Kor. J. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 32, No. 3, 249–255 (2004)

발효 온도에 따른 김치의 산도 변화와 Vancomycin 내성 젖산균의 분포

정의숙 · 김기환 · 신원철[1] · 송광영[2] · 윤성식[2,*]
연세대학교 응용과학부 생물자원공학과, [1]강원대학교 바이오산업공학부,
[2]연세대학교 생리활성소재연구소

Changes in Acidity and Distributions of the Vancomycin-Resistant Lactic Acid Bacteria in the Kimchi Fermented at Different Temperatures. Jung Eui-Sook, Ki-Hwan Kim, Won-Cheol Shin[1], Kwang-Young Song[2], and Sung-Sik Yoon[2]*. *Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, [1]School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, [2]The institute of Functional Biomaterials and Biotechnology, Yonsei University* – Chinese cabbage ("Baechu") Kimchi was fermented at the three different temperatures right after it was prepared. Samples were taken everyday for measuring bacterial populations, pH, and titratable acidity through the whole periods of fermentation up to 50 days. pH values and developed acidity were significantly affected by the fermenting temperatures of 4, 10, and 20°C, suggesting that different bacterial flora has been established by the temperatures exposed. The modified MRS agar containing vancomycin (300 μg/mL) was used for isolating the vancomycin-resistant LAB strains and 127 isolates were finally obtained. Of the LAB isolates, 13 isolates were subjected to the identification experiments based on the biochemical characteristics and the molecular-typing approach, an ITS-PCR, whether they belong to the genus *Leuconostoc* or not. The data obtained from API 50 CHL kit resulted that six isolates were identified as the members of *Leuconostoc* and six as *Lactobacillus brevis* strains except for a single isolate YKI 30-0401, which was not able to be identified because its biochemical traits were not matched to the database of API 50 CHL kit. It was noted that some isolates were distinct in a couple of some biochemical characteristics compared with those of the reference *Leuconostoc* species. To overcome the limitations experienced in the commercial identification products above, an ITS-PCR experiment was also conducted for the isolates, resulting that eight isolates belong to *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* or *dextranicum* with a single band of 564 bp, and four to *L. brevis* strains. The ITS-PCR profiles clearly differentiated the closely-related LAB isolates for which same results were obtained by the biochemical method. This molecular approach, however, failed to produce the amplicons for the YKI 20-1003, leaving the strain unidentified. Judging from the identification data obtained in the Kimchi fermented at 4°C or 10°C, *Leuconostoc* spp. including *Leu. mesenteroides/dextranicum* were likely predominant species in the earlier stage and *L. brevis* occurred at the high level through the whole period. By contrast, *L. brevis*, as one of the major flora, possibly lead the fermentation from the beginning in the Kimchi fermented at 20°C.

Key words: Leuconostoc, Kimchi, identification, ITS-PCR method, vancomycin-resistant

*Leuconostoc*속 세균은 발효유제품의 풍미, 유기산류 및 탄산가스 생성[1], 채소 및 포도주 등의 발효과정에 관여하는 미생물로서, 보고된 바에 의하면 sauerkraut와 같은 식품에서는 주로 발효초기에 우점하는 세균이다[2]. *Leuconostoc*이라는 명칭은 그리스어로 clear를 뜻하는 "leukos"와 라틴어인 "nostoc"과의 합성어이다[3]. 1878년 Cienkowski에 의해 제당공정 중 점질을 생성하는 오염균으로 최초로 분리되었고 우리 나라의 전통식품인 김치의 발효과정 중에도 초기에 우점하는 미생물로서 다수 보고된 바 있다[4]. 분류학적으로 이 그룹 미생물은 구균, 그람 양성(Gram-positive)의 *Deinococcaceae*과에 속하며[5], 초기에는 Orla-Jensen에 의해 *Betacoccus*로 명명되었으나 현재는 생화학적 특성에 따라 4종이 등록되어 있다. 그 중 하나인 *Leu. mesenteroides*는 3개의 아종(subspecies)으로 세분된다. 최근 국내에서는 *Leu. kimchi*라는 새로운 종이 김치에서 분리된 바 있고[6] 최근 들어 새로운 종들이 새로 발견되고 있는 추세이다. 이 그룹의 미생물은 포도당을 분해시켜 젖산뿐만 아니라 acetic acid, acetoin, carbon dioxide, diacetyl, ethyl alcohol, hydrogen peroxide 등을 생성하기[7] 때문에 대표적인 헤테로발효균(heterolactic fermenter)으로 분류된다. 그 외의 특징으로는 구연산(citrate)

*Corresponding author
Tel: 82-33-760-2251, Fax: 82-33-760-2803
E-mail: sungsik@dragon.yonsei.ac.kr

을 탄소원으로 이용할 수 있으며[8], 특히 vancomycin에 대한 내성이 타 젖산균에 비해 매우 강하며, 최소저해농도(minimal inhibitory concentration)가 500 μg/mL나 된다는 보고가 있다[9-10]. 항생물질 vancomycin은 glycopeptide 물질로서 원핵생물 세포벽의 peptidoglycan 말단에 존재하는 D-Alanyl-D-Alanyl 잔기에 결합함으로써 세포벽 합성을 저해하는 물질이다[11]. Daba 등[12]은 *Leu. mesenteroides*으로부터 *Listeria monocytogenes*에 대한 항균활성을 가지는 분자량 4.5-kDa의 박테리오신 mesentericin 5를 분리하였다. 일반적으로 *Leuconostoc*속 세균은 발효식품의 바람직한 균으로 알려져 있으나 포장 육제품의 변패를 유발하는 균종도 있다고 보고되었다[13].

이 미생물의 분류학적 문제점은 분류의 기준이 되는 생리적 특성들이 명확하지 않아 그 우선순위를 정하기가 어렵고, 동일한 종임에도 불구하고 몇 가지의 생화학적 특성에서는 양성(+), 음성(-)이 교차로 나타나며, 균주 상호간에도 DNA homology가 낮다는 점이다[14]. 따라서 생화학적 동정법의 정확성이 의문시 되어 최근에는 유전자나 단백질, 지질 등 특수한 성분을 응용한 새로운 동정법이 개발되어 사용되고 있다. 분자유전학적 동정법 중에서도 ITS-PCR법(internal transcribed spacer region PCR)은 신속, 정확하게 미생물을 동정할 수 있는 도구로서 최근 각광을 받고 있다[15]. ITS 영역이란 16s와 23s rRNA 유전자 사이에 존재하는 영역으로서 원핵생물의 속 및 종에 따라 그 길이 및 염기서열에 차이가 있음이 밝혀진 후 Jensen 등[16]은 이 원리를 이용하여 세균의 16s와 23s rRNA 유전자들 사이에 존재하는 구간(spacer 영역으로 불림)을 PCR로 증폭함으로써 신속, 정확하게 미생물을 동정할 수 있다고 주장하였다.

그 동안 국내에서는 김치를 비롯한 전통 발효 식품의 발효 과정에 관여하는 미생물학적 성상에 대한 연구가 활발하게 수행되었지만, 아직도 김치 발효에 관여하는 주요 미생물에 대한 체계적인 연구 자료가 크게 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 김치 발효에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려진 *Leuconostoc*속 균주를 탐색하고자 발효 온도를 달리하면서 경시적으로 산도의 변화를 측정하였으며, *Leuconostoc*속 세균의 보편적인 특성인 vancomycin 내성을 이용하여 젖산균을 분리하였다. 분리된 젖산균을 생화학적인 방법과 ITS-PCR법을 각각 이용하여 동정함으로써 발효 온도별 *Leuconostoc*속 세균의 분포를 검토한 결과이다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 방법

시료 김치의 제조 – 시료용 김치의 재료는 원주시 소재 남부시장에서 구입하였고, 재료 배합비는 배추 100 g, 마늘 2.0 g, 파 0.5 g, 고춧가루 2.0 g, 생강 0.5 g, 젓갈 10 g, 식염 2.0 g 이였다[17]. 주재료 배추는 4~5 cm 길이로 잘라서 15% 식염수중에서 약 3시간 절인 후 2% 식염수로 3회 씻고 탈수한 다음 상기 부재료를 잘 버무려서 담았다. 본 실험에 사용한 김치의 최종 식염 농도는 약 2.0%(w/v)가 되게 조정하였다. 김치 시료는 100 g씩 시판 비닐지퍼백 (롯데)에 주입하고 가급적 공기를 제거한 상태로 밀봉하여 4, 10 및 20°C 항온기에서 일정기간 동안 각각 발효시켰다.

분리용 배지의 제조 및 분리 – 김치로부터 *Leuconostoc*속 균주를 분리하기 위하여 변형 MRS 고체배지(mMRS, pH 6.8)를 사용하였다. 분리용 배지의 조제는 시판 Lactobacilli MRS broth에 10%(v/v) 배추즙, vancomycin 300 μg/mL[18], L-cystein · HCl 0.5 mg/mL, 0.005% bromophenol blue를 각각 첨가하여 고체배지를 제조하였다[19]. 배추즙은 최 등[20]의 방법에 따라서 조제하였다. 온도별로 발효중인 김치를 국물과 함께 100 g정도를 취하여 가정용 소형 믹서기(BDK Morning, Tecon Inc., Korea)로 파쇄한 다음 멸균 거즈로 여과하였다. 여과액의 산도는 상법[16]에 준하여 측정하였고, pH값은 pH meter(Corning, model 220, USA)로 측정하였다. *Leuconostoc*속 균주는 여과액 1 mL를 0.85%(v/v) 멸균 식염수로 적절히 희석하여 미리 굳혀 놓은 상기 한천배지 표면에 고르게 도말하고 28°C에서 48시간 배양하였으며 배지 상에 자란 집락을 재차 획선분리하였다. 분리 균주명은 YKI로 시작되는 일련번호(xx-xxxx)를 부여하여 표기하였다. 처음 두 자리 수는 발효기간, 다음 네 자리 수 중 앞 두 자리 숫자는 발효온도, 뒤 2자리 수자는 일련번호를 각각 의미한다. 각 분리 균주는 MRS 액체배지 중에서 증식시킨 후 3,000×*g*에서 10분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고 소량의 동일 배지에 현탁한 다음 glycerol이 25%가 되도록 혼합하여 -20°C에서 보존하면서 실험에 사용하였다.

분리 균주의 동정

Field Emission Scanning Electron Microscope(FE-SEM) 사진 촬영 – 분리균주를 mMRS 배지에 배양하고 0.22 μm filter(Gelman, Ann Arbor, MI, USA)로 여과 후 여지를 0.5×0.5 mm의 크기로 절단하고 4%의 glutaraldehyde로 2시간 동안 고정시켰다. 이어서 에탄올의 농도를 50%부터 100%까지 단계별로 높여가면서 각 10분간 탈수 처리하였다. 이것을 critical point drying한 후 액체 이산화탄소를 처리하여 기화시킨 후 코팅한 다음 주사전자현미경(Field Emission Scanning Electron Microscope, Japan.)을 사용하여 20,000배의 배율로 촬영하였다.

생화학적 동정 – 상기 mMRS 고체배지를 이용하여 분리된 균주를 대상으로 Gram 염색, 가스생성 유무, catalase 활성을 각각 실험하였다. 분리균주의 동정은 API 50 CHL kit (BioMerieux, France)를 이용하여 28°C에서 48시간 배양한 후 결과를 기록하였다. 양성 및 음성의 판정은 28°C에서 24~48시간 배양한 후 실시하였다. 판정 결과는 API 50 CHL version 5.0(BioMerieux, France)의 ATB Plus V3.3.3. database

에 입력하여 동정하였다.

ITS-PCR법을 이용한 동정 – 분리 균주와 표준 균주(*L. brevis* KCCM 35464, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* KCCM 35471)를 MRS 액체 배지 중에서 각각 배양한 다음 3,000×g 10분 동안 원심분리 하여 얻은 균체로부터 genomic DNA를 분리하였다. 균체를 용균시키기 위해서 lysozyme 10 mg/mL과 함께 mutanolysin(Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 최종농도가 2.4 mg/mL 되게 처리하였다. 추출된 DNA는 Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 불순물을 제거하였다. ITS - PCR 반응은 냉각장치가 부착된 PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research Inc., USA)를 사용하여 Bredit와 Fleming의 방법[21]에 따라 실시하였다. 최종 반응액 100 μl의 조성은 다음과 같다. 70 μl 탈이온 증류수, 10 μl PCR buffer(500 mM KCl, 100 mM Tris, pH 8.3), 1% Triton X-100(Sigma), 10 μl 25 mM $MgCl_2$, 50 mM deoxynucleoside triphosphates(dNTP) 각 4 μl, 0.8 μl Taq polymerase(5U/mL, Promega), 2 μl primer(Genosys Biotechnologies, Woodland, TX), 적당한 농도로 희석된 4 μl의 template DNA primer는 G1-16s(5'-GAAGTCGTAACAAGC-3') 및 L2-23s(5'-GGGTTTCCCCATTCGGA-3')를 사용하였고 최초 denaturation 온도는 94°C에서 5 min 처리하였으며, 매 cycle마다 94°C에서 1 min, 55°C에서 5 min, 72°C에서 2 min으로 프로그램을 설정하고 총 24 cycle동안 증폭하였다. PCR 생성물은 1% agarose gel 상에 loading하고 수평전기영동장치(Mupid-2, Cosmo Bio Co., Ltd., Japan)를 사용하여 전기영동 하였다. 분자량은 100 bp DNA molecular marker(BRL, Carlsbad, California)를 사용하였으며 영동 후 gel은 ethidium bromide 수용액(0.2 μg/mL, Sigma)에 20분간 염색한 다음 UV transilluminator(Spectroline TR-302, USA) 상에서 적색 필터를 장착한 디지털사진기(Olympus, model C-4000, Japan)을 사용하여 자외선 조명하에서 촬영하였다. 생성된 amplicon 크기는 SEQAID 프로그램(Germany)을 이용하여 측정하였다.

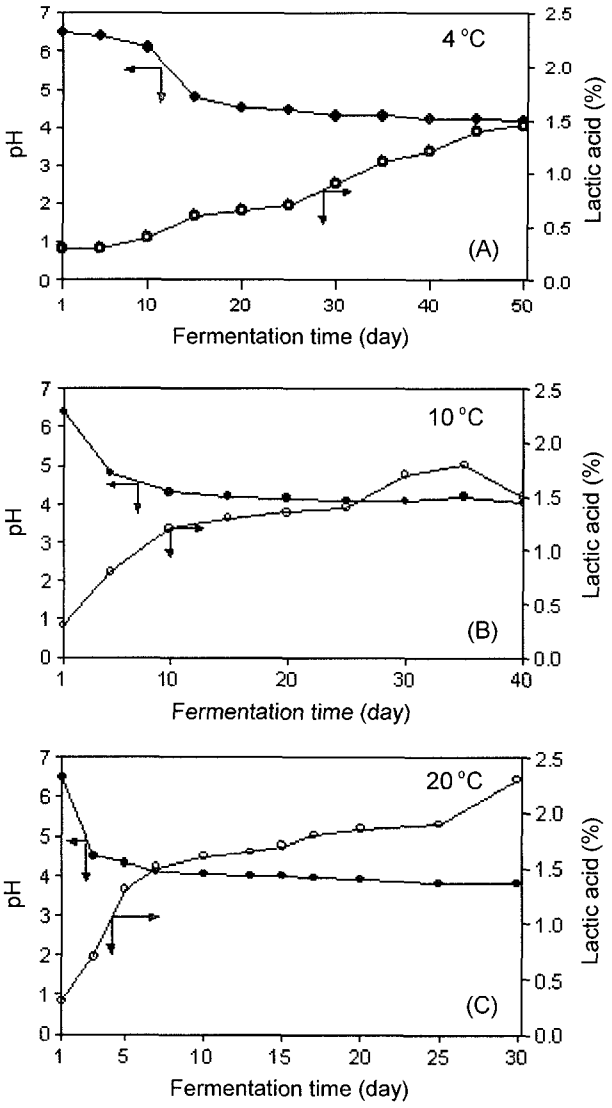

Fig. 1. Time profiles of pH and titratable acidity in the *Kimchi* fermenting at 4°C (A), 10°C (B), and 20°C (C). pH, ●-●; titratable acidity, ○-○.

결과 및 고찰

발효 온도별 pH 및 산도의 변화

김치처럼 자연발효에 의존하는 식품에서는 발효온도에 따른 미생물학적 성상이 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 실제로 김치의 발효과정에서 다양한 미생물의 증식과 소멸이 연속적으로 일어나는 미생물의 천이과정이 일어난다고 한다[22]. 본 연구에서는 발효온도가 김치 중의 *Leuconostoc* 속 세균의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 이해하기 위하여 4°C, 10°C, 20°C로 구분하여 발효시켰다. 각 온도별 발효 김치의 pH와 적정산도의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1에 표시한 바와 같다.

김치를 담근 직후의 pH와 적정산도는 각각 6.4%와 0.27%로 측정되었으며, 4°C 김치의 경우에는 총 50일 동안 발효시켰다. 발효 시작 후 15~25일 사이에 산도가 0.6%~0.78%에 도달하였고 종료 시까지 완만하게 증가하는 경향을 나타냈으며 최고 1.44%까지 도달하였다. 민과 권[23]의 보고에서 제시된 바와 같이 적숙기 산도를 0.6%~0.8% 범위라고 가정할 경우 이 온도에서는 담근 직후부터 대략 25일 정도까지 상미기간이 유지되었다. 한편 pH는 시간이 경과할수록 매우 완만하게 감소하였고, 20일 이후에는 pH의 변화는 거의 없었으며, 발효 후 50일째까지 pH 4.2~4.4 범위를 나타냈다(Fig. 1-A). 김치의 적숙기 pH 값은 pH 4.2~4.5 정도이며, 이 범위에서는 *Leuconostoc*속이 김치의 주된 발효균이라는 보고[23]가 있다.

10°C 발효 김치의 경우에는 Fig. 1-B에 표시한 바와 같이

3~6일 경과 후 적숙기에 도달하였다. 산도는 발효 10일까지는 빠른 증가를 보이다가 그 후부터 25일까지 완만하게 증가하였으며 30~35일 사이에 최대치(1.8%)에 도달하였으며 그 후부터는 40일째까지 감소 추세를 보였다. pH는 10일째까지 빠르게 감소하였고 이후에는 거의 pH 3.9~4.0으로 거의 일정하게 유지되었다.

20°C 발효에서는 적숙기에 도달하는 기간이 가장 짧아 적정산도 값으로 판단할 때 1~2일만에 적숙기에 도달하는 것으로 나타났다(Fig. 1-C). pH는 3일째까지 급격히 감소하는 추세를 보이다가 발효 종료시점인 30일째에는 3.8~3.9정도까지 감소하였다. 산도는 발효 5일째까지 급격히 증가하였으며 그 후에도 약간씩 증가하는 경향을 보이다가 발효 30일째에는 2.25%까지 올라갔다. 온도별로 종료 발효종료 시점의 산도를 상호 비교할 경우, 4°C, 10°C 발효 김치는 각각 1.35%(50일째)와 1.44%(40일째)로 비슷하였으나, 20°C 발효 김치에서는 가장 높은 2.25%(30일째)나 되었다. 결과적으로 발효중인 김치의 pH와 산 생성량은 발효온도에 크게 의존하는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 발효 온도가 높을수록 산 생성량이 증가함을 의미하며 온도가 올라갈수록 헤테로형 보다는 호모형 젖산균이 발효를 주도한 결과로 해석된다. 소 등[24]도 발효 온도에 따라 김치 중에 우점하는 미생물의 성상에 차이가 있다고 주장하였다.

Vancomycin 내성 *Leuconostoc*속 세균의 분리 및 동정

온도별로 발효시킨 김치 중에서 mMRS배지를 이용하여 vancomycin 내성(300 μg/mL)의 127개 젖산균을 분리하고, 이 중에서 13개(4°C 6주, 10°C 4주, 20°C 3주)를 임의로 취하여 *Leuconostoc*속 미생물이 점유하는 분포를 검토하였다. 이를 위해서 생화학적 방법 및 molecular typing법을 이용하여 분리 균주의 동정을 실시하였다. 전자현미경 사진 상에 나타난 형태적 특징(Fig. 2)을 보면 전형적인 구균(cocci) 또는 구간균(coccobacilli)으로 관찰된 것이 9주였으며, YKI 03-0404와 YKI 30-0405주는 쌍(pair)을 형성하는 구간균 형태로서 포도당을 이용하여 gas를 생성하는 전형적인 헤테로형 발효균의 생리적 특징을 보였다(data not shown). YKI 30-0401, 05-1001, 05-0406, 20-1003 및 30-2003은 전형적인 간균(bacilli) 형태였고, YKI 03-0404, 03-0405, 03-0406, 05-0401, 10-1003, 30-0405, 05-1002, 05-2001 및 20-2002는 구간균으로 나타났다. 이들에 대하여 API 50 CHL kit를 사용하여 생화학적 동정을 실시한 결과(Table 1), *Leuconostoc* 속은 6 균주(03-0405, 03-0406, 05-0401, 10-1003, 20-2002 및 30-2003)였고, *Lactobacillus* 속은 6 균주(05-0406, 30-0401, 05-1001,

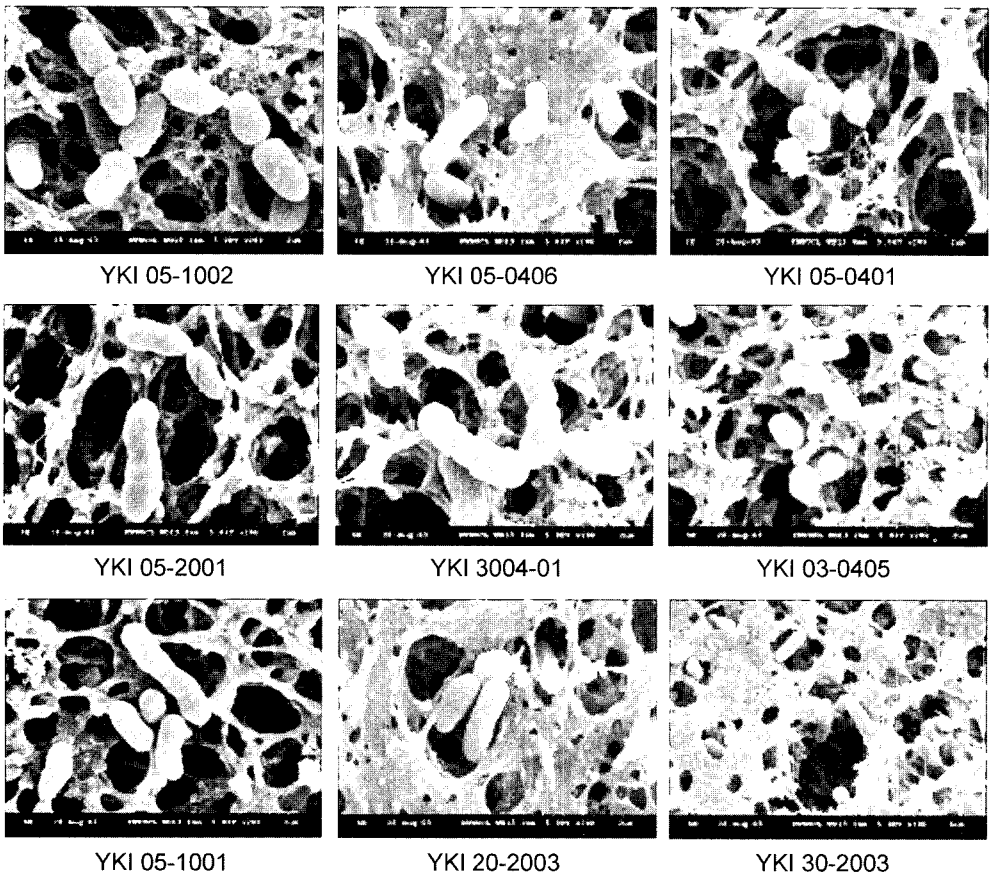

Fig. 2. Field emission scanning electron microscopy (FE-SEM) of the LAB isolates from the fermenting *Kimchi*.

Table 1. Identification of the vancomycin-resistant LAB isolates by the biochemical and the ITS-PCR experiments.

Temp	Isolates	Morphology*	API 50 CHL kit	ITS-PCR
4°C	03-0404	coccbacilli	*L. brevis*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	03-0405	coccobacilli	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	03-0406	coccobacilli	*Leu. citreum*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	05-0401	coccobacilli	*Leu. lactis*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	05-0406	bacilli	*L. brevis*	*L. brevis*
	30-0401	bacilli	(-)	*L. brevis*
10°C	05-1001	bacilli	*L.brevis*	*L. brevis*
	05-1002	coccobacilli	*L. coprophillus*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	10-1003	coccobacilli	*Leu. mesenteroide* ssp. *mesenteroides/dextranicum*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	20-1003	coccobacilli	*L. brevis*	(-)
20°C	05-2001	coccobacilli	*L. brevis*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	20-2002	coccobacilli	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*
	30-2003	bacilli	*Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*	*L. brevis*

*Field emission scanning electron microscope (FE-SEM)
All the LAB isolates were obtained in the presence of vancomycin, 300 μg/mL, on the modified MRS medium (pH 6.8). (–) sign means "not identified".

05-1002, 20-1003 및 05-2001)였다. 위의 *Leuconostoc* 속으로 분류된 6 균주를 종 차원(species-level)에서 분류하면 03-0405, 10-1003, 20-2002 및 30-2003은 *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*, 03-0406은 *Leu. citreum*, 그리고 05-0401은 *Leu. lactis*로 각각 동정되었다. 또한 *Lactobacillus* 속의 경우에는 03-0404, 05-0406, 05-1001, 20-1003, 05-2001주는 *L. brevis*, 05-1002주는 *L. coprophilus*로 각각 동정되었다. 단 YKI 30-0401은 생화학적 특성이 기존 균종과 상당히 달라 API kit를 이용한 동정이 불가능하였으며(Table 1), 기존에 보고된 균주와 특성이 크게 다른 새로운 균종일 가능성이 있다고 생각되었다. 국내에서는 기존에 *Leuconostoc* 속으로 보고된 적이 없는 새로운 균종 *Leuconostoc kimchi*가 김치에서 분리 · 등록된 바 있다[6].

통상적으로 김치의 발효초기에는 *Leuconostoc*속이 우점하고 후기에는 *Lactobacillus plantarum*이 우점균으로 알려져 있으나[23], 본 연구의 결과로 미루어 볼 때 4~10°C 발효 초기에는 *Leuconostoc*속이 우점종의 하나로서 보이며, 발효기간이 경과할수록 *L. brevis*로 동정되는 균종도 상당히 존재하는 것으로 판단되었다. 이에 반해서 20°C에서는 *Leuconostoc* 속 균주가 우세하게 출현할 것이라는 예상과는 달리 발효 초기부터 *L. brevis*가 발효를 주도하는 균종으로 나타났다. 분리균주에 대하여 촬영한 전자현미경 사진 상의 형태적 특성과 생화학적 특성을 이용한 결과만을 가지고 해석할 경우 *Leuconostoc* 속 균주가 전체의 약 46% (6/12주)를 차지하였고, *Lactobacillus* 속 균주의 출현 비율도 46%나 되는 것으로 나타났다. 젖산균의 vancomycin 내성과 관련하여 수행된 타 연구 결과에서 특히 침채류에 서식하는 *L. plantarum*과

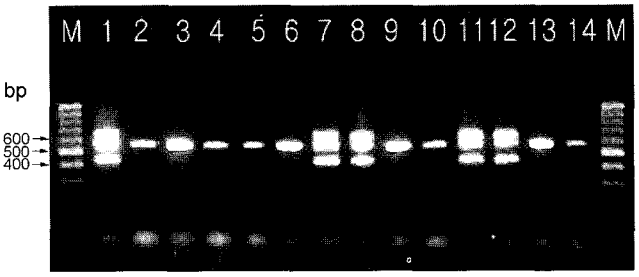

Fig. 3. Banding profiles of ITS-PCR products of the LAB isolates from the fermenting *Kimchi*. Lane M, 100 bp size standard; lane 1, *L. brevis* KCCM 35464; lane 2, *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides* KCCM 35471; lane 30-30404; land 4, 03-0405; lane 5, 03-0406; lane 6, 05-0401; lane 7, 05-0406; lane 8, 30-0401; lane 9, 05-1002; lane 10, 10-1003; lane 11, 05-1001; lane 12, 05-2001; lane 13, 20-2002; and lane 14, 30-3003.

*L. brevis*은 MIC가 2000 μl/mL 이상이었다는 보고[2]를 감안한다면 일단 *Lactobacillus*속으로 확인된 분리 균주 의 대부분은 vancomycin 내성을 가진 *L. brevis* 또는 *L. plantarum*일 가능성이 크다고 생각되었다. 이와 같은 가정을 확인하기 위해 최근 분자유전학적 동정법으로 널리 사용되고 있는 ITS-PCR을 수행하였다. 공시한 표준균주의 ITS-PCR pattern 13개 분리 균주의 그것을 비교한 결과 03-0404, 03-0405, 03-0406, 05-0401, 05-1002, 10-1003, 20-2002, 및 30-2003 주는 각각 단 1개의 DNA band로 나타났고, 그 크기는 564 bp 이었다(Fig. 3). 결과적으로 이들 8 균주들은 모두 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicucm*로 동정되었다. 또한 05-0406, 30-0401, 05-1001 및 05-001 균주는 3개의 DNA 단편을 가지고 있었으며 표준균주(reference species)

와 비교한 결과 *L. brevis*로 동정되었다. 그러나 20-1003주는 미리 표준균주를 사용하여 구축해 놓은 database의 banding pattern과 일치하는 것이 없어 동정이 불가능하였다(data not shown). 특히 주목되는 점은 API 50 CHL kit을 사용하여 *L. brevis*로 확인된 3 균주가 ITS-PCR법에서는 *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*으로 동정되었다는 점이다. 이와 같이 동정법에 따라 결과가 상이하게 나타나므로 특히 야생형 균주를 동정할 때에는 동정의 오류를 피하기 위해 실험방법에 대한 세심한 고려가 필요하다고 생각된다. Lee 등[25]도 김치에서 분리한 WL6주에 대하여 생화학적 방법으로 동정한 결과 *Leuconostoc mesenteroides* 또는 *Lactobacillus bifermentans*로 결정되어, 이를 확인하고자 *Pep*N gene과 16s rRNA gene을 기초로 한 species-specific primer를 이용한 multiplex PCR법을 통하여 최종 *Lactobacillus bifermentans*로 결론을 지었다. Perez 등[26]은 *Leuconostoc mesenteroides*의 아종(subspecies)을 구분하기 위해서 RAPD-PCR fingerprint법을 이용할 경우 *Leu. mesenteroides* ssp. *mesenteroides*는 1800, 1600, 1150 bp, cremoris는 1800, 1150, 350 bp 그리고 *dextranicum*은 1800, 1600, 1500 bp 크기의 각각 서로 다른 3개의 특징적인 DNA banding profile을 얻을 수 있다고 보고하였다. 최근 Heo 등[27]은 김치의 우점 미생물을 확인하기 위하여 16s rRNA유전자의 특이적인 부위를 증폭하여 얻은 amplicon을 culture-independent법의 하나인 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) 실험을 통하여 분석한 결과, 저온 발효 김치의 우점균은 *Weissella koreensis*, *Lactobacillus sakei*, *Leuconostoc gellidum*이었으며, 특히 *Weissella koreensis*는 전 발효기간에 걸쳐 지속적으로 출현하였다고 주장하였다. Hoit 등[28]은 dextran-producing *Leuconostoc*속 균종을 RAPD(randomly amplified polymorphic DNA)법을 이용하여 확인하였다고 보고하였으나, 현재 이 방법은 종 특이적(species-specific) 동정보다는 균주 특이적(strain-specific) 동정법으로 잘 이용되고 있다. 본 연구에서도 일차적으로 동정된 *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*을 상기의 RAPD법을 이용하여 구분하고자 하였으나 실험 조건에 따라 재현성 있는 결과를 얻을 수 없었다. Lee 등[29]은 16s rRNA 유전자를 표적으로 한 종 특이적 primer를 고안하여 multiplex PCR을 수행한 결과 신속, 정확하게 *Leuconostoc*속 균종을 동정할 수 있다고 하였다. 한편 *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* 등의 젖산균에서 흔히 나타나는 vancomycin 내성은 염색체 상에 운반되는 선천적 형질로서 비전이성(non-transferable)으로 알려져 있어[30], 현재로서는 vancomycin 내성 여부가 이 미생물이 starter로 활용되는데 제약이 되지 않을 것으로 생각된다.

이상의 결과를 Table 1에 종합적으로 요약하였다. 생화학적 동정과 ITS-PCR 동정 결과를 상호 비교한 바, 전자(API 50 CHL kit)의 경우에는 총 13개 분리 균주 중에서 *Leuconostoc* 속은 6 균주, *Lactobacillus* 속은 6 균주로 나타난 반면, 후자인 ITS-PCR 실험에서는 전형적인 504 bp 크기의 band를 나타내는 *Leuconostoc* 속에 속하는 8 균주, 서로 상이한 3개의 band를 나타내는 *L. brevis*로 동정된 4 균주가 각각 확인되었다. 그러나 이 경우에도 한 균주는 공시한 primer에 대한 PCR 반응 생성물이 검출되지 않아 동정할 수 없었다. 따라서 본 연구에서 노출된 ITS-PCR법의 문제점을 해결하고 보다 정확한 결과를 얻기 위해서는 앞으로 체계적인 보완 실험이 필요하다고 생각된다.

요 약

배추김치를 담근 직후 4°C, 10°C, 그리고 20°C에서 최고 50일까지 발효시키면서 매일 시료를 취하여 pH 및 적정산도의 변화를 경시적으로 관찰하였다. pH 와 산도는 발효온도에 따라서 크게 영향을 받은 것으로 나타났으며 이러한 결과는 발효 김치중의 미생물학적 성상이 발효 온도에 따라서 상당하게 달라진다는 점을 암시하였다. 각 발효 온도별로 숙성 김치의 상미범위로 알려진 적정산도 0.6~0.8%(pH 4.2)에 도달하여 유지되는 시간을 보면 4°C에서는 20~30일, 10°C에서는 3~5일 그리고 20°C에서는1~2일이 소요되었다. 각 김치 시료로부터 vancomycin(300 μg/mL)이 함유된 modified Lactobacilli MRS agar를 이용하여 vancomycin에 대한 내성을 나타내는 127주를 분리하였다. 이 중에서 저온에서 분리한 균주를 중심으로 13개를 선택하여 생화학적 동정(API 50 CHL kit)을 실시함으로서 분리균 중 *Leuconostoc* 속 균주가 차지하는 비율을 검토한 결과 *Leuconostoc* 속과 *Lactobacillus* 속은 각각 6 균주로 나타났으며, 한 균주는 생화학적 동정이 불가능하여 아직 보고되지 않은 새로운 균종으로 추정되었다. 생화학적 방법의 재현성이 문제가 되어 다시 ITS-PCR법을 사용하여 동정하였다. 그 결과 8 균주는 크기가 564 bp인 1개의 DNA 밴드를 형성하였으며, *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextraniucm*로 동정되었다. 또 3개의 DNA 밴드를 나타낸 4개의 균주는 *L. brevis*로 동정되었으나 1 균주는 ITS-PCR법으로도 동정할 수 없었다. 본 연구의 결과로 미루어 볼 때 4~10°C 발효 초기에는 *Leuconostoc* 속이 우점 세균으로 지목되었고 발효기간이 경과 할수록 *L. brevis*도 김치의 균총에서 상당한 부분을 차지할 것으로 추정된다. 이에 반해서 20°C에서는 *Leuconostoc*속 균주가 우세하게 출현할 것이라는 예상과는 달리 발효 초기부터 *L. brevis*와 같은 세균이 발효를 주도하는 균종으로 생각되었다.

감사의 글

본 연구는 산학협동재단(2001년) 및 연세대학교 학술연구비(2002년) 지원에 의하여 수행된 것으로 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Fleming, H. P., R. F. McFeeters, and M. A. Daeschel, 1985. The Lactobacilli, Pediococi, and Leuconostocs: vegetable products. pp. 97-117. CRC Press, Inc. N.Y.
2. Stamer, J. R., B. O. Stoyla, and B. A. Dunckel. 1971. Growth rates and fermentation patterns of lactic acid bacteria associated with the sauerkraut fermentation. *J. Milk Food Technol.* **8**: 127.
3. Garvie, E. I. 1986. The genus Leuconostoc. pp. 1071-1075. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt(eds.), Vol 2, Williams and Wilkins Co., Boltimore, MD.
4. Lee, C. W., C. Y. Ko, and D. M. Ha. 1992. Microbial changes of the lactic acid bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
5. Thunell, R. K. 1995. Taxonomy of the Leuconostocs. *J. Dairy Sci.* **78**: 2514-2522.
6. Kim, J., J. Chun, and H. Han. 2000. *Leuconostoc kimchi*, a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **50**: 1915-1919.
7. Cogan, T. M. and K. N. Jordan. 1994. Metabolism of *Leuconostoc* bacteria. *J. Dairy Sci.* **77**: 2704-2717.
8. Levata-Jovanovic, M. and W.E. Sandine. 1996. Citrate utilization and diacetyl production by various strains of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. *J. Dairy Sci.* **79**: 1928-1935.
9. Vedamuthu, E. R. 1994. The dairy Leuconostoc: Use in dairy products. *J. Dairy Sci.* **77**: 2725-2737.
10. Mathot, A. G., M. Kihal, H. Prevost, and C. Divies. 1994. Selective enumeration of *Leuconostoc* on vancomycin agar media. *Int. Dairy J.* **4**: 459-2145.
11. Perez-Hernandez, X., S. Mendez-Alvarez, and F. Claverie-Martin. 2002. A PCR assay for rapid detection of vancomycin-resistant enterococci. *Diagnostic Microbiol. Infec. Disease*, **42**: 273-277.
12. Daba, H., S. Padian, J. F. Gossekin, R. E. Simard, J. Huang, and C. Lacroix. 1991, Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 3450-3455.
13. Bjorkroth, K. J., R. Geisen, U. Schillinger, N. Weiss, P. D. Vos, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala, and P. Vandamme. 2000. Characterization of *Leuconostoc gasicomitatum* sp. nov., associated with spoiled raw tomato-marinated broiler meat strips packaged under modified-atmosphere conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3764-3772.
14. Kim, E. K., C. S. Ryu, M. H. So, and Y. B. Kim. 1997. Studies on the genetic diversity using RAPD in *Leuconostoc* sp. isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 1063-1066.
15. Song, Y., N. Kato, C. Liu, Y. Matsumiya, H. Kato, and K. Watanabe. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16s-23s rRNA intergenic spacer region and its flanking 23s rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 167-173.
16. Jensen, M. A., J. A. Webster, and N. Straus. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 945-952.
17. Oh, Y. J. and I. J. Hwang. 1997. Effects of Kimchi consumption on iron status in adult male volunteers. *J. Kor. Nutr. Soc.* **30**: 1188-1194.
18. Benkeroum, N., M. Misbah, W. E. Sandine, and A. T. Elaraki. 1993. Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 607-609.
19. Hang, H. U., S. J. Woo and Y. K. Ha. 1991. Microbial community dynamics during the degradation of waste cabbage on the soil-bed. *Kor. J. Environ. Biol.* **9**: 1-6.
20. Choi, H. J., Y. J. Shin, J. H. Yu, and S. S. Yoon. 1996. A new selective medium for the isolation and the detection of *Leuconostoc* in foodstuffs. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **28**: 279-284.
21. Breidt, F. and H. P. Fleming. 1996. Identification of lactic acid bacteria by ribotyping. *J. Rap. Meth. Auto. Microbiol.* **4**: 219-233.
22. Lee, M. K., Y. J. Nam, W. S. Park, S. I., Hong, and I. H. Kim. 1998. Control of kimchi fermentation by regulating microbial succession. Korea Food Research Institute, Research Report E1421-0895, Songnam, Korea.
23. Min, T. I. and T. W. Kwon. 1984. Effect of temperature and salt concentration on Kimchi fermentation. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **16**: 4-12.
24. So, M. H. and Y. B. Kim. 1995. Effects of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **27**: 495-505.
25. Lee, M. K., W. S. Park, and B. H. Lee. 2000. Genetic identification of the kimchi strain using PCR-based *Pep*N and 16S rRNA gene sequence. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **32**: 1331-1335.
26. Perez G, E. V. Cardell, and Zarate. 2002. Random amplified polymorphic DNA analysis for differentiation of *Leuconostoc mesenteroides* subspecies isolated from Tenerife cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* **4**: 82-85.
27. Heo, G.-Y., J. A. Park, Y. J. Oh, J. S. Lee, C. K. Km. T. I. Mheen, and J. S. Ahn. 2003. Analysis of microbial diversity in low-temperature fermented Kimchi. pp22-25. Proceeding 2003 International Meeting of the Microbiological Society of Korea, May 2-3, Chunchon, Korea.
28. Hoit, S. M. and G. L. Cote. 1998. Differentiation of dextran-producing *Leuconostoc* strains by a modified randomly amplified polymorphic DNA protocol. *Appl. Environ. Microbiol.* **8**: 3096-3098.
29. Lee, H.-J., S.-Y. Park, and J. Kim. 2000. Multiplex PCR-based detection and identification of *Leuconostoc* species. *FEMS Microbiol. Lett.* **193**: 243-247.
30. Swensen, J. M., Facklam, R. R. and C. Thornsberry. 1990. Antimicrobial susceptibility of vancomycin-resistant *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Lactobacillus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**: 543-549.

(Received May 28, 2004/Accepted Sep. 7, 2004)