Korean J Food Preserv, 30(6), 1082-1094 (2023)
https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.6.1082
pISSN: 1738-7248, eISSN: 2287-7428

Korean Journal of Food Preservation
한국식품저장유통학회지

Research Article

Characteristics of *Leuconostoc* spp. isolated from radish *kimchi* and its immune enhancement effect

무김치에서 분리한 *Leuconostoc* 속의 특성과 면역증강 효과

Seoyeon Kwak, Seongeui Yoo, Jieon Park, Woosoo Jeong, Hee-Min Gwon, Soo-Hwan Yeo, So-Young Kim*
곽서연 · 유성의 · 박지언 · 정우수 · 권희민 · 여수환 · 김소영*

Department of Agrofood Resources, Fermented and Processed Food Science Division, National Institute of Agricultural Science, RDA, Wanju 55365, Korea

농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 발효가공식품과

Abstract The purpose of this study was to examine the characteristics of *Leuconostoc* spp. isolated from radish *kimchi* and to investigate the potential for the use of functional ingredients by evaluating enzymatic characteristics, safety, and immune-enhancing effects among the isolates, including *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 (LGG) as a control strain. All test strains exhibited β-glucosidase enzyme activity that releases β-1,4 sugar chain bonds. In addition, as a result of antibiotic resistance assay among the isolates, MIC values on 8 antibiotics were below compared to the EFSA standard, and hemolytic experiments confirmed that all showed gamma hemolysis without hemolytic ability. As a result of the antibacterial activity experiment, the *Leu. mesenteroides* K2-4 strain showed a higher activity than LGG against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus.* Additionally, the activity of the NF-kB/AP-1 transcription factor increased when the isolates were treated in macrophage RAW cells. These results were related to increasing the high mRNA expression levels on TNF-α and IL-6 by *Leu. mesenteroides* K2-4 strain to be treated at low concentration. Consequently, we suggest that it will be useful as a candidate for functional food ingredients.

Keywords radish *kimchi*, lactic acid bacteria, safety, immunity

OPEN ACCESS

Citation: Kwak S, Yoo S, Park J, Jeong W, Gwon HM, Yeo SH, Kim SY. Characteristics of *Leuconostoc* spp. isolated from radish *kimchi* and its immune enhancement effect. Korean J Food Preserv, 30(6), 1082-1094 (2023)

Received: September 05, 2023
Revised: November 07, 2023
Accepted: November 08, 2023

***Corresponding author**
So-Young Kim
Tel: +82-63-238-3610
E-mail: foodksy@korea.kr

Copyright © 2023 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

유산균은 무포자 그람양성 간균 또는 구균으로 37℃에서 가장 생육이 활발하고 45℃ 이상에서는 생육이 정지되고 60℃ 이상의 고온에서는 사멸하는 등 내열성이 없는 특징을 가지고 있다(Ann 등, 2011). 그럼에도 불구하고 자연계에 널리 분포하고 있어 전통 발효식품 제조 및 가공 시 자연 접종되어 일정한 역할을 담당하고 있는데, 선행 연구결과들에서는 이들 유산균들을 크게 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, 그리고 *Bifidobacterium* 등으로 분류되고 있다(Ann 등, 2011). 이들 유산균은 탄수화물을 혐기적으로 이용하여 젖산을 통해 식품의 저장성을 향상시키며, 식품의 조직과 향미를 개선하고(Schillinger와 Lücke,

1989), 발효식품을 통하여 섭취한 유산균은 장내로 유입된 후 장내 상피세포에 착생하게 되어 병원성 미생물 저해 및 길항작용, 암 발생률의 감소 및 면역활성의 증진 등 숙주동물에 많은 도움을 준다(Lindgen과 Dobrogosz, 1990). 이와 같은 선행연구 결과로부터 유산균들이 침채류, 유제품, 육제품 및 각종 젓갈류 등의 가공과정에서 저장성 연장의 역할에서 프로바이오틱스 소재로서 활용성이 넓어지고 있다(Lee 등, 2014).

Probiotics는 적절한 양을 투여했을 때 숙주에게 건강상의 이점을 주는 미생물로 정의되며(Sanders 등, 2008), probiotics의 주요 기능으로는 유당불내증 감소, 유해균 증식억제(Reddy 등, 1984), 장내 균총의 안전화(Attaie 등, 1987), 혈중 콜레스테롤 수치 감소, 항암 작용(Ann 등, 2011) 및 장내 환경을 개선하여 음식물의 소화와 흡수를 도우며 건강을 증진시킨다(Kim, 2002). 이들 유산균이 여러 부패성 및 병원성 미생물들에 대하여 증식억제 작용을 나타내는 것은 이들이 생산한 몇 가지 대사산물들에 의한 것으로 초산 및 젖산과 같은 유기산은 알칼리성 및 중성에서 잘 생육하는 미생물에 대하여 bactericidal 작용으로 인한 강한 항균활성을 갖기 때문으로 알려져 있다(Lee 등, 2014). 대표적인 프로바이오틱스로 이용되고 있는 유산균은 *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*(Ann 등, 2011)을 포함한 19종이 기능성소재로 활용되고 있지만, 현재까지 *Leuconostoc*속 균주는 프로바이오틱스 소재로 등록되어 있지는 않다.

Leuconostoc 속을 포함한 일부 유산균들은 sucrose을 이용하여 exopolysaccharide인 dextran을 생산할 수도 있는데, 대표적인 것이 *Leuconostoc* 속으로 dextransucrase의 작용으로 활용도가 높은 dextran을 생산하여(Zhou 등, 2018) 산업적 활용성이 높아 주목받고 있으며 흡습성, 점착성 및 열안전성의 물리화학적 성질을 가지고 있어 식품의 물성조절에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되어 있다(Santos 등, 2000). 그리고 *Leuconostoc* 균은 설탕으로부터 과당, 만니톨 등을 생산하면서 발효제품에 상큼한 맛과 단맛을 부여하는 역할을 한다(Kim 등, 2002). 유산균에 의해서 생성되는 당알코올은 화학적으로 고압, 고온조건에서 수소첨가에 의한 생산방법에 비해서 장점이 있어 이들에 의한 만니톨 생산에 관하여 많은 연구들이 보고되었으며(Saha 등, 2011), 이러한 연구들을 바탕으로 제빵 · 제과공정에서 설탕을 대신하여 당 알코올을 사용함으로써 건강지향적인 쿠키 및 케이크 제품을 제조하는 연구가 보고되었다(Ghosa 등, 2012). 한편, *Leuconostoc* 속은 내산성, 바이오제닉아민 비생성능, 항산화, 항균활성 등 기능성이 밝혀져 많은 연구자들이 주목하고 있지만, 현재까지는 국내외 건강기능성 원료로 등록되어 상용화된 사례는 알려져 있지 않다.

따라서 본 연구에서는 김치에서 가장 빈도 높게 검출되는 *Leuconostoc*속 균주들을 대상으로 효소학적, 안전성 및 기능적 특성조사를 수행하여 probiotic 소재로서 활용 가치를 평가하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 무김치 시료로부터 균주 분리 및 동정

이번 연구에서는 김치에서 유용한 신규 미생물 자원을 발굴하기 위하여 전통시장에서 구입한 무김치 2종(깍두기와 고춧가루 미포함 나박김치)을 전라북도 지역(전주와 부안)에서 2021년 수집하여 진행하였다. 각 무김치 시료를 일정량 취하여 blender로 마쇄하여 균질화 과정을 거친 후 멸균한 0.85% 생리식염수로 단계별로 십진 희석한 후, lactobacilli MRS agar(MRS, Difco, Sparks, MD, USA) 배양배지에 희석액을 50 μL씩 접종, 도말한 다음 35℃에서 48시간 혐기배양한 후, 자란 유산균 집락을 취하여 3회 이상 계대 배양하여 순수 분리하였다. 이후 유산균주들은 (주)마크로젠(Macrogen Co., Daejeon, Korea)에 미생물 동정을 의뢰하여 분석을 진행 후 이들 시험균주들은 MRS broth에 액체배양한 후 50% 글리세롤을 중층하여 사용 전까지 -70℃에서 보존하였다. 모든 시험항목에 양성대조군으로 *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103(LGG, American Type Culture Collection(ATCC), Manassas, VA, USA)를 비교균으로 구매하여 사용하였다.

2.2. 효소활성 측정

먼저 분리한 유산균주들이 보유한 다양한 효소활성을 조사하기 위하여 Api kit(ZYM, BioMerieux, Marcy-I'Etoile, France)를 이용하여 업체에서 제공해주는 분석 매뉴얼에 따라 수행하였다. MRS agar에서 24시간 배양시킨 균체를

수집하여 0.85% NaCl 멸균생리식염수로 희석하여 탁도 3-4 McFarland(BioMerieux)로 조정한 현탁액을 ZYM kit의 각 큐플에 65 μL씩 접종하여 37℃ 배양기에서 4시간 배양하였다. 분석 결과를 확인하기 위해 ZYM A와 B 시약을 각각의 큐플에 가득 채워 5분간 반응 후 control(1) 대비 색 변화를 통해 negative(-)와 positive(+)로 효소활성 보유 여부를 판정하였다.

2.3. 항생제 내성 평가

무김치에서 분리된 균주의 항생제 내성 평가를 위해 실험에 사용된 항생제는 8종으로 ampicillin, chloramphenicol, gentamycin, kanamycin, streptomycin, clindamycin, tetracycline(BioMerieux)이며, 항생제의 최소 생육저해 농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하기 위하여 ETEST®strip를 이용하여 업체에서 제공해주는 분석 매뉴얼에 따라 수행하였다. 분리 균주는 MRS 배지에 탁도 0.5 McFarland (BioMerieux)로 조정한 현탁액을 멸균된 면봉으로 접종한 후 각각의 항생제 스트립을 올려놓은 후 37℃ 배양기에서 24시간 배양하였다. 본 연구에서 항생제 8종에 대한 cut-off value는 European Food Safety Authority(EFSA, 2012)를 참고하여 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소 생육 저해 농도를 결정하였다.

2.4. 용혈성 평가

무김치에서 분리된 균주가 적혈구를 파괴하거나 분해하는 현상인 용혈성 분석은 Seo 등(2023)의 방법을 변형하여 실시하였다. 분리된 유산균을 7% sheep blood(Kisanio, Seoul, Korea)를 함유하는 MRS agar(Difc) 평판배지에 획선도말법으로 도말 후 37℃ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 후 육안을 통하여 감마용혈(γ-haemolysis, colony 주변 환 생성 없음), 베타용혈(β-haemolysis, colony 주변 투명환 생성), 그리고 알파용혈(α-haemolysis, colony 주변 녹색환 생성)을 판단하였다(Kang 등, 2020).

2.5. 항균활성 평가

무김치에서 분리한 유산균주들의 항균활성은 병원성 미생물 중 그람 양성균 2종(*Bacillus* (*B.*) *cereus* KACC 10004와 *Staphylococcus* (*St.*) *aureus* ATCC 6538)와 그람 음성균 2종(*Escherichia* (*E.*) *coli* KCTC 1309와 *Salmonella* (*Sal.*) *typhimurium* KCTC 41028)을 국립농업과학원, 생물자원센터 기관에서 각각 분양받아 사용하였고, 이들 미생물들은 tryptic soy agar(TSA, Difco) 배지에서 24시간 배양 후 병원성 미생물을 0.5 McFarland (BioMerieux)로 탁도를 맞춘 후 균액을 0.6% agar를 포함한 semi-soluble TSA(Difco)에 현탁하여 top agar plate를 제조하였다(Kim 등, 2015). 분리한 유산균주의 배양액을 0.5 McFarland(BioMerieux)로 탁도를 맞춘 후, MRS(Difco)고체 평판 배지에 5 μL 접종 후 37℃, 24시간 호기 배양하였다. MRS 고체 평판배지 위에 top agar plate를 분주 후 37℃에서 24시간 배양 후 형성된 clear zone의 지름(mm)을 측정하여 병원성 미생물에 대한 항균활성 보유 여부를 판단하였다.

2.6. 세포 생존율 측정

무김치에서 분리한 유산균주들의 면역증강 효과를 평가하기에 앞서 먼저 RAW-Blue™ cell(KCLB, Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)을 이용하여 시험물질(유산균)에 의한 세포독성 수준을 조사하였다. RAW-Blue™ cell (이하 RAW cell)의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 환원 방법을 이용하여 평가하였다. MTT 실험 원리는 세포 안에 있는 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 지질인 MTT tetrazolium이 비수용성의 청자색을 띄는 MTT formazan으로 환원되는 양을 측정하는 방법이다(Gil 등, 2018). 먼저, 96 well plate에 RAW cell을 1×10^5 cell/mL의 농도로 분주하여 24시간 배양 후 분리 유산균과 양성대조군 LGG를 각각 OD600=0.5 조정한 배양액의 생균수는 2×10^7 CFU/mL로 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL로 처리하고, control은 배지를 동량으로 처리한 이후 5% CO_2, 37℃ 조건으로 24시간 배양하여 MTT assay를 수행하였다. MTT 시약에 PBS(Gibco, Carlsbad, CA, USA)를 첨가하여 제조한 5 mg/mL 농도의 MTT 시약을 96 well plate에 200 μL씩 첨가한 후 plate를 알루미늄 호일을 이용하여 빛을 차광시켜 37℃에서 4시간 배양하여 MTT formazan

https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.6.1082

으로 환원되도록 하였다. 배양 후 유리 파스퇴르 피펫을 이용하여 배지를 제거하고 유기용매 Dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma Chemical Co., st. Louis, MO, USA)를 각 well에 150 μL 첨가하여 불용성의 formazan 결정을 용해시킨 후 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 세포 생존율은 각각의 흡광도를 대조군의 흡광도 결과값에 대한 백분율(%)로 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료의 흡광도값}}{\text{Blank의 흡광도값}} \times 100$$

2.7. NF-kB 전사인자 활성

선천성 면역반응의 중추적인 역할을 하는 NF-kB의 활성화는 대식세포에서 lipopolysaccharide(LPS)와 cytokines 같은 다양한 자극인자들에 의해 자극을 받으면 IkB (inhibitor of NF-kB)의 인산화에 의하여 활성화되어 핵 내부로 이동됨으로써 유전자들의 transcriptional activator로 작용하게 되는데(Baeuerle 등, 1988), 본 연구에서는 그람양성균에 해당되는 유산균 분리균주의 세포벽을 구성하고 있는 펩티도글라이칸(peptidoglycan)과 지단백질(lipoprotein) 등이 대식세포의 TLR2에 인식하여 활성화된 NF-κB 반응을 측정함으로 선천면역 기능을 평가하였다(Chae 등, 2005). 이번 실험에 사용한 RAW cell은 NF-κB/AP-1 reporter cell line(RAW-Blue™ cells, Waltham, MA, USA)으로 RAW 264.7 macrophages에서 유래된 세포로 NF-κB/AP-1-inducible SEAP reporter 유전자를 가지고 있기에 면역반응에 의해 자극을 받으면 활성화되어 quanti blue 지시약(InvivoGen)에 의해 색변화가 일어나 활성 여부를 판단할 수 있다(Xie 등, 2011). RAW cell은 1×10^5 cell/mL의 농도로 96 well plate에 분주하여 5% CO_2, 37℃ 조건으로 24시간 동안 배양 후, 분리한 유산균주와 양성대조구 LGG를 각각 OD600=0.5 조정한 배양액의 생균수는 2×10^7 CFU/mL로 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL의 양을 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 quanti blue 시약 200 μL와 상층액 20 μL를 혼합하여 암실에서 10분 반응시킨 후 microplate reader (SpectraMax M2, Austin, TX, USA)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다. 균주를 처리하지 않고 배지만 넣은 것을 대조군으로 사용하여 무처리구 대비 시험군의 활성화 비율로 면역증강 효과를 평가하였다.

2.8. 세포활성물질(Cytokine) 측정

대식세포에 LPS와 함께 처리하면 생성되는 세포활성물질 중 TNF-α와 IL-6의 생성량을 Gil 등(2018)의 방법을 변형하여 측정하였다. 앞에 언급된 NF-kB 시험 방법과 동일하게 세포배양 후 각각의 균주를 농도별로 처리한 후, 원심분리(1,200 rpm, 5분) 하여 상등액만을 취하여 효소결합면역흡착검사(enzymelinked Immumosorbent assay, ELISA)를 이용하는 cytokine kit(TNF-α와 IL-6 ELISA Reddy-SET-Go, Bioscience Co., SanDiego, CA, USA)로 TNF-α 및 IL-6의 발현 생성량을 측정하였다. TNF-α와 IL-6의 항체가 코팅이 되어 있는 96 well plate에 상층액 시료 100 μL를 각 well에 넣은 후 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후 상층액을 제거하고, PBS와 Tween 20(Sigma-Aldrich Co.)을 혼합하여 제조한 washing buffer로 6회 세척하였다. Detection antibody solution을 넣고 항체와 반응시킨 후, avidin과 결합된 horseradish peroxidase (HRP) enzyme을 첨가하여 상온에서 15분 동안 반응시키고, tetramethylbenzidine (TMB) solution을 넣어 HRP 효소에 대한 기질로 반응시켜 색상의 변화가 관찰되면 Stop solution(H_2SO_4)을 넣어 TMB 기질과 HRP 효소의 반응을 종결시킨 후, microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 양성대조군(LPS) 대비 증가량을 비율로 환산하여 나타내었다.

2.9. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

RAW cell에서 발현되는 분자지표인 tumor necrosis factor-alpha(TNF-α), interleukin-6(IL-6)의 유전자 발현에서 유산균주들이 미치는 영향을 알아보기 위해 Gil 등(2018)의 방법을 참고하여 RT-PCR을 수행하였다. 앞에서 cytokine assay와 동일한 방법으로 시험균주들과 macrophage을 반응시킨 후 세포만을 취하여, RNeasy plus kit(Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 다음으로 cDNA synthesis platinum

master mix(GenDEPOT, Barker, TX, USA)와 oligo dT primer를 사용하여 cDNA를 합성하여 template로 사용하였고, Lee 등(2006)의 선행문헌에서 제시한 TNF-α, IL-6 등 타깃 유전자와 housekeeping 유전자인 β-actin의 internal control 유전자 검출용 primer set(Table 1)를 업체(Cosmo Genetech, Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작하여 다음 RT-PCR 조건으로 증폭시켰다. 94℃에서 30초간 denaturation시키고, 56℃에서 30초간 annealing 시킨 후, 72℃에서 1분간 extension cycle을 40회 반복하였다(Kim 등, 2023). 마지막 extension은 72℃에서 5분간으로 하여 RT-PCR을 진행하였다. 측정하고자 하는 mRNA 양은 image lab statistical software(Bio-RAD, Mercules, CA, USA)를 사용하여 β-actin으로 수치를 정량화하여 계산하였다.

2.10. 통계처리

이번 실험을 통해 도출된 모든 연구결과들은 3회 반복 후 평균값을 산출하여 나타내었고, SPSS(version 27, Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 Duncan's multiple range test로 각 실험구 간의 유의성($p<0.05$)을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 무김치 시료로부터 균주 분리 및 동정

본 연구를 위하여 전라북도 지역에서 가정식 무김치(깍두기, 나박김치) 2종을 수집하여 MRS 생육배지에서 자란 전형적인 유산균주를 분리하여 동정하였다. 이들 분리 유산균주들은 16S rRNA 염기서열 분석결과를 통해 *Leuconostoc citreum* 1주(K1-17), 그리고 *Leuconostoc mesenteroides* 3주(K1-18, K2-1 및 K2-4)로 확인되었다(Fig. 1). Choi 등(2003)에 따르면 무김치에서 분리한 유산균들은 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 발효초기에 *Leuconostoc*속이 우점종이고, 그 다음 *Weissella*속이 우세하다고 언급하였는데, 본 연구에서도 *Leuconostoc* 유산균주들이 빈도 높게 검출되어 김치 내 우점균임을 확인할 수 있었다. 이들 분리균주는 국내외에서 식품에 사용 가능한 미생물 원료로 등록되어 있지만(Korea Food Standards Codex, 2020), 현재까지는 건강기능성원료로 등록된 사례가 없어 본 연구에서는 김치 유래 높은 빈도로 검출된 *Leuconostoc*속 분리균주를 항생제내성 평가를 통해 항생제감수성을 보유한 4균주를 대상으로 효소학적, 안전성 및 기능적 특성을 조사하였다.

3.2. 효소활성 평가

먼저 분리균주 4주에 대한 효소학적 특성을 알아보고자 API 20 zym kit를 이용하여 분석하였고 그 결과는 Table 2에 제시하였다. 모든 분리균주는 leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, 그리고 α-glucosidase 등 4종 효소들에 대하여 활성을 보였다. Jeong 등(2021)의 연구에 따르면 김치 및 젓갈에서 분리한 유산균주의 leucine와 valine arylamidase, 그리고 α-glucosidase에 대해서 활성을 나타내어 본 연구 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 한편, 분리한 균주 중 *Leu. mesenteroides* 3주(K1-18, K2-1, 및 K2-4)는 β-glucosidase 효소에 대한 활성을 나타냈으나, *Leu. citreum* K1-17 균주는 활성을 보이지 않아 종(species) 간 차이를 나타내기도 하였다. Kwun 등(2019)의 보고에서도 김치에서 분리한 *Leu. mesenteroides* MSL129 균주가 가장 우수한 β-glucosidase 효소활성을 가지고 있다고 언급하였는데, 이 효소가 β-1,4 당쇄 결합을 가지고 있는 기질로부터 포도당을 유리시키는 특성(Ahmed 등, 2017)으로 식품, 세제, 화학 등 여러 산업 분야에서 활용되고 있어 본 연구에

Table 1. Identification of lactic acid bacteria isolated from radish *kimchi*

Source	Strain	Isolate bacteria	Accession No.	Similarity
Cubed radish *kimchi*	K1-17	*Leuconostoc citreum*	LC096222.1	99
	K1-18	*Leuconostoc mesenteroides*	CP012009.1	99
Radish *kimchi*	K2-1	*Leuconostoc mesenteroides*	LC096223.1	99
	K2-4	*Leuconostoc mesenteroides*	LC096223.1	99

https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.6.1082

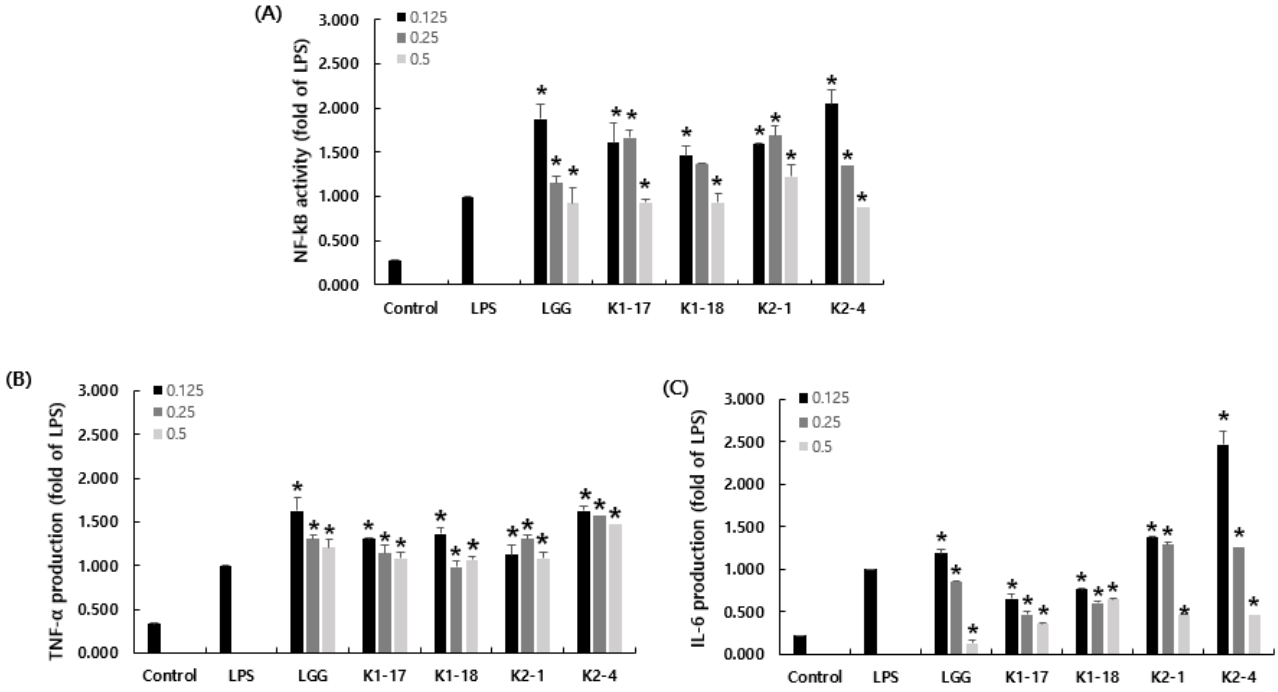

Fig. 1. NF-kB activation (A), cytokines TNF-α (B), and IL-6 (C) production in RAW-Blue cell by the leuconostoc isolates. All values are mean±SD (n=3). *p<0.05 versus control group by student's t-test.

Table 2. List of primer sets used in this study

Gene		Primer sequences	References
β-Actin	Sense	5'-GTGGGCCGCCCTAGGCACCAG-3'	Lee et al. (2006)
	Anti-sense	5'-GGAGGAAGAGGATGCGGCAGT-3'	
TNF-α	Sense	5-TTGACCTCAGCGCTGAGTTG-3	Lee et al. (2006)
	Anti-sense	5-CCTGTAGCCCACGTCGTAGC-3	
IL-6	Sense	5-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3	Lee et al. (2006)
	Anti-sense	5-TGCTGGTGACAACCACGGCC-3	

서 발굴된 *Leu. mesenteroides* 3주 역시 관련 산업분야에 이용가능성이 있을 것으로 기대된다. 그리고 모든 시험에 양성대조구로 사용된 LGG 균주의 경우 앞에서 언급한 효소들 외에도 esterase(C4), esterase lipase(C8), valine arylamidase, acid phosphatase, β-glucosidase, α-fucosidase, 및 β-galactosidase 등 7종에 대해서도 활성을 나타내었는데 이들 효소들 중 유당분해효소인 β-galactosidase에 대해 *Leu. mesenteroides* K2-1 균주만이 양성대조구와 동일하게 활성을 보여 starter로서 사용 시 유제품에 함유된 lactose를 분해하여 유당불내증을 가진 소비자들 대상 제품개발 시 활용이 가능할 것으로 사료된다(Park 등, 2021). 그 밖에 시험균주들은 alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, α-chymotrypsin, α-galactosidase, acetyl glucosaminidase, α-mannosidase, α-fucosidase, 및 β-glucuronidase 등 분해효소들에 대한 활성은 나타나지 않았는데, 특히 장에서 장내미생물에 의해 분비되는 β-glucuronidase 효소는 벤조피렌과 같은 발암성 전구물질이 간에서 무독화된 이후 장에서 다시 발암물질로 재전환시킬 때 관여하는 것으로

알려져 있어(Borriello 등, 2003), 모든 시험균주들이 독소인자인 β-glucuronidase 효소 분비능을 갖고 있지 않아 안전한 스타터 및 프로바이오틱스 소재로 활용가치가 있을 것으로 기대된다.

3.3. 항생제 내성 평가

2019년 이후 식품의약품안전처에서는 '건강기능식품의 기준 및 규격'에 제시된 바와 같이 프로바이오틱스 균주들의 항생제 내성 보유 여부를 확인하는 것을 권고하고 있다(Eun 등, 2021). 이에 본 연구에서 분리한 유산균주들을 대상으로 EFSA(2012)의 'probiotics에 대한 항생제 평가 가이드라인'에 따라 8종 항생제(vancomycin 제외)에 대한 내성 보유 여부를 측정하였고, Table 3에 그 결과를 제시하였다. 모든 시험균주들은 ampicillin, clindamycin, chloramphenicol, erythromycin, gentamycin, streptomycin, tetracycline, 그리고 kanamycin 등 8종 항생제들에 대해서 MIC 값이 EFSA 기준치 이하로 감수성이 나타났다. 그러나 일부 균주들이 kanamycin 항생제 대해서는 MIC값이 cut-off 기준값인 16 mg/L와 동일한 수준으로 다른 항생제에 비해 다소 높은 민감성을 나타내기도 하였다. 이와 관련하여 Chon 등(2020)은 세포벽 투과성의 변화를 일으키는 kanamycin에 대하여 *Leuconostoc*속이 내성을 가지고 있다고 보고하였는데, 본 연구에서 사용한 균주들은 기준에 모두 부합하였다. 한편, gentamycin에 대한 항생제 내성 평가결과에서 *Leu. citreum* K1-17 균주와 양성대조구 LGG 균주는 MIC값이 6 mg/L로 *Leu.*

Table 3. Enzymatic profiles of the *Leuconostoc* spp. isolated from radish *kimchi* using Api 20 zym kit

Enzymes	Lactic acid bacterial isolates				
	Leuconostoc citrium K1-17	*Leuconostoc mesenteroides* K1-18	*Leuconostoc mesenteroides* K2-1	*Leuconostoc mesenteroides* K2-4	*Lactobacillus rhamnosus* GG
Control	−	−	−	−	−
Alkaline phosphatase	−	−	−	−	−
Esterase (C4)	−	−	−	−	+
Esterase lipase (C8)	−	−	−	−	+
Lipase (C14)	−	−	−	−	−
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	−	−	−	−	+
Cystine arylamidase	−	−	−	−	−
Trypsin	−	−	−	−	−
α-Chymotrypsin	−	−	−	−	−
Acid phosphatase	+	+	+	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+
α-Galactosidase	−	−	−	−	−
β-Galactosidase	−	−	+	−	+
β-Glucuronidase	−	−	−	−	−
α-Glucosidase	+	+	+	+	+
β-Glucosidase	−	+	+	+	+
Acetyl glucosaminidase	−	−	−	−	−
α-Mannosidase	−	−	−	−	−
α-Fucosidase	−	−	−	−	+

https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.6.1082

mesenteroides 3균주(K1-18, K2-1 및 K2-4)의 값인 2 mg/L보다 조금 높은 값을 나타내기도 하였다. 이와 같이 본 시험에 사용한 모든 균주들은 8종 항생제에 대한 민감성을 나타내어 안전성을 확인하였지만, 균주 단위에서 항생제에 대한 민감성 반응이 달라, Kang 등(2020)이 언급한 바와 같이 대부분의 유산균들이 다양한 항생제에 대한 내재적인 내성을 가지고 있어 식품원료 또는 기능성 소재로서 활용성을 평가하기 전에 반드시 선행적으로 확인시험을 수행하여야 할 것이다.

3.4. 용혈성 평가 및 항균활성 측정

Probiotics는 체내 환경 내에서 생존하여 장관 내 유용한 생리활성을 나타내야 하며 용혈능이나 돌연변이 유발이 없어야 한다고 알려져 있다(Salminen 등, 1998).

Table 4에 제시한 것처럼 무김치에서 분리한 4주의 시험균주와 양성대조구로 사용된 LGG균은 모두 용혈능이 없는 감마 용혈 현상을 나타내는 것으로 확인되었다. Ji 등(2015)의 보고에서도 유아의 대변 및 김치에서 분리한 11종의 유산균 모두에서 감마 용혈을 나타났다고 보고하였다. 또한, Yun 등(2013) 역시 전통 장류로부터 분리한 *Leu. mesenteroides* 균주는 투명환을 나타내지 않았다고 보고하여 이번 연구 결과와 유사한 경향을 보였다. 일부 연구에서는 멸치 젓갈로부터 분리된 유산균주 중 *Pediococcus pentosaceus*와 *Enterococcus faecium*에서 혈액배지에서 집락주변이 녹색으로 나타나는 알파 용혈 현상을 나타내었다고 보고하였다(Lim 등, 2016). 그러나 현재까지는 발효식품에서 빈도 높게 검출되는 *bacilli*속 균주 중에는 *B. cereus* KCTC 3624 균주와 같이 균체 주위에 투명환이 나타나는 베타 용혈 현상을 나타낸 사례는 거의 보고되지 않았다(Lee 등, 2014). 이러한 결과들을 토대로 식품유래 유산균을 비롯한 유용 세균들 일부가 알파, 감마형 현상을 보이고 있기는 하지만, *Leuconostoc*속 균주를 포함한 대부분은 생체 세포내에서 베타형 용혈 독성을 나타내지 않는 것으로 판단된다.

다음으로 시험균주들의 병원성 미생물 4종에 대한 항균활성 평가를 진행하고 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 시험균주 중에는 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주가 그람 양성균인 *B. cereus*와 *Sta. aureus*에 대하여 각각 19.80±0.00과 20.45±0.00 mm의 억제환을 나타내었는데 이는 17.85±0.03과 18.90±0.04 mm의 억제환을 보

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) values against eight antibiotics of *Leuconostoc* spp. used in this study

Strains	Microbiological cut-off values (mg/L) of lactic acid bacteria against antibiotics							
EFSA guideline	Clindamycin	Chloramphenicol	Gentamicin	Kanamycin	Streptomycin	Ampicillin	Erythromycin	Tetracycline
Leuconostoc	1	4	16	16	64	2	1	8
Lactobacillus rhamnosus GG	0.19±0.01$^{b1)}$	2.00±0.00^{b}	6.00±0.00^{a}	16.00±0.00$^{NS2)}$	24.00±0.09^{a}	0.05±0.00^{a}	0.32±0.00	0.25±0.00
Leuconostoc citrium K1-17	0.01±0.00^{d}	4.00±0.01^{a}	6.00±0.00^{a}	16.00±0.00	20.00±0.00^{b}	0.02±0.00^{d}	0.19±0.00	0.25±0.00
Leuconostoc mesenteroides K1-18	0.19±0.07^{b}	2.00±0.01^{b}	1.00±1.00^{b}	16.00±0.00	8.00±0.01^{e}	0.05±0.00^{b}	0.38±0.00	0.50±0.00
Leuconostoc mesenteroides K2-1	0.05±0.00^{a}	2.00±0.04^{b}	1.75±0.00^{b}	16.00±0.04	12.00±0.01^{d}	0.03±0.03^{c}	0.38±0.02	0.50±0.01
Leuconostoc mesenteroides K2-4	0.03±1.00^{c}	2.00±0.00^{b}	1.75±0.00^{b}	16.00±0.00	18.00±0.00^{c}	0.05±0.01^{b}	0.25±0.00	0.25±0.00

[1)]All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters (a-e) indicate the statistical differences determined by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).
[2)]NS, not significant.

Table 5. Prevalence of anti-microbial and hemolytic activities among the isolates

LAB strains	Haemolysis			Antibacterial effect [inhibition zone, diameter (mm)]			
	α	β	γ	*Escherichia coli* KCTC 1309	*Salmonella typhimurium* KCTC 41028	*Bacillus cereus* KACC 10004	*Staphylococcus aureus* ATCC 6538
LGG	−[1)]	−	+[2)]	22.07±0.01[a3)]	17.20±0.00[b]	17.85±0.03[d]	18.90±0.04[b]
K1-17	−	−	+	19.45±0.00[c]	16.00±0.05[c]	10.02±0.00[e]	18.00±0.00[d]
K1-18	−	−	+	21.00±0.00[b]	14.10±0.00[d]	18.00±0.01[c]	18.25±0.02[c]
K2-1	−	−	+	12.96±1.00[e]	11.50±0.03[e]	18.10±0.00[b]	18.00±0.00[d]
K2-4	−	−	+	19.00±0.01[d]	17.00±0.00[a]	19.80±0.00[a]	20.45±0.00[a]

[1)]−, negative haemolysis.
[2)]+, positive haemolysis.
[3)]All values are the mean±SD (n=3). Different superscript letters (a-e) indicate the significant differences determined by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

인 양성대조구인 LGG균에 비해 높아 항균 활성을 보였다. 또한 그람 음성균인 *E. coli*와 *Sal. typhimurium*에 대해서도 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주는 19.00±0.01과 17.00±0.00 mm의 억제환을 나타내었는데, 양성대조구인 LGG균이 22.07±0.01과 17.20±0.00 mm 값을 보여 그람 음성균들에 대해서도 유사한 수준의 항균활성을 보유하고 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과와 연계하여 So 등(1999)의 연구결과에서 *Leu. mesenteroides*를 접종하여 제조한 동치미액이 그람 양성균인 *B. cereus*와 *Sta. aureus*에서 그람 음성균인 *E. coli*와 *Sal. typhimurium*보다 항균활성이 더 강하게 나타나 *Leu. mesenteroides*가 항균활성에 기여하고 있음을 시사하였다. 그 외 *Leuconostoc*속 3균주는 양성대조구 LGG와 동일하게 *Sta. aureus*에 대해서만 18.00±0.01-18.90±0.04 mm 범위의 억제환을 보여 항균활성을 보유하고 있었다. 이와 같은 결과는 Lee 등(2014)이 언급한 바와 같이 *Leu. mesenteroides* 균주들이 생성한 박테리오신 중 citricin, mesenterocin 등은 그람양성균에 대하여 항균활성을 나타낸다고 보고하여 이러한 결과들을 토대로 본 연구에서 분리한 시험균주들 역시 박테리오신 생성능을 보여하고 있을 가능성이 있어 일부 균주에서 높은 항균활성을 나타내었다고 판단된다.

3.5. NF-kB 전사인자 활성능

김치에서 분리한 유산균주가 대식세포 증식에 미치는 영향을 알아보기 위하여 먼저 세포생존율을 평가한 결과, 모든 균주들은 OD600=0.5 조정한 배양액(생균수: 2×10^5 CFU/mL)을 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL로 처리하였을 때, 무처리구(control) 대비 각각 평균 102.09±0.00, 100.12±0.03 그리고 97.31±0.01%로, 모든 처리구에서 95% 이상의 증식률을 나타내어 RAW cell에 대한 세포 독성은 나타나지 않았다(data not shown).

유산균은 프로바이오틱스로서 숙주의 면역시스템 조절하여 유익한 작용을 하는 미생물로 알려져 있고(Gil 등, 2018), 대표적으로는 *L. rhamnosus* GG균이 NF-kB의 신호전달체계를 활성화시켜 면역기능을 조절하는 것으로 알려져 있어(Zhang 등, 2005), 본 연구의 양성대조구로서 시험균주와의 비교를 위해 사용하였다. Fig. 2에서처럼 분리한 유산균주와 양성대조구 LGG를 RAW cell에 처리하여 발현되는 NF-kB/AP-1 전사인자의 활성 정도를 측정한 결과, 모든 시험균주들은 무처리구 대비하여 통계적인 유의수준($p<0.05$)으로 높은 활성을 나타내었다. 배양액을 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL로 처리하였을 때, 무처리구 대비 양성대조구 LGG의 활성능은 668, 409와 329%이었고, *Leu. citreum* K1-17 균주는 572, 591, 331%, *Leu. mesenteroides* K1-18 균주는 518, 488, 331%, *Leu. mesenteroides* K2-1 균주는 566, 600, 435%이었으며, 특히, *Leu. mesenteroides* K2-4 균주의 경우 726, 483, 310%의 활성능을 보였고, 저농도 처리구에서 높게 나타났다.

3.6. 세포활성물질(Cytokine) 측정

대식세포는 외부 항원물질이 체내에 유입되면 1차 면역반응으로 TNF-α, IL-6 등의 사이토카인을 분비하여 이들 항

https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.6.1082

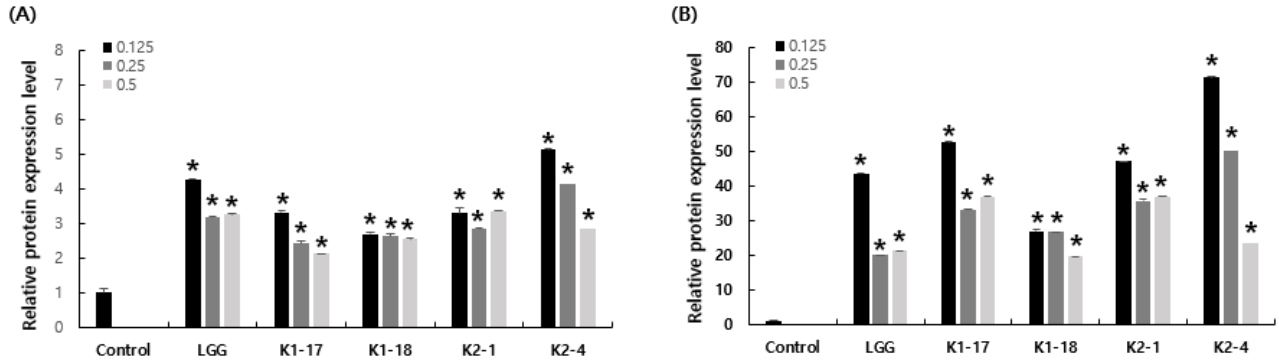

Fig. 2. Effects of lactic acid bacteria on the mRNA expression levels of TNF-α (A) and IL-6 (B) in macrophages (RAW-Blue^{TM} cells). All values are mean±SD (n=3). $^{*}p<0.05$ versus control group by student's t-test.

원을 제거하는 등 면역조절 역할을 수행한다(Gil 등, 2018).

이에 유산균주들이 대식세포를 활성화시켜 면역증강 효과를 갖고 있는지 평가하기 위하여 세포활성 물질 중 TNF-α와 IL-6의 생성량을 확인하여 Fig. 2에 그 결과를 나타내었다. 먼저, 시험균주들과 양성대조구의 처리에 의한 TNF-α 생성량을 무처리구와 비교해본 결과, 모든 시험균주들과 양성대조구는 NF-kB 활성화 결과와 동일하게 처리 농도가 낮을수록 생성량이 높았으며, *Leuconostoc citreum* K1-17, *Leu. mesenteroides* K1-18, K2-1, 및 K2-4 등 시험균주들은 각각 131, 136, 112, 및 163% 순으로 나타내었다. 이들 중 특히 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주를 0.125 mL로 낮게 처리하였을 때 다른 균주 대비 높았고 양성대조구 LGG와 비교해서도 비슷한 수준(163%)을 나타내었다. 또한, 고농도를 처리하였을 때도 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주는 양성대조구 LGG와 비교하였을 때 무처리구 대비 각각 148%와 121%로 높은 TNF-α 생성량을 나타내었다. Gil 등(2018)에 따르면 유산균주와 가죽나무 추출물의 혼합 비율이 1:0.25로 낮은 처리군에서 TNF-α 생성량이 높아 본 연구 결과와 유사한 경향을 보였다. 또한, Riina 등(2008) 연구에 따르면 인간 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)에서 사이토카인 생산을 유도할 수 있는 최적의 박테리아를 결정하기 위해, 세포를 살아있는 다양한 박테리아로 자극한 결과, 모든 박테리아가 TNF-α 생산을 유도했고, *Leu. mesenteroides* 균주가 가장 강력한 유도자였으며, 본 연구결과에서 *Leu. citreum* K1-17에 비해 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주가 TNF-α 활성을 보여 본 연구 결과와 유사한 경향을 보였다. 그리고 IL-6의 생성량을 측정한 결과에서도 *Leu. citreum* K1-17, *Leu. mesenteroides* K1-18, K2-1, 및 K2-4 시험균주들을 저농도에서 처리하였을 때 무처리구 대비 각각 299, 349, 628, 및 1,132%의 값을 나타내었는데, K2-4 균주의 경우 546%로 양성대조구인 LGG균주에 비해 통계적 유의 수준($p<0.05$)으로 높은 결과를 나타내어 최종적으로 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주를 면역증강 기능을 가진 균주로 선정하기 위하여 관련 유전자 발현량을 확인하였다.

3.7. mRNA 유전자 발현량 측정

체내 항상성이 유지되는 정상범위 내에서 사이토카인의 생성 증가는 면역세포의 활성을 증진시키는 역할을 하는데, 다양한 유산균들은 사이토카인 생성 증가를 촉진시켜, 면역활성의 증진 효과를 갖는다는 다수의 보고가 있다(Yoo 등, 2014). 앞서 수행한 시험균주 중 *Leu. mesenteroides* K2-4균주는 macrophage cell을 자극시킴으로 cytokine 생성능이 가장 높았는데 이에 대한 TNF-α와 IL-6의 단백질 발현량을 real time PCR을 사용하여 mRNA 수준에서 확인하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. TNF-α와 IL-6의 mRNA 발현량은 *Leu. mesenteroides* K2-4균주를 처리하였을 때 무처리구 대비 유의적($p<0.05$)으로 높은 생성량을 보였으며 이와 같은 결과는 단백질의 발현량 결과와 일치하였다. 이들 사이토카인들은 Kiemer 등(2001)의 보고에 따르면 TNF-α는 Th1 세포 및 대식세포로부터 생성되어 단핵구 및 여러 면역세포를 자극하여 백혈구의 활성 등에

중요한 역할을 하는 chemokine을 분비하게 해 백혈구의 활성을 통해 병원체를 제거한다고 하여 이들 사이토카인들의 상호작용으로 T세포와 B세포를 자극하여 체내 면역체계를 활성화시켜 면역증강에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 한편, *in vitro*상 세포실험에서는 *Leu. mesenteroides* K1-17의 IL-6의 면역증강 효과가 확인되지 않았으나, mRNA 수준에서 면역증진 효과를 나타내었다. 또한, 본 실험에서는 분리균주의 세포 독성 평가에서 각 plate에 0.125, 0.25와 0.5 mL로 처리하였을 때 무처리구(control) 대비 각각 평균 102, 100, 97%로 농도를 높게 처리하였을 때 live cell에 영향을 주어 활성이 떨어져서 저농도에서 면역활성이 높게 나타난 것으로 판단된다.

4. 요약

본 연구는 무김치에서 우점균인 *Leuconostoc*속의 균주 특성을 살펴보고 유용한 균주를 발굴하여 소재화하기 위해 수행되었는데, 이들 *Leuconostoc*속 4균주의 효소학적 특성, 안전성 평가, 및 면역증강 효과는 양성대조구 LGG와 함께 비교 · 분석하였다. 효소활성 평가에서 모든 시험균주들은 벤조피렌과 같은 발암성 전구물질 생성과 연관된 β-glucuronidase 효소활성을 갖고 있지 않았고, β-1,4 당쇄 결합을 유리시키는 β-glucosidase 효소활성을 나타내어 식품, 세제, 화학 등 여러 산업 분야로의 활용성을 기대할 수 있는 특징을 보유하고 있었다. 또한, 시험균주들에 대한 항생제 내성 평가결과는 8종 항생제들에 대해 MIC 값이 EFSA 기준치 이하로 감수성을 나타내었다.

용혈성 현상 실험 결과, 4종의 시험균주와 양성대조구로 사용된 LGG균은 모두 용혈능이 없는 감마 용혈 현상을 나타내었고, 병원성 미생물 4종에 대한 항균활성 결과에서도 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주가 *B. cereus*와 *Sta. aureus*에 대하여 각각 19±0과 20±0 mm의 억제환을 나타내었는데, 이는 양성대조구인 LGG균보다 높은 항균활성을 보였다. 대식세포 RAW cell에 시험균주들을 처리하였을 때 NF-kB/AP-1 전사인자의 활성도는 모든 유산균주가 처리 농도가 낮을수록 농도 의존적으로 증가하였다. 이들 세포들에 의해 염증성매개물질 중 TNF-α와 IL-6의 생성량 역시 시험균주의 처리 농도가 낮을수록 높은 값을 보였는데, 특히 *Leu. mesenteroides* K2-4 균주는 모든 항목에서 다른 균주들에 비해 뚜렷한 차이를 보였다. 또한, mRNA 수준에서 TNF-α와 IL-6 발현량 역시 통계적 유의수준($p<0.05$)으로 높은 활성을 저농도에서 처리하였을 때 유의적($p<0.05$)으로 높은 값을 나타내었다. 따라서 이들 균주들이 분비한 사이토카인들은 T세포와 B세포를 자극하여 체내 면역체계를 활성화시켜 면역증강에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

종합적으로 본 연구에서 사용한 모든 *Leuconostoc* 균주들은 효소활성과 안전성이 확인되었는데, 그 중 *Leu. mesenteroides* K2-4균주가 높은 면역활성능을 보여, 향후 면역 기능 개선을 위한 건강기능식품 개발을 위한 후보 소재로서 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgements

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJPJ014161042023)의 지원으로 수행되었습니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Kwak S. Data curation: Kwak S, Kim SY. Formal analysis: Kwak S, Yoo S, Pakr J, Jeong W, Gwon HM, Kim SY. Methodology: Jeong W, Yeo SH, Kim SY. Validation: Kwak S, Kim SY. Writing - original draft: Kwak S, Kim SY. Writing - review & editing: Kwak S, Kim SY.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Seoyeon Kwak (First author)
https://orcid.org/0009-0001-3160-8882
Seongeui Yoo

https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.6.1082

https://orcid.org/0000-0002-0106-1070
Jieon Park
https://orcid.org/0009-0006-7560-5639
Woosoo Jeong
https://orcid.org/0000-0002-1620-9373
Hee-Min Gwon
https://orcid.org/0000-0002-8808-5875
Soo-Hwan Yeo
https://orcid.org/0000-0001-7722-7447
So-Young Kim (Corresponding author)
https://orcid.org/0000-0002-9729-6869

References

Ahn SB, Lee SM, Shon MY, Kim SY, Shin MS, Lee WK. Immune-enhancing effects of *Leuconostoc* strains isolated from *Kimchi*. J Biomed Res, 13, 353-356 (2012)

Ann YG. Probiotic lactic acid bacteria. J Korean Soc Food Sci Nutr, 24, 817-832 (2011)

Chae SW. Function and activation of NF-κB in immune system. Korean J Otolaryngol, 48, 284-288 (2005)

Eun Ji, Lee JE, Jo SY, Kim SB, Yu DN, Kook M, Kim AJ. Anti-hemolytic and antimicrobial effects against multidrug-resistant bacteria of *Enterococcus faecalis* isolated from human breast milk. Microbiol Biotechnol Lett, 49, 519-527 (2021)

Fang F, Zhou Q, Yang Y, Zhao F, Du R, Han Y, Xiao H, Zhou Z. Characterization of highly branched dextran produced by *Leuconostoc citreum* B-2 from pineapple fermented product. Int J Biol Macromol, 113, 45-50 (2018)

Ghosh S, Sudha ML. A review on polyols: New frontiers for health-based bakery products. Int J Food Sci Nutr, 63, 372-379 (2012)

Gil NY, Choi BY, Park SY, Cho YS, Kim SY. Physicochemical properties of *Doenjang* using grain type *Meju* fermented by *Aspergillus oryzae* and protease. Korean J Food Preserv, 24, 697-706 (2017)

Hwang SK, Hong JT, Jung KH, Chang BC, Hwang KS, Shin JH, Yim SP, Yoo SK. Process optimization of dextran production by *Leuconostoc* sp. strain YSK. isolated from fermented kimchi. J Life Sci, 18, 1377-1383 (2008)

Kekkonen RA, Kajasto EN, Miettinen MJ, Veckman VL, Korpela RT, Julkunen IK. Probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* and Streptococcus thermophilus induce IL-12 and IFN-gamma production. World J Gastroenterol, 14, 1192-1203 (2008)

Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzyme: Fundamentals and applications. Microbiol Mol Biol Rer, 69, 306-325 (2005)

Kim CY, Lee JH, Kim BH, Yoo SK, Seo ES, Chos KS, Day DF. Kim DM. Production of mannitol using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1149. Biotechnol Bioprocess Eng, 7, 234-236 (2002)

Kim HJ, Cho SY, Kim JB, Kim HW, Choe JS, Jang HH. Effects of the *Cedrela sinensis* A. Juss. leaves on the alcohol-induced oxidative stress in the human hepatic HepG2 cells. J Korean Soc Food Sci Nutr, 31, 464-470 (2018)

Lee H, Choi HJ, Seo MJ. Characteristics of bacteriocins by lactic acid bacteria isolated from Kimchi. Curr Top Lact Acid Bac Probiotics, 2, 1-6 (2014)

Lee HJ, Hyun EA, Yoon WJ, Kim BH, Rhee MH, Kang HK, Cho JY, Yoo ES. *In vitro* anti-inflammatory and anti-oxidative effects of *Cinnamomum camphora* extracts. J Ethnopharmacol, 103, 208-216 (2006)

Lee IH, Lee SH, Lee IS, Park YK, Chung DK, Choue RW. Effects of probiotic extracts *of Kimchi* on immune function in NC/Nga mice. Korean J Food Sci Technol, 40, 82-87 (2008)

Lee JH. Safety of the genus *Enterococcus* and the development of food fermentation starters in Korea: Current status and future steps. Korean J Food Sci Technol, 52, 11-18 (2020)

Lim ES, Kim YM, Lee EW. Probiotic properties and

safety assessment of lactic acid bacteria isolated from salt-fermented anchovy. Korean J Food Sci Technol, 48, 306-316 (2016)

Lindgen SE, Dobrogosz WJ. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol Rer, 87, 149-173 (1990)

Saha BC, Racine FM. Biotechnological production of mannitol and its applications. Appl Microbiol Biotechnol, 89, 879-891 (2011)

Sanders ME. Probiotics: Definition, sources, selection, and uses. Clin Infect Dis, 46, 58-61 (2008)

Santos M, Teixeira JA, Rodrigues A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). Biochem Eng J, 4, 177-188 (2000)

Schillinger U, Lucke FK. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Appl Environ Microbiol, 55, 1901-1906 (1989)

Seo E, Woo JB, Seo M, Woo J. *In vitro* safety and efficacy of probiotics mixture on carbohydrate digestion inhibition. Korean J Food Preserv, 30, 538-545 (2023)

Seo YS, Shin KS. Immune system-stimulating activities of mucilage polysaccharides isolated from *Opuntia humifusa*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 95-102 (2012)

Zhou Q, Feng F, Yang Y, Zhao F, Du R, Zhou Z. Characterization of a dextran produced by *Leuconostoc pseudomesenteroides* XG5 from homemade wine. Int J Biol Macromol, 107, 2234-2241 (2018)

https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.6.1082