을 김치의 주재료로 사용하며 다양한 부재료 특히, 향신료, 곡물류, 젓갈 등의 동물성 식품재료를 사용하고 이들 재료에서 유래된 미생물에 의하여 발효된 식품이다. 1995년에 김치 종류가 190여종 이상이라 밝혀진 이후(6) 최근 농촌진흥청의 자료에 따르면 김치의 종류는 무려 300여종 이상으로 밝혀진바 김치의 종류는 점점 늘어나고 있다.

최근 경제가 발전함에 따라 식생활 패턴이 변화되어 소비자의 요구가 다양해지며, 식생활 문화의 서구화로 인하여 각종 성인병에 위협받는 현대인들에게 김치는 단순한 전통식품의 개념을 넘어서 영양학적 우수성뿐만 아니라 다양한 건강 증진 효과를 가진 식품으로 알려지고 있다. Kim 등의(25) 보고에 의하면 김치는 세계적인 건강식품으로 주목받고 있으며 김치의 영양 생리적 특성인 항암효과, 항산화효과, 면역증강효과, 변비예방 효과, 동맥경화증 억제효과, 에너지 소비촉진, 피로억제효과, 혈전억제효과, 철분흡수 촉진과 장내세균 억제 효과 그리고 김치가 갖는 기타 영양성분에 대하여 소개하였다. 또한 묵은지에 함유된 유산균은 일반 숙성 김치에 비해 그 생균의 수가 작다고 알려져 있지만 사멸한 유산균이 장내에 있는 살아있는 유산균의 성장인자를 촉진하여 증식을 돕고 각종 아미노산, 젖산, 생리활성 물질들이 일반 김치에 비해 더 많이 함유되어 있고, 맛과 영양이 배가 되어 비타민, 무기질 등을 많이 함유한 건강식품으로도 알려져 있다(24). 이러한 김치의 유일한 점이 소개되어지면서 김치에 대한 연구들과 함께 이를 이용한 여러 가지 요리들이 인기를 얻고 있는데 적당히 발효시켜 상쾌한 신맛을 내는 숙성 김치를 즐겨 먹던 것에서 벗어나 갓 담근 김치, 숙성 김치, 묵은 김치 등 소비자의 기호가 다양하게 차별화 되고 있다.

일찍부터 김치에 관해서는 많은 연구가 행해졌고 현재도 여러 분야로 세분하여 더욱 정밀한 연구가 수행되고 있다. 김치 제조 단계별로 화학적, 물리적 연구가 이루어졌으며 숙성중의 여러 성분 변화에 대한 연구 그리고 저장성을 증대하기 위한 연구, 김치발효에 관여하는 미생물의 연구 등으로 구분지어서 생각할 수 있다(74).

김치는 채소절임과 발효의 특성을 동시에 지니는데 그 중 김치에서의 발효가 진행됨에 따라 미생물의 군 총에도 변화가 오게 되는데, 김치 발효 초기에는 호기성 세균인 *Achromobacter*속과 *Bacillus*속 등이 우점하며 이어 이종젖산 발효균(heterofermentative lactic acid bacteria)속이 우세하게 증식하여 젖산 이외에 초산 등의 유기산들과 ethanol, 탄산가스를 생산하여 산의 생성이 점점 많아지고 이후 발효 후기에는 혐기성 세균인 *Lactobacillus*속 등이 동종젖산발효균(homofermentative lactic acid bacteria)이 증식하며 젖산이 더욱 왕성하게 생성된다(63). 이러한 미생물의 군 총의 변화와 김치의 숙성 온도, 저장 용기, 저장 방법 등에 따라 김치의 발효는 달라지는데, 일반적인 김치의 발효조건으로 김치를 제조하고 장기 저장할 경우, 김치 발효 후기에 관여하는 동종젖산발효균의 과도한 생성으로 산패를 유도하며 그 외 생성되는 미생물과 효소작용에 의해 불쾌한 휘발성 유기화합물의 생성으로 인하여 맛과 냄새가 나빠지고 산막효모가 번식하고 펙틴의 분해로 배추조직의 연부현상이 나타나 김치 품질이 떨어지게 된다(69). 김치의 산패 현상으로 젖산균의 과도한 생성으로 인한 신맛, 효모 등에 의한 이취(군덕내), 그리고 polygalacturonase라는 미생물의 효소작용으로 인한 배추의 연부현상을 들 수 있는데 김치의 숙성기간 연장에 대한 연구는 물리 화학적인 방법, 항생물질과 합성 보존료의 첨가 등의 특정 물질을 첨가하여 그 물질이 산패를 일으키는 균을 억제하는 방법, 유산균을 이용한 천연 보존제를 사용하는 방법까지 끊임없이 연구되어지고 있는 실정이다. 그 중 이 문제를 해결하기 위해 김치에 유산균과 효모 등을 starter를 첨가하는 시도가 있었다. Kim 등(36)은 *Saccharomyces* sp. 등을 스타터로 사용하였고, 이 밖에도 Lee와 Kim(49)은 *Lactobacillus plantarum* 등의 4가지 복합 균을, Kang 등(23)과 Kim 등(35)은 *Leuconostoc mesenteroides* 변이 주를, Ha와 Cha(16) 그리고 Moon 등(56)은 bacteriocin을 생산하는 *Enterococcus* sp. 등을, Choi 등(11)은 호염성 *Lactobacillus* sp.를, Park 등(61)은 *L. mesenteroides*와 *Bifidobacterium bifidum*을, So 등(67)은 *Leuconostoc*과 *Lactobacillus*속 스타터를, Cho와 Rhee(8,9)는 *L. plantarum*, *L. mesenteroides*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus brevis* 등의 젖산균을, Kim 등(34)은 *L. mesenteroides*의 내산성 변이주와 *Saccharomyces fermentati* 등을, Chae와 Jhon(3)은 *Bifidobacterium animalis*를 사용하여 숙성제품의 미생물 조성과 맛 또는 저장성을 조절하고자 하였다. 이러한 시도들은 원료를 열처리하는 등으로 김치의 제조방법을 변형하거나, 스타터가 지배균으로 성장하는지에 대한 자료가 부족하였고, 맛과 미생물 조성에 미

치는 스타터의 영향에 대해 보고하지 않았다(19). 그 외 Chang(5)의 bacterion 생성 능이 있는 유산균 *Leuconostoc citerum* GJ7을 김치의 starter로 이용함으로써 김치의 저장 기간을 연장하는 연구까지 현재 이어져 오고 있다.

그러나 이러한 김치의 숙성기간에 연장에 관계없이 숙성과 저장 조건이 최적으로 유지되면 수개월 또는 그 이상 경과하여도 묵은 김치로서의 독특한 풍미와 조직감을 유지시킬 수 있는데 이러한 최적 조건에서 생성되는 김치를 우리는 묵은지라 한다.

묵은지의 정의는 정확히 밝혀진 바 없으나 묵은지는 김장철 속이 단단한 겨울 배추를 이용하고 묵은지와 일반 김치의 차이점은 김치를 담글 때 일반 김치는 배추 속에 들어갈 야채를 많이 쓰는 편이지만 묵은지의 경우, 배추 이외의 야채는 거의 쓰지 않는다. 또한 일반 김치의 경우 양념을 풍부하게 사용하는 반면, 묵은지 제조 시에는 양념을 최소화하며 배추의 단단한 조직감을 장기간 유지하기 위하여 염 농도를 일반 김치에 비하여 1~1.5% 이상 높여 담는다. 묵은지는 지난 해 겨울에 담갔다가 6개월에서 1년 이상 저온에서 숙성 저장시켜 따뜻한 계절에 김장김치의 맛을 느끼게 하는 별미김치를 말하기도 한다(73). 또한 묵은지의 발효 및 저장 방법을 보면 단순 저장법과 복합 저장법으로 나뉘게 되는데, 단순 저장법은 처음부터 한 조건에서 저장하는 방법이고 복합 저장법은 15℃ 정도의 실온에서 일정기간 발효시킨 후 -1℃ 김치냉장고나 땅에 독을 묻어 숙성 저장하는 방법이다.

한국농촌경제연구원의 2011년 김장시장 분석과 전망 보고(75)에 의하면, 소비자들의 김치에 대한 소비가 가장 많은 종류는 배추김치(61.5%), 무김치(22.0%), 기타 김치(16.5%)순으로 배추김치가 가장 많은 부분을 차지하였고, 또한 배추김치 숙성 상태별 맛에 대한 선호도 조사 결과, 잘 익은 김치(36%), 생김치와 조금 덜익은 김치(27%), 묵은지(9%), 그리고 신김치(7%) 순으로 나타났고, 묵은지에 대한 선호도는 점점 높아지는 현황이라고 밝혔다. 이는 묵은지가 최근 웰빙 음식을 선호하는 추세에 따라 묵은지를 이용한 요리에 대한 관심과 선호도가 높아졌고(21) 묵은지를 이용한 응용요리와 이의 이화학적 특성에 관한 연구가 이루어지고 있기 때문이다(39). 이에 따라 묵은 김치에 관한 연구 및 상품화에 많은 기업들의 관심이 활발해지고 있으며 한류열풍과 함께 외국에서 우리음식인 김치와 장류 등의 발효음식과 다양한 응용요리 개발 및 김치 등 발효음식 관련 첨가연구가 지속되고 있는 실정이다(21). 묵은지를 이용한 응용요리에 관한 연구로는 묵은지를 첨가한 만두(44), 묵은지를 첨가한 떡갈비(43), 허브를 첨가한 묵은지 볶음밥과 묵은지 찌개(21) 등이

있으며, 그 외에도 묵은지는 전, 찜, 말이, 볶음, 국수, 감자탕, 조림, 탕, 구이, 전골, 비빔밥 등에 아주 다양하게 응용되어 판매되고 있다. 또한, 묵은지로부터 분리한 유산균의 기능성 조사에 대한 연구(32)도 발표되었다. 상품 묵은지는 2000년부터 소개되어, 2003년부터 본격적으로 생산 판매하게 되었다. 묵은지 시장규모는 2005년부터 급격하게 증가한 것으로 나타났고, 업체 생산규모는 전문 업체와 소규모 업체로 분리되어 생산하는 것으로 알려졌다. 묵은지는 일반적으로 11월 중순에서 익년 5월까지 생산 가능하나, 1월과 2월에 집중 생산하며, 묵은지의 제조방법은 일반 김치에 비해 많은 양의 소금을 사용하고 짓갈의 종류와 량이 다르며 각 지역별, 업체별, 가정에 따라 그 차이가 크다고 볼 수 있다. 일부 업체에서 절임 및 탈수공정과 양념 배합비를 차별화 하고 있지만, 이는 업체마다 다르며 자세한 정보도 알기 어려운 실정이다. 묵은지의 상품화에 대한 기업들의 관심은 높아지고 있으나 묵은지에 대한 국가적인 품질규격은 적립되어 있지 않고 또한 품질규격의 확립에 있어 묵은지의 발효현상이나 영양학적 우수성에 대한 과학적 자료 확충이 우선 필요할 것으로 보인다.

묵은지에 대한 관심과 선호도가 높아지고 이를 응용한 음식이 늘어남에 따라 묵은지에 대한 수요가 급격히 상승하여 단기간에 묵은지를 제조할 수 있는 방법에 대한 연구가 현재 무엇보다도 필요한 실정이다. 현재까지 숙성 묵은지 제조와 묵은지 품질 향상을 위한 제조 방법에 대한 연구로는 폐 터널이나 동굴에서 3개월 이상 1년간 묵은 김치를 제조, 숙성발효 및 보관하는 방법(72), 고추씨와 분쇄된 고추를 포함하는 양념을 절인 배추에 첨가하여 3~6개월 동안 숙성하는 방법(20), 김치 발효시 유산균의 일종인 *Lactobacillus platarum* KCTC 3928을 접종하여 발효시킨 후 건조 분말 김치를 제조하는 방법(13), 김치에서 분리한 *Leuconostoc*속 유산균과 내염성 *Saccaromyces*속 효모를 무즙 배지에서 배양하여 각각의 미생물 스타터를 김치에 첨가하여 숙성시키는 방법(7), 해양심층수가 주원료인 염수에 절인 배추에 열처리 마늘을 포함하는 부재료를 배합하여 김치를 제조하고 발효와 숙성과정을 거침으로써 묵은 김치를 숙성으로 제조하는 방법(50), 미네랄이 첨가된 증류수에 유산균을 배양하여 함수포도당과 돼지 사골육수추출액을 혼합하여 이를 김치에 적용하여 2차적으로 숙성하여 묵은지를 숙성으로 제조하는 방법(51) 등이 있다. 그러나 현재까지 밝혀진 숙성 묵은지 제조 방법들은 묵은지라 판단할 수 있는 관능적 특성에 대한 근거가 부족하였고 기간 숙성에 의한 비용의 증가와 대량 숙성 저장을 위해서 관리의 어려움과 대용량의 저장시설이 필요로 하는 문제점이 있었다. 또

한, 단 기간 내 제조한 속성 묵은지는 맛과 풍미를 향상시키는 방법에 중점을 둔 연구가 전적으로 많았고 또한 속성 묵은지 내 존재하는 유산균의 수가 일반 속성 김치의 유산균 수보다 현저히 적은 결과를 보고 하는 등 실질적으로 묵은지 산업에서 이용하기에는 어려움이 있는 것으로 보였다.

따라서, 본 연구는 최근 높아진 묵은지에 대한 관심과 이를 응용한 요리에 대한 선호도가 증가함에 따라 생겨난 문제점인 수요량 급증과 그에 대한 공급 부족 현상에 대한 방안으로서, 우리나라 전통발효 식품인 김치로부터 유산균을 분리하고 분리유산균주의 특성을 규명하여 이를 김치액에 1차적으로 적용하여 맛에 대한 선호도가 높은 균주를 선별하여 2차적으로 선별된 균주를 김치에 적용하여 제조함으로써 맛이 우수하고 단기간에 일반 묵은지와 같은 맛과 풍미 그리고 질감을 갖는 속성 묵은지 제조의 가능성을 제시하고자 하였다. 또한 유산균을 김치의 starter로 적용하고 발효 최적화를 통하여 묵은지 제조기간을 단축하고 김치의 맛에 대한 일관성을 부여하며 동시에 김치발효를 인위적으로 조절하여 품질이 균일한 속성 묵은지 제조의 실현 가능성을 제시하고자 하였다.

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 starter 균주의 분리 · 동정 및 특성규명

1. 속성 묵은지 starter 균주의 분리

속성 묵은지 starter 균주를 분리하기 위하여 다양한 김치로부터 분리한 김치 유산균 중 김치 후기 발효에 관여하는 김치 간균 유산균 (*Lactobacillus* 속) 총 29종을 김치 여과액에 적용하여 그 발효취를 조사하였다. 분리 균주는 MRS액체배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후에 25%(w/v) glycerol stock으로 -70℃에서 보관되어 있었고, 실험에 사용할 경우에는 5 mL MRS 액체배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후에 본 배양할 배지에 계대하여 사용하였다. 김치 여과액을 얻기 위하여 담금 직후의 김치 내용물 전체를 마쇄한 후에 멸균거즈로 여과하였다. 김치 여과액을 얻은 후 멸균된 삼각 플라스크에 100 mL 씩 담았다. 준비된 플라스크에 각각의 균주를 1% (v/v) 접종하고 15℃에서 24~48시간 배양 후, 김치 액의 향과 맛에 대하여 관능평가를 실시하였다. 또한, 그 김치 여과액을 멸균수를 이용하여 적정배율로 단계적으로 희석하여, CaCO₃(Amersco Inc., USA) 이 2%(w/v) 첨가된 De Man Rogosa Sharpe(MRS; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후 30℃에서 평판배양한 후, 투명환을 형성하는 colony를 관찰하여 우점 여부를 확인하였다.

2. 균주의 동정

분리된 유산균의 동정을 위하여 일차적으로 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 그람염색(Gram stain kit, DB Co., USA) 및 현미경 관찰과 API 50 CHL system (BioMerieux, Marcy l'Étoile, France)을 이용하여 당 발효 능력을 조사한 후에 균주동정 프로그램 (<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 균주를 동정하였다. 최종적인 동정을 위하여 분리균주의 16s rDNA 염기서열을 결정하여 알려진 균주들과 비교하였다. 16s rDNA 염기서열을 분석하기 위하여, 분리 균으로부터의 genomic DNA 추출은 Genome DNA kit(Q-Biogene, USA)을 사용하였다.

3. 균주의 특성

1) 배양시간에 따른 생육도

분리균주의 배양시간에 따른 생육도를 조사하기 위하여 MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 48시간 동안 정치배양 하면서 매 6시간마다 A₆₀₀(Ultra spec 2100 pro, Amersham Biosciences Co. England)에서 흡광도를 측정하여 변화를 조사하였다. 흡광도는 3회 반복하여 측정하였다.

2) 배지의 초기 pH에 따른 생육도

배지의 초기 pH가 분리유산균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 1N NaOH 또는 1N HCl로 pH 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 그리고 10.0으로 보정한 100 mL MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치배양한 후 A₆₀₀(Amersham Biosciences Co. England)에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 흡광도는 3회 반복하여 측정하였다.

3) 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도

배지의 초기 NaCl 농도가 균주의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, NaCl을 0,1,3,5 및 7%(v/v) 첨가한 100 mL MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치배양한 후 A₆₀₀(Amersham Biosciences Co. England)에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 흡광도는 3회 반복하여 측정하였다.

4) 내산성 측정

균주의 내산성을 측정하기 위하여, 균주를 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 배양한 후 원심분리(9,950 ×g, 5 min)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 다음, pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 조정된 MRS 배지에 첨가하여 30℃에서 24시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

5) 균주의 D/L-lactic acid의 농도측정

균주의 lactic acid form을 알아보기 위하여 lactic acid 정량 Kit (Roche, r-biopharm, D-lactic acid/L-lactic acid)(46)을 이용하였다. 시료는 각 균주에 맞는 희석배수를 정하여 멸균수에 희석하여 준비하였다. 최종 값에 희석배수 값을 곱하여 계산하였다.

6) 콜레스테롤 저하능

균주의 콜레스테롤 저하능을 측정하기 위하여, *O*-phthalaldehyde method(52)를 사용하였다. 5 mL MRS 액체배지에 균주를 1% 접종하여 혐기적으로 정치 배양하고 원심분리(9,950×g, 5 min, 4°C)하여 상등액을 얻었다. 30°C와 37°C에서 균을 배양하였으며 24시간, 48시간 배양액을 각각 사용하여 실험하고 그에 따른 수치를 측정하였다. 각 균에 대하여 3회 반복 수행하였다. 1 mL의 상등액에 2 mL KOH(50% wt/wol) 용액과 3 mL absolute ethanol(95%)을 취하고 1분 동안 vortex 한 후 60°C water bath에 10분 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 흐르는 물에 충분히 식히고 hexane을 5 mL를 취한 후 5~20초간 vortex하였다. 1 mL의 3차 증류수를 취하고 다시 같은 시간동안 vortex를 하였다. 층이 분리되도록 10분간 상온에 방치하면서 층이 분리되는 것을 확인하고 상층에 생기는 hexane층에서 3 mL를 취하여 깨끗한 test tube에 옮겨 담았다. 60°C water bath에 test tube를 반쯤 닫근 상태에서 질소가스를 이용하여 hexane층을 증발시켜 농축하였다. 농축한 hexane이 담긴 test tube에 4 mL의 *O*-phthalaldehyde 용액(0.5 mg/ml *O*-phthalaldehyde in glacial acetic acid)을 취하고 충분히 vortex하였다. *O*-phthalaldehyde 용액은 실험에 사용하기 바로 직전에 만들어 사용하였다. 10분간 상온에 방치한 후 2 mL의 황산을 넣고 5~20초간 vortex하고 10분간 다시 상온에 방치하였다. 1 mL의 액을 Y-cell에 취하여 A₅₅₀(Amersham Biosciences Co. England)에서 흡광도를 측정하였다. 각 균주에 대하여 3회씩 반복 수행한 값을 측정하고 이를 standard curve와 비교하였다.

Computer와 Spectrophotometer(Amersham Biosciences Co. England)를 연결하여 Swift II - Quantification을 이용하여 standard curve를 작성하고 균주의 콜레스테롤 저하능 수치를 측정하였다.

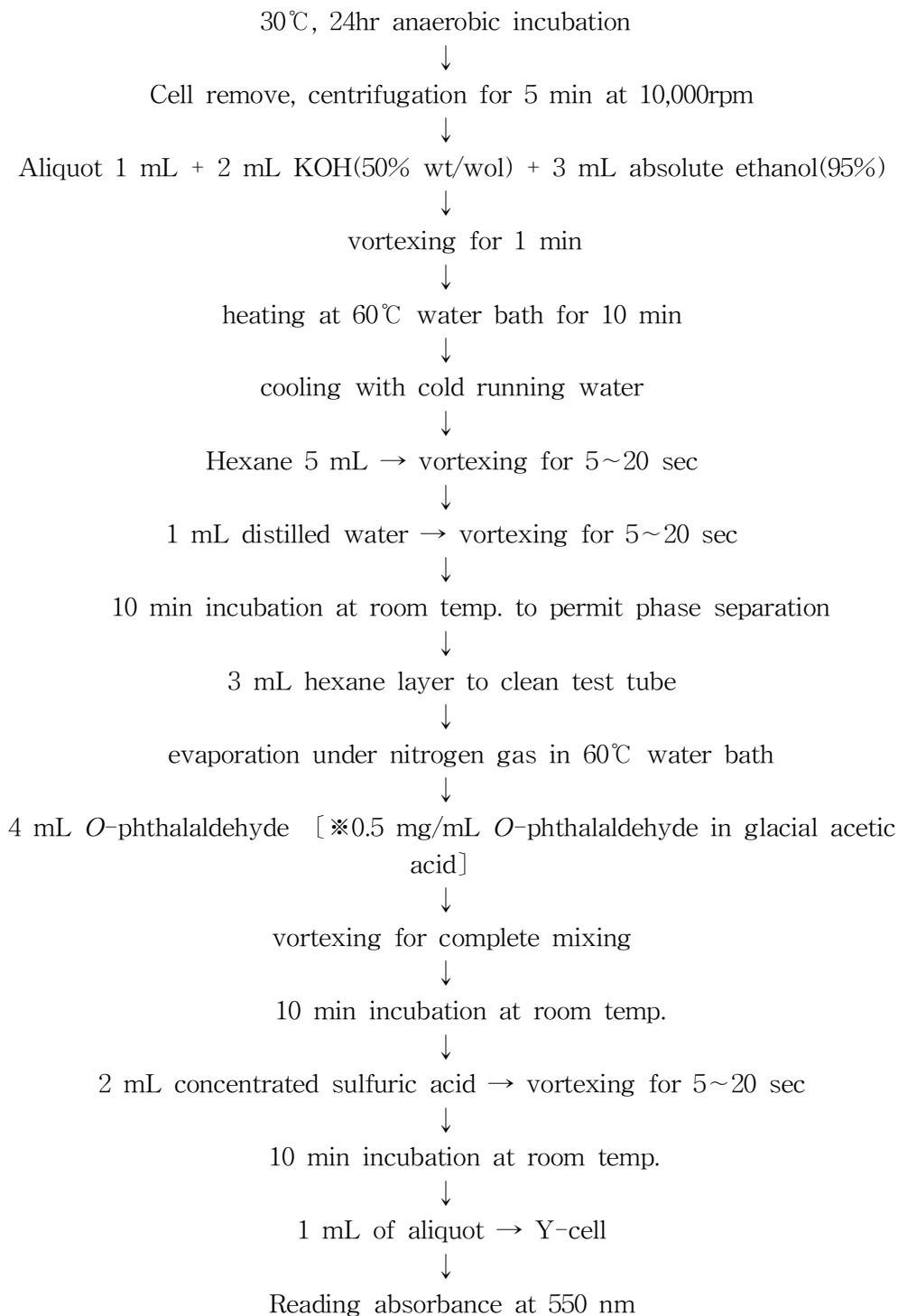


Figure1. *O*-phthalaldehyde Method (52)

7) 항균 활성 조사

조항균 물질의 준비는 Direct method(31)의 경우, 분리균주를 5 mL MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 정치하면서 전 배양하였다. 배양액 1 mL를 원심분리(9,950 ×g, 15 min)하여 상정액은 제거하고 균체에 100 μL MRS 액체배지로 희석한 액을 900 μL soft agar에 함유시켜 사용하였다. Paper disk assay(66)의 경우, 분리균주를 5 mL MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 동안 정치하면서 전 배양하였다. 100 mL MRS 액체 배지에 1%의 전배양액을 접종하고, 다시 30°C에서 24시간 동안 본 배양하였다. 본 배양액을 4°C에서 원심분리(9,950 ×g, 15 min)하여 얻은 상정액을 0.45 μm 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) 완충액 또는 3차 증류수에 녹여 5배 농축 배율로 준비하여 항균 활성 실험에 사용하였다. 분리 유산균주의 항균물질 생산여부를 조사하기 위하여 Direct method와 Paper disk method를 병행하였다. Direct method는 유해 균주를 지시균으로 사용한 경우에 LB 고체배지에 지시균을 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 농도로 도말한 후 직경 5.00 mm로 구멍을 내고 그 구멍에 분리 유산균주를 soft-agar에 함유시켜 넣었다. 37°C에서 24시간 배양하며 유산균주의 환의 크기를 측정하였다. Paper disk method는 상기의 방법으로 제조한 조항균 물질을 LB 고체배지에 지시균을 $10^5 \sim 10^6$ CFU/mL 농도로 도말한 후 8 mm의 직경의 paper disk(diameter 8.00mm, Advantec Co., Japan)에 100 μL 일정하게 가하여 지시균에 대한 생육 저해 활성을 측정하였다. 생육 저지환은 digimatic caliper(CD-15CPX, Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 지름을 측정하였다. 분리된 유산균의 항균물질 생산능 검증용 지시균으로 유해균주 *Bacillus subtilis* ATCC 6633 을 사용하였다.

항균 활성을 나타내는 원인이 균주가 생성하는 젖산에 의한 것인지 균주가 생산하는 항균 물질에 의한 것인지 확인하기 위하여 pH를 조정하여 항균 활성을 측정하였다. pH는 균주의 배양액의 pH인 4.0을 기준으로 하여 pH 5.0, 5.5, 6.0으로 조정된 조항균 물질을 이용하여 Paper disk method와 같은 방법으로 시행하였다.

제 2 절 분리 균주를 이용한 속성 묵은지 제조와 발효특성

1. 속성 묵은지의 제조

김치 후기 발효에 관여하는 정상(homo형) 젖산균을 김치의 starter로 이용하여 김치발효 시스템(비살균 개방형 발효시스템)에 적용함으로써 김치발효를 인위적으로 조절하여 품질이 균일하며 맛이 좋은 속성 묵은지 제조가 가능한지, 오랜 저장기간에도 김치 내에 유산균이 존재할 수 있는지 또한 유산균이 갖는 항균활성으로 김치의 보존성을 향상시킬 수 있는지를 조사하였다.

1) 김치의 제조

김치 제조에는 김치로부터 분리한 정상(homo형) 젖산균 균주인 *Lactobacillus plantarum* AF1, *Lactobacillus sakei* WJ1, *Lactobacillus sakei* SC1, 그리고 *Lactobacillus sakei* YY1을 사용하였다. 김치 제조 시 사용된 절임배추는 광주 지역 김치 제조 공장으로부터 제공받았고, 양념과 배합하기 전 4~5시간 탈수하였다.

김치 양념 배합비는 탈수된 절임배추 100 g에 대하여 1) 고춧가루 2.7 g, 마늘 1.33 g, 생강 0.5 g, 까나리 젓 4.06 g, 무채 1.2 g, 쪽파 1.33 g, 배 1.22 g, 당근 0.66 g, 설탕 0.86 g, 찹쌀 풀 6.1g로 일반 김치와 같은 재료를 사용하여 김치를 제조하였고, 2)의 경우, 김치의 최종 염도가 일반 묵은지와 같이 3.0%(w/v)가 되도록 하고, 액젓과 찹쌀의 비율은 낮추고 고춧가루의 비율은 높여 제조하였다.

균주 배양액은 원심분리 (9,950×g, 15 min, 4℃) 후 멸균수로 2회 세척하여 김치 양념에 혼합하였으며, 균 첨가량은 총 김치 무게의 1%(w/v)가 되도록 준비하였다. 제조한 김치는 폴리에틸렌수지 또는 나일론+PE 1 kg용 포장지에 담아 진공 포장하였다. 포장한 김치는 15℃에서 발효시킨 후 -1℃ 김치냉장고 (Dimchae DD-1827DFB, Winiamando, Asan, Korea)에서 보관하여 시료로 사용하였다. 김치 제조는 3회 반복 수행하였다.

2) 발효 온도 설정

속성 묵은지 제조에 있어 김치의 발효 온도를 설정하기 위하여 100 mL MRS 액체배지에 분리 유산 균주를 1%(v/v) 접종하였고, 10°C, 12°C, 15°C, 18°C, 20°C에서 60시간 정치배양하며 매 12시간마다 A₆₀₀(Ultro spec 2100 pro, Amersham Biosciences Co., England)에서 흡광도를 측정하여 생육도를 확인하였다. 흡광도는 3회 반복하여 측정하였다.

2. 일반분석

1) pH 및 산도의 측정

김치는 hand blender(HHM-620, Hanil, Seoul, Korea)로 마쇄하여 멸균거즈를 이용하여 여과한 김치액을 실험에 사용하였다. pH는 pH meter(545 pH meter, Denver, Arvada, Co., USA)를 사용하여 실온에서 측정하였으며, 산도는 AOAC (Association of official analytical chemists) 방법(2)에 의하여 김치액 10 mL를 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.3이 될 때까지 적정하여 소비된 0.1 N NaOH용액을 아래 식에 의하여 환산하여 총산함량(% , w/w)으로 표시하였다.

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

a : 0.1 N NaOH 용액의 소비 mL수

f : 0.1 N NaOH 용액의 factor (0.001)

F: 0.1 N NaOH 용액의 1 mL에 상당하는 유기산 계수 (젓산인 경우 0.009)

2) 염도 및 당도 측정

김치를 마쇄하여 멸균거즈를 이용하여 여과한 김치액을 염도계(Sekisui Co. SS-21A, Japan)을 사용하여 김치의 염도를 측정하였고, 당도계(Atago Co., Ltd. Japan)를 사용하여 김치의 당도를 측정하였다.

3. 미생물균수의 측정

김치를 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치액을 멸균수를 이용하여 적정배율로 단계적으로 희석하여, MRS, CaCO₃가 2% 함유된 MRS, LB, 그리고 YPD 고체배지에 100 μ L 도말하여 30°C에서 48시간 배양한 후 형성된 colony를 그람염색 및 현미경으로 관찰하였다.

4. 색도 및 물성 측정

김치를 마쇄하여 멸균거즈를 이용하여 여과한 김치액을 색차계(CM-3500d, Konica minolta, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정한 후 Hunter's scale L (lightness), a (redness), b (yellowness) 값으로 표시하였다. 또한, 김치의 물성은 Texture Analyzer (TA-XT Plus, Stable Microsystems, Godalming, UK)를 사용하였다. 배추하단으로부터 9 cm 부위의 두께가 4~5mm인 김치를 2×2 cm 로 절단한 후 측정하였다. 측정조건은 2×2 cm 로 절단하여 준비한 김치 시료를 36 mm Dia Aluminium probe로 시료 두께의 60%까지 관통하면서 받는 최대 힘으로 표시하였다. 이 때 pre-test speed는 5.0 mm/s, test speed는 1.0 mm/s, post-test speed는 10.0 mm/s였고, trigger type은 auto-5 g 조건으로 측정하였다. 각 실험군당 5개의 시료를 측정하여 측정치가 가장 높거나 가장 낮은 것을 제외한 3개를 평균 내어 그 값을 나타내었다.

5. 속성 묵은지의 관능조사

균주 *Lactobacillus plantarum* AF1, *Lactobacillus sakei* WJ1, *Lactobacillus sakei* SC1, 그리고 *Lactobacillus sakei* YY1 4종을 김치에 적용한 속성 묵은지에 대하여 관능적인 특징 및 기호도를 조사하기 위하여 조선대학교 식품영양학과 대학원생 15명을 대상으로 일정 기간마다 김치에 대하여 관능평가를 실시하였다. 관능검사는 blind test 방식을 이용하였고, 맛, 냄새, 조직감, 색깔 및 전반적인 기호도에 대하여 구술하였다.

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 starter 균주의 분리 · 동정 및 특성규명

1. 속성 묵은지 starter 균주의 분리

다양한 김치로부터 분리하여 실험실에서 보유중인 김치 유산균 중 김치 후기 발효에 관여하는 김치 간균 유산균 (*Lactobacillus* 속) 총 29종을 김치 여과액에 적용하여 그 발효취를 조사하였다. 담금 직후의 김치를 마쇄하여 김치 여과액을 얻은 후 멸균된 삼각 플라스크에 100 mL 씩 담았다. 준비된 플라스크에 각각의 균주를 1% (v/v) 접종하고 15°C에서 24~48시간 배양 후, 김치 액의 향과 맛에 대하여 관능평가를 실시하였다. 접종 균주에 따라 김치발효액은 각기 다른 향과 맛을 나타내었으며(Table 1), 시험된 총 29종의 김치 발효액 중 가장 묵은지 향과 유사하며 기호도가 좋은 균주 4종을 최종적으로 선별하였다(*Lactobacillus plantarum* AF1, WJ1, SC1, YY1). 4종의 균주가 적용된 김치액을 CaCO₃가 2% (w/v) 첨가된 MRS 고체배지에 도말하여 30°C에서 48시간 동안 평판배양하며 균의 우점을 확인하였다. 이미 동정이 되어 있는 균주 *Lactobacillus plantarum* AF1(65)을 제외한 나머지 3종의 분리균주를 동정하기 전까지 편의상 WJ1, SC1, 그리고 YY1이라 명명하였다.

Table 1. Changes of pH and sensory evaluation on 29 selected *Lactobacillus* spp. strain applied to kimchi juice at 30°C for 48h

균주	학명	48시간 배양 후 pH	관능결과
BU1	<i>Lactobacillus curvatus</i>	3.9	향에 대한 긍정적 평가
봉운사1	<i>Lactobacillus</i> sp	3.9	깔끔하며 시원한 맛이 있지만 신맛 강함
곡성4	<i>Lactobacillus</i> sp.	3.9	발효취가 풍부, 군덕내가 약간 남
전복1	<i>Lactobacillus</i> sp.	3.9	신맛과 단맛이 조금씩 남
NJ1	<i>Lactobacillus sakei</i>	3.8	특유의 단맛을 지님
SI3	<i>Lactobacillus sakei</i>	3.9	쓴맛이 약간 있음
AF1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.5	깊은 맛이 나며 끝맛이 달고 발효취가 많음
HD1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.5	향이 좋으며 깊은 맛이 나지만 신맛 강함
고서2	<i>Lactobacillus</i> sp	3.9	연한 단맛이 있고 후 향이 긍정적
NO1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.5	신맛이 약간 있지만 달고 깊은 맛 지님
SC1	<i>Lactobacillus</i> sp	4.1	달고 깔끔하며 풍부한 향 청량감 조금 느껴짐
SC4	<i>Lactobacillus</i> sp.	4.1	깔끔하고 발효취가 약간 있지만 풋 냄새 남
굴1	<i>Lactobacillus</i> sp	4.0	후 향에 대한 긍정적인 평
증심사6	<i>Lactobacillus</i> sp	4.1	깔끔하고 청량감 약간 느껴짐
WJ1	<i>Lactobacillus</i> sp	4.2	달고 맛이 깔끔하며 향이 좋음
GR4	<i>Lactobacillus</i> sp.	4.0	끝에 나는 특이한 향이 있음
중흥2	<i>Lactobacillus</i> sp.	4.0	향이 풍부하며 맛이 좋음
석C4-1	<i>Lactobacillus</i> sp	4.1	시원한 맛에 약간 쓴맛
MS1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	4.0	깊은 맛이 느껴지나 이취가 남
배추C	<i>Lactobacillus sakei</i>	4.1	청량감이 약간 있음
불C1	<i>Lactobacillus sakei</i>	3.9	약한 단맛을 지님
달성사1	<i>Lactobacillus</i> sp	3.9	깔끔하며 개운한 맛
주월1	<i>Lactobacillus</i> sp.	3.9	단맛이 약간 있음
주월3	<i>Lactobacillus</i> sp	3.9	약간 시고 새콤한 맛
HA1	<i>Lactobacillus</i> sp	3.9	끝맛이 달고 후 향이 풍부함
HA2	<i>Lactobacillus</i> sp.	3.9	끝에 단맛이 있음
YY1	<i>Lactobacillus</i> sp	3.9	단맛이 있으며 시원하고 깔끔한 맛
진도C1	<i>Lactobacillus</i> sp	3.9	끝에 약한 군덕내
대C3	<i>Lactobacillus sakei</i>	3.9	발효취가 많음

2. 분리균주의 분류 및 동정

Lactobacillus plantarum AF1(67)을 제외한 나머지 3종 WJ1, SC1, 그리고 YY1의 생태학적, 배양학적 특성 및 당 대사능을 통한 생화학적 특성, 그리고 16s rDNA 염기서열 분석을 통한 분자생물학적 특성을 살펴보았다.

(1) 형태 및 배양학적 특성

분리균주 3종을 MRS 액체배지에 접종하여 24시간 혐기 배양하고 gram staining을 하여 광학현미경으로 관찰한 결과 (Table 1, Figure 2) 분리 균주 3종은 그람양성의 간균이었고 colony는 3종 모두 등근 형이었다. 균주 AF1의 colony 색은 불투명한 연한 노란 빛을 나타내었고, WJ1은 불투명 하얀색 그리고 SC1과 YY1은 불투명한 아이보리 빛을 나타내었다. 4종 균주 모두 colony 표면은 윤기가 흐르고 매끈하였다.

(2) 당 대사능

생화학적 특성으로 Biolog에 의한 유산균(*Lactobacillus* sp.)동정 kit에 해당하는 API 50 CHL을 통한 분리균주의 당 대사능을 검토한 결과는 Table 2에 나타내었다. 당 대사능의 결과로 간이동정해본 결과, *Lactobacillus sakei*는 아직 API에 등록되어 있지 않아 *Lactobacillus sakei*가 아닌 *Lactobacillus*속의 다른 종으로 나타났다. 따라서 본 Biolog data는 균주의 C-화합물의 대사능을 알아보는 자료로 삼았다. 일반적으로 *Lactobacillus sakei*가 대사하는 당 화합물로는 L-Arabinose, Galactose, Maltose, Melibiose, Sucrose등이 있고 분리균주 3종 모두 위 당 화합물에 대하여 대사반응을 일으키는 것을 확인하였다.

(3) 16s rDNA 염기서열 분석

이미 동정이 된 균주 *Lactobacillus plantarum* AF1(67)을 제외한 나머지 분리균주의 16s rDNA 염기서열 분석을 통한 균주동정을 위하여 분리 균주 3종으로부터 chromosomal DNA를 분리하였다. Figure 3~5에서와 같이 WJ1은 총 1503bp를, SC1는 총 1507bp, 그리고 YY1은 총 1492bp를 결정한 후 읽어진 16s rDNA 서열 분석은 Blast program을 사용하여 상동성을 검색하였다. 분리균주 WJ1, SC1, 그리고 YY1은 모두 *Lactobacillus sakei* DSM 20017과 99%의 높은 상동성을 나타내었으며, Figure 6에 16s rDNA 염기서열을 기초로 한 다른 bacteria와의 계통 발생론적 관계를 나타내었다.

분리유산균주 WJ1, SC1, 그리고 YY1의 당대사능을 포함한 일반적인 특성과 16s rDNA 염기서열을 분석한 결과 3종 모두 *Lactobacillus sakei*의 표준균주인 DSM20017과 비교하여 99.9%의 상동성을 갖는 결과로서, *Lactobacillus sakei* WJ1, *Lactobacillus sakei* SC1, 그리고 *Lactobacillus sakei* YY1으로 명명하였다.

Table 2. Morphological and cultural characteristics of the isolated strains *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1 and *Lb. sakei* YY1

Characteristics	AF1	WJ1	SC1	YY1
Gram-stain	+	+	+	+
Morphology	rod	rod	rod	rod
Colony	circular	circular	circular	circular
Colony surface	smooth	smooth	smooth	smooth
Colony color	yellow	white	ivory	ivory
Colony opacity	opaque	opaque	opaque	opaque

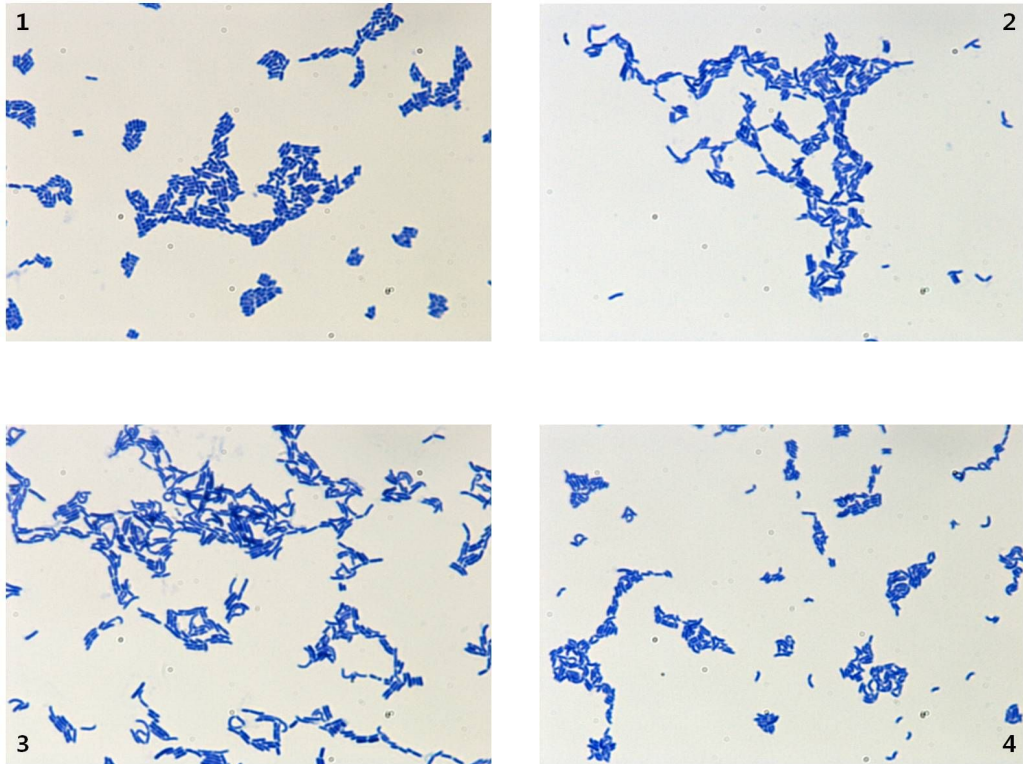


Figure 2. Gram staining of the isolated strain

1. Isolated strain *Lb. plantarum* AF1, 2. Isolated strain WJ1
3. Isolated strain SC1, 4. Isolated strain YY1

Table 3. Sugar utilization characteristics of the isolated strains *Lb. plantarum* AF1, WJ1, SC1, and YY1

Characteristics	AF1	WJ1	SC1	YY1	Characteristics	AF1	WJ1	SC1	YY1
Glycerol	-	-	-	-	Salicine	+	+	+	-
Erythritol	-	-	-	-	Cellobiose	+	-	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	Maltose	+	-	+	-
L-Arabinose	+	-	-	-	Lactose	+	-	+	-
Ribose	+	+	+	+	Melibiose	+	-	-	-
D-Xylose	-	+	+	+	Sucrose	+	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	Trehalose	+	+	+	+
Adonitol	-	-	-	-	Inuline	+	-	+	+
β -Methyl-xyloside	-	-	-	-	Melezitose	+	-	-	-
Galactose	+	-	-	-	D-Raffinose	+	-	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	Amidon	-	-	-	-
D-Fructose	+	+	+	+	Glycodene	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	Xylitol	-	-	-	-
L-Sorbose	-	+	+	+	β -Gentiobiose	+	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	D-Turanose	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	D-Tagatose	-	-	-	-
Manitol	+	-	-	-	D-Fucose	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	L-Fucose	-	-	-	-
α -Methyl-D-mannoside	+	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-	-
α -Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	L-Arabitol	-	-	-	-
N-Acetylglucosamine	+	-	+	+	Gluconate	+	+	-	+
Amygdaline	+	+	+	+	2-ceto-gluconate	-	-	-	-
Arbutine	-	-	-	-	5-ceto-gluconate	-	-	-	-
Esculine	+	-	-	-					

Incubation at 30°C for 48 hours

+ : positive reaction, - : negative reaction

1	AGGACGAACG	CTGGCGGCGT	GCCTAATACA	TGCAAGTCGA	ACGCACTCTC	GTTTAGATTG	60
61	AAGGAGCTTG	CTCCTGATTG	ATAAACATTT	GAGTGAGTGG	CGGACGGGTG	AGTAACACGT	120
121	GGGTAACTG	CCCTAAAGTG	GGGGATAACA	TTTGAAACA	GATGCTAATA	CCGCATAAAA	180
181	CCTAGCACCG	CATGGTGCAG	GGTTGAAAGA	TGGTTTCGGC	TATCACTTTA	GGATGGACCC	240
241	GCGGTGCATT	AGTTAGTTGG	TGAGGTAAAG	GCTCACCAAG	ACCGTGATGC	ATAGCCGACC	300
301	TGAGAGGGTA	ATCGGCCACA	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	360
361	AGTAGGGAAT	CTTCCACAAT	GGACGAAAGT	CTGATGGAGC	AACGCCGCGT	GAGTGAAGAA	420
421	GGTTTTCGGA	TCGTAAAACT	CTGTTGTTGG	AGAAGAATGT	ATCTGATAGT	AACTGATCAG	480
481	GTAGTGACGG	TATCCAACCA	GAAAGCCACG	GCTAACTACG	TGCCAGCAGC	CGCGGTAATA	540
541	CGTAGGTGGC	AAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGGCGTAAAG	CGAGCGCAGG	CGGTTTCTTA	600
601	AGTCTGATGT	GAAAGCCTTC	GGCTCAACCG	AAGAAGTGCA	TCGGAAACTG	GGAAACTTGA	660
661	GTGAGAAGA	GGACAGTGGA	ACTCCATGTG	TAGCGGTGAA	ATCGGTAGAT	ATATGGAAGA	720
721	ACACCAGTGG	CGAAGGCGGC	TGTCTGGTCT	GTAAC TGACG	CTGAGGCTCG	AAAGCATGGG	780
781	TAGCAAACAG	GATTAGATAC	CCTGGTAGTC	CATGCCGTAA	ACGATGAGTG	CTAGGTGTTG	840
841	GAGGGTTTCC	GCCCTTCAGT	GCCGCAGCTA	ACGCATTAAG	CACTCCGCT	GGGGAGTACG	900
901	ACCGCAAGGT	TGAAACTCAA	AGGAATTGAC	GGGGGCCCGC	ACAAGCGGTG	GAGCATGTGG	960
961	TTTAATTCTGA	AGCAACGCGA	AGAACCTTAC	CAGGTCTTGA	CATCCTTTGA	CCACTCTAGA	1020
1021	TCCCTTCGGG	TCCCTTCGGG	GACAAAGTGA	CAGGTGGTGC	ATGGTTGTGC	TCAGCTCGTG	1080
1081	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	TTATTACTAG	TTGCCAGCAT	1140
1141	TAAGTTGGGC	ACTCTAGTGA	GACTGCCGGT	GACAAACCGG	AGGAAGGTGG	GGACGACGTC	1200
1201	AAATCATCAT	GCCCTTATG	ACCTGGGCTA	CACACGTGCT	ACAATGGATG	GTACAACGAG	1260
1261	TTGCGAGACC	GCGAGGTTTA	GCTAATCTCT	TAAAACCATT	CTCAGTTCGG	ATTGTAGGCT	1320
1321	GCAACTCGCC	TACATGAAGC	CGGAATCGCT	AGTAATCGCG	GATCAGCATG	CCGCGGTGAA	1380
1381	TACGTTCCCG	GGCCTTG TAC	ACACCGCCCG	TCACACCATG	AGAGTTTGTA	ACACCCAAAG	1440
1441	CCGGTGAGGT	AACCCTTCGG	GGAGCCAGCC	GTCTAAGGTG	GGACAGATGA	TTAGGGTGAA	1500
1501	GTC	1503					

Figure 3. DNA sequence of the 16s rDNA from the isolated strain *Lb. sakei* WJ1

1	GGCTCAGGAC	GAACGCTGGC	GGCGTGCCTA	ATACATGCAA	GTCGAACGCA	CTCTCGTTTA	60
61	GATTGAAGGA	GCTTGCTCCT	GATTGATAAA	CATTTGAGTG	AGTGGCGGAC	GGGTGAGTAA	120
121	CACGTGGGTA	ACCTGCCCTA	AAGTGGGGGA	TAACATTTGG	AAACAGATGC	TAATACCGCA	180
181	TAAAACCTAA	CACCGCATGG	TGTAGGGTTG	AAAGATGGTT	TCGGCTATCA	CTTTAGGATG	240
241	GACCCGCGGT	GCATTAGTTA	GTTGGTGAGG	TAAAGGCTCA	CCAAGACCGT	GATGCATAGC	300
301	CGACCTGAGA	GGGTAATCGG	CCACACTGGG	ACTGAGACAC	GGCCCAGACT	CCTACGGGAG	360
361	GCAGCAGTAG	GGAATCTTCC	ACAATGGACG	AAAGTCTGAT	GGAGCAACGC	CGCGTGAGTG	420
421	AAGAAGGTTT	TCGGATCGTA	AAACTCTGTT	GTTGGAGAAG	AATGTATCTG	ATAGTAACTG	480
481	ATCAGGTAGT	GACGGTATCC	AACCAGAAAG	CCACGGCTAA	CTACGTGCCA	GCAGCCGCGG	540
541	TAATACGTAG	GTGGCAAGCG	TTGTCCGGAT	TTATTGGGCG	TAAAGCGAGC	GCAGGCGGTT	600
601	TCTTAAGTCT	GATGTGAAAG	CCTTCGGCTC	AACCGAAGAA	GTGCATCGGA	AACTGGGAAA	660
661	CTTGAGTGCA	GAAGAGGACA	GTGGAATCC	ATGTGTAGCG	GTGAAATGCG	TAGATATATG	720
721	GAAGAACACC	AGTGGCGAAG	GCGGCTGTCT	GGTCTGTAAC	TGACGCTGAG	GCTCGAAAGC	780
781	ATGGGTAGCA	AACAGGATTA	GATACCTGG	TAGTCCATGC	CGTAAACGAT	GAGTGCTAGG	840
841	TGTTGGAGGG	TTTCCGCCCT	TCAGTGCCGC	AGCTAACGCA	TTAAGCACTC	CGCCTGGGGA	900
901	GTACGACCGC	AAGGTTGAAA	CTCAAAGGAA	TTGACGGGGG	CCCGCACAAAG	CGGTGGAGCA	960
961	TGTGGTTTAA	TTCGAAGCAA	CGCGAAGAAC	CTTACCAGGT	CTTGACATCC	TTTGACCACT	1020
1021	CTAGAGATAG	AGCTTTCCT	TCGGGGACAA	AGTGACAGGT	GGTGCATGGT	TGTCGTCAGC	1080
1081	TCGTGTCGTG	AGATGTTGGG	TTAAGTCCCG	CAACGAGCGC	AACCCTTATT	ACTAGTTGCC	1140
1141	AGCATTAGT	TGGGCACTCT	AGTGAGACTG	CCGGTGACAA	ACCGGAGGAA	GGTGGGGACG	1200
1201	ACGTCAAATC	ATCATGCCCC	TTATGACCTG	GGCTACACAC	GTGCTACAAT	GGATGGTACA	1260
1261	ACGAGTTGCG	AGACCGCGAG	GTTTAGCTAA	TCTCTTAAAA	CCATTCTCAG	TTCGGATTGT	1320
1321	AGGCTGCAAC	TCGCCTACAT	GAAGCCGGAA	TCGCTAGTAA	TCGCGGATCA	GCATGCCGCG	1380
1381	GTGAATACGT	TCCCGGGCCT	TGTACACACC	GCCCCGCACA	CCATGAGAGT	TTGTAACACC	1440
1441	CAAAGCCGGT	GAGGTAACCC	TTCGGGGAGC	CAGCCGTCTA	AGGTGGGACA	GATGATTAGG	1500
1501	GTGAAGT	1507					

Figure 4. DNA sequence of the 16s rDNA from the isolated strain *Lb. sakei* SC1

1	CGCACTCTCG	TTTAGATTGA	AGGAGCTTGC	TCCTGATTGA	TAAACATTTG	AGTGAGTGGC	60
61	GGACGGGTGA	GTAACACGTG	GGTAACCTGC	CCTAAAGTGG	GGGATAACAT	TTGGAAACAG	120
121	ATGCTAATAC	CGCATAAAAC	CTAACACCGC	ATGGTGTAGG	GTTGAAAGAT	GGTTTCGGCT	180
181	ATCACTTTAG	GATGGACCCG	CGGTGCATTA	GTTAGTTGGT	GAGGTAAAGG	CTCACCAAGA	240
241	CCGTGATGCA	TAGCCGACCT	GAGAGGGTAA	TCGGCCACAC	TGGGACTGAG	ACACGGCCCA	300
301	GACTCCTACG	GGAGGCAGCA	GTAGGGAATC	TTCCACAATG	GACGAAAGTC	TGATGGAGCA	360
361	ACGCCGCGTG	AGTGAAGAAG	GTTTTCGGAT	CGTAAAACTC	TGTTGTTGGA	GAAGAATGTA	420
421	TCTGATAGTA	ACTGATCAGG	TAGTGACGGT	ATCCAACCAG	AAAGCCACGG	CTAACTACGT	480
481	GCCAGCAGCC	GCGGTAATAC	GTAGGTGGCA	AGCGTTGTCC	GGATTATTG	GGCGTAAAGC	540
541	GAGCGCAGGC	GGTTCTTAA	GTCTGATGTG	AAAGCCTTCG	GCTCAACCGA	AGAAGTGCAT	600
601	CGGAAACTGG	GAAACTTGAG	TGCAGAAGAG	GACAGTGGAA	CTCCATGTGT	AGCGGTGAAA	660
661	TGCGTAGATA	TATGGAAGAA	CACCAGTGGC	GAAGGCGGCT	GTCTGGTCTG	TAACTGACGC	720
721	TGAGGCTCGA	AAGCATGGGT	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ATGCCGTAAA	780
781	CGATGAGTGC	TAGGTGTTGG	AGGGTTCCG	CCCTTCAGTG	CCGCAGCTAA	CGCATTAAAGC	840
841	ACTCCGCTCG	GGGAGTACGA	CCGCAAGGTT	GAAACTCAA	GGAATTGACG	GGGGCCCGCA	900
901	CAAGCGGTGG	AGCATGTGGT	TTAATTCGAA	GCAACGCGAA	GAACCTTACC	AGGTCTTGAC	960
961	ATCCTTTGAC	CACTCTAGAG	ATAGAGCTTT	CCCTTCGGGG	ACAAAGTGAC	AGGTGGTGCA	1020
1021	TGGTTGTCGT	CAGCTCGTGT	CGTGAGATGT	TGGGTAAAGT	CCCACAACGA	GCGCAACCCT	1080
1081	TATTAAGT	TGCCAGCATT	TAGTTGGGCA	CTCTAGTGAG	ACTGCCGGTG	ACAAACCGGA	1140
1141	GGAAGGTGGG	GACGACGTCA	AATCATCATG	CCCCTTATGA	CCTGGGCTAC	ACACGTGCTA	1200
1201	CAATGGATGG	TACAACGAGT	TGCGAGACCG	CGAGGTTTAG	CTAATCTCTT	AAAACCATTG	1260
1261	TCAGTTCGGA	TTGTAGGCTG	CAACTCGCCT	ACATGAAGCC	GGAATCGCTA	GTAATCGCGG	1320
1321	ATCAGCATGC	CGCGGTGAAT	ACGTTCCCGG	GCCTTGATCA	CACCGCCCGT	CACACCATGA	1380
1381	GAGTTTGATA	CACCCAAAGC	CGGTGAGGTA	ACCCTTCGGG	GAGCCAGCCG	TCTAAGGTGG	1440
1441	GACAGATGAT	TAGGGTGAAG	TCGTAACAAG	GTAACCA	1477		

Figure 5. DNA sequence of the 16s rDNA from the isolated strain *Lb. sakei* YY1

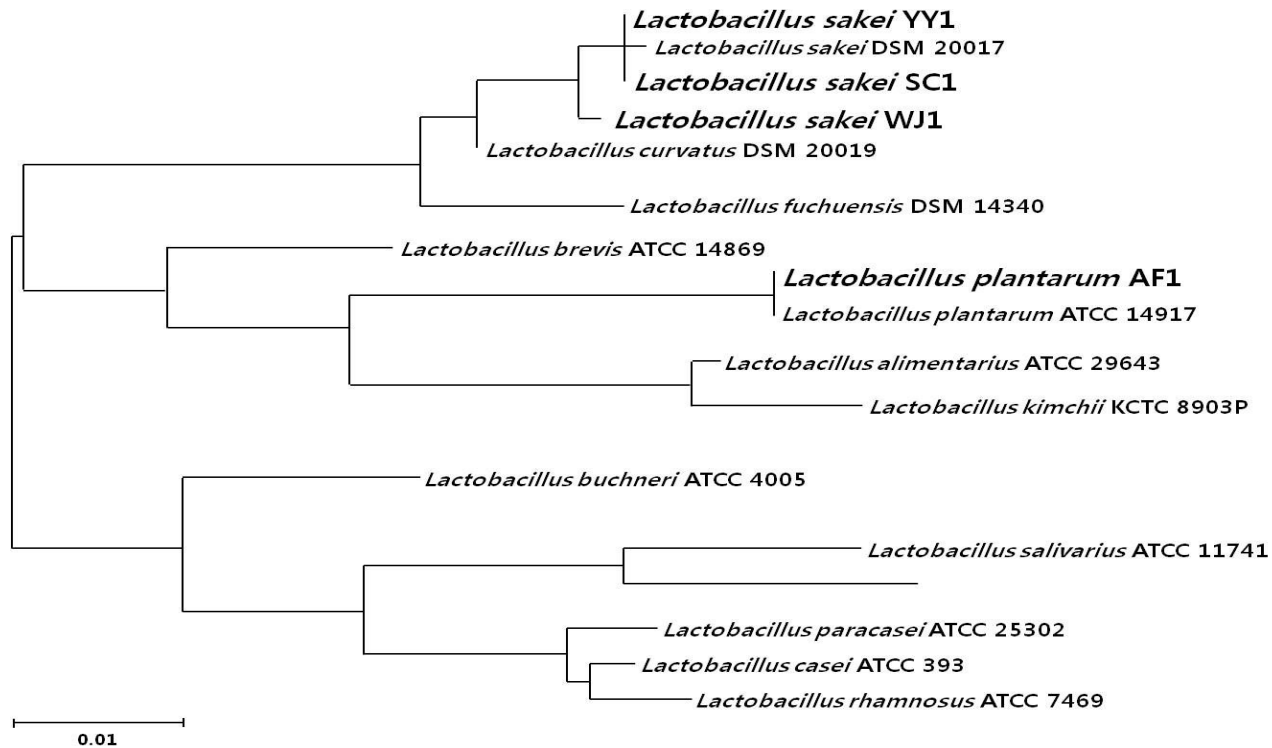


Figure 6. Phylogenetic relationship between *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1 and *Lb. sakei* YY1 and other related bacteria based on 16s rDNA sequence

3. 분리균주의 일반적 특성

(1) 배양시간에 따른 생육도

분리균주 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, *Lb. sakei* YY1을 30°C에서 48시간 동안 정치배양 하면서 매 6시간마다 흡광도를 측정하여 배양시간에 따른 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. 측정결과 Figure 7 과 같이 분리균주 4종 모두 6시간부터 12시간까지 대수적으로 증가하였고 *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, *Lb. sakei* YY1은 18~24시간에서 생육도가 최대가 되었으며 그 이후에는 정지기로 접어드는 것을 관찰할 수 있었다. *Lb. plantarum* AF1은 30~36시간에서 생육도가 최대가 되었으며 그 이후에 정지기로 들어가는 것을 관찰하였다.

(2) 배지의 초기 pH에 따른 생육도

pH 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 그리고 10.0으로 보정한 MRS 액체배지에 30°C에서 24시간 정치 배양하여 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, 그리고 *Lb. sakei* YY1의 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 배양한 균주를 측정하여 평균치로 나타내었다. 보통 pH 4.0까지의 균의 생육도를 관찰하는 것이 일반적이거나 pH 3.0과 3.5는 장기간 저장된 일반적인 묵은지의 pH범위로서 본 실험 범위에 추가하여 생육도를 관찰하였다. 결과 Figure 8 과 같이 *Lb. plantarum* AF1은 pH 5.0 에서부터 pH 9.0 까지의 범위에서 잘 생육하였으나 pH 5.0 이하 그리고 pH 10.0 이상에서 생육도는 감소하였다. *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, *Lb. sakei* YY1은 pH 6.0 에서부터 pH 10.0 까지의 범위에서 잘 생육하였으나 pH 6.0 이하에서 생육도는 조금씩 감소하였다. 분리균주의 최적 pH는 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* SC1, *Lb. sakei* YY1은 pH 7.0으로 나타났고, *Lb. sakei* WJ1은 pH 6.0으로 나타났다. pH 3.0에서는 4 균주 모두 거의 생육하지 못하였고, pH 3.5에서 *Lb. plantarum* AF1 경우 어느 정도 생육하였으나 높은 pH 범위에서와는 확연히 차이가 나는 것을 관찰하였다.

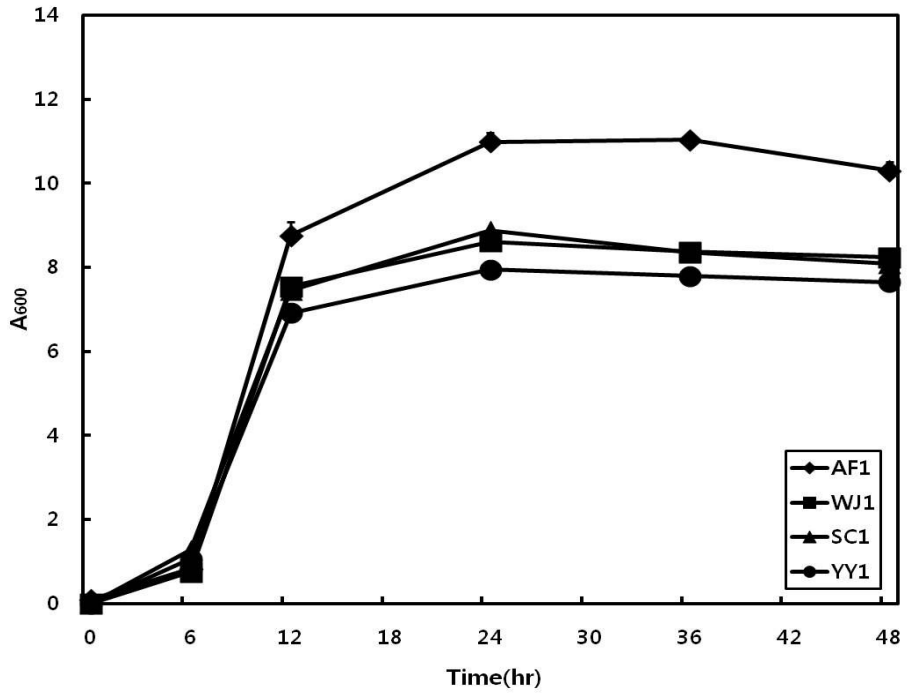


Figure 7. Growth Curves of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1

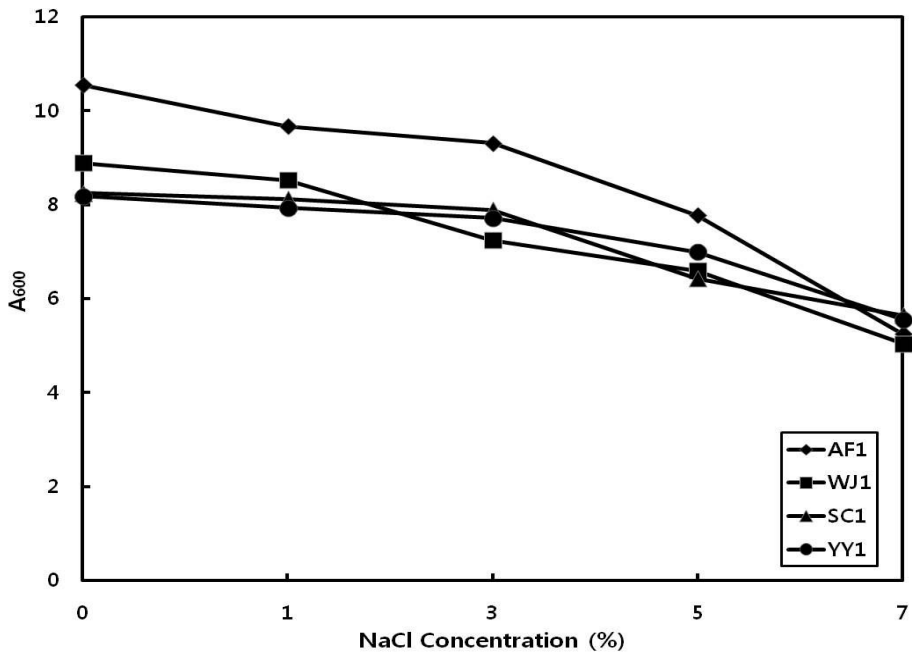


Figure 8. Effects of NaCl of the growth media on the growth of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1

(3) 배지의 NaCl 농도에 따른 생육도

NaCl이 균주의 성장에 미치는 영향을 검토하기 위하여 MRS 액체배지에 NaCl을 0, 1, 3, 5 및 7%(v/v)되게 첨가하여 30℃에서 24시간 정치 배양하여 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, 그리고 *Lb. sakei* YY1의 생육도를 조사하였다. 흡광도는 3번씩 측정하여 평균치로 나타내었다. 측정결과, Figure 9와 같이 4균주 모두 NaCl 농도 0~3%에서 비교적 안정적인 생육도를 보였다. *Lb. plantarum* AF1은 NaCl 농도 1%에서 최대의 생육도를 보였고 5%에서 최대 생육도의 약 80%정도를 나타내었으며 7%에서는 약 30%정도의 생육도를 나타내었다. *Lb. sakei* WJ1은 NaCl 농도 0%에서 최대 생육도를 나타내었고 NaCl 농도가 높아 질수록 생육도가 점차 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1은 NaCl 농도 1%에서 최대의 생육도를 보였고 *Lb. sakei* WJ1와 같이 1%이상의 농도에서는 점차적으로 생육도의 감소를 보였다.

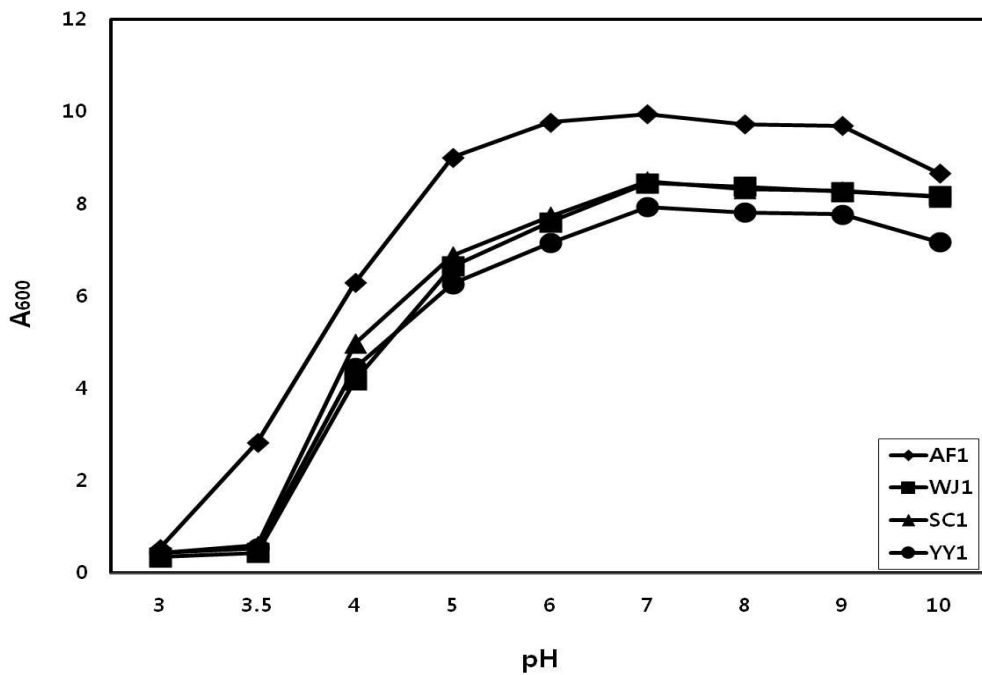


Figure 9. Effects of initial pH of the growth media on the growth of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1

(4) 내산성 측정

일반적으로 행해진 유산균의 내산성 실험은 프로바이오틱으로서 역할을 수행하기 위한 기본 특성으로서 pH 3.0 이하의 강한 산성조건의 위장관을 통과하여 도달하여 생존해야하므로 그에 대한 단순 산성 pH에 대한 내성(60)과 체내 소화관 조건과 유사한 환경에서 측정하기 위해 인공위액 하에서의 저항성(40)을 실시한다. 그러나 본 실험 균주의 내산성 실험은 목은지와 같은 낮은 pH에서 균주의 생존율을 확인하기 위하여 실시하였다.

균주의 내산성을 측정하기 위하여, 균주를 MRS 액체배지에 1%(v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 원심분리(9,950 ×g, 5 min)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 다음, pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0으로 조정된 MRS 배지(균주를 키운 MRS와 같은 중량)에 첨가하여 30°C에서 24시간 배양한 후 생존수를 측정하였다. *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, 그리고 *Lb. sakei* YY1의 생존수는 처리 전과 처리 후를 3번씩 반복 측정하여 평균치로 나타내었으며, 이를 통하여 pH별 균주의 생존율을 계산하였다. *Lb. plantarum* AF1는 처리 전과 처리 후의 생존수 비교 결과, pH 3.0에서 약 10%의 생존율을 보였고, pH 4.0에서 그보다 높은 약 11%를 나타내었다. pH 5.0에서는 약 87%의 높은 생존율을 보였다. pH 6.0이상에서는 처리 전보다 더 높은 생존수를 나타내었는데, 적게는 10¹배에서 10²배 이상의 생존수를 나타내었고 이는 생존한 균 외에 균이 더 증식하였음을 확인하였다. *Lb. sakei* WJ1의 경우, pH 3.0에서 약 1%, pH 4.0구간에서 약 7%의 생존율을 보이며 *Lb. plantarum* AF1보다는 낮은 생존율을 나타내었다. pH 5.0에서는 약 67%의 생존율을 나타내었고, pH 6.0 구간에서는 처리전과 같은 생존수를 유지하였고 pH 7.0에서는 처리전보다 약 2배 이상의 생존수를 보이며 높은 생존율과 더불어 균이 더 생육함을 확인하였다. *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1의 생존율 확인 결과, pH 3.0구간에서는 균이 거의 생존하지 못함을 확인하였고, pH 4.0에서 약 1~2%의 아주 낮은 생존율을 나타내었다. pH 5.0에서는 약간 높아진 약 26~36%의 생존율을 보이며, *Lb. plantarum* AF1과 *Lb. sakei* WJ1에 비하여 현저히 낮은 생존율을 나타냄을 확인하였다. 그러나 pH 6.0 구간에서는 처리 전에 비하여 적게는 2배에서 많게는 7배 정도의 높은 생존수를 나타내었고, pH 7.0 구간에서는 처리 전보다 10²배 내외의 높은 생존수를 나타내며 균이 더 증식함을 확인하였다.

위 결과와 같이 pH가 낮아질수록 균의 생존율은 점점 낮아지며, 유산균을 배양

하는 MRS 배지의 pH인 6.5 부근에서는 균이 더 생육함을 확인하였다. *Lb. plantarum* AF1과 *Lb. sakei* WJ1을 제외한 나머지 균주의 경우, pH 4.0이하의 구간에서는 현저히 낮은 생존율을 나타내었으며, 이는 균주를 김치에 적용하였을 시 저장 기간이 오래됨에 따라 낮아진 pH에서 높은 우점률을 유지하지 못하는 원인에 대한 근거가 되었다.

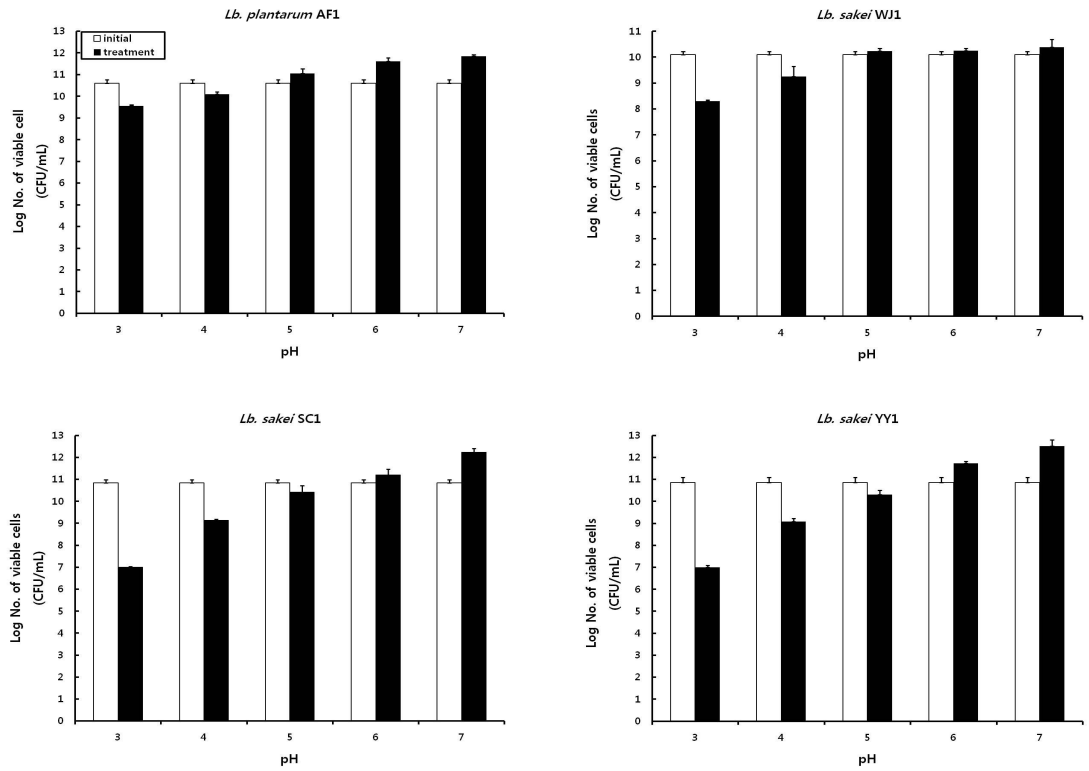


Figure 10. Acid tolerance of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1. Values are means \pm SD from triplicate determinations.

(5) 균주의 D/L-lactic acid의 농도 측정

분리균주 4종의 D/L-lactic acid의 농도를 측정한 결과, Table 3에 나타내었다. 균주 *L. plantarum* AF1과 *Lb. sakei* WJ1는 D(-)-lactic acid와 L(+)-lactic acid를 모두 생산하는 D(-)/L(+)-lactic acid로 확인되었으며 균주 *Lb. sakei* SC1과 *Lb. sakei* YY1는 L(+)-lactic acid를 주로 생산하여 L(+)-lactic acid로 확인되었다.

Okada(57)는 *Lactobacillus* 속, *Pediococcus* 속 *Leuconostoc* 속, *Enterococcus* 속, *Sporolactobacillus* 속 등의 유산균으로부터 생산되는 D(-)/L(+)-lactic acid를 정량한 결과에 대하여 보고하였는데, *Lactobacillus plantarum*은 보통 D(-)/L(+)-lactic acid 모두 생산하는 균주로서 분류가 되며, *Lb. sakei*의 경우 D/L-form과 L-form을 모두 지닌다고 보고하였다. 또한, Yoon(70)의 보고를 보면 김치로부터 분리한 균주 *Lactobacillus plantarum*의 lactic acid를 정량한 결과, D(-)-lactic acid와 L(+)-lactic acid의 생산량의 비가 58:42로 D/L-lactic acid로 나타냄으로서 *Lactobacillus plantarum*이 D(-)-lactic acid와 L(+)-lactic acid 모두 생산하는 균주임을 확인하였고, Lee(45)의 보고에서도 김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* NR74균주가 D(-)-lactic acid와 L(+)-lactic acid 모두 생산하는 균주임을 나타내어 본 실험 결과와 일치함을 확인하였다.

Lee(46) 등에 의하면, L(+)-lactic acid를 생산하는 *Lb. sakei* strain의 섭취 시 부드럽고 어려워 보이는 피부를 증진하고 GI tract에 긍정적인 영향을 미친다는 몇 가지 유용한 기능들을 보고함으로써 L(+)-lactic acid가 갖는 이점에 대해 설명하였고, *Lb. sakei* strain의 경우 대부분 L(+) form을 많이 나타낸다는 보고에 따라 균주 *Lb. sakei* SC1과 *Lb. sakei* YY1이 L(+)form을 나타냄으로서 본 실험결과와 일치함을 확인할 수 있었다. 또한 FAO/WHO가 공동 발표한 Food Additives 내용 중 특히 유아들에게 있어 L(+)-lactic acid으로 바꾸는 효소의 결핍을 일으키는 D(-)-lactic acid의 섭취를 제한할 것을 제안하였는데, 4종 균주의 D/L-lactic acid를 정량한 결과, 제한되어져야 D(-)-lactic acid를 생산하는 균주는 확인되지 않았다.

Table 4. Quantitative analysis of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1

	Lactic acid isomer	D(-)-lactic acid	L(+)-lactic acid	Total lactic acid
<i>L.plantarum</i> AF1	D/L	10.75g/L	5.01g/L	15.76g/L
<i>L.sakei</i> WJ1	D/L	5.702g/L	5.662g/L	11.364g/L
<i>L.sakei</i> SC1	L	0.026g/L	13.483g/L	13.509g/L
<i>L.sakei</i> YY1	L	0.705g/L	12.429g/L	13.134g/L

(6) 콜레스테롤 저하능

Gilliland(15)에 의하면 많은 유산균은 프로바이오틱스(probiotics)로서 소화 흡수를 돕고 장내부패를 억제하고, 설사 변비의 치료 효과, 장내 유해균의 억제, 비타민의 생성, 혈중 콜레스테롤 저하 능, 항암 효과, 인체의 면역 능력 증강 등에 대한 다양한 기능성이 보고되고 있다. 본 연구에서는 분리균주의 콜레스테롤 저하 능을 측정하여 유산균의 기능성 여부를 확인하였다.

균주의 콜레스테롤 저하 능은 *in vitro*에서 콜레스테롤 저하 능을 측정하는데 이용되어 지고 있는 *o*-phthalaldehyde method(52)로 측정하였다. 균주의 최적 온도인 30℃와 인체 온도인 37℃에서 균을 혐기배양하고 24시간, 48시간 후 각각 콜레스테롤 저하 능을 측정하였다. Table 4 에서와 같이, *Lb. plantarum* AF1은 30℃에서 24시간 후 약 70%의 콜레스테롤 저하 능을 나타내었고, 48시간 후 약 66%정도의 콜레스테롤 저하 능을 수치를 보이며 24시간 후보다 더 낮은 수치를 보였다. 37℃에서는 24시간 후 약 85%, 48시간 후 약 97% 정도의 수치를 보이며 30℃와 비교 시 훨씬 높은 콜레스테롤 저하 능을 나타내었다. *Lb. sakei* WJ1와 *Lb. sakei* SC1의 경우 30℃에서 24시간 후 약 53~58%의 콜레스테롤 저하 능을 나타내었고 48시간 후 약간 더 높은 약 58~61%의 수치를 나타내었다. 그러나 37℃에서 24시간 후의 수치는 30℃에 비하여 낮은 약 50~52% 정도의 저하 능을 보였고 48시간 후 약간 높은 약 50~51% 정도의 수치를 나타내었다. *Lb. sakei* YY1은 30℃에서 24시간 후 약 60%, 48시간 후 약 59%의 저하 능을 나타내었고, 37℃에서 24시간 후 약 47%, 48시간 후 약 44%의 저하 능을 보였다.

김치의 콜레스테롤 저하에 대한 연구들은 Kim(30, 41, 48)등에 의하여 보고되었으며 김치의 섭취로 콜레스테롤 수치가 낮아진다는 점에서 모두 공통점을 보이고 있다. Kim(30, 33)과 Lee(46) 등의 보고에서 사용된 균주 *Lactobacillus plantarum*의 콜레스테롤 저하 능은 각각 55.91%, 60%, 그리고 48%의 콜레스테롤 저하 능을 나타내었고, 본 실험에서 사용한 균주 *Lb. plantarum* AF1의 콜레스테롤 저하능은 82~97%로 그보다 훨씬 높은 수치를 나타내었다. 또한, Lee(46)의 보고에서 사용한 *Lactobacillus sakei* 균주는 50~60% 이상의 콜레스테롤 저하 능을 나타내며 대조구 균주에 비하여 훨씬 높은 수치를 나타내었고, 이는 본 실험 균주 *Lb. sakei* WJ1, SC1, 그리고 YY1의 콜레스테롤 저하능과 비슷한 수치를 나타내는 것을 확인함으로써 본 실험 *Lb. sakei*균주 또한 높은 콜레스테롤 저하능이 있는 것으로 확인

되었다.

Ahn(1)은 *Lactobacillus spp.*은 복합 담즙산 분해 효소와 관련되어 혈중 콜레스테롤의 저하 효과를 나타내며 콜레스테롤의 흡착 능력이 다른 젓산균에 비해 높아 심각한 콜레스테롤 혈증에도 생물학적 대체 치료가 가능하다고 주장하는 젓산균으로 과숙기 김치를 섭취함으로써 기대해 볼 수 있는 효과라고 밝혔다. 콜레스테롤 저하능 실험은 *in vitro*에서 더 나아가 *in vivo*실험을 통하여 실질적으로 콜레스테롤 저하의 실현 가능성을 부여할 수 있는지 검증되어야 할 것으로 사료된다.

Table 5. Absorbance at 580 nm and cholesterol assimilation of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1 in 30°C and 37°C for 24hr and 48h

	30°C			
	24h	Cholesterol assimilation(%)	48h	Cholesterol assimilation(%)
<i>Lb. plantarum</i> AF1	11.3	68.795±0.868	11.3	65.893±0.765
<i>Lb. sakei</i> WJ1	6.62	53.375±0.702	6.90	61.244±0.388
<i>Lb. sakei</i> SC1	5.75	58.676±0.528	6.13	58.415±0.209
<i>Lb. sakei</i> YY1	5.36	60.575±0.314	5.52	59.763±0.110

	37°C			
	24h	Cholesterol assimilation(%)	48h	Cholesterol assimilation(%)
<i>Lb. plantarum</i> AF1	8.08	85.397±0.133	8.61	97.511±0.471
<i>Lb. sakei</i> WJ1	5.21	50.392±0.599	5.76	50.412±0.793
<i>Lb. sakei</i> SC1	5.09	52.099±0.970	5.14	51.930±0.827
<i>Lb. sakei</i> YY1	3.90	47.370±0.899	3.44	43.867±0.406

Values are means ±SD from triplicate determinations.

(7) 항균 활성

분리 유산 균주의 항균물질 생산여부를 조사하기 위하여 균체를 직접가하는 Direct method(31)와 조항균 물질을 paper disk에 가하여 생육 저지환을 관찰하는 Paper disk method(66)를 병행하여 실험하였다. 지시균으로는 *Bacillus subtilis* ATCC 6633를 사용하였다. Direct method를 사용하여 항균활성을 측정한 결과 (Figure10-A), *Lb. plantarum* AF1이 가장 큰 생육 저지환을 나타내었고, 그 외 3종의 균주인 *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1과 *Lb. sakei* YY1은 거의 비슷한 크기의 생육 저지환을 나타내었다. Paper disk method를 이용한 항균 활성 측정 시 조항균 물질은 5배 농축하여 실험에 이용하였다. Figure10-B와 같이, *Lb. plantarum* AF1(67)은 이미 보고된 바와 같이 높은 항균활성을 나타내므로 4종의 균주 중 가장 큰 생육 저지환을 나타내었고, 나머지 3종 균주의 생육 저지환은 비슷한 크기를 나타내었다.

위와 같은 결과로부터 지시균에 대한 항균 활성이 균주가 생성하는 강한 젖산에 의한 것인지 균주의 bacteriocin 생성으로 인한 항균활성인지 확인하기 위하여 pH를 조정하여 항균 활성을 측정하였다. Figure 11 에서와 같이, 균이 자란 배양액의 pH인 pH 4.0 대에서는 4종의 균주 모두 높은 항균활성을 나타내었다. 그러나 pH 5.0 이상에서는 *Lb. plantarum* AF1만 약간 활성을 나타내었고 나머지 3종의 균주는 활성을 급격히 상실함을 관찰하였다.

Kim(32)은 항균활성에 관여하는 요인으로는 유기산(organic acid), 과산화수소(hydrogen peroxide), 디아세틸(diacetyl), 박테리오신(bacteriocin) 등이 알려져 있으며, 특히 많은 *Lactobacillus* 종에서 생산되는 박테리오신은 그람양성과 그람음성세균에 대하여 넓은 항균스펙트럼을 가지는 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 pH 조절을 통하여 분석된 항균활성에 관여하는 물질로는 lactic acid와 acetic acid의 유기산의 활성임을 확인하였다.

선행된 *Lb. plantarum* AF1(67)의 항균활성은 pH 3.0에서 6400 AU/mL, pH 4.0에서 3200 AU/mL, pH 5.0에서 200 AU/mL, pH 6.0에서 100 AU/mL으로 측정되었고, pH 7.0이상에서는 항균 활성이 전혀 관찰되지 않았다고 보고하였다. *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1과 *Lb. sakei* YY1의 경우, pH 4.0에서 1600 AU/mL, 그리고 pH 5.0이상에서는 항균 활성이 전혀 나타나지 않았다. 또한 모든 균주 pH 5.0 이상에서는 활성이 감소되고 pH 4.0에서 최적의 활성을 나타냄을 알 수 있었다.

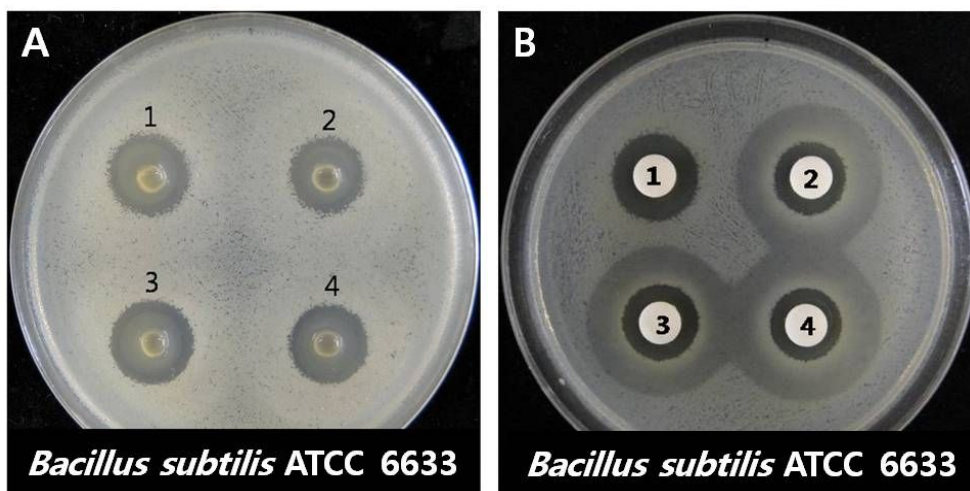


Figure 11. Antibacterial activity of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1 against *Bacillus subtilis* ATCC 6633

A, Direct assay; B, Paper disk assay.

1, *Lb. plantarum* AF1; 2. *Lb. sakei* WJ1; 3, *Lb. sakei* SC1; 4. *Lb. sakei* YY1

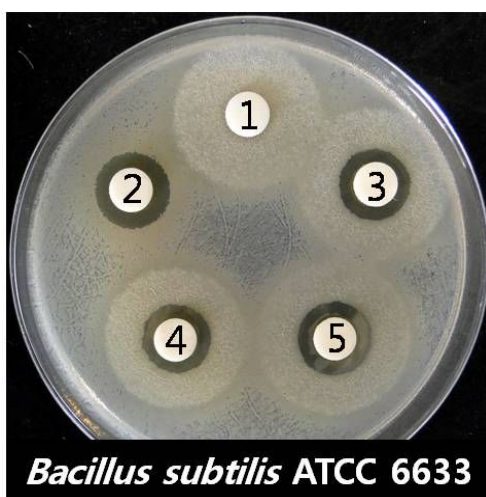


Figure 12. Effect of pH 4.0 treatment on the antibacterial activity of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1 against *Bacillus subtilis* ATCC 6633

1. MRS (Ref.); 2, *Lb. plantarum* AF1; 3. *Lb. sakei* WJ1; 4, *Lb. sakei* SC1; 5. *Lb. sakei* YY1

제 2 절 분리 균주를 이용한 김치의 발효특성

김치 후기 발효에 관여하는 김치 간균 유산균 (*Lactobacillus* 속)을 적용한 김치 발효액 중 가장 묵은지 향과 유사하며 기호도가 좋아 최종적으로 선별된 균주 4종 *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, *Lb. sakei* YY1을 김치에 적용하여 제조하였다. 김치는 15℃에서 발효하고 -1℃에서 저장하며 pH, 산도, 균총 (총 균수 및 중균점유율)의 변화를 분석하였다. 또한 색도와 물성을 측정하고 관능평가를 실시하여 김치의 특성을 조사하였다.

1. 발효 온도 설정

숙성 묵은지 제조에 앞서 발효 온도 설정하기 위하여 100 mL MRS 액체배지에 분리균주를 1%(v/v) 접종하고, 10℃, 12℃, 15℃, 18℃, 20℃에서 60시간 정치배양하며 매 12시간마다 흡광도를 측정하여 생육도를 관찰하였다. 발효조건에 따라 김치 발효를 관여하는 젖산균에는 차이가 있는데, Kim(74)에 의하면 20~30℃에서 숙성을 시킨 김치의 유산균을 보게 되면 *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc cremoris*, *Lactobacillus leichimanni*, *Lactobacillus sakei* 등이 초기, 중기에 성장을 하고 말기에 나면 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus homohiochii* 등이 성장을 하고 14℃내외에서 숙성된 김치는 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus fructosus* 등이 초기, 중기에 성장을 하고 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus maltaromicus* 등이 말기에 성장을 하며, 5℃ 내외에서 숙성된 김치는 *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc paramesenteroides* 등 성장을 하고 말기에는 *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus bayaricus* 등 성장한다고 보고하고 있으며, 저온과 고온에서 숙성을 시킨 김치에서 우점이 되는 유산균의 차이를 보이는데, 저온에서는 *Leuconostoc*속이 많이 존재하고 고온에서는 *Lactobacillus*속이 많이 존재한다고 밝혔다. 측정결과, 18℃, 20℃에서 24시간 배양한 균의 생육도는 30℃에서 배양한 균의 생육도와 비슷한 수치를 나타내었다. 그러

나, 균주 분리를 하기 위한 선행 단계에서 29종의 균주를 김치액에 적용하여 20℃에서 발효시킨 결과, 균덕내가 심하게 올라오는 것을 확인하였다. 10℃이하 그리고 12℃에서 균의 생육도를 관찰한 결과, Kim(74)의 보고와 같이 본 실험에서 사용하는 균주인 *Lactobacillus*속 모두 잘 생육하지 못함을 관찰하였다. 15℃에서 균의 생육은 조금 늦었으나 일정 시간 후 30℃에서 배양한 균의 생육과 비슷한 수치로 자라는 것을 관찰하였다. 위와 같은 결과로 최종 숙성 목은지 제조의 발효온도를 15℃로 설정하였다.

기존의 여러 연구문헌들은 김치의 숙성단계에서부터 온도 개념을 다루고 있다. Choi등(10, 45, 54)에 의하면 김치의 제조에서부터 숙성 및 저장에 이르기까지 온도와의 상관관계는 매우 크고 온도에 따라서 김치의 숙성진행속도가 달라질 뿐만 아니라 저장성과도 바로 연결되고 나아가서는 김치의 관능적 특성에도 큰 영향을 미친다고 보고하였다.

또한 본 실험을 통하여 정한 발효 온도는 Yoo(68, 69)의 보고에서와 같이 김치가 발효되면서 다양한 유산균이 생성되는데 김치 유산균의 DNA 분석 결과 15℃에서 생성되는 유산균에서 분비되는 영양학적 가치가 가장 높아 이를 목은 김치에 적용하여 김치 제조 후 15±1℃에서 발효하여 -1℃에 30주간 저장하며 목은지를 제조하는 방법에서 적용한 발효 온도와 일치함을 확인할 수 있었다.

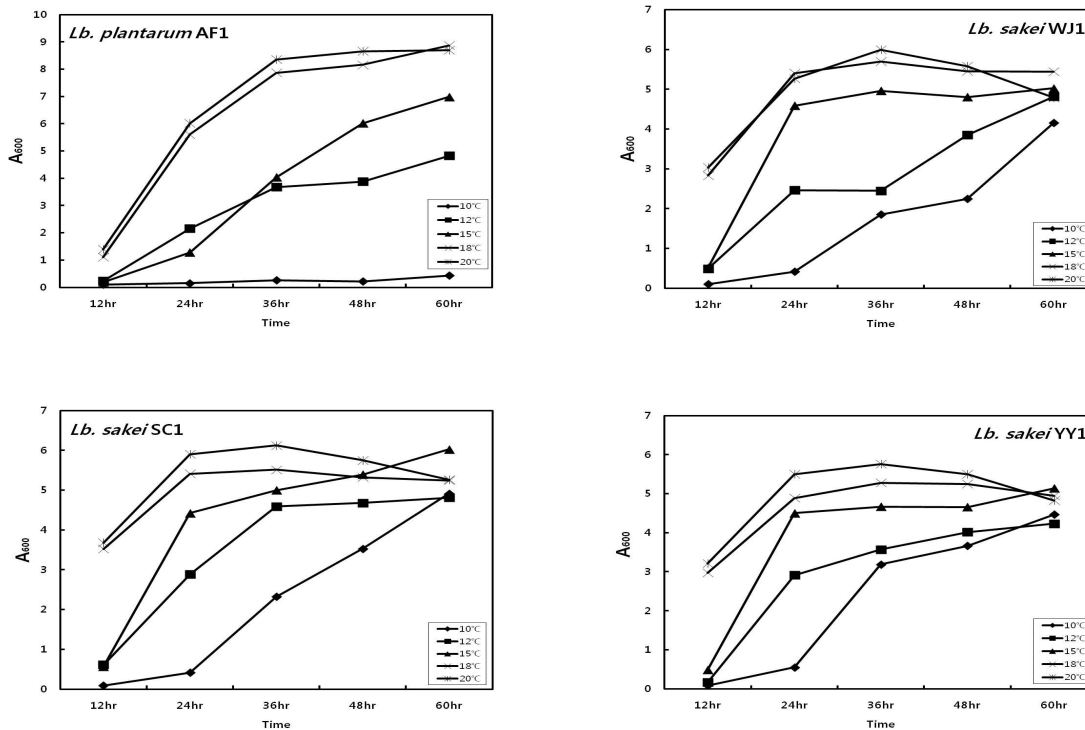


Figure 13. Growth of *Lb. plantarum* AF1, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, and *Lb. sakei* YY1 on 10, 12, 15, 18, and 20°C for setting the fermentation temperature on kimchi

2. 김치의 발효특성

1) 일반 양념 배합비를 이용하여 제조한 김치의 발효특성

일반 양념 배합비를 이용하여 제조한 김치의 발효 특성을 관찰하기 위하여, 15°C에서 발효하며 일반적 묵은지가 갖는 pH 3.9~4.0 초반 때와 산도 0.6~0.8% 범위 때 김치를 -1°C로 옮겨 약 8달간 저장하며 발효 특성을 관찰하였다. Figure 12~15 에서와 같이, 15°C에서 발효 5일째 일반적 묵은지가 갖는 적정 pH와 산도에 도달하여 -1°C인 김치냉장고로 옮겨졌다. pH는 김치 담금 직후부터 발효기간을 거쳐 김치 냉장고로 이동하기 직전 가장 급속히 떨어졌고 -1°C에 저장하는 동안 거의 비슷한 수치를 유지하였다. 김치의 산도는 pH와 마찬가지로 발효 후 급속히 상승하는 것으로 관찰되었고 그 값은 저장하면서 약간 올랐지만 그 변화는 미미했다. Codex의 김치 규격 기준에 따르면 산도는 1.0%이내여야 한다고 명시되어 있는데 시중에 판매되고 있는 묵은지의 pH는 pH 3.0 이상부터 pH 4.0 이상의 값을 포함하며 다양한 값을 보이고 있으며 산도는 대부분 1.0% 이상으로 보고되고 있다. 그러나 여전히 묵은지에 대한 정확한 규격이 정해져 있지 않아 일반적 묵은지의 pH와 산도의 기준을 내세워 보고할 수 없는 실정이다.

김치 내 총균수는 김치 4종 모두 10^9 CFU/mL 이상으로 저장 직후에 최고치를 나타내었다. *Lactobacillus plantarum* AF1, *Lactobacillus sakei* WJ1, *Lactobacillus sakei* SC1, 그리고 *Lactobacillus sakei* YY1을 적용한 김치 4종 모두 종균 점유율은 저장기간 120일 이상 총균수의 90%이상을 차지하며 높은 우점률을 나타내었다. 특히, *Lb. plantarum* AF1을 적용한 김치는 저장 180일까지 95~96%의 높은 우점률을 나타내었고 210일차에 87~92%의 우점률을 유지하였으나 240일차에 80~87%으로 우점률이 약간 낮아짐을 보였다. *Lb. sakei* WJ1을 적용한 김치의 경우, 저장 210일까지도 총 균수의 90%이상을 차지하였고 240일 저장에서 86~90%의 높은 우점률을 보였다. *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1을 적용한 김치의 경우, 120일까지는 높은 우점률을 보였으나 저장 180일부터 78~84% 정도의 우점률을 보이며 우점률이 점점 감소하는 경향을 보였고 240일에는 57~67%의 우점률을 나타내었다. 이때 유산균수는 감소하고 유산균 외 세균의 증가를 관찰할 수 있었다. *Lb. plantarum* AF1과 *Lb. sakei* WJ1을 적용한 김치에서는 발효 5일째, 즉 저장 직후부터 효모가 관찰되기 시작하여 저장 기간 내내 효모가 관찰되었다. *Lb.*

sakei SC1와 *Lb. sakei* YY1을 적용한 김치에서는 저장 60일째부터 효모가 관찰되기 시작하여 저장 기간 내내 존재하였다. 김치 내 효모의 총균수는 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 범위로 유지되었다. 유산균 외 G(+)균의 수는 발효부터 저장 기간 내내 10^5 CFU/mL 범위로 거의 일정하게 유지되었으며 저장 기간이 길어짐에 따라 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 염도는 발효와 저장 전반에 걸쳐 2.0이상을 나타내었고 당도는 10~11 brix % 범위 안의 값으로 측정되었다.

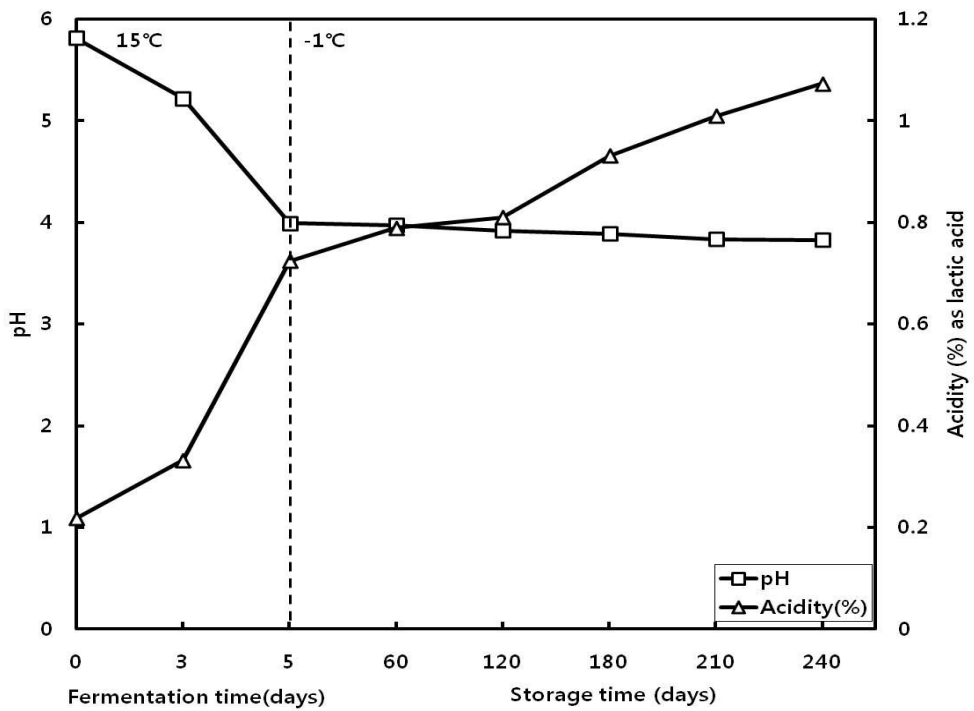


Figure 14. Total pH and acidity changes of AF1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C.

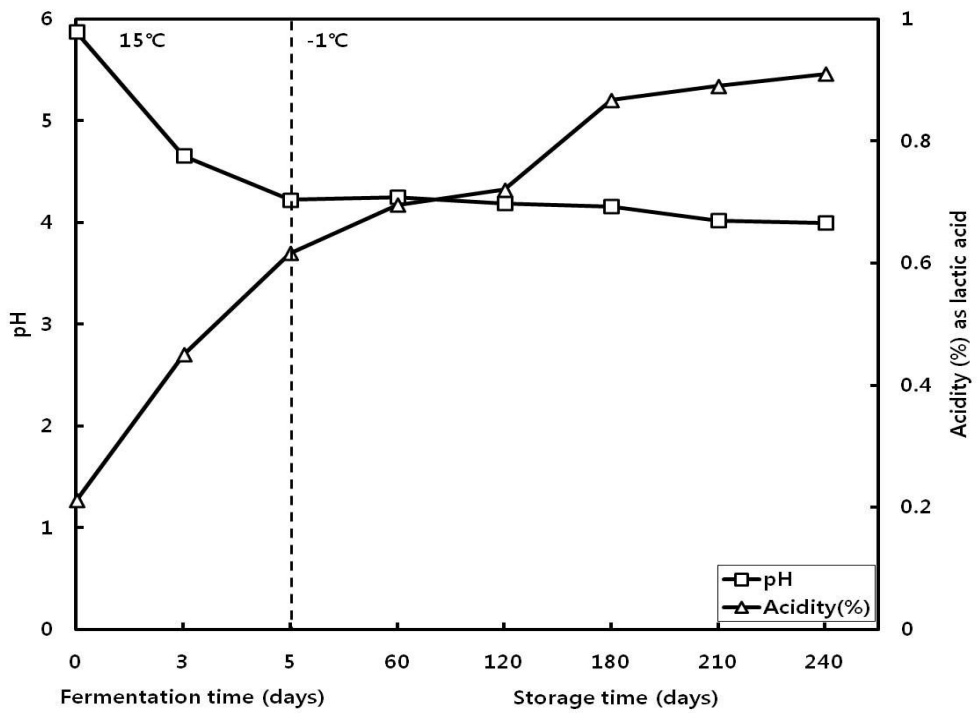


Figure 15. Total pH and acidity changes of WJ1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C.

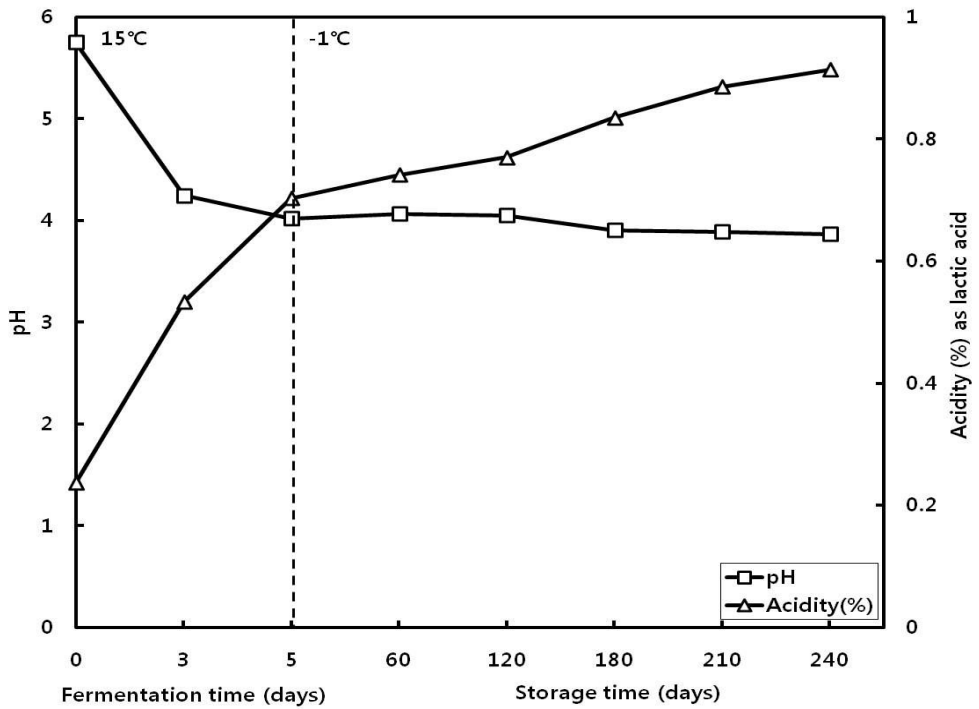


Figure 16. Total pH and acidity changes of SC1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C.

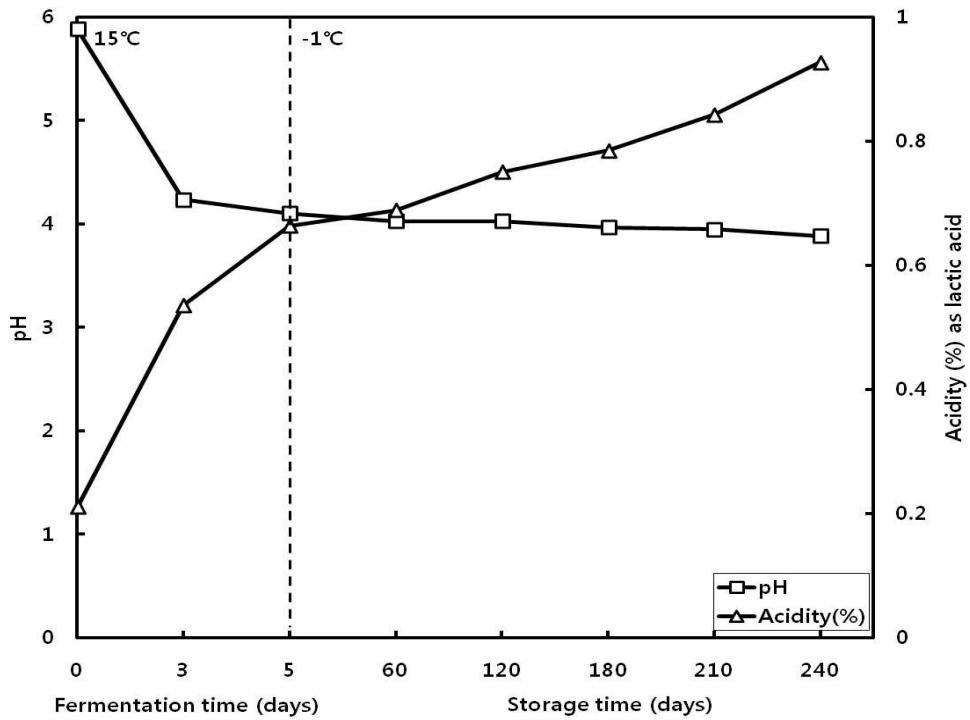


Figure 17. Total pH and acidity changes of YY1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C.

Table 6. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the AF1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

AF1		Fermentation time (days)			Storage time (days)					
		0	3	5	0	60	120	180	210	240
pH		5.812	5.219	3.992	3.992	3.975	3.917	3.886	3.837	3.826
Acidity(%)		0.218	0.332	0.724	0.724	0.789	0.81	0.931	1.009	1.073
Salinity(%)		2.8	2.69	2.67	2.67	2.91	2.72	2.96	2.0	3.0
Sweetness(brix %)		10.5	10.6	10.4	10.4	10.5	10.4	10.5	10.3	10.8
Microbial population (log CFU/mL)	Total viable cell	8.18±0.13	9.23±0.11	9.28±0.06	9.28±0.06	8.93±0.01	7.92±0.03	7.41±0.03	6.97±0.02	6.83±0.07
	Lactic acid bacteria	8.18±0.10	9.20±0.12	9.26±0.07	9.26±0.07	8.92±0.01	7.91±0.03	7.40±0.03	6.92±0.03	6.75±0.05
	Gram (+) bacteria	6.00±0.01	5.56±0.01	5.18±0.13	5.18±0.13	4.43±0.09	5.70±0.08	4.66±0.29	4.73±0.05	5.3±0.06
	Yeast	2.00±0.01	-	2.60±0.01	2.60±0.01	3.84±0.01	2.84±0.01	3.00±0.01	3.30±0.01	3.23±0.01
	Dominance (%)	99.3	94.12	94.74	94.74	97.67	97.62	96.15	89.36	83.58

All values were mean ±SD. (n=3)

Table 7. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the WJ1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

WJ1		Fermentation time (days)			Storage time (days)					
		0	3	5	0	60	120	180	210	240
pH		5.873	4.654	4.222	4.222	4.25	4.186	4.156	4.018	3.994
Acidity(%)		0.211	0.450	0.616	0.616	0.695	0.72	0.867	0.89	0.91
Salinity(%)		2.52	3.1	3.06	3.06	2.95	2.95	2.00	2.02	2.07
Sweetness(brix %)		10.8	11.0	10.4	10.4	11.1	11.2	10.1	10.5	10.1
Microbial population (log CFU/mL)	Total viable cell	7.84±0.05	9.04±0.07	9.20±0.01	9.20±0.01	8.48±0.13	7.71±0.02	7.14±0.01	7.04±0.02	6.40±0.06
	Lactic acid bacteria	7.82±0.06	9.04±0.07	9.18±0.01	9.18±0.01	8.46±0.13	7.70±0.03	7.11±0.02	7.00±0.02	6.32±0.08
	Gram (+) bacteria	5.60±0.18	5.40±0.08	5.18±0.13	5.18±0.13	5.18±0.13	5.32±0.02	5.46±0.02	4.66±0.29	5.04±0.04
	Yeast	-	-	2.70±0.01	2.70±0.01	4.53±0.01	3.00±0.01	3.11±0.01	3.30±0.01	3.30±0.01
	Dominance (%)	95.65	99.98	93.75	93.75	96.67	96.08	92.86	90.91	84

All values were mean ±SD. (n=3)

Table 8. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the SC1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

SC1		Fermentation time (days)			Storage time (days)					
		0	3	5	0	60	120	180	210	240
pH		5.748	4.244	4.019	4.019	4.064	4.049	3.903	3.887	3.867
Acidity(%)		0.237	0.533	0.703	0.703	0.741	0.770	0.835	0.886	0.914
Salinity(%)		2.57	2.47	2.68	2.68	2.39	2.54	2.02	2.04	2.15
Sweetness(brix %)		11.3	10.2	10.3	10.3	10.4	10.2	10.8	10.2	11.0
Microbial population (log CFU/mL)	Total viable cell	7.66±0.29	9.00±0.05	9.64±0.01	9.64±0.01	8.60±0.12	7.89±0.03	6.11±0.03	5.30±0.08	4.56±0.01
	Lactic acid bacteria	7.63±0.31	9.00±0.05	9.63±0.01	9.63±0.01	8.59±0.13	7.88±0.04	6.04±0.04	5.08±0.09	4.30±0.02
	Gram (+) bacteria	5.30±0.18	5.00±0.10	5.04±0.04	5.04±0.04	5.40±0.08	5.28±0.08	4.54±0.06	4.51±0.07	4.49±0.04
	Yeast	2.30±0.01	2.30±0.01	-	-	3.60±0.01	3.70±0.01	3.30±0.01	3.00±0.01	3.18±0.01
	Dominance (%)	93.48	99.9	97.73	97.73	97.5	97.4	84.62	63.16	55.56

All values were mean ±SD. (n=3)

Table 9. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the YY1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

YY1		Fermentation time (days)			Storage time (days)					
		0	3	5	0	60	120	180	210	240
pH		5.882	4.234	4.101	4.101	4.028	4.025	3.967	3.948	3.884
Acidity(%)		0.211	0.535	0.664	0.664	0.649	0.750	0.745	0.843	0.927
Salinity(%)		2.28	2.66	2.75	2.75	2.29	2.72	2.43	2.09	2.3
Sweetness(brix %)		10.1	10.4	11.1	11.1	10.8	11.3	10.5	10.8	11.2
Microbial population (log CFU/mL)	Total viable cell	7.45±0.11	9.36±0.02	9.23±0.09	9.23±0.09	8.87±0.02	7.94±0.02	6.43±0.10	6.34±0.06	5.40±0.08
	Lactic acid bacteria	7.43±0.11	9.36±0.02	9.20±0.10	9.20±0.10	8.85±0.03	7.93±0.03	6.36±0.09	6.20±0.07	5.20±0.05
	Gram (+) bacteria	5.54±0.06	5.32±0.14	5.30±0.01	5.30±0.01	5.59±0.01	5.46±0.10	5.64±0.04	5.26±0.14	5.20±0.10
	Yeast	-	-	-	-	3.30±0.01	2.00±0.01	2.48±0.01	3.15±0.01	3.30±0.01
	Dominance (%)	96.43	99.99	94.12	94.12	94.59	96.59	85.19	72.73	64

All values were mean ±SD. (n=3)

2) 염도 3% 양념 배합비를 이용하여 제조한 김치의 발효특성

Yoo(69)에 의하면 묵은지의 제조 시 일반적인 김치의 발효조건으로 김치를 제조하고 장기 저장할 경우, 김치 발효 후기에 관여하는 동중젖산발효균의 과도한 생성으로 산패를 유도하며 그 외 생성되는 미생물과 효소작용에 의해 불쾌한 휘발성 유기화합물의 생성으로 인하여 맛과 냄새가 나빠지고 산막효모가 번식하고 펙틴의 분해로 배추조직의 연부현상이 나타나 김치 품질이 떨어지게 된다는 보고하였다. 또한, Choi(10)등은 염 농도를 3%로 제조한 김치는 120일 이상의 오랜 저장 기간에도 김치의 품질이 유지되어 이는 김치 저장성 향상에 효과적이라 보고하였다. 이에 따라 본 실험에서는 연부현상을 늦춰 배추조직의 단단함을 오래 유지하며 김치의 저장성 향상을 도모하고 시판되는 공장김치와 같은 염도 3%의 양념 배합비를 고안하여 김치 제조에 적용하였다.

염도 3% 양념 배합비를 이용하여 제조한 김치의 발효 특성을 관찰하기 위하여, 15°C에서 발효하며 일반적 묵은지가 갖는 pH 3.9~4.0 초반 때와 산도 0.6~0.8% 범위 때 김치를 -1°C로 옮겨 약 8달간 저장하며 발효 특성을 관찰하였다. 염도 3% 김치는 균주를 첨가하지 않은 대조구 김치를 포함시켜 균주를 첨가한 김치와 비교하여 관찰하였다. Figure 16~18 에서와 같이 일반 양념비로 제조한 김치에 비하여 적정 pH와 산도에 이르기까지 5일이 더 걸린 10일째 pH 4.1~4.2에 도달하였고 이때 산도는 0.6%로 일반 양념비를 이용하여 제조한 김치에 비하여 약간 높은 pH와 낮은 산도를 나타내었다. 일반 양념비를 이용하여 제조한 김치와 같이 -1°C 김치냉장고에 저장하는 동안 pH는 거의 비슷한 수치를 유지하였지만 오랜 저장 기간에 따라 조금씩 떨어지는 것을 관찰하였고 이에 따라 산도도 조금씩 상승하는 것을 관찰하였다.

김치 내 총 균수는 일반 양념비를 이용하여 제조한 김치와 같이 $10^8 \sim 10^9$ CFU/mL 로 발효가 끝난 저장 직후에 최고치를 나타내었다. *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1을 적용한 김치 모두 종균 점유율은 발효초기 5일 이후부터 저장기간 150일까지 90%이상의 높은 우점률을 나타내었고 그 이후 점차적으로 감소하기 시작하였다. *Lb. sakei* SC1을 적용한 김치는 저장 180일에는 약 80%의 우점률을 나타내었고 저장 240일에 약 50%의 우점률을 나타내었다. *Lb. sakei* YY1을 적용한 김치는 저장 180일에는 약 80%, 210일에는 약 50% 그리고 저장 240일에는 약 45%의 우점률을 나타내었다. 균주를 적용한 김치와 대조구 김치 모두 발효 10일째

부터 효모가 관찰되기 시작하였고 저장 180일까지 관찰되다가 그 이후부터 저장 240일까지 관찰되지 않았다. *Lb. sakei* SC1을 적용한 김치의 효모 총균수는 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 범위로 유지되었고, *Lb. sakei* YY1김치는 초기에 10^4 CFU/mL을 보이다가 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 범위로 유지되었고 대조구 김치의 경우도 $10^2 \sim 10^3$ CFU/mL 범위로 유지되었다.

염도는 초기에 3%에 맞춰 김치를 제조하여 발효부터 저장 기간 내내 비슷한 수치를 나타내었고 당도의 경우 김치 시료에 따라 약간 오차를 보였으나 큰 차이는 없었다.

Yoo(68)의 경우, 염 농도를 3%보다 더 높은 3.67%에 맞춰 묵은 김치를 제조하였고, 숙성시키며 관능적 특성 변화를 조사하였는데, 기호도가 가장 높은 시기는 숙성 14주와 18주째로 나타났고, 이는 본 실험에서 유산균 starter를 이용하여 관능적으로 묵은지의 특성을 나타내는 시기가 숙성 10주라는 것에 대하여 그 기간을 짧게는 4주, 길게는 8주 앞당긴 것으로 확인되었다.

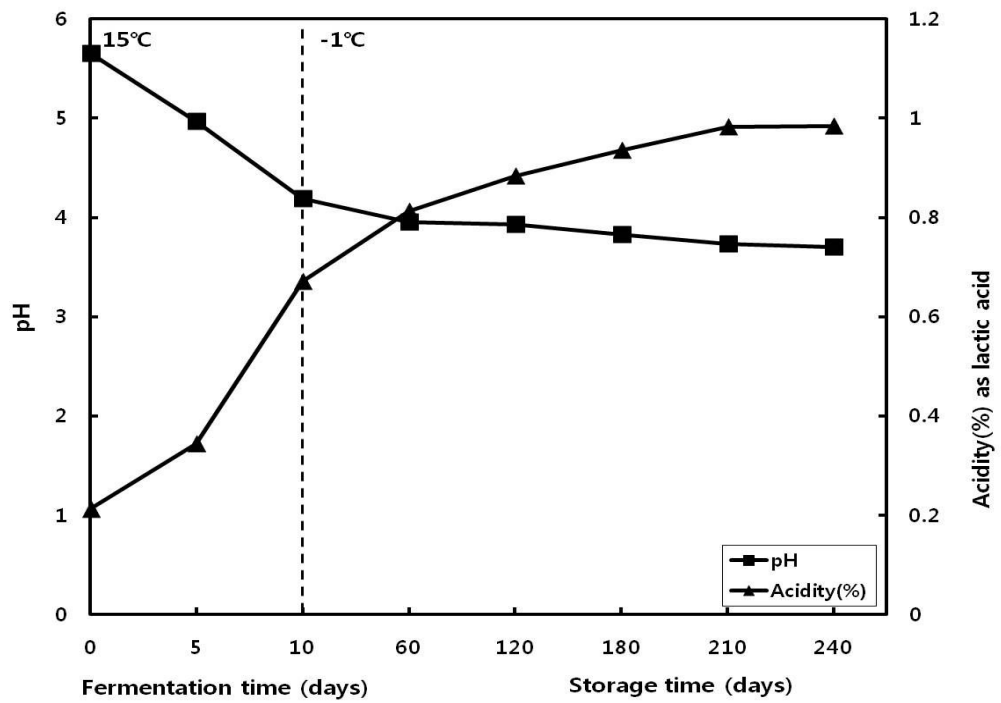


Figure 18. Total pH and acidity changes of 3% of salinity SC1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

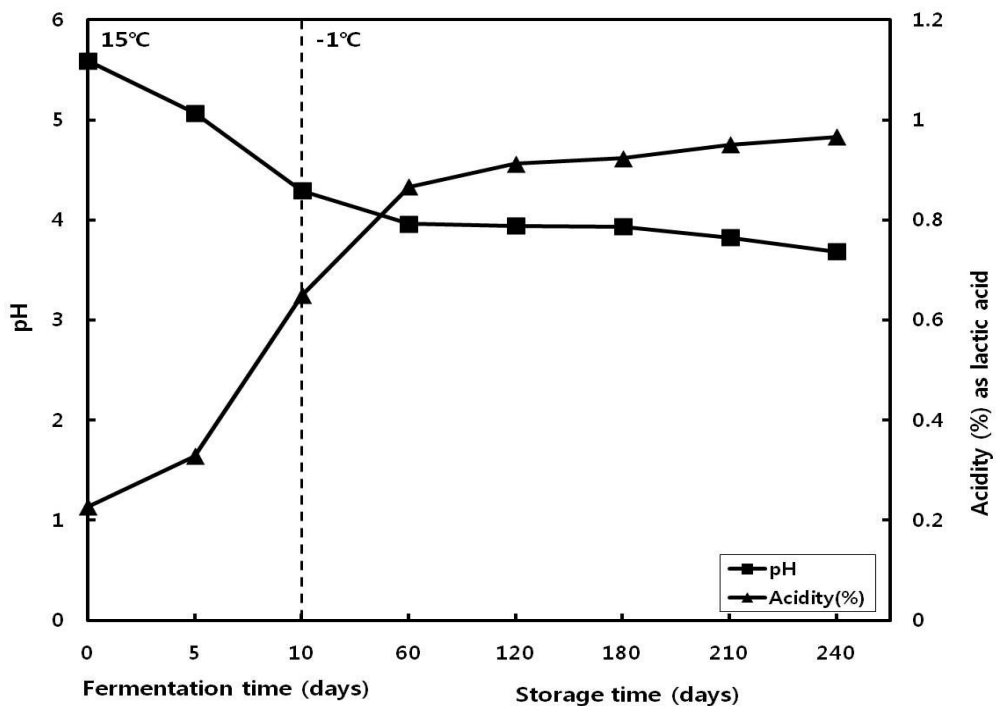


Figure 19. Total pH and acidity changes of 3% of salinity YY1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

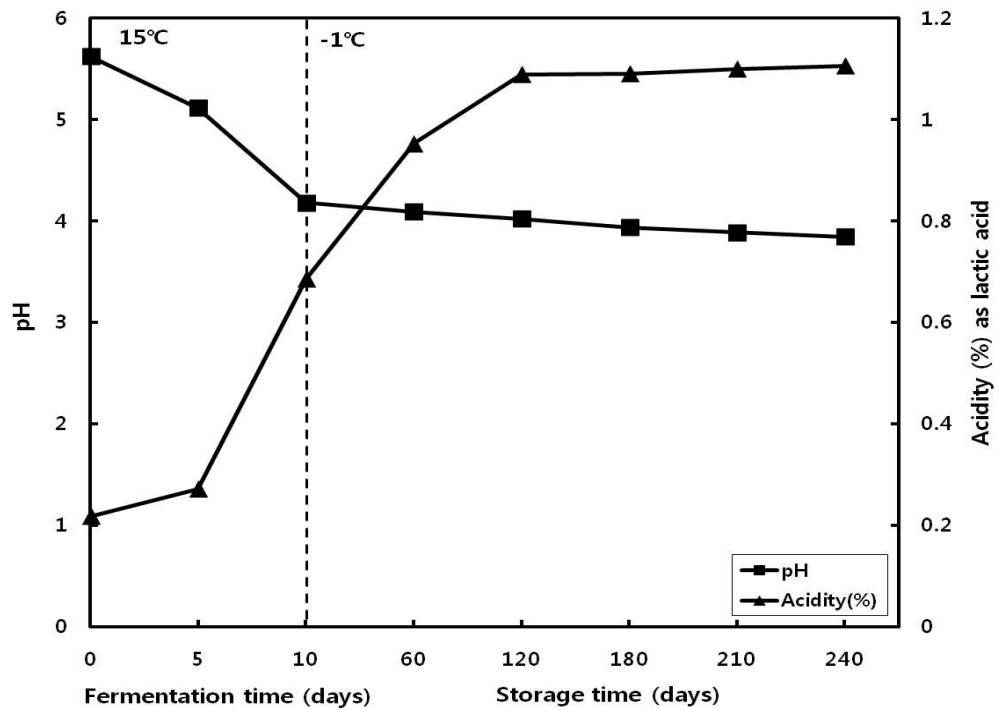


Figure 20. Total pH and acidity changes of 3% of salinity Control kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

Table 10. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the 3% of salinity SC1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

SC1		Fermentation time (days)			Storage time (days)					
		0	5	10	0	60	120	180	210	240
pH		5.654	4.971	4.189	4.189	3.957	3.933	3.825	3.732	3.704
Acidity(%)		0.213	0.344	0.672	0.672	0.813	0.935	0.884	0.982	0.904
Salinity(%)		2.92	2.85	2.88	2.88	2.91	2.97	2.8	2.73	3.1
Sweetness(brix %)		11.0	10.5	11.1	11.1	9.84	11.2	10.6	10.9	12.8
Microbial population (CFU/mL)	Total viable cell	6.74±0.11	8.93±0.03	9.23±0.03	9.23±0.03	8.61±0.01	7.54±0.15	5.48±0.03	5.32±0.08	5.38±0.05
	Lactic acid bacteria	6.69±0.14	8.88±0.01	9.20±0.03	9.20±0.03	8.59±0.01	7.51±0.18	5.36±0.02	5.04±0.07	5.08±0.11
	Gram (+) bacteria	5.48±0.22	4.18±0.12	4.85±0.11	4.85±0.11	4.43±0.10	4.74±0.11	4.54±0.06	4.54±0.06	4.54±0.07
	Yeast	-	-	2.60±0.01	2.60±0.01	2.85±0.01	3.48±0.01	3.00±0.01	-	-
	Dominance (%)	89.09	91.57	94.12	94.12	95.12	91.43	76.67	52.38	50

All values were mean ±SD. (n=3)

Table 11. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the 3% of salinity YY1 kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

YY1		Fermentation time (days)			Storage time (days)					
		0	5	10	0	60	120	180	210	240
pH		5.591	5.067	4.294	4.294	3.960	3.941	3.933	3.822	3.686
Acidity(%)		0.227	0.328	0.649	0.649	0.966	0.923	0.915	0.95	0.912
Salinity(%)		2.98	2.91	2.92	2.92	3.52	2.59	2.77	2.57	2.68
Sweetness(brix %)		12.1	10.5	11.3	11.3	11.48	10.2	10.9	11.1	10.6
Microbial population (CFU/mL)	Total viable cell	6.74±0.04	7.54±0.01	8.82±0.03	8.82±0.03	8.42±0.15	7.47±0.13	5.54±0.06	5.15±0.08	5.18±0.13
	Lactic acid bacteria	6.72±0.03	7.52±0.03	8.81±0.03	8.81±0.03	8.38±0.16	7.47±0.11	5.45±0.07	4.85±0.01	4.82±0.13
	Gram (+) bacteria	5.18±0.13	4.30±0.01	4.90±0.05	4.90±0.05	4.57±0.03	4.04±0.04	4.81±0.03	4.00±0.01	4.18±0.13
	Yeast	-	-	4.04±0.01	4.04±0.01	2.95±0.01	2.00±0.01	3.30±0.01	-	-
	Dominance (%)	96.36	94.29	98.48	98.48	96.15	93.33	84.85	50.71	44.17

All values were mean ±SD. (n=3)

Table 12. Changes of pH, acidity(%), salinity, sweetness and microflora in the 3% of salinity control kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

Control		Fermentation time (days)			Storage time (days)					
		0	5	10	0	60	120	180	210	240
pH		5.624	5.114	4.181	4.181	4.092	4.021	3.936	3.887	3.847
Acidity(%)		0.218	0.272	0.686	0.686	0.953	1.089	1.091	1.100	1.106
Salinity(%)		2.81	2.82	2.81	2.81	2.64	2.29	3.4	2.17	2.53
Sweetness(brix %)		10.6	10.0	10.2	10.2	11.04	9.7	10.0	9.1	11.3
Microbial population (CFU/mL)	Total viable cell	5.81±0.03	8.71±0.25	8.79±0.11	8.79±0.11	8.40±0.08	7.79±0.01	6.32±0.06	6.11±0.03	5.89±0.01
	Lactic acid bacteria	5.67±0.01	8.95±0.05	8.78±0.11	8.78±0.11	8.38±0.08	7.76±0.01	6.26±0.07	6.04±0.04	5.60±0.01
	Gram (+) bacteria	4.65±0.13	4.11±0.06	4.40±0.08	4.40±0.08	4.60±0.18	4.32±0.16	4.88±0.03	4.54±0.06	4.48±0.05
	Yeast	-	-	3.04±0.01	3.04±0.01	2.00±0.01	2.90±0.01	3.48±0.01	-	-

All values were mean ±SD. (n=3)

3. 색도 및 물성의 변화

1) 색도의 변화

제조된 starter 김치의 발효 기간에 따른 색도의 변화를 Hunter's scale에 의한 L(명도), a(적색도), b(황색도) 값으로 표시한 결과를 Table 5에 나타내었다. 일반 김치의 숙성 과정 중의 색도 변화를 보면 명도는 점점 낮아지고 연부 현상이 심해짐에 따라 황색도(b)가 저장 기간이 길어짐에 따라 급격히 상승하는 것을 관찰할 수 있다. 김치의 적색도(a)는 배추의 백색부가 숙성이 진행되어감에 따라 고춧가루의 붉은색이 용출되어 조직으로 스며들어 붉은색이 점점 진해져 적색도의 값이 증가하게 된다. 숙성의 진행에 따른 녹색부 및 조직의 적색화 정도는 육안으로 김치의 미숙기, 적숙기 및 과숙기를 식별할 수 있는 기준이 될 수 있는데, 숙성초기의 미숙기는 밝은 연두 빛을 띄는 녹색에서 적숙기에 적색도가 증가하며 과숙기에는 적색과 갈색을 품은 어두운 녹색을 나타내어 이를 통하여 김치의 숙성 정도를 알 수 있다(29). 김치의 황색도(b)는 배추의 엽록소가 pheophytin으로 변화되어 황녹색을 띠게 되어 증가하게 된다(62). Chlorophyll은 산에 불안정한 화합물이기 때문에 산성에서 쉽게 분해되어 Mg^{++} 이 이탈되어 pheophytin으로 변화되어 녹색이 퇴색되는데, 김치의 숙성말기에 b값이 증가하는 것은 김치내 생성된 젖산에 의하여 배추의 chlorophyll을 분해하여 pheophytin을 생성하기 때문이다(62).

본 실험에서 제조한 김치의 경우 숙성 기간에 비하여 연부현상이 많이 진행되지 않았고 김치의 붉은 기가 점점 어두워지며 주황색에 가까운 색으로 관찰되었으며 황색도(b) 측정 시 일반 김치의 오랜 숙성 과정에서 보이는 황색도(b)도의 변화가 크지 않고 김치 담금 직후와 비교 시 거의 일정하게 유지되는 것으로 나타났다. 염도 3% 양념 배합비로 제조한 김치의 경우, 부식재료가 줄고 고춧가루의 양을 많이 넣어 제조하여 일반 양념 배합 비 김치에 비하여 붉은색이 강하였고 이는 묵은지의 색과 유사하게 보였다. 색도 측정 결과, 일반 숙성 김치와는 달리 연부현상이 적어 황색도(b)값의 변화는 크지 않았으며 일반 묵은지와 같이 적색이 검붉은 빛으로 변화되는 것으로서 명도의 수치가 낮아지는 것을 관찰하였다. Yoo(68) 등에 의하면 pH가 감소함에 따라 L, a, b값은 전반적으로 증가하는 경향을 나타낸다는 보고와는 달리 본 실험에서는 저장 기간 중 pH의 감소에 색도의 변화는 그리 크지 않은 것으로 나타났다. 또한 Shin(64) 등은 김치를 온도별로 저장하면서 색도를 관

찰한 결과 온도가 높을수록 변화의 정도가 심하다고 보고하였는데 본 실험에서는 15℃라는 비교적 높은 온도에서 발효하였으나 담금 직후와 저장 240일 차의 색도의 변화는 그리 크지 않음을 확인하였다.

Table 13. Changes of Hunter's color values of starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at 1°C

Hunter's Value ¹⁾	Samples	Fermentation time (days)				Storage time (days)			
		0	3	5	60	120	180	210	240
L	AF1	35.94±0.02	35.84±0.01	35.74±0.01	35.56±0.04	35.45±0.08	35.11±0.03	34.45±0.03	34.27±0.04
	WJ1	35.37±0.04	35.24±0.03	35.22±0.01	35.12±0.02	34.85±0.01	34.16±0.01	34.11±0.02	33.62±0.05
	SC1	36.08±0.01	35.89±0.07	35.74±0.01	35.25±0.08	34.91±0.05	34.82±0.01	34.74±0.02	34.65±0.15
	YY1	34.97±0.05	34.88±0.01	34.56±0.01	34.51±0.03	34.50±0.05	34.40±0.02	33.70±0.02	32.96±0.28
a	AF1	34.50±0.07	35.34±0.10	35.43±0.10	36.10±0.04	36.25±0.06	36.29±0.12	36.32±0.08	36.48±0.06
	WJ1	33.00±0.11	33.11±0.18	34.75±0.18	35.01±0.12	35.21±0.15	35.45±0.11	35.68±0.07	35.78±0.09
	SC1	33.29±0.10	34.60±0.12	35.44±0.21	35.56±0.10	35.78±0.21	35.86±0.09	35.90±0.10	35.96±0.08
	YY1	31.29±0.08	32.57±0.16	33.68±0.22	34.68±0.11	35.21±0.14	35.45±0.06	35.86±0.12	35.89±0.10
b	AF1	49.00±0.32	49.25±0.28	49.32±0.14	49.35±0.39	50.21±0.26	50.41±0.51	50.61±0.42	50.82±0.54
	WJ1	45.49±0.25	45.66±0.22	45.76±0.23	45.89±0.25	46.98±0.74	48.00±0.87	48.79±0.33	49.70±0.23
	SC1	48.55±0.28	49.91±0.32	50.09±0.89	52.02±0.12	52.02±0.35	52.32±0.21	52.48±0.66	52.80±0.36
	YY1	46.78±0.83	47.29±0.54	48.44±0.21	48.85±0.14	48.92±0.55	49.17±0.22	50.40±0.32	50.60±0.71

All values were mean ±SD. (n=3)

¹⁾L: lightness(+white~-black), a: redness(+red~-green), b: yellowness(+yellow~-blue).

Table 14. Changes of Hunter's color values of 3% salinity kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

Hunter's Value ¹⁾	Samples	Fermentation period (days)				Storage time (days)			
		0	5	10	60	120	180	210	240
L	SC1	37.05±0.02	37.11±0.05	36.98±0.02	36.67±0.02	36.29±0.02	35.64±0.02	35.40±0.01	35.04±0.01
	YY1	37.12±0.05	37.20±0.02	36.61±0.01	36.37±0.05	35.22±0.03	35.04±0.02	35.01±0.01	34.89±0.01
	Control	37.16±0.01	37.03±0.10	36.99±0.21	36.57±0.08	36.27±0.02	35.30±0.03	34.70±0.03	34.57±0.01
a	SC1	33.81±0.01	34.13±0.01	34.00±0.07	34.27±0.11	34.58±0.05	35.21±0.07	35.77±0.12	36.14±0.11
	YY1	33.79±0.12	34.28±0.10	34.60±0.05	34.75±0.20	34.85±0.02	35.05±0.10	35.57±0.14	37.43±0.04
	Control	33.08±0.09	33.07±0.12	33.14±0.12	34.53±0.11	34.73±0.01	35.29±0.15	35.48±0.08	36.26±0.08
b	SC1	48.03±0.03	48.77±0.23	49.02±0.15	51.55±0.15	51.63±0.25	51.70±0.25	51.83±0.24	51.99±0.35
	YY1	48.14±0.29	48.45±0.42	49.65±0.23	50.78±0.25	50.82±0.37	51.00±0.12	51.39±0.32	51.63±0.41
	Control	48.12±0.01	48.27±0.21	49.73±0.30	50.35±0.33	50.80±0.22	51.29±0.34	52.65±0.36	54.65±0.52

All values were mean ±SD. (n=3)

¹⁾L: lightness(+white~-black), a: redness(+red~-green), b: yellowness(+yellow~-blue).

2) 물성의 변화

제조된 starter 김치의 발효 기간에 따른 물성 측정 결과, Figure 19~20 과 같이 일반 양념 배합비 김치와 염도 3% 양념 배합비 김치의 배추의 단단함을 비교하였다. 염도 3% 양념 배합비 김치의 배추 조직감이 일반 양념 배합비 김치의 배추 조직감보다 더 단단함을 관찰하였다. 담금 직후에서부터 저장 240일차까지의 변화를 보면, 일반 양념 배합비 김치의 배추의 단단함은 저장 120일째부터 점점 감소하는 것을 관찰할 수 있으며 그 중 균주 WJ1과 SC1을 starter로 제조한 김치의 배추 조직감이 가장 낮은 수치를 나타내며 담금직후와 큰 차이를 보였다. 이에 비하여, 염도 3% 양념 배합비에 따라 제조한 김치의 경우, 저장 210일차부터 단단함이 점차적으로 감소하기 시작하였으며 균주가 첨가되지 않은 대조구 김치의 배추 조직감이 가장 낮은 수치를 나타냄을 확인하였다. 대조구 김치의 물성은 저장 기간이 오래될수록 더 큰 차이를 나타내었다. 염도 3% 양념 배합비로 제조한 김치의 배추 조직감은 담금 직후와 저장 240일째 차이를 보였으나 그 변화는 일반 양념 배합비의 물성의 차이에 비하여 작았고 그 단단함은 오래 유지 되었다.

Yoo(69)의 묵은 김치의 텍스처 특성 변화에 대한 연구 중, 배추김치는 숙성 중에도 계속해서 소금의 탈수 작용이 일어나 세포벽이 쭈그러져 포개지게 되므로 절단면에 걸리는 섬유소의 수가 증가하게 되고 유연하게 밀리면서 섬유소의 밀도가 높아짐으로써 절단력은 증가하게 되나 탈수 작용으로 초기에는 배추조직에 함유된 효소들이 활성화되면서 세포벽 다당류와 단백질 등의 거대분자를 분해시켜 물성의 변화를 초래할 수 있으며, 숙성이 진행되면서 미생물이 번식하고 이들이 생성하는 효소작용에 의해서 더욱 다양한 물성변화가 진행되는데 경도는 담금이나 숙성조건에 따라서 상이한 양상을 보인다고 보고하였다. 또한, 염도가 높은 묵은 김치의 텍스처 변화는 일반 김치에 비하여 그 변화의 폭이 작고 연부현상이 지연되어 오랜 저장 기간에도 배추 조직의 단단함을 관찰할 수 있다고 밝혔다. 본 실험에서의 균주 첨가 김치는 저장 기간이 길어짐에 따라 각 균주를 첨가한 김치는 일반 묵은지와 비슷한 질감을 갖는 것을 관찰하였다.

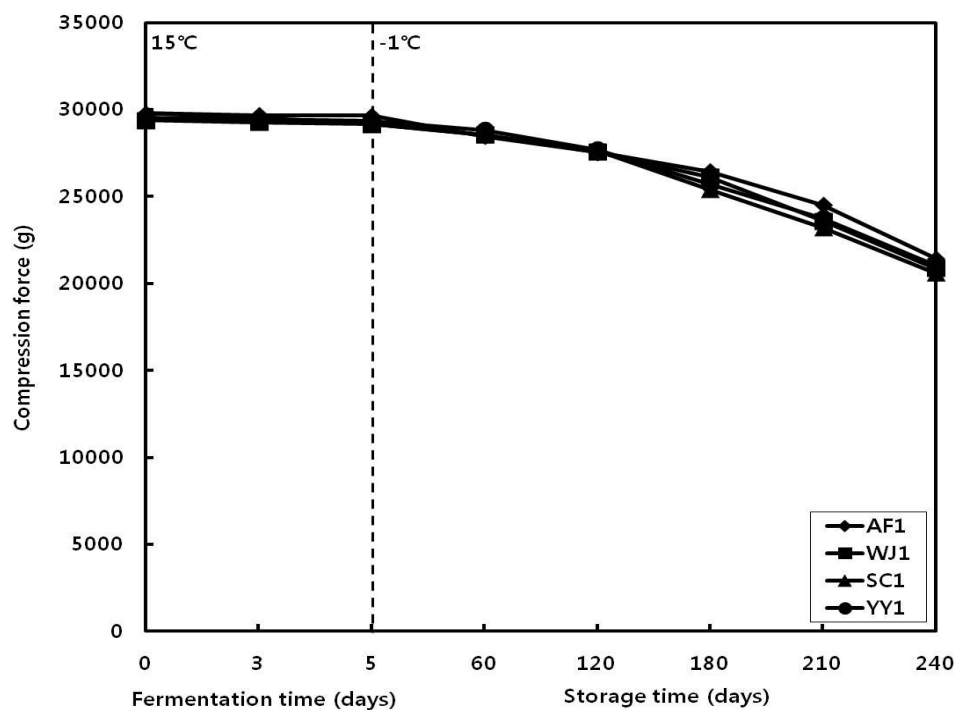


Figure 21. Changes in texture properties of AF1, WJ1, SC1, and YY1 starter kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

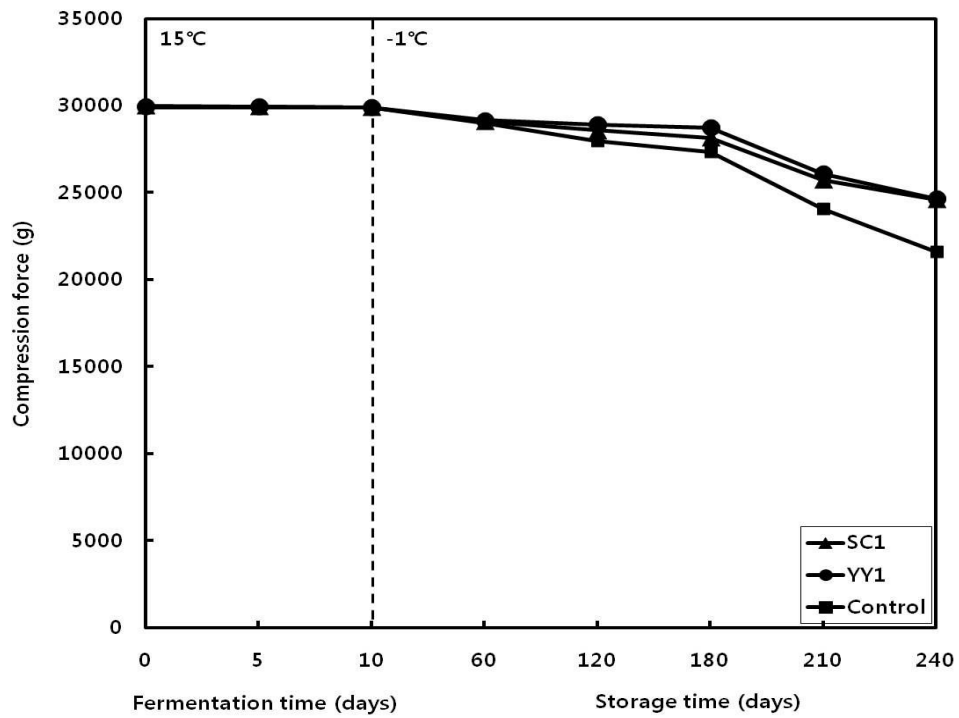


Figure 22. changes of compression force of 3% of salinity kimchi during fermentation at 15°C and storage at -1°C

3) 관능평가

일반 양념 배합비로 제조한 김치의 관능적 특성을 관찰한 결과를 Table15~16에 나타내었다. *Lactobacillus plantarum* AF1을 적용한 김치는 숙성 초기에 발효취가 풍부하였으나 숙성 기간이 길어짐에 따라 신맛이 강하여 김치의 본래의 깊은 맛이 사라지게 되고 군덕 내가 나기 시작하였고, *Lactobacillus sakei* WJ1을 적용한 김치는 부드러운 단맛과 풍부한 발효취와 특유한 향을 지니고 있었으나 시간이 지남에 따라 이취와 쓴맛으로 변하였다. *Lactobacillus sakei* YY1을 적용한 김치는 숙성 초기 새콤한 맛을 내고 숙성 기간이 길어짐에 따라 시원하고 깔끔한 맛을 유지하였으나 이는 묵은지의 고유의 향취와는 다소 다른 맛이었으며 숙성 기간이 길어짐에 따라 이취가 생성되었다. *Lactobacillus sakei* SC1를 적용한 김치는 신맛이 강하지 않고 강한 단맛을 내며 숙성 80일째부터 묵은지 특유의 깊은 감칠맛과 향을 가지기 시작하였고 숙성 기간에 따른 깊은 맛과 풍부한 발효 취를 내었다.

염도3% 양념비를 이용한 김치는 일반 양념 배합비로 제조한 김치보다 맛에 대한 전반적인 선호도가 높았다. *Lactobacillus sakei* SC1와 *Lactobacillus sakei* YY1을 적용한 김치는 발효취가 풍부하고 단맛과 깊은 맛이 강하며 오랜 저장 기간에도 군덕내가 나지 않는 특징을 보였다. 또한 높은 염도로 김치를 제조하여 배추의 아삭아삭한 맛이 오래 유지되었고 이는 맛에 대한 선호도를 더 높였다. 또한, 균주의 적용으로 낮은 pH에 비하여 신맛이 강하지 않았다.

균주가 첨가되지 않은 대조구 김치의 경우, 저장기간이 길어질수록 군덕내가 심하였고 신맛이 아주 강하였다.

Table 15. Sensory evaluation on *L. plantarum* AF1, *L. sakei* WJ1, *L. sakei* SC1, and *L. sakei* YY1

	Fermentation time (days)			Storage time (days)				
	0	3	5	60	120	180	210	240
<i>L.plantarum</i> AF1	생 김치맛 (배추의 단맛)	약한 발효취가 있으나 배추의 단단함은 담금 직후와 거의 같음	신맛이 강하나 발효취가 풍부 배추 조직 변화 없음	깊은 맛과 신맛이 적절하게 섞임 생 배추와 같은 풋냄새 사라짐	신맛이 강하여 깊은 맛이 약해짐 배추가 약간 물러졌으나 거의 변화 없음	연부현상이 눈에 띄기 시작하여 군덕내가 나기 시작하고 신맛 강함	연부현상이 현저히 눈에 띄며 군덕내와 신맛이 강하고 이취 심함	연부현상이 가장 심하며 군덕내와 신맛 강함
<i>L.sakei</i> WJ1	생 김치맛 (배추의 단맛)	배추의 풋 냄새 강하며 조직의 단단함 유지	발효취가 나기 시작함 배추의 조직감 거의 변화 없음	부드러운 단맛과 발효취가 풍부 조직의 단단함 감소	특이한 향과 맛을 가지기 시작했으며 배추는 약간 물러졌으나 아삭함 지남	단맛이 있으나 약한 쓴맛 남 아삭한 맛을 내지만 부위별 연부현상이 관찰됨	단맛이 나고 쓴맛이 조금 강해짐 연부현상이 시작되는 것으로 보임	쓴맛이 강해졌으며 연부현상이 심해지고 군덕내 남
<i>L.sakei</i> SC1	생 김치맛 (배추의 단맛)	발효취가 나기 시작하며 조직은 단단함	발효취가 강하고 단맛 남 배추의 조직감 변화 없음	발효취가 풍부 부드러운 단맛 신맛 없음 배추의 단단함 약간 감소	묵은지 특유의 향과 감칠맛 남 단맛 강함 생배추의 맛은 사라졌으나 아삭함 유지	깊은 맛이 더 강해지고 풍부한 발효취가 남 아삭한 맛보다 약간 질긴 단단함 느껴짐	묵은지 풍미와 향취가 느껴짐 단맛 강함 연부현상이 관찰되며 아삭한 맛이 약간 감소	배추의 식감과 색, 향과 맛 모두 묵은지와 흡사 연부현상이 약간 진행됨
<i>L.sakei</i> YY1	생 김치맛 (배추의 단맛)	풋향이 강하고 약간 발효취 남	발효취와 함께 새콤한 맛이 남 배추의 조직 변화 없음	깊은 맛은 없고 시원, 깔끔한 맛 단단함 감소	배추의 아삭한 맛이 유지되어 시원하고 깔끔한 맛 유지	단맛이 있고 시원한 맛 이취가 있음 아삭하나 부위별 연부현상 보임	연한 단맛이 있으나 연부현상과 더불어 이취가 점점 심해짐	새콤달콤한 맛이 나며 심해진 연부현상이 보이며 이취 강함

Table 16. Sensory evaluation on 3% salinity *L. sakei* SC1, *L. sakei* YY1 starter kimchi and control kimchi

	Fermentation time (days)			Storage time (days)				
	0	5	10	60	120	180	210	240
<i>L.sakei</i> SC1	생 김치맛 (배추의 단맛)	배추의 풋 냄새가 강하며 조직이 담금 직후와 차이 없음	배추의 풋 냄새가 약간 나며 특유의 단맛이 나기 시작함 배추의 물성 변화는 거의 없음	단맛이 강하며 높은 염도에 비하여 짠맛이 강하게 느껴지지 않고 묵은지와 비슷한 식감의 아삭한 맛 지님	묵은지 특유의 향과 감칠맛이 있고 단맛과 깊은맛을 지님 배추 조직이 아삭하고 약간 질겨 묵은지의 식감과 비슷	단맛이 강하고 저장 기간에 따른 발효취가 김치와 잘 어울러지고 향이 풍부하여 묵은지 맛과 유사	묵은지 풍미와 향취가 느껴짐 단맛 강함 약한 연부현상은 느껴지나 강하지 않음	배추의 식감과 색, 향과 맛 모두 저장 기간에 따른 묵은지의 풍미와 흡사
<i>L.sakei</i> YY1	생 김치맛 (배추의 단맛)	배추의 풋 냄새 심하며 조직 단단함	배추의 풋 냄새가 완전히 사라지고 발효취가 나기 시작함	시원하며 높은 염도에 비해 짠맛이 강하지 않고 물성의 변화가 저장 전과 비교시 약간 있음	연한 단맛을 내며 시원한 맛 유지 물성의 변화와 더불어 발효취 풍부하게 지님	새콤달콤한 맛이 있으나 김치 본래에서 나지 않는 특유의 이취가 나기 시작	단맛이 있으나 이취가 더욱 강하게 나고 약간 씹쓸한 맛도 생겨남 연부현상 관찰됨	연한 단맛에 비하여 이취가 강하여 김치 본래의 맛을 느끼기 어려움
Control	생 김치맛 (배추의 단맛)	배추의 풋 냄새 강하며 물성은 담금 직후와 같음	배추의 풋향은 전혀 느끼지지 않으며 발효취가 조금 나지만 물성 변화 거의 없음	단맛은 없으나 시원하고 향과 맛에 대한 평이 좋고 배추의 단단함이 약간 감소	맛에 대한 평 좋으나 단맛과 깊은 맛은 없으며 물성의 변화를 가장 크게 보임	starter 김치에 비해 연부현상이 관찰되었고 신맛이 강하였으나 맛에 대한 선호도 높음	신맛이 더욱 강해지고 심한 연부현상의 진행으로 군덕내가 심하게 남	연부현상이 아주 심하며 이로 인한 군덕내가 강하고 신맛이 최고조에 이름

제 4장 결 론

많은 유산균은 프로바이오틱스(probiotics)로서 소화 흡수를 돕고 장내부패를 억제하고, 설사 변비의 치료 효과, 장내 유해균의 억제, 비타민의 생성, 혈중 콜레스테롤 저하능, 항암 효과, 인체의 면역 능력 증강 등 다양한 기능이 보고되고 있다(15). 그 중 *Lactobacillus strain*의 경우 immunoglobulin의 생산 자극, 대식세포에 interferon 유도, 신체 부분적 산성화, hypocholesteroleaemic 효과, mutagenic 물질과의 반응, 항균물질인 박테리오신의 생성, 그리고 *Salmonella enterica serovar Typhimurium*과 *Neisseria gonorrhoea*와 같은 병원성 세균의 흡착 저해 등의 기능이 밝혀진 바 있으며, 이와 같이 유산균의 숙주에 대하여 이로온 작용을 하는 probiotics로서의 기능이 밝혀져 한때 영양적 측면에서 가치 없는 식품으로 오인 받았던 발효 식품들은 오늘날에 이르러서는 가장 과학적인 식품으로 인정받고 있다(14, 17, 37, 38, 59, 71).

이러한 몸에 이로온 기능을 전달하고 영양적 측면에서 가치가 높은 유산균을 우리나라 전통적인 식품인 김치에 적용하고 이를 적정 온도에서 발효하고 숙성시켜 최근 급증하는 목은지에 대한 관심과 수요에 대처할 수 있도록 숙성 목은지 제조에 응용하는 것은 반드시 필요하다.

현재, 목은지에 관련한 여러 가지 과제들이 진행되고 있는 가운데, 목은지 미생물상의 정성적·정량적 분석 및 분리 젖산균의 기능적 특성 분석, 목은지의 숙성제조를 위한 미생물학적 공정개발 및 품질기준의 확립, 고품질 목은 김치의 산업적 생산기술 개발 등이 있으며 이러한 과제의 궁극적인 목적은 목은지에 대한 품질기준 확립 그리고 목은 김치의 숙성제조 개발이다. 이와 같은 목적을 달성하기 위한 첫 번째 단계는 목은지에 적용할 수 있는 종균의 분리가 우선이 될 것이며, 목은지의 제조가 적어도 6개월 이상 소요되는 것과 비교하여 제조기간을 현저하게 단축한다는 것은 목은지의 안정적이고 신속한 공급이 가능하다는 점에서 산업적으로 의미가 크다.

따라서 본 연구에서는 김치로부터 분리된 김치유산균을 숙성 목은지 제조의 starter로 이용하기에 앞서, 균주 4종의 생육도, 내염성, D/L-lactic acid의 농도측정, 콜레스테롤 저하능, 항균 활성 등의 일반적인 특성을 규명하고 이를 김치의

starter로 적용, 제조하여 김치의 일반 분석과 발효 패턴을 관찰하고 숙성 기간에 따른 관능평가, 색도와 물성의 변화를 통하여 균주의 숙성 목은지 starter로서의 가능성을 제고하고자 실시하였다.

선별된 유산균은 Gram staining을 비롯한 형태학적 특성과 생화학적 특성 및 16S rRNA 염기서열을 통하여 동정한 결과, 이미 동정된 *Lactobacillus plantarum* AF1외 나머지 3종 모두 *Lactobacillus sakei* 로 동정되었으며 이들을 각각 *Lactobacillus sakei* WJ1, *Lactobacillus sakei* SC1, 그리고 *Lactobacillus sakei* YY1이라 명명하였다. 선별된 균주의 배양시간에 따른 균의 생육도를 관찰한 결과, *Lb. plantarum* AF1은 36시간 쯤 정지기에 접어들었고 그 외 나머지 *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1, 그리고 *Lb. sakei* YY1은 24시간에 접어들어 정지기에 도달하였다. 선별된 균주의 초기 배지의 pH (pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0) 와 NaCl (0, 1, 3, 5, 7%) 농도에 따른 생육도를 관찰한 결과, 4 균주 모두 pH 7.0에서 최대 생육도를 나타내었으며 pH 6.0 이상의 범위에서 최대 생육도의 90%이상, pH 5.0 이하에서 생육도가 점점 감소하는 것으로 관찰되었다. NaCl 농도에 따른 생육도를 관찰한 결과 4균주 모두 NaCl의 함량이 높아질수록 생육도가 감소하는 경향을 보였으며 NaCl 농도 3%에서부터 생육의 현저한 감소를 관찰하였다.

선별된 균주의 콜레스테롤 저하능과 관련하여 균주의 D/L-lactic acid 농도를 측정하였다. 그 결과, *Lb. plantarum* AF1은 D(-)-lactic acid, *Lb. sakei* WJ1은 D/L-lactic acid, *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1은 L(+)-lactic acid를 생산하는 균주로 확인되었다.

균주의 기능적인 특성을 조사하기 위하여 O-phthalaldehyde 방법을 이용하여 30℃와 37℃에서 균을 배양하고 24시간, 48시간 후 콜레스테롤 저하능을 측정한 결과, *Lb. plantarum* AF1은 30℃에서 약 62~69%, 37℃에서 약 82~97%의 높은 콜레스테롤 저하능을 나타내었다. 그 외, *Lb. sakei* WJ1, *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1은 30℃에서 약 52~59%, 37℃에서 약 42~55%의 콜레스테롤 저하능을 보였다. L-form의 유산균의 콜레스테롤 저하능이 높다는 보고에 따라 *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1 모두 각 온도에서 50%이상의 콜레스테롤 저하능을 나타내는 것으로 관찰되었으나 본 실험에서는 D-form인 *Lb. plantarum* AF1이 가장 높은 콜레스테롤 저하능을 나타내는 것으로 나타났다.

균주를 김치에 적용하였을 시 균의 우점이 되는 근거로서 균의 항균 활성을 측정하였다. 균체를 직접 가하는 direct method와 조항균 물질을 paper disk에 가하

여 생육 저지환을 관찰하는 paper di나 method를 병행하여 실험하였다. Direct method를 사용하여 항균활성을 측정된 결과, *Lb. plantarum* AF1이 가장 큰 생육 저지환을 나타내었고 그 외 3종의 균주는 거의 비슷한 크기의 저지환을 나타내었다. Paper disk method를 이용한 항균 활성 측정은 지시균인 *Bacillus subtilis* ATCC 6633에 대하여 균주의 5배 농축된 상징액을 이용하여 실험하였고, 모두 활성을 나타내었다. 그러나, 이 항균 활성의 원인 물질에 대하여 정확히 알짜 pH를 조정하여 항균 활성을 측정된 결과, pH 4.0이상에서는 활성을 나타내지 않는 것으로 관찰되었다. 결과적으로 균주의 강한 산 생성능력으로 항균 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

위와 같은 균주의 일반적인 특성을 규명하고 이를 숙성 묵은지 제조에 이용하기 위하여 김치의 starter로서 적용하였다. 1차적으로 일반 양념비를 이용한 김치를 제조하였고 2차적으로 일반 묵은지의 염도에 맞춰 염도3% 양념비를 이용한 김치를 제조하였다. 일반 양념비에 균주를 적용한 김치 4종 모두 저장 120일까지도 90%이상의 높은 우점률을 나타내었다. 특히, *Lb. plantarum* AF1 과 *Lb. sakei* WJ1의 starter 김치는 저장 210일까지도 90%정도의 높은 우점률을 나타내었으나, *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1의 srater 김치는 우점률이 저장 180일부터 조금씩 감소하여 저장 240일에 약 50%정도의 우점률을 나타내었다. 그러나 관능평가를 통한 맛, 향, 그리고 배추의 조직감에 대하여 *Lb. sakei* SC1 starter 김치에 대한 선호도가 가장 높았으며 저장 60일 이후부터 묵은지와 비슷한 맛과 향을 나타내기 시작하였으며 저장 기간이 오래될수록 그 특성을 더 뚜렷해졌다. 염도 3% 양념비를 사용한 김치는 *Lb. sakei* SC1와 *Lb. sakei* YY1를 적용하였고 그 외 균주를 첨가하지 않은 대조구 김치를 제조하여 균주첨가 김치와 비교하였다. 균주 적용 김치 2종 모두 저장 150일까지 90% 이상의 높은 우점률을 나타내었으나 그 이후부터 우점률이 점차적으로 떨어져 저장 240일까지 약 50%의 우점률을 나타내었다. 관능평가의 특징으로는 높은 염도에도 불구하고 그 짠맛은 잘 느껴지지 않았고 이로 인하여 높은 산도에 비하여 그 신맛이 강하게 느껴지지 않았다. 또한 높은 염도로 인하여 발효는 늦게 진행되었으나 배추 조직의 단단함이 오래 유지되어 오랜 저장 기간에도 묵은지와 같은 아삭아삭한 맛을 느낄 수 있었다. 일반 양념비를 이용한 김치를 제조하였을 경우와 같이, *Lb. sakei* SC1를 적용한 김치에서 풍부한 발효취와 더불어 강한 단맛을 느낄 수 있었고 묵은지 특유의 향과 색을 관찰할 수 있었다.

본 실험은 김치로부터 우수한 유산균을 분리하고 분리된 유산균의 일반적인 특성을 관찰하고 이를 토대로 김치에 적용하여 선별된 유산균이 속성 묵은지의 starter로서의 가능성을 확인하고자 실시하였다. 속성 묵은지를 제조하는 것은 현재 묵은지 수요량 급증과 그에 대한 공급 부족 현상으로 인해 문제가 되고 있는 묵은지 산업에서 반드시 필요할 것이며 또한 문제점에 대한 해결방안이 될 것이다.

많은 연구들에서 묵은 김치의 표준화된 품질규격을 마련하는 기초자료를 제공하기 위하여 묵은지의 이화학적 및 미생물학적 특성 변화를 관찰하고 제조과정에서의 텍스처 및 관능적 특성 변화에 대해서도 연구하였고(68, 69), 묵은 김치의 휘발성 성분 및 향기활성성분에 관한 연구도 이루어진 바 있다(26). 또한, 속성 묵은지를 제조하기 위한 여러 가지 방법들이 연구, 개발되어 지고 있다(7, 13, 20, 50, 51, 72). 그러나 이러한 연구들이 실질적으로 묵은지 산업에 적용하기에 앞서 묵은지에 대한 품질 기준의 확립이 필요하다. 묵은지 산업 측면에서 현재 묵은지에 대한 국내 품질기준이 없으며, 대부분 자세한 묵은지 품질관리지침을 가지고 있지 않아 묵은지에 대한 품질관리가 잘 이루어 지지 않고 있는 실정이다. 묵은지의 품질기준은 일반김치와는 차별화하여 저장기간, 산도, 염도 등 묵은지만 갖는 특성을 기준으로 설정되어야 할 것으로 보인다. 이러한 문제점이 해결된다면 묵은지와 같이 경쟁력을 가진 김치의 상품화를 위하여 기존 김치 제품의 품질 개선 및 공정의 표준화를 이루게 될 것이며 또한 높은 수요에 대한 공급이 가능할 것이고 묵은지 맛과 품질에 대한 균일화를 이룰 것이다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Ahn, Y. T., and Kim, H. U. 1999. A review on the hypocholesterolemic effect of lactic acid bacteria. *Kor. Dairy Techno.* **17**: 109-121.
2. AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
3. Chae, M. H., and Jhon, D. Y. 2006. Preparation of kimchi containing *Bifidobacterium animalis* Y-64. *J Microbiol Biotechnol* **16**: 431-437.
4. Chang, J. Y., Kim, I. C., and Chang, H. C. 2011. Effect of Solar Salt on the Fermentation Characteristics of Kimchi. *Korean J Food Preserv.* **18**: 256-265.
5. Chang, J. Y. and Chang, H. C. 2010. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin-producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *Journal of food science.* **75**: 103-110.
6. Cheigh, H. S. 1995 Critical Review on Biochemical Characteristics of Kimchi (Korean Fermented Vegetable Products). *Journal of the east asian society of dietary life.* **5**: 89-101.
7. Cheon, E. H. Method for preparing old ripening kimchi using starter of microorganism. *Korean patent.* 10-0736835.
8. Cho, Y., and Rhee, H. S. 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation (I). *Korean J Food Cookery Sci* **7**: 15-25.
9. Cho, Y., and Rhee, H. S. 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation (II). *Korean J Food Cookery Sci* **7**: 89-95.
10. Choi, S. Y., Kim, Y. B., Yoo, J. Y., Lee, I. S., Chung, K. S., and Koo, Y. J. 1990. Effect of Temperature and Salts Concentration of Kimchi Manufacturing on Storage. *Korean J. FOOD SCI. TECHNOL.* **22**: 707-710.
11. Choi, K. S., Sung, C. G., Kim, M. H., and Oh, T. K. 1999. Fermentation Method of Kimchi Using Halophilic *Lactobacillus* sp. HL-48 and Lactic acid. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 246-251.

12. Choi, S. Y., Lee, S. H., Koo, Y. J., and Shin, D. H. 1989. Production of Rapid-Fermented Kimchi with Starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **17**: 403-406.
13. Choi, S. W. Preparation of old storage kimchi and it's powder used starter of Lactic acid bacteria. *Korean patent.* 10-2011-0055156.
14. Fernandes, C. F., Shahani, K. M., and Amer, M. A. 1987. Therapeutic role of dietary *lactobacilli* and *lactobacillic* fermented dairy products. *FEMS Microbiol. Lett.* **46**: 343-356.
15. Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **7**: 175-188.
16. Ha, D. M., and Cha, D. S. 1994. Novel starter for kimchi, using bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strain. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* **22**: 550-556.
17. Isolauri, E., Joensuu, J., Suomalainen, H., Luomala, M., and Vesikari, T. 1995. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactabacillus casei* GG. *Vaccine.* **13**: 310-312.
18. Ji, S. H., Han, W. C., Lee, J. C., Cheong, C., Kang, S. A., Lee, J. H., and Jang, K. H. 2009. Effect of Low Temperature on the Qualities of Long-term Fermented Kimchi (Korean Pickled Cabbage). *Korean J. Food Preserv.* **16**: 804-809.
19. Jin, H. S., Kim, J. B., Yun, Y. J., and Lee, K. J. 2008. Selection of kimchi starters based on the microbial composition of kimchi and their effects. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **37**: 671-675.
20. Joo. E. P. Method for preparing old-fermented kimchi and old-fermented Kimchi prepared thereby. *Korean patent.* 10-1238316.
21. Jung, H. O., Ki, Y. H., Kim, B. H., Lee, J. J., and Lee, M. Y. 2006. A Study on Sensory Characteristics of Ripened Kimchi with Herbs. *The Korean Journal of Culinary Research.* **12**: 184-194.
22. Kang, S. M., Kim, H. J., and Yang, C. B. 1997. Effects of yeast addition as starter on fermentation of kimchi. *Korean J. Food SCI. TECHNOL.* **29**: 790-799.
23. Kang, S. M., Yang, W. S., Kim, Y. C., Joung, E. Y., and Han, Y. G. 1995.

- Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* for kimchi fermentation and effect of starter. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 461-471.
24. Kim, S. E., Kim, Y. H., Lee, H. J., Kim, D. O., and Kim, H. Y. 2012. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from *Mukeunji*, a long-term ripened kimchi. *Food sci. Biotechnol.* **21**: 1135-1140.
 25. Kim, Y. J. 1999. Physiological properties of kimchi. *Food industry and Nutrition.* **4**: 59-65.
 26. Kim, J. Y., Park, E. Y., and Kim, Y. S. 2006. Characterization of Volatile Compounds in Low-Temperature and Long-Term Fermented Baechu Kimchi. *Korean J. Food Culture.* **21**: 319-324.
 27. Kim, E. K., An, S. Y., Lee, M. S., Kim, T. H., Lee, H. K., Hwang, W. S., Choe, S. J., Kim, T. Y., Han, S. J., Kim, H. J., Kim, D. J., and Lee, K. W. 2011. Fermented kimchi reduces body weight and improves metabolic parameters in overweight and obese patients. *Nutrition Research.* **31**: 436-443.
 28. Kim, T. W., Lee, J. Y., Jung, S. H., Kim, Y. M., Jo, J. S., Chung, D. K., Lee, H. J., and Kim, H. Y. 2002. Identification and Distribution of Predominant Lactic Acid Bacteria in Kimchi, a Korean Traditional Fermented Food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 635-342.
 29. Kim, M. K., Ha, K. H., Kim, M. J., and Kim, S. D. 1994. Change in Color of Kimchi during Fermentation. *J. Korea. Soc. Food Nutr.* **23**: 274-278.
 30. Kim, M. J., and Kim, G. R. 2006. In Vitro Evaluation of Cholesterol Reduction by Lactic Acid Bacteria Extracted from Kimchi. *The Korean Journal of Culinary Research.* **12**: 259-268.
 31. Kim, S. I., Kim, I. C., and Chang, H. C. 1999. Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganism and sensitive strain from soil. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **28**: 526-533.
 32. Kim, D. S., Cho, H. W., Kim, D. H., and Oh, K. H. 2013. Funtional Characterization of *Lactobacillus sakei* JK-17 Isolated from Long-term fermented kimchi, *Muk Eun Ji. Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal* **28**: 18-23.
 33. Kim, S. H., Kim, Y., Whang, J. Y., Whang, K. Y., and Oh, S. 2008. Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Biosci. Biotechnol.*

Biochem. **72**: 1483–1490.

34. Kim, Y. C., Jung, E. Y., Kim, H. J., Jung, D. H., Hong, S. G., Kwon, T. J., and Kang, S. M. 1999. Improvement of kimchi fermentation by using acid-tolerant mutant of *Leuconostoc mesenteroides* and aromatic yeast *Saccharomyces fermentati* as starters. *J Microbiol Biotechnol* **9**: 22–31.
35. Kim, J. H., Park, J. Y., Jeong, S. J., Chun, J. Y., and Kim, J. H. 2005. Cold shock response of *Leuconostoc mesenteroides* SY1 isolated from kimchi. *J Microbiol Biotechnol* **15**: 831–837.
36. Kim, H. J., Kang, S. M., and Yang, C. B. 1997. Effects of yeast addition as starter on fermentation of kimchi. *Korean J Food Sci Technol* **29**: 790–799.
37. Kitazawa, H., Matsumura, K., Itoh, T., and Yamaguchi, T. 1992. Interferon induction in murine peritoneal macrophage by stimulation with *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiol. Immunol.* **36**: 311–315.
38. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**: 39–85.
39. Ko, Y. T., and Lee, S. H. 2006. Quality Characteristics of Kimchi with Added Purified Licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) Extract. *Korean J. Food Cookery Sci.* **23**: 609–616.
40. Kobayashi, Y., Tohyama, K., and Terashima, T. 1974. Studies on biological characteristics of *Lactobacillus*: II. Tolerance of the multiple antibiotic resistance strain, *L. casei* PSR3002, to artificial digestive fluids. *Jpn. J. Microbiol.* **29**: 691–698.
41. Kwon, J. Y., Cheigh, H. S., and Song, Y. O. 2004. Weight Reduction and Lipid Lowering Effects of Kimchi Lactic Acid Powder in Rats Fed High Fat Diets. *Korean J. Food Sci. Technol.* **36**: 1014–1019.
42. Lee, C. W., Ko, C. Y., and Ha, D. M. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Biotechnol.* **20**: 102–109.
43. Lee, J. J., Jung, H. O., and Lee, M. Y. 2011. Development of Dduk-Galbi Added with Ripened Korean Cabbage Kimchi. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **31**: 304–310.
44. Lee, J. J., Jung, H. O., Lee, M. Y. and Chang, H. C. 2012. Characteristics of

- Mandu with Ripened Korean Cabbage Kimchi. *Korean J. Food Preserve.* **19**: 209-215.
45. Lee, S. H., and Kim, S. D. 1988. Effect of Various Ingredients of Kimchi on the Kimchi Fermentation. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**: 642-650.
 46. Lee, H. J., Yoon, H. S., Ji, Y. S., Kim, H. N., Park, H. J., Lee, J. E., Shin, H. K., and Holzapfel, W. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology.* **145**: 155-161.
 47. Lee, H. A., Song, Y. O., Jang, M. S., and Han, J. S. 2013. Effect of *Ecklonia cava* on the Quality Kimchi during Fermentation. *J. Korean. Soc. Food Sci Nutr.* **42**: 83-88.
 48. Lee, J. J., and Jeong, Y. K. 1999. Cholesterol-Lowering Effect and Anticancer Activity of Kimchi and Kimchi Ingredients. *Korean J. Life Science.* **9**: 743-752.
 49. Lee, S. H, and Kim, S. D. 1988. Effect of starter on the fermentation of kimchi. *J Korean Soc Food Nutr* **17**: 342-347.
 50. Lee, J. S. Accelerated Preparation Method of Fully Ripened Kimchi Containing Deep Sea Water and Heat Treated Garlic. *Korean patent.* 10-2013-0025109.
 51. Lee, D. S. The speedy manufacturing method of Mukeunji containing *Lactobacillus fermentum* JS. *Korean patent.* 10-2310-0005725.
 52. Mathara, J. M., Schillinger, U., Guigas, C., Franz, C., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., Shin, H. K., and Holzapfel, W. H. 2008. Functional characteristics of *lactobacillus spp* .from traditional Massai fermented milk products in Kenya. *International Journal of Food Microbiology.* **126**: 57-64.
 53. Mheen, T. I. Kimchi fermentation and characteristics of the related lactic acid bacteria. *Korea Institute of Science and Technology Information.*
 54. Mheen, T. I. and Kwon, T. W. 1984. Effect of Temperature and Salt Concentration on Kimchi Fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**: 443-450.
 55. Moon, Y. J, Baek, K. A., and Sung, C. K. 2001. Characterization of Biological Chemistry from Over Ripened Kimchi. *Korean J. Food & Nutr.*

- 14: 512-520.
56. Moon, G. S., Kang, C. H., Pyun, Y. R., and Kim, W. J. 2004. Isolation, identification, and characterization of a bacteriocin-producing *Enterococcus* sp. from kimchi and its application of kimchi fermentation. *J Microbiol Biotechnol* **14**: 924-931.
 57. Nam, M. H., Kong, C. S., Bak, S. S., Lee, Y. B., Rhee, S. H., and Park, K. Y. 2007. Physicochemical Properties of Long-term Fermented Kimchi. *J Food Sci. Nutr.* **12**: 46-50.
 58. Okada, S., Manome, A., Uchimura, T., and Komagata, K. 1998. The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **44**: 371-374.
 59. Orrhage, K., Sillerstrm, E., Gustafsson, J. A., Nord, C. E., and Rafter, J. 1994. Binding of mutagenic heterocyclic amines by intestinal and lactic acid bacteria. *Mutat. Res.* **311**: 239-248.
 60. Park, J. G., Yun, S. Y., Oh, S., Shin, J. G., and Beak, Y. J. 2003. Probiotic characteristics of *Lactobacillus acidophilus* KY1909 isolated from Korean Breast-fed infant. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **35**: 1244-1247.
 61. Park, H. O., Kim, Y. K., and Yoon, S. 1993. The effect of blanching and lactic acid bacteria inoculation on the quality of kimchi *Korean J Food Cookery Sci* **9**: 61-66.
 62. Shewfelt, R. L., Gnanasekharan, V., and Chinnan, M. S. 1992. Detection of color changes in green vegetables. *J. Food Science.* **57**: 149-154.
 63. 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. Technol.* **28**: 137-145.
 64. Shin, D. H., Kim, M. S., Han, J. S., Lim, D. K., and Bak, W. S. 1996. Changes of Chemical Composition and Microflora in Bottled Vacuum Packed Kimchi during Storage at Different Temperature. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 127-136.
 65. So, M. H., Shin, M. Y., and Kim, Y. B. 1996. Effects of Psychrotrophic Lactic Acid Bacterial Starter on Kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 806-813.

66. Tagg, T. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria.
67. Yang, E. J., and Chang, H. C. 2008. Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* Isolated from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 276-284.
68. Yoo, M. J., Kim, H. R., and Chung, H. J. 2001. Changes in Physicochemical and Microbiological Properties in Low-Temperature and Long-Term Fermented Kimchi during Fermentation. *Korean J. Dietary Culture.* **16**: 431-441.
69. Yoo, M. J., Kim, H. R., and Chung, H. J. 2005. Changes in Texture and Sensory Properties of Low-Temperature and Long-Term Fermented Baechu Kimchi during the Fermentation. *Korean J. Dietary Culture.* **20**: 426-432.
70. Yoon, H. S., Han, J. S., Jin, Q., Han, N. S., and Lee, J. 2006. Effect of lactic acid bacteria on D- and L-lactic acid contents of kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **15**: 948-953.
71. Zheng, H. Y., Alcorn, T. M., and Cohen, M. S. 1994. Effects of H₂O₂-producing lactobacilli on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J. Infect. Dis.* **170**: 1209-1215.
72. 기영호. 묵은김치의 숙성발효 제조방법. *Korean patent.* 10-0212879-0000.
73. 박완수. 2008. 한민족의 열, 김치. *식품이야기.* pp. 29-24.
74. 최홍식. 2004. 김치의 발효와 식품과학. pp. 165-166.
75. 한국농촌경제연구원. 2011. 2011년 김장시장 분석과 전망

감사의 글

후회와 아쉬움이 많이 남는 석사 생활을 마치며 제가 이 긴 여정을 무사히 끝낼 수 있도록 도움을 주신 많은 분들에게 감사한 마음을 전하고자 몇 자 적어봅니다.

먼저 부족한 저를 학문의 길로 인도해주시고 끊임없는 조언과 격려, 그리고 따뜻한 관심과 열정으로 제가 나아가야 할 길을 밝혀주시고 여러 가지로 아낌없는 지원과 배려를 해주신 장해춘 지도교수님께 깊이 고개 숙여 감사드립니다. 또한 바쁘신 와중에도 부족한 저의 논문을 다듬어 주시고 조언해주시며 논문 심사를 맡아주신 이명렬 교수님과 이재준 교수님께 다시 한 번 감사드리고 학부과정 중 저의 학문적 지식을 넓혀 주신 김경수 교수님, 김복희 교수님, 노희경 교수님께도 감사의 말씀 전하고 싶습니다.

학부 과정부터 실험실 생활을 하지 않아 처음 석사를 시작하였을 당시 어려움을 많이 겪었던 저를 애정으로 보듬어 주고 이 자리에 있게 해준 실험실 식구들 많이 사랑하고 이 은혜 잊지 않겠습니다.

지금은 더 좋은 곳에서 연구활동을 하고 계신 실험에 대한 충고를 많이 해주셨던 양은주 박사님, 부드럽게 때론 엄하게 고민 상담과 실험에 대한 조언을 아끼지 않으셨던 장미 박사님 감사드립니다. 끊임없는 충고와 격려를 아끼지 않으시고 못한 저를 애정으로 감싸주시고 마음 나눠주신 장지윤 박사님, 맨 처음 실험을 가르쳐 주시고 마음이 잘 맞았던 지혜 선생님 또한 감사의 마음 전합니다. 누구보다도, 늦게 실험실에 들어와 사건 사고가 많았던 나 때문에 제일 많이 마음 고생했을, 그래서 너무 미안하고 고마운 내 친구 송희. 항상 웃는 얼굴로 대해주고 모르는 부분에 대해 꼼꼼히 알려주는 예쁜 은혜, 실험실에 있는 동안 실험도 잘 알려주고 대화가 잘 통했던 해훈이, 실험실에 빨리 적응하도록 세심하게 나를 옆에서 가장 많이 챙겨주고 신경써준 사랑스런 내 동생들, 항상 긍정적이고 대화가 잘 통했던 세연이, 힘들 때마다 힘이 되어 주던 슬기, 웃음을 많이 선물해 준 은아. 지금은 없지만 귀염둥이 양송 그리고 언니처럼 든든하게 자리를 지키며 모두에게 웃음을 준 희정이. 말로 다 표현하지 못할 만큼 너무 고마워. 야무지고 꼼꼼하고 항상 밝고 사람들에게 에너지를 전해주는 설화 그리고 좋은 말들로 항상 사람들 기분을 좋게 해 주고 호기심 많은 은지, 너희들의 앞날에도 힘찬 응원의 박수를 보낼게. 이 외에도 이제 막 실험실 생활을 시작한 귀여운 막내 성경이, 수진이, 해비에게도 고마움을 전합니다.

그 누구보다 이 자리에 저를 있게 해주시고 제가 학문의 길로 나아갈 수 있도록 항상 조언을 아끼지 않으시고 힘들고 지칠 때마다 든든한 어깨로 제가 의지할 곳을 내어 주신 엄마, 아빠께 감사드리고 너무너무 사랑합니다. 멀리 떨어져 있지만

항상 내 건강부터 걱정하고 응원해주는 우리 성호 오빠에게도 고마운 마음 전합니다. 저를 가장 가까이서 응원해주시고 제 몸 생각해서 항상 아침마다 야채 주스 챙겨주신 사랑하는 할아버지, 맛있는 음식 해주시는 할머니, 멀리서 응원해주시는 서울의 작은고모와 영국의 큰고모, 보약으로 제 육신을 다스려주시는 큰아빠 가족 모두에게 감사드립니다. 또한 실험실 생활을 누구보다 잘 이해해주고 다독여준 하림 언니 고마워요. 우리 가족 모두 건강하고 항상 행복하시길 기도할게요.

힘들다고 징징대는 날 이해해주고 함께 있는 것만으로도 힘이 되는 내 친구들 고마워. 내 인생의 동반자이자 내가 가장 사랑하는 팡. 언제 만나도 열심히 자신의 삶을 가꿔가는 나와 너무 닮은 내 친구 기소. 직장과 대학원을 다니며 또 다른 꿈을 향해 나아가는 나의 자극제 흥. 이제 다 커서 날 돌봐주는 우리 막내 송. 자기 소신을 믿고 당당히 나아가는 찬. 기쁠 때나 슬플 때나 함께 해줘서 고맙고 너무 사랑해. 자립심 강하고 무뚝뚝한 듯 항상 전화로 내 안부 물어주는 수깡. 얼굴은 자주 못 보지만 마음으로 응원해주는 다운이, 소희, 미희, 보람이, 미국에서부터 지금까지 가족처럼 서로 챙겨주는 병주, 광호, 한빈 오빠, 은혜언니, 선교, 지선이. 각자의 자리에서 최선을 다하는 그대들 너무 멋져. 마지막으로 my J 고마워. 만날 수 없고, 직접 연락이 닿을 수 없는 내 사람들, 그리고 약한 저에게 큰 힘으로 용기로 북돋아 주시고 힘들 때마다 손 내밀어 주신 분들, 논문 쓰는 동안 큰 힘이 되어 주신 분들, 모두에게 다시 한 번 진심으로 감사드립니다.

저작물 이용 허락서

학 과	식품영양학과	학 번	20117555	과 정	석사
성 명	한글 문정선	한문 文 鼎 宣	영문 Moon Jeong Sun		
주 소	광주 광역시 동구 학동 아남아파트 101-1501				
연락처	e-mail : pogns@nate.com				
논문제 목	김치로부터 분리한 유산균의 특성규명 및 이를 적용한 속성 묵은지 제조				
	영문 Characterization of lactic acid bacteria isolated from kimchi and their application for <i>Mukeunji</i>				

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()

2013 년 8 월

저작자 : 문정선 (인)

조선대학교 총장 귀하