

김치에서 분리한 *Leuconostoc*속의 RAPD 법을 이용한 유전적 변이도 추론

김은경 · 류춘선 · 소명환* · 김영배
고려대학교 생명공학원, *부천전문대학 식품영양학과

Studies on the Genetic Diversity using RAPD in *Leuconostoc* sp. Isolated from *Kimchi*

Eun-Kyung Kim, Chun-Sun Ryu, Myung-Hwan So* and Young-Bae Kim
Graduate School of Biotechnology, Korea University
*Department of Food and Nutrition, Bucheon Junior College

Abstract

Thirty four *Leuconostoc* strains originated from *kimchi* were subjected to analyse their genetical similarity by using RAPD-PCR. At the 0.5 level of similarity, *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* and *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* formed 3 and 2 clusters, and each *L. lactis* and *L. paramesenteroides* strains was clustered in one, respectively. Every type strain tested as a control, belongs to the cluster or one of the clusters of the corresponding species or subspecies as the isolates from *kimchi*, respectively. However the similarity between a and b cluster was less than 0.2 and c cluster is even less similar to both of them (a and b). *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strains from *kimchi* have shown a variety of RAPD patterns in spite of morphological and physiological similarities.

Key words: *Kimchi*, *Leuconostoc*, Genetic diversity, RAPD

서 론

*Leuconostoc*속 균주들은 김치 발효에서 중요한 역할을 한다. 이 들은 주로 발효 초기에 우점종을 이루나 숙성 후에도 상당수 분리되고 있다⁽¹⁾. 그람 양성 균의 하나인 *Leuconostoc* 속은 Bergey's manual of systematic Bacteriology⁽²⁾에 의하면 주로 당 발효성을 포함하여 생화학적 특성에 따라 4종이 등록 되어있고 그 중 하나인 *L. mesenteroides* 밑에 세 아종이 있다. 그러나 분류에 사용되는 특성들은 우선 순위가 명확하지 않고 다수의 생화학적 특징에서 양성, 음성이 같은 종 안에서 인정되고 있어 몇 가지 생화학적 특성들이 문헌과 동시에 일치하는 결과가 얻어지지 않는 경우에는 동정에 어려움이 있다. 실제로 *Leuconostoc*속으로 분류된 균주들에는 문헌과 일치하지 않는 특성이 있고^(1,3,4) DNA 상동성이 같은 종 내에서 높지 않거나 다른 종과 한 무리로 분류되기도 함이 보고되기도 하였다⁽⁵⁾.

이러한 어려움 때문에 유전자^(4,6,8), 단백질⁽⁹⁾, 지질⁽⁷⁾ 등과 같은 추가적인 정보가 분류에 도움이 될 수 있는지 시험되었고 *L. amelibiosum*⁽³⁾, *L. gelidum*, *L. carnosum*⁽⁷⁾, *L. citreum*, *L. pseudomesenteroides*⁽⁶⁾ 및 *L. argentinum* 등 새로운 종은 물론 *Weissella*⁽⁴⁾ 같은 새로운 속도 제안되고 있다^(4,9). RAPD (random amplified polymorphic DNA) 기법은 다수 균주의 총 DNA를 한꺼번에 비교 분석할 수 있으므로 신속하고 경제적인 장점이 있다. 따라서 재배작물⁽¹⁰⁾이나 곰팡이 분리주의 구별이나⁽¹¹⁾ 세균의 손쉬운 인식 수단으로 응용될 것을 제안하고 있다^(12,13).

본 실험은 김치에서 분리한 *Leuconostoc*속 균주들의 생리 특성의 유사성에도 불구하고 유전자의 상이함을 RAPD-PCR 방법으로 연구하려 하였다.

재료 및 방법

사용균주

사용된 균주는 저온에서 발효된 김치에서 분리한 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (A01-

Corresponding author: Young Bae Kim, The Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

A14 및 B26-B28) 17균주, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (A15-A26) 11균주, *L. lactis* (B23-B25) 3균주, *L. paramesenteroides* (B29, B30) 2균주이며, 이들의 생리적 특성은 이미 보고하였다⁽¹⁾.

표준 균주 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ATCC 8293 (KCTC 13422) 및 *L. paramesenteroides* ATCC 33313 (KCTC 13424)은 유전 공학 연구소에서 분양 받았고, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* ATCC 19255 및 *L. lactis* ATCC 19256은 American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, U.S.A.)에서 분양 받았다.

배지

균주들은 MRS broth와 Tomato juice broth를 동량 혼합한 사면배지에 배양하였다. DNA 분리 시에는 0.5% glycine이 첨가된 TCM broth⁽³⁾ (beef extract 4.5 g, peptone 7.5 g, yeast extract 5.0 g, Tween80 1 mL, K₂HPO₄ 3.0 g, KH₂PO₄ 1.5 g, glucose 2.0 g, MgSO₄ 7H₂O 0.1 g, MnSO₄·4H₂O 0.025 g)를 사용하였다.

PCR primer 및 시약

PCR에 사용된 Primer는 Canada British Columbia 대학에서 합성한 arbitrary decamer를 구입하여 사용하였고, 기타 필요한 시약 및 효소들은 FINNZYMES Oy (Finland) 제품을 사용하였다.

Total DNA의 추출 및 증폭

충분히 활성화 된 균주를 0.5% glycine 함유 TCM broth 5 mL에 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 원심 분리하여 균체를 회수하였고, 1 mL GTE buffer (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8)로 세척하였다. 세척 된 균체는 30 µL 추출 buffer (50 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, 0.35 M sorbitol, pH 8)에 재현탁시키고 200 µL lysozyme 용액 (40 mg/mL TE buffer; 10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.0) 및 53 µL의 5% sarcosyl을 가하여 37°C에서 30분 반응시킨 후 10% SDS 100 µL를 추가하여 30분 더 반응시켰다. 이어 균체 반응액에 46 µL의 5 M NaCl 및 40 µL의 8.6% cethyltrimethylammonium bromide를 가하고 65°C에서 30분 반응시키어 반응액이 맑아짐을 확인하였다. 다시 2 µL의 RNase (5 mg/mL)를 첨가하여 37°C에서 30분 반응시키고 반응액은 phenol/chloroform 혼합 용매로 순화시키고 상등액을 취하여 1/2 부피의 7.5 M ammonium acetate 및 2배 부피의 95% ethyl alcohol을 가하여 -20°C에서 DNA를 침전시

켰다. 원심 분리하여 얻은 DNA 분획은 건조시키고 TE buffer에 녹여 사용하였다. DNA의 농도는 spectrophotometer (Uvikon 930, Kontron Ltd., Switzerland)로 정량 하였다. 260 nm에서 O.D.값 1을 DNA 농도 50 µg/mL에 해당하는 것으로 계산하였다.

증폭 반응에는 Gene E thermal cycler (Techne Co Ltd., Cambridge, England)가 사용되었으며 초기 92°C에서 3 분간 denaturation 시킨 후, 92°C 45초, 30°C 1분, 72°C에서 1분으로 구성된 프로그램을 40 cycle 반복 수행하였고 마지막으로 72°C에서 5분 처리하였다. *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 13422의 genomic DNA를 template로, UBC 109 (5'-TGTACGTGAC-3')를 primer로 각각 사용하여 결정된 최적 반응 농도는 25 µL의 총 용량에 대하여 template DNA 40 ng, primer 1.5 mM, MgCl₂ 0.5 mM, dNTP 1.0 mM, polymerase 2.0 unit의 조성이었다.

전기 영동

증폭 반응액 8 µL를 취하여 loading buffer (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 30% glycerol in water) 3 µL와 혼합한 뒤 1.5% agarose gel을 사용하여 전기 영동시키고, ethidium bromide 용액 및 UV로 가시화 하여 육안으로 band의 크기와 강도를 사진 촬영하였다.

Data 분석

각 균주의 DNA 및 각 primer를 사용하여 증폭된 DNA 절편들 가운데 특정 크기의 것을 marker로 정하여 이의 존재 여부를 관찰하였다. Marker에 해당하는 크기의 절편의 존재 여부에 따라 각각 1 및 0의 값을 주어 다변형을 정리하고 상사도(F)는 Nei와 Li의 방법⁽⁴⁾으로 추정하였다. 즉 $F = 2M_{xy} / (M_x + M_y)$, 이때 $2M_{xy}$ 는 두 균주에서 공통으로 발견되는 marker의 총수이며, M_x 및 M_y 는 각 각의 균주에서 발견된 marker의 총수이다. The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA)과 Computer package program, NTSYS⁽⁵⁾를 사용하여 dendrogram으로 도시하였다.

결과 및 고찰

Primer 선택 및 Marker의 선발

총 67개의 primer를 PCR로 실험을 실시한 결과, 특이성, 민감성 및 반복성이 우수한 primer를 10개 선택하였고 선정된 primer들과 이들에서 증폭되어 marker로서 사용된 DNA 절편의 수를 Table 1에 나타내었다.

Table 1. List of random primers and the numbers of amplified DNA fragments selected as markers

Primer Accession No. ¹⁾	Primer Sequences	No. of Amplified DNA fragments selected as markers
109	5'-TGTACGTGAC-3'	16
111	5'-AGTAGACGGG-3'	8
114	5'-TGACCGAGAC-3'	7
116	5'-TACGATGACG-3'	13
118	5'-CCCGTTTTGT-3'	14
146	5'-ATGTGTTGCG-3'	8
148	5'-TGTCCACCAG-3'	10
153	5'-GAGTCACGAG-3'	16
172	5'-ACCGTCGTAG-3'	10
184	5'-CAAACGGCAC-3'	14
total		116

¹⁾Accession number of University of British Columbia in Canada.

선정된 marker의 수는 UBC 114에서 7개, 그리고 UBC 153의 경우 가장 많은 16개로서 모두 10개의 primer에서 총 116개의 marker를 사용하여 분석에 사용하였다.

김치에서 분리한 *Leuconostoc*속 균주의 상사도

김치에서 분리한 *Leuconostoc*속 균주의 DNA와 선정한 10개의 primer를 이용하여 실시한 PCR 결과에서 나타난 RAPD로 추정된 유전적 상사도를 Fig. 1에 나타내었다.

상사도 0.5 수준 이상에서 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 균주들은 각각 3 및 2개의 cluster를 형성하며 *L. lactis* 및 *L. paramesenteroides* 균주들은 각각 하나의 cluster를 형성하였다. a cluster에는 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*의 A01-A06 및 표준 균주 ATCC 8293이 속하며, b cluster는 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*의 A07-A12 균주들이 이루는 무리로서 두 cluster 간에는 0.2 수준의 낮은 상사도를 보였다. b cluster는 같은 아종의 a cluster보다는 오히려 다른 아종 (subsp. *dextranicum*)의 d 및 e cluster와 상대적으로 높은 상사성을 보이고 있어 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 균주들간의 유전적 상이성을 암시하고 있다. 또한 c cluster에 속하는 균주들은 a 및 b cluster는 물론 다른 종의 균주와도 가장 거리가 먼 것으로 나타났다. 이들은 모두 적숙기의 김치에서, 그리고 c cluster의 균주들은 과숙기에 분리되었다. 그러나 형태 및 생리적 특징에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 단지 b cluster의 균주들은 모두 ribose에서 산을 생성하지 못 하였으나 b 및 c 그룹 균주들은 모두 산을 생성하

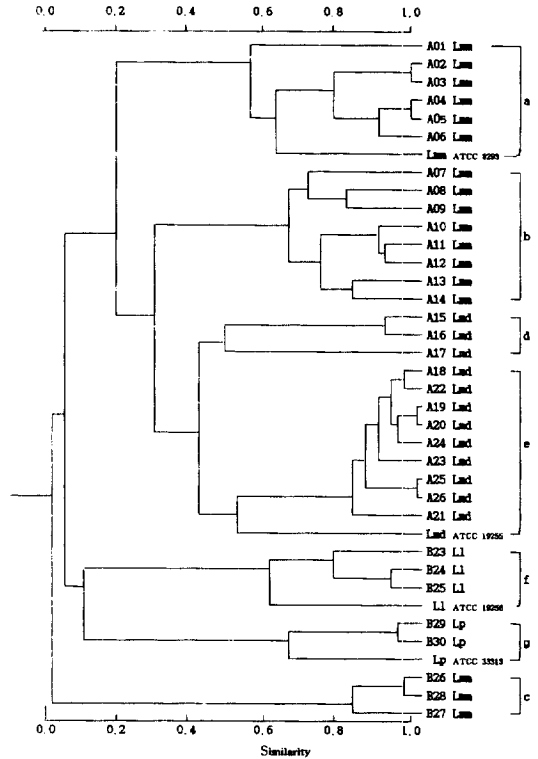


Fig. 1. Dendrogram of *Leuconostoc* sp. isolated from kimchi and some type strains by RAPD analysis. Lmm: *Leuconostoc mesenteroides mesenteroides*, Lmd: *Leuconostoc mesenteroides dextranicum*, Ll: *Leuconostoc lactis*, Lp: *Leuconostoc paramesenteroides*.

였다⁽¹⁾. c cluster를 이루는 균주들은 dextran 형성, arginine에서 NH₃ 생성 등, 일반적인 *Leuconostoc*의 특징을 나타내는 그람 양성, catalase 음성의 구균이며 다수의 당 발효성도 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 균주들과 차이가 없었고 단지 inulin 혹은 arbutin의 발효능에서만 일부 차이를 보였을 뿐이나⁽¹⁾ 유전자의 수준에서는 뚜렷한 차이가 있음을 확인할 수 있었다.

L. mesenteroides subsp. *dextranicum* 12주는 d와 e의 2 cluster를 형성하며 표준균주인 ATCC 19255는 e cluster에 속하였다. 그리고 과숙기의 김치에서 분리된 *L. lactis* 및 *L. paramesenteroides* 등도 각각 표준 균주와 함께 같은 그룹으로 분류함에 무리함이 없었다. 특히 B23, B24, 및 B25의 *L. lactis* 균주들은 arginine에서 NH₃를 생성하는 등 *Leuconostoc*속의 특징과 달라 속의 동정도 확인할 수 없었으나⁽¹⁾ 본 실험의 결과에서는 표준균주와 함께 0.6 수준의 상사도를 나타내며 한 그룹을 이루는 것으로 나타나서, 예외적인 생리적 특성에도 불구하고 *L. lactis*로 동정한 결과를 확신할

수 있었다. 이와 같이 기존의 분류에 의한 종 단위의 균주들은 같은 그룹을 형성하여 유전자적으로도 비교적 유사도가 높음을 말해주고 있다. 단지 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 균주들은 유전적으로 동일하지 않은 듯하며 특히 b cluster는 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*과 보다 가깝게 나타났고, 과숙기의 김치에서 분리한 3 균주(c cluster)들은 적숙기의 균주들과는 생리적인 유사성에도 불구하고 유전자에서는 상당한 차이가 있음을 시사한다. 이들의 차이에 대해서는 더욱 다양한 방법으로 분류학적 위치를 밝혀 볼 가치가 있다고 생각된다.

요 약

김치에서 분리한 *Leuconostoc*속 4종 34주를 RAPD-PCR 방법으로 분석하여 기존의 동정 결과를 비교 검토하였다. 상사도 0.5이상의 수준에서 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 및 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 균주들은 각각 3 및 2의 cluster를 형성하였고 *L. paramesenteroides* 및 *L. lactis*는 각각 하나의 cluster를 형성하였다. 각각의 표준 균주들도 같은 종 혹은 아종의 cluster에 속하는 것으로 나타났다. 그러나 a 및 b cluster의 상사도는 0.2 이하의 수준이며 c cluster는 이들과 상사도가 더욱 낮아 *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 균주들은 유전적 상사도가 낮은 다양한 종류의 집단임을 추정 할 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 실험에 많은 도움을 주신 고려대학교 생명공학원 신경섭 교수님께 감사드립니다.

문 헌

1. 소명환, 김영배 : 김치에서 분리한 저온성 젖산균의 동정. 한국식품과학회지, **27**, 495-505 (1995)
2. Garvie, E.I.: Genus *Leuconostoc*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Sneath, P.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. (Ed.), Vol. 2, p.1071 (1986)
3. Mäkelä, P., Schillinger, U., Korkeala, H. and Holzappel,

- W.H.: Classification of ropy slime-producing lactic acid bacteria based on DNA-DNA homology, and Identification of *Lactobacillus sake* and *Leuconostoc amelibiosum* as dominant spoilage organisms in meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, **16**, 167 (1992)
4. Collins, M.D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbanks, S.: Taxonomy studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.*, **75**, 595 (1993)
 5. Hontebeyrie, M. and Gasser F.: Deoxyribonucleic acid homologies in the *Leuconostoc*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**, 9 (1977)
 6. Farrow, J.A.E., Facklam, R.R. and Collins, M.D.: Nucleic acid homologies of some vancomycin-resistant *Leuconostocs* and description of *Leuconostoc citreum* sp. nov. and *Leuconostoc pseudomesenteroides* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 279 (1989)
 7. Shaw, B.G. and Harding C.D.: *Leuconostoc gelidum* sp. nov. and *Leuconostoc carnosum* sp. nov. from chill-stored meats. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 217 (1989)
 8. Garvie, E.I.: Sub-divisions within the genus *Leuconostoc* as shown by RNA-DNA hybridization. *J. Gen. Microbiol.*, **127**, 209 (1981)
 9. Dicks, L.M.T.: Relatedness of *Leuconostoc* species of the *Leuconostoc sensu stricto* Line of Descent, *Leuconostoc oenos* and *Weissella paramesenteroides* revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. *Syst. Appl. Microbiol.*, **18**, 99 (1995)
 10. Lee, S.J., Shin, J.S., Park, K.W. and Hong, Y.P.: Detection of genetic diversity using RAPD-PCR and sugar analysis in watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Mansf.] germplasm. *Theor. Appl. Genet.*, **92**, 719 (1996)
 11. Aufauvre-Brown, A., Cohen, J. and Holden, D.W.: Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J. Clinic. Microbiol.*, **30**, 2991 (1992)
 12. Matthews, K.R. and Oliver, S.P.: Differentiation of *Staphylococcus* species by polymerase chain reaction based DNA fingerprinting. *J. Food Prot.*, **57**, 486-489 (1994)
 13. 남진식, 이정준, 신명수, 나석환, 백영진, 유민 : Polymerase Chain Reaction에 의한 *Lactobacillus casei* 및 돌연변이 균주들의 비교 분석. 한국산업미생물학회지, **22**, 577 (1994)
 14. Nei, M. and Li, W.: Mathematical model for studying genetics variation in terms of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5269 (1979)
 15. Rolf, F.J.: NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.60 Applied Biostatics, New York. (1990)

(1997년 5월 3일 접수)