Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 24, No. 2, 234-241 (1996)

김치유래 젖산균의 균체지방산 분석을 이용한 분류학적 연구

이정숙 · 정민철 · 김우식 · 이근철 · 김홍중 · 박찬선[1] · 이헌주[1] · 주윤정[1] · 이근종[1] · 안종석[1] · 박 완[2] · 박용하* · 민태익[1]
한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행, [1]미생물화학연구그룹,
[2]경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Identification of Lactic Acid Bacteria from Kimchi by Cellular FAMEs Analysis. Jung-Sook Lee, Min-Chul Jung, Woo-Sik Kim, Keun-Chul Lee, Hong-Joong Kim, Chan-Sun Park[1], Hun-Joo Lee[1], Yun-Jung Joo[1], Kun-Jong Lee[1], Jong-Seog Ahn[1], Wan Park[2], Yong-Ha Park* and Tae-Ick Mheen[1]. *Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejon, 305-600, Korea, [1]Microbial Chemistry Research Group, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. Box 115, Yusong, Taejon, 305-600, Korea, [2]Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea* — Two hundreds and thirty lactic acid bacteria, mostly isolated from Kimchi, including type strains were used for analysis of cellular fatty acids. The 230 test strains were recoverd in 7 major and 1 single clusters defined at Euclidian distance of 17.5. These aggregate taxa were equivalent to the genus *Leuconostoc* (aggregate group A, B, C and D), the genus *Lactobacillus* (aggregate group F), the genera *Lactobacillus* and *Pediococcus* (aggregate group E) and the genera *Leuconostoc* and *Lactobacillus* (aggregate group G). It is concluded as evident that FAMEs (Fatty Acid Methyl Esters) profile of cell can be used as a criterion in classification of lactic acid bacteria from kimchi. Additional comparative taxonomic studies need to be carried out on well chosen representative strains to determine the most appropriate methods of value.

한국 고유의 김치는 배추나 무우가 주원료이며 이것을 소금에 절인 후 여러가지 양념과 혼합하여 일정기간 미생물로 발효시킨 채소발효식품이다. 이러한 김치는 여러가지 원료와 미생물이 적절하게 조화되고 발효되어 그 고유의 맛이 나타나게 된다. 김치에 대한 과학적인 연구가 시작된 후 지금까지 김치의 맛, 성분분석 및 산패 등의 원인에 대해서 많은 보고가 되어왔다(1). 김치 발효에 관여하는 미생물들은 주로 젖산균들이 분리 보고되었는데, *Leuconostoc mesenteroides*가 가장 많이 분리되었으며, 그 외 *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Streptococcus faecalis, Pediococcus cerevisiae*와 *Pediococcus pentosaceus* 등이 보고되고 있다(2-5). 그리고 김치의 발효에 관여하는 주요 젖산균은 *Leuconostoc mesenteroides*이고 *Lactobacillus plantarum*은 산패에 관여한다고 보고되었다(6). 그러나 김치 발효에 관여하는 미생물의 분류, 동정에 있어서는 몇 가지 생리생화학적 특징만을 이용하는 간이 동정법이 사용되어왔을 뿐 체계적인 연구가 미흡하였다. 따라서 김치유래 젖산균에 대한 체계적인 분류 및 고속동정에 대한 연구의 필요성이 증가되고 있다.

젖산균들은 그람양성 세균으로서 *Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Lactococcus* 및 *Enterococcus* 등의 구균과 *Lactobacillus*와 *Carnobacterium* 등의 간균이 알려져 있다. 이러한 젖산균은 선택분리배지가 비슷하며 생리적으로도 유사하여 생육에 따른 명확한 구분도 어렵다. 그리고 *Leuconostoc, Lactobacillus* 및 *Pediococcus*는 16S rRNA 염기서열 분석을 통한 계통진화학적 관계에서도 혼재된다고 보고되었다(7-9).

오늘날 미생물의 분류, 동정에는 여러가지 방법들이 이용되고 있다. 그 중의 하나인 화학적 분류방법(chemotaxonomy)은 DNA base composition(G+C mol %), DNA-DNA hybridization, DNA-RNA hybridization, Amino acid sequence analysis, Phospholipid pattern, Quinone 및 Cellular fatty acid profile 등의 여러가지 분석을 통하여 미생물이 지니고 있는 화학적 다양성을 미생물의 체계적인 분류(classification)와 동정(identification)에 이용하는 것으로서, 분석기기의 발달로 간편하고 신속하게 미생물을 분류, 동정할 수 있게 되었다.

이들중 균체지방산은 세포 지질의 필수 구성성분으로 젖산균을 포함한 모든 미생물에 존재하고 있다(10). 미생물에서 균체지방산은 10~24개 정도의 carbon chain으로 이루어져 있으며 그들의 길이, 이중결합의 위치, 치환기 등에 따라 다양한 형태로 존재하기 때문에 미생물 분류 연구에서 중요한 위치를 차지하고 있다. 지금까지의 균체 지방산 분석은 주로 일반적인 Gas Chromatography를 이용하여 왔으나, 최근에는 Microbial

*Corresponding author.
Key words: Cellular fatty acid profiles, lactic acid bacteria, chemotaxonomy

Identification System(MIDI ; Microbial ID, Inc., Newark, Del., USA) 이라는 Automated Gas Chromatography를 도입하여 균체지방산을 분석하고, UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic averages, 11)를 이용하여 신속하게 균주들간의 상호관계를 grouping 하여 미생물의 분류, 동정에 응용하고 있으며, 이를 이용한 *Xanthomonas* 및 *Aeromonas* 등의 분류학적 연구가 발표되었다(12, 13). *Xanthomonas*는 주로 식물 병원균이며 생리, 생화학적 특성이나 protein, DNA, bacteriophage 분석 등을 통하여서는 분류 체계가 모호하였으나, MIDI를 이용하여 균체지방산 조성의 분석을 토대로 하여 시험균주들을 grouping하고 균체지방산 조성 분석 패턴을 데이타베이스화 함으로써 이들 균주의 분류체계의 확립과 동시에 미지의 *Xanthomonas* 균주의 고속동정에도 응용할 수 있게 되었다(12). 또, 동물성 병원균인 Aeromonas의 분류는 지금까지의 생리, 생화학적 방법이나 유전자 분석방법을 통해서는 분류 체계 정립에 혼돈이 있었으나 MIDI를 이용한 균체지방산 조성 분석과 grouping을 이용하여 분류 체계를 재정립하게 되었다(13).

본 연구에서는 김치로 부터 분리한 젖산균에 대한 체계적 분류 및 고속동정을 위한 일차단계로서 Whole Cell Fatty Acid Methyl Esters(FAMEs)를 Automated Gas Chromatography로 분석한 결과를 이용하여 데이타베이스를 구축하고 이를 토대로 그들간의 상관관계를 밝혔다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용된 김치 유래의 젖산균은 한국과학기술연구원 생명공학연구소 미생물화학 Research Group으로 부터 약 500여 균주가 분리, 공급되었으며(14), 대조균으로서 사용된 표준균주는 한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행에서 분양 받았다(Table 1).

분리 젖산균의 배양

본 실험에 사용된 모든 균주는 MRS(Difco #0881-17-5) 액체배지에서 1차적으로 배양한 후 MRS 고체배지에서 48시간씩 두번 계대배양하여 실험에 사용하였고 배양온도는 28℃로 하였다.

FAMEs(Fatty Acid Methyl Esters) 분석을 위한 시료의 준비

Gas Chromatography를 이용한 FAMEs 분석은 Miller의 방법(15)에 따랐다. MRS 고체배지에서 배양한 약 50 mg(wet weight)의 cell을 Teflon-lined screw cap tube(φ 13×100 mm, pyrex)에 옮긴 후, 50% methanol에 15% NaOH를 첨가한 용액 1 m*l*을 넣고 100℃에서 30분간 가열하여 실온에서 식힌다. 여기에 methanolic-HCl 2 m*l*(6.0N HCl 325 m*l*과 methanol 275 m*l* 혼합 용액)을 첨가하여 80℃에서 10분간 가열한 뒤 급냉한 후 1.25 m*l*의 hexane/methyl-tert-butylether(1 : 1 v/v)을 넣고 10분간 잘 섞어준다. 실온에 정치한 후 반응액이 2개의 층으로 분리되면 하등액만을 제거하고 3 m*l*의 dilute NaOH(10.8 g NaOH/900 m*l* D.W.)를 첨가하여 5분간 섞어주고 saturated NaCl을 몇 방울 떨어뜨린 다음 상등액의 2/3 정도를 septum-capped sample vial(12×32 mm, Alltech Associates, Inc., IL, U.S.A)로 옮겨 capping 하여 시료로 사용하였다.

Gas Chromatography에 의한 Fatty Acid Methyl Esters(FAMEs) 분석

FAMEs의 분석에는 Hewlett Packard series II Gas Chromatograph model 5890A(Microbial ID, Inc., Delaware, USA)가 이용되었으며 separation column은 25 m×0.22 mm×0.33 m methyl phenyl silicone fused silica capillary column(HP 19091B-102)을 사용하였다.

FAMEs profile은 Microbial Identification System Software(Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 이용하였으며 standard calibration 용액(Microbial ID, Inc., Delaware, USA)과의 비교에 의해 peak의 동정, retention time, peak의 면적, 면적 비율을 구하였다.

본 연구에 사용된 Gas Chromatography의 조건은 다음과 같다. Carrier Gas, Hydrogen ; Column Head Pressure, 10 psi ; Split Ratio, 100 : 1 ; Split Vent, 50 m*l*/min ; Septum Purge, 5 m*l*/min ; FID Hydrogen, 30 m*l*/min ; FID Nitrogen, 30 m*l*/min ; FID Air, 400 m*l*/min ; Initial Temperature, 170℃ ; Program Rate, 5℃/min ; Final Temp, 270℃ ; FID Temperature, 300℃ ; Injection Port, 250℃ ; Injection volumn, 2 μ*l*

결과분석방법

1차적으로 500여 균주를 대상으로 한 동정은 Microbial Identification System Aaerobe Library(version 3.5, Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 이용하였으며 Library Generation Software Package를 이용하여 모든 실험 균주를 대상으로 FAMEs profile의 정량적 분석에 의한 dendrogram을 구한 후 99% 이상의 매우 높은 similarity 값을 갖는 유사 균주들은 전체적인 데이타분석을 위해서 한 시료씩만 선택하여 230여 균주를 대상으로 최종적으로 dendrogram을 구하였다. Clustering은 UPGMA를 이용하였다. FAMEs profile간의 유사성은 Euclidean distance를 사용하여 계산되어졌다. Euclidean distance(d)는 $d^2=\Sigma(a_i-b_i)^2$에 의해 구해진다(a_i, b_i는 i번째 character의 값)

Table 1. Source of strains used for analysis of fatty acid

Cluster	Strain	Source
A	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*^{T} KCTC[a] 3530	ATCC[b] 19255
	S3, S27, S105, S178, S199	Korea Fermented Food (Kimchi)
B	S93, S136, S147, S156, S157, S172, S175, S239, S240, S247, S248, S257, S259, S269, S275, S277, S5031, S5032, S5104, S5160, S5178, S5184, S5216, S5225, S5226, S5285, S5286, S5287, S5299, S5300, S5302, S5379, S5382, S5385, S5386, S5388, S5390, S5393, S5394, S5395, S5398, S5400, S5401, S5406, S5412, S5413, S5414, S5417, S5422, S5473, S5474, S5479, S5482, S5486, S5488, S5490, S5493, S5497, S5499, S5502, S5507	Korea Fermented Food (Kimchi)
C	*Leuconostoc amelibiosum*^{T} KCTC 3524	ATCC 13146
	Leuconostoc citreum^{T} KCTC 3526	ATCC 49370
	Leuconostoc pseudomesenteroides^{T} KCTC 3532	ATCC 12291
	S9, S15, S24, S25, S29, S33, S34, S37, S38, S45, S55, S89, S92, S125, S128, S130, S140, S163, S166, S171, S177, S180, S255, S267, S272, S5036, S5037, S5041, S5042, S5047, S5048, S5051, S5055, S5062, S5064, S5112, S5115, S5118, S5119, S5141, S5143, S5147, S5149, S5150, S5151, S5152, S5157, S5158, S5159, S5162, S5163, S5164, S5168, S5169, S5174, S5176, S5180, S5181, S5186, S5224, S5234, S5236, S5247, S5248, S5250, S5251, S5264, S5265, S5272, S5275, S5276, S5277, S5278, S5290, S5297, S5303	Korea Fermented Food (Kimchi)
D	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*^{T} KCTC 3505	NCDO[c] 523
	Leuconostoc carnosum^{T} KCTC 3525	ATCC 49367
	Leuconostoc lactis^{T} KCTC 3528	ATCC 19256
	Leuconostoc mesenteroides subsp. *cremoris*^{T} KCTC 3529	ATCC 19254
	Lactobacillus viridescens^{T} KCTC 3504	NCDO 1655
	S14, S22, S111, S114, S123-1, S170, S174, S176, S207, S231, S242, S262, S263, S5103, S5140, S5166, S5280, S5298, S5312, S5420	Korea Fermented Food (Kimchi)
E	*Lactobacillus plantarum* KCTC 1048	ATCC 8014
	Lactobacillus animalis^{T} KCTC 3501	NCDO 2425
	Lactobacillus brevis^{T} KCTC 3498	NCDO 1749
	S102, S113, S115, S118, S123-2, S126, S141, S168, S185, S187, S212, S5043, S5050, S5056, S5126, S5128, S5129, S5188	Korea Fermented Food (Kimchi)
F	*Lactobacillus plantarum* KCTC 3103	NCDO 340
	Lactobacillus plantarum KCTC 3107	NCDO 1193
	Lactobacillus plantarum^{T} KCTC 3108	NCDO 1752
	Lactobacillus parabuchneri^{T} KCTC 3503	NCDO 2748
	S13, S20, S64, S73, S75, S83, S186, S188, S192, S193, S194, S197, S198, S200, S210, S217, S220, S222, S224, S225, S230, S232, S234, S236	Korea Fermented Food (Kimchi)
G	*Lactobacillus plantarum* KCTC 3104	ATCC 10241
	Lactobacillus delbruekii subsp. *delbruekii*^{T} KCTC 1047	IFO[d] 3202
	Lactobacillus casei^{T} KCTC 3109	NCDO 161
	S1, S2, S4, S32, S63	Korea Fermented Food (Kimchi)
H	S5123	Korea Fermented Food (Kimchi)

[a]KCTC: Korean Collection for Type Cultures, KRIBB, KIST, Taejon, Korea.
[b]ATCC: American Type Culture Collection, Rockvill, Md., U. S. A.
[c]NCDO: NCFB, National Collection of Food Bacteria, Reading, UK.
[d]IFO: Institute for Fermentation, Yodogawa-ku, Osaka, Japan.
[T]Type strain

결과 및 고찰

배양시간이 FAMEs profile에 미치는 영향

본 실험에서 대조균으로 사용된 6개의 표준균주(*Lactobacillus delbruekii* subsp. *delbruekii*^{T} KCTC 1047, *Lactobacillus plantarum* KCTC 1048, *Lactobacillus plantarum*^{T} KCTC 3108, *Lactobacillus brevis*^{T} KCTC 3498, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*^{T} KCTC 3505, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*^{T} KCTC 3529)를 MRS 고체 배지에서 28℃로 각각 24시간과 48시간 배양한 후 FAMEs profile을 비교하였다. 그 결과 48시간 배양후의 FAMEs profile에서 24시간 배양 결과보다 높은 재현성을 보여주었다. 따라서 본 실험에서는 모든 균주를 48시간 배양후 FAMEs profile을 비교하였다.

재현성

Gas Chromatography에 의한 FAMEs profile의 분석은 매우 높은 재현성을 보여주고 있다. 실험에 대조균으로 사용된 4개의 표준균주(*Lactobacillus plantarum* KCTC 1048, *Lactobacillus brevis*^{T} KCTC 3498, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*^{T} KCTC 3530, *Leuconostoc pseudomesenteroides*^{T} KCTC 3532)와 3개의 분리균주(S38, S188, S229)를 대상으로 재현성 실험을 거친 결과 동일한 Cluster에 포함되어졌으며, 5개의 표준균주(*Lactobacillus parabuchneri*^{T} KCTC 3503, *Leuconostoc carnosum*^{T} KCTC 3525, *Leuconostoc lactis*^{T} KCTC 3528, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*^{T} KCTC 3505, *Leuconostoc amelibiosum*^{T} KCTC 3524)는 40일의 간격으로 재현성 실험을 거친 결과 동일한 Cluster에 포함되었다. 그리고 재현성 실험에서 모든 균주의 대표적인 지방산 성분의 변화는 3% 미만이었으며, 이것은 본 실험 결과가 높은 재현성을 보여주고 있음을 나타내었다(12, 13).

김치 유래 젖산균의 지방산 조성

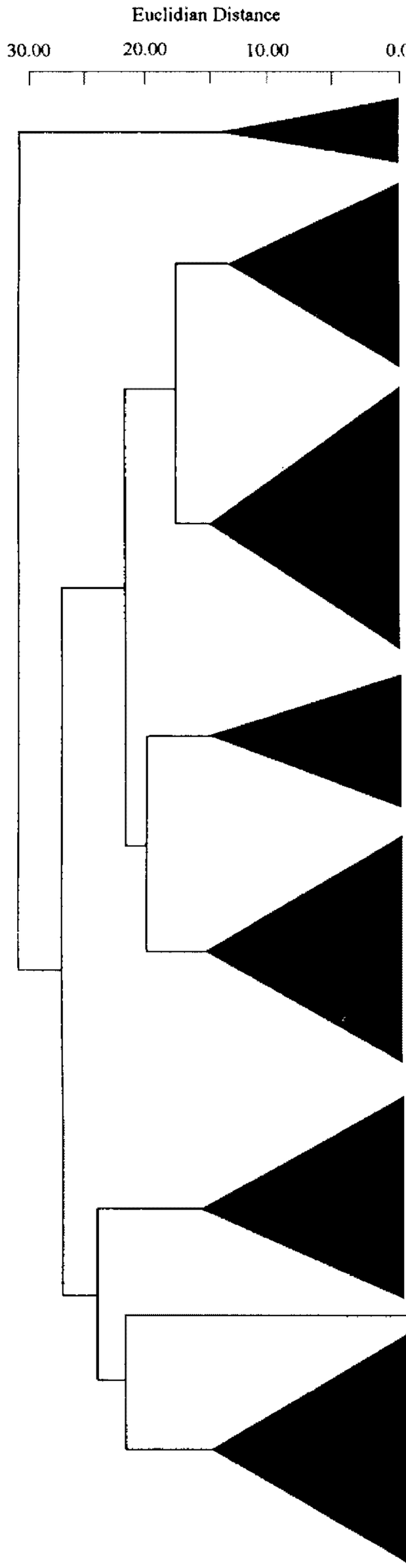
표준균주를 포함한 230여개의 김치 유래 젖산균의 지방산 분석 결과 37 종류의 지방산 성분이 검출되었다. 이중 15 종류의 FAMEs는 실험한 모든 균주에서 5% 미만의 미량으로만 검출되었으므로 UPGMA에 의한 분석에는 포함시키지 않았다(12, 13). 나머지 22개 FAMEs의 빈도와 평균 백분율은 Table 2에 나타내었다.

모든 균주는 C14 : 0, C16 : 0, C16 : 1 ω7*c*, C18 : 1 ω9*c* 및 Summed feature 7 등의 7개의 FAMEs를 가지고 있다. 그리고 70% 이상의 균주들에서 그외 3개의 FAMEs(C18 : 0, C19 : 0 CYCLO ω8*c*, Summed feature 9)가 나타났다. 10개의 FAMEs는 김치 유래 젖산균 지방산의 주요성분이라고 생각된다. 각 균주들이 함유하고 있는 FAMEs의 조성비는 Cluster에 따라서 차이

Table 2. Major fatty acid profiles of test strains[a]

Compound	Frequency (%)	% in lactic acid bacteria: Mean[b] (%)	Minimum value	Maximum value
Saturated fatty acids				
12:0	45	0.35	0.00	1.79
14:0	100	8.08	1.14	21.18
15:0	32	0.16	0.00	1.58
16:0	100	24.56	10.80	41.14
18:0	84	1.44	0.00	8.04
Unsaturated fatty acids[c]				
16:1 ω9*c*	9	0.03	0.00	0.91
16:1 ω7*c*	100	7.56	1.10	16.28
16:1 ω5*c*	45	0.30	0.00	1.49
17:1 ω8*c*	62	0.47	0.00	1.76
18:1 ω9*c*	100	21.17	5.91	52.45
Branched fatty acids				
15:0 *anteiso*	14	0.05	0.00	0.82
17:0 *anteiso*	37	0.23	0.00	2.68
18:1 *iso* H[d]	7	0.11	0.00	5.11
19:0 *iso*	29	0.26	0.00	1.92
Hydroxy				
16:0 2OH	8	0.09	0.00	4.56
Cyclopropane				
17:0 CYCLO	22	0.25	0.00	2.86
19:0 CYCLO ω8*c*	73	8.38	0.00	39.14
Summed features[e]				
Summed feature 1	24	0.15	0.00	2.15
Summed feature 4	20	0.64	0.00	9.49
Summed feature 6	39	0.24	0.00	1.75
Summed feature 7	100	11.46	2.71	33.13
Summed feature 9	97	13.73	0.00	37.88

[a] Fatty acids 10:0, 12:0 2OH, 13:0 2OH, unknown (The unknown fatty acids do not have name listed in the Peak Library File of the MIDI system and therefore can be identified only by their equivalant chain lengths.) 14.966, 15:0 *iso*, 16:0 *iso*, *iso* 17:1 ω5*c*, anteiso 17:1 ω9*c*, 17:0, 17:0 *iso* 3OH, 18:0 *iso*, 19:0 *anteiso*, 19:1 *iso* I, 19:1 ω12*t*, and 20:1 ω9*t* were present in less than 5% of the strains tested.
[b] Mean values were calculated by using FAME data for the tested strains, regardless of the fact that every fatty acid was not detected in all of the strains.
[c] The position of the double bond can be located by counting from methyl (ω) end of the carbon chain. A *cis* isomer is indicated by the suffix *c*.
[d] The double bond position indicated by a capital letter is unknown.
[e] Summed features represent groups of two or three fatty acids which could not be separated by gas-liquid chromatography with the MIDI system. Summed feature 1 contained one or more of following fatty acids: 14:1 ω5*t* and/or 14:1 ω5*c*. Summed feature 4 contained one or more of following fatty acids: 15:0 *iso* 2OH and/or 16:1 ω7*t*. Summed feature 6 contained one or more of following fatty acids: 18:0 *anteiso* and/or 18:2 ω6,9*c*. Summed feature 7 contained one or more of following fatty acids: 18:1 ω7*c*, 18:1 ω9*t* and/or 18:1 ω12*t*. Summed feature 9 contained one or more of following fatty acids: unknown 18.846, unknown 18.858 and/or 19:0 CYCLO ω10*c* (*cis* and *trans* isomers are indicated by the suffixes *c* and *t*, respectively).



Cluster	Number of strains	Identity
A	6	Leu. mesenteroides subsp. dextranicum
B	61	Leuconostoc sp.
C	79	Leu. amelibiosum Leu. citreum Leu. pseudomesenteroides
G	8	Lac. delbrueckii subsp. delbrueckii Lac. casei
F	28	Lac. plantarum Lac. parabuchneri
E	21	Lac. plantarum Lac. animalis Lac. brevis
H	1	Leuconostoc sp.
D	25	Leu. mesenteroides subsp. mesenteroides Leu. carnosum Leu. lactis Leu. mesenteroides subsp. cremoris Lac. viridescens

Fig. 1. Dendrogram showing the relationship between test strains based on their cellular fatty acid profiles.

를 나타내었다.

Cluster 분석

실험 균주들은 UPGMA를 통한 Cluster 분석에서 Euclidian Distance 17.5에 의해 7개의 Major Cluster와 1개의 Single Cluster가 나타났다(Fig. 1). 7개의 Major Cluster중 4개는 *Leuconostoc*속(Cluster A, B, C, D)으로 이루어졌으며, 1개는 *Lactobacillus*속(Cluster F)으로 이루어졌다. 그리고, *Lactobacillus*속 표준균주와 *Pediococcus*속으로 분석된 분리균이 혼재된 것(Cluster E)과 *Lactobacillus*속 표준균주와 *Leuconostoc*속으로 분석된 분리균이 혼재된 것(Cluster G)이 각각 1개씩이었다.

Cluster A는 표준균주 *Leuconostoc*(*Leu.*) *mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530를 포함한 6개의

균주로 이루어졌다. 이 Cluster는 C19 : 0 CYCLO ω8*c*를 가장 많이 포함하고 있으며, C16 : 0, Summed feature 9이 다음이었다. Cluster A의 김치유래 젖산균은 모두 *Leuconostoc*속으로 동정되었다.

Cluster B는 표준균주를 포함하지 않으며 *Leuconostoc*속으로 분석되어진 61개의 균주로 이루어져 있다. 이 Cluster는 C16 : 0의 함량이 가장 높았다.

Cluster C는 표준균주 *Leuconostoc amelibiosum* KCTC 3524, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526 및 *Leuconostoc pseudomesenteroides* KCTC 3532를 포함한 79균주로 이루어졌다. 이 Cluster는 Cluster B처럼 C16 : 0의 함량이 가장 높지만 Cluster B보다 Summed feature 9의 양이 3배 정도 높고, C14 : 0는 2배 정도 적은 양을 보여주었다. 그리고 모든 젖산균은 *Leuconostoc*속으로 동정되었다.

Cluster D는 표준균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505, *Leuconostoc carnosum* KCTC 3525, *Leuconostoc lactis* KCTC 3528, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* KCTC 3529 및 *Lactobacillus* (*Lac.*) *viridescens* KCTC 3504를 포함하여 25균주로 이루어졌으며 C18 : 1 ω9*c*의 함량이 가장 높고 그 다음이 C16 : 0이었다. 본 실험에 사용된 김치유래

Table 3. Major cellular fatty acid composition of FAMEs clusters of the strains

Compound[a]	% (Mean percentage of total)							
	cluster A (6)[b]	cluster B (61)	cluster C (79)	cluster D (25)	cluster E (21)	cluster F (28)	cluster G (8)	cluster H (1)
Saturated fatty acids								
12:0	tr[d]	tr	1.0(0.4)	1.0(0.4)	tr	0.7(0.5)	tr	ND
14:0	5.8(2.2)[c]	11.8(3.1)	6.0(1.6)	11.1(3.6)	7.2(2.8)	6.1(3.1)	5.4(1.8)	9.09
15:0	ND[e]	tr	tr	tr	tr	tr	tr	ND
16:0	26.8(3.2)	29.7(2.6)	22.7(3.8)	20.3(3.7)	16.7(3.3)	31.9(4.3)	16.0(3.4)	20.52
18:0	tr	1.2(1.2)	1.9(0.8)	1.6(1.0)	1.7(0.7)	2.0(0.8)	1.3(0.2)	ND
Unsaturated fatty acids								
16:1 ω9*c*	ND	tr	tr	tr	tr	ND	tr	ND
16:1 ω7*c*	7.7(2.9)	10.6(1.9)	7.0(0.9)	7.9(1.9)	7.2(1.1)	3.0(1.2)	8.9(2.6)	7.77
16:1 ω5*c*	ND	0.7(0.1)	tr	0.8(1.2)	1.0(0.3)	0.6(0.2)	0.7(0.2)	ND
17:1 ω8*c*	ND	0.6(0.1)	0.7(0.1)	1.0(0.1)	1.1(0.3)	0.7(0.3)	0.8(0.2)	ND
18:1 ω9*c*	8.7(2.4)	16.7(3.5)	17.1(4.7)	36.6(6.9)	25.6(4.3)	22.3(5.4)	24.4(3.5)	52.45
Branched fatty acids								
15:0 *anteiso*	tr	tr	tr	tr	tr	tr	tr	ND
17:0 *anteiso*	tr	tr	0.6(0.4)	0.7(0.5)	tr	tr	tr	ND
18:1 *iso* H	tr	tr	tr	tr	tr	ND	tr	ND
19:0 *iso*	ND	tr	tr	tr	tr	tr	tr	ND
Hydroxy								
16:0 2OH	ND	tr	tr	ND	ND	ND	ND	ND
Cyclopropane								
17:0 CYCLO	2.3(0.5)	0.7(0.2)	tr	ND	1.7(0.9)	ND	ND	ND
19:0 CYCLO ω8*c*	30.1(5.2)	12.1(3.0)	11.9(4.1)	7.6(4.1)	ND	5.5(2.9)	3.0(1.1)	ND
Summed features								
Summed feature 1	ND	tr	0.7(0.2)	tr	tr	ND	tr	ND
Summed feature 4	ND	tr	ND	tr	tr	2.8(1.2)	4.4(2.7)	ND
Summed feature 6	ND	tr	0.6(0.3)	0.74(0.3)	0.8(0.3)	0.64(0.2)	0.8(0.6)	ND
Summed feature 7	4.9(1.7)	9.3(2.7)	10.3(3.9)	9.0(2.5)	10.1(3.9)	17.9(5.3)	25.4(6.0)	10.17
Summed feature 9	12.8(2.9)	6.5(1.9)	19.5(3.0)	9.4(4.9)	28.5(4.1)	9.2(3.7)	10.0(5.3)	ND

[a] the definition of the fatty acids is the same as explained in the footnotes of Table 2.
[b] number of strains within the cluster.
[c] ( ) standard deviation.
[d] tr, trace (<0.5%).
[e] ND, not detected.

젖산균은 모두 *Leuconostoc*속이었다. 이 Cluster에서는 *Leuconostoc*속으로 grouping된 cluster중 유일하게 *Lactobacillus*속 표준균주가 포함되어 있다. *Lactobacillus* (*Lac.*) *viridescens* KCTC 3504는 16S rRNA에 의한 분자진화적 분류에서도 *Lactobacillus*속의 다른 균주보다 *Leuconostoc*속에 가까운 것으로 보고되었다.

Cluster E는 *Lactobacillus plantarum* KCTC 1048, *Lactobacillus animalis* KCTC 3501 및 *Lactobacillus brevis* KCTC 3498 표준균주와 함께 21균주가 포함되었는데 김치 유래 젖산균은 모두 *Pediococcus*속으로 분석되었다. 이 Cluster는 Summed feature 9가 가장 많은 함량을 나타내었고, 그 다음으로 C18 : 1 ω9*c*, C16 : 0 순이었다. 그리고 C19 : 0 CYCLO ω8*c*는 나타나지 않았는데 이것은 나머지 6개 Cluster와 차이를 보여주는 것이다. 이 Cluster는 관련된 *Lactobacillus*속 표준균주와 *Pediococcus*속 표준균주를 확보하여 데이타를 보강한 후 재분석이 필요하다.

Cluster F는 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3103, *Lactobacillus plantrum* KCTC 3107, *Lactobacillus plantrum* KCTC 3108, *Lactobacillus parabuchneri* KCTC 3503 등의 *Lactobacillus*속 표준균주와 *Lactobacillus*속으로 분석되어진 젖산균 등 28균주로 이루어져 있다. 이 Cluster는 C16 : 0의 양이 가장 많고 C18 : 1 ω9*c*가 그 다음이다. C16 : 1 ω7*c*의 함량이 다른 6개 Cluster에 비해 적고 C18 : 1 *iso*는 검출되지 않았다.

Cluster G는 *Lactobacillus plantarum* KCTC 3104, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* KCTC 1047 및 *Lactobacillus casei* KCTC 3109 등의 *Lactobacillus*속 표준균주와 *Leuconostoc*속으로 분석된 젖산균 등 8개 균주로 이루어져 있다. 그리고 모든 표준균주는 *Lactobacillus casei*로 동정되었다. Summed feature 7의 함량이 가장 많았고 C18 : 1 ω9*c*, C16 : 0의 순이었다. 특히 Summed feature 7의 함량이 다른 Cluster에 비해 높았다. 이 Cluster도 2개 속의 균이 혼재되어 나타나므로 관련 표준균주의 확보와 데이타의 보강이 필요하다고 생각된다.

Cluster H는 S5123만으로 구성되어졌고, 이 균주는 *Leuconostoc*속으로 동정되어졌으며, C18 : 1 ω9*c*의 함량이 가장 많았다. 이 Cluster는 Euclidian Distance에 의한 분석에서 Cluster D와 가장 높은 상관관계를 나타내고 있다.

이와같이 각 Cluster는 함유하고 있는 fatty acid의 종류는 비슷하지만 정량적 차이들에 의해 각각 특징화되어 있음을 보여주고 있다. Cluster E와 G는 두개의 genus에 속하는 균주가 혼재되어 있으므로 관련된 더 많은 표준 균주를 확보한 후 실험을 통하여 새롭게 밝혀져야 한다. 그러나 Cluster A, B, C, D의 *Leuconostoc*속과 Cluster F의 *Lactobacillus*속은 이것과 관련된 새로운 젖산균주들에 대한 신속하고 정확한 동정에 크게 활용되어질 것이다. 이와같이 하나의 화학특성을 이용한 분류학적 연구는 앞으로 95가지 탄소원을 이용하는 수치분류학적 접근방법 및 Pyrolysis Mass Spectrometry 등의 다른 화학적 분석 방법과 분자 진화 연구 등을 통해 종합적 분류(polyphasic taxonomy) 정보를 갖추게 될 것이다. 본 연구실에서는 이러한 종합 분류 정보 체계를 위한 계속적인 연구가 진행되고 있으며, 종합 분류 정보는 다양한 목적의 젖산균 연구에 정확한 정보를 제공하게 될 것이다.

요 약

표준균주를 포함한 230여개의 김치유래 젖산균에 대한 균체지방산(FAMEs)을 분석하였다. FAMEs profiles는 Euclidian Distance 17.5에 의해 7개의 Major Cluster와 1개의 Single Cluster로 나뉘어졌다. 이중 A, B, C 및 D Cluster는 *Leuconostoc*속으로 분석되어졌고, F는 *Lactobacillus*속으로 분석되어졌다. 그리고 E와 G Cluster는 두개의 Genus가 혼재되어 나타났으며 보충적인 연구가 필요하다. 앞으로 김치유래 젖산균의 균체지방산 분석결과를 기반으로 한 데이타베이스에 95가지 탄소원을 이용하는 수치분류학적 접근방법 및 Pyrolysis Mass Spectrometry 등의 화학적 분석 방법과 분자진화적 연구를 통한 종합적 분류정보 체계가 갖추어지면 젖산균의 신속, 정확한 동정 및 연구에 활발히 이용되어질 것이다.

참고문헌

1. Cheigh, H.S. and K.Y. Park. 1994. Biochemical, microbiological and nutritional aspect of Kimchi. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **34**: 175-203.
2. 민태익. 1988. 김치발효와 미생물. 한국조리과학회지 **4**: 96-102.
3. 임종락, 박현근, 한홍의. 1989. 김치에 서식하는 Gram 양성세균의 분리 및 동정의 재평가. 한국산업미생물학회지 **27**: 404-414.
4. 심선택, 경규항, 유양자. 1990. 김치에서 젖산균의 분리 및 이 세균들의 배추즙액 발효. 한국식품과학회지 **22**: 373-379.
5. 이철우, 고창영, 하덕모. 1992. 김치발효중의 젖산균의 경시적 변화 및 분리 젖산균의 동정. 한국산업미생물학회지 **20**: 102-109.
6. 민태익, 권태완. 1984. 김치발효에 미치는 온도 및 식염농도의 영향. 한국식품과학회지 **16**: 443-450.
7. Garvie, E.I. 1986. Genus *Leuconostoc*. Pp. 1071-1075. *In*: Bergey's manual of systematic bacteriology. vol. 2. Williams and Wilkins, Baltimore.
8. Stackebrandt, E. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**: 317-324.
9. Yang, D. and C.R. Woese. 1989. Phylogenetic struc-

ture of the *Leuconostocs*; an interesting case of rapidly evolving organisms. *Syst. Appl. Microbiol.* **12**: 145-149.
10. Tracey, R.P. and T.J. Britz. 1989. Cellular fatty acid composition of *Leuconostoc oenos*. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 445-456.
11. Sokal, R.R. and C.D. Michener. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Kansas Univ. Science Bull.* **38**: 1409-1438.
12. Yang, P., L. Vauterin, M. Vancaneyt, J. Swings, and K. Kersters. 1993. Application of fatty acid methyl esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**: 47-71.
13. Huys, G., M. Vancaneyt, R. Coopman, P. Janssen, E. Falsen, M. Altwegg, and K. Kersters. 1994. Cellular fatty acid composition as a chemotaxonomic marker for the differentiation of phenospecies and hybridization groups in the genus *Aeromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 651-658.
14. 전효곤, 민태익, 안종석, 박용하, 박찬선, 이헌주, 주윤정, 이근종. 1995. 김치발효균주의 개량 및 기능성 물질의 탐색 연구. 한국과학기술연구원 생명공학연구소. 과학기술처 보고서.
15. Miller, L.T. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acid. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 861-867.

(Received 15 October 1995)