

고로쇠 수액의 저장 중 세균군집 분석

오정환 · †서상태 · 오혜영 · 홍진성* · 강하영

국립산림과학원 산림병해충연구과, *서울여자대학교 자연과학연구소

Analysis of the Bacterial Community during the Storage of *Gorosoe*(*Acer mono* Max.) Sap

Jung-Hwan Oh, †Sang-Tae Seo, Hye-Young Oh, Jin-Sung Hong* and Ha-Young Kang

Division of Forest Insect Pests & Diseases, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

*Institute of Nature Science, Seoul Women's University, Seoul 139-774, Korea

Abstract

The composition of the bacterial populations in *Gorosoe*(*Acer mono* Max.) sap was characterized during storage with different heat treatments(63°C for 30 min and 73°C for 15 sec). The saps were aseptically collected at 0, 15 and 30 days of storage and analyzed by dilution plating and 16S rDNA PCR-DGGE analysis. There were significant differences in the total number of colony forming units(CFU) of bacteria between heated and nonheated saps. Bacteria of nonheated sap were present at a level of 3.4×10^7 CFU/ml⁻¹, whereas living bacteria were not detected in the heated sap. According to the 16S rDNA sequence and DGGE analysis, *Pseudomonas* sp. was the most abundant bacterial strain in the samples, and the bacterial community structures become more simplified with time and were composed of the *Chryseobacterium* sp. with time. These results allowed us to characterize the dominant bacteria involved in *Gorosoe* sap and to better understand their dynamics throughout storage.

Key words: *Gorosoe* sap, dilution plating, 16S rDNA, DGGE.

서론

현대 사회의 웰빙화에 맞춰 수액을 이용한 건강음료의 응용이 확산되고 있다. 주로 이용되는 수종으로는 단풍나무과의 고로쇠나무, 당단풍 그리고 자작나무과의 자작나무, 거제수나무, 박달나무, 물박달나무, 시스래나무 등이 있다(Kwon SD 2003). 이들 수종 중 고로쇠나무 수액이 전체 수액 중 97%로 가장 많이 응용되는 것으로 연구된 바 있다. 단풍나무과에 속하는 고로쇠나무(*Acer mono* Max.)는 해발 100~1,800 m에 분포하며, 300~500 m에서 중심으로 분포한다(Korea Forest Service 2002). 우리나라뿐만 아니라, 일본, 중국, 만주까지 분포하고 있으며, 목재의 재질은 치밀하고 무거우며 단단하고 질긴 성분을 가지고 있기 때문에 가구와 악기, 건축자재 등으로도 이용되기도 한다(Moon 등 2004).

수액은 건강음료로써 마시는 풍습은 우리나라뿐만 아니라 소련, 중국 및 일본 등지에서도 오랜 음용의 역사가 있다(Sung 등 2001). 고로쇠 수액에는 각종 미네랄, 마그네슘, 칼슘, 비타민 등이 풍부하게 함유되어 있어 이뇨, 변비, 위장병, 통풍, 신경통 및 산후통 등에 효과가 있다는 것이 민간요법으로 구전되고 있다(Kim 등 2006). 특히 4대 미네랄이라 일컫는 칼슘(Ca), 칼륨(K), 마그네슘(Mg), 나트륨(Na)이 전체 무기성분의 94%를 차지하고 있으며, 자당 성분이 약 16.4 g/l 포함되어 있어 약간 단맛이 난다.

고로쇠나무의 연구는 주로 성분분석에 의한 단맛의 차이와 채취량 그리고 음용되는 수종 등의 연구가 진행되었으나(Korea Forest Service 2002; Kwon SD 2003; Moon HS 등 2004; Park 등 1989), 이들의 연구내용은 단순한 수액 성분 분석과 수액 채취량이나 채취방법 등에 국한되어 있다. 고로쇠 수액

† Corresponding author: Sang-Tae Seo, Division of Forest Insect Pests & Diseases, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea. Tel: +82-2-961-2667, Fax: +82-2-961-2679, E-mail: stseo@forest.go.kr

의 살균방법이나 보관방법의 연구는 아직 보고된 바 없어 단지 저온에서 되도록 빨리 먹는 것을 권유하고 있는 실정이다. 다른 나라에서도 역시 수액을 음용하고 있는데, 일본에서는 자작나무(*Betula platyphylla* var. *japomoca*)에 관한 연구(Kim CM 등 1991), 미국과 캐나다에서는 사탕단풍나무(*Acer saccharum*)에 관한 연구(Korea Forest Service 2002; Terazawa K & Kikuzawa K 1994) 등이 보고되고 있지만, 대부분의 연구는 수액 성분과 관련한 연구에 국한되어 있는 실정이다.

본 연구에서는 고로쇠 수액의 살균 처리와 보관 방법에 따른 총 세균 수의 변화를 조사하였고, 세균 군집의 변화를 알아보고자 16S rDNA sequencing과 Denaturing Gradient Gel Electrophoresis(DGGE) 분석을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 시료 채취 및 열처리

수액 시료는 2008년 3월 20일 강원도 인제의 고로쇠나무로부터 채취하였다. 본 연구의 취지에 맞게 일반적으로 수액을 받는 방법으로 채취하였으며, 관 입구를 화염 멸균하여 채취하였다. 채취된 시료는 waterbath에서 예열된 멸균 tube(Falcon, 50 ml)에 옮긴 후 각각 63°C에서 30분, 73°C에서 15초 동안 열처리하였으며, 각각을 4°C, 0°C, -2°C, -20°C에서 30일 동안 보관하면서 실험에 이용하였다.

2. 총 세균 수와 대장균 수 조사

고로쇠 수액에 존재하는 총 세균 수는 Plate Counting Agar (PCA, Difco)를 이용하여 표준평판계수법(Standard plate count)으로 28°C에서 48 hr 배양 후 조사하였다. 또한, 대장균과 대장균 수는 *E. coli*/Coliform Count Plate(3M Petrifilm)를 사용하여 36°C에서 48 hr 배양 후 조사하였다.

3. 분리배양 및 염기서열 분석

식품의 가장 일반적인 보관온도인 4°C에 보관중인 열처리하지 않은 시료를 이용하여 저장 중 세균군집의 변화를 관찰하였다. 저장 기간별 시료를 PCA 배지에 dilution plating법을 이용하여 도말한 후 28°C에서 48 hr 배양하였다. 배양 후 나타나는 colony 수가 20~30개 정도의 plate를 선택하여 모든 colony를 순수 분리하여 염기서열 분석에 이용하였다. 순수 분리한 세균은 InstaGene Matrix(BIO-RAD)를 이용하여 DNA를 추출하였고, 16S rDNA PCR은 27F와 1492R primer를 이용하여 Blackall(Kauffeld J 1990)이 보고한 방법에 따라 실시하였다. 증폭된 유전자는 PCR Purification Kit(QIAGEN)을 사용하여 정제 후 염기서열 분석에 이용하였다. 염기서열 분석은 ALF-Express automatic sequencer(Pharmacia biotech, Lyon, France)

를 이용하였으며, 염기서열 비교분석은 NCBI BLAST search 프로그램을 이용하여 동정하였다.

4. DGGE 분석

DGGE 분석 시 보다 높은 농도의 증폭물을 얻기 위해 16S rDNA PCR product를 주형으로 nested PCR을 진행하였다. Muyzer(1993) 등이 보고한 방법에 따라 PCR을 실시하였으며, 341F-GC(5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGCGGG GG CACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 518R(5'-ATTA CCGCGGCKGCTG-3') primer를 이용하여 증폭하였다. PCR 용액의 조성은 최종농도 10 mM Tris · Cl(pH 8.5), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 nM dNTPs이었으며, 각 10 pmole의 forward와 reverse primer와 30 ng의 주형 DNA를 첨가하고 Taq DNA polymerase(Takara) 2 unit을 사용하여 총 반응용량을 50 μ l로 맞추었다. PCR 조건은 touchdown PCR을 이용했으며, 반응조건은 94°C에서 5분간 초기 DNA 변성 후, 94°C 30초, 65°C부터 56°C까지 2 cycle마다 1°C씩 온도를 내려가며 30초, 72°C 30초 후, 94°C 30초, 55°C 30초, 72°C 30초씩 10회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 7분간 처리한 후 4°C에서 보관하였다. DGGE gel은 40~60%의 농도 구배가 있는 gel을 사용하였으며, 60°C에서 50 V로 800분간 전기영동한 후 ethidium bromide 용액(10 mg ml⁻¹)에서 염색하고 UV를 이용해 밴드를 확인하였다.

Cloning을 통해 선별된 각각의 clone들을 다시 341F-GC, 518R primer를 사용하여 증폭한 뒤, 증폭산물을 다시 위와 같은 방법으로 DGGE하여 마커를 기준으로 밴드의 위치를 비교하여 각각의 밴드들을 동정하였다.

결과 및 고찰

1. 총 세균 수 및 대장균 수

열처리 시료와 무처리 시료의 저장 온도에 따른 기간별 총 세균 수는 Table 1과 같았으며, *E. coli*/Coliform Count Plate(3M Petrifilm)를 이용한 실험에서 대장균과 대장균군은 나타나지 않았다(자료 미제시). 0일차에서 63°C와 73°C로 열처리한 시료에서는 세균이 검출되지 않았다. 열처리 시료와 대조적으로 무처리 시료에서는 3.4×10⁷ CFU ml⁻¹로 세균이 검출되었다. 국내 먹는 물 수질기준이 일반세균 수 1.0×10² CFU ml⁻¹ 이하인 것과 비교해볼 때 매우 많은 수의 일반세균이 검출되었다. 일반가정에서의 보관온도인 4°C 저장의 경우 열처리 시료에서도 시간이 지남에 따라 세균 수는 무처리보다는 적지만 2.3×10⁷~4.3×10⁷ CFU ml⁻¹로 나타났다. 이러한 일반세균의 기간별 증식 속도를 살펴보았을 때 수액은 받자마자 바로 섭취하는 것이 가장 좋을 것으로 판단되었다.

Table 1. Analysis of bacteria cell counts during storage of *Gorosoe*(*Acer mono* Max.) sap at different temperatures

Date	Storage(°C)	Non-Tret.(CFU/ml ⁻¹)	63°C-Tret.(CFU/ml ⁻¹)	73°C-Tret.(CFU/ml ⁻¹)
0 day	-	3.4×10 ⁷	0.0	0.0
	4	7.4×10 ⁷	3.8×10 ⁷	2.3×10 ⁷
15 day	0	5.2×10 ⁷	3.4×10 ⁷	1.2×10 ⁷
	-2	3.2×10 ⁷	0.4×10 ⁷	0.0
	-20	2.3×10 ⁷	0.0	0.0
30 day	4	1.0×10 ⁸	4.3×10 ⁷	3.4×10 ⁷
	0	6.9×10 ⁷	3.9×10 ⁷	2.8×10 ⁷
	-2	3.4×10 ⁷	0.5×10 ⁷	0.1×10 ⁷
	-20	2.6×10 ⁷	0.0	0.0

무처리군의 0°C 보관 시료에서 세균 수는 0일차에서 3.4×10⁷ CFU ml⁻¹이었는데 15일차에서는 5.2×10⁷ CFU ml⁻¹으로, 30일차에서는 6.9×10⁷ CFU ml⁻¹으로 증가하는 것으로 보아, 수액을 0°C에 보관해도 세균의 증식이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 냉동보관(-20°C)의 경우 보관 30일 후에도 세균의 증식이 관찰되지 않아 고로쇠 수액의 영양요소 등에 변화가 없다면 수액의 저장은 냉동보관이 좋을 것으로 판단되었다. 열처리 시료의 저장 온도별 세균 수 검정결과 73°C 15초 처리 방법이 63°C 30분 처리 방법보다 효과적인 것으로 관찰되었다.

2. 16S rDNA Sequencing을 이용한 세균군집 조사

무처리 시료를 일반 저장온도인 4°C에 보관하면서 세균군집의 변화를 16S rDNA sequencing을 통하여 분석한 결과(Fig. 1), 0일차에서는 *Pseudomonas* sp. 외 6개종의 세균이 분포하고 있었으며, 그 중 *Pseudomonas* sp.가 61.9%로 가장 많이 관찰되었고, *Stenotrophomonas* sp.와 *Bacterium* TLCL3이 각각 9.5%, 그밖에 *Chryseobacterium* sp.와 *Janthinobacterium* sp. 등이 관찰되었다. Lagace 등(2004)도 설탕단풍나무의 수액에서도 *Pseudomonas*종이 높은 밀도로 존재한다고 보고하여, 일반 수액에는 그람음성균인 *Pseudomonas*가 일반적으로 분포하고 있다고 판단되었다. 그러나, 저장기간에 따라 세균 종의 변화가 관찰되었는데, 보관 15일차에는 *Chryseobacterium* sp.가 78.9%, *Rahnella* sp.와 *Stenotrophomonas* sp.가 각각 10.5%로 종의 수가 줄어들었으며, 우점종이 *Pseudomonas* sp.에서 *Chryseobacterium* sp.로 변화하였다. 30일차에도 *Chryseobacterium* sp.(77.3%)이 우점하였으며, 15일차에서 검출되지 않았던 *Pseudomonas* sp.(13.6%)와 *Bacterium* TLCL3(4.5%)이 나타났다.

3. DGGE를 이용한 세균군집 변화

16S rDNA sequencing을 이용한 위의 방법은 배양 가능한 세균군집 중에서의 다양성만을 알 수 있다는 단점이 있기 때

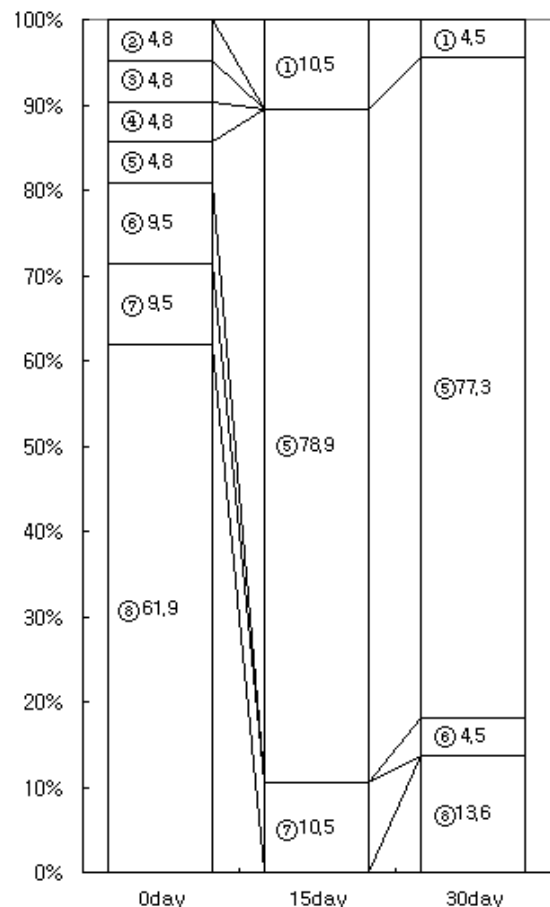


Fig. 1. Change in the *Gorosoe* sap bacterial composition (%) during storage at 4°C. ① *Rahnella* sp. ② Arctic soil bacterium ③ Antarctic bacterium ④ *Janthinobacterium* sp. ⑤ *Chryseobacterium* sp. ⑥ *Bacterium* sp. TLCL3 ⑦ *Stenotrophomonas* sp. ⑧ *Pseudomonas* sp.

문에 우리는 DGGE 분석을 추가로 시행하였다. DGGE를 이용한 보관 기간에 따른 종 다양성의 분석 결과(Fig. 2), 0일차에서는 *Pseudomonas* sp.와 Uncultured bacteria, *Janthinobacterium*

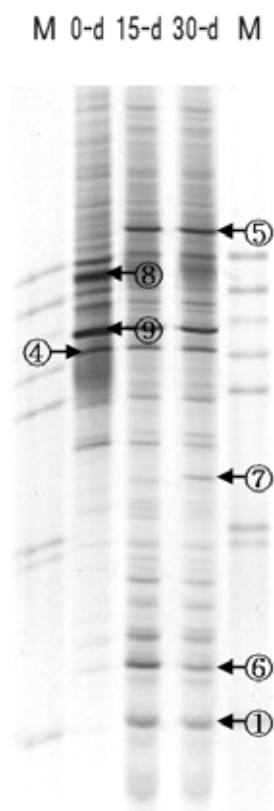


Fig. 2 DGGE gels of PCR amplified 16 rDNA fragments showing fingerprints for *Gorosoe* sap microflora during storage at 4°C. ① *Rahnella* sp. ④ *Janthinobacterium* sp. ⑤ *Chryseobacterium* sp. ⑥ *Bacterium* sp. TLCL3 ⑦ *Stenotrophomonas* sp. ⑧ *Pseudomonas* sp. ⑨ Uncultured bacterium.

sp. 등이 비슷한 비율로 분포하고 있는 것으로 나타났다. 16S rDNA sequencing 결과에서도 *Pseudomonas* sp.가 우점하여 관찰되었던 결과와 일치한다. 15일이 지난 후에는 *Pseudomonas* sp.와 Uncultured bacteria가 점차 줄어들고, *Chryseobacterium* sp.와 *Bacterium* TLCL3, 그리고 *Rahnella* sp.가 증가하는 현상이 나타났다. 또한 30일이 지난 후에는 *Stenotrophomonas* sp.가 증가된 것으로 관찰되었다. DGGE 결과에서 나타난 band들의 수는 종의 수를 의미하며, band의 진하기는 그 종의 분포 정도를 의미한다(Ministry of Environment, Republic of Korea 2002; Muylaert 등 2002).

16S rDNA sequencing과 DGGE 결과를 종합해 보면 공통적으로 0일차에서 우점하고 있던 *Pseudomonas* sp.가 시간이 지남에 따라 점차 줄어들고, 새로운 *Chryseobacterium* sp.가 우점하는 현상이 관찰되었다. 수액에 *Pseudomonas* sp.가 우점할 것이라는 것은 예상이 되었는데, 그람음성균인 이 세균은 보통 담수나 해수 토양에 호기성으로 존재하며, *Pseudomonas* 속에는 xenobiotic 물질을 분해하는 식물병원균이 속해 있기

도 하며, 식물 성장을 촉진하는 기능이 있는 균도 속해 있다 (Muyzer & Smalla 1998). 시간이 지남에 따라 증가한 *Chryseobacterium*은 호기성 그람 음성 간균으로 *C. meningosepticum*, *C. indologenes*, *C. gleum* 등이 속해 있으며, 주로 식물, 유제품, 토양, 민물, 바닷물 등에 편재하며, 육조, 체내 유지 도관 등에서 동정되기도 한다(Lagace 등 2004).

이 연구는 지금까지의 수액을 대상으로 한 수액의 성분 분석 연구와는 달리 수액의 열처리 방법과 보관온도 및 유통기한의 설정을 위한 기초연구로써 수행되었으며, 수액의 저장을 위한 기초 자료를 제시하였다.

결론

고로쇠나무 수액의 세균 수 및 보관 기간에 따른 세균 군집의 변화를 dilution plating법과 16S rDNA PCR-DGGE법을 이용해 분석하였다. 열처리(63°C 30분, 73°C 15초) 수액과 무처리 수액을 4°C, 0°C, -2°C, -20°C에서 30일간 보관하면서 총 세균 수를 확인하였다. 수액을 채취한 직후 수액내의 세균 수는 3.4×10^7 CFU ml⁻¹이었으나, 열처리 수액에서는 관찰되지 않았다. 4°C 보관 무처리 수액을 이용한 16S rDNA 염기서열 분석결과 *Pseudomonas* sp.가 우점하였으나, 보관 일수가 증가할수록 종의 단순화와 새로운 우점종인 *Chryseobacterium* sp.이 나타났다. DGGE 분석에서도 보관 일수가 지남에 따라 *Chryseobacterium* sp.가 우점하는 것으로 나타났다. 이 연구는 고로쇠 수액의 저장 중 세균 군집 변화를 보여준다.

참고문헌

- Blackall LL. 1994. Molecular identification of activated sludge foaming bacteria. *Water Sci Technol* 29:35-42
- Choi SY, Sung NJ, Kim HJ. 2006. Physicochemical analysis and sensory evaluation of fermented soy sauce from *Gorosoe* (*Acer mono* Max.) and *Kojesu* (*Betula costata* T.) saps. *Korean J Food & Nutr* 19:318-326
- Chung MJ, Jo JS, Kim HJ, Sung NJ. 2001. The components of the fermented soy sauce from *Gorosoe* and *Bamboos* sap. *Korean J Food & Nutr* 14:167-174
- Johnsen K, Nielsen P. 1999. Diversity of *Pseudomonas* strains isolated with King's B and Gould's S1 agar determined by repetitive extragenic palindromic-polymerase chain reaction, 16S rDNA sequencing and Fourier transform infrared spectroscopy characterization. *FEMS Microbiol Lett* 173:155-162
- Kauffeld J. 1990. Sweet future. *Ohio* 21:4-5
- Kim CM, Jung DL, Seo HJ. 1991. A study on the ingredients

- in the sap of *Acer mono* Max, and *Betula costata* T. in Mt. Jiri area. *J Korean Soc Food Nutr* 20:479-482
- Korea Forest Service. 2002. Statistical yearbook of forestry. 32
- Kwon SD. 2003. A study on the sap of *Acer mono*, *Acer mono* for. *rubripes* and *Acer okamotoanum*. Unpublished doctoral dissertation, Gyeongsang Uni
- Lagace L, Pitre M, Jacques M, Roy D. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing. *Appl Environ Microbiol* 70:2052-2060
- Ministry of Environment, Republic of Korea. 2002. Drinking Water Quality Standard
- Moon HS, Park SB, Kwon SD, Koo JU. 2004. Bleeding of painted maple in Mt. Jiri area and component analysis. *Korean J Ecol* 27:263-267
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700
- Muylaert K, van der Cucht K, Vloemans N, Meester LD. 2002. Relationship between bacterial community composition and Bottom-Up versus Top-Down variables in four eutrophic shallow lakes. *Appl Environ Microbiol* 68:133-139
- Muyzer G, Smalla K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:127-141
- Park HS, Song WD, Na CS. 1989. Relationship with sap volume, growth and temperature in Mt. Baekun area. *Report of Forest Bleeding Research* 25:30-34
- Terazawa K, Kikuzawa K. 1994. Effects of flooding on leaf dynamics and other seeding responses in flood-tolerant *Alnus japonica* and flood-intolerant *Betula platyphylla* var. *japonica*. *Tree Physiol* 14:251-261

(2009년 8월 25일 접수; 2009년 12월 4일 채택)