



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](#)

2021年 2月

碩士學位 論文

목은지로부터 분리된
*Pediococcus inopinatus*의 특성 규명
및 안전성 평가

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

李秀榮

묵은지로부터 분리된
*Pediococcus inopinatus*의 특성
규명 및 안전성 평가

Characterization and safety assessment of
Pediococcus inopinatus isolated from *Mukeunji*

2021年 2月 25日

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

李秀榮

묵은지로부터 분리된
*Pediococcus inopinatus*의 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


2020年 10月


朝鮮大學校大學院


食品營養學科

李 秀 榮

李秀榮의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 이재준 

委員 조선대학교 교수 이주빈 

委員 조선대학교 교수 장해춘 

2020年 11月

朝鮮大學校大學院

목 차

LIST OF TABLES	IV
LIST OF FIGURES	V
ABSTRACT	VI
제 1장 서론	1
제 2장 실험 재료 및 방법	4
제 1절 시판 목은지의 수집 및 분석	4
1. 목은지 시료의 준비	4
2. 수집한 목은지의 이화학적 특성 분석	4
3. 비배양학적 방법을 통한 목은지의 미생물 분석	8
가. 사용 목은지 및 균주	8
나. Genomic DNA 추출 및 PCR을 통한 증폭	8
다. PCR-DGGE를 통한 목은지의 미생물 분석	11
제 2절 <i>P. inopinatus</i> 추정 균주의 분리 및 동정	13
1. <i>P. inopinatus</i> 추정 균주의 분리	13
2. 분리한 <i>P. inopinatus</i> 추정 균주의 동정	13
제 3절 목은지로부터 분리한 <i>P. inopinatus</i> 의 특성	14
1. <i>P. inopinatus</i> 배양액 pH 측정	14
2. <i>P. inopinatus</i> 당 대사능 확인	14
제 4절 선발 유산균의 배양 온도에 따른 생육	15

1. 사용 균주 및 배지	15
2. 배양 온도에 따른 생육도	15
제 5절 분리 유산균의 안전성 평가	16
1. 용혈성 검사	16
2. 유해 효소 활성	16
3. 항생제 내성	17
4. Biogenic amine 생성	17
제 3장 실험 결과 및 고찰	18
제 1절 시판 목은지의 수집 및 분석	18
1. 수집한 목은지의 저장 온도 및 저장 기간 분석	18
2. 수집한 목은지의 이화학적 특성 분석	18
3. 비배양학적 방법을 통한 목은지의 미생물 분석	18
제 2절 <i>P. inopinatus</i> 추정 균주의 분리 및 동정	25
1. <i>P. inopinatus</i> 추정 균주의 분리	25
2. 분리한 <i>P. inopinatus</i> 추정 균주의 동정	25
제 3절 목은지로부터 분리한 <i>P. inopinatus</i> 의 특성	31
1. <i>P. inopinatus</i> 배양액 pH 측정	31
2. <i>P. inopinatus</i> 당 대사능 확인	31
제 4절 선발 유산균의 배양 온도에 따른 생육	40
1. 배양 온도에 따른 흡광도 변화	40
2. 배양 온도에 따른 pH와 산도의 변화	44
제 5절 분리 유산균의 안전성 평가	48
1. 용혈성 검사	48

2. 유해 효소 활성화	48
3. 항생제 내성	49
4. Biogenic amine 생성	49
제 4장 결론	55
제 5장 참고문헌	59

LIST OF TABLES

Table 1. Product name of Mukeunji collected from 40 regions.....	6
Table 2. List of lactic acid bacteria(LAB) used PCR-DGGE.....	10
Table 3. Storage temperature and aging period of product mukeunji.....	19
Table 4. Chemical properties of products mukeunji.....	21
Table 5. Identification of strains isolated from mukeunji based on 16S rRNA gene sequence.....	29
Table 6. Culture medium pH of <i>P. inopinatus</i>	33
Table 7. Carbohydrate metabolism of <i>P. inopinatus</i> isolated from mukeunji.....	35
Table 8. Identification of strains isolated from mukeunji based on carbohydrate metabolism.....	39
Table 9. Enzymatic activities of <i>P. inopinatus</i> by API ZYM analysis.....	52
Table 10. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics for <i>P. inopinatus</i>	53

LIST OF FIGURES

Figure 1. Mukeunji sampling locations	5
Figure 2. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from thirty-five product mukeunji	23
Figure 3. Isolation of <i>P. inopinatus</i> from mukeunji	26
Figure 4. Gram staining and microscopic observation of isolated strains	27
Figure 5. Growth of lactic acid bacteria at different temperature	41
Figure 6. pH changes of lactic acid bacteria growth at different temperature	45
Figure 7. Hemolysis test of <i>P. inopinatus</i> and <i>B. cereus</i> KCTC 3624	51
Figure 8. The developed screening plate for biogenic amine production by <i>P. inopinatus</i>	54

ABSTRACT

Characterization and safety assessment of *Pediococcus inopinatus* isolated from *Mukeunji*

Su Yeong Lee

Advisor : Prof. Hae Choon Chang, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

In this study, *Pediococcus inopinatus* strains, which were dominant microorganism in mukeunji, were isolated and then analyzed their characteristics and safeties. Forty samples of mukeunji were collected from 32 regions in Korea. Storage temperatures and aging periods of product mukeunji samples were investigated and their chemical properties were determined. Forty samples of mukeunji were collected to isolate the dominant lactic acid bacteria (LAB). And then identified the LAB isolated base on morphological characteristics, gram-staining and determination of 16S rRNA gene sequence. As a result, 31 strains of *P. inopinatus* were isolated.

The result of measuring the pH of the culture medium after culturing the isolated *P. inopinatus* and the type strain. It was confirmed that the pH was 4.14 ± 0.10 . As a result of analyzing sugar metabolism using the API 50 CHL kit, it was confirmed that it can metabolize an average of 11 to 16 sugars. The effect of culture temperature on the growth of *P. inopinatus* strains during cultivation was confirmed. It was confirmed that it grows best at 30°C.

As a result of safety testing, none of the *P. inopinatus* strains showed α , β type hemolysis, and no harmful enzyme activity. Also *P. inopinatus* strains showed low antibiotic sensitivity to 6 antibiotics. As a result of observing whether or not *p. inopinatus* produced biogenic amine, it was observed that it did not produce

biogenic amine. Through this study, it can be proved that the *P. inopinatus* strain, which dominates the mukeunji, is safe.

제 1 장 서 론

영국의 세계적 식음료 권위지 “Foodbev”에서는 향후 글로벌 슈퍼푸드 시장을 지배할 식품으로 발효식품, 식물성 단백질 파우더, 식물성 단백질, 슈퍼오일, 슈퍼시드를 선정하였다[58]. 그 중에서도 김치는 소금에 절인 각종 채소류를 짓갈을 비롯한 여러 부재료들과 혼합한 뒤 발효, 숙성시킨 우리나라 고유의 전통 발효 식품이다[30]. 일반적으로 김치의 발효는 주재료와 부재료에서 유래한 다양한 미생물(호기성·혐기성 세균, 효모)에 의해 이루어지는데, 김치를 담근 후 저장하는 동안 미생물들은 발효 과정을 거치면서 김치 특유의 독특한 향미와 식감, 향, 생리활성 물질 등을 생성한다[31,57]. 특히 정장작용, 혈청콜레스테롤 저하, 면역 증강작용, 항암작용, 항산화 활성 등의 기능이 있다고 알려진 유산균은 김치 발효에 관여하여 다양한 건강상의 이점을 부여한다[9,18,46,55]. 그 중에서도 김치의 발효 초기에 우점하는 hetero-type의 *Leuconostoc* 속은 이산화탄소를 생성하여 김치를 혐기적인 상태로 만들고, 유기산과 만니톨을 생성하여 김치에 부드러운 신 맛과 톡 쏘는 시원한 맛을 부여하여 관능적 특성 향상에도 기여한다고 알려져 있다[7]. 이러한 김치의 효능 때문에 미국의 건강 전문 월간지 “Health”는 한국의 김치를 일본의 낫토, 스페인의 올리브유, 그리스의 요구르트, 인도의 렌즈콩과 함께 세계 5대 건강식품으로 선정한 바 있다[21].

묵은지는 일반 김치에 비해 배추를 더 짜게 절인 후 여러 부재료 및 양념을 덜 사용하여 10℃ 이하에서 6개월~3년간 저장하여 숙성하는 김치를 뜻한다[19,30]. 때문에 김치 발효 및 저장 기간이 3개월 이하여서 단순 신맛만 강하고 풍미가 떨어지는 신김치와 달리 묵은지는 강한 신맛, 짠맛과 더불어 특유의 묵은지 향미를 내는 별미김치이다[43]. 일반 김치에 비하여 유산균의 수가 적다고 알려져 있지만, 묵은지 내의 사멸한 유산균이 장내의 살아있는 유산균의 성장인자를 촉진하여 증식을 도우며 각종 아미노산, 젖산, 생리활성 물질들이 일반 김치보다 더 많이 함유되어 있다고 알려져 있다[21].

최근 국내 김치 업체들의 미국 내 대형유통업체 입점 확대에 인하여 김치 수출량이 큰 폭으로 증가하였고, 호주에서도 한국산 BBQ와 김치를 함께 먹는 K-식문화가 인기를 끌면서 김치에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 특히, 2020년 상반기에는 코로나 바이러스감염증-19의 여파로 인한 내식(內食)의 증가와 더불어 면역력 강화 식품에 대한 선호도가 증가하면서 김치 수출액이 전년 동기 대비 44.3% 증가를 기록하였다[60].

하지만 일반 김치가 아닌 파김치, 갓김치, 오이김치 등 세분화 된 별미김치를 찾는 소비자들이 증가함에 따라 소비자들의 다양한 선호를 반영한 별미김치가 꾸준히 출시되고 매출 또한 매년 증가하고 있으나, 국내 일반 김치의 시장 규모에 비해 별미김치의 시장 규모는 아직 상대적으로 부진한 편이며, 특히 묵은지는 특유의 향과 식감으로 인하여 타 별미김치에 비하여 수요가 낮은 편이다[40]. 따라서 묵은지 수급에 관련된 통계도 자료화되지 않고 있다[40]. 묵은지를 대상으로 한 연구도 묵은지 특성 분석, 묵은지 발효 숙성, 묵은지 향미 성분, 묵은지 제조 기술, 묵은지를 활용한 제품 개발 등과 같은 일반적인 연구가 주를 이룰뿐더러 10종 미만의 묵은지 시료만이 연구에 사용되어 그 연구 결과가 보편적인 묵은지 특징인지 규정하기 어려운 점이 있다[25,26,27,32,41].

묵은지의 균총에 대하여 조사한 연구 역시 일반 김치에 비해 크게 미진한 실정이다. Park 등(2010)은 비배양학적 방법인 16S rRNA gene sequence 분석법을 이용하여 4°C에서 2년 이상 숙성한 묵은지 3종의 균총을 조사한 결과, 2년 이상 숙성한 묵은지 3종에서 *Leuconostoc gelidum*는 각각 46.4%, 34.5%, 30.4%의 우점도를 나타내고, *Lactobacillus sakei subsp. sakei*는 각각 14.3%, 20.7%, 34.8%의 우점도를 나타내어 2년 이상 숙성한 묵은지에서 *Leuconostoc gelidum*과 *Lactobacillus sakei subsp. sakei*가 우점함을 규명한 바 있다[47]. Hong 등(2015)은 1년 이상 숙성한 묵은지 1종과 2년 이상 숙성한 묵은지 1종의 균총을 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate-Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)를 통하여 분류하고, 16S rRNA gene sequence 분석법을 통하여 묵은지의 균총을 조사하였다. 조사 결과 김치의 숙성 기간이 길어질수록 김치 내의 균총이 감소하며 1년 동안 숙성한 묵은지에서 *Pediococcus damnosus*가 93.3%의 우점도를 나타내고, 2년 동안 숙성한 묵은지에서는 *P. damnosus*와 *P. parvulus*가 각각 75.0%, 25.0%로 우점함을 보고하였다. 이와 더불어 *Pediococcus* 속이 낮은 온도와 pH에서 견딜 수 있고 pediocin과 biofilm을 형성하므로 저온에서 오랜 기간 숙성하는 묵은지에서 우점할 것이라고 예측하였으나, 이러한 생리적 특성을 지니는 유산균은 *Pediococcus* 속 외에도 다양하게 존재하므로 묵은지에서 *Pediococcus* 속이 우점할 수 있는 다른 원인에 대한 연구가 필수적일 것이라고 제안하였다[20].

하지만 위와 같은 묵은지 균총 분석 연구에서도 3종 미만의 묵은지 시료만이 사용되어 일반적인 묵은지의 균총 분석이 선행되어야 한다고 사료된다. 이에 본 연구에서는 전국으로부터 수집한 묵은지 40종을 분석함으로써 일반적인 묵은지 특성과 균총에 대한 데이터를 수집하였고 묵은지에서 우점하는 유산균주 *P. inopinatus*를 분리 및 동정 후 묵은지 내의 우점도를 확인하였다.

*P. inopinatus*는 맥주 효모에서 최초로 분리된 유산균주로 흔히 맥주의 부패균으로 알려져 있으며, 지금까지 보고된 *P. inopinatus*에 대한 연구 동향을 살펴보면 부패된 맥주에서 분리된 *P. inopinatus*가 맥주의 부패에 어떠한 관여를 하는지에 대한 연구가 주를 이룬다[3,22,56]. 이에 따라 *P. inopinatus*의 특성 분석에 대한 연구에서도 *P. inopinatus*의 분리원이 부패된 맥주인 것을 확인할 수 있다[14,22]. Lim 등(2020)은 함경도 지방의 전통 발효 음식인 가자미 식혜의 발효 초기에 우세하게 관여하는 *P. inopinatus*를 분리하여 프로바이오틱 균주로의 활용 가능성을 확인하기 위하여 특성 및 응집능, 표면 소수성, 향균 활성, 항산화 활성 등을 평가하여 *P. inopinatus*는 뛰어난 응집능이 있음을 보고하였다[37]. 그러나 일반 가정집에서 제조한 1종의 가자미 식혜 시료만이 연구에 사용되었고 분리된 *P. inopinatus* 또한 1종이라는 점에서 연구 결과를 토대로 *P. inopinatus*의 특성과 안전성을 규명하기에는 한계가 있다. 이러한 사실을 통하여 묵은지에서 분리되는 *P. inopinatus*의 특성 분석이나 안전성 평가에 대한 데이터가 부족하다고 사료된다.

유산균은 여러 건강상의 이점으로 인하여 오래 전부터 발효 식품을 비롯한 다양한 식품에서 발효 종균으로 이용되고 있으며 보편적으로 안전하다고 인정되는 GRAS (Generally Recognized As Safe) 미생물로 인식되어 왔다[15]. 그러나 *P. inopinatus*의 안전성 평가에 대한 자료 부족으로 인하여 *P. inopinatus*는 GRAS 미생물로 인정되지 않는다. 그러므로 우리나라 전통 발효 식품인 묵은지로부터 분리되는 새로운 유산균의 경우, 안전성 평가를 통한 안전성 규명은 더욱 필수적이다.

본 연구는 전국 묵은지 제조업체로부터 40종의 묵은지를 수집하여 묵은지의 이화학적 특성 분석 및 비배양학적인 방법을 통한 미생물학적 특성 분석을 수행하였다. 그리고 미생물학적 특성 분석 결과 *P. inopinatus*가 존재한다고 판단되는 묵은지로부터 *P. inopinatus* 추정 균주를 분리·동정 후 우점도를 분석하였다. 또한 선발 기준에 따라 *P. inopinatus* 6종을 선발하여 형태학 및 배양학적 특성 분석을 실시하고 용혈성 검사, 유해 효소 활성 측정, 항생제 내성 및 biogenic amine 생성 여부 확인 등 안전성을 평가함으로써 본 연구 결과에 기초하여 향후 진행될 묵은지를 대상으로 한 다양한 연구로의 접근성을 높이며 *P. inopinatus*의 식품 적용 가능성을 확인하고자 하였다.

제 2장 실험 재료 및 방법

제 1절 시판 목은지의 수집 및 분석

1. 목은지 시료의 준비

본 연구에서는 전국 32개 지역의 온라인 판매처에서 저장 5개월~1년 9개월 숙성된 목은지 40종을 구입하여 실험에 사용하였다. 서울·경기도 지역에서 목은지 7종, 강원도 지역에서 목은지 6종, 충청도 지역에서 목은지 6종, 대구·울산·경상도 지역에서 목은지 9종, 광주·전라도 지역에서 목은지 11종, 제주도 지역에서 목은지 1종을 수집하였다 (Figure 1, Table 1).

2. 수집한 목은지의 이화학적 특성 분석

수집한 목은지를 마쇄 후 멸균 거즈로 여과하여 얻어진 목은지 여액으로 이화학적 특성을 분석하였다. pH와 산도는 pH 510 (Fisher Science Education, Hanover Park, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 산도는 A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists)법에 의하여 목은지 여액 10 mL에 0.1 N NaOH 용액을 적정하여 pH 8.10이 되었을 때 0.1 N NaOH의 소비량을 측정하였고, 이를 아래 계산식에 대입하여 총산 함량(%)을 구하였다[2].

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

a: 0.1 N NaOH 용액의 소비량 (mL)

f: 0.1 N NaOH 용액의 factor (1.001)

F: 0.1 N NaOH 용액의 1 mL 상당 유기산 계수

목은지의 염도는 ES-421 (ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였고, 당도는 Digital probe refractometer WM-7 (ATAGO)를 사용하여 측정하였다.



Figure 1. Mukeunji sampling locations

Table 1. Product name of mukeunji collected from 40 areas (continue)

Collected area		Product name
Seoul · Gyeonggi	Bucheon	UM mukeunji
	Hwaseong	GMN mukeunji
	Icheon	KL mukeunji
	Paju	BMC mukeunji
		AM mukeunji
	Seoul	JM mukeunji
	Yeoncheon	AR mukeunji
Gangwon	Gangneung	AN mukeunji
	Jeongseon	GD mukeunji
	Pyeongchang	PC mukeunji
	Sokcho	SW mukeunji
	Taebaek	TGM mukeunji
		DM mukeunji
Chungcheong	Chungju	YN mukeunji
	Danyang	SM mukeunji
	Goesan	EC mukeunji
	Nonsan	SNK mukeunji
		BCU mukeunji
	Seosan	NB mukeunji

Table 1. (Continue)

Collected area		Product name
Daegu · Ulsan · Gyeongsang	Andong	PS mukeunji
	Changwon	UCM mukeunji
	Cheongsong	ME mukeunji
	Daegu	PG mukeunji
	Gimhae	CG mukeunji
	Goryeong	KR mukeunji
	Miryang	JO mukeunji
	Ulsan	NM mukeunji
	Yeongyang	TN mukeunji
Gwangju · Jeolla	Gurye	RM mukeunji
	Gwangju	KD mukeunji
		MM mukeunji
		BK mukeunji
		RK mukeunji
		KG mukeunji
		AJ mukeunji
	Haenam	HAL mukeunji
	Jeonju	JJ mukeunji
	Muan	HK mukeunji
Muju	BD mukeunji	
Jeju	Jeju	MK mukeunji

3. 비배양학적 방법을 통한 묵은지의 미생물 분석

가. 사용 묵은지 및 균주

수집한 묵은지 40종의 미생물 균총을 분석하기 위하여 Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)를 통해 band를 확인하였다[29,33]. 묵은지 시료는 마쇄 후 멸균 거즈로 여과한 여액을 사용하였다. Standard로는 배추김치 발효시 우점하는 균주를 분리, 동정하여 본 실험실에서 보유하고 있는 유산균 6종과 국립농업과학원(Korean agricultural culture collection, Wanju, Korea)에서 분양받은 표준 균주 *Pediococcus inopinatus* KACC 12308^T을 사용하였다(Table 2). 모든 균주는 de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, Difco, Sparks, MD, USA) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치배양 후 계대하여 사용하였다.

나. Genomic DNA의 추출 및 PCR을 통한 증폭

묵은지 여액 40종과 유산균 7종의 배양액을 원심분리(13,475× g, 5 min, 4℃)하여 상정액을 제거하고 얻어진 균체를 멸균수로 세척한 다음 DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 추출한 genomic DNA는 0.8% agarose gel에 전기 영동하여 genomic DNA의 분리 여부를 확인하였고, Spectrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Little Chalfont, England)으로 흡광도를 측정하여 농도와 순도를 확인하였다.

추출한 genomic DNA를 증폭하기 위해 Polymerase chain reaction (PCR) template으로 사용하였다. DNA 증폭기는 CP2-03 (Corbett research, Sydney, Australia)을 이용하였고, primer는 universal primer 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGG CTCAG-3')를 forward primer로, universal primer 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3')를 reverse primer로 사용하였다. PCR template은 멸균수, 10 × PCR buffer (Mg²⁺ free), dNTP mixture (2.5 mM each), 25 mM MgCl₂, 10 pmol primer (27F, 1492R), 25 ng/mL genomic DNA, 5 U/μL Taq polymerase를 각각 넣어 최종

부피가 25 μ L가 되게 하였다. PCR template 제조에 사용된 모든 시약들은 Takara (Takara Korea Biomedical Incorporated, Takara, Kusatsu, Japan) 사에서 구매하였다.

DNA 증폭을 위한 반응 조건은 95°C에서 4분간 열을 가하여 initial denaturation 단계를 수행한 다음, 95°C에서 1분간 denaturation, 45°C에서 1분간 annealing, 72°C에서 2분간 extension하는 과정을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 10분간 처리하는 조건으로 진행하였다[19]. 증폭된 genomic DNA는 0.8% agarose gel에 전기 영동한 다음, 흡광도를 측정하여 농도와 순도를 확인하였다.

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

Genus	Species & Strains	Reference
LAB isolated from kimchi	<i>Lactobacillus plantarum</i> HD1	[49]
	<i>Lactobacillus sakei</i> SC1	[41]
	<i>Weissella koreensis</i> SK	[61]
	<i>Weissella cibaria</i> EB1	[6]
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TA	[35]
	<i>Leuconostoc citreum</i> GR1	[39]
LAB isolated from brewery yeast	<i>Pediococcus inopinatus</i> KACC 12308 ^T	[3]

다. PCR-DGGE를 통한 목은지의 미생물 분석

PCR을 통하여 증폭된 genomic DNA는 nested-PCR 과정에서 PCR template로 사용되었다. *Lac1* (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3')을 forward primer로, 16S rRNA 유전자 중 변이가 가장 잘 일어나는 V3 region을 증폭시키기 위해 GC-clamp가 포함된 *GC-Lac2* (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGG GATTYCACCGCTACACATG-3')를 reverse primer로 코스모진텍(Cosmogenetech, Seoul, Korea)에서 주문 제작하여 사용하였다[34]. PCR template은 멸균수, 10 × PCR buffer (Mg²⁺ free), dNTP mixture (2.5 mM each), 25 mM MgCl₂, 10 pmol primer (*Lac1*, *GC-Lac2*), 50 ng/mL genomic DNA, 5 U/μL Taq polymerase (Takara)를 각각 넣어 총 부피가 50 μL가 되게 하였다.

Nested-PCR 반응은 94°C에서 2분간 열을 가하여 initial denaturation 단계를 수행한 다음, 94°C에서 30초간 denaturation, 61°C에서 1분간 annealing, 68°C에서 1분간 extension하는 단계를 40회 반복하고, 마지막으로 68°C에서 10분 동안 처리하는 조건으로 진행하였다[60]. 증폭된 산물은 2.0% agarose gel에 전기 영동한 다음, 흡광도를 측정하여 농도와 순도를 확인하였다.

Nested-PCR 과정을 통해 얻은 증폭 산물은 The DCode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용한 PCR-DGGE에 의하여 분석되었다. Denaturing gradient gel은 8% polyacrylamide gel을 사용하였다. Acrylamide와 bis-acrylamide (n,n'-methylenebisacryl-amide, for molecular biology, minimum 98%), 멸균수를 혼합하여 제조한 40% acrylamide/bis (37.5:1)에 50 × TAE buffer (2 M tris base, 1 M acetic acid, 50 mM ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.0), 7 M urea, 40% formamide, 멸균수를 사용하여 0% denaturing solution과 100% denaturing solution를 제조한 다음, 0%, 100% denaturing solution을 농도에 맞게 혼합하여 30%, 60% denaturing gradient gel을 제조하였다. 각각의 denaturing gradient gel에 10% ammonium persulfate와 n,n,n',n'-tetramethylethylene diamine을 넣고 농도 구배가 30%에서 60%로 연속되도록 8% polyacrylamide gel을 제조하였다. 8% polyacrylamide gel의 제조에 사용된 모든 시약들은 Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA) 사에서 구입하였다.

PCR 증폭 산물을 gel의 well에 loading 한 후, 1 × TAE buffer에서 60°C, 50 V,

20시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel은 10 mg/L Ethidium bromide (EtBr)를 사용하여 10분간 염색 후 1 × TAE buffer에서 탈색하여 관찰하였다.

제 2절 *P. inopinatus* 추정 균주의 분리 및 동정

1. *P. inopinatus* 추정 균주의 분리

PCR-DGGE를 통하여 *P. inopinatus* band가 확인된 31종의 묵은지를 마쇄 후 멸균 거르로 여과하여 묵은지 여액을 제조하였다. 묵은지 여액은 serial dilution (10^n)에 의하여 단계 희석한 후 MRS 평판 배지와 MRS+2% (w/v) CaCO_3 (Amersco, Cochran, GA, USA) 평판 배지에 100 μL 도말하여 25 $^\circ\text{C}$, 30 $^\circ\text{C}$ 에서 5일간 배양하였다. 배양 후 형성된 colony들을 모양, 크기, 색, 광택 유무, 투명도, 환 생성능 등의 형태학적 기준으로 grouping을 하여 MRS, MRS+2% CaCO_3 평판 배지에 그룹별로 toothpick 하였다. 각 그룹은 gram stain kit (BD, San Jose, CA, USA)를 사용하여 gram-staining을 시행하였다. toothpick 결과 본 실험실에서 기존에 보유 중이던 *P. inopinatus* KACC 12308^T와 형태가 비슷하면서 gram-staining 결과 그람 양성, 구균 형태인 균주를 대상으로 16S rRNA gene sequence 분석을 진행하였다. 묵은지로부터 분리된 모든 균주들은 25% glycerol stock 상태로 -70 $^\circ\text{C}$ deep freezer (Sanyo, Moriguchi, Japan)에 보관하였다.

2. 분리한 *P. inopinatus* 추정 균주의 동정

묵은지로부터 분리된 *P. inopinatus* 추정 균주를 동정하기 위해 16S rRNA gene sequence 분석을 시행하였다. Dneasy blood & tissue kit (Qiagen)를 이용하여 genomic DNA를 추출하고 GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 균주와의 16S rRNA gene sequence을 비교하여 동정하였다. 또한 CLUSTAL W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>)에서 표준 균주(type strain)와의 상동성을 비교하였다.

제 3절 목은지로부터 분리한 *P. inopinatus*의 특성

1. *P. inopinatus* 배양액 pH 측정

목은지로부터 분리된 *P. inopinatus* 31종과 표준 균주인 *P. inopinatus* KACC 12308^T을 MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치배양 후 30 mL MRS 액체 배지에 계대하여 배양액의 pH와 산도를 측정하였다. pH와 산도 측정값은 3회 측정하여 평균치로 나타내었다.

2. *P. inopinatus* 당 대사능 확인

목은지로부터 분리된 *P. inopinatus* 31종 중 18종과 *P. inopinatus* KACC 12308^T의 당 대사능을 Biomerieux 사의 생화학 동정 kit (API 50 CHL)을 이용하여 조사하였다. *P. inopinatus* 19종을 MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종 후 계대하여 배양하였고, 배양액을 원심분리(13,475× g, 5 min, 4℃)하여 상정액을 제거한 후 균체를 회수하여 멸균수 500 μL에 풀어 균주 현탁액을 준비하였다. 현탁액을 suspension medium 5 mL에 넣어가며 Mcfarland standard 2와 동일한 탁도로 맞추었다. 탁도를 맞추기 위하여 사용된 균주 현탁액의 2배에 해당하는 양의 배양액을 API 50 CHL medium에 넣어준 뒤, 이를 각 strip의 tube에 분주하였다. strip 위에 mineral oil 한 방울을 떨어뜨려 혐기적 조건 하에 30℃에서 24시간, 48시간 배양하여 당 대사능을 확인하였다. 당 대사능 결과를 동정 프로그램(<https://apiweb.biomerieux.com>)에 입력하여 *P. inopinatus* 19종 간의 동정 결과를 비교하였다.

제 4절 선발 유산균의 배양 온도에 따른 생육

1. 사용 균주 및 배지

*P. inopinatus*의 특성을 규명하기 위해 *P. inopinatus* 6종을 선발하였다. *P. inopinatus*의 표준 균주인 *P. inopinatus* KACC 12308^T과 분리 균주 31종 16S rRNA gene sequence가 *P. inopinatus* KACC 12308^T과 100% 상동성을 보이지 않는 *P. inopinatus* JM1 (99.87%), *P. inopinatus* BD2 (99.60%), *P. inopinatus* PS1 (99.60%)을 선발하고, 서울에서 분리된 *P. inopinatus* JM1, 무주에서 분리된 *P. inopinatus* BD2, 안동에서 분리된 *P. inopinatus* PS1과 다른 지역에서 분리된 *P. inopinatus* TGM1 (태백), *P. inopinatus* BCU1 (논산)을 추가 선발하여 실험에 사용하였다. 25% glycerol stock 상태로 보관 중이던 *P. inopinatus* 6종을 MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 동안 정치배양 후, 계대 배양하여 사용하였다.

2. 배양 온도에 따른 생육도

MRS 액체 배지에 *P. inopinatus* 6종을 1% (v/v) 접종하고 이를 5, 10, 15, 25, 30℃에서 배양하여 배양 온도에 따른 생육도를 확인하였다. 5℃는 3일 간격 30일까지, 10℃와 15℃는 24시간 간격 168시간까지, 25℃와 30℃는 4시간/8시간/12시간 간격 72시간까지 생육도를 확인하였다. Spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였고, pH meter를 사용하여 pH를 측정하여 *P. inopinatus*의 배양 온도에 따른 생육 곡선을 확인하였다.

제 5절 분리 유산균의 안전성 평가

1. 용혈성 검사

*P. inopinatus*의 용혈성 유·무를 조사하기 위해 용혈성 검사를 수행하였다. 멸균한 Blood agar base (Oxoid, Hampshire, England)에 7% horse blood (Oxoid)를 넣어 용혈성 배지를 제조하였고, MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 배양한 *P. inopinatus* 6종을 용혈성 배지에 백금이로 희석 도달한 후 30℃에서 3일간 배양하여 적혈구 용혈에 의한 균체 주위의 녹색의 용혈대나 투명 환 생성 여부를 확인함으로써 용혈성 여부를 판정하였다[49]. 용혈을 일으키는 양성 반응 대조구로는 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, Jeongeup, Korea)에서 분양받은 *Bacillus cereus* KCTC 3624를 사용하였다[48]. *B. cereus* KCTC 3624는 Luria Bertani (LB; 1% NaCl, 1% Bacto-tryptone, 0.5% Yeast extract, Duchefa, Haarlem, Netherlands) 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37℃에서 진탕배양 후 용혈성 배지에 희석 도달한 다음, 37℃에서 3일간 배양하여 결과를 관찰하였다.

2. 유해 효소 활성

*P. inopinatus*의 유해 효소 활성은 Biomerieux 사의 API ZYM kit를 사용하여 조사하였다. *P. inopinatus* 6종을 MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종 후 계대하여 사용하였고, 배양액 1.5 mL를 원심분리(13,475× g, 5 min, 4℃)하여 상정액을 제거하고 균체를 회수한 후 멸균수 500 μL에 풀어 균주 현탁액을 준비하였다. 균주 현탁액을 suspension medium 2 mL에 넣어가며 Mcfarland standard 5와 동일한 탁도로 맞추었다. 탁도를 맞추는데 사용된 균주 현탁액의 동량을 멸균수 2 mL와 혼합한 후, strip의 cupule에 65 μL씩 접종하여 37℃의 암실에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 ZYM A와 ZYM B를 한 방울씩 떨어뜨리고 밝은 곳에서 5분간 반응시킴으로써 반응하지 않고 남아있는 ZYM B의 fast Blue BB로 인해 발생할 수 있는 노란색을 제거한 다음 색의 변화를 관찰하였다. 결과는 0~5까지의 값으로 표시하였으며 0인 경우 음성, 3 이상인 경우는 양성으로 판정하였다(0: 0 nM, 1: 5 nM, 2: 10 nM, 3: 20 nM, 4: 30 nM, 5: ≥ 40 nM).

3. 항생제 내성

P. inopinatus 6종의 항생제 내성은 액체 배지 희석법(Broth microdilution method)으로 측정하였다[50]. 본 실험에 사용된 항생제 8종 ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, tetracycline, chloramphenicol은 모두 Sigma 사에서 구입하였으며, 이들 항생제는 규정된 용매에 녹여 고농도 stock을 제조한 후 0.5% dextrose와 0.7% yeast extract를 첨가한 Mueller-Hinton (MH, Difco) 액체 배지와 혼합하여 단계별로 희석하였다. MRS 액체 배지에 배양한 균주 배양액을 원심분리(13,475× g, 5 min, 4°C)후 상정액을 제거하고 얻어진 균체를 MH 액체 배지에 현탁 후 희석하였다. 이 균주 희석액을 단계별로 희석하여 준비한 항생제와 1:1로 섞었을 때 초기 균수가 1.00×10^7 CFU/mL이 되게 접종한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하였다.

배양 후 생육 정도를 spectrophotometer를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다. European Food Safety Authority (EFSA, 2012)의 규정을 참고하여 각각의 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 생육 저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 판정하였다[16].

4. Biogenic amine 생성

Bover-cid 등의 decarboxylase plate method를 변형하여 *P. inopinatus* 6종의 Biogenic amine (BA) 생성 여부를 확인하였다[5]. MRS 액체 배지에 1% 접종하여 (v/v) 배양한 배양액 1 mL를 0.1%의 전구체 아미노산(precursor) histidine, tyrosine이 함유된 9 mL의 MRS 액체 배지에 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 균 양을 10^9 unit/mL로 맞추어 decarboxylase plate에 10 μ L 점적한 후 30°C에서 3일간 배양한 다음 colony 주변의 색깔 변화를 관찰하였다. Histidine 양성 대조구로 국립농업과학원(KACC)에서 분양받은 *Morganella morganii* KACC 13822를 사용하였고[8], tyrosine 양성 대조구로 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받은 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212를 사용하였으며[24], Tryptic Soy Broth (TSB; Difco, Sparks, MD, USA)액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 37°C에서 진탕배양 후 실험에 사용하였다.

제 3장 실험 결과 및 고찰

제 1절 시판 목은지의 수집 및 분석

1. 수집한 목은지의 저장 온도 및 저장 기간 분석

전국 32개 지역의 온라인 판매처에서 구입한 목은지 40종 중 25종의 저장 온도와 저장 기간을 조사한 결과, 모든 목은지는 10℃ 이하에서 저장되었으며 0℃에서 저장한 목은지가 5종으로 가장 많았다. 저장 기간은 2개월~1년 9개월로 다양하였으나, 6개월 동안 저장한 목은지가 가장 많았다(Table 3).

2. 수집한 목은지의 이화학적 특성 분석

수집한 목은지 중 pH가 가장 낮은 목은지는 BCU 목은지로 pH 3.58, pH가 가장 높은 목은지는 PS 목은지로 pH 4.56으로 나타났으며, 목은지의 평균 pH는 $\text{pH } 3.96 \pm 0.23$ 로 나타났다. 산도가 가장 낮은 목은지는 PS 목은지로 0.70%, 산도가 가장 높은 목은지는 DM 목은지로 1.88%로 나타났으며, 목은지의 평균 산도는 $1.21 \pm 0.29\%$ 로 나타났다. 염도가 가장 낮은 목은지는 GD 목은지로 1.57%, 염도가 가장 높은 목은지는 ME 목은지로 2.94%로 나타났으며, 목은지의 평균 염도는 $2.12 \pm 0.32\%$ 로 나타났다. 당도가 가장 낮은 목은지는 SM 목은지로 5.70 brix°, 당도가 가장 높은 목은지는 PS 목은지로 12.40 brix°로 나타났으며 목은지의 평균 당도는 $9.31 \pm 1.36 \text{ brix}^\circ$ 로 나타났다(Table 4).

3. 비배양학적 방법을 통한 목은지의 미생물 분석

수집한 목은지의 미생물 균종을 분석하기 위하여 PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis)를 실시하였다(Figure 2). standard의 band와 비교한 결과 40종의 목은지 중 31종의 목은지에서 *P. inopinatus* KACC 12308^T 위치에 band가 확인되었다.

Table 3. Storage temperature and aging period of product mukeunji
(continue)

Collected area	Products	Storage temperature	Aging period
Hwaseong	GMN mukeunji	~5℃	1 Year
Icheon	KL mukeunji	0℃	1 Year
Paju	AM mukeunji	~10℃	6 Months
Taebaek	TGM mukeunji	~10℃	6 Months
Jeongseon	GD mukeunji	0~10℃	2 Months
Nonsan	SNK mukeunji	0~2℃	6 Months
Nonsan	BCU mukeunji	0~3℃	9 Months
Chungju	YN mukeunji	4℃	6 Months
Danyang	SM mukeunji	0~2℃	6 Months
Daegu	PG mukeunji	~10℃	6 Months
Andong	PS mukeunji	-2~-1℃	5 Months
Miryang	JO mukeunji	0~1℃	11 Months
Changwon	UCM mukeunji	0℃	6 Months
Ulsan	NM mukeunji	0℃	1 Year
Cheongsong	ME mukeunji	-2℃	1 Year
Goryeong	KR mukeunji	~5℃	7 Months

Table 3. (Continue)

Collected area	Products	Storage temperature	Aging period
Gwangju	KG mukeunji	1.5℃	7 Months
Gwangju	MM mukeunji	2~4℃	9 Months
Gwangju	BK mukeunji	1℃	6 Months
Gwangju	RK mukeunji	1℃	6 Months
Gwangju	KD mukeunji	1℃	8 Months
Haenam	HAL mukeunji	1.5~4℃	1 Year 7 Months
Gurye	RM mukeunji	0℃	1 Year 9 Months
Muan	HK mukeunji	1.5℃	7 Months
Jeju	MK mukeunji	0℃	6 Months

Table 4. Chemical properties of products mukeunji (continue)

Products	pH	Acidity (%)	Salinity (%)	Sugar content (brix°)
UM mukeunji	3.92	1.53	2.28	10.30
GMN mukeunji	3.64	1.49	2.30	10.86
KL mukeunji	4.11	0.95	1.66	7.50
AM mukeunji	4.01	0.81	1.71	7.60
BMC mukeunji	3.82	1.09	2.49	8.50
JM mukeunji	4.07	1.37	1.91	8.50
AR mukeunji	3.66	1.55	2.10	9.60
AN mukeunji	3.65	1.59	2.01	8.10
GD mukeunji	3.98	1.05	1.57	10.30
PC mukeunji	4.15	1.68	1.97	8.90
SW mukeunji	4.00	1.04	1.70	9.20
DM mukeunji	3.87	1.88	2.19	9.09
TGM mukeunji	4.06	1.06	2.17	8.20
YN mukeunji	3.72	1.71	1.81	8.80
SM mukeunji	4.01	0.72	1.71	5.70
EC mukeunji	4.33	1.02	1.95	9.30
BCU mukeunji	3.58	1.53	2.59	9.41
SNK mukeunji	4.25	0.97	2.33	12.37
NB mukeunji	3.91	1.44	1.85	9.00
PS mukeunji	4.56	0.70	2.19	12.40

Table 4. (Continue)

Products	pH	Acidity (%)	Salinity (%)	Sugar content (brix°)
UCM mukeunji	4.11	0.90	2.20	9.50
ME mukeunji	3.93	0.90	2.94	8.20
PG mukeunji	4.16	0.94	1.78	9.70
CG mukeunji	3.61	1.49	2.39	11.90
KR mukeunji	3.96	1.15	1.70	7.60
JO mukeunji	3.82	1.31	2.83	8.20
NM mukeunji	3.97	1.18	1.69	9.60
TN mukeunji	3.91	0.87	2.27	7.60
RM mukeunji	3.85	1.38	2.17	9.40
AJ mukeunji	4.32	0.92	2.24	11.00
BK mukeunji	4.17	1.08	2.24	11.00
KD mukeunji	3.73	1.52	2.58	10.20
KG mukeunji	3.73	1.27	1.92	9.50
MM mukeunji	3.71	1.50	2.05	8.80
RK mukeunji	4.23	0.97	1.93	10.10
HAL mukeunji	3.90	1.16	2.64	8.10
JJ mukeunji	4.23	1.16	2.11	10.90
HK mukeunji	4.27	0.87	2.15	8.89
BD mukeunji	3.96	1.45	2.07	9.30
MK mukeunji	3.71	1.26	2.31	9.30

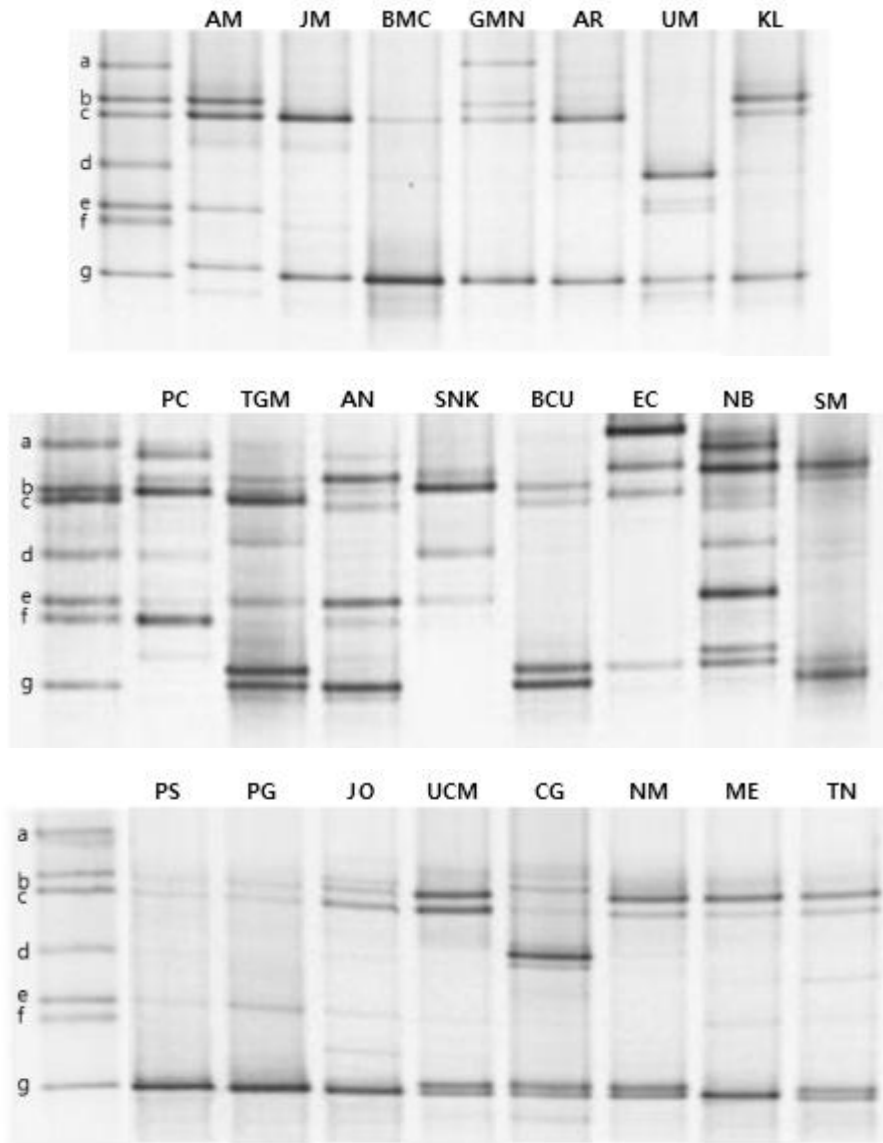


Figure 2. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA fragment from forty product mukeunji (continue)

a, *Lb. plantarum* HD1; b, *Lb. sakei* SC1; c, *W. koreensis* SK;
 d, *W. cibaria* EB1; e, *Leu. mesenteroides* TA; f, *Leu. citreum* GR1;
 g, *P. inopinatus* KACC 12308^T

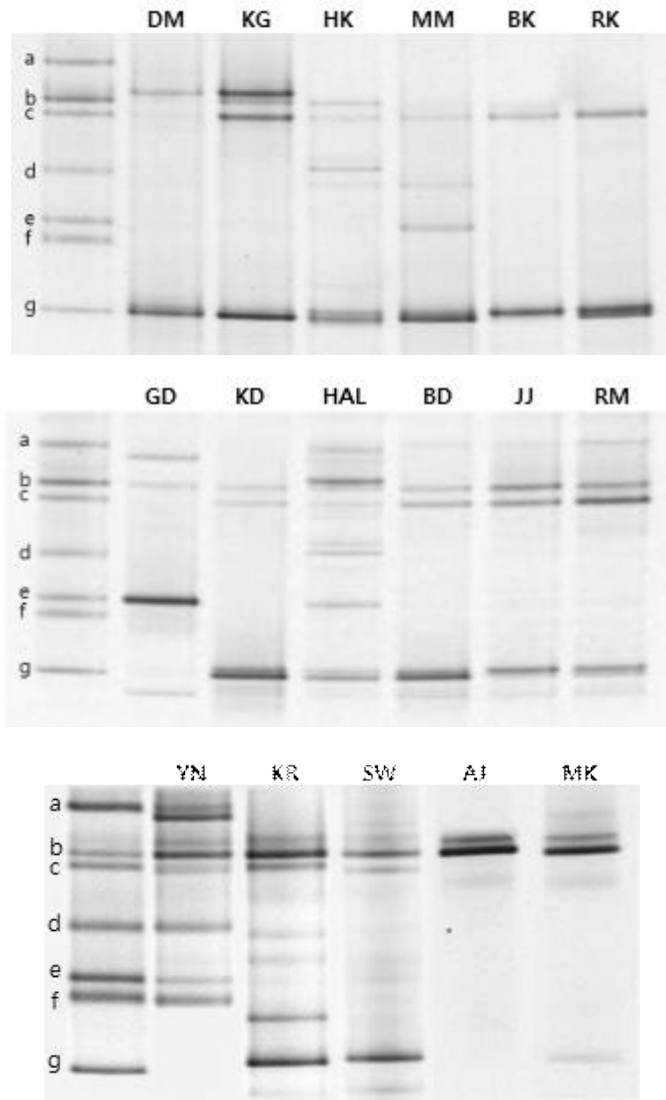


Figure 2. (Continue)

제 2절 *P. inopinatus* 추정 균주의 분리 및 동정

1. *P. inopinatus* 추정 균주의 분리

PCR-DGGE 결과 *P. inopinatus* KACC 12308^T band와 동일한 위치에서 band가 확인된 31종의 묵은지로부터 제조한 묵은지 여액을 MRS 평판 배지와 MRS+2% CaCO₃ 평판 배지에 도말하여 30°C에서 5일간 배양 후 관찰하였다. 관찰 결과 31종의 묵은지 전부에서 *P. inopinatus* KACC 12308^T와 colony 형태가 동일한 원형에 ivory 색과 광택을 띠면서 gram-staining 결과 그람 양성, 구균 형태인 균주들이 확인되었다. 이러한 *P. inopinatus* 추정 균주 31종을 분리하여 16S rRNA gene sequence 분석을 진행하였다(Figure 3, Figure 4).

2. 분리한 *P. inopinatus* 추정 균주의 동정

묵은지로부터 분리된 *P. inopinatus* 추정 균주에서 genomic DNA를 추출하고 Gene bank에 등록된 균주와의 16S rRNA gene sequence을 비교하여 동정한 결과 31종의 *P. inopinatus* 추정 균주 모두 *P. inopinatus*으로 동정되었다. 또한 CLUSTAL W에서 표준 균주(type strain)와의 상동성을 비교한 결과 *P. inopinatus* JM1 (1,516 bp)은 *P. inopinatus* strain DSM 20285^T와 99.87%의 상동성을 나타내었으며 *P. inopinatus* PS1 (1,513 bp)과 *P. inopinatus* BD2 (1,500 bp)은 99.60%의 상동성을 나타내었다. *P. inopinatus* JM1, *P. inopinatus* PS1, *P. inopinatus* BD2를 제외한 28종의 균주들은 *P. inopinatus* strain DSM 20285^T와 100.00%의 상동성을 나타내었다(Table 5).

*P. inopinatus*으로 동정된 균주 31종 중 23종이 1우점 종이었으며 2우점 종, 3우점 종, 4우점 종은 각각 5종, 2종, 1종이었다. 이를 통하여 묵은지 내의 *P. inopinatus*의 우점도는 높다고 사료된다.

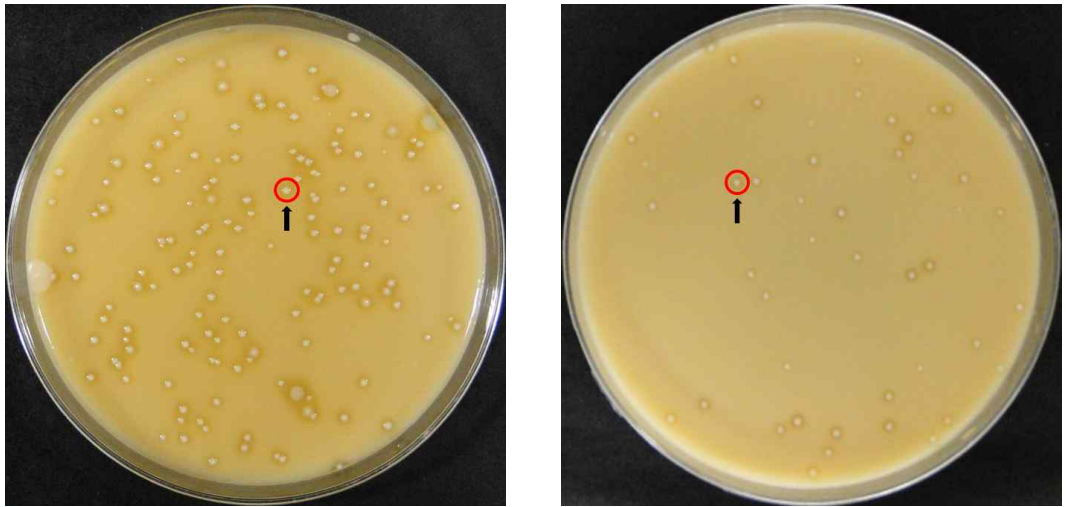


Figure 3. Isolation of *P. inopinatus* from mukeunji

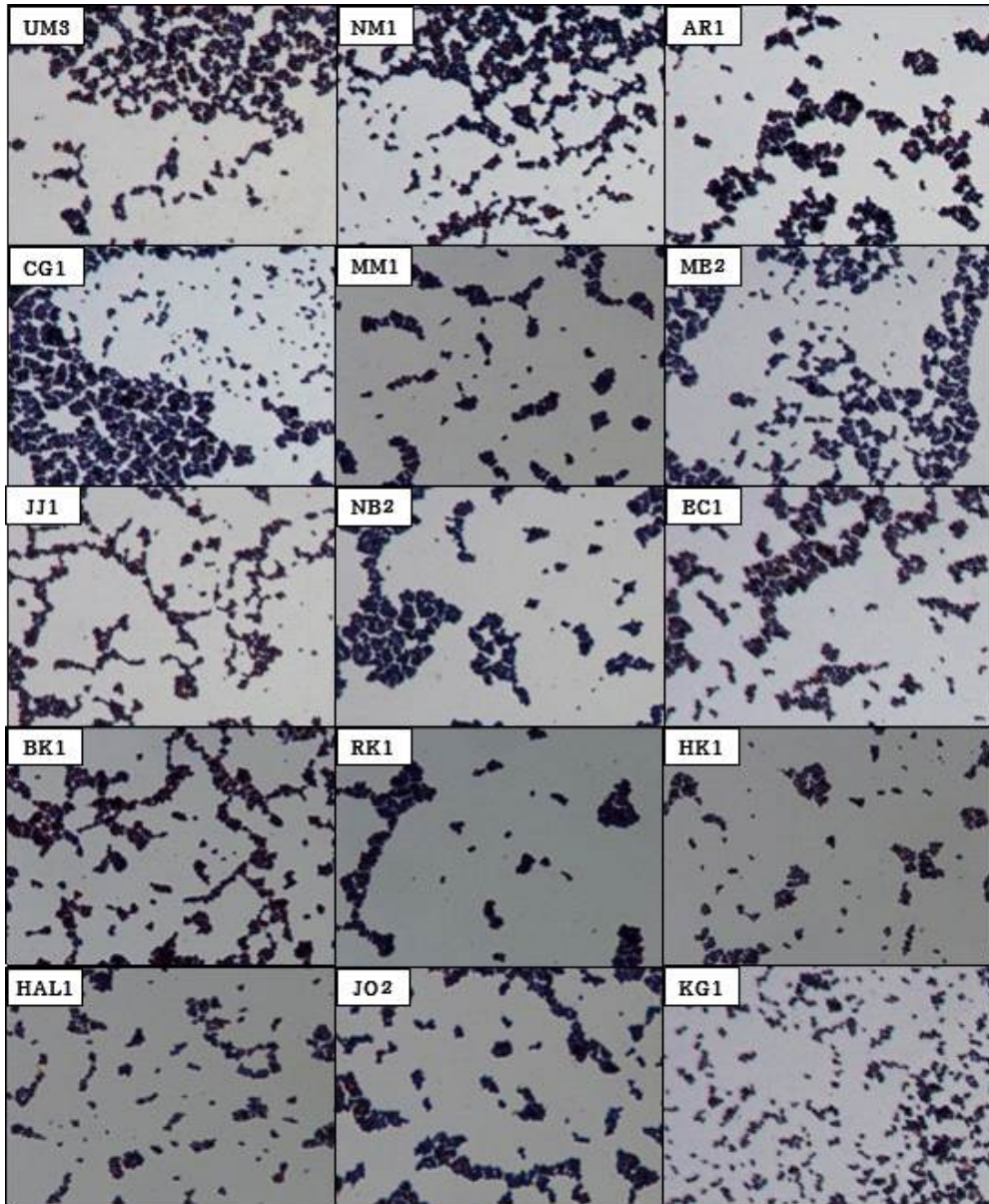


Figure 4. Gram staining and microscopic observation of isolated strains (continue)

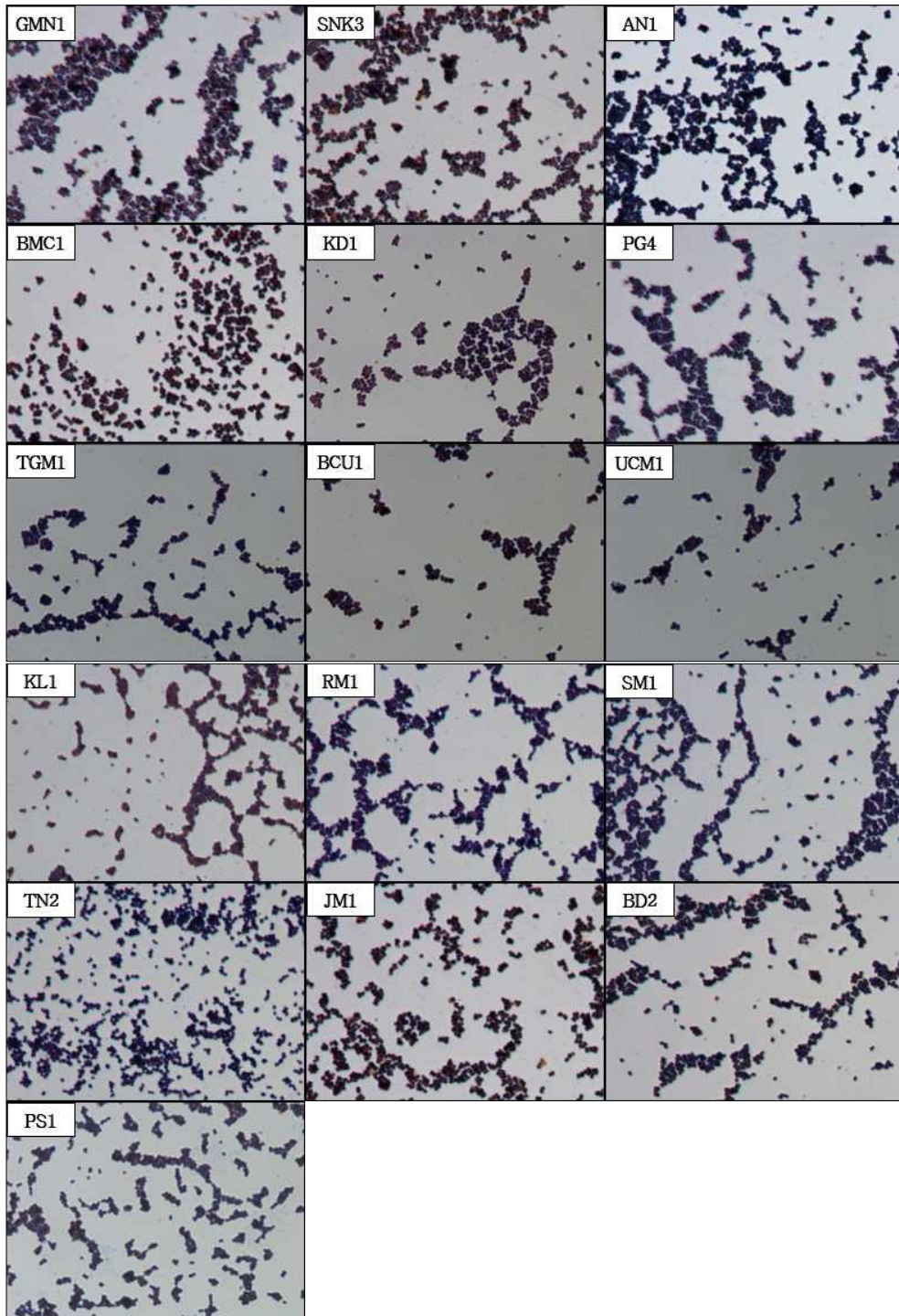


Figure 4. (Continue)

Table 5. Identification of strains isolated from mukeunji based on 16S rRNA gene sequence (continue)

No.	Strain	Bi-direction	NCBI blast results	Identity
1	UM3	1,493	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
2	GMN1	1,512	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
3	KL1	1,546	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
4	BMC1	1,535	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
5	JM1	1,516	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	99.87%
6	AR1	1,499	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
7	AN1	1,519	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
8	TGM1	1,543	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
9	SM1	1,544	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
10	EC1	1,506	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
11	SNK3	1,515	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
12	BCU1	1,544	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
13	NB2	1,505	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
14	PS1	1,513	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	99.60%
15	UCM1	1,545	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%

Table 5. (Continue)

No.	Strain	Bi-direction	NCBI blast results	Identity
16	ME2	1,541	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
17	PG4	1,540	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
18	CG1	1,504	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
19	JO2	1,511	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
20	NM1	1,496	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
21	TN2	1,546	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
22	RM1	1,546	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
23	KD1	1,537	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
24	MM1	1,499	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
25	BK1	1,507	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
26	RK1	1,508	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
27	KG1	1,511	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
28	HAL1	1,511	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
29	JJ1	1,501	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
30	HK1	1,511	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	100.00%
31	BD2	1,500	<i>Pediococcus inopinatus</i> strain DSM 20285 ^T	99.60%

제 3절 목은지로부터 분리한 *P. inopinatus*의 특성

1. *P. inopinatus* 배양액 pH 측정

목은지로부터 분리된 *P. inopinatus* 31종과 표준 균주인 *P. inopinatus* KACC 12308^T을 MRS 액체 배지에 1% (v/v) 접종하여 30℃에서 24시간 정치배양 후 30 mL MRS 액체 배지에 계대하여 배양액의 pH와 산도를 측정하였다. pH와 산도 측정값은 3회 측정하여 평균치로 나타내었다.

측정 결과 *P. inopinatus* 32종 중 가장 낮은 pH를 나타낸 균주는 *P. inopinatus* PG4로 pH 4.01, 가장 높은 pH를 나타낸 균주는 *P. inopinatus* UCM1으로 pH 4.34을 나타냈으며 *P. inopinatus* 32종의 평균 pH는 pH 4.14 ± 0.10으로 나타났다. 가장 낮은 산도를 나타낸 균주는 *P. inopinatus* BD2로 0.75%, 가장 높은 산도를 나타낸 균주는 *P. inopinatus* BMC1으로 1.40%을 나타냈으며 *P. inopinatus* 32종의 평균 산도는 1.11 ± 0.18%으로 나타났다(Table 6).

2. *P. inopinatus* 당 대사능 확인

API 50 CHL kit을 이용하여 *P. inopinatus* KACC 12308^T과 *P. inopinatus* 31종 중 19종에 대하여 당 대사능을 확인하였다. 실험 결과 *P. inopinatus* 19종이 양성 반응을 나타낸 탄수화물의 개수는 11~16개였으며, 동일한 탄수화물 6종 D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, N-Acetyl glucosamine, Esculin에 대하여 양성을 나타내었다(Table 7).

판독 결과를 토대로 apiweb에서 동정한 결과 *P. inopinatus* JM1, *P. inopinatus* TGM1, *P. inopinatus* BCU1, *P. inopinatus* UCM1, *P. inopinatus* PG4, *P. inopinatus* RK1은 *Pediococcus* spp.으로 동정되었고, *P. inopinatus* JO2, *P. inopinatus* TN2는 *Pediococcus damnosus* 1으로 동정되었다. *P. inopinatus* KACC 12308^T, *P. inopinatus* GMN1, *P. inopinatus* KL1, *P. inopinatus* BMC1, *P. inopinatus* AN1, *P. inopinatus* SM1, *P. inopinatus* RM1, *P. inopinatus* KD1, *P. inopinatus* MM1, *P. inopinatus* BD2가 *Pediococcus damnosus* 2로 동정되었고, *P. inopinatus* PS1이 *Lactobacillus*

acidophilus 1으로 동정되었으나, 실험에 사용된 API 50 CHL kit는 *Lactobacillus* 속의 동정을 위한 kit이고, apiweb 사이트에 *P. inopinatus*는 등록되어있지 않으므로 실험에 사용된 *P. inopinatus*는 위와 같은 당 대사능 판정 결과로 동정하기에는 적합하지 않다고 사료된다(Table 8).

Table 6. Culture medium pH of *P. inopinatus* (continue)

Strain	pH	Acidity (%)
KACC 12308 ^T	4.25	1.05
UM3	4.10	1.35
GMN1	4.13	1.24
KL1	4.15	1.23
BMC1	4.02	1.40
JM1	4.02	0.85
AR1	4.25	1.15
AN1	4.15	1.17
TGM1	4.31	1.05
SM1	4.19	1.18
EC1	4.07	1.32
SNK3	4.30	1.01
BCU1	4.14	0.99
NB2	4.14	1.19
PS1	4.07	0.88
UCM1	4.34	1.01

Table 6. (Continue)

Strain	pH	Acidity (%)
ME2	4.25	1.11
PG4	4.01	1.28
CG1	4.32	1.00
JO2	4.06	0.86
NM1	4.24	1.11
TN2	4.05	1.39
RM1	4.17	1.16
KD1	4.05	0.93
MM1	4.03	1.38
BK1	4.09	1.25
RK1	4.07	0.92
KG1	4.06	1.28
HAL1	4.08	1.36
JJ1	4.15	0.83
HK1	4.04	0.88
BD2	4.14	0.75

Table 7. Carbohydrate metabolism of *P. inopinatus* isolated from mukeunji (continue)

NO.	Sugar	KACC 12308 ^T	GMN1	KL1	BMC1	JM1	AN1	TGM1	SM1	BCU1
1	Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Methyl- β -D-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	Amygdalin	+	+	+	-	+	-	+	-	-
24	Arbutin	+	-	-	-	+	-	+	-	-
25	Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: positive reaction, -: negative reaction

Table 7. (Continue)

NO.	Sugar	KACC 12308 ^T	GMN1	KL1	BMC1	JM1	AN1	TGM1	SM1	BCU1
26	Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
27	Celobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
28	Malotse	-	+	+	+	+	-	+	-	+
29	Lactose	-	+	-	-	+	-	+	-	+
30	Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Sucrose	-	-	-	-	-	-	+	-	-
32	Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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

Table 7. (Continue)

NO.	Sugar	UCM1	PS1	PG4	JO2	TN2	RM1	KD1	MM1	RK1	BD2
1	Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Methyl-BD-xylopyranosicle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
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	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
25	Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: positive reaction, -: negative reaction

Table 7. (Continue)

NO.	Sugar	UCM1	PS1	PG4	JO2	TN2	RM1	KD1	MM1	RK1	BD2
26	Salicine	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
27	Cellobiose	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+
28	Malotse	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-
29	Lactose	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
30	Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	Trehalose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Inuline	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	Raffinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
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

Table 8. Identification of strains isolated from mukeunji based on carbohydrate metabolism

Strain	Identification result	Identity (%)
JM1	<i>Pediococcus</i> spp.	99.8
TGM1		82.0
BCU1		99.9
UCM1		96.7
PG4		99.8
RK1		99.8
JO2		<i>Pediococcus damnosus</i> 1
TGM1	96.5	
KACC 12308 ^T	<i>Pediococcus damnosus</i> 2	99.8
GMN1		33.9
KL1		81.7
BMC1		98.6
AN1		99.5
SM1		99.5
RM1		98.6
KD1		81.7
MM1		66.1
BD2		93.2
PS1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1	93.0

제 4절 선발 유산균의 배양 온도에 따른 생육

배양 온도에 따른 생육도는 MRS 액체 배지에 *P. inopinatus* 6종을 1% (v/v) 접종하고 이를 5, 10, 15, 25, 30℃에서 배양하여 확인하였다. Spectrophotometer를 사용하여 600nm에서 흡광도를 측정하였고, pH meter를 사용하여 pH를 측정하여 *P. inopinatus* 6종의 배양 온도에 따른 생육 곡선을 확인하였다.

1. 배양 온도에 따른 흡광도 변화

배양 온도에 따른 생육도를 흡광도 측정을 통하여 확인하였다. 측정 결과, *P. inopinatus* KACC 12308^T은 5℃에서 648시간($A_{600} = 3.081$), 10℃에서 144시간($A_{600} = 4.036$), 15℃에서 96시간($A_{600} = 4.545$), 25℃에서 48시간($A_{600} = 5.340$), 30℃에서 32시간($A_{600} = 6.215$)에 최대 생육에 도달하였고, *P. inopinatus* JM1은 5℃에서 504시간($A_{600} = 2.340$), 10℃에서 144시간($A_{600} = 5.695$), 15℃에서 144시간($A_{600} = 6.345$), 25℃에서 40시간($A_{600} = 5.840$), 30℃에서 32시간($A_{600} = 5.735$)에 최대 생육에 도달하였다. *P. inopinatus* BD2는 5℃에서 504시간($A_{600} = 5.450$), 10℃에서 96시간($A_{600} = 4.584$), 15℃에서 64시간($A_{600} = 6.630$), 25℃에서 40시간($A_{600} = 5.485$), 30℃에서 24시간($A_{600} = 5.630$)에 최대 생육에 도달하였으며 *P. inopinatus* PS1은 5℃에서 360시간($A_{600} = 4.725$), 10℃에서 144시간($A_{600} = 4.880$), 15℃에서 96시간($A_{600} = 5.811$), 25℃에서 20시간($A_{600} = 5.790$), 30℃에서 20시간($A_{600} = 6.225$)에 최대 생육에 도달하였다. *P. inopinatus* TGM1은 5℃에서 576시간($A_{600} = 2.663$), 10℃에서 120시간($A_{600} = 4.568$), 15℃에서 120시간($A_{600} = 4.470$), 25℃에서 32시간($A_{600} = 5.735$), 30℃에서 20시간($A_{600} = 5.245$)에 최대 생육에 도달하였고, *P. inopinatus* BCU1은 5℃에서 216시간($A_{600} = 2.997$), 10℃에서 120시간($A_{600} = 4.568$), 15℃에서 120시간($A_{600} = 4.470$), 25℃에서 48시간($A_{600} = 6.300$), 30℃에서 32시간($A_{600} = 6.530$)에 최대 생육에 도달하였다. 이를 통하여 *P. inopinatus*는 배양 온도가 30℃일 때 가장 단시간에 최대 생육에 도달하는 것을 알 수 있었다(Figure 5).

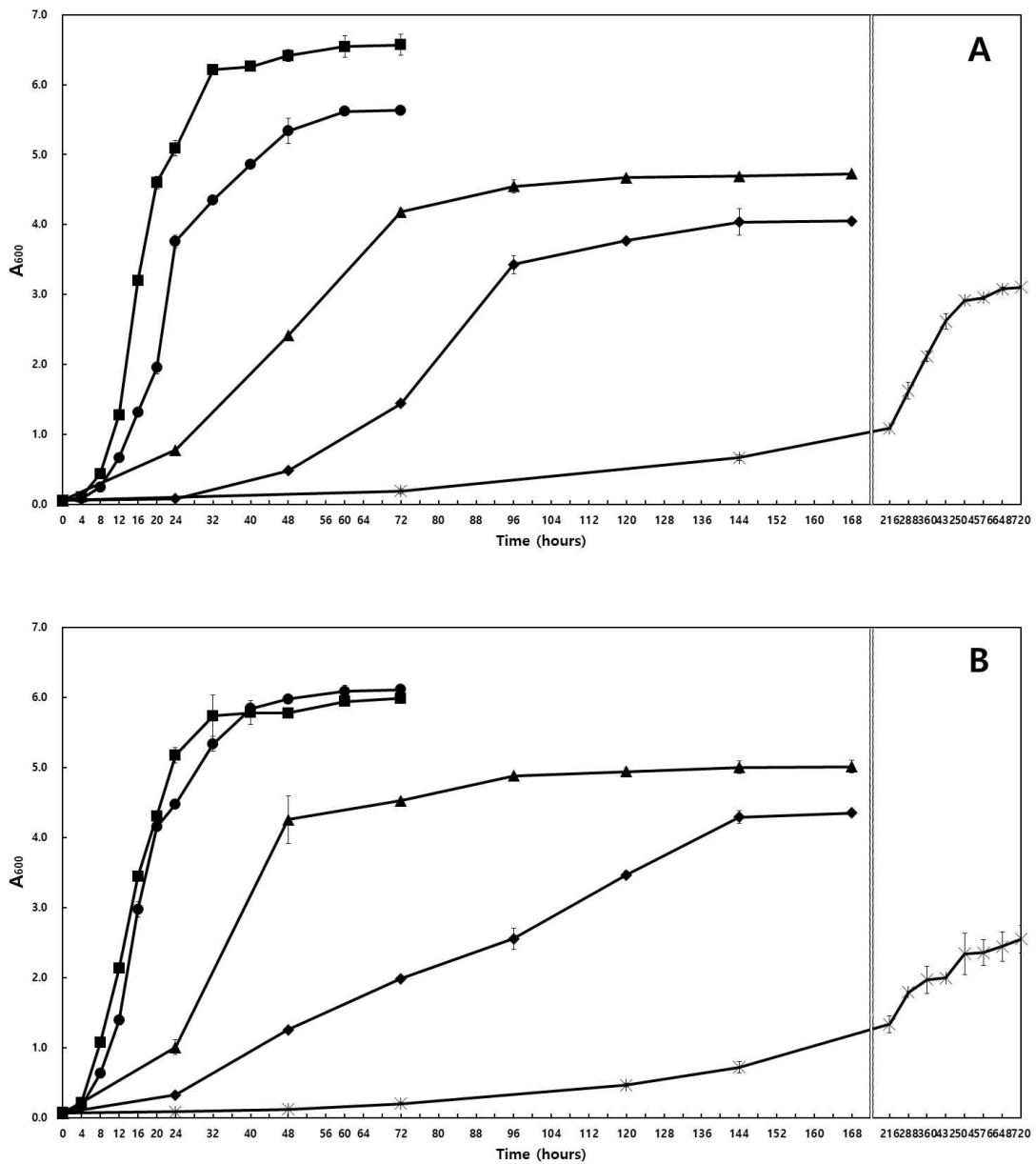


Figure 5. Growth of lactic acid bacteria at different temperature
 5°C (✱), 10°C (◆), 15°C (▲), 25°C (●), 30°C (■) (continue)

A, *P. inopinatus* KACC 12308^T; B, *P. inopinatus* JM1; C, *P. inopinatus* BD2
 D, *P. inopinatus* PS1; E, *P. inopinatus* TGM1; F, *P. inopinatus* BCU1

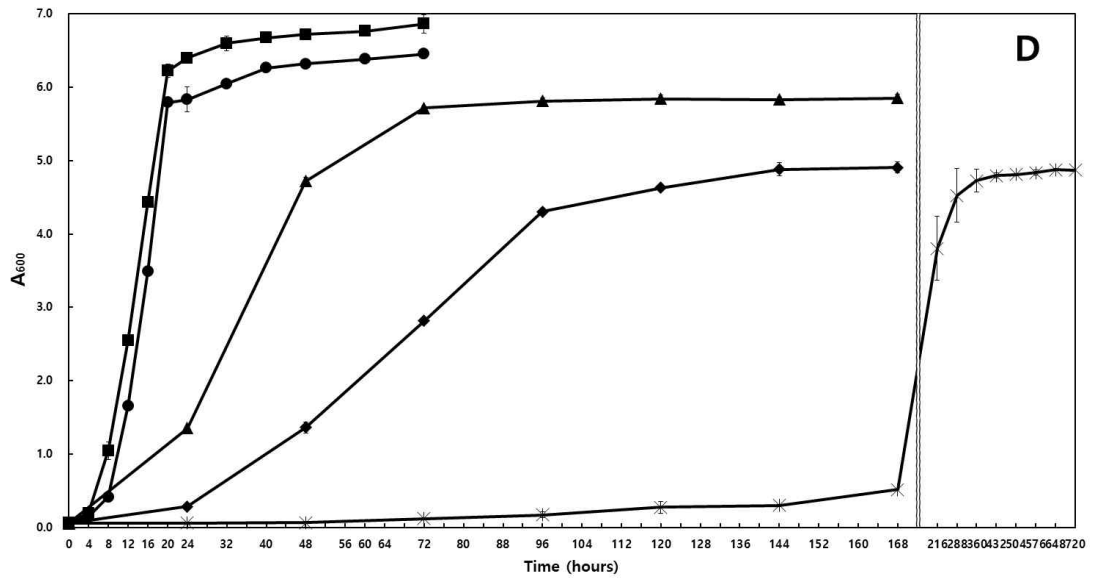
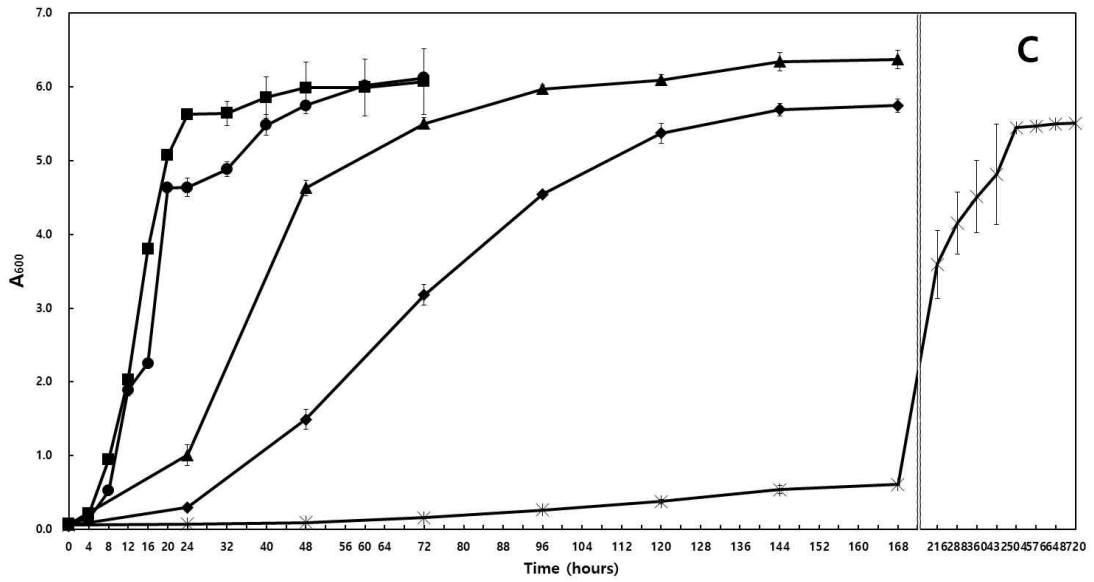


Figure 5. (Continue)

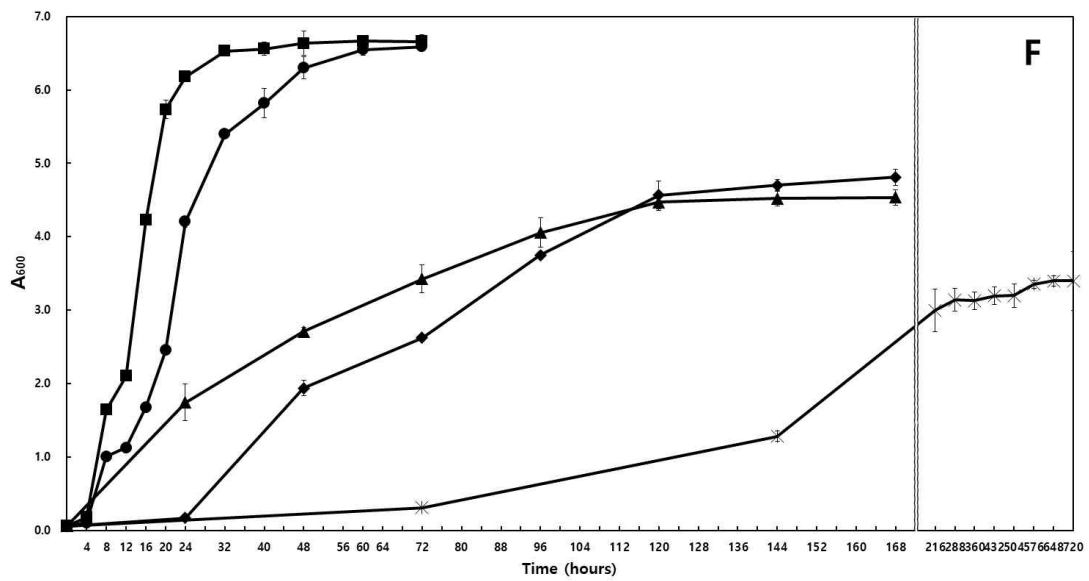
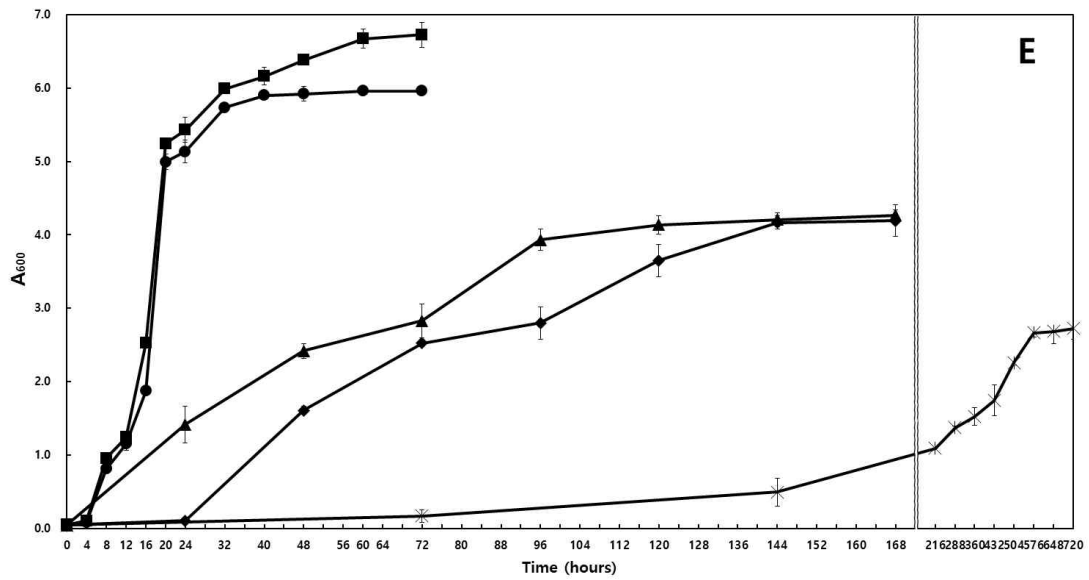


Figure 5. (Continue)

2. 배양 온도에 따른 pH의 변화

배양 온도에 따른 생육도를 pH 측정을 통하여 확인하였다. *P. inopinatus* KACC 12308^T의 pH는 배양하는 과정에서 꾸준히 감소하다가, 5℃에서 576시간(pH 4.51), 10℃에서 144시간(pH 4.10), 15℃에서 144시간(pH 3.88), 25℃에서 48시간(pH 3.98), 30℃에서 40시간(pH 3.91)에 이를 때 pH가 유지되었다. *P. inopinatus* JM1의 pH는 5℃에서 432시간(pH 4.56), 15℃에서 144시간(pH 3.88), 25℃에서 48시간(pH 3.82), 30℃에서 32시간(pH 4.01)에 이를 때 pH가 유지되었다. 10℃에서는 168시간 이후에도 pH가 감소하였다. *P. inopinatus* BD2의 pH는 5℃에서 576시간(pH 4.39), 15℃에서 120시간(pH 3.89), 25℃에서 40시간(pH 3.90), 30℃에서 40시간(pH 3.97)에 이를 때 pH가 유지되었다. 10℃에서는 168시간 이후에도 pH가 감소하였다. *P. inopinatus* PS1의 pH는 15℃에서 72시간(pH 4.01), 25℃에서 48시간(pH 3.87), 30℃에서 32시간(pH 3.90)에 이를 때 pH가 유지되었다. 5℃와 10℃에서는 720시간, 168시간 이후에도 pH가 감소하였다. *P. inopinatus* TGM1의 pH는 10℃에서 144시간(pH 4.37), 15℃에서 144시간(pH 4.17), 25℃에서 60시간(pH 3.79), 30℃에서 40시간(pH 4.09)에 이를 때 pH가 유지되었다. 5℃에서는 720시간 이후에도 pH가 감소하였다. *P. inopinatus* BCU1의 pH는 5℃에서 504시간(pH 4.14), 25℃에서 48시간(pH 3.77), 30℃에서 32시간(pH 3.89)에 이를 때 pH가 유지되었다. 10℃와 15℃에서는 168시간 이후에도 pH가 감소하였다(Figure 6).

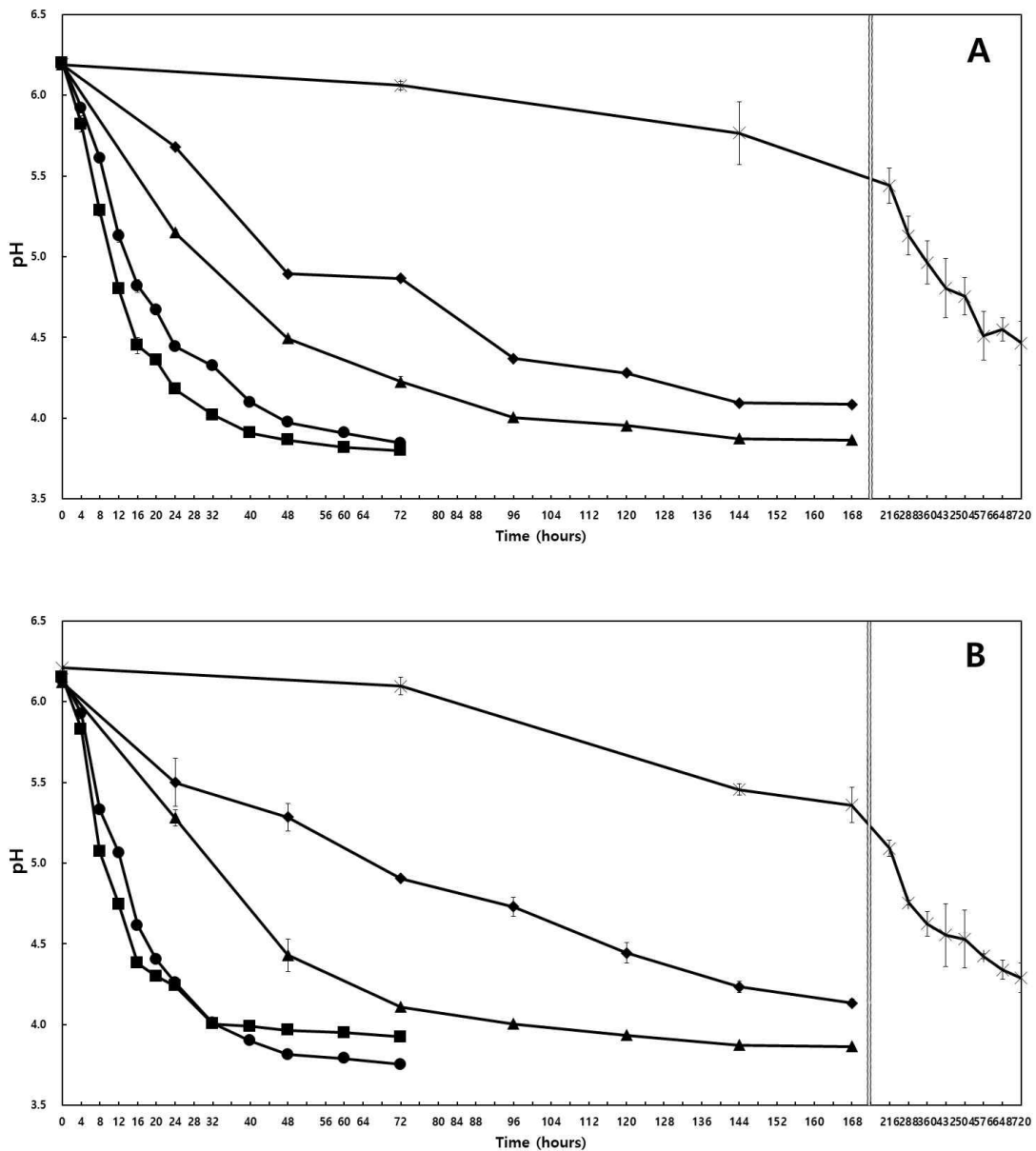


Figure 6. pH changes of lactic acid bacteria growth at different temperature 5°C(✕), 10°C(◆), 15°C(▲), 25°C(●), 30°C(■) (continue)

A, *P. inopinatus* KACC 12308^T; B, *P. inopinatus* JM1; C, *P. inopinatus* BD2
 D, *P. inopinatus* PS1; E, *P. inopinatus* TGM1; F, *P. inopinatus* BCU1

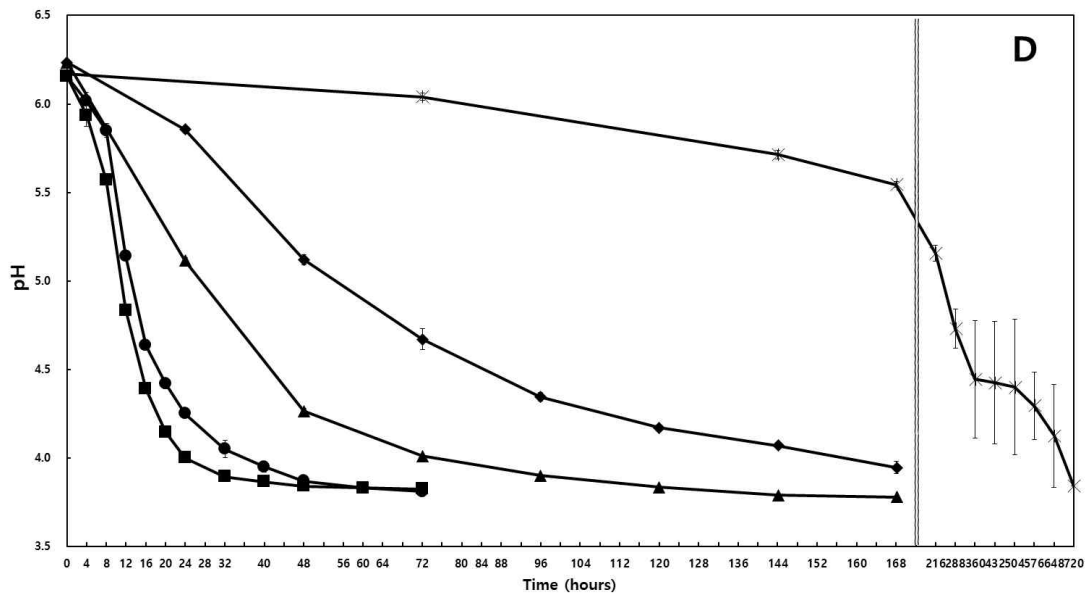
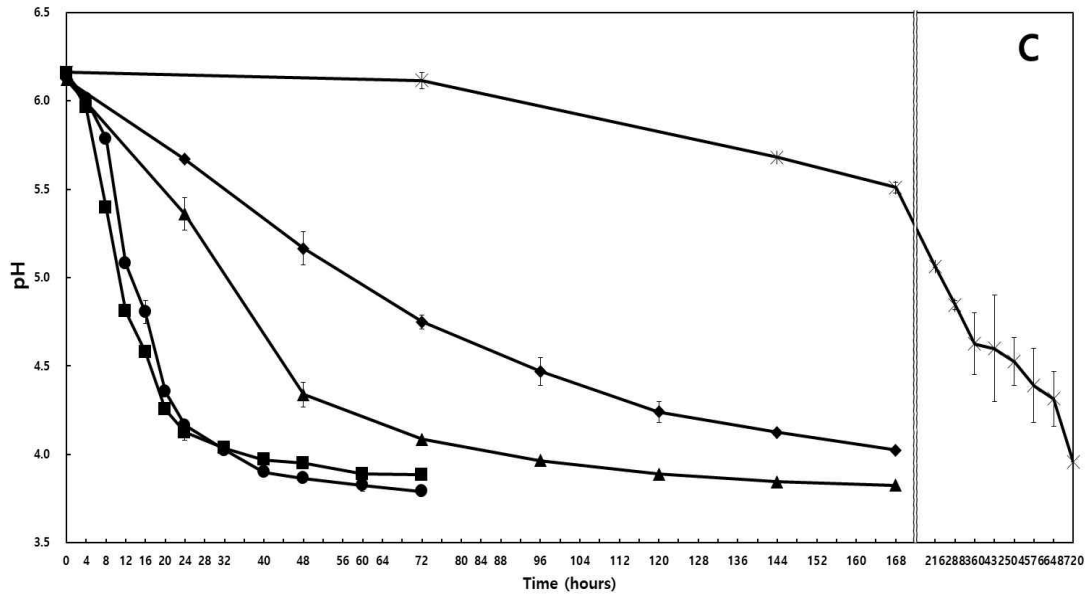


Figure 6. (Continue)

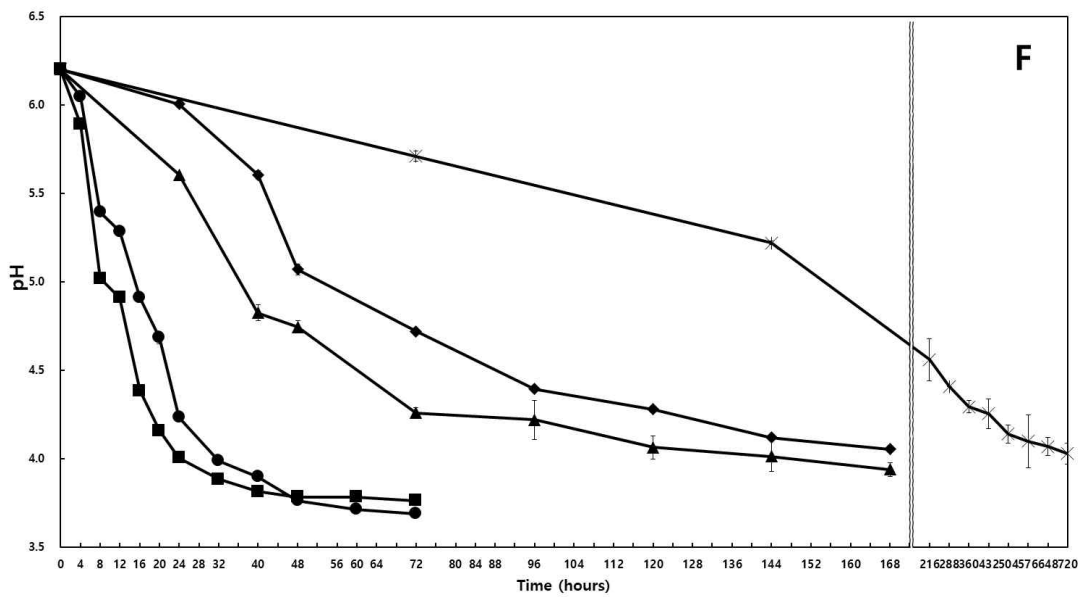
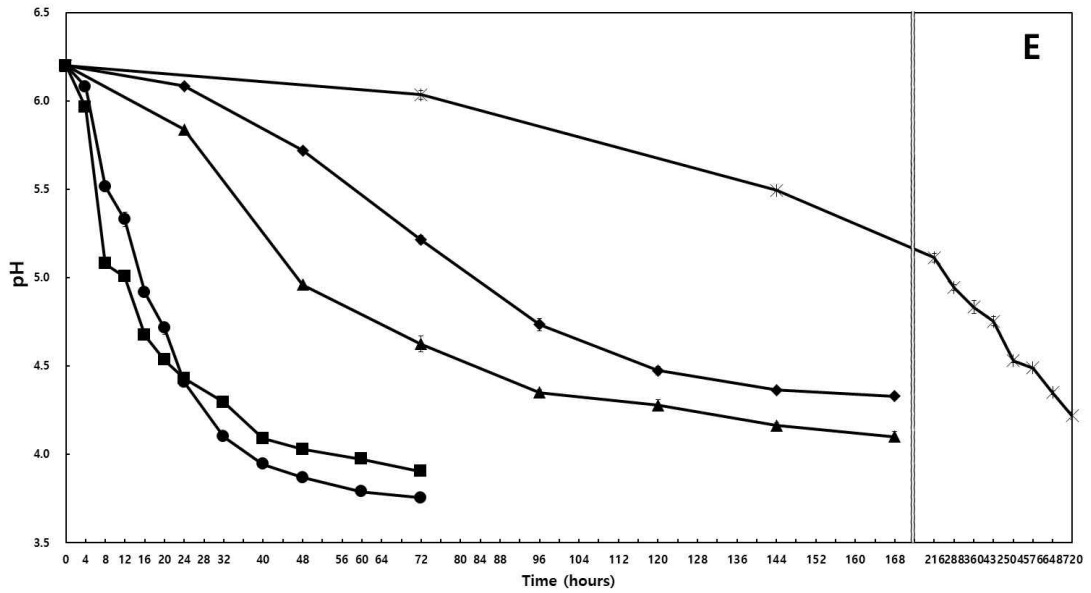


Figure 6. (Continue)

제 5절 분리 유산균의 안전성 평가

1. 용혈성 검사

생체 내 용혈 현상은 주로 비장, 간장, 골세포 등에서 발생하며, 비정상적인 용혈 현상이 발생할 경우 적혈구의 산소 운반 기능 장애로 인하여 생체 내에 치명적인 결과를 가져온다[23]. 특히 α -hemolysis와 β -hemolysis는 병원성 미생물에 의한 용혈성 현상으로 알려지고 있어 균주의 안전성 확인을 위해서는 용혈성 검사가 필수적이다[50].

P. inopinatus 6종에 대하여 용혈성 검사를 수행한 결과, *P. inopinatus* 6종 모두 집락 주변에 녹색의 환을 생성하는 α -hemolysis 반응 또는 투명한 환을 생성하는 β -hemolysis 반응이 관찰되지 않았다. β -hemolysis 양성 반응을 보이는 양성 대조구 *B. cereus* KCTC 3624는 균체 주위에 투명한 환을 나타내는 것을 확인하였다(Figure 7).

2. 유해 효소 활성

API ZYM kit를 사용하여 *P. inopinatus* 6종의 효소 활성을 조사하고 유해 효소에 대한 활성 여부를 확인하였다. *P. inopinatus* BCU1을 제외한 *P. inopinatus* 5종은 펩타이드 가수분해효소인 leucine arylamidase, valine arylamidase에 대하여 활성을 나타내었고, *P. inopinatus* JM1, *P. inopinatus* BD2, *P. inopinatus* PS1은 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 대해서도 활성을 나타내었다(Table 9). 반면 유해효소인 α -chymotrypsin, β -glucuronidase, β -glucosidase에 대해서는 *P. inopinatus* 6종 모두 활성을 나타내지 않았다. α -chymotrypsin은 감염성 심내막염 중 바이러스성 및 국소성 손상의 원인이 되는 것으로 알려져 있으며[45], β -glucuronidase은 장내 세균의 대사 작용으로 분비되는 효소로, 유해 물질이 체내로 유입되면 간에서 glucuronic acid에 의해 포함되어 해독 작용이 이루어지나, β -glucuronidase에 의해 담즙과 함께 장내로 배설된 glucuronic acid 포함체를 탈포합하여 다시 독성을 생성한다고 알려져 있다[44]. 또한 β -glucuronidase와 β -glucosidase의 활성이 높아지면 아민류와 독성물질, 변이원 등이 생성되고, 장관

내로 흡수된 유독 물질들은 체내를 순환하면서 암 유발, 동맥경화, 간장 장애, 면역기능 저하 등을 일으킨다. 심한 경우 장 점막에 손상을 주어 대장암을 유발하는 것으로 알려져 있다[12,17].

3. 항생제 내성

EFSA에서 제시한 *Pedococcus* 속의 break point를 참고하여 *P. inopinatus* 6종의 항생제 8종 ampicillin, vancomycin, gentamycin, streptomycin, erythromycin, tetracycline chloramphenicol에 대한 최소 생육 저해농도(Minimum inhibitory concentration, MIC)를 확인하였다[16].

P. inopinatus 6종 모두 항생제 6종 ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin에 대하여 EFSA에서 제시한 break point보다 낮거나 같은 농도에서 감수성을 보였다. 항생제 2종 tetracycline, chloramphenicol에 대해서는 EFSA에서 제시한 break point보다 높은 감수성을 보이는 것으로 보아 *P. inopinatus*는 종 특이적인 항생제 내성 유전자를 가지고 있으며, 내성 유전자가 chromosomal DNA에 존재할 것으로 추정된다(Table 10). Bacteria의 항생물질 내성 인자는 내재형(intrinsic)과 획득형(acquired)으로 구분되며, 특히 획득형 내성 인자는 항생물질 노출 환경에서 내성 유전자를 보유한 다른 bacteria로부터 수평이동(horizontal transfer)에 의하여 전이되므로 위해성이 있는 것으로 평가되고 있다[38]. 그러므로 획득형 항생물질 내성 유전자를 보유하고 있는 미생물이 식품발효용 종균이나 프로바이오틱 균주로 사용될 경우, 식품이나 장관을 매개로 위해미생물에게 항생물질내성 인자를 전파할 수 있는 가능성이 높아지기 때문에, 식품용 미생물 선발과정에서 반드시 검증되어야 한다[1,16].

4. Biogenic amine 생성

발효식품에서 가장 대표적인 화학적 위해 요인인 BA는 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효과정에서 유리아미노산이 미생물의 탈탄산 효소작용에 의해 생성되는 질소화합물로[51], Histidine으로부터 전환되는 histamine은 과량 섭취할 경우 피부에 발진, 두드러기, 부종 및 국소 염증 등을 일으키고[54], 메스꺼움, 구토, 설사 및 복부

경련 등의 증상과 심한 경우 질식 및 호흡곤란이 나타난다고 알려져 있다[42,54]. Tyrosine으로부터 전환되는 tyramine은 과량 섭취할 경우 고혈압을 일으키며[4,36,52] 우울증 치료제인 MAOI (Monoamine oxidase inhibitor) 복용하는 중에 같이 섭취할 경우에는 효소 활성이 저해되어 ‘cheese reaction’과 같은 편두통, 뇌출혈, 심부전을 유발하기도 한다[53]. 한국인에게 BA의 섭취는 주로 김치, 장류 및 젓갈 등의 발효식품에서부터 기인되기 때문에 묵은지에서 우점하는 *P. inopinatus*의 경우 BA 생성 여부 확인이 필수적이다[10].

Decarboxylase plate method는 배지 내에 함유된 pH indicator에 의해 산 혹은 알칼리인 배지의 상태에 따라 알칼리성 BA가 검출되는 원리를 이용한 방법이다. 즉, 균주가 amino acid decarboxylase에 의해 amine을 생성하여 배지가 pH 5.0에서 pH 6.8 이상으로 알칼리화 되면 균주 주변의 배지가 보라색으로 발색되어 BA 생성 균주가 검출된다[5]. 유산균은 glucose 당 대사에 따라 젖산이 생성되므로 BA를 생성하지 않는 유산균은 배양 후 pH가 산성이고, BA를 생성하는 유산균은 생성된 BA의 알칼리성에 의하여 배양 후 pH가 중성~약알칼리를 나타내게 된다.

이러한 decarboxylase plate method를 변형하여 *P. inopinatus* 6종의 BA 생성 여부를 확인한 결과, *P. inopinatus* 6종은 색깔 변화가 관찰되지 않았고, histidine 양성 대조구인 *M. morgani* KACC 13822는 진한 보라색으로 발색되고 tyrosine 양성 대조구인 *E. faecalis* ATCC 29212는 하얗게 변하여 BA 생성 균주로 추정되었다(Figure 8).

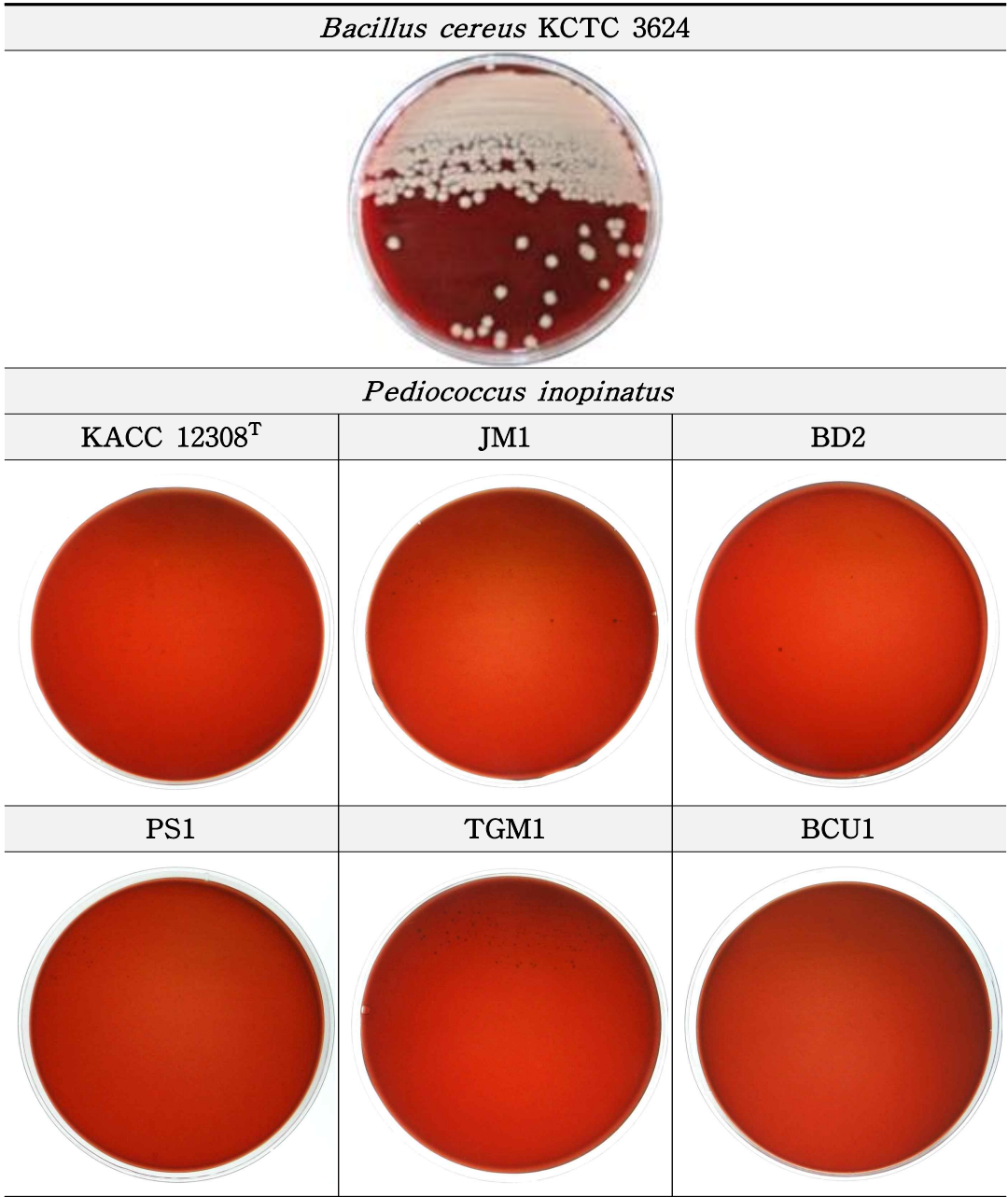


Figure 7. Hemolysis test of *P. inopinatus* and *B. cereus* KCTC 3624

Table 9. Enzymatic activities of *P. inopinatus* by API ZYM analysis

NO.	Strain Enzyme	KACC 12308 ^T	JM1	BD2	PS1	TGM1	BCU1
1	Control	0	0	0	0	0	0
2	Alkaline phosphatase	0	0	0	0	0	0
3	Esterase	0	0	0	0	0	0
4	Esterase lipase	0	0	0	0	0	0
5	Lipase	0.5	0.5	0	0.5	0.5	0
6	Leucine arylamidase	4	3	3	4	4	1
7	Valine arylamidase	3	3	3	4	4	0.5
8	Cystine arylamidase	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0
9	Trypsin	0	0	0	0	0	0
10	α -chymotrypsin	0	0	0	0	0	0
11	Acid phosphatase	0	0	0.5	0	0.5	0
12	Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase	1	5	4	3	1	0.5
13	α -galactosidase	0	0	0	0	0	0
14	β -galactosidase	0	0	0	0	0	0
15	β -glucuronidase	0	0	0	0	0	0
16	α -glucosidase	0	1	0	1	0	0
17	β -glucosidase	0	0.5	0	1	0	0
18	N-acetyl- β -glucosaminidase	0	0	0	0	0	0
19	α -mannosidase	0	0	0	0	0	0
20	α -fucosidase	0	0	0	0	0	0

Table 10. Minimum inhibitory concentrations (MIC) of antibiotics for *P. inopinatus*

Unit: MIC ($\mu\text{g/mL}$)

Antibiotics ¹⁾								
Strain	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	TET	CHL
Break point ²⁾ for <i>Pediococcus</i> sp.	4	n.r.	16	64	64	1	8	4
KACC 12308 ^T	4	512	4	32	8	0.25	16	4
JM1	4	512	4	64	16	0.25	16	8
BD2	1	512	4	16	16	0.5	16	8
PS1	4	512	4	64	64	0.25	16	8
TGM1	4	512	8	32	32	1	16	8
BCU1	4	512	4	32	16	0.5	32	8

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 (2012).

3) n.r.: Not required.

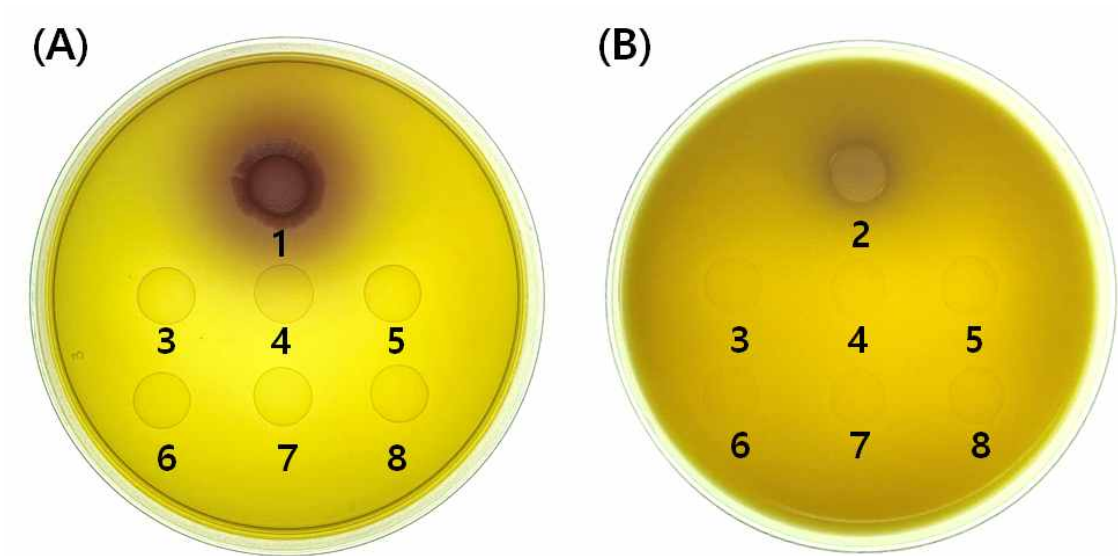


Figure 8. The developed screening plate for biogenic amine production by *P. inopinatus*

(A) media with precursor histidine, (B) media with precursor tyrosine

1, *Morganella morganii* KACC 13822; 2, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212;

3, *P. inopinatus* KACC 12308^T; 4, *P. inopinatus* JM1; 5, *P. inopinatus* BD2;

6, *P. inopinatus* PS1; 7, *P. inopinatus* TGM1; 8, *P. inopinatus* BCU1

제 4장 결 론

최근 국내 김치 업체들의 미국 내 대형유통업체 입점 확대에 의하여 김치 수출량이 증가하였고, K-식문화의 유행, 코로나바이러스감염증-19의 여파로 인한 내식(肉食)의 증가, 그로 인한 면역력 강화 식품에 대한 선호도 증가 등의 이유로 김치에 대한 수요가 꾸준히 증가하고 있다[60]. 그러나, 국내 일반 김치의 시장 규모에 비해 별미김치의 시장 규모는 아직 상대적으로 부진한 편이다[40]. 특히 묵은지는 특유의 향과 식감으로 인하여 타 별미김치에 비하여 수요가 낮은 편이며 묵은지 수급에 관련된 통계도 자료화되지 않고 있다[40]. 묵은지의 특성이나 균총에 대하여 분석한 연구 역시 일반 김치에 비해 크게 부진한 실정이다[40]. Hong 등의 연구를 통하여 1년 이상 숙성한 묵은지에서 *P. damnosus*와 *P. parvulus*가 우점함이 규명되었지만, 3종 미만의 묵은지 시료만이 사용되어 그 연구 결과가 보편적인 묵은지 균총 패턴인지 규정하기 어려운 점이 있다[20].

이에 따라 본 연구에서는 전국으로부터 수집한 묵은지 40종의 균총을 분석함으로써 일반적인 묵은지 특성과 균총에 대한 데이터를 수집하였다. 묵은지의 균총 분석 결과 묵은지에서 *P. inopinatus*가 우점함을 확인하였다. *P. inopinatus*는 맥주 효모에서 최초로 분리된 유산균주로 흔히 맥주의 부패균으로 알려져 있다[3,22]. 따라서 *P. inopinatus*에 대한 연구 동향을 살펴보면 맥주의 부패에 어떠한 관여를 하는지에 대한 연구가 주를 이루며 *P. inopinatus*의 특성 분석에 대한 연구에서도 *P. inopinatus*의 분리원이 부패된 맥주인 것을 확인할 수 있다[56]. 이에 본 연구는 묵은지에서 우점하는 *P. inopinatus*의 특성을 분석하고 안전성을 평가하고자 하였다.

전국 32개 지역의 온라인 판매처에서 구입한 40종의 묵은지 중 25종의 저장 온도 및 저장 기간을 조사하였다. 조사 결과 25종의 묵은지는 10℃ 이하에서 저장되었고 0℃ 이하에서 저장한 묵은지가 5종으로 가장 많았다. 저장 기간은 2개월~1년 9개월로 다양하였으나, 6개월 저장한 묵은지가 가장 많은 것으로 조사되었다. 묵은지의 이화학적 특성 분석 결과 묵은지의 평균 pH는 $\text{pH } 3.96 \pm 0.23$, 산도는 $1.21 \pm 0.29\%$, 염도는 $2.12 \pm 0.32\%$, 당도는 $9.31 \pm 1.36 \text{ brix}^\circ$ 로 나타났다. 또한 비배양학적 방법(PCR-DGGE)을 통하여 묵은지 시료 40종의 DGGE 분석 결과 31종의 묵은지에서 *P. inopinatus* KACC 12308^T의 밴드와 동일한 위치에서 band가 관찰되었다.

PCR-DGGE 결과 *P. inopinatus* KACC 12308^T band와 동일한 위치에서 band가 관찰된 묵은지 시료 31종의 여액을 제조하여 MRS, MRS+2% CaCO₃ 평판 배지에 도말하고 25°C, 30°C에 배양하였다. 배양 후 형성된 colony들의 형태를 관찰하고, 형태학적 특성을 기준으로 나뉘어진 그룹 별로 gram-staining을 진행하였다. 그 결과 31종의 묵은지 전부에서 *P. inopinatus* KACC 12308^T와 colony 형태가 동일한 원형에 ivory 색과 광택을 띠면서 gram-staining 결과 그람 양성, 구균 형태인 균주들이 확인되었다. 이들을 분리하여 16S rRNA gene sequence 분석을 통한 동정을 진행하였다. 동정 결과 *P. inopinatus* 31종이 동정되었고, 그 중 23종이 1우점 종임을 확인할 수 있었다.

P. inopinatus 31종과 표준 균주인 *P. inopinatus* KACC 12308^T 배양액의 pH를 측정한 결과 *P. inopinatus* 균주 32종의 평균 pH는 pH 4.14 ± 0.10이며, 평균 산도는 1.11 ± 0.18%으로 나타났다. *P. inopinatus* 균주 31종 중 18종과 *P. inopinatus* KACC 12308^T의 당 대사능을 분석한 결과, 양성 반응을 나타낸 탄수화물의 개수는 11~16개였으며, 동일한 탄수화물 6종 D-Galactose, D-Glucose, D-Fructose, D-Mannose, N-Acetyl glucosamine, Esculin에 대하여 양성을 나타내었다. 판독 결과를 토대로 apiweb에서 동정한 결과, *Pediococcus* spp., *P. damnosus* 1, *P. damnosus* 2 등으로 동정되었으나, 실험에 사용된 API 50 CHL kit는 *Lactobacillus* 속의 동정을 위한 kit이고, apiweb 사이트에 *P. inopinatus*는 등록되어있지 않으므로 위와 같은 당 대사능 판정 결과로 *P. inopinatus*를 동정하기에는 적합하지 않다고 사료된다.

P. inopinatus KACC 12308^T과 선발 기준에 따라 선발한 *P. inopinatus* 5종의 배양학적 특성을 규명하였다. *P. inopinatus* 6종을 5, 10, 15, 25, 30°C에 배양하여 생육도를 확인한 결과 *P. inopinatus* 6종 모두 30°C에서 배양할 때 가장 단시간에 최대 흡광도 값과 최소 pH 값을 나타내었다. 따라서 *P. inopinatus*의 배양 최적 생육 온도는 30°C인 것으로 사료된다.

P. inopinatus 6종의 안전성을 검사를 수행하였다. 생체 내 용혈 현상은 주로 비장, 간장, 골세포 등에서 발생하며, 비정상적인 용혈 현상이 발생할 경우 적혈구의 산소 운반 기능 장애로 인하여 생체 내에 치명적인 결과를 가져온다[23]. 용혈성 검사 결과 *P. inopinatus* 6종 모두 α-hemolysis 반응 혹은 β-hemolysis 반응을 나타내지 않았고, *B. cereus* KCTC 3624는 균체 주위에 투명한 환을 생성하는 β-hemolysis 양성 반응을 나타내었다.

API ZYM kit을 사용하여 *P. inopinatus* 6종의 유해 효소 활성을 조사한 결과, *P.*

inopinatus BCU1을 제외한 5종은 leucine arylamidase, valine arylamidase에 대하여 활성을 나타내었고, *P. inopinatus* JM1, *P. inopinatus* BD2, *P. inopinatus* PS1은 Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 대해서도 활성을 나타내었지만, *P. inopinatus* 6종 모두 유해 효소인 α -chymotrypsin, β -glucuronidase, β -glucosidase를 생성하지 않는 것으로 나타났다.

항생제 내성을 확인하기 위하여 항생제 8종 ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tetracycline, chloramphenicol에 대하여 최소 생육 저해농도를 확인한 결과 *P. inopinatus* 6종 모두 항생제 6종 ampicillin, vancomycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erythromycin에 대하여 EFSA에서 제시한 breakpoint보다 낮거나 같은 감수성을 보였으나, 항생제 2종 tetracycline, chloramphenicol에 대해서는 EFSA에서 제시한 break point보다 높은 감수성을 보였다. Bacteria의 항생물질 내성 인자는 내재형(intrinsic)과 획득형(acquired)으로 구분되는데, 이 중 획득형 내성 인자는 항생물질 노출 환경에서 내성 유전자를 보유한 다른 bacteria로부터 수평이동(horizontal transfer)에 의하여 전이되므로 위해성이 있는 것으로 평가된다[38]. 그러므로 획득형 항생물질 내성 유전자를 보유하고 있는 미생물이 식품발효용 종균이나 프로바이오틱 균주로 사용될 경우, 식품이나 장관을 매개로 위해미생물에게 항생물질내성 인자를 전파할 수 있는 가능성이 높아지기 때문에, 식품용 미생물 선발과정에서 반드시 검증되어야 하며[1,16], 추후 연구를 통해 획득형 항생물질 내성 유전자의 확인이 필요하다.

Histidine으로부터 전환되는 histamine은 과량 섭취할 경우 피부에 발진, 두드러기, 부종 및 국소 염증 등을 일으키고, 심한 경우 질식 및 호흡곤란이 나타난다고 알려져 있다[42,54]. Tyrosine으로부터 전환되는 tyramine은 우울증 치료제인 MAOI (Monoamine oxidase inhibitor)를 복용하는 중에 같이 섭취할 경우 효소 활성이 저해되어 ‘cheese reaction’과 같은 편두통, 뇌출혈, 심부전을 유발하기도 한다고 알려져 있다[53]. 한국인에게 BA의 섭취는 주로 김치, 장류 및 젓갈 등의 발효식품에서부터 기인되기 때문에 묵은지에서 우점하는 *P. inopinatus*의 경우 BA 생성 여부 확인이 필수적이다[10]. Decarboxylase plate method를 변형하여 *P. inopinatus* 6종의 BA 생성 여부를 확인한 결과, *P. inopinatus* 6종은 색깔 변화가 관찰되지 않아 BA를 생성하지 않음이 확인되었고, histidine 양성 대조구인 *M. morgani* KACC 13822는 진한 보라색으로 발색되고 tyrosine 양성 대조구인 *E. faecalis* ATCC 29212는 하얗게 변하여 BA 생성 균주로 추정되었다.

본 연구에서는 전국 묵은지 제조업체로부터 40종의 묵은지를 수집하여 묵은지의 이화학적 특성 분석 및 비배양학적인 방법을 통한 미생물학적 특성 분석을 수행하였다. 그리고 미생물학적 특성 분석 결과 *P. inopinatus*가 존재한다고 판단되는 묵은지로부터 *P. inopinatus* 추정 균주를 분리·동정 후 우점도를 분석하였다. 또한 선발 *P. inopinatus* 6종의 형태학 및 배양학적 특성 분석 등을 실시하고 용혈성 검사, 유해 효소 활성 측정, 항생제 내성 및 biogenic amine 생성 여부 확인 등 안전성을 평가함으로써 묵은지로부터 분리된 *P. inopinatus*의 기초 자료를 마련하고자 하였다. 이러한 본 연구 결과에 기초하여 향후 진행될 묵은지를 대상으로 한 광범위한 연구로의 접근성을 높이며 *P. inopinatus*만의 다양한 기능에 대하여 연구됨으로써 묵은지 뿐만 아니라 여러 식품에서도 종균으로서의 사용이 가능할 것으로 기대된다.

제 5장 참고문헌

1. Ammor MS, and Mayo B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*. **76**: 138-146.
2. AOAC. 1990. Official methods of analysis 15th edition. Association of official analytical chemists, Washington DC, USA.
3. Back W. 1978. Zur taxonomie der gattung *Pediococcus*. *Brauwiss.* **31**: 237-250, 312-330, 338-340.
4. Blackwell B. 1963. Hypertensive crises due to monoamine oxidase inhibitors. *Lancet*. **2**: 849-851.
5. Bover-Cid S, and Holzapfel WH. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbial*. **53**: 33-41.
6. Chae SJ, Jeon YB, Moon SH, Moon SY, Seo YJ, Choi HJ, and Chang HC. 2018. Characteristics of *Lactobacillus sakei* SC1 as a starter culture for kimchi. *Proceedings of the Korean Society of Microbiology and Biotechnology*. p373.
7. Chang JY, and Chang HC. 2010. Improvements in the quality and shelf life of kimchi by fermentation with the induced bacteriocin producing strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a starter. *Journal of food science*. **75**: 103-110.
8. Okuzumi M, Yamanaka H, Kubozuka T, Ozaki H, and Matsubara K. 1984. Changes in numbers of histamine-forming bacteria on/in common mackerel stored at various temperatures. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*. **50**: 653-657.
9. Cheigh HS, Park KY, and Lee CY. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Critical*

Reviews in Food Science and Nutrition. **34**: 175–203.

10. Cho TY, Han GH, Bahn KN, Son YW, Jang MR, Lee CH, Kim SH, Kim DB and Kim SB. 2006. Evaluation of biogenic amines in Korean commercial fermented foods. *Korean Society of Food Science and Technology.* **38**: 730–737.
11. Cho Y, and Rhee HS. 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on kimchi fermentation (I). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.* **7**: 15–25.
12. Cumming JH, and Macfarlane GT. 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Microbiology.* **70**: 443–459.
13. Delgado S, O'Sullivan E, Fitzgerald G, and 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**: 1119–1127.
14. Dobson CM, Deneer H, Lee S, Hemmingsen S, Glaze S, and Ziola B. 2002. Phylogenetic analysis of the genus *Pediococcus*, including *Pediococcus claussenii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from beer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* **52**: 2003 - 2010.
15. Donohue DC, and Salminen S. 1996. Safety of probiotic bacteria. *Asia Pacific journal of clinical nutrition.* **5**: 25–28.
16. EFSA (European Food Safety Authority). 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *The EFSA Journal.* **10**: 2740.
17. Goldin BR. 1990. Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. *Annals of medicine.* **22**: 43–48.

18. Hirayama K, and Rafter J. 2000. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes and Infection*. **2**: 681-686.
19. Hong Y, and Chang HC. 2013. Comparison of bacterial community changes in fermenting kimchi at two different temperatures using a denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **23**: 76-84.
20. Hong Y, Li L, Qin P, Lee SY, and Kim HY. 2015. Predominant lactic acid bacteria in mukeunji, a long-term-aged kimchi, for different periods. *Food Science and Biotechnology*. **24**: 545-550.
21. Hur SW, Ko MS, Kim MR, Lee HR, Chung SJ, and Cho MS. 2015. Physicochemical characteristics and sensory properties of commercial mukeunji products. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **44**: 702-708.
22. Iijima K, Suzuki K, Asano S, Kuriyama H, Kitagawa Y. 2007. Isolation and identification of potential beer spoilage *Pediococcus inopinatus* and beer spoilage *Lactobacillus backi* strains carrying the *horA* and *horC* gene clusters. *Journal of the Institute of Brewing*. **113**: 96-101.
23. Lee Y, and Chang HC. 2008. Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Microbiology and Biotechnology Letters*. **36**: 106-114.
24. Joosten HM, Gaya P, and Nuñez M. 1995. Isolation of tyrosine decarboxylaseless mutants of a bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* strain and their application in cheese. *Journal of food protection*. **58**: 1222-1226.
25. Ji SH, Han WC, Lee JC, Cheong C, Kang SA, Lee JH, and Jang KH. 2009. Effect of low temperature on the qualities of long-term fermented Kimchi (Korean pickled cabbage). *Korean Journal of Food Preservation*. **16**: 804-809.
26. Kim HJ, Shin HK, and Yang EJ. 2013. Production and fermentation

- characteristics of mukeunji with a mixed starter. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **42**: 1467-1474.
27. Kim JY, Park EY, and Kim YS. 2006. Characterization of volatile compounds in low-temperature and long-term fermented Baechu Kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Culture*. **21**: 319-324.
 28. Kim SE, Kim YH, Lee HJ, Kim DO, and Kim HY. 2012. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from mukeunji, a long-term ripened kimchi. *Journal of Food Science and Biotechnology*. **21**: 1135-1140.
 29. Kim SY, Yoo KS, Kim JE, Kim JS, Jung JY, Jin Q, and Han NS. 2010. Diversity analysis of lactic acid bacteria in Korean rice wines by culture-independent method using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Science and Biotechnology*. **19**: 749-755.
 30. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, and Salminen SJ. 1998. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*. **167**: 185-189.
 31. Ko KH, Liu W, Lee HH, Yin J, and Kim IC. 2013. Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **42**: 89-95.
 32. Ko MS, Hur SW, Kim MR, Jung SJ, Lee H and Cho MS. 2015. The quality properties of rapidly fermented mukeunji (long-term fermented) Kimchi with different salinity and fermented temperature. *The Korean Journal of Food And Nutrition*. **28**: 335-342.
 33. Kwon SJ, and Sohn JH. 2012. Analysis of microbial diversity in nuruk using PCR-DGGE. *Journal of Life Science*. **22**: 110-116.
 34. Lee K, and Lee Y. 2010. Effect of *Lactobacillus plantarum* as a starter on the food quality and microbiota of kimchi. *Food Science and Biotechnology*. **19**:

641-646.

35. Lee SH, and Chang HC. 2016. Isolation of antifungal activity of *Leuconostoc mesenteroides* TA from kimchi and characterization of its antifungal compounds. *Food Science and Biotechnology*. **25**: 213-219.
36. Lejonc JL, Gusmini D, and Brochard P. 1979. Isoniazid and reaction to cheese. *Annals of Internal Medicine*. **91**: 793.
37. Lim SJ, Bae EY, Seol MK, Cho YJ, Jung HY, and Kim BO. 2020. Change in *Lactobacillus brevis* GS1022 and *Pediococcus inopinatus* GS316 in gajami sikhae fermentation. *Journal of Life Science*. **30**: 491-500.
38. Mathur S, and Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *International Journal of Food Microbiology*. **105**: 281-295.
39. Moon SH, Chang HC, and Kim IC. 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**: 1125-1132.
40. Moon SH, Kim CR, Lee PW, and Chang HC. 2019. Study on the establishment of standard for mukeunji product through characteristic analysis of commercial mukeunji products. *Journal of Korean Society of Community Living Science*. **30**: 33-51.
41. Moon SH, Moon JS, and Chang HC. 2015. Rapid manufacture and quality evaluation of long-term fermented kimchi (mukeunji) using *Lactobacillus sakei* SC1. *Food Science and Biotechnology*. **24**: 1797-1804.
42. Murray CK, Hobbs G, and Gilbert RG. 1982. Scombrotxin and scombrotxin-like poisoning from canned fish. *Journal of Hygiene-Cambridge*. **88**: 215-218.
43. Nam MH, Kong CS, Bak SS, Lee YB, Rhee SH, and Park KY. 2007.

- Physicochemical properties of long-term fermented Kimchi. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. **12**: 46-50.
44. Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, and Mutai M. 1986. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by β -glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *Journal of Medical Microbiology*. **22**: 351-355.
 45. Oakey HJ, Harty DW, and Knox KW. 1995. Enzyme production by lactobacilli and the potential link with infective endocarditis. *Journal of Applied Microbiology*. **78**: 142-148.
 46. Ouwehand AC. 2007. Anti allergic Effects of Probiotics. *Journal of Nutrition*. **137**: 794 - 797.
 47. Park JM, Shin JH, Lee DW, Song JC, Suh H.J, Chang UJ, and Kim JM. 2010. Identification of the lactic acid bacteria in Kimchi according to initial and over-ripened fermentation using PCR and 16S rRNA gene sequence analysis. *Journal of Food Science and Biotechnology*. **19**: 541-546.
 48. Ryu EH, and Chang HC. 2013. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Annals of microbiology*. **63**: 1387-1395.
 49. Ryu EH, Yang EJ, Woo ER, and Chang HC. 2014. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi. *Food microbiology*. **41**: 19-26.
 50. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ, and Tassou CC. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food microbiology*. **33**: 282-291.
 51. Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. **29**: 675-690.

52. Smith CK, and Durack DT. 1978. Isoniazid and reaction to cheese. *Annals of internal medicine*. **88**: 520-521.
53. Smith TA. 1981. Amines in food. *Food Chemistry*. **6**: 169-200.
54. Taylor SL. 1986. Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology*. **17**: 91-128.
55. Weston S, Halbert A, Richmond P, and Prescott SL. 2005. Effects of probiotics on topic dermatitis: A randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood*. **90**: 892 - 897.
56. Yansanjav A, Siegumfeldt H, Jespersen L, Vancanneyt M, Swings J, Hollerova I, and Leisner JJ. 2004. Detection of resistance of lactic acid bacteria to a mixture of the hop analogue compounds tetrahydroiso- α -acids by noninvasive measurement of intracellular pH. *Journal of Applied Microbiology*. **96**: 1324-1332.
57. Yoo MJ, Kim HR, and Chung HJ. 2001. Changes in physicochemical and microbiological properties in low-temperature and long-term fermented Kimchi during fermentation. *Journal of the Korean Society of Food Culture*. **16**: 431-441.
58. <https://www.foodbev.com/>
59. <http://www.health.com/>
60. www.atfis.or.kr
61. 김은지, 장해춘, 2015, 김치로부터 분리한 *Weissella* 속, *Leuconostoc* 속, *Lactobacillus* 속 특성 규명, 석사학위논문, 조선대학교, 광주

감사의 글

어느덧 길면 길었고 짧으면 짧았던 2년 간의 대학원 생활을 마무리하며 졸업을 앞두고 되었습니다. 돌이켜보니 한편으론 아쉽고 후회도 되지만, 많은 것을 배우며 성장할 수 있는 계기가 되었던 소중한 시간이었습니다. 2년이라는 시간 동안 저를 항상 진심어린 마음으로 응원해주시고 따뜻하게 격려해주신 많은 분들에게 감사의 말씀을 전합니다.

먼저 저를 학문의 길로 이끌어주시고 학문에 대한 열정과 앞으로 제가 나아가야 할 방향을 가르쳐주신 장해춘 교수님, 부족한 저를 항상 믿어주시고 저에게 아낌없는 지원과 배려 해주심에 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 논문을 심사해주시고 세심하게 다듬어주신 이재준 교수님과 이주민 교수님께 다시 한번 감사드립니다. 또한 학부 시절부터 학문적으로 큰 가르침을 주시며 학문적 시야를 넓혀주신 김경수 교수님, 김복희 교수님께도 감사의 말씀을 전합니다.

지난 3년 동안 저와 함께 울고 웃으며 가족처럼 지냈던 우리 실험실 식구들..! 정말 감사합니다. 새로 도전하는 것에 대해서 자신 없어 했던 저에게 항상 용기를 북돋아주시며 할 수 있다고 격려해주시고, 저의 하이텐션을 유일하게 받아주시는 문송희 박사님, 따끔한 충고와 함께 끊임없는 조언으로 저의 부족한 부분을 채워주시며 마지막까지 누구보다 아낌없는 도움을 건네주신 소영언니, 항상 다정한 말투로 실험에 대한 조언을 아끼지 않으셨던 유빈언니, 제가 힘들어할 때 따뜻한 아이스아메리카노 같은 모습으로 걸보기엔 냉정하지만 마음 만든 따뜻하게 저를 지켜주신 소정언니, 짧았지만 많은 면에서 가르침 주신 홍준오빠, 저와 티격태격했지만 배울 점 많은, 고맙기도 하지만 죄송한 마음이 더 큰 예진언니.. 언니오빠들 덕분에 제가 평생 못 받아 본 귀여움도 받으면서 실험실 생활을 잘 지낼 수 있었던 것 같습니다. 항상 감사합니다. 1년 반이라는 시간 동안 함께 고생했던 수트리오희수, 은수, 서로 의지하면서 누구보다 힘이 되어준 우리 민정이, 힘들어할 때마다 귀여운 애교로 응원해준 우리 지우, 다운이, 유정이, 민주, 다른 길을 걷고 있지만 잘 해내고 있을 준휘, 소영이, 도경이에게도 고마운 마음을 전합니다.

또한 늘 힘이 되어주고 날 믿어준 소중한 친구들.. 반복되는 생활에 지쳐있을 때 제일 먼저 캐치하고 기분 전환 시켜주려 노력해준 하린이, 고등학교 3년+대학교 4년이라는 시간 동안 같이 붙어 다니며 쌍둥이 소리도 들었던 단비, 먼저 사회인의 길을 걷고 있는 멋진 예원이, 지연이, 자주는 못 만나지만 만날 때마다 유쾌한 서정이, 그리고 멀리서도 항상 응원하고 있는 내 동기들 미지, 은별이, 여진이, 수민이. 항상 고맙고 응원해!

마지막으로 엄마, 아빠, 언니, 우찬이. 애정 표현을 잘 못하는 성격인지라 이 짧은 글로도 다 표현하지 못하겠지만, 누구보다 고맙고 사랑합니다.

항상 저를 믿고 응원해주신 많은 분들께 진심으로 감사드립니다. 앞으로도 건강, 행복하시고 좋은 일만 가득하시길 바랍니다.