

Analysis of the Distribution and Diversity of the Microbial Community in *Kimchi* Samples from Central and Southern Regions in Korea Using Next-generation Sequencing

Yunjeong Noh, Gwangsu Ha, Jinwon Kim, Soo-Young Lee, Do-Youn Jeong and Hee-Jong Yang*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

Received September 29, 2022 / Revised December 1, 2022 / Accepted December 1, 2022

The fermentation process of *kimchi*, which is a traditional Korean food, influences the resulting composition of microorganisms, such as the genera *Leuconostoc*, *Weissella*, and *Lactobacillus*. In addition, several factors, including the type of *kimchi*, fermentation conditions, materials, and ingredients, can influence the distribution of the *kimchi* microbial community. In this study, next-generation sequencing (NGS) of *kimchi* samples obtained from central (Gangwon-do and Gyeonggi-do) and southern (Jeolla-do and Gyeongsang-do) regions in Korea was performed, and the microbial communities in samples from the two regions were compared. Good's coverage prediction for all samples was higher than 99%, indicating that there was sufficient reliability for comparative analysis. However, in a α -diversity analysis, there was no significant difference in species richness and diversity between samples. The Firmicutes phylum was common in both regions. At the species level, *Weissella kandleri* dominated in central (46.5%) and southern (30.8%) regions. Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) analysis was performed to identify biomarkers representing the microbial community in each region. The LEfSe results pointed to statistically significant differences between the two regions in community composition, with Leuconostocaceae (71.4%) dominating in the central region and Lactobacillaceae (61.0%) dominating in the southern region. Based on these results, it can be concluded that the microbial communities of *kimchi* are significantly influenced by regional properties and that it can provide more useful scientific data to study the relationship between regional characteristics of *kimchi* and their microbial distribution.

Key words : Biomarker, *Kimchi*, microbiome, next generation sequencing

서론

김치는 유산균(Lactic acid bacteria) 의해 다양한 발효 과정을 거쳐 생산된 한국의 대표적인 전통 발효식품으로, 발효 조건 및 발효에 관여하는 유산균에 따라 맛이 달라진다. 김치의 가장 흔한 주재료는 배추와 무이며, 배추김치는 현재 한국에서 가장 보편적으로 소비되는 김치이다 [8, 23]. 또한, 각종 비타민과 식이섬유, 미네랄 등의 활성 성분이 풍부하여 건강에 유익한 식품 중 하나로 여겨지며, 김치 발효 유산균들은 프로바이오틱스 균주로서 항산화, 항균, 항암, 항비만, 콜레스테롤 저하 등 다양한 효능에 대한 연구가 많이 보고되고 있다[4, 7, 15]. 발효에 관여하

는 주요 유산균은 *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속, *Lactococcus* 속, *Weissella* 속, *Pediococcus* 속 등의 균주가 발효 시기에 따라 우세하게 나타나며[4, 9], 발효 중 이 유산균들의 군집 변화는 원산지, 발효 시간, 계절 등에 영향을 받는다[19, 20, 22]. 김치 제조 방법은 기온과 습도 등에 따라 지역별로 다양한 원부재료를 사용하기 때문에 종류와 특성이 다르다. 일반적으로 2.0~3.0%의 염도에서 김치가 발효되지만, 비교적 따뜻한 남부지방은 발효를 늦추기 위해 소금의 첨가량을 약 3.0~5.0%로 높게 넣고, 그 외 고춧가루, 마늘, 젓갈류를 많이 넣어 맵고 짜게 담그는 특성이 있으며, 이와 반대로 중부지방은 염도가 낮고 양념도 담백하게 담그는 차이점이 있다[2, 8, 18]. 원부재료와 관련된 연구에서 고춧가루가 첨가된 김치는 첨가되지 않은 김치보다 *Weissella* 속의 비율이 높지만, *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속의 비율은 고춧가루가 첨가된 김치에서 낮게 분포하며, 염도에 따른 미생물 분포는 *Leuconostoc* 속과 *Weissella* 속의 비율이 소금 2.5%의 농도에서 가장 높고, 3.5% 농도에서는 가장 낮게 나타나는 등[8, 10] 김치가 원부재료에 존재하는 미생물들에 의해 발효되는 식품

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2036, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : godfiltss@naver.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이기 때문에 제조 방법과 재료에 따라 우점하는 미생물의 분포가 달라질 수 있다. 김치 미생물 분포에 관한 선행 연구는 발효 중 미생물 변화 양상, 김치 내 유해 세균, 온도에 따른 군집 변화[16, 17, 28] 등 다양한 연구가 이루어졌지만, 지역별 원부재료에 따른 미생물의 다양성과 분포 분석 연구는 미비한 실정이다. 이에 따라, 본 연구에서는 중부지역과 남부지역의 김치를 수집하여 김치 발효에 관여하는 미생물 분포를 비교 분석하여 지역별 김치의 특성 및 원부재료에 따른 미생물 군집 구조에 대한 자료를 제시하고자 한다.

수집한 김치의 미생물 분포와 다양성을 분석하기 위해 Illumina Miseq 플랫폼을 이용하여 16S rRNA 유전자 분석에 기반한 차세대 염기서열 분석(Next-generation sequencing, NGS)을 수행하였다. 16S rRNA 유전자를 타겟으로 하는 미생물 군집 분석의 분자 생물학적 기법은 정성적 분석 방법인 PCR-DGGE (Polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis), 제한효소를 이용한 T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism) 분석법, 정량적 분석 방법의 qPCR (Quantitative polymerase chain reaction) 등이 이용되고 있지만[5, 24, 27], 차세대 염기서열 분석은 적은 양의 시료로 염기서열 분석이 가능하며 다양한 유형의 미생물을 동시에 검출할 수 있는 생물정보학적 기법으로 발효식품 내에서도 미생물 군집의 다양성을 규명하기 위해 많이 사용되고 있는 분석법이다[1].

본 연구는 경기도, 강원도, 전라도, 경상도 지역을 중부지방(경기도, 강원도)과 남부지방(전라도, 경상도)으로 나누어 각 지역별 김치 미생물의 다양성과 분포의 차이를 확인하였고, 상관관계를 규명하기 위해 미생물 군집을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

김치 시료의 수집

김치 미생물 균총을 분석하기 위해 본 연구에 사용된 재료는 중부와 남부지방의 배추김치로 중부지방인 경기도 5종, 강원도 5종 그리고 남부지방인 전라도 5종, 경상도 5종으로 총 20종을 무작위로 수집하였다.

DNA 추출 및 정량

김치의 genomic DNA는 QIAamp® PowerFecal® Pro DNA Kit (QIAGEN)를 이용해 분리하였고, 제조사의 추출 방법에 따라 진행되었다. 추출한 DNA는 Nanodrop One 분광광도계(ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA)를 이용해 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하여 순도를 검사하였고, 1.5% Agarose gel에서 전기영동 과정을 통해 DNA의 degradation을 확인하였다. 또한 각 시료의 dsDNA 농도를 Qubit 4 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)

장비를 이용하여 정량화하였다.

16S metagenomic sequencing library 제작 및 Illumina MiSeq platform을 이용한 염기서열 분석

김치 시료에서 추출한 genomic DNA를 주형으로 16S rRNA 유전자의 V3-V4 부위를 증폭시키기 위한 primer 조합을 사용하여 PCR을 수행하였다. 1차 PCR은 V3-V4 region target primer 서열(Forward: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3', Reverse: 5' GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3', N; A or C or G or T, W; A or T, H; A or C or T, V; A or C or G)을 이용하였으며, PCR 반응물은 추출한 DNA 12.5 ng, 1 uM의 forward/reverse primer 5 ul, 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Base, Switzerland) 12.5 ul와 멸균수로 혼합액을 25 µl 맞추어 제조하였다. 반응 조건은 95°C에서 3분간 반응 후(pre-denaturation), 95°C에서 30초 동안 반응(denaturation), 55°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초(extension)를 25회 반복하였고, 72°C에서 5분 반응(final extension)을 수행하였다. 증폭 산물은 AMPure XP (BECKMAN COULTER, Brea, California, USA) bead를 사용하여 불순물을 제거하였으며, 각 시료 마다 다른 index를 붙이기 위한 PCR은 Nextera XT Index kit v2 (Illumina, San Diego, California, USA)를 사용하였다. 1차 PCR 증폭 산물 5 ul, index primer (N7XX)와 index primer (S5XX) 5 ul, 2x KAPA HiFi Hotstart Ready Mix 25 ul와 멸균수로 50 ul를 맞추어 혼합액을 제조한 후, 95°C에서 3분 반응 후(pre-denaturation), 95°C에서 30초(denaturation), 55°C에서 30초(annealing), 72°C에서 30초 반응(extension)을 8회 반복하였으며, 72°C에서 5분 동안 최종 반응(final extension) 한 후, PCR clean up을 다시 수행하였다. 다음으로 Index PCR product의 농도 및 순도를 측정 후, 각 시료를 4 nM로 희석하여 normalization 하였으며, pooling 후 제작된 mixture를 PhiX Control (Illumina)과 혼합하여 최종 library를 제작하였고 cartridge (Illumina)에 주입하여 Miseq (Illumina) 플랫폼을 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다.

미생물 군집 분석

Miseq 플랫폼 sequencing을 통해 생산된 FASTQ 파일은 EzbioCloud (CJ bio science Inc.) 플랫폼의 16S-based MTP (microbiome taxonomic profiling) software [30]에서 분석되었다. 증폭된 서열에서 low quality, non-target, chimeric read를 제거하는 QC 과정을 진행한 후 97% 이상의 유사성을 가지는 서열을 기준으로 OTU (Operational Taxonomy Unit) clustering하여 시료 내 미생물 군집의 분포를 분석하였으며, α -diversity 분석을 통해 다양성 지수(diversity in-

dex) 및 종 풍부도(richness) 등을 분석하였다. 그룹 간 미생물 군집의 상관관계를 알아보기 위한 β -diversity 분석은 Jensen-Shannon [6]과 Generalized UniFrac [3] metric을 기반으로 PCoA (Principal Coordinate Analysis)와 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean)-clustering으로 시각화 하였으며, 그룹 간 미생물 군집 구조 차이의 유무를 beta set-significance를 통해 검증하였다. 또한 각 그룹의 유의미한 미생물학적 분류 수준을 나타내는 바이오마커(biomarker)를 규명하기 위해 LEfSe (Linear discriminant analysis effect) 분석[25]을 실시하였다.

결과 및 고찰

지역별 김치의 미생물 군집 비교 분석

각 지역의 미생물 군집 구성의 차이를 비교하기 위해 distance metric으로 Jensen-Shannon 방법을 통해 시료 간의

유사도를 나타내는 PCoA (Principal coordinate analysis) 분석을 실시한 결과, 중부지방인 강원도와 경기도, 남부지방인 전라도와 경상도로 2개의 그룹으로 구분되었다(Fig. 1). 또한, beta set-significance에서 PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) 분석은 전라도와 강원도 사이의 p -value=0.017, 강원도와 경상도 사이의 p -value=0.017, 경상도와 경기도 사이의 p -value=0.010으로 나타나 중부지방과 남부지방의 미생물 군집 구조에 통계학적으로 유의미한 차이가 있다는 것을 검증하였다(Table 1). 이상의 결과를 근거로 미생물 군집 구조는 중부지방과 남부지방별 차이가 명확하게 나타났으므로, 2개의 그룹 (중부: 강원도, 경기도와 남부: 경상도, 전라도)으로 그룹화하여 분석을 실시하였다.

중부지방과 남부지방 김치의 α -diversity 분석

모든 시료의 Raw read 데이터는 평균 92,376 valid read

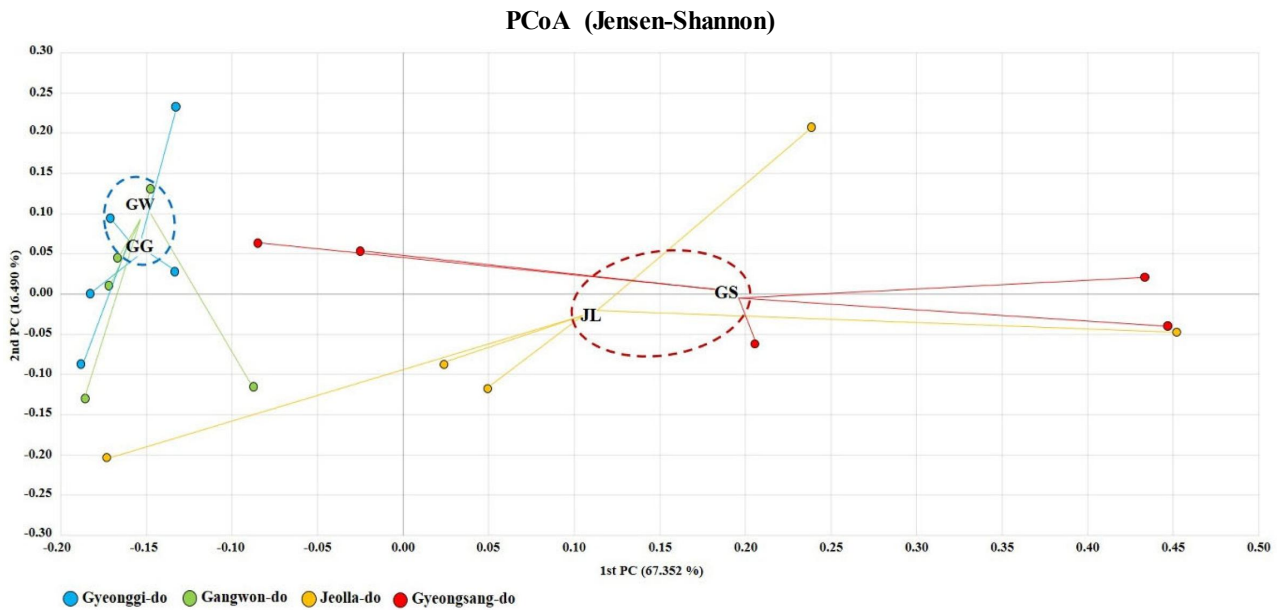


Fig. 1. PCoA results of bacterial communities at the species level (GG: Gyeonggi-do, GW: Gangwon-do, JL: Jeolla-do, GS: Gyeongsang-do) based on Jensen-Shannon.

Table 1. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) results of bacterial communities in kimchi by region

Test	PERMANOVA			
β -diversity distance metrics	Jensen-Shannon			
Set	4			
Samples	20			
Permutations	999			
	Gangwon-do	Gyeonggi-do	Jeolla-do	Gyeongsang-do
Gangwon-do	–	$p=0.164$	$p=0.017$	$p=0.017$
Gyeonggi-do	$q=0.197$	–	$p=0.010$	$p=0.010$
Jeolla-do	$q=0.026$	$q=0.026$	–	$p=0.616$
Gyeongsang-do	$q=0.026$	$q=0.026$	$q=0.616$	–

수와 99% 이상의 Good's coverage of library로 미생물 군집 분석을 파악하는데 충분한 read 수를 얻었으며, 각 시료 별 총 추정치(Operational Taxonomic Units, OTUs)는 남부 지방 353.9와 중부지방 351.1로 유사하게 나타났다. α -diversity 분석은 시료에 얼마나 많은 종이 존재하는지를 나타내는 종 풍부도(species richness)와 종들이 얼마나 균등하게 분포하는지 나타내는 종 다양성(species diversity)으로 측정된다. 종 풍부도를 나타내는 ACE, CHAO, Jackknife 지수는 중부지방과 남부지방 사이에서 유의미한 차이는 없었으며, 다양성 지수인 Shannon, NPS Shannon, Simpson 지수에서도 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 2).

중부지방과 남부지방 김치의 분류학적 수준에서 미생물 군집 분포 분석

중부지방과 남부지방 김치의 미생물 군집 분포는 문(phylum) 수준에서 Firmicutes가 97.8%, 강(class) 수준에서 Bacilli가 97.8%로 중부와 남부지방에서 동일한 수준으로 나타났으며, 목(order) 수준에서도 Lactobacillales가 97.2% (중부지방), 97.5%(남부지방)로 모든 지역에서 우점하는 것으로 나타났다. 과(family) 수준에서는 Leuconostocaceae 이 중부지방에서 71.4% 남부지방이 36.5%, Lactobacillaceae는 중부지방에서 25.7%, 남부지방에서 61.0%로 나타

나 중부지방에서는 Leuconostocaceae, 남부지방은 Lactobacillaceae이 우세한 것으로 나타났다. 속(genus) 수준에서 중부와 남부지방의 미생물 분포는 *Weissella* 속의 분포가 각각 47.7%, 31.3%로 가장 우세하게 나타났으며, 두번째로 *Lactobacillus*가 각각 25.6%, 45.2%, 마지막으로 *Leuconostoc*이 중부지방 23.7%, 남부지방 5.2%의 순으로 나타났다. 중부지방의 종(species) 수준에서 차지하는 미생물 분포는 *Weissella kandleri* (46.5%), *Lactobacillus sakei* (23.7%), *Leuconostoc gelidum* (18.4%)으로 나타났으며, 남부지방의 경우에는 *Weissella kandleri* (30.8%), *Pediococcus inopinatus* (15.4%), *Lactobacillus sakei* (4.4%), *Leuconostoc gelidum* (3.6%)의 분포를 보였다(Fig. 3), (Table 2). 이전의 Jung 등의 연구[11]에서 김치 발효 중 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* 속이 우세한 세균 군집이라고 보고한 바 있고, Song 등의 연구[29]에 따르면 *Leuconostoc gelidum*, *Weissella kandleri*, *Lactobacillus sakei* 균주가 발효 시기에 따라 김치에 주로 분포하는 미생물로 나타낸 바 있다. 따라서 중부지방과 남부지방 김치에 우점하는 세균 군집이 김치 발효 기간에 따른 세균 군집과 동일하게 나타났음을 보여준다.

중부지방과 남부지방 그룹의 β -diversity 및 beta-significance 분석

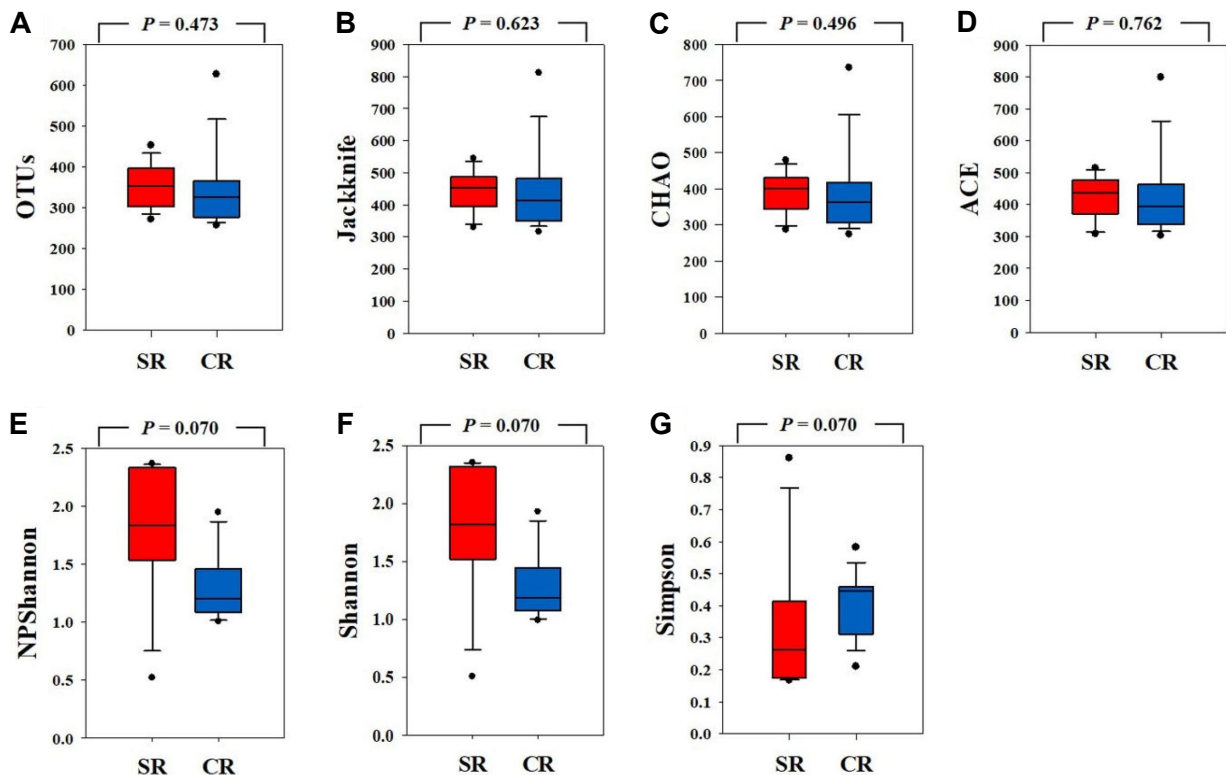


Fig. 2. Comparison of bacterial diversity index according to kimchi in southern and central regions. SR: southern region CR: central region.

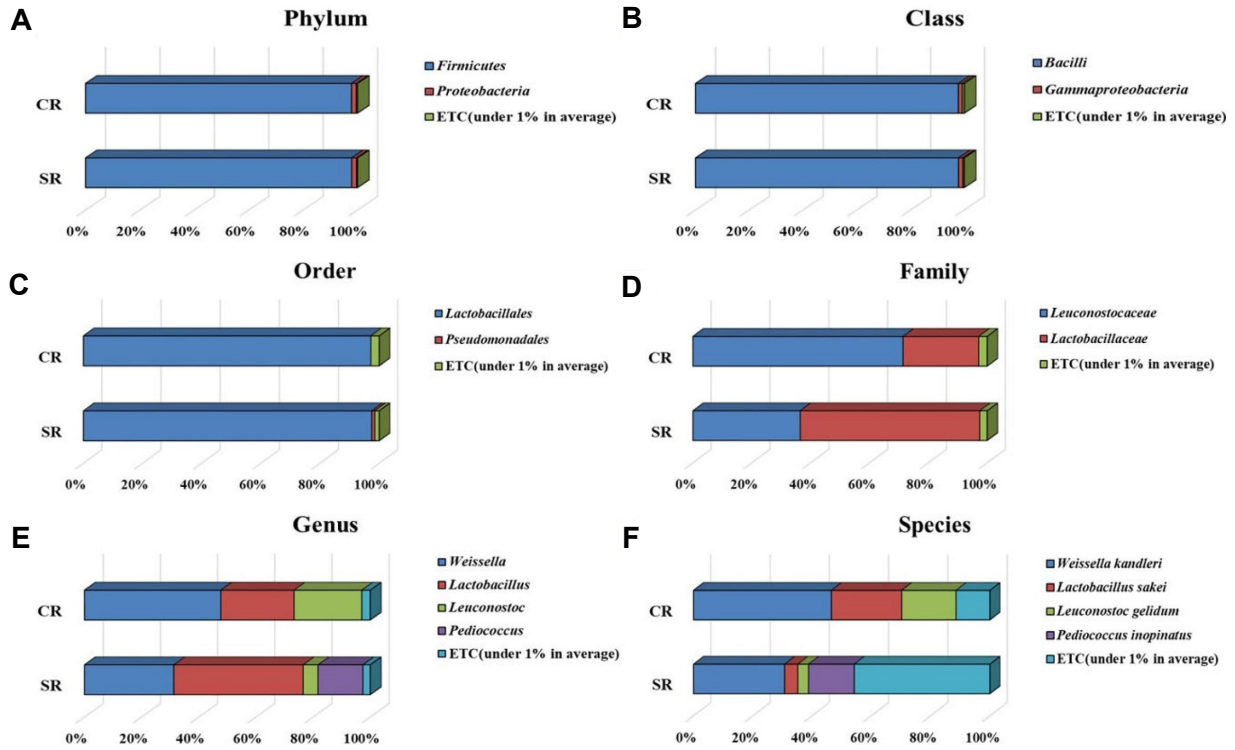


Fig. 3. Distribution of microbial taxa for (A) Phylum, (B) Class, (C) Order, (D) Family, (E) Genus, and (F) Species levels in the central and southern regions.

Table 2. Microbial communities in the central and southern regions at the taxonomic level

Taxonomic rank			
		CR (%)	SR (%)
Phylum	Firmicutes	97.8	97.8
	Proteobacteria	1.7	1.8
	ETC (under 1% in average)	0.4	0.3
Class	Bacilli	97.8	97.8
	Gammaproteobacteria	1.4	1.6
	ETC (under 1% in average)	0.8	0.6
Order	Lactobacillales	97.2	97.5
	Pseudomonadales	0	1.0
	ETC (under 1% in average)	2.8	1.5
Family	Leuconostocaceae	71.4	36.5
	Lactobacillaceae	25.7	61.0
	ETC (under 1% in average)	2.8	2.5
Genus	<i>Weissella</i>	47.7	31.3
	<i>Lactobacillus</i>	25.6	45.2
	<i>Leuconostoc</i>	23.7	5.2
	<i>Pediococcus</i>	0	15.7
	ETC (under 1% in average)	2.9	2.5
Species	<i>Weissella kandleri</i>	46.5	30.8
	<i>Lactobacillus sakei</i>	23.7	4.4
	<i>Leuconostoc gelidum</i>	18.4	3.6
	<i>Pediococcus inopinatus</i>	0	15.4
	ETC (under 1% in average)	11.4	45.8

CR: central region, SR: southern region

각 그룹의 미생물 군집 차이를 알아보기 위한 β -diversity 분석은 Jensen-Shannon과 Generalized UniFrac metric을 기반으로 하였으며, PCoA 분석과 시료를 계층적인 방법으로 그룹화 하는 UPGMA clustering 분석을 수행하였다. 중부지방과 남부지방의 시료들이 속 수준에서 그룹별로 그룹화(clustering) 되어 중부지방과 남부지방의 김치 제조 지역이 미생물 군집 구조에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 4). beta-set-significance 분석은 시료 세트의 중심(centroid)과 산포(dispersion)가 모든 세트에 대해 동등하다는 귀무가설을 분석하여 그룹 간의 연관성을 나타내는 PERMANOVA를 사용하였으며, Jensen-Shannon과 Generalized UniFrac metric을 기반으로 분석하였다. 그 결과 중부지방과 남부지방의 p -value가 각 0.001, 0.002로 나타나 귀무가설이 기각되어 중부지방과 남부지방 지역 간의 미생물 분포에 매우 유의미한 차이가 있다는 것을 검증하였다(Table 3).

Taxonomic biomarker 분석

중부지방과 남부지방을 비교 분석하여 통계적으로 유의하게 차이가 나타나는 미생물 군집(biomarker)을 확인하기 위해 LEfSe 분석을 실시하였다. LDA Score>3.5와 p -value<0.05를 기반으로 effect size를 추정하였으며, 총 16개의 taxa에서 유의한 상관관계가 나타났다(Table 4). 과 수준에서 Lactobacillaceae, Leuconostocaceae가 LDA Score

Table 3. Results of PERMANOVA analysis of microbial communities in the central and southern regions

Test	PERMANOVA	
β -diversity distance metrics	Jensen-Shannon	Generalized UniFrac
Set	2	2
Samples	20	20
Permutations	999	999
Pair-wise (CR and SR)	**($p=0.001$)	**($p=0.002$)

CR: central region, SR: southern region

값이 5.24로 가장 높게 나타났으며, 중부지방에서는 Leuconostocaceae, 남부지방은 Lactobacillaceae가 가장 유의한 바이오마커로 나타났다. 속 수준에서는 *Leuconostoc*, *Pediococcus*가 중부지방과 남부지방 그룹간의 차이가 있음을 확인하였고, 종 수준에서는 *Lactobacillus sakei*, *Pediococcus inopinatus*, *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus plantarum*의 분포 차이가 중부지방과 남부지방 사이에서 10% 이상 나타났으며, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc gelidum*는 중부지방에서 상대적인 풍부도가 높았고, *Pediococcus inopinatus*, *Lactobacillus plantarum*은 남부지방에서 높은 분포를 나타냈다. 결과적으로 중부지방과 남부지방 김치의 상대적인 풍부도를 통해 바이오마커를 분석한 결과 Leuconostocaceae, Lactobacillaceae가 중부지방과 남

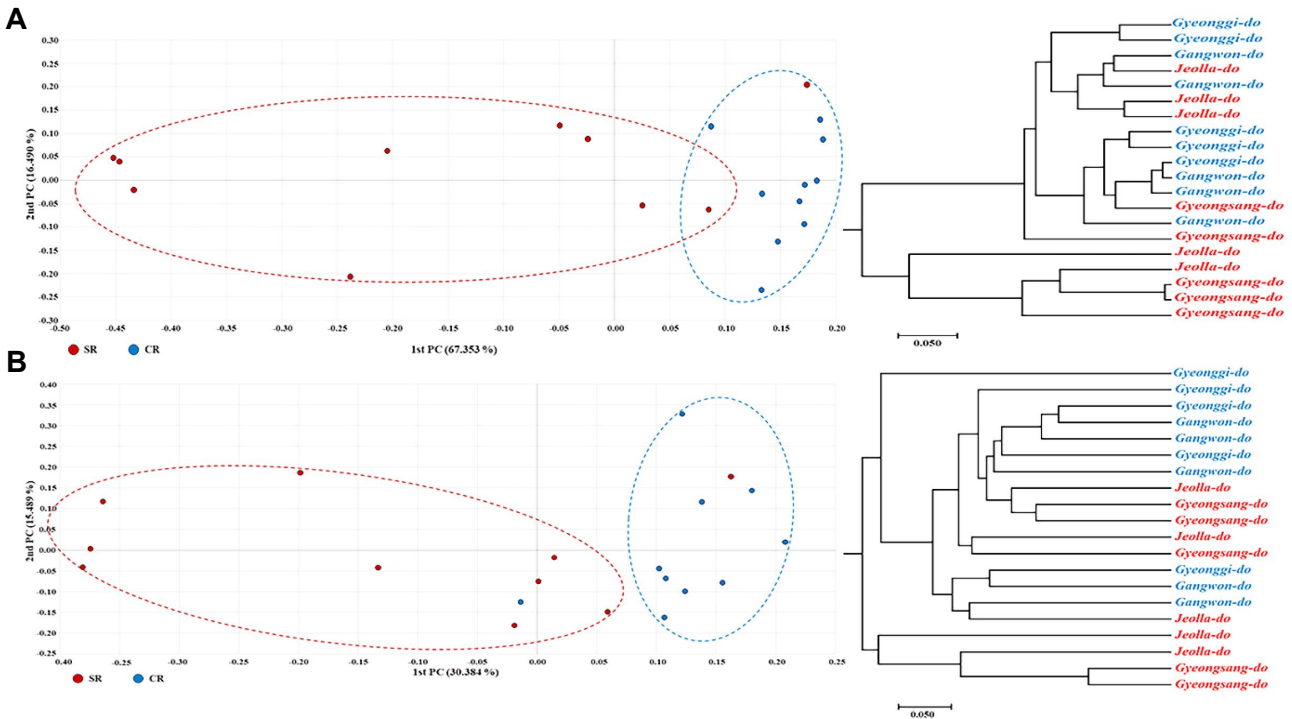


Fig. 4. PCoA plot and UPGMA dendrogram analysis results of microbial communities at the species level based on (A) Jensen-shannon and (B) Generalized UniFrac.

Table 4. Identification of biomarkers for microbial communities for collected *kimchi* samples from different regions (central and southern) using LEfSe analysis method

Taxon name	Taxon rank	LDA Score	p-value	Relative taxonomic abundance	
				CR (%)	SR (%)
Lactobacillaceae	Family	5.24763	0.01911	25.71900	61.02240
Leuconostocaceae	Family	5.24356	0.01911	71.43600	36.46890
<i>Leuconostoc</i>	Genus	5.01449	0.00407	23.70090	5.18060
<i>Lactobacillus sakei</i>	Species	4.97682	0.04125	23.72770	4.44540
<i>Pediococcus</i>	Genus	4.95627	0.00088	0.08830	15.72680
<i>Pediococcus inopinatus</i>	Species	4.95022	0.00194	0.07690	15.44000
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Species	4.91105	0.00407	18.35650	3.60240
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Species	4.76557	0.01911	0.23370	12.42470
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	Species	4.56137	0.00250	0.00710	6.80650
<i>Lactobacillus koreensis</i>	Species	4.28516	0.02837	0.34250	4.33300
<i>Leuconostoc carnosum</i>	Species	4.11712	0.00407	2.54280	0.10960
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Species	3.98272	0.04125	2.45210	1.39540
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	Species	3.92219	0.00493	0.00050	1.45470
<i>Lactobacillus paucivorans</i>	Species	3.64302	0.01345	0.00300	0.89630
<i>Lactobacillus_uc</i>	Species	3.61682	0.00650	0.10360	0.98390
<i>Lactobacillus mudanjiangensis</i>	Species	3.58663	0.01366	0.00310	0.87070

CR: central region, SR: southern region

부지방 사이에 가장 뚜렷한 분포 차이를 보였으며, 종 수준에서 바이오마커를 분석한 결과 중부지방에서는 *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc gelidum*, 남부지방에서는 *Pediococcus inopinatus*, *Lactobacillus plantarum*이 상대적으로 높게 분포하여 두 지역간 김치 미생물 군집 구조 차이에 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.

본 연구는 중부지방과 남부지방 김치 미생물 군집의 차이와 분포에 대한 상관관계를 비교 분석하였으며, 그 결과 *Weissella kandleri*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc gelidum* 속이 공통적으로 우세하게 발견되었고 미생물 종 풍부도와 다양성에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. PCoA를 이용한 미생물 군집 분석은 지역에 따라 그룹화 되었으며, 중부지방과 남부지방 김치에서 통계적으로 유의미한 biomarker는 Lactobacillaceae와 Leuconostocaceae로 나타났다. 김치 발효 과정 중 유산균의 증식은 소금, 마늘, 고춧가루 등 다양한 부재료에 의해 영향을 받는 것으로 알려져 있으며[12], 속 수준에서 중부지방과 남부지방의 미생물 분포를 비교했을 때, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* 유산균이 97% 이상을 차지하는 것으로 나타나 지역별 김치 원부재료에 따른 유산균의 분포가 김치 미생물 전체 군집을 결정하는데 큰 기여를 하는 것으로 판단된다. 종 수준에서 중부지방과 남부지방의 미생물 분포를 비교했을 때, 남부지방의 대부분의 유산균 분포가 중부지방에 비해 낮은 것으로 나타나는데 비해 호염성 유산균으로 알려진 *Pediococcus*와 *Lactobacillus plantarum* [13]은 남부지방에서 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 마늘, 소금의 첨가량이 높은 김치에서 유

산균 생육이 억제되었다는 이전의 연구결과[14, 26]와 유사하였으며, 일반적으로 중부지방에 비해 기온이 높은 남부지방이 김치의 가식 기간을 늘리기 위해 소금, 고춧가루, 마늘 등의 양념을 많이 사용하여 김치를 맵고 짜게[21] 담그기 때문인 것으로 판단된다.

본 연구에서는 중부지방과 남부지방의 김치를 수집하였으며, 차세대염기서열 분석을 통해 중부지방과 남부지방 김치의 미생물 군집 구조에 통계적으로 유의한 수준의 차이가 있음을 확인하였다. 속 수준에서 미생물 분포를 분석한 결과 중부지방과 남부지방 모두 유산균이 전체 미생물의 97% 이상 차지하는 것으로 나타났으나, 유산균 종류에 차이가 있는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 중부지방과 남부지방의 김치 원부재료에 의한 것으로 판단되며, 원부재료에 따른 미생물의 분포가 김치 발효에 미치는 영향 및 중부지방과 남부지방의 지역에 따른 김치의 미생물학적 특징에 대한 유용한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2022년 농림축산식품부 농축산·식품마이크로바이옴 통합 바이오뱅크구축사업의 지원에 의해 수행된 것입니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest

with the contents of this article.

References

- Cao, Y., Fanning, S., Proos, S., Jordan, K. and Srikumar, S. 2017. A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome Studies. *Front. Microbiol.* **8**, 1829.
- Cha, Y. J., Lee, Y. M., Jung, Y. J., Jeong, E. J., Kim, S. J., Park, S. Y., Yoon, S. S. and Kim, E. J. 2003. A nationwide survey on the preference characteristics of minor ingredients for winter kimchi. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 555-561.
- Chen, J., Bittinger, K., Charlson, E. S., Hoffmann, C., James, L., Wu, G. D., Collman, R. G. and Bushman, F. D., Li, H. 2012. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* **28**, 2106-2113.
- Dharaneedharan, S. and Heo, M. S. 2016. Korean traditional fermented foods - A potential resource of beneficial microorganisms and their applications. *J. Life Sci.* **26**, 496-502.
- Garofalo, C., Bancalari, E., Milanovic, V., Cardinali, F., Osimani, A., Sardaro, M. L. S., Bottari, B., Bernini, V., Aquilanti, L., Clementi, F., Neviani, E. and Gatti, M. 2017. Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* **242**, 24-36.
- Grosse, I., Galvan, B. P., Carpena, P., Roldan, R. R., Oliver, J. and Stanley, E. H. 2002. Analysis of symbolic sequences using the Jensen-Shannon divergence. *Phys. Rev. E.* **65**, 041905.
- Han, K. J., Lee, J. E., Lee, N. K. and Paik, H. D. 2020. Antioxidant and anti-inflammatory effect of probiotic lactobacillus plantarum KU15149 derived from Korean homemade Diced-Radish Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 591-598.
- Hong, G. H., Lee, S. Y., Park, E. S. and Park, K. Y. 2021. Changes in microbial community by salt content in kimchi during fermentation. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **50**, 648-653.
- Jang, J. H., Lee, N. K. and Paik, H. D. 2019. Probiotic characterization of *Lactobacillus brevis* KU15153 showing antimicrobial and antioxidant effect isolated from kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **28**, 1521-1528.
- Jeong, S. H., Lee, H. J., Jung, J. Y., Lee, S. H., Seo, H. Y., Park, W. S. and Jeon, C. O. 2013. Effects of red pepper powder on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **160**, 252-259.
- Jung, J. Y., Lee, S. H., Kim, M. J., Park, S. M., Bae, J. W., Hahn, Y. S., Madsen, E. L. and Jeon, C. K. 2011. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2264-2274.
- Kang, S. Y. and Han, M. J. 2005. Effect of kimchi ingredients on the growth of pathogenic and lactic acid bacteria. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **21**, 838-843.
- Karyantina, M., Anggrahini, S., Utami, T. and Sutriswati, E. A. 2020. Moderate halophilic lactic acid bacteria from jambal roti: A traditional fermented fish of central java, Indonesia. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **29**, 990-1000.
- Kim, D. M. and Kim, K. H. 2014. Growth of lactic acid bacteria and quality characteristics of baechu kimchi prepared with various salts and concentration. *Kor. Soc. Food Cult.* **29**, 286-297.
- Kim, M. S., Yang, H. J., Kim, S. H., Lee, H. W. and Lee, S. M. 2018. Effects of kimchi on human health. *Medicine* **97**, e0163.
- Ko, J. L., Oh, C. K., Oh, M. C. and Kim, S. H. 2009. Isolation and identification of lactic acid bacteria from commercial kimchi. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 732-741.
- Lee, H. Y., Haque, M. A. and Cho, K. M. 2020. Changes in physicochemical property and lactic acid bacterial community during kimchi fermentation at different temperatures. *J. Appl. Biol. Chem.* **63**, 429-437.
- Lee, I. S., Kim, H. Y. and Kim, E. J. 2004. A survey on the commercial poggi kimchi and consumer acceptance test prepared in the various region. *Kor. J. Food Cult.* **19**, 460-467.
- Lee, M. E., Song, J. H., Lee, S. H., Jung, M. Y. and Chang, J. Y. 2018. Effect of seasonal production on bacterial communities in Korean industrial kimchi fermentation. *Food Control* **91**, 381-389.
- Lee, M. J., Cho, K. H., Han, E. S. and Lee, J. H. 2010. Bacterial diversity in the initial fermentation stage of Korean and Chinese kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 207-215.
- Lee, Y. S., Cha, J. A. and Rho, J. O. 2013. Quality characteristics of baechu kimchi at Jangsu area as compared with commercial kimchi. *J. East Asian Soc. Diet. Life* **23**, 413-422.
- Park, J. A., Heo, G. Y., Lee, J. S., Oh, Y. J., Kim, B. Y., Mheen, T. I., Kim, C. K. and Ahn, J. S. 2003. Change of microbial communities in kimchi fermentation at low temperature. *Kor. J. Microbiol.* **39**, 45-50.
- Park, K. Y., Jeong, J. K., Lee, Y. E. and Daily, J. W. 2014. Health benefits of Kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J. Med. Food* **1**, 6-20.
- Ponnusamy, K., Choi, J. N., Kim, J. Y. and Lee, S. Y. 2011. Microbial community and metabolomic comparison of irritable bowel syndrome faeces. *J. Med. Microbiol.* **60**, 817-827.
- Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L. and Garrett, W. S. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60.
- Shim, S. M. and Lee, J. H. 2008. Evaluation of lactic acid bacterial community in Kimchi using terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 247-259.
- Shin, J. H., Kim, R. J., Kang, M. J., Kim, G. M. and Sung, N. J. 2012. Quality and fermentation characteristics of garlic-added kimchi. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 539-546.
- Shin, S. M., Park, J. Y., Kim, E. J. and Hahn, Y. S. 2005.

- Investigation of some harmful bacteria in commercial kimchi. *Kor. J. Food Cookery Sci.* **21**, 195-200.
29. Song, H. S., Lee, S. H., Ahn, S. W., Kim, J. Y., Rhee, J. K. and Roh, S. W. 2021. Effects of the main ingredients of the fermented food, kimchi, on bacterial composition and metabolite profile. *Int. Food Res. J.* **149**, 110668.
30. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S. J., Lim, J. M., Kim, Y. S., Seo, H. S. and Chun, J. S. 2017. Introducing ezbio-cloud: a taxonomically united database of 16SrRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.

초록 : 차세대 염기서열 분석법을 이용한 우리나라 중부지방과 남부지방의 김치 미생물 군집의 분포 및 다양성 분석

노윤정 · 하광수 · 김진원 · 이수영 · 정도연 · 양희종*
 ((재)발효미생물산업진흥원)

한국 전통 음식으로 알려진 김치의 발효는 다양한 미생물에 의해 일어나며, 주로 *Leuconostoc* 속, *Weissella* 속, *Lactobacillus* 속 유산균들이 관여한다. 또한 김치의 미생물 군집은 김치의 종류, 발효 조건, 재료 및 성분 등에 따라 분포와 차이가 다르게 나타난다. 본 연구는 중부지방(강원도, 경기도)과 남부지방(전라도, 경상도) 김치에 대한 미생물 군집을 분석하기 위해 16S rRNA 유전자를 증폭하여 차세대 염기서열 분석법을 실시하였다. 모든 시료가 99% 이상의 Good's coverage of library를 보여 비교분석을 하는데 충분한 신뢰성을 얻었으며, α -diversity 분석에서 종 풍부도와 다양성은 시료 간 유의미한 차이가 나타나지 않았다. 중부지방과 남부지방 김치에 공통적으로 분포하고 있는 주요 세균 문은 Firmicutes 이었으며, 속 수준에서 *Weissella kandleri* 가 각 46.5%(중부지방), 30.8%(남부지방)로 가장 우점하였다. 마지막으로 중부지방과 남부지방의 미생물 군집을 대표하는 바이오마커를 확인하기 위해 LEfSe 분석을 실시한 결과, 중부지방에서 Leuconostocaceae (71.4%) 과, 남부지방에서 Lactobacillaceae (61.0%) 과가 통계적으로 유의미한 빈도 차이를 보였다. 따라서, 본 연구는 중부지방과 남부지방에서 나타나는 김치 미생물 군집의 분포와 차이를 규명하였으며, 이를 바탕으로 지역별 유사점과 차이점에 대한 미생물 군집의 분포를 연구하기 위한 과학적 기초자료를 제공할 것으로 예상된다.