

어젠다코드	1 - 6 - 20		구 분	완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S04	작목구분코드	FR-02-FR-21
과 제 종 류	공동연구		세세부사업	핵심전략기술개발	
연구과제 및 세부과제			수 행 기 간	소 속	과제책임자
발효식품용 종균 활용을 위한 효모와 세균의 선발 및 자원 풀 구축			'13~'15	국립농업과학원	백성열
2) 발효식품(청국장, 김치, 주류) 제조용 세균 선발 및 자원 풀 구축			'13~'15	농식품연구소	김상수
색인용어	발효, 식품, 미생물, 스크리닝, 풀				

## ABSTRACT

Total 1,799 of food microorganisms(Lactic acid bacteria, 739 isolates, *Bacillus* sp. 833 isolates, Yeast 227 isolates) were isolated from Korea traditional fermented food in order to select useful starter. To screen useful strains, we evaluated enzyme activities of isolates such as lipase, protease, fibrinolytic and antipathogenic activities and productivity of useful products such as acetic acid and lactic acid. *Bacillus subtilis* AFY-2 producing high polyglutamic acid(PGA) in Chungkookjang and *Leuconostoc mesenteroides* AFY-3 enhancing Kimchi taste and crunch texture were selected as final starters. We provided two starters to local food companies at a cost

### 1. 연구목표

미생물은 바이러스, 세균, 균류, 조류, 원생동물로 분류되며 다양한 발효식품에 존재하고, 여러 산업공정에 촉매로 활용되고 있으며, 인류의 병을 고치는 백신 등으로 사용되고 있다. 미생물은 생명공학 연구의 유전자 조작에 사용되는 효소 대부분을 생산하고, 미생물 유전자는 식물에 삽입되어 새로운 품종도 개발되고 있고, 폐수처리, 퇴비 등의 재생과 바이오 에너지, 미생물을 활용 농약, 비료, 사료 첨가제 등에도 이용중이다. 발효는 넓은 의미에서 미생물이 자신의 효소로 유기물을 분해 또는 변화시켜 자기 특유의 최종산물을 만들어내는 현상으로 식품을 발효시키는 목적은 맛과 향, 저장성을 증진시키기 위한 것이며, 이러한 발효식품의 기능을 과학적으로 해석하려는 시도가 지속적으로 이루어지고 있다. 우리나라의 전통적인 발효식품은 장, 김치, 젓갈, 식초, 식혜, 술 등이 있으며, 서구적인 식습관의 유입으로 요구르트나 치즈 같은 유제품, 와인 등도 판매량이 지속적으로 증가하고 있다. 우리나라의 전통 발효 식품의 제조공정은 주원료에 부재료를 첨가, 혼합하여 원료나 공기 중에서 유입된 천연 미생물에 의한 자연발효 과정을 이용하지만 고품질 전통 발효 식품의 생산, 또는 표준화 제조공정을

위하여 종균 스타터의 이용이 필요한 실정이다. 따라서 종균 확보를 위한 균주의 수집 및 유용 미생물 선발 기술의 개발은 필수적이며, 이를 활용한 생물자원의 소재화에 대한 연구도 이루어져야 한다고 판단된다.

세계 바이오시장은 연간 17%의 성장률로, 올해 2,585억 달러 규모의 바이오시장에서 발효 관련 제품은 730억 달러로 전체 바이오시장에서 28%를 차지하고 있다. 발효 기술을 바탕으로 한 제품 시장은 매년 증가추세이며, 2000년 기준으로 152억 달러에 이르던 시장규모는 2010년 730억 달러로 4배 증가하였다. 해외에서는 일찌감치 식품 및 의약품 등 분야에서 미생물이 인류의 생활에 중요한 역할을 차지하고 있음을 감지하고 해외 국가들은 국가가 나서서 관련 산업을 지원하고 있으며, 미국의 경우 200개 이상의 산·학·연, 정부, 비정부기관(NGO), 국제기구 등을 연계한 국가생물자원정보인프라(NBII)를 구축해 생물자원을 체계적으로 관리하고 있고, 발효선진국 일본에서도 제품평가기술기반기구(NITE)에서 관련 산업을 지원하고 있으며 인력만 100여 명을 보유할 정도의 규모를 자랑하고 있다. 또한 2010년 10월에 다른 나라의 생물자원을 이용할 경우 경제적 보상을 의무화한 국제조약인 '나고야 의정서'가 타결되어 발효를 앞두고 있음. 의정서가 발효되면 생물자원을 보유한 국가로부터 취득 및 사용에 대한 사전 승인을 받아야 하고, 그 생물자원을 이용함으로써 발생하는 이익을 상호합의한 조건에 따라 분배해야 한다. 나고야 의정서 협약사무국에 따르면 전 세계 생물자원의 가치는 700조원으로 추정하고 있을 만큼 경제적·산업적으로 중요한 위치를 차지하고 있으며, 국내에서도 미생물자원의 중요성이 부각되어 한국식품연구원과 농촌진흥청에서 관련연구가 진행되고 있으나, 아직은 국외 연구에 비해 활발하지 못한 실정이다. 특히, 산업적인 관점에서 전통발효식품 중 매출규모가 가장 큰 품목은 장류로 7,204억원 규모이며, 다음으로 김치류, 민속주류, 차류의 순서임. 장류의 국내 매출규모는 매년 일정규모를 유지하고 있지만, 직접 담가먹는 방식보다는 마트에 서 구입하는 비율이 지속적으로 증가하고 있고, 대외 수출에서도 꾸준히 증가 추세이다. 장류의 산업화를 위한 제품의 규격화는 발효공정의 조절을 통해 가능하며, 발효공정의 조절은 숙성에 관여하는 미생물의 동정 및 특성 분석과 작용기작의 이해가 필수적이므로 본 과제에서의 종균용 발효 미생물의 선발 및 대사체 분석이 중요한 역할을 하리라 사료된다.

우리나라 식품산업의 기술 수준은 선진국 대비 30~60% 수준인 것으로 평가되고 있음(농림수산식품부, 2008). 주요 OECD 국가와 비교한 식품분야의 미국특허 출원건수는 상당히 뒤져 있으며 식품분야 SCI 게재 논문수도 미국의 2%에 지나지 않고 있다. 우리나라는 전통적으로 발효와 깊은 연관을 가진 전통바이오 기술의 종주국이라 할 수 있지만, 체계적인 연구개발과 관리가 미흡하여 그림 5에서와 같이 대부분의 종균 및 식품소재를 수입에 의존하는 실정이다. 따라서 이러한 전통 바이오 산업을 현대화 하는 일은 우리의 식문화를 계승·발전시키는 의미와, 토착자원의 유전자원화를 통해 지역 및 국가기술발전에도 기여 할 수 있으리라 기대된다. 한편, 전통메주는 장기간 자연발효를 실시하므로 표면에 유해곰팡이가 발생하게 되어 인체에 유해한 곰팡이 독소가 생성될 수 있음. 메주 표면의 발효 균주와 외형적으로 거의 비슷한 유해곰팡이 *Aspergillus flavus*가 번식하게 되면 강력한 발암물질인 아플라톡신을 생성

하게 되며, 이러한 문제점을 해결하기 위하여 전통발효식품을 생명공학적인 기법으로 생산할 필요가 있다. 장류를 비롯한 발효식품의 숙성과정 중 맛, 향, 색 등의 품질을 결정짓는 데 여러 가지 요인이 작용하지만, 숙성 과정 중 미생물의 작용에 따라 그 맛과 향 등이 결정 되므로 미생물의 역할이 가장 중요함. 숙성에 관여하는 여러 곰팡이, 각종 세균 등의 미생물들이 복합적으로 작용하여 이들이 내는 효소에 의해 발효식품의 맛과 향에 영향을 미친다. 발효식품의 품질에 영향을 끼칠 수 있는 미생물 효소로는 protease, amylase, lipase 등이 있으며, 이런 미생물 효소에 의해 원료의 단백질과 탄수화물 그리고 지방 등이 가용성으로 분해되어 발효식품의 맛과 향이 결정된다. 농수산 발효식품의 품질고급화와 표준화 생산 공정을 위해서 우수한 접종균 스타터 개발 연구가 선행되어야 하며, 특히 전통발효식품에 우수성을 입증할 수 있는 접종균 스타터의 응용연구는 앞으로 중요한 연구분야가 될 것으로 예상 된다. 우수한 접종균 스타터의 개발을 위해서는 많은 우수균주 발굴연구는 물론 탐색균주를 수집, 보존하고, 균주와 대사산물의 분류와 유용물질의 조사가 필요한 실정이다.

## 2. 재료 및 방법

**<제2세부과제 : 발효식품(청국장, 김치, 주류) 제조용 세균 선발 및 자원 풀 구축>**

### (시험 1) 식품 제조용 세균 선발을 위한 다양한 유전자원 수집

발효식품 자원 총 89점을 수집하였고 세부내역별로는 장류 38점, 김치류 34점, 젓갈류 14점, 발효액 등 기타로 3점을 수집하였다. 표 1은 전국에서 수집한 자원을 품목별로 표시했으며, 전국을 대상으로 수집한 자원은 주로 순창장류축제 및 전주발효엑스포장 등 축제에 전시되었던 품목 위주로 수집하였다.

### (시험 2) 전통발효 식품 유래 미생물 분리 및 활성 검정

수집한 자원은 10ml의 멸균수에 1g의 시료를 첨가하여 균질화 한 후 유산균의 경우는 MRS배지(Casein peptone, tryptic digest 10g, Meat extract 10g, Yeast extract 5g, Glucose 20g, Tween 80 1g, K<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 2g, Na-acetate 5g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> citrate 2g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.05g, Agar 15g, Distilled water 1L, Adjust pH to 6.2-6.5), 고초균은 NA(beef extract 1g, Yeast extract 2g, Peptone 5g, NaCl 5g, Agar 15g, Distilled water 1L, Adjust pH to 7.4), 효모는 YPD(Yeast extract 10g, Peptone 20g, Dextrose 20g, Agar 15g, Distilled water 1L)배지에 200 $\mu$ l씩 각각 분주하여 콜로니 생성여부를 확인 한 후 Picking 방법을 이용해 각 선택배지로 옮겨 효소 활성 여부를 검정하였다.

### (시험 3) 유용 미생물 균주 은행 기탁

세균의 경우 16s rRNA 증폭을 위해 27F, 1492R 프라이머를 이용했으며 효모의 경우는

ITS1,4 프라이머를 사용하여 유전자를 증폭하였다. 16s rRNA gene은 약 1.6 kb의 사이즈로 증폭되었으며 효모는 450 bp의 크기로 증폭되었다. 증폭된 유전자는 정제를 거쳐 마크로젠 (Marcrogen co., korea)에 의뢰하여 시퀀싱하였다. 기탁은 농업유전자원센터(KACC)와 한국 미생물보존센터(KCCM)에 기탁하였다.

#### (시험 4) 발효식품(청국장, 김치, 주류) 제조용 우수 균주 선발

청국장 종균의 경우 독소 및 항생물질 생성 유전자가 없는 비독성 균주를 1차 선발하고, 풍미에 영향을 미치는 아미노태질소, PGA생성능, 혈전용해 활성을 검토하여 선발하였다. 김치용 종균은 저온생육성, 내염성, 내산성을 종합적으로 검토하여 선발하였다. 주류용 유산균은 알코올 내성 및 젖산 내성을 검토하였다.

#### (시험 5) 선발 균주 동정 및 기탁

세균의 경우 16s rRNA 증폭을 위해 27F, 1492R 프라이머를 이용했으며 효모의 경우는 ITS1,4 프라이머를 사용하여 유전자를 증폭하였다. 16s rRNA gene은 약 1.6 kb의 사이즈로 증폭되었으며 효모는 450 bp의 크기로 증폭되었다. 증폭된 유전자는 정제를 거쳐 마크로젠 (Marcrogen co., korea)에 의뢰하여 시퀀싱하였다. 기탁은 농업유전자원센터(KACC)와 한국 미생물보존센터(KCCM)에 기탁하였다.

#### (시험 6) 청국장 발효 선발 균주 실용화 기술 개발

선발 균주의 실용화를 위해 강일콩을 포함한 10개의 품종을 이용하여 청국장 제조 및 품질을 비교 조사하였다. 또한 포장용기 및 시제품을 평창 부일농산과 공동개발하였다.

#### (시험 7) 종균 활용 청국장 품질 표준화 연구

발효정도, 풍미, 향 등 종합적으로 판단한 결과 상대적으로 우수한 청아콩과 대원콩을 대상으로 저장 온도 및 기간에 따른 청국장의 pH 및 PGA의 변화를 알아보았다.

#### (시험 8) 종균 특성 유지 기술 개발

계대배양에 따른 종균의 노화를 방지하고자 경쟁배양 방법을 활용한 종균 특성 유지기술을 개발하였다. 경쟁배양에 사용한 균주는 비독성이면서 종균의 생육과 유사한 *Micrococcus luteus*를 혼합하여 사용하였다.

#### (시험 9) 현장적용을 위한 종균 최적 배양 조건 설정

김치용으로 선발한 AFY-3과 주류용으로 선발한 YA6-17 유산균의 생육특성을 확인하기 위하여 성장곡선 및 접종농도에 따른 김치의 특성을 조사하였다.

### 3. 결과 및 고찰

<제2세부과제 : 발효식품(청국장, 김치, 주류) 제조용 세균 선발 및 자원 풀 구축>

(시험 1) 식품 제조용 세균 선발을 위한 다양한 유전자원 수집

가. 유전자원 수집내역

표 1. 지역별 발효식품자원 수집 내역

구분	연번	시군	품목	주 소	첨가물
1	KA20	삼척	간장	삼척시	저온숙성1개월
2	KA21	삼척	간장	삼척시	
3	KA22	홍천	간장	홍천군	
4	KAGB 23	경북영주	간장	영주시	만포농산
5	KAGB 24	경북영주	간장	영주시	무수촌
6	KAGB 25	경북김천	간장	김천시	김천정월된장
7	KACB 26	충북영동	간장	영동군	물한골식품
8	KACB 27	충북괴산	간장	괴산군	호산식품
9	KAJN 28	전남보성	간장	보성군	성원식품
10	KAJN 29	전남담양	간장	담양군	고려전통식품
11	KAJB 30	전북순창	간장	순창군	향적원(무농약)
12	K33	삼척	고추장	삼척시	청국장이용
13	K34	홍천	고추장	홍천군	
14	KGB 35	경북영주	고추장	영주시	만포농산
15	KGB 36	경북영주	고추장	영주시	무수촌
16	KGB 37	경북김천	고추장	김천시	김천정월된장
17	KCB 38	충북영동	고추장	영동군	물한골식품
18	KCB 39	충북괴산	고추장	괴산군	호산식품
19	KGN 40	경남함양	고추장	함양군	인산가(순한맛)
20	KGN 41	경남함양	고추장	함양군	인산가(매운맛)
21	DGB 51	경북영주	된장	영주시	만포농산
22	DGB 52	경북영주	된장	영주시	무수촌
23	DGB 53	경북김천	된장	김천시	김천정월된장
24	DCB 54	충북영동	된장	영동군	물한골식품
25	DCB 55	충북괴산	된장	괴산군	호산식품
26	DGN 56	경남함양	된장	함양군	인산가(서목태)
27	DGN 57	경남함양	된장	함양군	인산가(죽염)
28	DJN 58	전남보성	된장	보성군	성원식품
29	DJN 59	전남담양	된장	담양군	고려전통식품
30	DJB 60	전북순창	된장	순창군	향적원(무농약)
31	DJB 61	전북순창	된장	순창군	향적원(상항버섯)

구분	연번	시군	품목	주 소	첨가물
32	DGG68	경기여주	된장	여주군	폴목산 농원
33	KGG50	경기여주	고추장	여주군	폴목산 농원
34	KAGG37	경기여주	간장	여주군	폴목산 농원
35	CGG30	경기여주	청국장	여주군	폴목산 농원, 유기농
36	CGG31	경기여주	청국장	여주군	폴목산 농원
37	TJN1	전남함평	탁주	함평군	자희자양
38	YJN1	전남함평	약주	함평군	자희자양
39	D65	강원인제	막장	인제군	미산청국장
40	M29	강원평창	막장	평창군	평창오가피
41	H1	강원평창	발효액	평창군	오가피 발효액
42	JGW15	강원속초	가리비	속초시	
43	JGW16	강원속초	오징어	속초시	
44	JGW17	강원속초	황태	속초시	
45	JGW18	강원속초	낙지	속초시	
46	JGW19	강원속초	갈치속젓	속초시	
47	JGW20	강원속초	명태아가미	속초시	
48	JGW21	강원속초	어리굴젓	속초시	
49	JGW22	강원속초	꽃뽀기	속초시	
50	JGW23	강원속초	멸치	속초시	
51	JGW24	강원속초	조개	속초시	
52	JGW25	강원속초	생굴	속초시	
53	JGW26	강원속초	가자미	속초시	
54	JGW27	강원속초	명란(생)	속초시	
55	JGW28	강원속초	창란	속초시	명태내장
56	KCGW1	강원평창	총각김치	평창군	
57	KCGW2	강원평창	갓김치	평창군	
58	KCGW3	강원평창	오이소박이	평창군	
59	KCGW4	강원평창	열무	평창군	
60	KCGW5	강원평창	파	평창군	
61	KCGW6	강원평창	곰취김치	평창군	
62	KCGW7	강원평창	냉이김치	평창군	
63	KCGW8	강원평창	당귀김치	평창군	
64	KCGW9	강원평창	산더덕김치	평창군	
65	KCGW10	강원평창	두릅김치	평창군	
66	KCGW11	강원평창	민들레김치	평창군	
67	KCGW12	강원평창	산마늘김치	평창군	
68	KCGW13	강원평창	오가피김치	평창군	
69	KCGW14	강원평창	포기김치	평창군	

구분	연번	시군	품목	주 소	첨가물
70	J6	강원평창	개두릅	평창군	
71	J7	강원평창	고들빼기	평창군	
72	J8	강원평창	고추장	평창군	
73	J9	강원평창	곰취장아찌	평창군	
74	J10	강원평창	고추냉이	평창군	
75	J11	강원평창	원추리	평창군	
76	J12	강원평창	산마늘김치	평창군	
77	J13	강원평창	산초	평창군	
78	J14	강원평창	오가피	평창군	
79	J15	강원평창	오이장아찌	평창군	
80	J16	강원평창	마늘쫑	평창군	
81	J17	강원평창	뽕잎	평창군	
82	J18	강원평창	당귀김치	평창군	
83	J19	강원평창	매실	평창군	
84	J20	강원평창	무말랭이	평창군	
85	김치품평회	-	배추김치	-	
86	김치품평회	-	배추김치	-	
87	김치품평회	-	배추김치	-	
88	김치품평회	-	배추김치	-	
89	김치품평회	-	배추김치	-	

(시험 2) 전통발효 식품 유래 미생물 분리 및 활성 검정

가. 전통발효식품 유래 미생물 분리

미생물 분리 및 저장내역은 총 1,799점을 저장하였으며 세부내역을 보면 젓산균 739점, 고초균 833점, 효모 277점을 저장하였다.

표 2. 미생물 분리·저장 내역

구 분	계	젓산균	고초균	효 모
계	1,799	739	833	227
장 류	850	115	615	120
김치류	538	389	125	24
절임류	139	79	25	35
젓갈류	224	156	68	-
발효액	48	-	-	48

#### 나. 유해균 증식 억제 능력을 갖는 고초균 분리

Bacteriocin 활성을 갖는 고초균을 분리하기 위하여 대표적인 식중독 균인 *E. coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*를 top agar 방법을 이용하여 NA 배지에 배양 후 Paper disk 위에 고초균 배양 여액을 20 $\mu$ l씩 분주하여 항균활성을 측정하였다.

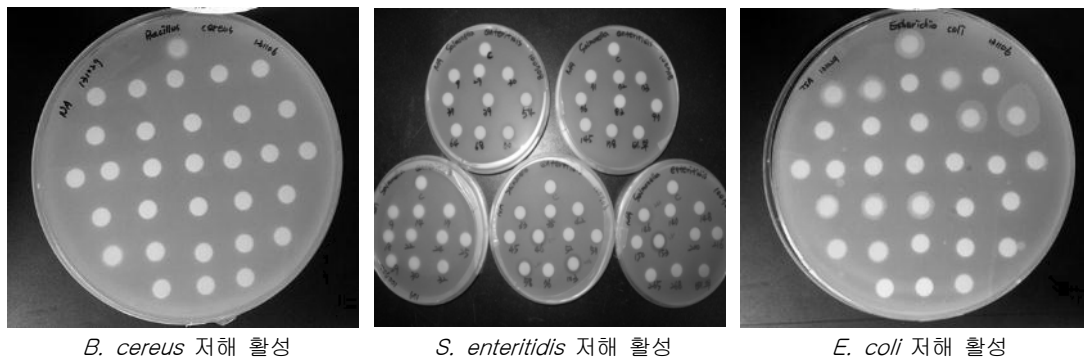


그림 1. Bacteriocin 활성을 갖는 고초균의 분리

*B. cereus*의 증식을 억제하는 C9Y12와 DJN59-1 균주를 선발하고 16S rRN의 염기서열을 확인하였다. 확인된 염기서열을 NCBI BLAST 프로그램을 이용하여 상동성을 분석한 결과 C9Y12는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 99%의 상동성을, DJN59-1은 *Bacillus subtilis*와 99%의 상동성을 보이는 것으로 나타났다(그림 1). 또한 *Salmonella enteritidis*에 대해 저해 활성을 갖는 몇몇 균주를 확인하였고 현재 동정 시험을 수행 중이다.

#### 다. Biogenic amin(BAs) 생성 여부 확인을 위한 유전자 검정

BAs 생성 여부를 확인하기 위하여 histamine 전구체인 histidin decarboxylase(*hdc* gene)와 tyramine 전구체인 tyrosine decarboxylase(*tdc* gene)의 확인을 위해 표 4와 같이 primer를 이용하여 각각의 유전자를 검정하였다. 또한 구토 독소로 알려진 *cesA* gene 과 설사 독소로 알려진 *plcR* gene도 함께 검정하였다.

고초균의 BAs 및 독소 유전자 유무를 검정하기 위해서 표 3과 같이 4쌍의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 먼저 BAs인 Histamine과 Tyramine 생성 유전자인 *hdc* gene과 *tdc* gene의 Primer를 이용하여 효소활성이 있는 균주 30점을 대상으로 PCR을 수행하였고, 일반적으로 독소 유전자로 알려진 *cesA* gene과 *plcR* gene의 유전자 유무 여부도 검정하였다. PCR product의 크기가 비교적 짧은 것을 감안하여, 최종 부피를 25  $\mu$ l로 하여 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 반응시키고 94 $^{\circ}$ C에서 15초, 56 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 1분 반응을 28 회 수행한 후, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시켰다.

표 3. 유해 독소 PCR 프라이머 내역

Primer pair <sup>1)</sup>	Sequence	Target sequence	Size(bp)	Note
HDC3-F HDC4-R	GAT GGT ATT GTT TCK TAT GA CAA ACA CCA GCA TCT TC	histidin decarboxylase ( <i>hdc</i> gene)	435	Histamine
TD2-F TD5-R	CAA ATG GAA GAA GAA GTA GG ACA TAG TCA ACC ATR TTG AA	tyrosine decarboxylase ( <i>tdc</i> gene)	1,100	Tyramine
CESA-F CESA-R	GTT GGC GTG TTA TGT GAT CG GGT GAA ACA GCT TCT CCT GC	cereulide synthetase A ( <i>cesA</i> gene)	662	구토 독소
PLCRF PLCRR	CRG GYG CRG TAT ACC CAA GT TGA AAT ACC CCA TGY CAT YG	phospholipase C ( <i>plcR</i> gene)	888	설사 독소

PCR을 통해 활성균주의 독성 유전자 검정을 한 결과 표 4와 같이 일부 균주에서 독소 유전자가 있음을 확인하였다. 젓갈에서 분리한 J3B16-4와 J4B16-1의 경우 구토 독소 유전자인 *cesA* gene이 확인되었고, J3B16-1의 경우는 BAs 생성 유전자를 갖고 있음을 확인하였다. 따라서, 종균으로 활용하기 전에 반드시 독소 유전자 검정이 필요하리라 판단된다.

표 4. 활성 균주 독소 유전자 검정

구분	균주명	<i>hdc</i> gene	<i>tdc</i> gene	<i>cesA</i> gene	<i>plcR</i> gene
1	C11Y16	ND	ND	ND	ND
2	SGB1B16-2	ND	ND	ND	ND
3	SGB1B16-3	ND	ND	ND	ND
4	SGB1B16-4	ND	ND	ND	ND
5	SGG2B16-2	ND	ND	ND	ND
6	SGG2B16-3	ND	ND	ND	ND
7	KCB38Y16-1	ND	ND	ND	ND
8	J1B16-1	ND	ND	ND	ND
9	J2B16-5	ND	ND	ND	D
10	J3B16-4	ND	ND	D	ND
11	J4B16-1	ND	ND	D	ND
12	J3B16-1	D	D	ND	ND
13	KAGB23	ND	ND	ND	ND
14	KAJN29	ND	ND	ND	ND
15	KAGB24	ND	ND	ND	ND
16	DJN58	ND	ND	ND	ND
17	KCB38Y16-2	ND	ND	ND	ND
18	KCB38Y16-3	ND	ND	ND	ND
19	KCB38Y16-4	ND	ND	ND	ND
20	KCB39Y16-1	ND	ND	ND	ND
21	KCB39Y16-2	ND	ND	ND	ND
22	KCB38Y16-4	ND	ND	ND	ND
23	KCB39Y16-1	ND	ND	ND	ND
24	DGN57Y16-1	ND	ND	D	ND
25	DGB51Y16-1	ND	ND	ND	ND
26	DJN58Y16-1	ND	ND	ND	ND
27	KAGB23Y16-1	ND	ND	ND	ND

<sup>1)</sup>ND : Not detected, D : detected

라. 분리원별 효소활성 균주의 분류

amylase 분비능은 2% soluble starch를 첨가한 NA 및 YPD배지에 Picking하여 배양한 후 iodine으로 염색한 후 starch 분해활성을 확인하였다. Protease 분비능은 2% skim milk를 첨가한 NA 및 YPD배지에 균주를 Picking하여 37℃에서 48시간 배양하고 colony주위의 투명환을 관찰하였다. Lipase 분비능은 100mM CaCl<sub>2</sub>, 2M NaCl, gum arabic이 혼합된 용액에 1% tributyrin을 첨가한 후 소니케이션을 한 후 NA배지 및 YPD배지에 혼합하여 멸균 후 사용하였다. 멸균된 배지에 균주를 Picking하고 같은 조건으로 배양한 후 투명환을 관찰하였다. 세포외로 분비되는 혈전분해효소 분비능 측정은 Astrup과 Mullertz의 방법을 변형하여 fibrinogen을 최종농도가 0.3%(w/v)가 되도록 PBS완충액(0.1 M, pH 7.4)에 용해시킨 후 평판에 부은 후 1.5%(w/v) agarose 용액을 동량 첨가하여 혼합하였다. 여기에 thrombin (Sigma-Aldrich, USA)을 100 µl 첨가하여 상온에서 정치한 후 균 배양액 20 µl를 분주하여 paper disk 방법으로 활성을 측정하였다. 양성 대조구로는 plasmin(1.0 U/mL, Sigma, USA)을 사용하였다. 각 균주가 나타내는 혈전용해활성은 아래식과 같이 plasmin이 나타내는 혈전용해활성의 상대활성으로 정의하였다.

$$\text{혈전용해활성(\%)} = \frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{Plasmin의 용해영역}} \times 100$$

α-amylase 활성을 갖는 균주는 *Bacillus* sp. 속에서 66점으로 가장 많이 나왔으며 주로 청국장에서 분리한 균주에서 활성이 많이 나왔다. 다음으로 젓갈류에서 분리한 젓산균에서 활성이 많았으며 상대적으로 효모는 적은 수의 α-amylase 활성을 보여주었다.

표 5. α-amylase 활성

구 분	활성 균수(점)			
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.	
고추장	—	—	—	
된 장	3	7	—	
간 장	1	2	4	
청국장	2	6	48	
김치류	2	—	4	
젓갈류	1	—	10	
기 타	—	3	—	
합 계	93	9	18	66

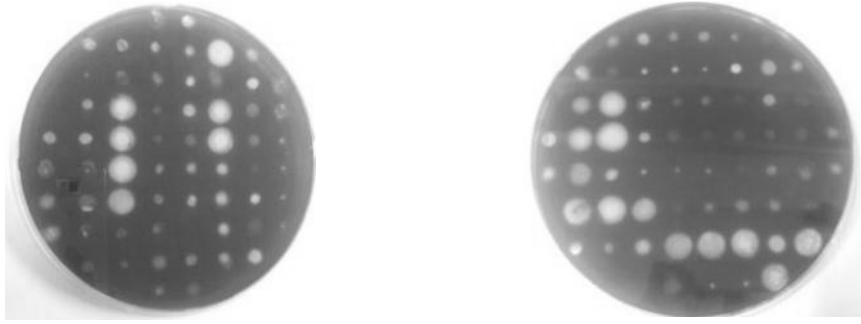


그림 2.  $\alpha$ -amylase activity staining

Lipase 활성을 갖는 균주의 수는 총 279점으로 젓산균, 효모, 고초균에서 다양하게 활성을 나타내었으며 각 분리원의 특성에 따라 분리된 균주에서 광범위한 활성을 보여주었다. 특히 고초균의 경우 다양한 분리원에 분리되었다.

표 6. Lipase 활성

구 분	활성 균수(점)		
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.
고추장	—	24	15
된 장	4	29	12
간 장	4	15	25
청국장	—	6	45
김치류	39	—	5
젓갈류	34	—	12
기 타	3	3	4
합 계	279	84	118

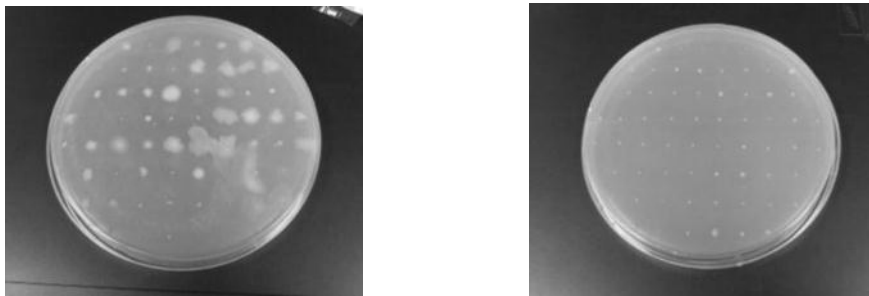


그림 3. Clear zone of Lipase activity

Protease 활성은 총 137점에서 확인했으며 주로 청국장에서 분리한 고초균에서 활성이 확인되었다. Protease 활성이 있는 균주가 Fibrinolytic 활성도 존재한다는 기존의 연구에 따라 Protease 활성이 있는 균주는 혈전분해활성도 동시에 검정하였다.

표 7. Protease 활성

구 분	활성 균수(점)		
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.
고추장	—	—	—
된 장	3	6	—
간 장	8	8	—
청국장	4	7	82
김치류	—	—	—
젓갈류	—	—	12
기 타	2	2	3
합 계	137	17	97

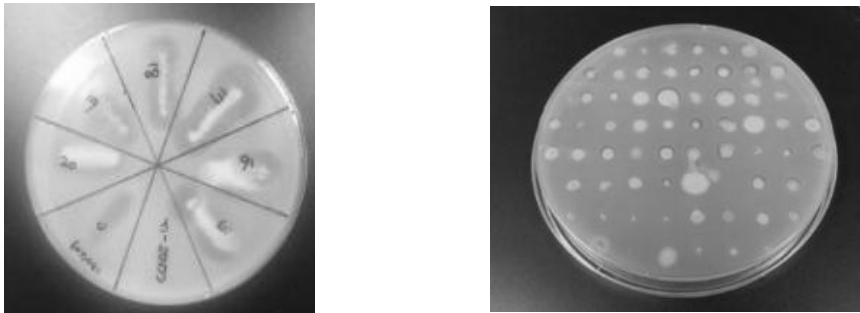


그림 4. Clear zone of Protease activity

Fibrinolytic enzyme 활성은 총 196점에서 확인하였으며 청국장에서 분리한 균주에서 가장 많은 활성을 보여주었다. 앞서 언급했듯이 Protease 활성을 갖는 균주 중에 Fibrinolytic enzyme 활성도 갖는 균주가 많았으며 일부 된장에서 분리한 효모중에 특히 상대적 활성이 높은 균주가 스크리닝 되었다.

표 8. Fibrinolytic enzyme 활성

구 분	활성 균수(점)		
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.
고추장	—	5	—
된 장	—	35	11
간 장	—	4	6
청국장	—	8	120
김치류	—	—	—
젓갈류	—	—	7
기 타	—	—	—
합 계	196	0	144

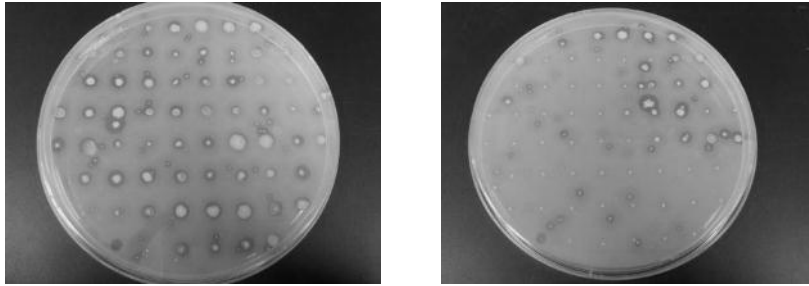


그림 5. Clear zone of Fibrilytic activity

고추장에서 분리한 균주의  $\alpha$ -amylase, Lipase, Protease, Fibrinolytic enzyme을 표에 표시한 바와 같이 대조구를 100으로 봤을때 상대적인 활성을 각각 측정하였다. K13Y12 균주에서 가장 높은 Lipase 활성을 보여주었고, K6M3 균주의 경우 Lipase와 Fibrinolytic 활성을 동시에 확인 할 수 있었다.

표 9. 주요 고추장 분리균 효소활성 검정

Strains	$\alpha$ -amylase (150U/ml) (활성율 %) <sup>1)</sup>	Lipase 활성능 (50mg/ml) (활성율 %)	Protease 활성능 (150U/ml) (활성율 %)	혈전용해능 (Plasmin 100 $\mu$ g/ml) (활성율 %)
Control	100	100	100	100
K3M1	-	-	-	-
K3M2	-	-	-	-
K3M3	-	73.5	-	-
K3M4	-	-	-	-
K3M5	-	-	-	-
K3M6	-	104.1	-	-
K3M8	-	92.2	-	-
K3M9	-	-	-	-
K5M1	-	93.0	-	-
K5M2	-	123.9	-	-
K6M1	-	88.6	-	-
K6M2	-	85.0	-	-
K6M3	-	91.7	-	88.5
K4Y1	-	-	-	-
K4Y2	-	-	-	-
K4Y3	-	119.9	-	-
K4Y4	-	114.4	-	-
K6Y1	-	75.3	-	-
K6Y2	-	-	-	-
K7Y1	-	-	-	-
K7Y2	-	83.7	-	-
K8Y1	-	72.3	-	-
K9Y2	-	85.5	-	34.5
K9Y3	-	95.3	-	51.4
K13Y1	-	-	-	-
K13Y2	-	231.3	-	-
K27Y1	-	-	-	-
K29Y2	-	140.5	-	-
K30Y1	-	133.7	-	-
K30Y2	-	117.1	-	-

<sup>1)</sup> 활성율(%) = (반응구의 직경)/(Control의 직경) × 100

된장에서 분리한 균주의  $\alpha$ -amylase, Lipase, Protease, Fibrinolytic enzyme을 표에 표시한 바와 같이 대조구를 100으로 봤을때 상대적인 활성을 각각 측정하였다.  $\alpha$ -amylase 활성은 DGB52Y16-2에서 가장 높았지만 대조구보다는 낮은 활성을 보여주었고, Lipase 활성은 D12Y6 균주가 Protease 활성은 D23Y1, Fibrinolytic 활성은 고초균 선택배지에서 분리된 DJN58 균주가 가장 높게 측정되었다. D12Y6 균주는 Lipase와 Fibrinolytic 활성에서 비교적 높게 나타나 평균으로서 유망하였다.

표 10. 주요 된장 분리균 효소활성 검정

Strains	$\alpha$ -amylase (150U/ml) (활성율 %) <sup>1)</sup>	Lipase 활성능 (50mg/ml) (활성율 %)	Protease 활성능 (150U/ml) (활성율 %)	혈전용해능 (Plasmin 100 $\mu$ g/ml) (활성율 %)
Control	100	100	100	100
D3M1	—	109.7	—	—
D12Y1	—	140.3	—	181.4
D12Y5	—	132.3	—	193.3
D12Y6	—	148.3	—	202.9
D17Y2	—	103.8	—	—
D23Y1	—	112.1	122.8	—
M24Y16-1	66.7	—	—	—
M24Y16-2	58.9	—	—	—
M24Y16-3	—	125.4	—	—
M23Y16-4	47.2	110.0	—	—
M23Y16-5	—	—	—	—
M25Y16-7	—	—	—	—
M25Y16-10	—	—	—	—
C8Y16-11	—	120.5	—	158.5
C9Y16-12	78.5	—	—	—
C11Y16-14	—	115.8	—	178.2
C12Y16-15	48.6	145.5	—	110.6
C13Y16-16	32.5	—	—	122.0
C14Y16-17	—	130.0	—	—
C17Y16-20	—	—	—	198.5
DGB51Y16-1	28.6	—	—	—
DGB52Y16-2	81.5	—	92.5	245.5
DGN56Y16-1	—	—	—	210.6
DGN56Y16-2	45.6	—	—	—
DGN57Y16-1	—	78.5	—	155.5
DJN58	—	—	—	245.5
DJN58N51-1	—	75.5	—	98.5
DJN59N51-1	—	—	—	—
DGB52N51-1	—	—	—	—
SGB1Y16-1	—	110.9	—	—
DGN56N51-1	—	—	—	—

<sup>1)</sup> 활성율(%) = (반응구의 직경)/(Control의 직경) × 100

간장에서 분리한 균주의  $\alpha$ -amylase 활성이 일부 확인되었지만 대조구보다 낮았고 Lipase와 Protease 활성은 대조구와 비슷한 활성을 보여주었다. Fibrinolytic 활성도 일부 확인되었다. 간장에서 분리한 균중에는 Lipase와 Protease 그리고 Fibrinolytic 활성을 모두 가지고 있는 KAGB23과 KA3Y1-1 균주와 Protease 활성이 가장 우수했던 KAJN29 균주가 유망하였다.

표 11. 주요 간장 분리균 효소활성 검정

Strains	$\alpha$ -amylase (150U/ml) (활성율 %) <sup>1)</sup>	Lipase 활성능 (50mg/ml) (활성율 %)	Protease 활성능 (150U/ml) (활성율 %)	혈전용해능 (Plasmin 100 $\mu$ g/ml) (활성율 %)
Control	100	100	100	100
KA18M1	87.1	119.2	87.1	-
KA3Y1-1	-	120.4	77.3	120.5
KA3Y2	80.0	105.8	76.0	105.8
KA3Y3	-	120.1	75.6	-
KA16Y1	-	111.9	73.7	-
KA18Y2	-	-	81.3	-
KA18Y4	-	-	58.2	-
KA18Y7	-	-	51.1	51.1
KAGB23	-	98.5	78.5	185.4
KAGB24Y16-1*	-	-	92.6	126.8
KAGB25Y16-1	-	118.2	-	-
KACB26Y16-1	-	-	75.6	-
KAJN28Y16-1	-	115.5	-	120.8
KAJN29	-	120.4	177.8	75.8
KAJB30Y16-1	-	135.6	-	110.2
KAJN28N51-1	-	-	120.5	-
KAJN29N51-1	-	98.5	-	108.5
sKAY16-2	-	85.6	-	-
sKAY16-9	-	-	69.8	-
sKAY16-19	-	-	-	105.4
sKAY16-20	-	114.8	-	-
sKAY16-30	-	-	115.5	-
sKAY16-31	-	120.5	-	-
sKAY16-40	-	-	-	95.8
sKAY16-41	-	-	-	-
sKAY16-48	-	-	-	114.7

<sup>1)</sup> 활성율(%) = (반응구의 직경)/(Control의 직경)  $\times$  100, \* : CMCase activity(Data not shown)

청국장에서 분리한 균주의  $\alpha$ -amylase 활성이 일부 확인되었지만 대조구보다 낮았고 Protease 활성은 C11Y16 균주가 가장 우수하였다. C17Y16은 Fibrinolytic 활성이 우수하였으며, CCN25Y16 균주는 Lipase와 Protease 그리고 Fibrinolytic 활성이 비교적 높게 나타나 유망하였다.

표 12. 주요 청국장 분리균 효소활성 검정

Strains	$\alpha$ -amylase (150U/ml) (활성율 %) <sup>1)</sup>	Lipase 활성능 (50mg/ml) (활성율 %)	Protease 활성능 (150U/ml) (활성율 %)	혈전용해능 (Plasmin 100 $\mu$ g/ml) (활성율 %)
Control	100	100	100	100
C6M1	—	122.8	—	—
C6M2	—	120.0	—	—
C6M8	—	183.7	76.6	—
C6M9	—	137.5	—	—
C7M1	—	177.6	—	—
C7M2-1	—	143.8	—	—
C7M2-2	—	166.9	—	—
C7M3	—	137.4	—	—
C7M4	—	184.9	73.5	—
C9M4	—	129.9	—	—
C9M6	—	14.1	—	—
C9M9	—	131.4	—	—
C5Y1	—	—	65.9	—
C5Y2	—	132.5	—	—
C6Y1	52.6	87.7	103.5	122.2
C6Y2	—	89.8	101.5	115.6
C7Y1	44.2	86.5	—	99.8
C7Y2	—	103.3	—	—
C7Y3	—	98.2	—	—
C8Y1	—	—	71.9	134.5
C8Y2	—	78.1	73.3	110.2
C8Y16-11	—	—	—	—
C9Y16-12	—	—	—	—
C10Y16-13	78.4	—	88.7	—
C11Y16	—	—	198.5	145.2
C12Y16-15	56.2	—	—	—
C13Y16-16	88.5	—	145.6	—
C14Y16-17	65.5	—	—	—
C15Y16-18	—	—	79.6	—
C16Y16-19	85.8	—	88.5	—
C17Y16	—	—	—	187.5
CCN25Y16_1	—	—	—	—
CCN25Y16_2	—	—	148.5	89.5
CCN25Y16	—	188.5	178.2	115.4
CCN25Y16_4	—	—	144.1	142.1
CCN25Y16_5	38.9	156.2	—	162.3
CCN25Y16_6	—	144.8	136.5	—
CCN25Y16_7	—	175.6	55.6	127.8
CCN27Y16_1	—	149.7	44.8	136.5
CCN27Y16_2	—	135.6	142.5	100.5
CCN27Y16_3	—	—	112.5	121.3
CCN27Y16_4	—	177.7	98.5	—
CCN27Y16_5	—	165.5	78.5	140.8

<sup>1)</sup> 활성율(%) = (반응구의 직경)/(Control의 직경) × 100

김치류에서는 주로 젖산균이 분리되었고 건더기와 국물을 따로 분리해본 결과 큰 차이점은 발견할 수 없었다. 젖갈류에서는 일부 젖산균과 고초균이 분리되었으며 활성은 대조구와 비슷하거나 낮은 경향을 보여주었다.

표 13. 김치류 등 주요 분리균 효소활성 검정

Strains	$\alpha$ -amylase (150U/ml) (활성율 %) <sup>1)</sup>	Lipase 활성능 (50mg/ml) (활성율 %)	Protease 활성능 (150U/ml) (활성율 %)	혈전용해능 (Plasmin 100 $\mu$ g/ml) (활성율 %)
Control	100	100	100	100
O3M4	—	122.9	—	—
O1Y1	—	69.5	—	—
O1Y2	—	64.7	—	10.9
KCGW5Y16-1	—	—	—	—
KCGW7Y16-2	—	—	—	—
KCGW7Y16-3	—	—	—	—
KCGW6Y16-1	44.1	55.5	—	—
KCGW6Y16-2-L	56.8	45.6	—	—
KCGW6Y16-3-L	—	25.8	—	—
KCGW4Y16-2	25.4	81.2	—	—
KCGW6N16-1-L	—	—	—	—
KCGW6N16-2-L	45.6	26.5	—	—
KCGW6N16-2	—	95.8	—	—
KCGW3M16-1	88.6	114.3	—	—
KCGW3M16-1-L	24.6	11.2	—	—
KCGW3M16-2-L	33.5	—	—	—
KCGW7M16-3-L	61.5	54.1	—	—
KCGW7M16-4-L	—	26.8	—	—
JGW5M18-1	—	23.6	—	25.8
JGW1T16-1	25.8	—	85.2	—
JGW1T16-2	24.7	—	123.5	45.6
JGW2T16-1	15.8	14.7	—	—
JGW3T16-2	—	—	65.6	60.3
JGW4T16-1	64.6	—	87.2	30.6
JGW5T18-1	—	—	—	—
JGW6T16-1	—	—	98.8	20.4
JGW7T16-1	—	—	114.5	25.8
JGW9T16-1	—	—	—	—
JGW12T16-1	—	—	120.5	63.2
JGW13T16-5	—	36.6	—	—
JGW14T16-4	—	—	—	29.8
FC16-10	—	125.2	—	45.4
FC16-11	—	—	—	—
FC16-13	—	—	78.4	29.8
FC18-1	—	—	112.5	—
FC18-9	—	96.8	—	—
FC18-21	—	48.2	—	—

<sup>1)</sup> 활성율(%) = (반응구의 직경)/(Control의 직경) × 100

### (시험 3) 유용 미생물 균주 은행 기탁

가. 균주 선발을 위한 고효성 균주의 동정

표 14. 동정에 사용한 Primer

Primers	Sequence(5' -3')	Size(bp)
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1,600bp
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	1,600bp
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	400-800bp
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	400-800bp

유산균의 경우 주로 *Lactobacillus* 속 또는 *Leuconostoc* 속으로 동정되었다. 기존의 유산균과의 유사성은 대부분 95~98%로 분포되었으며 97%이하의 호모로지를 보여주는 균주의 경우 추후 형태적 또는 생리학적 정밀 동정을 통해 추가 확인이 필요함을 보여주었다.

표 15. 고효성 유산균 동정 결과

No.	Strains	Species	Homology (%)
1	JGW1T16-1	<i>Lactobacillus sakei</i> strain NJ2	95.0
2	JGW2T16-2	<i>Lactobacillus sakei</i> strain KLDS	96.0
3	JGW6T16-1	<i>Leuconostoc citreum</i>	97.0
4	JGW12T16-1	<i>Leuconostoc fallax</i>	97.0
5	JGW13T16-5	<i>Lactobacillus curvatus</i>	97.0
6	KCGW1M16-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	95.0
7	JGW11T16-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	96.0
8	JGW2T16-1	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carnosus</i>	98.0
9	JGW3T16-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	95.0
10	JGW4T16-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	96.0
11	JGW6T16-2	<i>Lactobacillus sakei</i>	96.0
12	JGW7T16-1	<i>Leuconostoc citreum</i>	95.0
13	JGW7T16-2	<i>Leuconostoc citreum</i>	96.0
14	JGW8T16-1	<i>Leuconostoc citreum</i>	96.0
15	JGW8T16-2	<i>Leuconostoc citreum</i>	95.0

고초균의 경우 Fibrinolytic 활성이 높았던 DJN58와 KAGB23 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens* 및 *Bacillus megaterium*과 98%의 상동성을 보였으며, Protease 활성이 높았던 C11Y16 및 KAJN29은 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 과 각각 98%의 상동성을 보여주었다. Protease와 Fibrinolytic 활성을 보였던 KAGB24 균주는 청국장 종균으로 사용되는 *Bacillus megaterium*과 98%의 상동성을 보여주었다. 이상의 5점의 균주는 농업유전자원센터(KACC)에 기탁하였다.

표 16. 고효율성 고초균 동정 결과

No.	Strains	Species	Homology(%)
1	CCN25Y16_1	<i>Bacillus subtilis</i>	97.0
2	CCN25Y16_2	<i>Bacillus subtilis</i>	96.0
3	C11Y16	<i>Bacillus subtilis</i>	98.0
4	CCN25Y16_5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97.0
5	CCN25Y16_7	<i>Bacillus sp.</i>	94.0
6	CCN27Y16_3	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	88.0
7	CCN27Y16_4	<i>Bacillus subtilis</i>	97.0
8	CCN27Y16_5	<i>Bacillus subtilis</i>	96.0
9	KCGW6Y16-1	<i>Bacillus altitudinis</i>	99.0
10	KCGW6Y16-2-L	<i>Bacillus pumilus</i>	91.0
11	DJN58	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98.0
12	sKAY16-13	<i>Bacillus subtilis</i>	97.0
13	KAGB23	<i>Bacillus megaterium</i>	98.0
14	KAJN29	<i>Bacillus amyloliquefaciens subsp. plantarum</i>	98.0
15	KAGB24	<i>Bacillus atrophaeus</i>	98.0
16	sKAY16-21	<i>Bacillus subtilis</i>	97.0
17	sKAY16-44	<i>Bacillus subtilis</i>	98.0
18	KCGW20T16-5	<i>Bacillus licheniformis</i>	97.0

효모의 경우 K29Y1균주가 *Zygosaccharomyces rouxii*와 유사도 91%로 가장 낮았으며, Query Coverage도 93%로 양호하여 새로운 genus일 확률이 높았다. Query Coverage는 낮지만 유사도가 높은 균주의 경우 추가 정밀 동정을 통해 새로운 종 여부를 확인 할 필요성이 있다. 일반적으로 유사도 97%이하의 균주는 신종으로 분류된다. 그 외 활성이 우수했던 KA3Y2과 D12Y2균주는 ITS gene의 Query coverage가 낮아 추가적인 동정이 필요하였다.

표 17. 고효율성 효모 동정 결과

No.	Strains	Species	Homology(%)
1	KCGW6Y16-1-L	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	92.0
2	KCGW4Y16-1-L	<i>Pseudomonas fragi</i>	97.0
3	FC18-23	<i>Pichia guilliermondii</i>	100.0
4	FC18-17	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	99.0
5	FC18-22	<i>Debaryomyces hansenii</i>	100.0
6	FC18-3	<i>Candida parapsilosis</i>	99.0
7	FC18-8	<i>Yarrowia lipolytica</i>	88.0
8	FC18-9	<i>Yarrowia lipolytica</i>	88.0
9	FC18-11	<i>Cryptococcus curvatus</i>	99.0
10	K29Y1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	91.0
11	KA3Y2	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	97.0
12	D12Y2	<i>Saccharomycetales sp.</i>	98.0
13	FC18-6	<i>Peyronellaea sp.</i>	96.0
14	KCGW20M18-3	<i>Kazachstania servazzii</i>	98.0
15	J30M18-1	<i>Debaryomyces hansenii</i>	99.0

○ 염기서열 비교를 통한 균주의 계통분석

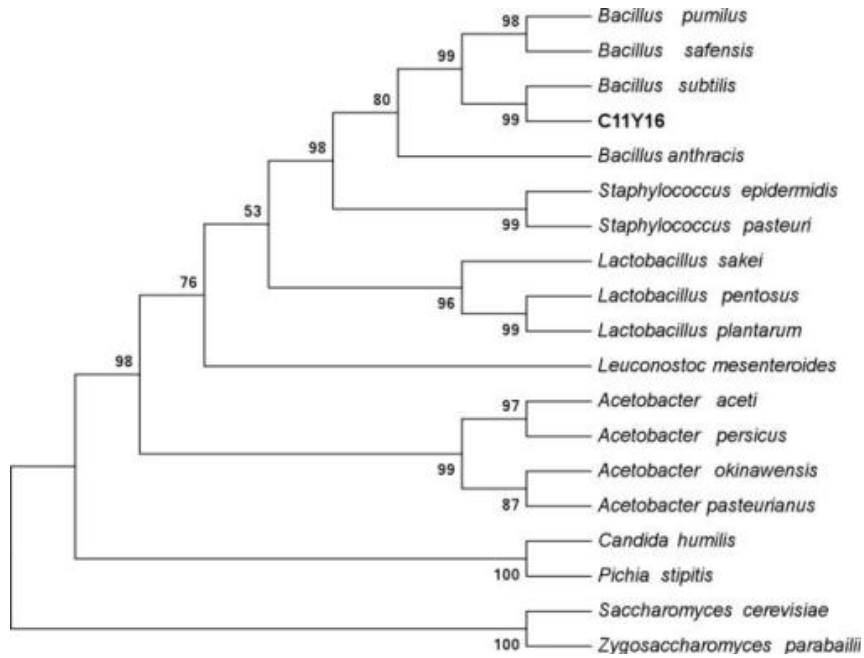


그림 6. 16S rRNA 염기서열 비교를 통한 C11Y16 균주의 계통분석

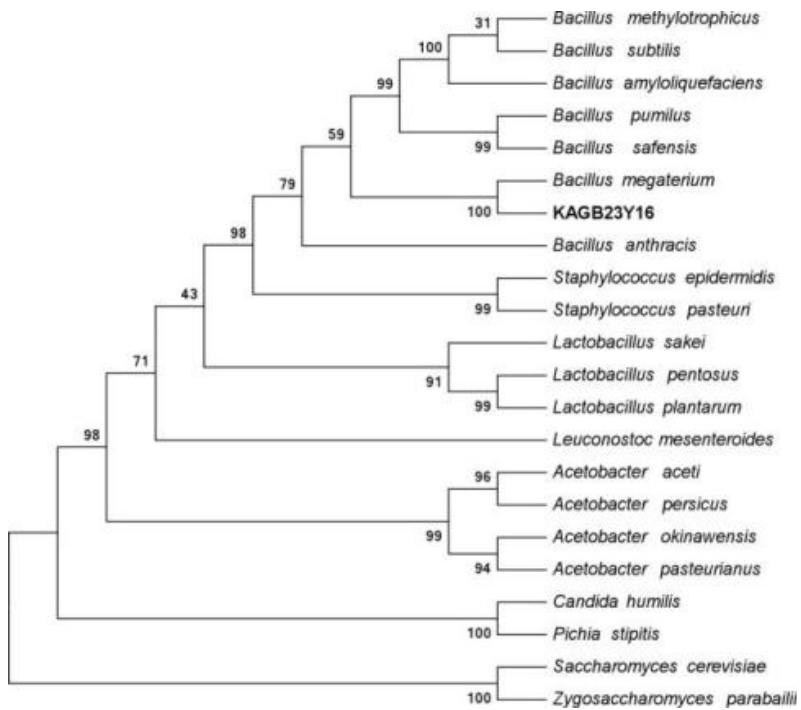


그림 7. 16S rRNA 염기서열 비교를 통한 KAGB23 균주의 계통분석

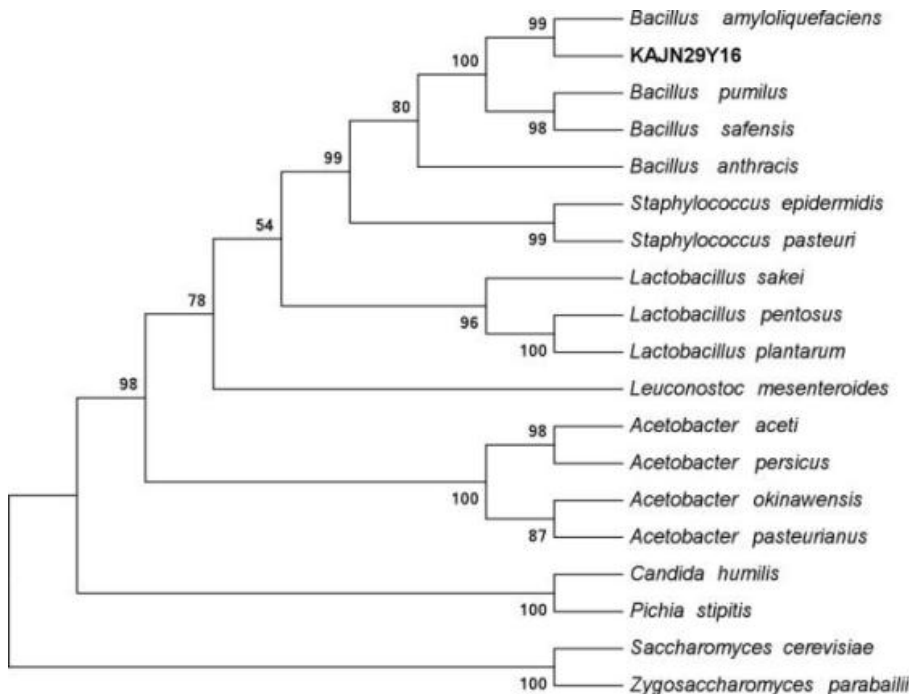


그림 8. 16S rRNA 염기서열 비교를 통한 KAJN29 균주의 계통분석

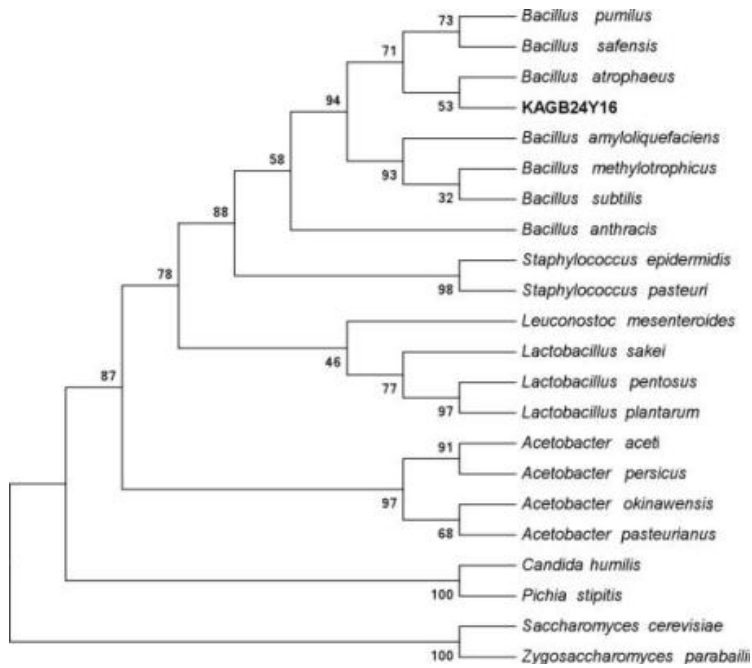


그림 9. 16S rRNA 염기서열 비교를 통한 KAGB24 균주의 계통분석

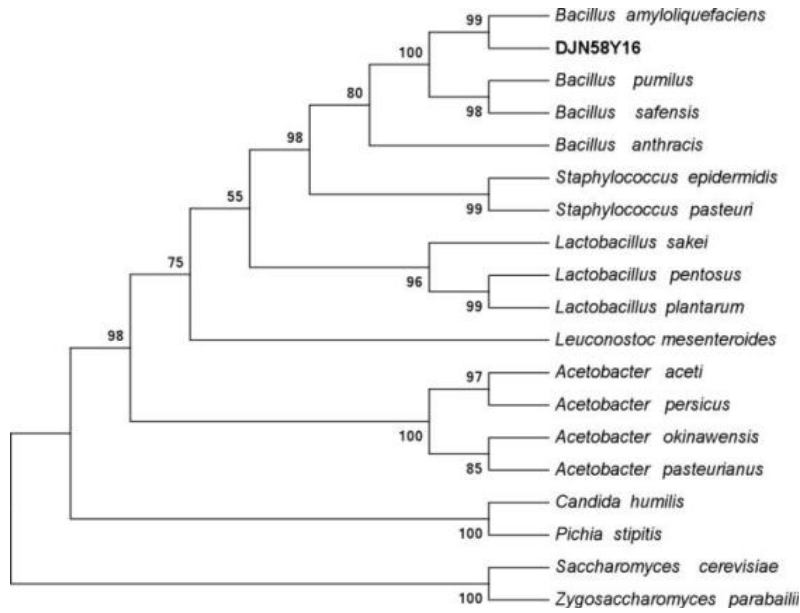


그림 10. 16S rRNA 염기서열 비교를 통한 DJN58 균주의 계통분석

#### 나. 고효성 균주 기탁

아래와 같이 5종의 세균을 농업유전자원센터에 기탁하였다(표 18). C11Y16과 KAJN29는 Protease 활성이 우수하였고, DJN58과 KAGB23은 Fibrinolytic 활성이 우수하였다. KAGB24는 CMCase에서 우수한 활성을 보여주었다.

표 18. 균주 기탁 내역

Strains	Species	농업유전자원센터 (기탁번호)
C11Y16	<i>Bacillus subtilis</i>	17703
KAGB23	<i>Bacillus megaterium</i>	17704
KAJN29	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	17705
KAGB24	<i>Bacillus atrophaeus</i>	17706
DJN58	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	17707

#### (시험 4) 발효식품(청국장, 김치, 주류) 제조용 우수 균주 선발

##### 가. 청국장 제조용 고초균 선발

(1) Biogenic amin(BAs), 독소, 향생물질 생성 여부 확인을 위한 유전자 검정

선발 균주들의 BAs (histamine, tyramine) 합성 유전자, 구토 독소 합성 효소 유전자(*cesA*, *cesB*), 설사독소 발현 전사조절 유전자(*plcR-papR*) 및 향균물질 합성 유전자 증폭을 위한 프라이머 서열들은 표 19와 같고, PCR 조건은 94℃에서 1분간 초기 변성 후, 94℃ 15초,

60°C 30초, 72°C 1분간 증폭과정을 28회 반복하고 72°C에서 7분간 마지막 증폭을 실시하였다. PCR 증폭 결과는 표 20과 같다. Positive control로는 *Bacillus cereus* KACC 11240, *B. licheniformis* KACC 10476, *B. subtilis* KACC 14394 균주를 사용하였고 negative control로는 NB 배지를 이용하였다.

표 19. BAs, 독소, 항균물질 유전자 프라이머 내역

Primer pair <sup>1)</sup>	Sequence	Target sequence	Size (bp)
HDC3-F HDC4-R	GATGGTATTGTTTCKTATGA CAAACACCAGCATCTTC	histidin decarboxylase ( <i>hdc</i> gene)	435
TD2-F TD5-R	CAAAATGGAAGAAGAAGTAGG ACATAGTCAACCATRTTGAA	tyrosine decarboxylase ( <i>tdc</i> gene)	1,100
CESA-F CESA-R	GTTGGCGTGTTATGTGATCG GGTGAAACAGCTTCTCCTGC	cereulide synthetase A ( <i>cesA</i> gene)	662
CESB-F CESB-R	AAAGAATGTTTCACCGAAGACGGTT ACACACTTCTTTCCGATTCCACCT	cereulide synthetase B ( <i>cesB</i> gene)	1161
PLCR-F PLCR-R	CRGGYGCRGTATACCCAAGT TGAAATACCCCATGYCATYG	phospholipase C ( <i>plcR</i> gene)	888
LCHA-F LCHA-R	ACGGCCGATCAGGAGCTTTC TCTCAGCGCCTTCGATCTGC	Lichenysin synthetase, ( <i>lchAA</i> )	557
LCHB-F LCHB-R	TTTGACCCGGAGCTCGTTGA CTGAGGGCGGAAAGCAGGAT	Lichenysin synthetase, ( <i>lchAB</i> )	706
LCHC-F LCHC-R	CATGTATACGGCCGACGGA CTGAAGGCCGGAGATGGCTT	Lichenysin synthetase, ( <i>lchAC</i> )	1173
LANM1-F LANM1-R	TCGCTGACCACCGAGGAAAA CGCTTTCTGCATGGTCCAG	Lantibiotic modification enzyme1, ( <i>licM1</i> )	571
LANM2-F LANM2-R	CGACAGCGCACTACGCTCT TCCCGCATGCTGCAGAAAAT	Lantibiotic modification enzyme2, ( <i>licM2</i> )	776
SRFA-F SRFA-R	CAGCGGCAGCGGATTAATG GGCCTTCAAAATCGCCTGCT	Surfactin synthetase A, ( <i>srfAA</i> )	1,025
SRFB-F SRFB-R	CGGTGTGTCATGGCGGATTT TCGAAAGCGGACGGTTCAAA	Surfactin synthetase AB, ( <i>srfAB</i> )	696
SRFC-F SRFC-R	TTCACTGTGCGAGGCGGAAA ACCGGCAGATAGGCTGCTCC	Surfactin synthetase AC, ( <i>srfAC</i> )	933

2013년도에 *Bacillus* sp.로 동정된 균주를 대상으로 '13년에 수행한 *hdc*, *tdc*, *cesA*, *plcR* 유전자 이외에 *cesB* 등 9개의 독소 및 항생물질 생성 유전자 검정을 실시하였다. 표 2와 같이 SGB1B16-3 등 8개의 균주에서 독소 유전자가 검출 되지 않았다. 8개의 균주 중에서 청국장 발효 주요 균주인 *Bacillus subtilis* 종으로 확인 된 J2B12-2 등 3개의 균주를 청국장 제조 시험에 활용하였다.

표 20. BAs, 독소, 항균물질 유전자 검정

구분	균주명	<i>hdc</i>	<i>tdc</i>	<i>cesA</i>	<i>cesB</i>	<i>plcR</i>	<i>lchAA</i>	<i>lchAB</i>	<i>lchAC</i>	<i>licM1</i>	<i>licM2</i>	<i>srfAA</i>	<i>srfAB</i>	<i>srfAC</i>
1	C11Y16	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D
2	SGB1B16-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND
3	SGB1B16-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	SGB1B16-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	SGG2B16-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND
6	SGG2B16-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND
7	KCB38Y16-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	D	ND	D
8	J1B16-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND
9	J2B16-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
10	J3B16-4	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND
11	J4B16-1	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND
12	J3B16-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
13	KAGB23	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14	KAJN29	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
15	KAGB24	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND
16	DJN59Y16-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
17	KCB38Y16-2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	D
18	KCB38Y16-3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D
19	KCB38Y16-4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	KCB39Y16-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	ND	ND
24	DGN57Y16-1	ND	ND	D	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D
25	DGB51Y16-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND
26	DJN58Y16-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND	D
27	KAGB23Y16-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

<sup>1)</sup>ND : Not detected, D : detected

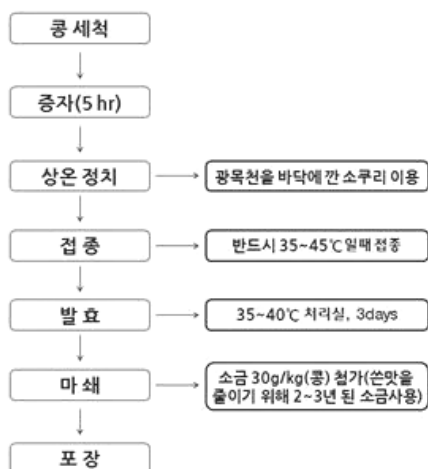


그림 11. 균주 첨가 청국장 제조 모식도

### (2) 아미노태 질소 고생성능 균주

청국장 제조시에 J2B12-2 등 4종 5처리구로 하여 균주를 접종하여 청국장을 제조하였다. 각 균주 배양액 20 ml을 삶은 콩 2kg에 접종 한 후, 72시간 까지 발효시켜 청국장을 제조하였다(그림 11). 이때, 대조군으로는 균주를 접종하지 않은 것과 시판되는 수입 종균(Takahasi연구소, 청국장/낫도 종균, 한홍순농수산 판매)을 동일한 조건으로 처리하였다. 처리구 6의 경우는 쓴맛 저감을 위해 효모 D12Y1을 동시에 처리하여 제조하였다. 제조한 청국장의 품질 특성을 검정하기 위해서 청국장 품질의 척도인 아미노태질소 함량과 폴리글루타메이트(PGA)도 측정하였는 바, 그 결과를 표 21에 나타내었다. 이때, 상기 아미노태질소 함량은 식품공전(제2권 1.1.3.2 아미노산질소, 홀물적정법)에 따라 측정하였고, 상기 폴리글루타메이트(PGA)는 청국장을 백금이로 취한 후 서서히 늘어뜨려 PGA가 생성되는 길이를 측정하였다. PGA의 길이가 < 5cm인 것은 +, < 10cm인 것은 ++, 10cm < 인 것은 +++로 표시하였다.

표 21. 균주 첨가 청국장 제조 특성

No.	Strains	아미노태질소(mg%)	상대적 혈전용해활성(%)	γ-PGA 생성능*
1	무처리	595.4±3.6	89.4±2.1	+
2	DJN59Y16-1	744.2±4.2	169.2±1.5	+++
3	DJN59Y16-1+D12Y1	527.9±3.4	96±1.7	++
4	수입종균	584.3±2.8	135.4±1.7	+++
5	J3B16-3	620.6±3.3	147.2±1.9	+++
6	J2B16-2	721.7±4.5	124.5±2.4	++

\* : +++(우수), ++(보통), +(저조)

### (3) γ-PGA 고생성능 균주

표 21의 결과와 같이 DJN59Y16-1의 아미노태질소 함량이나 혈전용해활성이 수입종균이나 다른 균주에 비해 우수한 결과를 나타내었다. 하지만 항혈전효과의 시너지 효과를 기대했던 처리구 3의 경우는 무처리구와 비슷한 항혈전 효과를 보여주었고 아미노태질소 함량도 낮은 결과를 나타내었다(그림 13). 아마도 고초균과 효모의 길항작용이 작용했으리라 판단된다. 이 같은 결과는 추후 추가 시험이 필요하리라 판단된다. 그리고 아미노태질소의 경우 함량이 증가할수록 청국장 특유의 쓴 맛이 증가한다는 보고가 있는데 DJN59Y16-1의 경우 간이로 테스트한 관능평가에서 쓴 맛은 나타나지 않았다(Data not shown). 이와 같은 결과를 바탕으로 DJN59Y16-1을 청국장 종균으로 최종 선발하였고 생화학적 동정 및 유전적 동정결과를 바탕으로 계통도를 작성하였다.

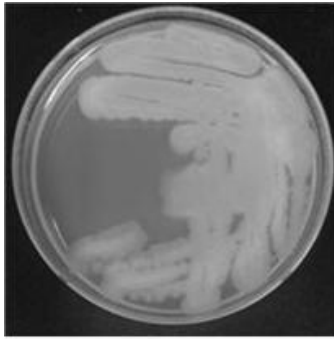


그림 12. DJN59Y16-1 균락

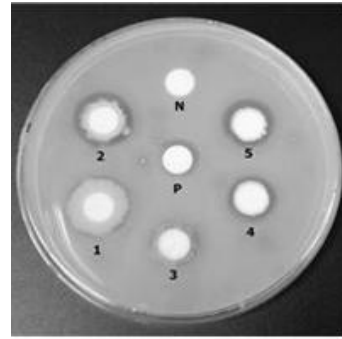


그림 13. 제조 청국장 혈전용해활성 측정

#### (4) 혈전용해 고활성 균주

그림 13의 혈전용해활성 측정은 Astrup과 Mullertz의 방법을 변형하여 fibrinogen을 최종농도가 0.3%(w/v)가 되도록 PBS완충액(0.1M, pH 7.4)에 용해시킨 후 평판에 부은 후 1.5%(w/v) agarose 용액을 동량 첨가하여 혼합하였다. 여기에 thrombin(Sigma-Aldrich, USA)을 100 $\mu$ l 첨가하여 상온에서 정치한 후 균 배양액 20 $\mu$ l를 분주하여 paper disk 방법으로 활성을 측정하였다. 양성 대조구로는 plasmin(1.0U/mL, Sigma, USA)을 사용하였다. 각 균주가 나타내는 혈정용해 활성은 아래식과 같이 plasmin이 나타내는 혈전용해 활성의 상대활성으로 정의하였다.

$$\text{혈전용해 활성(\%)} = (\text{반응구의 직경} / \text{대조구의 직경}) \times 100$$

#### 나. 김치 제조용 유산균 선발

##### (1) 고염도 내성 유산균

일부 대기업을 제외한 김치업체의 주요 애로사항이 여름 김치의 유통과정 중 냉장유통시스템의 부재로 인해 쉽게 김치가 시어지는 현상이었다. 따라서 김치의 맛 개선 뿐만 아니라 숙성지연효과를 주요 목표로 균주 선발을 실시하였다.

표 22. 주요 균주 글루코노 델타 락톤 생성 정량적 검정

구 분	Strains	OD340nm	총량(g/L)
1	KCGW25-1	0.283	0.001
2	KCGW25-2	0.279	0.013
3	KCGW25-3	0.283	0.002
4	KCGW25-4	0.291	0.005
5	KCGW25-5	0.280	0.003
6	KCGW25-6	0.278	0.004
7	KCGW25-7	0.277	0.001
8	KCGW28-1	0.274	0.002
9	KCGW28-2	0.267	0.001
10	KCGW28-3	0.264	0.002
11	KCGW28-5	0.281	0.003
12	KCGW28-7	0.265	0.004
13	Standard	0.298	0.297

식품첨가물 중의 하나인 글루코노 델타락톤이 김치숙성 지연에 효과가 있다는 보고가 있어 표 22와 같이 분리된 김치에서 분리된 유산균을 대상으로 D-Glucono-delta-Lactone assay kit (Megazyme, Ireland)을 이용하여 정량적 assay를 실시하였다. 글루코노 델타락톤의 경우 현재까지 미생물에서 미보고 되었다는 결과와 동일하게 스탠다드에 비해 낮은 값을 보여 주었다.

표 23. 분리균주 내염성 및 저온생육도 검정

전체 분리균수 (점)	내염성 검정(1차선발 균수)			저온 생육 검정(7°C) (2차선발 균수)
	5%	7%	10%	
753	466	133	15	107

김치의 염도가 일반적으로 5~8%임을 감안하여 김치 및 젓갈에서 선택배지인 MRS 배지를 이용하여 분리한 균주들을 대상으로 고염도에서 생육이 우수한 균주를 1차 선발하였다. 1차 선발한 균주는 다시 김치냉장고의 저장온도인 저온 (7-10°C)에서 생육이 활발한 균주를 2차 선발하였다. 대상균주는 MRS 선택배지에서 분리된 753점을 대상으로 NaCl을 이용하여 염도를 5, 7, 10%로 첨가한 MRS 고체배지를 이용하여 1차 선발한 결과 5%에서는 466점, 7%에서는 133점, 10%에서 15점의 균주의 생육을 확인하였다. 7%이상에서 생육이 우수한 균주와 5%에서 생육이 월등히 우수한 균주 400점을 대상으로 7°C에서 저온 생육 여부를 검정한 결과 107점에서 생육을 확인 할 수 있었다(표 23).

표 24. 주요 내염성 균주 생육 특성

구분	Strains	OD600nm*희석배수	균수(cell/ml)
1	KCGW3M16-1	0.321	2.57x10 <sup>8</sup>
2	KCGW28-1	0.760	6.08x10 <sup>8</sup>
3	JGW1-21	0.703	5.63x10 <sup>8</sup>
4	JGW1-22	1.039	8.31x10 <sup>8</sup>
5	JGW2-1	0.841	6.73x10 <sup>8</sup>
6	JGW2-23	1.086	8.69x10 <sup>8</sup>
7	JGW2-24	1.560	1.25x10 <sup>9</sup>
8	JGW3-2	1.646	1.32x10 <sup>9</sup>
9	JGW3-4	1.686	1.35x10 <sup>9</sup>
10	JGW3-8	0.502	4.02x10 <sup>8</sup>
11	JGW3-11	1.146	9.17x10 <sup>8</sup>
12	JGW3-18	1.445	1.16x10 <sup>9</sup>
13	JGW3-19	1.243	9.94x10 <sup>8</sup>
14	KCGW28M16-20	0.357	2.86x10 <sup>8</sup>
15	KCGW28M16-21	1.029	8.23x10 <sup>8</sup>
16	KCGW28-40	0.766	6.13x10 <sup>8</sup>
17	KCGW29-11	0.433	3.46x10 <sup>8</sup>
18	KCGW29-13	0.478	3.83x10 <sup>8</sup>
19	KCGW29-19	0.465	3.72x10 <sup>8</sup>
20	KCGW29-33	0.700	5.60x10 <sup>8</sup>
21	KCGW30-1	0.542	4.34x10 <sup>8</sup>
22	KCGW30-3	0.304	2.43x10 <sup>8</sup>
23	KCGW31-10	1.407	1.13x10 <sup>9</sup>
24	KCGW24M16-3	1.281	1.03x10 <sup>9</sup>
25	JGW10-14	1.353	1.08x10 <sup>9</sup>
26	JGW10-16	0.399	3.19x10 <sup>8</sup>
27	JGW10-21	0.341	2.73x10 <sup>8</sup>

표 24는 주요 내염성 균주의 생육을 측정하였다. 내염성 측정은 MRS 배지 제조 시 NaCl을 이용하여 농도에 맞게 제조하고, streaking을 통해 생육 여부를 1차 스크리닝 한 후 액체배지에서 키워 OD 600nm에서 측정하여 생균수를 카운팅하였다. KCGW24M16-3 등 3점에서  $10^9$  이상의 높은 생균수를 나타내었고, 다른 주요 균주에서도  $10^8$  이상의 생균수를 보여주었다. 일반적으로  $10^6$  이상의 생육을 보여주면 생육이 양호한 것으로 평가한다.

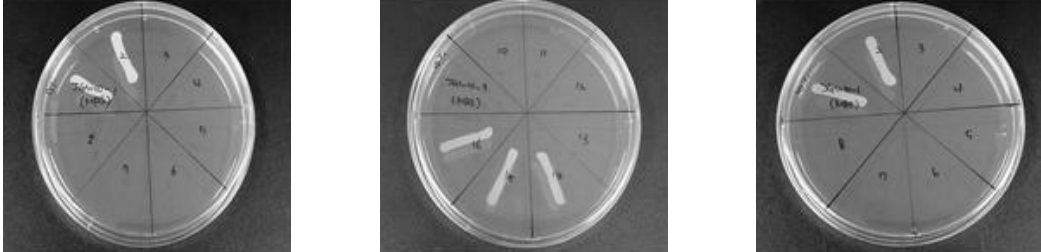


그림 14. 내염성 유산균 스크리닝(7% ~ 10%)

(2) 김치숙성 온도인 저온에서 생육이 활발한 균주 선발

표 25는 내염성이 우수했던 400점을 대상으로 김치 저장 온도인 7°C에서 균주의 생육을 검정한 결과이다. 테스트할 균주는 미리 액체 MRS에 배양 한 균주를 3ml이 들어있는 라운드 플라스크에 20μL 씩 접종하여 shaking incubator(제이오텍, MI-400)의 온도를 7°C로 세팅한 후 2시간 후 부터 48시간, 120rpm으로 배양하였다. 배양 한 후에 육안으로 생육이 확인 된 샘플을 OD 600nm 에서 측정하여 생균수를 측정하였다. 측정결과 KCGW28M16-21처럼  $10^9$  이상의 높은 생균수를 나타내는 균주가 일부 있었고, 주로  $10^8$ 이상의 생균수를 나타내었다.

표 25. 주요 저온(7°C) 생육 우수 균주 생육 특성

구 분	Strains	OD 600nm*희석배수	균수(cell/ml)
1	KCGW3M16-1	0.248	$1.98 \times 10^8$
2	JGW5-24	0.546	$4.37 \times 10^8$
3	JGW10-1	0.354	$2.83 \times 10^8$
4	JGW10-2	0.622	$4.98 \times 10^8$
5	JGW10-13	0.365	$2.92 \times 10^8$
6	JGW10-14	1.304	$1.04 \times 10^9$
7	JGW10-15	1.124	$8.99 \times 10^8$
8	JGW10-17	0.894	$7.15 \times 10^8$
9	JGW10-21	1.308	$1.05 \times 10^9$
10	JGW11-2	0.494	$3.95 \times 10^8$
11	JGW11-16	1.750	$1.40 \times 10^9$
12	JGW11-21	0.508	$4.06 \times 10^8$
13	JGW3-19	0.824	$6.59 \times 10^8$
14	KCGW28M16-20	0.356	$2.85 \times 10^8$
15	KCGW28M16-21	1.580	$1.26 \times 10^9$
16	KCGW27-3	0.523	$4.18 \times 10^8$
17	KCGW27-4	0.425	$3.40 \times 10^8$
18	KCGW27-18	0.512	$4.10 \times 10^8$
19	KCGW27-34	0.523	$4.18 \times 10^8$
20	JGW1-8	0.197	$1.58 \times 10^8$
21	JGW1-14	0.548	$4.38 \times 10^8$

구분	Strains	OD 600nm*희석배수	균수(cell/ml)
22	JGW1-17	0.468	$3.74 \times 10^8$
23	JGW2-4	0.290	$2.32 \times 10^8$
24	KCGW24M16-3	0.169	$1.35 \times 10^8$
25	KCGW24-40	0.554	$4.43 \times 10^8$
26	KCGW25-8	0.247	$1.98 \times 10^8$
27	KCGW25-9	0.198	$1.58 \times 10^8$

### (3) 젖산 내성 균주 분리 및 선발

표 26은 김치의 중기 발효 주요 유산균인 *Lactobacillus* sp.의 젖산 분비에 대한 내산성을 검정하기 위해 pH별 균주 생균수를 나타낸 표이다. MRS 액체배지에 HCl을 적정하여 pH를 맞춘 후 미리 시드했던 균주를 20μL씩 분주하여 접종하였다. Shaking incubator(제이오텍, MI-400)에서 30℃, 48시간, 180 rpm으로 배양한 후 육안으로 1차 스크리닝 후 생육이 확인된 균주를 OD 600nm에서 측정하여 생균수를 측정하였다. 측정 결과 KCGW28M16-20 등 유산균의 특성에 맞게 pH 3.0에서도  $10^7$  정도의 생균수를 보여주었고, 중성인 pH 7.0 에서 왕성한 생육을 보여주었다.

표 26. 젖산 내성 주요 균주 생육 특성

구분	Strains	OD600nm(cell/ml)				
		pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
1	KCGW28M16-1	$3.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
2	KCGW28M16-3	$3.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
3	KCGW28M16-5	$2.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
4	KCGW28M16-9	$3.0 \times 10^7$	$7.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^9$	$4.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
5	KCGW28M16-10	$6.0 \times 10^6$	$2.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
6	KCGW28M16-14	$3.0 \times 10^7$	$7.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
7	KCGW28M16-16	$2.0 \times 10^7$	$9.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
8	KCGW28M16-20	$2.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
9	KCGW28M16-21	$2.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
10	KCGW28M16-22	$2.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
11	KCGW29M16-1	$2.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
12	KCGW29M16-2	$2.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
13	KCGW29M16-4	$3.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
14	KCGW29M16-5	$2.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
15	KCGW29M16-6	$2.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
16	KCGW29M16-9	$3.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
17	KCGW29M16-11	$3.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
18	KCGW29M16-12	$2.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
19	KCGW29M16-13	$3.0 \times 10^7$	$6.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
20	KCGW29M16-14	$3.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
21	KCGW30M16-1	$4.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
22	KCGW30M16-2	$8.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^9$	$5.0 \times 10^9$	$6.0 \times 10^9$	$7.0 \times 10^9$
23	KCGW30M16-5	$3.0 \times 10^7$	$5.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
24	KCGW30M16-7	$4.0 \times 10^7$	$1.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$	$3.0 \times 10^9$
25	KCGW30M16-8	$2.0 \times 10^7$	$4.0 \times 10^7$	$3.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
26	JGW3M16-7	$4.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^9$	$4.0 \times 10^9$	$4.0 \times 10^9$
27	JGW7M16-1	$2.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$	$3.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$

표 27. 김치용 균주 동정 내역

No.	Strains	Species	Homology (%)
1	KCGW24M16-3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PON10024	97.0
2	KCGW28M16-20	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MOO9	97.0
3	KCGW28M16-21	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> PON100350	95.0

내염성, 내산성, 저온적응성을 검토 한 후 3개 부분에서 우수한 생육을 보여주는 균주 89점을 선발하여 16S rRNA를 PCR로 증폭하고 시퀀싱을 (주)마크로젠(Macrogen Inc., Korea)에 의뢰하여 유전적 균주 동정을 실시하였다. 시퀀싱한 서열을 BLAST N 프로그램을 사용하여 표준 균주와의 상동성을 비교하였고, 그 중 김치 발효의 초기에 관여하는 *Leuconostoc mesenteroides* 3점을 선발하였다. 현장 실증 시험을 거쳐 최종적으로 KCGW28M16-20을 선발하였다.



그림 15. KCGW24M16-3



그림 16. KCGW28M16-20



그림 17. KCGW28M16-21

#### 다. 주류 제조용 유산균 선발

##### (1) 알코올 내성 유산균 분리

1차년도에 수집하지 못했던 주류를 표 10과 같이 막걸리 7종, 약주 6종, 와인 7종 총 20종을 수집하여 시료로 사용하였다. 주류 이외에 누룩을 5종 수집하여 유산균 분리에 이용하였다(표 28).

표 28. 주류 수집 내역

구분	연번	품목	주소	첨가물
1	MA1	막걸리	춘천시 김유정길	생막걸리 봄봄
2	MA2	막걸리	춘천시 신동면 풍류1길 34	국순당 대박
3	MA3	막걸리	황성군 둔내면 강변로 975	산천어 생막걸리
4	MA4	막걸리	화천군 하남면 공단길 18	소양강 생막걸리
5	MA5	막걸리	춘천시 신북읍 울문리 553-13	생막걸리곤드레
6	MA6	막걸리	정선군 북평면 송석길 146-7	호박막걸리
7	MA7	막걸리	동해시 구호동 235-6	백화미인
8	YA1	약주	철원군 김화읍 청양리 2889	동몽
9	YA2	약주	홍천군 내촌면 물걸리 508-2	산돌배 주
10	YA3	약주	인제군 북면 원통리	호곡 황금주
11	YA4	약주	원주시 소초면 홍양리17-2	평창서주 감자술
12	YA5	약주	평창군 진부면 하진부리	더덕주동강

구분	연번	품목	주소	첨가물
13	YA6	약주	영월군 주천면 솔치로 633	홍천강 탁주
14	WA1	와인	홍천군 내촌면 물걸리 508-2	산야 더덕와인
15	WA2	와인	영월군 주천면 신일1리 379-2	블루베리 와인
16	WA3	와인	화천군 간동면 모현동로 185-17	토종 다래와인
17	WA4	와인	원주시 소초면 홍양리 17-2	너와 머루와인
18	WA5	와인	삼척시 도계읍 신리 412번지	만나와인
19	WA6	와인	춘천시 신북읍 지내리 646-1	레드듀
20	WA7	와인	영월군 영월읍 문산리 624	평창 머루주

표 29. 막걸리에서 분리한 균주의 알코올 내성 검정

구분	Strains	OD 600nm (cell/ml)				
		3%	5%	7%	10%	15%
1	MA4-1	$2.1 \times 10^8$	$4.7 \times 10^7$	$2.9 \times 10^7$	$2.7 \times 10^7$	$4.7 \times 10^7$
2	MA4-2	$2.6 \times 10^7$	$4.6 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$	$1.0 \times 10^7$	$4.1 \times 10^7$
3	MA4-3	$1.8 \times 10^8$	$7.8 \times 10^7$	$4.5 \times 10^6$	$1.7 \times 10^7$	$2.6 \times 10^7$
4	MA4-4	$1.6 \times 10^7$	$6.8 \times 10^7$	$2.3 \times 10^7$	$4.8 \times 10^7$	$6.6 \times 10^7$
5	MA4-5	$1.5 \times 10^8$	$2.5 \times 10^7$	$3.5 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$	$3.3 \times 10^7$
6	MA5-1	$3.4 \times 10^8$	$6.1 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$	$1.9 \times 10^7$	$1.8 \times 10^7$
7	MA2-5	$1.7 \times 10^8$	$1.7 \times 10^8$	$2.9 \times 10^7$	-	-

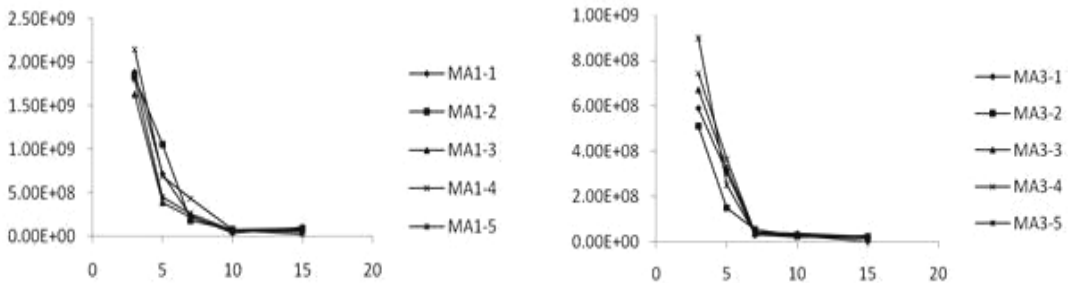


그림 18. 막걸리 분리균주 알코올 내성 측정

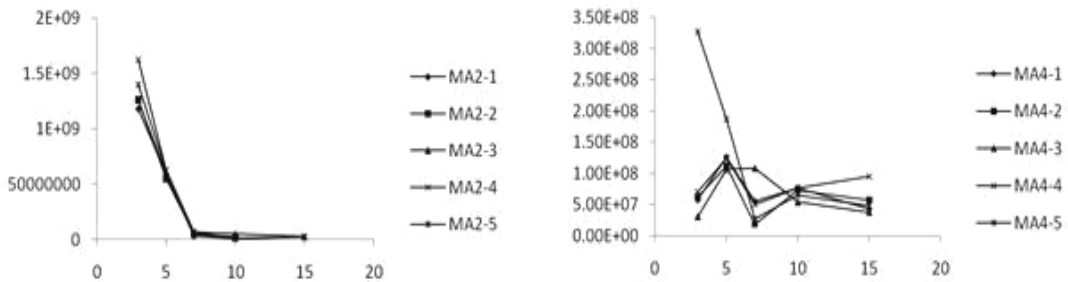


그림 19. 막걸리 분리균주 알코올 내성 측정

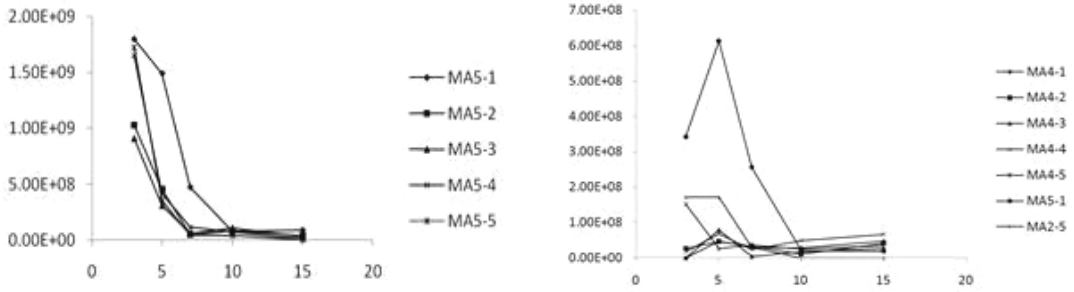


그림 20. 막걸리 분리균주 알코올 내성 측정

막걸리에서 알코올내성이 있는 유산균을 분리하기 위하여 수집한 막걸리 원액을 적절히 증류수를 이용해 희석하여 MRS 배지에 도말 한 후 집락이 형성된 콜로니를 다시 에탄올(3~15%)이 포함된 MRS 액체배지에 배양하여 스펙트로미터를 이용하여 OD 600nm에서 생균수를 측정하였다. 표 29는 알코올 내성을 보여주었던 198점의 균주 중에서 일부 균주를 나타낸 표이다. 막걸리의 도수가 5% 안팎임을 감안하여 3~15%의 알코올 범위를 설정하였고, 5%까지의 생균수는 유지되다가 7% 부터 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 15%의 일부 균주에서 내성이 보이는 이유는 막걸리 제조에 이용되었던 효모로 추정되었다(그림 18, 19, 20).

표 30. 약주에서 분리한 균주의 알코올 내성 검정

구 분	Strains	OD600nm(cell/ml)			
		5%	10%	15%	20%
1	YA6-1	8.4x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	—	1.0x10 <sup>7</sup>
2	YA6-2	9.1x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	—	—
3	YA6-3	4.2x10 <sup>8</sup>	—	—	—
4	YA6-4	1.1x10 <sup>9</sup>	—	6.4x10 <sup>6</sup>	—
5	YA6-5	8.1x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	—	—
6	YA6-6	2.6x10 <sup>9</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	—	—
7	YA6-7	1.0x10 <sup>9</sup>	—	—	—
8	YA6-8	3.5x10 <sup>8</sup>	7.0x10 <sup>6</sup>	6.4x10 <sup>6</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>
9	YA6-9	9.1x10 <sup>8</sup>	—	—	—
10	YA6-10	6.9x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>6</sup>	5.3x10 <sup>6</sup>	5.0x10 <sup>6</sup>
11	YA6-11	1.5x10 <sup>9</sup>	—	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>
12	YA6-12	8.5x10 <sup>8</sup>	7.0x10 <sup>7</sup>	2.2x10 <sup>7</sup>	—
13	YA6-13	8.6x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	—	—
14	YA6-14	5.0x10 <sup>8</sup>	—	—	2.0x10 <sup>6</sup>
15	YA6-15	1.1x10 <sup>9</sup>	—	—	—
16	YA6-16	5.2x10 <sup>8</sup>	—	—	—
17	YA6-17	1.5x10 <sup>9</sup>	—	8.2x10 <sup>6</sup>	6.0x10 <sup>6</sup>
18	YA6-18	4.2x10 <sup>8</sup>	—	—	—

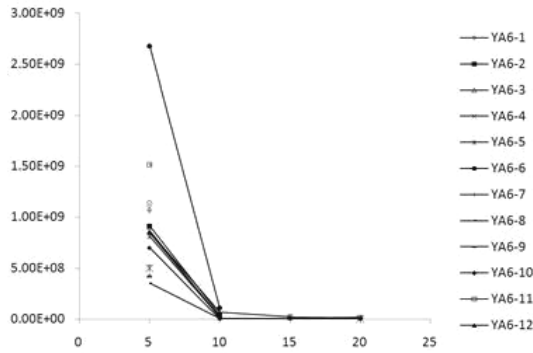


그림 21. 약주 분리균주 알코올 내성 측정

약주에서 알코올내성이 있는 유산균을 분리하기 위하여 수집한 약주 원액을 적절히 증류수를 이용해 희석하여 MRS 배지에 도달 한 후 집락이 형성된 콜로니를 다시 에탄올(5~20%)이 포함된 MRS 액체배지에 배양하여 스펙트로미터를 이용하여 OD 600nm에서 생균수를 측정하였다. 표 30은 알코올 내성을 보여주었던 120점의 균주 중에서 일부 균주를 나타낸 표이다. 약주의 도수가 12% 안팎임을 감안하여 5~20%의 알코올 범위를 설정하였고, 5%에서는 우수한 생육을 보여주다가 10% 부터 점차 감소하는 경향을 나타내었다. 일부 내성이 우수했던 균주를 대상으로 시퀀싱을 통하여 동정을 진행하였다.

표 31. 누룩에서 분리한 균주의 알코올 내성 검정

구 분	Strains	OD 600nm(cell/ml)	
		5%	10%
1	MBE1378	5.6x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>
2	MBE1379	7.1x10 <sup>8</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>
3	MBE1380	1.0x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>
4	MBE1381	5.5x10 <sup>8</sup>	2.1x10 <sup>8</sup>
5	MBE1382	4.6x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>
6	MBE1383	5.4x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>8</sup>
7	MBE1384	4.6x10 <sup>8</sup>	1.7x10 <sup>8</sup>
8	MBE1385	6.4x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>
9	MBE1386	5.4x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>
10	MBE1387	6.1x10 <sup>8</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>
11	MBE1388	6.3x10 <sup>8</sup>	1.7x10 <sup>8</sup>
12	MBE1389	6.1x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
13	MBE1390	7.4x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>
14	MBE1391	7.3x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
15	MBE1392	5.2x10 <sup>8</sup>	1.9x10 <sup>8</sup>

구 분	Strains	OD 600nm(cell/ml)	
		5%	10%
16	MBE1393	6.5x10 <sup>8</sup>	1.9x10 <sup>8</sup>
17	MBE1394	4.7x10 <sup>8</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>
18	MBE1395	4.7x10 <sup>8</sup>	1.7x10 <sup>8</sup>
19	MBE1396	3.6x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
20	MBE1397	3.6x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
21	MBE1398	6.5x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
22	MBE1399	4.4x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>
23	MBE1400	5.3x10 <sup>8</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>
24	MBE1401	5.3x10 <sup>8</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>
25	MBE1402	5.1x10 <sup>8</sup>	1.7x10 <sup>8</sup>
26	MBE1403	4.9x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
27	MBE1404	6.3x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>
28	MBE1405	5.2x10 <sup>8</sup>	1.9x10 <sup>8</sup>
29	MBE1406	6.2x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>
30	MBE1407	5.1x10 <sup>8</sup>	9.0x10 <sup>7</sup>
31	MBE1408	5.5x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>
32	MBE1409	6.2x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>
33	MBE1410	5.0x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
34	MBE1411	7.3x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
35	MBE1412	5.3x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
36	MBE1413	5.9x10 <sup>8</sup>	2.1x10 <sup>8</sup>
37	MBE1414	5.5x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
38	MBE1415	4.1x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>8</sup>
39	MBE1416	4.3x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
40	MBE1417	1.6x10 <sup>9</sup>	9.4x10 <sup>7</sup>
41	MBE1418	4.9x10 <sup>8</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
42	MBE1419	1.5x10 <sup>9</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>
43	MBE1420	1.6x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>8</sup>
44	MBE1421	1.5x10 <sup>9</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>
45	MBE1422	1.5x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>
46	MBE1423	1.5x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>
47	MBE1424	1.2x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
48	MBE1425	1.6x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
49	MBE1426	1.5x10 <sup>9</sup>	1.7x10 <sup>8</sup>

구 분	Strains	OD 600nm(cell/ml)	
		5%	10%
50	MBE1427	1.5x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>8</sup>
51	MBE1428	1.6x10 <sup>9</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>
52	MBE1429	3.3x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>
53	MBE1430	1.6x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>
54	MBE1431	1.6x10 <sup>9</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>
55	MBE1432	1.7x10 <sup>9</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>
56	MBE1433	1.5x10 <sup>9</sup>	2.3x10 <sup>8</sup>
57	MBE1434	7.6x10 <sup>7</sup>	1.2x10 <sup>8</sup>
58	MBE1435	1.5x10 <sup>9</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>
59	MBE1436	1.6x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>
60	MBE1437	1.6x10 <sup>9</sup>	2.1x10 <sup>8</sup>
61	MBE1438	1.2x10 <sup>9</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>
62	MBE1439	1.6x10 <sup>9</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>
63	MBE1440	1.5x10 <sup>9</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>
64	MBE1441	1.5x10 <sup>9</sup>	1.9x10 <sup>8</sup>
65	MBE1442	1.6x10 <sup>9</sup>	2.3x10 <sup>8</sup>
66	MBE1443	1.6x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>8</sup>
67	MBE1444	1.8x10 <sup>9</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>
68	MBE1445	1.8x10 <sup>9</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>
69	MBE1446	1.5x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>8</sup>
70	MBE1447	1.5x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>8</sup>
71	MBE1448	1.5x10 <sup>9</sup>	2.5x10 <sup>8</sup>
72	MBE1449	1.5x10 <sup>9</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>
73	MBE1450	1.5x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>
74	MBE1451	1.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>
75	MBE1452	2.0x10 <sup>9</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>

누룩에서 알코올내성이 있는 유산균을 분리하기 위하여 수집한 누룩을 적절히 증류수를 이용해 희석하여 MRS 배지에 도말 한 후 집락이 형성된 콜로니를 다시 에탄올(5~10%)이 포함된 MRS 액체배지에 배양하여 스펙트로미터를 이용하여 OD 600nm에서 생균수를 측정하였다. 표 31은 알코올 내성을 보여주었던 300점의 균주 중에서 일부 균주를 나타낸 표이다. 5% 에서는 우수한 생육을 보여주었고 10% 에서도 비교적 양호한 생균수를 나타내었다. 일부 내성이 우수했던 균주를 대상으로 시퀀싱을 통하여 동정을 진행하였다.

표 32. 젖산 내성 주요 균주 생육 특성

구 분	Strains	OD 600nm (cell/ml)				
		pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
1	MA1-1	1.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>
2	MA1-3	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>8</sup>	5.0x10 <sup>8</sup>
3	MA1-5	1.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>
4	MA2-5	7.0x10 <sup>6</sup>	8.0x10 <sup>6</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>
5	MA3-2	3.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>9</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>
6	MA3-4	2.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>
7	MA3-5	8.0x10 <sup>6</sup>	8.0x10 <sup>6</sup>	7.0x10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>
8	MA4-1	6.0x10 <sup>6</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>
9	MA5-1	4.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>
10	MA5-4	3.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	1.0x10 <sup>9</sup>
11	MA5-5	8.0x10 <sup>6</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>
12	YA6-1	1.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	8.0x10 <sup>8</sup>
13	YA6-11	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>
14	YA6-17	5.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>7</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>
15	YA6-18	2.0x10 <sup>7</sup>	9.0x10 <sup>6</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>
16	MBE1429	4.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>
17	MBE1438	3.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>7</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>	3.0x10 <sup>9</sup>

표 32는 젖산 분비에 대한 내산성을 검정하기 위해 pH별 주요 균주 생균수를 나타낸 표이다. MRS 액체배지에 HCl을 적정하여 pH를 맞춘 후 미리 접종했던 균주를 20uL씩 분주하여 접종하였다. Shaking incubator(제이오텍, MI-400)에서 30℃, 48시간, 180rpm으로 배양한 후 육안으로 1차 스크리닝 후 생육이 확인 된 균주를 OD 600nm에서 측정하여 생균수를 측정하였다. 측정 결과 YA6-17 등 유산균의 특성에 맞게 pH 3.0에서도 10<sup>7</sup>정도의 생균수를 보여주었고, 약산성인 pH 6.0~7.0 에서 높은 생균수를 보여주었다.

표 33. 주류용 균주 동정 내역(효모)

No.	Strains	Species	Homology (%)
1	MA3M18-1	<i>Pichia</i> sp.	99.0
2	MA3M18-2	<i>Pichia</i> sp.	99.0
3	MA5M18-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	96.0
4	MA5M18-3	<i>Pichia</i> sp.	99.0
5	MA5M18-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98.0
6	MA5M18-5	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	98.0

표 33은 알코올 내성과 내산성이 우수한 균주를 대상으로 시퀀싱을 통해 동정한 결과 중 일부를 나타낸 표이다. 특별히 알코올 내성이 우수한 균주는 표에서 보는 바와 같이 *Saccharomyces* 속과 *Pichia* 속으로 동정되었다. 본 과제는 유산균 선발에 그 목적이 있으므로 효모로 동정된 균주는 추후 다른 과제 이용을 위해 초저온 냉동고에 장기 보존 하였다.

표 34. 주류용 유산균 선발

No.	Strains	Species	Homology (%)
1	MA1-3	<i>Lactobacillus</i> sp.	99.0
2	MA2-5	<i>Leuconostoc citreum</i>	95.0
3	YA6-17	<i>Lactobacillus sakei</i>	99.0

표 34는 알코올 내성과 내산성이 우수한 균주를 대상으로 시퀀싱을 통해 동정한 결과 중 목적하는 유산균으로 동정된 균주를 나타낸 표이다. MA1-3의 경우 알코올 내성과 내산성이 비교적 우수하였고, MA2-5는 알코올 내성이, YA6-17은 내산성이 특히 우수하였다.

### (시험 5) 선발 균주 동정 및 기탁

#### 가. 선발 균주의 유전학적·형태적·생화학적 분류 및 동정

16S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균주 동정을 위하여, 유니버설 프라이머(universal primer)로서 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')과 1492R(5'-TACGGATACCTTGT TACGACTT-3')을 이용하여 16S rRNA 유전자를 PCR로 증폭한 후, 전체 약 1.4Kbp 염기서열을 (주)마크로젠(Macrogen Inc., Korea)에 의뢰하여 해독하였다. 상기 16S rRNA 유전자의 염기서열은 NCBI 데이터베이스로부터 BLAST N 프로그램을 사용하여 표준 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들과 상동성을 비교하였다. 이때, 표준 균주와 함께, 16S rRNA 유전자의 염기서열과 높은 일치도를 보이는 균주들간의 상호 비교는 CLUSTAL W 프로그램 (Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTALW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680)을 사용하였다.

표 35. DJN59Y16-1의 생화학적 특성

Test <sup>1)</sup>	Reaction	Test	Reaction
Control	- <sup>2)</sup>	Aesculin	+
Glycerol	+	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Sucrose	+

Test <sup>1)</sup>	Reaction	Test	Reaction
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	+
β-Methylxyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Srarch	+
D-Fructose	+	Glycogen	+
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	+	β-Gentiobiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	+
Inositol	+	D-Tagatose	-
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamine	+	Gluconate	+
Amygdalin	+	2-Ketogluconate	-
Arbutin	+	5-Ketogluconate	+

<sup>1)</sup> Used with API 50CHB kit, <sup>2)</sup> + : Positive, - : Negative

청국장 종균인 DJN59Y16-1을 *Bacillus subtilis* AFY-2로 명명하고 특허균주 기탁을 위해 생화학적 동정을 실시하였다(표 35). 생화학적 검사는 API 50CHB kit (API bioMerieux Co.)을 이용하여 키트 시스템에 따라 조작하였고 판독하였다. 계통도 분석 결과, AFY-2 균주는 *B. subtilis*과 가장 가까운 근연관계로서, 16S rRNA 유전자 서열의 상동성은 99.0%이었다(그림 22). 따라서, 생화학 분석과 계통학적 분류를 고려하여 상기 AFY-2 균주를 *B. subtilis*로 최종 동정하였다.

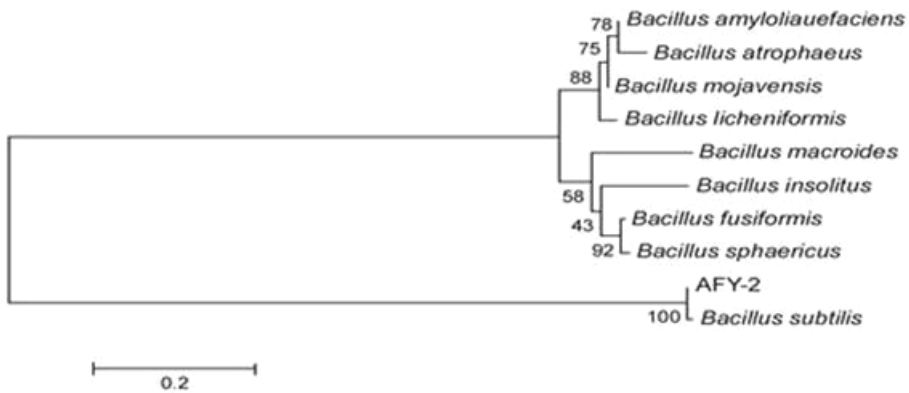


그림 22. AFY-2 16S rRNA sequences에 기반한 계통도

나. 선발 균주의 미생물 은행 기탁

내염성과 저온 적응성이 우수한 균주를 대상으로 한국미생물보존센터에 6점을 기탁하였고, 특히균주인 AFY-2는 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 기탁하였다. 16S rRNA sequences에 기반한 계통도는 그림 23-28로 나타내었다.

표 36. 균주 기탁 내역

Strains	Species	한국미생물보존센터 (KCCM기탁번호)
KCGW29M16-2	<i>Lactobacillus curvatus</i>	43119
JGW7M16-1	<i>Leuconostoc holzapfelii</i>	43120
KCGW29M16-8	<i>Lactobacillus curvatus</i>	43121
JGW3M16-7	<i>Lactobacillus sakei</i>	43122
KCGW23M16-43	<i>Weissella koreensis</i>	43123
KCGW23M16-48	<i>Weissella koreensis</i>	43124

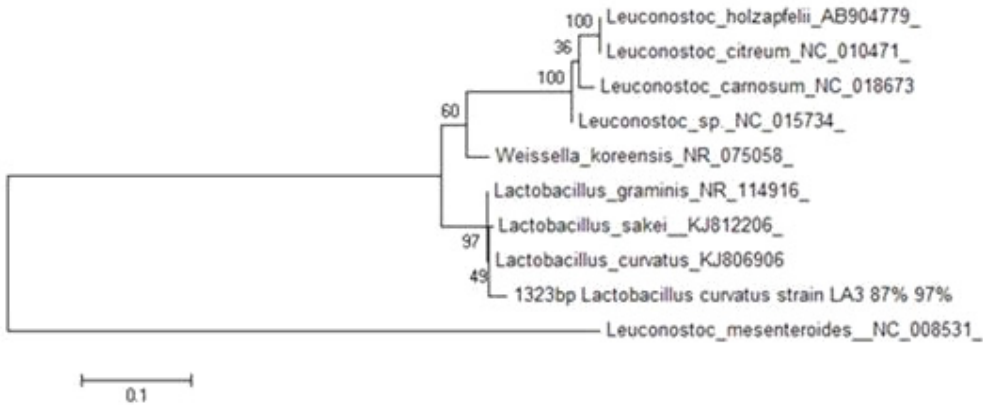


그림 23. KCGW29M16-2 16S rRNA sequences에 기반한 계통도

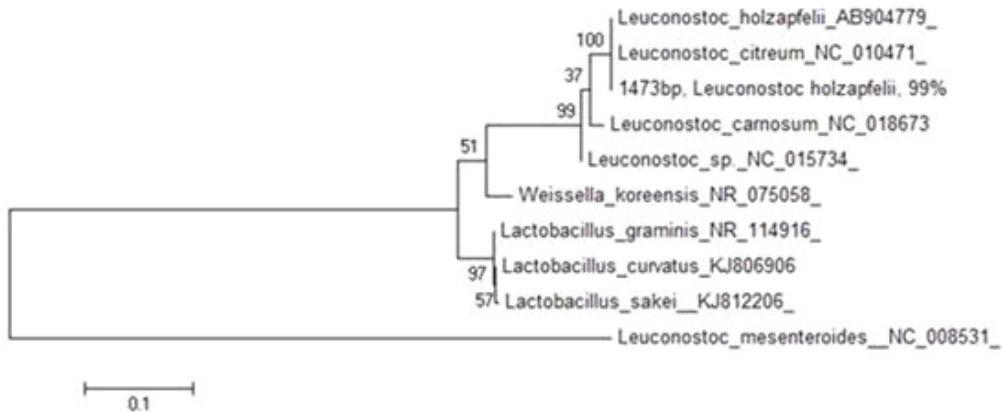


그림 24. JGW7M16-1 16S rRNA sequences에 기반한 계통도

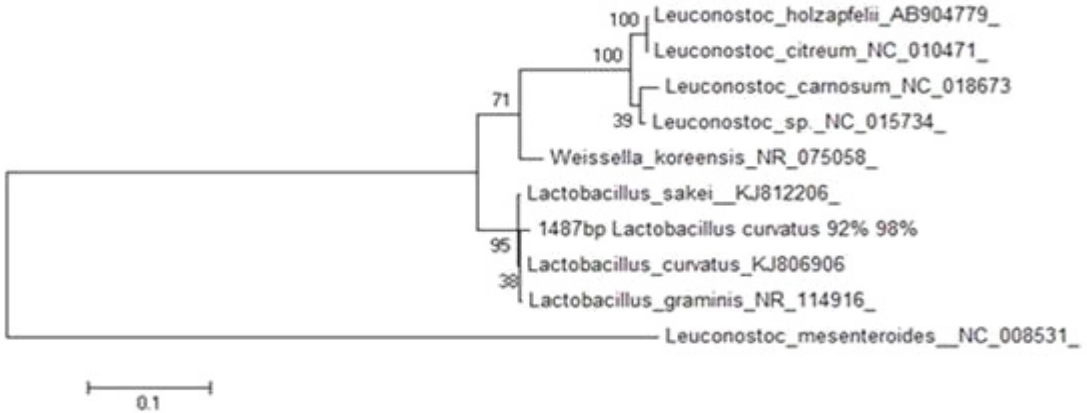


그림 25. KCGW29M16-8 16S rRNA sequences에 기반한 계통도

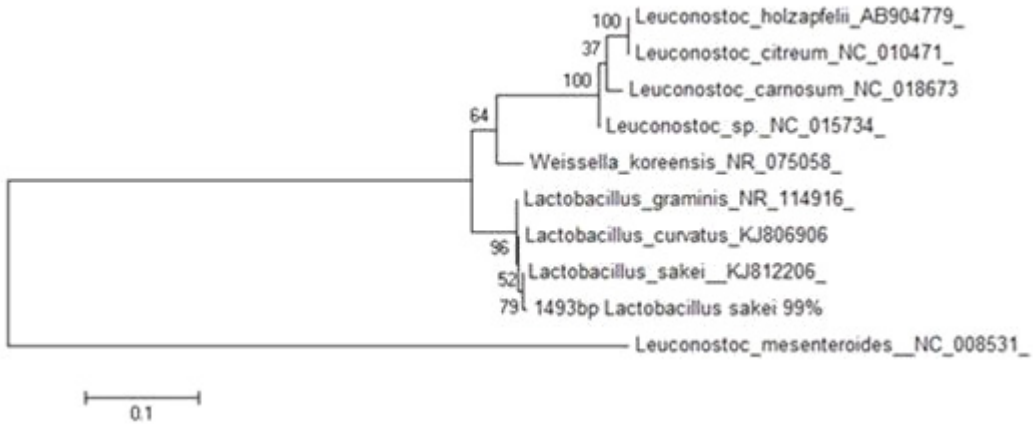


그림 26. JGW3M16-7 16S rRNA sequences에 기반한 계통도

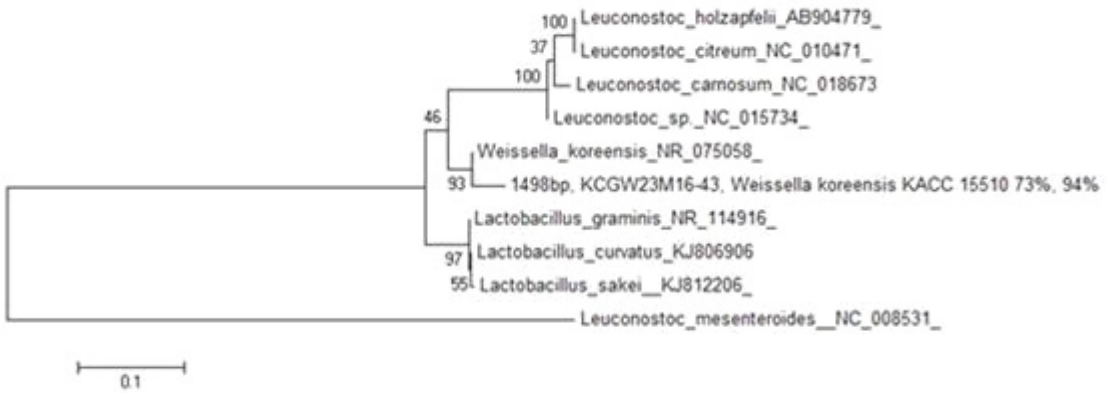


그림 27. KCGW23M16-43 16S rRNA sequences에 기반한 계통도

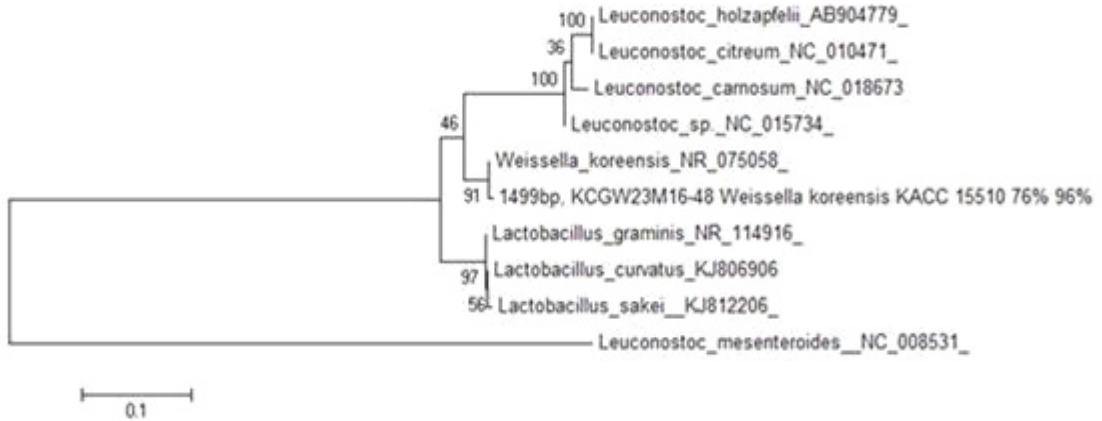


그림 28. KCGW23M16-48 16S rRNA sequences에 기반한 계통도

### (시험 6) 청국장 발효 선발 균주 실용화 기술 개발

#### 가. 기존 및 선발 균주 이용 청국장 제조 및 품질 특성 비교 조사

강일콩을 포함한 10개의 품종과 gws138, 140 계통을 이용하여 콩 품종에 따른 청국장 환원당 함량을 살펴보았다. 일반적으로 환원당 함량은 청국장 제조시 아밀라아제 같은 당화효소의 작용에 의해 당 함량이 높아지고, 그 후 종균에 의해 발효의 기질로 사용됨에 따라 감소하는 것으로 알려져 있다. 표 37과 같이 모든 품종에서 같은 경향을 나타내었다.

표 37. 종균 첨가 청국장 환원당 함량 (mg/ml)

시료명	24시간	48시간	72시간
강일	0.20±0.004	0.22±0.002	0.18±0.004
기찬	0.25±0.013	0.24±0.003	0.22±0.011
대원	0.27±0.011	0.31±0.003	0.24±0.011
대풍	0.23±0.007	0.24±0.002	0.22±0.005
대왕	0.20±0.002	0.22±0.003	0.17±0.003
태광	0.18±0.008	0.23±0.003	0.19±0.007
호반	0.25±0.017	0.34±0.001	0.26±0.008
햇살	0.17±0.026	0.22±0.001	0.16±0.024
흑청	0.17±0.002	0.16±0.002	0.13±0.004
청아	0.23±0.009	0.30±0.003	0.22±0.005
gws138	0.15±0.003	0.17±0.003	0.14±0.005
gws140	0.21±0.007	0.24±0.006	0.19±0.006

표 38. 종균 첨가 청국장 pH 검정

시료명	24시간	48시간
강일	7.08±0.04	7.12±0.01
기찬	6.78±0.06	7.00±0.02
대원	7.14±0.03	7.40±0.01
대왕	6.92±0.06	7.02±0.02
대풍	7.01±0.05	7.24±0.02
청아	7.28±0.07	7.47±0.02
태광	6.69±0.04	7.06±0.01
호반	7.20±0.02	7.51±0.01
햇살	6.75±0.01	7.04±0.00
흑청	7.09±0.04	7.06±0.01
gws138	6.76±0.06	7.15±0.02
gws140	7.04±0.01	6.98±0.00

발효정도의 지표로 활용되는 pH는 24시간에서 48시간까지 호반콩에서 크게 증가하여, 단기간 발효로는 호반콩이 가장 유리함을 알 수 있었다.

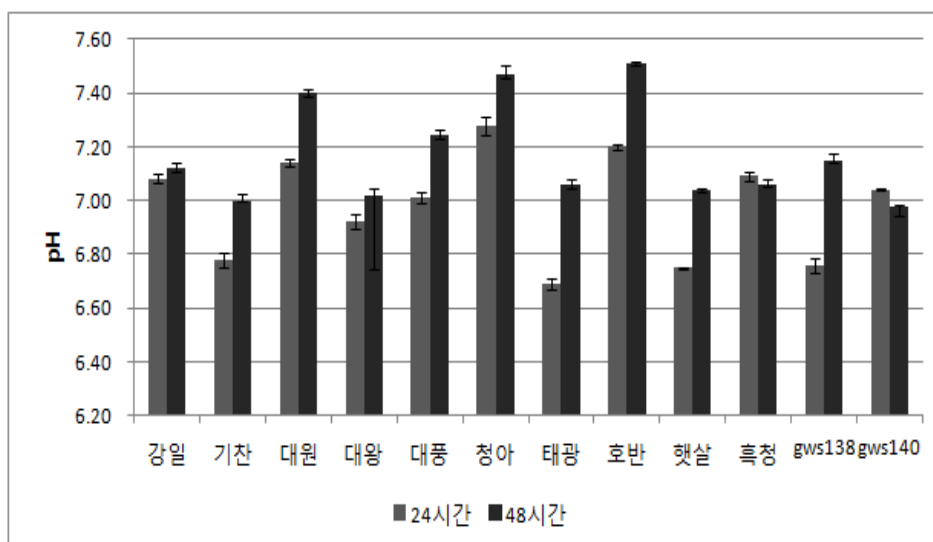


그림 29. 콩 품종 및 시간에 따른 pH 변화

표 39. 청국장 아미노태 질소 함량(mg%)

시료명	24시간	48시간
강일	499.90±0.62	610.83±0.22
기찬	412.83±0.63	474.62±0.34
대원	506.92±0.41	610.27±1.09
대왕	464.79±0.27	612.23±1.09
대풍	465.91±1.33	614.48±0.45
청아	518.99±0.15	566.45±1.04
태광	428.28±0.60	571.51±0.35
호반	408.62±0.29	533.60±0.38
햇살	429.69±0.85	606.61±0.92
흑청	533.60±0.42	469.00±0.65
gws138	415.64±1.48	551.85±0.81
gws140	516.75±0.28	550.45±0.56

청국장 품미의 척도인 아미노태 질소 함량은 48시간 기준으로 대풍, 대왕, 대원 순으로 우수함을 나타내었다.

#### 나. 포장용기 및 시제품 개발

포장용기 및 시제품은 '15년 상반기에 AFY-2 균주를 기술이전 한 평창의 (주)부일농산과 공동으로 개발하였다. 뚜껑의 지름이 75mm, 몸통 사이즈가 223\*56mm의 폴리카보네이트로 제작된 원통형 용기로 약 200g의 청국장을 담을 수 있는 용기이다. 다음은 개발된 포장용기와 용기에 붙일 스티커 도안이다.



찌개용 청국장

뚜껑 size : 75×75mm / 몸통 size : 223×56mm



그림 30. 찌개용 청국장 용기 및 포장라벨 시안

(시험 7) 종균 활용 청국장 품질 표준화 연구

가. 종균 제품의 안정적인 저장 기술 개발

발효정도, 풍미, 향 등 종합적으로 판단한 결과 상대적으로 우수한 청아콩과 대원콩을 대상으로 저장 온도 및 기간에 따른 청국장의 pH 및 PGA의 변화를 알아보았다.

표 40. 저장 온도 및 기간에 따른 청국장 pH의 변화

구분	pH			
	청아_처리 4℃	청아_처리 15℃	무처리 4℃	무처리 15℃
1일차	7.40±0.02	7.26±0.02	7.17±0.01	7.29±0.01
4일차	6.77±0.01	6.83±0.01	6.77±0.01	6.86±0.01
5일차	6.89±0.01	6.72±0.01	6.95±0.01	6.94±0.01
6일차	6.85±0.01	6.82±0.01	6.89±0.01	7.03±0.01
7일차	6.86±0.02	6.81±0.01	6.88±0.01	6.98±0.01

종균을 첨가하여 제조한 청국장과 그렇지 않은 청국장을 가지고 각각 저온인 4℃와 상온인 15℃에서 보관하면서 pH변화를 측정결과 처리구에서는 1일차에 7.4에서, 7일차에 6.86까지 0.54가 떨어졌고, 무처리에서는 0.29가 감소하였으나 처리구별로 큰 차이는 보이지 않았다(표 40).

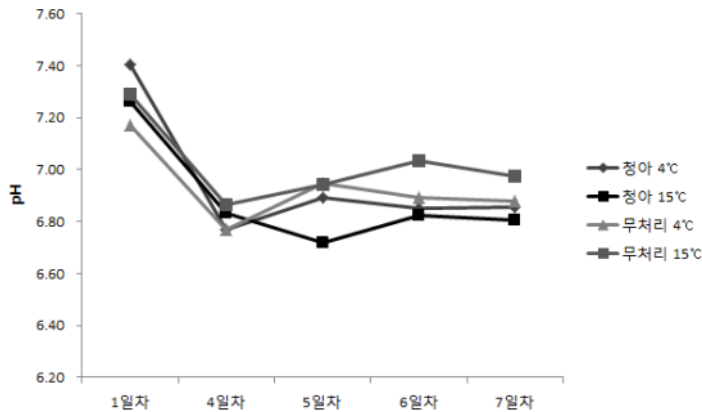


그림 31 저장온도에 따른 pH 변화

표 41. 저장 온도 및 기간에 따른 청국장 PGA의 변화

구분	PGA(cm)			
	대원_처리 4℃	대원_처리 15℃	무처리 4℃	무처리 15℃
1일차	20.33±0.58	22.67±0.58	8.67±0.58	16.67±0.58
4일차	15.33±0.58	9.67±0.58	4.67±0.58	1.33±0.58
5일차	14.67±0.58	4.67±0.58	4.67±0.58	1.33±0.58
6일차	7.33±0.58	3.33±0.58	3.67±0.58	1.33±0.58
7일차	7.29±0.58	3.67±0.58	1.67±0.58	1.00±0.00

종균을 첨가하여 제조한 청국장과 그렇지 않은 청국장을 가지고 각각 저온인 4℃와 상온인 15℃에서 보관하면서 PGA변화를 측정결과 4℃ 처리구에서 1일차에 20.33, 무처리구에서 8.67로 종균 첨가가 PGA 생성에 큰 영향을 미침을 확인하였고, PGA 유지를 위해 저온보관이 유리함을 확인 할 수 있었다(표 41).

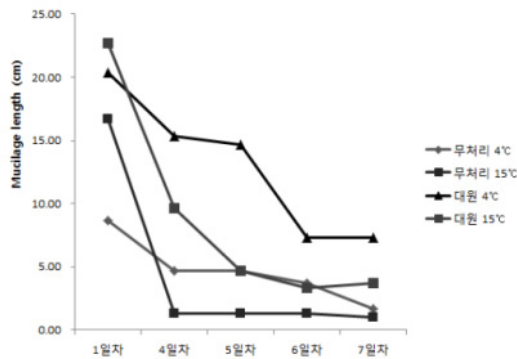


그림 32. 저장온도에 따른 PGA 변화

#### 나. 종균의 바이오제닉 아민 분해력 조사

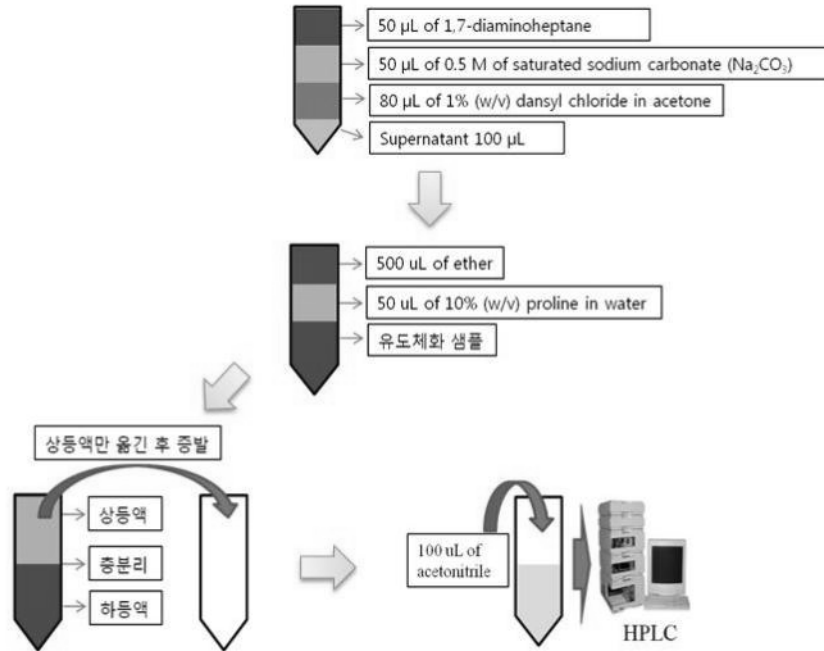
Test strain : *Bacillus subtilis* AFY-2 with Biogenic amines, Biogenic Amines 합성유전자가 없기 때문에 배양시간이 지날 수록 Biogenic Amines을 분해시킨다.

Positive control : *Bacillus subtilis* KACC 14394 with Biogenic amines, Biogenic Amines 합성유전자를 가지는 *Bacillus subtilis* KACC 14394 는 분해능이 없거나 오히려 배지에 포함되어 있는 soybean 성분에 의해 Biogenic Amines이 증가할 수도 있다.

Negative control : Tryptic Soy Broth with Biogenic amines, Biogenic Amines이 배양기간 중 온도나 배지성분에 의해 분해되지 않는다는 것을 확인하였다.

AFY-2균주와 *Bacillus subtilis* KACC 14394 균주 stock을 백금니로 tryptic soy agar에 streaking 하고 37℃에서 24시간 배양 후 single colony를 tryptic soy broth 5mL 에 접종한 후 37℃, 150rpm에서 24시간 배양 하고 PBS를 이용하여 OD가 0.4가 되게 맞춘다. Negative Control은 Histamine 15mg, Tyramine 15mg, Cadaverine 15mg을 EP 튜브(2ml)에 넣은 후 Tryptic Soy broth 1 mL을 넣어 Total Biogenic Amines 농도가 4.5% (w/v) 되도록 만들고 다시 15mL 튜브로 옮긴 뒤 37℃에서 48시간 동안 배양한다. AFY-2 균주는

Histamine 15mg, Tyramine 15mg, Cadaverine 15mg을 EP 튜브(2ml)에 넣고 Tryptic Soy broth 0.5mL과 AFY-2균주와 0.5mL을 넣어 Total Biogenic Amines 농도가 4.5% (w/v) 되도록 만들고 다시 15mL 튜브로 옮긴 뒤 37°C에서 48시간 동안 배양한다. HPLC 분석을 위한 샘플 전처리는 다음과 같이 처리하였다.



HPLC 분석조건은 Column : C18 (Capcellpak, 4.6mm × 250mm, 5µm), Injection Volume: 10 µL, Flow rate : 1mL/min, Mobile phase : 0.1% (v/v) formic acid in water (A), 0.1% (v/v) formic acid in acetonitrile (B), Gradient : 0-10min, A:B = 45:55; 11-15 min, A:B = 35:65; 16-25 min, A:B = 20:80; 26-30 min, A:B = 10:90, UV detector 254 nm를 사용하였다. LC 분석결과 BAs 생성 포지티브로 사용한 14394균주에서 BAs를 확인하였고, 배지와 BAs인 Histamine 15mg, Tyramine 15mg, Cadaverine 15mg을 첨가한 네가티브 컨트롤 역시 14394균주와 비슷한 양으로 검출됨을 확인 할 수 있었다. AFY-2의 어떤 대사산물이 BAs를 분해 시켰는지는 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다(표 42).

표 42. AFY-2의 BAs 분해력 평가

구분	RT(min)	Area
<i>B. subtilis</i> 14394(PC)	16.224	612,356
배지 + BAs(NC)	16.316	782,894
<i>B. subtilis</i> AFY-2	16.512	205,405

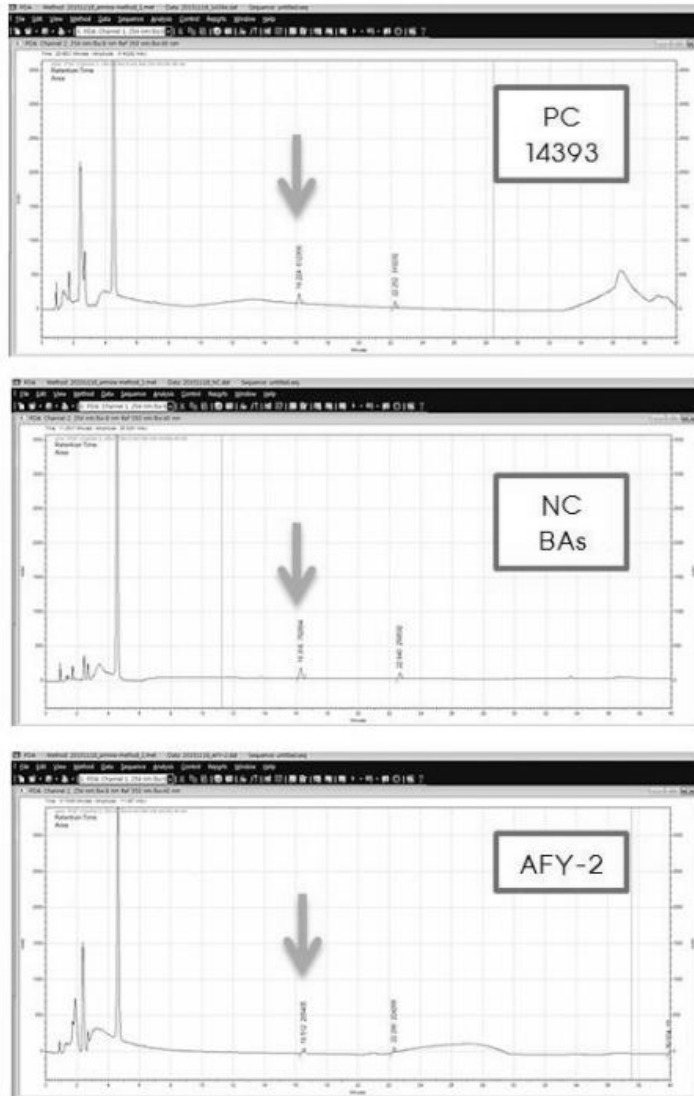


그림 33. AFY-2의 BAs 분해 활성 측정

## (시험 8) 종균 특성 유지 기술 개발

### 가. 계대배양에 따른 종균 특성 변화 검정

발효정도, 풍미, 향 등 종합적으로 판단한 결과 상대적으로 우수한 청아콩과 대원콩을 대상으로 종균의 계대배양(1세대~25세대)에 따른 종균의 특성과 종균을 이용한 청국장 제조시의 특성을 확인하였다. 계대배양은 NB배지를 이용하여 스트리킹을 한 후 2일간 배양한 것을 1세대로 정해서 25세대까지 반복적으로 배양하였다. 표 34에서 보듯이 아미노태 질소 함량은 품종별, 시간별로 뚜렷한 경향을 보이지 않았다.

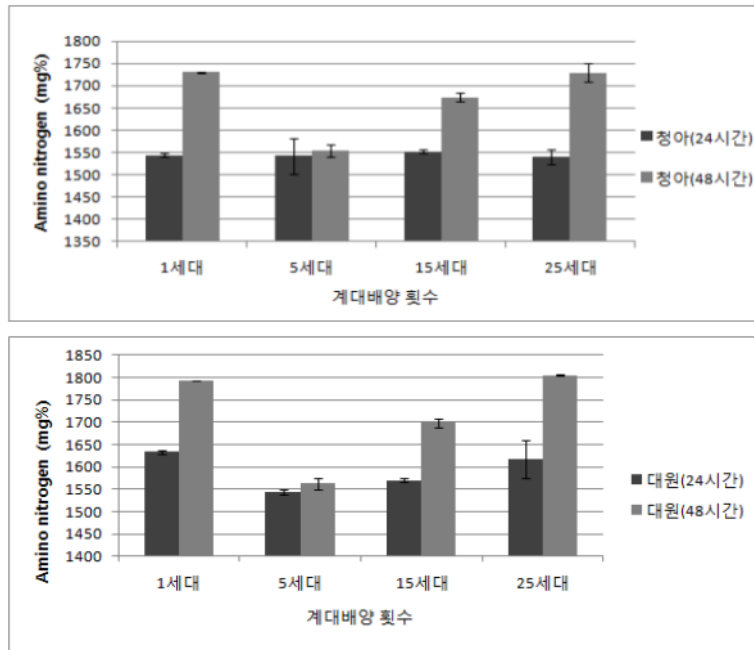


그림 34. 계대배양 횟수에 따른 청국장 아미노태 질소 함량

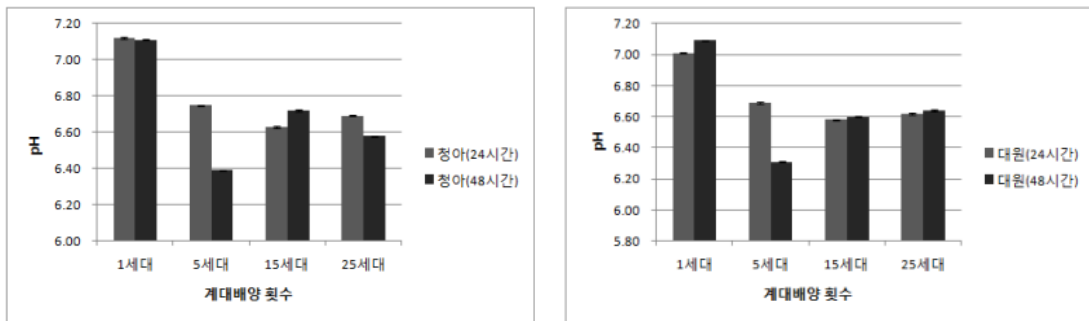


그림 35. 계대배양 횟수에 따른 청국장 pH 변화



그림 36. 1세대 AFY-2

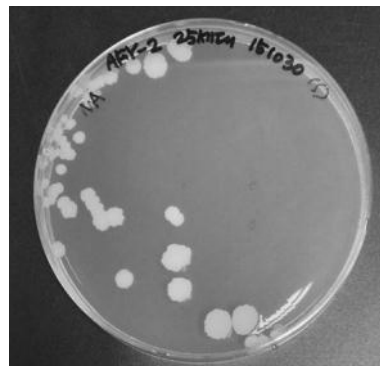


그림 37. 25대 AFY-2

표 43. 계대배양 횟수에 따른 청국장 PGA

시료명	1세대	5세대	15세대	25세대
청아(24시간)	32.8±1.92	11.0±1.00	8.8±1.10	9.6±1.14
대원(24시간)	47.4±1.67	10.0±1.00	11.0±1.22	3.0±1.58

청국장의 면역물질로 알려진 PGA 생성능의 경우도 표 43에서 알 수 있듯이 세대를 거듭할수록 균주의 노화에 비례적으로 생성량이 적어짐을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 AFY-2의 경우 세대를 거듭할수록 단백질 분해능은 유지하지만, PGA생성능과 혈전용해분해능은 감소함을 알 수 있었다.

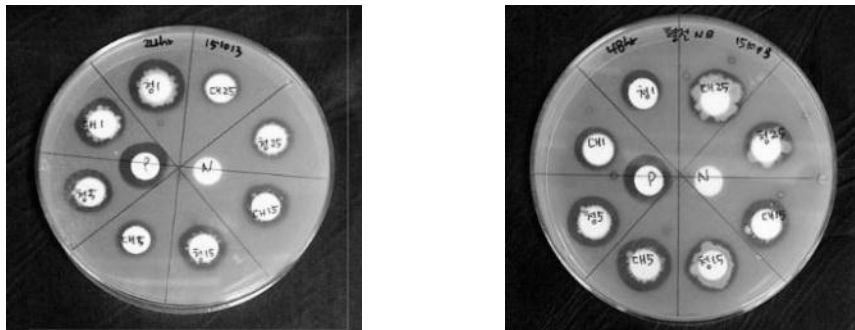


그림 37 세대별 혈전용해활성 검정

세대가 거듭될수록 청국장의 PGA생성능과 혈전용해분해능이 감소함에 따라 활성이 감소된 종균의 특성을 회복하기 위해서 *Micrococcus luteus* 혼합하여 경쟁배양을 실시하였다. 미생물간의 길항작용 원리를 응용하였고 선정된 균주는 비독성이면서 종균의 생육과 유사한 균주를 선정하였다. 선정된 *Micrococcus luteus*를 AFY-3균주와 1:1, 1(AFY-3):3, 1:10의 비율로 혼합하여 액체배양 후 공통적으로 자라는 NB배지에 분주하여 생육을 관찰하였다. 2일간 배양한 플레이트에서 AFY-2로 추정되면 콜로니를 picking하여 같은 배지에 액체배양 한 후 청국장 종균으로 활용하였다.

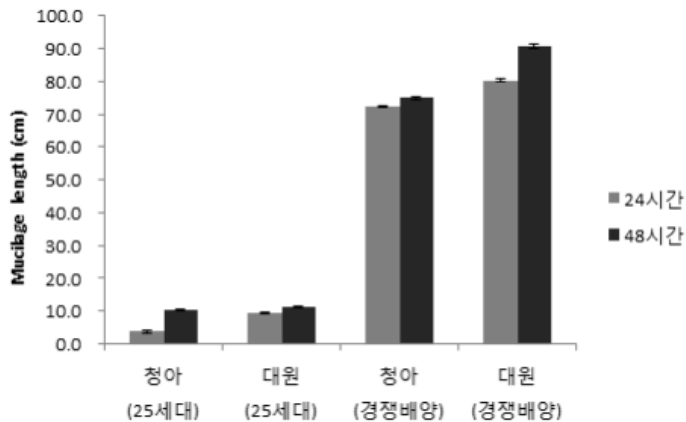


그림 38. 경쟁배양에 따른 종균의 PGA 생성능

그림 38과 같이 PGA 생성능의 경우 25세대 종균과 비교하여 경쟁배양을 통해 활성이 회복된 종균이 청아콩에서는 약 7배, 대원콩에서는 약 8.5배 증가함을 확인할 수 있었다. 아래 그림(39-41)은 25세대 동안 반복적으로 사용한 종균과 경쟁배양을 통해 재생한 종균의 PGA 생성능과 혈전용해활성을 비교한 그림이다. 혈전용해활성의 경우 청아콩에서는 약 3배, 대원콩에서는 약 2배의 활성 증가를 확인할 수 있었다.

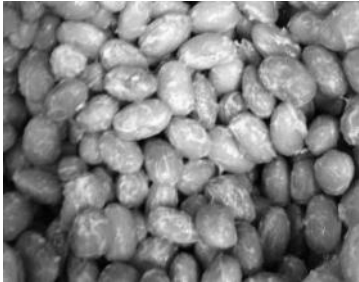


그림 39. 25세대 AFY-2

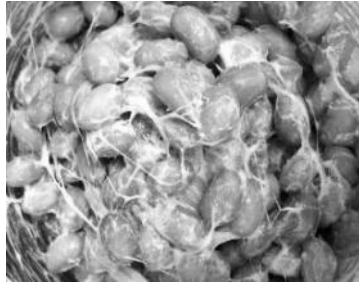


그림 40. 재생 AFY-2

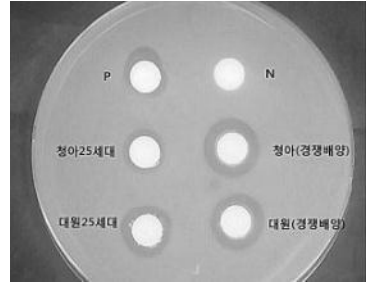


그림 41. 경쟁배양 후 혈전활성

하지만 재생 종균의 경우 pH나, 아미노태질소 생성능에서는 별다른 차이를 보이지 않아 종균이 분비하는 Intracellular와 Extracellular 대사물질의 차이와 재생종균과 노화종균과의 관계에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

나. 종균 특성 유지를 위한 장기 저장형 기술 개발

아포형(spore) 종균 제조 방법을 확립하기 위하여 포자형성 배지인 NBP 배지에 5일간 배양하여 spore를 생산토록 유도하였다. 원심분리를 통해 회수된 아포는 증류수로 세척한 후 다시 현탁하여 저온에서 1일간 저장 후 50℃에서 2일간 저장하여 아포의 생성 효율을 증가시켰다. 이후 비드를 첨가하여 강하게 교반하면서 표면에 남아있는 영양세포 및 잔사를 제거 중에 있다. 추후 데시케이터에 3일간 건조 시킨 후 비드로부터 아포를 회수하고 동결 건조를 수행하였다.



그림 42. Spore 형성(NBP배지)



그림 43. 고온처리(50℃)

## (시험 9) 현장적용을 위한 종균 최적 배양 조건 설정

가. 김치용, 주류용 종균 최적 배양 조건 설정

김치용으로 선발한 AFY-3과 주류용으로 선발한 YA6-17 유산균의 생육특성을 확인하기 위하여 생장곡선을 측정하였다.

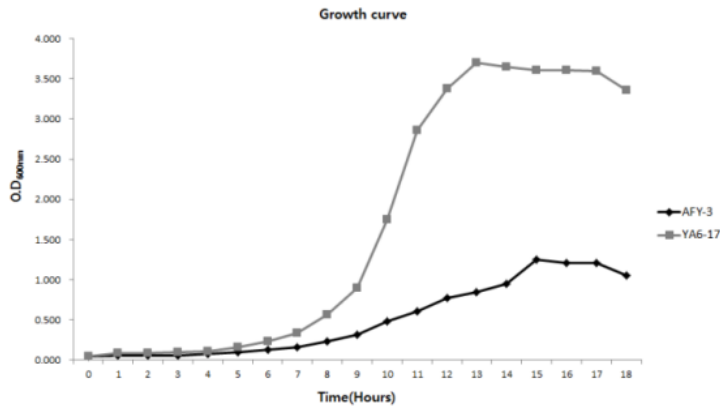


그림 44. 선발 종균 생육곡선

두 종균 모두 접종 후 4시간이 유도기였고 AFY-3은 15시간까지가 대수기 YA6-17은 13시간까지가 대수기였다. *Lactobacillus* sp. 인 YA6-17의 생육이 *Leuconostoc* sp. 인 AFY-3에 비해 더 우수하였다. 김치용으로 선발한 AFY-3과 주류용으로 선발한 YA6-17 유산균의 생육 특성을 확인하기 위하여 생장곡선을 측정하였다. 김치용 종균인 *Leu. mesenteroides* AFY-3 균주의 김치 제조시 적정 사용농도를 확인하기 위하여 동해에 위치한 (주)락천식품과 공동으로 추진하였다. 김치제조에 사용된 각 재료의 사용비율과 제조방법은 (주)락천식품의 제조방법을 일부 수정하여 사용하였다. 배추는 결구배추로서 겉잎을 제거하고 뿌리로부터 줄기로 2등분하고, 염도 15%의 소금물에서 16시간 동안 절임하였다. 소금물의 온도는 9~11℃로 유지하였다. 절인 배추는 세척통에 물이 흐르게 하여 2회의 자동 세척과 1회의 수동세척을 실시하고 4시간 동안 자연 탈수하여 최종염도가 1.7~1.9%가 되도록 절임 배추를 준비하였다. 김치소는 찹쌀풀, 생강, 마늘, 멸치액젓, 새우젓을 혼합하여 준비하였으며, 솔치, 다시마, 표고버섯으로 우려낸 육수에 균주를 전체 김치 중량에 대해 0.5, 1.0, 2.0(% w/v) 농도로 접종하였다. 무는 채를 썰어 고춧가루와 함께 버무리고 미리 배합한 양념과 혼합하였다. 과와 갓은 물로 세척한 후 2~4cm 크기로 잘라 넣었다. 대조구로서 스타터를 첨가하지 않은 김치를 제조하였다. 배추를 포함한 모든 부재료는 국내산을 이용하였다. 총산도, pH 및 미생물 군집 분석에 사용할 김치는 채취의 용이성과 균일성을 위해 발효 용기 중앙에 공간을 만들어 두고 이 곳에 고인 김치 국물을 잘 저어 균질화 한 후 시료를 10ml 씩 회수하여 사용하였다.

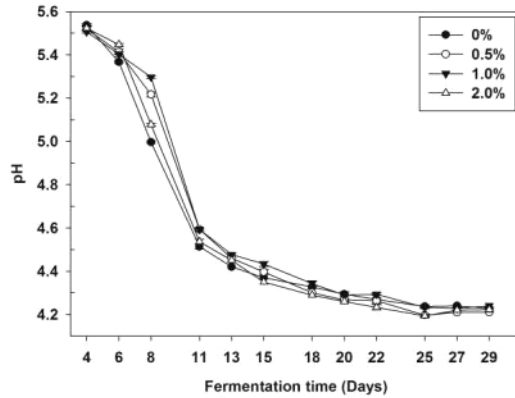


그림 45. AFY-3 접종 농도에 따른 김치의 pH 변화

김치의 pH는 pH meter (Starter 3100, Ohaus, Parsippany, NJ, USA)를 사용하여 측정하였고, 액체시료에 0.1N의 NaOH용액을 첨가하여 pH 8.2로 중화 적정하고 젖산 함량(%)을 계산하여 총산을 측정하였다. *L. mesenteroides* AFY-3 균주를 스타터로 사용한 김치발효 과정에서 pH 및 총산 함량에 대한 변화를 조사하였다(그림 45, 46). 전반적으로 발효 초기의 pH는 약 5.5로 동일하다가 발효 개시 8일 이후 급격하게 감소하였고 11일 이후에는 완만히 감소하는 경향을 보이다가 20일 이후에 4.2를 유지하였다(그림 45). 특히 발효 개시 후 8일째까지 대조구 김치의 pH가 급격히 감소한 것은 AFY-3 균주가 중기 발효 주요 유산균인 *Lactobacillus*속 젖산균의 성장을 억제했으리라 추정된다.

한편, 숙성시간에 따른 총산도의 변화는 제조 후 8일까지는 산도 0.5% 이하로 미숙기, 8~18일은 적숙기, 18일 이후에는 산도가 1%를 초과하여 김치 발효가 과숙기에 접어든 것으로 판단되었다(그림 46). 모든 처리구에서 비슷한 양상을 보였으며 앞서 pH에서와 같이 8일째부터 급격히 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 적숙기부터 젖산균들이 활발히 생육하여 다량의 젖산을 생성했기 때문인 것으로 추정되었다.

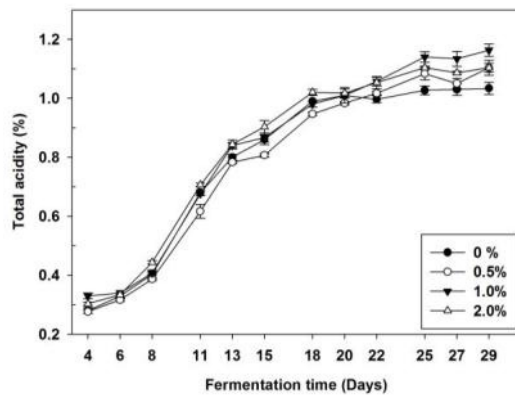


그림 46. AFY-3 접종 농도에 따른 김치의 총산 변화

김치 조직의 견고성 측정을 위하여 배추 잎 중 외각 줄기 중 가운데 부위를 선별하여 크기가 약 폭 5cm, 두께 5mm인 시료를 채취하였다. 김치의 견고성은 경도계(Brookfield, Middleboro, MA, USA)를 이용하여 최대압력 10kg, 1.50mm/sec로 총 5회 반복하여 측정하였다. 김치 조직의 견고성은 발효 개시 후 13일에 대조구 김치에서 1.86이었던 것이 27일째에는 1.61로 감소한 반면, *Leu. Mesenteroides* AFY-3을 김치양념 대비 2.0% 농도로 접종한 김치의 경우 2.06에서 2.08로 상대적으로 거의 변화가 없었다(그림 47). 김치의 연화에 관여하는 미생물로는 주로 곰팡이, 산막효모 등이 알려져 있으며, 젖산균에 대한 보고는 아직 알려진 바가 없으므로 젖산균들도 균주에 따라 김치의 연화에 관여하는지의 여부를 파악하기 위한 추가 연구가 필요하리라 생각된다.

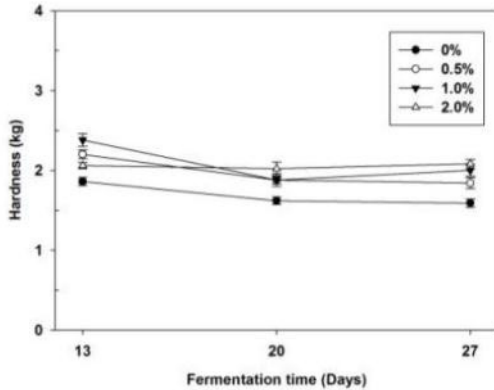


그림 47. AFY-3 접종 농도에 따른 김치의 경도 변화

총균수는 aerobic count petrifilm(3M, Paul, MN, USA)에 1mL의 액체시료와 9mL의 멸균 증류수를 혼합하여 분주한 후, 35°C에서 24시간 배양하여 붉은색 집락만을 계수하였다. 대장균과 대장균군은 각각 *E. coli* count petrifilm(3M)과 coliform count petrifilm(3M)을 사용하여 1mL의 액체시료와 9mL의 증류수를 혼합하여 분주한 후, 35°C에서 24시간 배양하여 CO<sub>2</sub> 가스가 발생한 붉은색 집락을 계수하였다. 스타터에 의한 미생물 군집의 영향은 총균수에서 김치 발효가 증가됨에 따라 초기에는 큰 폭으로 증가하다가 산도가 급격히 증가하는 적숙기에 접어들면서 균체성장 증가폭이 감소하였다(그림 48). 이와 같은 결과를 바탕으로 2015년 11월에 (주)락천식품에 김치용 종균 AFY-3을 유상기술이전 하였다.

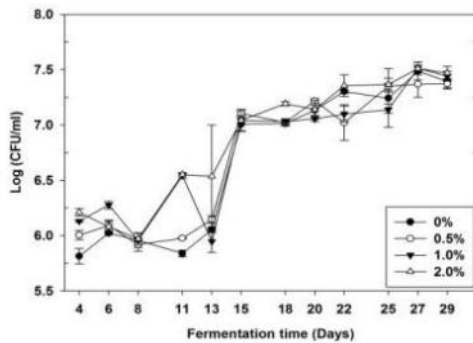


그림 48. AFY-3 접종 농도에 따른 김치의 총균수 변화

## 4. 적 요

### <제2세부과제 : 발효식품(청국장, 김치, 주류) 제조용 세균 선발 및 자원 풀 구축>

- 가. 종균 선발을 위한 발효식품 자원은 장류, 김치류를 포함하여 총 89점을 수집하였고, 수집된 자원으로부터 젓산균 739점, 고초균 833점, 효모 227점을 분리하였다. 분리된 균주의 효소활성검정 결과  $\alpha$ -amylase 93점, Protease 137점, Lipase 279, Fibrinolytic enzyme 196점의 활성을 확인하였다.
- 나. 활성이 우수한 균주를 대상으로 동정을 실시하여, 청국장 제조용 고초균인 AFY-2와 김치 제조용 유산균인 AFY-3을 최종 선발하였다. AFY-2는 비독성 균주로 청국장의 풍미와 PGA 함량이 우수한 것이 특징이고, AFY-3은 내염성 및 저온생육이 우수하여 김치 맛 개선 및 아삭한 식감을 높여주는 것이 특징이다.
- 다. 개발된 종균은 실용화를 위해 평창의 부일농산과 동해의 (주)락천식품에 각각 유상기술이전을 실시하였다.

## 5. 인용문헌

- Anghong, P., Watthanasurorot, A., Klinbunga, S., Ruangdej, U., Soderhall, I., & Jiravanichpaisal, P. (2010). Cloning and characterization of a melanization inhibition protein (PmMIP) of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol*, 29(3), 464-468.
- Baek, J. G., Shim, S. M., Kwon, D. Y., Choi, H. K., Lee, C. H., & Kim, Y. S. (2010). Metabolite profiling of Cheonggukjang, a fermented soybean paste, inoculated with various *Bacillus* strains during fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 74(9), 1860-1868.
- Brunati, M., Perucca, S., Han, L., Cattaneo, A., Consolato, F., Andolfo, A., Rampoldi, L. (2015). The serine protease hepsin mediates urinary secretion and polymerisation of Zona Pellucida domain protein uromodulin. *Elife*, 4.
- Choi, H., Kim, Y. W., Hwang, I., Kim, J., & Yoon, S. (2012). Evaluation of *Leuconostoc citreum* HO12 and *Weissella koreensis* HO20 isolated from kimchi as a starter culture for whole wheat sourdough. *Food Chem*, 134(4), 2208-2216.
- Gonzalez, A., Gomez, B. L., Restrepo, A., Hamilton, A. J., & Cano, L. E. (2005). Recognition of extracellular matrix proteins by *Paracoccidioides brasiliensis* yeast cells. *Med Mycol*, 43(7), 637-645.
- Haider, M. A., Pakshirajan, K., Singh, A., & Chaudhry, S. (2008). Artificial neural network-genetic algorithm approach to optimize media constituents for enhancing lipase production by a soil microorganism. *Appl Biochem Biotechnol*, 144(3), 225-235.
- Jo, S. Y., Choi, E. A., Lee, J. J., & Chang, H. C. (2015). Characterization of starter

- kimchi fermented with *Leuconostoc kimchii* GJ2 and its cholesterol-lowering effects in rats fed a high-fat and high-cholesterol diet. *J Sci Food Agric*, 95(13), 2750–2756.
- Jung, J. Y., Lee, S. H., Lee, H. J., Seo, H. Y., Park, W. S., & Jeon, C. O. (2012). Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *Int J Food Microbiol*, 153(3), 378–387.
- Jung, Y. J., & Choi, M. J. (2015). Effects of *Rubus coreanus*-Cheonggukjang on Bone Mineral Density and Bone Mineral Content in Growing Rats. *Prev Nutr Food Sci*, 20(4), 260–265.
- Kar, M. K., Ray, L., & Chattopadhyay, P. (1996). Isolation and identification of alkaline thermophilic lipase producing microorganism and some properties of crude enzyme. *Indian J Exp Biol*, 34(6), 535–538.
- Kim, J., Choi, J. N., John, K. M., Kusano, M., Oikawa, A., Saito, K., & Lee, C. H. (2012). GC-TOF-MS- and CE-TOF-MS-based metabolic profiling of cheonggukjang (fast-fermented bean paste) during fermentation and its correlation with metabolic pathways. *J Agric Food Chem*, 60(38), 9746–9753.
- Lee, J. Y., Kim, C. J., & Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Sci*, 72(3), 437–445.
- Lee, K. H., Song, J. L., Park, E. S., Ju, J., Kim, H. Y., & Park, K. Y. (2015). Anti-Obesity Effects of Starter Fermented Kimchi on 3T3-L1 Adipocytes. *Prev Nutr Food Sci*, 20(4), 298–302.
- Lee, M. E., Jang, J. Y., Lee, J. H., Park, H. W., Choi, H. J., & Kim, T. W. (2015). Starter cultures for kimchi fermentation. *J Microbiol Biotechnol*, 25(5), 559–568.
- Park, J. A., Tirupathi Pichiah, P. B., Yu, J. J., Oh, S. H., Daily, J. W., 3rd, & Cha, Y. S. (2012). Anti-obesity effect of kimchi fermented with *Weissella koreensis* OK1-6 as starter in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice. *J Appl Microbiol*, 113(6), 1507–1516.
- Pascon, R. C., Bergamo, R. F., Spinelli, R. X., de Souza, E. D., Assis, D. M., Juliano, L., & Vallim, M. A. (2011). Amylolytic microorganism from sao paulo zoo composting: isolation, identification, and amylase production. *Enzyme Res*, 2011, 679624.
- Ranasinghe, S. L., Fischer, K., Zhang, W., Gobert, G. N., & McManus, D. P. (2015). Cloning and Characterization of Two Potent Kunitz Type Protease Inhibitors from *Echinococcus granulosus*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(12), e0004268.
- Soh, J. R., Shin, D. H., Kwon, D. Y., & Cha, Y. S. (2008). Effect of Cheonggukjang supplementation upon hepatic acyl-CoA synthase, carnitine palmitoyltransferase

I, acyl-CoA oxidase and uncoupling protein 2 mRNA levels in C57BL/6J mice fed with high fat diet. *Genes Nutr*, 2(4), 365–369.

Souza, Cd, Faria, Y. V., Sant'Anna Lde, O., Viana, V. G., Seabra, S. H., Souza, M. C., Mattos-Guaraldi, A. L. (2015). Biofilm production by multiresistant *Corynebacterium striatum* associated with nosocomial outbreak. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 110(2), 242–248.

Sung, J. H., Ahn, S. J., Kim, N. Y., Jeong, S. K., Kim, J. K., Chung, J. K., & Lee, H. H. (2010). Purification, molecular cloning, and biochemical characterization of subtilisin JB1 from a newly isolated *Bacillus subtilis* JB1. *Appl Biochem Biotechnol*, 162(3), 900–911.

Thakur, K., Tomar, S. K., & De, S. (2015). Lactic acid bacteria as a cell factory for riboflavin production. *Microb Biotechnol*.

Toshimitsu, T., Mochizuki, J., Ikegami, S., & Itou, H. (2016). Identification of a *Lactobacillus plantarum* strain that ameliorates chronic inflammation and metabolic disorders in obese and type 2 diabetic mice. *J Dairy Sci*, 99(2), 933–946.

Wade, D., Palma, M., Lofving-Arvholm, I., Sallberg, M., Silberring, J., & Flock, J. I. (1998). Identification of functional domains in Efb, a fibrinogen binding protein of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 248(3), 690–695.

Zhao, Y., Yu, X., Jia, R., Yang, R., Rui, Q., & Wang, D. (2015). Lactic Acid Bacteria Protects *Caenorhabditis elegans* from Toxicity of Graphene Oxide by Maintaining Normal Intestinal Permeability under different Genetic Backgrounds. *Sci Rep*, 5, 17233.

## 6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2013(1년)	학술발표	청국장으로부터 분리한 <i>Bacillus</i> 속 미생물의 biogenic amin 및 독소 유전자의 확인
	학술발표	고활성 균주 첨가 육류구이용 발효소스의 연육효과
	학술발표	Characteristics of the extracellular enzyme producing microorganisms isolated from traditional Gangwon soybean fermented products
	특허출원	혈전분해효소 활성을 갖는 효모 생균제 및 그의 제조방법
	기술이전	생균제 제조용 균주 제공
	생물자원	<i>Bacillus subtilis</i> AFY2 16S rRNA의 6건

연도(연차)	활용구분	제 목
2014(2년)	논문게재	전통장류로부터 혈전용해 활성이 우수한 효모균주의 분리
	학술발표	A Monitoring for the distribution of microorganisms in fermented Doenjang by differences in climate
	학술발표	Selection of biogenic amin-reducing microorganisms from a traditional fast fermented soybean paste, Cheonggukjang
	균주기탁	Lactobacillus curvatus KCGW29M16-2외 5건
	홍 보	김치용 종균 개발
	특허출원	비독성 신규 바실러스 서브틸리스 균주 및 이를 이용하는 발효시킨 장류
2015(3년)	학술발표	Screening of useful starter for manufacturing Cheonggukjang and Inspection characteristics of Cheonggukjang based on Soybean Cultivars
	학술발표	Effect of Leuconostoc mesenteroides AFY-3 Starter Concentration on the Microbial Communities and Physicochemical Properties during Kimchi Fermentation
	학술발표	강원전통막장의 초기 숙성에 관여하는 미생물 군집 분석
	홍 보	농식품 신기술 설명회 및 기술이전
	특허출원	내염성 및 저온생육이 우수한 류코노스톡 메센테로이드 균주 및 이를 포함하는 김치
	기술이전	내염성 및 저온생육이 우수한 류코노스톡 메센테로이드 김치용 종균 제공(유상)
기술이전	비독성 신규 바실러스 서브틸리스 균주 제공(유상)	

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
					'13	'14	'15
과제책임자	국립농업과학원	농업연구사	백성열	과제 총괄	○	○	○
2세부책임자	농식품연구소	농업연구관	김상수	세부주관 수행	-	-	○
공동연구자	농식품연구소	농업연구사	이재형	시험수행 및 평가	○	○	○
	농식품연구소	농업연구관	허남기	특성평가 지원	-	○	○
	농식품연구소	농업연구사	권혜정	특성평가 지원	-	○	○
	농식품연구소	농업연구사	이하연	평가분석 지원	-	○	○
	농식품연구소	연구원	김주영	시험수행	○	○	○