



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](#)

2022年 2月
碩士學位論文

저온성 김치 유산균
Leuconostoc gelidum 균주의
특성 규명

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

趙 珉 慶

저온성 김치 유산균
Leuconostoc gelidum 균주의
특성 규명

Characterization of psychrotrophic kimchi lactic acid bacteria,
Leuconostoc gelidum strains

2022年 2月 25日

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

趙 珉 慶

저온성 김치 유산균
Leuconostoc gelidum 균주의
특성 규명

指導教授 張 海 春

이 논문을 理學碩士學位申請 論文으로 提出함

2021年 10月

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

趙 珉 慶

趙珉慶의 碩士學位論文을 認准함

委員長 조선대학교 교수 김복희 印

委員 조선대학교 교수 이주민 印

委員 조선대학교 교수 장해춘 印

2021년 12월

朝鮮大學校 大學院

목 차

ABSTRACT	X
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
가. pH 및 산도 측정	4
나. 염도 및 당도 측정	5
3. 비배양학적 방법을 통한 균총 분석	8
가. Genomic DNA 추출 및 PCR을 통한 증폭	8
나. DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)를 통한 김치의 미생물상 분석	9
제 2절 저온 생육능 균주의 분리 및 동정	10
1. 저온 생육능 균주의 분리	10
2. 분리 균주의 동정	10
가. 16S rRNA gene sequence 분석	10
나. 생화학적 특성 분석	11

다. Heme에 따른 호기적 환경에서의 생육 특성 분석	11
라. 6.5% NaCl을 첨가한 배지에서의 생육 특성 분석	12
마. Plasmid profile 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
4. 배지의 초기 NaCl 농도에 따른 생육도	14
제 4절 분리 유산균의 안전성 평가	16
1. 용혈성 검사	16
2. 효소활성	16
3. 항생제 내성	17
4. Biogenic amine 생성능	17
제 5절 분리 유산균의 안정성 평가	18
1. 내산성	18
2. 내열성	18
3. 내염성	18
제 6절 분리 유산균의 기능성 평가	19
1. Exopolysaccharide 생성능	19
제 7절 통계학적 분석	19
1. 통계학적 분석	19

제 3장 실험 결과 및 고찰	20
제 1절 시판 저온발효 김치의 수집 및 분석	20
1. 김치의 저장온도 및 기간 분석	20
2. 김치의 이화학적 특성 분석	20
3. 배양학적 방법을 통한 김치의 미생물상 분석	23
제 2절 저온 생육능 균주의 분리 및 동정	25
1. 저온생육능 균주의 분리	25
2. 분리 균주의 동정	30
가. 16S rRNA gene sequence 분석	30
나. 생화학적 특성 분석	30
다. Heme에 따른 호기적 환경에서의 생육 특성 분석	31
라. 6.5% NaCl을 첨가한 배지에서의 생육 특성 분석	31
마. Plasmid profile 분석	31
제 3절 분리 유산균의 배양학적 특성 규명	42
1. 배양온도에 따른 생육도	42
가. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> 의 배양온도에 따른 생육	42
나. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> 의 배양온도에 따른 생육	43
2. 배지의 초기 pH에 따른 생육도	48
가. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> 의 초기 pH에 따른 생육	48

나. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> 의 초기 pH에 따른 생육	49
3. 배지의 초기 NaCl 농도에 따른 생육도	52
가. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> 의 초기 염 농도에 따른 생육	52
나. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> 의 초기 염 농도에 따른 생육	53
제 4절 분리 유산균의 안전성 평가	56
1. 용혈성 검사	56
2. 효소활성	56
3. 항생제 내성	57
4. Biogenic amine 생성능	58
제 5절 분리 유산균의 안정성 평가	65
1. 내산성	65
가. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> 의 내산성 ...	65
나. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> 의 내산성 ...	65
2. 내열성	66
가. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> 의 내열성 ...	66
나. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> 의 내열성 ...	66
3. 내염성	67
가. <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> 의 내염성 ...	67

나. *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 내염성 ... 67

제 6절 분리 유산균의 기능성 평가 77

1. Exopolysaccharide 생성능 77

제 4장 결론 79

제 5장 참고문헌 84

LIST OF TABLES

Table 1. The sample names of kimchi collected from 7 regions·····	7
Table 2. List of lactic acid bacteria used in this study·····	14
Table 3. Storage temperature and aging period of kimchi samples·····	20
Table 4. Chemical properties of kimchi samples·····	21
Table 5. LAB strains isolated from kimchi fermented at low temperature ·····	26
Table 6. Morphological characteristics and catalase test results of the isolated strains·····	27
Table 7. Identification of the isolated strains·····	32
Table 8. Carbohydrate metabolism of the isolated strains·····	33
Table 9. Comparison of general genome features of <i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> ·····	39
Table 10. Enzymatic activities of psychrotrophic LAB using API zym kit·····	61
Table 11. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibiotics for psychrotrophic LAB·····	62
Table 12. Acid and alkali tolerance of <i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> ·····	67
Table 13. Acid and alkali tolerance of <i>Leu. gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> ·····	68

Table 14. Temperature tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 70

Table 15. Temperature tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*71

Table 16. Salt tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*73

Table 17. Salt tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*74

LIST OF FIGURES

Figure 1. Kimchi sampling locations.....	6
Figure 2. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments from four out of seven kimchi samples.....	23
Figure 3. Colony growth from toothpick-inoculated spots.....	25
Figure 4. Gram staining and microscopic observation of the isolated strains ...	28
Figure 5. Effect of heme on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> aerobic growth.....	35
Figure 6. Effect of heme on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> aerobic growth.....	36
Figure 7. Effect of addition 6.5% NaCl on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> growth.....	37
Figure 8. Effect of addition 6.5% NaCl on <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> growth.....	38
Figure 9. Plasmid profiles of the isolated <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strains	40
Figure 10. Growth of <i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> at different temperatures.....	44

Figure 11. Growth of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* at different temperatures.....45

Figure 12. Effect of initial pH of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* growth..... 49

Figure 13. Effect of initial pH of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* growth..... 50

Figure 14. Effect of initial NaCl concentration of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* growth..... 53

Figure 15. Effect of initial NaCl concentration of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* growth..... 54

Figure 16. Hemolysis test of *B. cereus* ATCC 14579 and *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*..... 59

Figure 17. Hemolysis test of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*..... 60

Figure 18. The screening plate for biogenic amine production by psychrotrophic LAB 63

Figure 19. The sucrose plate for EPS production by psychrotrophic LAB 77

ABSTRACT

Characterization of psychrotrophic kimchi lactic acid bacteria, *Leuconostoc gelidum* strains

Min Kyeong Jo

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

In this study, 7 kimchi samples fermented at low temperature were collected from 7 different regions in Korea. Storage temperature, aging period, chemical properties of the collected samples were investigated. Microbial profiles of the samples were analyzed using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE). Psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) were isolated from the samples using 25°C incubation temperature. A total of 8 LAB were isolated, and then they were identified by determination of 16S rRNA gene sequences, biochemical properties, growth with 6.5% NaCl, growth with heme and plasmid profiles of the isolates. As a result, 2 LAB were identified as *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* and 6 LAB were *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*. The effects of different temperature (-2~37°C), initial pH (pH 4.0~pH 9.0) and initial NaCl concentration (1~9%) on the LAB growth were investigated. They can grow at 5°C but not at 37°C, maximum cell growth can be obtained at 25°C and pH 8.0. In safety test, the isolates did not present harmful characteristics such as hemolysis, undesirable enzyme activities, antibiotic resistance and biogenic amine production. The isolates were investigated for their suitability for technological processes (pH, temperature and NaCl treatment). In pH and temperature tolerance, all 8 strains were stable at pH 8.0, -2~10°C for 72 h. And in salt tolerance test, *Leu. gelidum* subsp.

aenigmaticum were stable at 3~5% (*w/v*) NaCl and *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* were stable at 7~9% (*w/v*) NaCl. The isolated strains showed exopolysaccharide (EPS) producing ability at 5% sucrose plate. The result of this study showed that the isolated psychrotrophic LAB can be used as a functional starter culture for food fermentation at low temperature.

제 1장 서론

김치는 우리 식생활에서 가장 큰 비중을 차지하고 있는 반찬 중 하나로 절인 배추나 무, 오이, 열무 등의 주원료를 소금에 절인 후 각종 고추, 파, 마늘, 생강, 젓갈 등의 부재료를 이용한 양념을 혼합하여 일정 기간 발효, 숙성시키면 독특한 향미를 갖게 되는 한국의 대표적인 채소 발효 식품이다[1, 2]. 현재까지 알려진 김치의 효능으로는 식욕촉진, 변비 및 대장암 예방, 항산화 효과, 비만 예방, 콜레스테롤 감소, 면역 증강 등이 있다[3]. 이러한 김치의 효능으로 인해 영국의 일간지 ‘가디언(The Guardian)’에서 김치를 세계 최고의 6가지 절임 및 발효 식품 중 하나로 소개한 바 있으며[4], 미국의 건강 전문 월간지 ‘헬스(Health)’에서 인도의 렌즈콩, 그리스의 요구르트, 스페인의 올리브유, 일본의 낫토와 함께 한국의 김치를 세계 5대 건강식품으로 선정하였고[5], 일본의 공영방송 ‘NHK’에서 한국 김치의 건강 기능성을 소개[6]하는 등 세계적으로 김치의 기능성이 주목받고 있다. 또한, 김치는 전 세계적인 매운맛 열풍과 함께 이국적인(Exotic) 식품, 발효 식품 트렌드에 따라 인기가 상승하던 중, 펜데믹 시기 프랑스 몽펠리에 대학의 Jean Bousquet 명예교수 연구진의 코로나19와 국가별 식생활 차이의 상관관계 분석에서 발효된 배추를 자주 먹는 나라에서 유독 적은 수의 사망자가 나왔다는 연구 결과와 함께 양배추를 소금에 절여 발효시킨 독일의 사우어크라우트(Sauerkraut)와 한국의 김치에 대한 언급[7]이 주목받게 되면서 작년 수출 역대 최대치를 찍게 되었다[8]. 이렇듯 최근 국내뿐만 아니라 국외적으로 관심과 수요가 증가하며 김치 산업이 빠르게 성장하고 있다.

김치는 주재료와 부재료에 들어 있는 효소와 야생 미생물의 상호작용, 소금 등에 의한 삼투압 작용 등 여러 물리, 화학적 작용에 의해 발효된다. 지금까지의 보고에 따르면 김치 발효에 주로 관여하는 유산균으로는 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, *Weissella*속, *Pediococcus*속 등이 있으며, 대표적으로 *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus lactics*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc inhae*, *Leuconostoc kimchii*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella koreensis*, *Weissella cibaria*, *Weissella confusa*, *Pediococcus inopinatus*, *Pediococcus pentosaceus* 등으로 알려져 있다[9, 10, 11, 12, 13, 14]. 이외에도 김치로부터 분리 동정된 미생물은 200여 종 이상으로 매우 다양하다. 따라서 김치 발효 과정에 따른 미생물군의 군집 분포는 김치의 품질 결정에 매우 중요

한 요소라 할 수 있다[15]. 이러한 미생물군의 종, 크기, 다양성, 우점률 등은 다양한 물리, 화학적 환경요인에 기인하게 되는데, 물리적 요인으로는 온도, 산소, 산화환원 전위, 압력 등이 있으며, 화학적 요인으로는 원료의 종류와 배합비율, 소금의 농도, 유기산의 농도 등이 있다. 이 중 가장 중요한 환경요인으로는 온도, 원부재료의 종류 및 배합비율, 소금의 농도, 숙성 기간, 저장조건 등이 영향을 준다[10, 11, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25]. 김치의 발효 초기에는 *Leuconostoc*속, *Weissella*속 등과 같은 저온에서 생육이 활발한 hetero type (이상발효) 유산균이 주를 이루는데, 이는 젖산, 초산과 같은 유기산과 에탄올, 텍스트란, 이산화탄소 등을 생산하여 김치에 적당한 신맛과 특 쏘는 청량감을 부여함으로써 관능적 특성을 우수하게 한다고 알려져 있다. 김치의 적숙기 이후 homo type (정상발효)의 *Lactobacillus*속의 분포가 증진되는데, 이는 다량의 유기산을 생산하여 김치가 점차 시어지게 되고, 발효 말기에는 김치의 표면에 산막효모가 분포되어 김치가 물러지는 연부현상과, 품질저하를 일으키게 된다[10, 12, 26, 27, 28, 29, 30]. 김치의 발효 및 숙성은 저장 온도에 가장 큰 영향을 받는데, 이는 원부재료에 존재하는 유산균이 온도에 따라 다른 생육 특성을 지니기 때문이다. 일반적으로 김치를 저온(2~6℃)에서 발효시켜 hetero type의 균주가 우점 하도록 함으로써 적절한 익힘 단계에서 맛이 좋은 상태를 유지하고자 한다. 하지만 흔히 유산균으로 알려진 연구는 치즈나 발효유와 같은 발효 유제품에서 기인한 것으로, 약 30℃에서 최적 성장 온도를 갖는 중온성 미생물로 연구가 이루어지고 있다[31]. 그러나 유산균에는 5~15℃와 같은 저온에서도 생육이 이루어지는 균주도 있으며 이는 중온성 유산균과 생리적 특성에 차이가 있을 수 있다. 이에 따라 최근 저온 생육능 유산균에 대한 연구가 보고되고 있다[32, 33, 34, 35, 36, 37, 38]. 앞서 말한 바와 같이 김치의 발효는 주로 저온에서 이루어지고 있어 김치 내 저온성 유산균의 분포는 김치의 관능적 특성을 비롯한 발효 특성에 중요한 영향을 미칠 것으로 예상되나, 현재까지 김치로부터 특정 저온성 균주를 분리하여 특성을 분석한 연구는 미흡하다.

특히 저온성 균주 가운데 *Leuconostoc gelidum*의 경우 김치의 저온 발효 시 우점하는 유산균에 대한 비배양학적 분석을 통한 분포 정도는 보고되었으나[10, 14, 20, 29, 39, 40, 41], 진공 포장된 육류 혹은 냉장보관 육류, 소세지 등에서 분리된 균주에 대한 분석이 주를 이룬다[32, 38, 42, 43, 44]. 특히, *Leuconostoc gelidum*과 *Leuconostoc gasicomitatum*은 Rhakila et al. (2014)의 보고에 의해 *Leuconostoc gelidum* subsp. *gelidum*, *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*,

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 3종으로 재분류 되었다[37]. 해당 연구에서 분리하여 연구를 진행한 균주는 육류 가공품의 부패 균주이며, 채소류에서 분리한 저온성 균주로는 *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*이 ready to eat 샐러드 오염을 일으키는 것으로 보고된 바 있다[33, 35, 36, 45].

본 연구에서는 저온 발효 김치로부터 저온 생육 유산균들을 분리하여 그 특성을 규명하고자 하였다. 이를 위하여 수집한 저온 발효 김치로부터 저온 생육 유산균을 분리하여 동정한 뒤, 생화학적 특성, 배양학적 특성을 비롯한 생육 특성과 더불어 안전성 평가와 안정성 평가를 진행하였으며, 이어서 기능성 여부 관찰을 진행하였다. 이러한 분석을 통해 김치로부터 분리한 저온성 균주의 특성에 대한 자료를 제공하고, 산업적으로 이용 가능한 가치평가에 중요한 자료 제공이 가능할 것으로 기대하는 바이다.

제 2장 실험 재료 및 방법

제 1절 시판 저온발효 김치의 수집 및 분석

1. 김치시료의 준비

본 연구에 사용된 김치는 가정집 혹은 온라인 판매처를 통해 0~4℃, 3개월 이내로 저장한 저온 발효 김치 7종을 수집 또는 구입하였다. 서울·경기도 지역에서 김치 2종, 충청도 지역에서 김치 1종, 광주·전라도 지역에서 김치 3종, 경상도 지역에서 김치 1종을 수집하였다(Figure 1, Table 1). 수집한 김치 7종의 내용물 전체를 마쇄 (hand blender; HHM-600, Hanil, Seoul, Korea)한 뒤 멸균 거즈로 여과하여 김치 여액을 제조 후 실험을 진행하였다. 이 때, 김치 여액 제조 중 교차오염을 방지하기 위해 모든 용기 및 기구는 멸균수와 70% (v/v) 에탄올로 처리하여 사용하였다.

2. 김치의 이화학적 특성 분석

가. pH 및 산도 측정

김치 여액의 pH와 산도는 pH meter (510 pH meter, Fisher Science Education, Harnover Park, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 산도는 A.O.A.C. (Association of official analytical chemists) 방법에 의해 김치 여액 10 mL를 pH 8.1이 될 때 까지 0.1 N NaOH 용액으로 적정 하는 데 필요한 소비량으로 정의하였으며, 아래 식을 이용해 젖산 함량으로 환산하여 총 산 함량(% , w/w)을 표시하였다[46].

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

a: 0.1 N NaOH 용액의 소비량 (mL)

f: 0.1 N NaOH 용액의 factor (1.000)

F: 0.1 N NaOH 용액의 1 mL 상당 유기산 계수 (젖산의 경우: 0.009)

나. 염도 및 당도 측정

김치의 염도 측정은 염도계(ES421, ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 김치 여액을 측정하였다. 김치의 당도 측정은 당도계(Digital probe refractometer WM-7, ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 염도와 당도는 3회 이상 반복 측정된 값을 기록하였다.



Figure 1. Kimchi sampling locations

Table 1. The sample names of kimchi collected from 7 regions

Region		Sample name
Seoul · Gyeonggi	Seoul	HM kimchi
	Incheon	GH kimchi
Gwangju · Jeolla	Gwangju	JW kimchi
	Gwangyang	SG kimchi
	Sunchang	EK kimchi
Chungcheong	Seocheon	TK kimchi
Gyeongsang	Uiryong	UR kimchi

3. 비배양학적 방법을 통한 균총 분석

가. Genomic DNA 추출 및 PCR을 통한 증폭

김치 여액 7종 중 김치 여액 4종을 원심분리($9,950 \times g$, 5 min)하여 얻은 균체에 DNeasy blood & tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 genomic DNA를 추출하고, 추출한 genomic DNA를 PCR template로 삼아 유전자 증폭기(CP2-03, CORBETT RESEARCH, Sydney, Australia)를 이용해 증폭하였다. 3DDW, 10 pmol primer (27F, 1492R), 25 ng DNA, 10 X PCR buffer, 2.5 mM dNTP mixture, 25 mM $MgCl_2$, 0.5 U *Taq* polymerase (Takara *Taq*TM DNA Polymerase, Takara, Kusatsu, Japan)를 혼합하여 최종 부피가 25 μ L가 되게 하였다. 이 때, primer는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 사용하였다. 1차 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 extension 하는 과정을 30회 반복한 다음, 마지막으로 72°C에서 10분 처리하였다[47]. Nested-PCR은 1차 PCR로 증폭된 genomic DNA를 PCR template로 사용하였다. 3DDW, 10 pmol primer (*Lac* 1, GC-*Lac* 2), 50 ng DNA, 10 X PCR buffer, 2.5 mM dNTP mixture, 25 mM $MgCl_2$, 0.5 U *Taq* polymerase (Takara)를 혼합하여 50 μ L가 되게 하였다. Nested-PCR에 사용한 primer는 16S rRNA 서열 중 가장 변이가 잘 일어나는 V3 region을 증폭하기 위해 reverse primer로 GC-clamp가 포함된 GC-*Lac* 2 (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGGGATTTCACCGCTACACATG-3')를 사용하였고, Forward primer는 *Lac* 1 (5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3')을 코스모진텍(Cosmogenetech, Seoul, Korea)에서 주문 제작하여 사용하였다[48]. 반응 조건은 94°C에서 2분 동안 initial denaturation 단계를 수행한 후 94°C에서 30초 동안 denaturation, 61°C에서 1분 동안 annealing, 68°C에서 1분 동안 extension하는 단계를 40회 반복하고, 마지막으로 68°C에서 10분 동안 처리하였다.

나. DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)를 통한 김치의 미생물상 분석

Nested-PCR을 통해 얻은 증폭된 DNA는 The DCode Universal Mutation Detection System (Bio-rad, Hercules, California, USA)을 사용하여 DGGE를 실시하였다. Denaturing gradient gel은 8% polyacrylamide gel을 사용하였다. 먼저 acrylamide (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)와 N,N'-methylenebisacryl-amide, 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 (1 M acetic acid, Daejung, Daejeon, Korea; 50 mM ethylenediaminetetra acetic acid, pH 8.0, Sigma; 2 M tris base, Sigma), 3DDW를 사용하여 제조하였고, 100% denaturing solution은 40% acrylamide/bis, formamide (Sigma), urea (Sigma), 50 X TAE buffer를 사용하여 제조하였다. 0%와 100% denaturing solution을 이용하여 30%, 60% denaturing gradient gel을 제조한 다음 10% ammonium persulfate (Sigma)와 N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (Sigma)를 각각의 denaturing gradient gel에 넣고 농도 구배가 30%에서 60%로 연속되도록 DGGE gel판을 제조하였다. PCR 증폭 산물을 gel판의 well에 loading 한 후, 1 X TAE buffer에서 60°C, 50 V, 20시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 뒤 gel을 10 mg/L ethidium bromide (EtBr; Sigma)를 사용하여 염색 후, 1 X TAE buffer에서 탈색하여 UV transilluminator로 관찰하였다.

제 2절 저온 생육능 균주의 분리 및 동정

1. 저온 생육능 균주의 분리

단계희석법(serial dilution; 10^n)을 사용하여 김치 여액과 멸균수를 적정 배율 희석한 뒤, de Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Difco, Detroit, MI, USA)와 2.0% CaCO_3 (Amersco, Cochran, GA, USA)를 첨가한 MRS, 0.002% bromophenol blue (BPB)를 첨가한 MRS에 1.5% (*w/v*) agar (Micro agar, Duchefa Biochemie, Haarlem, Netherlands)를 이용하여 평판배지를 제조 후 도말하였다. 배지는 25°C와 30°C에서 각각 5일 배양한 다음 균체의 모양, 크기, 광택의 유무, 색, 환 생성능 등 형태학적 기준으로 grouping을 진행하였다. 분리한 group별로 ID-ASE (Bio Merieux, Marcy-l'Étoile, France)를 이용하여 catalase test를 하였다. 또한, 세균의 일차적 분리를 위해 Gram stain kit (BD, San Jose, California, USA)를 사용하여 gram staining을 진행한 뒤, 현미경(Eclipse 55i, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다. MRS, MRS+2% CaCO_3 , BPB-MRS 평판배지에 멸균 이쭉시개를 이용하여 grouping한 균체를 접종해 25°C와 30°C에서 각각 배양한 뒤 25°C에서 생육이 더 잘 보이는 균주를 저온 생육능 균주로 분리하였다. 분리한 균주는 MRS (Difco) 액체배지에 접종하여 25°C에서 24시간 배양하였고, 배양액을 glycerol 25% (*v/v*)가 되도록 첨가하여 stock 형태로 -70°C deep freezer (Sanyo, Osaka, Japan)에 보관하였다.

2. 분리 균주의 동정

가. 16S rRNA gene sequence 분석

김치로부터 분리된 저온 생육능 균주 8종의 동정을 위해 DNeasy blood & Tissue kit (Qiagen)을 이용하여 genomic DNA를 추출하고 16S rRNA gene을 분석하였다. 염기서열의 상동성 검사는 Genbank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)에 등록된 표준 균주의 16S rRNA gene 정보를 비교 대상으로 진행하였으며, CLUSTAL W (<https://www.genome.jp/tools-bin/clusterw>) 알고리즘에 맞춰 정렬한 뒤 표준 균주와의 상동성을 확인하였다.

나. 생화학적 특성 분석

저온 생육능 균주 8종의 당 대사능 분석은 생화학 동정 kit (API 50 CHL, Biomerieux)를 이용하여 진행하였다. 균주 8종을 5 mL MRS (Difco) 액체배지에 1% (v/v) 접종 후 계대 배양하였고, 배양액을 원심분리($9,950 \times g$, 5 min, 4°C)하여 상정액을 제거한 뒤 회수한 균체를 멸균수 500 μ L에 풀어 균주 현탁액을 준비하였다. 현탁액을 suspension medium 5 mL (Biomerieux)에 풀어 Mcfarland standard 2와 동일한 탁도로 맞추었다. 탁도 조정에 사용된 균주 현탁액의 2배에 해당하는 양의 현탁액을 API 50 CHL medium에 넣은 뒤 이를 각 스트립의 튜브에 분주 후, 미네랄 오일을 사용하여 혐기적 조건을 형성하였다. 25°C에서 24시간, 48시간 배양하여 당 대사능을 확인하였다. 이후 관찰 결과를 동정 프로그램 (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 입력하여 분리 균주 간의 당 대사능 차이와 동정 결과를 확인하였다.

다. Heme에 따른 호기적 환경에서의 생육 특성 분석

호기적 환경에서 heme 첨가에 따른 MRS (Difco) 액체배지에서의 생육을 분석하였다. 실험에 이용된 heme (Sigma, St.Louis, MO, USA)은 0.05 M NaOH에 0.5 mg/mL 농도로 준비하였으며, 이를 250 mL flask에 제조한 50 mL MRS 액체배지에 최종적으로 2 μ g/mL의 농도가 되도록 첨가하였다[49]. 분리 균주 8종은 5 mL MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종 후 50 mL MRS 액체배지에 계대하여 사용하였다. 균주 배양액은 heme를 첨가한 배지와 heme를 첨가하지 않고 동량의 0.05 M NaOH만 첨가한 배지, 아무것도 첨가하지 않은 MRS 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 25°C, 250 rpm (HK-S125C, Hankook, Hwaseong, Korea)으로 호기적 환경에서 24시간, 48시간 배양하였다. 흡광도 측정기기(A_{600} ; Ultrospec 2100 pro, Biochrom, Cambridge, UK)를 이용하여 배양액의 흡광도를 3회 반복 측정 후 기록하였다.

라. 6.5% NaCl을 첨가한 배지에서의 생육 특성 분석

6.5% (*w/v*)의 NaCl을 첨가한 MRS (Difco) 액체배지에서의 생육을 보기 위해 분리 균주 8종을 5 mL MRS 액체배지에 1% (*v/v*) 접종 후 계대한 배양액을 염 농도 조정배지에 접종하여 25°C, 4주(672시간)까지 정지 배양하였다[37]. 흡광도 측정 기기(A_{600} ; Ultrospec 2100 pro, Amersham biosciences, Little chalfont, England)를 이용하여 배양액의 흡광도를 3회 반복 측정 후 기록하였다.

마. Plasmid profile 분석

분리 균주의 plasmid를 분석하기 위해 Qiaprep spin miniprep kit (Qiagen Co., Germany)를 사용하였다. 5 mL MRS (Difco) 액체배지에 1% (*v/v*) 접종 후 계대하여 20시간 배양하였고, 배양액을 원심분리 ($9,950 \times g$, 5 min)하여 상정액을 제거한 뒤 균체를 회수하여 37°C에서 1시간 진탕 배양한 뒤, kit를 이용하여 plasmid DNA를 추출하였다. 추출한 plasmid는 0.8% (*w/v*) LE Agarose gel에 loading한 뒤 45 V로 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 gel을 EtBr (Sigma)에서 염색 후, 탈색하여 균주 별 plasmid 구성을 관찰하였다.

제 3절 분리 유산균의 배양학적 특성 규명

1. 사용균주 및 배지

저온 생육능 균주 8종(*Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* 2종, *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종)에 대해 배양학적 특성을 조사하였다(Table 2). 25% glycerol stock 형태로 보관한 균주를 5 mL MRS (Difco) 액체배지에 1% (v/v) 접종 후 25°C, 24시간 정치배양 하였고, 이를 계대하여 사용하였다.

2. 배양 온도에 따른 생육도

배양 온도에 따른 생육도는 MRS (Difco) 액체배지에 분리 균주를 1% (v/v) 접종하여 -2, 0, 5, 10, 15, 25, 30, 37°C에 대해 생육을 확인하였다. 실험 구간은 -2°C는 4주 간격 12주까지, 0°C는 2일 간격 4주(28일)까지, 5°C는 1일 간격 12일까지, 10°C, 15°C는 8시간 간격 5일(120시간)까지, 25°C, 30°C는 4시간 간격 3일(72시간)까지, 37°C는 1일 간격 4일(96시간)까지 관찰하였다. 배양액의 흡광도(A_{600} ; Ultrospec 2100 pro, Amersham biosciences, Little chalfont, England)를 측정하여 균주의 생육 곡선을 확인하였다.

3. 배지의 초기 pH에 따른 생육도

배지의 초기 pH에 따른 균주의 생육을 확인하기 위하여 MRS (Difco) 액체배지를 5 N HCl과 5 N NaOH로 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0이 되도록 조정하였다. pH를 조정 한 MRS 액체배지에 분리 균주를 1% (v/v) 접종하여 25°C, 24시간 정치배양 하였다. 배양액의 흡광도(A_{600} ; Ultrospec 2100 pro, Amersham biosciences, Little chalfont, England)를 측정하여 균주의 생육 그래프를 확인하였다.

4. 배지의 초기 NaCl 농도에 따른 생육도

배지의 초기 pH에 따른 균주의 생육을 확인하기 위하여 MRS (Difco) 액체배지에 NaCl을 첨가하여 1.0, 3.0, 5.0, 6.5, 7.0, 9.0% (*w/v*)가 되도록 조정하였다. 염 농도를 조정한 MRS 액체배지에 분리 균주를 1% (*v/v*) 접종하여 25°C, 24시간 정치배양 하였다. 배양액의 흡광도(A_{600} ; Ultrospec 2100 pro, Amersham biosciences, Little chalfont, England)를 측정하여 균주의 생육 그래프를 확인하였다.

Table 2. List of lactic acid bacteria used in this study

Species	Strain
<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i>	UR2
	EK3
<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i>	TK1
	TK7
	SG4
	JW2
	GH3
	HM3

제 4절 분리 유산균의 안전성 평가

1. 용혈성 검사

분리 균주 8종의 용혈성을 관찰하기 위해 blood agar base (Oxoid, Hampshire, England)를 멸균한 뒤 7% (v/v) horse blood (Oxoid)를 첨가하여 평판배지를 제조하였다. 분리 균주 배양액을 제조한 평판배지에 10 μ L 희석 도말 한 뒤 25 $^{\circ}$ C, 48시간 배양하여 균체의 색 변화 여부로 α -hemolysis를 판정하고, β -hemolysis는 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 추가배양하여 균체 주위에 투명한 생성 여부로 판정하였다[50, 51, 52]. 용혈을 일으키는 양성반응 대조구로는 *Bacillus cereus* ATCC 14579를 사용하였다[52, 53].

2. 효소 활성

분리 균주 8종의 효소 활성을 확인하기 위해 총 19종의 각종 효소의 기질 이용성을 기초로 제작된 API ZYM kit (BioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)를 사용하였다. 분리 균주 계대 배양액을 원심분리(9,500 \times g, 3 min, 4 $^{\circ}$ C)하여 상정액을 제거한 뒤 회수한 균체를 3DDW 500 μ L에 풀어 현탁액을 준비하였다. 현탁액을 suspension medium 2 mL (BioMerieux)에 풀어 Mcfarland standard 5와 동일한 탁도로 맞추었다. 이를 각 스트립의 튜브에 65 μ L씩 분주한 뒤 암실 배양(25 $^{\circ}$ C, 4시간)하였다. 표면의 활성 증가와 용해를 돕기 위해 ZYM A와 ZYM B를 한 방울씩 떨어뜨린 다음 실온에서 5분간 반응시킨 뒤 색 변화를 관찰하여 각각의 기질 효소에 대한 활성 여부를 판독하였다. 색 변화는 0~5의 값으로 표기하였으며, 3 이상일 경우 양성으로 판정하였다(0 = 0 nM, 1 = 5 nM, 2 = 10 nM, 3 = 20 nM, 4 = 30 nM, 5 = 40 nM)[52].

3. 항생제 내성

분리 균주 8종의 항생제 내성을 확인하기 위해 액체배지 희석법(Broth microdilution method)을 사용하였다. 사용한 항생제는 ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, vancomycin (Sigma) 총 8종으로 각각 규정된 용매에 녹여 고농도 stock을 제조한 뒤 실험 농도에 맞게 0.5% (*w/v*) dextrose를 첨가한 Mueller-Hinton (MH; Difco) 액체배지에 희석하여 사용하였다. 균주는 MRS (Difco) 액체배지 배양액을 원심분리(9,500 × *g*, 3 min, 4°C) 후 상청액을 제거한 뒤 균체를 0.5% dextrose를 첨가한 MH 액체배지에 현탁하였다. 균주 현탁액을 준비한 항생제 희석액과 1:1로 혼합하였을 때 초기 균수가 1.0×10^7 CFU/mL가 되도록 접종한 후 25°C, 24시간 배양하였다[52]. 배양 후 생육 정도를 흡광도 측정기기(Amersham biosciences)를 사용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항생제 내성 여부 판정 기준은 European Food Safety Authority (EFSA; 2012) 규정을 참고하여 각각의 항생제 첨가 배지에서 균주가 증식하지 못하는 최소 생육 저해농도 (MIC; Minimum Inhibitory Concentration)를 판정하였다[54].

4. Biogenic amine 생성능

저온 생육능 균주 8종을 대상으로 pH 지시약을 포함하는 배지를 사용하여 아미노산으로부터 Biogenic amine (BA) 생성을 조사하였다. 실험에 사용된 decarboxylase 배지는 Bover-Cid와 Holzapfel (1999)에 의해 고안된 방식(2% agar, 1.0% amino acid, 0.2% ammonium citrate, 0.006% bromocresol purple, 0.01% CaCO₃, 0.004% FeSO₄, 0.05% glucose, 0.2% K₂PO₄, 0.5% meat extract, 0.02% MgSO₄, 0.005% MnSO₄, 0.005% pyridoxal-5-phosphate, 0.25% sodium chloride, 0.5% tryptone, 0.1% tween 80, 0.001% thiamine, 0.5% yeast extract, pH 5.3)으로 제조되었다[55]. 균주는 전구체 아미노산인 ornithine, histidine, tyrosine이 0.1% (*w/v*) 함유된 액체배지 9 mL에 배양액 1 mL를 첨가하여 활성화하였다. 활성화 배양액을 전구체 아미노산이 1% (*w/v*) 함유된 decarboxylase 배지에 10 µL 분주하여 균체 주변의 색 변화를 확인하였다. BA를 생성하는 양성 대조구로 ornithine과 histidine은 *Lactobacillus* sp. ATCC 33222를 사용하였고, tyrosine은 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212를 사용하였다[56, 57].

제 5절 분리 유산균의 안정성 평가

1. 내산성

분리 균주 8종의 산과 알칼리 조건에서 내성을 측정하기 위하여, MRS (Difco) 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 배양한 배양액을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)한 뒤 상징액을 제거하고 균체를 회수하였다. 균체를 pH 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0으로 조정한 MRS 배지에 현탁하여 25°C에서 24, 48, 72시간 처리하였고 pH를 조정하지 않은 MRS를 대조구(con.; control)로 비교하였다. 각 시간마다 MRS 평판배지에 도말 하여 생균수를 측정하였다.

2. 내열성

분리 균주 8종의 온도에 따른 내성을 측정하기 위하여, MRS (Difco) 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 배양한 배양액을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)한 뒤 상징액을 제거하고 균체를 회수하였다. 균체를 MRS 배지에 현탁하여 -2, 0, 4, 10, 20, 30, 50, 70°C에서 24, 48, 72시간 처리하였고, 100, 121°C는 각각 15, 30분 처리하였다. 이 때, 균주의 최적 생육온도인 25°C를 대조구(con.)로 비교하였다. 각 시간마다 MRS 평판 배지에 도말 하여 생균수를 측정하였다.

3. 내염성

분리 균주 8종의 염 농도에 따른 내성을 측정하기 위하여, MRS (Difco) 액체배지에 1% (v/v) 접종하여 배양한 배양액을 원심분리(9,950 × g, 15 min, 4°C)한 뒤 상징액을 제거하고 균체를 회수하였다. 균체를 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15%의 염 농도로 조정한 MRS 배지에 현탁하여 25°C에서 24, 48, 72시간 처리하였고, 염 농도를 조정하지 않은 MRS를 대조구(con.)로 비교하였다. 각 시간마다 MRS 평판배지에 도말 하여 생균수를 측정하였다.

제 6절 분리 유산균의 기능성 평가

1. Exopolysaccharide 생성능

분리 균주 8종 가운데 exopolysaccharide (EPS) 생성 균주 여부를 확인하고자 하였다. MRS (Difco) 액체배지에 1% (v/v) 접종한 배양액을 sucrose배지(0.5% diammonium citrate, 0.5% dipotassium phosphate, 5% sucrose, 1% tryptone, 0.5% yeast extract, pH 7.0)에 3 μ L 씩 각각 분주하여 25 $^{\circ}$ C, 48시간 배양 후 균체 주변 점질물 생성 여부와 형태를 관찰하였다[58].

제 7절 통계학적 분석

1. 통계학적 분석

결과는 Statistical Package for the Social Science (SPSS)프로그램(Version 26.0 for Window, Chicago, IL, USA)을 사용하여 통계적으로 분석되었으며, 데이터는 평균(AV) \pm 표준편차(SD)로 표기하였다. 모든 실험은 반복 측정하여 수행되었고, 데이터 간의 평균 차이는 Duncan의 다중 범위 테스트를 사용하여 평가하였다 ($p < 0.05$).

제 3장 실험 결과 및 고찰

제 1절 시판 저온발효 김치의 수집 및 분석

1. 김치의 저장온도 및 기간 분석

전국 7개 지역의 가정집 또는 온라인 판매처에서 저온발효 김치 7개를 수집하여 저장온도와 저장 기간을 분석하였다. 대부분의 김치는 4℃ 이하에서 저장되었으며 0℃에서 저장한 김치 4종, 4℃ 저장한 김치 2종, 옹기에서 저장한 김치 1종으로 조사되었다. 발효 기간은 1주일 저장된 김치 1종, 1개월 저장된 김치 1종, 2~3개월 저장된 김치 5종으로 조사되었다(Table 3).

2. 김치의 이화학적 특성 분석

수집한 김치의 평균 pH는 pH 4.21±0.19로 나타났으며 가장 낮은 pH를 나타낸 김치는 SG 김치로 pH 3.90, 가장 높은 pH를 나타낸 김치는 JW 김치로 pH 4.53이었다(Table 4). 평균 산도는 0.89±0.20%로 나타났으며, 이 중 가장 낮은 산도를 나타낸 김치는 GH 김치로 산도 0.65%였으며, 가장 높은 산도를 나타낸 김치는 EK 김치로 산도 1.27%이었다(Table 4).

수집한 김치의 평균 염도는 1.88±0.30%로 나타났으며 이 중 가장 낮은 염도를 나타낸 김치는 EK 김치로 염도 1.56%이었고, 가장 높은 염도를 나타낸 김치는 SG 김치로 2.23%이었다(Table 4). 평균 당도는 10.73±1.26 brix°로 나타났으며 이 중 가장 낮은 당도를 나타낸 김치는 JW 김치로 9.80 brix°였으며, 가장 높은 당도를 나타낸 김치는 EK 김치로 13.50 brix°로 측정되었다(Table 4).

Table 3. Storage temperature and aging period of kimchi samples

Sample	Storage temperature	Aging period
UR kimchi	0℃	2 Months
EK kimchi	4℃	3 Months
TK kimchi	0℃	2~3 Months
SG kimchi	Onggi room temperature	1 Week
JW kimchi	4℃	2 Months
GH kimchi	0℃	3 Months
HM kimchi	0℃	1 Month

Table 4. Chemical properties of kimchi samples

Sample	pH	Acidity (%)	Salinity (%)	Sugar content (brix°)
UR kimchi	4.16	1.01	1.72	10.60
EK kimchi	4.28	1.27	1.56	13.50
TK kimchi	4.18	0.85	2.20	10.30
SG kimchi	3.90	0.89	2.23	10.20
JW kimchi	4.53	0.74	1.58	9.80
GH kimchi	4.27	0.65	1.70	10.70
HM kimchi	4.18	0.85	2.15	10.00

3. 비배양학적 방법을 통한 김치의 미생물상 분석

수집된 저온 발효 김치 7종 가운데 보관 중인 김치 여액 4종에 대해 DGGE를 실시하여 미생물을 분석하였다(Figure 2). Kim 등에 의하면 *Leuconostoc gelidum*은 8℃에서 발효된 김치에서 우점하는 *Leuconostoc*속이라고 보고되었으며[40], Park 등에 의하면 4℃에서 발효된 김치에서 *Leu. gelidum*등이 우점함을 보고하였다[59]. 분석을 진행한 김치 4종 모두 *Lactobacillus sakei* (band b), *Weissella koreensis* (band c), *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* (band g)과 *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* (band h) 위치에서 band를 확인할 수 있었으며, EK 김치에서는 *Leuconostoc mesenteroides* (band e) 위치에서 band를 관찰할 수 있었다. 이를 통해 시료로 선정한 저온에서 발효된 김치에서는 *Lb. sakei*, *W. koreensis*와 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 및 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*이 주로 우점하는 것을 추측할 수 있었다.

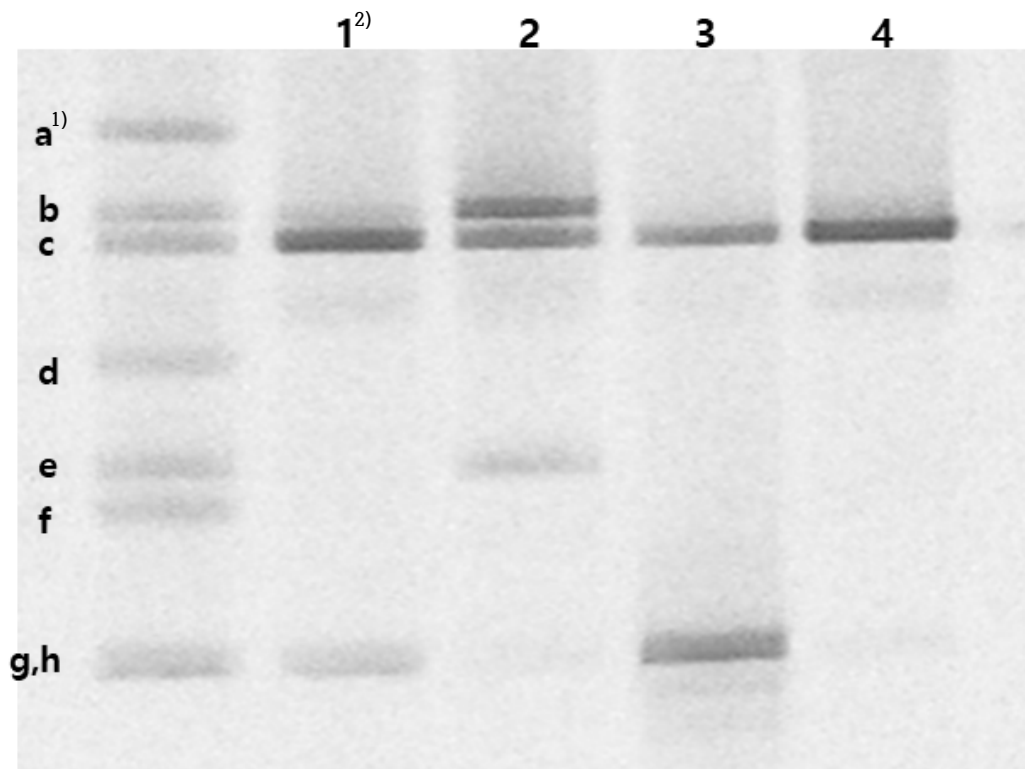


Figure 2. DGGE analysis of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments from four out of seven kimchi samples

- 1) a, *Lactobacillus plantarum* HD1; b, *Lactobacillus sakei* SC1; c, *Weissella koreensis* SK; d, *Weissella cibaria* 37; e, *Leuconostoc mesenteroides* TA; f, *Leuconostoc citreum* GR1; g, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* JW1; h, *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* CH3
- 2) 1, UR kimchi; 2, EK kimchi; 3, TK kimchi; 4, HM kimchi

제 2절 저온 생육능 균주의 분리 및 동정

1. 저온 생육능 균주의 분리

저온 생육능 균주의 분리를 위해 수집한 저온 발효 김치 7종의 김치 여액을 단계희석법(serial dilution; 10^n)에 의해 희석 후 MRS (Difco) 평판배지와 2% (*w/v*) CaCO_3 (Amersco)가 첨가된 MRS 평판배지, BPB가 첨가된 MRS 평판배지에 도달한 후 25°C, 30°C에 각각 배양하여 형성된 균체를 확인하였다. 각 배지에서 grouping을 진행한 뒤 MRS, MRS+2% CaCO_3 , BPB-MRS 평판배지에 멸균 이쑤시개를 이용하여 균체를 접종하였고, 이를 25°C와 30°C에 각각 배양하여 25°C에서 생육이 더 잘 관찰되는 균주 8종을 저온 생육능 균주로 분리하고 균주별 형태학적 특성을 관찰하여 명명하였다(Figure 3, Table 5). 관찰 결과 8종의 균체 모두 원형, ivory 색, 광택을 띄었고, catalase test 결과 모두 음성으로 확인되었다(Table 6). 그람 염색 후 광학현미경(Eclipse 55i, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였을 때 8종의 분리 균주는 모두 Gram 양성, 구균으로 관찰되었다(Figure 4).

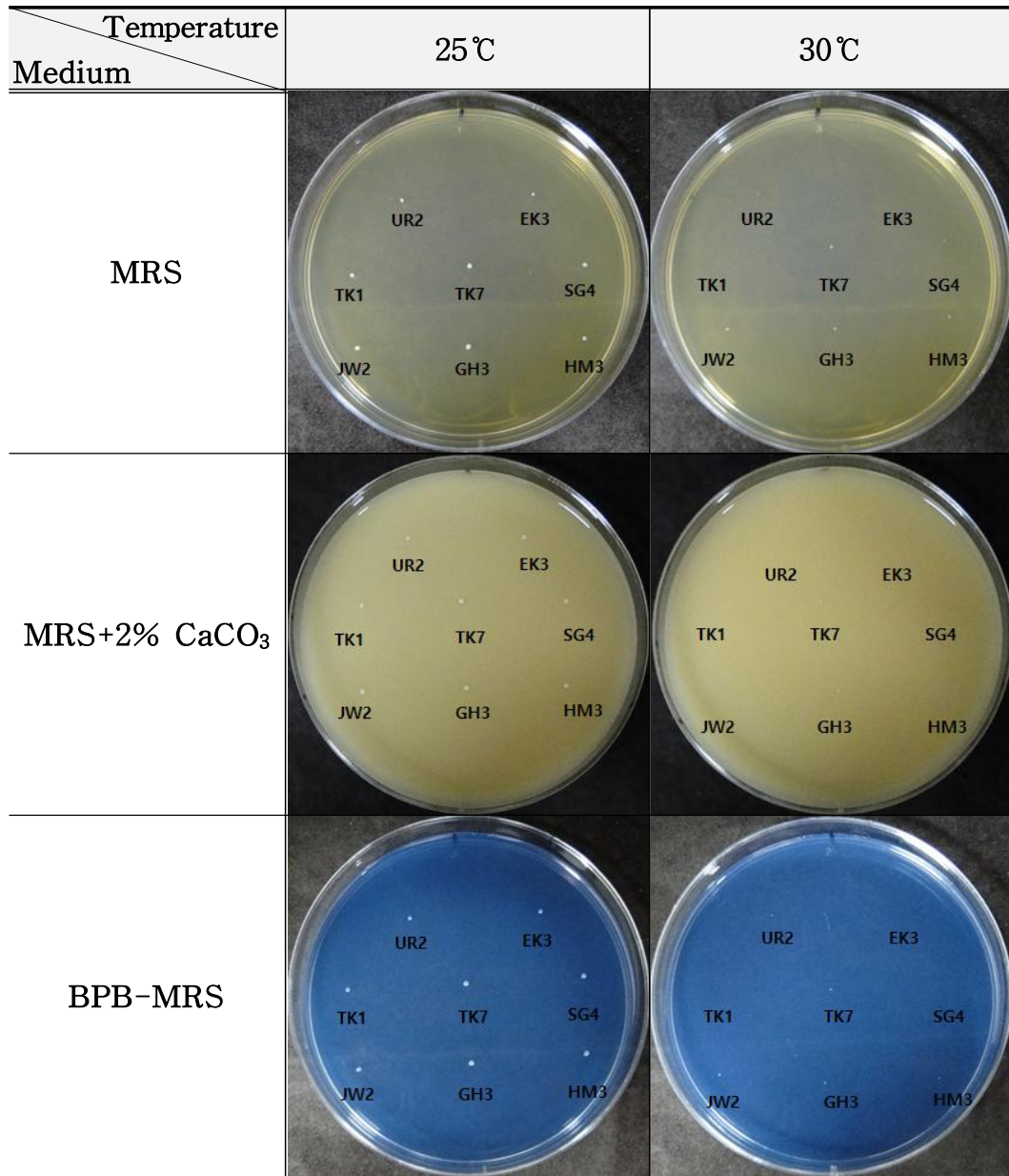


Figure 3. Colony growth from toothpick-inoculated spots

Table 5. LAB strains isolated from kimchi fermented at low temperature

Sample	Strain
UR kimchi	UR2
EK kimchi	EK3
TK kimchi	TK1
	TK7
SG kimchi	SG4
JW kimchi	JW2
GH kimchi	GH3
HM kimchi	HM3

Table 6. Morphological characteristics and catalase test results of the isolated strains

Strain	Color	Shape	Glossy	Stringy	Gram stain	Morphology	Catalase test
UR2	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-
EK3	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-
TK1	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-
TK7	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-
SG4	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-
JW2	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-
GH3	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-
HM3	Ivory	Circular	○	○	+	Coccus	-

○,+ : positive; ×,- : negative

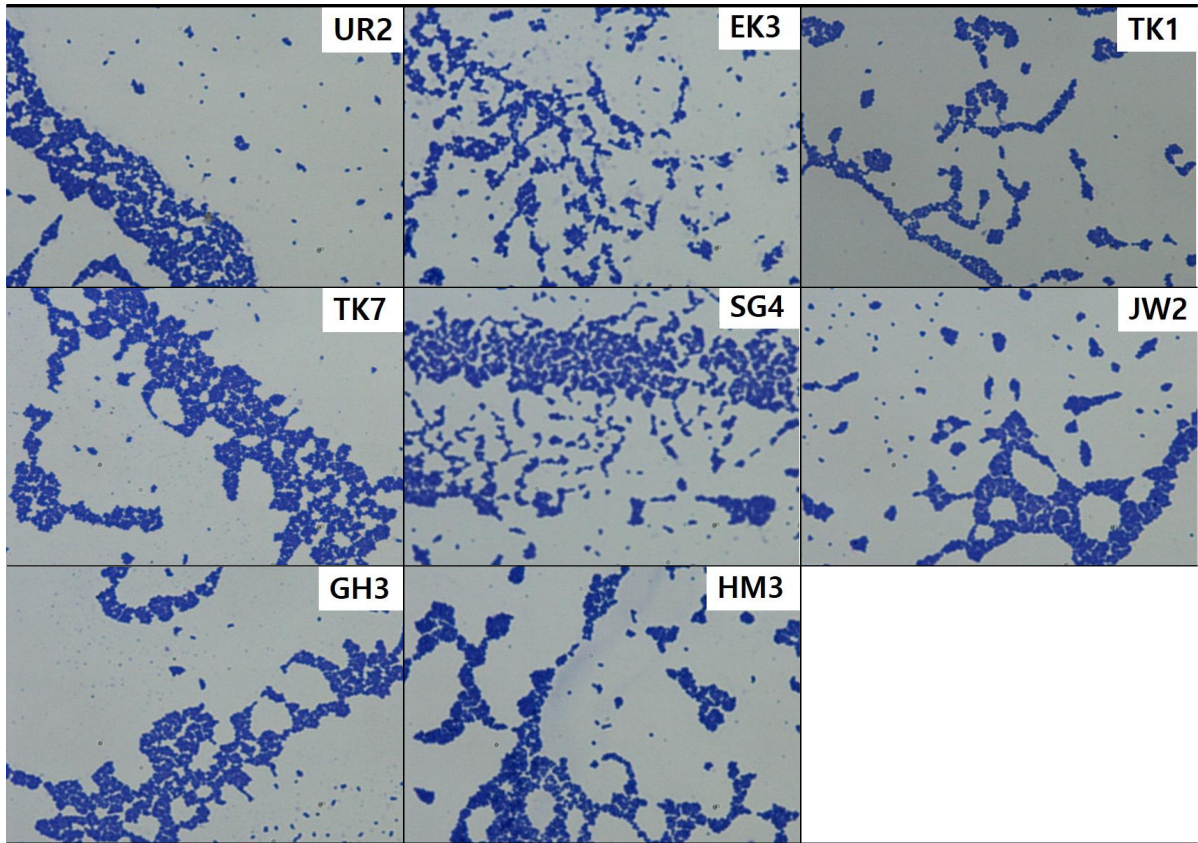


Figure 4. Gram staining and microscopic observation of the isolated strains

2. 분리 균주의 동정

가. 16S rRNA gene sequence 분석

8종의 분리 균주에 대해 16S rRNA gene sequence를 분석하여 Genbank에 등록된 표준 균주와 염기서열을 비교한 결과 UR2 (1,479 bp)와 EK3 (1,519 bp)는 *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* POU4d^T와 각각 100%, 99.93%의 상동성을 나타내어 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* UR2, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* EK3로 명명하였다. TK1 (1,504 bp), TK7 (1,489 bp), SG4 (1,513 bp), JW2 (1,512 bp), GH3 (1,509 bp), HM3 (1,350 bp)는 모두 *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* TB1-10^T와 100%의 상동성을 나타내어 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* TK1, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* TK7, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* SG4, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* JW2, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* GH3, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* HM3라 명명하였다(Table 7). *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*과 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*은 저온 생육능 균주로 알려져 있다[37].

나. 생화학적 특성 분석

생화학 동정 kit (BioMerieux)를 이용하여 분리된 8종 균주의 당 대사능을 관찰하였다(Table 8). *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* UR2, EK3는 동일한 19종에 대해 당 대사능이 양성을 보였고, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* TK1과 GH3는 동일한 20종에 대해 당 대사능 양성을 보였으며, TK7과 JW2는 동일한 18종의 당에 대해, SG4와 HM3는 21종의 동일한 당에 대해 대사능 양성을 보였다. 대사능 관찰 결과를 동정 프로그램 (<https://apiweb.biomerieux.com>)에 입력하여 동정한 결과 8종의 균주 모두 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*/ *dextranicum* 2에 99% 이상의 상동성을 보였다. 기존에 알려진 유제품 기원 유산균은 lactose를 대사하여 에너지원으로 사용되는 것으로 알려졌지만 김치에서 분리된 8종의 유산균 중 2종 SG4와 HM3를 제외한 6종은 lactose를 대사하지 않는 것으로 보아 식물질 기원 유산균은 lactose가 아닌 다른 탄수화물을 에너지원으로 대사함을 알 수 있었다.

다. Heme에 따른 호기적 환경에서의 생육 특성 분석

기존 연구에 따르면 호기적 환경에서 *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*은 heme에 의해 생육이 촉진되지 않으며, *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*은 heme에 의해 생육이 촉진된다고 보고되었다[37]. 이를 바탕으로 분리한 저온성 균주 8종에 대해 호기적 환경에서의 heme에 의한 생육능을 관찰한 결과 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*으로 동정된 UR2와 EK3는 heme에 의해 생육이 촉진되지 않았으며(Figure 5), *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*으로 동정된 TK1, TK7, SG4, JW2, GH3, HM3는 heme에 의해 생육이 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 6).

라. 6.5% NaCl을 첨가한 배지에서의 생육 특성 분석

기존 연구에 따르면 *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*은 6.5% NaCl이 첨가된 배지에서 생육을 보이며, *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*은 6.5% NaCl이 첨가된 배지에서 생육을 보이지 않는다고 보고되었다[37]. 이를 바탕으로 분리한 저온성 균주 8종에 대해 6.5% NaCl을 첨가한 MRS (Difco) 액체배지에서의 생육을 관찰한 결과, UR2 ($A_{600}=0.378$), EK3 ($A_{600}=0.333$), TK1 ($A_{600}=0.298$), TK7 ($A_{600}=0.389$), SG4 ($A_{600}=0.242$)는 완만한 생육 곡선을 보였으며, JW2 ($A_{600}=0.721$), GH3 ($A_{600}=0.734$), HM3 ($A_{600}=1.012$)는 48에서 72시간 이후 급격히 생육이 증진되는 생육 곡선을 확인할 수 있었다(Figure 7, Figure 8).

마. Plasmid profile 분석

유산균의 plasmid는 산업적으로 유효한 기능성 물질 생산에 이용되고 있으며, plasmid를 지닌 유산균은 유용 유전자 전달의 vector로 응용될 수 있다. 또한, 다양한 pattern을 지니고 있어, 유산균의 유래에 따라 같은 종의 유산균일지라도 plasmid profile에 있어 차이가 나고, plasmid의 개수가 다를 수 있다고 보고된 바 있어 김치 유산균을 분류하는 데 적용 가능하다는 의미에서 본 실험을 진행하였다[60, 61].

NCBI에서 기존에 분석이 완료된 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 균주 가운데 complete genome으로 분석된 총 4 균주(LMG18811^T, KG16-1, TMW2.1619, CBA3613)의 서열 정보를 참고하여 비교 분석하였다. 4 균주의 plasmid 정보를 본 결과, plasmid가 없거나, 3개를 보유하고 있으며, 그 크기는 작게는 19,636 bp에서 부터 36,706 bp인 것으로 확인할 수 있었다(Table 9).

분리한 저온 생육능 균주 중 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종의 plasmid를 Qiaprep spin miniprep kit (Qiagen Co., Germany)를 사용하여 추출하였다. 추출한 plasmid DNA를 0.8% LE agarose gel을 이용하여 45 V에서 전기영동을 진행한 결과, TK1은 약 17 kb의 위치에서 1개의 band가 확인되었으며, TK7, JW2, GH3, HM3는 약 22 kb와 약 9 kb의 위치에서 2개의 band가 확인되어 해당 균주 4종은 유사한 크기의 plasmid를 보유하고 있음을 확인할 수 있었으며, SG4는 약 17 kb, 약 5 kb 위치에서 2개의 band를 확인할 수 있었다(Figure 9).

Table 7. Identification of the isolated strains

No.	Strain	Length (bp)	NCBI blast results	Identity (%)
1	UR2	1,479	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d ^T	100.00
2	EK2	1,519	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d ^T	99.93
3	TK1	1,504	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00
4	TK7	1,489	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00
5	SG4	1,513	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00
6	JW2	1,512	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00
7	GH3	1,509	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00
8	HM3	1,350	<i>Leuconostoc gelidum</i> subsp. <i>gasicomitatum</i> strain TB 1-10 ^T	100.00

Table 8. Carbohydrate metabolism of the isolated strains

NO.	Carbohydrates	UR2	EK3	TK1	TK7	SG4	JW2	GH3	HM3
1	Glycerol	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-
2	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
4	L-Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+
5	D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+
6	D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
8	D-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
9	β -Methyl-D-xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
10	D-Galactose	-	-	-	-	-	-	-	-
11	D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
15	L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
18	D-Mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-
19	D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
20	α -Methyl-D-mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
21	α -Methyl-D-glucofuranoside	+	+	+	-	+	-	+	+
22	N-Acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+
23	Amygdalin	-	-	-	-	-	-	-	-
24	Arbutin	-	-	-	-	-	-	-	-
25	Esculine	+	+	+	+	+	+	+	+
26	Salicin	-	-	-	-	-	-	-	-
27	D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+
28	D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
29	D-Lactose	-	-	-	-	+	-	-	+
30	D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+
31	D-Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+
32	D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
33	Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-

1) + : positive reaction, - : negative reaction, W : weak reaction

Table 8. (continued)

NO.	Carbohydrates	UR2	EK3	TK1	TK7	SG4	JW2	GH3	HM3
34	D-Melezitose	- ¹⁾	-	-	-	-	-	-	-
35	D-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	+	+	+	-	+	-	+	W
48	2-Keto-gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+
49	5-Keto-gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+

1) + : positive reaction, - : negative reaction, W : weak reaction

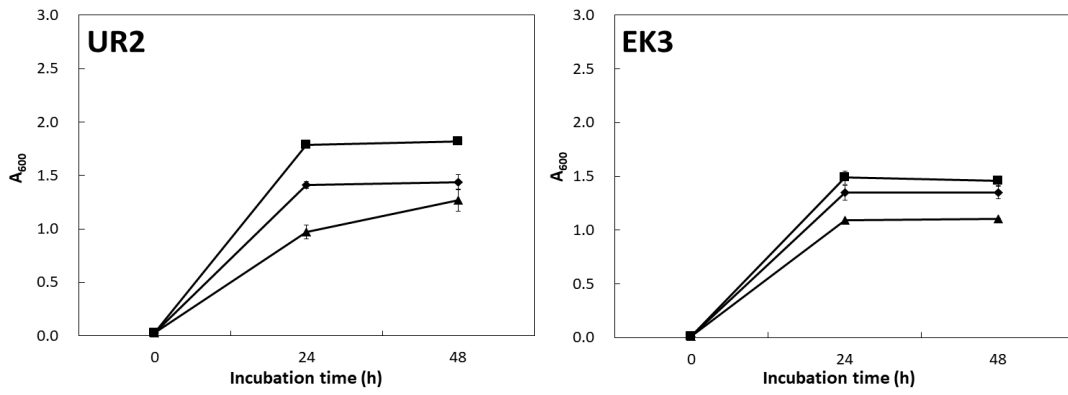


Figure 5. Effect of heme on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* aerobic growth

- , Growth of lactic acid bacteria in MRS
- ▲, Growth of lactic acid bacteria in MRS+NaOH
- ◆, Growth of lactic acid bacteria in MRS+heme

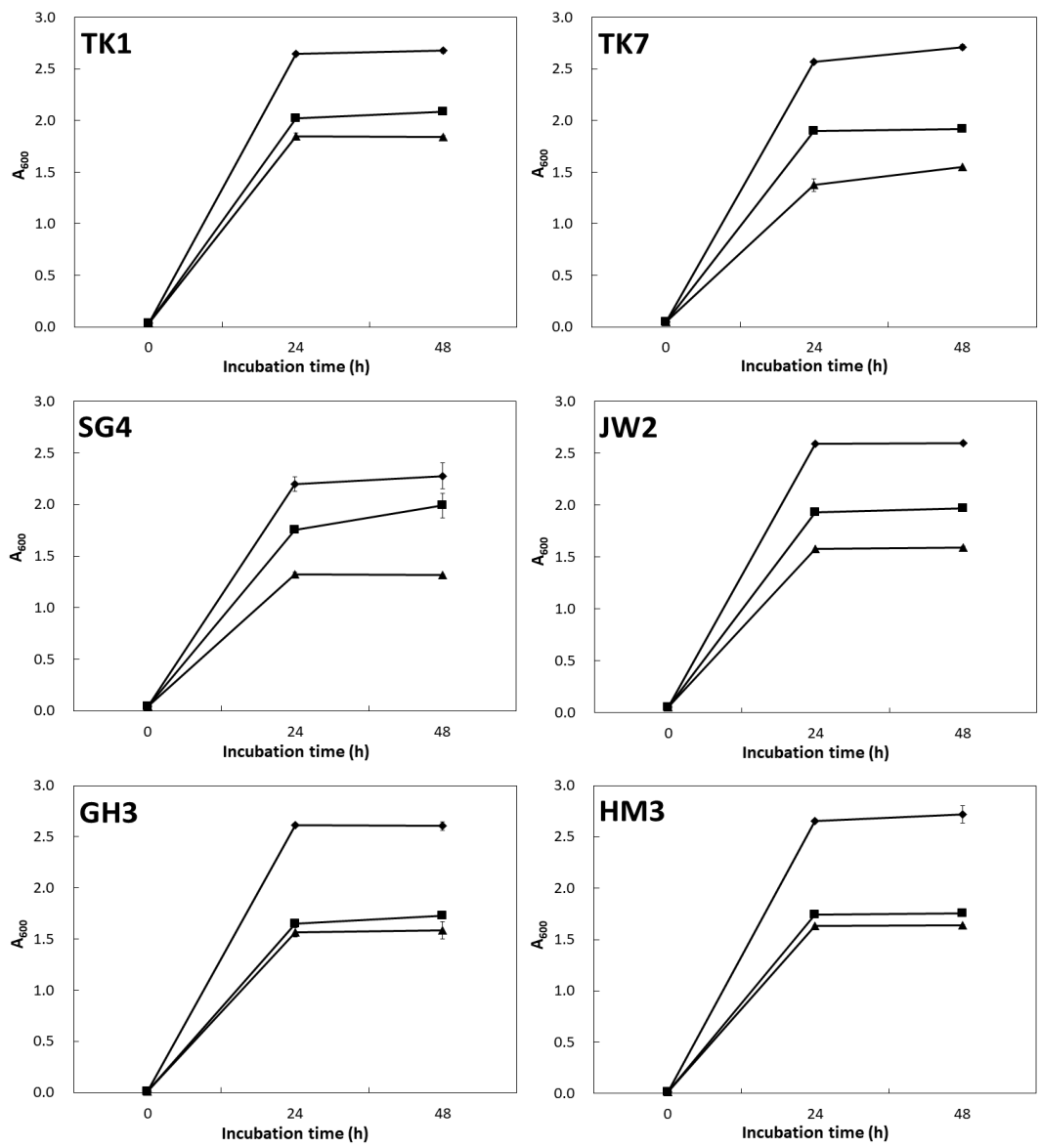


Figure 6. Effect of heme on *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* aerobic growth

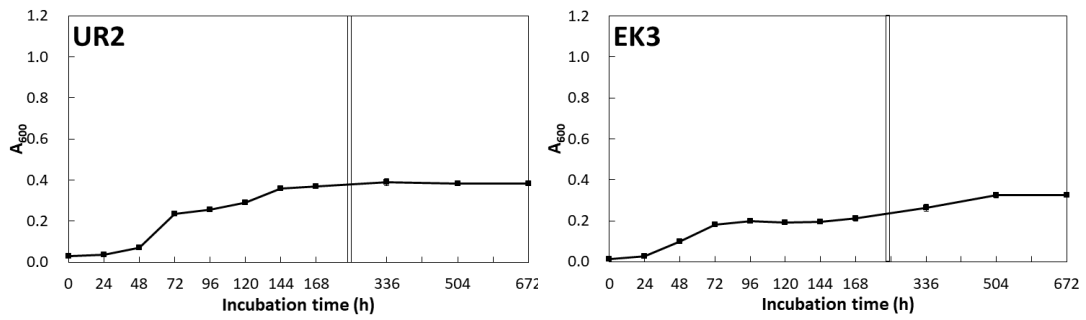


Figure 7. Effect of addition 6.5% NaCl on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* growth

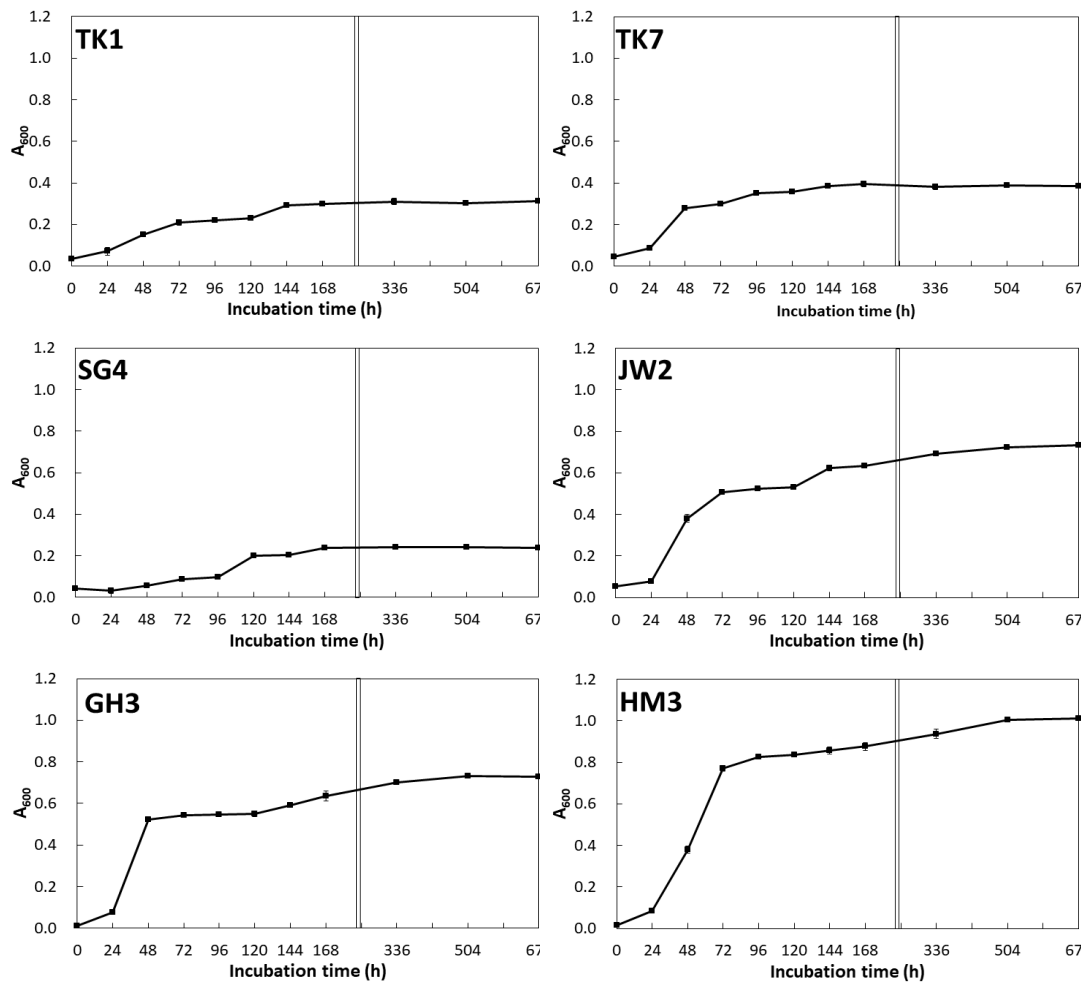


Figure 8. Effect of addition 6.5% NaCl on *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* growth

Table 9. Comparison of general genome features of *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*

Feature	LMG 18811 ^T		KG16-1				TMW 2.1619				CBA3613	
	chromo-some	plasmid	chromo-some	plasmid			chromo-some	plasmid			chromo-some	plasmid
Genome size (bp)	1,954,080	-	1,965,841	35,714	29,494	19,683	1,836,357	36,706	31,685	19,636	1,812,661	-
GC content (%)	36.7	-	36.9	37.2	31.9	38.7	36.9	35.8	35.9	36	36.9	-
Total genes (no.)	2,047	-	2,069	46	32	22	1,944	46	42	26	1,896	-
Protein coding sequences (no.)	1,947	-	1,965	46	32	22	1,845	44	42	24	1,792	-
rRNAs (no.)	12	-	12	-	-	-	12	-	-	-	12	-
tRNAs (no.)	67	-	67	-	-	-	58	-	-	-	67	-
Gen Bank Accession No.	FN 822744	-	LN 890331	LN 890332	LN 890333	LN 890334	CP 017197	CP 017198	CP 017199	CP 017200	CP 058617	-
Source	MAP tomato-marinated broiler meat		vacuum-packaged vegetable sausages				MAP meat				-	
Ref.	[62]		[42]				-				-	

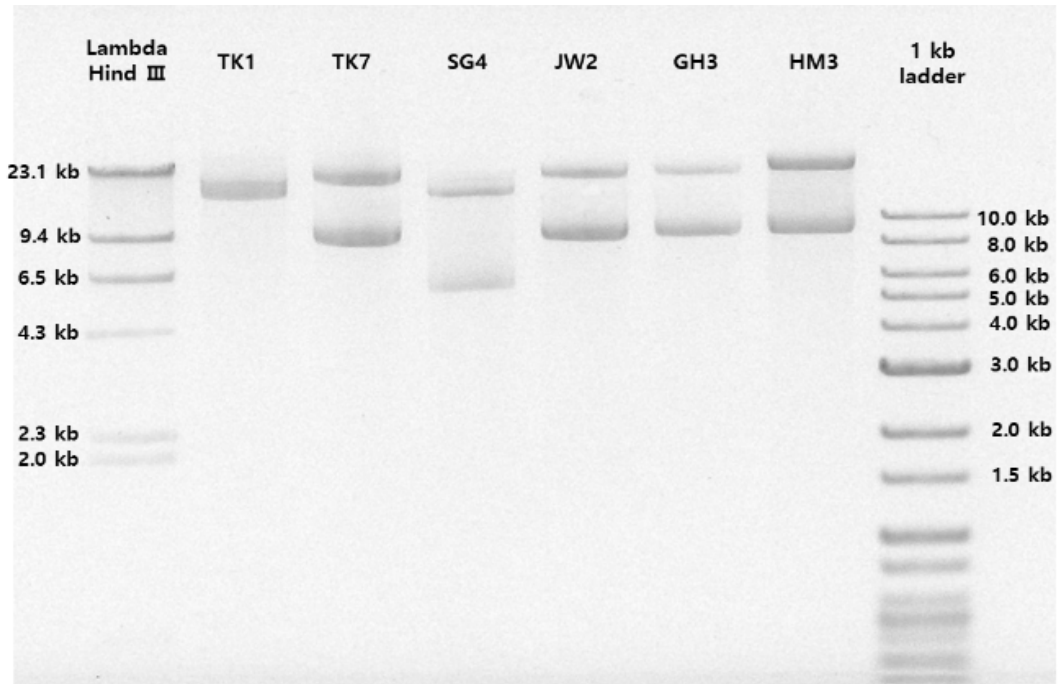


Figure 9. Plasmid profiles of the isolated *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* strains

제 3절 분리 유산균의 배양학적 특성 규명

1. 배양온도에 따른 생육도

분리된 유산균을 MRS 액체배지에 1% 접종하여 -2℃는 4주 간격 12주까지, 0℃는 2일 간격 4주까지, 5℃는 1일 간격 12일까지, 10℃, 15℃는 8시간 간격 5일(120시간)까지, 25℃, 30℃는 4시간 간격 3일(72시간)까지, 37℃는 1일 간격 4일(96시간)까지 관찰하였다. 이는 *Leu. gelidum*은 5℃에서는 자라나 37℃에서는 생육하지 못한다는 연구 결과를 바탕으로 하였다[37, 38, 43]. 대부분의 *Leuconostoc*속과 달리 *Leu. gelidum*은 저온 생육능을 갖는 것으로 알려져 있다[36].

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

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 2종의 배양온도에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 10). UR2는 -2℃에서 672시간 ($A_{600}=1.021$), 0℃에서 288시간 ($A_{600}=1.065$), 5℃에서 192시간 ($A_{600}=1.454$), 10℃에서 96시간 ($A_{600}=1.972$), 15℃에서 88시간 ($A_{600}=2.181$), 25℃에서 24시간 ($A_{600}=1.987$), 30℃에서 20시간 ($A_{600}=0.488$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.063$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰할 수 있었으며, EK3는 -2℃에서 672시간 ($A_{600}=0.968$), 0℃에서 528시간 ($A_{600}=0.952$), 5℃에서 192시간 ($A_{600}=1.340$), 10℃에서 88시간 ($A_{600}=1.831$), 15℃에서 64시간 ($A_{600}=2.037$), 25℃에서 20시간 ($A_{600}=2.103$), 30℃에서 24시간 ($A_{600}=0.650$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.087$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰할 수 있었다. 이에 따라 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 2종 모두 최적 생육 온도는 25℃인 것을 확인하였다.

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

Leuconostoc gelidum subsp. *gasicomitatum* 6종의 배양온도에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 11). TK1은 -2℃에서 672시간 ($A_{600}=0.845$), 0℃에서 288시간 ($A_{600}=1.006$), 5℃에서 264시간 ($A_{600}=1.685$), 10℃에서 88시간 ($A_{600}=1.991$), 15℃에서 56시간 ($A_{600}=2.220$), 25℃에서 24시간 ($A_{600}=2.011$), 30℃에서 24시간 ($A_{600}=0.657$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.064$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰할 수 있었고, TK7은 -2℃에서 672시간 ($A_{600}=0.995$), 0℃에서 480시간 ($A_{600}=0.861$), 5℃에서 240시간 ($A_{600}=1.668$), 10℃에서 96시간 ($A_{600}=1.931$), 15℃에서 80시간 ($A_{600}=2.123$), 25℃에서 24시간 ($A_{600}=2.283$), 30℃에서 24시간 ($A_{600}=1.083$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.133$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰하였으며, SG4는 -2℃에서 1344시간 ($A_{600}=0.852$), 0℃에서 288시간 ($A_{600}=0.686$), 5℃에서 192시간 ($A_{600}=1.032$), 10℃에서 88시간 ($A_{600}=1.635$), 15℃에서 104시간 ($A_{600}=2.049$), 25℃에서 24시간 ($A_{600}=2.027$), 30℃에서 16시간 ($A_{600}=0.380$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.093$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰할 수 있었다. 또한, JW2는 -2℃에서 1344시간 ($A_{600}=0.859$), 0℃에서 240시간 ($A_{600}=0.867$), 5℃에서 168시간 ($A_{600}=1.380$), 10℃에서 80시간 ($A_{600}=1.606$), 15℃에서 48시간 ($A_{600}=2.190$), 25℃에서 24시간 ($A_{600}=2.100$), 30℃에서 32시간 ($A_{600}=1.275$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.113$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰할 수 있었고, GH3는 -2℃에서 672시간 ($A_{600}=0.992$), 0℃에서 336시간 ($A_{600}=0.940$), 5℃에서 168시간 ($A_{600}=1.281$), 10℃에서 96시간 ($A_{600}=1.980$), 15℃에서 64시간 ($A_{600}=2.233$), 25℃에서 24시간 ($A_{600}=2.380$), 30℃에서 24시간 ($A_{600}=1.314$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.097$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰할 수 있었으며, HM3는 -2℃에서 672시간 ($A_{600}=0.950$), 0℃에서 240시간 ($A_{600}=0.570$), 5℃에서 192시간 ($A_{600}=1.628$), 10℃에서 72시간 ($A_{600}=1.830$), 15℃에서 56시간 ($A_{600}=2.254$), 25℃에서

24시간 ($A_{600}=2.115$), 30℃에서 24시간 ($A_{600}=1.242$), 37℃에서 48시간 ($A_{600}=0.096$)에 각 온도에 따른 최대 생육을 관찰할 수 있었다. 이에 따라 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종 모두 25℃에서 가장 단시간에 최대 생육에 도달하는 것으로 보아 최적 생육 온도는 25℃인 것을 확인하였다.

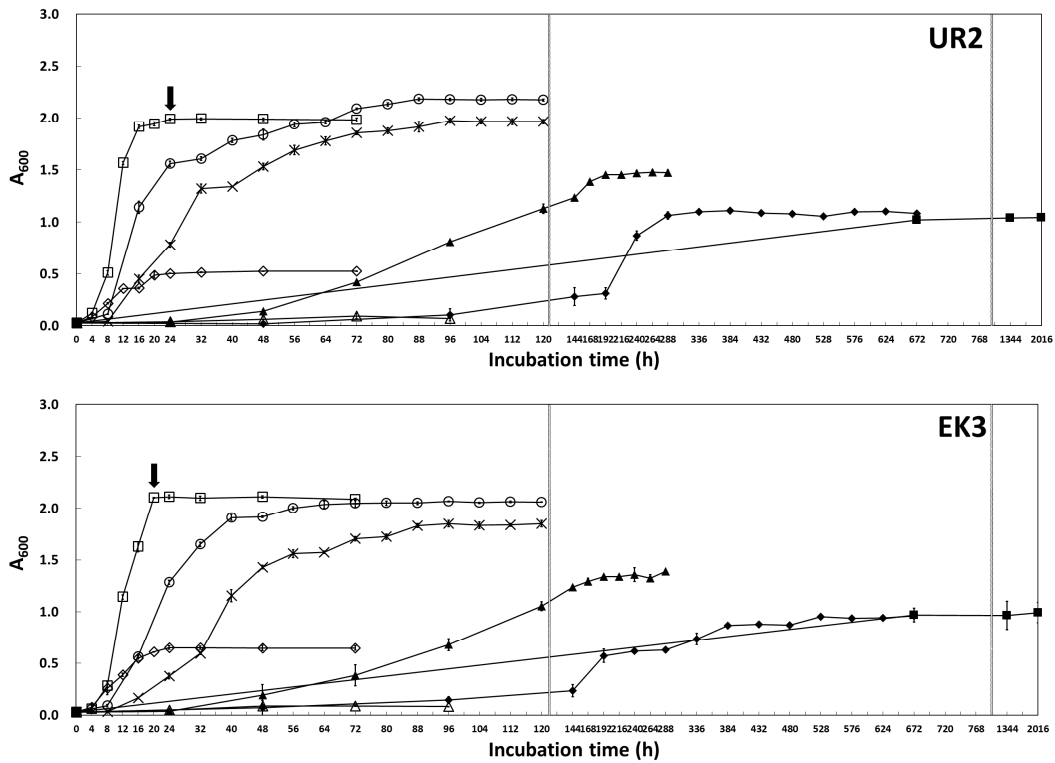


Figure 10. Growth of *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* at different temperatures

- , Growth of lactic acid bacteria at -2°C
- ◆, Growth of lactic acid bacteria at 0°C
- ▲, 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
- △, Growth of lactic acid bacteria at 37°C

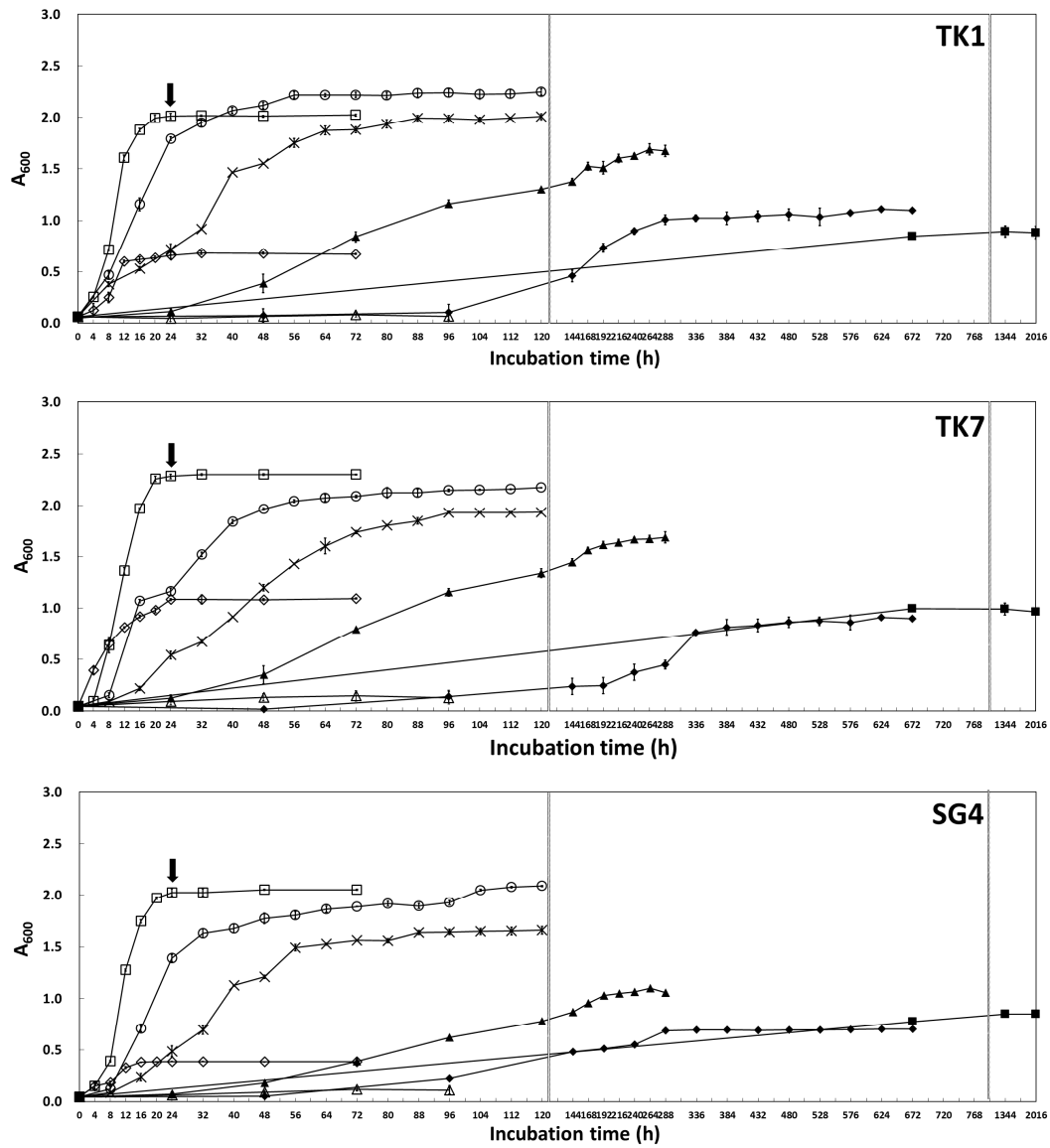


Figure 11. Growth of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* at different temperatures

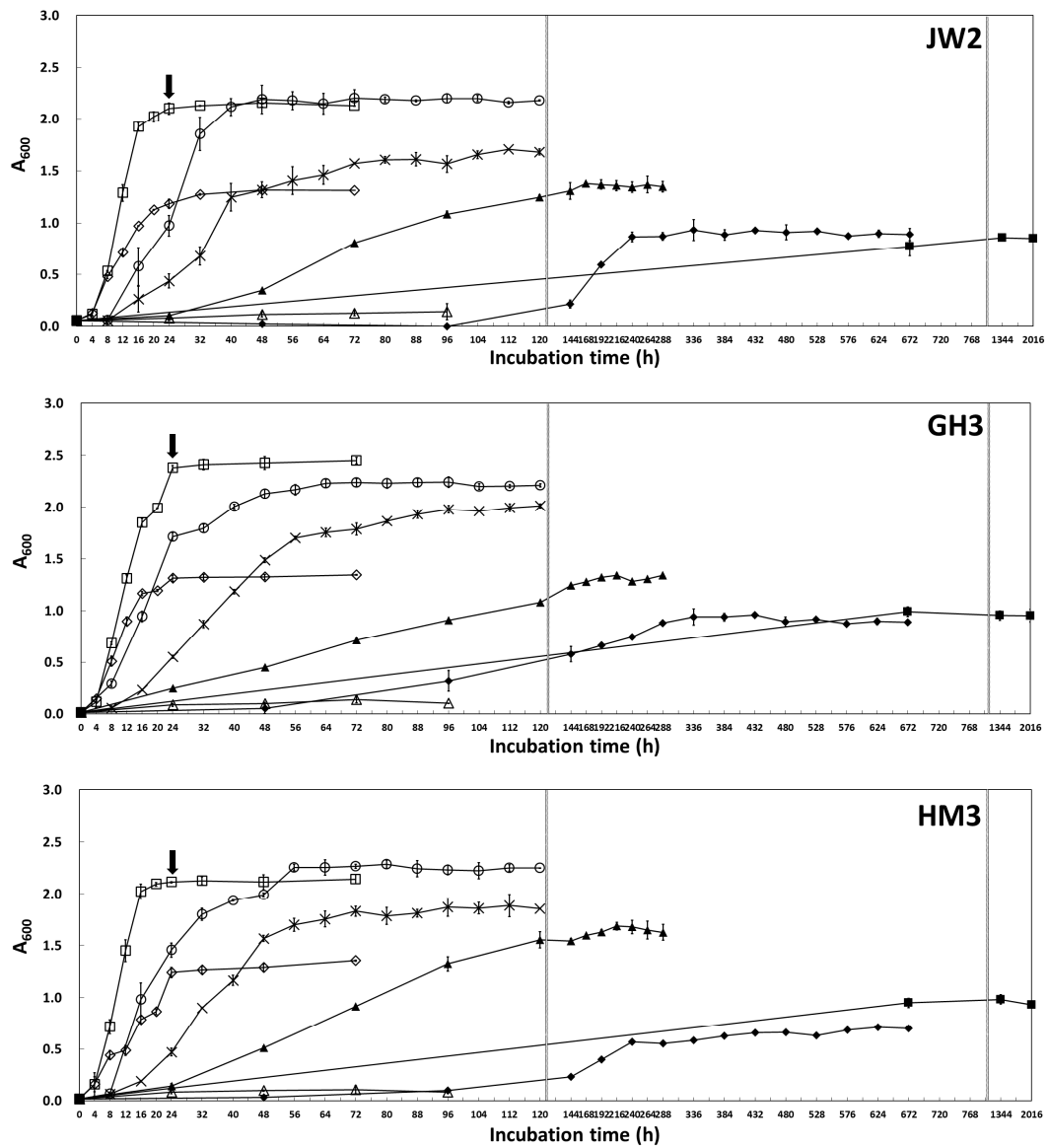


Figure 11. (continued)

2. 배지의 초기 pH에 따른 생육도

MRS 액체배지에 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0으로 pH를 조정한 배지를 실험에 사용하였다. pH를 조정하지 않은 MRS 액체배지를 대조구(con.)로 비교하였다. 분리된 저온 생육능 유산균을 pH를 조정한 MRS 액체배지에 1% 접종하여 25°C에서 24시간 정치 배양하여 배지의 초기 pH에 따른 생육을 조사하였다. 배양액의 흡광도는 3번씩 측정하여 평균치로 나타내었다.

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

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 2종의 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 12). UR2는 pH 4.0 ($A_{600}=0.055$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.526$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.618$)은 con. ($A_{600}=2.052$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.460$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.550$)에서 상승하는 생육 그래프를 보였으며, pH 8.0에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내는 것을 관찰하였다. EK3는 pH 4.0 ($A_{600}=0.058$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.465$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.455$)은 con. ($A_{600}=1.820$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.192$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.314$)에서 상승하는 생육 그래프를 보였으며, pH 8.0에서 가장 높은 흡광도 값을 나타내는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 2종 모두 생육 최적 pH는 pH 8.0임을 확인할 수 있었다.

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

Leuconostoc gelidum subsp. *gasicomitatum* 6종의 초기 pH에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 13). TK1은 pH 4.0 ($A_{600}=0.069$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.725$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.664$)은 control ($A_{600}=2.118$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.558$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.974$)에서 상승하는 생육 그래프를 보였으며, TK7은 pH 4.0 ($A_{600}=0.087$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.657$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.626$)은 con. ($A_{600}=2.050$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.432$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.662$)에서 상승하는 생육 그래프를 보였으며, SG4는 pH 4.0 ($A_{600}=0.063$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.446$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.477$)은 con. ($A_{600}=1.906$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.242$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.368$)에서 상승하는 생육 그래프를 보였고, JW2는 pH 4.0 ($A_{600}=0.089$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.565$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.626$)은 con. ($A_{600}=1.914$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.382$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.566$)에서 상승하는 생육 그래프를 보였다. 또한, GH3는 pH 4.0 ($A_{600}=0.095$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.599$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.746$)은 con. ($A_{600}=2.060$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.560$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.724$)에서 상승하는 생육 그래프를 보였으며, HM3는 pH 4.0 ($A_{600}=0.082$)과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못했으며 pH 5.0 ($A_{600}=0.394$)과 pH 6.0 ($A_{600}=1.743$)은 con. ($A_{600}=2.286$) 대비 생육도가 낮았다. pH 7.0 ($A_{600}=2.824$)과 pH 8.0 ($A_{600}=2.914$)에서 상승하는 생육 그래프를 확인할 수 있었다. 따라서 6종 모두 생육 최적 pH는 pH 8.0임을 관찰하였다.

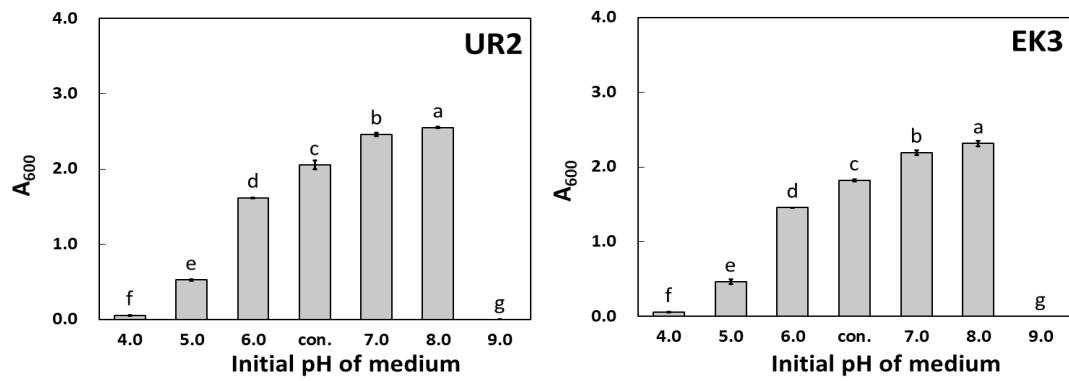


Figure 12. Effect of initial pH of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* growth

1) a~g, Significantly different in the growth ($p < 0.05$)

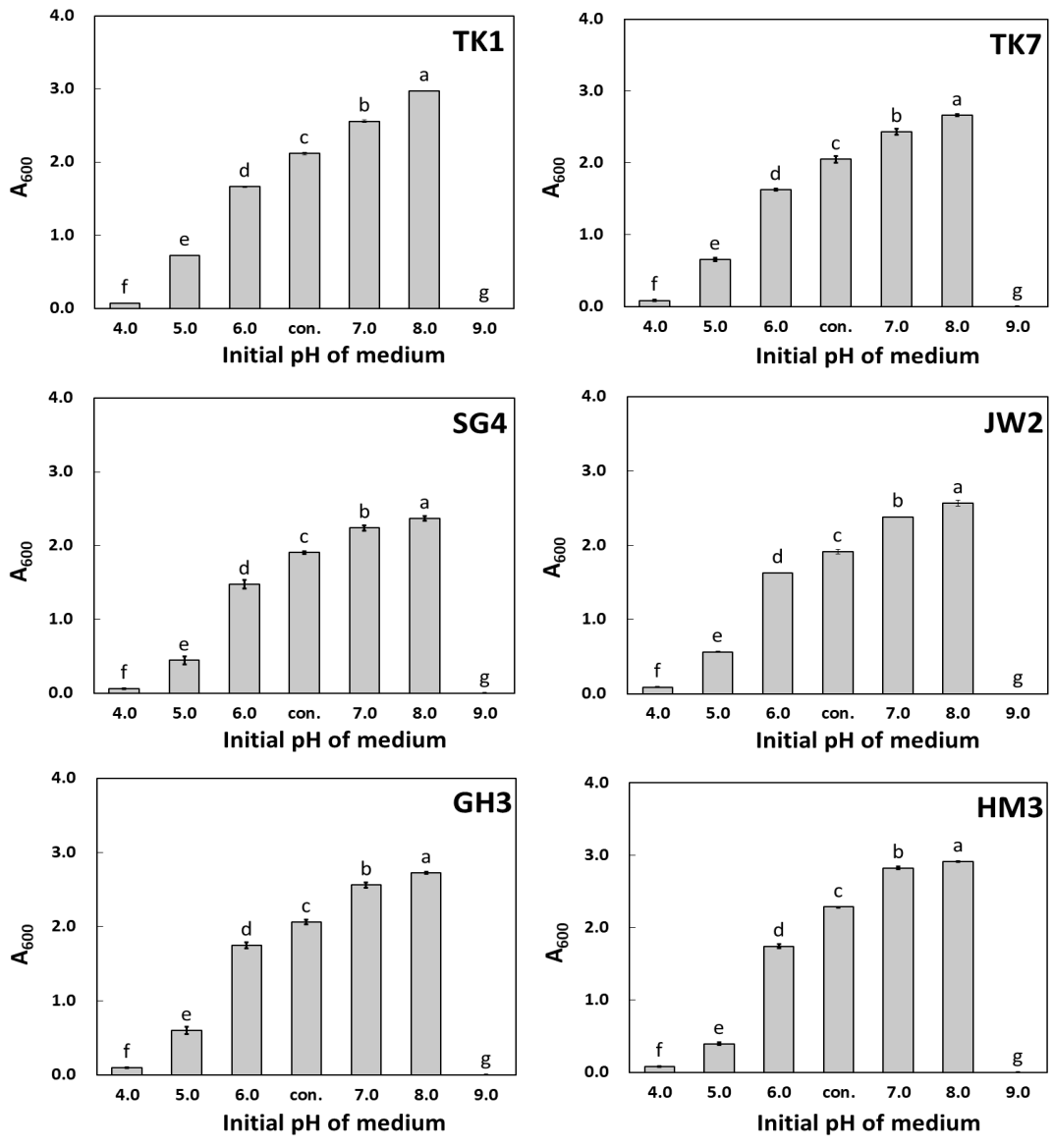


Figure 13. Effect of initial pH of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* growth

1) a~g. Significantly different in the growth ($p < 0.05$)

3. 배지의 초기 NaCl 농도에 따른 생육도

MRS 액체배지를 Sodium chloride로 염 농도를 조정하여 1, 3, 5, 6.5, 7, 9% 배지를 제조한 후 실험에 사용하였다. 염 농도를 조정하지 않은 MRS 액체배지를 대조구(con.)로 비교하였다. 분리된 저온 생육능 유산균을 염 농도를 조정한 MRS 액체배지에 1% 접종하여 25°C에서 24시간 정치 배양하여 배지의 초기 염 농도에 따른 생육을 조사하였다. 배양액의 흡광도는 3번씩 측정하여 평균치로 나타내었다.

가. *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*의 초기 염 농도에 따른 생육

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 2종의 초기 염 농도에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 14). UR2는 con. ($A_{600}=2.116$) 대비 1% ($A_{600}=1.968$), 3% ($A_{600}=1.610$), 5% ($A_{600}=0.927$), 6.5% ($A_{600}=0.368$), 7% ($A_{600}=0.063$), 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인할 수 있었으며, EK3는 control ($A_{600}=2.220$) 대비 1% ($A_{600}=1.964$), 3% ($A_{600}=1.576$), 5% ($A_{600}=0.892$), 6.5% ($A_{600}=0.198$), 7%, 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인할 수 있었다. 따라서 2종 모두 con. 대비 염 농도가 증가할수록 생육이 저해되며 특히 7%와 9%에서는 거의 생육을 보이지 못하는 것을 관찰하였다.

나. *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 초기 염 농도에 따른 생육

Leuconostoc gelidum subsp. *gasicomitatum* 6종의 초기 염 농도에 따른 생육을 관찰하였다(Figure 15). TK1은 control ($A_{600}=2.282$) 대비 1% ($A_{600}=2.108$), 3% ($A_{600}=1.656$), 5% ($A_{600}=0.946$), 6.5% ($A_{600}=0.299$), 7% ($A_{600}=0.072$), 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인할 수 있었으며, TK7는 con. ($A_{600}=2.320$) 대비 1% ($A_{600}=2.138$), 3% ($A_{600}=1.718$), 5% ($A_{600}=1.014$), 6.5% ($A_{600}=0.392$), 7% ($A_{600}=0.095$), 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인할 수 있었고 SG4는 con. ($A_{600}=2.072$) 대비 1% ($A_{600}=1.878$), 3% ($A_{600}=1.410$), 5% ($A_{600}=0.752$), 6.5% ($A_{600}=0.220$), 7% ($A_{600}=0.065$), 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인하였다. 또한, JW2는 con. ($A_{600}=2.182$) 대비 1% ($A_{600}=2.134$), 3% ($A_{600}=1.736$), 5% ($A_{600}=1.071$), 6.5% ($A_{600}=0.630$), 7% ($A_{600}=0.133$), 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인하였으며, GH3는 con. ($A_{600}=2.344$) 대비 1% ($A_{600}=2.174$), 3% ($A_{600}=1.822$), 5% ($A_{600}=1.079$), 6.5% ($A_{600}=0.604$), 7% ($A_{600}=0.102$), 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인하였고, HM3는 con. ($A_{600}=2.400$) 대비 1% ($A_{600}=2.306$), 3% ($A_{600}=1.796$), 5% ($A_{600}=1.223$), 6.5% ($A_{600}=0.855$), 7% ($A_{600}=0.126$), 9% 모두 점차 감소하는 생육 그래프를 확인할 수 있었다. 따라서 6종 모두 con. 대비 염 농도가 증가할수록 생육이 저해되며 특히 7%와 9%에서는 거의 생육을 보이지 못하는 것을 관찰하였다.

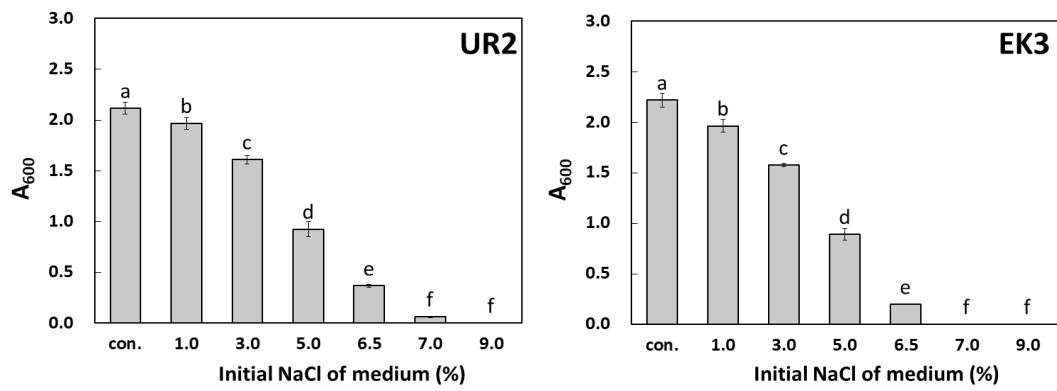


Figure 14. Effect of initial NaCl concentration of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* growth

1) a~g. Significantly different in the growth ($p < 0.05$)

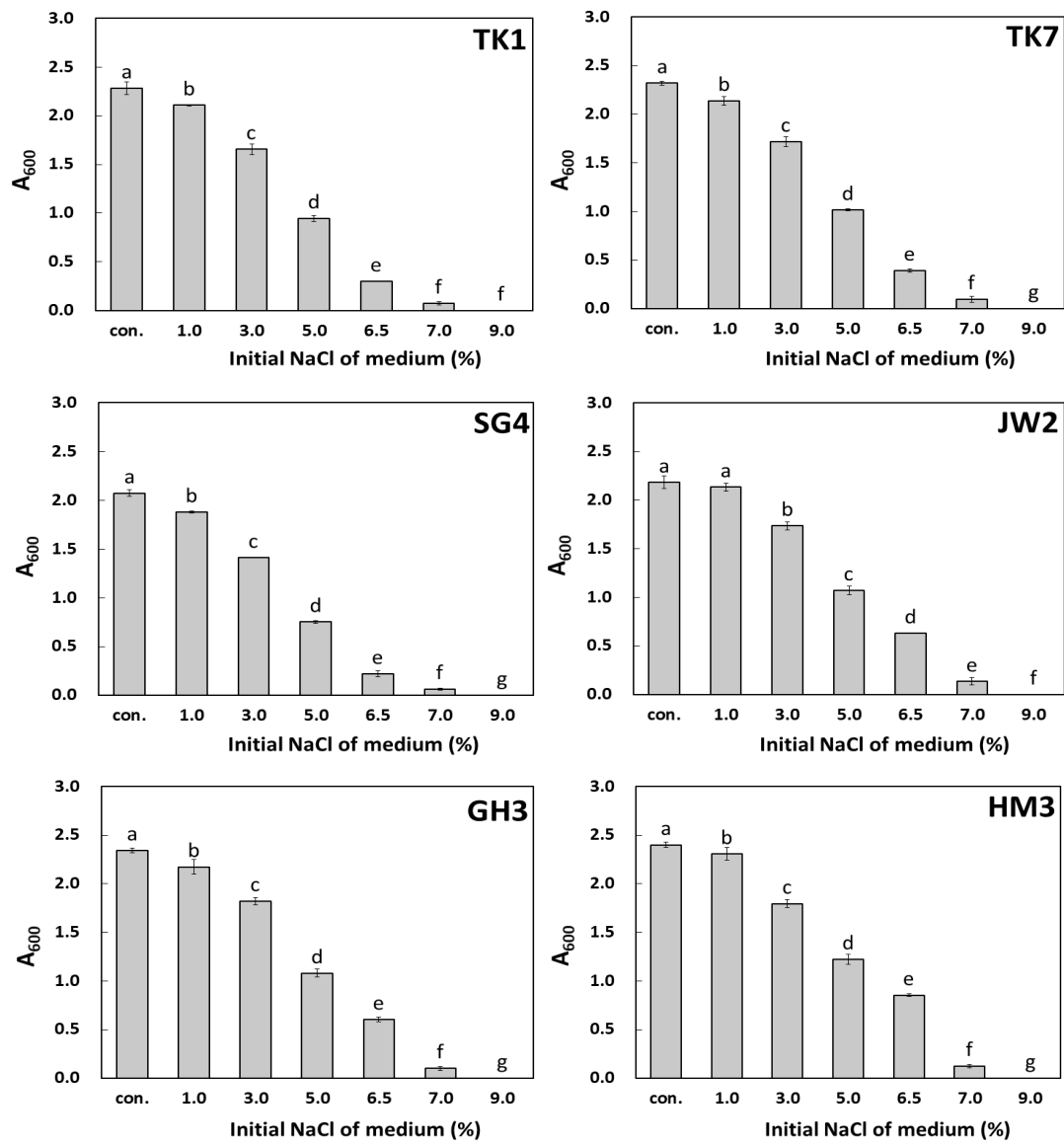


Figure 15. Effect of initial NaCl concentration of medium on *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* growth

1) a~g. Significantly different in the growth ($p < 0.05$)

제 4절 분리 유산균의 안전성 평가

1. 용혈성 검사

용혈성은 적혈구가 파괴되며 발생하는 정상적인 작용과 화학물질, 유전적 결함, 미생물에 의해 생성된 독성 물질에 의한 비정상적 작용으로 나뉘는데, 비정상적 용혈성이 발생할 경우 적혈구의 산소운반 기능에 장애가 생겨 인체 내 치명적일 수 있다[63].

따라서 저온 생육능 균주 8종에 대해 용혈작용에 대한 안전성을 평가하였다. 균주 배양액 8종을 7% horse blood 평판배지에 희석도말하여 배양 후 관찰하였다. 비정상적 용혈성인 hemolysin을 생성하지만 적혈구의 막을 파괴하지 않고 hemoglobin을 methemoglobin으로 전환하여 균체 주변이 녹색으로 변하는 α -hemolysis와 가용성 hemolysin에 의해 적혈구 막이 파괴되어 균체 주변이 투명해지는 β -hemolysis를 양성으로 보았다. 관찰 결과 8종 모두 γ -hemolysis로 음성임을 확인하였다. 양성 대조구 *B. cereus* ATCC 14579는 균체 주위에 투명한이 형성되어 β -hemolysis 반응이 관찰되었다(Figure 16, Figure 17).

2. 효소활성

일반적으로 미생물의 경우 각각의 유해 효소 및 유용 효소에 대한 억제와 생성에 대한 특성이 상이하다. 따라서 저온 생육능 균주 8종의 효소 활성을 관찰하기 위해 API zym kit (BioMerieux)을 이용하여 실험하였다(Table 10). *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 2종과 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종 중 JW2와 HM3는 β -galactosidase에 활성을 나타내었다. 또한, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* UR2와 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* HM3는 α -glucosidase에 대해 활성을 나타내었다. 저온 생육능 유산균 8종 모두 유해 효소에 대해 활성이 없어

안전함을 확인할 수 있었다. 유해 효소로는 감염성 심내막염 가운데 바이러스성 또는 국소성 손상의 원인이 되는 것으로 알려진 α -chymotrypsin[64], 보통 유해 물질의 체내 유입 시 간에서 glucuronic acid에 의해 포함 되어 해독 작용이 이루어지나 이를 탈포합 시켜 다시 독성을 가지게 되어 활성이 높아지면 아민류와 독성물질, 변이원 등을 생성시키는 장내 세균의 대사 작용으로 분비되는 효소인 β -glucuronidase[65, 66], 암 유발, 동맥경화, 간장장애, 면역기능 저하 등의 원인이 되는 β -glucosidase를 대상으로 관찰하였다[66, 67].

3. 항생제 내성

Bacteria의 항생물질 내성 인자는 내재형과 획득형으로 구분되는데, 특히 획득형 내성 인자는 항생물질 노출 환경에서 내성 유전자를 보유한 다른 bacteria로부터 수평 이동에 의해 전이될 위험이 있는 것으로 평가되고 있다. 그러므로 획득형 내성 인자를 보유한 미생물이 식품발효용 종균이나 프로바이오틱 균주로 사용될 경우, 식품이나 장관을 매개로 위해 미생물에 항생물질 내성 인자를 전과할 수 있어 식품용 미생물 선정 과정에서 반드시 검증되어야 한다[54, 68]. 이를 관찰하기 위해 EFSA의 *Leuconostoc*속 break point를 참고하여 분리 균주 8종을 대상으로 항생제 8종 ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, tetracycline, vancomycin (Sigma)에 대한 최소 생육 저해농도(MIC)를 확인하였다[54].

Leu. gelidum subsp. *aenigmaticum* UR2와 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종은 실험대상 항생제 8종에 대하여 EFSA에서 제시한 break point보다 낮거나 같은 농도에서 감수성을 보였고, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* EK3는 항생제 7종에 대해 EFSA에서 제시한 break point보다 낮거나 같은 농도에서 감수성을 보였지만, ampicillin에 대해서는 높은 감수성을 보였다. 이는 중 특이적인 항생제 내성 유전자를 가지고 있을 것으로 추정되므로 추가적인 검증이 필요할 것으로 보인다(Table 11).

4. Biogenic amine 생성

전통식품 가운데 발효 식품에서 가장 대표적인 화학적 위해 요소인 biogenic amine은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나 발효 과정에서 아미노산 탈탄산효소 활성을 갖는 미생물에 의해 생성되는 질소화합물을 의미하며 이는 두통, 복통, 알레르기성 반응 등을 일으킨다고 보고되고 있다 [69]. 배추김치는 배추에 식염, 고춧가루, 마늘, 젓갈 등의 부재료를 넣어 만든 발효 식품으로 putrescine, histamine, tyramine 함량이 높은 경우가 있었다. 이는 부재료 가운데 멸치액젓이나 까나리액젓과 같은 젓갈에서 유래 되는 것으로 추측되어 김치에서 분리한 균주의 biogenic amine 생성 여부 또한 중요한 안전성 확인 요소로 인식된다[70].

Histamine은 histidine으로부터 전환되며 과량 섭취 시 피부 발진, 부종, 두드러기, 국소 염증 등을 일으키고 메스꺼움, 구토, 설사 및 복부 경련 등의 증상과 심한 경우 질식 및 호흡곤란이 나타난다고 알려져 있다[70, 71, 72, 73]. Putrescine은 앞서 말한 histamine의 독성을 강화시킬 수 있으며, 아질산염과 반응하여 발암성 물질인 니트로사민을 형성할 수 있다[74]. 또한, tyramine은 tyrosine으로부터 전환되며 과량 섭취 시 고혈압을 유발하며 우울증 치료제 monoamine oxidase inhibitor (MAOI)와 함께 섭취할 경우 효소 활성이 저해되어 ‘cheese reaction’과 같은 편두통, 뇌출혈, 심부전을 유발하기도 한다[70, 71, 75, 76].

BA로 인한 위해성을 확인하기 위해 decarboxylase 배지를 이용한 방법을 사용하였다. 이는 균주가 아미노산 탈탄산효소에 의해 amine을 생성하여 배지가 알칼리화되면 배지 내에 함유된 pH indicator에 의해 균주 주변의 배지가 보라색으로 발색 되어 BA 생성 균주가 검출되는 방식이다[55]. BA를 생성하지 않는 유산균은 당 대사 과정에서 생성된 젖산에 의해 배양 후 pH가 산성이 되고, BA를 생성하는 유산균은 생성된 BA의 알칼리성에 의해 배양 후 pH가 중성~약알칼리를 나타내게 된다.

이러한 plate method를 기반으로 decarboxylase plate를 제조하여 저온 생육능 균주 8종의 BA 생성 여부를 확인한 결과, *Leuconostoc*속은 BA

혹은 tyrosine으로부터 tyramine을 생성하는 것으로 보고된 바 있으나[62, 77], 8종 모두 색 변화가 관찰되지 않았다. Ornithine과 histidine 양성 대조구인 *Lb.* ATCC 33222는 보라색으로 발색 되었고, tyrosine 양성 대조구인 *Ent. faecalis* ATCC 29212는 환이 생성되며 주변부가 보라색으로 발색 되어 BA 양성 반응을 확인하였다(Figure 18).

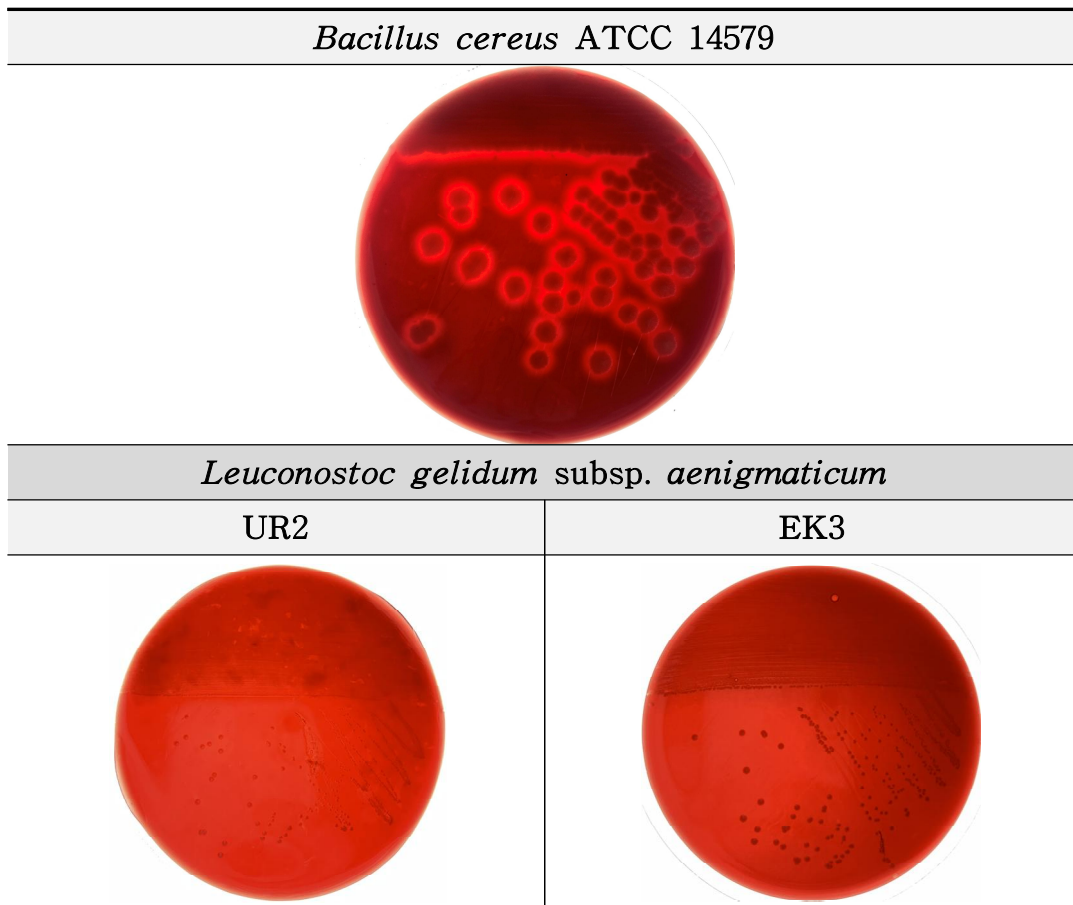


Figure 16. Hemolysis test of *B. cereus* ATCC 14579 and *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*

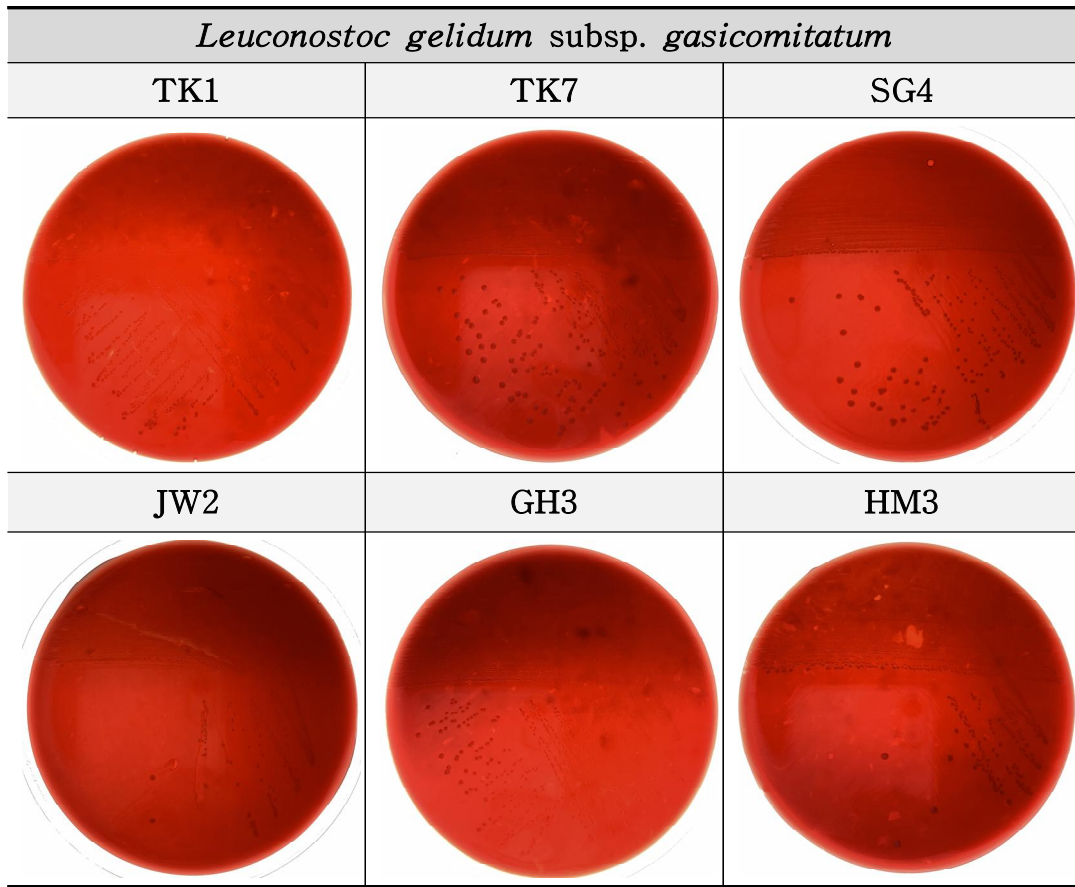


Figure 17. Hemolysis test of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*

Table 10. Enzymatic activities of psychrotrophic LAB using API zym kit

NO.	Enzyme	UR2	EK3	TK1	TK7	SG4	JW2	GH3	HM3
1	Control	0 ¹⁾	0	0	0	0	0	0	0
2	Alkaline phosphatase	0	0	0	0	0	0	0	0
3	Esterase	0	0	0	0	0	0	0	0
4	Esterase Lipase	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Lipase	0	0	0	0	0	0	0	0
6	Leucine arylamidase	1	0	0	0	0	1	0	0
7	Valine arylamidase	0	0	0	0	0	0	0	0
8	Cystine arylamidase	0	0	0	0	0	0	0	0
9	Trypsin	0	0	0	0	0	0	0	0
10	α -Chymotrysin	0	0	0	0	0	0	0	0
11	Acid phosphatase	0	0	0	0	0	0	0	1
12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	1	1	1	2	0	2	1	2
13	α -Galactosidase	1	0	0	0	0	0	0	0
14	β -Galactosidase	4	4	1	2	2	4	2	4
15	β -Glucuronidase	0	0	0	0	0	0	0	0
16	α -Glucosidase	3	1	0	1	2	2	0	3
17	β -Glucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0
18	N - acetyl- β -glucosaminidase	0	0	0	0	0	0	0	0
19	α -Mannosidase	0	0	0	0	0	0	0	0
20	α -Fucosidase	0	0	0	0	0	0	0	0

 1) 0: 0 nM, 1: 5 nM, 2: 10 nM, 3: 20 nM, 4: 30 nM, 5: \geq 40 nM

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

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

Antibiotics ¹⁾	AMP	CHL	ERY	GEN	KAN	STR	TET	VAN
Strain								
Break point ²⁾ for <i>Leuconostoc</i> sp.	2	4	1	16	16	64	8	n.r. ³⁾
UR2	2	4	1	0.125	2	2	1	512
EK3	3	4	0.5	0.031	0.5	1	1	512
TK1	2	4	1	0.250	2	4	1	512
TK7	2	4	1	0.125	2	4	1	512
SG4	2	2	0.5	0.125	1	2	1	512
JW2	2	4	0.5	0.125	2	4	1	512
GH3	2	4	1	0.125	2	4	2	512
HM3	2	4	0.5	0.125	2	4	2	512

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

2) Break points were according to the guidelines of European Food Safety Authority (2012).

3) n.r.: Not required.

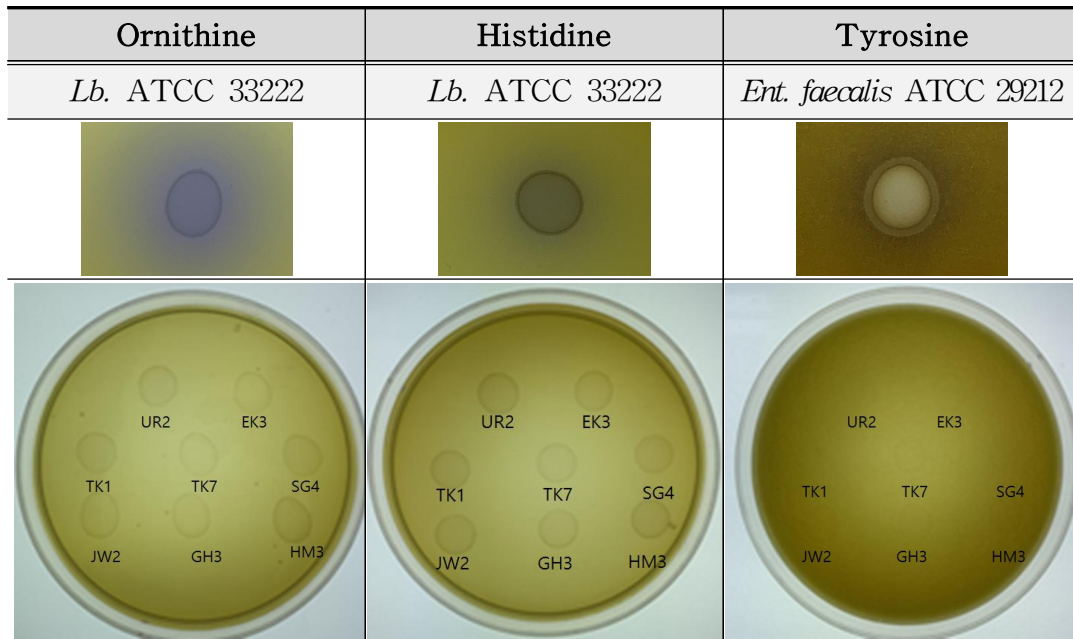


Figure 18. The screening plate for biogenic amine production by psychrotrophic LAB

제 5절 분리 유산균의 안정성 평가

1. 내산성

분리 균주 8종의 산과 알칼리 조건하에 내성을 측정하기 위하여, 원심분리로 균체를 회수하여 pH 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0으로 조정된 MRS 액체배지에 현탁하여 25℃에서 24, 48, 72시간 처리하였고, pH를 조정하지 않은 MRS를 대조구(con.)로 비교하였다. 각 시간마다 MRS 평판 배지에 도달하여 생균수를 측정하였다.

가. *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmatocum*의 내산성

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 2종의 내산성을 관찰하였다(Table 12). UR2와 EK3 모두 pH 2.0과 pH 10.0에서는 24시간 만에 사멸한 반면, pH 4.0에서는 24시간 이후 점차 감소하였고, pH 6.0에서 pH 8.0구간에서는 48시간 이후 점차 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 2종은 pH 8.0에서 가장 잘 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

나. *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 내산성

Leuconostoc gelidum subsp. *gasicomitatum* 6종의 내산성을 관찰하였다(Table 13). TK1은 pH 4.0과 pH 10.0에서 24시간 만에 사멸하였으며, pH 4.0에서 48시간 만에 사멸한 반면, pH 6.0과 pH 8.0 구간에서는 48시간 이후 감소하는 것을 확인하였다. TK7, SG4, JW2, GH3, HM3는 pH 2.0과 pH 10.0에서 24시간 만에 사멸하였으며, pH 4.0에서 24시간 이후 감소하였고, pH 6.0과 pH 8.0구간에서 48시간 이후 감소하는 것을 확인하였다. 따라서 TK1, SG4, JW2, HM3는 pH 8.0에서 TK7, GH3는 con.과 pH 8.0에서 가장 잘 유지되는 것을 확인하였다.

2. 내열성

분리 균주 8종의 온도에 따른 내성을 측정하기 위하여, 원심분리로 균체를 회수하여 MRS 액체배지에 현탁하여 -2, 0, 4, 10, 20, 30, 50, 70℃에서 24, 48, 72시간 처리하였고, 100, 121℃는 각각 15, 30분 처리하였다. 이때, 최적 배양온도 25℃를 대조구(con.)로 비교하였다. 각 시간마다 MRS 평판 배지에 도말하여 생존수를 측정하였다.

가. *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*의 내열성

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 2종의 내열성을 관찰하였다(Table 14). UR2와 EK3 모두 -2, 0, 4, 10℃에서는 유지하고, 20℃에서는 48시간 이후 점차 감소하고, 30℃에서는 24시간 이후 감소하여 72시간 만에 사멸하였다. 또한, 50, 70℃에서는 24시간 만에 사멸하였고, 100, 121℃는 처리 직후 사멸하는 것을 확인하였다.

나. *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 내열성

Leuconostoc gelidum subsp. *gasicomitatum* 6종의 내열성을 관찰하였다(Table 15). 6종 모두 -2, 0, 4, 10℃에서는 유지하고, 20℃에서는 48시간 이후 점차 감소하고, 30℃에서는 24시간 이후 감소하여 72시간 만에 사멸하였다. 특히 SG4의 경우 48시간 만에 사멸하는 것을 확인하였다. 또한, 50, 70℃에서는 6종 모두 24시간 만에 사멸하였고, 100, 121℃는 처리 직후 사멸하는 것을 확인하였다.

3. 내염성

분리 균주 8종의 염 농도에 따른 내성을 측정하기 위하여, 원심분리로 균체를 회수하여 1, 3, 5, 7, 9, 12, 15%의 염 농도로 조정된 MRS 액체배지에 현탁하여 25℃에서 24, 48, 72시간 처리하였고, 염 농도를 조정하지 않은 MRS배지를 대조구(con.)로 비교하였다. 각 시간마다 MRS 평판배지에 도말하여 생존수를 측정하였다.

가. *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum*의 내염성

Leuconostoc gelidum subsp. *aenigmaticum* 2종의 내염성을 관찰하였다(Table 16). 2종 모두 1, 3, 5, 7%에서는 48시간부터 점차 감소하였으며, 9%에서는 48시간 만에 사멸하였고, 12, 15%에서 24시간 만에 사멸하는 것을 확인하였다. UR2는 3%에서, EK3는 3, 5%에서 가장 잘 유지하는 것을 확인할 수 있었다.

나. *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 내염성

Leuconostoc gelidum subsp. *gasicomitatum* 6종의 내염성을 관찰하였다(Table 17). TK1은 1, 3, 5%에서는 24시간부터 점차 감소한 반면, 7, 9%에서는 48시간 이후 감소하였다. 9%에서 가장 잘 유지함을 확인하였다. TK7은 3, 5, 7, 9%에서 24시간부터 점차 감소하였으며, 9%에서 가장 잘 유지하였다. SG4는 1, 3, 5, 7, 9%에서 48시간 이후 점차 감소하였으며, 9%에서 가장 잘 유지하였다. JW2는 1, 3, 5, 7, 9%에서 48시간 이후 점차 감소하였으며, 7, 9%에서 가장 잘 유지하였다. GH3는 1, 3, 5, 7, 9%에서 48시간 이후 점차 감소하였으며, 7%에서 가장 잘 유지하였다. HM3는 1, 9%에서 48시간 이후 점차 감소한 반면, 3, 5, 7%에서 24시간 이후 감소하였고, 7, 9%에서 가장 잘 유지하였다. 6종 모두 12, 15%에서 24시간 만에 사멸하였으나, TK7만 특이적으로 24시간까지 어느 정도 생존수를 유지하되 48시간 이후 사멸하였다.

Table 12. Acid and alkali tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

UR2	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.27±0.09 ^{aA1)}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}
pH 4	9.27±0.09 ^{aA}	5.90±0.16 ^{bB}	3.64±0.11 ^{bC}	2.74±0.29 ^{dD}
pH 6	9.27±0.09 ^{aA}	9.27±0.10 ^{aA}	7.73±0.17 ^{aB}	3.54±0.12 ^{cC}
con.	9.27±0.09 ^{aA}	9.37±0.06 ^{aA}	7.82±0.03 ^{aB}	4.91±0.06 ^{bC}
pH 8	9.27±0.09 ^{aA}	9.44±0.03 ^{aA}	7.73±0.19 ^{aB}	6.08±0.29 ^{aC}
pH 10	9.27±0.09 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}
EK3	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.26±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
pH 4	9.26±0.10 ^{aA}	8.03±0.33 ^{bB}	6.61±0.14 ^{cC}	5.39±0.11 ^{cD}
pH 6	9.26±0.10 ^{aA}	9.40±0.09 ^{aA}	8.51±0.24 ^{aB}	6.37±0.08 ^{bC}
con.	9.26±0.10 ^{aA}	9.41±0.03 ^{aA}	8.52±0.19 ^{aB}	5.20±0.39 ^{cC}
pH 8	9.26±0.10 ^{aA}	9.48±0.04 ^{aA}	8.12±0.12 ^{bB}	7.52±0.15 ^{aC}
pH 10	9.26±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

Table 13. Acid and alkali tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

TK1	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.36±0.02 ^{aA1)}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{cB}
pH 4	9.36±0.02 ^{aA}	8.25±0.09 ^{bB}	0.00±0.00 ^{dC}	0.00±0.00 ^{cC}
pH 6	9.36±0.02 ^{aA}	9.41±0.01 ^{aA}	6.81±0.05 ^{cB}	5.11±0.05 ^{bC}
con.	9.36±0.02 ^{aA}	9.37±0.10 ^{aA}	7.22±0.02 ^{bB}	5.67±0.16 ^{bC}
pH 8	9.36±0.02 ^{aA}	9.37±0.01 ^{aA}	7.99±0.13 ^{aB}	7.27±0.11 ^{aC}
pH 10	9.36±0.02 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{cB}

TK7	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.45±0.05 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}
pH 4	9.45±0.05 ^{aA}	8.47±0.03 ^{bB}	6.42±0.10 ^{dC}	5.31±0.02 ^{cD}
pH 6	9.45±0.05 ^{aA}	9.52±0.01 ^{aA}	8.12±0.11 ^{aB}	6.42±0.04 ^{bC}
con.	9.45±0.05 ^{aA}	9.49±0.09 ^{aA}	7.41±0.07 ^{cB}	6.58±0.11 ^{aC}
pH 8	9.45±0.05 ^{aA}	9.52±0.01 ^{aA}	7.58±0.01 ^{bC}	6.54±0.02 ^{abD}
pH 10	9.45±0.05 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}

SG4	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.32±0.21 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
pH 4	9.32±0.21 ^{aA}	8.78±0.11 ^{bB}	3.14±0.07 ^{cC}	2.87±0.19 ^{cD}
pH 6	9.32±0.21 ^{aA}	9.23±0.05 ^{aA}	7.19±0.23 ^{bB}	6.15±0.13 ^{bC}
con.	9.32±0.21 ^{aA}	9.18±0.13 ^{aA}	7.18±0.21 ^{bB}	6.19±0.23 ^{bC}
pH 8	9.32±0.21 ^{aA}	9.17±0.01 ^{aA}	8.33±0.02 ^{aB}	7.19±0.07 ^{aC}
pH 10	9.32±0.21 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

Table 13. (Continued)

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

JW2	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.40±0.03 ^{aA1)}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{cB}
pH 4	9.40±0.03 ^{aA}	8.37±0.17 ^{bB}	6.88±0.12 ^{cC}	5.37±0.15 ^{bD}
pH 6	9.40±0.03 ^{aA}	9.35±0.03 ^{aA}	7.41±0.10 ^{bB}	5.31±0.03 ^{bC}
con.	9.40±0.03 ^{aA}	9.38±0.02 ^{aA}	7.77±0.09 ^{aB}	6.17±0.01 ^{bC}
pH 8	9.40±0.03 ^{aA}	9.33±0.05 ^{aA}	7.33±0.08 ^{bB}	7.23±0.26 ^{aC}
pH 10	9.40±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{cB}

GH3	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.37±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}
pH 4	9.37±0.03 ^{aA}	8.22±0.13 ^{bB}	7.03±0.31 ^{bC}	5.33±0.44 ^{cD}
pH 6	9.37±0.03 ^{aA}	9.41±0.01 ^{aA}	8.20±0.01 ^{aB}	6.29±0.21 ^{bC}
con.	9.37±0.03 ^{aA}	9.54±0.02 ^{aA}	8.28±0.12 ^{aB}	7.53±0.18 ^{aC}
pH 8	9.37±0.03 ^{aA}	9.48±0.01 ^{aA}	8.31±0.05 ^{aB}	7.37±0.42 ^{aC}
pH 10	9.37±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}

HM3	0h	24h	48h	72h
pH 2	9.39±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}
pH 4	9.39±0.10 ^{aA}	8.33±0.10 ^{bB}	4.34±0.18 ^{dC}	3.18±0.21 ^{cD}
pH 6	9.39±0.10 ^{aA}	9.33±0.14 ^{aA}	5.87±0.05 ^{cB}	5.56±0.40 ^{bB}
con.	9.39±0.10 ^{aA}	9.23±0.02 ^{aA}	7.67±0.09 ^{bB}	5.19±0.32 ^{bC}
pH 8	9.39±0.10 ^{aA}	9.40±0.01 ^{aA}	8.14±0.36 ^{aB}	6.32±0.13 ^{aC}
pH 10	9.39±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

Table 14. Temperature tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

UR2	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.27±0.09 ^{aA1)}	9.26±0.11 ^{bA}	9.29±0.06 ^{aA}	9.31±0.07 ^{aA}
0℃	9.27±0.09 ^{aA}	9.33±0.01 ^{abA}	9.18±0.20 ^{aA}	9.34±0.02 ^{aA}
4℃	9.27±0.09 ^{aA}	9.41±0.04 ^{aA}	9.34±0.05 ^{aA}	9.38±0.08 ^{aA}
10℃	9.27±0.09 ^{aA}	9.39±0.04 ^{aA}	9.26±0.17 ^{aA}	9.41±0.03 ^{aA}
20℃	9.27±0.09 ^{aA}	9.36±0.03 ^{abA}	9.34±0.01 ^{aA}	8.68±0.27 ^{bB}
con.	9.27±0.09 ^{aA}	9.37±0.06 ^{abA}	7.85±0.08 ^{bB}	4.91±0.07 ^{cC}
30℃	9.27±0.09 ^{aA}	8.12±0.06 ^{cB}	1.88±0.31 ^{cC}	0.00±0.00 ^{dD}
50℃	9.27±0.09 ^{aA}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.27±0.09 ^{aA}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}

EK3	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.26±0.10 ^{aA}	9.41±0.09 ^{aA}	9.34±0.08 ^{aA}	9.39±0.04 ^{aA}
0℃	9.26±0.10 ^{aA}	9.40±0.20 ^{aA}	9.37±0.13 ^{aA}	9.34±0.14 ^{aA}
4℃	9.26±0.10 ^{aA}	9.44±0.01 ^{aA}	9.42±0.09 ^{aA}	9.37±0.07 ^{aA}
10℃	9.26±0.10 ^{aA}	9.39±0.02 ^{aA}	9.36±0.03 ^{aA}	9.36±0.03 ^{aA}
20℃	9.26±0.10 ^{aA}	9.37±0.01 ^{aA}	9.38±0.02 ^{aA}	8.82±0.01 ^{bB}
con.	9.26±0.10 ^{aA}	9.41±0.03 ^{aA}	8.52±0.19 ^{bB}	5.20±0.06 ^{cC}
30℃	9.26±0.10 ^{aA}	8.33±0.31 ^{bB}	5.37±0.43 ^{cC}	0.00±0.00 ^{dD}
50℃	9.26±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.26±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

Table 15. Temperature tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

TK1	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.36±0.02 ^{aA1)}	9.40±0.07 ^{aA}	9.42±0.01 ^{aA}	9.39±0.09 ^{aA}
0℃	9.36±0.02 ^{aA}	9.35±0.05 ^{aA}	9.43±0.06 ^{aA}	9.40±0.01 ^{aA}
4℃	9.36±0.02 ^{aA}	9.37±0.01 ^{aA}	9.39±0.01 ^{aA}	9.40±0.01 ^{aA}
10℃	9.36±0.02 ^{aA}	9.39±0.01 ^{aA}	9.40±0.02 ^{aA}	9.39±0.02 ^{aA}
20℃	9.36±0.02 ^{aA}	9.35±0.04 ^{aA}	8.93±0.07 ^{bB}	7.55±0.04 ^{bC}
con.	9.36±0.02 ^{aA}	9.37±0.10 ^{aA}	7.22±0.02 ^{cB}	5.67±0.16 ^{cC}
30℃	9.36±0.02 ^{aA}	8.15±0.10 ^{bB}	1.54±0.09 ^{dC}	0.00±0.00 ^{dD}
50℃	9.36±0.02 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.36±0.02 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}
TK7	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.45±0.05 ^{aA}	9.39±0.03 ^{aA}	9.41±0.01 ^{aA}	9.38±0.00 ^{aA}
0℃	9.45±0.05 ^{aA}	9.37±0.20 ^{aA}	9.48±0.01 ^{aA}	9.40±0.02 ^{aA}
4℃	9.45±0.05 ^{aA}	9.51±0.03 ^{aA}	9.47±0.08 ^{aA}	9.44±0.04 ^{aA}
10℃	9.45±0.05 ^{aA}	9.44±0.04 ^{aA}	9.40±0.06 ^{aA}	9.41±0.01 ^{aA}
20℃	9.45±0.05 ^{aA}	9.45±0.13 ^{aA}	8.43±0.08 ^{bB}	8.39±0.10 ^{bB}
con.	9.45±0.05 ^{aA}	9.49±0.09 ^{aA}	7.41±0.07 ^{cB}	6.58±0.11 ^{cC}
30℃	9.45±0.05 ^{aA}	7.38±0.41 ^{bB}	5.25±0.21 ^{dC}	0.00±0.00 ^{dD}
50℃	9.45±0.05 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.45±0.05 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}
SG4	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.32±0.21 ^{aA}	9.41±0.06 ^{aA}	9.35±0.01 ^{aA}	9.34±0.11 ^{aA}
0℃	9.32±0.21 ^{aA}	9.33±0.11 ^{aA}	9.36±0.01 ^{aA}	9.40±0.10 ^{aA}
4℃	9.32±0.21 ^{aA}	9.38±0.05 ^{aA}	9.39±0.02 ^{aA}	9.37±0.01 ^{aA}
10℃	9.32±0.21 ^{aA}	9.41±0.04 ^{aA}	9.39±0.01 ^{aA}	9.38±0.08 ^{aA}
20℃	9.32±0.21 ^{aA}	9.28±0.29 ^{aA}	9.18±0.03 ^{bA}	7.41±0.11 ^{bB}
con.	9.32±0.21 ^{aA}	9.18±0.13 ^{aA}	7.18±0.21 ^{cB}	6.19±0.23 ^{cC}
30℃	9.32±0.21 ^{aA}	6.41±0.31 ^{bB}	0.00±0.00 ^{dC}	0.00±0.00 ^{dC}
50℃	9.32±0.21 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.32±0.21 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}

Table 15. (Continued)

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

JW2	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.40±0.03 ^{aA1)}	9.38±0.05 ^{aA}	9.41±0.02 ^{aA}	9.40±0.04 ^{aA}
0℃	9.40±0.03 ^{aA}	9.41±0.01 ^{aA}	9.40±0.05 ^{aA}	9.36±0.06 ^{aA}
4℃	9.40±0.03 ^{aA}	9.42±0.04 ^{aA}	9.41±0.00 ^{aA}	9.39±0.04 ^{aA}
10℃	9.40±0.03 ^{aA}	9.41±0.03 ^{aA}	9.41±0.02 ^{aA}	9.37±0.03 ^{aA}
20℃	9.40±0.03 ^{aA}	9.43±0.02 ^{aA}	9.33±0.10 ^{aA}	8.12±0.14 ^{bB}
con.	9.40±0.03 ^{aA}	9.38±0.02 ^{aA}	7.77±0.09 ^{bB}	6.17±0.01 ^{cC}
30℃	9.40±0.03 ^{aA}	7.58±0.54 ^{bB}	4.21±0.22 ^{cC}	0.00±0.00 ^{dD}
50℃	9.40±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.40±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
GH3	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.37±0.03 ^{aA}	9.43±0.00 ^{aA}	9.33±0.05 ^{aA}	9.34±0.08 ^{aA}
0℃	9.37±0.03 ^{aA}	9.45±0.11 ^{aA}	9.37±0.05 ^{aA}	9.37±0.08 ^{aA}
4℃	9.37±0.03 ^{aA}	9.45±0.02 ^{aA}	9.46±0.02 ^{aA}	9.40±0.08 ^{aA}
10℃	9.37±0.03 ^{aA}	9.43±0.02 ^{aA}	9.41±0.02 ^{aA}	9.41±0.01 ^{aA}
20℃	9.37±0.03 ^{aA}	9.46±0.01 ^{aA}	9.41±0.07 ^{aA}	8.31±0.05 ^{bB}
con.	9.37±0.03 ^{aA}	9.54±0.02 ^{aA}	8.28±0.12 ^{bB}	7.53±0.18 ^{cC}
30℃	9.37±0.03 ^{aA}	7.48±0.25 ^{bB}	4.53±0.29 ^{cC}	0.00±0.00 ^{dD}
50℃	9.37±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.37±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
HM3	0h	24h	48h	72h
-2℃	9.39±0.10 ^{aA}	9.38±0.05 ^{aA}	9.35±0.02 ^{aA}	9.26±0.08 ^{aA}
0℃	9.39±0.10 ^{aA}	9.34±0.03 ^{aA}	9.33±0.01 ^{aA}	9.24±0.09 ^{aA}
4℃	9.39±0.10 ^{aA}	9.38±0.01 ^{aA}	9.38±0.02 ^{aA}	9.30±0.09 ^{aA}
10℃	9.39±0.10 ^{aA}	9.37±0.04 ^{aA}	9.36±0.01 ^{aA}	9.35±0.02 ^{aA}
20℃	9.39±0.10 ^{aA}	9.39±0.06 ^{aA}	9.35±0.01 ^{aA}	7.73±0.17 ^{bB}
con.	9.39±0.10 ^{aA}	9.32±0.01 ^{aA}	7.67±0.09 ^{bB}	5.19±0.32 ^{cC}
30℃	9.39±0.10 ^{aA}	8.30±0.13 ^{bB}	3.40±0.15 ^{cC}	0.00±0.00 ^{dD}
50℃	9.39±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
70℃	9.39±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

Table 16. Salt tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

UR2	0h	24h	48h	72h
con.	9.27±0.09 ^{aA1)}	9.37±0.06 ^{aA}	7.85±0.08 ^{dB}	4.86±0.07 ^{dC}
1%	9.27±0.09 ^{aA}	9.24±0.06 ^{abA}	7.88±0.05 ^{cdB}	6.63±0.17 ^{cC}
3%	9.27±0.09 ^{aA}	9.06±0.09 ^{bA}	8.12±0.16 ^{bcB}	7.16±0.04 ^{aC}
5%	9.27±0.09 ^{aA}	9.06±0.09 ^{bA}	8.17±0.16 ^{bB}	6.94±0.13 ^{bC}
7%	9.27±0.09 ^{aA}	9.02±0.05 ^{cAB}	8.72±0.17 ^{aB}	6.57±0.13 ^{cC}
9%	9.27±0.09 ^{aA}	5.57±0.05 ^{dB}	0.00±0.00 ^{eC}	0.00±0.00 ^{eC}
12%	9.27±0.09 ^{aA}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{eB}
15%	9.27±0.09 ^{aA}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{eB}
EK3	0h	24h	48h	72h
con.	9.26±0.10 ^{aA}	9.41±0.03 ^{aA}	8.52±0.19 ^{aB}	5.20±0.06 ^{dC}
1%	9.26±0.10 ^{aA}	9.33±0.05 ^{aA}	8.10±0.11 ^{bB}	6.49±0.07 ^{cC}
3%	9.26±0.10 ^{aA}	9.09±0.03 ^{bA}	8.01±0.01 ^{bB}	7.30±0.08 ^{aC}
5%	9.26±0.10 ^{aA}	9.15±0.01 ^{bA}	8.06±0.10 ^{bB}	7.26±0.10 ^{aC}
7%	9.26±0.10 ^{aA}	8.96±0.01 ^{cA}	7.53±0.29 ^{cB}	6.66±0.04 ^{bC}
9%	9.26±0.10 ^{aA}	8.76±0.07 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dC}	0.00±0.00 ^{eC}
12%	9.26±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{eB}
15%	9.26±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{eB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

Table 17. Salt tolerance of *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

TK1	0h	24h	48h	72h
con.	9.36±0.02 ^{aA1)}	9.37±0.10 ^{aA}	7.22±0.02 ^{cB}	5.67±0.16 ^{eC}
1%	9.36±0.02 ^{aA}	8.77±0.12 ^{cB}	7.16±0.10 ^{cC}	6.31±0.06 ^{dD}
3%	9.36±0.02 ^{aA}	8.39±0.03 ^{dB}	7.72±0.05 ^{bC}	7.17±0.05 ^{cD}
5%	9.36±0.02 ^{aA}	8.78±0.13 ^{cB}	7.55±0.06 ^{bC}	7.10±0.10 ^{cD}
7%	9.36±0.02 ^{aA}	9.12±0.15 ^{bA}	8.47±0.18 ^{aB}	7.52±0.08 ^{bC}
9%	9.36±0.02 ^{aA}	9.37±0.04 ^{aA}	8.57±0.16 ^{aB}	8.10±0.21 ^{aC}
12%	9.36±0.02 ^{aA}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{fB}
15%	9.36±0.02 ^{aA}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{fB}
TK7	0h	24h	48h	72h
con.	9.45±0.05 ^{aA}	9.49±0.09 ^{aA}	7.41±0.07 ^{dB}	6.58±0.11 ^{eC}
1%	9.45±0.05 ^{aA}	9.41±0.01 ^{aA}	7.86±0.19 ^{cB}	7.69±0.10 ^{cB}
3%	9.45±0.05 ^{aA}	9.00±0.05 ^{dB}	8.10±0.05 ^{bC}	7.31±0.10 ^{dD}
5%	9.45±0.05 ^{aA}	9.21±0.06 ^{cB}	8.13±0.13 ^{bC}	7.44±0.06 ^{dD}
7%	9.45±0.05 ^{aA}	9.32±0.01 ^{bB}	8.44±0.02 ^{aC}	8.10±0.04 ^{bD}
9%	9.45±0.05 ^{aA}	9.18±0.05 ^{cB}	8.59±0.18 ^{aC}	8.49±0.02 ^{aC}
12%	9.45±0.05 ^{aA}	8.62±0.01 ^{eB}	0.00±0.00 ^{eC}	0.00±0.00 ^{fC}
15%	9.45±0.05 ^{aA}	0.00±0.00 ^{fB}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{fB}
SG4	0h	24h	48h	72h
con.	9.32±0.21 ^{aA}	9.32±0.03 ^{aA}	7.18±0.21 ^{cB}	6.19±0.23 ^{cC}
1%	9.32±0.21 ^{aA}	9.35±0.05 ^{aA}	7.47±0.01 ^{bB}	6.70±0.06 ^{cC}
3%	9.32±0.21 ^{aA}	9.36±0.07 ^{aA}	7.66±0.07 ^{bB}	7.37±0.09 ^{bB}
5%	9.32±0.21 ^{aA}	9.31±0.01 ^{aA}	7.64±0.01 ^{bB}	7.26±0.07 ^{bC}
7%	9.32±0.21 ^{aA}	9.33±0.04 ^{aA}	8.01±0.08 ^{aB}	7.59±0.32 ^{aB}
9%	9.32±0.21 ^{aA}	9.34±0.12 ^{aA}	8.10±0.12 ^{aB}	7.27±0.04 ^{bC}
12%	9.32±0.21 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}
15%	9.32±0.21 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{dB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

Table 17. (Continued)

Unit: Viable Cell Counts (log CFU/mL)

JW2	0h	24h	48h	72h
con.	9.40±0.03 ^{aA1)}	9.38±0.02 ^{aA}	7.77±0.09 ^{bB}	6.17±0.01 ^{dC}
1%	9.40±0.03 ^{aA}	9.35±0.08 ^{aA}	7.88±0.09 ^{bB}	6.83±0.11 ^{bcC}
3%	9.40±0.03 ^{aA}	9.21±0.02 ^{aA}	7.82±0.04 ^{bB}	6.39±0.35 ^{cC}
5%	9.40±0.03 ^{aA}	9.28±0.18 ^{aA}	7.79±0.05 ^{bB}	6.68±0.24 ^{bcC}
7%	9.40±0.03 ^{aA}	9.29±0.09 ^{aA}	8.45±0.04 ^{aB}	7.52±0.13 ^{aC}
9%	9.40±0.03 ^{aA}	9.29±0.09 ^{aA}	8.42±0.03 ^{aB}	7.47±0.19 ^{aC}
12%	9.40±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}
15%	9.40±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{eB}
GH3	0h	24h	48h	72h
con.	9.37±0.03 ^{aA}	9.39±0.02 ^{aA}	8.28±0.12 ^{abB}	7.53±0.18 ^{bcC}
1%	9.37±0.03 ^{aA}	9.31±0.09 ^{aA}	8.40±0.24 ^{aB}	7.51±0.04 ^{bcC}
3%	9.37±0.03 ^{aA}	9.35±0.07 ^{aA}	7.93±0.03 ^{bB}	7.17±0.19 ^{cC}
5%	9.37±0.03 ^{aA}	9.30±0.12 ^{aA}	7.94±0.07 ^{bB}	7.46±0.39 ^{bcB}
7%	9.37±0.03 ^{aA}	9.34±0.02 ^{aA}	8.51±0.03 ^{aB}	8.17±0.05 ^{aC}
9%	9.37±0.03 ^{aA}	9.28±0.05 ^{aA}	8.58±0.37 ^{aB}	7.74±0.18 ^{bcC}
12%	9.37±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}
15%	9.37±0.03 ^{aA}	0.00±0.00 ^{bB}	0.00±0.00 ^{cB}	0.00±0.00 ^{dB}
HM3	0h	24h	48h	72h
con.	9.39±0.10 ^{aA}	9.23±0.02 ^{bA}	7.67±0.09 ^{cB}	5.19±0.32 ^{dC}
1%	9.39±0.10 ^{aA}	9.23±0.12 ^{bA}	8.06±0.03 ^{bB}	6.60±0.11 ^{cC}
3%	9.39±0.10 ^{aA}	8.77±0.01 ^{dB}	7.86±0.02 ^{cC}	7.48±0.06 ^{bD}
5%	9.39±0.10 ^{aA}	8.97±0.09 ^{cB}	7.90±0.08 ^{cC}	7.47±0.10 ^{bD}
7%	9.39±0.10 ^{aA}	9.18±0.01 ^{bB}	8.11±0.01 ^{bcC}	8.08±0.01 ^{aC}
9%	9.39±0.10 ^{aA}	9.38±0.01 ^{aA}	9.13±0.05 ^{aB}	8.25±0.16 ^{aC}
12%	9.39±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{eB}
15%	9.39±0.10 ^{aA}	0.00±0.00 ^{eB}	0.00±0.00 ^{dB}	0.00±0.00 ^{eB}

1) a~d, significantly different in the same column; A~D, significantly different in the same row

제 6절 분리 유산균의 기능성 평가

1. Exopolysaccharide 생성능

Exopolysaccharide (EPS)는 미생물 세포벽의 일부로 세포벽 주위에 협막을 형성하거나 세포벽 외부에 점질물 형태로 발효 중 축적되는 다당류이다. 이는 에너지원으로 이용되지는 않지만, 건조, 식균작용, 원생동물의 습식, 항생제, 독성, 삼투압 작용 등의 외부적 스트레스로부터 미생물 스스로를 보호하는 작용을 한다. 또한, 미생물로부터 가장 쉽게 다량 생성 가능한 다당류로 정제비용에 있어 경제적이며, 유산균 발효 유제품에서의 유청 분리 문제를 완화 시키고 점성을 증가시킴과 동시에 조직감을 부드럽게 하여 상업적 잠재력이 높다. 최근에는 EPS가 단순 물성 기능 소재뿐만 아니라 항암효과, 항궤양효과, 면역, 콜레스테롤 저하효과 등에 대한 보고가 되고 있어 생리 기능 소재로서 주목받고 있다[78, 79].

저온 생육능 균주 8종의 exopolysaccharide (EPS) 생성 여부를 보기 위해 5% sucrose를 첨가한 평판배지에 균주 배양액 3 μ L 씩을 분주하여 점질물 생성 여부와 형태를 관찰하였다. *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* 2종은 유사한 형태와 크기, ivory 색을 띠는 점질물을 형성하였다. 또한, *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* TK1은 yellow 색을 띠는 가장 많은 양의 점질물을 형성하였으며, TK7과 GH3는 유사한 형태와 크기, 투명한 색을 띠는 점질물을 형성하였고, SG4, JW2, HM3는 점질물을 거의 형성하지 못하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 19).

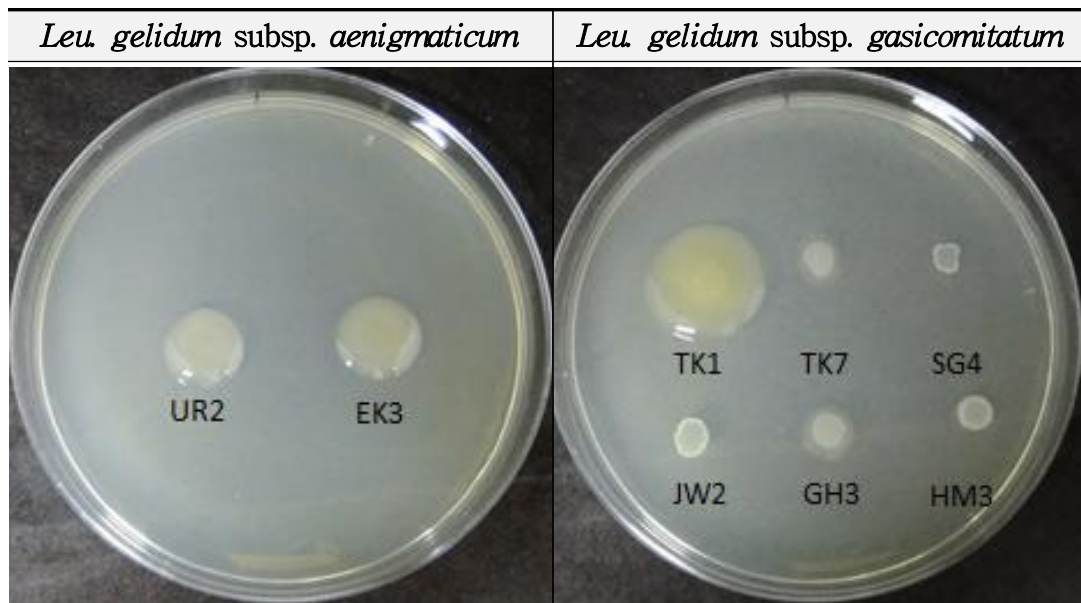


Figure 19. The sucrose plate for EPS production by psychrotrophic LAB

제 4장 결 론

김치는 대표적인 채소 발효 식품으로 특히 저온에서 발효 및 저장되는 것이 특징이다. 주재료와 부재료의 종류, 저장조건 등에 따라 유산균의 분포가 달라지는데, 우리나라의 주요 식품임과 동시에 김치의 세계화가 진행되고 있는 요즘 김치의 품질향상을 위해 김치의 발효에 관여하는 유산균을 포함한 각종 미생물의 특성 이해의 중요도가 높아지고 있다[15]. 김치 발효에 관여하는 미생물에 대해 기존에 다양한 연구가 진행되어 있으며, 이러한 연구 결과에 의하면 *Leuconostoc*속은 *Weissella*속과 함께 김치가 저온에서 발효될 때 주요 역할을 한다[10, 40, 41]. 이는 젖산, 초산과 같은 유기산과 에탄올, 텍스트란, 이산화탄소 등을 생산하여 김치에 적당한 신맛과 특 쏘는 청량감을 주어 관능적 특성을 우수하게 한다.

김치 발효에 관여하는 *Leuconostoc*속으로는 주로 *Leu. citreum*, *Leu. sakei*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. kimchii*, *Leu. carnosum*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. inhae* 등으로 알려져 있다[9, 10, 11, 12, 13, 14]. 이들 중 저온 발육 유산균으로 알려진 *Leu. carnosum*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. inhae*는 비배양학적 분석을 통해 저온 발효된 김치에서 검출된다는 연구 결과가 보고되어 있으나[10, 14, 39, 40], 배양학적 방법을 통해 균주를 분리하여 분석한 것은 다양한 연구가 이루어지지 않았다. 특히, *Leu. gelidum*과 *Leu. gasicomitatum*은 Rhakila 등(2014)의 보고에 의해 *Leu. gelidum* subsp. *gelidum*, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*, *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*으로 재분류되었다[37]. 해당 균주는 진공 포장된 육류 혹은 냉장 보관한 육류, 절임육 등을 분리원으로 한 균의 특성 분석이 주를 이루고 있으며, 채소류로부터 분리되어 진행된 연구는 미흡하다[32, 38, 42, 43]. 따라서 본 연구에서는 전국에서 수집한 저온 발효 김치로부터 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 2종, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종을 분리하고, 이의 특성을 규명하고자 하였다.

전국 7개 지역에서 7개 김치를 수집하여 저장온도 및 기간을 분석한

결과, 4°C 이하의 저온에서 발효된 김치를 수집하였으며, 저장 기간은 3개월 이하로 조사되었다. 김치의 이화학적 특성 측정 결과 평균 pH는 pH 4.21±0.19, 평균 산도는 0.89±0.20%, 평균 염도 1.88±0.30%, 평균 당도는 10.73±1.26 brix°로 나타났다. 비배양학적 방법(PCR-DGGE)을 통해 김치 시료 7종 가운데 4종의 김치에 대한 미생물 분석 결과 *Lb. sakei*, *W. koreensis*와 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 및 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 위치에서 band가 관찰되었고, EK 김치에서는 *Leuconostoc mesenteroides* 위치에서 band를 관찰할 수 있었다. 이와 유사한 결과로 Kim 등(2000)과 Park 등(2003)이 저온에서 김치가 발효될 때 *Leu. gelidum*, *Lb. sakei*, *W. koreensis*가 분포함을 보고한 바 있다[40, 59].

김치로부터 분리한 미생물을 형태학적 특성 분석과 catalase test를 통해 grouping하여 총 8종을 선정한 후 분자생물학적 동정, 생화학적 특성 분석, heme을 이용한 호기적 환경에서의 생육능과 6.5% NaCl을 포함한 배지에서의 생육능, plasmid 추출을 통해 균주를 동정하였다. 16S rRNA sequence를 분석한 결과 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 2종, *Leu. subsp. gasicomitatum* 6종으로 동정되었다. 당 대사능을 분석한 결과 분리 균주 8종은 18~21종의 당에 대해 대사능이 있는 것으로 나타났으며, 분석 프로그램을 통해 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides/dextranicum* 2로 동정되었다. Rhakila의 연구에서 명시한 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*과 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*의 다른 종의 균주와 차이를 보이는 특이적 대사 당인 L-arabinose, D-xylose, D-raffinose에 대해서는 분리 균주 8종 모두 양성을 보였으며, amygdalin, arbutin, salicin에 대해서는 음성을 보여 기존 보고와 동일한 결과를 확인하였다[37]. 하지만, 표준균주 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* LMG18811^T의 연구[43]와 달리 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*으로 동정된 분리 균주 6종은 D-galactose에 대해 음성, 2-keto-gluconate에 대해 양성을 보였으며, α-methyl-D-glucoside, gluconate에 대해 TK7, JW2가 음성을 보였고, lactose에 대해 SG4, HM3가 양성을 보였다. 육류에서 분리된 표준균주와 차이를 보이는 것을 통해 분리원에 따라 당

대사능이 다를 수 있음을 확인하였다. 또한, 실험 균주 8종 중 6종은 lactose를 대사하지 않는 것으로 관찰되어 유제품에서 분리된 유산균과 달리 김치와 같은 식물질에서 기원된 유산균은 lactose가 아닌 다른 당질을 에너지원으로 사용함을 확인할 수 있었다. Rhakila 연구의 재분류 기준 가운데 heme을 첨가하였을 때 호기적 환경에서의 생육능과 6.5% NaCl을 첨가한 배지에서의 생육능을 보는 실험을 진행하였다. 연구 보고에 의하면 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*은 heme에 의해 생육이 촉진되지 않으며, 6.5% NaCl이 첨가된 배지에서 생육을 보이고, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*은 heme에 의해 생육이 촉진되고, 6.5% NaCl이 첨가된 배지에서 생육을 보이지 않는다고 확인되었다[37]. 이를 바탕으로 실험을 진행한 결과 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum*으로 동정된 UR2와 EK3는 heme에 의해 호기적 생육이 촉진되지 않았으며, 6.5% NaCl이 첨가된 배지에서 생육을 크게 보이지 않았다. 또한, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*으로 동정된 6종 모두 heme에 의해 호기적 생육이 촉진되었으나, 6.5% NaCl이 포함된 배지에서 TK1, TK7과 SG4는 생육을 크게 보이지 않았고, JW2, GH3, HM3는 48시간 이후 생육이 증가하는 양상을 확인할 수 있었다. Heme에 의한 호기적 환경에서의 생육 여부는 기존 연구와 유사한 결과를 보였으나, 6.5% NaCl 첨가에 따른 생육능은 기존 연구와 차이가 있어 이는 균주의 분리원에 따른 차이가 있는 것으로 추측된다. 또한, 일반적으로 균주 동정에 사용하는 16S rRNA 분석에서 표준 균주와 차이가 없이 모두 100%의 상동성을 보인 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종에 대해 plasmid profile은 균주마다 상이한 것을 기반으로 plasmid를 추출하여 전기영동을 통해 관찰한 결과 TK1은 약 17 kb의 위치에서 1개의 band가 확인되었으며, TK7, JW2, GH3, HM3는 약 22 kb와 9 kb의 위치에서 2개의 band가 확인되었고, SG4는 약 17 kb, 5 kb 위치에서 2개의 band를 확인할 수 있었다. 이를 통해 plasmid를 지니지 않은 표준균주와 더불어 3개의 plasmid를 지닌 육류분리 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*과 차이가 있음을 볼 수 있었다.

분리 균주 8종에 대해 배양 온도에 따른 생육도를 관찰하였다. 기존 *Leu.*

gelidum subsp. *gasicomitatum* 연구에 의하면 4~15℃에서 생육을 보이며, 25℃가 최적온도인 반면, 30℃에서는 생육이 더디게 진행되고, 37~45℃에서는 거의 생육하지 못한다[37, 38, 43]. 이를 기반으로 분리 균주 8종 모두 -2~25℃의 저온에서 생육을 보였으며, 특히 25℃에서 최적 생육을 하고, 중온 이상의 30, 37℃에서 거의 생육하지 못하는 psychrotrophic 균주임을 확인하였다. *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* KG16-1의 연구에 의하면 pH 5.0~8.0에서 생육을 보였으며, 특히 pH 6.5에서 최적 생육을 보인 바 있다[42]. 배지의 초기 pH에 따른 생육을 관찰한 결과 분리 균주 8종 모두 공통적으로 pH 8.0에서 최대 생육을 나타내었고, pH 4.0과 pH 9.0에서는 거의 생육하지 못하였다. 배지의 초기 염 농도에 따른 생육을 관찰한 결과, 8종 모두 con. 대비 염 농도가 높아질수록 생육능이 저해되는 것을 확인할 수 있었다.

실험 균주 *Leu. gelidum*속 균주가 기존에 진공포장육, 소시지의 부패균주로 알려진 바 있어 안전성 평가에 대한 중요성이 높다고 평가하였다. 이에 용혈성(hemolysis test), 효소 활성, 항생제 내성, biogenic amine 생성능을 분석하여 김치로부터 분리된 저온 생육능 유산균 8종의 안전성 확인을 진행하였다. 용혈성 실험은 적혈구의 파괴로 인한 혈액의 산소운반 능력 저하로 빈혈 현상을 유발할 위험이 있는지를 파악하는 것으로 저온 생육능 유산균 8종 모두 음성임을 확인하였다. API zym kit를 사용하여 분리 균주 8종이 생산하는 효소를 분석하였고 기존 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 균주의 효소 활성에 대한 연구 결과[43]와 달리 분리 균주 가운데 *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum*으로 동정된 6종은 esterase, esterase lipase, lipase, acid phosphate에 활성을 보이지 않았으며, naphtol-AS-BI-phosphohydrolase, β -galactosidase에 약하게나마 활성을 확인할 수 있었다. 또한, 분리 균주 8종 모두 유해효소로 알려진 α -chymotrypsin, β -glucosidase, β -glucuronidase에 활성이 없는 것으로 나타나 효소에 의한 위험성이 없는 것으로 관찰되었다. 저온성 유산균 8종을 항생제 8종(ampicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamycin, kanamycin,

streptomycin, tetracycline, vancomycin)에 대하여 감수성을 측정한 결과 전반적으로 EFSA (2012)에서 제시한 break point보다 낮은 MIC를 보였으나 EK3의 경우 ampicillin에 대해 EFSA 규정보다 약간 높게 나와 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한, 한국인에게 BA의 섭취는 주로 김치, 장류 및 젓갈 등의 발효 식품에서부터 기인되는 것으로 알려진 바 있어 저온 숙성 김치로부터 분리한 균주 8종의 BA 생성능을 보기 위해 ornithine, histidine, tyrosine을 전구체로 하여 putrescine, histamine, tyramine 생성능을 관찰한 결과 전 균주 모두 음성으로 확인되었다.

이어서 분리 균주의 배양학적 특성 규명과 함께 안전성의 평가가 진행됨에 따라 추후 산업적으로 이용 시 특정 조건에서 안정적으로 생균수를 유지할 수 있는지에 대한 확인을 위해 내산성, 내열성, 내염성 실험을 진행하였다. 그 결과 균주 8종 모두 72시간 기준 pH 8.0, -2~10°C에서 생육이 가장 잘 유지되었으나, 염 농도에 따른 생육 유지를 본 결과 *Leu. gelidum* subsp. *aenigmaticum* 2종은 3~4%, *Leu. gelidum* subsp. *gasicomitatum* 6종은 7~9%에서 생육이 가장 잘 유지되어 두 종간의 차이를 확인할 수 있었다. 추가적으로, 다양한 기대효과가 보고되어 생리 기능 소재로서 주목받고 있는 EPS에 대한 생성능 여부를 확인하고자 5% sucrose를 첨가한 배지에서의 점질물 형성을 관찰하였다. TK1에서 가장 다량의 점질물이 관찰되었으며, 다음으로 UR2, EK3에서 유사한 형태의 점질물이 관찰되었고, TK7, GH3에서 소량 관찰되었으며, SG4, JW2에서는 점질물이 거의 관찰되지 않았다. 이를 통해 분리 균주들 가운데 EPS 생성능 균주를 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 김치로부터 분리한 저온 생육능을 지닌 *Leu. gelidum* 균주 8종에 대한 특성 분석을 수행하였다. 이는 기존에 알려진 육류 부패 균주가 아닌 김치로부터 분리한 저온성 균주의 특성과 안전성뿐만 아니라 안정성과 기능적 가능성에 대해 연구를 진행하였다는 데 의미가 있다. 따라서 실험 결과를 바탕으로 저온성 유산균의 기초 자료와 산업적 이용 가치평가에 대한 자료를 제공하여 해당 저온 발효 식품을 위한 스타터 균주를 비롯해 다양한 산업에도 적용 가능할 것으로 사료된다.

제 5장 참고문헌

1. CHO, Eun-Ju; PARK, Kun-Young; RHEE, Sook-Hee. 1997. Standardization of ingredient ratios of Chinese cabbage kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **29(6)**: 1228-1235.
2. Patra, Jayanta Kumar, et al. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: a review. *Frontiers in microbiology*, **2016(7)**: 1493.
3. Lee MK, Rhee KK, Kim JK, Kim SM, Jeong JW, Jang DJ. 2007. A survey of research papers on Korean Kimchi and R&D trends. *Journal of the Korean Society of Food Culture*, **22(1)**: 104-114.
4. <https://www.theguardian.com>
5. <https://www.health.com>
6. <https://www3.nhk.or.jp/nhkworld/en/news/>
7. Bousquet, J., Anto, J. M., Iaccarino, G., Czarlewski, W., Haahtela, T., Anto, A., & Costa Domínguez, M. D. C. 2020. Is diet partly responsible for differences in COVID 19 death rates between and within countries?. *Clinical and translational allergy*, **10(1)**: 16.
8. <https://www.kati.net>
9. Cheigh, H. S., Park, K. Y., & Lee, C. Y. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*,

34(2): 175-203.

10. Cho, J. H., Lee, D. Y., Yang, C. N., Jeon, J.I. , Kim, J. H. & Han, H. I., 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiology Letters*, **257**: 262-267.
11. Jeong, S. H., Lee, H. J., Jung, J. Y., Lee, S. H., Seo, H. Y., Park, W. S., & Jeon, C. O. 2013. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, **160(3)**: 252-259.
12. 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.
13. Kim, M., & Chun, J. 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)**: 91-96.
14. 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.
15. Park, Kee-Jai, et al. 1996. Initial control of microorganism in Kimchi by the modified preparation method of seasoning mixture and the pretreatment of electrolyzed acid-water. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **28(6)**: 1104-1110.

16. Chang, M. J., & Kim, M. H. 2000. Fermentation property of Chinese cabbage kimchi by fermentation temperature and salt concentration. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry*, **43(1)**: 7-11.
17. 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 Journal of Food Science and Technology*, **30(3)**: 644-649.
18. Jeon, Y. S., Kye, I. S. & Cheigh, H. S. 1999. Changes of vitamin C and fermentation characteristics of kimchi on different cabbage variety and fermentation temperature. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **28(4)**: 773-779.
19. 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.
20. Lee, D., Kim, S., Cho, J., & Kim, J. 2008. Microbial population dynamics and temperature changes during fermentation of kimjang kimchi. *The Journal of Microbiology*, **46(5)**: 590-593.
21. Mheen, T. I., & Kwon, T. W. 1984. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **16(4)**: 443-450.
22. No, H. K., Lee, S. H., & Kim, S. D. 1995. Effects of ingredients on fermentation of Chinese cabbage Kimchi. *Journal of The Korean Society of Food and Nutrition*, **24(4)**: 642-650.

23. Park, S. J., Park, K. Y., & Jun, H. K. 2001. Effects of commercial salts on the growth of kimchi-related microorganisms. *Journal-Korean Society of Food Science and Nutrition*, **30(5)**: 806-813.

24. Shin, D. H., Kim, M. S., Han, J. S., Lim, D. K., & Bak, W. S. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **28(1)**: 137-145.

25. Jung, J. Y., Lee, S. H., Kim, J. M., Park, M. S., Bae, J. W., Hahn, Y., & Jeon, C. O. 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Applied and environmental microbiology*, **77(7)**: 2264-2274.

26. Chang, J. Y., & Chang, H. C. 2010. Improvements in the Quality and Shelf Life of Kimchi by Fermentation with the Induced Bacteriocin Producing Strain, *Leuconostoc citreum* GJ7 as a Starter. *Journal of Food Science*, **75(2)**: 103-110.

27. 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.

28. 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.

29. 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.

30. Kim, Y. H., Kim, H. Z., Kim, J. Y., Choi, T. B. & Kang, S. M. 2005, Strain improvement of *Leuconostoc mesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on kimchi fermentation as a starter. *Korean journal of microbiology and biotechnology*, **33**: 41-50.
31. Saranraj, P., Naidu, M. A., & Sivasakthivelan, P. 2013. Lactic acid bacteria and its antimicrobial properties: a review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, **4(6)**: 1124-1133.
32. 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.
33. Pothakos V, Nyambi C, Zhang BY, 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.
34. Pothakos V, Taminiau B, Huys G, Nezer C, Daube G, Devlieghere F. 2014. Psychrotrophic lactic acid bacteria associated with production batch recalls and sporadic cases of early spoilage in Belgium between 2010 and 2014. *International journal of food microbiology*. **191**: 157 - 163.
35. Pothakos, V., Samapundo, S., & Devlieghere, F. 2012. Total mesophilic counts underestimate in many cases the contamination levels of psychrotrophic lactic acid bacteria (LAB) in chilled-stored food products at the end of their shelf-life. *Food microbiology*, **32(2)**: 437-443.

36. 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. *Food microbiology*. **39**: 61 - 67.

37. Rahkila, R., De Bruyne, K., Johansson, P., Vandamme, P., & Björkroth, J. 2014. Reclassification of *Leuconostoc gasicomitatum* as *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* comb. nov., description of *Leuconostoc gelidum* subsp. *aenigmaticum* subsp. nov., designation of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gelidum* subsp. nov. and emended description of *Leuconostoc gelidum*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, **64**(4): 1290-1295.

38. Shaw, B. G., & Harding, C. D. 1989. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **39**(3): 217-223.

39. Ahmadsah, L. S., Min, S. G., Han, S. K., Hong, Y., & Kim, H. Y. 2015. Effect of low salt concentrations on microbial changes during kimchi fermentation monitored by PCR-DGGE and their sensory acceptance. *Journal of microbiology and biotechnology*, **25**(12): 2049-2057.

40. 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.

41. Lee, S. H., Jung, J. Y., & Jeon, C. O. 2015. Source tracking and succession of kimchi lactic acid bacteria during fermentation. *Journal of food science*, **80(8)**: 1871-1877.
42. Andreevskaya, M., Hultman, J., Johansson, P., Laine, P., Paulin, L., Auvinen, P., & Björkroth, J. 2016. Complete genome sequence of *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* KG16-1, isolated from vacuum-packaged vegetable sausages. *Standards in genomic sciences*, **11(1)**: 1-12.
43. Björkroth, K. J., Geisen, R., Schillinger, U., Weiss, N., De Vos, P., Holzapfel, 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.
44. J skeläinen, E., Vesterinen, S., Parshintsev, J., Johansson, P., Riekkola, M. L., & Björkroth, J. 2015. Production of buttery-odor compounds and transcriptome response in *Leuconostoc gelidum* subsp. *gasicomitatum* LMG18811^T during growth on various carbon sources. *Applied and environmental microbiology*, **81(6)**: 1902-1908.
45. 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.
46. AOAC. 1990. Official methods of analysis 15th edition. Association of official analytical chemists, Washington DC, USA.

47. Hong, Y., & Chang, H. C. 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.

48. 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.

49. Watthanasakphuban, N., Virginia, L. J., Haltrich, D., & Peterbauer, C. 2021. Analysis and Reconstitution of the Menaquinone Biosynthesis Pathway in *Lactiplantibacillus plantarum* and *Lentilactibacillus buchneri*. *Microorganisms*, **9(7)**: 1476.

50. Jeong, D. W., Han, S., & Lee, J. H. 2014. Safety and technological characterization of *Staphylococcus equorum* isolates from jeotgal, a Korean high-salt-fermented seafood, for starter development. *International journal of food microbiology*, **188**: 108-115.

51. Jeong, D. W., Heo, S., & Lee, J. H. 2017. Safety assessment of *Tetragenococcus halophilus* isolates from doenjang, a Korean high-salt-fermented soybean paste. *Food microbiology*, **62**: 92-98.

52. 채소정, 문송희, 김은정, 장혜춘. 2019. 유산균 측정을 위한 형광측정법의 안전성 평가. *The Korean Journal of Community Living Science*, **30(3)**: 327-339.

53. Ryu, E. H., & Chang, H. C. 2013. In vitro study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from kimchi. *Annals of microbiology*, **63(4)**: 1387-1395.

54. 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.
55. 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.
56. Bargossi, E., Tabanelli, G., Montanari, C., Gatto, V., Chinnici, F., Gardini, F., & Torriani, S. 2017. Growth, biogenic amine production and tyr DC transcription of *Enterococcus faecalis* in synthetic medium containing defined amino acid concentrations. *Journal of applied microbiology*, **122(4)**: 1078-1091.
57. Diez-Ozaeta, I., Amarita, F., Lavilla, M., & Rainieri, S. 2019. Ecology of indigenous lactic acid bacteria from Rioja Alavesa red wines, focusing on biogenic amine production ability. *LWT*, **116**: 108544.
58. Kim, H.J.; Chang, H.C. 2006. Isolation and characterization of exopoly- saccharide producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **34**: 196 - 203.
59. 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.
60. Ricci G, Borgo F, Fortina MG. 2006. Plasmids from *Lactobacillus helveticus*: distribution and diversity among natural isolates. *Letters in applied microbiology*. **42(3)**: 254-258.

61. Soomro AH, Masud T. 2007. Protein pattern and plasmid profile of lactic acid bacteria isolated from dahi, a traditional fermented milk product of Pakistan. *Food Technol Biotechnol* **45**: 447-453.
62. Johansson, P., Paulin, L., Säde, E., Salovuori, N., Alatalo, E. R., Björkroth, K. J., & Auvinen, P. 2011. Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811^T, in association with specific spoilage reactions. *Applied and environmental microbiology*, **77(13)**: 4344-4351.
63. Lee Y, Chang HC. 2008. Isolation and characterization of kimchi lactic acid bacteria showing anti-*Helicobacter pylori* activity. *Microbiology and Biotechnology Letters*, **36(2)**: 106-114.
64. 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 candidates. *Journal of Applied Microbiology*, **104(4)**: 1119-1127.
65. Goldin BR. 1990. Intestinal microflora: metabolism of drugs and carcinogens. *Annals of medicine*. **22**: 43-48.
66. Heavey, P. M., & Rowland, I. R. 2004. Gastrointestinal cancer. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, **18(2)**: 323-336.
67. Rowland, I. R., & Tanaka, R. 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *Journal of Applied Bacteriology*, **74(6)**: 667-674.

68. Mathur S, and Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria a review. *International Journal of Food Microbiology*. **105**: 281-295.
69. Shalaby AR. 1996. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International*. **29**: 675-690.
70. 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.
71. Lejonic JL, Gusmini D, and Brochard P. 1979. Isoniazid and reaction to cheese. *Annals of Internal Medicine*. **91(5)**: 793.
72. Murray CK, Hobbs G, and Gilbert RG. 1982. Scombrototoxin and scombrototoxin-like poisoning from canned fish. *Epidemiology & Infection*. **88(2)**: 215-220.
73. Taylor SL. 1986. Histamine food poisoning: Toxicology and clinical aspects. *Critical Reviews in Toxicology*. **17**: 91-128.
74. Halász, A., Barath, A., Simon-Sarkadi, L., & Holzapfel, W. 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, **5(2)**: 42-49.
75. Smith CK, and Durack DT. 1978. Isoniazid and reaction to cheese. *Annals of internal medicine*. **88**: 520-521.
76. Smith TA. 1981. Amines in food. *Food Chemistry*. **6**: 169-200.

77. Pircher, A., F. Bauer, and P. Paulsen. 2007. Formation of cadaverine, histamine, putrescine and tyramine by bacteria isolated from meat, fermented sausages and cheeses. *European Food Research and Technology*. **226(1)**: 225 - 231.
78. Lynch, K. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. 2018. Lactic acid bacteria exopolysaccharides in foods and beverages: Isolation, properties, characterization, and health benefits. *Annual review of food science and technology*, **9**: 155-176.
79. Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, **12(2-3)**: 163-171.
80. 장해춘. 2019. 유전체분석기술기반 저온 김치발효 우점유산균의 기능성 특성 규명. 대전: 한국연구재단.

감사의 글

이 논문은 2019년 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (NRF-2019R1A2C1002643).