

김치의 저온 발효 중 미생물 변화 양상

박정아 · 허건영 · 이정숙 · 오윤정 · 김보연 · 민태익 · 김치경¹ · 안종석*

한국생명공학연구원, ¹충북대학교 미생물학과

분자 생물학적 방법인 DGGE를 이용하여 저온에서 김치가 발효되는 동안 관여하는 미생물의 다양성과 변화양상을 분석하였다. 김치를 저온(4°C)에서 발효시키는 60 일 동안 5 일 마다 시료를 채취하였으며, 채취한 김치 시료에서 genomic DNA를 추출하여 실험을 수행하였다. 김치 시료 genomic DNA로부터 16S rDNA의 V3 영역을 증폭하여 DGGE를 수행한 결과에서 관찰된 amplicon들의 염기서열을 분석한 결과 저온에서 김치가 발효되는 동안 젖산균들이 주요 미생물 군집으로 나타났으며, 그 중에서도 *Weissella koreensis*가 발효 전 과정 동안, *Lactobacillus sakei*의 경우는 발효 10 일째부터, 그리고 *Leuconostoc gelidum*은 발효 30 일째부터 amplicon들의 농도가 진하게 나타나 이들이 저온에서 김치 발효 과정 동안의 우점종 균주들임을 알 수 있었다.

Key words □ DGGE, kimchi, lactic acid bacteria, 16S rDNA

김치는 각종 채소류를 소금에 절여 젖갈류 및 적절한 부재료를 혼합하여 발효, 숙성시킴으로써 독특한 향미와 질감을 가지게 하는 우리나라 고유의 전통 발효 식품이다. 이런 김치는 사용하는 재료와 제조 방법 및 지역에 따라 그 종류가 매우 다양하며, 그 맛의 독특함과 젖산균에 의한 각종 암의 억제효과와 면역증강효과 등의 영양학적 가치가 인정되면서 김치에 대한 관심이 국제적으로도 높아지고 있다(2). 근래에 들어 국내의 여러 연구자들에 의하여 김치 발효에 관여하는 미생물들에 대한 연구가 본격화되면서 다양한 젖산균들이 김치의 발효에 관여한다는 사실을 확인하였으며(3), 특히 이들 젖산균들 중에서도 *Leuconostoc* 속의 젖산균들이 김치를 숙성시켜 풍미를 향상시키고 적숙기 이후에는 *Lactobacillus* 속의 젖산균이 주로 관여하여 김치의 산패에 관여한다고 알려져 있다(15). 또한, 저온에서 천천히 숙성시킨 김장김치가 여름철의 숙성 발효된 김치보다 풍미가 뛰어나다는 경험적인 사실로부터 온도에 따라 김치 발효에 관여하는 미생물들의 다양성에 상당한 차이가 있으며 김치의 풍미에는 저온 발효 시에 관여하는 미생물들이 크게 작용하는 것으로 추정하여 저온에서 발효시킨 김치에 존재하는 미생물들을 분리한 결과, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 및 *Lactobacillus bavaricus*가 우점종으로 나타났다고 보고된 바 있다(1).

이와 같이 김치 발효 미생물들에 대한 연구는 지금까지 김치 시료에서 미생물을 분리한 후 생리학적 및 형태학적 분석을 기초로 한 전통적인 방법들에 의해 이루어져 왔다. 그러나 전통적인 방법은 실제 조건과 같은 인공배지를 만들 수 없어 존재하는 모든 미생물들을 배양하지 못하며, 특이적인 선택배지의 부재 및

배지 상에서의 미생물의 형태에 따른 동정의 한계 등으로 인하여 미생물들의 정확한 분류와 동정에 한계를 가지고 있다(5). 최근 이러한 한계를 해결하고자 전통적인 방법에 의한 분류 및 동정법에 비해 단기간에 분석이 가능한 방법으로 분자생물학적 방법이 활발하게 사용되고 있다(9). 미생물의 생태 및 동정에 관한 분자생물학적인 방법은 미생물의 ribosomal DNA (rDNA) 영역에 대하여 주로 연구가 진행되고 있는데, 미생물의 rDNA 영역은 균주들 사이에서 높은 상동성을 나타내는 영역으로써 균주들 간의 생태학적인 관계를 규명하기에 유용하다. 특히 16S rDNA 영역은 수많은 미생물들로부터 그 염기서열이 밝혀져서 database화되어 있어 미생물의 생태 및 동정에 유용하게 이용되고 있다.

특히, Ampe 등(6), Randazzo 등(18)의 연구자들에 의해 전기영동시 겔 내에 존재하는 변성제의 농도 구배에 따른 핵산의 이중나선 구조와 변성구조, 즉 염기서열이 가지는 melting temperature (T_m) 값의 차이에 의해 핵산의 이동속도가 달라지는 점을 이용한 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)를 사용하여 발효 식품에서의 미생물 생태 연구를 시도하였다(8,14).

본 연구에서는 김치의 풍미를 좋게 하는 발효 온도라고 추정되는 4°C에서 김치가 발효되는 동안 김치의 발효에 관여하는 미생물들의 동태를 DGGE 기법을 이용하여 관찰함으로써 기존의 배양 의존적인 방법에서 확인하지 못했던 발효기간에 따른 정성, 정량적인 미생물들의 변화추이와 미생물들의 다양성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

김치 시료의 제조

본 실험에서 사용한 배추, 쪽파, 마늘, 생강, 고춧가루는 대전 유성구 어은동 소재의 한화 스토아에서 구입하여 사용하였고, 소

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-860-4312, Fax: 042-860-4595
E-mail: jsahn@kribb.re.kr

Table 1. Components of Chinese Cabbage kimchi

| Ingredients | Content |
|-------------------------|---------|
| Raw Chinese cabbage | 100 g |
| Sugar | 1 g |
| Green onion | 4 g |
| Garlic | 2 g |
| Ginger | 1 g |
| Red pepper powder | 2 g |
| Fermented anchovy sauce | 1.4 ml |

금은 정제염을 사용하였으며 짓갈은 (주)하선정 종합식품에서 제조한 멸치 액젓을 사용하였다. 배추는 흐르는 물에 깨끗이 씻어 3×4 cm 정도의 크기로 썰어 10% 소금물 (150 ml/배추 100 g)에 2 시간동안 절인 후 흐르는 물에 행군 다음 체를 이용하여 물기를 제거하였으며 최종적으로 담근 배추의 염도가 2%가 되도록 소금을 첨가하였다. 소금에 절인 배추에 Table 1의 조성대로 부재료를 넣고 버무려 김치를 제조하였다(4). 담근 김치는 비닐팩 (50 cm×10 cm×12 cm)에 700 g 씩 담아 공기가 없도록 밀봉한 후 비닐팩의 모양이 변형되지 않도록 플라스틱 용기에 넣어 4°C의 항온기에서 60 일간 발효시켰다. 발효 기간동안 5 일마다 700 g의 김치를 채취하여 거르로 1 차 걸러 김치의 고형물을 제거하고 filter paper (Whatman, No. 1)를 사용하여 재차 거른 후 -70°C에 보관하여 시료액으로 사용하였다.

김치 시료의 pH 측정

김치 발효 60 일 동안 5 일 마다 김치 시료의 pH를 pH/ion meter (Fisher Scientific, model 25, Denver Instrument, Arvada, USA)로 측정하였다.

김치 시료로부터 핵산 추출

김치 시료로부터 total genomic DNA를 추출하기 위하여 Miller 등(16)의 방법을 다음과 같이 변형하여 이용하였다. 우선 김치 시료액 5 ml를 원심분리 (12,000×g, 10 분)하여 얻은 침전물에 STES 완충용액 (0.5 M NaCl, 0.2 M Tris-HCl, 0.01 M EDTA, 1% SDS, pH 7.5) 400 µl, 0.1 mm zirconia glass bead (Biospec, Bartlesville, USA) 200 mg을 첨가하고, microtube agitator (Finepcr Co. Seoul, Korea)를 이용하여 2,000 rpm으로 5 분 동안 진탕하여 세포벽을 파쇄하였다. 세포 파쇄물은 원심분리 (12,000×g, 5 분) 하여 제거한 후, 상층액을 취하여 phenol : chloroform : isoamylalcohol (P : C : I = 25 : 24 : 1) 용액과 chloroform : isoamylalcohol (C : I = 24 : 1) 용액을 차례로 처리하였다. 상층액에 2 배량 (v/v)의 99% 에탄올과 1/10 배량(v/v)의 3 M sodium acetate (최종 농도 0.3 M)를 첨가하여 -20°C에서 10 분간 정치하여 DNA를 침전시켰다. 침전된 DNA는 원심분리 (12,000×g, 20 분)한 후, 70% 에탄올로 1 회 세척하여 감압 건조하였다. 추출된 DNA는 적당량의 TE 완충용액 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 현탁한 후, 0.8% 아가로스 겔에서

전기영동하여 확인한 다음 QIAEXII Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 아가로스 겔로부터 추출하여 -20°C에 보관하였다.

PCR 증폭

김치에 존재하는 미생물들의 다양성을 분석하기 위하여 김치 시료로부터 추출한 DNA에 대하여 16S rDNA 염기서열을 touchdown-PCR을 수행하여 증폭하였다(17). PCR의 주형으로는 김치 시료로부터 직접 추출한 genomic DNA를 사용하였다. PCR에 이용된 프라이머는 16S rDNA의 V3 영역의 염기서열을 증폭하기 위하여 40 bp의 GC clamp가 포함된 gc338f (5'-CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGGCACGGGGG GACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (6)을 바이오니아사(Bioneer, Seoul, Korea)에 주문 제작하여 사용하였다. PCR 반응은 100 ng의 주형 DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 5 pM primer, 그리고 1 U의 Taq polymerase를 첨가하여 최종 부피가 20 µl 되도록 하였다.

PCR 반응 조건은 94°C에서 5 분간 초기 열 처리한 후, 94°C에서 1 분 동안 변성시키고 annealing 온도는 초기에 65°C에서 시작하여 매 2 cycle 마다 1°C씩 감소되도록 설정하고 55°C에 도달하면 15 cycle을 더 수행하도록 하여 1 분간 반응시키고 신장을 위하여 72°C에서 1 분간 반응시킨 후 최종적으로 72°C에서 10 분간 처리하고 반응을 중단시켰다. PCR 증폭산물은 0.8% 아가로스 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

PCR 증폭산물들의 DGGE 분석

Touchdown-PCR을 수행하여 얻은 PCR 증폭산물은 BioRad Dcode System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)으로 DGGE를 수행하여 분석하였다. Denaturing gradient gel은 7.5%의 polyacrylamide (37.5 : 1=acrylamide : bisacrylamide)에 urea와 formamide 변성제를 20%에서 50%까지 농도구배가 연속적으로 형성되도록 첨가하여 제작하였다. 이와 같이 제작된 겔에 touchdown-PCR을 수행하여 얻은 증폭산물 20 µl를 loading하여 1×TAE 완충용액 (40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60°C, 60 V로 16 시간 동안 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 겔은 SYBR GREEN I (Sigma, St. Louis, USA)을 사용하여 염색한 후 Image analyzer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)로 관찰하였다.

Type amplicon들의 염기서열 분석

Denaturing gradient gel 상에서 위치가 다른 밴드들로부터 DNA 단편들을 회수하기 위하여 먼저 각각의 밴드들을 자른 후 멸균된 3차 증류수 10 µl를 첨가하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치한 다음 원심분리(12,000×g, 10 분)하여 상층액을 취하였다. 각 밴드에서 회수한 DNA에 대해 프라이머 gc338f와 518r을 가지고 touchdown-PCR을 수행한 후 증폭된 PCR 산물들은 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여

정제하였다.

정제된 PCR 산물들은 ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster, USA)를 사용하여 반응시킨 다음 automatic DNA sequencer (model 377; Applied Biosystems, Foster, USA)를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 Blast search와 RDP (www.rdp.cme.msu.edu)의 상동성 검색 프로그램을 이용하여 분석하였다. Distance matrix는 PHYLIP package의 DNADIST program을 사용하여 계산하였고, 계통수는 같은 package의 NEIGHBOR program의 neighbor-joining method를 사용하였다. 16S rDNA들의 연관성은 PHYLIP package의 SEQBOOT, DNADIST, NEIGHBOR와 CONSENSE program을 사용하여 평가하였다(9,11).

결 과

김치 시료의 pH 변화

4°C에서 배추김치가 발효할 때의 pH 변화를 조사한 결과는 Fig. 1과 같았다. 배추김치를 담근 직후에는 pH가 4.7이었고, 발효 10 일째까지 증가하여 pH 5.5에 도달 한 후 낮아지기 시작하여 발효 20 일째까지 4.4로 낮아졌다. 그 후 발효 60 일까지 pH가 4.2 정도로 유지되었다.

김치 시료의 PCR-DGGE 양상

발효 시간별로 채취한 김치 시료들로부터 전체 DNA를 추출한 다음 프라이머 gc338f와 512r을 사용하여 touchdown-PCR을 수행하여 얻은 PCR 산물들은 아가로스 겔상에서 예상했던 크기의 약 200 bp 위치에서 단일 밴드를 형성하는 것을 확인할 수 있었고 (데이터 미제시), 이들 PCR 산물들을 DGGE에 의해 분리한 결과는 Fig. 2와 같았다. DGGE profile에서는 겔상에서 다른 이동도를 나타내는 다양한 밴드들을 관찰할 수 있었고 이 밴드들

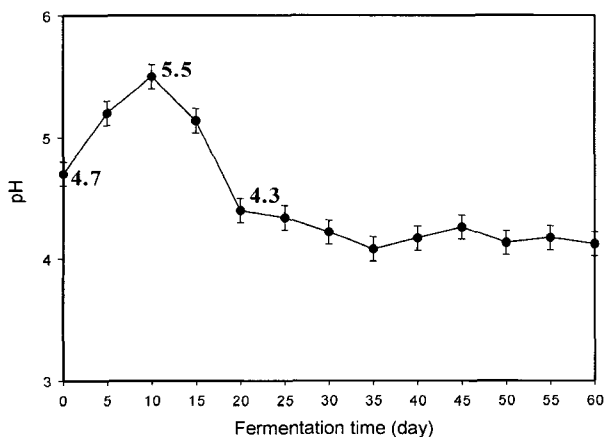


Fig. 1. Changes of pH during fermentation of Chinese Cabbage kimchi at 4°C.

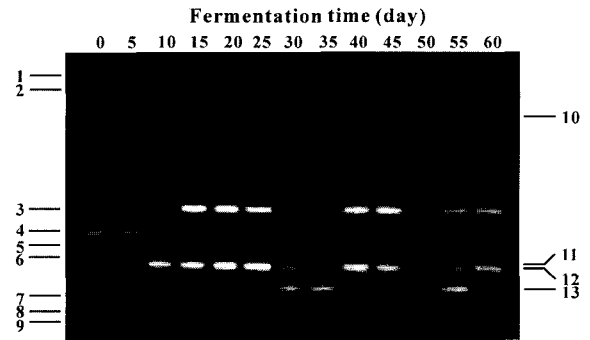


Fig. 2. DGGE profile of 16S rDNA fragments from kimchi samples. The numbers of bands are same to the numbers in Table 2.

Table 2. Identity of the bands obtained from DGGE profile of kimchi samples

| Band No. ^a | Closest relative | % identity ^b |
|-----------------------|--|-------------------------|
| 1 | <i>Leuconostoc citreum</i> | 88 |
| 2 | <i>Leuconostoc citreum</i> | 98 |
| 3 | <i>Weissella koreensis</i> | 100 |
| 4 | <i>Leuconostoc citreum</i> | 100 |
| 5 | <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 98 |
| 6 | Uncultured bacterium | 95 |
| 7 | Uncultured gamma proteobacterium | 93 |
| 8 | <i>Pseudoalteromonas sp.</i> | 97 |
| 9 | Uncultured bacterium | 95 |
| 10 | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | 95 |
| 11 | <i>Lactobacillus sakei</i> | 99 |
| 12 | <i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> | 99 |
| 13 | <i>Leuconostoc gelidum</i> | 100 |

^aBands were extracted from the DGGE gel shown in Fig. 2. ^bPercentage of identical nucleotides between the sequences retrieved from the DGGE gel and the closet relative found in GenBank or RDP. Comparison was made using partial 16S rDNA sequences only (around 180 bases, corresponding to the region sequenced).

의 염기서열을 분석하여 NCBI 및 RDP database를 바탕으로 상동성을 비교 검색한 결과 Table 2와 같이 젖산균들이 김치내에서 주요 미생물 군집을 이루고 있는 것을 확인하였다. *Leuc. citreum*, *Leuc. mesenteroides*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. gelidum*과 같은 *Leuconostoc* 속에 속하는 균주들, *Lb. sakei*와 같이 *Lactobacillus* 속에 속하는 균주 및 *W. koreensis*와 같은 *Weissella* 속에 속하는 균주들이 확인이 되었으며, 배양에 의존적인 방법에 의하여 아직까지 분리되지 않은 미생물들도 김치의 발효에 관여하는 것을 확인할 수가 있었다. 발효 초기에는 김치의 재료에 존재한 많은 균주들이 확인이 되었는데 5 일 이후 그 수가 현저히 줄어드는 것을 관찰하였다.

Leuc. citreum (Band No. 4)은 0~10 일에서 관찰되어졌으며 *Leuc. mesenteroides* (Band No. 5)는 0~25 일에 밴드가 나타나

김치 발효 초기에 관여하는 젖산균으로 사료된다. 30 일 이후부터는 저온성 균주로 알려진 *Leuc. gelidum* (Band No. 13)이 나타나 발효 60 일까지 지속적으로 존재하는 것을 확인할 수 있었다. *Leuc. pseudomesenteroides* (Band No. 12)의 경우에도 30~60 일에 나타나서 발효후기에 관여하는 것으로 보이나 다른 우점종 균주들에 비해선 상대적으로 밴드가 미약하여 우점종은 아닌 것으로 확인이 되었다.

한편, *W. koreensis* (Band No. 3)와 *Lb. sakei* (Band No. 11)의 경우는 발효기간 내내 다른 균주들에 비해 높은 농도의 수준으로 꾸준히 나타나서 저온에서 김치가 발효되는 동안 김치 내에 존재하는 미생물들 중 가장 높은 분포를 가지는 우점종들로 관찰되었다.

표준균주와 김치 시료의 DGGE 양성 비교

DGGE profile에서 16S rDNA 유래의 각 밴드들에 대하여 염기서열을 분석하여 확인한 결과는 200 bp의 짧은 PCR 단편으로부터 상동성 검색을 통하여 얻은 결과로써 실제 균주들의 16S rDNA로부터 얻은 PCR 단편들과 DGGE 겔 상에서 상호 비교하여 볼 필요성이 있었다.

DGGE profile에서 우점종을 차지하는 것으로 확인된 균주들의 표준 균주들을 한국 유전자 은행(KCTC)로부터 분양받아 MRS (1% Peptone, 1% Beef extract, 1% Yeast extract, 2% Glucose, 0.2% K_2HPO_4 , 0.2% NH_4 -citrate, 0.5% Na-acetate, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 6.6) 배지에 배양한 후 genomic DNA를 추출하여 김치 시료로부터 얻은 DNA와 함께 touchdown-PCR을 수행하였다. 각각의 표준 균주들과 김치 시료 DNA 유래의 PCR 증폭산물들을 가지고 DGGE를 수행한 결과, Fig. 3에서 보는 바와 같이 김치 시료 DNA 유래의 16S rDNA

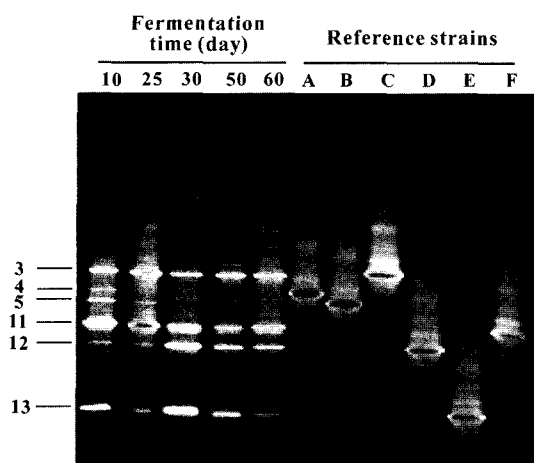


Fig. 3. Comparison of DGGE profile of 16S rDNA fragments from reference strains with kimchi samples. Lanes: A, *Leuc. citreum* KCTC 3526^T; B, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505^T; C, *W. koreensis* KCTC 3621^T; D, *Leuc. pseudomesenteroides* KCTC 3652^T; E, *Leuc. gelidum* KCTC 3527^T; F, *Lb. sakei* KCTC 3603^T. The numbers of bands are same to the numbers in Table 2.

밴드들의 위치와 표준 균주 DNA 유래의 밴드들의 위치가 동일함을 관찰하였다.

고 찰

우리나라 고유의 전통 발효 식품인 김치가 세계적인 발효 식품으로 각광을 받고 있는 상황에서 김치의 산업화를 위해 품질의 균일화와 저장성 증진 등과 같은 문제의 해결이 요구된다(10). 이런 문제의 해결을 위한 기초 자료로써 김치 제조의 발효 과정 중에 관여하는 각 미생물들의 작용을 분석하고자 본 실험에서는 분자생물학적 방법인 DGGE를 이용하여 16S rDNA를 분석대상으로 하였다. 또한, 전통적으로 저온에서 제조한 김치의 풍미가 우수함에 착안하여 저온에서 김치가 발효되는 동안 관여하는 미생물들의 변화양상을 관찰하였다.

발효식품에서의 미생물 생태를 분석함에 있어 무엇보다 중요한 단계는 시료로부터 존재하고 있는 모든 미생물 유래의 DNA와 RNA를 추출하는 것이다(20). Phenol과 chloroform을 처리하여 시료의 지방과 단백질을 제거하고 bead beater를 이용하여 미생물의 세포벽을 파쇄하는 것은 매우 효율적이었으며 PCR을 하기 위한 DNA의 순도도 높았다(12,21).

Fig. 1에서 보는 바와 같이 4°C에서 김치를 발효시키는 동안 발효 초기인 10 일째까지 pH가 5.5로 증가하는 현상이 나타나는데, 이것은 김치 재료에 존재하고 있는 미생물 및 김치 재료로부터 세포질 용액 등이 용출되어 나오는 현상에 의한 것으로 추정되어 진다. 김치 발효 10 일째부터는 점차적으로 젖산균들이 김치 내에서 우점종을 차지하게 되어 미생물 다양성에 큰 변화를 가져오게 되며, 이들이 유기산을 분비하여 김치의 pH를 낮춤으로써 발효 20 일째까지 pH가 급속하게 떨어지게 되는 것으로 추정된다(Fig. 2, Fig. 3, Table 1). DGGE의 결과 발효초기에 호기성 세균을 비롯해 다양한 미생물들이 관찰되었지만, 발효하는 동안 주로 나타난 미생물들은 젖산균들이었다. 이들 젖산균들은 김치재료 중 당분을 분해하여 젖산과 유기산을 생성하여 김치의 숙성을 일으키는 것으로 알려져 있다. 지금까지 배양방법에 의한 연구에서는 발효초기 우점종으로 동정된 *Leuc. mesenteroides* 균주가 발효 초기에 많이 번식하여 젖산과 CO₂를 많이 생성하여 김치 국물을 산성으로 만들고 혐기 상태로 해줌으로써 호기성 균의 생육을 억제한다고 추정하였다(15). 그러나 본 연구의 결과 DNA 유래의 DGGE의 상에서 *Leuc. mesenteroides*는 김치 내에서 우점종을 점하고 있지 않은 것으로 나타났으며 김치가 발효되는 동안 중요한 작용을 하지는 않는 것으로 추측된다. 그리고 김치 발효 전과정 동안 DNA 유래의 DGGE profile에서 다른 균주들에 비하여 상당히 높은 16S rDNA gene 수준을 보이는 균주들은 1°C 이하에서도 생장이 가능한 것으로 알려진 저온성 균주인 *Leuc. gelidum* (19)과 최근에 김치로부터 새로이 분리된 *W. koreensis* (13)로서 이들 균주들이 김치가 저온에서 발효되는 동안 중요하게 작용하는 우점종이라는 새로운 사실을 알았다. *Lb. sakei*의 경우 김치의 pH가 떨어지기 시작하는 시기인 발효 10 일 이후부터 유전자 수준이 높게 나타나는 것을 관찰 할 수 있

었다. 김치의 산패와 연부현상에 관여하는 것으로 알려진 *Lb. brevis*와 *Lb. plantarum* (1,15)은 DGGE profile에서 발견되지 않았는데 이들은 김치의 저온 발효와 크게 관련성이 없거나 아니면 발효 기간이 상당히 경과한 뒤 충분히 pH가 떨어진 후에 나타나는 균주들일 것으로 추정된다. DGGE에 의한 방법은 배양에 의한 방법보다 정성적, 정량적인 면에서 월등했다. 우점종으로 나타난 *W. koreensis*와 *Leuc. gelidum*의 경우 배양법에 의해서는 그 중요성이 보고 된 적이 없었으나, DGGE 결과를 통해서 이 균들이 저온에서 김치가 발효되는 동안 활발히 활동하는 균주들인 것으로 관찰되었다. 그러나 이 DGGE 방법은 낮은 분포를 보이는 균집의 경우 증폭되는 과정에서 검출되지 않을 가능성도 있으며 시료로부터 DNA와 RNA를 추출 시에 환경 상에서의 분포도와는 상관없이 미생물 자체의 특성에 의하여 다른 미생물에 비하여 핵산의 추출이 어려워 발생하는 오차와 PCR로 증폭시키는 동안 mismatch에 의해 오류가 발생할 수 있으며, 무엇보다 200 bp의 염기서열을 가지고 분석을 하기 때문에 하나의 amplicon에 대하여 여러 후보 균주들이 동정되는 결과가 나와 표준 균주들과 다시 비교해야 등의 문제가 발생하였다(5,7,10). 따라서, 기존의 배양법에 의해 관찰되었던 결과에서 김치가 발효되는 동안 주로 관여하는 젖산균에 속하는 것으로 알려진 *Streptococcus*와 *Pediococcus* 속의 균주들이 전혀 검출되지 않은 것은 이러한 오차에 의한 결과이던지 아니면 이들 균주들이 저온발효 김치 중에서 아주 미약하게 존재하지만 배지 상에서의 성장이 왕성하여 나타난 결과로 사료된다.

김치 발효에 주로 관여하는 미생물 균집으로 알려진 젖산균은 요구르트, 치즈, 발효시킨 채소 음식, 발효된 고기, 와인, 맥주, 빵 등의 제조시에 스타터로써 산업에 많이 사용되고 있으며 건강에 유익한 균주로써 식품이나 의약품 산업에서 시장성이 증가되고 있다(10). 김치가 저온에서 발효되는 동안에 *W. koreensis*, *Leuc. gelidum*, 그리고 *Lb. sakei* 균주들이 우점종으로서 김치의 발효에 활발히 관여하여 저온 발효 김치의 품미에 중요한 작용을 할 것으로 추측되어지며, 이들 균주들을 저온 발효 김치를 위한 스타터 균주로 사용이 가능하리라 예측할 수 있다.

감사의 말

본 연구는 과학기술부의 21세기 프런티어사업인 미생물유전체 활용기술개발사업단의 연구비와 중점생명공학실용화사업단의 연구비 그리고 한국생명공학연구원의 연구비 지원에 의해서 이루어 졌으며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 소명환, 김영배. 1995. 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 동정. 한국식품과학회지 27, 495-505.
2. 안순철, 김태강, 이현주, 오윤정, 이정숙, 강대욱, 오원근, 민태익, 안종석. 2001. 부추김치와 배추김치 발효양상. 한국미생물학회지 37, 234-238.
3. 이철우, 고창령, 하덕모. 1992. 김치발효 중의 젖산균의

경시적 변화 및 분리 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지 20, 102-107.

4. 이현주, 주윤정, 박찬선, 이정숙, 박용하, 민태익, 안종석. 1999. 파김치와 배추김치의 발효양상. 한국식품과학회지 31, 488-494.
5. Amann, R.L., W. Ludwig, and K.H. Schleiffer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59, 143-109.
6. Ampe, F., N.B. Omar, C. Moizan, C. Wachter, and J.P. Guyot. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5464-5473.
7. Felske, A., A.D.L. Akkermans, and W.M. de Vos. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4581-4587.
8. Fischer, S.G. and L.S. Lerman. 1979. Length-independent separation of DNA restriction fragments in two dimensional gel electrophoresis. *Cell* 16, 191-200.
9. Felsenstein, J. 1993. PHYLIP (phylogeny inference package), version 3.5c. Department of genetics, University of Washington. Seattle: WA, USA.
10. Giraffa, G. and N. Erasmo. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 19-34.
11. Jukes, T.H. and C.R. Cantor. 1969. Evolution of protein molecules, p. 121-132. In H.N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Vol. 3, Academic Press. New York.
12. Klijn, N., A.H. Weerkamp, and W.M. de Vos. 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* subsp. in a natural ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 788-792.
13. Lee, J.S., K.C. Lee, J.S. Ahn, T.I. Mheen, Y.R. Pyun, and Y.H. Park. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1257-1261.
14. Lerman, L.S. and K. Silverstein. 1987. Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155, 482-501.
15. Mheen, T.I. and T.W. Kwon. 1984. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 16, 443-450.
16. Miller, D.N., J.E. Bryant, E.L. Madsen, and W.C. Ghiorse. 1999. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4715-4724.
17. Muyzer, G., E.C. de Waal, and A.G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial communities populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.
18. Randazzo, C.L., S. Torriani, A.D.L. Akkermans, W.M.D. Vos, and E.E. Vaughan. 2002. Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1882-1892.
19. Shaw, B.G. and C.D. Harding. 1989. *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* from chill-stored meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39, 217-223.
20. Vaughan, E.E., F. Schut, H.G.H.J. Heilig, E.G. Zoetendal, W.M. de

- Vos, and A.D.L. Akkermans. 2000. A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 1, 1-12.
21. Zoetendal, E.G., A.D.L. Akkermans, and W.M. de Vos. 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3854-3859.

(Received February 6, 2003/Accepted February 6, 2003)

ABSTRACT: Change of Microbial Communities in Kimchi Fermentation at Low Temperature

Jeong A Park, Gun-Young Heo, Jung Sook Lee¹, Yun Jung Oh, Bo Yeon Kim, Tae Ick Mheen, Chi Kyung Kim¹, and Jong Seog Ahn* (Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea, ¹Department of Microbiology, Chung-buk National University, Cheongju 361-763, Korea)

The diversity and change of microbial communities during kimchi fermentation at 4°C were analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Kimchi samples were taken every 5 days over the fermentation periods (for 60 days) to extract total DNA for DGGE analysis. Touchdown polymerase chain reaction was performed to amplify the V3 region of 16S rRNA gene. Sequencing results of partial 16S rDNA amplicons from DGGE profiles revealed that lactic acid bacteria (LAB), especially *Weissella koreensis*, *Lactobacillus sakei* and *Leuconostoc gelidum* were dominants in kimchi fermentation at 4°C. And we knew that *W. koreensis* steadily existed throughout the whole fermentation period, also *Lb. sakei* and *Leuc. gelidum* appeared from 10th day and 30th day of fermentation time, respectively and then these species were to be dominant microorganisms.