

어젠다코드	1 - 2 - 7		구분	완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	S04	작목구분코드	MC-01-MC04
과제종류	기관고유		과제번호	LP002995	
과제명	발효식품 유용 미생물 자원 발굴 및 보존연구				
과제책임자	성명		직급	소속기관 및 부서	
	이하연		농업연구사	강원도원 농식품연구소	
연구기간	2016 ~ 2020		참여연구기관	-	
세부과제명			부서	세부책임자	연구기간
1) 발효미생물 은행 구축 및 종균보급			농식품연구소	이하연	'16~'20
2) 발효식품용 종균 소재 선별			농식품연구소	임재길	'17~'20
색인용어	발효식품, 종균, 유전자원				

## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate what types of useful starter are produced by strains isolated from Korean fermented foods. Although it is a source technology that can facilitate the development of starters for traditional food microorganisms that are easy to overlook among items in the food industry, the information on the current traditional food microorganism is only basic information on the secured strains. Since information on characteristics is not linked, more than 90% of starters used in food manufacturing depend on imports. Accordingly, it was attempted to develop a starter that is systematically used in food manufacturing by securing information on microorganisms by collecting various fermented foods, separating and preserving useful microorganisms, and searching for functionality. It was intended to continuously manage and supply strains to companies through the development and technology transfer of starters such as kimchi, paste, yeast and lactic acid bacteria that can be used in the fields of liquor or bakery, which have high industrial value for use in the industry. Total 6,978 of food microorganisms (Lactic acid bacteria, 258 isolates, Acetic acid 108 isolates, Yeast 133 isolates) were isolated from Korea traditional fermented food in order to select useful starter. Cheonggukjang manufacturing technology was transferred to 31 companies as it was selected as a pilot project of Cheonggukjang manufacturing technology in 2018. Theory and practice on the manufacturing method were conducted, and on-site consulting was also conducted.

## 1 연구목표

식품 산업의 품목 중 간과하기 쉬운 전통식품 미생물의 스타터 개발을 용이하게 해줄 수 있는 원천 기술임에도 불구하고 현재 전통식품 미생물에 관한 정보는 확보된 균주에 대한 기본적인 정보만이 구축되어 있을 뿐 기능적, 유전적 특성에 관한 정보가 연계되어 있지 않아 식품제조에 이용하는 스타터의

90%이상이 수입에 의존하고 있는 실정이다. 이에 다양한 발효식품을 수집, 유용 미생물을 분리·보존, 기능성 탐색 등을 통하여 미생물에 관한 정보를 확보하여 체계적으로 식품제조에 이용하는 스타터 개발을 하고자 하였다. 종균의 산업적 이용가치가 높은 김치, 장류, 술이나 제빵 분야에서 이용할 수 있는 효모와 유산균 등의 스타터 개발 및 기술이전을 통해 업체에 지속적인 균주 관리 및 보급을 하고자 하였다.

## 2 재료 및 방법

### 〈제1세부과제: 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급〉

#### (시험 1) 발효미생물 은행 구축

발효미생물 은행 구축을 위한 분리원 수집을 위하여, 전통 발효식품인 장류 284점(44%), 절임류 71(11), 식초류 66(10), 주류 57(9)를 지역적으로 강원 285점(59.1%), 전북 35(7.3), 경기 33(6.8)에서 수집하였다.

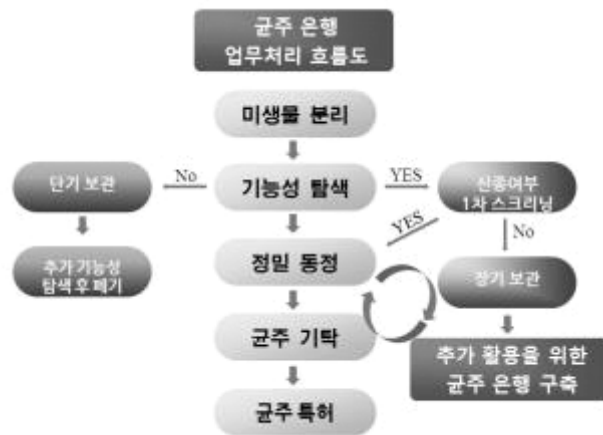


그림 1. 균주 은행 업무처리 흐름도

유산균은 10진 단계 희석 샘플을 Bromophenol Blue (이하 BPB라 함)를 0.02% 함유한 MRS 배지에 100  $\mu$ l 분주 후, 화염 멸균한 삼각스틱을 이용해 배지에 도말한 후 2~3일 후에 암청색 콜로니들을 계수한 후, 모양과 색등의 외형적으로 다른 콜로니를 1백금이 따서 BPB-MRS 배지에 다음과 같이 순수 분리를 한후 저장한다.

효모는 10진 단계 희석한 샘플을 10% Tartaric acid를 이용해 pH 3.5로 맞춘 YMA (Yeast Mannitol Agar)에 100  $\mu$ l분주 후, 화염 멸균한 삼각스틱을 이용해 배지에 도말한 후 30°C에서 2~3일 배양후에 집락 콜로니들을 카운트한 후, 모양과 색등의 외형적으로 다른 콜로니를 1백금이 따서 순수분리한 다음 저장한다.

고초균은 10진 단계 희석한 샘플을 염산과 수산화나트륨 용액을 이용해 pH 6.8로 맞춘 NBA

(Nutrient Broth Agar)에 100  $\mu$ l를 분주후, 화염 멸균한 삼각스틱을 이용해 배지에 도말한 후 30°C에서 2~3일 배양후에 집락 콜로니들을 카운트 한후 모양과 색등의 외형적으로 다른 콜로니를 1백금이 따서 순수분리를 한 후 저장한다.

유용균주 동정 및 저장은 일반적으로 미생물의 동정법은 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 기초로 하여 세균의 경우 Bergey's manual의 분류 및 기준을 따르는 것이 일반적이며, 곰팡이와 효모는 Introduction to food-borne fungi의 방법을 사용하기도 한다.

미생물의 저장 보존(세포현탁액의 동결보존, -70°C)은 정상기에 달한 배양 세포를 멸균된 수개의 소형 원심관에 80%(0.8ml)를 넣은 후 여기에 20% Glycerol을 가하여 잘 혼합한 후 상층을 봉합하여 -70°C로 유지되는 초저온냉동고에 보관한다.

미생물 동정 세균류는 16S rRNA, 효모는 18S rRNA 부위의 염기서열을 분석하여 미생물을 동정한 다. 형태학적 분석 UHR-SEM(Ultra high resolution-scanning electron microscope) 촬영을 위한 전처리 과정으로 고체배지 위에 세포를 고정시키기 위하여 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2-7.4)로 제조한 glutaraldehyde 용액으로 3시간 고정시킨 후, 0.1 M sodium phosphate buffer로 2회 세척 후, 1% osmium tetroxide 용액으로 30분간 최종 고정한다. 50~100% 농도 구배 알코올로 각각 단계적으로 5분씩 탈수시킨 후에 100% hexamethyldisilazane으로 완전히 탈수시키고 건조한다.

전처리한 샘플은 SEM S2500C(Hitachi, Japan)을 이용하여 관찰한다. 생화학적 특성 분석 그람음성균은 API(Analytical Profile Index) 20E kit(BioMerieux, France), 효모는 API 20C AUX kit, 유산균은 API 50CH kit를 이용하여 탄소원 이용능 등을 분석하였다.

## (시험 2) 종균 실용화를 위한 보급

특허종균 *Bacillus subtilis* AFY-2, *Leuconostoc mesenteroides* AFY-3, *Acetobacter pasteurianus* AFY-4를 이용하여 청국장, 김치, 식초를 제조하는 방법에 대한 기술이전을 실시하였다. 2018년 청국장 제조기술 시범사업으로 선정되어 3년에 걸쳐 31개 업체, 지역별로 경기 5, 강원 6, 충북 7, 충남 6, 전북 2, 전남 4, 경남 2곳에 *Bacillus subtilis* AFY-2을 이용하여 청국장 제조방법에 대한 이론·실습 실시하였고 현장컨설팅도 실시하였다.

## <제2세부과제: 발효식품용 종균 소재 개발>

### (시험 1) 빵 제조용 발효종 선발

빵 제조용 액종 제조는 각각의 복숭아(건조, 냉동) 50g에 물 600g, 설탕 20g을 혼합하여 잘 녹인 후 액종을 체에 거르고 사용하였음. 도우는 액종 50g에 강력분 100g과 물100g을 혼합하여 25°C에서 보관하면서 발효시킨 후 도우가 부풀어진 액종을 선별하여 효모 및 유산균 분리에 이용하였다.

Protease 활성은 효소액 1 ml를 시험관에 취하고 미리 30°C로 예열시킨 0.6% casein용액 5 ml를 가하여 잘 흔든 후 정확히 10분간 항온수조 내에서 반응 시킨다. 곧 0.44 M trichloroacetic acid 5ml를 넣어서 흔들고 반응을 중지시킨다. 다시 항온수조 내에 약 30분간 방치한다. 침전의 생성이 완료되면 시험관위에 소형(직경 3 cm정도)의 깔 때기를 씌우고 경질여지(를 사용하여 여과한다. 여액 2ml를 시험관에 취하여 0.55M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>용액 5 ml와 Folin 시약(시약을 증류수로 3배 묽게 한 것) 1 ml를 넣

어서 혼든 후 30℃에서 30분간 방치한다. 이 액에 대하여 660nm의 파장에서 흡광도(O.D.)를 측정한다.

별도의 실험으로 L-tyrosine을 여러 가지의 농도로 용해시킨 용액에 대하여 같은 방법에 의한 측정을 행하고, 여기에서 작성한 표준곡선 으로부터 앞에 기술한 실험에 의하여 얻어진 측정치에 대한 tyrosine량을 계산한다. 이것을 E $\mu$ g으로 한다. 대조로서 효소액 1 ml에 0.44 M trichloroacetic acid 5ml를 가한다. 여기에 0.6% casein 용액 5ml를 가한 것에 대하여 같은 방법으로 측정된 tyrosine량을 B $\mu$ g으로 한다.

### (시험 2) 종균 제조 공정 개선

내열성과 내산성을 높은 아포형 종균을 생산하기 위하여 포자형성 배지(DSM)에 저온(4℃) 및 고온처리(45℃)를 하여 마그네틱 비드로 회수하였고, 감압건조(실온, 2일)하여 아포를 회수 배양기간까지 포함하여 약 10일이 소요되었다.

AFY-2 균주 이용 가이드라인을 설정하기 위하여 찐 콩에 AFY-2 종균 분말을 접종할 때, 종균 활성화 시간을 달리하여 생청국을 제조하여 진의 생성 등을 비교하였다.

### (시험 3) 생청국용 발효적성 우수 콩 품종

생청국 제조시 가장 많이 사용되는 소립종(풍산나물)과 대립종(대원, 청아), 유색콩(흑청, 약선)을 이용하여 생청국을 제조하여 품질 특성을 비교하였다.

### (시험 4) 혼합배양을 통한 발효종 제조조건 확립

3차년도에 선발한 발효종(효모, 유산균)을 이용하여 혼합배양을 통한 제빵 적성을 비교 평가하였다.

빵의 조직감은 시료 10g을 물성측정기(Texture analyzer, model CT3-10k, Brookfield, Middleboro, USA)에서 직경 4cm, 높이 1cm의 cell에 넣어 full-cap method 방법을 이용하여 10회 반복 측정한다. 측정조건은 plunger diameter 25mm를 이용하여 crosshead speed 10mm/sec로 시료를 60% compression 한다. 조직감은 hardness(경도), adhesiveness(부착성), springiness(탄력성), cohesiveness(응집성), chewiness(씹힘성)를 측정한다.

인장강도는 반죽을 3cm길이로 잘라 Rheometer(compac-100 II, sun scientific Co., Jtd, Tokyo, Japan)의 Tensil ring에 감아 반죽을 늘였다가 끊어졌을 때의 힘으로 3회 반복하여 측정한다.

색도와 탁도는 spectrophotometer를 사용하여, Hunter color value 즉 명도(L value), 적색도(a value), 황색도(b value)와 색깔 차이인  $\Delta E$ 로 나타낸다.

### (시험 5) AFY-3 종균 사용 가이드라인 설정

동결건조한 종균 *Leuconostoc mesenteroides* AFY-3 첨가량에 따른 김치제조를 제조하였다. 시판 절임 배추를 구매하여 균주의 접종량을 달리하여 김치를 제조하여 저장기간에 따른 산도는 변화를 분석하였다.

시료 각 50g을 증류수 250ml로 정용한 후 핸드믹서로 30초간 분쇄하고 고속원심분리(24,000×g, 4℃, 20min)를 실시한다. 이후 상층액을 감압여과(Whatman filter paper No. 2)하고 그 여과액을 취하여 pH와 산도를 측정한다. pH는 여과액 20ml를 취하여 pH meter(SevenEasy, mettlert toledo, Swiss)로 직접 측정한다.

### (시험 6) 제빵용 종균 제조조건 확립

Sourdough의 발효율을 측정하기 위해서 반죽 직후의 Sourdough 100g을 채취후, 실험조각이 용이하도록 둥글게 만들어 100mL mess cylinder에 넣고 1차 발효조건에서 발효시키면서 30분 간격으로 반죽의 둥글게 올라온 윗부분의 높이를 측정하여 부피로(ml)로 발효율을 분석했다. pH 측정은 Sourdough starter와 반죽의 pH는 시료 4g 취하여 비커에 넣고 증류수로 10배 희석 한후 측정하였고, 방냉한 식빵을 3cm의 두께로 절단한 수 식빵의 중앙부위를 색차계를 이용하여 측정하였다.

## 3 결과 및 고찰

### 〈제1세부과제: 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급〉

#### (시험 1) 발효미생물 은행 구축

강원도농업기술원 농식품연구소 발효미생물 은행 구축을 위하여 '16 ~ '20 총 647점의 자원을 수집하여, 2,340주의 균주를 분리하여 저장하였다. 수집자원 지역은 강원 285점(59.1%), 전북 35(7.3), 경기 33(6.8) 등이며, 수집자원 분류하자면 장류 284점(44%), 절임류 71(11), 식초류 66(10), 주류 57(9)에서 분리하였다(그림 2).



장류



절임류



식초류



주류

그림 2. 주요 수집자원

발효미생물실 균주 은행의 누적 균주는 총 6,978주('16~'20) 분리 저장하였다. 균주 분리 내용을 세균 2,481주, 효모 4,465주, 곰팡이 10주를 분리하였고, 균주 동정을 956주(14%)이다. 구체적으로 유산균(258), 효모(133), 초산균(108) 으로 동정되었다(그림 3).

발효미생물실 균주은행			
* 균주은행 현황			
구분	종류	수	비율
전체	총 균주	6,978	100%
구분	세균	2,481	35.6%
구분	효모	4,465	64.4%
구분	곰팡이	10	0.1%
구분	유산균	258	3.7%
구분	효모	133	1.9%
구분	초산균	108	1.5%
구분	기타	20	0.3%

* 균주 분리년도			
연도	총 균주	세균	효모
2016	2,712	1,142	1,570
2017	960	688	272
2018	2,587	16,718	498,000
2019	5,152	16,111	443,000
2020	2,629	8,891	391,000
2021	2,993	6,171	298,000
2022	3,358	8,991	41,000
2023	1,111	1,111	94,000
2024	817	817	292,000
2025	495	1,081	218,000
2026	569	1,111	874,000
2027	-	0,000	0,000
2028	-	0,000	0,000
2029	-	0,000	0,000
2030	-	0,000	0,000
2031	-	0,000	0,000
2032	-	0,000	0,000
2033	-	0,000	0,000
2034	-	0,000	0,000
2035	-	0,000	0,000
2036	-	0,000	0,000
2037	-	0,000	0,000

그림 3.

표 1. 자원 수집 내역('16)

구분	연번	품목	분리원 정보 (수집식품명)	분리원제공처	분리원 주소
1	JG44	명란젓	오마니명란젓	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 74(대포동)
2	JG45	창란젓	오마니창란젓	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 75(대포동)
3	JG46	명태회	오마니명태회	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 76(대포동)
4	JG47	오징어젓	오마니오징어젓	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 77(대포동)
5	JG48	낙지젓	오마니낙지젓	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 78(대포동)
6	JG49	해수명란	오마니해수명란	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 79(대포동)
7	JG50	명게젓	오마니명게젓	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 80(대포동)
8	JG51	가자미식해	오마니가자미식해	(주)동화푸드	강원도 속초시 농공단지길 81(대포동)
9	KJ27	고추장	바다소리 별미레 해산물 볶음 고추장(깨장어)	(주) 선해수산	경기도 광주시 광남안로 39-12(태전동)
10	KJ28	고추장	고추장(잔멸치)	(주) 선해수산	경기도 광주시 광남안로 39-13(태전동)
11	KJ29	고추장	고추장(중하새우)	(주) 선해수산	경기도 광주시 광남안로 39-14(태전동)
12	KJ30	고추장	고추장(황태채)	(주) 선해수산	경기도 광주시 광남안로 39-15(태전동)
13	GJ28	간장	홍계소스맛장	홍일식품	부산광역시 기장군 일광면 일광로 61-6
14	GJ29	간장	홍계맛장소스골드	홍일식품	부산광역시 기장군 일광면 일광로 61-7
15	GJ30	간장	찍어먹는 홍계소스	홍일식품	부산광역시 기장군 일광면 일광로 61-8
16	JG52	액젓	홍계액젓	홍일식품	부산광역시 기장군 일광면 일광로 61-9
17	DJ45	된장	재래식홍계맛된장	홍일식품	부산시 기장군 일광면 일광로 61-9

2016년 자원수집은 젓갈, 장류 위주로 총 17점을 수집하였으며(표 1), 와인 개발에 필요한 효모 분리를 먼저 실시하였고, 추후 도서지역 위주로 자원수집을 할 예정이며, 균종도 유산균, 고초균 등으로 확대하였다.

표 2. 분리균주 동정 내역(효모, 가자미식해)

No.	Strains	Species	Homology(%)
1	JG51-1-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	98%
2	JG51-2-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	96%
3	JG51-3-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	99%
4	JG51-4-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	99%
5	JG51-5-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	99%
6	JG51-6-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	97%
7	JG51-7-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	97%

No.	Strains	Species	Homology(%)
8	JG51-8-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC58439	98%
9	JG51-9-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC58439	99%
10	JG51-10-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC58439	98%
11	JG51-11-18S	Kazachstania aerobia strain AS 2.2384	98%
12	JG51-12-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC58439	98%
13	JG51-13-18S	Saccharomyces servazzii isolate KI1	98%
14	JG51-14-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC58439	97%
15	JG51-15-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC58439	98%
16	JG51-16-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC 58439	98%
17	JG51-17-18S	Kazachstania aerobia strain AS 2.2384	97%
18	JG51-18-18S	Saccharomyces servazzii strain ATCC58439	98%
19	JG51-19-18S	Saccharomyces servazzii isolate KI1	98%
20	JG51-20-18S	Kazachstania aerobia strain AS 2.2384	98%

분리 균주 동정을 위한 효모 분리조건을 설정하기 위해 YEPC, YM 등 효모 선택배지를 활용하여 분리하고 ITS, 18S rRNA 유전자 분석을 통해 균주 동정 결과 주로 *Saccharomyces servazzii*와 *Kazachstania aerobia* 종으로 확인 되었다(표 2). 동정 균주 목록을 DB화하여 구축하였다.

표 3. 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	가자미식혜	오마니가자미식혜	"	"
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)	"	"

구분	연번	품목	분리원 정보 (수집식품명)	분리원 제공처	분리원 주소
13	GJ28	간장	홍계소스맛장	홍일식품	기장군 일광면 일광로 61-6
14	GJ29	간장	홍계맛장소스골드	"	"
15	GJ30	간장	찍어먹는 홍계소스	"	"
16	JG52	액젓	홍계액젓	"	"
17	DJ45	된장	재래식홍계맛된장	"	"
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	심청청국장	"
25	KJ31	고추장	2014년 이전 전주심청 고추장	"	"
26	KJ32	고추장	2015년 전주심청고추장	"	"
27	KJ33	고추장	2016년 전주심청고추장	"	"
28	KJ34	고추장	2017년 전주심청고추장	"	"
29	CJJ17	청국장	전주심청청국장	"	"

표 4. 분리 미생물 동정('17)

구분	균주명	동정결과	상동성(%)	비 고
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	

구분	균주명	동정결과	상동성(%)	비 고	
14	KCGW34N16-5	<i>Bacillus aryabhatai</i>	96	고초균	
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%		
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		
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		고초균
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%	유산균	
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%		

구분	균주명	동정결과	상동성(%)	비 고
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%	
52	KCGW35M16-11	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99%	
53	KCGW35M16-12	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98%	
54	KCGW35M16-13	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	91%	유산균
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 확인되었고 고초균은 주로 서브틸리스와 리케니포니스 종으로 확인되었고, 유산균은 씨트리엄 종과 메센테로이드 종으로 확인되었다(표 4).

2018년도에는 84점의 유전자원을 수집하여 총 617주의 미생물(효모 569주, 유산균 183주, 세균 65주)을 확보하였다(표 5).

표 5. 균주 분리 현황('18)

구 분	유전자원(점)	분리균주(주)			
		합계	효모	유산균	세균
2018년	84	617	369	183	65

2019년도에는 79점의 유전자원을 수집하여 총 485주의 미생물(효모 209주, 세균 276주)을 확보하였다(표 5).

표 6. 균주 분리 현황('19)

구 분	분리균주(주)			
	세균	효모	곰팡이	합계
2019년	276	209	-	485

## (시험 2) 종균 실용화를 위한 보급

청국장 종균인 AFY-2의 경우 '16년 9월부터 봉화 미소왕이라는 업체에 기술이전하여 추가로 보급 중이며 가평의 신규업체와 계약 체결을 추진중에 있음. 김치용 종균인 AFY-3의 경우 11월 12일에 계약이 완료되어 정산 및 추가 갱신을 협의하였다.

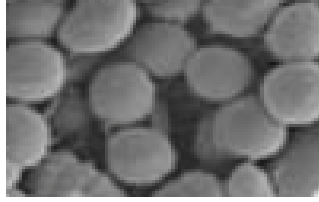
표 7. AFY-3 분양내역('16)

번호	분양 업체	분양균주	분양 날짜	용량(mL)
1	락천 김치	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (AFY-3)	2015/08/12	200
2	락천 김치	"	2015/11/10	200
3	락천 김치	"	2015/12/23	300
4	락천 김치	"	2016/01/22	300
5	락천 김치	"	2016/04/11	200
6	락천 김치	"	2016/05/26	200
7	락천 김치	"	2016/06/17	200
8	락천 김치	"	2016/07/11	200
9	락천 김치	"	2016/09/14	200
10	락천 김치	"	2016/10/20	200
11	락천 김치	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> AFY-3	2017/02	
12	락천 김치	"	2017/03	
13	락천 김치	"	2017/04	
14	락천 김치	"	2017/06	
15	락천 김치	"	2017/08	
16	락천 김치	"	2017/09	
17	락천 김치	"	2017/10	
18	(주)미소왕	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	2017/03	
19	(주)미소왕	"	2017/05	
20	(주)미소왕	"	2017/08	
21	(주)미소왕	"	2017/10	

농식품연구소 특허균주(그림 3)의 유상 기술이전은 '16 ~ '20 총 11건을 실시하였다(표 7). *Bacillus subtilis* (AFY-2) 6건, *Leuconostoc mesenteroides* (AFY-3) 3건, *Acetobacter pasteurianus* (AFY-4) 1건을 실시하였다.



청국장 고초균



김치 유산균



식초 초산균

그림 4. 특허 발효미생물 균주 3종

표 9. 특허 균주의 유상 기술이전 현황('16~'20)

구분	균주명	기술이전 업체	기술이전
1	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	청국장 고초균	미소왕(봉화) 2016
2	<i>Leuconostoc mesenterodites</i> AFY-3	김치 유산균	락천식품(동해) 2016
3	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	청국장 고초균	농업법인부일농산(평창) 2017
4	<i>Leuconostoc mesenterodites</i> AFY-3	김치 유산균	락천식품(동해) 2017
5	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	청국장 고초균	봉화 발효마을(봉화) 2017
6	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	청국장 고초균	레인보우바이오테크(춘천) 2018
7	<i>Leuconostoc mesenterodites</i> AFY-3	김치 유산균	케이엔비푸드(정선) 2018
8	<i>Leuconostoc mesenterodites</i> AFY-3	김치 유산균	레인보우바이오테크(춘천) 2018
9	<i>Acetobacter pasteurianus</i> AFY-4	식초 초산균	농업법인부일농산(평창) 2018
10	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	청국장 고초균	우리푸드스(전주) 2019
11	<i>Bacillus subtilis</i> AFY-2	청국장 고초균	농업법인부일농산(평창) 2020

농진청에서 주관하는 2018 신기술 보급사업에 '청국장 제조 기술 시범 사업'이 채택되어 시연회 개최하였고, 전국 31개소에 AFY-2 청국장 종균을 보급하였다(표 11).

표 10. '청국장 제조기술 시범사업' AFY-2 종균 보급 현황

구분	계	경기	강원	충북	충남	전북	전남	경남
	31	5	6	7	6	2	4	1
2020년	10	2	3	3	2			
2019년	9		3	1	1	2	1	1
2018년	12	3		3	3		3	



이론 교육



실습 교육



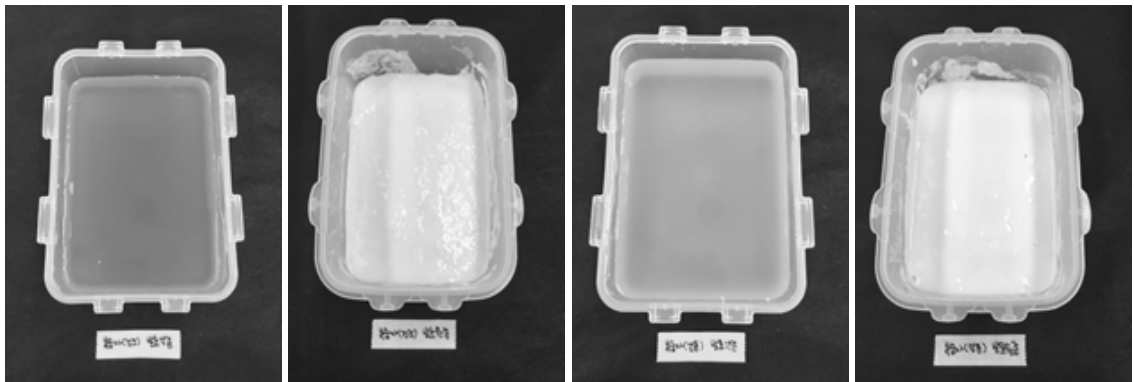
현장컨설팅

그림 5. 종균 실용화

### 〈제2세부과제: 빵 제조용 발효종 선발〉

#### (시험 1) 빵 제조용 발효종 선발

빵 제조용 발효종 선발을 위하여 액종(복숭아)을 제조하였다(그림 6). 종 제조는 각각의 복숭아(건조, 냉동) 50g에 물 600g, 설탕 20g을 혼합하여 잘 녹인 후 액종을 체에 거르고 사용하였고, 도우는 액종 50g에 강력분 100g과 물100g을 혼합하여 25℃에서 보관하면서 발효시킨 후 도우가 부풀어진 액종을 선별하여 효모 및 유산균 분리에 이용하였다.



건조 액종

건조 도우

냉동 액종

냉동 도우

그림 6. 액종 및 도우 제조

표 11. 발효 액종 동정 내역

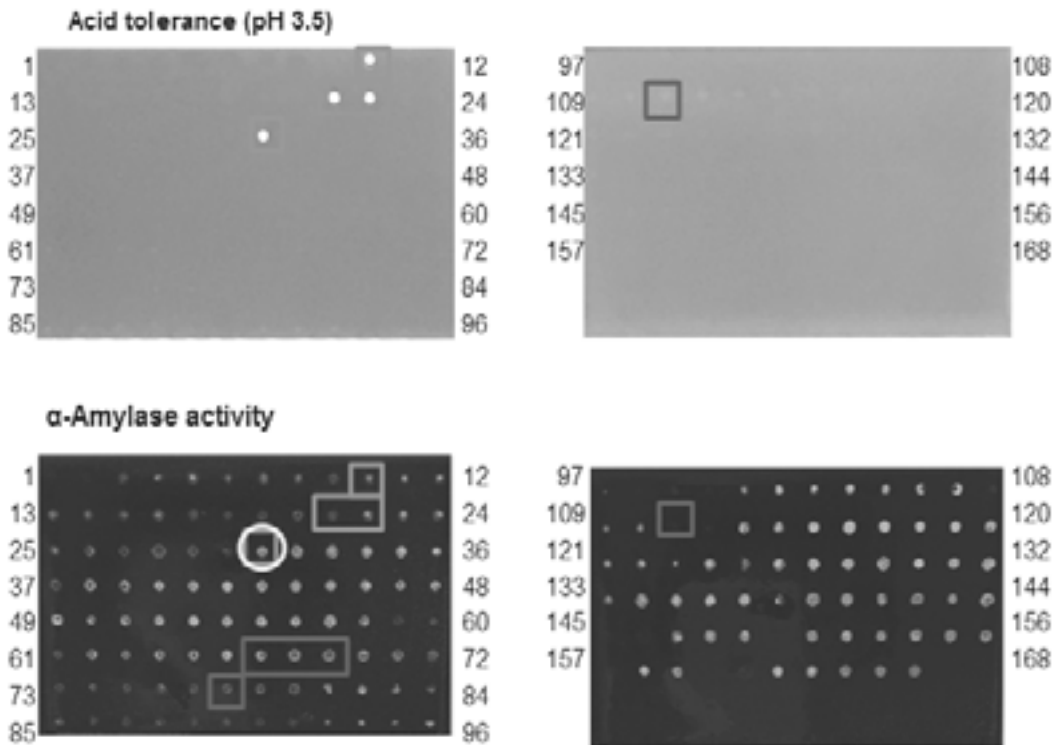
구분	균주명	동정결과	상동성(%)	Accession No.
1	FG17Y-1	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	KR336835.1
2	FG17Y-2	<i>Pichia guilliermondii</i>	99%	DQ821711.1
3	FG17Y-3	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	KR063216.1
4	FG17Y-4	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99%	KX791421.1
5	FP17Y-1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	99%	KU350743.1

구분	균주명	동정결과	상동성(%)	Accession No.
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

청향을 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 확인되었다(표 11).

빵 제조용 유산균 스크리닝위한 균주 특성 평가를 실시하였다. 유산균 166주에 대하여 내산성, α-아밀라아제, 프로테아제 효소활성, 저온생육, EPS(Exopolysaccharide) 생성에 대하여 평가하여 최종적으로 총 8주의 유산균을 선발하였다.(그림 7)

Sourdough의 pH는 3.5~5.5 범위이므로 내산성은 필수요건이며, 탄수화물 및 단백질 가수분해효소 활성은 빵 발효특성에 영향을 주고, 균체외다당류(EPS)는 기능성물질로서 제품의 점도를 높이고, 안정제 및 유화제로서 이용되고 있어 이러한 내산성과 가수분해효소 고활성, EPS 고생성 특성을 보유하고 있는 균주를 선발하고자 하였다.



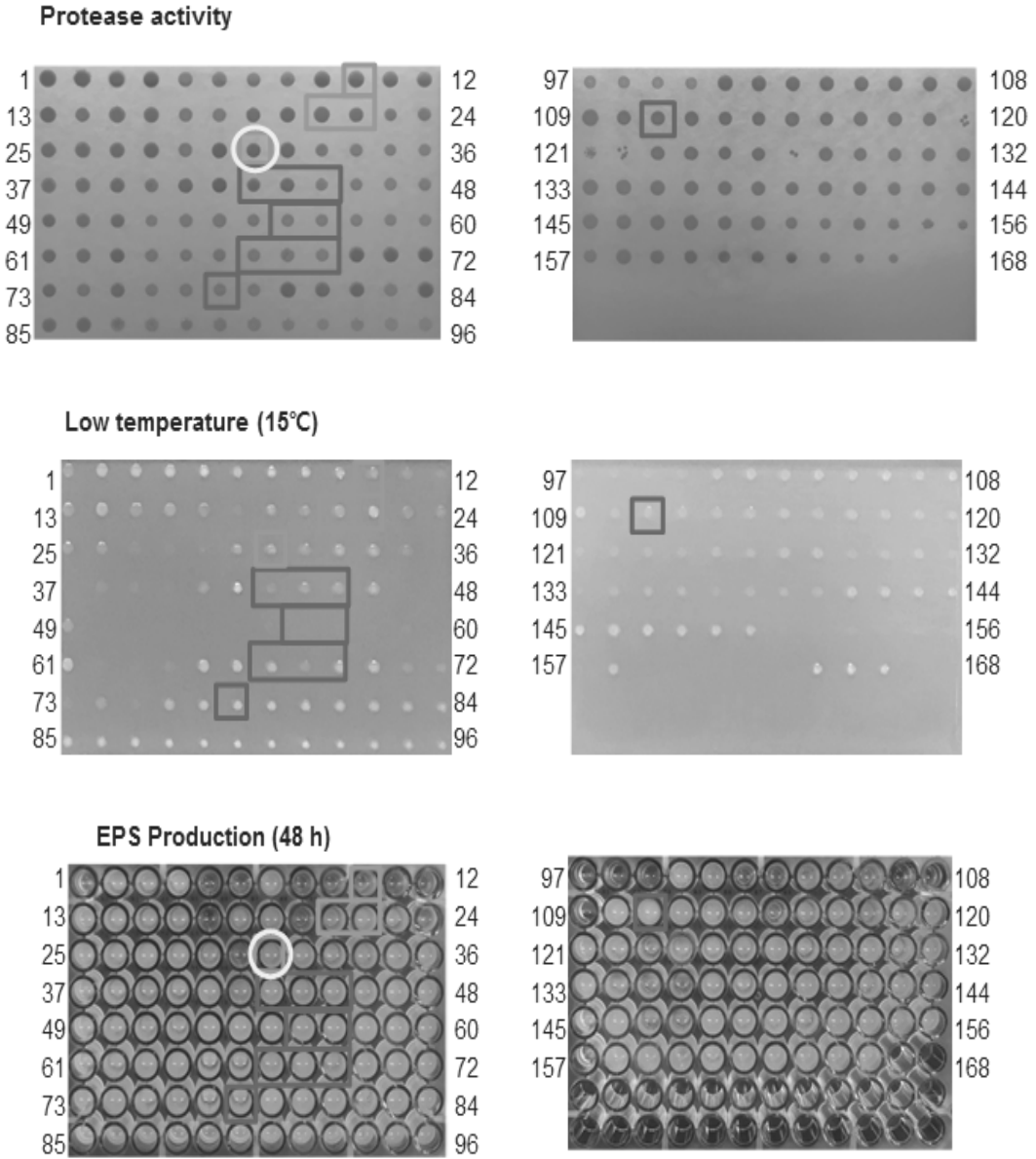


그림 7. 제빵용 유산균 스크리닝

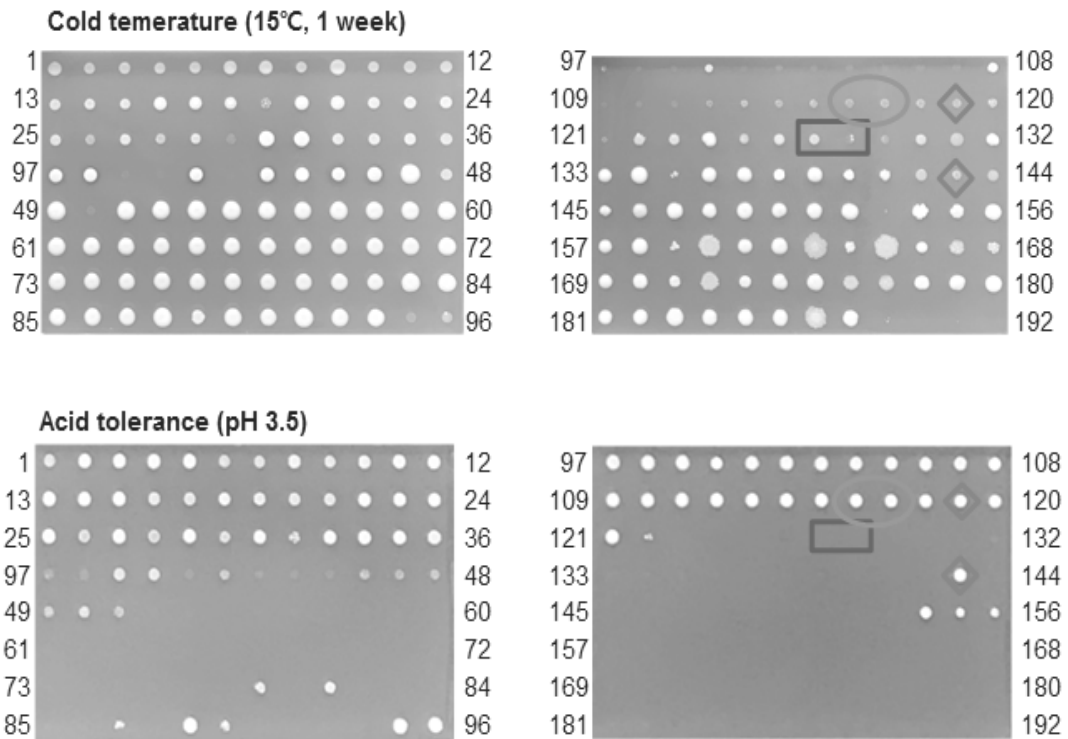
유산균 166주에 대하여 내산성, α-아밀라아제, 프로테아제 효소활성, 저온생육, EPS(Exopolysaccharide) 생성에 대하여 평가하여 최종적으로 총 8주의 유산균을 선발하였다.

Sourdough의 pH는 3.5~5.5 범위이므로 내산성은 필수조건이며, 탄수화물 및 단백질 가수분해효소 활성은 빵 발효특성에 영향을 주고, 균체외다당류(EPS)는 기능성물질로서 제품의 점도를 높이고, 안정제 및 유화제로서 이용되고 있어 이러한 내산성과 가수분해효소 고활성, EPS 고생성 특성을 보유하고 있는 균주를 선발하고자 하였다(표 12).

표 12. 1차 선발 유산균 균주 특성

구 분	균주 번호	내산성 (pH 3.5)	알파-아밀라아제	프로테아제	저온 생육 (15°C)	EPS 생성
1	10	+++++	-	-	+	+
2	21	+++++	-	-	+	++
3	22	+++++	+	-	+++	+++
4	31	+++++	++++	-	+	++++
5	67	-	+++	-	++	+++++
6	68	-	+++	-	+	+++++
7	69	-	+++	-	++++	+++++
8	78	-	+	-	+++	+++

빵 제조용 효모 스크리닝을 하고자 효모 188주에 대하여 저온 생육, 내산성, α-아밀라아제, 프로테아제 효소활성을 평가하였(그림 8)고, 최종적으로 6주의 효모를 선발하였다(표 5).



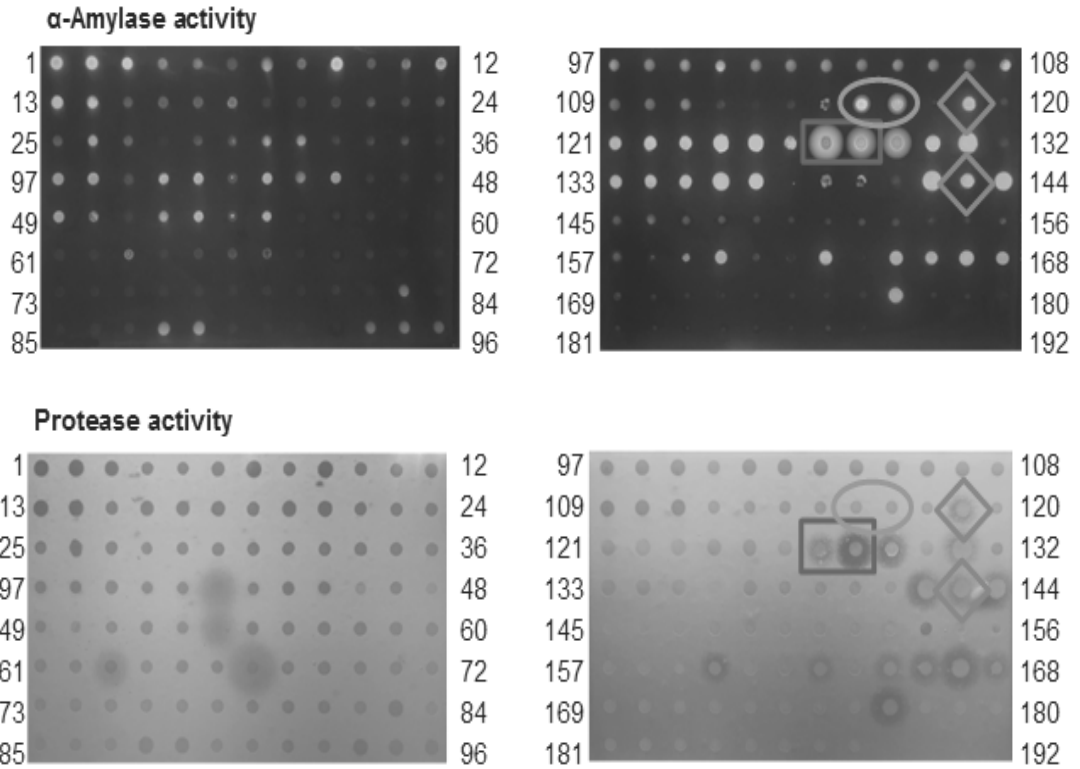


그림 8. 제빵용 효모 스크리닝

표 13. 1차 선발 효모 균주 특성

구 분	균주번호	알파-아밀라아제	프로테아제	저온 생육(15°C)	내산성(pH 3.5)
1	120	+	-	++	++++
2	121	++	-	++	++++
3	123	-	++	++	++++
4	131	+++++	+++	+++	-
5	132	++++	+++++	-	-
6	147	-	++	++	++++

(시험 2) 종균 제조 공정 개선

가. 아포형 종균의 제조 및 확인

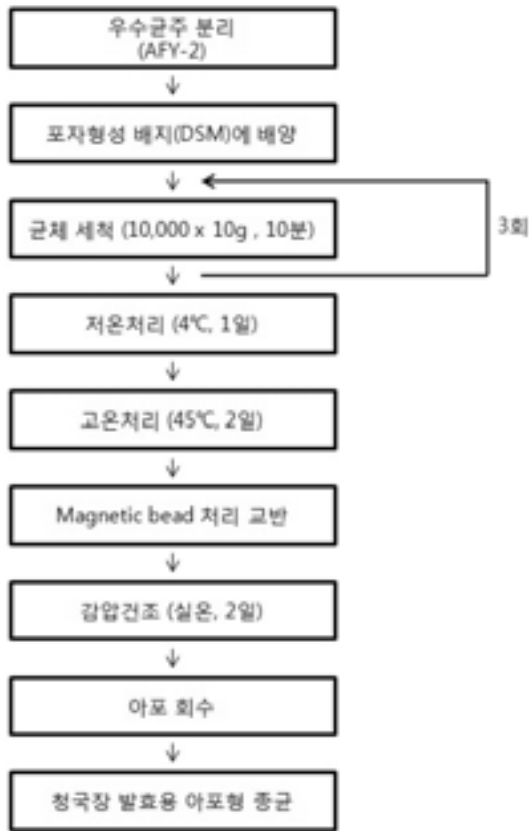


그림 9. AFY-2 아포형 제조 모식도

포자형성 배지에 저온 및 고온처리를 하여 마그네틱 비드로 회수하였고 배양기간까지 포함하여 약 10일 소요되었다(그림 9). 제조한 아포형 종균의 18S 시퀀싱 분석결과 영양형과 100% 일치하였다(그림 9).

아포형 종균의 제조방법을 통해 포자형성 확인 SEM 촬영 결과 영양형은 막대형태의 간균형이며, 아포형은 둥근 구균형태에 가까웠다(그림 10, 11).

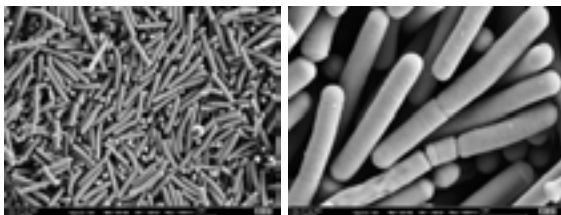


그림 7. 영양형 AFY-2

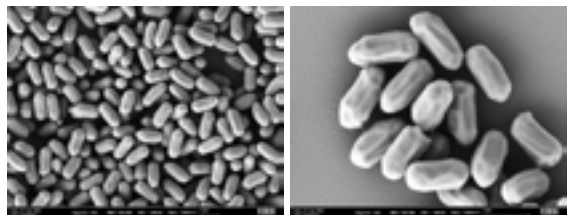


그림 8. 아포형 AFY-2

AFY-2	95	CTGCCTGTAAAGACTGGGATAA	CTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGAT	143
SporeAFY-2	100	CTGCCTGTAAAGACTGGGATAA	CTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGAT	148
AFY-2	144	GGTTGTCTGAAACCCGCATGG	TTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGGCTACCA	192
SporeAFY-2	149	GGTTGTCTGAAACCCGCATGG	TTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGGCTACCA	197
AFY-2	193	CTTACAGATGGACCCGCGGCG	CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC	241
SporeAFY-2	198	CTTACAGATGGACCCGCGGCG	CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTC	246
AFY-2	242	ACCAAGGCGACGATGCGTAG	CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG	290
SporeAFY-2	247	ACCAAGGCGACGATGCGTAG	CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTG	295
AFY-2	291	GGACTGAGACACGGCCAGACT	CCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCT	339
SporeAFY-2	296	GGACTGAGACACGGCCAGACT	CCTACGGGAGGCGAGCAGTAGGGAATCT	344
AFY-2	340	TCCGCAATGGACGAAAAGTCT	GACGGAGCAACCGCCGCTGAGTGATGAA	388
SporeAFY-2	345	TCCGCAATGGACGAAAAGTCT	GACGGAGCAACCGCCGCTGAGTGATGAA	393
AFY-2	389	GTTTTGGATCUTAAAAGCTCT	GTTTGGGAAAGAACAAATGCCCTTCA	437
SporeAFY-2	394	GTTTTGGATCUTAAAAGCTCT	GTTTGGGAAAGAACAAATGCCCTTCA	442
AFY-2	438	AATAGGCGCGCACCTTGC	CGGTACCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTA	486
SporeAFY-2	443	AATAGGCGCGCGCACCTTGC	CGGTACCTAACCCAGAAAAGCCACGGCTAACTA	491
AFY-2	487	CGTGCCAGCAGCCGCGGTA	AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAAT	535
SporeAFY-2	492	CGTGCCAGCAGCCGCGGTA	AATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAAT	540
AFY-2	536	ATTGGGCGTAAAAGGGCTCG	CAGGCGTTTCTTAABTCTGATGTGAAAAC	584
SporeAFY-2	541	ATTGGGCGTAAAAGGGCTCG	CAGGCGTTTCTTAABTCTGATGTGAAAAC	589

그림 9. 영양형과 아포형의 18S rRNA alignment

나. 아포형 종균의 내산성, 내열성 검정

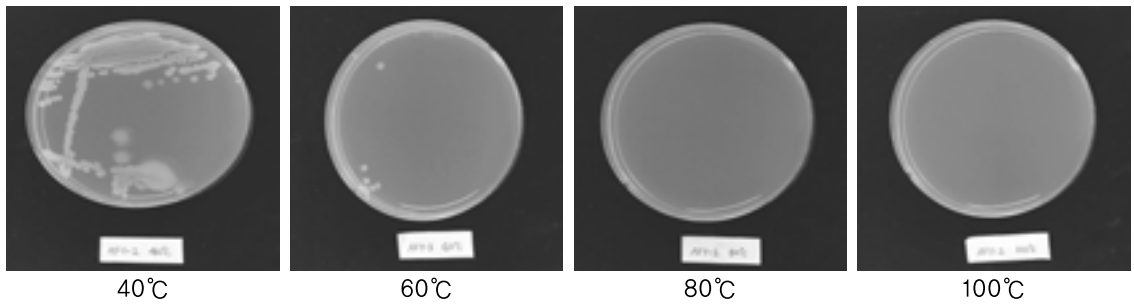


그림 10. 영양형 내열성 검정

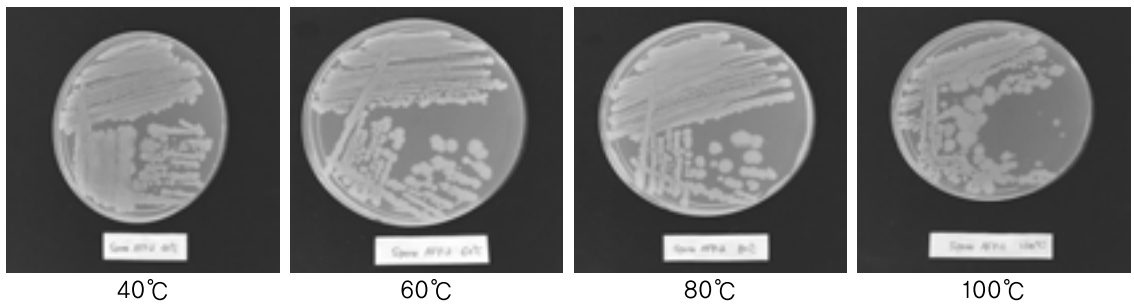


그림 11. 아포형 내열성 검정

아포형의 내열성 검정을 위해 30°C~100°C 까지 10°C 간격으로 측정하였고 아포형 종균을 각각의 온도에서 5 분 동안 정치 후 배지에 스트리킹으로 확인하였다. 그림 5, 6과 같이 영양형은 60°C부터 생육이 불량하였으나, 아포형은 100°C까지 생육이 왕성하였다.

다. 아포형 종균의 Spotting Assay

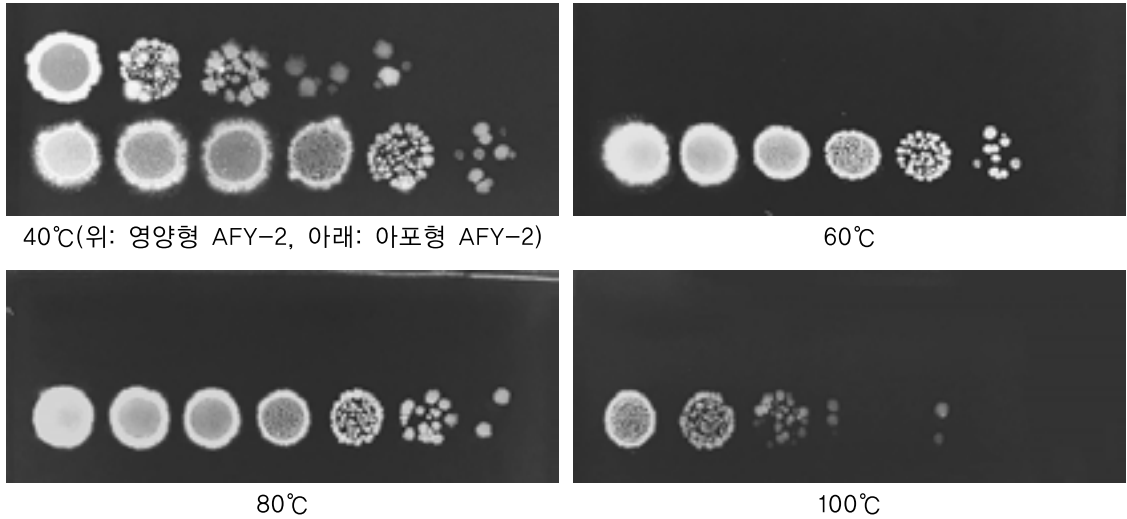


그림 12. Spotting Assay(내열성)

아포형 종균의 내열성 점적 어세이는 플레이트 결과과 비슷하게 영양형은 60°C부터 생육이 불량했으며, 아포형은 100°C 까지 왕성한 생육을 보여주었다(그림 12). 따라서 아포형 종균을 이용했을 때 청국장을 찌개로 이용했을 시 종균의 사멸로 인한 실할 문제를 어느 정도 방지하리라 생각되었다.

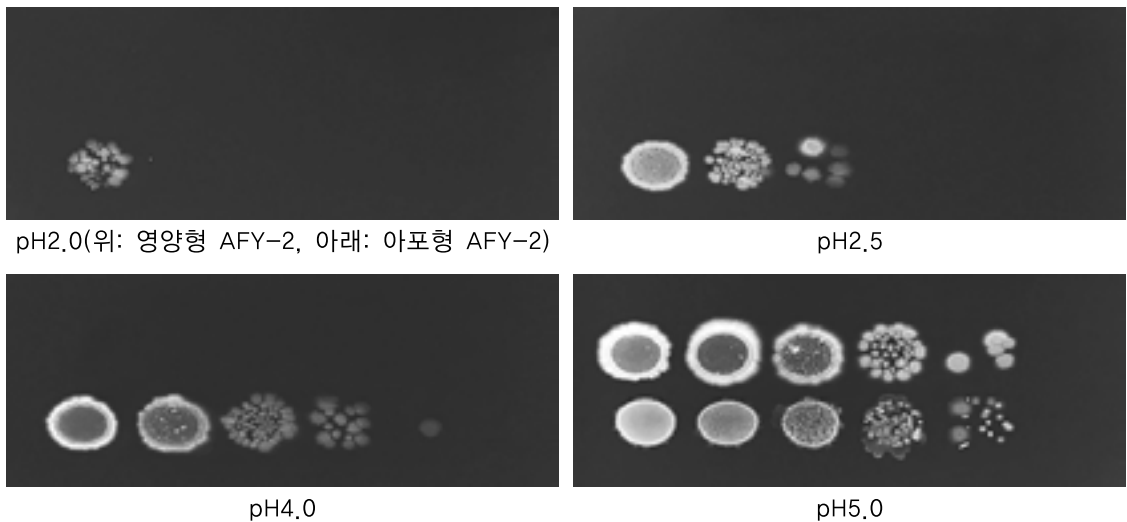


그림 13. Spotting Assay(내산성)

내산성 검정결과 pH2.0부터 아포형 종균의 생육을 확인 할 수 있었다(그림 13). 인체의 위산이 pH1.5~2.5 사이인 점을 감안할 때 아포형 종균을 이용했을 때 위산으로부터 종균의 사멸을 방지하리라 판단되었다.

### (시험 3) 종균 제조 공정 개선

AFY-2 균주 이용 가이드라인을 설정하기 위하여 찐 콩에 AFY-2 종균 분말을 접종할 때, 종균 활성시간을 달리하여 생청국을 제조하여 진의 생성을 비교한 결과, 종균을 30분 활성화시킨 후, 접종하여 생청국을 제조하였을 때의 진의 생성이 가장 큰 것으로 나타났다. 실험조건은 접종농도(0.1, 1, 2, 5, 10), 품종(대립종 대원, 소립종 풍산), 온도(37℃ 40℃, 43℃)를 달리한 결과, 접종농도는 0.1%, 온도는 대립종 37℃, 소립종은 40℃로 나타났다(그림 14).

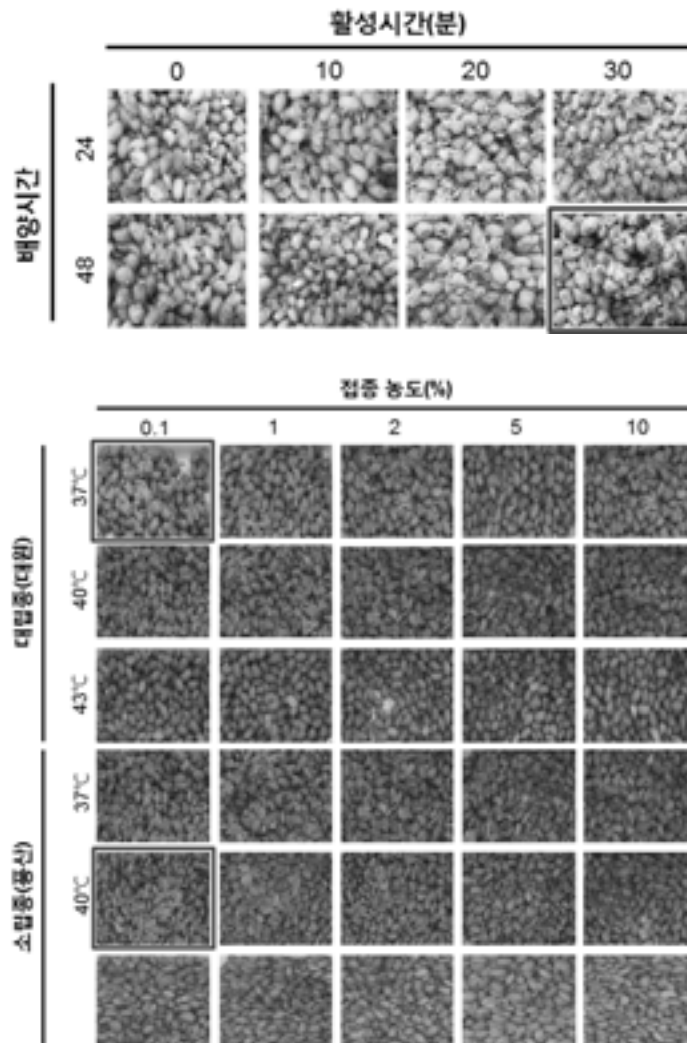


그림 14. 품종 및 접종농도별 비교

표 14. AFY-2 균주 권장 사용조건

구 분	균주접종농도	활성시간(분)	온도(°C)	시간
조 건	0.1% (1 g/L)	30	37(대립) 40(소립)	24~48

AFY-2 균주 권장 사용조건은 균주접종농도 0.1%( 1 g/L), 활성시간 30분 등 표 14와 같이 설정하였다.

(시험 4) 생청국용 발효적성 우수 콩 품종

생청국용 발효적성 우수 콩 품종을 선발하기 위하여 콩 품종 풍산나물, 청아, 대원, 약선, 흑청을 선발하여 청국장을 제조하여 비교하였다. 생청국용 제조공정은 침지, 증자, 발효, 숙성 과정이다. 조사내용 점진물 길이 함량, 아미노테질소, 암모니아테질소를 분석하였다.

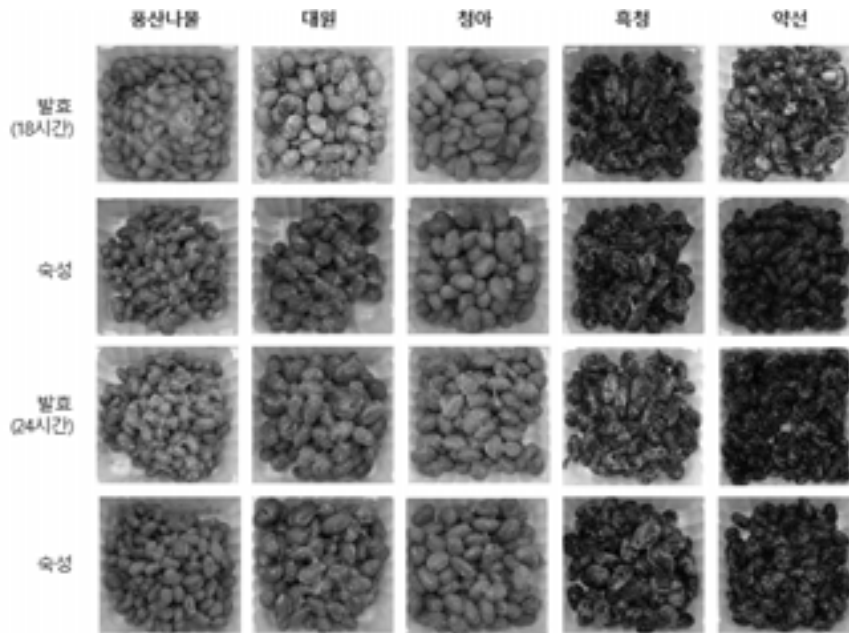


그림 15. 품종별 콩 생청국 비교

표 15. 품종별 콩 생청국 특성

구 분	풍산나물	대원	청아	흑청	약선
수분함량	61.9±0.9	59.9±0.6	63.0±1.0	61.0±0.5	63.3±0.4
산도(%)	0.25±0.01	0.11±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.18±0.01
점진물함량(생청국 1g당)	0.68±0.04	0.58±0.02	0.64±0.03	0.62±0.07	0.64±0.09
아미노테질소함량(mg%)	162.9±7.0	70.9±1.6	63.7±2.9	57.4±2.8	78.9±2.1

(시험 5) 혼합배양을 통한 발효종 제조조건 확립

발효종 제조시 효모, 유산균의 혼합배양을 통한 제빵 제조를 저온내성, 내산성 우수, 전분분해능 양성 효모(Y121번)(표 16)와 EPS 고생성 등 유산균 2종(45번, 68번)을(표 17) 가지고 빵을 제조하여 특성을 평가하였다.

표 16. 효모 균주 특성

균주번호	동정결과	온도(°C) <sup>1)</sup>	pH <sup>2)</sup>	a-amylase	Protease
121	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10-40	3.0-6.0	+	-

표 17. 유산균 균주 특성

균주번호	동정결과	온도(°C)	pH	EPS
45	<i>Lactobacillus paracasei</i>	20-40	5.5-6.0	++ (1d)
				+++ (2d)
68	<i>Pediococcus acidilactici</i>	15-50	> 6.0	++ (1d)
				+++ (2d)

제빵의 적성을 평가하기 위하여 pH, 반죽부피, 경도, 조직감을 분석하였다. 빵의 pH는 단독으로 효모(Y121)만 사용하였을 때 가장 높았고, 효모와 유산균을 혼합배양한(Y121+L45)가 가장 낮았다. 반죽의 부피는 효모(Y121)만 사용하였을 때 발효속도는 느리지만 팽창은 가장 높았다. 또한 혼합배양(Y121+L68)이 (Y121+L45)보다 팽창이 잘되었다. 경도는 Y121, Y121 + L45가 가장 낮았고, 시판효모에 비하여 121번 효모 노화지연이 우수한 것으로 나타났다.

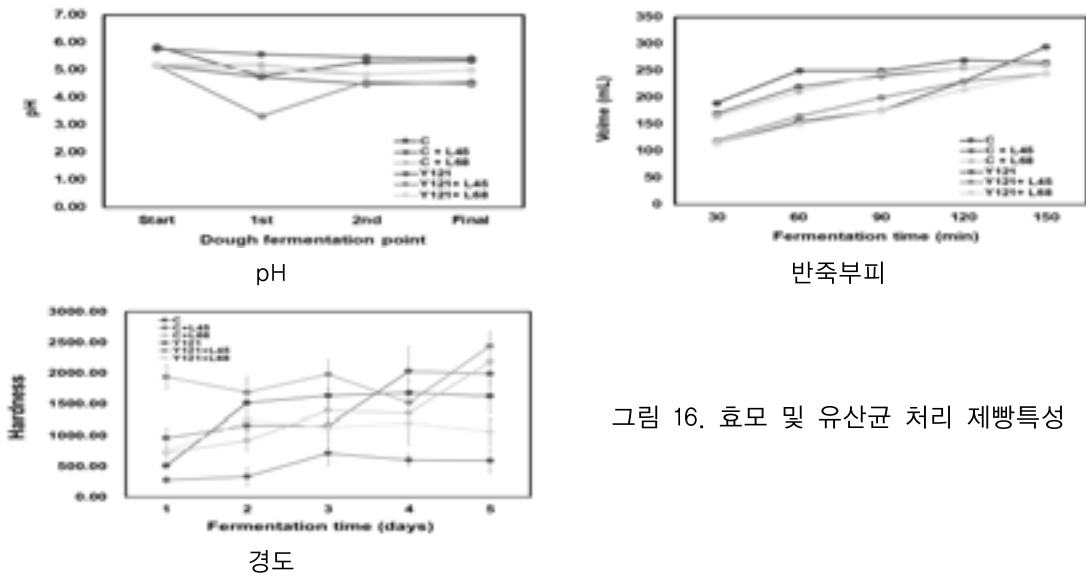


그림 16. 효모 및 유산균 처리 제빵특성



그림 17. 효모 및 유산균 처리 빵 단면

빵의 조직감을 분석한 결과 저장기간이 지날수록 응집성, 점착성은 증가하였고, 탄력성은 감소하였다, 응집성, 탄력성은 45번 유산균 처리구가 가장 낮았고, 점착성은 유산균 처리구가 대조구에 비하여 높았다(표 18, 19, 20).

표 18. 저장기간에 따른 응집성 (단위: %)

효모 유산균	시판			121번		
	-	45번	68번	-	45번	68번
1일	0.74±0.02	0.59±0.07	0.72±0.14	0.67±0.15	0.63±0.11	0.72±0.16
2일	0.56±0.06	0.59±0.19	0.57±0.10	0.52±0.16	0.44±0.06	0.57±0.20
3일	0.58±0.13	0.46±0.05	0.54±0.15	0.66±0.17	0.54±0.16	0.54±0.17
4일	0.56±0.14	0.61±0.16	0.44±0.03	0.58±0.15	0.62±0.19	0.44±0.15
5일	0.61±0.10	0.55±0.16	0.58±0.14	0.51±0.07	0.38±0.01	0.58±0.13

표 19. 저장기간에 따른 탄력성 (단위: %)

효모 유산균	시판			121번		
	-	45번	68번	-	45번	68번
1일	9.33±0.15	9.33±0.02	12.06±3.65	9.22±0.19	9.16±0.21	12.06±1.73
2일	8.91±0.19	9.55±0.80	8.82±0.25	8.82±0.71	9.86±2.36	8.82±2.48
3일	9.01±0.11	8.60±0.60	9.33±0.14	9.62±0.59	8.96±0.13	9.33±0.26
4일	9.08±0.15	9.07±0.28	9.20±0.06	9.19±0.29	9.31±0.32	9.20±0.25
5일	9.10±0.14	9.03±0.24	10.32±2.25	9.14±0.08	8.73±0.10	10.32±0.50

표 20. 저장기간에 따른 점착성 (단위: g/cm<sup>2</sup>)

효모 유산균	시판			121번		
	-	45번	68번	-	45번	68번
1일	396.50±33.23	680.50±13.44	597.25±96.85	399.60±76.14	1380.00±348.05	528.50±109.34
2일	850.50±169.00	580.50±99.70	536.50±89.12	411.00±173.09	790.67±158.57	784.67±272.79

효모	시판			121번		
	-	45번	68번	-	45번	68번
유산균	-	45번	68번	-	45번	68번
3일	828.50±3.54	538.50±30.41	712.00±240.20	1112.00±76.74	854.00±7.07	508.00±130.66
4일	793.50±7.78	982.33±92.78	580.00±77.74	956.00±260.65	707.50±48.79	684.67±46.58
5일	632.50±146.37	800.00±188.22	1309.67±254.19	643.50±51.62	991.67±59.37	649.25±151.92

빵의 저장성 평가를 위하여 빵을 제조후 폴리에틸렌 봉지에 넣어 상온 보관 후 육안으로 최초로 곰팡이가 피는 것을 관찰하였다. 저장성은 유산균을 혼합배양시, 효모(121번), 유산균(45번)을 혼합배양한 것이 우수한 것으로 나타났고, 시판효모(C) 보다 효모(121번)가 저장성이 우수한 것으로 추정되어졌다(그림 18)

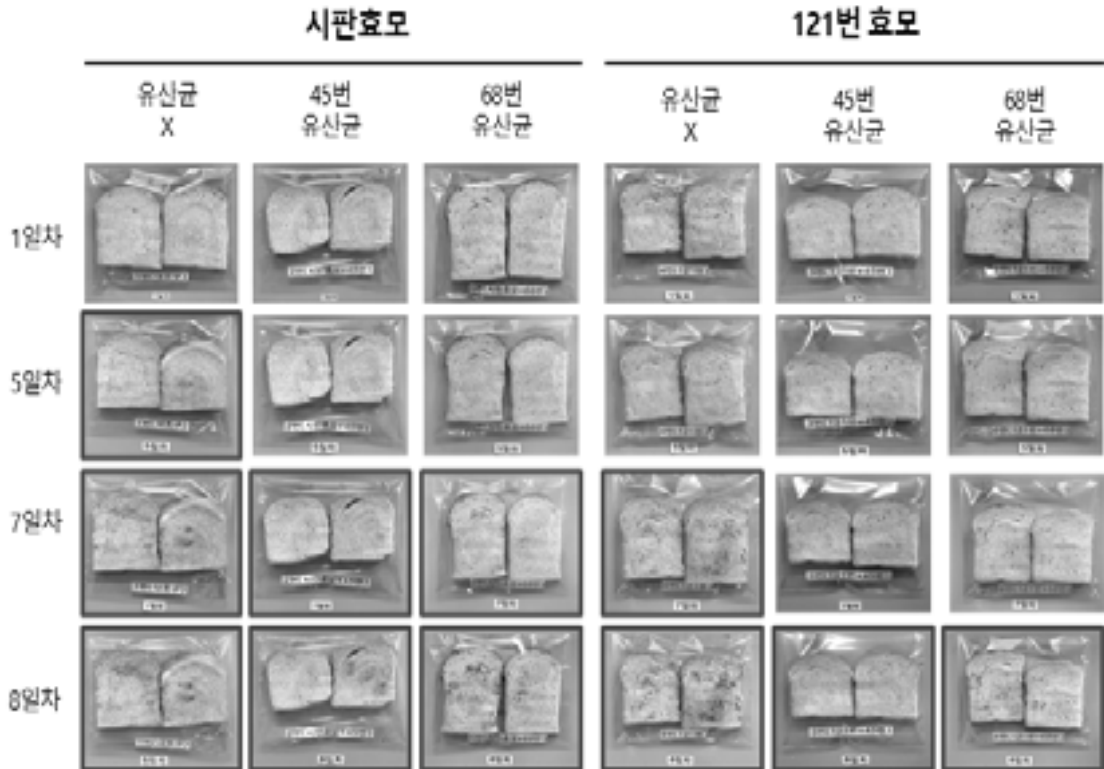


그림 18. 저장기간에 따른 효모 및 유산균 처리 빵

#### (시험 5) AFY-3 종균 사용 가이드라인 설정

동결건조한 AFY-3 종균을 이용한 숙성기간에 따른 김치의 특성을 분석하고자 종균 접종량을 달리 하여 김치를 제조하였다. 시판 절임배추를 구매하여 균주의 접종량을 달리하여 김치를 제조하였다(표 21).

표 21. 김치 제조시 동결건조 AFY-3의 접종 증균수

구분	유산균 정보	증균 첨가량
A	Skim milk 4.9g + AFY-3 0.1g	105
B	Skim milk 4g + AFY-3 1g	106
C	AFY-3, 5g	5×106

농림부(2007)는 김치의 숙성도 단계를 pH와 산도 기준으로 미숙성 김치, 적당히 숙성된 김치, 과숙된 김치 등 3단계로 제안 하고 있다. 산도를 기준으로 김치의 숙성도는 균주와 상관없이 12일을 기준으로 과숙된 김치 단계로 변화였고, 오래 저장할수록 대조구 보다는 과숙의 정도가 심하지 않았다(표 22).

표 22. 배추 김치 숙성기간에 따른 산도 변화

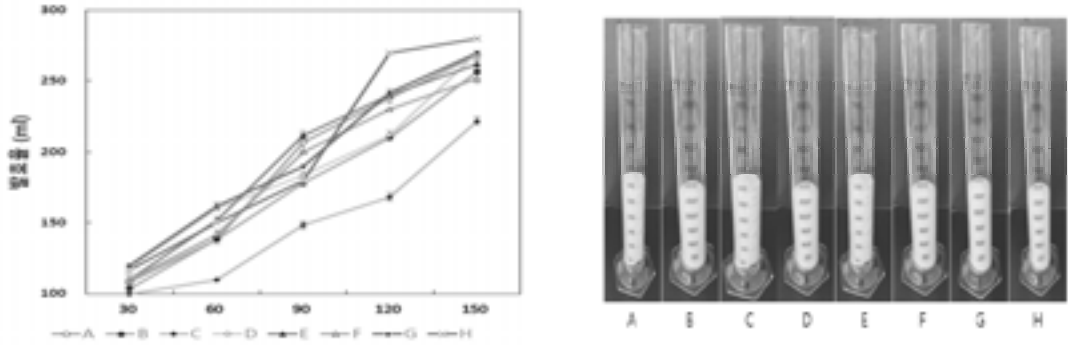
구분	4일	8일	12일	32일
대조구	0.79±0.01	0.93±0.01	1.07±0.02	1.51±0.00
A	0.85±0.00	0.96±0.01	1.06±0.01	1.33±0.00
B	0.84±0.00	0.93±0.01	1.06±0.00	1.47±0.01
C	0.83±0.00	0.94±0.01	1.09±0.01	1.45±0.01

### (시험 5) 제빵용 증균 제조조건 확립

발효종 제조시 효모(시판효모, 121번), 유산균(45, 65, 111번)의 혼합배양을 통한 제빵시 CO<sub>2</sub> 생성이 원활히 이루어지는 확인을 위하여 반죽의 부피변화를 분석한 결과 선발효모 121번과 유산균 111번을 혼합배양한 반죽의 팽창이 잘되었고, 반죽 및 빵에서 pH가 가장 낮고 수분함량은 많은 것으로 확인 되었다(표 24, 25). 또한 일반세균수 변화는 10일이 되어도 불검출되었고, 유산균과 같이 혼합배양하여 제빵시 일반세균수 발생이 지연되었다(표 26).

표 23. 발효시간에 따른 반죽의 부피 변화

구분	발효시간(분)				
	30	60	90	120	150
A	108.33±2.89	138.33±2.89	206.67±5.77	238.00±3.46	268.33±2.89
B	103.33±2.89	138.33±2.89	178.33±2.89	210.00±0.00	256.67±5.77
C	100.00±0.00	110.00±0.00	148.33±2.89	168.33±2.89	221.67±2.89
D	118.33±2.89	160.00±0.00	183.33±2.89	211.67±2.89	270.00±0.00
E	110.00±0.00	151.67±2.89	211.67±2.89	240.00±0.00	261.67±2.89
F	110.00±0.00	141.67±2.89	200.00±0.00	230.00±0.00	251.67±2.89
G	120.00±0.00	161.67±2.89	190.00±0.00	241.67±2.89	270.00±0.00
H	116.67±2.89	150.00±0.00	180.00±0.00	270.00±0.00	280.00±0.00



A: 시판효모, B: 121, C: 시판효모+45, D: 121+45  
 E: 시판효모+68, F: 121+68, G: 시판효모+111 H: 121+111

그림 19. 발효시간에 따른 반죽의 부피 변화

빵을 방냉 후 단면 및 전면을 비교한 결과 효모를 단독으로 사용시 성형 및 부피감이 좋았고, 유산균을 혼합배양시에는 C, D(45번 유산균)이 팽창율이 좋지 않았다(그림 20).

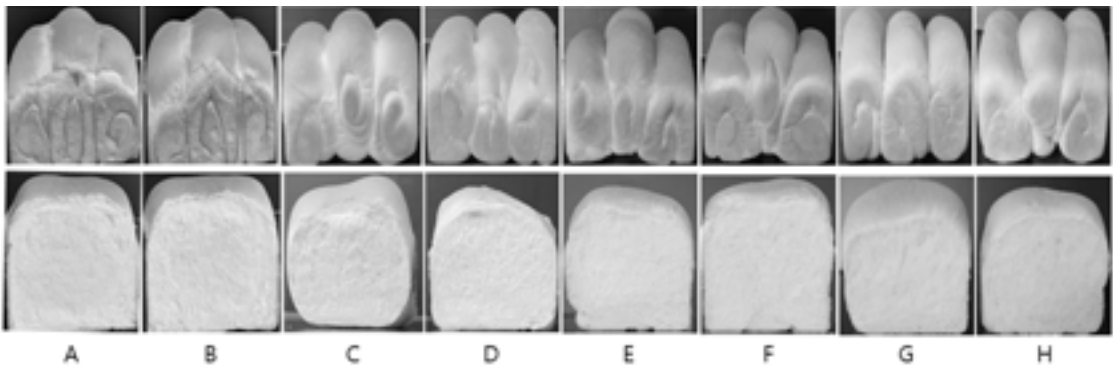


그림 20. 빵의 단면 및 전면 구조

표 24. 발효시간에 따른 반죽 및 빵의 pH변화

구분	혼합 직후	1차 발효	2차 발효	빵
A	5.91±0.01	5.80±0.01	5.62±0.01	5.78±0.00
B	5.98±0.01	5.77±0.01	5.71±0.01	5.82±0.01
C	5.45±0.01	5.22±0.01	4.97±0.02	4.98±0.01
D	5.21±0.02	4.96±0.02	4.77±0.01	4.76±0.01
E	5.38±0.02	5.10±0.01	4.88±0.01	4.93±0.01
F	5.32±0.02	5.01±0.01	4.92±0.01	4.91±0.01
G	4.85±0.01	4.52±0.01	4.32±0.01	4.31±0.01
H	4.81±0.01	4.48±0.01	4.28±0.02	4.28±0.01

표 25. 빵의 수분함량 및 색도

구분	수분함량 (%)	Hunter color values		
		L	a	b
A	0.38±0.00	78.16±5.65	-0.88±0.06	9.14±0.82
B	0.37±0.01	77.80±2.10	-0.95±0.04	8.66±0.74
C	0.34±0.00	80.00±0.90	-0.83±0.13	10.62±0.51
D	0.33±0.05	77.67±1.96	-0.97±0.13	10.98±0.29
E	0.32±0.00	78.04±5.96	-0.78±0.17	11.78±1.50
F	0.36±0.02	78.86±0.66	-0.76±0.10	11.90±0.78
G	0.37±0.01	74.42±0.93	-0.92±0.09	11.64±0.76
H	0.38±0.01	76.77±3.05	-0.94±0.12	11.33±0.85

표 26. 25°C 저장기간에 따른 일반세균 변화(CFU/g)

구분	저장시간(일)					
	1	2	3	4	5	10
A	0.00±0.00	0.00±0.00	2.31±0.03	1.26±0.24	1.99±0.09	5.23±0.14
B	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	2.11±0.09	2.59±0.11	4.37±0.10
D	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.33±0.07
F	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	5.72±0.10
H	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

## 4 적 요

### 〈제1세부과제: 발효미생물 은행 구축 및 종균 보급〉

#### (시험 1) 발효미생물 은행 구축

가. 발효미생물실 균주 은행의 누적 균주는 총 6,978주(16~20)분리 저장하였다. 균주 분리 내용을 세균 2,481주, 효모 4,465주, 곰팡이 10주를 분리하였고, 균주 동정을 956주(14%)이다. 유산균(258), 효모(133), 초산균(108)으로 동정되었다.

나. 2017년 수집한 발효식품으로부터 총 60점의 미생물을 분리하였으며, 효모(13점), 고초균(27점), 유산균(20점)으로 동정하였다.

다. 분리한 효모는 *Saccharomyces servazzii*와 *Kazachstania servazzii* 종으로 확인 되었음. 고초균은 주로 서브틸리스와 리케니포니스 종으로 확인되었고, 유산균은 씨트리엄 종과 메센테로이드 종으로 확인되었다.

- 라. 2018년도에는 84점의 유전자원을 수집하여 총 617주의 미생물(효모 569주, 유산균 183주, 세균 65주)을 확보하였다.
- 마. 2019년도에는 발효식품, 양생화, 벗짚 등 79점의 유전자원으로부터 균주 485주를 신규 분리·확보하였다.
- 바. 2020년도에는 발효식품, 잡곡류 등유전자원으로부터 균주 500주를 신규 분리·확보하였다.

## (시험 2) 종균 실용화를 위한 보급

- 가. *Bacillus subtilis* (AFY-2) 6건, *Leuconostoc mesenteroides* (AFY-3) 3건, *Acetobacter pasteurianus* (AFY-4) 1건 총 11건을 실시하였다.
- 나. 2017년 김치유산균인 *Leuconostoc mesenteroides* AFY-3은 동해 락천김치에 청국장 고초균인 *Bacillus subtilis* AFY-2은 봉화 미소왕에 유상기술이전하여 보급하였다.
- 다. 2018년 특허 균주 3종(청국장용 고초균 AFY-2, 김치용 유산균 AFY-3, 식초용 초산균 AFY-4)에 대하여 2018년도에 4개소에 유상 기술이전하였다.
- 라. 2019년 청국장용 종균 AFY-2는 전주 우리푸디스에 유상기술이전 하였다.
- 마. 2020년 *Bacillus subtilis* AFY-2를 부일농산에 유상기술이전 하였다.
- 바. 2018년 청국장 제조기술 시범사업으로 선정되어 3년에 걸쳐 31개 업체, 지역별로 경기 5, 강원 6, 충북 7, 충남 6, 전북 2, 전남 4, 경남 2곳에 *Bacillus subtilis* AFY-2을 이용하여 청국장 제조방법에 대한 이론·실습 실시하였고 현장컨설팅도 실시하였다.

## <제2세부과제: 발효식품용 종균 소재 개발>

### (시험 1) 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 확인았다.
- 나. 빵 제조용 효모를 선발하기 위하여 효모 188주에 대하여 저온 생육, 내산성,  $\alpha$ -아밀라아제, 프로테아제 효소활성을 평가하였고, 최종적으로 6주의 효모를 선발하였다. 사멸을 방지하리라 판단되었다.
- 다. 유산균 166주에 대하여 내산성,  $\alpha$ -아밀라아제, 프로테아제 효소활성, 저온생육, EPS 생성에 대하여 평가하여 최종적으로 총 8주의 유산균을 선발하였다
- 라. 빵 제조용 효모를 선발하기 위하여 효모 188주에 대하여 저온 생육, 내산성,  $\alpha$ -아밀라아제, 프로테아제 효소활성을 평가하였고, 최종적으로 6주의 효모를 선발하였다.

### (시험 2) 종균 제조 공정 개선

- 가. 아포형 종균과 영양형 종균의 내열성을 비교 검증한 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 생각되었다.

- 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 판단되었다.
- 다. 접종농도(0.1, 1, 2, 5, 10), 품종(대립종 대원, 소립종 풍산), 온도(37℃ 40℃, 43℃)를 달리한 결과, 접종농도는 0.1%, 온도는 대립종 37℃, 소립종은 40℃로 나타났다.

**(시험 3) 생청국용 발효적성 우수 콩 품종**

- 가. 생청국 제조시 가장 많이 사용되는 소립종(풍산나물)과 대립종(대원, 청아), 유색콩(흑청, 약선)을 이용하여 생청국을 제조시 소립종과 비교하여 대립종과 유색콩은 아미노태질소 함량이 현저히 낮은 것으로 나타나 콩 종류에 따라 생청국 발효에 영향을 미치는 것을 확인하였음을 명을 방지하리라 판단되었다.

**(시험 4) 혼합배양을 통한 발효종 제조조건 확립**

- 가. 3차년도에 선발한 발효종(효모, 유산균)을 이용하여 혼합배양을 통한 제빵 적성을 비교 평가하였다.
- 나. 시판효모에 비하여 내산성 효모인 121번 효모가 발효 속도는 느리지만 후기로 갈수록 반죽 부피가 더 증가하는 것을 확인하여 제빵용 효모로서 CO2 생성이 원활히 이루어짐을 확인하였다.
- 다. 유산균과 혼합배양을 통하여 곰팡이 발생이 지연되는 것을 확인하였고, 경도가 시판효모로만 제조한 빵에 비하여 더 낮은 것을 확인하여 노화지연 효과가 있는 것을 확인하였다.

**(시험 5) AFY-3 종균 사용 가이드라인 설정**

- 가. 총각김치의 숙성도는 균주와 상관없이 12일을 기준으로 과숙된 김치 단계로 변화였고, 오래 저장할수록 대조구 보다는 과숙의 정도가 심하지 않았다.
- 나. 김치의 유산균수는 접종량에 따른 차이는 미비하였고, 숙성기간에 20일을 전 후 기전으로 처리구 상관없이 감소하였다.

**(시험 6) 제빵용 종균 제조조건 확립**

- 가. 선발효모 121번과 유산균 111번을 혼합배양 한 반죽의 팽창이 잘되었고, 반죽 및 빵에서 PH가 낮은 것으로 확인 되었다.
- 나. 유산균과 혼합배양을 통하여 곰팡이 발생이 지연되는 것을 확인되었다.

**5 인용문헌**

이성훈, 이소영. 2011. 전통식품 미생물 활용과 미생물 유전자은행. p74-79. Bulletin of Food Technology. 24(1):74-79.  
 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.
- Chang, J. Y., & 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. *J Food Sci*. 75(2), M103-110.
- Chang, J. Y., & Chang, H. C. 2011. Growth inhibition of foodborne pathogens by kimchi prepared with bacteriocin-producing starter culture. *J Food Sci*. 76(1), M72-78.
- Cho, C. W., Han, C. J., Rhee, Y. K., Lee, Y. C., Shin, K. S., Shin, J. S., Hong, H. D. 2015. Cheonggukjang polysaccharides enhance immune activities and prevent cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Int J Biol Macromol*. 72, 519-525.
- Moon JY, Kwon SW, Hong SB, Seok SJ, Kim JS, Kim SJ. 2015. Characteristics and functional analysis of *Bacillus* strains from the fermented soybean products, Cheonggukjang. *Korean J Microbiol*. 51:300-307.
- Baek SY, Lee YJ, Yun HJ, Park HY, Yeo SH. 2014. Characterization of alkaline cellulase from *Bacillus subtilis* 4-1 isolated from Korean traditional soybean paste. *Korean J Food Preserv*. 21:442-450.
- Chang M, Chang HC. 2007. Characteristics of bacterial-koji and deonjang (soybean paste) made by using *Bacillus subtilis* DJI. *KorJ Microbiol Biotechnol*. 35:325-333.
- Cho KM, Lee JH, Yun HD, Ahn BY, Kim H, Seo WT. 2011. Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolic acids) during Cheonggukjangsoybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. *J Food Compos Anal*. 24:402-410
- Kim JH, Hwang CE, Lee CK, Lee JH, Kim GM, Jeong SH, Shin JH, Kim JS, Cho KM. 2014. Characteristics and antioxidant effect of garlic in the fermentation of Cheonggukjang by *Bacillus amyloliquefaciens* MJ1-4. *J Microbiol Biotechnol*, 24:959-968.
- Watanabe J, Kawabata J, Kurihara H, Niki R. 1997. Isolation and identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from tochucha (*Eucommia ulmoides*). *Biosci Biotech Biochem*, 61: 177-178.

## 6 연구결과 활용

연도(연차)	활용방안	제 목
2016(1년)	기술이전	(신규) 비독성 청국장 종균(AFY-2), 봉화 미소왕어린잎채소 동계재배용 향채류 선발(중양) (갱신) 아삭한 김치용 유산균(AFY-3), 동해 락천식품
	사업화	아삭한 김치용 유산균(AFY-3), 동해 락천식품
2017(2년)	기술이전	유상기술이전(평창 부일농산, 동해 락천식품)
	사업화	평창 부일농산

연도(연차)	활용방안	제 목
2018(3년)	기술이전	- AFY-2: 레인보우바이오테크(춘천) - AFY-3: 케이엔비푸드(정선), 레인보우바이오테크(춘천) - AFY-4: 농업법인부일농산(평창)
	사업화	AFY-2 균주 사업화 매출증빙(부일농산)
	논문게재	첨가물을 혼합한 김치와 된장의 이화학적 기능성에 대한 연구(강원농업생명환경연구)
2019(4년)	기술이전	- AFY-2 고초균: 우리푸드스(전주)
	사업화	농업법인 부일농산(평창)
	특허등록	AFY-4 초산균: 특허
	DB구축	발효미생물 DB구축 485점
	홍보	생청국 종균 AFY-2(월간 새농사)
	컨설팅	신기술보급사업 현장컨설팅 3회, 경기(안산), 전남(순천, 장흥)
2020(5년)	DB구축	발효미생물 은행 구축을 위한 DB 구축
	기술이전	- AFY-2: 부일농산 등 14건 - 포장용 용기 상표등록: 오대서주양조장
	홍보	한국농촌경제신문 등 8건
	생물자원	- Saccharomyces cerevisiae AFY-8 - Pediococcus pentosaceus AFY-9
	사업화실적	기술이전 업체 매출실적

성과지표명	연 도	1년차 (2016)		2년차 (2017)		3년차 (2018)		4년차 (2019)		5년차 (2020)		계	
		목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적	목표	실적
논문 게재	SCI												
	비SCI					1							1
기술이전		1	1	1	2	1	4	1	1	1	15	5	23
생물자원기탁											2		2
홍 보									1		8		9
DB 구축								485	494	500	500	985	994
특허등록									1				1
컨설팅									3				3
사업화		1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	5	6
계		2	2	2	4	2	6	487	501	502	502	906-	1039-

## 7 연구원 편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도				
					'16	'17	'18	'19	'20
과제책임자	농식품연구소	농업연구사	이하연	과제 총괄		○	○	○	○
1세부책임자	농식품연구소	농업연구사	이하연	세부주관 수행		○	○	○	○
연구원	인삼약초연구소	농업연구사	이재형	과제 총괄	○				
	농식품연구소	농업연구사	임재길	평가분석 지원					
	농식품연구소	농업연구사	박지선	평가분석 지원	○			○	
	농식품연구소	공무직	고윤지	시험수행 및 평가					
	농식품연구소	공무직	변금옥	시험수행 및 평가					○
2세부책임자	농식품연구소	농업연구사	임재길	세부주관 수행			○	○	○
연구원	농식품연구소	농업연구사	이하연	평가분석 지원	○			○	
	농식품연구소	농업연구사	박지선	평가분석 지원	○			○	
	농식품연구소	공무직	고윤미	시험수행 및 평가			○	○	○
	농식품연구소	공무직	윤서현	시험수행 및 평가					○