



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2020年 2月

碩士學位 論文

저온발효 김치로부터 분리된
저온발육 유산균의 특성 규명 및
안전성 평가

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

徐芮眞

저온발효 김치로부터 분리된
저온발육 유산균의 특성규명 및
안전성 평가

Characterization and safety assessment of
psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from
kimchi fermented at low temperature

2020年 2月 25日

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

徐芮眞

저온발효 김치로부터 분리된
저온발육 유산균의 특성 규명 및
안전성 평가

指導教授 張 海 春

이 논문을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함


2019年 10月


朝鮮大學校大學院


食品營養學科

徐 芮 眞

徐芮眞의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 김복희 

委員 조선대학교 교수 이주민 

委員 조선대학교 교수 장해춘 

2019년 11월

朝鮮大學校大學院

목 차

LIST OF TABLES	IV
LIST OF FIGURES	V
ABSTRACT	VII
제 1장 서론	1
제 2장 실험 재료 및 방법	4
제 1절 시판 저온발효 김치의 수집 및 분석	4
1. 김치 시료의 준비	4
2. 김치의 이화학적 특성 분석	4
3. 배양학적 방법을 통한 미생물 분석	7
가. 사용 균주 및 김치	7
나. Genomic DNA 추출 및 PCR을 통한 증폭	9
다. DGGE(Denaturing gradient gel electrophoresis)을 통한 김치의 미생물 분석	10
제 2절 저온 발육 유산균의 분리 및 동정	11
1. 저온 발육 균주의 분리	11
2. 분리 균주의 동정	11
가. 16S rRNA gene sequence 분석	11
나. 생화학적 특성 분석	12
제 3절 분리 유산균의 배양학적 특성 규명	13

1. 사용균주 및 배지	13
2. 배양온도에 따른 생육도	13
3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도	13
제 4절 분리 유산균의 안전성 평가	15
1. 용혈성 검사	15
2. 효소활성	15
3. 항생제 내성	15
제 3장 실험 결과 및 고찰	17
제 1절 시판 저온발효 김치의 수집 및 분석	17
1. 김치의 저장온도 및 기간 분석	17
2. 김치의 이화학적 특성 분석	17
3. 비배양학적 방법을 통한 미생물 분석	20
제 2절 저온 생육능 균주의 분리 및 동정	23
1. 저온 발육 균주의 분리	23
2. 분리 균주의 동정	29
가. 16S rRNA gene sequence 분석	29
나. 생화학적 특성 분석	29
제 3절 분리 유산균의 배양학적 특성 규명	34
1. 배양온도에 따른 생육도	34
가. <i>Leuconostoc carnosum</i> 의 배양온도에 따른 생육	34
나. <i>Leuconostoc inhae</i> 의 배양온도에 따른 생육	34
다. <i>Lactobacillus algidus</i> 의 배양온도에 따른 생육	35
라. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmatocum</i> 의 배양온도에 따른 생육	37

마. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> 의 배양온도에 따른 생육.....	39
2. 배지의 초기 pH에 따른 생육도	41
가. <i>Leuconostoc carnosum</i> 의 초기 pH에 따른 생육.....	41
나. <i>Leuconostoc inhae</i> 의 초기 pH에 따른 생육.....	41
다. <i>Lactobacillus algidus</i> 의 초기 pH에 따른 생육.....	41
라. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmatocum</i> 의 초기 pH에 따른 생육.....	43
마. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> 의 초기 pH에 따른 생육.....	43
제 4절 분리 유산균의 안전성 평가.....	46
1. 용혈성 검사.....	46
2. 효소활성	46
3. 항생제 내성	46
제 4장 결론	51
제 5장 참고문헌	54

LIST OF TABLES

Table 1. Product name of kimchi collected from 9 regions.....	6
Table 2. List of lactic acid bacteria (LAB) used PCR-DGGE.....	8
Table 3. List of LAB used in this study.....	14
Table 4. Storage temperature and aging period of product kimchi.....	18
Table 5. Chemical properties of products kimchi.....	19
Table 6. Naming of strains isolated from kimchi.....	26
Table 7. Morphological characteristics and catalase test of the isolated strains.....	27
Table 8. Identification of strains isolated from low temperature fermented kimchi.....	31
Table 9. Biochemical characteristics of LAB isolated from low temperature fermented kimchi.....	32
Table 10. Enzymatic activities of psychrotrophic LAB by API zym analysis	49
Table 11. Minimum inhibitory concentrations(MIC) of antibiotics for psychrotrophic LAB.	50

LIST OF FIGURES

Figure 1. Kimchi sampling locations.....	5
Figure 2. DGGE profile of eleven LAB.....	21
Figure 3. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from seven product kimchi.....	22
Figure 4. Toothpick of fifteen strain isolated low temperature fermented kimchi	24
Figure 5. Gram staining and microscopic observation of isolated strains.....	28
Figure 6. Effect of temperature on <i>Leuconostoc carnosum</i> , <i>Leuconostoc inhae</i> , <i>Lactobacillus algidus</i> growth.....	36
Figure 7. Effect of temperature on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> growth.....	38
Figure 8. Effect of temperature on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> growth.....	40
Figure 9. Effect initial medium pH on <i>Leuconostoc carnosum</i> , <i>Leuconostoc inhae</i> , <i>Lactobacillus algidus</i> growth.....	42
Figure 10. Effect initial medium pH on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> growth.....	44
Figure 11. Effect initial medium pH on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> growth.....	45

Figure 12. Hemolysis test of psychrotrophic LAB and *B. cereus* KCTC
3624(Control)..... 48

ABSTRACT

Characterization and safety assessment of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi fermented at low temperature

Ye Jin Seo

Advisor : Prof. Chang Hae Choon, Ph. D.
Department of Food and Nutrition,
Graduate School of Chosun University

In this study, low-temperature fermented kimchi was collected from nine regions in Korea. Storage temperature and aging period of product kimchi were analyzed and chemical properties were measured. DGGE profile was analyzed for 6 kinds of lactic acid bacteria(LAB) and 5 kinds of LAB isolated from low temperature kimchi. DGGE analysis was performed on the seven kimchi collected. *Weissella koreensis* and psychrotrophic *Leuconostoc* sp. band were observed in seven kimchi and *Lactobacillus sakei* band were observed in six kimchi. Fifteen kinds of psychrotrophic lactic acid bacteria were isolated and their characteristics were confirmed. Gram stain, catalase test, morphological observation and biochemical properties with API 50 CHL kit were performed. When 16S rRNA gene sequences of fifteen isolates were compared with type strains, one strain was identified as *Leuconostoc carnosum* NRIC 1722T, two as *Leuconostoc inhae* IH003^T, and two as *Lactobacillus algidus* strain M 6 A9T, five as *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* POUF4d^T, five as *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* strain TB 1-10^T. The effect of initial temperature(5~30°C) and initial pH(pH 4~10) on LAB growth were confirmed for selected strains and they showed optimal growth ability at 15-25°C and pH 7-9. Safety results, all of them didn't show α , β type hemolysis and harmful enzyme

activity when tested by API zym kit. Thirteen strains showed antibiotic susceptibility lower than or equal to the breakpoint of EFSA(2012). The results of this study show that the characteristics of psychrotrophic LAB isolated from kimchi differ from mesophilic LAB and they are safe.

제 1장 서론

미생물 중 젖산을 대사산물로 생성하는 세균들을 총칭하여 유산균(lactic acid bacteria)이라고 한다. 유산균은 인류가 이용할 수 있는 유용한 미생물 중 하나로 발효 유제품(발효유, 치즈)을 중심으로 각종 장류, 김치, 의약품, 사료 첨가제 등 인류 생활에 광범위하게 활용되고 있다[25].

유산균은 비운동성이고 색소를 생성하지 않는 간균 또는 구균으로 catalase 음성(혐기성 발효), 그람 양성, 무포자, 비운동성이다. 유산균이 당을 대사하여 젖산을 생성하는 형식에는 homo-type(정상 발효형), hetero-type(이상 발효형)이 있다. Hetero-type은 homo-type에 비하여 저온에서 생육이 빠르지만 내산성과 산생성력이 약하다. 따라서 식품에서는 hetero type이 먼저 우점하여 식품에서 젖산을 생성하고, 이어서 homo type이 우점하여 충분한 산을 생성한다[30].

유산균은 식품에서 젖산을 생성하여 부패균 또는 병원균 등 유해 세균을 억제하여 보존성을 높이고, 대사산물에 의한 관능적 특성에 기여한다. 또한 정장작용, 항암작용, 면역 증강작용, 혈청콜레스테롤 저하, 피부 미용효과 등의 기능이 있다[12, 19, 26, 29, 32].

김치는 배추, 무, 마늘, 파, 생강 등 각종 채소류를 소금에 절여 젖갈류 및 적절한 부재료를 혼합하여 발효, 숙성시켜 독특한 향미와 질감을 가지게 하는 우리나라 고유의 전통 발효식품이다[46]. 자연발효 김치는 종균의 첨가 없이도 주재료와 부재료에서 유래한 다양한 미생물에 의해 발효되어 김치 고유의 맛, 향, 생리활성 물질 등이 생성된다[45, 46].

김치발효에 관여하는 유산균은 크게 *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속, *Weissella* 속, *Pediococcus* 속으로 나뉘며 대표적으로 *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc miyukkimchi*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus pentosus*, *Weissella koreensis*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Pediococcus pentosaseus*, *Pediococcus inopinatus* 등으로 알려져 있다[5, 17, 18, 63].

김치의 발효 초기에는 그람 음성 균인 *Aeromonas* 속과, *Achromobacter* 속, 그람 양성균인 *Bacillus* 속이 관찰된다. 이어서 hetero-type 유산균인 *Leuconostoc* 속이

우점을 이루어 유기산, mannitol, ethanol, CO₂ 등을 생성하고 김치에 부드러운 신맛과 톡 쏘는 시원한 맛을 부여함에 따라 관능적으로 우수해진다. 또한 김치의 pH는 낮아지고 혐기상태가 되어 호기성 세균의 성장이 억제된다. 이후 김치의 pH는 더 낮아져 내산성이 약한 *Leuconostoc* 속은 감소하고 homo-type의 내산성이 강한 *Lactobacillus* 속이 우점을 이루어 다량의 유기산을 생성하고 김치는 더 시어진다. 김치 발효 말기에는 산막효모가 검출되면서 표면에 흰 피막이 형성되어 연부현상과 이미, 이취가 발생하게 된다[4, 62].

온도는 김치의 발효에 가장 중요한 요소 중 하나이다. 김치는 적절한 숙성과 보관을 위해 일반적으로 저온(2~6℃)에서 발효되며 원부재료에 존재하는 유산균은 온도에 따라 다른 생육 특성을 가지므로 발효 온도는 김치의 균총에 영향을 미친다[5, 7, 27, 34]. 비배양학적 방법 및 배양학적 방법으로 김치 유산균을 분석한 연구에 따르면 *Lactobacillus* 속은 고온에서, *Leuconostoc* 속과 *Weissella* 속은 저온에서 잘 생육한다고 보고되었다[5, 6, 44]. 유산균은 일반적으로 약 30℃ 및 최대 35~45℃의 최적 성장 온도를 갖는 중온성 미생물로 알려져 있지만[59] 저온에서도(5~15℃) 유산균의 생육은 일어날 수 있으며 온도에 따른 생육 정도는 속에 따라 다소 차이가 날 수 있다[41].

최근 북유럽과 일본에서 30℃에서 생육하지 않는 저온 발육 유산균 *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*, *Leuconostoc. gelidum* subsp. *aenigmaticum*, *Lactobacillus. algidus*, *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc piscium*에 대해 보고되었다[2, 20, 37, 42, 50, 51, 53, 57]. *Leu. gelidum*, *Leu. carnosum*, *Lb. algidus*는 진공 포장된 냉장저장 쇠고기에서 최초로 분리되었으며, *Leu. gasicomitatum*은 modified atmosphere-packaged(MAP) marinated broiler에서, *Leuconostoc inhae*는 김치에서 최초로 분리되었다[2, 20, 21, 61]. *Leu. gelidum*, *Leu. carnosum*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. inhae*는 16s rRNA gene 분석에 기반하여 계통학적으로 유사하다고 보고되었다[52]. 최근 *Leu. gelidum*은 Rahkila *et al.*의 보고에 의해 다시 3종으로 재분류 되었고, *Leu. geliudm* subsp. *gelidum*, *Leu. gasicomitatum*이 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*으로, 진공 포장된 육류에서 분리된 새로운 균주가 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*으로 명명되었다[52].

냉장보관 육류, 절임육 및 진공포장 식품 등에서 존재하는 저온발육 유산균에 대해서 비배양학적, 배양학적 분석을 통한 많은 연구가 보고되었다[15, 48, 50, 56, 60, 61, 66]. *Leu. carnosum*, *Leu. gelidum* subsp. *gelidum*, *gasicomitatum*, *Lb.*

*algidus*는 진공 포장된 냉장 식품, 특히 육류 및 육류 제품에서, *Leu. gelidum* subsp. *gelidum*과 *gasicomitatum*, *Leu. inhae*는 ready to eat 샐러드에서 오염을 일으킨다고 보고되었지만 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*은 아직 보고된바 없다[48, 55]. 또한 김치에서 우점하는 저온 발육 유산균은 현재 비배양학적 분석을 통한 우점은 보고되었지만 배양학적 방법을 통해 균주를 분리하여 특성을 분석한 것은 아직 미흡한 실정이다 [5, 17, 18, 28, 47].

Leuconostoc 속은 비용혈성 세균이며 일반적으로 인간에게 비병원성으로 여겨진다. 같은 *Leuconostoc* 속이라도 인체(30-37°C)에서와 김치의 저온 발효(15°C 이하)에서 분리된 균의 생리적 특징이 다를 수 있다. 최근 미국에서는 *Leuconostoc* 속으로 인한 균혈증 사례가 보고되었으며, 이를 기회성 병원균(opportunistic pathogen)으로 분류하고 GRAS(Generally Recognized As Safe) list에서 제외되었다 [9, 10, 43]. 그러므로 우리나라 전통발효 식품인 김치로부터 분리되는 신규 유산균의 경우, 그 안전성 평가를 통한 안전성 규명이 요구되어진다.

본 연구에서는 저온 발효 김치로부터 저온 발육 유산균을 분리하고 이를 동정하였다. 또한 분리·동정된 유산균들의 생화학적 분석, 배양학적 분석, 배지의 초기 pH에 따른 생육 특성 등을 조사하였다. 이와 더불어 새로 분리된 저온 발육 김치유산균의 용혈성검사, 유해효소활성, 항생제 내성 등 안전성 평가를 수행하였다. 김치발효는 저온에서 일어나고, 이와 같은 저온 발효에서 저온성 김치유산균은 실제로 중요한 역할을 수행할 것으로 예측된다. 그러나 현재까지도 저온성 김치유산균에 대한 보고는 소수에 불과하다[5, 46, 63, 64]. 본 연구는 이들 저온성 김치유산균의 미생물학적 특성 및 안전성 평가를 수행함으로써 김치발효 저온성 유산균의 특성에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다. 본 연구결과는 향후 보다 많은 이와 같은 정보들로부터 유제품 발효에서 잘 알려진 중온성 유산균과의 특성들과 비교 고찰하는 연구와 이들 저온성 유산균의 기능에 대한 연구에 중요한 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

제 2장 실험 재료 및 방법

제 1절 시판 저온발효 김치의 수집 및 분석

1. 김치시료의 준비

본 연구에 사용된 김치는 전국 9개 지역의 가정집 또는 온라인 판매처에서 저장 3개월 이하 저온발효 김치 10개를 수집 또는 구입하여 실험에 사용하였다. 서울·경기도 3개 지역에서 김치 3종, 대구·경상도 5개 지역에서 김치 6종, 광주·전라도 2개 지역에서 김치 2종을 수집하였다 (Figure 1, Table 1).

2. 김치의 이화학적특성 분석

김치는 마쇄하여 멸균거즈로 여과한 김치여액으로 이화학적 특성을 분석하였다. pH와 산도는 pH meter (510 pH meter, Fisher Science Education, Harnover Park, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 산도는 AOAC (Association of official analytical chemists)법에 의하여 김치여액 10 mL에 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.10이 될 때까지의 0.1 N NaOH 용액 소비량으로 정의하였으며, 이를 환산하여 총 젖산 함량으로 표시하였다[1].

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

a: 0.1 N NaOH용액의 소비량 (mL)

f: 0.1 N NaOH용액의 factor (1.001)

F: 0.1 N NaOH용액의 1 mL 상당 유기산 계수

김치의 염도는 ES421 (ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였고, 당도는 Digital probe refractometer WM-7 (ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.



Figure 1. Kimchi sampling locations

Table 1. Product name of kimchi collected from 9 regions

Region		Product name
Seoul · Gyeonggi	Hwaseong	CH kimchi
	Seoul	HM kimchi
	Yangpyeong	GT kimchi
Gwangju · Jeolla	Gwangju	JW kimchi
	Iksan	LS kimchi
Daegu · Gyeongsang	Andong	YK kimchi
	Busan	CY kimchi
	Daegu	PG kimchi
		HT kimchi
Gimhae	JG kimchi	

3. 비배양학적 방법을 통한 미생물 분석

가. 사용균주 및 김치

실험에 사용된 유산균은 여러 지역의 배추김치에서 김치발효에 우점하는 균주를 분리, 동정하여 본 실험실에서 보유하고 있는 유산균 6종과 저온 발효 김치에서 분리, 동정된 유산균 5종을 사용하였고, Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)를 실시한 후 확인하였다 (Table 2).

수집한 저온발효 김치 10종 중 JW, HT, CH 김치를 제외한 김치 7종에 대해 DGGE를 수행하였다. 모든 균주는 Man Rogosa Sharpe (MRS, Difco, Detroit, MI, USA) 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 각각의 생육적온에서 24시간 정치배양 후 계대하여 사용하였다.

Table 2. List of lactic acid bacteria(LAB) used PCR-DGGE

Genus	Species & Strain	Reference
LAB isolated from kimchi	<i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	55
	<i>Lactobacillus sakei</i> SC1	40
	<i>Weissella koreensis</i> SK	24
	<i>Weissella cibaria</i> 37	24
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA	33
	<i>Leuconostoc citreum</i> GR1	38
LAB isolated from low temperature fermented kimchi	<i>Lactobacillus algidus</i> GT6	In this study
	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> JW1	
	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> CH3	
	<i>Leuconostoc inhae</i> PG7	
	<i>Leuconostoc carnosum</i> HT1	

나. Genomic DNA 추출 및 PCR을 통한 증폭

김치여액 7종을 원심분리 (9,950 $\times g$, 5 min, 4°C)하여 얻은 균체에 DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 genomic DNA을 추출하고, genomic DNA는 PCR template로 이용되었다. PCR은 유전자 증폭기 (CP2-03, Corbett Research, Sydney, Australia)를 이용하였고, primer는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. 3DDW, 10 pmol primer (27F, 1492R), 25 ng/mL genomic DNA, 10 X PCR buffer, 2.5 mM dNTP mixture, 25 mM MgCl₂, 0.5 U Taq polymerase (Takara Taq™ DNA Polymerase, Takara, Kusatsu, Japan)를 합하여 최종 부피가 25 μ L가 되게 하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 4분 동안 initial denaturation 단계를 수행한 후 95°C에서 1분 동안 denaturation, 45°C에서 1분 동안 annealing, 72°C에서 2분 동안 extension하는 과정을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분 동안 처리하였다 [14]. 1차 PCR로 증폭된 genomic DNA를 2차 PCR에서 PCR template로 사용하였다. 사용된 primer는 forward primer로 *Lac 1*(5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'), reverse primer로 GC-clamp가 포함된 GC-*Lac2*(5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGC CCGGGGCACCGGGGATTYCACCGCTACACATG-3')를 코스모진텍(Cosmogenetech, Seoul, Korea)에서 주문제작하여 사용하였다[14]. 3DDW, 10 pmol primer(*Lac 1*, GC-*Lac 2*), 50 ng/mL genomic DNA, 10 X PCR buffer, 2.5 mM dNTP mixture, 25 mM MgCl₂, 0.5 U Taq polymerase (Takara)를 첨가하여 총 부피가 50 μ L가 되게 하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 2분 동안 initial denaturation 단계를 수행한 후 95°C에서 30초 동안 denaturation, 61°C에서 1분 동안 annealing, 68°C에서 2분 동안 extension하는 단계를 40회 반복하고, 마지막으로 68°C에서 10분 동안 처리하였다[35].

다. PCR-DGGE를 통한 김치의 미생물 분석

Nested-PCR을 통해 얻은 증폭산물은 The DCode Universal Mutation Detection System (Bio-rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 DGGE를 수행하였다. Denaturing gradient gel은 8% polyacrylamide gel을 사용하였다. 먼저 acrylamide (Sigma, St. Louis, MO, USA), n,n' -methylenebisacrylamide, for molecular biology, minimum 98% (Sigma)를 사용하여 40% acrylamide/bis(37.5:1)를 제조하였다. 0% denaturing solution은 40% acrylamide/bis와 50 X TAE buffer (2 M Tris base, 1 M Acetic acid, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.0), 3DDW, 100% denaturing solution은 40% acrylamide/bis, urea (Sigma), formamide (Sigma), 50 X TAE buffer를 사용하여 제조하였다. 0%, 100% denaturing solution을 이용하여 30%, 60% denaturing gradient gel을 제조한 다음 10% ammonium persulfate (Sigma)와 n,n,n',n' -tetramethylethylene diamine (Sigma)을 각각의 denaturing gradient gel에 넣고 농도구배가 30%에서 60%로 연속되도록 DGGE gel을 제조하였다.

PCR 증폭산물을 loading 한 후, 1 X TAE buffer에서 60°C, 50 V, 20시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 10 mg/L Ethidium bromide (Sigma)를 사용하여 10분 동안 염색 후 1 X TAE buffer에서 탈색하여 관찰하였다.

제 2절 저온 발육 유산균의 분리 및 동정

1. 저온 발육 유산균의 분리

전국에서 수집한 10개의 김치를 마쇄 후 멸균 가아제로 걸러 김치여액을 제조하였다. 김치여액은 serial dilution(10^n)에 의해 희석 후 MRS 1.5% (w/v) 평판배지와 2% (w/v) CaCO_3 (Amersco, Cochran, GA, USA)가 첨가된 MRS 평판배지에 하였으며 25°C, 30°C에 각각 5일 배양하였다. 배양 후 colony를 모양, 색, 광택 유무, 그람 염색 (Gram stain kit, BD, San Jose, CA, USA)을 통한 형태학적 분석과 catalase test (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)를 통해 분류하였다. 각 그룹은 toothpick하여 25°C, 30°C에 각각 배양하였고, 25°C에서 생육이 더 뛰어난 균주를 저온 발육 균주로 분리하였다. 분리된 균주는 25% glycerol stock 형태로 -70°C deep freezer (Panasonic, Kadoma, Japan)에 보관하였다.

2. 분리 균주의 동정

분리된 15종의 균주는 분자생물학적 분석, 생화학적 특성 분석을 수행하여 동정하였다.

가. 16S rRNA gene sequence 분석

분리된 균주의 동정을 위해 Dneasy blood & tissue kit (Qiagen)를 이용하여 genomic DNA를 추출하고 16s rRNA gene sequence를 분석하였다. Gene bank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 균주와의 16S rRNA gene sequence를 비교하여 동정하였고, Clustal W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)에서 표준 균주(type strain)과의 상동성을 비교하였다.

나. 생화학적 특성 분석

생화학 동정 kit (API 50CHL, Biomerieux)을 이용하여 분리된 유산균의 당 대사능을 조사하였다. 분리 균주를 5 mL MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종 후 계대하여 사용하였고, 배양액을 원심분리(9,950 $\times g$, 5 min, 4°C)하여 상정액을 제거한 후 균체를 회수하여 3DDW 500 μL 에 풀어 균주 현탁액을 준비하였다. 현탁액을 suspension medium (Biomerieux) 5 mL에 풀어 Mcfarland standard 2 (Biomerieux)와 동일한 탁도로 맞추었다. 탁도를 맞춘 API 50 CHL 배지를 각 스트립의 튜브에 분주하고 미네랄 오일을 첨가한 후 각 균주의 최적 배양온도에서 24시간, 48시간 배양하여 확인하였다. 결과를 동정 프로그램 (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 입력하여 동정 후 분리 균주 간 차이를 확인하였다.

제 3절 분리 유산균의 배양학적 특성 조사

1. 사용균주 및 배지

저온 발효 김치에서 분리된 저온 발육 균주 15종(*Leuconostoc carnosum* 1종, *Leuconostoc inhae* 2종, *Lactobacillus algidus* 2종 *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* 5종, *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* 5종)이 본 실험에 사용되었다 (Table 3). MRS 액체배지에 glycerol을 가하여 최종 25% glycerol stock 상태로 보관한 균주를 5 mL MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종 후 *Lb. algidus* JG2는 15°C, 나머지 14종은 25°C에서 24시간 정치배양 하였고, 계대하여 사용하였다.

2. 배양 온도에 따른 생육도

배양 온도에 따른 생육도는 MRS (Difco) 액체 배지에 분리 균주를 1% (v/v) 접종하여 5, 10, 15, 25, 30°C에 대해 확인하였다. 5°C는 1일 간격 10일까지, 10°C는 8시간 간격 88시간 까지, 15°C는 8시간 간격 64 시간 까지, 25°C와 30°C는 4시간 간격 32시간 까지 생육을 확인하였다. Spectrophotometer (Ultraspec 2100 pro, Amersham Biosciences, Little Chalfont, England)를 사용하여 600 nm 에서 흡광도를 측정 후 균주의 배양 온도에 따른 생육곡선을 확인하였다.

3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도

초기 pH에 따른 균주의 생육을 확인하기 위하여 MRS (Difco) 액체배지를 5 N HCl, 5 N NaOH로 pH를 조정하여 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0의 MRS 액체배지를 제조하였고, pH를 조정하지 않은 MRS 액체배지(pH 6.5)를 대조구로 설정하여 비교하였다. pH를 조정된 MRS (Difco) 액체 배지에 분리 균주를 1% (v/v) 접종하여 각 균주의 생육적온에 24 시간 정치배양 하였다. 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 최대 생육을 확인하였고, 배양 후 pH를 측정하였다.

Table 3. List of LAB used in this study

Species	Strain
<i>Leuconostoc carnosum</i>	HT1
<i>Leuconostoc inhae</i>	PG7
	YK7
<i>Lactobacillus algidus</i>	GT6
	JG2
<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i>	CY3
	JG6
	JW1
	LS4
	YK5
<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i>	CH3
	CY5
	CY6
	HM5
	JG1

제 4절 분리 유산균의 안전성 평가

1. 용혈성 검사

저온 발육 유산균의 용혈작용 유·무를 조사하기 위해 용혈성 검사를 진행하였다. Blood agar base (Oxoid, Hampshire, England)에 7% (v/v) horse blood (Oxoid)를 넣어 용혈성 배지를 제조하였고, 5 mL MRS (Difco) 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 생육적온에서 24시간 배양한 분리 균주를 배지에 백금으로 획선 도말 후 생육적온에 배양하였다[55].

2. 효소활성

저온 발육 유산균의 효소활성을 확인하기 위해 API Zym kit (Biomerieux)를 사용하였다. 분리 균주를 5 mL MRS 액체배지 1% (v/v) 접종 후 계대하여 사용하였고, 배양액을 원심분리($9,950 \times g$, 5 min, 4°C)하여 상징액을 제거한 후 균체를 회수하여 3DDW 500 μ L에 풀어 균주 현탁액을 준비하였다. 현탁액을 suspension medium (Biomerieux) 2 mL에 풀어 Mcfarland standard 5 (Biomerieux)와 동일한 탁도로 맞추었다. Strip을 준비하여 탁도를 맞춘 균주현탁액을 각 cupule에 65 μ L씩 접종하고 암실에서 37°C, 4시간 동안 배양하였다. 표면의 활성을 증가와 용해를 돕기 위해 ZYM A (Biomerieux)와 ZYM B (Biomerieux)를 한 방울씩 떨어뜨린 다음 밝은 곳에서 5분간 반응시켜 색의 변화를 관찰하였다. 0-5의 값으로 결과를 표시할 수 있으며 3이상인 경우 양성으로 판정하였다(0 = 0 nM, 1 = 5 nM, 2 = 10 nM, 3 = 20 nM, 4 = 30 nM, 5 = 40 nM).

3. 항생제 내성

분리된 저온 발육 유산균의 항생제 내성 test는 액체배지 희석법으로 측정하였다. 사용된 항생제는 8종으로 ampicillin(Sigma), vancomycin(Sigma), gentamycin (Sigma), kanamycin (Sigma), streptomycin (Sigma), erythromycin (Sigma),

tetracycline (Sigma), chloramphenicol (Sigma)이며, 이들 항생제는 규정된 용매에 녹여 준비하였다. 0.5% dextrose를 첨가한 mueller-hinton (Difco) 액체배지에 넣어 각 실험 농도에 맞게 희석하였다. 균주는 MRS 액체배지에 배양한 배양액을 원심분리($9,950 \times g$, 5 min, $4^{\circ}C$)하여 상청액을 제거 후 균체를 회수하였다. 0.5% dextrose가 함유된 MH 액체배지에 균주를 현탁하여 $A_{600}=0.4\sim0.5$ 가 되도록 한 후 현탁액을 MH (Difco) 액체 배지에 1:1000 희석하고, 항생제를 단계별로 희석하여 준비한 배지에 접종한 후 $25^{\circ}C$, 24시간 배양하였다. 600 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였으며 European Food Safety Authority (EFSA, 2018)를 참고하여 각각의 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 저해 농도로 최소 생육 저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 결정하였다[11].

제 3장 실험 결과 및 고찰

제 1절 시판 저온발효 김치의 수집 및 분석

1. 김치의 저장온도 및 기간 분석

전국 9개 지역의 가정집 또는 온라인 판매처에서 저온발효 김치 10개를 수집하여 저장온도와 저장기간을 분석하였다. 대부분의 김치는 10℃ 이하에서 저장되었으며 -1~0℃에서 보관 중인 김치가 5종으로 가장 많았으며 2~3℃ 저장 1종, 4℃ 저장 2종, 5~10℃ 저장 2종으로 조사되었다. 발효 기간은 1개월 저장된 김치 2종, 2개월 저장된 김치 4종, 3개월 저장된 김치 4종으로 조사되었다 (Table 4).

2. 김치의 이화학적 특성 분석

수집한 김치의 평균 pH는 $\text{pH } 4.30 \pm 0.14$ 로 나타났으며 가장 낮은 pH를 나타낸 김치는 CH 김치로 $\text{pH } 4.09$, 가장 높은 pH를 나타낸 김치는 JW 김치로 $\text{pH } 4.53$ 로 나타났다 (Table 5). 평균 산도는 $0.83 \pm 0.11\%$ 로 나타났으며. 이 중 가장 낮은 산도를 나타낸 김치는 LS 김치로 산도 0.65%를 나타냈으며 가장 높은 산도를 나타낸 김치는 YK 김치로 산도 0.97%로 나타났다 (Table 5).

수집한 김치의 평균 염도는 $2.90 \pm 2.59\%$ 로 나타났으며 이 중 가장 낮은 염도를 나타낸 김치는 PG 김치로 염도 1.78%로 나타났으며 가장 높은 염도를 나타낸 김치는 YK 김치로 2.33%로 나타났다 (Table 5). 평균 당도는 $9.34 \pm 3.07 \text{ brix}^\circ$ 로 나타났으며 이 중 가장 낮은 당도를 나타낸 김치는 CY 김치로 9.13 brix° 로 나타났으며 가장 높은 당도를 나타낸 김치는 YK 김치로 12.37 brix° 로 나타났다 (Table 5).

Table 4. Storage temperature and aging period of product kimchi

Product	Storage temperature	Aging period
CH kimchi	4℃	3 Month
HM kimchi	-1℃	2 Month
GT kimchi	4℃	2 Month
JW kimchi	-1℃	2 Month
LS kimchi	0℃	1 Month
YK kimchi	2~3℃	3 Month
CY kimchi	0℃	3 Month
PG kimchi	10℃	3 Month
HT kimchi	-1℃	2 Month
JG kimchi	5~10℃	1 Month

Table 5. Chemical properties of products kimchi

Product	pH	Acidity (%)	Salinity (%)	Sugar content (brix°)
CH kimchi	4.09	0.95	1.73	10.58
HM kimchi	4.18	0.85	2.15	10.00
GT kimchi	4.42	0.71	2.18	9.30
JW kimchi	4.53	0.74	1.58	9.80
LS kimchi	4.41	0.65	1.95	10.77
YK kimchi	4.25	0.97	2.33	12.37
CY kimchi	4.30	0.81	2.05	9.13
PG kimchi	4.16	0.94	1.78	9.70
HT kimchi	5.48	0.33	1.84	9.20
JG kimchi	4.39	0.83	2.14	10.60

3. 비배양학적 방법을 통한 김치의 미생물 분석

김치로부터 분리된 11종의 유산균에 대해 DGGE를 실시하여 균주의 밴드를 확인하였다 (Figure 2). *Lactobacillus* sp. 3종을 비교하였을 때 *Lb. sakei* SC1 (band a)을 제외한 *Lb. plantarum* HD1, *Lb. algidus* GT6 2종은 유사한 위치에서 밴드가 확인되었다 (band f, g). *Weissella* sp. 2종의 유산균을 비교하였을 때 *W. koreensis* SK (band b), *W. cibaria* 37 (band c)은 각각 다른 위치에서 밴드가 확인되었다. *Leuconostoc* sp. 6종에 대해 비교하였을 때 *Leu. mesenteroides* TA (band d), *Leu. citreum* GR1 (band e) 2 종은 각각 다른 위치에서 밴드가 확인되었지만 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JW1 (band h), *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3 (band i), *Leu. inhae* PG7 (band j) 3종은 같은 위치에서 밴드가 확인되었고, *Leu. carnosum* HT1 (band k)은 확인한 유산균 11종 중 가장 아래 위치에서 밴드가 확인되었다.

수집된 저온 발효 김치 10종 중 보관중인 김치 7종에 대해 DGGE를 실시하여 미생물을 분석하였다 (Figure 3). 실험한 김치 7종 모두 *W. koreensis* (band c), *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 또는 *Leu. inhae* (band g)가 관찰되었고, LS kimchi를 제외한 김치 6종 모두 *Lb. sakei* (band b)가 관찰되었다. 3개월 이하 발효된 김치에서는 *Lb. sakei*, *W. koreensis* 두 종이 주로 우점하는 것을 확인하였다.

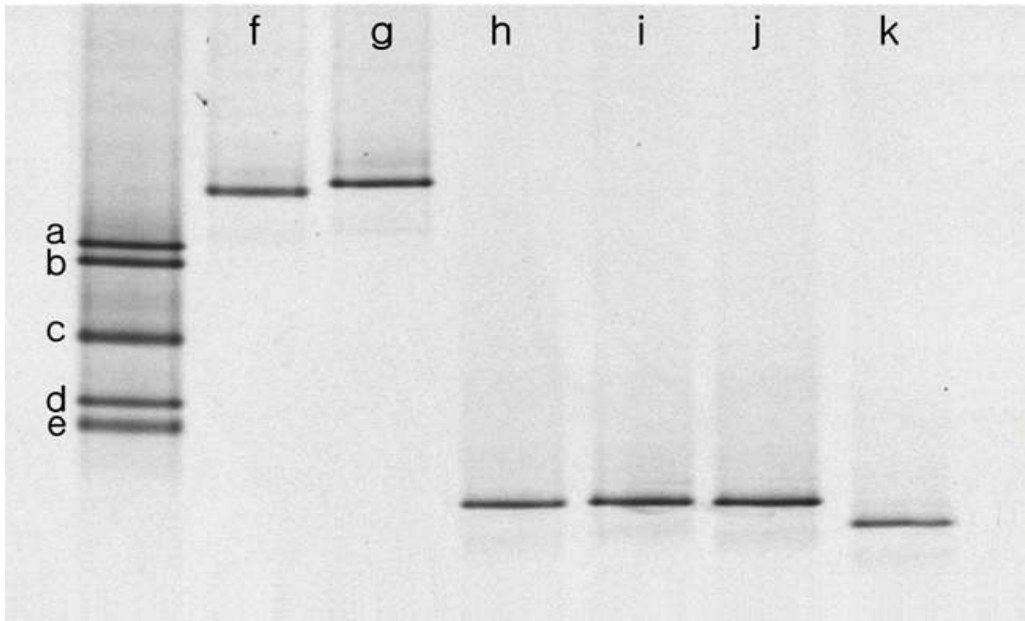


Figure 2. DGGE profile of eleven LAB

a, *Lb. sakei* SC1; b, *W. koreensis* SK; c, *W. cibaria* 37; d, *Leu. mesenteroides* TA; e, *Leu. citreum* GR1; f, *b. plantarum* HD1; g, *Lb. algidus* GT6; h, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JW1; i, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3; j, *Leu. inhae* PG7; k, *Leu. carnosum* HT1

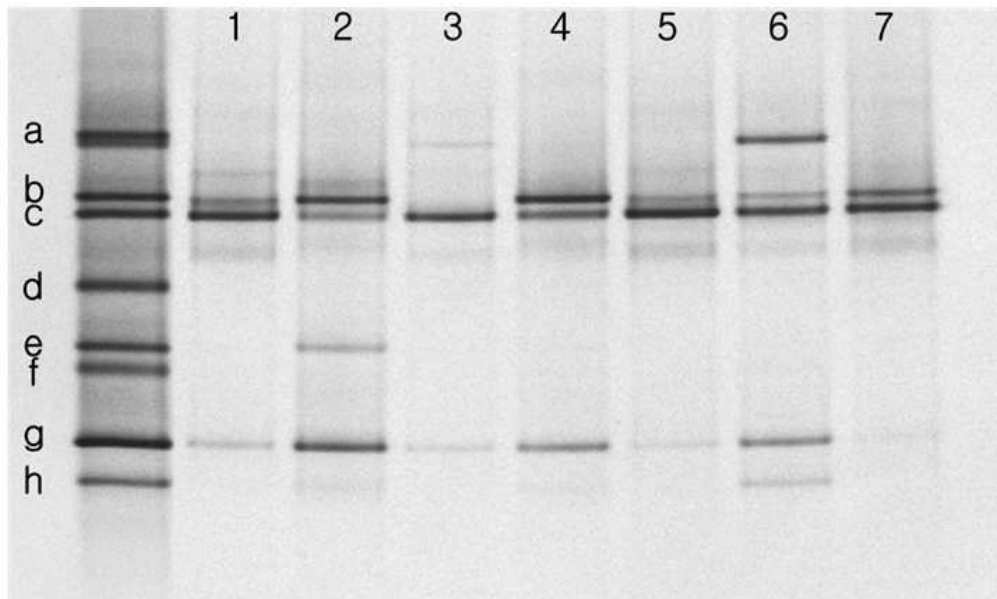


Figure 3. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from seven product kimchi

a, *Lb. plantarum* HD1, *Lb. algidus* GT6; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK; d, *W. cibaria* 37; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JW1; i, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3; j, *Leu. inhae* PG7; h, *Leu. carnosum* HT1

1, PG kimchi; 2, YK kimchi; 3, LS kimchi; 4, HM kimchi; 5, CY kimchi 6, JG kimchi; 7, GT kimchi

제 2절 저온 발육 균주의 분리 및 동정

1. 저온 발육 균주의 분리

저온 발육 균주의 분리를 위해 수집한 저온발효 김치 10종의 김치여액을 serial dilution(10^n)에 의해 희석하여 MRS (Difco) 평판배지와 2% (w/v) CaCO_3 (Amersco)가 첨가된 MRS 평판배지에 도말하였다. 배지는 25°C, 30°C에 각각 배양 후 형성된 집락을 확인하였다. 각 배지에서 grouping을 진행 후 MRS, MRS+2% CaCO_3 , BPB(Bromo phenol blue)-MRS 평판배지에 toothpick하여 25°C, 30°C에 각각 배양하였다. colony 크기, 환 생성능을 비교 후 균주를 분리하고 명명하였다 (Figure 4, Table 6). Toothpick plate를 관찰한 결과 JG2를 제외한 14종 모두 30°C보다 25°C에서 배양한 배지에서 생육이 더 뛰어났으며 JG2는 25°C, 30°C 모두 생육하지 않았다.

형태학적 특성을 관찰하였을 때 15종 colony 모두 원형, ivory 색, 광택을 띄었고, catalase test 결과 모두 음성으로 관찰되었다 (Table 7). 그람 염색 후 광학현미경 (DIGITAL SIGHT DS-UI, NIKON, Tokyo, Japan)으로 관찰하였을 때 GT6, JG2는 Gram 양성, 단간균으로 관찰되었으며 2종을 제외한 13종의 분리균주는 Gram 양성, 구균으로 관찰되었다 (Figure 5).

Figure 4. Toothpick of fifteen strain isolated low temperature fermented kimchi (continue)

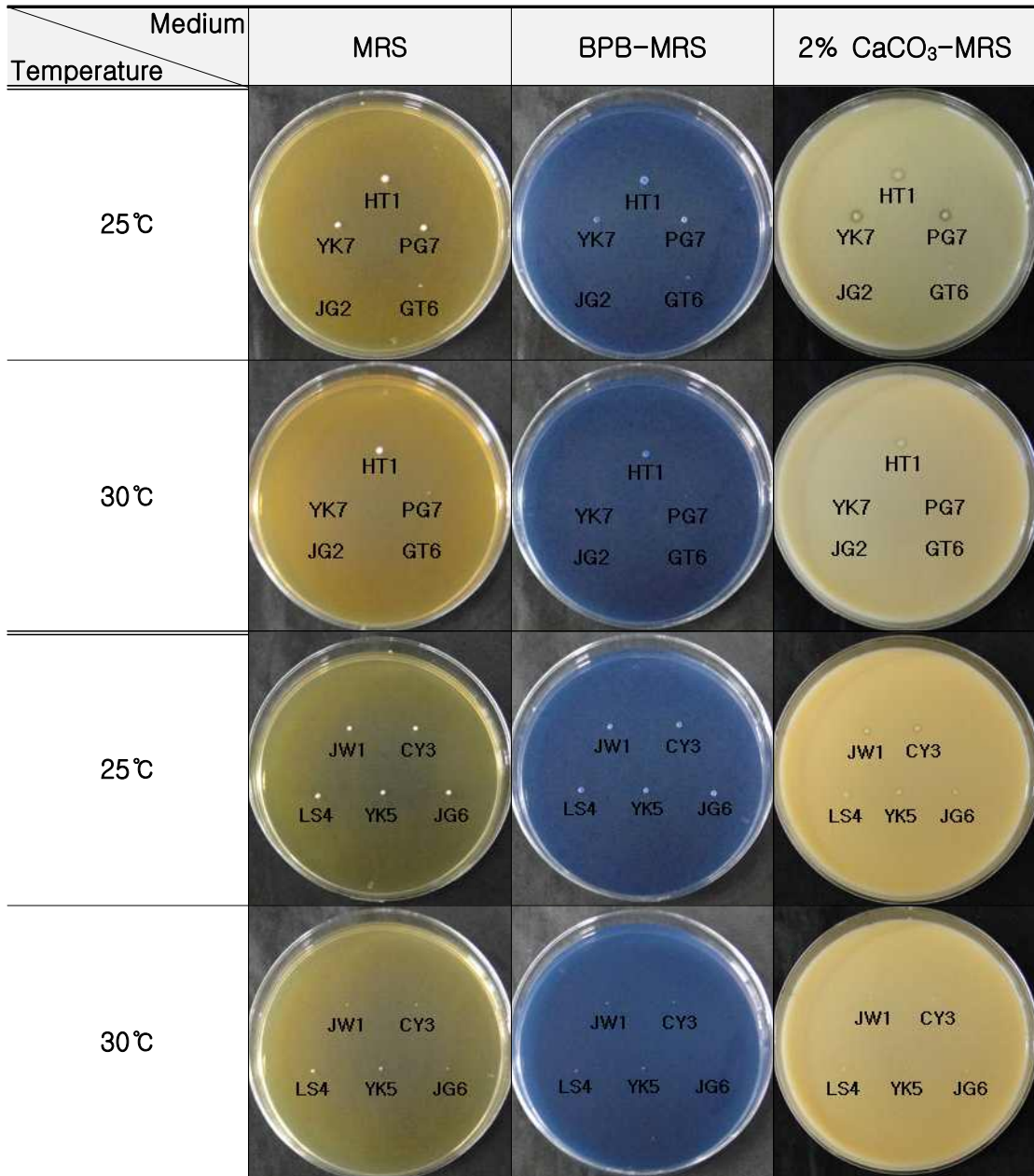


Figure 4. (Continue)

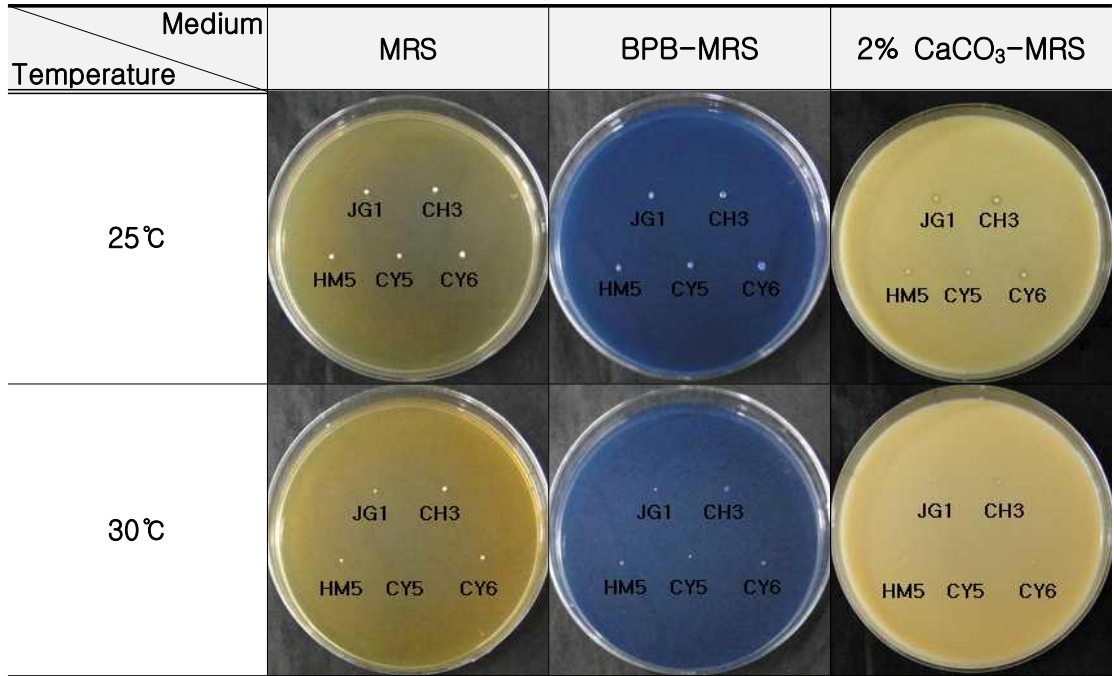


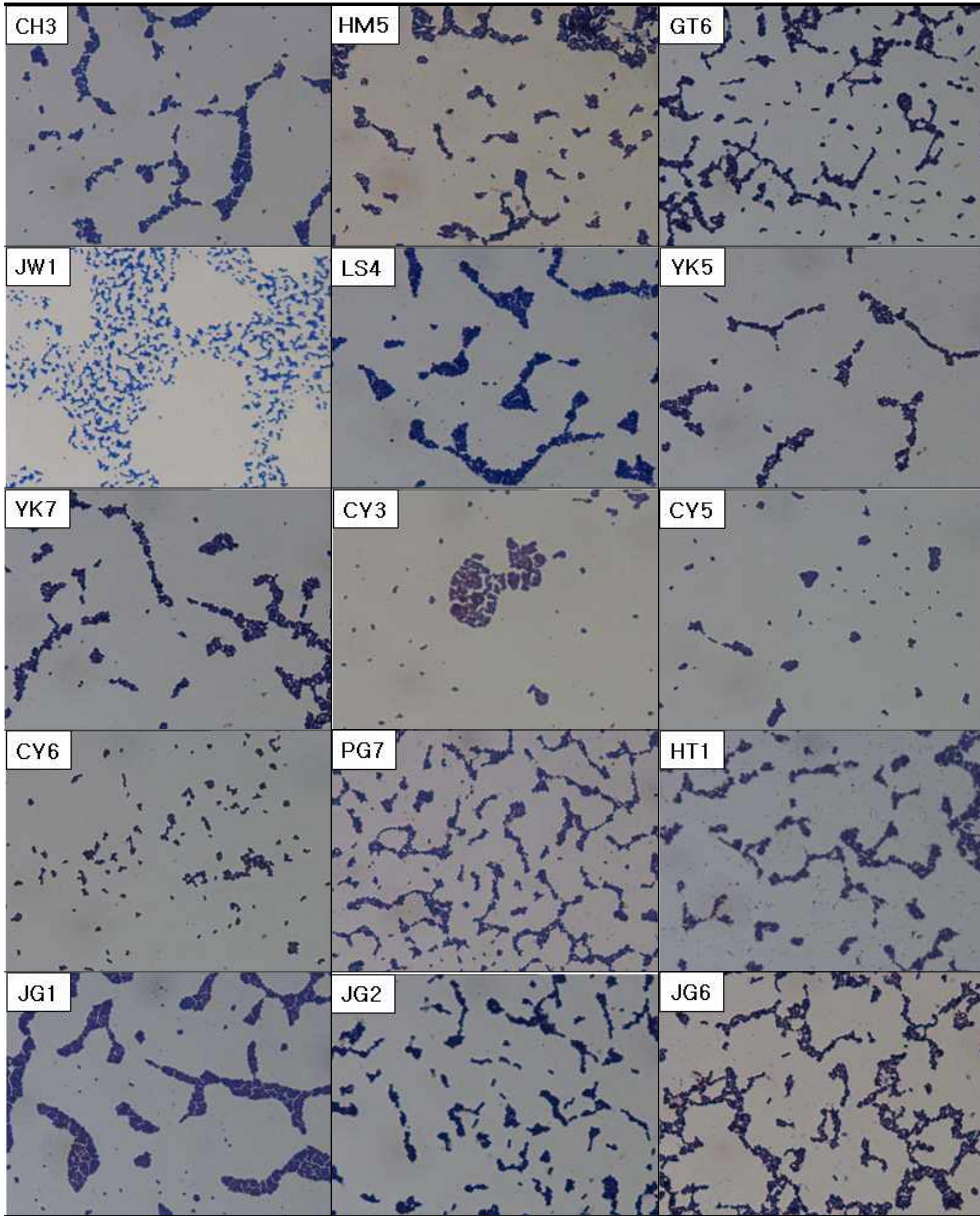
Table 6. Naming of strains isolated from kimchi

Product	Strain
CH kimchi	CH3
HM kimchi	HM5
GT kimchi	GT6
JW kimchi	JW1
LS kimchi	LS4
YK kimchi	YK5
	YK7
CY kimchi	CY3
	CY5
	CY6
PG kimchi	PG7
HT kimchi	HT1
JG kimchi	JG1
	JG2
	JG6

Table 7. Morphological characteristics and catalase test of the isolated strains

Strain	Color	Shape	Glossy	Stringy	Gram stain	Morphology	Catalase test
CH3	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
HM5	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
GT6	Ivory	Circle	○	○	+	Short rod	-
JW1	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
LS4	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
YK5	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
YK7	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
CY3	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
CY5	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
CY6	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
PG7	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
HT1	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
JG1	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-
JG2	Ivory	Circle	○	○	+	Short rod	-
JG6	Ivory	Circle	○	○	+	Coccus	-

Figure 5. Gram staining and microscopic observation of isolated strains



2. 분리 균주의 동정

가. 16S rRNA gene sequence 분석

15종의 분리된 균주에 대해 16S rRNA gene sequence를 분석하여 Genebank에 등록된 다른 균주들과 염기서열을 비교하였다. HT1(1,500 bp)은 type strain인 *Leuconostoc carnosum* NRIC 1722^T와 99.93%의 상동성을 나타내었으며 따라서 HT1은 *Leu. carnosum* HT1으로 명명하였다. PG7(1,504 bp)와 YK7(1,500 bp)은 type strain인 *Leu. inhae* IH003^T와 99.66%, 99.66%의 상동성을 각각 나타내었다. 따라서 *Leu. inhae* PG7과 *Leu. inhae* YK7이라 명명하였다. JG6(1,501 bp)은 type strain인 *Leuconostoc. gelidum* subsp. *aenigmaticum* POUF4d^T와 99.93% 상동성을 나타내었고, CY3(1,518 bp), JW1(1,508 bp), LS4(1,511 bp), YK5(1,501 bp)는 type strain인 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* POUF4d^T와 100% 상동성을 나타내었다, 따라서 CY3, JG6, JW1, LS4, YK5는 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* CY3, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JG6, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JW1, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* LS4, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* YK5로 명명하였다. CY6(1,512 bp)은 type strain인 *Leuconostoc. gelidum* subsp. *gasicomitatum* TB 1-10^T과 99.67% 상동성을 나타내었고, CH3(1,509 bp), CY5(1,509 bp), HM5(1,517 bp), JG1(1,519 bp)는 type strain인 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* TB 1-10^T과 100% 상동성을 나타내었다, 따라서 CH3, CY5, CY6, HM5, JG1은 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY3, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* JG6, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* JW1, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* LS4, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* YK5로 명명하였다 (Table 8).

나. 생화학적 특성 분석

생화학 동정 kit (Biomerieux)를 이용하여 분리된 15종 균주의 당대사능을 관찰하였다 (Table 9). *Leu. carnosum* HT1는 13종, *Leu. inhae* PG7, *Leu. inhae*

YK7는 동일한 탄수화물 18종에 대해 대사능이 양성으로 나타났다. *Lb. algidus* GT6, *Lb. algidus* JG2은 동일한 7종에 대해 대사능이 양성으로 나타났고, D-Galactose, D-Fructose, D-Mannose, Salicine에 대해 *Lb. algidus* JG2는 대사능이 양성으로 나타났지만 *Lb. algidus* GT6는 음성으로 나타났다. Melibiose에 대해 *Lb. algidus* JG2는 대사능이 음성으로 나타났지만 *Lb. algidus* GT6는 양성으로 나타났다. *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 5종은 동일한 탄수화물 19종에 대해 대사능을 나타냈고, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* LS4, JG6, JW1은 Gluconate에 대해 대사능이 양성, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* CY3, YK5는 음성으로 나타났다. *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 5종은 탄수화물 17종에 대해 대사능이 양성으로 나타났고, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY5, CY6, JG1 3종은 Gluconate, 2 Keto-gluconate, 5 keto-gluconate에 대해 대사능이 양성, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3는 모두 음성, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* HM5는 2 Keto-gluconate, 5 keto-gluconate 2 종에 대해서만 양성으로 관찰되었다. 또한 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* HM5를 제외한 14종 모두 Lactose에 대해 대사능이 음성으로 관찰되었다.

Table 8. Identification of strains isolated from low temperature fermented kimchi

No.	Strain	Bi-direction	NCBI blast results	Identity
1	HT1	1,500	<i>Leuconostoc carnosum</i> NRIC 1722 ^T	99.93%
2	PG7	1,504	<i>Leuconostoc inhae</i> IH003 ^T	99.66%
3	YK7	1,500	<i>Leuconostoc inhae</i> IH003 ^T	99.66%
4	GT6	1,522	<i>Lactobacillus algidus</i> strain M 6 A9 ^T	99.46%
5	JG2	1,518	<i>Lactobacillus algidus</i> strain M 6 A9 ^T	99.33%
6	CY3	1,518	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d ^T	100.00%
7	JG6	1,501	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d ^T	99.93%
8	JW1	1,508	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d ^T	100.00%
9	LS4	1,511	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d ^T	100.00%
10	YK5	1,501	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d ^T	100.00%
11	CH3	1,509	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00%
12	CY5	1,509	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00%
13	CY6	1,512	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	99.67%
14	HM5	1,517	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00%
15	JG1	1,519	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00%

Table 9. Biochemical characteristics of LAB isolated from low temperature fermented kimchi (continue)

NO.	Sugar	HT1	PG7	YK7	GT6	JG2	CY3	JG6	JW1	LS4	YK5	CH3	CY5	CY6	HM5	JG1
1	Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Ribose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	D-Xylose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Methyl-BD-xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	D-Galactose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	α -Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	α -Methyl-D-Glucoside	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
22	N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Amygdaline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Arbutin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : positive reaction, - : negative reaction

Table 9. (continue)

NO.	Sugar	HT1	PG7	YK7	GT6	JG2	CY3	JG6	JW1	LS4	YK5	CH3	CY5	CY6	HM5	JG1
25	Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
26	Salicine	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Cellobiose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	Malotse	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
29	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
30	Melibiose	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
31	Sucrose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	Trehalose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Rafiinose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
36	Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	β -Gentiobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	D-Turanose	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Gluconate	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	+
48	2 Keto-gluconate	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
49	5 keto-gluconate	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

+ : positive reaction, - : negative reaction

제 3절 분리 유산균의 배양학적 특성 규명

1. 배양온도에 따른 생육도

분리된 유산균을 MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 5℃는 1일 간격 10일까지, 10℃는 8시간 간격 80시간까지, 15℃는 8시간 간격 64 시간까지, 25℃, 30℃는 4시간 간격 32시간까지 정치 배양하여 매 시간마다 흡광도를 측정하여 배양온도에 따른 생육을 조사하였다. 생육도는 600 nm에서 측정하였고, 3회 반복하여 평균치로 나타내었다.

가. *Leuconostoc carnosum*의 배양온도에 따른 생육

Leuconostoc carnosum HT1은 5℃에서 216시간($A_{600}=0.677$), 10℃에서 72시간($A_{600}=2.183$), 15℃에서 72시간($A_{600}=2.538$), 25℃에서 24시간($A_{600}=3.029$), 30℃에서 24시간($A_{600}=2.303$)에 최대 생육에 도달하였으며 이에 따라 25℃에서 가장 단시간에 최대 생육에 도달하는 것으로 보아 최적 생육 온도는 25℃인 것을 확인하였다 (Figure 6).

나. *Leuconostoc inhae*의 배양온도에 따른 생육

Leuconostoc inhae 2종의 배양온도에 따른 생육을 관찰하였다 (Figure 6). *Leu. inhae* PG7은 5℃에서 216시간($A_{600}=1.485$), 10℃에서 72시간($A_{600}=2.383$), 15℃에서 40시간($A_{600}=2.423$), 25℃에서 24시간($A_{600}=2.525$)에 최대 생육에 도달하였으며 30℃에서는 생육이 관찰되지 않았다($A_{600}=0.222$). *Leu. inhae* YK7은 5℃에서 192시간($A_{600}=1.345$), 10℃에서 72시간($A_{600}=1.777$), 15℃에서 40시간($A_{600}=1.987$), 25℃에서 24시간($A_{600}=2.153$)에 최대 생육에 도달하였으며 30℃에서는 생육이 관찰되지 않았다($A_{600}=0.256$). 이에 따라 25℃에서 가장 단시간에 최대 생육에 도달하는 것으로 보아 *Leu. inhae* 2종의 최적 생육 온도는 25℃인 것을 확인하였다 (Figure 6).

다. *Lactobacillus algidus*의 배양온도에 따른 생육

Lactobacillus algidus 2종의 배양온도에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 6). *Lb. algidus* GT6는 5℃에서 216시간($A_{600}=3.280$), 10℃에서 72시간($A_{600}=3.420$), 15℃에서 40시간($A_{600}=3.835$), 25℃에서 24시간($A_{600}=3.280$)에 최대 생육에 도달하였으며 30℃에서는 배양 후 24시간이 되었지만 생육이 관찰되지 않았다($A_{600}=0.067$). *Lb. algidus* JG2는 5℃에서 216시간($A_{600}=2.750$), 10℃에서 72시간($A_{600}=2.690$), 15℃에서 40시간($A_{600}=2.875$), 25℃에서 28시간($A_{600}=1.050$)에 최대 생육에 도달하였으며 30℃에서는 배양 후 24시간이 되었지만 생육이 관찰되지 않았다($A_{600}=0.054$). 이에 따라 *Lb. algidus* GT6는 25℃, *Lb. algidus* JG2는 그보다 더 낮은 온도인 15℃에서 가장 단시간에 최대 생육에 도달하는 것으로 보아 *Lb. algidus* GT6와 *Lb. algidus* JG2의 최적 생육 온도는 각각 25℃와 15℃인 것을 확인하였다 (Figure 6).

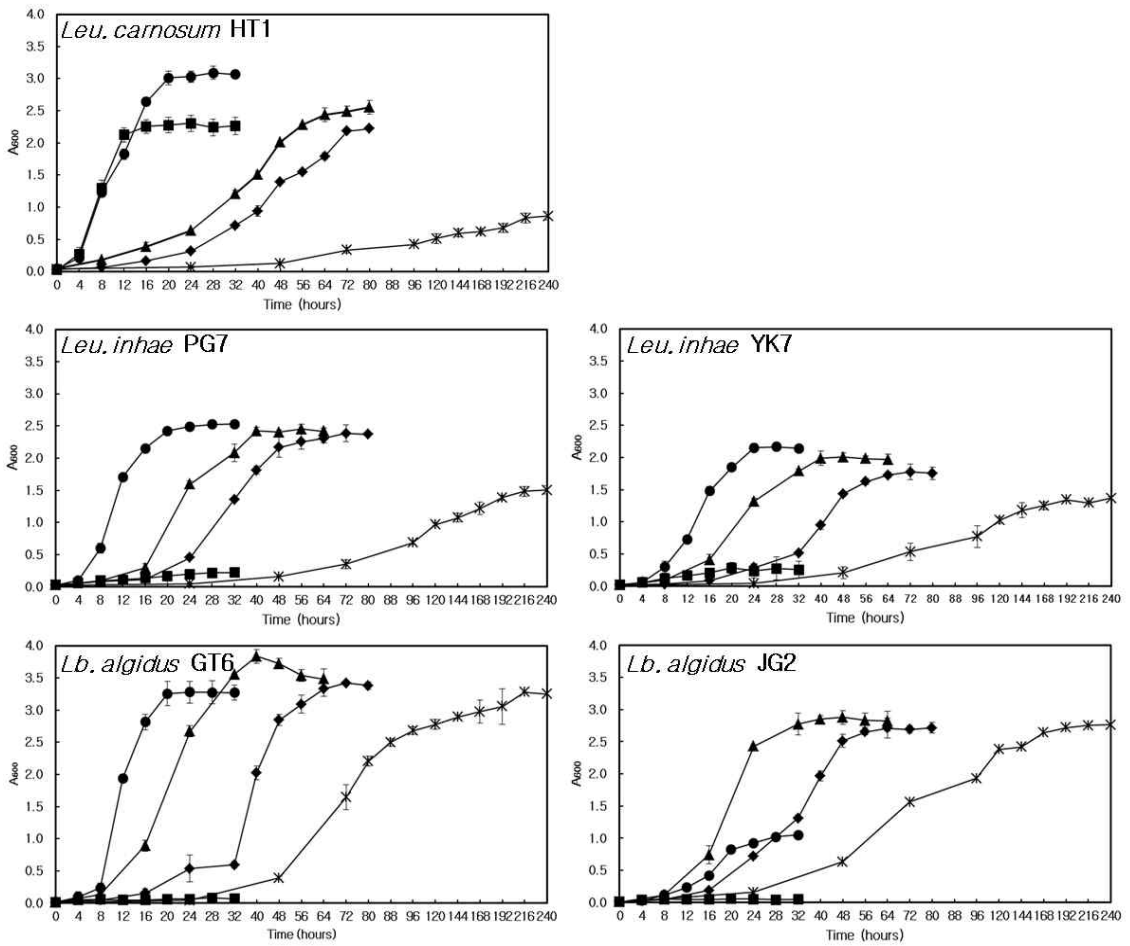


Figure 6. Effect of temperature on *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc inhae*, *Lactobacillus algidus* growth

- ✱, Growth of lactic acid bacteria at 5°C
- ◆, Growth of lactic acid bacteria at 10°C
- ▲, Growth of lactic acid bacteria at 15°C
- , Growth of lactic acid bacteria at 25°C
- , Growth of lactic acid bacteria at 30°C

라. *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*의 배양온도에 따른 생육

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 5종의 배양온도에 따른 생육을 관찰하였다 (Figure 7). *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* CY3는 5°C에서 216시간($A_{600}=1.670$), 10°C에서 72시간($A_{600}=2.180$), 15°C에서 56시간($A_{600}=2.320$), 25°C에서 24시간($A_{600}=2.230$), 30°C에서 24시간($A_{600}=1.170$)에 최대 생육에 도달하였으며, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JG6 5°C에서 216시간($A_{600}=1.650$), 10°C에서 80시간($A_{600}=2.063$), 15°C에서 48시간($A_{600}=2.400$), 25°C에서 24시간($A_{600}=2.130$), 30°C에서 24시간($A_{600}=1.390$)에 최대 생육에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JW1은 5°C에서 216시간($A_{600}=1.010$), 10°C에서 72시간($A_{600}=1.885$), 15°C에서 48시간($A_{600}=2.013$), 25°C에서 24시간($A_{600}=1.965$), 30°C에서 24시간($A_{600}=1.160$), *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* LS4는 5°C에서 240시간($A_{600}=1.975$), 10°C에서 72시간($A_{600}=1.805$), 15°C에서 48시간($A_{600}=2.247$), 25°C에서 24시간($A_{600}=2.173$), 30°C에서 28시간($A_{600}=1.020$), *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* YK5는 5°C에서 192시간($A_{600}=1.530$), 10°C에서 64시간($A_{600}=1.785$), 15°C에서 48시간($A_{600}=2.077$), 25°C에서 24시간($A_{600}=1.990$), 30°C에서 24시간($A_{600}=0.934$)에 최대 생육에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 따라 25°C에서 가장 단시간에 최대 생육에 도달하는 것으로 보아 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 5종의 최적 생육 온도는 25°C인 것을 확인하였다.

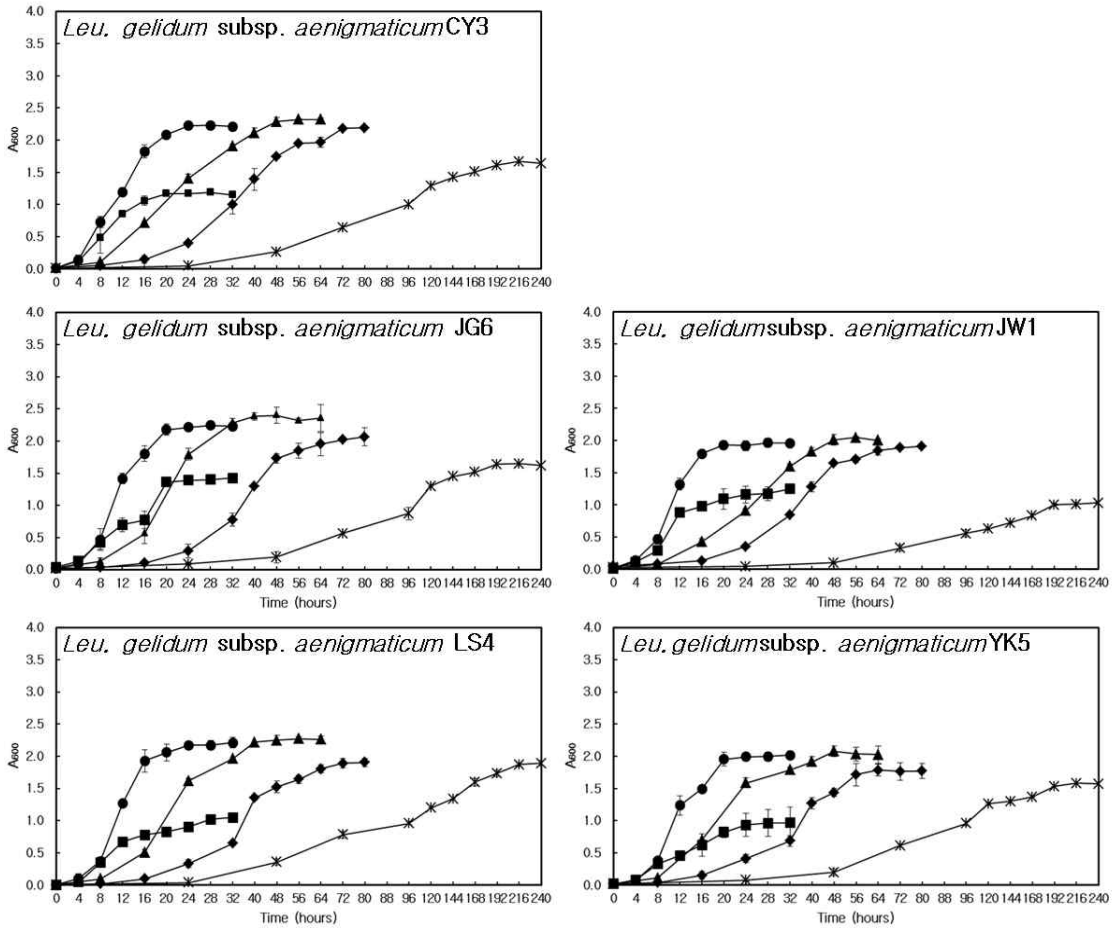


Figure 7. Effect of temperature on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* growth

- ✱, Growth of lactic acid bacteria at 5°C
- ◆, Growth of lactic acid bacteria at 10°C
- ▲, Growth of lactic acid bacteria at 15°C
- , Growth of lactic acid bacteria at 25°C
- , Growth of lactic acid bacteria at 30°C

마. *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 배양온도에 따른 생육

Leu. gelidum subsp. *gasicomitatum* 5 종의 배양온도에 따른 생육을 관찰하였다 (Figure 8). *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3는 5℃에서 216시간($A_{600}=1.110$), 10℃에서 72시간($A_{600}=1.880$), 15℃에서 48시간($A_{600}=1.855$), 25℃에서 24시간($A_{600}=2.088$), 30℃에서 24시간($A_{600}=1.537$)에 최대 생육에 도달하였으며, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY5는 5℃에서 216시간($A_{600}=1.590$), 10℃에서 64시간($A_{600}=2.075$), 15℃에서 48시간($A_{600}=2.170$), 25℃에서 24시간($A_{600}=2.270$), 30℃에서 24시간($A_{600}=1.350$)에 최대 생육에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY6은 5℃에서 216시간($A_{600}=1.490$), 10℃에서 64시간($A_{600}=1.770$), 15℃에서 56시간($A_{600}=2.065$), 25℃에서 24시간($A_{600}=2.190$), 30℃에서 24시간($A_{600}=1.590$), *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* HM5는 5℃에서 216시간($A_{600}=1.540$), 10℃에서 56시간($A_{600}=1.875$), 15℃에서 40시간($A_{600}=2.080$), 25℃에서 24시간($A_{600}=2.050$), 30℃에서 24시간($A_{600}=1.265$), *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* JG1은 5℃에서 216시간($A_{600}=1.420$), 10℃에서 72시간($A_{600}=1.810$), 15℃에서 48시간($A_{600}=2.195$), 25℃에서 24시간($A_{600}=2.187$), 30℃에서 28시간($A_{600}=0.949$)에 최대 생육에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 따라 25℃에서 가장 단시간에 최대 생육에 도달하는 것으로 보아 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 5종의 최적 생육 온도는 25℃인 것을 확인하였다.

2. 배지의 초기 pH에 따른 생육도

MRS 액체배지를 5 N HCl과 5 N NaOH로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 pH를 조정하여 배지를 제조한 후 실험에 사용하였다. pH를 조정하지 않은 MRS 액체배지 (pH 6.5)를 대조구로 사용하였다. 분리된 유산균을 pH를 조정한 MRS 액체배지에 1% 접종하여 각 생육 적온에서 24시간 정치 배양하여 배지의 초기 pH에 따른 생육을 조사하였다. 생육도는 600 nm에서 측정하였고, 3회 반복하여 평균치로 나타내었다.

가. *Leuconostoc carnosum*의 초기 pH에 따른 생육

Leu. carnosum HT1 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 9). pH 4.0에서 생육이 미약하였으며, pH 5.0~6.0은 대조구 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0~9.0에서 생육이 증가하였으며, pH 9.0에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내었고 pH 10.0에서 생육도가 낮아지는 것을 관찰하였다. 따라서 생육 최적 pH는 9.0으로 확인되었다.

나. *Leuconostoc inhae*의 초기 pH에 따른 생육

Leu. inhae YK7, *Leu. inhae* PG7의 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였다 (Figure 9). 2종 모두 pH 4.0에서 생육이 미약하였으며, pH 5.0~6.0은 대조구 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0~9.0에서 생육이 증가하였으며, pH 9.0에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내었고 pH 10.0에서 생육도가 낮아지는 것을 관찰하였다. 따라서 *Leu. inhae* YK7, *Leu. inhae* PG7의 생육 최적 pH는 9.0으로 확인되었다.

다. *Lactobacillus algidus*의 초기 pH에 따른 생육

Lb. algidus GT6, *Lb. algidus* JG2의 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였다 (Figure 9). 2종 모두 pH 4.0, 5.0에서 생육이 미약하였다. pH 6.0~9.0에서 잘 생육하였으며 pH 10.0에서 생육도가 낮아지는 것을 관찰하였다. *Lb. algidus* GT6의 생육 최적 pH는 7.0, *Lb. algidus* JG2의 생육 최적 pH는 8.0임을 관찰하였다.

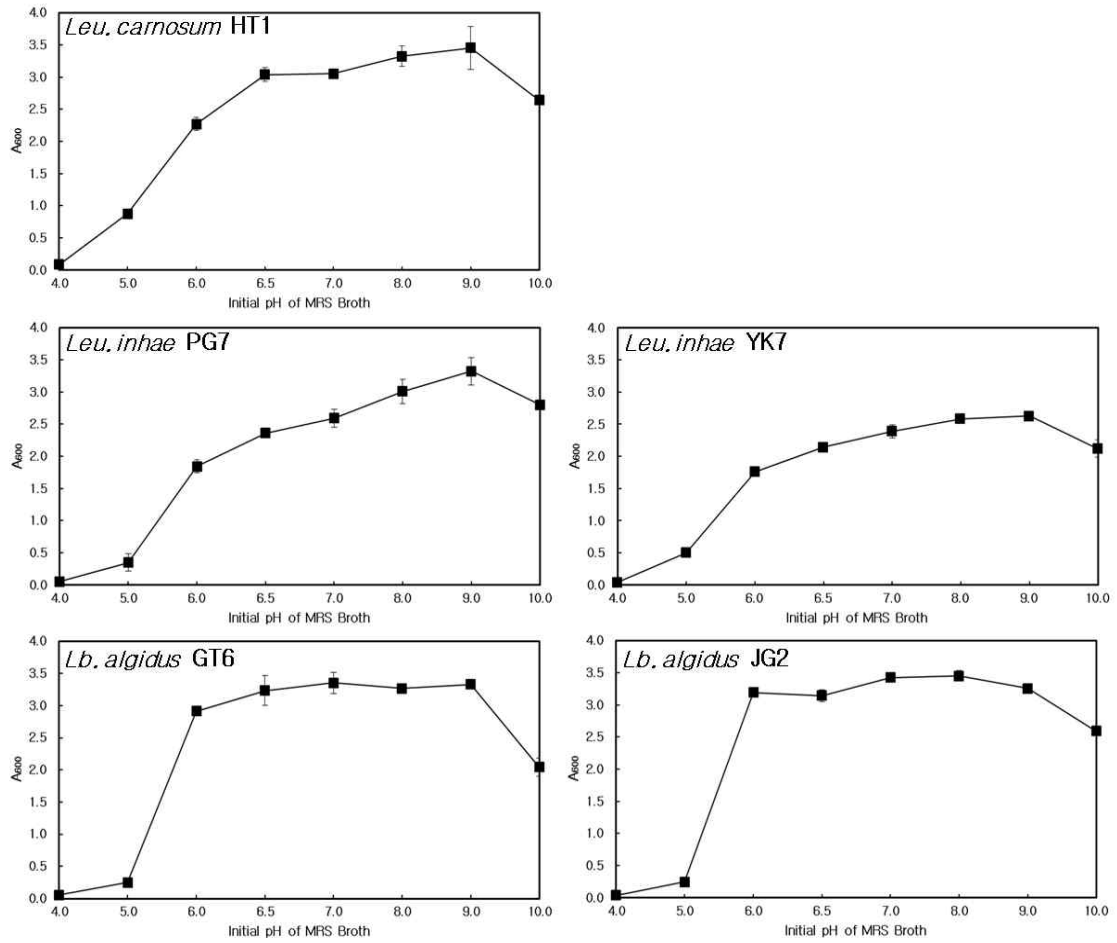


Figure 9. Effect initial medium pH on *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc inhae*, *Lactobacillus algidus* growth

라. *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*의 초기 pH에 따른 생육

Leu. gelidum subsp. *aenigmaticum* 5종의 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 10). 5종 모두 pH 4.0에서 생육이 미약하였으며 pH 5.0~6.0은 대조구 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0~9.0에서 생육이 증가하였으며, pH 9.0에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내었고 pH 10.0에서 생육도가 낮아지는 것을 관찰하였다. 따라서 5종 모두 생육 최적 pH는 9.0임을 관찰하였다.

마. *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 초기 pH에 따른 생육

Leuconostoc gelidum subsp. *gasicomitatum* 5종의 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 11). 5종 모두 pH 4.0에서 생육이 미약하였고 pH 5.0~6.0은 대조구 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0~9.0에서 생육이 증가하였다. 그리고 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY5, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY6는 pH 8.0에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내었고 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3, HM5, JG1은 pH 9.0에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내었으며 5종 모두 pH 10.0에서 생육도가 낮아지는 것을 관찰하였다. 따라서 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY5, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CY6의 생육 최적 pH는 8.0, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* HM5, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* JG1은 pH 9.0임을 관찰하였다.

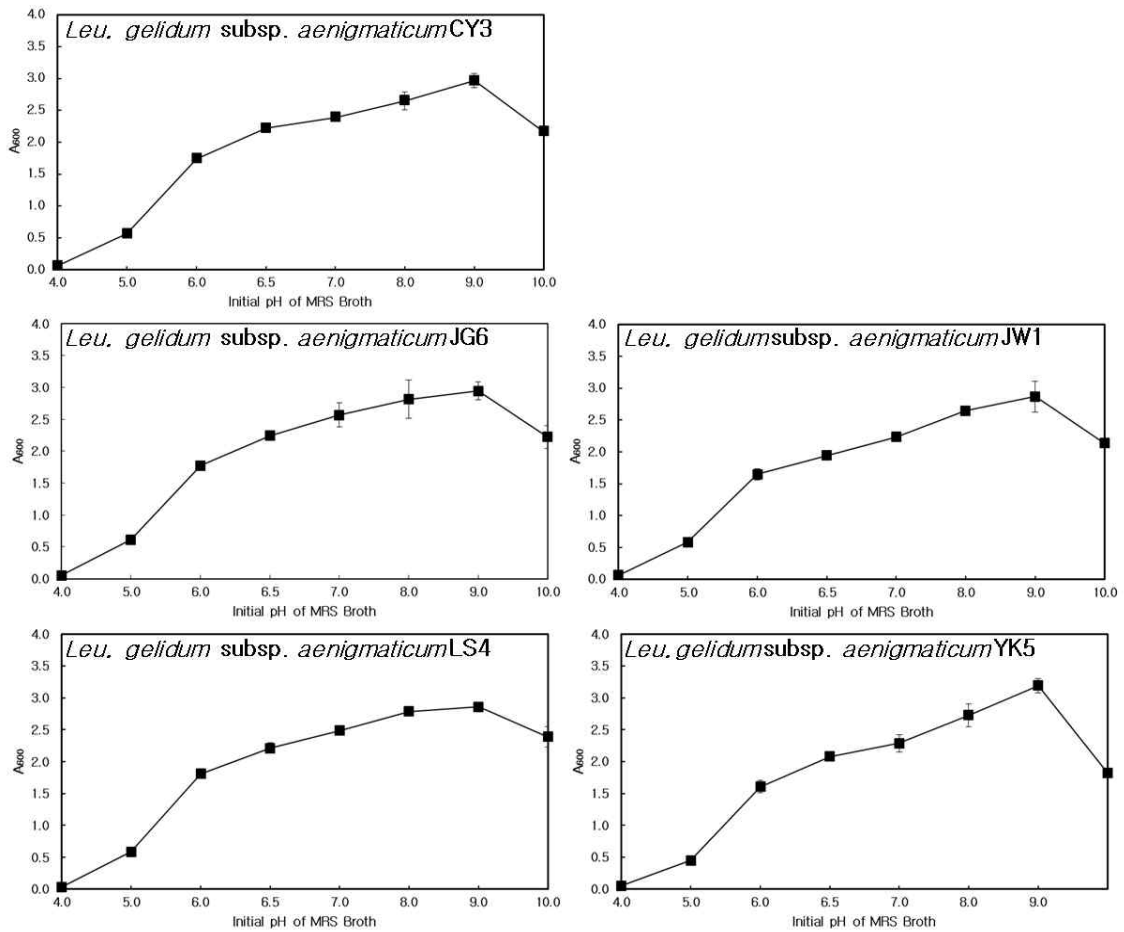


Figure 10. Effect initial medium pH on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* growth

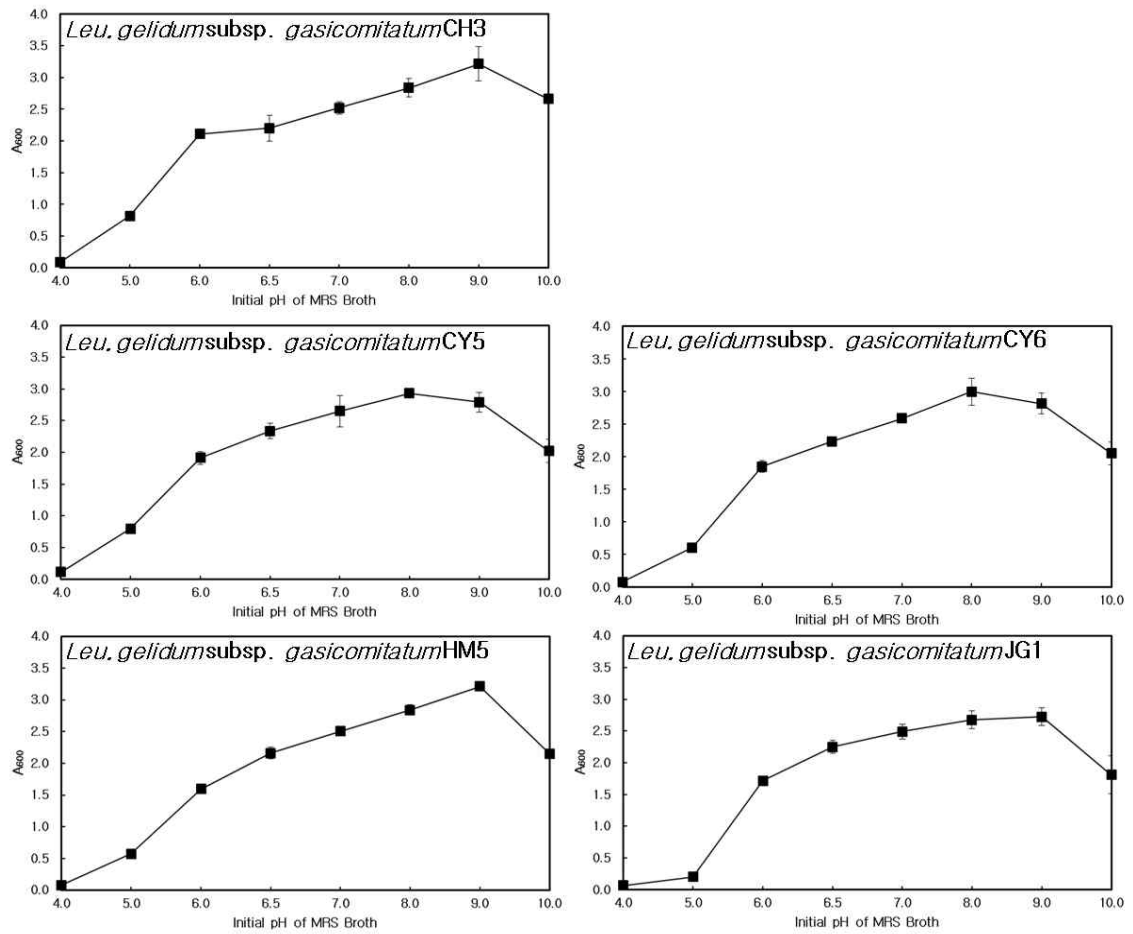


Figure 11. Effect initial medium pH on *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* growth

제 4절 분리 유산균의 안전성 평가

1. 용혈성 검사

저온 발육 유산균 15종을 7% horse blood 평판배지에 백금으로 획선 도말하여 관찰하였다. 15종 모두 α -hemolys 또는 β -hemolysis 반응이 관찰되지 않았다. 양성 대조구 *Bacillus cereus* KCTC 3624는 균체 주위에 투명한을 나타내는 β -hemolysis 반응이 관찰되었다 (Figure 12).

2. 유해효소활성

저온 발육 유산균 15종의 효소활성을 관찰하기 위해 API zym kit (Biomerieux)을 이용하여 실험하였다 (Table 10). *Leu. carnosum* HT1은 acid phosphatase, *Lb. algidus* 2종은 leucine arylamidase, valine arylamidase에 대해 활성을 나타내었다. *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 5종 모두 β -galactosidase에 활성을 나타내었고, CY3와 LS4는 α -glucosidase에 대해서도 활성을 나타내었다. *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 5종 모두 β -galactosidase에 활성을 나타내었고 CY5와 JG1은 α -glucosidase에 대해서도 활성을 나타내었다. 저온 발육 유산균 15종은 모두 α -chymotrypsin, β -glucosidase, benzopyrene 등의 물질이 체내 유입 시 발암물질로 전환하는 효소인 β -glucuronidase 활성이 없는 것으로 관찰되었고, 이에 따라 발암 유발의 위험성이 없는 것으로 사료된다[6, 8].

3. 항생제 내성

Lb. algidus 2종을 제외한 저온 발육 유산균 13종에 대해 European food safety authority (EFSA, 2018)에서 제시한 *Leuconostoc* 속의 break point를 참고하여 ampicillin (Sigma), vancomycin (Sigma), gentamycin (Sigma), streptomycin (Sigma), erythromycin (Sigma), tetracycline (Sigma), chloramphenicol (Sigma) 항생제 8종에 대하여 최소 저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를

측정하였다.

저온 발육 유산균 13종 모두 EFSA 2018에서 제시한 break point보다 낮거나 같은 농도에서 감수성을 보이므로 숙주의 건강에 위험을 나타내지 않는 기준의 항생제 저항성을 나타내었다.

Figure 12. Hemolysis test of psychrotrophic LAB and *B. cereus* KCTC 3624(Control)

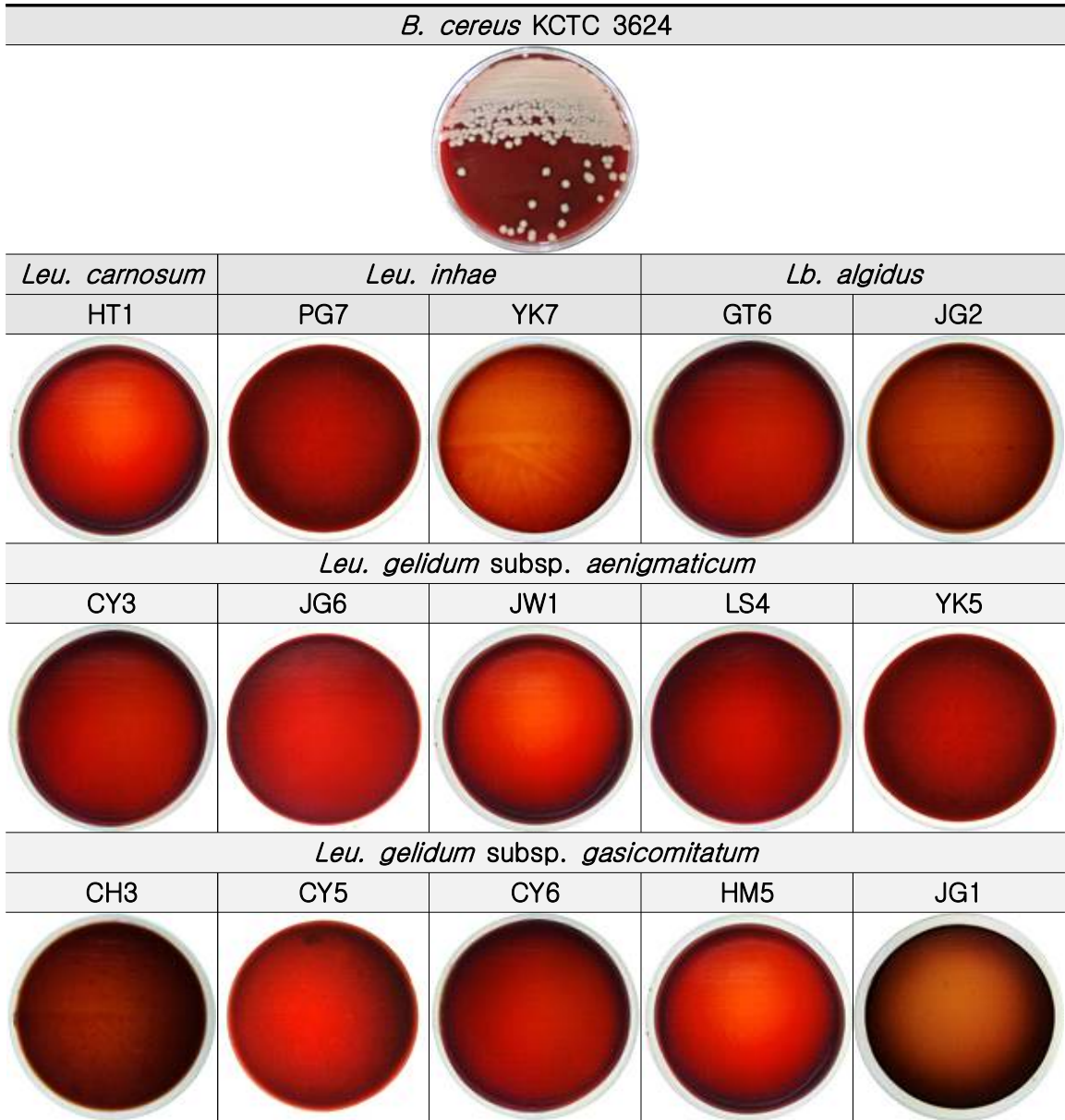


Table 10. Enzymatic activities of psychrotrophic LAB by API zym analysis

NO.	Enzyme	Strain														
		HT1	PG7	YK7	GT6	JG2	CY3	JG6	JW1	LS4	YK5	CH3	CY5	CY6	HM5	JG1
1	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	Alkaline phosphatase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Esterase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Esterase Lipase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Lipase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Leucine arylamidase	0	0	0	≥40	≥40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Valine arylamidase	0	0	0	≥40	≥40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Crystine arylamidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Trypsin	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	α-chymotrysin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Acid phosphatase	20	5	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	5	5	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
13	α-galactosidase	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
14	β-galactosidase	0	0	0	0	0	≥40	20	≥40	≥40	≥40	20	≥40	≥40	20	20
15	β-glucuronidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16	α-glucosidase	5	0	5	0	0	20	0	0	20	5	0	20	0	0	20
17	β-glucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	N-acetyl-β-glucosaminidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	α-mannosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	α-fucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0: No enzyme activity; 5, 10, 20, 30, ≥40 indicates nanomoles of hydrolyzed substrate after 4 h of incubation at 37°C

Table 11. Minimum inhibitory concentrations(MIC) of antibiotics for psychrotrophic LAB.

		Unit: MIC (µg/mL)							
Strain	Antibiotics ¹⁾	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	TET	CHL
	Break point for <i>Leuconostoc</i> sp. ²⁾		2	n.r. ³⁾	16	16	64	1	8
<i>Leu. carnosum</i> HT1		2	256	0.06	1	1	0.25	8	4
<i>Leu. inhae</i> YK7		2	512	0.5	8	8	0.125	2	4
<i>Leu. inhae</i> PG7		1	512	0.125	4	2	0.06	2	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> CY3		2	256	0.25	2	4	0.03	0.25	2
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> LS4		2	512	0.125	2	4	0.06	1	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> JG6		2	512	0.25	4	8	0.06	2	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> JW1		1	512	0.06	1	2	0.06	1	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> YK5		2	512	0.125	2	2	0.125	0.5	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> CH3		1	512	0.125	2	2	0.03	1	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> CY5		2	512	0.5	8	16	0.25	4	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> CY6		2	512	0.25	4	8	0.125	2	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> HM5		2	512	0.25	4	8	0.06	2	4
<i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> JG1		2	512	0.25	4	8	0.125	1	4

1) AMP ampicillin, VAN vancomycin, GEN gentamycin, KAN kanamycin, STR streptomycin, ERY erythromycin, TET tetracycline, CHL chloramphenicol.

2) Break point : Break point were according to the guidelines of European Food Safety Authority (2018).

3) n.r. : Not required.

제 4장 결 론

김치는 저온에서 발효 및 보관이 이루어지는 대표적인 식품으로, 사용되는 재료와 제조 후 숙성 시간 및 온도 그리고 저장조건에 따라서 유산균의 분포가 달라지는 것으로 알려져 있다. 김치의 품질향상을 위해서는 발효에 관여하는 미생물의 특성을 이해하는 것이 중요하다[5, 23, 44, 46].

국내의 여러 연구자들에 의해 김치발효에 관여하는 미생물에 대해 다양한 연구가 진행되었고 비배양학적 방법, 배양학적 방법을 통해 김치 유산균을 분석한 연구에 따르면 *Leuconostoc* 속, *Weissella* 속은 저온에서 김치가 발효되는 동안 중요하게 작용하는 우점종이며, *Lactobacillus* 속은 중온 또는 고온에서 생육이 활발한 것으로 보고되었다[5, 6, 44].

김치의 발효에 관여하는 *Leuconostoc* 속은 *Leu. cirteum*, *Leu. sakei*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. kimchii*, *Leu. carnosum*, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*, *Leu. inhae* 등으로 알려져 있다[5, 28, 45]. 이들 중 저온 발육 유산균으로 알려진 *Leu. carnosum*, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*, *Leu. inhae*는 비배양학적 분석을 통해 김치에서 저온 발효시 검출된다는 연구결과가 보고되었지만[5, 45] 배양학적 방법을 통해 균주를 분리하여 특성을 분석한 것은 다양한 연구가 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 전국에서 수집한 저온 발효 김치로부터 저온 발육 유산균 15종을 분리하고, 분리된 유산균의 특성 및 안전성을 규명하고자 하였다.

전국 9개 지역에서 10개 김치를 수집하여 저장온도 및 기간을 분석하였다. 대부분의 김치의 저장 온도는 10℃ 이하, 저장기간은 3개월 이하로 조사되었다. 김치의 이화학적특성 측정 결과 평균적으로 pH는 pH 4.30±0.14, 산도는 0.83±0.11%, 염도는 2.90±2.59%, 당도는 9.34±3.07 brix°로 나타났다.

비배양학적 방법(PCR-DGGE)을 통해 본 실험실에서 보유하는 김치에서 분리된 유산균 6종과 저온 발효 김치에서 분리한 유산균 5종에 대해 DGGE profile을 확인하였다 (Figure 2). 저온 발효 김치에서 분리한 유산균 5종의 밴드 위치를 확인하였을 때 *Lb. algidus* (band g)는 *Lb. plantarum* (band f)보다 조금 위에서 관찰되었고, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* (band h)과 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* (band i), *Leu. inhae* (band j)는 같은 위치에서 밴드가 관찰되었다. 보관한 저온 발효 김치 시료 7종의 DGGE 분석 결과 (Figure 3) JG 김치에서 *Lb.*

plantarum 또는 *Lb. algidus*로 관찰된 band a에서 밴드가 관찰되었다. 분석한 김치 7종 모두 *W. koreensis* (band c), *Leu. gelidum* sp. 또는 *Leu. inhae*로 관찰된 band g 위치에서 밴드가 관찰되었고, LS kimchi를 제외한 김치 6종 모두 *Lb. sakei* (band b)가 관찰되었다. 이와 비슷한 결과로 Park 등이[45] 김치가 저온에서 발효되는 동안에 *Leu. gelidum*, *Lb. sakei*, *W. koreensis* 균주들이 우점종으로서 김치의 발효에 관여한다고 보고하였으며, Kim 등이[28] 시판 김치 5종을 구입하여 비배양학적 방법으로 미생물 분석을 진행했을 때 *W. koreensis*, *Lb. sakei*, *Leu. gelidum*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. inhae* 등이 빈번하게 검출되었다고 보고하였다.

수집한 김치의 김치여액을 serial dilution에 의해 희석하였고, MRS, MRS+2% CaCO₃ 평판배지에 도말하여 25℃, 30℃에 배양하였다. 배양이 끝나고 colony를 형태학적 특성분석, catalase test를 통해 grouping하여 균주 15종을 분리하였다. 16S rRNA gene 분석을 통한 분자생물학적 동정, 생화학적 특성 분석을 시행하였다. 16S rRNA sequence를 분석한 결과 *Leu. carnosum* 1종, *Leu. inhae* 2종, *Lb. algidus* 2종, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 5종, *Leu. subsp. gasicomitatum* 5종으로 동정되었다. API 50 CHL kit을 이용하여 당 대사능을 분석하였고 *Leu. carnosum*은 13종, *Leu. inhae*는 18종, *Leu. gelidum* sp.은 17~20종에 대해 당 대사능이 있는 것으로 나타났다. 이들 분리된 균주 15종 중 14종은 lactose를 대사하지 않는 것으로 관찰되었다. 이는 유제품에서 분리된 유산균과 달리 김치에서 분리된 유산균과 같은 식물질 기원 유산균은 lactose가 아닌 다른 탄수화물을 대사하여 에너지원으로 사용하는 것으로 사료된다.

분리된 유산균 15종에 대해 배양학적 특성을 분석하였고 배양 온도에 따른 생육, 배지의 초기 pH에 따른 생육을 분석하였다. 배양 온도에 따른 생육을 분석한 결과 *Lb. algidus* JG2는 15℃에서 최적 생육을 하는 것으로 관찰되었고, 이를 제외한 14종은 모두 25℃에서 최적 생육을 하는 것으로 관찰되었다. 유제품 기원 유산균 또는 김치발효에 관여하는 유산균은 30~37℃에서 최적 생육을 하는 중온성 유산균으로 알려져 있지만 분리된 유산균 15종은 모두 30℃에서 생육을 하지 못하거나 25℃보다 더 낮은 생육이 관찰되었다. Moon 등에[41] 의하면 김치에서 분리한 중온성 *Lactobacillus* 속 4종과, *Leuconostoc* 속 4종을 5℃에서 배양하였을 때 8종은 모두 72시간에 A₆₀₀=0.200 정도 생육하였으나 분리된 유산균 15종은 A₆₀₀=0.459~1.645으로 중온성 유산균 보다 저온(5℃)에서 생육도가 더 높은 것으로 관찰되었다. 따라서 저온 발효된 김치에서 분리된 저온 발육 유산균은 30℃보다 낮은

온도에서 생육이 뛰어난 것으로 사료된다. 또한 배지의 초기 pH에 따른 생육도를 관찰한 결과, 저온 발육 유산균 15종 모두 pH 4.0에서 생육이 미약하였으며 pH 5.0~6.0에서 대조구 대비 생육이 낮았다. Chang의[3] 보고에 따르면 *Leu. citreum*의 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였을 때 pH 6.5에서 최대 생육에 도달한 후 pH 7.0~10.0에서 생육도가 감소하였고. Lee, Moon등의[35, 40] 보고에 따르면 각각 *Lactobacillus* 속 4종에 대해 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였을 때 4종 모두 pH 6.5~7.0에서 최대 생육에 도달한 후 pH 7.0~9.0에서 생육도가 유사하거나 감소한다고 보고하였다. *Lb. algidus* GT6는 pH 7.0, *Lb. algidus* JG2는 pH 8.0에서 최대 생육도가 관찰되었으며, 이들을 제외한 13종은 pH 6.5~8.0에서 점점 생육도가 증가하였으며 pH 9.0에서 최대 생육도를 나타내었다. 따라서 저온 발육 유산균은 다른 유산균 보다 알칼리 환경에서 생육이 더 뛰어난 것으로 사료된다.

저온 발육 유산균 15종의 안전성을 검사하였고, 용혈성(hemolysis test), 효소활성(API zym), 항생제내성에 대해 확인하였다. 용혈현상은 적혈구가 붕괴되어 헤모글로빈이 적혈구 밖으로 용출되는 것으로 저온 발육 유산균 15종 모두 용혈현상을 나타내지 않는 것으로 관찰되었다. API zym kit을 사용하여 저온 발육 유산균이 생산하는 효소를 분석하였고 15종 모두 α -chymotrypsin, β -glucosidase와 발암효소로 알려진 β -glucuronidase에 활성이 없는 것으로 나타났다. *Lb. algidus* 2종을 제외한 저온 발육 유산균 13종을 항생제 8종(ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol)에 대하여 감수성을 측정한 결과 항생제에 대해 EFSA 2018 [20]에서 제시한 breakpoint보다 낮은 MIC를 보이면서 감수성을 나타냈다. 따라서 *Lb. algidus* 2종을 제외한 저온 발육 유산균 13종은 모두 안전하며 *Lb. algidus* 2종에 대한 항생제 내성은 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 저온 발효 김치에서 저온 발육 유산균을 분리하여 특성을 규명하였고, 안전성 평가를 실시하였다. 현재 김치의 저온 발효에 관여하는 중온성 유산균에 대한 균주의 특성과 기능에 관한 많은 연구가 보고되었으나 25℃ 이하에서 최적 생육 온도를 가지는 저온 발육 유산균을 분리하여 특성을 분석한 연구는 미흡한 실정이며 균주의 특성 규명과 기능 분석에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 저온 발육 유산균은 안전성 실험을 바탕으로 인체에 안전하며 저온 발효 식품 위한 스타터 균주로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

제 5장 참고문헌

1. AOAC. 1990. Official methods of analysis.15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
2. Björkroth, K., J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzappel, W., H., & Vandamme, P. 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3764-3772.
3. Chang, J., Y. 2005. Characterization of bacteriocin GJ7 from *Leuconostoc citreum* GJ7 and the inducing factor that influence the bacteriocin production, and its application to the Kimchi fermentations. Doctor's Thesis, Chosun University.
4. Chang, J., Y., Choi, Y., R., Chang, H., C. 2011. Change in the Microbial Profiles of Commercial Kimchi during Fermentation. *Korean Journal of Food Preservation*, 18(5), 786-794.
5. Cho, J., H., Yang, C., N., Jeon, J., G., Kim, J., H., Han, H., G. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiology Letters*, 257(2), 262-267.
6. Cho, Y., Rhee, H., S. 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation (I). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 7(1), 15-25.
7. Choi, S., Y., Lee, M., K., Choi, K., S., Koo, Y., J., Park, W., S. 1998. Changes of fermentation characteristics and sensory evaluation of kimchi on

- different storage temperature. *Korean society of food science and technology*, 30(3), 644–649.
8. Delgado, S., O’Sullivan, E., Fitzgerald, G., Mayo, B. 2008. In vitro evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidate. *Journal of Applied Microbiology*, 104(4), 1119–1127.
 9. Dellaglio, F., de Roissard, H., Torriani, S., Curk, M., C., Janssens, D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In: De Roissard, H., et Luquet, F.M. (Eds.), *Bactéries lactiques*, vol. 1. Loriga, Uriage, pp, 25–116.
 10. Dhodapkar, K., M., Henry, N., K. 1996. *Leuconostoc* bacteremia in an infant with short-gut syndrome: case report and literature review. *Mayo Clinic Proceedings*, 71, 1171–1174.
 11. EFSA(European Food Safety Authority). 2018. Guidance on the characterization of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *The EFSA Journal*, 16(3) 5206.
 12. Hayashi, A., Kimura, M., Nakamura, Y., Yasui, H. 2009. Anti-atopic dermatitis effects and the mechanism of lactic acid bacteria isolated from Mongolian fermented milk. *Journal of dairy research*, 76(2), 158–164.
 13. Heavey, P., M., Rowland, I., R. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Gastrointestinal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18(2), 323–336.
 14. Hong, Y., Yang, H., S., Chang, H., C., Kim, H., Y. 2013. Comparison of bacterial community changes in fermenting kimchi at two different temperatures using a denaturing gradient gelelectrophoresis analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 76–84.

15. Hilgarth., M., Behr., J., Vogel., R., F. 2018. Monitoring of spoilage-associated microbiota on modified atmosphere packaged beef and differentiation of psychrophilic and psychrotrophic strains. *Journal of applied microbiology*, 124(3), 740–753.
16. Jung, J., Y., Lee, S., H., Kim, J., M., Park , M., S., Bae, J., W., Hahn. Y., S., Madsen, E., L., Jeon, J., O. 2011. Metagenomic analysis of Kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2264–2274.
17. Jung, J., Y., Lee, S., H., Jeon, C., O. 2014. Kimchi microflora: History, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2385–2393.
18. Jung, J., Y., Lee, S., H., Jin, H., M., Hahn, Y., Madsen, E., L., Jeon, C., O. 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 171–179.
19. Kang, B., S., Seo, J., G., Lee, G., S., Kim J., H., Kim, S., Y., Han Y., W., Kang, H., Kim, H., O., Rhee, J., H., Chung, M., J., Park, Y., M. 2009. Antimicrobial activity of enterocins from *Enterococcus faecalis* SL-5 against *Propionibacterium acnes*, the causative agent in acne vulgaris, and its therapeutic effect. *Journal of Microbiology*, 47(1), 101–9.
20. Kato, Y., Sakala, R., M., Hayashidani, H., Kiuchi, A., Kaneuchi, C., & Ogawa, M. 2000. *Lactobacillus algidus* sp. nov., a psychrophilic lactic acid bacterium isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1143–1149.
21. Kim, B., J., Lee, J., H., Jang, J., C., Kim, J., H., and Han, H., G. 2003.

- Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(4), 1123–1126.
22. Kim, B., J., Lee, H., J., Park, S., Y., Kim, J., H., Han, H., U. 2000. Identification and Characterization of *Leuconostoc gelidum*, Isolated from Kimchi, a Fermented Cabbage Product, *Journal of Microbiology*, 38(3), 132–136.
23. Kim, B., Seo, W., T., Kim, M., G., Yun, H., D., Cho, K., M. 2012. Metagenomic lactic acid bacterial diversity during *Mulkimchi* fermentation based on 16S rRNA sequence. *The korean society for applied biological chemistry*. 55(6), 787–792.
24. Kim, E., J. 2015. Characterization of *Weissella* sp., *Leuconostoc* sp., and *Lactobacillus* sp. isolated from kimchi. Master's Thesis, Chosun University.
25. Kim, J. H., Lee, W. J., Cho, Y. W., Kim, K. Y. 2009. Storage-life and palatability extension of betula platyphylla sap using lactic acid bacteria fermentation, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 38(6), 787–794.
26. Kim, J., E., Kim, J., Y., Lee, K., W., Lee, H., J. 2007. Cancer Chemopreventive Effects of Lactic Acid Bacteria, *Journal of Microbiology Biotechnol*, 17(8), 1227–1235.
27. Kim, M., H., Chang, M., J. Kim, M., H. 2000. Fermentation property of chinese cabbage kimchi by fermentation temperature and salt concentration, *The korean society for applied biological chemistry*, 43(1), 7–11.
28. kim, M., J., Chun, J., S. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a

- korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis, *International journal of food microbiology*, 103(1), 91–6.
29. Kim, Y., H., Whang, J., Y., Whang k., Y., Oh, S., J., kim, S., H. 2008. Characterization of the cholesterol-reducing activity in a cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(6), 1483–1490.
 30. Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), 103–25.
 31. Lee, D., Kim, S., Cho, J., Kim, J. 2008. Microbial population dynamics and temperature changes during fermentation of *Kimjang kimchi*. *Journal of microbiology*, 46(5), 590–593.
 32. Lee, K., E., Choi, U., H., Ji, G., E. 1996. Effect of kimchi intake on the composition of human large intestinal bacteria. *Korean Society of Food Science and Technology*, 28(5), 981–986.
 33. Lee, S., H., Chang, H., C. 2016. Isolation of antifungal activity of *Leuconostoc mesenteroides* TA from kimchi and characterization of its antifungal compounds. *Food Science and Biotechnology*, 25(1), 213–219.
 34. Lee, E., H., Lee, M., J., Song, Y., O. 2012. Comparison of Fermentation Properties of Winter Kimchi Stored for 6 Months in a Kimchi Refrigerator Under Ripening Mode or Storage Mode. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 41(11), 1619–1625.
 35. Lee, Y. 2006. Isolation and characterization of lactic acid bacteria showing anti-cancer activity and anti-*Helicobacter pylori*. Master's Thesis, Chosun University.

36. Lee, K., Lee, Y. 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* as a starter on the food quality and microbiota of kimchi, *Food Science and Biotechnology*, 19(3), 641–646.
37. Lyhs, U., Koort, J., Lundström, H., S., Björkroth, K., J. 2004. *Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve. *International Journal of Food Microbiology*, 90(2), 207–218.
38. Moon, S., H., Chang, H., C., Kim, I., H. 2013. Development of a novel medium with chinese cabbage extract and optimized fermentation conditions for the cultivation of *Leuconostoc citreum* GR1. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 42(7), 1125–1132.
39. Moon, S., H., Kim, C., R., Chang, H., C. 2018. Heterofermentative lactic acid bacteria as a starter culture to control kimchi fermentation. *LWT – Food Science and Technology*, 88, 181–188.
40. Moon, S., H., Moon, J., S., Chang, H., C. 2015. Rapid manufacture and quality evaluation of long-term fermented kimchi (mukeunji) using *Lactobacillus sakei* SC1. *Food Science and Biotechnology*, 24(5), 1797–1804.
41. Moon, S., H., Kim, E., J., Kim, E., J., Chang, H., C. 2018. Development of fermentation storage mode for kimchi refrigerator to maintain the best quality of kimchi during storage. *Korean Society of Food Science and Technology*, 50(1), 44–54.
42. Nieminen, T., T., Vihavainen, E., Paloranta, A., Lehto, J., Paulin, L., Auvinen, P., & Björkroth, K., J. 2011. Characterization of psychrotrophic bacterial communities in modified atmosphere-packed meat with terminal restriction

- fragment length polymorphism. *International Journal of Food Microbiology*, 144(3), 360–366.
43. Ogier, J., C., Casalta, E., Farrokh, C., Saïhi, A. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *International journal of food microbiology*, 126(3), 286–290.
44. Oh, S., H., Kim, H., J., Kim, Y., H., Yu, J., J., Park, K., B., Jeon, J., I. 2008. Changes in some physic–chemical properties and γ -aminobutyric acid content of *Kimchi* during fermentation and storage. *Journal of Food Science and Nutrition*, 13(3), 219–224.
45. Park, J., A., Heo, G., Y., Lee, J., S., Kim, B., Y., Mheen, T., I., Kim, C., K., Ahn, J., S. 2003. Change of microbial communities in kimchi fermentation at low temperature, *Korean Journal of Microbiology*, 39(1), 45–50.
46. Park, J., B., Kim, S., G., Yu, J., H., Kim, J., S., Kim, E., S., Jeon, S., I., Oh, S., H. 2013. Changes in fermentation properties and ornithine levels of baechu kimchi by storage condition. *The Korean Journal of Food And Nutrition*, 26(4), 945–951.
47. Park, S., J., Chang, J., H., Cha, S., K., Moon, G., S. 2008. Microbiological analysis of dongchimi, korean watery radish kimchi, at the early and mid–phase fermentation. *Food science and biotechnology*, 17(4), 892–894.
48. Pennacchia., C., Ercolini., D., Villani., F. 2011. Spoilage–related microbiota associated with chilled beef stored in air or vacuum pack. *Food Microbiology*, 28(1), 84–93.
49. Pothakos, V, Snauwaert C, De Vos P, Huys G, Devlieghere F. 2014. Monitoring psychrotrophic lactic acid bacteria contamination in a

- ready-to-eat vegetable salad production environment. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 7–16.
50. Pothakos, V., Snauwaert C., De Vos P., Huys G., Devlieghere, F. 2014. Psychrotrophic members of *Leuconostoc gasicomitatum*, *Leuconostoc gelidum* and *Lactococcus piscium* dominate at the end of shelf-life in packaged and chilled-stored food products in Belgium. 39, 61–67.
51. Pothakos, V., Nyambi, C., Zhang, B., Papastergiadis, A., De Meulenaer, B., & Devlieghere, F. 2014. Spoilage potential of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) species: *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* and *Lactococcus piscium*, on sweet bell pepper (SBP) simulation medium under different gas compositions. *International Journal of Food Microbiology*, 178, 120–129.
52. Rahkila, R., De Bruyne, K., Johansson, P., Vandamme, P., & Björkroth, J. 2014. Reclassification of *Leuconostoc gasicomitatum* into the species *Leuconostoc gelidum* and description of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gelidum* subsp. nov., *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* subsp. nov. and *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(4), 1290–1295.
53. Rahkila, R., Nieminen, T., Johansson, P., Säde, E., & Björkroth, J. 2012. Characterization and evaluation of the spoilage potential of *Lactococcus piscium* isolates from modified atmosphere packaged meat. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 50–59.
54. Ryu, E., H., Chang, H., C. 2013. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 63(4), 1387–1395.

55. Ryu, E., H., Yang, E., J., Woo, E., R., Chang, H., C. 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food Microbiology*, 41, 19–26.
56. Säde, E. 2011. *Leuconostoc* spoilage of refrigerated, packaged foods. PhD thesis. The Faculty of Veterinary Medicine. University of Helsinki.
57. Sakala, R., M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C., Ogawa, M. 2002a. Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigerated beef. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 173–179.
58. Sakala, R., M., Kato, Y., Hayashidani, H., Murakami, M., Kaneuchi, C., & Ogawa, M. 2002b. *Lactobacillus fuchuensis* sp. nov., isolated from vacuum-packaged refrigerated beef. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(4), 1151–1154.
59. Sarangraj, P., Naidu, M., A., Sivasakthivelan, P. 2013. Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(6), 1124–1133.
60. Schirmer, B., C., Heir, E., and Langsrud, S. 2009. Characterization of the bacterial spoilage flora in marinated pork products. *Journal of applied microbiology*, 106(6), 2106–2032.
61. Shaw, B., G., & Harding, C., D. 1989. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 39(3), 217–223.
62. Shin, D., H., Kim, M., S., Han, J., S., Lim, D., K., Bak, W., S., 1996. Changes of chemical composition and microflora in chemical kimchi. *Korean*

Society of Food Science and Technology, 28(1), 137–145.

63. So, M., H., Kim, Y., B. 1995. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 27(4), 495–505.
64. So, M., H., Shin, M., Y., Kim, Y., B. 1996. Effects of psychrotrophic lactic acid bacterial starter on kimchi fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 28(5), 806–816.
65. Stiles, M., E., Holzapfel, W., H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36(1), 1–29.
66. Vihavainen, E.,J., Björkroth, K., J. 2007. Spoilage of value-added, high-oxygen modified-atmosphere packaged raw beef steaks by *Leuconostoc gasicomitatum* and *Leuconostoc gelidum*. *International journal of food microbiology*, 119(3), 340–345.