

Comparative Physicochemical Characteristics and Microbial Communities in Commercial *Kimchi* and *Mukeunji* Products

Soo-Young Lee, Su-Ji Jeong, Myeong Seon Ryu, Gwangsu Ha, Yunjeong Noh, Do-Youn Jeong and Hee-Jong Yang*

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

Received November 30, 2022 /Revised April 18, 2023 /Accepted April 20, 2023

This study compared and analyzed the microbial composition and physicochemical characteristics of kimchi (*gimjang* kimchi) and *mukeunji* (aged kimchi). Commercial kimchi and *mukeunji* products were purchased through an online market. After an analysis of physicochemical characteristics, the pH of the *mukeunji* samples was found to be lower and the acidity higher than in the kimchi samples. There was no significant difference in salinity between kimchi and *mukeunji*, but the sugar content was higher in the kimchi samples. The phylogenetic diversity index, which incorporates phylogenetic difference between species, was significantly higher in *mukeunji* than in the kimchi. The most dominant order in both groups was *Lactobacillales*, but several lactic acid bacteria, such as the *Pediococcus* and *Lactobacillus* species, which may be more acid tolerant or more competitive, are relatively predominant in *mukeunji*. Beta set-significance analysis based on two different distance metric results revealed that microbial distributions of population were different at the statistical confidence level ($p < 0.001$). We investigated the effect of respective species on total microbial community using the LefSe (linear discriminant analysis effect size) mechanism. According to the results of LefSe testing, a relatively higher abundance of *Weissella kandleri* in kimchi and a higher abundance of *Pediococcus inopinatus* in *mukeunji* have the greatest influence on the differences in microbial structure between the two groups.

Key words : *Kimchi*, *Mukeunji*, next-generation sequencing, physicochemical characteristics

서론

김치는 배추, 무, 오이 등의 채소를 소금에 절여 적절한 부재료와 양념을 가미하여 일정 기간 숙성시켜 제조되는 한국의 고유 전통 발효식품으로, 김치의 종류는 제조 지역의 특성과 제조 방법 및 재료 등에 따라 매우 다양하고, 현재까지 알려진 김치의 종류만 해도 수백 가지에 달한다 [11]. 김치는 맛, 조직감, 품질 등이 좋고 한국인들에게 섬유질, 비타민, 미네랄, 식물성 화합물 등과 같은 주요 영양원을 공급해 주는 필수 식품으로 [23], 2006년 미국의 건강전문지인 *Health*에서 세계 5대 건강식품으로 선정되면서 전 세계적으로 건강 기능성 식품으로 주목받고 있다 [27].

김치의 기능성을 높여주는 주요 인자는 김치 제조 시 사용되는 재료와 김치의 발효에 관여하는 미생물 및 발효

숙성 과정을 거치며 생성된 발효산물 등이 있으며, 이들의 복합 작용에 의해 면역증강, 항비만, 항노화, 항산화, 항암 효과 등을 갖는다고 알려져 있다 [24]. 과거에는 주로 가정에서 직접 김치를 만들어 먹었지만, 지금은 50% 정도가 산업체에서 제조되고 있으며, 급속한 국민소득 증대와 핵가족화 및 편의성을 추구하는 소비자 생활패턴 변화 등으로 인해 김치 시장의 산업 규모가 점차 확대되고 있다. 그중에서도 한국의 대표적인 김치인 배추김치의 경우 김치 소비시장의 약 70%를 차지하고 있으며 [26], 김치 시장의 세분화와 함께 다양한 소비자의 기호도에 따라 숙성 정도를 달리한 김치의 수요도 증가하는 추세이다 [8].

김치는 숙성 정도에 따라서 갓 담은 김치, 익은 김치, 묵은지 등으로 나눌 수 있다. 갓 담은 김치는 김장 후 숙성 과정을 거치지 않은 김치로 절기 상 입동 전, 후에 김치를 대량으로 담가 겨우내 먹는 김장 김치라 부르며, 통상적으로 김장 김치라 하면 포기 배추김치를 일컫는다 [12]. 묵은지는 일반 배추김치보다 양념이 많이 들어가지 않고 6개월에서 1년 이상 발효 및 숙성되어 제조되는 묵은 김치로 특유의 독특한 풍미를 지닌 비살균 자연 발효식품이다 [20]. 김치의 숙성에 따른 pH, 산도 등의 이화학적 특성과 발효에 관여하는 다양한 미생물은 김치의 풍미에 영향을 미치는 주요 인자로 작용한다고 알려져 있다 [29]. 이에

*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.

대하여 김치의 발효 및 숙성 정도에 따른 이화학적 특성 및 미생물에 대한 연구가 수행된 바 있으나, 국제식품규격위원회에서 제정한 김치의 표준 국제규격은 식염 1.0~4.0%, 산도 1.0% 이하의 김치에만 한정되어 있어 산도 1.0% 이상을 품질기준으로 하는 묵은지는 규격에 포함되기 어려우며[2], 묵은지는 다른 김치 종류에 비해 미생물 군집 구조에 대한 연구도 미비한 수준이다.

현재까지 진행된 묵은지에 대한 연구는 제조 및 숙성과정에 따른 품질 특성[7, 10, 16, 18, 20], 향미 및 관능적 특성 변화[4, 9], 묵은지 제조를 위한 혼합 스타터 개발[8, 19], 묵은지를 이용한 제품개발[13, 14], 발효 미생물[3, 22] 등이 이루어졌으나, 시판 묵은지에 대한 품질 및 미생물학적 특성에 대한 비교 연구는 부족한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 숙성 과정을 거치지 않은 김치와 6개월에서 3년간 숙성시킨 시판 묵은지를 온라인을 통해 구매하여 숙성 기간에 따른 수집 시료의 품질 및 차세대 염기서열 분석기술(Next generation sequencing)을 활용하여 확인된 미생물 군집을 비교 분석하였으며, 향후 묵은지의 품질 규격의 개발 및 표준화에 활용될 수 있는 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 수집

본 연구에서는 김치와 묵은지 시료 간의 이화학적 특성 및 미생물 군집의 비교를 위하여 국내의 온라인 판매처로부터 스타터를 사용하지 않은 김치와 자연적으로 발효시킨 묵은지 제품을 제품명에 따라 구매하여 시료로 사용하였다. 김치는 광주·전라 7종, 부산·경상 5종, 제주 3종 총 15종을 수집하였고, 묵은지는 광주·전라 8종, 부산·경상 4종, 제주 3종 총 15종을 수집하였다. 본 연구에서는 국립농산물품질관리원에서 발간한 전통식품 표준규격의 김치 표준 규격에 따라 김치는 산도 1.0% 이하, pH 3.8 이상, 묵은지는 산도 1.0% 이상, pH 3.4 이상인 시료로 구분하였다.

이화학적 특성 분석

수집한 김치와 묵은지 시료를 MQ7045 핸드블렌더(BRAUN, Kronberg, Germany)로 마쇄 후, 멸균된 거즈로 여과한 여액을 이화학적 특성 분석에 사용하였다. pH는 S20 Seven Easy pH meter (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Switzerland)를 사용하여 측정하였고, 적정 산도는 A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists)법에 따라 김치 및 묵은지 여액 10 ml에 0.1 N NaOH 용액을 pH 8.30이 될 때까지 적정한 후, 0.1 N NaOH 용액의 소비량을 다음 계산식에 대입하여 lactic acid (%) 함량으로 나타내었다 [1].

$$\text{산도(lactic acid \% , w/v)} = [(0.1 \text{ N NaOH 소비량(ml)} \times 0.1 \text{ N NaOH factor} \times 0.009 / \text{시료량(ml)} \times 100\%)]$$

염도는 TM-30D 염도계(TAKEMURA, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였고, 당도는 김치 및 묵은지 여액을 10 배 희석한 후, PAL-1 당도계(ATAGO, Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다.

Total DNA 추출

김치와 묵은지로부터 16S rRNA 염기서열을 분석하기 위한 total DNA를 추출하기 위하여 QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하였으며, 제조사의 추출 방법에 따라 total DNA 추출을 진행하였다. 각 시료로부터 추출된 total DNA의 농도와 순도를 Qubit 4 형광측정기(Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA)와 Nanodrop One 분광광도계(ThermoFisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA)를 이용하여 측정한 후 1.5% agarose 전기영동을 통해 추출된 total DNA의 품질을 검증하였다.

16S metagenomic library 제작 및 염기서열 분석(Next Generation Sequencing)

미생물 군집 분석을 위한 16S metagenomic library 제작의 모든 과정은 Illumina (Illumina, San Diego, California, USA)사의 16S metagenomic sequencing library pre preparation guide에 따라 수행하였다[6]. 추출된 total DNA 내의 16S rRNA 유전자의 V3-V4 부분을 증폭시키기 위하여 V3-V4 region target primer set (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')와 KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Basel, Switzerland)를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 1차 PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 polymerization하는 단계를 25회 반복한 후, 72°C에서 5분간 최종 extension을 수행하는 조건으로 진행하였으며, library 이외의 불순물은 AMPure XP bead (BECKMAN COULTER, Brea, California, USA)를 사용하여 제거하였다. 각 library마다 다른 index를 붙이는 2차 PCR을 수행하기 위해 Nextera XT Index kit v2 (Illumina, San Diego, California, USA)를 사용하였다. 2차 PCR 반응은 95°C에서 5분간 pre-denaturation, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 polymerization하는 단계를 8회 반복한 후, 72°C에서 5분간 최종 extension 반응을 수행하는 조건으로 진행하였으며, library 이외의 불순물은 AMPure XP bead를 사용하여 제거하였다. 제작된 library의 품질

검증을 위해 Qubit 4 형광측정기와 Nanodrop One 분광광도계를 이용하여 library의 농도 및 순도 측정을 수행하고, 1.5% agarose 전기영동을 통해 제작된 library의 크기를 분석하였다. 각 library를 동일한 농도(4 nM)로 희석하는 normalization을 진행한 다음 pooling을 통하여 mixture를 제작하고, PhiX library (Illumina)와 혼합하였다. 최종적으로 combined library를 MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) cartridge에 주입하고, Miseq (Illumina) 플랫폼을 통해 염기서열 분석을 실시하였다.

데이터 분석

염기서열 분석을 통하여 생산된 FASTQ 파일을 Ezbio Cloud 16S-based microbiome taxonomic profiling (MTP, CJ bio science Inc.) software를 통해 분석하였다. 각 시료의 library로부터 얻어진 read 중에서 low quality, non-target, chimeric read를 제거한 다음 97.0% 이상의 염기서열 유사성 기준으로 Operational taxonomic unit (OTU) clustering 하였다. α-diversity 분석을 위한 종 다양성(diversity)의 지표로 Simpson, Phylogenetic diversity를 산출하였으며, 종 풍부도(richness)의 지표로 ACE, Chao1, Jackknife, 종 균등성(evenness)의 지표로 NPS Shannon, Shannon을 산출하여 비교분석하였다. 시료 간 미생물 군집의 다양성 분석은 UniFrac metric [17]을 기반으로 한 β-diversity 분석으로 수행되었으며, 김치와 묵은지 미생물 군집의 차이를 비모수 다변량 통계 검정(PERMANOVA, Permutational multivariate analysis of variance) 분석으로 검증하였다. 마지막으로, 선형 판별 분석 효과 크기(LEfSe, Linear discriminant analysis effect size) 분석을 통하여 김치와 묵은지의 미생물학적 분류 수준에 따른 taxonomic biomarker를 분석하였다[28].

결과 및 고찰

김치 및 묵은지의 이화학적 특성

이화학적 특성 분석 결과 수집된 김치 시료 15종의 평균 pH와 산도는 각각 pH 5.50±0.43, 0.40±0.11%로 나타났으며, 묵은지 시료 15종의 평균 pH와 산도는 각각 pH 3.82±0.23, 1.44±0.29%로 나타났다. 수집된 모든 김치의 pH는 3.8, 산도는 1.0% 이하로 나타났으며, 묵은지의 pH는 3.4, 산도는 1.0% 이상으로 나타나 전통식품 표준규격에 적합한 것으로 나타났다. 묵은지 시료들의 pH가 더 낮고, 산도는 더 높은 것으로 확인되었다. 이는 김치가 발효되는 동안 이형발효 유산균 및 동형발효 유산균의 작용을 통하여 젖산을 비롯한 다양한 유기산을 생성하기 때문으로 사료된다[30]. 또한 김치의 평균 염도는 3.02±0.52%, 평균 당도는 11.76±1.36 brix°였으며, 묵은지의 평균 염도는 3.03±0.59%, 평균 당도는 9.29±1.55 brix°로 나타나, 김치와 묵은지 간의 염도는 유의미한 차이가 없었지만, 당도에서는 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다(Table 1). 김치 발효에 관여하는 미생물들이 에너지원으로 당을 이용하기 때문에 김치 발효 중에 김치 내의 환원당을 에너지원으로 이용함에 따라 당도가 낮아진 것으로 사료된다 [25]. 이와 같은 연구 결과는 김치의 숙성기간이 경과할수록 pH는 급격히 감소하고 산도는 증가하며, 염도에서는 큰 변화를 보이지 않지만 당도는 감소한다는 Hwang 등의 연구 결과[5]와 유사하였다.

김치 및 묵은지 시료의 α-diversity 분석

김치 및 묵은지 시료의 α-diversity 분석 결과를 Table 2과 같이 요약하였다. 김치의 평균 valid read 수는 84,470 개, 묵은지의 평균 valid read 수는 92,240개였으며, 모든

Table 1. pH, acidity, salinity, and sugar contents of *Kimchi* and *Mukeunji* samples

Sample	pH	Acidity (%)	Salinity (%)	Sugar content (brix)
KC	5.50±0.43	0.40±0.11	3.02±0.52	11.76±1.36
MEJ	3.82±0.23	1.44±0.29	3.03±0.59	9.29±1.55

Symbols: KC: *Kimchi*, MEJ: *Mukeunji*

Table 2. α-diversity of *Kimchi* and *Mukeunji* samples

Sample	ACE	Chao1	Jackknife	OTUs
KC	414.42±147.34	382.38±131.86	436.00±140.15	346.60±107.92
MEJ	459.82±132.35	421.40±114.56	481.94±120.97	368.73±83.33
p-value	p=0.165	p=0.165	p=0.165	p=0.263
Sample	NPS Shannon	Shannon	Simpson	Phylogenetic diversity
KC	1.14±0.56	1.13±0.56	0.55±0.22	435.67±153.24
MEJ	1.27±0.48	1.25±0.48	0.49±0.21	539.33±165.82
p-value	p=0.494	p=0.494	p=0.419	p=0.033

Symbols: KC: *Kimchi*, MEJ: *Mukeunji*

시료에서 99.7% 이상의 Good's coverage of library를 나타내 시료 내 미생물 군집을 파악하고 비교분석 하는데 신뢰성을 확보할 수 있는 충분한 read를 얻은 것으로 확인하였다. 김치와 묵은지의 종 추정치(OTUs) 수는 각각 346.60, 368.73으로 계산되었으며, 종 균등성(evenness)을 나타내는 Shannon 지표는 김치에서 1.13, 묵은지에서 1.25로 나타났고, 하나의 시료에서 임의의 두 read를 선택하였을 때 같은 종일 확률, 즉 종 다양성을 나타내는 Simpson 지표는 김치에서 0.55, 묵은지에서 0.49로 나타났지만, 종간의 계통학적 차이를 수치화하여 계통적 다양성을 나타내는 phylogenetic diversity 지표는 김치에서 평균 435.67, 묵은지에서 평균 539.33으로 나타나 김치와 묵은지 간의 미생물 분포의 균등성이나 다양성에는 차이가 없으나, 묵은지의 phylogenetic diversity 지표가 김치보다 유의미한 수준으로 높으므로($p=0.033$) 묵은지에서 계통학적으로 먼 미생물이 김치보다 더 다양하게 존재하고 있음을 확인하였다.

김치 및 묵은지 세균 분포 분석

김치 및 묵은지의 세균 분포도를 확인하기 위하여 미생

물학적 분류단계 수준에 따른 미생물의 비율을 Fig. 1에 나타내었다. 김치와 묵은지는 문(phylum) 수준에서 *Firmicutes*, 강(class) 수준에서 *Bacilli*, 목(order) 수준에서 *Lactobacillales*가 95% 이상의 비율을 차지한다는 공통점을 나타내었다. 과(family) 수준에서는 김치 *Leuconostocaceae* 83.74%, 묵은지 *Lactobacillaceae* 80.87% 비율로 차이를 보였으며, 속(genus) 수준에서는 *Weissella* 속이 김치의 60.62%를 차지한 반면, 묵은지에서는 *Pediococcus* 속이 57.61%를 차지하였다.

종(species) 수준에서는 김치에서 *Weissella kandleri* 58.97%, 묵은지에서 *Pediococcus inopinatus* 56.90%를 차지하였다. *Pediococcus inopinatus*의 경우 묵은지에서 56.90% 비율을 차지하는 묵은지의 우점 종인데 반해, 김치에서는 전혀 존재하지 않았다. Ohn 등의 연구 결과[22]에 의하면 전통발효식품인 가자미 식해로부터 분리된 *Pediococcus inopinatus*가 pH 2.5의 산성 조건에서 60% 이상의 생존율을 나타내었다고 보고한 바 있어 묵은지 내에서만 *Pediococcus inopinatus*가 존재하는 원인은 김치보다 평균 pH가 낮은 묵은지의 산성 조건에서도 높은 생존율을 보이기 때문인 것으로 사료된다.

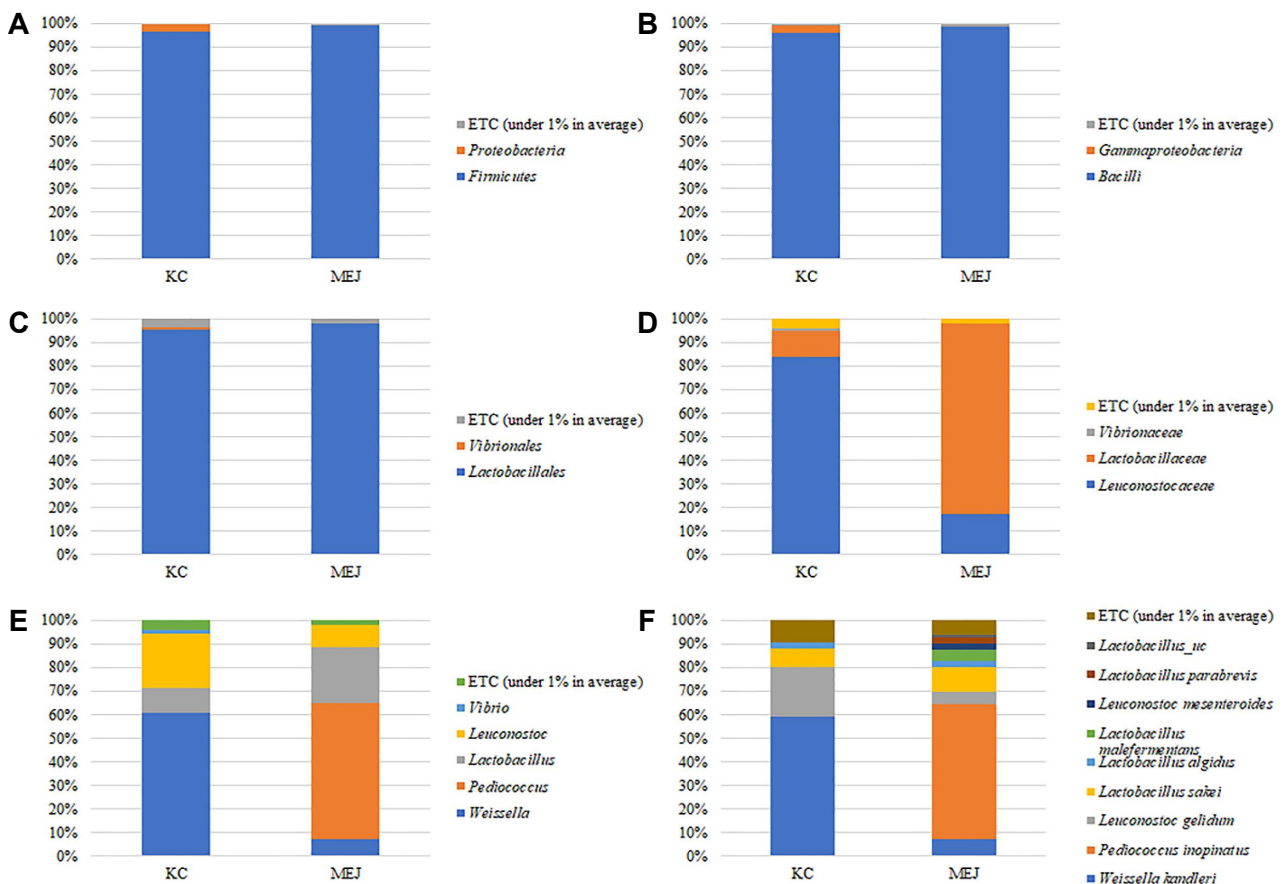


Fig. 1. Microbial composition and relative abundance in *Kimchi* (KC) and *Mukeunji* (MEJ) based on taxonomic levels of classification. uc: uncultured.

또한 종 수준에서 평균 1.00% 이상의 비율을 차지하는 세균의 분포를 비교분석한 결과, 김치에는 *Weissella kandleri*, *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus algidus*만 확인되었으나, 묵은지에는 *Pediococcus inopinitus*, *Lactobacillus sakei*, *Weissella kandleri*, *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus malefermentans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus parabrevis*, *Lactobacillus algidus*가 확인되어 김치보다 묵은지에 더욱 다양한 미생물이 분포한다는 것과 미생물학적 분류 수준이 낮아질수록 미생물 분포 차이가 확연하게 드러나는 것을 확인할 수 있었다.

김치 및 묵은지 시료의 β -diversity 및 beta set-significance 분석

김치와 묵은지 시료 간의 세균 군집구조를 비교하기 위하여 UniFrac metric을 기반으로 한 β -diversity 분석을 실시하였다. 클러스터링을 통하여 시료 간 미생물 군집의 차이를 알아보는 PCoA (Principal coordinate analysis) 분석과 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) 분석을 수행한 결과, 속 수준과 종 수준에서 모두 김치와 묵은지 그룹 간의 클러스터가 명확하게 분리되는 것을 확인하였다(Fig. 2, Fig. 3). 또한, 김치와 묵은지의 미생물 분포에 통계학적으로 유의한 수준의 차이가 있는지 분석하기 위하여 Generalized UniFrac distance metric, UniFrac distance metric을 기반으로 PERMANOVA 분석을 수행하였다. 그 결과, p -value가 0.001로 나타나 김치와 묵은지의 미생물 분포가 상이하다는 것이 통계학적으로 검

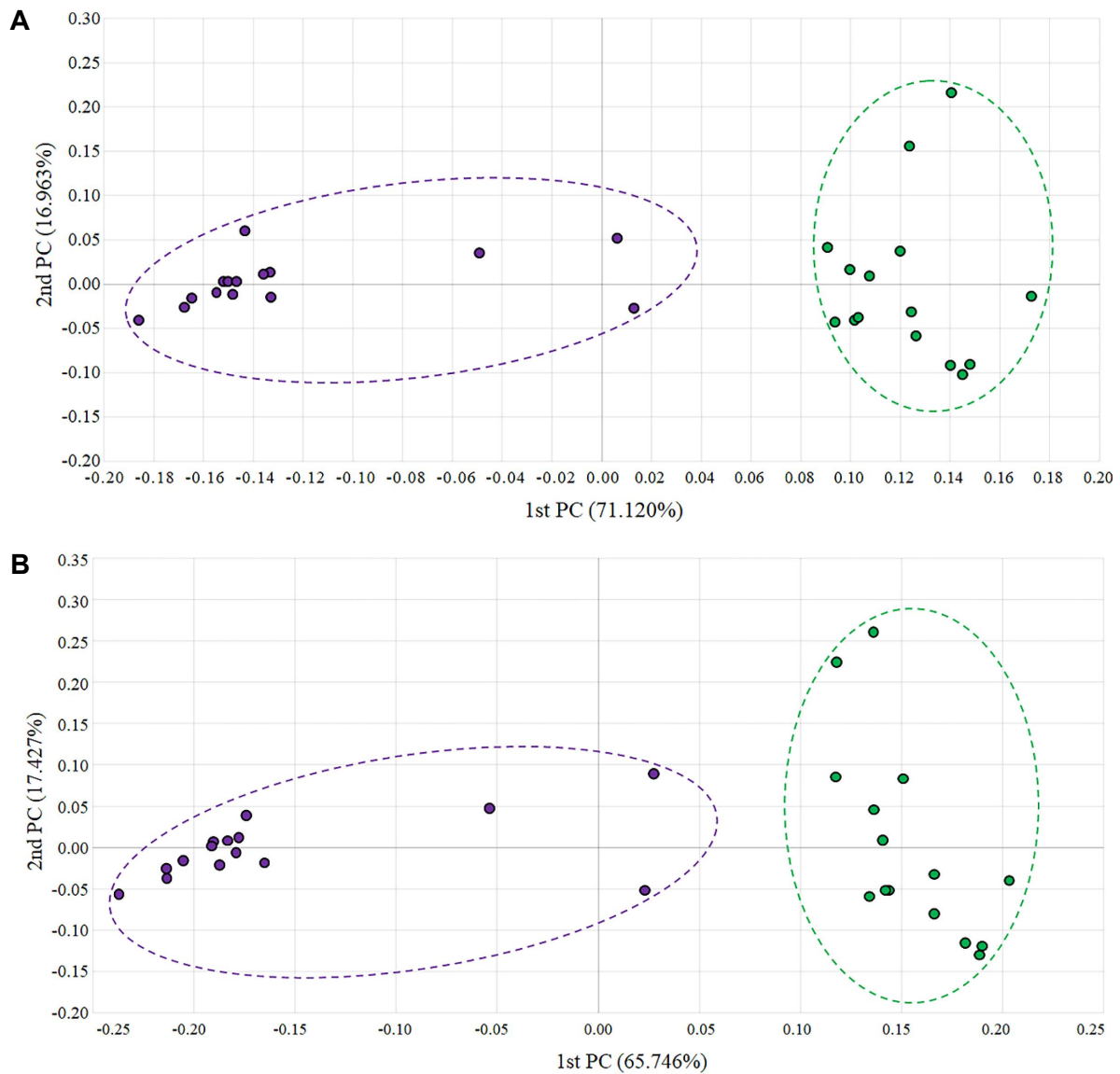


Fig. 2. PCoA clustering result based on UniFrac dissimilarity metric of bacterial communities at genus (A) and species (B) level (green circle : Kimchi, purple circle : Mukeunji).

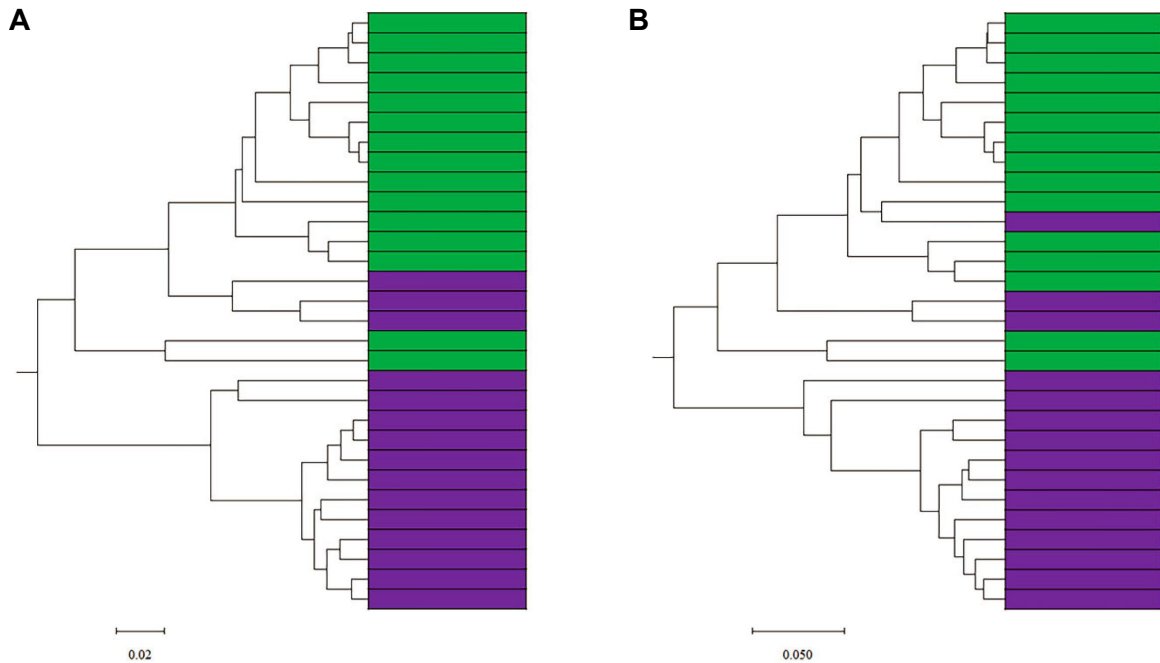


Fig. 3. UPGMA clustering result based on UniFrac dissimilarity metric of bacterial communities at genus (A) and species (B) level (green bar : Kimchi, purple bar : Mukeunji).

증되었다(Table 3).

Taxonomic biomarker 분석

김치와 묵은지 내의 세균 군집을 대표하는 지표(biomarker)를 확인하기 위한 LEfSe 분석을 실시하였다. 종 수준에서 2.0 이상의 LDA (Linear discriminant analysis) score를 LDA effect size로 하였으며, LEfSe 분석 결과를 바탕으로 LDA effect size 상위 22종의 taxa와 p-value를 Table 4에 나타내었다. 종 수준에서의 biomarker를 비교한 결과 *Weissella kandleri*, *Leuconostoc gelidum*은 상대적으로 김치에서 많이 분포하며, *Pediococcus inopinatus*, *Lactobacillus malefermentans*, *Leuconostoc mesenteroides*는 묵은지에 상대적으로 많이 분포하는 것으로 나타났다(Fig. 4). 이러한 biomarker 미생물들은 김치와 묵은지 사이에 $p < 0.05$ 의 값을 나타내어 김치와 묵은지 세균 군집 간에 매우 유의한 차이가 있는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 묵은지에서 *Pediococcus* 속이 우점한다는 Hong 등의 연구 결과[3]와 유사하였다. 이전의 연구결과[15]에 의하면 *Weis-*

sella 속과 *Leuconostoc* 속은 낮은 내산성으로 김치 발효 초기에 우점하나 *Leuconostoc mesenteroides*는 발효 후기에 우점하며, *Lactobacillus* 속 또한 높은 내산성으로 김치 발효 후기에 우점하는 것으로 알려진 바 있어 본 연구 결과와 유사하였으며, 김치의 미생물 군집 구조 변화는 김치 발효 기간이 진행됨에 따라 낮아지는 산도에 의한 것으로 판단된다.

본 연구에서는 국내 시판 김치와 묵은지의 이화학적 특성 및 군집 구조를 비교 분석한 결과, 김치에 비하여 묵은지의 pH가 더 낮고 산도는 상대적으로 더 높으며, 염도는 유의미한 차이를 보이지 않았지만, 당도는 김치가 더 높은 것을 확인하였다. 차세대 염기서열 분석기술을 통하여 군집 구조를 분석한 결과 김치보다 묵은지 내에 계통학적으로 먼 미생물이 더 다양하게 존재하고 있는 것으로 확인되어, 종 수준에서 평균 1.00% 이상의 비율을 차지하는 세균의 분포를 비교해 보았을 때, 김치에는 *Weissella kandleri*, *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus algidus*로 나타났으나, 묵은지에는 *Pediococcus inopinatus*, *Lactobacillus sakei*, *Weissella kandleri*, *Leuconostoc gelidum*, *Lactobacillus malefermentans*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus parabrevis*, *Lactobacillus algidus*가 나타났다. 특히 *P. inopinatus*는 묵은지 내에서만 특이적으로 존재하는 것으로 확인되었다. 이러한 김치와 묵은지 시료 간 미생물 분포에 통계학적으로 유의한 수준의 차이가 있는지 분석하기 위하여 PERMANOVA 분석을 수행하였으며, 그 결과 p-value가 0.001로 나타나 김치와

Table 3. PERMANOVA for bacterial communities from Kimchi and Mukeunji

Test	Generalized UniFrac	UniFrac
Group size	2	2
Sample size	30	30
Permutations	999	999
p-value	p=0.001	p=0.001

Table 4. Biomarker analysis of microorganisms at the species level between *Kimchi* and *Mukeunji* using LEfSe analysis

Taxon name	LDA effect size	p-value	Relative taxonomic abundance (%)	
			KC	MEJ
<i>Pediococcus inopinatus</i>	5.47	0.00001	0.19570	56.89790
<i>Weissella kandleri</i>	5.43	0.00005	58.96870	7.30560
<i>Leuconostoc gelidum</i>	4.87	0.04425	21.14900	5.69290
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	4.41	0.00007	0.01180	4.54250
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4.02	0.02944	0.57010	2.75400
<i>Lactobacillus parabrevis</i>	4.00	0.00257	0.00390	2.53380
<i>Lactobacillus hokkaidonensis</i>	3.72	0.02943	0.00180	0.88280
<i>Lactobacillus_uc</i>	3.70	0.00394	0.03080	1.28310
<i>Pediococcus_uc</i>	3.54	0.00004	0.01230	0.68200
<i>Weissella_uc</i>	3.47	0.00001	0.67220	0.09560
<i>Lactobacillus koreensis</i>	3.19	0.04133	0.00060	0.38680
<i>Lactobacillus oryzae</i>	2.79	0.00020	0.00010	0.10930
<i>Weissella diestrammenae</i>	2.65	0.00005	0.10480	0.01840
<i>Lactobacillus paucivorans</i>	2.56	0.00756	0.00000	0.09280
<i>Pseudomonas_uc</i>	2.41	0.01071	0.08010	0.03370
<i>Clostridium celatum</i>	2.38	0.04270	0.05220	0.00460
<i>Pseudomonas amygdali</i>	2.26	0.00692	0.03990	0.03150
<i>Pseudomonas veronii</i>	2.20	0.00129	0.03760	0.01190
<i>Janthinobacterium lividum</i>	2.15	0.00080	0.02590	0.00040
<i>Pediococcus acidilactici</i>	2.06	0.00534	0.00170	0.02890
<i>Pseudomonas marginalis</i>	2.04	0.00467	0.02170	0.00260
<i>Lactobacillus plajomi</i>	2.03	0.01774	0.00010	0.02600

Symbols: KC: Kimchi, MEJ: Mukeunji
uc: uncultured.

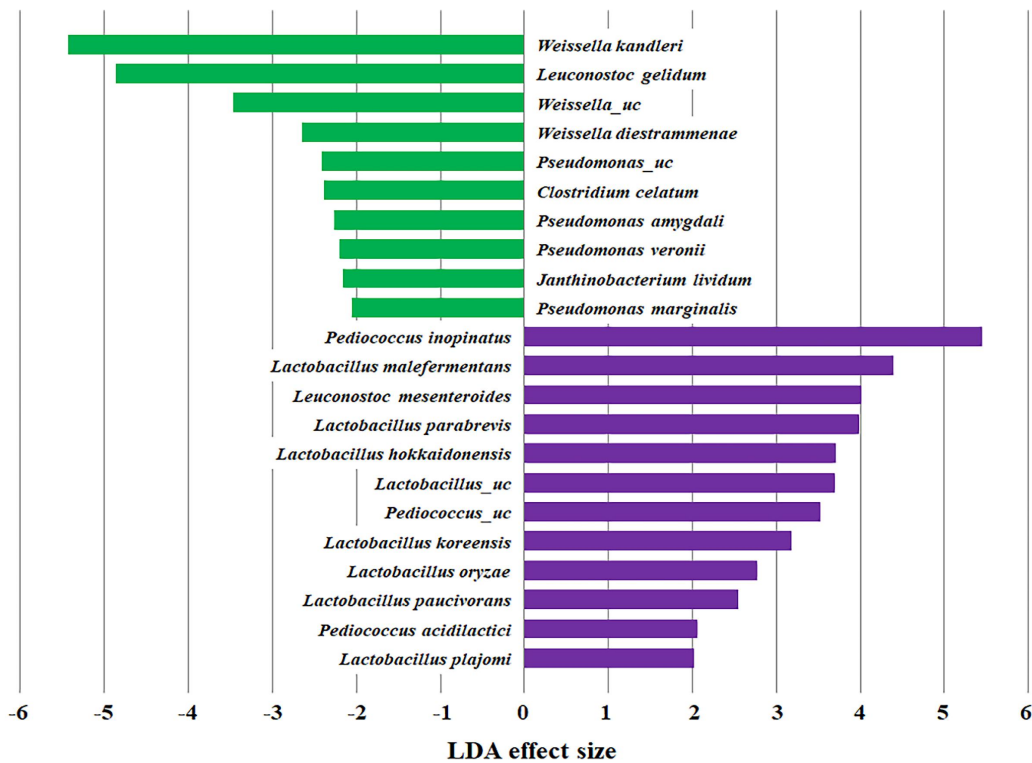


Fig. 4. Biomarker discovery by LEfSe analysis between *Kimchi* and *Mukeunji* at species level (green bar : *Kimchi*, purple bar: *Mukeunji*). uc: uncultured.

묵은지의 미생물 분포가 상이하다는 것이 통계학적으로 검증되었다. LEfSe 분석을 통하여 김치와 묵은지 내의 세균 군집을 대표하는 지표(biomarker) 탐색 결과 *W. kandleri*, *L. gelidum*은 김치의 biomarker 미생물이며, *P. inopinatus*, *L. malefermentans*, *L. mesenteroides*는 묵은지의 biomarker 미생물로 확인되었다. 이와 같은 연구 결과는 향후 묵은지의 품질 규격의 개발 및 표준화에 활용될 수 있을 것으로 예상된다.

감사의 글

본 연구는 2022년 농림축산식품부 농축산·식품 마이크로바이옴 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

1. AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. Method 33.7, 16th ed., Association of official analytical chemists, Washington DC, USA
2. Codex Alimentarius Commission. 2001. Codex standard for kimchi. *Codex Stan.* **223**, 1-3.
3. Hong, Y., Li, J., Qin, P., Lee, S. Y. and Kim, H. Y. 2015. Predominant lactic acid bacteria in mukeunji, a long-term-aged kimchi, for different aging periods. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 545-550.
4. Hur, S. W., Ko, M. S., Kim, M. R., Lee, H. R., Chung, S. J. and Cho, M. S. 2015. Physicochemical characteristics and sensory properties of commercial Mukeunji products. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **44**, 702-708.
5. Hwang, E. S., Kim, H. S., Kim, S. H., Ko, H. J., Lee, M. Y. and Yoon, E. K. 2016. Quality and sensory characteristics of commercial Kimchi according to sodium contents. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **48**, 413-417.
6. Illumina. 2013. 16S metagenomic sequencing library preparation protocol: Preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. Part no. 15044223 Rev B. Illumina, San Diego, CA. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
7. Ji, S. H., Han, W. C., Lee, J. C., Cheong, C., Kang, S. A., Lee, J. H. and Jang, K. H. 2009. Effect of low temperature on the qualities of long-term fermented kimchi (Korean pickled cabbage). *Kor. J. Food Preserv.* **16**, 804-809.
8. Kim, H. J., Shin, H. K. and Yang, E. J. 2013. Production and fermentation characteristics of mukeunji with a mixed starter. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 1467-1474.
9. Kim, J. Y., Park, E. Y. and Kim, Y. S. 2006. Characterization of volatile compounds in low-temperature and long-term fermented baechu kimchi. *J. Kor. Soc. Food Cult.* **21**, 319-324.
10. Ko, M. S., Hur, S. W., Kim, M. R., Jung, S. J., Lee, H. and Cho, M. S. 2015. The quality properties of rapidly fermented mukeun (long-term fermented) kimchi with different salinity and fermented temperature. *Kor. J. Food Nutr.* **28**, 335-342.
11. Lee, C. H. 1986. Kimchi; Korean fermented vegetable foods. *J. Kor. Soc. Food Cult.* **1**, 395-402.
12. Lee, E. H., Lee, M. J. and Song, Y. O. 2012. Comparison of fermentation properties of winter kimchi stored for 6 months in a kimchi refrigerator under ripening mode or storage mode. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **41**, 1619-1625.
13. Lee, J. J., Jung, H. O. and Lee, M. Y. 2011. Development of dduk-galbi added with ripened Korean cabbage kimchi. *Food Sci. Anim. Resour.* **31**, 304-310.
14. Lee, J. J., Jung, H. O., Lee, M. Y. and Chang, H. C. 2012. Characteristics of *Mandu* with ripened Korean cabbage *Kimchi*. *Kor. J. Food Preserv.* **19**, 209-215.
15. Lee, S. H., Jung, J. Y. and Jeon, C. O. 2015. Source tracking and succession of Kimchi lactic acid bacteria during fermentation. *J. Food Sci.* **80**, M1871.
16. Lim, E. S. 2020. Evaluation of microbial contamination levels and biogenic amines content in over-ripened kimchi. *Kor. J. Food Preserv.* **27**, 635-650.
17. Lozupone, C. and Knight, R. 2005. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 8228-8235.
18. Moon, S. H., Kim, C. R., Lee, P. W. and Chang, H. C. 2019. Study on the establishment of standard for mukeunji product through characteristic analysis of commercial mukeunji products. *Kor. J. Community Living Sci.* **30**, 33-51.
19. Moon, S. H., Moon, J. S. and Chang, H. C. 2015. Rapid manufacture and quality evaluation of long-term fermented kimchi (mukeunji) using *Lactobacillus sakei* SC1. *Food Sci. Biotechnol.* **24**, 1797-1804.
20. Nam, M. H., Kong, C. S., Bak, S. S., Lee, Y. B., Rhee, S. H. and Park, K. Y. 2007. Physicochemical properties of long-term fermented kimchi. *Prev. Nutr. Food Sci.* **12**, 46-50.
21. Ohn, J. E., Seol, M. K., Bae, E. Y., Cho, Y. J., Jung, H. Y. and Kim, B. O. 2020. The potential probiotic and functional health effects of lactic acid bacteria isolated from traditional Korean fermented foods. *J. Life Sci.* **30**, 581-591.
22. Park, J. M., Shin, J. H., Lee, D. W., Song, J. C., Suh, H. J., Chang, U. J. and Kim, J. M. 2010. Identification of the lactic acid bacteria in kimchi according to initial and over-ripened fermentation using PCR and 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Sci. Biotechnol.* **19**, 541-546.
23. Park, K. Y. 1995. The nutritional evaluation, and antimutagenic and anticancer effects of Kimchi. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **24**, 169-182.
24. Park, K. Y., Jeong, J. K., Lee, Y. E. and Daily III, J. W.

2014. Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J. Med. Food* **17**, 6-20.
25. Park, S. H. and Lee, J. H. 2005. The correlation of physico-chemical characteristics of Kimchi with sourness and overall acceptability. *Kor. J. Food Cook Sci.* **21**, 103-109.
26. Park, W. S., Lee, I. S., Han, Y. S. and Koo, Y. J. 1994. Kimchi preparation with brined chinese cabbage and seasoning mixture stored separately. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 231-238.
27. Raymond, J. 2006. World's healthiest foods: Kimchi (Korea). *Health Magazine*.
28. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky L. and Garrett, W. S. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, R60.
29. Woo, N., Lee, H. R. and Ko, S. 2022. Changes in microbial properties and sensory characteristics during the storage of kimchi in containers with native plant extracts. *Jour. of KoCon.a* **22**, 646-655.
30. You, S. Y., Yang, J. S., Kim, S. H. and Hwang, I. M. 2017. Changes in the physicochemical quality characteristics of cabbage kimchi with respect to storage conditions. *J. Food Qual.* **2017**, 1-7.

초록 : 국내 시판 김치와 묵은지의 이화학적 특성 및 미생물 군집 구조 비교

이수영 · 정수지 · 류명선 · 하광수 · 노윤정 · 정도연 · 양희종*

((재)발효미생물산업진흥원)

본 연구에서는 김치와 묵은지의 미생물 군집 구조와 이화학적 특성을 비교 분석하였다. 김치와 묵은지의 이화학적 특성 분석 결과 묵은지 시료들의 pH가 김치보다 더 낮았으며, 산도는 더 높은 것으로 나타났다. 김치와 묵은지 간의 염도에는 차이가 없는 것으로 나타났으며, 김치에서 당도가 묵은지보다 높은 것으로 나타났다. α -diversity 분석 결과 김치와 묵은지 사이에 종 추정치와 종 풍부도 지수는 차이가 없는 것으로 나타났으나, 계통발생학적 차이를 반영한 phylogenetic diversity 지수는 묵은지에서 김치보다 유의한 수준으로 높은 것으로 나타났다. 김치와 묵은지의 미생물 군집을 생물학적 분류수준에 따라 분석한 결과 두 그룹 모두 공통적으로 과(family) 수준에서 *Lactobacillaceae*가 가장 우점하였으나, 높은 내산성을 갖거나 김치 내에서 높은 성장 경쟁력을 갖는 것으로 알려진 *Pediococcus* 속과 *Lactobacillus* 속 유산균의 상대적인 분포가 묵은지에서 높은 것으로 나타났다. 김치와 묵은지의 전체 미생물 군집 구조에 통계학적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 beta set-significance 분석을 수행한 결과 김치와 묵은지 두 그룹의 전체 미생물 군집 구조가 통계학적으로 신뢰수준에서 매우 다른 것으로 나타났으며, 김치에서 상대적으로 높은 *Weissella kandleri*의 분포와 묵은지에서 상대적으로 높은 *Pediococcus inopinatus*의 높은 분포가 김치와 묵은지의 전체 미생물 군집 구조 차이에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다.