

Weissella 속 유산균의 빠른 동정을 위한 16S rDNA PCR-RFLP 분석법의 적용

이명재 · 조경희 · 이종훈*
경기대학교 식품생물공학과

Application of 16S rDNA PCR-RFLP Analysis for the Rapid Identification of *Weissella* Species. Lee, Myeongjae, Kyeung Hee Cho, and Jong-Hoon Lee*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea – A polymerase chain reaction (PCR)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was applied to detect and identify ten *Weissella* spp. frequently found in kimchi. The previously reported genus-specific primers designed from 16S rDNA sequences of *Weissella* spp. were adopted but PCR was performed at the increased annealing temperature by 4°C. The sizes of amplified PCR products and restricted fragments produced by *AluI*, *MseI*, and *BceAI* endonucleases were well correspond with the expected sizes. *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. confusa*, *W. minor*, *W. viridescens*, *W. cibaria*, and *W. soli* were distinguished by *AluI* and *MseI* and *W. hellenica* and *W. paramesenteroides* were identified by *BceAI*. *W. thailandensis* was distinguished when restriction pattern of other species was compared but identified by the single use of *MspI*.

Key words: 16S rDNA, RCR-RFLP, *Weissella*, kimchi

서 론

한국 고유의 대표적 발효 침채류 김치는 재료에서 유래하는 미생물의 자연발효에 의해 고유한 풍미가 만들어지며, 식이섬유, 비타민, 무기질 등을 공급해주는 우수한 식품이다. 김치의 품질에 영향을 미치는 주요한 요소 중의 하나인 김치발효 관련 미생물에 대한 연구는 발효 관련 미생물의 분리 및 동정을 중심으로 시작되어, 상품김치의 수요 증가에 따라 유통기간과 가식기간의 연장을 목표로 한 김치 산패균의 생육억제에 대한 연구로 진행되었고[1, 23], 상품김치의 품질 균일화를 위해 유제품발효에서와 같이 우수 유산균을 김치발효의 종균(starter)으로 첨가하려는 시도가 진행되었다[5, 9, 14].

1939년 김치발효 관련 미생물에 대한 연구가 처음으로 보고된 이후, 1984년 Mheen과 Kwon의 보고[26]를 시작으로 김치발효에 관여하는 미생물에 대한 연구가 본격적으로 진행되어 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속에 속하는 다양한 유산균들이 김치발효에 관여한다는 사실이 밝혀졌고, 숙성과정에서 발견되는 유산균 중, *Leuconostoc* 속은 발효 초기에 주로 검출되고 적숙기 이후에는 *Lactobacillus* 속이 검출되는 것으로 보고되었다[18, 24, 26, 30]. 특히, 분리된 leuconostocs 중, 많은 수가 *Leuconostoc mesenteroides*로 분류되었고, 발효 후기에

검출되는 *Lactobacillus* 속 중에서 많은 수가 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되어, *Lc. mesenteroides*은 김치에 풍미를 부여하는 유익균으로 *Lb. plantarum*은 산패균으로 인식되었다[18, 26].

2000년 이후에는 계통발생학적(phylogenetic) 분류체계에 의한 미생물의 동정이 일반화 되고, DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis)[20, 27], T-RFLP(terminal restriction fragment length polymorphism) [29]와 같은 분자생물학적 방법에 의한 배양 비의존적 균총분석이 진행되었을 뿐만 아니라, microarray 분석이 김치유산균 연구에 적용되어[2], 형태 및 생리학적 특성에 근거한 고전적 동정법에 의해서 진행된 연구와는 다른 결과들이 도출되어 기존에 보고된 김치발효의 주발효균과 산패균에 대한 인식이 달라지고 있고, 기존에 보고되지 않았던 다양한 유산균이 김치발효에 관여하는 것으로 나타났다[2, 6, 7, 15-17, 19, 20, 27, 29, 33].

2000년 이후의 김치유산균 연구에서 공통적으로 언급되고 있는 주요 내용은 1) 기존의 주발효균과 산패균으로 인식되었던 *Lc. mesenteroides*와 *Lb. plantarum*보다는 *Weissella koreensis* 등의 *Weissella* 속 및 *Lactobacillus sakei*가 발효 온도에 관계 없이 김치발효에 크게 관여하는 우점종이라는 사실이다. 2) 또한 초기 및 중기의 발효를 주도하는 것으로 알려진 *Lc. mesenteroides* 외에도 *Lc. kimchii* 및 *Lc. inhae*와 같은 신규 균주와 *Lc. citreum*, *Lc. carnosum*, *Lc. gasicomitatum*, *Lc. gelidum*, *Lc. lactis*와 같은 다양한 *Leuconostoc* 속 유산균이 김치발효에 관여하며 발효 후반에도 활성을 나타내고 있다는 점, 3) 이미 초기의 김치발효 관련

*Corresponding author

Tel: 82-31-249-9656, Fax: 82-31-253-1165

E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

미생물연구[24, 30]에서도 *Lb. plantarum*이 저온발효에서 검출되지 않는다고 제시된 바 있지만, *Lb. plantarum*의 생장이 온도에 크게 영향을 받아 저온발효 김치에서는 발효 후기의 우점종으로 발전하지 못한다는 점 등을 들 수 있다[19]. 이러한 김치발효 관련 유산균 연구결과의 변화 요인으로는 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA) 염기서열을 이용한 계통발생학적 분류체계의 도입에 따른 유산균 분류체계의 변화[10, 31], 근연 관계에 있는 유산균의 생리 및 영양 요구의 유사성에 의해 발생하는 고전적 동정법 적용 시의 오류를 들 수 있다. 또한 과거의 연구자들의 경우 균총분석을 위하여 20°C 이상의 온도에서 발효를 진행시켰지만, 최근의 연구자들의 실험이 모두 저온발효에서의 균총분석을 진행하고 있어 저온에서 경쟁력이 있는 유산균들이 주로 분리되었기 때문에 분석된다[19]. 특히, 김치유산균 균총 해석에 있어 가장 큰 영향을 준 요인으로는 Collins 등[10]이 과거 *Lactobacillus* 속으로 분류되었던 일부 유산균 및 *Lc. paramesenteroides*를 새로운 *Weissella* 속으로 재정리한 점을 들 수 있다. 분자생물학적 방법론의 도입 전에 분리된 김치발효 관련 유산균 중, 초기 주발효균으로 인식되었던 상당수 *Lc. mesenteroides*의 동정에 오류가 있었을 것으로 추정되고, 발효 후기의 주요균 *Lb. plantarum*을 비롯한 *Lactobacillus* 속 유산균의 동정에도 오류가 있었을 것으로 추정되며, 이들 중 일부는 *Weissella* 속으로 편입된 것으로 추정된다. 새로운 *Weissella* 속의 정립과 함께 현재 김치발효의 주발효균의 하나로 생각되는 *W. koreensis*가 한국 연구자에 의해서 신종으로 등록하였다는 점에서 김치 종주균으로의 자존심을 지켰다 할 수 있다.

김치에서 검출되는 미생물 중에서 *Weissella* 속이 차지하는 비중이 높다는 보고들이 증가함에 따라 김치발효와 관련한 *Weissella* 속의 역할 규명의 필요성이 날로 증가하고 있다. 향후, 김치발효와 관련한 *Weissella* 속에 대한 집중적인 연구에 앞서 분자생물학적 방법에 의한 신속, 정확한 *Weissella* 속의 분리 및 동정법이 확립되어야 한다.

최근 들어 빠르고 정확한 미생물 동정 및 검출을 위하여 특정 유전자를 특이적으로 증폭하는 PCR 검출법이 많이 이용되고 있고, 16S rDNA가 표적유전자로 가장 많이 사용되고 있다. 하지만, 유산균과 같이 16S rDNA 염기서열이 높은 상동성을 가지고 있거나 다수 미생물의 동시 검출을 시도하는 경우에는 16S rDNA가 표적유전자로 적합하지 않다는 결과들이 보고되고 있다[3, 28, 32]. 이러한 문제점의 보완을 위해, PCR에 의한 표적유전자 증폭과 증폭된 유전자의 제한효소 처리에 따른 DNA 단편의 다형성(polymorphism)을 결합한 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)가 다양한 미생물의 확인 및 빠른 동정에 이용되고 있다[13]. 이미 Jang 등[12]은 amplified ribosomal DNA restriction analysis(ARDRA)를 이용한 10종의 *Weissella* 속 유산균의 신속 검출법을 보고한 바 있다. 그러나 검출법이

보고된 후, *W. koreensis* [21]와 *W. soli* [25], *W. ghanensis* [4]가 신종균으로 등록되었고, *W. kimchii* [8]는 *W. cibaria*와 동일한 heterotypic 균주로 판명되어 *W. cibaria*로 통합되었다[11]. 또한 GenBank database에 16S rDNA 염기서열 (AY040669)이 등록된 *W. hanii*는 유전적으로 *W. koreensis*와 동일한 것으로 판명되어 신종균으로 등록되지 못했다. 본 논문을 작성하고 있는 2010년 8월 현재 *Weissella* 속에는 13종이 등록되어 있다.

최근에 본 연구자들[22]은 *W. soli*가 중국산 김치에서 검출되지만, 한국산 김치로부터는 검출되지 않는다는 연구결과를 얻게 되어 *W. soli* 및 *Weissella* 속 균주들의 신속, 정확한 분리 동정법을 이용한 김치 원산지 판별기술 개발을 시도하고 있다. 또한 기존에 보고된 Jang 등[12]의 ARDRA 수행 시, *Weissella* 속 균주의 특이적 증폭에 사용된 PCR primer가 사용하는 *Taq* polymerase에 따라 비특이적인 band가 증폭되는 것을 확인하였기에 새로운 PCR 조건과 제한효소의 사용에 대한 필요성이 대두되었다. 본 연구에서는 김치에서 주로 검출되는 10종의 *Weissella* 속 유산균의 빠른 동정에 16S rDNA PCR-RFLP 분석법을 적용한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

빠른 동정법 개발에 사용한 대상 유산균은 김치에서의 검출이 보고된 *Weissella* 속 10종(Table 1) 및 *Leuconostoc* 속 7종(*Lc. carnosum* KCTC3525^T, *Lc. citreum* KCTC3526^T, *Lc. gelidum* KCTC3527^T, *Lc. kimchii* KCTC2386^T, *Lc. lactis* KCTC3528^T, *Lc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC3530^T, *Lc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC3505^T)과 *Lactobacillus* 6종(*Lb. brevis* ATCC14869^T, *Lb. curvatus* subsp. *curvatus* KCTC3767^T, *Lb. graminis* KCTC3542^T, *Lb. plantarum* KCTC3108^T, *Lb. pentosus* KCCM40997^T, *Lb. sakei* subsp. *sakei* KCTC3603^T)을 선정하였다. 이들 표준(type) 균주들은 Korean Collection for Type Cultures(KCTC), Korean Culture Center for Microorganisms(KCCM), ATCC the global bioresource center로부터 구입하였다. 그러나 *W. koreensis* 표준균주는 특허균주로 등록되어 분양이 불가능한 관계로 본 실험실에서 한국산 김치로부터 직접 분리 동정한 *W. koreensis* KK0101 균주를 사용하였다. 유산균주들은 MRS broth(Difco, USA)를 사용하여 30°C 미호기적 조건에서 배양하였으며, 고체배지의 제조에는 한천을 1.5%(w/v) 첨가하였다.

실험에 사용한 표준균주의 total DNA는 MRS 배지에서 30°C, 24시간 배양한 균체로부터 Genome DNA extraction kit(Axygen, CA, USA)을 사용하여 추출하였다. *Weissella* 속 균주들의 16S rDNA 증폭을 위한 PCR primer는 Jang 등[12]이 구축한 forward primer S-G-Wei-0121-a-S-20(5'-

CGTGGGAAACCTACCTCTTA-3')와 reverse primer S-G-Wei-0823-a-A-18(5'-CCCTCAAACATCTAGCAC-3')를 사용하였고, Solgent(Daejeon, Korea)에서 제작하였다. PCR 반응에는 T3000 thermal cycler(Biometra, Germany)를 사용하였으며, 50 μ L 반응계에는 20 ng template DNA, 0.1 mM dNTP, 1.25 U *Taq* polymerase(RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) 및 각 primer를 1.0 μ M를 첨가하였다. 온도조건은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C 1분간 변성, 65°C 1분 annealing, 72°C 1분간의 중합반응 과정을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 7분간 처리한 후 반응을 중단했다. 반응 후 증폭된 PCR 산물은 1% agarose gel 상에서 전기영동하여 확인하였으며, Gel & PCR purification kit(Solgent)를 이용하여 primer에 의한 증폭으로 예상되는 약 727 bp 크기의 단편을 정제하였다. 정제한 단편은 제한효소 *AluI*, *MseI*, *BceAI*(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 사용하여 절단한 다음, 4% agarose gel(NuSieve 3:1 Agarose, Lonza, UK)을 이용하여 전기영동 하였다. 정제한 증폭단편의 제한효소 처리에 의해 생성되는 DNA 단편의 예측에는 Webcutter 2.0 program(<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>)을 사용하였다.

결 과

Jang 등[12]이 보고한 반응조건 및 *Weissella* 속 특이적 PCR primer를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 비특이적인 DNA 단편이 다수 증폭되었다. Annealing 온도의 수정을 진행한 결과, 4°C 높게 설정한 65°C, 1분의 조건이 본 실험실에서 사용한 효소 및 기계에 적합한 것으로 나타났다. 새로 설정한 PCR 반응조건에서 10종의 *Weissella* 속, 6종의 *Lactobacillus* 속, 7종의 *Leuconostoc* 속 유산균의 total DNA를 template로 genus-specific PCR을 수행한 결과, 약 727 bp 크기의 예상 증폭 단편이 *Weissella* 속 균주에서만 특이적으로 검출되었다(data not shown).

Webcutter 2.0 program을 사용하여 727 bp 증폭단편 내부의 제한효소 절단위치를 예측한 결과(Table 1), Jang 등[12]이 사용한 제한효소 *MnII*, *MseI*, *BceAI* 중 *MnII*의 경우, 너무 많은 절단위치를 가지고 있어 100 bp 이하의 단편이 다수 생성되기 때문에 제한효소 처리 후 나타나는 단편의 정확한 크기 확인에 어려움이 있는 것으로 나타났다. 시판되고 있는 제한효소에 의해 생성되는 단편의 크기를 Webcutter 2.0 program을 이용하여 검토한 결과, *AluI*은 *MnII*과 동일하게 *Weissella* 속을 3그룹으로 구분하지만, 134 bp 이상의 단편을 생성하기 때문에 단편 크기의 구분에 용이한 것으로 예상되었다. 증폭산물을 *AluI*으로 처리한 결과, 10종의 *Weissella* 균주 중, *W. kandleri*, *W. koreensis*의 증폭산물은 절단되지 않아 나머지 균주들과 명확하게 구분되는 단일 band로 확인되었다. *W. confusa*, *W. hellenica*, *W. minor*,

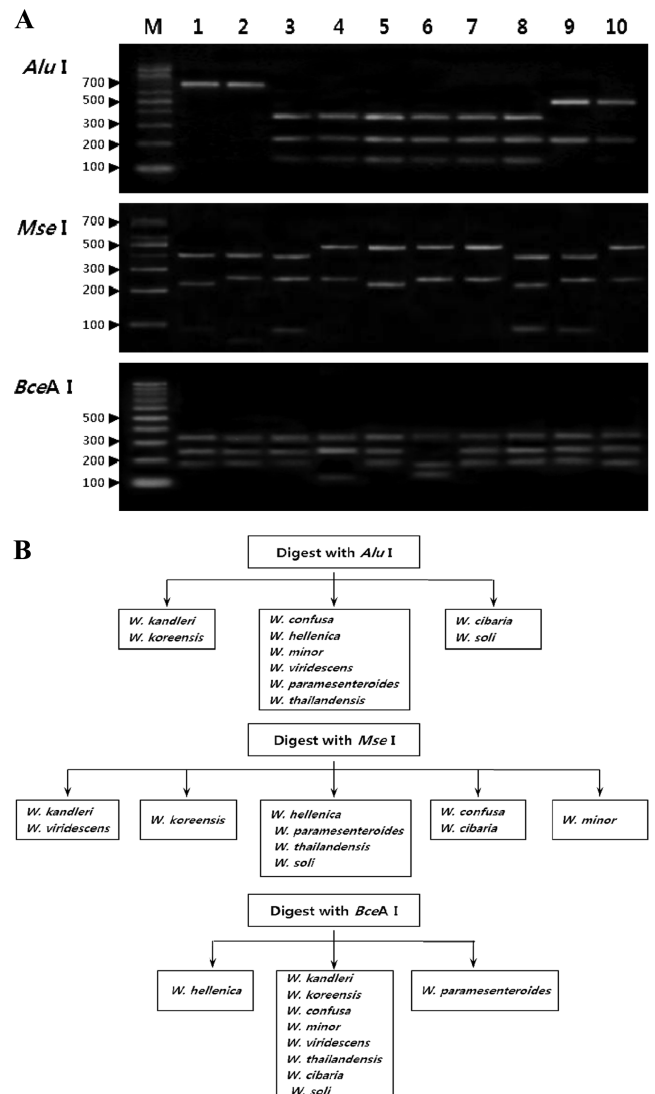


Fig. 1. PCR-RFLP profiles after the digestion of *Weissella*-specific PCR products with *AluI*, *MseI*, and *BceAI* endonucleases (A) and the schematic presentation of restriction patterns (B). Lanes: M, 100-bp DNA ladder (Solgent, Korea); 1, *W. kandleri* KCTC3610^T; 2, *W. koreensis* KK0101; 3, *W. confusa* KCTC3499^T; 4, *W. hellenica* KCTC3668^T; 5, *W. minor* KCTC3604^T; 6, *W. paramesenteroides* KCTC3531^T; 7, *W. thailandensis* KCTC3751^T; 8, *W. viridescens* KCTC3504^T; 9, *W. cibaria* KCTC3817^T; 10, *W. soli* KCTC3789^T.

W. viridescens, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis*는 동일한 band 양상을 나타내었고, *W. cibaria*와 *W. soli*가 동일한 band 양상을 나타내었다(Fig. 1). 제한효소 *MseI*에 의한 절단위치의 예측결과, *Weissella* 속 균주들이 5그룹으로 나누어지는 것으로 예상되었다(Table 1). 증폭산물의 *MseI* 처리 결과, *W. koreensis*와 *W. minor*는 각각의 균주 특이적인 band 양상을 나타내었고, *W. kandleri*와 *W. viridescens*, *W. confusa*와 *W. cibaria*, 그리고 *W. hellenica*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis*, *W. soli*가 각각 동일한

Table 1. List of *Weissella* strains used in this study and the expected sizes of the digested amplicons by *AluI*, *MseI*, and *BceAI* endonucleases.

Species	Strain No.	Accession No.	<i>AluI</i> (bp)		<i>MseI</i> (bp)		<i>BceAI</i> (bp)	
			RP	FS	RP	FS	RP	FS
<i>W. cibaria</i>	KCTC3817 ^T	AJ295989	504	223/504	86/480	86/247/394	216/390	174/216/337
<i>W. confusa</i>	KCTC3499 ^T	AB023241	134/504	134/223/370	86/480	86/247/394	216/390	174/216/337
<i>W. hellenica</i>	KCTC3668 ^T	X95981	134/504	134/223/370	480	247/480	216/339/390	51/123/216/337
<i>W. kandleri</i>	KCTC3610 ^T	X52570	-	727	86/480/506	26/86/221/394	216/390	174/216/337
<i>W. koreensis</i>	KK0101		-	727	65/86/480	21/65/247/394	216/390	174/216/337
<i>W. minor</i>	KCTC3604 ^T	AB022920	134/504	134/223/370	480/506	26/221/480	216/390	174/216/337
<i>W. paramesenteroides</i>	KCTC3531 ^T	AB023238	134/504	134/223/370	480	247/480	150/216/339/390	51/66/123/150/337
<i>W. soli</i>	KCTC3789 ^T	AY028260	504/716	223/504	480	247/480	216/390	174/216/337
<i>W. thailandensis</i>	KCTC3751 ^T	AB023838	134/504	134/223/370	480	247/480	216/390	174/216/337
<i>W. viridescens</i>	KCTC3504 ^T	AB023260	134/504	134/223/370	86/480/506	26/86/221/394	216/390	174/216/337

RP: restriction endonuclease cutting points in the amplicon.

FS: the sizes of the digested amplicons by *AluI*, *MseI*, and *BceAI* endonucleases.

- : no cutting point.

band 양상을 나타내어, 실험결과가 예상과 일치함을 확인하였다(Fig. 1). 제한효소 *BceAI*으로 절단하면 *W. hellenica*와 *W. paramesenteroides*가 특이적인 band 양상을 나타내어 동일한 band 양상을 나타낸 나머지 8종의 균주들과 쉽게 구분되었다(Fig. 1). 증폭된 727 bp 단편의 제한효소 처리 후, 수행한 전기영동 결과(Fig. 1)는 Webcutter 2.0 program을 이용하여 추측한 결과(Table 1)과 완전히 일치하였으며, Fig. 1-B에는 제한효소 처리에 의해 나타나는 band 양상을 정리하여 도식화 하였다.

본 실험에서 사용한 제한효소 3종 중, 하나의 사용으로는 *Weissella* 속 균주의 제한적인 구분이 가능했지만, 두개 또는 세개의 제한효소를 이용하여 band 양상을 비교하면 모든 균주의 확인이 가능한 것으로 나타났다. *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. confusa*, *W. minor*, *W. viridescens*, *W. cibaria*, *W. soli*는 *AluI*과 *MseI*의 사용으로 동정이 가능한 것으로 확

인되었다. *W. hellenica*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis*의 경우, 3균주 간의 16S rDNA 유사성이 97% 이상으로 매우 높아 *AluI* 및 *MseI*에 의해서는 구분되지 않는 것으로 나타났다. 그러나 *W. hellenica*, *W. paramesenteroides*는 *BceAI*에 의해 균주 특이적인 band 양상이 나타나기 때문에 두 균주의 구분이 가능하였다. *W. thailandensis*의 경우, 본 실험에서 사용한 제한효소 *AluI*, *MseI*, *BceAI* 모두에 의해 독립적인 band 양상은 나타나지 않았지만, 나머지 9종 균주들과의 절단 양상의 비교를 통해 구분이 가능하였다. 그러나, 제한효소 *MspI*을 사용하면 *W. thailandensis*는 727 bp 증폭산물의 442/606 bp에 절단위치를 가지고 있어 121, 164, 442 bp 크기의 나머지 균주들과 구분되는 band 양상을 나타내어 신속한 구분이 가능하다(data not shown).

본 실험에서 적용한 PCR-RFLP 결과를 *Weissella* 속 균주의 동정에 적용함에 있어 DNA fingerprinting 결과의 비교

Table 2. The restriction pattern analysis derived from the digestion with *AluI*, *MseI*, and *BceAI* endonucleases.

No.	Species	<i>AluI</i> (bp)			<i>MseI</i> (bp)				<i>BceAI</i> (bp)			
		727	134/223/370	223/504	26/86/221/394	21/65/247/394	86/247/394	247/480	26/221/480	216/174/337	51/123/216/337	51/66/123/150/337
1	<i>W. kandleri</i>	O			O					O		
2	<i>W. koreensis</i>	O				O				O		
3	<i>W. confusa</i>		O				O			O		
4	<i>W. hellenica</i>		O					O			O	
5	<i>W. minor</i>		O						O	O		
6	<i>W. paramesenteroides</i>		O					O				O
7	<i>W. thailandensis</i>		O					O		O		
8	<i>W. viridescens</i>		O		O					O		
9	<i>W. cibaria</i>			O			O			O		
10	<i>W. soli</i>			O				O		O		

The sizes of the digested amplicons by *AluI*, *MseI*, and *BceAI* endonucleases are summarized in table.

없이 빠른 확인을 위하여 3종의 제한효소 처리에 의하여 증폭산물로부터 얻어지는 DNA 단편의 크기를 균주 별로 정리하였다(Table 2). *W. soli*의 예를 들어 Table 2의 사용을 설명하면, *AluI* 처리에 의해서는 증폭산물로부터 223 및 504 bp의 단편이 생성되기 때문에 *W. cibaria*와 구분되지 않는다. 그러나 증폭산물의 처리에 *MseI*을 함께 사용하면, *W. cibaria*는 86, 247, 394 bp의 단편을 생성하고, *W. soli*는 247, 480 bp의 단편을 생성하여 2종류 효소의 사용만으로도 빠른 동정이 가능하다. *W. confusa*의 경우에는 *AluI* 처리에 의해서 5종의 다른 균주들과 동일한 134, 223, 370 bp의 단편을 생성하지만, *MseI* 처리에 의해서 5종의 균주들과 다른 86, 247, 394 bp의 단편을 생성하기 때문에 전기영동 후에 나타나는 단편들의 크기 확인을 통하여 빠른 동정이 가능하다. 본 실험의 결과로부터 정리한 Table 2는 *Weissella* 속 균주의 빠른 동정에 적용 가능할 것으로 기대한다.

요 약

16S rDNA 특이적 PCR과 증폭산물의 제한효소 처리 후, 나타나는 단편의 크기를 분석하는 PCR-RFLP 분석법을 김치에서 빈번하게 검출되는 *Weissella* 속 균주 10종의 신속하고 정확한 동정에 적용하였다. *Weissella* 속 균주 16S rDNA의 특이적 증폭에는 기존에 보고된 PCR primer를 사용하였지만, annealing 온도는 기존의 조건보다 4°C 높게 설정한 65°C에서 PCR을 수행하였다. 증폭산물은 예상크기인 727 bp와 일치하였으며, 제한효소 *AluI*, *MseI*, *BceAI*의 처리를 통하여 나타난 단편의 크기는 제한효소 절단위치 분석으로부터 추정된 단편의 크기와 일치하였다. *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. confusa*, *W. minor*, *W. viridescens*, *W. cibaria*, *W. soli*는 제한효소 *AluI*과 *MseI*의 사용으로 구분이 가능하였으며, *W. hellenica*, *W. paramesenteroides*의 경우, *BceAI*을 사용하면 독립적인 구분이 가능하였다. *W. thailandensis*의 경우, 본 실험에서 사용한 제한효소 *AluI*, *MseI*, *BceAI*에 의해 독립적인 band 양상은 나타나지 않았지만 나머지 9종과의 절단 양상 비교를 통해 구분이 되었으며, 제한효소 *MspI*을 사용하면 신속하게 동정할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 농림기술개발사업(과제번호: 109175-2)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- An, D.-J., K. Lew, and K.-P. Lee. 1999. Effects of adipic acid and storage temperature on extending the shelf life of kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **8**: 78-82.
- 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 microarrays for monitoring lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8825-8835.
- Berthier F. and S. D. Ehrlich. 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16/23 rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 97-106.
- Bruyne, K. D., N. Camu, K. Lefebvre, L. D. Vuyst, and P. Vandamme. 2008. *Weissella ghanensis* sp. nov., isolated from a Ghanaian cocoa fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 2721-2725.
- Chae, M.-H., E.-J. Park, T.-K. Oh, and D.-Y. Jhon. 2006. Preparation of kimchi containing *Bifidobacterium longum* BO-11. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 232-236.
- Chin, H. S., F. Breidt, H. P. Fleming, W.-C. Shin, and S.-S. Yoon. 2006. Identifications of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 68-76.
- Cho, J., D. Lee, C. Yang, J. Jeon, J. Kim, and H. Han. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**: 262-267.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Jang, J., B. Kim, J. Lee, J. Kim, G. Jeong, and H. Han. 2002. Identification of *Weissella* species by the genus-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* **212**: 29-34.
- Jang, J., B. Kim, J. Lee, and H. Han. 2003. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *J. Microbiol. Methods* **55**: 295-302.
- Jin, H. S., J. B. Kim, Y. J. Yun, and K. J. Lee. 2008. Selection of kimchi starters based on the microbial composition of kimchi and their effects. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 671-675.
- Kim, B.-J., H.-J. Lee, S.-Y. Park, J. Kim, and H.-U. Han. 2000. Identification and characterization of *Leuconostoc*

- gelidum*, isolated from kimchi, a fermented cabbage product. *J. Microbiol.* **38**: 132-136.
16. Kim, M. and J. 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.
 17. Kim, T.-W., J.-Y. Lee, S.-H. Jung, Y.-M. Kim, J.-S. Jo, D.-K. Chung, H.-J. Lee, and H.-Y. Kim. 2002. Identification and distribution of predominant lactic acid bacteria in kimchi, a Korean traditional fermented food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 635-642.
 18. Lee, C.-W., C.-Y. Ko, and D.-M. Ha. 1992. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during Kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
 19. Lee, J.-H. 2009. Current studies on the community of lactic acid bacteria in kimchi, a traditional Korean fermented food. *Milk Sci.* **58**: 153-159.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Lee, M., K. H. Cho, E. S. Han, and J.-H. Lee. 2010. Bacterial diversity in the initial fermentation stage of Korean and Chinese kimchi. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **38**: 207-215.
 23. Lee, S.-H., N.-Y. Park, and W.-J. Choi. 1999. Changes of the lactic acid bacteria and selective inhibitory substances against homo and hetero lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 410-414.
 24. Lim C.-R., H.-K. Park, and H.-U. Han. 1989. Reevaluation of isolation and identification of Gram-positive bacteria in kimchi. *Korean J. Microbiol.* **27**: 404-414.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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. *Korean J. Microbiol.* **39**: 45-50.
 28. Shim, S. and J.-H. Lee. 2008. PCR-based detection of lactic acid bacteria in Korean fermented vegetables with *recA* gene targeted species-specific primers. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 96-100.
 29. Shim, S. and J.-H. Lee. 2008. Evaluation of Lactic acid bacterial community in kimchi using terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 247-259.
 30. So, M.-H. and Y.-B. Kim. 1995. Identification of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **27**: 495-505.
 31. Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 1-29.
 32. Torriani, S., G. E. Felis, and F. Dellaglio. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3450-3454.
 33. Um, S., W.-S. Shin, and J.-H. Lee. 2006. Real-time PCR monitoring of *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus plantarum*, and *Lactobacillus paraplantarum* during kimchi fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* **15**: 595-598.

(Received Oct. 9, 2010/Accepted Nov. 26, 2010)