

어젠다코드	2 - 6 - 2		구분	전반기 (계속)	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S04	작목구분코드	MC-01-MC14
과제종류	기관고유		세부사업(약어)	-	
과제명	발효식품 유용미생물 자원 발굴 및 보존연구				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	이재형		농업연구사	강원도원 농식품연구소	
연구기간	2016~ 2020		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급			농식품연구소	이재형	'16~'20
2) 발효식품용 종균 소재 선발			농식품연구소	이하연	'17~'20
색인용어	발효식품, 미생물, 유전자원				

## I. 연구목적

- 다양한 발효식품을 수집, 유용 미생물을 분리·보존, 기능성 탐색 등을 통하여 기술이전 업체에 지속적인 균주 보급 및 새로운 종균 소재를 개발하고자 함

## II. 2017년도 추진목표 대비 당해연도 목표 달성도

추진목표	달성내용	달성도
<b>&lt;제1세부과제 : 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급&gt;</b> ○ 발효미생물 은행 구축 ○ 종균 실용화 및 보급	[결과활용 : 유상기술이전 2/0] ○ 유상기술이전 2건 ○ 종균보급	100%
<b>&lt;제2세부과제 : 발효식품용 종균 소재 선발&gt;</b> ○ 빵 제조용 발효종 선발 ○ 종균 제조 공정 개선	[결과활용 : 사업화실적 1/0] ○ 사업화	100%

## III. 주요 연구내용 및 결과요약

### 1. 연구내용

#### <제1세부과제 : 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급>

##### (시험1) 발효미생물 은행 구축

- 가. 수집내역 : 김치류, 장류, 전통주 등 발효식품
- 나. 수집지역 : 전국(도서지역 중심)
- 다. 연구내용 : 균주 분리 및 동정
  - 세균, 효모 중심으로 희석도말법 이용
  - 16S · 18S rRNA, API 생리특성, SEM 촬영 등

**(시험2) 종균 실용화 및 보급**

- 가. 시험재료 : AFY-2, AFY-3
- 나. 보급업체 : 유상기술이전 업체 3개소
- 다. 보급내용 : 수시로 종균 제공
  - 청국장 제조 종균 1종
  - 김치 제조용 종균 1종

**<제2세부과제 : 발효식품용 종균 소재 개발>**

**(시험1) 빵 제조용 발효종 선발**

- 가. 시험재료 : 천연발효종(건포도, 복숭아 등)
- 나. 선발내역 : 효모 1종, 유산균 1종
- 다. 연구내용 : 균주 분리 및 동정
  - 세균, 효모 중심으로 희석도말법 활용
  - 16S rRNA, API 생리특성, SEM 촬영 등

**(시험2) 종균 제조 공정 개선**

- 가. 시험재료 : 고초균 AFY-2
- 나. 연구내용
  - 아포형 종균 제조 배지 제조
  - 아포형 종균 특성 검정

**2. 연구결과 요약**

**<제1세부과제 : 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급>**

**가. 발효식품 자원 수집 목록**

표 1. 발효식품자원 수집목록('16-'17)

구분	연번	품목	분리원 정보 (수집식품명)	분리원 제공처	분리원 주소
1	JG44	명란젓	오마니명란젓	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길
2	JG45	창란젓	오마니창란젓		
3	JG46	명태회	오마니명태회		
4	JG47	오징어젓	오마니오징어젓		
5	JG48	낙지젓	오마니낙지젓		
6	JG49	해수명란	오마니해수명란		
7	JG50	명게젓	오마니명게젓		
8	JG51	가자미식해	오마니가자미식해		
9	KJ27	고추장	바다소리 별미레	(주) 선해수산	경기도 광주시 39-12(태전동)
10	KJ28	고추장	고추장(잔멸치)		
11	KJ29	고추장	고추장(중하새우)		
12	KJ30	고추장	고추장(황태채)		
13	GJ28	간장	홍계소스맛장	홍일식품	부산광역시 기장군
14	GJ29	간장	홍계맛장소스폴드		

15	GJ30	간장	찍어먹는 홍게소스	일광면 일광로 61-6
16	JG52	액젓	홍게액젓	
17	DJ45	된장	재래식홍게맛된장	
18	GJ31	간장	전주심청집간장	심청청국장  전주시 태평3길 84 중앙시장
19	DJ46	된장	2012년 전주심청된장	
20	DJ47	된장	2013년 전주심청된장	
21	DJ48	된장	2014년 전주심청된장	
22	DJ49	된장	2015년 전주심청된장	
23	DJ50	된장	2016년 전주심청된장	
24	DJ51	된장	2017년 전주심청된장	
25	KJ31	고추장	2014년 전주심청 고추장	
26	KJ32	고추장	2015년 전주심청고추장	
27	KJ33	고추장	2016년 전주심청고추장	
28	KJ34	고추장	2017년 전주심청고추장	
29	CJJ17	청국장	전주심청청국장	

### 나. 발효미생물 분리·동정 내역

표 2. 분리 미생물 동정('17)

구분	균주명	동정결과	상동성(%)	비고
1	MBE/L 1672	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
2	MBE/L 1409	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
3	MBE/L 1389	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
4	MBE/L 1380	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
5	MBE/L 1699	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
6	MBE/L 1666	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
7	MBE/L 1627	<i>Saccharomyces servazzii</i>	99	효모
8	MBE/L 1683	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
9	MBE/L 1397	<i>Saccharomyces servazzii</i>	99	
10	MBE/L 1671	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
11	MBE/L 1383	<i>Saccharomyces servazzii</i>	99	
12	MBE/L 1400	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
13	MBE/L 1405	<i>Kazachstania servazzii</i>	99	
14	KCGW34N16-5	<i>Bacillus aryabhatai</i>	96	
15	KCGW34N16-6	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	97	
16	KCGW34N16-7	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	96	
17	KCGW34N16-8	<i>Bacillus acidicer</i>	98	
18	KCGW34N16-9	<i>Bacillus amyloliquefacien</i>	97	
19	SPORE AFY-2	<i>Bacillus subtilis</i>	99	고초균
20	CCN25Y16-1	<i>Bacillus subtilis</i>	97	
21	CCN25Y16-2	<i>Bacillus subtilis</i>	97	
22	CCN25Y16-5	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97	
23	CCN25Y16-6	<i>Bacillus sp.</i>	97	
24	CCN25Y16-7	<i>Bacillus sp.</i>	97	
25	CCN27Y16-4	<i>Bacillus sp.</i>	98	
26	M23Y16-6	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	96	
27	M24Y16-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98	고초균
28	M24Y16-3	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99	
29	M24Y16-1	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	99	

30	M25Y16-8	<i>Bacillus subtilis</i>	99	
31	sKAY16-1	<i>Bacillus sp.</i>	90	
32	sKAY16-3	<i>Bacillus subtilis</i>	97	
33	sKAY16-4	<i>Bacillus subtilis</i>	98	
34	sKAY16-5	<i>Bacillus subtilis</i>	93	
35	sKAY16-6	<i>Bacillus tequilensis</i>	96	
36	sKAY16-7	<i>Bacillus subtilis</i>	96	
37	sKAY16-8	<i>Bacillus tequilensis</i>	99	
38	sKAY16-9	<i>Bacillus licheniformis</i>	90	
39	sKAY16-11	<i>Bacillus subtilis</i>	98	
40	sKAY16-12	<i>Bacillus subtilis</i>	96	
41	JGW6T16-1	<i>Leuconostoc citreum</i>	97	
42	JGW7T16-1	<i>Leuconostoc citreum</i>	95	
43	JGW7T16-2	<i>Leuconostoc citreum</i>	96	
44	JGW7T16-3	<i>Leuconostoc citreum</i>	95	
45	JGW8T16-1	<i>Leuconostoc citreum</i>	96	
46	JGW8T16-2	<i>Leuconostoc citreum</i>	95	
47	JGW8T16-3	<i>Leuconostoc citreum</i>	97	
48	KCGW34M16-3	<i>Leuconostoc lactis</i>	99	
49	KCGW34M16-4	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>	94	
50	KCGW34M16-6	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98	
51	KCGW35M16-10	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	96	유산균
52	KCGW35M16-11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	
53	KCGW35M16-12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98	
54	KCGW35M16-13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	91	
55	KCGW35M16-14	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97	
56	KCGW35M16-15	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	
57	KCGW35M16-16	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	94	
58	KCGW35M16-17	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97	
59	KCGW35M16-18	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	90	
60	KCGW35M16-2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99	

- 증류주용 효모 분리를 위해 YEPC, YM 등 효모 선택배지를 활용하여 분리하고 ITS, 18S rRNA 유전자 분석을 통해 균주 동정 결과 주로 *Saccharomyces servazzii*와 *Kazachstania servazzii* 종으로 확인 되었음. 고초균은 주로 서브틸리스와 리케니 포니스 종으로 확인되었고, 유산균은 씨트리엄 종과 메센테로이드 종으로 확인 되었음

#### 다. 종균 배양 및 보급 내역

- 3차년도 부터는 종균을 OEM으로 생산하여 일괄적으로 대량으로 보급 예정

표 3. AFY-3 분양내역

번호	분양 업체	분양균주	분양 날짜
1			2017/02
2			2017/03
3			2017/04
4	락천김치	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AFY-3	2017/06
5			2017/08
6			2017/09
7			2017/10
8			2017/03
9	(주)미소왕	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	2017/05
10			2017/08
11			2017/10

<제2세부과제 : 발효식품용 종균 소재 개발>

가. 빵 제조용 발효종 선발

- 복숭아 액종 및 도우 제조

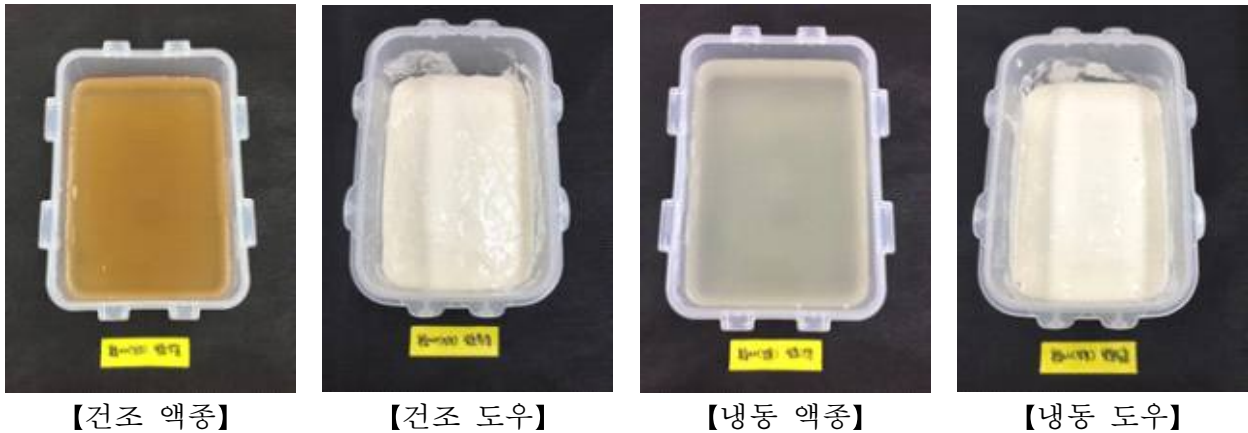


그림 1. 복숭아 액종 및 도우 제조

- 액종 제조는 각각의 복숭아(건조, 냉동) 50g에 물 600g, 설탕 20g을 혼합하여 잘 녹인 후 액종을 체에 거르고 사용하였음. 도우는 액종 50g에 강력분 100g과 물 100g을 혼합하여 25℃에서 보관하면서 발효시킨 후 도우가 부풀어진 액종을 선별하여 효모 및 유산균 분리에 이용하였음

나. 발효종의 분리 및 동정

- 청향 포도를 액종(FG17Y)으로 활용한 처리구에서는 식품미생물로 활용이 불가능한 *Pichia* sp. *Meyerozyma* sp. 속이 분리 되었고 건조 복숭아를 액종(FP17Y)으로 활용한 처리구에서 *Saccharomyces cerevisiae* 종이 확인되었음. 유산균으로 추정되는 균주는 고초균으로 확인되었음

표 4. 발효 액종 동정 내역

구분	균주명	동정결과	상동성(%)	Accession No.
1	FG17Y-1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99	KR336835.1
2	FG17Y-2	<i>Pichia guilliermondi</i>	99	DQ821711.1
3	FG17Y-3	<i>Meyerozyma guilliermondi</i>	99	KR063216.1
4	FG17Y-4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99	KX791421.1
5	FP17Y-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KU350743.1
6	FP17Y-2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KU350743.1
7	FP17Y-3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KU535607.1
8	FP17Y-4	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99	KU535607.1
9	FG17M-1	<i>Bacillus subtilis</i>	99	EU096316.1

다. 아포형 종균의 제조 및 확인

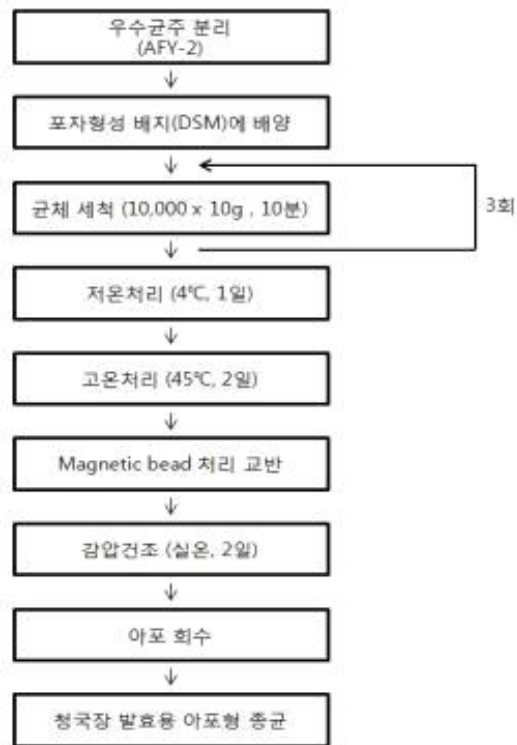


그림 2. AFY-2 아포형 제조 모식도

- 포자형성 배지에 저온 및 고온처리를 하여 마그네틱 비드로 회수. 배양기간까지 포함하여 약 10일 소요

```

AFY-2      95 CTGCCTGT AAGACTGGGATA AACTCCGGGAAACC GGGGCTAATA ACCGGAT 143
SporeAFY-2 100 CTGCCTGT AAGACTGGGATA AACTCCGGGAAACC GGGGCTAATA ACCGGAT 148

AFY-2      144 GGT TGTCTGA ACCGCATGGTTCAGACATA AAAAGGTGGCTTCGGCTACCA 192
SporeAFY-2 149 GGT TGTCTGA ACCGCATGGTTCAGACATA AAAAGGTGGCTTCGGCTACCA 197

AFY-2      193 CTTACAGATGG ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC 241
SporeAFY-2 198 CTTACAGATGG ACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC 246

AFY-2      242 ACCAAGGCGA CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTG 290
SporeAFY-2 247 ACCAAGGCGA CGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGCCACACTG 295

AFY-2      291 GGACTGAGACACGG CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT 339
SporeAFY-2 296 GGACTGAGACACGG CCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCT 344

AFY-2      340 TCCGCAATGG ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGGAGTGATGAAG 388
SporeAFY-2 345 TCCGCAATGG ACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGTGGAGTGATGAAG 393

AFY-2      389 GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAAGAACAAAGTCCCGTTCA 437
SporeAFY-2 394 GTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAAGAACAAAGTCCCGTTCA 442

AFY-2      438 AATAGGGCGG CACC TTGACGGTACCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTA 486
SporeAFY-2 443 AATAGGGCGG CACC TTGACGGTACCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTA 491

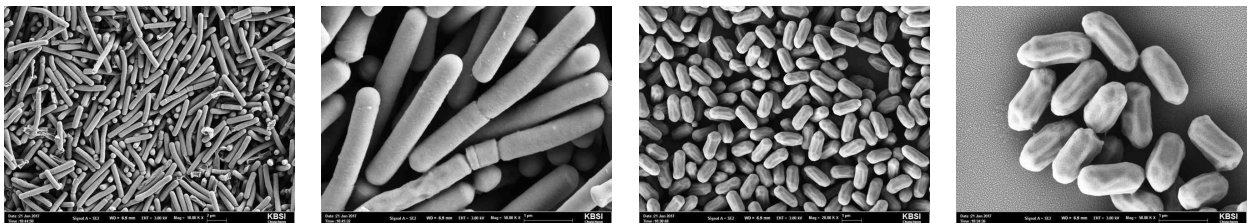
AFY-2      487 CGTGCCAGCA GCCCGCGGTAATACGTAGG TGGCAAGCGTTGTCCGGAAAT 535
SporeAFY-2 492 CGTGCCAGCA GCCCGCGGTAATACGTAGG TGGCAAGCGTTGTCCGGAAAT 540

AFY-2      536 ATTGGGCGTA AAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGC 584
SporeAFY-2 541 ATTGGGCGTA AAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGC 589

```

그림 3. 영양형과 아포형의 18S rRNA alignment

- 아포형 종균의 18S 시퀀싱 분석결과 영양형과 100% 일치하였음



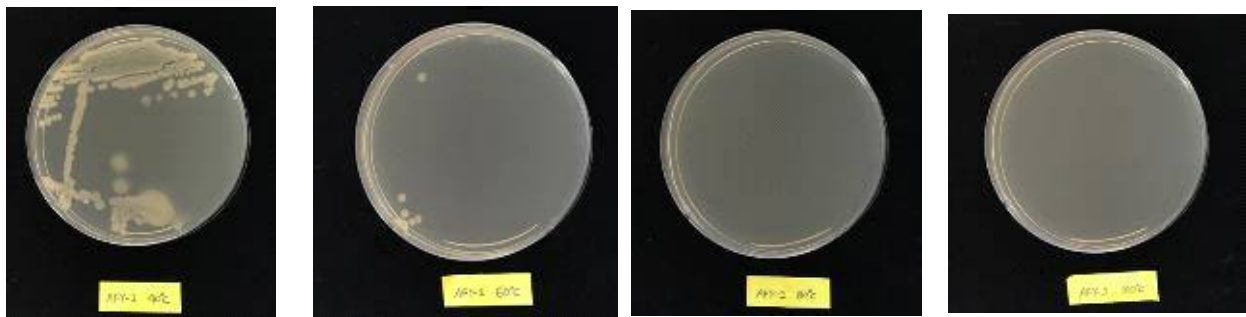
【영양형】

【아포형】

그림 4. AFY-2 균주의 영양형 및 아포형 SEM 촬영 사진

- SEM 촬영 결과 영양형은 막대형태의 간균형이며, 아포형은 둥근 구균형태에 가까움

라. 아포형 종균의 내산성, 내열성 검정



【40℃】

【60℃】

【80℃】

【100℃】

그림 5. 영양형 내열성 검정



【40℃】

【60℃】

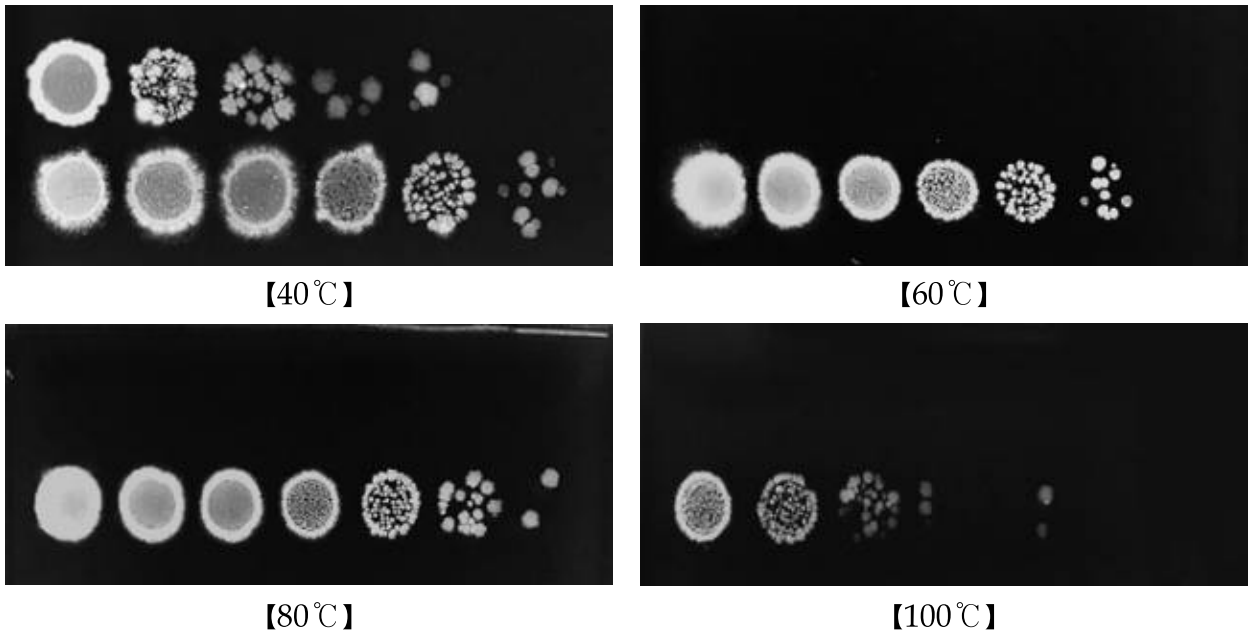
【80℃】

【100℃】

그림 6. 아포형 내열성 검정

- 아포형의 내열성 검정을 위해 30℃~100℃ 까지 10℃ 간격으로 측정하였음. 아포형 종균을 각각의 온도에서 5 분 동안 정치 후 배지에 스트리킹으로 확인하였음. 그림 5, 6과 같이 영양형은 60℃부터 생육이 불량하였으나, 아포형은 100℃까지 생육이 왕성하였음

#### 마. 아포형 종균의 Spotting Assay



【40℃】

【60℃】

【80℃】

【100℃】

그림 7. 내열성 Spotting Assay  
(위: 영양형 AFY-2, 아래: 아포형 AFY-2)

- 아포형 종균의 내열성 점적 어세이는 플레이트 결과과 비슷하게 영양형은 60℃ 부터 생육이 불량했으며, 아포형은 100℃ 까지 왕성한 생육을 보여주었음. 따라서 아포형 종균을 이용했을 때 청국장을 찌개로 이용했을 시 종균의 사멸로 인한 실활 문제를 어느 정도 방지하리라 생각됨

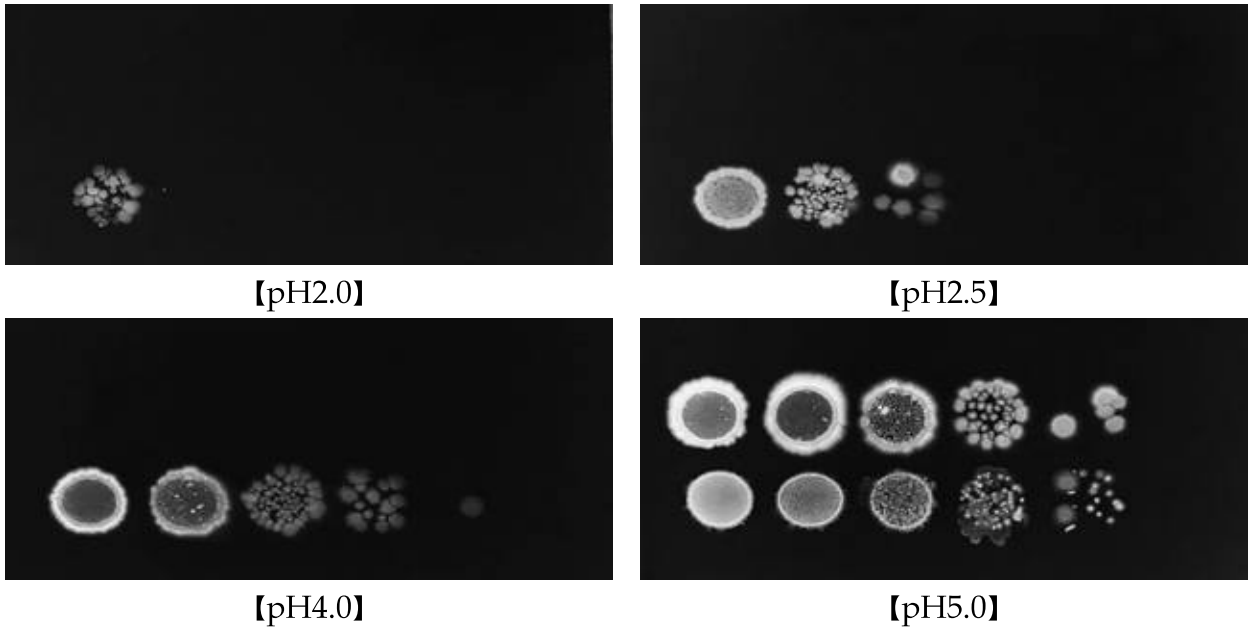


그림 7. 내산성 Spotting Assay  
(위: 영양형 AFY-2, 아래: 아포형 AFY-2)

- 내산성 검정결과 pH 2.0부터 아포형 종균의 생육을 확인 할 수 있었고, 인체의 위산이 pH 1.5~2.5 사이인 점을 감안할 때 아포형 종균을 이용했을 때 위산으로부터 종균의 사멸을 방지하리라 판단됨

### 3. 적 요

#### <제1세부과제 : 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급>

##### (시험1) 발효미생물 은행 구축

- 가. 수집한 발효식품으로부터 총 60점의 미생물을 분리하였으며, 효모(13점), 고초균(27점), 유산균(20점)으로 동정하였음
- 나. 효모는 *Saccharomyces servazzii*와 *Kazachstania servazzii* 종으로 확인 되었음. 고초균은 주로 서브틸리스와 리케니포니스 종으로 확인되었고, 유산균은 씨트리엄 종과 메센테로이드 종으로 확인되었음

##### (시험2) 종균 실용화 및 보급

- 가. 김치유산균인 *Leuconostoc mesenteroides* AFY-3은 동해 락천김치에 청국장 고초균인 *Bacillus subtilis* AFY-2은 봉화 미소왕에 유상기술이전하여 보급하였음

#### <제2세부과제 : 발효식품용 종균 소재 개발>

##### (시험1) 빵 제조용 발효종 선발

- 가. 청향 포도를 액종(FG17Y)으로 활용한 처리구에서는 식품미생물로 활용이 불가능한 *Pichia* sp. *Meyerozyma* sp. 속이 분리 되었고 건조 복숭아를 액종(FP17Y)으로

활용한 처리구에서 *Saccharomyces cerevisiae* 종이 확인되었음. 유산균으로 추정되는 균주는 고초균으로 확인되었음

**(시험2) 종균 제조 공정 개선**

- 가. 아포형 종균과 영양형 종균의 내열성을 비교 검정한 결과, 양형은 60℃부터 생육이 불량하였으나, 아포형은 100℃까지 생육이 왕성한 것을 확인하여 청국장을 찌개로 이용했을 시 종균의 사멸로 인한 실활 문제를 어느 정도 방지하리라 생각됨
- 나. 내산성 검정결과 pH 2.0부터 아포형 종균의 생육을 확인하여 인체의 위산이 pH1.5~2.5 사이인 점을 감안할 때 아포형 종균을 이용했을 때 위산으로부터 종균의 사멸을 방지하리라 판단됨

**IV. 연구결과 활용**

연도(연차)	활용구분	제목
2017(2년)	기술이전	유상기술이전(평창 부일농산)
	기술이전	유상기술이전(동해 락천식품)
	사업화	평창 부일농산, 봉화 발효마을 사업매출 5,150만원

**V. 기대 및 파급효과**

- 유용 미생물의 분리·동정 및 기능성 입증을 통한 유전자원 확보
- 발효미생물을 소재를 기반으로 한 신규 산업분야 창출