(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0034493
(43) 공개일자 2017년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23B 7/10* (2006.01)
A23L 19/20 (2016.01) *C12N 9/38* (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23B 7/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0132807
(22) 출원일자 2015년09월21일
심사청구일자 2015년09월21일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
목포대학교산학협력단
전라남도 무안군 청계면 영산로 1666
(72) 발명자
김현진
경상남도 진주시 초북로 77, 301동 903호
김동욱
경상남도 통영시 광도면 죽림1로 41-42, 112동 1203호 (통영죽림1차푸르지오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

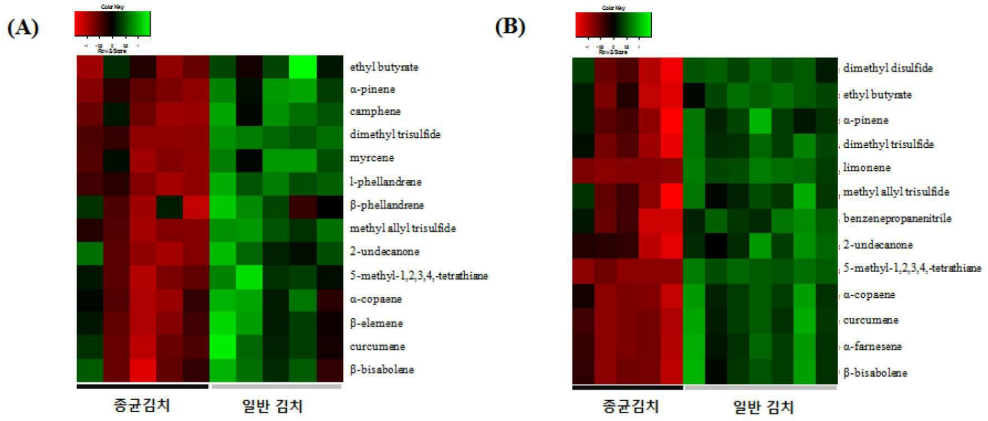
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **동치미에서 분리한 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 우수한 류코노스탁 메센테로이드 P30 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 동치미에서 분리한 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 우수한 류코노스탁 메센테로이드 P30 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 균주를 김치 제조시 스타터 균주로 사용한다면 냄새를 줄여 관능성이 우수한 김치를 제조할 수 있어 보다 넓은 소비자층의 확보에 유리하고, 장기 유통 과정에서 맛이 변질되거나, 과숙성 또는 산패되어 먹을 수 없게 되는 등 김치 상품의 저장성 저하의 걸림돌을 발효 과정의 제어를 통해 극복함으로써 김치 품질을 표준화할 수 있어 식품 산업에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23L 19/20 (2016.08)
C12N 9/2465 (2013.01)
C12N 9/2471 (2013.01)
C12Y 302/01021 (2013.01)
C12Y 302/01023 (2013.01)
A23Y 2260/35 (2013.01)
C12R 1/01 (2013.01)

(72) 발명자
구은지
경상북도 포항시 북구 흥해읍 한동로 5, F동 112호 (대성아파트)
김정환
경상남도 진주시 금산면 중장로154번길 49, 101동 503호 (진주금산두산위브아파트)
이강욱
경상남도 진주시 진주대로 501 경상대학교

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20130290
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원
연구사업명 수산연구센터지원사업
연구과제명 세계적으로 희소가치를 갖는 한국산 천일염 및 그 가공염의 우수성 구명 및 새로운 부가가치 창출
기 여 율 1/1
주관기관 목포대학교 산학협력단
연구기간 2013.12.24 ~ 2020.10.23

명 세 서

청구범위

청구항 1

동치미에서 분리한 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 우수한 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 기탁번호 KFCC11617P로 기탁된 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 당 분해능은 β-갈락토시다제(β-galactosidase) 및 β-글루코시다제(β-glucosidase) 분비에 의해 이루어지는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 김치 제조용 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항의 균주를 배양하는 단계를 포함하는 김치 제조용 조성물의 제조방법.

청구항 6

제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 김치 발효용 스타터(Starter).

청구항 7

제1항 또는 제2항의 균주 또는 이의 배양액을 스타터 균주로 이용한 김치의 제조 방법.

청구항 8

제7항의 제조 방법에 의해 제조된 김치.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 동치미에서 분리한 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 우수한 류코노스탁 메센테로이드 P30 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리나라 고유의 대표적인 전통발효식품 중 상품화되고 있는 김치의 경우, 일정한 품질의 김치를 제공할 수 없고, 장기 유통 과정에서 맛이 변질되거나, 과숙성 또는 산패되어 먹을 수 없게 되는 등 상품으로써 가치가 극감하는 저장성이 낮은 문제가 있었다. 저장성을 연장시키기 위한 다양한 방법이 시도되었으며, 김치에서 유래되는 유산균을 분리한 후, 김치 제조시 스타터(starter)로 첨가함으로써 김치의 맛과 발효를 조절하려는 연구들이 많이 진행되고 있다.

[0003] 또한, 일반적으로 숙성이 되지 않은 상태에서 저장할 경우 저장성은 향상되나 관능이 매우 낮으며, 과다 숙성된 김치를 저장할 경우 저장성 및 관능이 모두 낮은 문제점이 있었다. 한편, 김치의 상업적 생산이 본격화되면서 김치발효에 관여하는 미생물을 효과적으로 제어하여 풍미를 향상시키고 가식기간을 연장시키려는 연구가 진행되고 있으며, 방사선 조사, 열처리, 고압처리와 같은 물리적 방법을 적용한 결과, 발효 초기 미생물의 생육저해를

통한 발효 지연효과가 보고되었다. 그러나 물리적 처리에 의한 품질 저하와 영양 손실의 가능성이 크고, 설비투자에 따른 생산비용 증가가 발생할 수 있다. 현재, 이를 해결하고자 종균(starter)을 이용하여 김치발효를 제어하려는 연구가 다수 진행되고 있으나, 적절한 종균의 확보가 미흡하고, 종균을 적용한 초기 연구에서 김치발효 미생물의 천이 및 역할에 대한 충분한 지식이 확보되지 못한 상태에 있다.

[0004] 한편, 한국공개특허 제2014-0098708호에서는 '신규한 스타터 균주 및 이를 이용한 김치를 포함하는 기능성 발효식품의 제조방법'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2015-0075994호에서는 '내산성이 우수하고 저 산생성능을 갖는 류코노스톡 메센테로이드 DSR8985 균주 및 이를 이용한 김치의 제조 방법'이 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '동치미에서 분리한 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 우수한 류코노스탁 메센테로이드 P30 균주 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 김치 품질을 표준화할 수 있으며, 냄새를 줄여 관능성이 우수한 김치를 제조하고자 연구하던 중 김치 제조시 스타터 균주로 사용될 수 있는 류코노스탁 메센테로이드 P30 균주를 분리하였는데, 상기 균주는 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 매우 우수한 효과를 가지는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 동치미에서 분리한 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 우수한 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 김치 제조용 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 김치 제조용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 김치 발효용 스타터(Starter)를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 스타터 균주로 이용한 김치의 제조 방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 김치를 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에서 새롭게 분리한 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주는 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 매우 우수한 효과를 가지는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 균주를 김치 제조시 스타터 균주로 사용한다면 냄새를 줄여 관능성이 우수한 김치를 제조할 수 있어 보다 넓은 소비자층의 확보에 유리하고, 장기 유통 과정에서 맛이 변질되거나, 과숙성 또는 산패되어 먹을 수 없게 되는 등 김치 상품의 저장성 저하의 걸림돌을 류코노스탁 메센테로이드 P30 균주를 이용한 발효 과정의 제어를 통해 극복함으로써 김치 품질을 표준화할 수 있어 식품 산업에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 GC/MS를 이용한 김치의 향기성분을 분석한 결과이다.

도 2는 김치 제조 후 2일 및 6주 동안 발효된 김치 향기성분의 PLS-DA 스코어 플롯(scores plots)(A, C)과 양적 파라미터(quality parameters) 및 순열(permutation) 분석을 이용한 교차 타당성(cross validation)(B, D)를 나타낸다. A, B는 김치 제조 후 2일; C, D는 김치 제조 후 6주.

도 3은 김치 제조 후 2일 발효(A)와 6주 발효(B)된 일반김치와 종균김치의 차이에 관여하는 주요 향기성분의 히트맵(heat map)을 나타낸다.

도 4는 2일간 발효 숙성된 일반김치와 종균김치의 주요 향기성분들의 상대적 정량비교 결과이다.

도 5는 6주간 발효 숙성된 일반김치와 종균김치의 주요 향기성분들의 상대적 정량비교 결과이다.

도 6은 2일간 발효 숙성된 일반김치와 종균김치의 주요 비향기성분들의 상대적 정량비교 결과이다.

도 7은 본 발명을 통해 동치미로부터 분리한 균주의 16S rRNA 유전자 서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 동치미에서 분리한 당분해능, 구연산과 소르비톨 생성능 및 김치 냄새 저감화능이 우수한 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주를 제공한다.

[0015] 본 발명의 상기 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주를 한국미생물보존센터에 2015년 8월 18일자로 기탁되었다(KFCC11617P).

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 당 분해능은 β-갈락토시다제(β-galactosidase) 및 β-글루코시다제(β-glucosidase) 분비에 의해 이루어지는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 김치 제조용 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 균주를 배양하는 단계를 포함하는 김치 제조용 조성물의 제조방법을 제공한다. 상기 균주의 배양 방법은 당업계에 공지된 임의의 방법을 이용할 수 있으며, 특정 방법에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군 중에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 김치 발효용 스타터(Starter)를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 용어 "스타터(starter)"란 식품의 발효에 관여하는 미생물을 포함하는 제제로, 발효식품 제조 시 첨가함으로써 숙성된 식품에서 지배적으로 생장하는 미생물을 말하며, 본 발명의 목적상 스타터란, 발효 식품의 맛을 일정하게 조절하게 할 뿐만 아니라 우수한 관능미를 가질 수 있도록 제공하는 미생물, 즉, 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주를 필수적으로 포함하는 제제를 의미한다.

[0021] 또한, 본 발명에 따른 상기 스타터는 액상 제제, 분말 제제 등으로 제형화 할 수 있으며, 바람직하게는 분말제제로 사용할 수 있다. 이는 스타터 미생물 균주를 발효 식품에 첨가하는 경우 균 배양액에서 분리한 젖은 형태의 균체를 첨가하는 것이 일반적이지만 액상 제형은 보관이 어렵고 유통 중 품질유지가 어려워 이를 상품으로 유통시키기 어려운 단점이 있으나, 분말 제제는 공급, 품질 유지 및 사용이 용이하다는 장점이 있다. 따라서 이러한 분말 제제는 배양된 각각의 균주를 원심분리 등의 방법으로 수집하여 동결 건조시켜 수득할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에서 제공하는 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주는 이를 이용하여 제조된 발효식품 내에서 체내 유용한 유산균의 수를 증가시키는 활성을 갖는 특징이 있다.

[0023] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 본 발명의 균주를 이용하여 제조된 김치 내에서 류코노스탁 메센티로이디스(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주의 총수가 대조군에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 스타터 균주로 이용한 김치의 제조 방법을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 김치를 제공한다. 상기 김치는 배추김치, 무김치, 파김치, 백김치, 열무김치, 깍두기, 동치미, 고들빼기, 갓김치, 나박김치 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0027] **1. 실험방법**

[0028] **가) 김치제조에 사용할 종균 분리 및 동정**

[0029] 동치미는 실험실에서 정제염, 천일염, 그리고 죽염 등을 이용하여 직접 담은 김치를 사용하였으며, 숙성 15일차에 유산균주들을 분리 동정하였다. 각각의 시료에서 동치미 국물을 1 mL을 덜어서 펩톤수를 이용하여 단계 희석을 실시하였다. 이 후, MRS 평판 배지에 도말하여 30℃에서 24시간 배양시킨 후, 각각의 콜로니(colony) 형태에 따라 다양한 종류들을 선별하였다. 분리된 유산균들은 다양한 소금의 종류가 첨가된 MRS 배지에서 배양하여 천일염과 죽염에서 생육이 상대적으로 빠른 균주들을 선별하였으며, 이들 중 하나인 류코노스탁 메센테로이드

(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주를 선택하여 김치 제조에 사용하였다. 류코노스탁 메센테로이드 P30의 동정을 위하여 16S rRNA 시퀀싱을 위하여 배양액 1.5 mL로부터 세포를 회수하여 크로모좀 DNA를 회수하였다. 크로모좀 DNA를 주형으로 하여 16S rRNA 유전자 증폭용 유니버설 프라이머 337F(5'-GAC TCC TAC GGG AGG CWG CAG-3' : 서열번호 1)와 1492R(5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3' : 서열번호 2), 그리고 Takara사의 Ex Taq 효소를 사용하여 PCR을 실시하였다. PCR 조건은 다음과 같다: 변성 - 94℃, 5분; 증폭 - 94℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 7분, 30회; 72℃ 2분 마지막 연장 반응. PCR 결과, 얻은 약 1.0 kb 크기의 PCR 산물을 확인하였고, 전기영동을 통하여 DNA 밴드를 전기영동 젤로부터 분리해 Favogen kit를 이용하여 젤 추출한 뒤 코스모진텍(주)에 시퀀싱 의뢰하였다.

[0030] **나) 종균을 첨가한 김치의 제조**

[0031] 김치 제조시 사용한 천일염은 3년 숙성된 천일염(2012년산, 태평염전)을 구입하고 사용하여 10% NaCl, 4℃에서 약 10시간 동안 절인 후 흐르는 물에서 3회 세척하고 3시간 동안 탈수한 후 사용하였다. 재료의 배합비율은 절임배추 100g당 고춧가루 3.5g, 마늘 1.5g, 생강 0.6g, 젓갈 2.2g, 무 13g, 설탕 1g, 쪽파 2g을 첨가하여 김치를 제조하였다. 이렇게 제조된 김치의 최종 염도는 2.05%(w/v)가 되도록 절임에 사용된 각각의 소금을 사용하여 조정하였다. 김치 제조에 사용된 균체 배양액은 원심분리(6000rpm, 15 min, 4℃)를 실시한 후 멸균수로 2회 세척하여 얻은 균체를 김치 양념에 혼합하였으며, 종균 접종량은 김치 1 g당 약 10^7 CFU가 되도록 첨가하였다. 제조된 김치들은 15℃에서 발효시켜 김치의 pH가 4.1-4.2에 이르면 이를 -1℃(Dimchae DD-1827DFB, Winiamando, Asan, Korea)에서 4개월 동안 보관하면서 시료로 사용하였다.

[0032] **다) 김치 특성 조사**

[0033] 김치 발효 및 저장 기간 동안의 총균수는 PCA(plate count agar: Merck, Dann Stadt, Germany) 배지, 효모수는 YPD(yeast peptone dextrose: BD/Difco, Sparks, MD, USA) 고체배지, 젖산균수는 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe: BD/Difco) 고체배지와 $CaCO_3$가 2% 함유된 MRS 고체배지를 사용하였다. 유산균 중 루코노스탁 속의 선별은 페닐에틸 알콜 수크로스(phenylethyl alcohol sucrose) 고체배지(PES 아가: 수크로스 2%, 트립티케이스 펩톤 0.5%, 효모 추출물 0.05%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.1%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.2%, 페닐에틸 알콜 0.25%, 아가 1.5%, pH 6.8)를 사용하였고, 락토바실러스 속의 선별은 변형된 LBS 고체배지(효모 추출물 0.5%, 글루코스 2%, 트립티케이스 펩톤 1%, 암모늄 시트레이트 0.2%, 소듐 아세테이트 1.5%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0575%, $MnSO_4$ 0.012%, $FeSO_4$ 0.0034%, 소르비탄 모노올레이트(sorbitan monoolate) 0.1%, KH_2PO_4 0.6%, 아세트산 0.25%, 아가 1.5%, pH 5.5)를 사용하였다. 준비된 김치여액은 0.1% 펩톤수로 연속적으로 희석하여, 각각의 평판배지에 플레이트 당 50-80개의 집락이 형성되도록 희석 도말한 후 30℃에서 1-2일간 배양하여 그 균수를 계수하였다.

[0034] 환원당 함량은 DNS(dinitrosalycylic acid) 비색정량법을 사용하여 측정하였다. 시료 1 g을 증류수로 희석하여 여과한 여과액(no. 1, Whatman, Maidstone, UK) 1 mL에 DNS 시약 3 mL를 넣어 혼합하고 끓는 물에 5분간 중탕한 후 식힌 후, 증류수 16 mL로 희석하여 분광광도계로 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 포도당 표준용액을 같은 방법으로 시험하여 표준선을 작성한 후 시료 중의 환원당 함량을 계산하였다.

[0035] **라) 대사체 분석**

[0036] **1) HS-SPME(headspace solid phase microextraction)**

[0037] 김치의 향기성분 분석은 40 mL의 바이알(vial)에 김치 국물 15 mL을 담아 2-페닐에탄올(phenylethanol)을 내부표준(internal standard)으로 하여 30%의 NaCl을 넣어 향기성분의 휘발성을 높여 헤드스페이스(head space)에 포집되도록 하였다. 현탁 배양기에서 40℃에서 30분간 온도평형화 및 향기포집을 한 후 헤드스페이스에 모인 향기를 40℃에서 100um PDMS 화이버를 사용하여 추출하였다. 추출된 향기성분은 바로 GC/MS로 분석하였다.

[0038] **2) 유도체화(Derivatization)**

[0039] 동결건조시킨 김치분말을 내부표준으로서 사용된 글루타르산(glutaric acid)이 들어간 50% 메탄올로 추출하여 40℃ CentriVap vacuum concentrator(LABCONCO Co., Kansas City, MO, USA)로 건조시켰다. 유도체화는 피리딘(pyridine)으로 녹인 메톡시아민 히드로클로라이드(methoxyamine hydrochloride)를 넣고 37℃에서 90분간 반응시켰다. 상온으로 냉각 후 BSTFA(1% TMCS)을 첨가하고 70℃에서 30분간 반응시킨 유도체화된 추출물은 바이알에 옮겨 담아 GC/MS로 분석하였다.

[0040] **3) GC/MS을 이용한 대사체 분석**

[0041] 천일염으로 담근 일반김치와 종균김치의 대사체 분석은 Shimadzu GC-2010 plus(Tokyo, Japan)을 이용하였다. 유도체화된 시료 1㎕를 DB-5MS 모세관 컬럼(30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 ㎛ film thickness, aglient Co., PA, USA)에 주입하여 GC/MS 분석을 진행하였다. 비향기성분 시료의 분할 비율(split ratio)은 1:40이고 향기성분의 시료는 1:5 비율로 시료 주입하였다. 캐리어 개스(carrier gas)로서 사용된 헬륨을 0.95 mL/min 유속으로 흘려보냈으며 주입 온도는 비향기성분의 경우 200℃로, 향기성분의 경우 270℃로 유지하였다. 비향기성분의 컬럼 오븐 조건은 초기 80℃에서 2분간 유지시킨 후 180℃까지 7℃/min으로, 280℃까지 4℃/min으로, 마지막으로 320℃까지 10℃/min의 속도로 올려주었으며, 향기성분의 컬럼 오븐 조건은 초기 50℃에서 2분간 유지시킨 후 80℃까지 10℃/min으로, 175℃까지 5℃/min으로, 마지막으로 320℃까지 10℃/min으로 상승시킨 후 3분간 유지시켰다. 컬럼 오븐 온도를 80℃로 2분간 유지시킨 후 10℃ min^{-1} 비율로 320℃까지 증가시키고 동일 온도에서 6분간 유지시켰다. 배지 대사체 분석을 위해 초기 오븐 온도를 70℃로 2분간 유지시킨 후 10℃ min^{-1} 비율로 320℃까지 증가시키고 동일 온도에서 5분간 유지시켰다. GC 컬럼을 통해 분석되어 나오는 물질들은 EI(electron impact) ionization mode(70 eV)로 작동하는 Shimadzu GCMS-TQ 8030(Tokyo, Japan)로 분석하였다. 이온 소스와 인터페이스 온도는 각각 230℃와 280℃였으며 GC 컬럼을 통해 분석되어 나오는 물질들은 full scan mode(m/z 45-550)로 모니터링 되었으며 스캔 시간과 스캔 속도는 각각 0.3 sec와 2000 u/sec이였다. 검출기 전압은 0.1 kV이고 임계점은 100를 사용하였다. 분석된 물질의 동정을 위해 GC/MS 데이터베이스(NIST 11과 Wiley 9 mass spectral libraries)와 *n*-알칸(*n*-alkanes)을 이용하여 계산된 RIs(retention indices)와 KIs(kovalts indices)를 이용하였다.

[0042] **4) 데이터 프로세싱**

[0043] GC/MS로 분석된 물질들의 질량 스펙트럼(mass spectra)의 디콘볼루션(deconvolution), 데이터 수집, 정렬 및 정규화(normalization)는 AnalyzerPro software(Spectralworks Ltd, UK)를 이용하여 데이터 프로세싱을 진행하였다. 분석된 물질들의 피크를 다음과 같은 조건에서 디콘볼루션된 데이터를 수집하였다 : area threshold 6000, height threshold 1, signal to noise 10, width threshold 0.01, scan windows 5 및 smoothing 5. 수집된 데이터는 retention time window 0.1±0.05 분으로 정렬하였고 질량 스펙트럼은 내부표준인 디시클로헥실프탈레이트(dicyclohexyl phthalate)를 이용하여 정규화하였다.

[0044] **5) 통계 분석**

[0045] 데이터 프로세싱된 균체 및 배지의 GC/MS 데이터 세트는 SIMCA-P^{+} 버전 12.0.1(Umetrics, Umea, Sweden)를 이용하여 다변량통계 분석하였다. 시험군 사이의 차이는 PCA(principal component analysis)와 PLSDA(partial least squares discriminant analysis)를 이용하여 시각화하였다. 사용된 PLS-DA 모델은 R_2X, R_2Y, Q_2Y 값으로 평가하였고 순열검정법(permutation test)으로 교차 검증하였다.

[0046] 정규화(Normalization)된 대사체들의 GC/MS 농도는 SPSS 17.0(SPSS Inc., Chicago, IL) 통계 프로그램의 Duncan's test(p<0.05)를 실시하여 각 시료간의 유의차를 5% 수준에서 검증하였다. 시료들 사이의 차이에 관여하는 대사체들(p<0.05)은 R-project version 2.13.2로 작성된 히트 맵(heat map)으로 비교 분석하였다. GC/MS 분석 중 기계적인 오류를 줄이기 위해 모든 GC/MS 분석은 엑셀을 이용하여 시료들을 무작위로 배치하여 분석하였으며 분석의 QC(quality control)를 위해 모든 시험군을 혼합한 시료를 본 시료분석 전·후 및 매 7개의 시료분석 후 동일 분석조건으로 분석되었다.

[0047] **실시예 1. 동치미로부터 분리한 균주의 동정 결과**

[0048] PCR을 통해 동치미로부터 분리한 균주의 16S rRNA 유전자는 1014bp의 증폭산물을 얻었으며, 이는 PCR 정제 키트(FavorPrep PCR purification mini kit, Favorgen, Ping-Tung, Taiwan)를 사용하여 정제한 후, 코스모진텍(주)에 의뢰하여 시퀀싱하였다. 시퀀싱된 DNA 서열(도 7)은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)에서 제공하는 BLAST 프로그램과 EZ TAXON database (http://www.ezbiocloud.net/eztaxon)를 바탕으로 염기서열의 유사성을 보이는 균주들을 확인하고 동정하였다. 그 결과 류코노스탁 메센테로이드 아종 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroies*)로 100% 동정하였다.

[0049] **실시예 2. 숙성 및 저장 기간 중의 김치 특성 조사**

[0050] 모든 김치 내 총 균수 및 유산균 수는 숙성 후에 급격하게 증가하였다가 이 후, 저장기간이 지남에 따라 점차 감소하는 경향을 보여주었다. 종균을 첨가한 김치 시료에서는 종균 비접종 시료와 비교하여 상대적으로 높은 비율로 루코노스탁(*Leuconostoc*) 속이 검출되고 있었으며, 이는 종균이 루코노스탁(*Leuconostoc*) 속이기 때문인 것으로 예상할 수 있다. 일반적으로 김치 내 루코노스탁(*Leuconostoc*) 속과 같은 동종발효 김치 유산균의 비율이 높아지는 것은 산도의 증가와 관련이 있다. 즉, 천일염 사용 김치에서 유산균 생육에 적합한 환경이 형성되므로, 김치에 접종된 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30과 같은 이종 발효 유산균이 발효 초기에 빨리 우점으로 차지하게 된 것으로 생각된다.

표 1

[0051] **김치 숙성 및 저장 기간 내의 균총 변화**

Micro population	김치	숙성 후 2일	저장 6주
김치 내 총 균수 (Log CFU/g)	일반김치	8.97 ±0.03	9.01 ±0.03
	종균김치	9.06 ±0.03	9.13 ±0.02
김치 내 유산균수 (Log CFU/g)	일반김치	8.95 ±0.02	8.89 ±0.03
	종균김치	9.05 ±0.01	9.08 ±0.03

[0052] 김치의 환원당은 주로 김치 미생물의 탄소원으로 이용되며, 김치의 품질 및 맛 등에 영향을 미친다. 김치 시료의 환원당을 조사한 결과를 표 2에 나타내었다. 숙성 후 증가하였던 환원당은 저장 기간이 지남에 따라 점차 감소하는 경향을 보여주고 있으며, 종균을 접종한 김치에서는 그 차이가 훨씬 크다는 것을 알 수 있다. 숙성 후 환원당이 증가한 것은 미생물에 의해 소모되는 양보다 더 많은 다당류가 분해되어 환원당이 생성된 것으로 보인다. 또한 저장 기간이 지남에 따라 감소하는 것은 소모되는 양이 상대적으로 더 많기 때문이며, 특히 종균 접종구에서 더 크게 감소한 것은 접종한 종균이 더 빠르게 증식하면서 상대적으로 더 많은 양의 환원당을 소모한 것이기 때문으로 예상된다.

[0053] 또한, 본 발명의 류코노스탁 메센테로이드(*Leuconostoc mesenteroides*) P30 균주의 당 분해능을 조사하기 위해 β-갈락토시다제 및 β-글루코시다제의 분비 활성을 조사한 결과, 각각 89.46±1.18(U/mg of protein), 151.98 ±1.19(U/mg of protein)로 β-글루코시다제 활성의 경우 양성 대조구인 *W. confusa* 30 균주보다 훨씬 높은 수치를 나타내었다.

표 2

[0054] 김치 숙성 및 저장 기간 내의 환원당의 변화

김치	환원당 함량(mg/김치 g당)	
	숙성 후	저장 6주
일반김치	5.81±0.19	4.38±0.42
종균김치	8.02±0.19	2.64±0.12

표 3

[0055] β-갈락토시다제 및 β-글루코시다제 활성

	β-갈락토시다제 (U/mg of protein)	β-글루코시다제 (U/mg of protein)
L. mesenteroides P30	89.46 ±1.18	151.98 ±1.19
Weissella confusa 30[1)]	131.88 ±3.08	117.45 ±2.24
Lactococcus lactis LM0230[2)]	32.54 ±0.75	30.04 ±1.93

[0056] [1)] *Weissella confusa* 30 : 양성 대조구

[0057] [2)] *Lactococcus lactis* LM0230 : 음성 대조구

[0058] 또한, 본 발명에서는 일반김치와 종균김치의 향기성분을 GC/MS를 이용하여 분석하였고(도 1), 두 김치를 다변량 통계분석으로 분석한 결과 질적 파라미터(quality parameters)와 순열(permutation) 분석(도 2B 및 도 2D) 결과 실험을 진행하는데 있어서 통계적으로 전혀 문제가 없었으며, 덜익은 김치(2일 발효)와 묵은 김치(6주 발효)에서 일반김치와 종균김치가 뚜렷하게 서로 분리되는 것을 확인할 수 있었다(도 2A 및 도 2C).

[0059] 또한, 2일차와 6주차의 향기성분을 히트맵(도 3A 및 도 3B)과 정량그래프 (도 4 및 도 5)로 나타내었을 때 종균김치의 향기성분이 덜 익은 김치(2일 발효)뿐만 아니라 묵은 김치(6주 발효)에서도 일반김치보다 감소하는 경향을 보였으며, 일반성분을 GC/MS로 분석하여 정량 그래프로 나타낸 결과(도 6)에서는 일반김치에 비해 종균 김치에서 더 많은 당을 분해하였고 구연산(citrate)과 소르비톨(sorbitol)의 생산량이 크게 증가한 것이 확인되었다. 또한, 붉은색은 감소하는 경향을 보여주고 있으며 초록색은 증가하는 경향을 보여주고 있다. 종균김치의 향기성분이 덜익은 김치(2일 발효) 뿐만 아니라 묵은 김치(6주 발효)에서도 일반김치보다 감소하는 경향을 보였다.

수탁번호

[0060]

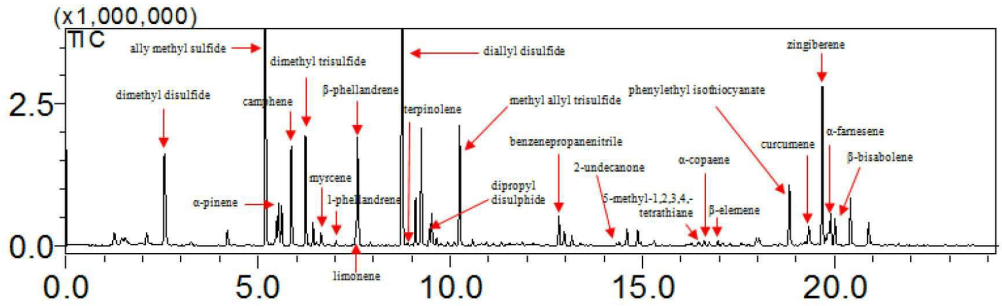
기탁기관명 : 한국미생물보존센터

수탁번호 : KFCC11617P

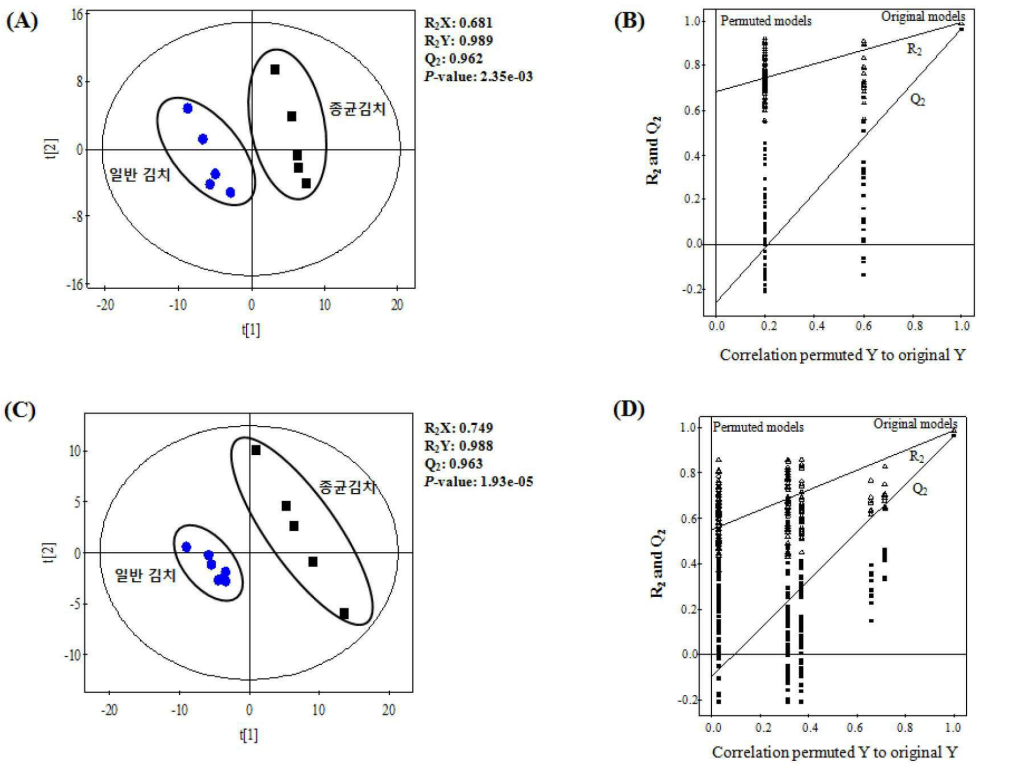
수탁일자 : 20150818

도면

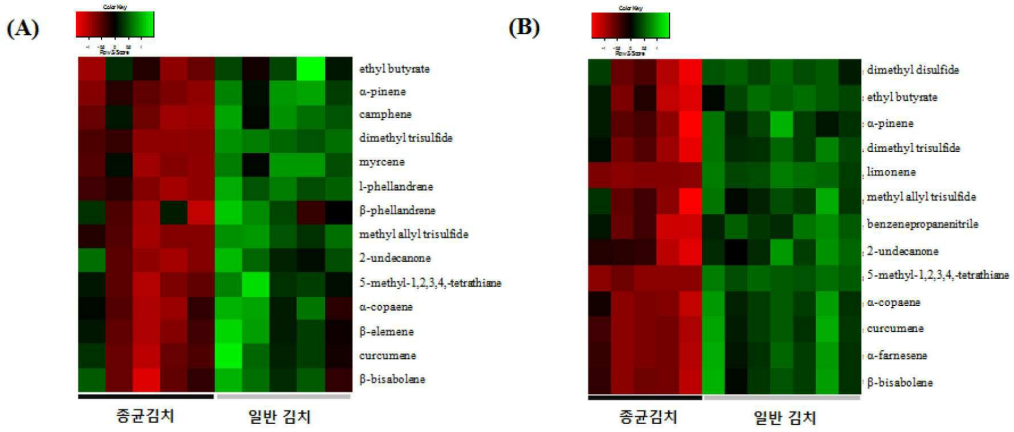
도면1



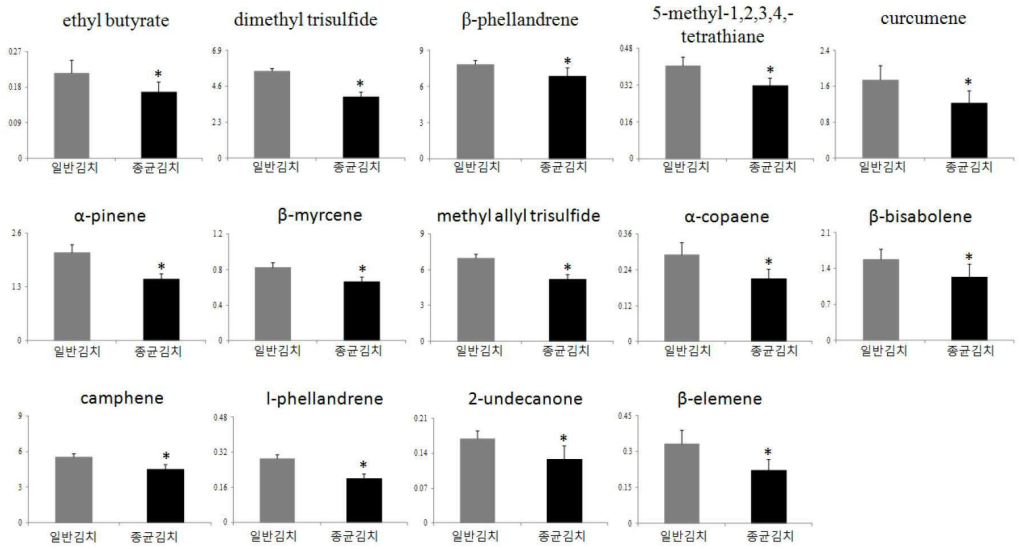
도면2


(A)
R2X: 0.681
R2Y: 0.989
Q2: 0.962
P-value: 2.35e-03
증균김치
일반 김치
t[1]
t[2]
(B)
Permuted models
Original models
R2
Q2
R2 and Q2
Correlation permuted Y to original Y
(C)
R2X: 0.749
R2Y: 0.988
Q2: 0.963
P-value: 1.93e-05
증균김치
일반 김치
t[1]
t[2]
(D)
Permuted models
Original models
R2
Q2
R2 and Q2
Correlation permuted Y to original Y

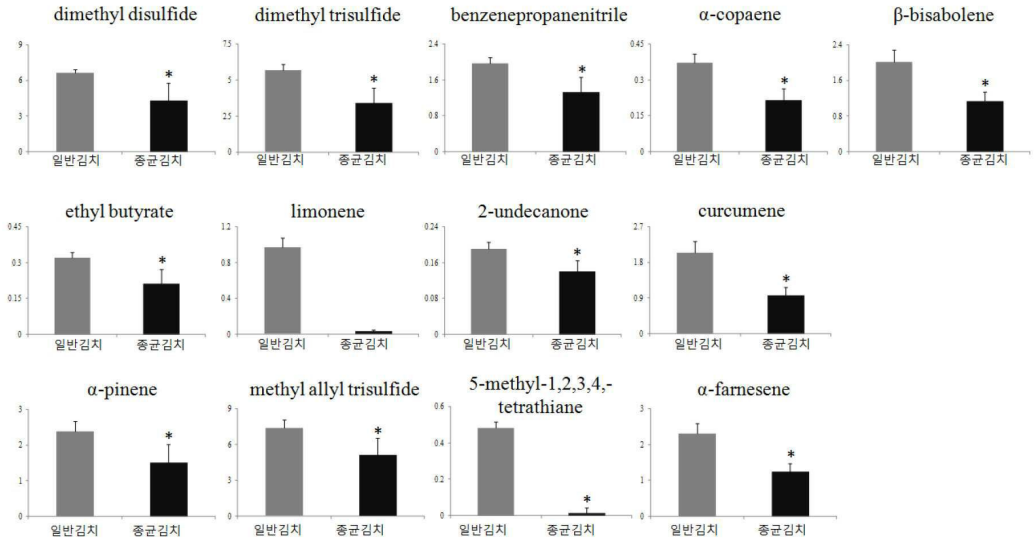
도면3


(A)
ethyl butyrate
α-pinene
camphene
dimethyl trisulfide
myrcene
l-phellandrene
β-phellandrene
methyl allyl trisulfide
2-undecanone
5-methyl-1,2,3,4,-tetrathiane
α-copaene
β-elemene
curcumene
β-bisabolene
증균김치
일반 김치
(B)
dimethyl disulfide
ethyl butyrate
α-pinene
dimethyl trisulfide
limonene
methyl allyl trisulfide
benzenepropanenitrile
2-undecanone
5-methyl-1,2,3,4,-tetrathiane
α-copaene
curcumene
α-farnesene
β-bisabolene
증균김치
일반 김치

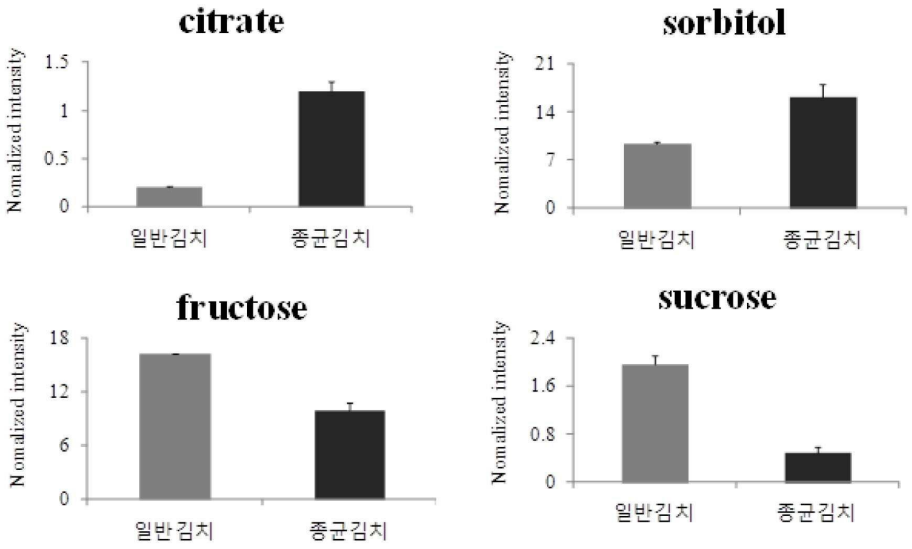
도면4


ethyl butyrate
dimethyl trisulfide
β-phellandrene
5-methyl-1,2,3,4,-tetrathiane
curcumene
α-pinene
β-myrcene
methyl allyl trisulfide
α-copaene
β-bisabolene
camphene
l-phellandrene
2-undecanone
β-elemene
일반김치
종균김치

도면5


dimethyl disulfide
dimethyl trisulfide
benzenepropanenitrile
α-copaene
β-bisabolene
ethyl butyrate
limonene
2-undecanone
curcumene
α-pinene
methyl allyl trisulfide
5-methyl-1,2,3,4,-tetrathiane
α-farnesene
일반김치
종균김치

도면6



도면7

GTGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAAGAACAGCTAGAATAGGAAA
TGATTTTAGTTTGACGGTACCATACCAGAAAGGGACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGT
AATACGTATGTCCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTTATTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAAACTGGTTAACTTGAGTGC
AGTAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGT
GGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGCAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAG
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAACACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCT
CTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAAGTGTTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT
CAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCTTCGGAGA
CAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCAGATGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGT
GACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAGATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACA
CACGTGCTACAATGGCGTATACAACGAGTTGCCAACCCGCGAGGGTGAGCTAATCTCTTAAAGT
ACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGA

서 열 목 록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

Mokpo National University Industry-Academia Cooperation Group

<120> Leuconostoc mesenteroides P30 strain having activity of sugar hydrolysis, citrate and sorbitol production and Kimchi odor reduction from dongchimi and uses thereof

<130> PN15259

<160> 2

<170> KoPatentIn

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gactcctacg ggaggcwgca g 21

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggttaccttg ttacgactt 19