

김치발효에서 *Weissella* 속의 중요성과 앞으로의 연구 과제

이강욱¹ · 박지영¹ · 천지연³ · 한남수⁴ · 김정환^{1,2*}
¹경상대학교 대학원 응용생명과학부(BK21), ²경상대학교 농업생명과학원
³순천대학교 식품공학과, ⁴충북대학교 식품공학과

Importance of *Weissella* Species during *Kimchi* Fermentation and Future Works. Lee, Kang Wook¹, Ji Yeong Park¹, Jiyeon Chun³, Nam Soo Han⁴, and Jeong Hwan Kim^{1,2*}. ¹Division of Applied Life Science (BK21), Graduate School, ²Institute of Life Science and Agriculture, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea, ³Department of Food Science and Technology, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea, ⁴Department of Food Science and Technology, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea - *Weissella* species are one of the most common lactic acid bacteria isolated from *kimchi* during *kimchi* fermentation but few researches have been done on this group of organisms. Its recent establishment as a separate genus is one reason for the few studies. Another reason is probably poor resolution of identification methods based on biochemical properties. Currently, 14 species are registered in the genus of *Weissella* but new members are reported continuously. It is important to understand at detail the properties and roles of *Weissella* species during *kimchi* fermentation if desirable properties of *Weissella* species are fully utilized for the production of high quality *kimchi* with good taste and enhanced biofunctionalities.

Key words: *kimchi*, *Weissella*, lactic acid bacteria, fermentation

Weissella 속 유산균 특성

Weissella 속 균들은 유산균에 포함되는 그램 양성 무포자 형성균이다. 그 대표적 형태는 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 단간균(short rod)으로 길이는 1.5-2.0 μm 폭은 0.8-1.0 μm 정도이다. 발효에 의해 에너지를 얻으며 포도당과 같은 당을 기질로 생육하면 이상유산발효(heterolactic fermentation)를 수행해서 유산과 함께 이산화탄소를 생성하며 균주에 따라 초산 혹은 알코올을 생성한다. *Weissella* 속은 1993년 Collins 등이 *Leuconostoc* 속의 다른 종들과 차이를 보이는 *Leuconostoc paramesenteroides*와 *Lactobacillus* 속 5종을 모아서 6종으로 새로운 속을 제안함으로써 만들어졌다[15]. 그 후 새로운 종들이 추가되어 현재 14종이 미국 NCBI (National Center for Biotechnology Information)에 등재되어 있다. 2010년에 2종이 새롭게 보고되었고[17, 35] 앞으로도 새로운 종들의 발견이 예상되어 그 수는 계속 증가할 것이다. *Weissella* 속 균들은 김치와 같은 발효 소채류, 발효식품, 사람과 동물의 소화관, 소시지 등 다양한 자연환경에서 검출된다. *W. soli*는 토양에서 검출되었으며[32], 특별한 병원성은 보고되지 않았다[4]. 김치에서는 2002년 *W. koreensis*가[28] 분리, 보고되었고 *W. kimchii*[11]도 보고되었으나 *W.*

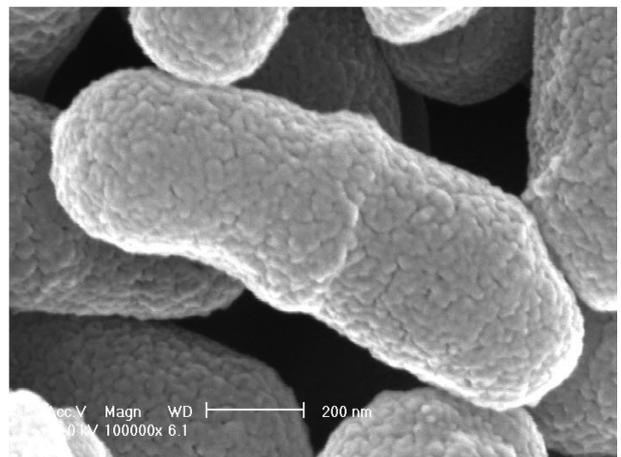


Fig. 1. A scanning electron micrograph of *W. confuse* 20 strain. Picture was taken using a field emission scanning electron microscope. Model, Philips XL30 S FEG (Netherlands).

*kimchii*는 나중 *W. cibaria*와 동일한 것으로 판명되었다 [19]. *W. hanii* 역시 김치 분리균으로 NCBI에 등재되어 있지만 논문으로 보고되지 않아 신종으로 공식적인 인정은 되지 않고 있다. Table 1에 현재까지 보고된 *Weissella* 종들을 정리하였다. 김치를 포함한 각국의 다양한 발효식품들에서 검출됨을 알수있다.

*Corresponding author
Tel: 82-55-751-5481, Fax: 82-55-753-4630
E-mail: jeonghkm@gnu.ac.kr

Table 1. *Weissella* species.

species	source	old name/reference
<i>W. beninensis</i>	From cassava fermentations	[35]
<i>W. cibaria</i>	from Malaysian foods	[4]
<i>W. confuse</i>	from sugar cane	<i>Lb. confusus</i>
<i>W. fabaria</i>	from cocoa fermentation	[17]
<i>W. ghanensis</i>	from fermented cocoa	[16]
<i>W. halotolerans</i>	from sausage	<i>Lb. halotolerans</i>
<i>W. hanii*</i>	from kimchi	
<i>W. hellenica</i>	from fermented Greek sausage	[15]
<i>W. kandleri</i>	from desert spring (Namib Desert, Namibia)	<i>Lb. kandleri</i>
<i>W. koreensis</i>	from kimchi	[28]
<i>W. minor</i>	from milking machine slime	<i>Lb. minor</i>
<i>W. paramesenteroides</i>	from fermented Greek sausage	<i>Leu. paramesenteroides</i>
<i>W. salipiscis*</i>	from fermented fish in Thailand	
<i>W. soli</i>	from soil	[32]
<i>W. thailandensis</i>	from fermented fish in Thailand	[41]
<i>W. viridescens</i>	from cured meat products	<i>Lb. viridescens</i>

*The species is not officially confirmed.

김치에서 분리된 *Weissella* 속 균주들

Weissella 속 균들은 이상유산발효를 수행하며 그 결과 비교적 적은 양의 유산을 생성하기에 평균으로 김치에 접종할 경우 산도를 낮추어 줄 것이 예상된다. Park 등(2001)이 깍두기 김치에서 분리한 *W. paramesenteroides* P30은 다른 유산균들 보다 산 생성이 적은 특징을 보였고 P30을 접종한 김치의 산도를 48시간까지 측정된 결과, 24시간까지는 접종하지 않은 김치와 차이를 보이지 않았지만, 24시간 이후에는 P30을 접종한 김치의 산도가 더 낮게 나타났다[36]. 김치에서 분리한 유산균 동정을 위해서는 전통적으로 고체배지에서 관찰되는 균락 형태와 색, 그리고 생화학적 특성들을 조사하지만 2000년 이후론 분자생물학적 방법들이 활발히 적용되고 있다. 특히 최근에는 생태학 연구에 적용되는 “비배양 방법(culture independent method)”이 발효식품들에도 사용되고 이는 발효식품들도 고유의 미생물 생태계로 간주된 때문이다. 비배양 방법들의 적용 결과 *Weissella* 속 균들이 김치발효에서 가장 주된 유산균들에 포함되는 것이 밝혀졌다. 비배양 방법의 핵심은 김치에서 회수한 미생물 세포들을 파쇄하여 total DNA를 추출한 후 이를 기질(template)로 PCR을 수행하는 것이다. 세균들의 16S rRNA 유전자를 target gene으로 증폭하며 16S rRNA 유전자 염기서열에서 잘 보존되어 있는 5'과 3' 부위에 각각 결합하는 primer들을 사용한다. 김치에는 세균외에 효모와 고세균들(archaea)도 존재하며 효모 검출은 26S rRNA gene을 target gene으로 고세균 검출은 고세균 고유의 16S rRNA gene을 target gene으로 하는 primer쌍을 사용한다[6].

안 등(2003)은 대구지역 가정에서 담근 콩잎물김치로부터 유산균들을 분리하고 이들의 16S rRNA 유전자 염기서열을

조사한 결과 *W. cibaria*로 추정되는 두 균주를 확인하였다[1]. 16S rRNA 유전자 염기서열에 의한 동정 결과는 Bergey 방법이나 bromphenol blue 배지를 사용한 생화학적 방법에 의한 동정 결과와 달랐다. Chin 등(2006)은 배추김치에서 분리한 유산균들을 API 50 CH kit를 사용한 생화학적 방법과 rRNA intergenic spacer region(ITS) 염기서열에 기초한 방법으로 각기 동정했을 때 결과가 차이가 있는 점과 *W. cibaria*가 우점종 중 하나임을 보고하였다[9]. 한편 Choi 등(2003)이 15°C 발효 배추김치에서 분리한 유산균들을 16S rDNA 염기서열 결정법으로 동정한 결과 발효초기와 중기에는 *Leu. citreum*이 우점종이고 *Weissella confusa*로 추정되는 균들은 중기에 검출되었다[12].

김치 발효 단계별로 우점종인 유산균 종들을 신속히 파악하기 위해서는 DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis) 방법이 효과적이다. 박 등(2003)은 4°C에서 60일간 발효시킨 김치에서 추출한 DNA로부터 증폭한 16s rRNA 유전자들에 대해 DGGE를 수행하였다[37]. 그 결과 *Leu. citreum*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. pseudomesenteroides*, *Leu. gelidium*과 같은 *Leuconostoc* 속들, *Lb. sakei* 같은 *Lactobacillus* 속 및 *W. koreensis* 같은 *Weissella* 속들이 확인되었다. *W. koreensis*는 발효 전 기간을 통해서 그리고 *Lb. sakei*는 10일 이후 우점종이었고 *Leu. gelidium*은 30일 이후 우점종에 포함되었다.

Lee 등(2005)도 16S rRNA 유전자 증폭물 DGGE 분석법으로 김치숙성중 미생물 균총 변화를 조사하였다[29]. 배추김치를 20°C와 10°C에서 각각 20일과 30일 숙성시키면서 균총 변화를 조사한 결과 10°C에서는 *W. confusa*가 발효 처음부터 마지막까지 검출되었고 *Leu. citreum*은 발효 1일째 나타나 4일부터 band 강도가 증가하여 마지막까지 일정하게

유지되었다. *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*는 4일째 나타나 마지막까지 검출되거나 발효 후기로 갈수록 그 강도는 감소하였다. 20°C 저장 김치의 경우 주요 균들은 10°C와 동일하나 *W. confusa* band 강도가 *Leu. citreum* 보다 크고 2일부터 8일에 *Lb. brevis*로 추정되는 균이 나타나지만 8일 이후 사라진 점이 달랐다.

Kim과 Chun(2005)은 시판 김치들에 존재하는 유산균들의 16S rRNA 유전자 염기서열을 조사하여 종을 먼저 확인하고 다음 증폭된 16S rDNA를 제한효소 *MspI*으로 절단하여 얻는 DNA 패턴을 분석하는, ARDRA법(Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis)을 분석에 사용하였다[23]. 조사한 5점 김치 모두에서 *W. koreensis*가 검출되었고 이중 3점에서는 가장 많은 수로 존재하였다. *Leu. gelidium*은 시료 3점에서 검출되었고 이중 2점에서 가장 많은 균으로 1점에서는 3번째로 많았다. *Lb. sakei*도 3점에서 검출되었고 1점에서 가장 많은 균으로 2점에서는 2번째로 많은 균이었다. *Leu. gasicomitatum*은 4점에서 검출되었고 이중 2점에서 두번째로 많았다. 한편 *Leu. inhae*도 3점에서 검출되었다. *Leu. inhae*는 2003년 김치에서 분리되어 신 종으로 등록되었다[22]. *Leu. gasicomitatum*은 2000년 진공포장된 닭고기에서 변질균으로 분리되어 신 종으로 등록되었다[3].

Cho 등(2006)은 김치냉장고내 온도가 다른 저장칸에서 저장한 김치를 대상으로 미생물 천이를 조사하였다[10]. 15°C에서 2일간 둔 후 24시간 동안 -1°C로 온도가 낮아지도록 프로그래밍하여 저장한 김치(15°C 김치)와 10°C에서 4일간 둔 후 12시간 이내에 -1°C로 낮추어 저장한 김치(10°C 김치)를 비교하였다. 15°C 김치의 경우 *Leu. citreum*과 *Leu. gasicomitatum*이 우점종이나 10°C 김치는 *W. koreensis*로 나타났다. 이는 *W. koreensis*가 *leuconostocs* 같은 타 유산균들보다 저온에서 더 잘 생육하기 때문일 것이다. 김치발효중 주된 유산균을 결정하는 일차적인 요소는 온도이다. 저온에서는 *Leu. gelidium*같이 저온에 잘 견디는 균들이 *Leu. mesenteroides*나 *Lb. plantarum*에 비해 유리하고 이 때문에 10°C 이하 숙성 김치에서는 *Leu. gelidium*이나 *Lb. sakei*들이 주로 검출된다[40].

Lee 등(2008)이 땅속에 파 묻는 전통 김장김치 저장방법으로 저장한 김치를 조사한 결과 *Leuconostoc* 속(*Leu. citreum* 등)이나 *W. koreensis* 보다 *Lb. sakei*가 주된 균으로 판명되었다[26]. *Lb. sakei*가 5-9°C 온도에 잘 적응한 점과 *W. koreensis*는 sucrose를 이용하지 못해서 sucrose를 첨가한 김치에서는 타 균들보다 불리하기 때문이라 추정되었다. 한편 *Lb. sakei*는 유산과 초산을 생성하였지만 에탄올은 생성하지 않았다. 균에 따라 그리고 탄소원에 따라 산들과 에탄올 생성 및 생성량에 차이가 있고 이는 김치 맛에도 영향을 준다. 맛이 좋은 김치들의 대사물과 그 함량을 측정하고 그와 같은 대사물들을 생성하는 균주들을 평균적으로 사용하는 연구들이 필요하다.

심과 이(2008)는 16S rRNA 유전자를 제한효소로 절단하여 얻는 DNA 절편들 패턴을 비교하는, T-RFLP(terminal-restriction fragment length polymorphism), 방법을 사용하여 15°C와 4°C 발효 김치에서 유산균 천이를 모니터링하였다[40]. 15°C 숙성의 경우 *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*가 가장 많았고 다음은 *W. cibaria*와 *W. koreensis* 그 다음은 *Leu. mesenteroides*, *Leu. inhae*, *Leu. citreum*, *Leu. kimchi* 등 *Leuconostoc* 속이 검출되었다. 4°C 김치의 경우 *W. koreensis*와 *W. cibaria*가 우점종이고 *Leuconostoc* 속이 다음이었다. *Weissella* 속은 발효 5주차에 가장 많지만 10주가 되면 감소하고 대신 *Lb. sakei*가 우점종 위치를 차지하였다. T-RFLP는 신속한 미생물 군집 분석법으로 장점이 있지만 다른 종들간에도 16S rRNA 유전자 염기서열은 99% 이상 같은 경우도 있어서[4] 보다 정확한 동정을 위해서는 다른 방법을 함께 사용할 필요가 있다.

이상 연구 결과들을 종합해보면 김치에서 유산균 생육을 결정하는 가장 중요한 두 가지 요소는 발효 온도와 당을 비롯한 영양소 종류로 생각된다. 김치제조시기나 지역에 따른 차이는 앞의 두 요인들에 의해 결정되는 종속변수들일 것이다. 저온저장 김치에서는 *W. koreensis*, *W. cibaria*, *W. confusa* 같은 *Weissella* 속과 *Lb. sakei*, *Leu. gelidium*, *Leu. citreum*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. inhae* 등 저온에 잘 견디는 균들이 우점종을 형성하지만 10°C 이상에서는 *Leu. mesenteroides*, *Lb. plantarum*, *Lb. brevis* 등이 우점종이 될 수 있다. 김치에서 유산균 생육은 환경조건이 조금만 바뀌어도 달라질 수 있다. 따라서 특정 김치에서 우점종을 형성하는 균들은 해당 환경(재료들의 종류, 저장 온도, 저장 방식 등)에 가장 잘 적응하는 종류들이다.

16S rRNA 유전자에 기초한 동정법의 문제점은 김치에 소수로 존재하는 균들은 검출이 힘들다는 점이다. 이를 잘 보여준 예가 Bae 등(2005)의 보고이다[2]. 여기서는 유리판에 고정화시킨 유산균 genomic DNA들에 김치에서 추출한 DNA를 첨가하여 DNA-DNA hybridization을 일으키는 genome-probing microarray(GPM)가 시도하였다. 총 149개 유산균 genomic DNA들이 사용되었고 김치 발효 단계별로 총 99균주들이 검출되었다. 타 연구들과 마찬가지로 *Weissella*, *Leuconostoc*, 그리고 *Lactobacillus* 속 검출 강도가 높아서 이들이 주된 발효균임을 보여주지만 *Enterococcus*, *Pediococcus* 및 *Streptococcus*들도 다수 검출되었다. GPM에 사용한 김치추출 DNA를 기질로 16S rRNA 유전자 증폭과 DGGE를 수행하였을 때는 단 9종만 검출되었고 이는 16S rRNA 유전자 증폭 방법은 다수인 균들은 검출하지만 소수 균들은 검출 못하는 문제점을 확인한 결과이다. 김치 발효에 관여하는 유산균 종류의 정확한 평가를 위해서는 16S rRNA 유전자 증폭의 GPM 방법 병행이 바람직하다. Nam 등(2009)은 김치유산균 동정에 GPM 방법을 사용하되 genomic DNA와 함께 cDNA도 사용하였다[34]. 김치 추출

RNA 시료에서 16S와 23S rRNA를 제거한 후 역전사효소를 사용하여 cDNA를 얻어 hybridization 실험(metatranscriptome analysis)을 수행한 결과 genomic DNA 보다 cDNA 사용시 더 많은 유산균들이 검출되었다. 이는 김치발효에서 각 유산균 역할을 자세히 이해하려면 발효중 mRNA 농도를 확인할 필요성을 보여준다. 전사체 농도 측정을 통해서 실제로 존재하지만 대사 활동이 없는 균들과 활발하게 대사하는 균들간 구별이 가능하기 때문이다. 하지만 이 실험의 경우 사용된 39종 유산균에 *W. koreensis*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. inhae* 등 김치발효에 중요한 종들이 제외된 점은 큰 단점이다.

김치발효에서 *Weissella* 속 균들의 역할

일반적으로 김치발효 초기와 중기에는 이상유산발효 유산균인 *Leu. mesenteroides*가 우점종으로 생육하여 김치의 적숙을 유도하다가 발효 후기에 들어서면 내산성이 약해서 그 숫자가 감소하는 반면에 내산성이 큰 *Lb. plantarum*이나 *Lb. brevis* 같은 lactobacilli는 급격히 증가하고 그 결과 더 많은 산이 생성되어 김치 산패를 일으킨다고 알려져 왔다[7, 25, 27, 33]. 하지만 위에서 일부 언급한 것 처럼 2000년 이후 수행된 연구결과들을 보면 김치발효에는 여러 다른 유산균들이 관여하고 이들의 역할이 더 중요할 수 있는 가능성을 보여서 이 부분은 앞으로 더 많은 연구를 통해서 확인이 필요하다. *Weissella* 속 균들이 김치에서 가장 빈번히 검출되는 것도 이는 *Weissella*들이 김치발효에서 중요한 역할을 수행할 개연성이 매우 높음을 보여준다. 하지만 김치에서 *Weissella*들의 생육과 김치 품질에 미치는 영향에 관한 연구는 매우 부족하다. 다른 속으로 잘못 동정된 균주들을 대상으로 연구들이 수행되었을 수 있지만 확인이 어렵기에 연구 결과가 없는 것이나 마찬가지이다. 지금 필요한 것은 여러 발효 조건들에서 *Weissella*들의 생육, 산 생성 및 다른 대사물들의 종류 및 생성량, 이들 대사물이 김치품질에 미치는 영향등을 조사할 연구이다. 또 김치 종균으로 *Weissella*의 사용 가능성, 종균으로서 갖는 장, 단점 등도 연구가 필요하다. 내산성, 내담즙성, 장내 정착성 등에 관한 연구들이 이루어지고 발효특성도 밝혀진다면 김치 종균 혹은 정장제제로 유용한 *Weissella* 균주들이 확인될 것이다. 비단 *Weissella* 속만 아니라 *Leuconostoc*, *Lactobacillus* 속 균들도 상세한 연구가 요구되기는 마찬가지이다. 김치 품질에 미치는 유산균 역할이 균 종류별로 구체적으로 이해된다면 궁극적으로 이들을 종균으로 활용한 다양한 맛의 김치 제조가 가능할 것이다.

Weissella 속 균들이 생산하는 효소와 그 기능성

Weissella 속 균주들을 sucrose 함유 배지에서 배양할 경

우 흔히 dextran같은 고분자 물질을 생성한다. Kim 등(2008)은 김치에서 분리한 *W. hellenica* 균주가 sucrose 함유 MRS 배지에서 분자량 203,000의 매우 큰 glucan을 생성하며 최적 생성조건은 pH 5와 20°C임을 확인하였다[24]. 또 중합체 구조분석을 통해서 glucose 단위들이 β -1,3 결합으로 연결된 것으로 추정하였다. *Weissella* 속 균들 중에는 α -galactosidase(α -Gal)나 β -glucosidase(β -Glu)같은 산업적 응용성을 지닌 효소들을 생산하는 균주들이 있다. α -Gal는 대두에 많이 존재하는 소당류인 stachyose나 raffinose의 α -1,6 결합을 끊어준다. 이들 당은 두유를 섭취할 경우 흔히 일어나는 소화불량이나 복통의 원인이 되기에 이들을 끊어주는 α -Gal 역가를 지닌 유산균은 두유발효에서 종균으로 바람직하다[20]. 한편 β -Glu는 대두에 존재하는 이소플라본 배당체들(isoflavone glycosides)을 생리활성이 더 높은 비배당체들(aglycones)로 전환시켜서 발효대두제품들의 기능성을 증진시킨다. 비배당체들은 소화관에서 흡수율이 배당체들 보다 높아서 기능성 측면에서 배당체들 보다 우수하다고 알려져 있다[21].

Chun 등(2008)은 인체에서 분리한, β -Glu 역가를 지닌 *Weissella* 균주들을 두유발효에 종균으로 사용하였다[14]. 분리균 *W. confusa* 31을 접종한 두유의 경우 37°C에서 발효시 9시간 이내에 이소플라본 배당체들인 daidzin과 genistin 함량은 급격히 감소하였고 대신 비배당체인 daidzein과 genistein 농도는 증가하였다. β -Glu 역가를 지닌 *Weissella* 들은 대두 이소플라본뿐 아니라 다른 식품소재들의 기능성 개선에도 활용될 수 있다. Chi 등(2005)이 보고한 인삼 ginsenoside들의 생전환이 좋은 예로서 비록 *Weissella*는 아니지만, *Lactobacillus* 속 등의 식용미생물 추출물에 있는 효소역가를 이용해 다양한 인삼 사포닌 배당체들을 비배당체로 전환시켰다[8]. 이처럼 *Weissella*들이 지닌 β -Glu 역가를 활용한다면 식품중 배당체들의 전환을 통해서 기능성이 개선된 화합물을 얻을 수 있다. 최근 Liang 등(2010)은 β -Glu 역가를 지닌 새로운 종인 *Lactobacillus kimchicus*를 김치에서 분리하였다[31]. *Lactobacilli*만 아니라 *Weissella* 속 중에도 β -Glu 역가를 가진 종이 많이 존재할 것으로 생각되며, 이를 김치 등의 종균으로 이용할 경우 유용할 것이다.

Yu 등(2009)은 김치에서 오르니틴 생성능을 지닌 *W. koreensis* 균주들을 분리하였다[43]. L-오르니틴은 근육 증강, 비만 예방 및 면역증강 등의 효능이 알려져 있어 기능성 식품소재로 활용 가능성이 있는 물질이다. 1% arginine이 첨가된 MRS 배지에서 분리한 두 균주를 배양한 결과 각각 27.01와 31.41 mg/L/h 수율로 오르니틴을 생성하였다. *Weissella*가 아미노산인 아르기닌에서 오르니틴을 생성한 것은 생전환의 또 다른 예이다.

발효식품을 포함한 천연 시료들의 탐색을 통해서 다양한 생전환 능력을 지닌 *Weissella*들이 확보된다면 이들을 여러 용도로 활용하는 것이 가능할 것이다. 생전환에 관련된 효

Table 2. Examples of bioconversions by *Weissella* and other lactic acid bacteria.

Strains	Bioconversion	reference
<i>Weissella confusa</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Enterococcus durans</i>	isoflavone glycosides into aglycons by single or mixed culture during soy milk fermentation	[13-14]
<i>Weissella koreensis</i>	production of ornithine from arginine	[43]
<i>Bifidobacterium</i> sp. <i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp.	transformation of ginsenosides Rb2 and Rc in ginseng	[8]
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	production of isoflavone aglycones during soy milk fermentation	[42]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i>	isoflavone glycosides into aglycons during soy milk fermentation	[18]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>	isoflavone glycosides into aglycons during soy milk fermentation	[38]
<i>Bifidobacterium</i> (26 strains)	conversion of daidzin and daidzein during soy milk fermentation	[39]
<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	isoflavones and B-vitamin changes by single or mixed culture during beverage fermentation	[5]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	production of conjugated linoleic acid (CLA) from linoleic acid (LA)	[30]

소들과 해당 유전자들이 확보된다면 단백질 공학 및 대사공학의 첨단 기술을 사용해서 변이를 유도하고 결과적으로 생 전환 능력이 향상된 변이주들을 얻을 수 있을 것이다. 변이주들을 식품발효에 종균으로 사용한다면 고농도의 생리활성 물질들을 지닌 발효식품 제조도 가능할 것이다. Table 2에 위의 예들을 포함하여 몇가지 보고된 생 전환 예를 정리하였다. 대부분은 두유발효중 이소플라본 배당체들의 비 배당체로의 전환에 관련된 보고들이다.

앞으로의 연구 과제들

현재 대부분의 김치는 종균을 사용하지 않는 자연발효 방식으로 제조되지만 앞으로는 종균 사용이 점차 시도될 것으로 예상된다. 이는 다양한 맛의 김치를 얻기 위해서는 김치에서 생육시 고유한 맛을 주는 균주들의 사용이 효과적이기 때문이다. 다양한 맛을 내는 김치 제조를 위해 예상되는 제조 과정들은 다음과 같을 것이다. 먼저 소비자들이 선호하는 맛을 지닌 김치의 상세한 대사물 분석을 통해 대사물 프로파일을 얻고 그런 프로파일에 적합한 균주들을 선발한다. 선발 균주(들)을 김치에 접종하고 대사물 생산에 적합한 조건(발효온도와 탄소원)에서 발효를 진행하면서 발효중 그리고 발효후 대사물 분석과 관능검사를 통해 기대한 대사물 조성과 맛을 지닌 김치가 얻어졌는지 확인한다. 체계적으로 이런 방법을 사용한다면 소비자의 국적이나 지역 혹은 연령대 별로 가장 적합한 맛을 지닌 김치 제조가 가능할 것이다. 이를 위해서는 대사체 분석 기술과 함께 유전체 정보를 활용한 우수 종균 확보 및 배양기술 개발이 필요하다. 종균으로는

기능성 물질 생산이나 유해균 증식 억제 같은 특성을 지닌 균주들이 바람직 할 것이다. 김치발효에서 중요한 역할을 수행하는 유산균들에 대해서는 재 검토가 필요하다. 흔히 가장 중요하다고 알려진 *Leu. mesenteroides*와 *Lb. plantarum*이 실제로는 주된 균이 아닐 가능성이 크다는 최근 연구결과들을 보면 그 필요성을 알 수 있다. 과거 보고들에서는 없던 균들이 최근 많이 검출된 이유로 생각할 수 있는 첫째는 이전의 생화학적 특성들(당 이용성, 생육온도, 염내성 등)에 기초한 동정이 정확하지 않았을 가능성이 있다. 즉, *Leu. mesenteroides*나 *Lb. plantarum*으로 동정되었지만 실제로는 다른 속이나 혹은 같은 속의 다른 종이였을 가능성이 있다. 표현형에 기초한 동정은 정확도가 떨어진다. 이는 유사한 종들간에는 생화학적 특성들이 종종 구별되지 않을 만큼 비슷하여서 정확한 동정이 어렵기 때문이다. 또 미생물들은 변이가 빈번히 일어나고 그 결과 같은 종이 다른 종으로 잘못 판정될 수도 있다. 다른 이유로는 분류체계 변경과 이전에 없던 새로운 속과 종의 등장을 들 수 있다. 1980년대 중반 이후 미생물 분류에서 계통발생학적 원리가 강조되면서 유산균을 포함한 여러 그룹들에서 변화가 있었다. 또 새로운 균들이 분리되어 새로운 종과 속들이 구성되었고 기존 균들도 상당수 다른 속이나 종으로 재배치 되었다. 그 결과 2000년대 초반 이전에 동정된 균주들과 변경이 일어난 이후에 보고된 결과들과 차이가 있을 수 있다.

김치에서 분리되어 종균센터에 등록된 유산균들도 2000년대 초반 이전에 기탁된 경우에는 재 동정을 실시할 필요가 있다. 만약 잘못 동정된 것으로 확인될 경우 수정하거나 혹은 이를 공지하여 연구자들이 참고하게 하는 것이 필요하

다. 미생물 특성상 어떤 동정법을 사용하더라도 100% 완벽한 동정이 어려울 수 있기에 여러 다른 원리에 기초한 동정법들을 사용하고 그 결과를 종합적으로 검토하는 소위 “polyphasic classification methods”가 바람직하다. 16S rRNA 유전자 염기서열이나 이것의 제한효소 절단 패턴 외에 가능하다면 세포벽이나 세포막의 화학적 조성, 세포 단백질 profile, 그리고 DNA-DNA hybridization과 같은 방법들의 동시 적용을 통해 동정 결과를 보완하는 것이 바람직하다. 여러 속에서 일부 종들은 16S rRNA 염기서열이 99% 이상 일치하기에 [4] 생화학적 특성들과 16S rRNA 염기서열만으로 종을 결정한다면 동정이 부정확할 위험성이 있다.

김치유산균 연구 활성화를 위해서는 중요한 김치유산균들에 대한 게놈 프로젝트 수행이 필요하다. 게놈(genome)은 잘 알려진 대로 해당 미생물의 모든 특성을 결정하는 유전정보들의 집약체로 흔히 생명의 설계도(blue print)로 비유된다. 구미에서는 이미 유산균 주요 속별로 수십 종의 균주들에 대한 게놈프로젝트 수행이 완료되었거나 완료단계에 있다. 가장 연구가 활발한 *Lactobacillus* 속의 경우 *Lactobacillus acidophilus*와 *Lb. plantarum*을 포함하여 22개 균주의 게놈 프로젝트가 완료되었다(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>). 이들 균들은 주로 유제품 제조나 probiotic으로 활용되는 종류들이다. 치즈 종균으로 이용되는 *Lactococcus lactis*의 경우 5균주의 게놈 프로젝트가 완료되었다. 김치발효 관련 유산균의 경우 2008년 한국생명공학연구원에서 *Leuconostoc citreum* KM20에 대해서 그리고 최근 서울대 미생물연구소에서 *Leuconostoc kimchii* IMSNU11154에 대해 수행한 것이 전부이다. 김치발효 관련 유산균 연구 활성화를 위해서는 *W. koreensis*, *W. cibaria*, *Leu. gasicomitatum*, *Leu. inhae* 등에 대한 게놈 프로젝트가 수행되어야 한다. 이를 통해 얻게될 정보들은 단순히 김치발효에 중요한 유전자들의 확인이나 이들의 확보에 그치지 않는다. 장기적으로 다방면의 연구를 촉진할 것이고 그 결과로 다양한 맛과 기능성을 지닌 김치 제조에 사용될 균주 개발이 촉진될 것이다. 더 나아가 식품용 벡터 개발과 이를 이용한 식용에 안전한 방식으로 유용 유전자들의 발현이 이루어질 경우 이전에는 전혀 예상치 못한 새로운 종류의 김치들도 등장할 것이다. 단 맛을 내는 단백질을 생산하는 유산균이나 경구용 항체를 생산하는 유산균들은 분명 신 개념 건강식품의 등장을 유도할 것이다.

김치발효 관련 유산균 연구 활성화에 필요한 요건들 중 하나는 이러한 김치발효 관련 유산균들만을 체계적으로 관리, 보관하는 기관의 설립 혹은 서비스이다. 김치유산균들의 분리, 동정 및 보관 기능을 수행하면서 연구자들로부터 기탁받은 균주들을 확인하고 제반 특성을 조사하며 확인된 균주를 연구자들에게 제공하는 전문 센터나 기관이 있다면 연구에 큰 도움이 될 것이다. 새로 설립되는 세계김치연구소가 앞으로 이런 기능과 역할을 수행해 줄것을 기대해 본다.

결론적으로 김치 품질에 중요할 것으로 생각되는 *Weissella* 속 유산균들에 대한 연구는 현재 크게 미흡하며 앞으로 많은 연구가 수행되어야 한다. 유전체학, 전사체학, 단백질체학, 및 대사체학의 최신 기술들을 활용한 연구들이 이루어진다면 우수한 김치 종균 확보가 가능할 것이고 이는 맛 좋고 안전성과 기능성도 개선된 다양한 김치 제품들의 생산에 기여할 것이다.

요 약

Weissella 종들은 김치발효중 가장 흔히 검출되는 유산균들이지만 이들에 대한 연구는 매우 부족하다. 새로운 속으로 비교적 최근에 정립된 점이 연구가 미흡한 한 이유이고 생화학적 특성들에 기초한 동정법의 부정확성도 다른 이유가 된다. 현재 14종이 등록되어 있으나 새로운 종들이 계속 보고되고 있다. *Weissella*들의 특성과 김치발효중 역할을 상세히 이해하는 것이 중요하며 특히 맛과 기능성이 우수한 김치 제조를 위해 *Weissella* 균주들의 장점을 충분히 이용하려 할 경우 중요하다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 중견연구자지원사업 (핵심연구 협동, No. 20090085901) 지원에 의해 이루어진 것입니다. 이강욱과 박지영은 교육과학기술부 BK21 지원을 받았습니다.

REFERENCES

- Ahn, D.-K., T.-W. Han, H.-Y. Shin, I.-N. Jin, and S.-Y. Ghim. 2003. Diversity and antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 191-196.
- Bae, J.-W., S.-K. Rhee, J. R. Park, W.-H. Chung, Y.-D. Nam, I. Lee, H. Kim, and Y.-H. Park. 2005. Development and evaluation of genome-probing microarray for monitoring lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8825-8835.
- Björkroth, K. J., R. Geisen, U. Schillinger, N. Weiss, P. De 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.
- Björkroth, K. J., U. Schillinger, R. Geisen, N. Weiss, B. Hoste, W. H. Holzapfel, H. J. Korkeala, and P. Vandamme. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* sp. nov., detected in food and clinical samples. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 141-148.
- Champagne, C. P., T. A. Tompkins, N. D. Buckley, and J. M. Green-Johnson. 2010. Effect of fermentation by pure and

- mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus helveticus* on isoflavone and B-vitamin content of a fermented soy beverage. *Food Microbiol.* **27**: 968-972.
6. Chang, H.-W., K.-H. Kim, Y.-D. Nam, S. W. Roh, M.-S. Kim, C. O. Jeon, H.-M. Oh, and J.-W. Bae. 2008. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **126**: 159-166.
 7. Cheigh, H. S. and K. Y. Park. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspects of kimchi (Korean fermented vegetable products). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **34**: 175-203.
 8. Chi, H., D.-H. Kim, and G.-E. Ji. 2005. Transformation of ginsenosides Rb2 and Rc from *Panax ginseng* by food microorganisms. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 2102-2105.
 9. Chin, H. S., F. Breidt, H. P. Fleming, W.-C. Shin, and S.-S. Yoon. 2006. Identification of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 68-76.
 10. Cho, J.-H., D.-Y. Lee, C.-N. Yang, J.-I. Jeon, J.-H. Kim, and H.-U. Han. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**: 262-267.
 11. Choi, H.-J., C.-I. Cheigh, S.-B. Kim, J.-C. Lee, D.-W. Lee, S.-W. Choi, J.-M. Park, and Y.-R. Pyun. 2002. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 507-511.
 12. Choi, I.-K., S.-H. Jung, B.-J. Kim, S.-Y. Park, J. Kim, and H.-U. Han. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**: 247-253.
 13. Chun, J., G. M. Kim, K. W. Lee, I. D. Choi, G.-H. Kwon, J.-H. Park, S.-J. Jeong, J. S. Kim, and J. H. Kim. 2007. Conversion of isoflavone glucosides to aglycones in soymilk by fermentation with lactic acid bacteria. *J. Food. Sci.* **72**: 39-44.
 14. Chun, J., J. S. Kim and J. H. Kim. 2008. Enrichment of isoflavone aglycones in soymilk by fermentation with single and mixed cultures of *Streptococcus infantarius* 12 and *Weissella* sp. 4. *Food Chem.* **109**: 278-284.
 15. Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos, and S. Wallbanks. 1993. Taxonomic 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**: 595-603.
 16. De Bruyne, K., N. Camu, K. Lefebvre, L. De Vuyst, and P. Vandamme. 2008. *Weissella ghanensis* sp. nov., isolated from a Ghanaian cocoa fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2721-2725.
 17. De Bruyne, K., N. Camu, L. De Vuyst, and P. Vandamme. 2010. *Weissella fabaria* sp. nov., from a Ghanaian cocoa fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 1999-2005.
 18. Donkor, O. N. and N. P. Shah. 2008. Production of beta-glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *J. Food. Sci.* **73**: 15-20.
 19. Ennahar, S. and Y. Cai. 2004. Genetic evidence that *Weissella kimchii* Choi et al. 2002 is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria* Bjorkroth et al. 2002. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 463-465.
 20. Hong, S. W., L. K. You, B. M. Jung, W. S. Kim, and K. S. Chung. 2009. Characterization of α -galactosidase and β -glucosidase by *Weissella cibaria*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 204-212.
 21. Izumi, T., M. K. Piskula, S. Osawa, A. Obata, K. Tobe, M. Saito, S. Kataoka, Y. Kubota, and M. Kikuchi. 2000. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* **130**: 1695-1699.
 22. Kim, B., J. Lee, J. Jang, J. Kim, and H. Han. 2003. *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1123-1126.
 23. Kim, M.-J. and J.-S. Chun. 2005. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **103**: 91-96.
 24. Kim, M.-J., H. N. Seo, T. S. Hwang, S. H. Lee, and D. H. Park. 2008. Characterization of exopolysaccharide (EPS) produced by *Weissella hellenica* SKkimchi3 isolated from kimchi. *The J. Microbiol.* **46**: 535-541.
 25. 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.
 26. Lee, D.-Y., S.-J. Kim, J.-H. Cho, and J.-H. Kim. 2008. Microbial population dynamics and temperature changes during fermentation of kimjang *Kimchi*. *The J. Microbiol.* **46**: 590-593.
 27. Lee, H.-J., Y.-J. Joo, C.-S. Park, J. S. Lee, Y.-H. Park, J.-S. Ahn, and T.-I. Mheen. 1999. Fermentation patterns of green onion kimchi and Chinese cabbage kimchi. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31**: 488-494.
 28. Lee, J.-S., K. C. Lee, J.-S. Ahn, T.-I. Mheen, Y.-R. Pyun, and Y.-H. Park. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1257-1261.
 29. Lee, J.-S., G.-Y. Heo, J. W. Lee, Y.-J. Oh, J. A. Park, Y.-H. Park, Y.-R. Pyun, and J. S. Ahn. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 143-150.
 30. Lee, S. O., C. S. Kim, S. K. Cho, H. J. Choi, G. E. Ji, and D. K. Oh. 2003. Bioconversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid during fermentation and by washed cells of *Lactobacillus reuteri*. *Biotechnol. Lett.* **25**: 935-938.
 31. Liang, Z.-Q., S. Srinivasan, Y.-J. Kim, H.-B. Kim, H.-T. Wang, and D.-C. Yang. 2010. *Lactobacillus kimchicus* sp. nov., a β -glucosidase producing bacterium isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press) doi:10.1099/ijs.0.017418-0.
 32. Magnusson, J., H. Jonsson, J. Schnurer, and S. Roos. 2002. *Weissella soli* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from

- soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 831-834.
33. Mheen, T.-I. and T.-W. Kwon. 1984. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **16**: 443-450.
34. Nam, Y.-D., H.-W. Chang, K.-H. Kim, S.-W. Roh, and J.-W. Bae. 2009. Metatranscriptome analysis of lactic acid bacteria during kimchi fermentation with genome-probing microarrays. *Int. J. Food Microbiol.* **130**: 140-146.
35. Padonou, S. W., U. Schillinger, D. S. Nielsen, C. M. A. P. Franz, M. Hansen, J. D. Hounhouigan, M. C. Nago, and M. Jakobsen. 2010. *Weissella beninensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium from submerged cassava fermentations, and emended description of the genus *Weissella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **60**: 2193-2198.
36. Park, H. J., Y.-H. Park, and Y. B. Kim. 2001. Characterization of growth and ethanol formation of *Weissella paramesenteroides* P₃₀. *Food Sci. Biotechnol.* **10**: 72-75.
37. Park, J. A., G.-Y. Heo, J. S. Lee, Y. J. Oh, B. Y. Kim, T. I. Mheen, C. K. Kim, and J. S. Ahn. 2003. Change of microbial communities in kimchi fermentation at low temperature. *The Kor. J. Microbiol.* **39**: 45-50.
38. Pham, T. T and N. P. Shah. 2008. Effect of lactulose on biotransformation of isoflavone glycosides to aglycones in soymilk by lactobacilli. *J. Food. Sci.* **73**: 158-165.
39. Raimondi, S., L. roncaglia, M. de Lucia, A. Amaretti, A. Leonardi, U. M. Pagnoni, and M. Rossi. 2009. Bioconversion of soy isoflavones daidzin and daidzein by *Bifidobacterium* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 943-950.
40. Shim, S.-M. and J.-H. Lee. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria community in *Kimchi* using terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 247-259.
41. Tanasupawat, S., O. Shida, S. Okada, and K. Komagata. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1479-1485.
42. Tang, A. L., N. P. Shah, G. Wilcox, K. Z. Walker, and L. Stojanovska. 2007. Fermentation of calcium-fortified soymilk with *Lactobacillus*: effects on calcium solubility, isoflavone conversion, and production of organic acids. *J. Food. Sci.* **72**: 431-436.
43. Yu, J.-J., H.-J. Park, S.-G. Kim, and S.-H. Oh. 2009. Isolation, identification, and characterization of *Weissella* strains with high ornithine producing capacity from kimchi. *Kor. J. Microbiol.* **45**: 339-345.

(Received July 9, 2010/Accepted Oct. 6, 2010)