

PepN과 16S rRNA Gene Sequence 및 PCR 방법을 이용한 김치 젖산균의 동정

이명기 · 박완수 · 이병훈*
한국식품개발연구원, *맥길대학교

Genetic Identification of the *Kimchi* Strain Using PCR-based *PepN* and 16S rRNA Gene Sequence

Myungki Lee, Wansoo Park and *Byong H. Lee
Korea Food Research Institute, *McGill University

Abstract

The WL6 strain isolated from *Kimchi* could not be made scientific name because it was identified as three species, i.e., *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* or *Lactobacillus bifermentans* when it was tested by API kit or Biolog system methods. The unidentifiable WL6 strain was finally reclassified as *Lactobacillus bifermentans* by genetic identification using two PCR-based specific sequence primer sets which were originated from homologous pepN and 16S rRNA genes.

Key words : primer, PCR, *Lactobacillus bifermentans*, *Kimchi*

서 론

김치는 젖산균에 의하여 발효되는 식품이고 초기에는 *Leuconostoc*속 균주가 우세한 반면, 후기에는 *Lactobacillus plantarum*이 우세하다고 알려져 있다⁽¹⁾. 최근에 김치의 젖산균은 온도 등, 발효조건에 따라 다양한 종류가 나타나면서 천이되고^(2,3) 낙농산업의 젖산균과는 다른 특성⁽⁴⁾이 많아 분류에 어려움이 보고되고 있다. 김치젖산균의 동정은 대부분이 생화학적인 방법에 머물러 있고 분류방법에 따라 서로 다른 분류군으로 동정되고 있으므로^(5,6), 최근에 보다 정확한 동정을 위하여 점차 유전학적인 방법을 사용하고 있다^(7,8).

일반 젖산균도 유전학적으로는 거리가 멀어도 일반 생화학적인 특성에서는 유사한 균이 대단히 많다. 즉, 생화학적으로 유사한 같은 이름의 *lactis*가 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*속 등에서 나타나고 *cremoris*는 *Lactococcus*, *Leuconostoc*속 등에서, *gallinarum*은 *Lactobacillus*, *Carnobacterium*속 등에서, *thermophilus*

는 *Lactobacillus*, *Streptococcus*속 등에서, *plantarum*은 *Lactobacillus*, *Lactococcus*속 등에서 나타난다^(9,10). 따라서, 이러한 균주들은 특히 유전학적인 방법에 의한 분리가 요구되고 있다.

젖산균의 유전학적인 분석은 16S rRNA와 23S rRNA를 이용한 restriction fragment length polymorphisms (RFLP)^(11,12), random amplified polymorphic DNAs (RAPD)^(13,14,15)와 pulsed field gel electrophoresis (PFGE)⁽¹⁶⁾ 방법이 많이 쓰이고 있으며, 최근에는 single-strand conformation polymorphisms(SSCP)⁽¹⁷⁾ 방법도 시도되고 있다.

본 실험에서는 저온저장 김치의 초기발효에서 최우세균으로 나타나는 김치 젖산균인 WL6 균주가 API kit(BioM rieux, France)⁽¹⁸⁾과 Biolog system(Biolog Inc. USA)⁽¹⁹⁾에서 다르게 동정되어 유전적으로 구별하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

사용균주는 동정할 균주로 김치 젖산균인 WL6와 표준균주로 *Lb. bifermentans* ATCC35409, *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* ATCC19524, *Leu.*

Corresponding author : Myungki Lee, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-ku, Songnam-si, Kyonggi-do 463-420, Korea
Tel : 82-31-780-9047
Fax : 82-31-780-9876
E-mail : lmk123@hanmail.net

mesenteroides ssp. *dextranicum* KFRI155, *Lb. delbruekii* ATCC9649, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC10830, *Leu. paramesenteroides* KFRI159, *Weissella confusa* ATCC10881을 사용하였다.

생화학적인 동정

김치젖산균 WL6는 API 50CHL kit(BioMérieux, France)⁽¹⁸⁾ 및 Biolog GP plate와 Microlog 3 system (Release 3.5A, Biolog Inc. USA)⁽¹⁹⁾의 생화학적인 방법으로 동정(Table 2)하였다.

배양 및 DNA 추출

배지는 MRS broth(Difco)를 사용하였고 *Lactobacillus* 와 *Weissella*속 균주는 35°C, *Leuconostoc*속 균주와 김치 젖산균 WL6는 30°C에서 배양하였으며, PCR용 chromosomal DNA는 Puregene(Gentra Systems, Inc.) kit을 사용하여 추출하였다.

PCR primer

GenBank⁽¹⁹⁾에 있는 각 균주의 *pepN* gene과 16S rRNA gene의 sequence를 DNASIS(Version 2.5, Hitachi Software Engineering Co.) 프로그램으로 비교하여 상동한 부분의 oligomer를 primer로 사용하였다(Table 1). *PepN* gene의 homologous sequence에 사용된 균주는 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MG1363(Accession no. M87840, 3200 bp), *Lb.*

helveticus CNRZ32(Accession no. U08224, 3796 bp) 와 *Lb. delbruekii* ssp. *lactis* DSM7290(Accession no. Z21701, 3122 bp)를 사용하였고, 16S rRNA gene의 homology sequence는 *Lc. lactis* ssp. *cremoris* ATCC19435(Accession no. M58837, 1552 bp), *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* DSM20346(Accession no. M23034, 1493 bp)와 *Wei. confusa* NCDO586 (Accession no. X52567, 1514 bp)를 사용하였다. 비교된 gene의 상동한 부분으로부터 얻어진 primer인 CH-15, DH-15, CDH-N(역방향 합성용), CR16R-13, LeCR16R, CDH-N(역방향 합성용)의 primer(Table 1)들은 Bio S&T(Canada)에서 제조한 것을 사용하였다.

Primer set에 의한 gene 증폭

PCR 방법은 ExpandTM High Fidelity PCR System (Boehringer mannheim Co.)과 PCR thermal cycler (Perkin-Elmer Cetus, USA)를 사용하였고, 그 방법에 준하여 다음과 같이 하였다. *PepN* gene set(CH-15, DH-15, CDH-N)은 denaturation 단계를 95°C에서 2분 실시하였고, 증폭 단계를 40 cycle(94°C 15초, 35°C 40초, 72°C 1분)로 하였으며, prolonged elongation 단계를 72°C에서 7분으로 하였다. 16S rRNA gene set (CR16R-13, LeCR16R, CDH-N)은 annealing 온도만 31°C로 변경하여 실시하였다. 증폭된 DNA는 3%(w/v) agarose gel에 전개하였으며, 분자량 DNA marker는 λ DNA를 Hind III(Promega)로 절단한 것을 사용하였다.

Table 1. Primers from homologous sequence on *pepN* or 16S RNA gene of lactic acid bacteria

Primers	Homologous Sequences	Compaired Strains
A) Homology on <i>Pep-N</i> gene		
CH-15	5'-TTTTGCTCGCCAAGC-3'	<i>Lc. ssp. cremoris</i> <i>Lb. helveticus</i>
DH-15	5'-TTTGCCTTTGGTGAA-3'	<i>Lb. delbruekii ssp. lactis</i> <i>Lb. helveticus</i>
CDH(Templet) CDH-N(Complement)	5'-ATGGAAAAGCTGGGG-3' 5'-CCCCAGTTTTCCAT-3'	<i>Lc. ssp. cremoris</i> <i>Lb. delbruekii ssp. lactis</i>
B) Homology on 16S RNA gene		
CR16R-13	5'-GAGCTATAAGTTC-3'	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> <i>Leu. mesenteroides ssp. cremoris</i>
LeCR16R	5'-AGAATAGGAATGATTTTA-3'	<i>Leu. mesenteroides ssp. cremoris</i> <i>Wei. confusa</i>
CR16R(Templet) CR16R-NC(Complement)	5'-CGATTTGATGAGCA-3' 5'-TGCTCATCAAATCG-3'	<i>Lc. lactis ssp. cremoris</i> <i>Leu. mesenteroides ssp. cremoris</i> <i>Wei. confusa</i>

Lb.: *Lactobacillus*, *Lc.*: *Lactococcus*, *Leu.*: *Leuconostoc*, *Wei.*: *Weissella*.

Table 2. Identification of WL6 strain by API kit and Biolog system

Method	Incubation Time(hr)	Species classified by each method
API	24	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>
	48	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>dextranicum</i>
Biolog	24	<i>Leu. mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i>
	36	<i>Lb. bifementans</i>

Lb.: *Lactobacillus*, Leu.: *Leuconostoc*.

결과 및 고찰

Lee 등⁽²⁾에 의하면 WL6 균주는 5°C에서 5일째에 배양한 맛김치에서 최우세균으로 나타났으며, 모양은 부정형으로 구균에서 짧은 간균형으로 다양하였다. 선택배지에서의 성장은 젖산간균을 선별하는 mLBS(modified *Lactobacillus* selective agar)에서는 작은 미색, 장구균을 선별하는 KF *Streptococcus* agar에서는 성장을 못하였고, *Leuconostoc*을 선별하는 PES agar(phenylethanol sucrose agar)에서는 거의 성장을 못하였으며, *Lactococcus*를 선별하는 M17 agar에서는 작은 미색으로 나타났다. 다른 특징으로는 낙농 젖산균과는 다르게 젖당을 이용하지 못하였다. 이 균주는 API 방법에 의하여 24 hr과 48 hr 배양후 측정시 모두 *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum*으로 동정되나 Biolog 방법에 의해서는 24 hr 배양 후는 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*, 36 hr까지 배양(사용방법에는 24 hr까지 배양하여야 하나 성장이 느려서 추가 배양)했을 때는 *Lb. bifementans*로 동정되었다(Table 2). 따라서, 세포모양과 kit에 의한 동정 방법에 의하여 구균의 *Leuconostoc*인지 간균의 *Lactobacillus*인지 알 수가 없었고 *Lactobacillus* 선택배지에서의 성장도 뚜렷하지 않을 뿐더러 *Leuconostoc* 선택배지에서의 성장도 뚜렷하지 않아 유전학적인 분류가 요구되었다.

이에 따라서 김치젖산균 WL6를 유전학적으로 구별하기 위하여 비교 표준균주로 생화학적인 동정으로 나타났던 *Lb. bifementans* ATCC35409, *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris* ATCC19524, *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* KFRI155의 3균주와 *Lactobacillus*속의 *Lb. delbruekii* ATCC9649, *Leuconostoc*속의 *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC10830와 *Leu. paramesenteroides* KFRI159, 그리고 *Lactobacillus*속에서 *Weissella*속으로 된 *Wei. confusa* ATCC10881을 사용하였다.

유전학적인 분류방법 중에 PCR 방법은 주로 random primer를 이용^(8,14-15)하였고 species level이나 유연관계가

가까운 균주분류를 위한 실험이 주로 이루어 졌으며, genus level은 16S rRNA의 gene 변이가 적은 부분을 specific oligonucleotide의 primer로 사용하여 vago cocci를 분류한 경우가 있었다⁽²⁰⁾. 본 실험에서는 genus level의 분리를 위하여 젖산균의 sequence가 알려진 gene 중에서 속이 다른 균간의 gene을 서로 비교하였고, 유전적인 변이가 적어 상동한 부분을 specific-sequence primer로 제조하여 사용하였다.

젖산균에서 *Lactobacillus helveticus* CNRZ32의 *pepN* gene은 *Lb. delbruekii* ssp. *lactis* DSM7290의 *pepN* gene과는 69.5%의 nucleotide 상동성과 71.8%의 amino acid의 상동성을 가졌고, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* MG1363의 *pepN* gene과는 61.1%의 nucleotide 상동성과 49.2%의 amino acid의 상동성을 갖고 있으며⁽²⁰⁾, 16S rRNA gene은 많은 균주에서 sequence가 연구되어 있고 chromosomal DNA에 연관⁽¹⁹⁾되어 specific-sequence primer 제조용으로 사용하였다. *PepN* gene의 homology primer set(CH-15, DH-15, CDH-N)(Table 1)를 사용한 PCR 증폭 band를 Fig. 1, A에 나타내었다. *Lactobacillus*속의 *Lb. delbruekii*는 260 bp와 200 bp의 band가 나타났고 *Lb. bifementans*에서는 200 bp와 75 bp가 나타나 200 bp가 두 균주에서 동일하게 증폭되었으며, 260 bp는 *Lb. delbruekii*만, 75 bp는 *Lb. bifementans*만 증폭되어 서로 달랐다. *Leuconostoc*속에서 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*는 200 bp와 75 bp, 그리고 *Leu. paramesenteroides*, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*, *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum*은 75 bp의 band가 나타나 모든 *Leuconostoc*속에서 75 bp가 동일하게 증폭되었다. *Wei. confusa*는 900 bp, 570 bp, 320 bp, 220 bp, 그리고 *Lactobacillus*속과 *Leuconostoc*속의 공동 band이었던 200 bp, 75 bp도 나타나 가장 다양한 gene이 증폭되었다. 한편, *Leuconostoc*속과 *Lactobacillus*속으로 생화학적 동정방법에 따라 다르게 동정되었던 김치 젖산균, WL6는 200 bp와 75 bp가 나타나 75 bp가 증폭이 안된 *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum*과는 구별이 되었으나 *Lb. bifementans*와 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*와는 동일한 band 형태로 나타나므로써 어느 쪽과 연관이 되었는지 구별이 안되었으며 다른 primer set과 병행한 분류 방법이 필요하였다.

16S rRNA gene의 homologous primer set(CR16R-13, LeCR16R, CR16R-NC)를 사용한 PCR 증폭 band는 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*와 *Wi. confusa*가 각각 240 bp와 60 bp의 band가 나타났으며 다른 균주에서는 나타나지 않았다(Fig. 1, B). 따라서, 16S rRNA

Fig. 1. Bands of PCR products of different lactic acid bacteria using primer set A(CH, DH, CDH-N; lane 1-8) and B(CR16R-13, LeCR16R, CR16R-NC; lane 9-16). Strain in lanes 1, 9; *Lactobacillus delbruekii* ATCC9649, lanes 2, 10; *L. bif fermentans* ATCC35409, lanes 3, 11; *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* ATCC19524, lanes 4, 12; *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* ATCC10830, lanes 5, 13; *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* KFRI155, lanes 6, 14; *Leu. paramesenteroides* KFRI159, lane 7, 15; *Weissella confusa* ATCC1088, lanes 8, 16; kimchi strain WL6, lane 17; λ markers(Hind III digested).

로부터 유래된 primer set 방법에 의하여 240 bp가 나타나지 않은 WL6균주와 *Lb. bif fermentans*는 240bp가 나타난 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*와는 구별이 되었다. 여기서, WL6와 *Lb. bif fermentans*의 gene이 증폭되지 않은 것은 16S rRNA gene의 primer가 아주 species-specific하여 증폭 band가 없었던 것으로 생각되며 원래 primer제조에 이용하였던 species(Table 1)와 같은 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*와 *Wei. confusa* 만 증폭된 것으로 추정되었다.

따라서, 김치 젖산균 WL6와 *Lb. bif fermentans*는 16S rRNA를 이용한 primer set 방법으로는 증폭된 gene이 없었으므로 두 균주가 얼마나 가까운지 알 수 없었으나 혼동되었던 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*와는 다르다는 것을 알 수 있었다. 그렇지만, WL6는 생화학적 방법과 *pepN* primer set 방법에 의하여 *Lb. bif fermentans*의 특성을 나타냈고 다른 생화학적으로 유사한 균주와 구별할 수 있었으므로 *Lb. bif fermentans*로 추정되었다.

한편, *pepN* gene set과 16S rRNA gene set은 genus-specific primer를 얻기 위하여 조제되었다. *pepN* gene set에서 75 bp의 *Leuconostoc* 공통의 band와 200 bp의 *Lactobacillus* 공통의 band를 얻었지만 특정한 genus만 구별되는 band가 나타나지 않아 보다 정밀한 genus level의 primer set이 요구되었다. 또한, 16S rRNA gene set에서 *Leu. mesenteroides* ssp. *cremoris*

와 *Wei. confusa*에서만 각각 240 bp와 60 bp의 species-specific band가 나타나 genus level의 사용에는 너무 specific 하였다. Genus-specific primer를 얻기 위해서는 *pepN* gene set의 경우에는 보다 특징적인 sequence를 인지하는 primer를 만들어야 할 것과, 16S rRNA gene set의 경우에는 젖산균간 광범위한 homologous sequence를 갖는 primer가 필요할 것으로 여겨졌다. 이를 위해서는 보다 많은 젖산균의 *pepN* gene과 16S rRNA gene의 sequence의 조사가 선행되어야 할 것이다. 또한, 여기서는 genus를 구별하기 위하여 두 primer set을 병행하였으나 각 genus만 특징적으로 갖는 다른 gene의 primer를 개발하면 하나의 primer set으로도 분류 될 수 있을 것이다.

요 약

김치 젖산균인 WL6는 API kit 또는 Biolog system 방법에 의하여 동정한 결과, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*, *Leu. mesenteroides* ssp. *dextranicum* 또는 *Lactobacillus bif fermentans*로 나타나 동정되지 않았다. 그러나, *pepN* gene과 16S rRNA gene으로부터 2개의 specific-sequence primer set을 제조하여 PCR 방법으로 증폭한 후에 표준균주들과 비교한 결과, WL6는 *Lactobacillus bif fermentans*로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 연구지원으로 이루어졌으며, 이를 감사 드립니다.

문 헌

1. Mheen, T. I. and Kwon, T. W. Effect of temperature and salt concentration of kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 16(4): 443-450 (1984)
2. Lee, M. K., Nam, Y. J., Park, W. S., Hong, S. I. and Kim, I. H. Research Report: Control of kimchi fermentation by regulating microbial succession. Korea Food Research Institute, Songnam, Korea, E1421-0895, (1998)
3. Han, H. U., Lim, C. R. and Park, H. K. Determination of microbial community as an indicator of kimchi fermentation. Korean J. Food Sci. Technol. 22(1): 26-32 (1990)
4. So, M. H. and Kim, Y. B. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. Korean J. Food Sci. Technol. 27(4): 495-505 (1995)
5. Lee, J. S., Jung, M. C., Park, W. and Park, Y. H. Identification of lactic acid bacteria from kimchi by cellular

- FAMEs analysis. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 24(2): 234-241 (1996)
6. Lee, J. S., Chun, C. O., Jung, M. C., Kim, W. S., Park, Y. H. and Mheen, T. I. Classification of isolates originating from *kimchi* using carbon-source utilization patterns. J. Microbiol. Biotechnol. 7(1): 68-74 (1997)
 7. Song, J. E., Heo, T. R. and So, J. S. Optimization of PCR Analysis of *Bifidobacterium* spp.. Food Biotechnol. 6(1): 30-33 (1997)
 8. Choi, S. H., Kwon, W. H., Goh, J. S., Lee, B. J. and Kim, P. H. Comparative study on biochemical and molecular genetical methods for identification of species and strains of Bifidobacteria. Korean J. Dairy Sci. 20(4): 261-272 (1998)
 9. Sneath, P. H., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. Gram-positive cocci, pp. 999-1259 In: Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Williams & Wilkins, Baltimore, USA (1986)
 10. GeneBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/>
 11. Satomi, M., Kimura, B., Mizoi, M., Sato, T. and Fujii, T. *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov., a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce. Inter. J. Syst. Bacteriol. 47(3): 832-836 (1997)
 12. Rodtong S. and Tannock G. W. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. Appl. and Environ. Microbiol. 59: 3480-3484 (1993)
 13. Nigatu, A., Ahme, S., Gashe, B. A. and Molin, G. Randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) for discrimination of *Pediococcus pentosaceus* and *Ped. acidilactici* and rapid grouping of *Pediococcus* isolates. Lett. Appl. Microbiol. 26: 412-416 (1998)
 14. Berthier F., Tailliez P., Ehrlich S. D. Grouping of the strains of the *Lactobacillus sake/curvatus* group by RAPD(random amplified polymorphic DNA). In: Fifth symposium on lactic acid bacteria. FEMS abstracts (1996)
 15. Dykes G. A. and Steele J. L., Strain typing in the genus *Lactobacillus*. Lett. Appl. Microbiol. 19: 63-66 (1994)
 16. Roy, D., Ward, P. and Champagne, G. Differentiation of bifidobacteria by use of pulsed-field gel electrophoresis and polymerase chain reaction. Inter. J. Food Microbiol. 29: 11-29 (1996)
 17. Belanger, E. Genetic identification of the *Lactobacillus* species using PCR-based *pepN* sequences. Master Degree Thesis, McGill Univ. (1998)
 18. API 50 CHL. *Lactobacillus*. 50410, 30275-FA-11/92
 19. Biolog System. Automated bacteria, yeast, and fungi identification system. Insung Bioscience.
 20. William, A. M. and Collins, M. D. Genus- and species-specific oligonucleotide probes derived from 16S rRNA for identification of vagococci. Lett. Appl. Microbiol. 14: 17-21 (1992)
 21. Christensen, J. E., Lin, D., Palva, A. and Steele, J. L. Sequence analysis, distribution and expression of an aminopeptidase N-encoding gene from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. Gene 155: 89-93 (1995)

(2000년 2월 15일 접수)