

발간등록번호

11-1541000-000869-01

일반과제

과제번호: 109175-2

미생물 군집 분석을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발

Development of Chinese *Kimchi* Discrimination Techniques
Using Microbial Community Analysis

연구기관

경기대학교

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “미생물 균집 분석을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발” 과제 (세부과제 “미생물 균집 분석을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발”, “김치시료 제조 공급 및 개발기술의 원산지 판별력 평가”)의 보고서로 제출합니다.

2011 년 9 월 2 일

주관연구기관명 : 경기대학교

주관연구책임자 : 이 종 훈

세부연구책임자 : 이 종 훈

협동연구기관명 : 농협식품안전연구원

협동연구책임자 : 한 응 수

요 약 문

I. 제 목

미생물 균집 분석을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

계속적으로 증가하고 있는 중국산 김치의 국내산 김치로의 둔갑 판매로 발생하는 생산자와 소비자의 피해의 방지, 김치에 대한 소비자의 신뢰회복 그리고, 한국산 김치의 국가 경쟁력 강화를 위해 한국산 김치와 중국산 김치를 판별할 수 있는 신속, 정확한 과학적 김치 원산지판별기술을 개발하여 김치의 안전한 공급 및 건전한 유통에 기여하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

우리나라는 경제 성장에 따른 주거환경의 변화, 가공식품산업의 발달, 여성의 사회참여 증가 및 김치냉장고 보급 확대 등의 사회적 변화에 의해 상품김치의 수요는 지속적인 증가 추세에 있다. 최근 수입개방 확대와 외식산업의 발달로 중국산 김치의 수입량이 급증하고 있으며, 수출량은 한계를 나타내고 있다. 중국산 김치의 수입은 2004년도에 물량면에서 수출을 넘어섰고, 2006년에는 금액면으로도 수출액을 초과하여 물량과 금액면에서 모두 김치의 수입이 수출을 초과하였다. 저가의 중국산 김치의 수입이 급증함에 따라 국내 김치산업은 물론 김치의 원료 및 부재료 농산물의 생산, 공급 및 가격에도 큰 영향을 미치고 있다. 특히 수입김치의 국내 유통 과정에서 국내산 둔갑으로 인한 유통질서 혼란과 안전성 부분에서 큰 문제를 야기하고 있다.

이러한 문제점의 해결을 위해 정부는 2008년 12월 28일부터 김치의 원산지표시를 소규모 음식점에까지 확대 시행하고 있지만, 중국산 김치와 한국산 김치를 과학적으로 판별할 수 있는 기술이 없어 충분한 효과를 거두지 못하고 있다.

수입김치의 지속적인 증가 및 저질 중국산 김치의 국내산 김치로의 둔갑 판매로 인해 발

생하는 생산자와 소비자의 피해의 방지, 김치에 대한 소비자의 신뢰회복 그리고, 한국산 김치의 국가 경쟁력 강화를 위해서는 신속, 정확한 원산지판별기술이 시급히 개발되어야 한다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발 내용

본 연구에서는 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 bacteria의 차이를 이용한 김치 원산지 판별기술의 개발을 위하여 발효 초기의 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 bacteria의 다양성을 검토하여 김치 원산지판별에 사용될 수 있는 지표 bacteria를 도출한다. 지표 bacteria가 결정되면 특이적 PCR을 이용한 지표 bacteria 검출법을 개발하고, PCR을 이용한 지표 bacteria 검출법의 유효성을 검증은 통하여 중국산 김치 판별법의 적용 가능성을 평가한다. 또한 본 연구에서는 김치 원산지판별기술 개발의 한 방법으로 미생물 군집의 다양성 및 역동성의 모니터링에 빠르게 적용되고 있는 T-RFLP 분석을 적용하여 그 가능성을 평가한다.

2. 연구개발 범위

가. 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 분석

- (1) 한국산 및 중국산 김치시료 수집
- (2) 한국산 및 중국산 김치로부터 분리된 bacteria의 다양성 분석
- (3) 중국산 김치 판별을 위한 지표 bacteria 도출

나. 특이적 지표 미생물 검출을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발

- (1) 16S rDNA PCR-RFLP 분석법을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발
- (2) *Weissella soli* 특이적 PCR 검출을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발
- (3) *Serratia proteamaculans* 특이적 PCR 검출을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발
- (4) T-RFLP 분석법을 적용한 김치 원산지판별법의 개발 및 평가

다. 중국산 김치 판별기술의 유효성 검증

IV. 연구개발 결과

1. 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 분석

미생물 군집의 차이를 이용한 한국산 및 중국산 김치의 판별 가능성을 평가하기 위해 pH 5 이상의 발효 초기 김치에 존재하는 bacteria의 다양성을 검토하였다. marine medium, nutrient medium, succinate minimal medium (SMM), leuconostocs selective medium (LUSM)의 한천배지를 이용하여 한국산 26종, 중국산 22종의 김치시료로부터 각각 45 속의 1017 균주, 54 속의 842 균주가 분리·동정되었다. 한국산 김치에서는 *Bacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* 속 순으로, 중국산 김치에서는 *Bacillus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* 속의 순으로 우점하는 것으로 나타났다. 유산균의 경우, LUSM의 이용으로 한국산, 중국산 모두에서 *Weissella* 속이 편중되어 검출되었지만, 한국산은 *Leuconostoc* 속이, 중국산은 *Lactobacillus* 속이 *Weissella* 속 다음으로 우점하는 것으로 나타났다. *Weissella confusa*는 한국산 김치에서 특이적으로 검출되었고, *W. soli*와 *Serratia proteamaculans*는 중국산 김치에서 특이적으로 검출되어 향후 김치의 원산지 판별을 위한 지표미생물로 사용될 가능성을 가지고 있다.

2. 특이적 지표 미생물 검출을 이용한 중국산 김치 판별기술 개발

가. *Weissella soli* 및 *Weissella* 속 유산균의 빠른 검출 및 동정을 위한 16S rDNA PCR-RFLP 분석법 개발

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 증폭으로 생성된 727 bp의 단편을 제한효소 *AluI*, *MseI*, *BceAI*의 처리를 통하여 10종의 *Weissella* 속 균주 구분에 성공하였다. *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.

나. *RecN* 유전자 특이적 PCR을 이용한 *Weissella* 속 유산균 검출법 개발 및 중국산 김치 판별

Weissella 속 유산균 검출의 차이를 이용한 한국산 및 중국산 김치 판별의 가능성 검토를 위하여 *Weissella* 속 9종 균주의 PCR 검출법을 개발하였다. 종(species) 수준에서의 *Weissella* 속 균주의 특이적 PCR 검출을 위한 primer는 *recN* 유전자의 염기서열을 이용하여 선정하였으며, 김치로부터 *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. koreensis*, *W. soli*를 모두 검출하기 위해서는 20 ng template DNA가 필요한 것으로 나타났다. 한국산 김치시료로부터는 *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. koreensis*가 높은 빈도로 검출되었지만, *W. soli*는 검출되지 않았다. 한편 중국산 김치시료로부터는 이들 4종의 *Weissella* 속 균주들이 모두 검출되었다. 따라서 PCR을 이용한 *W. soli* 특이적 검출은 중국산 김치의 판별법으로 이용될 높은 가능성을 가지고 있는 것으로 평가된다.

다. *GyrB* 유전자 특이적 PCR을 이용한 *Serratia proteamaculans* 검출법 개발 및 중국산 김치 판별

발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가로부터 *Weissella soli*와 함께 *Serratia proteamaculans*가 중국산 김치에서 검출됨에 따라 *S. proteamaculans* 특이적 PCR 검출법을 개발하여 김치 원산지판별기술로서의 적용 가능성을 평가하였다. *S. proteamaculans*의 특이적 검출을 위한 PCR primer는 *gyrB* 유전자를 대상으로 선정하였고, 김치에 존재하는 *S. proteamaculans*의 특이적 검출을 위해서는 30 ng의 template DNA가 필요한 것으로 나타났다. 기존 연구에서 *Serratia* 속 bacteria가 검출된 중국산 김치 12종과 한국산 4종을 대상으로 *S. proteamaculans* 특이적 PCR 검출을 수행한 결과, 기존의 결과와 완벽히 일치하지 않았고 한국산 김치 2종에서도 *S. proteamaculans*가 검출되는 것으로 나타났다. 본 연구에서 개발된 *S. proteamaculans*의 특이적 검출법을 중국산 김치 판별에 적용한 결과, 적용되기 힘든 것으로 나타났다.

라. T-RFLP 분석을 이용한 한국산 및 중국산 김치 원산지판별 가능성 평가

미생물 구조 및 집단 구성원의 변화를 배양에 의존하지 않고, 빠르게 평가할 수 있는 방법의 하나인 terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 분석을 각각 7종의 한국산 및 중국산 김치에 적용하여 중국산 김치 판별법으로써의 적용 가능성을 평가하였다. 16S ribosomal RNA 유전자 증폭에 사용한 2종의 PCR primer pair와 4종의 제한효소를 이용하여 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 미생물 군집의 분석에 T-RFLP 분석을 적용한 결과, 유의적인 차이를 발견하지 못하였고, 종(species) 수준에서의 미생물 군집 분석에는 적합

하지 않은 것으로 나타났다.

3. 중국산 김치 판별기술의 유효성 검증

본 연구자들이 수행한 연구 결과에서 *recN* 유전자 특이적 PCR을 이용한 *W. soli*의 검출이 중국산 김치의 판별에 가장 높은 가능성을 나타내었기 때문에 *W. soli*의 검출을 시판 김치에 적용하여 중국산 김치의 판별에 대한 유효성을 검토해 보았다. 총 36개의 한국산 김치로부터 *W. soli*를 검출한 결과, 약 17% 수준인 6개의 시료로부터 검출되었고, *W. soli*의 검출은 제조사와 무관한 것으로 나타났다. 한편, 중국산 김치로 부터는 대부분의 시료로부터 *W. soli*가 검출되는 결과를 얻었고, 검출빈도는 86% 수준으로 나타났다. *W. soli*가 모든 중국산 김치 시료로부터 검출되지 않고, 한국산 김치에서도 17% 수준에서 검출되기 때문에 실용화는 현실점에서 불가능한 것으로 평가되지만, 미생물 군집의 차이를 이용한 새로운 과학적 검증법이 제시되어 그 가능성이 검토되었다는 점에서 의의를 가지고 있다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 분석을 통하여 지금까지 김치발효를 담당하는 것으로 알려진 유산균 외에도 다양한 bacteria가 발효 초기에 존재한다는 과학적 근거를 확보했다. 또한 위해가 발생할 수 있는 수준은 아니지만, 위해미생물의 존재가 확인되어 김치의 위생적 관리의 필요성이 제시되었으며, 한국산보다 중국산 김치로부터 위해미생물의 검출빈도가 높게 나타났기 때문에 수입김치의 위생적 관리체계가 필요함이 제시되었다.

한국산 및 중국산 김치의 미생물군집 분석 결과, *W. soli*와 *S. proteamaculans*가 중국산 김치 판별을 위한 지표미생물로 선정되었다. 다양한 김치를 이용하여 원산지판별을 검증한 결과 *W. soli*의 검출이 중국산 김치의 판별에 유리한 것으로 나타났지만, 현재까지 확인된 정확도는 86% 수준에 머물러 있어 중국산 김치 판별법으로 활용되기 위해서는 아직 해결해야 할 문제점이 남아 있다. 그러나 미생물 군집의 차이를 이용한 새로운 과학적 검증법이 제시되어 그 가능성이 검토되었고, 어느 정도의 효과가 나타났다는 점에서 김치 원산지표시와 같은 사회적 검증법과 동시에 적용한다면 수입김치의 건전한 유통에 기여할 수 있을 것으로 생각한다.

SUMMARY

I. Title

Development of Chinese *Kimchi* Discrimination Techniques Using Microbial Community Analysis

II. Goal and Importance of the Research

1. Goal of the Research

The increase of *kimchi* import from China has brought about social and economical problems in the *kimchi* market of Korea. This research was carried out to contribute to the sound and safe circulation of *kimchi* in the domestic market of Korea by the development of scientific Chinese *kimchi* discrimination techniques.

2. Importance of the Research

Social changes of Korea originated from economic growth accelerated the growth of commercial *kimchi* market in Korea. With the increase of commercial *kimchi* market, the import of *kimchi* made in China has been increased and brought about social and economical problems such as distribution order, safety, domestic *kimchi* share, and etc.

In order to solve these problems, Korean government has put into force the labeling of *kimchi* origin since 2008, but the achieved effects are not enough to solve the problems owing to the lack of a scientific verification method.

The scientific *kimchi* origin discrimination method has to be developed urgently to solve the problems originated from the import of *kimchi* from China.

III. Research Contents and Scope

1. Research Contents

For future use in the discrimination of Korean and Chinese *kimchi*, the bacterial communities in Korean and Chinese *kimchi* samples were compared. Based on the bacterial difference according to *kimchi* origin, the target bacteria to be used in the discrimination of Korean and Chinese *kimchi* were determined. Rapid and specific target bacteria detection methods were developed to apply for the confirmation of *kimchi* origin and the possibility of application was evaluated by the field test for commercial *kimchi*.

2. Research Scope

(1) Analysis of bacterial diversity in Korean and Chinese *kimchi*

- Collection of *kimchi* samples manufactured in Korea and China
- Analysis of bacterial diversity in Korean and Chinese *kimchi*
- Determination of the target bacteria based on the bacterial differences in Korean and Chinese *kimchi*

(2) Development of Chinese *kimchi* discriminating methods using target bacteria-specific detection

- Application of 16S rDNA PCR-RFLP analysis for the rapid detection of *Weissella* species
- Development of PCR-based *Weissella soli* detection method with *recN* gene targeted species-specific primers
- Development of PCR-based *Serratia proteamaculans* detection method with *gyrB* gene targeted species-specific primers
- Application and evaluation of T-RFLP analysis as a tool for the discrimination of Korean and Chinese *kimchi*

(3) Evaluation of the developed of Chinese *kimchi* discrimination techniques

IV. Research Results

1. Analysis of bacterial diversity in Korean and Chinese *kimchi*

The purpose of this research is to draw the bacterial community difference between Korean and Chinese *kimchi* for future use in the confirmation of *kimchi* origin. Initial fermentation stage *kimchi* samples (above pH 5) were used for the analysis of bacterial diversity. From 26 Korean *kimchi* samples, 1,017 strains in the 45 genera and from 22 Chinese *kimchi* samples, 842 strains in the 54 genera were isolated with use of marine medium, nutrient medium, succinate minimal medium (SMM), leuconostocs selective medium (LUSM) agars. In the order of isolated numbers, *Bacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, and *Lactobacillus* genera and *Bacillus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, and *Enterobacter* genera were predominated in Korean and Chinese *kimchi*, respectively. Among the isolated lactic acid bacteria, *Weissella* spp. were isolated most dominantly owing to the biased growth of *Weissella* spp. on LUSM agar. Species in the genera *Leuconostoc* and *Lactobacillus* were the next frequently isolated LAB from Korean and Chinese *kimchi*, respectively. *Weissella confusa* was isolated only from Korean *kimchi* and *W. soli* and *Serratia proteamaculans* were isolated only from Chinese *kimchi*. They have a possibility to be used as target bacteria to differentiate Korean *kimchi* from Chinese *kimchi*.

2. Development of Chinese *kimchi* discriminating methods using target bacteria-specific detection

(1) Application of 16S rDNA PCR-RFLP analysis for the rapid detection of *Weissella* species

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*.

(2) Development of PCR-based *Weissella soli* detection method with *recN* gene targeted species-specific primers

PCR-based *Weissella* species-specific detection method was developed to apply for the discrimination of Korean and Chinese *kimchi* by detecting a *Weissella* species only found in Korean or Chinese *kimchi*. PCR primers were designed from the species-specific sequence in the *recN* gene of each species. The primers allowed the species-specific detection and identification of nine species in the genera *Weissella*, and were successfully applied to the detection of *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. koreensis*, and *W. soli* in *kimchi* with 20 ng template DNA. *W. cibaria*, *W. confusa*, and *W. koreensis* were detected from the Korean *kimchi* samples tested but *W. soli* was not detected. However, the four species were detected from Chinese *kimchi* samples. PCR-based *W. soli*-specific detection has the potential of scientific verification method will be evaluated as a tool for Chinese *kimchi* discrimination.

(3) Development of PCR-based *Serratia proteamaculans* detection method with *gyrB* gene targeted species-specific primers

PCR-based *Serratia proteamaculans*-specific detection method was developed to apply for the discrimination of Korean and Chinese *kimchi* by detecting a species *S. proteamaculans* only found in Chinese *kimchi*. PCR primers were designed from the species-specific sequence in the *gyrB* gene of the species. The primers allowed the species-specific detection and identification and were successfully applied to the detection of *S. proteamaculans* in *kimchi* with 30 ng template DNA. In the application of PCR-based *S. proteamaculans*-specific detection of Korean *kimchi* samples, successful detection was performed at 50% level. PCR-based *S. proteamaculans*-specific detection could not be perfectly applied as the Chinese *kimchi* discriminating method but has significance as an approach to evaluate the potential of scientific verification method based on the difference of microbial community.

(4) Application and evaluation of T-RFLP analysis as a tool for the discrimination of Korean and Chinese *kimchi*

Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis, one of rapid culture-independent microbial community analysis methods, was applied to prove the possibility in the discrimination of Korean and Chinese *kimchi*. Two kinds of primer pairs for the amplification of 16S rRNA gene and 4 kinds of restriction enzymes for the production of T-RFs were used for

the analysis of bacterial complexity in Korean and Chinese *kimchi*. Distinguishable T-RFLP profiles were not produced to differentiate Korean and Chinese *kimchi*. T-RFLP analysis was not suitable for the bacterial community analysis in the species level.

3. Evaluation of the developed Chinese *kimchi* discrimination techniques

PCR-based *Weissella soli*-specific detection was proved to have the potential to be used as a tool for the discrimination of Korean and Chinese *kimchi*. The method was applied for the verification of commercial Korean and Chinese *kimchi*. *W. soli* was detected from six samples among 36 Korean *kimchi* samples. In the application to Chinese *kimchi*, *W. soli* was detected at the 86% of 36 samples. The developed technique was not a perfect success in the discrimination of Korean and Chinese *kimchi*. However, *W. soli*-specific detection has a meaning in the aspect that a potential of scientific verification method was evaluated as a tool for Chinese *kimchi* discrimination.

V. Research Achievements and their Applications

Through the research on the bacterial communities in *kimchi* made in Korea and China, we came to know the complexity and diversity of bacteria in *kimchi* that was not reported before. Additionally, harmful microbes including food pathogens were detected from *kimchi* at the very low level and the detection was more frequent in Chinese *kimchi* than in Korean *kimchi*. These insinuated the necessity of quality control for the imported *kimchi* in the safety aspects.

From the bacterial community differences between Korean and Chinese *kimchi*, *W. soli* and *S. proteamaculans* were determined as the target bacteria for the discrimination of Korean and Chinese *kimchi*. Rapid and specific target bacteria detection methods were developed and applied for the confirmation of *kimchi* origin and the possibility of application was evaluated by the field test for commercial *kimchi*. PCR-based specific detection of *W. soli* was the most reliable method for the discrimination of Chinese *kimchi* among the techniques developed in this research. However, discrimination of Chinese *kimchi* by *W. soli*-specific detection was successful at 86% level. Even this technique is not perfectly applied to Chinese *kimchi* discrimination, this is the first scientific approach to applied *kimchi* origin verification. If this scientific technique would be used together with social verification method such as origin labeling will be successful for the verification of *kimchi* origin.

CONTENTS

Chapter 1	Introduction	14
Chapter 2	The Present State of Technical Development	17
Chapter 3	Contents and Results of Research	21
Section 1	Analysis of bacterial diversity in Korean and Chinese <i>kimchi</i>	21
Section 2	Application of 16S rDNA PCR-RFLP analysis for the rapid detection of <i>Weissella</i> species	32
Section 3	Development of PCR-based <i>Weissella soli</i> detection method with <i>recN</i> gene targeted species-specific primers	39
Section 4	Development of PCR-based <i>Serratia proteamaculans</i> detection method with <i>gyrB</i> gene targeted species-specific primers	49
Section 5	Application and evaluation of T-RFLP analysis as a tool for the discrimination of Korean and Chinese <i>kimchi</i>	54
Section 6	Evaluation of the developed Chinese <i>kimchi</i> discrimination techniques	70
Chapter 4	Achievements and Contributions of Research	73
Chapter 5	Application Plans for the Results	76
Chapter 6	References	77

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 -----	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황 -----	17
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 -----	21
제1절	발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 분석 -----	21
제2절	<i>Weissella soli</i> 및 <i>Weissella</i> 속 유산균의 빠른 검출 및 동정을 위한 16S rDNA PCR-RFLP 분석법 개발 -----	32
제3절	<i>RecN</i> 유전자 특이적 PCR을 이용한 <i>Weissella</i> 속 유산균 검출법 개발 및 중국산 김치 판별 -----	39
제4절	<i>GyrB</i> 유전자 특이적 PCR을 이용한 <i>Serratia proteamaculans</i> 검출법 개발 및 중국산 김치 판별 -----	49
제5절	T-RFLP 분석을 이용한 한국산 및 중국산 김치 원산지판별 가능성 평가 -	54
제6절	중국산 김치 판별기술의 유효성 검증 -----	70
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	73
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 -----	76
제 6 장	참고문헌 -----	77

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

계속적으로 증가하고 있는 중국산 김치의 국내산 김치로의 둔갑 판매로 인해 발생하는 생산자와 소비자의 피해의 방지, 김치에 대한 소비자의 신뢰회복 그리고, 한국산 김치의 국가 경쟁력 강화를 위해 한국산 김치와 중국산 김치를 판별할 수 있는 신속, 정확한 과학적 김치 원산지판별기술의 개발하여 김치의 안전한 공급 및 건전한 유통에 기여하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

김치는 각종 채소를 소금에 절여 젓갈 및 고추를 비롯한 다양한 부재료를 혼합하여 발효, 숙성시킴으로써 독특한 풍미와 물성이 만들어지는 우리나라 고유의 전통 발효식품이다. 1988년 서울올림픽에서 소개된 이후, 지속적인 올림픽 및 2002년 한일월드컵축구에서의 홍보, 그리고 2001년 7월 국제식품규격위원회에서 한국의 배추김치가 Codex 규격으로 채택됨에 따라 세계에 알려지기 시작했다. 뿐만 아니라 2006년 올리브유, 대두, 요구르트, 렌즈콩과 함께 미국의 Health magazine (<http://www.health.com/>)에서 세계적 건강식품의 하나로 거론됨에 따라 김치에 대한 세계적 관심이 증가하고 있다[Lee 2009].

우리나라는 경제 성장에 따른 주거환경의 변화, 가공식품산업의 발달, 여성의 사회참여 증가 및 김치냉장고 보급 확대 등의 사회적 변화에 의해 상품김치의 수요는 지속적인 증가 추세에 있다[Jeon 2009]. 한국 농촌경제연구원에서 발행한 농협 김치사업 활성화를 위한 컨설팅 결과 보고서에 따르면 2008년 국내 김치의 수요는 144만 톤으로 추정되며, 이중 상품김치의 공급량은 국내산 45만 톤(포장김치 41만 톤, 즉석김치 4만 톤), 수입김치 22만 톤으로 총 67만 톤에 달한다. 수출을 제외한 국내 김치시장 규모는 상품김치가 소비자 구매가격 기준으로 2조 원이고, 공장 매출액과 수입가 기준으로는 약 1조원 규모로, 이중 공장김치가 7,840억 원, 즉석제조 김치가 780억 원, 수입김치가 1,100억 원 정도로 추정된다.

최근 수입개방 확대와 외식산업의 발달로 중국산 김치의 수입량이 급증하고 있으며, 수출량은 한계를 나타내고 있다. 중국산 김치의 수입은 2004년도에 물량면에서 수출을 넘어섰고, 2006년에는 금액면으로도 수출액을 초과하여 물량과 금액면에서 모두 김치의 수입이 수출을 초과하였다. 저가의 중국산 김치의 수입이 급증함에 따라 국내 김치산업은 물론 김치의 원료 및 부재료 농산물의 생산, 공급 및 가격에도 큰 영향을 미치고 있다. 특히 수입김치의 국내유

통 과정에서 국내산 둔갑으로 인한 유통질서 혼란과 안전성 부분에서 큰 문제를 야기하고 있다. 식품의약품안전청의 보고에 따르면 2007년 중국산 김치에서 사이클라메이트 등 금지 감미료가 검출된 사례가 모두 30건에 달하고, 삭카린나트륨, 타르색소 등 미신고 첨가물 검출 31건, 비위생적인 작업 환경과 생산과정으로 인한 이물질 검출 18건, 첨가물 사용 기준위반 3건, 부적합품 재수입 1건 등으로 나타났고, 수입김치 부적합 판정건수도 2005년 279 톤, 2006년 282 톤, 2007년 1637 톤으로 매년 증가하고 있다. 또한 김치 수입량이 증가할수록 배추, 무, 마늘, 고추 등 주·부재료의 재배면적 감소와 함께 타 작목으로의 전환이 증가해 전체 농산물 수급 및 가격에까지 영향을 미치는 것으로 보고되었다[Jeon 2009].

이러한 문제점의 해결을 위해 정부는 2008년 12월 28일부터 김치의 원산지 표시를 소규모 음식점에까지 확대 시행하고 있지만, 중국산 김치와 한국산 김치를 과학적으로 판별할 수 있는 기술이 없어 충분한 효과를 거두지 못하고 있다.

수입김치의 지속적인 증가 및 저질 중국산 김치의 국내산 김치로의 둔갑 판매로 인해 발생하는 생산자와 소비자의 피해의 방지, 김치에 대한 소비자의 신뢰회복 그리고, 한국산 김치의 국가 경쟁력 강화를 위해서는 신속, 정확한 원산지 판별기술이 시급히 개발되어야 한다.

제 3 절 연구개발의 범위

김치는 원료에서 유래하는 미생물의 증식에 의하여 풍미가 형성되는 천연발효식품으로, 국내에서 진행된 많은 김치 관련 미생물 연구를 통하여 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Weissella* 속 등의 다양한 유산균이 발효에 관여하는 것으로 알려져 있다[Bae et al. 2005; Chang et al. 2008; Cho et al. 2006, 2009; Lee 2009; Kim and Chun 2005; Lee et al. 2005a; Park et al. 2003; Shim and Lee 2008b]. 이와 같이 김치의 주발효 미생물이 유산균이라는 사실이 이미 잘 알려져 있기 때문에 김치에 존재하는 다른 미생물에 대한 연구는 거의 보고되지 않았다. 그러나 원료에서 유래하는 다양한 미생물이 발효 초기에 존재할 것이고, 이들 미생물은 원재료가 재배된 원산지의 환경을 반영할 것으로 추정된다. 따라서 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 bacteria의 종류에 차이가 있을 것으로 추정되고, 그 차이는 발효가 진행되어 유산균이 증가하기 전단계에서 현저하게 나타날 것으로 추정하였다.

본 연구에서는 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 bacteria의 차이를 이용한 김치 원산지 판별기술의 개발을 위하여 발효 초기의 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 bacteria의 다양성을 검토하여 김치 원산지판별에 사용될 수 있는 지표 bacteria를 도출한다. 지표 bacteria가

결정되면 특이적 PCR을 이용한 지표 bacteria 검출법을 개발하고, PCR을 이용한 지표 bacteria 검출법의 유효성 검증을 통하여 중국산 김치 판별법의 적용 가능성을 평가한다.

최근 들어 미생물 환경(군집) 분석에 필요한 다양한 배양 비의존적인 DNA fingerprinting 기술이 개발되었고, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)와 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 분석은 미생물 구조 및 집단 구성원 변화의 모니터링에 사용되는 대표적 방법이다. 이미 서구에서는 여러 종류 발효식품의 미생물 환경 분석에 적용되었고, 김치발효 관련 미생물 연구에서도 DGGE가 적용된 바 있다[Lee et al. 2005a; Park et al. 2003]. DGGE는 T-RFLP 분석과 함께 미생물 구조 분석에 적합한 기술로 평가되고 있으나 연구자에 따른 재현성이 다소 떨어지는 것으로 평가되고 있다. T-RFLP는 재현성의 측면에서 높은 평가를 받고 있으며, DGGE에 비해서 시료의 처리 속도가 빠르다는 장점이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 김치 원산지판별기술 개발의 한 방법으로 미생물군집의 다양성 및 역동성의 모니터링에 빠르게 적용되고 있는 T-RFLP 분석을 적용하여 그 가능성을 평가한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 김치미생물 연구 현황

우리나라 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[An et al. 1999; Lee et al. 1999], 상품김치의 품질 균일화를 위해 유제품발효에서와 같이 우수 유산균을 김치발효의 종균(starter)으로 첨가하려는 시도가 진행되었다[Chae et al. 2006; Choi et al. 2003; Jin et al. 2008].

1939년 김치발효 관련 미생물에 대한 연구가 처음으로 보고된 이후, 1984년 Mheen과 Kwon의 보고[1984]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[Lee et al. 1992; Lim et al. 1989; Mheen and Kwon 1984; So and Kim 1995]. 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[Lee et al. 1992; Mheen and Kwon 1984].

2000년 이후에는 계통발생학적(phylogenetic) 분류체계에 의한 미생물의 동정이 일반화되고, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) [Lee et al. 2005a; Park et al. 2003], T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) [Shim and Lee 2008b]와 같은 분자생물학적 방법에 의한 배양 비의존적 균총분석이 진행되었을 뿐만 아니라, microarray 분석이 김치유산균 연구에 적용되어[Bae et al. 2005], 형태 및 생리학적 특성에 근거한 고전적 동정법에 의해서 진행된 연구와는 다른 결과들이 도출되어 기존에 보고된 김치 발효의 주발효균과 산패균에 대한 인식이 달라지고 있고, 기존에 보고되지 않았던 다양한 유산균이 김치발효에 관여하는 것으로 나타났다[Bae et al. 2005; Chin et al. 2006; Cho et al. 2006; Kim et al. 2000a; Kim and Chun 2005; Kim et al. 2002; Lee 2009; Lee et al. 2005a; Park et al. 2003; Shim and Lee 2008b; Um et al. 2006].

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 발효온도에 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 미생물연구[Lim et al. 1989; So and Kim 1995]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[Lee 2009].

이러한 김치발효 관련 유산균 연구결과의 변화 요인으로는 16S ribosomal RNA 유전자 (16S rDNA) 염기서열을 이용한 계통발생학적 분류체계의 도입에 따른 유산균 분류체계의 변화[Collins et al., 1993; Stiles and Holzapfel 1997], 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°C이상의 온도에서 발효를 진행시켰지만, 최근의 연구자들의 실험이 모두 저온발효에서의 균총분석을 진행하고 있어 저온에서 경쟁력이 있는 유산균들이 주로 분리되었기 때문으로 분석된다[Lee 2009]. 특히, 김치유산균 균총 해석에 있어 가장 큰 영향을 준 요인으로는 Collins 등[1993]이 과거 *Lactobacillus* 속으로 분류되었던 일부 유산균 및 *Lc. paramesenteroides*를 새로운 *Weissella* 속으로 재정리한 점을 들 수 있다. 분자생물적 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 종주국으로의 자존심을 지켰다 할 수 있다[Lee et al. 2002].

W. koreensis 외에도 김치에 대한 관심의 증가는 신종 미생물의 발굴로 연결되어 2000년 *Leuconostoc kimchii* [kim et al. 2000b]의 등록을 시작으로 2010년까지 *Lactobacillus kimchii* [Yoon et al. 2000], *Weissella kimchii* [Choi et al. 2002], *Leuconostoc inhae* [KIm et al. 2003], *Tetragenococcus koreensis* [Lee et al. 2005b], *Lactobacillus koreensis* [Bui et al. 2010], *Lactobacillus kimchicus* [Liang et al. 2010]가 신종으로 등록되어 총 8종이 등록되었다.

김치에서 검출되는 미생물 중에서 *Weissella* 속이 차지하는 비중이 높다는 보고의 증가와 함께 김치발효와 관련된 *Weissella* 속의 역할 규명의 필요성이 날로 증가하고 있다.

2. 유산균 PCR 검출법 연구 현황

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[Berthier et al. 1998; Shim and Lee 2008a; Torriani et al. 2001].

이러한 문제점의 보안을 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[Jang et al. 2003]. 이미 Jang 등[2002]은 amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)를 이용한 10종의 *Weissella* 속 유산균의 신속 검출법을 보고한 바 있다. 그러나 검출법이 보고된 후, *W. koreensis* [Lee et al. 2002]와 *W. soli* [Magnusson et al. 2002], *W. ghanensis* [Bruyne et al. 2008]가 신종균으로 등록되었고, *W. kimchii* [Choi et al. 2002]는 *W. cibaria*와 동일한 heterotypic 균주로 판명되어 *W. cibaria*로 통합되었다[Ennahar and Cai 2004]. 또한 GenBank database에 16S rDNA 염기서열(AY040669)이 등록된 *W. hani*는 유전적으로 *W. koreensis*와 동일한 것으로 판명되어 신종균으로 등록되지 못했다. 본 논문을 작성하고 있는 2010년 현재 *Weissella* 속에는 13종이 등록되어 있다. 따라서 새로운 *Weissella* 속 유산균의 신속한 검출법이 필요한 실정이다.

또 다른 16S rDNA 염기서열의 높은 상동성에서 발생하는 문제점 보완의 해결책으로는 *gyrB* [Duaga 2002], *oriC* [Roggenkamp, 2007], *recA* [Shim and Lee 2008a; Torriani 2001], *recN* [Arahal et al. 2008], *rpoB* [Mollet et al. 1997] 등의 단백질 구조유전자를 지표유전자로 이용하는 예가 증가하고 있고, 특히 *recN* 유전자는 16S rDNA보다 종(species) 간의 구분에 유용한 것으로 보고되었다[Arahal et al. 2008; Zeigler 2005].

3. 국내·외 기술개발 현황에서 본 연구가 차지하는 위치

- 한국과학기술정보원(KISTI)의 데이터베이스를 이용하여 검색한 김치 관련 논문 및 특허는 2011년 현재 각각 2,359건 및 5,723건으로 집계되지만, 미생물을 이용하여 김치 원산지판별을 시도한 연구는 본 연구자들이 처음이다.
- 최근의 김치 미생물 연구는 김치발효에 관여하는 유산균의 다양성 및 이들의 특이적 검출, 발효 과정 중의 유산균 그룹의 역동성 모니터링이 주를 이루고 있고, 결과의 도출을 위한 방법론은 DGGE, Clone analysis, Microarray, T-RFLP, Species-specific PCR 등 다양한 분자생물학적 방법이 사용되었지만, 주로 검출의 대상 미생물은 유산균이다. 따라서 유산균 외의 다양한 미생물의 관련 가능성이 있음에도 불구하고 이에 대한 언급은 거의 보고되지 않았다.
- 본 연구에서 진행한 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가를 통하여 유산균 외에도 다양한 bacteria가 존재한다는 점을 규명하였고, 원산지에 따라서 동일한 식품이라도 미생물상이 다르게 나타남을 증명하였다.
- 김치로부터 bacteria의 다양성을 분석하는 과정에서 *Bacillus cereus*, *Enterobacter* 속 bacteria가 소수로 검출되었다. 발효가 진행됨에 따라 유산균이 증식하고, 생성된 유기산에 의해 pH가 감소되어 위해세균이 생장이 억제되어 식중독을 일으키지는 않을 것으로 예상되나 안전을 염려하지 않았던 김치에 대해서도 위생 및 안전성과 관련한 주의가 필요한 것으로 나타났다.
- 중국산 김치로부터 한국산에 비해 높은 빈도로 위해세균이 검출되는 것으로 보아 중국산의 제조환경이 한국산에 비해 좋지 못하다는 점이 예상되기 때문에 중국산 김치에 대한 안전성 검증의 필요성을 제기하는 계기가 되었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 분석

1. 연구 내용

본 연구에서는 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 bacteria의 차이를 이용한 김치 원산지 판별 기술의 개발 가능성 평가 및 원산지판별에 사용될 지표 bacteria의 도출을 위하여 발효 초기의 한국산 및 중국산 김치에 존재하는 bacteria의 다양성을 검토해 보았다.

2. 재료 및 방법

가. 한국산 및 중국산 김치시료 수집

원산지에 따른 김치 유래 bacteria의 다양성 평가를 위해 사용된 김치시료는 총 5회에 걸쳐 57종이 수집되었다. 한국산 김치 28종은 경기도 연천, 충청남도 아산, 전라북도 해남, 경상북도 안동의 농협협동조합으로부터 공급받아 사용하였고(Fig. 1-1), 29종의 중국산 김치는 중국 산둥성의 청도시, 연태시, 위해시 지역에서 제조되어 수입된 것을 구입하거나 현지의 공장에서 수집하였다(Fig. 1-2). 이들 김치 중, 김치국물의 pH가 5.0 이상이 되는 발효 초기의 한국산 김치 26종, 중국산 김치 22종만을 bacteria 분리원으로 사용하였다(Table 1-1).

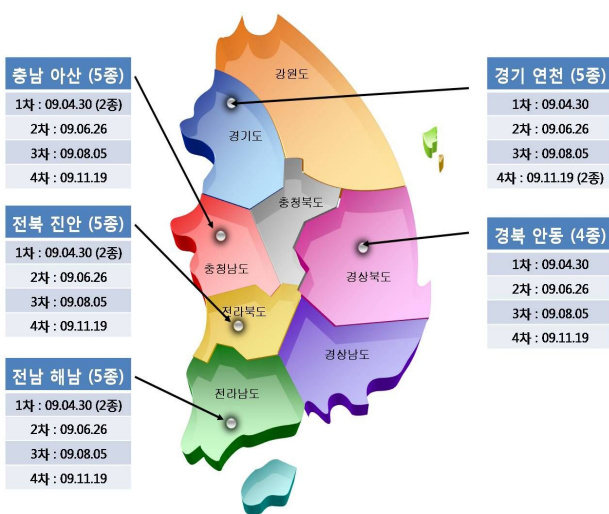


Fig. 1-1. 한국산 김치 수집 지역

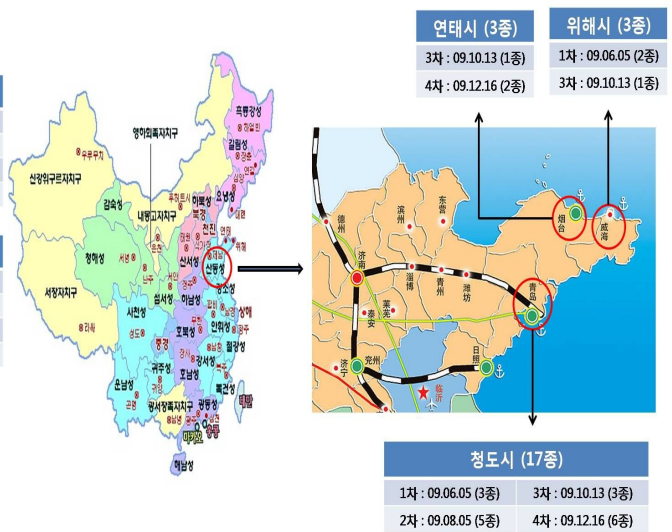


Fig. 1-2. 중국산 김치 수집 지역

Table 1-1. The pHs of Korean and Chinese *kimchi* samples.

Sample ^a	Korean <i>kimchi</i>					Chinese <i>kimchi</i>				
	1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
1	5.65	5.63	5.69	5.65	5.44	4.23	6.08	5.53	5.82	5.46
2	5.41	5.26	5.68	5.66	5.43	5.39	5.72	5.42	5.50	5.32
3	5.52	5.35	5.75	5.81	5.72	5.43	4.47	5.50	5.68	4.57
4	5.82	4.95	5.43	5.60	5.95	4.62	6.03	5.65	5.39	4.56
5	5.33	5.05	5.56	5.29	5.39	4.53	5.64	5.47	5.66	5.58
6	4.70								5.58	4.89
7	5.41								5.80	
8	5.69								5.63	
Total			28					29		

^aSample number was arbitrarily mentioned.

나. 김치 유래 bacteria 분리 및 배양조건

김치 유래 bacteria의 분리를 위한 김치시료 국물은 멸균한 거즈로 여과하였고, 고형물은 무게대비 2배의 생리식염수를 가하여 혼합한 후에 여과하였다. 얻어진 여액을 동량 혼합한 다음, bacteria의 분리가 가능한 농도로 생리식염수로 희석하여 marine medium (Difco, USA), nutrient medium (Difco), succinate minimal medium (SMM)[Monna et al. 1993], leuconostocs selective medium (LUSM)[Benkerroum et al. 1993]에 1.5% (w/v) 한천을 첨가한 고체배지에 도말하여 30℃, 미호기 조건에서 24시간 배양하였다. 가능한 다양한 집락의 선별을 위하여 각 배지에서 성장한 집락들 중, 외관상 색깔과 모양이 차이가 나는 집락을 각 배지별 10개씩 총 40개를 선별 과정에서 사용한 동일 배지를 이용하여 순수분리하였다.

다. 16S ribosomal RNA 유전자 분석을 통한 bacteria 동정

각 배지에서 분리된 bacteria의 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 증폭은 DNeasy tissue kit (Qiagen, Germany)을 이용하여 추출된 DNA를 PCR 하거나, colony PCR을 통하여 수행하였다. 16S rDNA PCR 증폭에는 다양한 bacteria의 증폭에 많이 사용되는 eubacterial universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC A-3')와 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')을 사용하였다[Shim and Lee 2008b]. PCR 반응에는 UNOII Thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였으며, 50 µL PCR 반응계에는 template DNA, 100 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 20 pmol의 primer를 첨가하였다. 반응조건은 95℃에서 5분 예비가열 후, 95℃ 1분간 변성, annealing 57℃ 1분, 72℃ 1분 중합반응의 과정을 30회 반복하고, 마지막에 72℃에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR 반응산물은 0.8% agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인하였으며, 16S rDNA 크

기에 해당하는 DNA band를 Gel & PCR purification system (SolGent, Korea)으로 회수, 정제한 후 -20°C 에서 보존하였다. 정제된 단편의 염기서열 결정은 수탁업체(SolGent)에 의뢰하여 수행하였고, 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)와 EzTaxon server 2.1 [Chun et al. 2007]에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast serch를 통해 계통발생학적 분석을 수행하였다. Database에 등록된 표준균주와 가장 높은 상동성을 나타내는 분류군(Taxon)을 해당 염기서열에 해당하는 bacteria로 동정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 한국산 및 중국산 김치로부터 분리된 bacteria의 다양성

김치국물과 고형분의 혼합여액 pH가 5.0 이상인 발효 초기의 한국산 김치 26종으로부터 1017 균주가, 중국산 김치 22종으로부터는 842 균주가 순수분리되어, 16S rDNA 염기서열 분석에 의해 계통발생학적으로 동정되었다. 한국산으로부터는 45속, 중국산에서는 54속이 분리되어 한국산보다는 중국산 김치에서 다양한 속 bacteria의 존재가 확인되었다(Table 1-2). *Actinobacteria*, *Bacilli*, β -*Proteobacteria*, γ -*Proteobacteria*, *Flavobacteria* 강(class)에 속하는 bacteria가 한국산 및 중국산 김치 모두에서 분리되었고, α -*Proteobacteria* 강 bacteria는 중국산 김치에서만 분리되었다. *Bacillus*, *Microbacterium*, *Weissella* 속 bacteria는 수집된 모든 김치시료에서 분리되었고, *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Plantibacter*, *Comamonas*, *Herbaspirillum*, *Acinetobacter*, *Buttiauxella*, *Cobetia*, *Moraxella*, *Elizabethkingia*, *Sphingobacterium* 속은 한국산 김치에서만 검출되었으며, *Brevibacterium*, *Cellulosimicrobium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Aerococcus*, *Brochothrix*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Thalassobacillus*, *Azospirillum*, *Rothia*, *Sanguibacter*, *Sphingomonas*, *Cedecea*, *Citrobacter*, *Pectobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Raoultella*, *Shewanella* 속은 중국산 김치에서만 검출되었다.

한국산과 중국산 김치시료에서 우점으로 검출되는 bacteria는 한국산 김치에서 *Bacillus*, *Weissella*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus* 속의 순으로, 중국산 김치에서는 *Bacillus*, *Weissella*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Enterobacter* 속의 순으로 확인되었다(Table 1-2). *Bacillus* 속과 유산균을 제외하면 *Pseudomonas* 속이 한국산과 중국산 김치 모두에서 높은 빈도로 검출되었다. *Pseudomonas* 속 다음으로는 한국산 김치에서 *Microbacterium* 속이 다수로 검출되었지만, 한국산 김치와 달리 *Enterobacter* 속과 *Serratia* 속이 중국산 김치의 우점으로 검출되었다(Table 1-2). 김치발효 초기에는 유산균보다 *Bacillus* 속 bacteria의 검출이 가장 높게 나타난 것으로 보아, 발효 초기에는 원료에서 유래하는 토양 유래 bacteria가 우점하는 것으로 사료된다.

Table 1-2. Numbers of the isolated genera from Korean and Chinese *kimchi* samples.

Class	Genus	Korean <i>kimchi</i>						Chinese <i>kimchi</i>					
		1st	2nd	3rd	4th	5th	Total ^a	1st	2nd	3rd	4th	5th	Total ^a
		7	4	5	5	5	26	2	4	5	8	3	22
Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i>				1	1	2						
	<i>Brevibacterium</i>										1		1
	<i>Cellulosimicrobium</i>									1			1
	<i>Corynebacterium</i>							1	1				2
	<i>Curtobacterium</i>	1	1				2						
	<i>Kocuria</i>	1	1	3			5		1				1
	<i>Microbacterium</i>	10	10	2	1	7	30	2	7	9	6	11	35
	<i>Ochrobactrum</i>			1		1	2				1		1
	<i>Paracoccus</i>			1			1			2	3		5
	<i>Plantibacter</i>	2					2						
Bacilli	<i>Rhodococcus</i>											1	1
	<i>Aerococcus</i>								2	1			3
	<i>Bacillus</i>	133	77	72	108	74	464	11	17	40	114	26	208
	<i>Brochothrix</i>								1				1
	<i>Carnobacterium</i>								3				3
	<i>Enterococcus</i>			1			1		1			6	7
	<i>Exiguobacterium</i>			2		3	5	2	1				3
	<i>Lactococcus</i>		2	7		2	11	6	13	7			26
	<i>Latobacillus</i>	16	2	2		17	37	7	13	18	35	3	76
	<i>Leuconostoc</i>	49	9	4	9	10	81		8	10	16	3	37
	<i>Lysinibacillus</i>		1				1				2		2
	<i>Marinilactibacillus</i>			2			2				1		1
	<i>Paenibacillus</i>			1			1		1				1
	<i>Pediococcus</i>									3			3
	<i>Staphylococcus</i>		4	2			6	2	1		29		32
	<i>Thalassobacillus</i>											1	1
<i>Weissella</i>	47	33	53	41	20	194	15	24	30	29	24	122	
α -Proteobacteria	<i>Azospirillum</i>											1	1
	<i>Rothia</i>									1			1
	<i>Sanguibacter</i>								1				1
	<i>Sphingomonas</i>							1					1
β -Proteobacteria	<i>Achromobacter</i>		1	2			3		1			1	2
	<i>Comamonas</i>			2		1	3						
	<i>Delftia</i>			2			2		1				1
	<i>Herbaspirillum</i>				1		1						
γ -Proteobacteria	<i>Acinetobacter</i>			2			2						
	<i>Buttiauxella</i>	1					1						
	<i>Cedecea</i>							1					1
	<i>Citrobacter</i>							4	1				5
	<i>Cobetia</i>					3	3						
	<i>Enterobacter</i>		2	5	3	1	11	8	10	14	6	1	39
	<i>Erwinia</i>				1		1	2	2	1	1		6
	<i>Ewingella</i>				1		1		2		3		5
	<i>Flavimonas</i>			1			1				1		1
	<i>Klebsiella</i>			1			1	1	1				2
	<i>Kluyvera</i>				2		2		1	1	3		5
	<i>Leclercia</i>			1			1	3		1			4
	<i>Moraxella</i>	1					1						
	<i>Pantoea</i>		2	2	3	3	10	3	3	2	4	8	20
	<i>Pectobacterium</i>							1					1
	<i>Proteus</i>							2			1		3
	<i>Providencia</i>							1		1			2
	<i>Pseudomonas</i>	2	10	13	6	22	53		17	10	23	21	71
	<i>Psychrobacter</i>	1			2	4	7		1	1	2		4
	<i>Rahnella</i>		1			7	8		4	4	3	2	13
<i>Raoultella</i>							1					1	
<i>Rhizobium</i>	6		8	1	9	24			4	8	3	15	
<i>Serratia</i>	1	3		5		9	6	9	16	7	2	40	
<i>Shewanella</i>								2				2	
<i>Sienotrophomonas</i>	2		1	5	4	12	1	3	4	3	1	12	
<i>Vibrio</i>			1			1				1		1	
<i>Yersinia</i>	1					1		2		1	1	4	
Flavobacteria	<i>Chryseobacterium</i>			3	1	5	9			2	2	1	5
	<i>Elizabethkingia</i>			1			1						
Sphingobacteria	<i>Sphingobacterium</i>				1		1						
Total		274	159	197	193	194	1017	80	155	183	307	118	842

^aNumber of *kimchi* samples.

나. Bacteria의 분리에 미치는 배지의 영향

현재까지 보고된 김치 유래 미생물 연구에서는 MRS 배지가 주 발효균인 유산균의 선택적 선발에 이용되었지만, 본 연구에서는 유산균 외의 다양한 bacteria의 분리를 위해 marine, nutrient, SMM, LUSM 한천배지를 사용하였다(Table 1-3). marine 배지에서 한국산 김치로부터 27속, 중국산 김치로부터 35속의 bacteria가 분리되었고, nutrient 배지에서는 한국산 김치로부터 25속, 중국산 김치로부터 33속의 bacteria가 분리되었다. SMM에서 한국산 김치로부터 19속, 중국산 김치로부터 25속의 bacteria가 분리되었고, LUSM에서 한국산 김치로부터 4속, 중국산 김치로부터 6속의 bacteria가 검출되었다. 본 실험에 사용한 모든 배지에서 한국산에 비해 중국산 김치로부터 많은 속의 bacteria가 검출되었지만, 각 배지에서 분리된 bacteria의 종류는 김치산지에 따른 현저한 차이가 발견되지 않았다.

SMM보다는 marine 및 nutrient 배지가 김치에 존재하는 다양한 bacteria의 검출에 유리한 것으로 나타났고, 우점종의 검출에 있어 SMM에서는 *Enterobacter* 속이 다른 배지에 비해 높은 수준으로 검출되었다. 또한 *Microbacterium* 속 검출에는 nutrient 배지가 *Pseudomonas* 속의 검출에는 nutrient 배지와 SMM이 비교적 용이한 것으로 나타났다. *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Serratia* 속은 사용된 모든 배지에서 검출되었고, *Enterobacter*, *Kluyvera*, *Lactococcus*, *Leclercia*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* 속은 LUSM을 제외한 모든 배지에서 검출되었다. *Leuconostoc* 속의 선택적 선별을 위해 개발된 LUSM에서는 *Leuconostoc* 속보다는 *Weissella* 속이 높은 빈도로 검출되어 *Leuconostoc* 속의 선별에 적합하지 않은 것으로 나타났다[Benkerroum et al. 1993; Choi et al. 1996].

Table 1-3. Numbers of the isolated genera from Korean and Chinese *kimchi* according to media.

Genus	Marine medium		Nutrient medium		SMM ^a		LUSM ^b	
	KK ^c	CK ^d	KK	CK	KK	CK	KK	CK
<i>Achromobacter</i>		2	3					
<i>Acinetobacter</i>					2			
<i>Aerococcus</i>		2		1				
<i>Arthrobacter</i>	1		1					
<i>Azospirillum</i>				1				
<i>Bacillus</i>	166	80	123	65	174	63	1	
<i>Brevibacterium</i>						1		
<i>Buttiarella</i>					1			
<i>Brochothrix</i>		1						
<i>Catnobacterium</i>		2		1				
<i>Cedecea</i>						1		
<i>Cellulosimicrobium</i>				1				
<i>Chryseobacterium</i>	1		8	5				
<i>Citrobacter</i>		2		1		2		
<i>Cobetia</i>	3							
<i>Corynebacterium</i>		2						
<i>Comamonas</i>	1		2					
<i>Curtobacterium</i>	2							
<i>Delftia</i>			2	1				
<i>Elizabethkingia</i>			1					
<i>Enterobacter</i>	2	8	4	6	5	25		
<i>Enterococcus</i>	1	5		2				
<i>Erwinia</i>		2		3	1	1		
<i>Ewingella</i>		2			1	3		
<i>Exiguobacterium</i>	5	2		1				
<i>Flavimonas</i>			1			1		
<i>Herbaspirillum</i>					1			
<i>Klebsiella</i>	1	1				1		
<i>Kluyvera</i>	1	4		1	1			
<i>Kocuria</i>	2		3	1				
<i>Lactobacillus</i>		1	1	2		2	36	71
<i>Lactococcus</i>	10	15		8	1	3		
<i>Leclercia</i>		1		2	1	1		
<i>Leuconostoc</i>	28	13	15	1	7		31	23
<i>Lysinibacillus</i>	1	1		1				
<i>Marinilactibacillus</i>	2	1						
<i>Microbacterium</i>	8	7	18	23	4	5		
<i>Moraxella</i>	1							
<i>Ochrobactrum</i>			2			1		
<i>Paenibacillus</i>	1			1				
<i>Pantoea</i>	2	5	3	2	5	13		
<i>Plantibacter</i>			2					
<i>Paracoccus</i>	1	5						
<i>Pectobacterium</i>						1		
<i>Pediococcus</i>				1				2
<i>Proteus</i>		1				2		
<i>Providencia</i>		1				1		
<i>Pseudomonas</i>	3	3	25	38	25	30		
<i>Psychrobacter</i>	7	4						
<i>Rahnella</i>		4	3		5	9		
<i>Raoultella</i>						1		
<i>Rhizobium</i>			7	3	17	12		
<i>Rhodococcus</i>				1				
<i>Rothia</i>		1						
<i>Sanguibacter</i>				1				
<i>Serratia</i>	2	12	5	13	2	14		1
<i>Shewanella</i>		2						
<i>Sphingomonas</i>						1		
<i>Sphingobacterium</i>			1	1				
<i>Staphylococcus</i>	1	12	2	13	3	7		
<i>Stenotrophomonas</i>			11	9	1	1		1
<i>Thalassobacillus</i>				1				
<i>Vibrio</i>	1	1						
<i>Weissella</i>	3	1	10	1			181	120
<i>Yersinia</i>		1	1			3		
Total	257	207	254	212	257	205	249	218

^aSMM: succinate minimal medium, ^bLUSM: leuconostocs selective medium.

^cKK: Korean *kimchi*, ^dCK: Chinese *kimchi*.

다. 한국산 및 중국산 김치에서 분리된 유산균의 다양성

한국산 및 중국산 김치로부터 *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella* 속 유산균이 검출되었고, 한국산, 중국산 모두에서 *Weissella* 속이 가장 우점으로 검출되었다(Table 1-4). 한국산의 경우 *Leuconostoc* 속이, 중국산은 *Lactobacillus* 속이 *Weissella* 속 다음가는 우점균으로 나타났다. 그러나 본 연구에서는 유산균의 검출에 일반적으로 사용되는 MRS 배지를 사용하지 않고, LUSM에서 성장한 유산균의 검출 결과를 바탕으로 하고 있어, 발효 초기 김치에 존재하는 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Weissella* 속 유산균의 비중에 대한 결론을 도출하기는 힘들다.

김치발효 후기 우점균으로 알려진 *Lactobacillus* 속의 경우, 한국산 및 중국산 모두에서 *Lb. sakei*가 우점으로 나타났고, 중국산 김치에서는 *Lb. graminis*가 한국산 김치에 비해 많이 검출되었다(Table 1-4). *Lactococcus* 속은 상대적으로 한국산에 비해 중국산에서 많이 검출되었다. *Leuconostoc* 속의 경우, 한국산에서는 *Leu. mesenteroides*와 *Leu. citreum*이 높은 빈도로 검출되었지만, 중국산에서는 *Leu. mesenteroides*가 우점균으로 나타났다. 가장 많이 검출된 *Weissella* 속의 경우, 한국산과 중국산 모두에서 *W. cibaria*와 *W. koreensis*가 우점으로 검출되었다. 중국산에서 1종이 검출된 *W. confusa*는 한국산에서는 우점을 형성하고 있었고, *W. soli*는 중국산에서만 특이적으로 검출되었다. LUSM에서는 *Weissella* 속이 선택적으로 분리되고 있어 *W. confusa*, *W. soli*의 신속한 검출에 도움을 줄 수 있는 배지로 사료된다.

Table 1-4. Lactic acid bacteria isolated from Korean and Chinese *kimchi*.

Genus	Species	Korean <i>kimchi</i>					Chinese <i>kimchi</i>				
		1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
<i>Carnobacterium</i>	<i>C. inhibens</i>							2			
	<i>C. maltaromaticum</i>							1			
<i>Enterococcus</i>	<i>E. casseliflavus</i>				1						
	<i>E. durans</i>										6
	<i>E. sulfureus</i>							1			
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lb. brevis</i>									1	
	<i>Lb. curvatus</i>					1		1			
	<i>Lb. graminis</i>					3		1	2	18	
	<i>Lb. paraplantarum</i>									1	
	<i>Lb. pentosus</i>					6				2	
	<i>Lb. plantarum</i>									2	
	<i>Lb. rossiae</i>									1	
	<i>Lb. sakei</i>	15	1	2		7	7	11	9	17	3
<i>Lactococcus</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>		2	7			2	7	3		
	<i>Lc. garvieae</i>					2	2	6	4		
	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>hordniae</i>						2				
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leu. carnosum</i>	1								2	
	<i>Leu. citreum</i>	19	6	3		5		3		5	1
	<i>Leu. holzapfelii</i>	1	1					1		1	
	<i>Leu. lactis</i>	3	1		5	2					1
	<i>Leu. mesenteroides</i>	25	1	1	3	3		4	10	8	1
	<i>Leu. pseudomesenteroides</i>					1					
<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i>	7	23	24	30	2	15	21	17		
	<i>W. koreensis</i>	40	2			8			9	21	24
	<i>W. soli</i>							3	2	8	
	<i>W. confusa</i>		6	27	11	10				1	
	<i>W. hellenica</i>		2	1							
	<i>W. paramesenteroides</i>			1							
	<i>W. viridescens</i>								1		

라. 한국산 및 중국산 김치에서 특이적으로 검출된 bacteria

Bacillus, *Weissella* 속은 모든 김치시료에서, *Serratia*, *Enterobacter* 속은 모든 중국산 김치시료에서 높은 빈도로 검출되어, 특정 김치시료에서의 1회성 검출이 아닌 것으로 확인되었다(Table 1-2, Table 1-5). 따라서 이들 속의 bacteria 중 한국산 또는 중국산에서 특이적으로 검출되는 종(species)이 존재한다면, 이들 종은 한국산 및 중국산 김치의 구분에 사용될 지표미생물로 선정될 가능성을 가지고 있다.

한국산에서 분리·동정된 1017 균주 중, *Bacillus* 속에서는 15 종의 464 균주가 분리되어 전체 분리균의 45%에 해당하는 것으로 나타났고, 중국산의 경우 전체 842 분리균 중, *Bacillus* 속에서 23 종의 208 균주가 분리되어 25%에 달하는 것으로 나타났다. *B. safensis* 와 *B. stratosphericus*는 한국산 및 중국산 김치 모두에서 검출되었다(Table 1-5).

한국산 및 중국산 김치에서 분리된 *Weissella* 속 중, *W. cibaria*와 *W. koreensis*는 한국산과 중국산 모두에서 가장 많이 검출되었고, 한국산에서는 *W. confusa*가 중국산에서는 *W. soli*가 특이적으로 검출되었다. 따라서 이들 균주는 한국산 및 중국산 김치의 판별에 적용 가능한 지표균 후보로 사료된다(Table 1-5).

토양이나 물에서 많이 검출되는 *Serratia* 속 bacteria는 대부분의 종이 중국산 김치에서 높은 빈도로 검출되었지만, 한국산에서도 낮은 빈도로 검출되었다. 그러나 *Serratia* 속 중, 중국산 김치에서 가장 높은 빈도로 검출된 *S. proteamaculans*는 한국산 김치에서는 검출되지 않았다. 따라서 중국산 김치의 판별을 위한 지표균으로 사용될 높은 가능성을 가진 종으로 사료된다(Table 1-5).

Enterobacter 속의 *E. amnigenus*는 중국산 김치에서는 많이 검출되었지만 한국산 김치에서도 낮은 빈도로 검출되어 지표균으로 선발되기에는 좀 더 많은 시료의 분석이 필요하다.

Table 1-5. Commonly isolated dominant genera from Korean and Chinese *kimchi*.

Genus	Species	Korean <i>kimchi</i>					Chinese <i>kimchi</i>				
		1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
<i>Bacillus</i>	<i>B. aerius</i>		2		1	5				2	
	<i>B. altitudinis</i>				1						
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	19	10	8	24		2	3	1	10	
	<i>B. anthracis</i>									1	
	<i>B. atrophaeus</i>	2		11				1	1	3	2
	<i>B. aryabhatai</i>				1					2	
	<i>B. cereus</i>									3	
	<i>B. flexus</i>									1	
	<i>B. gibsonii</i>					1					1
	<i>B. licheniformis</i>	16	5	16	1	2		3	2	2	
	<i>B. infantis</i>						1			1	
	<i>B. marisflavi</i>						1	1			
	<i>B. mojavensis</i>								3	3	
	<i>B. methylotrophicus</i>					16					3
	<i>B. niacini</i>									1	
	<i>B. safensis</i>	21	8	6	9	4	3	2	14	47	12
	<i>B. simplex</i>									1	
	<i>B. sonorensis</i>		2							1	
	<i>B. stratosphericus</i>	37	22	14	21	24	1	4	7	25	3
	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>			1				2	1	8	3
<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	38	9	5	10	22	2		1	1	2	
<i>B. tequilensis</i>		18	11	35			1	2	5		
<i>B. thuringiensis</i>									1	1	
<i>B. vallismortis</i>		1		5		1		1	2		
<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i>	7	23	24	30	2	15	21	17		
	<i>W. koreensis</i>	40	2			8			9	21	24
	<i>W. soli</i>							3	2	8	
	<i>W. confusa</i>		6	27	11	10			1		
	<i>W. hellenica</i>		2	1							
	<i>W. paramesenteroides</i>			1							
	<i>W. viridescens</i>								1		
<i>Serratia</i>	<i>S. fonticola</i>		1		1			2			
	<i>S. glossinae</i>				4						
	<i>S. grimesii</i>		1				2	2			
	<i>S. marcescens</i>						2			2	
	<i>S. nematodiphila</i>									1	
	<i>S. plymuthica</i>	1	1							3	2
	<i>S. proteamaculans</i>						2	5	16	2	
<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i>							1			
	<i>E. amnigenus</i>		2		2		1	4	12	1	1
	<i>E. asburiae</i>						4		2		
	<i>E. cancerogenus</i>						1	2			
	<i>E. cowanii</i>				1						
	<i>E. kobei</i>						1				
	<i>E. ludwigii</i>			1			1	3		5	

마. 위해세균의 검출

pH 5 이상의 발효 초기 김치에서는 토양 및 오염된 물에서 검출되는 병원성 미생물을 포함하는 *Enterobacter*, *Erwinia*, *Serratia* 속 bacteria가 한국산 및 중국산 모두에서 검출되었지만, 검출빈도는 중국산이 높은 것으로 나타났다(Table 1-6)[Grimont and Grimont 1978; Madigan et al. 2009]. 대체로 식물병원균이 주를 이루고, 식중독균으로 알려진 *B. cereus*와 *E. aerogenes*가 중국산 일부에서 검출되었다. 2008년에 발간된 식품공전에 따르면 *B. cereus*의 검출은 식품에 따라 한도가 다르게 적용되고, 절임식품의 경우 10,000 CFU/g 이하로, 신선편의식품의 경우 1,000 CFU/g 이하로 규정되어 있다. 김치류의 경우, *B. cereus*에 대한 규격이 정해지지 않았지만, 본 연구에서 검출된 수준은 기준 이하로 식품의 안전에는 문제가 되지 않는다. 살균포장제품 형태의 김치류의 경우, 대장균군 검출이 음성으로 규정되어 있다. 그러나 본 연구의 시료의 경우 살균포장제품에 해당하지 않고, 1건의 *E. aerogenes* 또한 문제로 제기될 수준은 아니다.

중국산 김치에서만 검출된 식물병원균인 *S. marcescens*의 경우, 일본에서는 감염성 병원균으로 분류되어 있다(<http://www.nih.go.jp/>). 식물병원균이 소수로 검출된 결과는 김치가 다소 비위생적인 환경에서 제조되거나, 신선도가 떨어지는 재료를 사용하여 나타난 결과로 추측된다. 중국산 김치에서 한국산에 비해 높은 빈도로 위해세균이 검출되는 것으로 보아 중국산의 제조환경이 한국에 비해 좋지 못하다는 점이 예상된다.

발효 초기의 김치에서 검출된 토양 및 물 유래 위해세균들은 발효의 진행에 따른 유산균의 증식으로 유산균이 생산하는 유기산과 bacteriocin에 의해 모두 생장이 억제될 것으로 사료된다. 따라서 소수의 위해세균이 검출되었다 하여도 섭취한 김치에 의해 식중독이 발생할 가능성은 희박할 것으로 사료된다.

Table 1-6. Potential pathogenic species isolated from Korean and Chinese kimchi.

Pathogenic character	Species	Korean kimchi					Chinese kimchi				
		1st	2nd	3rd	4th	5th	1st	2nd	3rd	4th	5th
Food pathogens	<i>Bacillus cereus</i>									3	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>								1		
Plant pathogens	<i>Enterobacter amnigenus</i>		2		2		1	4	12	1	
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>							1	2		
	<i>Erwinia perscina</i>	1					2	2		1	
	<i>Serratia marcescens</i>						2			2	

제 2 절 *Weissella soli* 및 *Weissella* 속 유산균의 빠른 검출 및 동정을 위한 16S rDNA PCR-RFLP 분석법 개발

1. 연구 내용

발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가로부터 *W. soli*가 중국산 김치에서 검출되지만 한국산 김치로부터는 검출되지 않는 결과를 얻었다. 따라서 *W. soli* 및 *Weissella* 속 균주들의 신속, 정확한 검출 및 동정법을 이용한 김치 원산지판별기술 개발을 시도하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균주 및 배양 조건

빠른 동정법 개발에 사용한 대상 유산균은 김치에서의 검출이 보고된 *Weissella* 속 10종 (Table 2-1) 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.

나. PCR 조건 및 제한효소

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[2002]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')을 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 mM를 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 전기영동 하여 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.

3. 결과 및 고찰

이미 Jang 등[2002]에 의해 ARDRA (amplified ribosomal DNA analysis)를 통하여 10종의 *Weissella* 속 유산균의 신속 검출법이 보고된 바 있다. 그러나 검출법이 보고된 후, *W. koreensis* [Lee et al. 2002]와 *W. soli* [Magnusson et al. 2002], *W. ghanensis* [Bruyne et al. 2008]가 신종균으로 등록되었고, *W. kimchii* [Choi et al. 2002]는 *W. cibaria*와 동일한 heterotypic 균주로 판명되어 *W. cibaria*로 통합되었다[Ennahar and Cai 2004]. 또한 GenBank database에 16S rDNA 염기서열(AY040669)이 등록된 *W. hani*는 유전적으로 *W. koreensis*와 동일한 것으로 판명되어 신종균으로 등록되지 못했다. 2010년 8월 현재 *Weissella* 속에는 13종이 등록되어 있다. 또한 Jang 등[2002]의 방법에 의해 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 (restriction fragment length polymorphism) 분석법을 적용한 결과를 보고한다.

Jang 등[2002]이 보고한 반응조건에서 PCR을 수행한 결과, 비특이적인 DNA 단편이 다수 증폭됨에 따라 annealing 온도의 수정을 진행하였다. 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 2-1), Jang 등[2002]이 사용한 제한효소 *Mn*Ⅱ, *Mse*Ⅰ, *Bce*Ⅲ 중 *Mn*Ⅱ의 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, *Alu*Ⅰ은 *Mn*Ⅱ과 동일하게 *Weissella* 속을 3그룹으로 구분하지만, 134 bp 이상의 단편을 생성하기 때문에 단편 크기의 구분에 용이한 것으로 예상되었다. 증폭산물을 *Alu*Ⅰ으로 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*, *W. viridescens*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis*는 동일한 band 양상을 나타내었고, *W. cibaria*와 *W. soli*가 동일한 band 양상을 나타내었다(Fig. 2-1). 제한효소 *Mse*Ⅰ에 의한 절단위치의 예측결과, *Weissella* 속 균주들이 5그룹으로 나누어지는 것으로 예상되었다(Table 2-1). 증폭산물의 *Mse*Ⅰ 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 band 양상을 나타내어, 실험결과가 예상과 일치함을 확인하였다(Fig. 2-1). 제한효소 *Bce*Ⅲ으로 절단하면 *W. hellenica*와 *W. paramesenteroides*가 특이적인 band 양상을 나타내어 동일한 band 양상을 나타낸 나머지 8종의 균주들과 쉽게 구분되었다(Fig. 2-1). 증폭된 727 bp 단편의 제한효소 처리 후, 수행한 전기영동 결과(Fig. 2-1)는 Webcutter 2.0 program을 이용하여 추측한 결과(Table 2-1)과 완전히 일치하였으며, Fig. 2-1-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 *Alu*Ⅰ과 *Mse*Ⅰ의 사용으로 동정이 가능한 것으로 확인되었다. *W. hellenica*, *W. paramesenteroides*, *W. thailandensis*의 경우, 3균주 간의 16S rDNA 유사성이 97% 이상으로 매우 높아 *Alu*Ⅰ 및 *Mse*Ⅰ에 의해서는 구분되지 않는 것으로 나타났다. 그러나 *W. hellenica*, *W. paramesenteroides*는 *Bce*Ⅲ에 의해 균주 특이적인 band 양상이 나타나기 때문에 두 균주의 구분이 가능하였다. *W. thailandensis*의 경우, 본 실험에서 사용한 제한효소 *Alu*Ⅰ, *Mse*Ⅰ, *Bce*Ⅲ 모두에 의해 독립적인 band 양상은 나타나지 않았지만, 나머지 9종 균주들과의 절단 양상의 비교를 통해 구분이 가능하였다. 그러나, 제한효소 *Msp*Ⅰ을 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 없이 빠른 확인을 위하여 3종의 제한효소 처리에 의하여 증폭산물로부터 얻어지는 DNA 단편의 크기를 균주 별로 정리하였다(Table 2-2). *W. soli*의 예를 들어 Table 2-2의 사용을 설명하면, *AluI* 처리에 의해서는 증폭산물로부터 223 및 504 bp의 단편이 생성되기 때문에 *W. cibaria*와 구분되지 않는다. 그러나 증폭산물의 처리에 *MseI*을 함께 사용한다면, *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 2-2는 *Weissella* 속 균주의 빠른 동정에 적용 가능할 것으로 기대한다.

Table 2-1. 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.

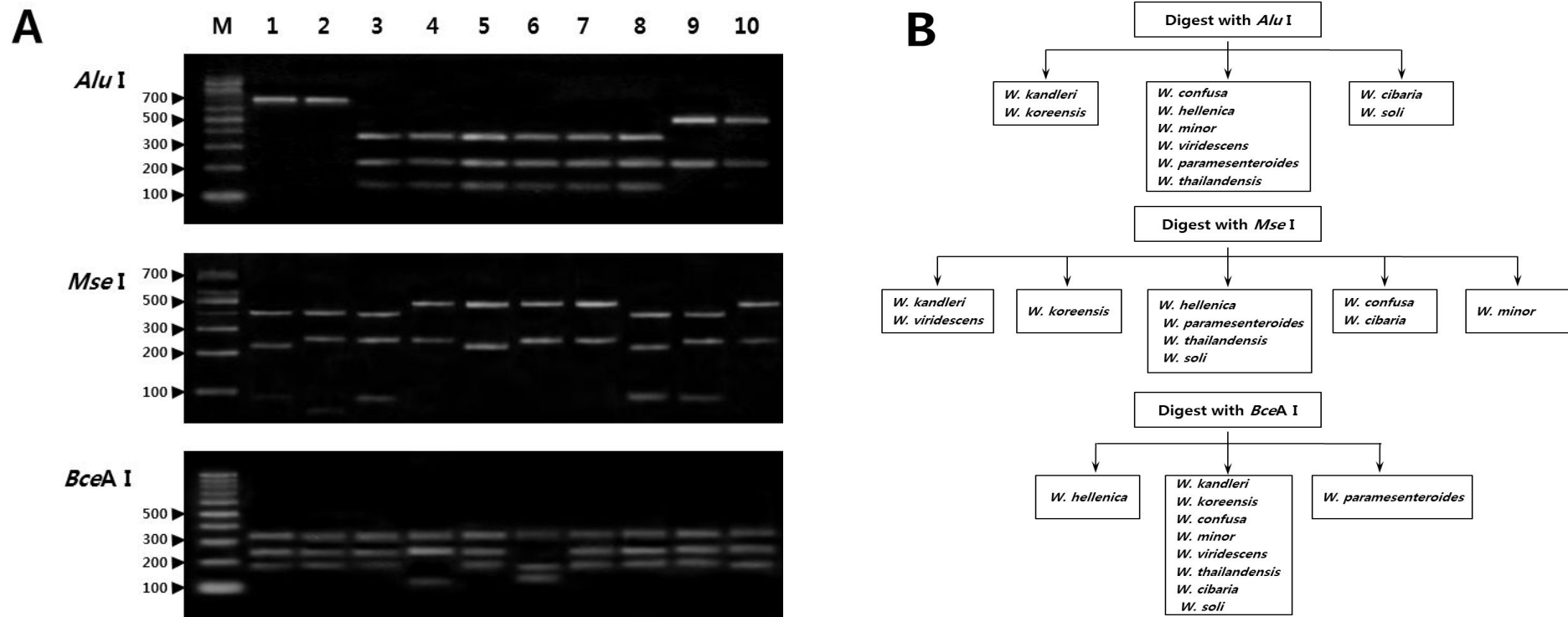


Fig. 2-1. PCR-RFLP profiles after the digestion of *Weissella*-specific PCR products with *AluI*, *MseI*, and *BceAI* endonucleases (A) and the schematic presentation of restriction patterns (B).

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.

Table 2-2. 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. thailandsis</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.

제 3 절 *RecN* 유전자 특이적 PCR을 이용한 *Weissella* 속 유산균 검출법 개발 및 중국산 김치 판별

1. 연구 내용

본 연구에서는 특정 미생물의 특이적 검출을 이용한 중국산 김치 판별법 개발을 최종 목표로 *W. confusa* 및 *W. soli*를 포함하는 *Weissella* 속 9종 균주의 PCR 검출법을 개발하였고, 이들의 검출을 이용한 중국산 김치 판별의 가능성을 검토하였다. *Weissella* 속 균주의 빠른 동정 및 검출을 위한 PCR 검출법에 사용된 종 수준의 특이적 PCR primer (Species-specific PCR primer)의 개발에는 *recN* 유전자를 지표유전자로 사용하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용한 표준균주(type strain)는 Korean Collection for Type Cultures (KCTC), Korean Culture Center for Microorganisms (KCCM), ATCC the global bioresource center로부터 구입하였다(Table 3-1). 그러나 *W. koreensis* 표준균주는 특허균주로 등록되어 분양이 불가능한 관계로 본 연구자들이 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.

나. *Weissella* 속 9종 균주의 특이적 검출을 위한 PCR primer 및 PCR 조건

Weissella 속 균주의 특이적 검출을 위한 PCR primer는 *Leuconostocaceae* 과(family)에 속해있어 *Weissella* 속과 근연 관계에 있는 *Oenococcus* 및 *Leuconostoc* 속 유산균들과 김치에서 많이 검출되는 *Lactobacillus* 속 균주들 중에서 GenBank에 등록된 *recN* 유전자 염기서열을 PHYDIT program (<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>)을 이용하여 정렬한 후, 종 수준에서 각 균주에 특이적인 부분을 선정하여 제작하였다. Table 3-1에는 primer 제작에 사용한 *recN* 유전자의 accession number를 균주 별로 정리하였다.

실험에 사용한 균주의 total DNA는 MRS 배지에서 30°C, 24시간 배양한 균체로부터 Genome DNA extraction kit (Axygen, CA, USA)을 사용하여 추출하였다. PCR은 50 µL 반응계에서 10 ng template DNA, 0.1 mM dNTP, 1.25 U *Taq* polymerase (RBC

Bioscience, Taipei, Taiwan) 및 각 primer를 10 pmol 농도로 첨가하여 T3000 thermal cycler (Biometra, Germany)를 사용하여 수행하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C 1분간 변성, 검출 균주에 따른 annealing 1분, 72°C 1분간의 중합반응 과정을 30회 반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단했다. Table 3-2에는 *Weissella* 속 균주들의 PCR 검출을 위한 primer의 염기서열과 annealing 온도를 나타내었다. PCR 산물은 2% agarose gel을 사용하여 전기영동한 후, ethidium bromide 용액으로 염색하여 band를 확인하였다.

Table 3-1. Reference strains and *recN* genes used in this study.

Species	<i>recN</i> accession number	Strain designation
<i>Weissella</i>		
<i>W. cibaria</i>	AM698013	KCTC 3817 ^T
<i>W. confusa</i>	AM698014	KCTC 3499 ^T
<i>W. hellenica</i>	AM698016	KCTC 3668 ^T
<i>W. kandleri</i>	AM698017	KCTC 3610 ^T
<i>W. koreensis</i>	AM698018	KK0101
<i>W. minor</i>	AM698019	KCTC 3604 ^T
<i>W. soli</i>	AM698020	KCTC 3789 ^T
<i>W. thailandensis</i>	AM698021	KCTC 3751 ^T
<i>W. viridescens</i>	AM698022	KCTC 3504 ^T
<i>Lactobacillus</i>		
<i>Lb. brevis</i>	CP000416.1	ATCC 14869 ^T
<i>Lb. curvatus</i>		KCTC 3767 ^T
<i>Lb. paraplantarum</i>		ATCC 700211 ^T
<i>Lb. pentosus</i>		KCCM 40997 ^T
<i>Lb. plantarum</i>	NC_012984	KCTC 3108 ^T
<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	NC_007576	KCTC 3603 ^T
<i>Leuconosotc</i>		
<i>Lc. carnosum</i>	AM698023	KCTC 3525 ^T
<i>Lc. citreum</i>	DQ489736	KCTC 3526 ^T
<i>Lc. gelidum</i>	AM698027	
<i>Lc. lactis</i>	AM698029	
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	AM698031	
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	AM698032	KCTC 3530 ^T
<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	AM698033	KCTC 3505 ^T
<i>Oenococcus</i>		
<i>O. onei</i>	AM698012	KCTC 3072 ^T

^T, type strain; KCTC, Korean Collection for Type Cultures; KCCM, Korean Culture Center for Microorganisms; ATCC, ATCC the global bioresource center.

Table 3-2. Sequences of the oligonucleotide primers and annealing temperatures used for species-specific PCR amplification and PCR product sizes.

Target species	Primer	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	Product size (bp)	Annealing Temp.
<i>W. cibaria</i>	WeicibaF	TTG ATT GAC ATA GAA CCT GAT	596	55°C
	WeicibaR	TTC GGT GCT AGT TCT TCA ATA		
<i>W. confusa</i>	WeiconF	CGC CAT TTA TCA TTG CTG	637	55°C
	WeiconR	GTT TCT CAG CAT GTG TAC G		
<i>W. hellenica</i>	WeihelF	GCG GCA AGC AGA TGA ACA GGC	513	67°C
	WeihelR	AGG GCA GCA TTT TCTTCA TTA		
<i>W. kandleri</i>	WeikanF	ACT TCC CT GAT GGC GAT TG	673	65°C
	recNR	CWC CTG TAT CAA CTT CAT CAA A		
<i>W. koreensis</i>	WeikorF	GTG CTG GTC TGC GTA AAA TA	812	64.5°C
	recNR	CWC CTG TAT CAA CTT CAT CAA A		
<i>W. minor</i>	WeiminF	GTT ACA GAC GCA ACA GGC CT	325	65°C
	recNR	CWC CTG TAT CAA CTT CAT CAA A		
<i>W. soli</i>	WeisolF	AGA GAT TGA ACC CCT GCT A	661	67°C
	WeisolR	GGC TTG GCG GAC TGC GGT TA		
<i>W. thailandensis</i>	WeithF	GCG ACG GCA ATG AGT GAG TT	660	65°C
	recNR	CWC CTG TAT CAA CTT CAT CAA A		
<i>W. viridescens</i>	WeiviF	CGA CAA AGC GTACGC GGA G	343	67°C
	WeiviR	CTC TAA TCC GTC ATG CAC		

다. 한국산 및 중국산 김치시료 및 DNA 추출

한국산 및 중국산 김치에 특이적으로 존재하는 *Weissella* 속 균주의 검출을 위해 사용된 김치시료는 본 연구자들이 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가를 위해 선행연구에서 수집한 한국산 및 중국산 김치시료의 여과액을 냉동보존하였다가 해동하여 사용하였다[Lee et al. 2010]. 김치국물 여과액 4 mL을 원심분리하여 균체를 회수한 다음, Genome DNA extraction kit (Axygen)을 사용하여 DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *Weissella* 속 균주의 빠른 동정을 위한 *recN* 유전자 특이적 PCR primer의 유용성

Table 3-2에는 *Weissella* 속 9종 균주의 빠른 동정 및 검출을 위해 최종적으로 결정된 *recN* 유전자 특이적 PCR primer, PCR 산물의 크기, annealing 온도를 정리하였다. Table 3-1에 나타낸 8종의 *Weissella* 속 표준균주 및 *W. koreensis* KK0101, 그리고 김치에서 자주 검출되는 *Lactobacillus* 속 균주 6종, *Weissella* 속과 근연 관계에 있는 *Oenococcus* 및 *Leuconostoc* 속의 5종 표준균주를 대상으로 PCR을 수행한 결과, 각각의 primer pair에 의해 *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. hellenica*, *W. kandleri*, *W. koreensis*, *W. minor*, *W. soli*, *W. thailandensis*, *W. viridescens* 특이적인 PCR 산물이 증폭되었으며, 증폭된 PCR 산물의 크기도 예상과 일치하였다(Fig. 3-1). 또한 증폭산물의 염기서열 결정을 통하여 각 균주에 해당하는 증폭산물이 생성된 것을 확인하였다. 그러나 증폭 대상 균주를 제외한 다른 균주들로부터는 각 primer pair에 의한 증폭산물이 형성되지 않아 *recN* 유전자 특이적 PCR이 *Weissella* 속 균주들의 종 수준에서의 특이적 검출 및 동정에 이용될 수 있음을 확인하였다.

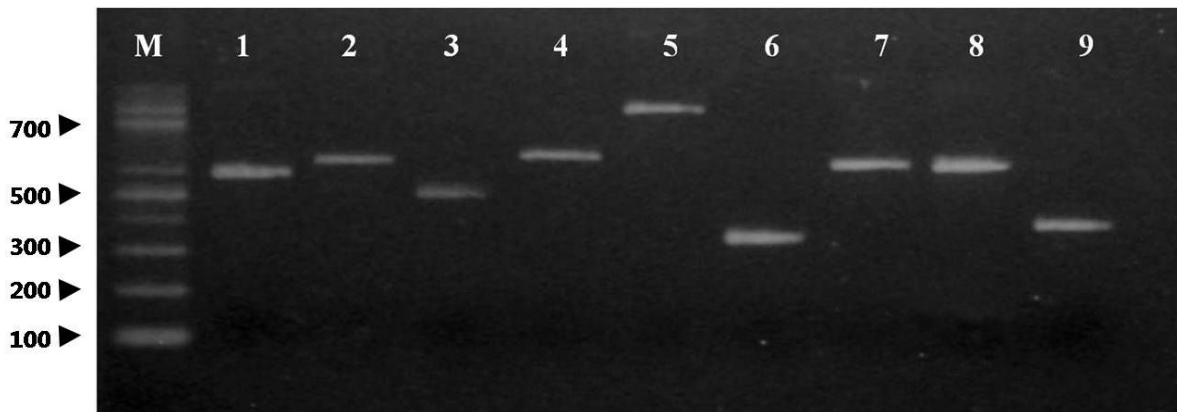


Fig. 3-1. PCR amplification of the *recN* gene from *Weissella* spp.

Lanes: M, 100 bp DNA size marker (SolGent, Korea); 1, *W. cibaria* KCTC 3817; 2, *W. confusa* KCTC 3499; 3, *W. hellenica* KCTC 3668; 4, *W. kandleri* KCTC 3610; 5, *W. koreensis* KK0101; 6, *W. minor* KCTC 3604; 7, *W. soli* KCTC 3789; 8, *W. thailandensis* KCTC 3751; 9, *W. viridescens* KCTC 3504. All reference strains are type strains except *W. koreensis* KK0101.

나. *recN* 특이적 PCR을 이용한 한국산 및 중국산 김치 중의 *Weissella* 속 균주의 특이적 검출

선정된 primer pair가 종 수준에서의 *Weissella* 속 균주 검출 및 동정에 유용한 것으로 확인됨에 따라 한국산 및 중국산 김치를 대상으로 *Weissella* 속 균주들의 PCR 검출을 시도하였다. 검출 대상은 *Weissella* 속 균주 중에서 김치에서 빈번하게 검출되는 *W. cibaria*와 *W. koreensis* 그리고, 본 연구자들의 선행연구에서 한국산 김치 및 중국산 김치로부터 각각 특이적으로 검출된 *W. confusa* 및 *W. soli*로 한정하였다. 김치시료에 존재하는 4종 *Weissella* 속 균주의 특이적 PCR 검출에 앞서 *recN* 유전자의 특이적 증폭에 필요한 김치시료 유래 DNA의 농도를 결정하였다. 이들 4종의 검출을 위해 사용한 template DNA는 각 균주들이 검출된 선행연구에 근거하여 각 균주들이 가장 많이 검출된 시료로부터 추출하였다. PCR법을 통해 검출 가능한 DNA의 최소농도 결정을 위해 김치로부터 추출한 DNA를 단계적으로 희석하여 PCR을 수행한 결과, *W. cibaria*는 10 ng, *W. koreensis*는 20 ng 농도에서 그리고 *W. confusa*와 *W. soli*는 1 ng 농도에서 검출이 가능하였다(Fig. 3-2). 따라서 김치시료에 존재하는 *Weissella* 속 균주의 종 수준에서의 검출을 위한 template DNA는 20 ng을 적용하였다.

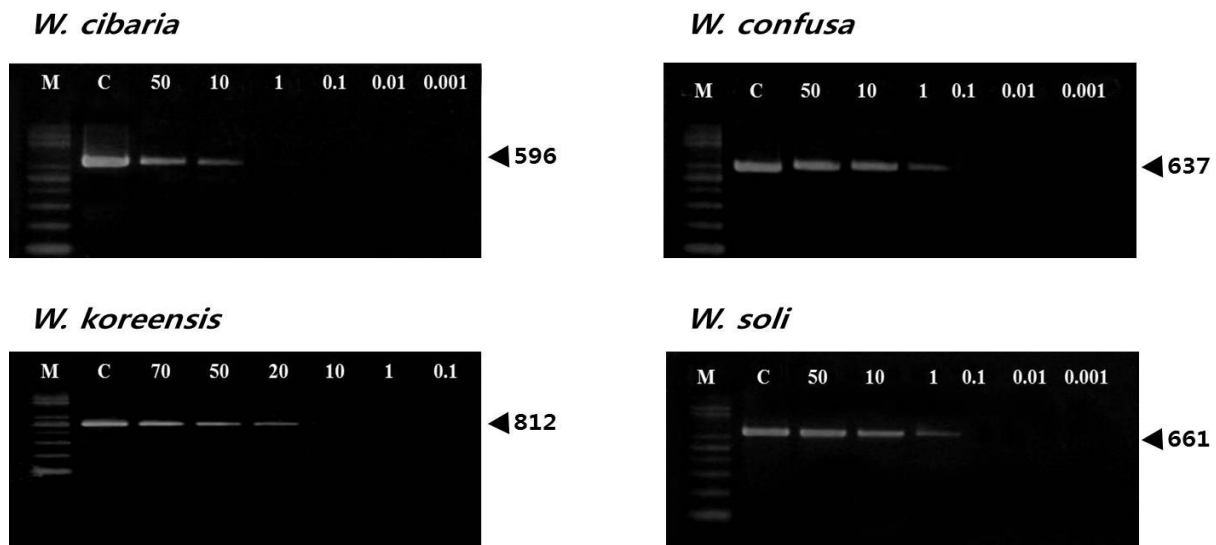


Fig. 3-2. Amplified PCR products according to the template DNA concentration.

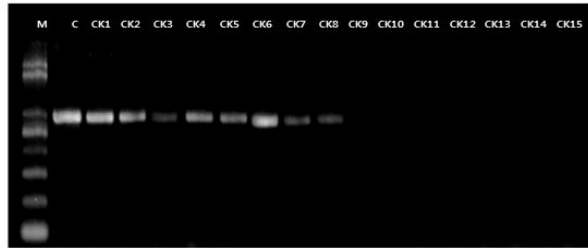
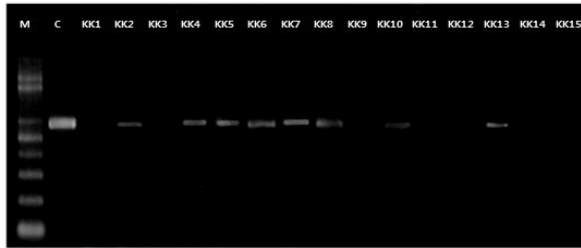
Template DNA was extracted from *kimchi* samples. PCR primer pairs specific for *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. koreensis*, and *W. soli* were used for the detection of each species. Lanes M and C are a 100 bp DNA size marker (SolGent, Korea) and positive control, respectively. Template DNA was used at the ng concentration.

김치시료로부터 추출한 DNA를 이용한 PCR 검출 결과에 따라 한국산 및 중국산 김치시료 각각 15종을 대상으로 20 ng의 template DNA 농도를 적용하여 특이적 PCR (Species-specific PCR)을 수행, 4종 *Weissella* 속 균주의 존재를 확인하였다. 한국산 김치의 경우, *W. cibaria*는 8종, *W. confusa*는 9종, *W. koreensis*는 4종의 김치에서 검출되었지만, *W. soli*는 검출되지 않았다. 중국산 김치에서는 *W. cibaria*가 8종, *W. confusa*는 7종, *W. koreensis*는 11종, *W. soli*는 11종의 김치로부터 검출되었다(Fig. 3-3). *W. cibaria*와 *W. confusa*는 7종 이상의 한국산 및 중국산 김치로부터 검출되었고, *W. koreensis*와 *W. soli*는 중국산 김치에서 빈번하게 검출되었다. 한국산 김치보다 다수의 중국산 김치에서 검출된 *W. koreensis*와 *W. soli*는 발효 초기의 한국산 김치에서는 상대적으로 적은 양이 존재하거나 존재하지 않는 것으로 나타났다.

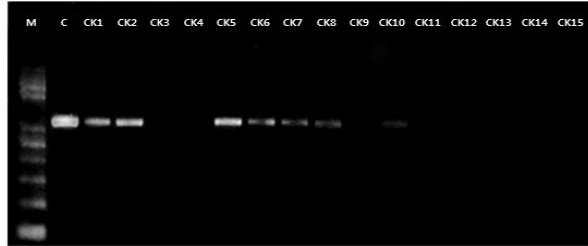
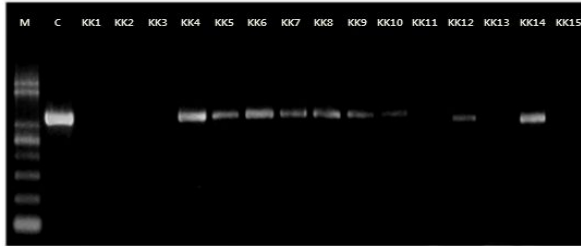
Korean *kimchi*

Chinese *kimchi*

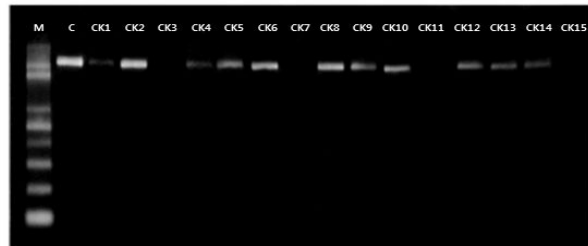
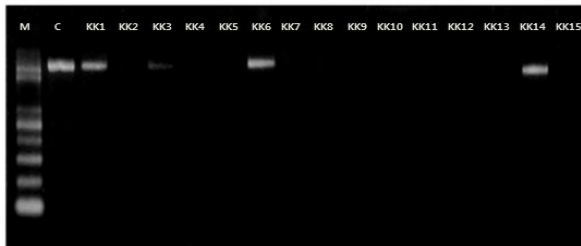
W. cibaria



W. confusa



W. koreensis



W. soli



Fig. 3-3. Detection of *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. koreensis*, and *W. soli* from the DNA extracted from Korean and Chinese *kimchi* samples.

Korean and Chinese *kimchi* samples are represented as KK and CK, respectively. C is the positive control.

다. 검출방법에 따른 *Weissella* 속 유산균의 검출 비교

Table 3-3에는 배양법을 이용하여 미생물을 검출한 선행연구의 결과와 시료로부터 추출한 DNA에 존재하는 특정 미생물의 DNA를 PCR로 검출하는 배양 비의존적 방법의 적용 결과를 정리하였다[Lee et al. 2010]. 배양법을 통하여 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성을 평가한 선행연구에서는 *W. confusa*가 한국산 김치에서만 검출되었지만, 추출한 DNA를 이용하는 PCR 검출법을 적용한 경우 중국산 김치에서도 검출되었고, 김치시료별 *Weissella* 속 4종 균주의 PCR 검출 결과가 배양법을 적용한 결과와 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 배양법과 배양 비의존적 방법의 결과가 일치하는 확률은 한국산 김치의 경우 *W. cibaria* 60%, *W. confusa* 80%, *W. koreensis* 67%, *W. soli* 100%로 나타났고, 중국산 김치의 경우 *W. cibaria* 80%, *W. confusa* 53%, *W. koreensis* 47%, *W. soli* 33%의 일치율을 보였다. 중국산 김치보다는 한국산 김치의 분석 결과가 높은 일치율을 보인 점은 선행연구에서 중국산 김치의 미생물상이 한국산에 비해 다양한 것으로 분석된 결과와 관련이 있는 것으로 한국산 김치의 미생물상이 중국산에 비해 안정적인 것으로 추정된다[Lee et al. 2010].

이러한 불일치는 기존의 미생물 군집분석 연구에서 지적되었던 문제점으로 본 연구에서 새롭게 나타난 결과는 아니다[Forney et al. 2004]. 미생물은 배양에 사용한 배지에 따라 선택적으로 성장하여 전체 군집에서 차지하는 비중이 다소 높게 평가되지만 실제로 전체 군집에서 차지하는 비중이 상대적으로 적어 PCR 증폭이 일어나지 않기도 한다. 뿐만 아니라 시료로부터 DNA를 추출하는 과정과 PCR 과정에서 특정 미생물의 존재가 축소될 가능성도 적지 않다. 또한 배양법을 적용한 경우에는 시료를 채취한 시점의 생균수가 결과로 나타나지만, 시료로부터 DNA를 추출하여 군집 내의 특정 미생물의 DNA를 검출하는 배양 비의존적 방법을 채택하는 경우, 사균(dead cell)의 DNA가 미생물 군집의 해석에 영향을 주게 되어 서로 다른 결과가 나타나게 된다. 따라서 배양 비의존적 방법에 의한 특정 미생물의 검출은 미생물의 상태에 관계 없이 그 미생물의 존재 여부를 결정하게 된다.

실험법에 관계 없이 한국산 김치로부터는 *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. koreensis*가 검출되었지만, *W. soli*는 검출되지 않았다. 한편 중국산 김치로부터는 PCR 검출법의 적용에 의해 배양법에 의하여 검출되지 않았던 *W. confusa*가 검출되었을 뿐만 아니라, 배양법을 적용하였을 경우 15개 시료 중 3개 시료에서 검출되었던 *W. soli*가 11개 시료로부터 검출되어 73% 확률로 검출빈도가 높아졌다. 따라서 PCR 검출법의 적용으로 *W. confusa*는 김치의 원산지 판별을 위한 검출 대상이 되지 못하는 것으로 나타났지만, *W. soli*의 검출에 대한 신뢰도는 높아진 것으로 사료된다.

W. soli 표준균주는 토양으로부터 분리되었고[Marnusson et al. 2002], 지금까지 김치에

서 분리된 바 없으며, 양배추나 당근의 뿌리, 사료용 풀 등에서 검출되었다[Yang et al. 2010]. 중국산에서만 *W. soli*의 검출이 확인된 것은 *W. soli*가 김치발효에 관여하는 유산균이라기 보다는 토양으로부터 유래되어 잔존하는 것으로 추측되며 본 연구자들이 예상한 바와 같이 원재료의 재배 산지가 미생물 검출의 차이로 나타난 것으로 추측할 수 있다.

본 연구에서 수행한 특정 미생물의 특이적 검출을 이용한 중국산 김치의 판별은 지표미생물의 선정 과정에서 중국으로부터 수입된 배추와 부재료를 사용한 경우 및 소금에 절여 수입된 절임배추로 한국에서 제조한 김치에 대한 고려가 없었다는 점과 *W. soli*가 모든 중국산 김치시료로부터 검출되지 않는다는 점에서 한계점을 가지고 있지만, 미생물 군집의 차이를 이용한 새로운 과학적 검증법이 제시되어 그 가능성이 검토되었다는 점에서 의의를 가지고 있다.

Table 3-3. Detection of *W. cibaria*, *W. confusa*, *W. koreensis*, and *W. soli* in Korean and Chinese *kimchi* samples by culture-dependent and culture-independent methods.

Sample	Korean <i>kimchi</i>								Chinese <i>kimchi</i>								
	<i>W. cibaria</i>		<i>W. confusa</i>		<i>W. koreensis</i>		<i>W. soli</i>		<i>W. cibaria</i>		<i>W. confusa</i>		<i>W. koreensis</i>		<i>W. soli</i>		
	16S rDNA	PCR	16S rDNA	PCR	16S rDNA	PCR	16S rDNA	PCR	16S rDNA	PCR	16S rDNA	PCR	16S rDNA	PCR	16S rDNA	PCR	
1					○	○			○	○			○			○	
2		○			○				○	○			○			○	
3	○							○		○						○	
4	○	○	○	○	○				○	○				○		○	
5	○	○	○	○					○	○			○		○	○	
6	○	○		○				○	○				○			○	
7		○	○	○						○			○			○	
8	○	○	○	○					○	○			○	○	○	○	
9	○		○	○					○				○	○	○		
10	○	○	○	○									○	○	○	○	
11	○		○											○			
12	○		○	○											○	○	
13	○	○	○		○									○	○		
14			○	○	○	○									○	○	
15																	
Total	10	8	10	9	5	4			7	8			7	5	11	3	11

The isolated bacteria by culture-dependent method were identified by 16S rDNA sequence analysis and species-specific PCR amplification was applied to detect each species by culture-independent method.

제 4 절 *GyrB* 유전자 특이적 PCR을 이용한 *Serratia proteamaculans* 검출법 개발 및 중국산 김치 판별

1. 연구 내용

발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가로부터 *Weissella soli*와 함께 *Serratia proteamaculans*가 중국산 김치에서 검출되지만, 한국산 김치로부터는 검출되지 않았다. 따라서 *S. proteamaculans*의 특이적 PCR 검출법을 개발하여 김치 원산지판별기술로서의 적용 가능성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용한 *Serratia* 속 표준균주(type strain)는 농업유전자원정보센터 (KACC)로부터 분양 받았으며 *Serratia* 속과 근연 관계에 있는 균주 12종은 본 보고서 제 3장 1절에서 기술한 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가 과정에서 분리 동정한 균주를 사용하였다(Table 4-1). 모든 균주는 Nutrient broth (Difco, USA)를 사용하여 30°C, 미호 기적 조건에서 배양하였으며, 고체배지의 제조에는 한천을 1.5% (w/v) 첨가하였다.

나. *S. proteamaculans* 특이적 검출을 위한 PCR primer 및 PCR 조건

*S. proteamaculans*의 특이적 검출을 위한 PCR primer는 계통발생학적으로 *S. proteamaculans*와 근연관계에 있는 bacteria 중에서 GenBank에 등록된 *gyrB* 유전자 염기서열을 PHYDIT program (<http://plaza.snu.ac.kr/~jchun/phydit/>)을 이용하여 정렬한 후, 종(species) 수준에서 *S. proteamaculans* 특이적인 부분을 선정하여 제작하였다. Table 4-1에는 primer 제작에 사용한 *gyrB* 유전자의 accession number를 균주 별로 정리하였다.

실험에 사용한 균주의 total DNA는 Nutrient 배지에서 30°C, 24시간 배양한 균체로부터 Genome DNA extraction kit (Axygen, CA, USA)을 사용하여 추출하였다. PCR은 50 µL 반응계에서 10 ng template DNA, 0.1 mM dNTP, 1.25 U *Taq* polymerase (RBC Bioscience, Taipei, Taiwan) 및 각 primer를 10 pmol 농도로 첨가하여 T3000 thermal cycler (Biometra, Germany)를 사용하여 수행하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C 1분간 변성, 검출 균주에 따른 annealing 1분, 72°C 1분간의 중합반응 과정을 30회

반복하고, 마지막으로 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단했다. PCR 산물은 2% agarose gel을 사용하여 전기영동한 후, ethidium bromide 용액으로 염색하여 band를 확인하였다.

Table 4-1. Accession numbers of the *gyrB* gene and reference strains used in this study.

Number	Species	Strain designation	<i>gyrB</i> gene
1	<i>Serratia proteamaculans</i>	KACC12322	AJ300531
2	<i>Serratia ficaria</i>	KACC12322	AJ300540
3	<i>Serratia fonticola</i>	KACC12323	AY370866
4	<i>Serratia grimesii</i>	KACC11959	AJ300538
5	<i>Serratia liquefaciens</i>	KACC11923	AJ300537
6	<i>Serratia marcescens</i> subsp. <i>marcescens</i>	KACC11961	AB014946
7	<i>Serratia odorifera</i>	KACC12324	AJ300533
8	<i>Serratia plymuthica</i>	KACC11971	AJ300532
9	<i>Serratia quinivorans</i>	KACC12326	
10	<i>Serratia rubidaea</i>	KACC11931	AJ300530
11	<i>Serratia ureilytica</i>	KACC11950	
12	<i>Serratia entomophila</i>	KACC12108	AJ300542
13	<i>Citrobacter murliniae</i>	CK0009	
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CK0020	EU499066
15	<i>Proteus hauseri</i>	CK0028	
16	<i>Raoultella terrigena</i>	CK0029	AJ300549
17	<i>Citrobacter braakii</i>	CK0047	
18	<i>Enterobacter asburiae</i>	CK0098	AY370835
19	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	CK0099	AY370836
20	<i>Shewanella putrefaciens</i>	CK0201	AF005683
21	<i>Erwinia persicina</i>	CK0224	HQ393610
22	<i>Rhizobium radiobacter</i>	CK0516	AM418832

다. 한국산 및 중국산 김치시료 및 DNA 추출

S. proteamaculans 특이적 검출을 위한 김치시료는 발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가를 위해 선행연구에서 수집하여 냉동보존한 김치시료의 여과액을 동결건조하여 사용하였다. *S. proteamaculans* 특이적 검출 실험은 전체 김치시료 48종 중

Serratia 속 균주가 검출된 중국산 김치 12종과 한국산 김치 4종을 대상으로 수행하였다. Genome DNA extraction kit (Axygen)을 사용하여 DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo, USA)를 사용하여 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

가. *S. proteamaculans* 특이적 검출을 위한 PCR primer의 유용성

본 연구에서 *S. proteamaculans*의 빠른 동정 및 검출을 위해 결정된 특이적 forward primer *gyrB128F* (5'-CTA CGC CAT GGG CGA ACC ACA-3')와 reverse primer *gyrB761R* (5'-ATC AGA TTA ACG ACC AGC TTC PCR-3')를 이용하여 특이적 검출의 조건을 검토한 결과, annealing 온도는 61°C로 결정되었고, 예상과 일치하는 633 bp의 증폭산물이 생성되었으며, 염기서열 결정 결과 *S. proteamaculans*의 16S rDNA가 증폭된 것을 확인하였다. Table 4-1의 12종 *Serratia* 속 표준균주 및 근연 관계에 있는 10종의 분리균주를 대상으로 *S. proteamaculans* 특이적 PCR을 수행한 결과, 본 실험에서 결정한 PCR primer에 의해 *S. proteamaculans* 특이적 PCR 산물이 증폭되었으며, 증폭된 PCR 산물의 크기도 예상과 일치하였다(Fig. 4-1). PCR primer의 유용성 확인을 위해 사용한 bacteria는 Table 4-1에 제시된 균주들을 사용하였고, Fig. 4-1에 제시된 PCR 검출 결과와 Table 4-1의 균주 순서는 일치한다.

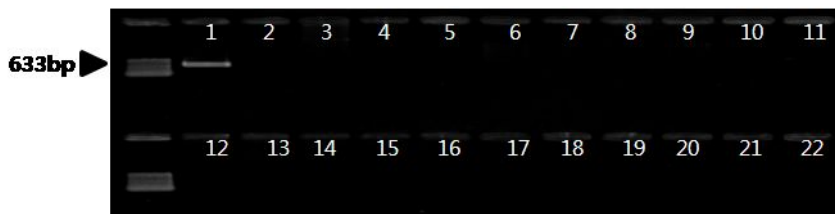


Fig. 4-1. *S. proteamaculans*-specific PCR detection using the *gyrB128F*-*gyrB761R* primer pair.
The number in the electrophoresis results corresponds to that in Table 4-1.

나. *gyrB* 특이적 PCR을 이용한 한국산 및 중국산 김치의 *S. proteamaculans* 검출

김치시료에 존재하는 *S. proteamaculans* 특이적 PCR 검출에 앞서 *gyrB* 유전자의 특이적 증폭에 필요한 김치시료 DNA의 농도를 결정하였다. *S. proteamaculans* 검출을 위해 사용한 template DNA는 선행연구에 근거하여 *S. proteamaculans*가 가장 많이 검출된 김치시료로부터 추출하였다. PCR법을 통해 검출 가능한 DNA의 최소농도 결정을 위해 시료로부터 추출한 DNA를 100 ng에서 1 ng까지 단계적으로 희석하여 PCR을 수행한 결과, 30 ng의 template DNA를 이용한 경우에서 *S. proteamaculans*의 검출이 가능하였다(data not shown). 따라서 김치시료에 존재하는 *S. proteamaculans*의 검출을 위한 template DNA는 30 ng을 적용하였다.

결정된 PCR 조건 및 template DNA 농도에 따라 선행연구에서 *S. proteamaculans*를 포함하는 *Serratia* 속 bacteria가 검출된 중국산 12종과 한국산 김치시료 4종 대상으로 *S. proteamaculans* 특이적 PCR 검출을 수행하였다. 배양법을 적용한 기존의 실험에서 *S. proteamaculans*는 7종의 중국산 김치시료로부터 분리되었지만, 특이적 PCR 검출에 의해서는 6종의 김치시료로부터 검출되었다. 한편 중국산 김치를 대상으로 특이적 PCR 검출법을 적용한 경우, *S. proteamaculans*를 검출하지 못한 경우가 2건 발생하였고, 검출되지 않았던 김치시료 1개로부터 특이적 PCR에 의해 검출되는 결과도 나타났다.

선행연구[Lee et al. 2010]에서 한국산 김치로부터도 *Serratia* 속이 검출되기는 하였지만, 검출빈도가 낮고, *S. proteamaculans*는 배양을 통해 분리되지 않았다. 그러나 특이적 PCR 검출에 의해 2종의 김치시료로부터 *S. proteamaculans*의 검출이 확인되었다(Table 4-2). Table 4-2에는 배양법을 이용하여 *S. proteamaculans*를 검출한 선행연구의 결과와 시료로부터 추출한 DNA에 존재하는 *S. proteamaculans*를 검출한 결과를 비교 정리하였다. *gyrB* 특이적 PCR을 적용한 경우, 2종의 한국산 김치로부터 *S. proteamaculans*가 검출됨에 따라 *S. proteamaculans*는 김치 원산지판별을 위한 지표균으로 적용하기 힘든 것으로 나타났다.

Table 4-2. Detection of *S. proteamaculans* in Korean and Chinese *kimchi* samples by culture-dependent and culture-independent methods.

<i>Kimchi</i> origin	Sample	Detection method		
		Culture-dependent	Culture-independent	
China	1-3	O		
	2-1	O	O	
	2-2	O	O	
	2-4			
	2-5			
	3-1	O	O	
	3-2	O	O	
	3-3			
	3-4		O	
	3-5	O		
	4-4			
	4-5	O	O	
	Korea	1-4		
		2-1		O
		2-3		O
4-1				

The isolated bacteria by culture-dependent method were identified by 16S rDNA sequence analysis and species-specific PCR amplification was applied to detect *S. proteamaculans* by culture-independent method.

제 5 절 T-RFLP 분석을 이용한 한국산 및 중국산 김치 원산지판별 가능성 평가

1. 연구 내용

최근 들어 미생물 환경(군집)의 분석에 다양한 배양 비의존적인 DNA fingerprinting 기술이 개발되었고, DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis)와 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 분석은 미생물 구조 및 집단 구성원 변화의 모니터링에 사용되는 대표적 방법이다. 이미 서구에서는 여러 종류 발효식품의 미생물 환경 분석에 적용되었고, 김치발효 관련 미생물 연구에서도 DGGE가 적용된 바 있다[Lee et al. 2005a; Park et al. 2003]. DGGE는 T-RFLP 분석과 함께 미생물 구조 분석에 적합한 기술로 평가되고 있으나 연구자에 따른 재현성이 다소 떨어지는 것으로 평가되고 있다. T-RFLP는 재현성의 측면에서 높은 평가를 받고 있으며, DGGE에 비해서 시료의 처리 속도가 빠르다는 장점이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 김치 원산지판별기술 개발의 한 방법으로 미생물군집의 다양성 및 역동성의 모니터링에 빠르게 적용되고 있는 T-RFLP 분석을 적용하여 그 가능성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

가. 균주 및 배양 조건

본 실험에 사용한 표준 유산균은 Korean Collections for Type Cultures (KCTC), Korean Culture Center for Microorganisms (KCCM)으로부터 구입하였고, *Weissella koreensis* 표준균주는 특허균주로 등록되어 분양이 불가능한 관계로 본 실험실에서 김치로부터 분리 동정한 *W. koreensis* KK0101 균주를 사용하였다. 이들 균주들은 MRS 액체배지(Difco, USA) 또는 1.5% (w/v) 한천을 첨가한 고체배지를 사용하여 30°C, 미호기성 조건에서 배양하였다.

나. 한국산 및 중국산 김치시료 및 DNA 추출

한국산 및 중국산 김치에 존재하는 미생물군집 평가를 위한 한국산 시료는 대형할인점에서 구입하였고, 중국산 김치는 중국 산둥성에서 제조되어 수입된 것들을 수집하였다. 원산지별로 각각 7종씩 총 14종을 사용하였다. 김치시료는 국물과 고형분을 분리한 후, 국물의 pH를 pH meter (Beckman Coulter, USA)로 측정하였다. 고형분은 무게대비 2배의 생리식염수를

첨가하여 고형분에 존재하는 미생물을 추출하였고, 동량의 김치 국물과 섞어 멸균한 거즈로 여과하였다. T-RFLP 분석을 위한 시료는 원심분리를 통해 균체를 회수한 후, DNeasy[®] tissue kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 total DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

다. T-RFLP 분석을 위한 16S ribosomal RNA 유전자 증폭

T-RFLP 분석에 필요한 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 증폭에는 다양한 bacteria의 증폭에 사용되는 eubacterial universal primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')를 forward primer로 사용하였고, reverse primer로는 eubacterial universal primer 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3')과 본 연구실에서 설계한 16R (5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG-3')을 사용하였다[Shim and Lee 2008b]. 16R primer는 GenBank database에 수록된 *Lactobacillus plantarum* (AL935260), *Lactobacillus pentosus* (D79211), *Lactobacillus paraplantarum* (AJ306297), *Bacillus cereus* (AE017194), *Listeria monocytogenes* (AL591981), *Bacillus subtilis* (Z99107), *Lactobacillus acidophilus* (CP000033), *Streptococcus thermophilus* (CP000023), *Streptococcus pyogenes* (AE004092), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (AE006456), *Clostridium perfringens* (CP000246), *Desulfotalea psychrophila* (CR522870), *Nitrobacter hamburgensis* (CP000319), *Shewanella denitrificans* (CP000302), *Vibrio fischeri* (CP000020), *Bifidobacterium longum* (AE014295), *Treponema denticola* (AE017226), *Ehrlichia canis* str. *Jake* (CP000107), *Chlamydia trachomatis* (DQ019307)의 16S rDNA 염기서열을 ClustalX multiple alignment program (Higgins Laboratory, Ireland)을 이용하여 정렬한 후, 보존영역을 선정하였고, 다인바이오(Korea)에서 제작하였다. 27F primer의 5'-말단에는 phosphoramidite dye인 6-carboxyfluorescein(6-FAM)으로 표식하였다(TaKaRa, Japan).

PCR 반응에는 UNOII Thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였으며, 100 μ L 반응계에는 300 ng DNA, 0.25 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 20 pmol의 primer를 첨가하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C 1분 변성, 58°C 1분 annealing, 72°C 1분 중합반응 과정을 30회 반복하고, 마지막에 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. PCR 반응산물은 0.8% agarose gel 전기영동으로 확인하였으며, 16S rDNA 크기에 해당하는 DNA band를 Gel & PCR purification system (SolGent, Korea)으로 회수, 정제한 후 -20°C에서 보존하였다.

라. T-RFLP 분석

Agarose gel로부터 회수·정제한 PCR 반응산물은 4염기서열 인식 제한효소 *AluI*, *HaeIII*, *MseI*, *MspI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)을 각각 20 Unit 첨가하여, 37°C에서 5시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 말단제한단편(T-RF)의 분석은 수탁업체(SolGent)에 의뢰하여 자동염기서열결정장치 ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA)에 의해 GeneScan mode에서 수행하였다. T-RF의 크기는 Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems)에서 Local southern 방법에 의해 결정되었으며, standard DNA size marker로는 GS-500 ROX와 GS-1000 ROX (Applied Biosystems)를 사용하였다. T-RFLP 분석의 결과로 나타난 각의 T-RF peak는 분류학적 단위(Operational Taxonomic Unit, OTU)의 다양성을, peak의 면적은 정량성을 의미하는 것으로 간주하였다. 각 T-RF에 해당하는 OTU의 확인은 Microbial Community Analysis III web site (<http://mica.ibest.uidaho.edu/>)의 Virtual Digest (ISPaR)을 이용하거나, 기존의 침체류에서 보고된 유산균의 16S rDNA 염기서열을 RDP database와 GenBank database로부터 추출한 다음, webcutter 2.0 program (<http://bio.lundberg.gu.se/cutter2/>)을 이용하여 예상되는 T-RF의 크기를 직접 계산하였다.

김치시료 수집을 제외한 모든 실험 과정은 독립적으로 3회 반복하였고, 실험 결과는 평균치로 표시하였다. 발효에 따른 미생물군집 천이 분석을 위한 김치는 10°C에서 보존하면서 각각 0, 3, 30일에 시료를 채취하였고, 분석에 앞서 각 시료 국물의 pH를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 표준 유산균의 T-RFLP 분석

T-RFLP 분석의 결과로 나타나는 T-RF의 실험치와 예상치의 오차 확인 및 제한효소와 16S rDNA 증폭용 primer의 유용성 확인을 위하여 배추김치에서 주로 검출되는 것으로 보고된 10종의 표준 유산균으로부터 추출한 DNA를 적당히 섞어 T-RFLP 분석을 수행하였다. Fig. 5-1에는 T-RFLP 분석에서 가장 많이 사용되는 forward primer 27F와 reverse primer 1492R을 사용하여 16S rDNA를 증폭한 결과를 나타내었다. 사용한 제한효소에 따라 서로 다른 T-RF pattern이 확인되어 본 연구에 사용된 primer가 김치유산균의 16S DNA의 증폭에 유용하게 작용하는 것으로 확인되었으나, 유산균의 16S rDNA의 상동성이 높은 관계로 한개의 T-RF peak가 한 종류 이상의 분류군(taxon)을 대표하는 경우가 발생하여 유산균 각각의 추적에는 유효성이 높지 않은 것으로 나타났다.

T-RFLP 분석에서 하나의 T-RF peak가 한 종류 이상의 분류군(taxon)을 대표하는 경우, 시료에 존재하는 다양한 미생물의 종(species) 수준까지의 분석에는 장애요인이 되고 있다. 따

라서 forward primer 27F와 본 연구자들이 유산균의 선택적 검출을 목표로 설계한 reverse primer 16R을 사용하여 표준 유산균주를 대상으로 한 T-RFLP 분석을 수행하였다(Fig. 5-2). 1492R reverse primer를 사용한 경우와 마찬가지로 한 peak의 T-RF가 한 종류 이상의 분 류균을 대표하는 경우가 발생하였고, 표준 유산균을 사용한 경우에는 primer의 차이에 따른 T-RFLP 결과의 차이가 발견되지 않았다.

T-RF의 생성을 위하여 사용한 제한효소는 *AluI* 보다는 *HaeIII*와 *MseI*이 다수의 peak를 생성하여 다수의 유산균 추적에 유용한 것으로 나타났고, *MseI*을 사용하면 각 peak의 분리가 우수하여 유산균의 추적에 오류가 적을 것으로 예상된다.

Table 5-1에는 표준 유산균주를 대상으로 수행한 실험에서 측정된 T-RF의 크기와 GenBank 및 RDP database의 16S rDNA 염기서열로부터 산출된 해당 균주의 T-RF 크기를 나타내었다. 실험치와 예측치 간에는 0-7 bp 정도의 오차가 있는 것으로 나타났다.

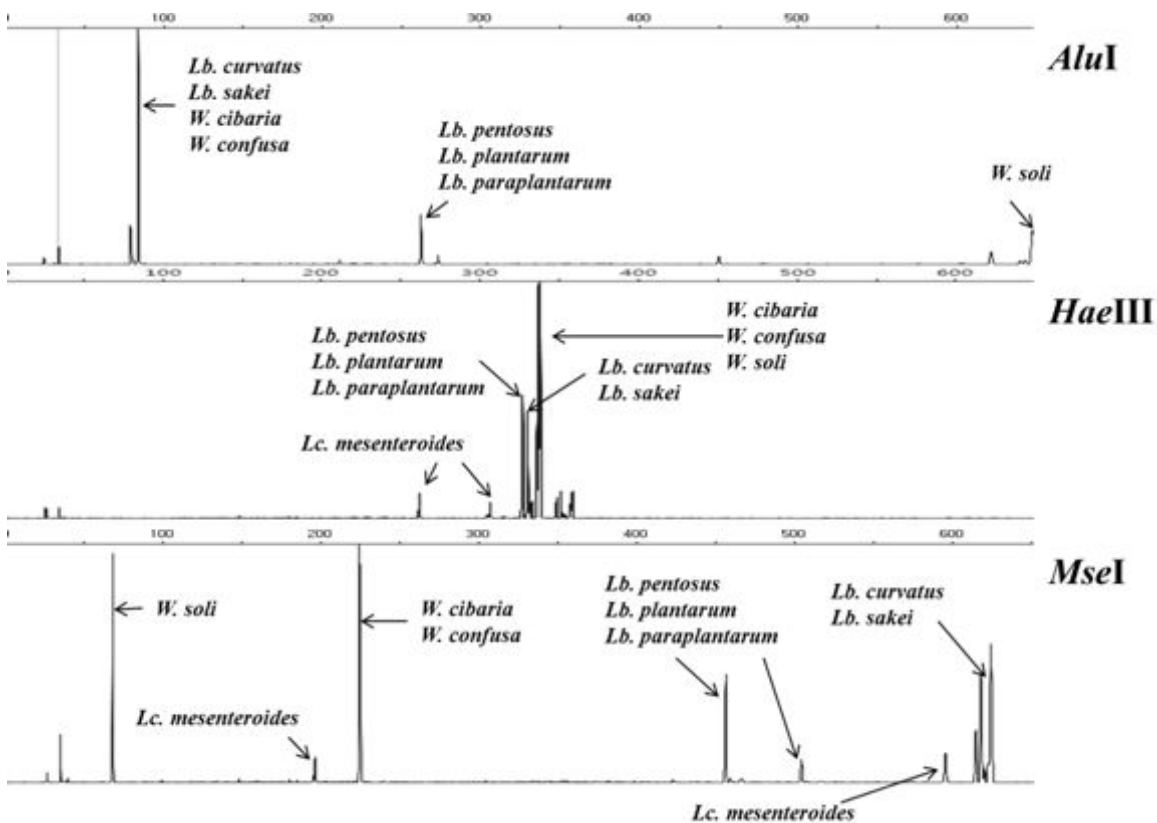


Fig. 5-1. T-RFLP profiles of reference strains (primer pair 27F-1492R).

T-RFs were generated by *AluI*, *HaeIII*, and *MseI* digestion of 16S rDNAs amplified from the total DNA mixtures of reference strains. Primers 27F and 1492R were used for the amplification of 16S rDNA. Each T-RF represents one or several bacterial species.

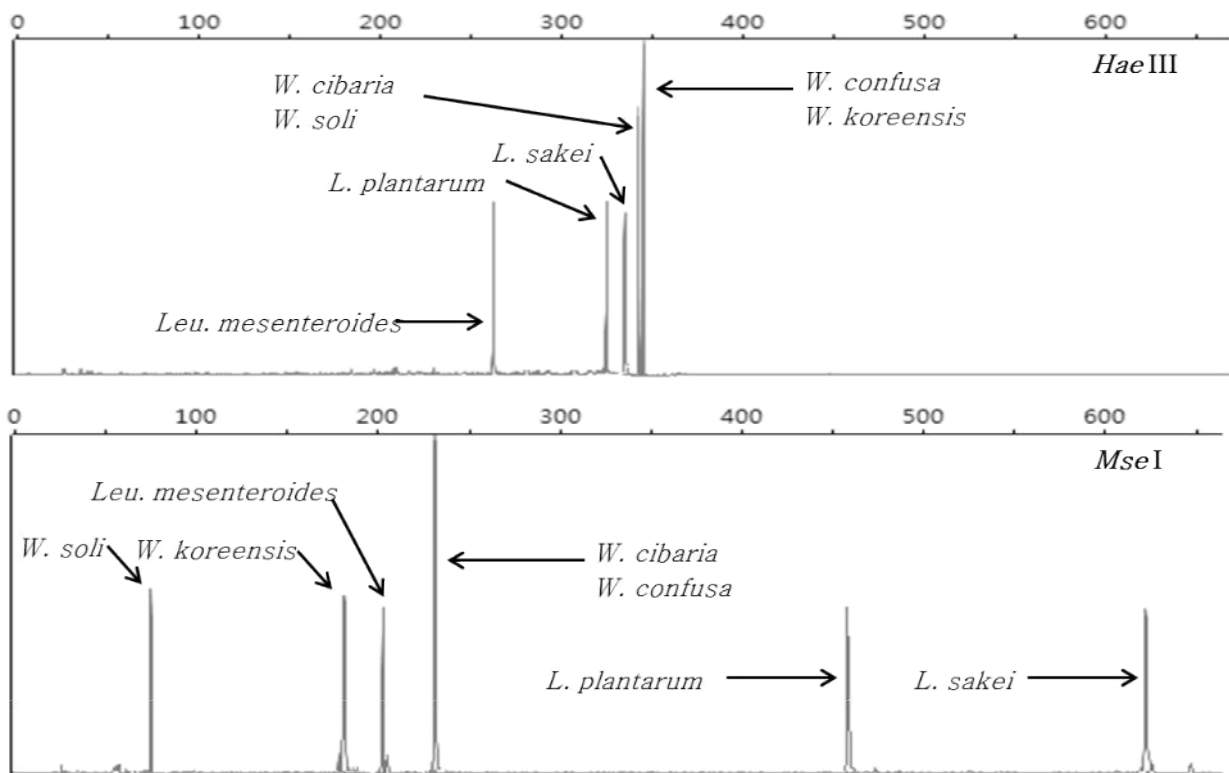


Fig. 5-2. T-RFLP profiles of reference strains (primer pair 27F-16R).

T-RFs were generated by *HaeIII* and *MseI* digestion of 16S rDNAs amplified from the total DNA mixtures of reference strains. Primers 27F and 16R were used for the amplification of 16S rDNA. Each T-RF represents one or several bacterial species.

Table 5-1. Predicted and observed T-RF sizes of reference strains.

Reference strain	Accession No.	5'-T-RF size (bp) ^a					
		<i>AluI</i>		<i>HaeIII</i>		<i>MseI</i>	
		T-RF	DB	T-RF	DB	T-RF	DB
<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC14869 ^T	CP000416	62	63	282	283	457	459
<i>Lactobacillus paraplantarum</i> ATCC700211 ^T	AJ306297	262	264	324	327	458	459
<i>Lactobacillus pentosus</i> KCCM40997 ^T	DQ239698	262	264	324	237	458	459
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3108 ^T	DQ239698	262	264	324	327	458	459
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> KCTC3603 ^T	NC_007576	84	84	332	333	623	616
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCTC3505 ^T	NC_008531	450	455	261	266	202	200
<i>Weissella cibaria</i> KCTC3817 ^T	AJ295989	84	87	336	340	226	228
<i>Weissella confusa</i> KCTC3499 ^T	AB023241	84	87	338	340	226	228
<i>Weissella koreensis</i> KK0101 ^b	-	ND	NA	338	340	182	183
<i>Weissella soli</i> KCTC3789 ^T	AY028260	643	643	336	340	73	75

^T, type strain.

^a, T-RF, observed size of T-RF; DB, predicted size of T-RF from 16S rDNA sequence in database.

^b, The strain was isolated from *kimchi* by our group.

ND, not detected, NA, not primed or not digested.

나. 16S rDNA 증폭을 위한 primer의 유용성 비교

표준 유산균을 이용한 T-RFLP 분석 결과, 제한효소 *Hae*III와 *Mse*I이 김치유산균의 검출에 있어 비교적 다수의 peak를 생성하여 다수의 유산균 추적에 유용한 것으로 나타났다. 따라서 이들 제한효소를 사용하여 forward primer 27F에 대한 reverse primer 1492R과 16R의 유용성을 평가해 보았다. 각각 2종의 한국산 및 중국산 김치시료를 대상으로 두 primer pair를 적용한 T-RFLP 분석을 수행한 결과, 표준 유산균주를 사용하여 분석한 결과와는 달리 1492R primer 보다는 16R primer를 사용한 경우에 많은 수의 peak가 생성되는 것으로 나타났다(Fig. 5-3). 따라서 시료의 원산지에 관계없이 김치에 존재하는 미생물의 다양성 분석에는 primer pair 27F-16R이 유용한 것으로 나타났다.

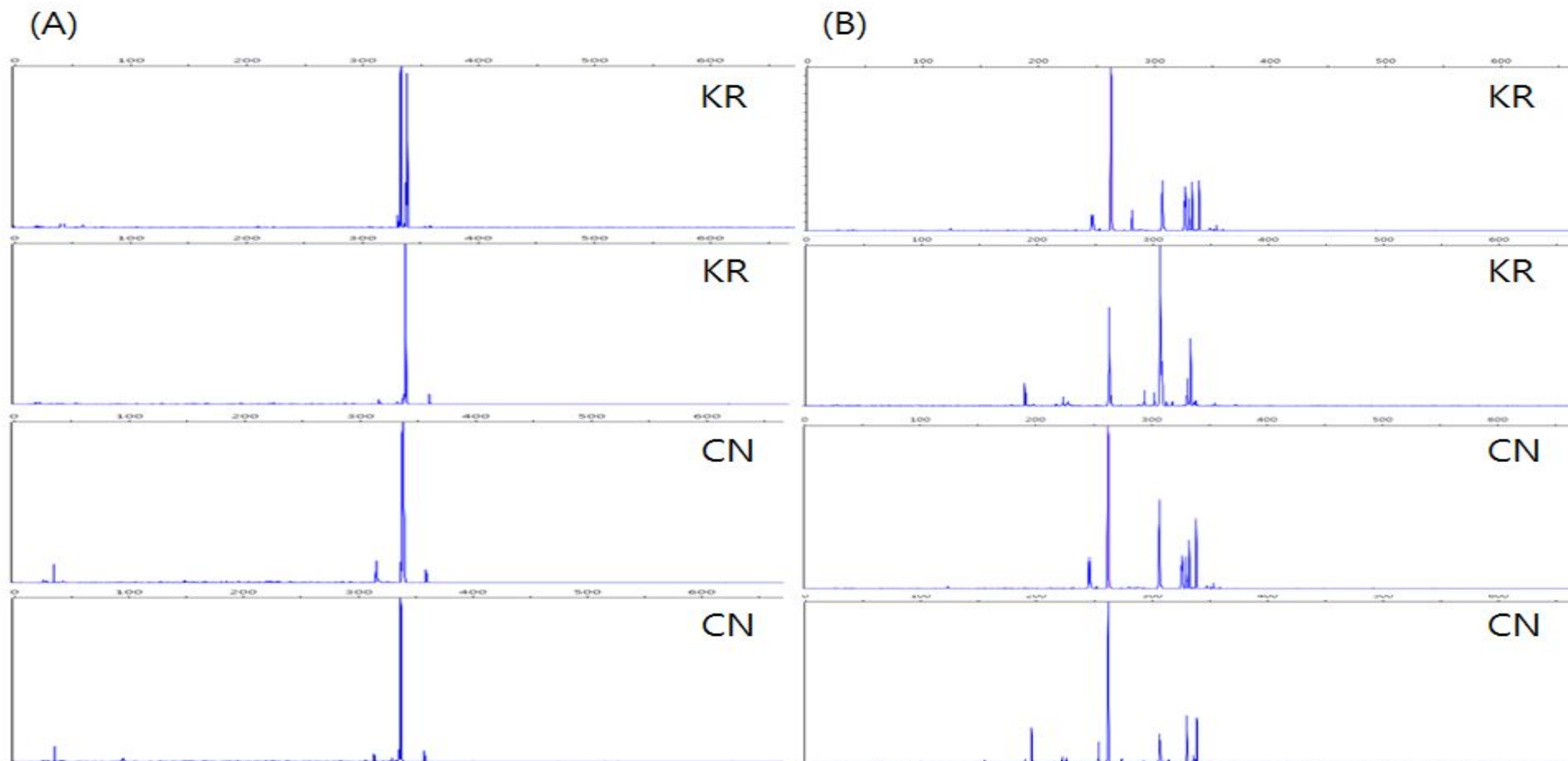


Fig. 5-3. Comparison of T-RFLP profiles for Korean and Chinese *kimchi* generated by *HaeIII*.

Primer pairs 27F-1492R (A) and 27F-16R (B) were used for the amplification of 16S rDNA.

KR, Korean *kimchi*; CN, Chinese *kimchi*.

다. 원산지에 따른 T-RFLP profile 비교

pH 5.0 이상의 한국산 및 중국산 김치시료 각 7종을 대상으로 제한효소 *AluI*, *HaeIII*, *MseI*, *MspI*을 사용한 T-RFLP 분석을 수행하여 원산지에 따른 T-RFLP profile의 차이를 검토해 보았다 (Fig. 5-4). 원산지의 차이를 구분하기 위한 기준은 a) T-RF peak 수의 차이, b) 원산지에 따른 특이적인 T-RF의 존재, c) 원산지에 따른 T-RF의 pattern 차이를 중심으로 설정하였다. 16S rDNA 증폭을 위한 primer는 27F와 16R을 사용하고, 4종류의 제한효소로 절단하여 T-RF profile pattern을 비교한 결과, 원산지에 따른 확연한 차이가 없는 것으로 나타났다. 따라서 T-RFLP 분석을 이용한 김치 원산지판별은 쉽지 않은 것으로 생각된다.

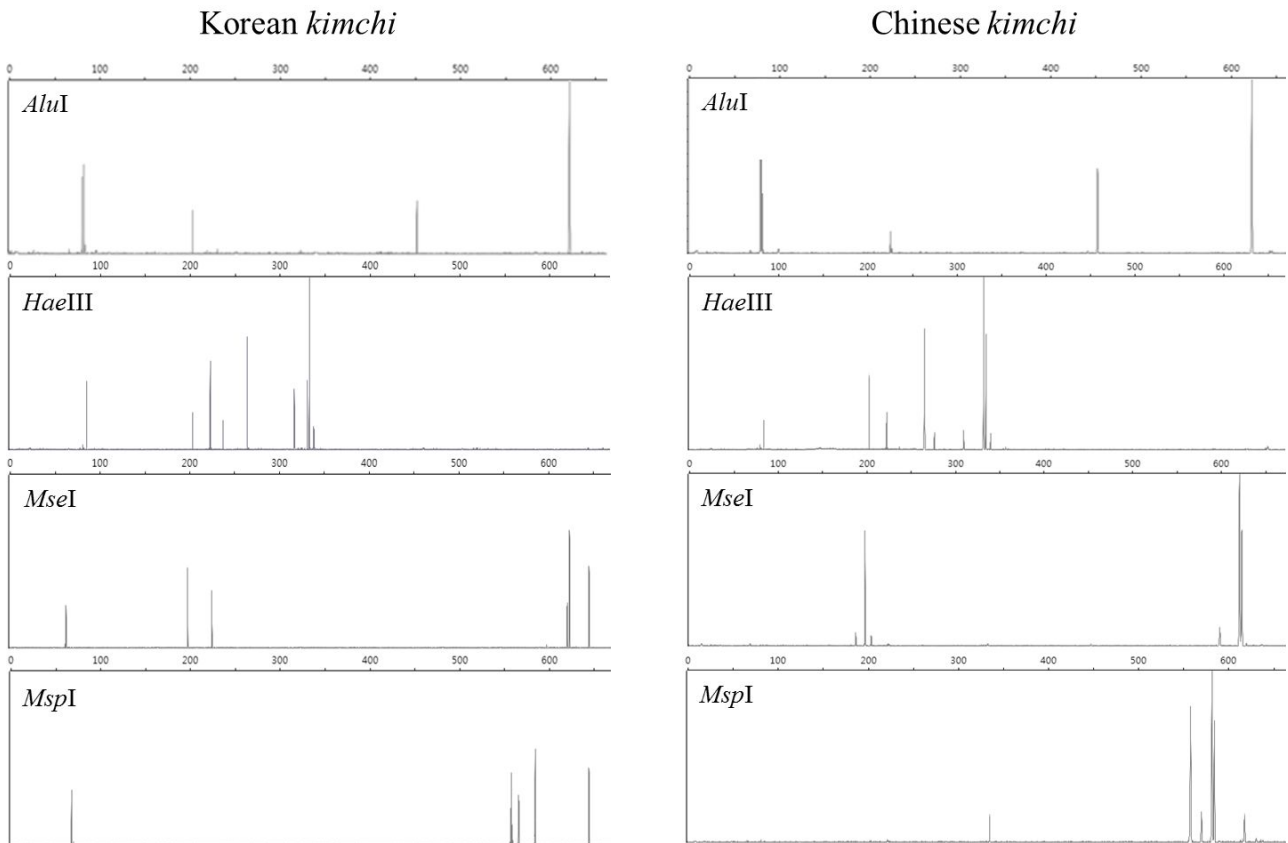


Fig. 5-4. Comparison of T-RFLP profiles generated by *AluI*, *HaeIII*, *MseI*, and *MspI* digestions of 16S rDNAs amplified from the total DNAs of *kimchi* manufactured in Korea and China.

라. 발효에 따른 한국산 및 중국산 김치의 미생물군집 천이 분석

두 종류의 primer pair를 이용하여 김치의 T-RFLP profile을 분석한 결과, reverse primer 1492R보다는 16R primer의 사용이 유산균에 대한 분리능이 높은 것으로 나타났고, T-RF의 생성을 위한 제한효소는 *AluI* 보다는 *HaeIII*와 *MseI*이 다수의 peak를 생성하여 다수의 유산균 추적에 유용한 것으로 나타났다. 또한 *MseI*을 사용하면 각 peak의 분리가 우수하여 유산균의 추적에 오류가 적을 것으로 예상된다.

따라서 27F-16R primer pair와 *HaeIII*, *MseI* 제한효소를 사용하여 한국산 및 중국산 김치의 발효과정 별 미생물군집의 천이를 모니터링하였다. Table 5-2에는 한국산 및 중국산 김치 각 7종의 시료 채취시기에 따른 pH를 나타내었다. 미생물군집 천이 분석을 위한 김치시료의 분류는 발효 초기로 알려진 pH 5.0 이상과 김치 적숙기로 알려진 pH 4.7-4.2 범위를 기준으로 4개 구간(<pH 4.2, pH 4.2-4.7, pH 4.7-5.0, >pH 5.0)으로 구분하였고, 구간별 시료의 수가 동일하지는 않지만, 평균 4개 이상의 시료수가 확보되어 분석에는 큰 지장이 없는 것으로 예상된다(Table 5-3).

Table 5-2. The pHs of Korean and Chinese *kimchi* samples during fermentation.

<i>Kimchi</i> origin	Sample No.	Day 0	Day 3	Day 30
Korea	1	4.43	4.21	3.91
	2	4.69	4.38	4.04
	3	5.69	4.98	4.09
	4	5.76	4.92	3.67
	5	6.16	5.54	3.90
	6	5.24	4.72	3.61
	7	6.00	4.80	4.10
China	1	4.78	4.51	4.02
	2	5.44	4.75	4.09
	3	5.90	4.91	4.05
	4	5.43	4.83	4.22
	5	4.75	4.56	4.49
	6	6.15	4.56	4.13
	7	5.63	4.53	4.21

Table 5-3. Classification of samples according to their pHs.

Sample	Korean <i>kimchi</i> (pH)				Chinese <i>kimchi</i> (pH)			
	>5.0	5.0-4.7	4.7-4.2	>4.2	>5.0	5.0-4.7	4.7-4.2	>4.2
1	6.16	4.98	4.69	4.10	6.15	4.91	4.56	4.22
2	6.00	4.92	4.43	4.09	5.90	4.83	4.56	4.21
3	5.76	4.80	4.38	4.04	5.63	4.78	4.53	4.13
4	5.69	4.72	4.21	3.91	5.44	4.75	4.51	4.09
5	5.54			3.90	5.43	4.75	4.49	4.05
6	5.24			3.67				4.02
7				3.61				
Total		21				21		

발효의 진행에서 따라 채취한 총 42개의 김치시료의 T-RFLP 분석 결과, *HaeIII*에 의해 생성된 T-RF profile에서는 이론치 236, 266, 310, 323, 326 및 340 bp 등에 해당하는 peak들이, *MseI*에 의해서는 이론치 183, 200, 228, 458, 598 및 616 bp 등에 해당하는 peak들이 주로 검출되었다. 예상 T-RF의 크기와 실험치의 오차를 고려하여 각각의 T-RF에 해당하는 분류군(OTU)를 database에서 검토한 결과, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 및 *Weissella* 속 균주의 T-RF인 것으로 나타났다(Table 5-4).

두 종류의 제한효소를 사용하여 김치에 존재하는 유산균의 종 수준에서의 검출을 목표로 하였으나, 일부 OTU는 99% 이상의 높은 16S rDNA 염기서열 상동성을 가지고 있어 16S rDNA 염기서열을 근간으로 한 T-RFLP 분석으로는 종간의 구분에 한계가 있는 것으로 나타났다.

2종의 제한효소 사용으로 종간 구분이 불가능한 OTU의 경우 본 실험자가 임의로 그룹을 나눈 결과, 김치에서 가장 높은 빈도로 검출되는 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* 속의 유산균들이 각각 2개의 그룹으로 나누어졌다. *HaeIII*에 의해 생성된 236 bp의 T-RF는 *Bacillus* 속 균주들에서 공통적으로 생성되는 peak로 종 수준에서의 구분은 불가능하였다.

이 밖에도, *Enterococcus*, *Pediococcus* 및 *Streptococcus* 속으로 추정되는 T-RF가 확인되었지만, 전체 T-RF peak 면적을 기준으로 0.5% 이하의 비중을 차지하고 있어 김치발효에서 이들이 차지하는 비중은 크지 않은 것으로 예상된다.

총 42개 김치시료의 T-RFLP 분석 결과를 시료의 pH에 따라 분류한 4개의 구간과 OTU

group을 기준으로 정리하여 Table 5-5와 같은 결과를 얻게 되었다. Table 5-5의 결과를 graph로 나타낸 결과를 Fig. 5-5에 제시하였다. pH 변화와 OTU group을 기준으로 정리한 결과를 속(genus) 수준에서 정리하면 Fig. 5-6과 같은 결과를 얻게 된다.

발효 과정에 따른 김치미생물군집의 변화를 속 수준에서 비교하면 김치의 원산지에 따라 각 속이 차지하는 비중이 다르게 나타났지만, 미생물군집의 천이 양상은 거의 비슷하게 나타났다. 한국산 및 중국산 김치 모두 발효가 진행됨에 따라 *Lactobacillus* 속의 비중은 높아지고, *Leuconostoc* 속의 비중은 줄어드는 양상을 보였고, *Weissella* 속 균주는 한국산 김치의 경우 pH 4.2-4.7 구간에서, 중국산의 경우에는 pH 4.7-5.0 구간에서 최대 비중을 차지하였다. 이는 김치시료에 따른 차이로 생각되고, pH 4.5를 정도의 적숙기에 *Weissella* 속의 군집이 최대치에 도달하는 것을 예상할 수 있다. 이러한 결과들은 기존에 보고된 결과와는 크게 다르지 않다. 그러나 본 연구에서는 pH 5 이상의 발효 초기의 김치에서 *Bacillus* 속이 *Leuconostoc* 속 다음으로 높은 비중을 차지하고 이들의 비중이 발효 후기까지 어느 정도 유지되는 것으로 나타났다.

본 연구자들의 배양법을 이용한 발효 초기 김치 미생물 연구에서도 발효 초기에 *Bacillus* 속이 가장 높은 비중을 차지한다는 결과[Lee et al. 2010]를 도출했지만, *Bacillus* 속이 발효 후기까지 지속적으로 존재한다는 결과는 본 연구가 처음이다. 향후 *Bacillus* 속의 발효 후기에서의 존재 및 역할에 대한 규명이 추가적으로 연구되어야 할 것으로 생각한다.

Table 5-4. Predicted genus or species in *kimchi* samples based on the predicted sizes of T-RFs.

Predicted 5'-T-RF size (bp)		Accession number	Predicted genus or species in database	OTU group
<i>HaeIII</i>	<i>MseI</i>			
236/310	598	-	<i>Bacillus</i> sp.	Bac
266	200	AF439560	<i>Leuconostoc inhae</i> KCTC3774	Leu1
266	200	CP000414	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC8293 ^T	Leu1
310	200	AF111948	<i>Leuconostoc citreum</i> ATCC49370	Leu2
310	200	AF173986	<i>Leuconostoc kimchii</i> KCTC2386	Leu2
310	598	AB259061	<i>Streptococcus dentirousetti</i> DSM18963	-
310	598	AY188349	<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC33478	-
323	604	AJ301831	<i>Enterococcus faecalis</i> LMG7937	-
326	616	AJ306297	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> ATCC700211 ^T	Lac1
326	616	D79211	<i>Lactobacillus pentosus</i> ATCC8041 ^T	Lac1
326	616	AJ965482	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC14917 ^T	Lac1
333	458	AM113777	<i>Lactobacillus curvatus</i> ATCC25601	Lac2
333	458	AM113778	<i>Lactobacillus graminis</i> ATCC51150	Lac2
333	458	AM113784	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> ATCC15521	Lac2
340	75	AJ305321	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC33316	-
340	75	AY028260	<i>Weissella soli</i> DSM14420	-
340	228	AJ295989	<i>Weissella cibaria</i> JCM12495 ^T	Wei1
340	228	AB023241	<i>Weissella confuse</i> ATCC10881	Wei1
340	183	AY035891	<i>Weissella koreensis</i> KCTC3621	Wei2

Table 5-5. Proportion of each OTU group in Korean and Chinese *kimchi* during fermentation.

Genus	OTU group	Korean <i>kimchi</i>				Chinese <i>kimchi</i>			
		>5.0	4.7-5.0	4.2-4.7	<4.2	>5.0	4.7-5.0	4.2-4.7	<4.2
<i>Lactobacillus</i>	Lac1	11.50	11.63	11.89	7.10	5.64	6.92	9.14	8.82
	Lac2	5.40	11.42	21.51	52.60	3.31	9.85	23.88	30.65
<i>Leuconostoc</i>	Leu1	27.14	20.21	14.02	10.28	26.98	24.73	18.65	16.09
	Leu2	5.53	4.22	2.96	2.44	7.14	6.12	4.73	3.70
<i>Weissella</i>	Wei1	9.24	13.14	21.12	6.70	8.84	18.48	13.47	9.40
	Wei2	18.15	14.10	9.30	1.77	12.09	17.77	6.97	2.86
<i>Bacillus</i>	Bac	15.80	20.19	15.26	15.85	29.89	11.77	19.78	24.14
Others	-	7.24	5.09	3.94	3.26	6.11	4.36	3.38	4.34
Total (%)		100	100	100	100	100	100	100	100

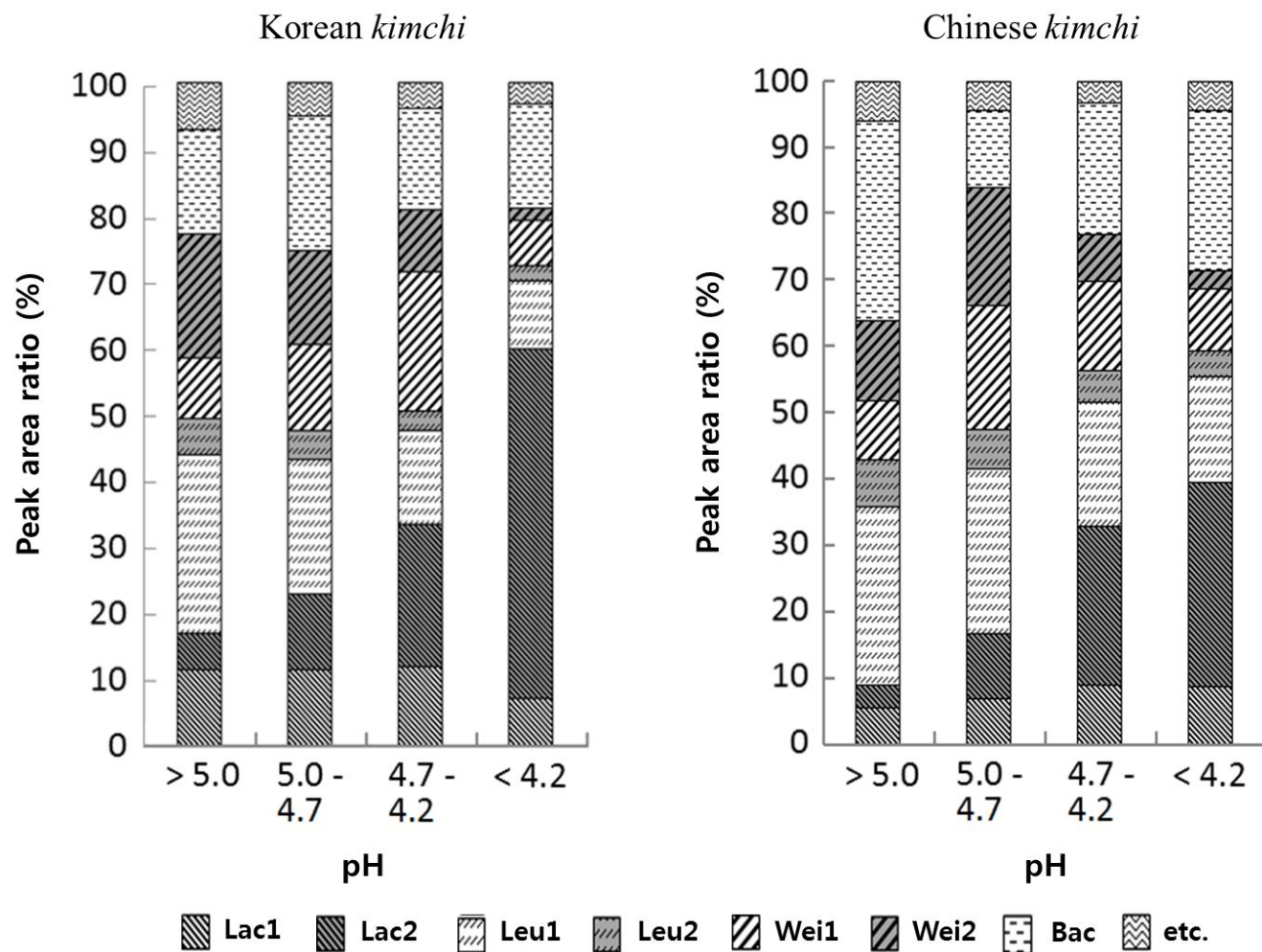


Fig. 5-5. Proportion of each OTU group in Korean and Chinese *kimchi* during fermentation.

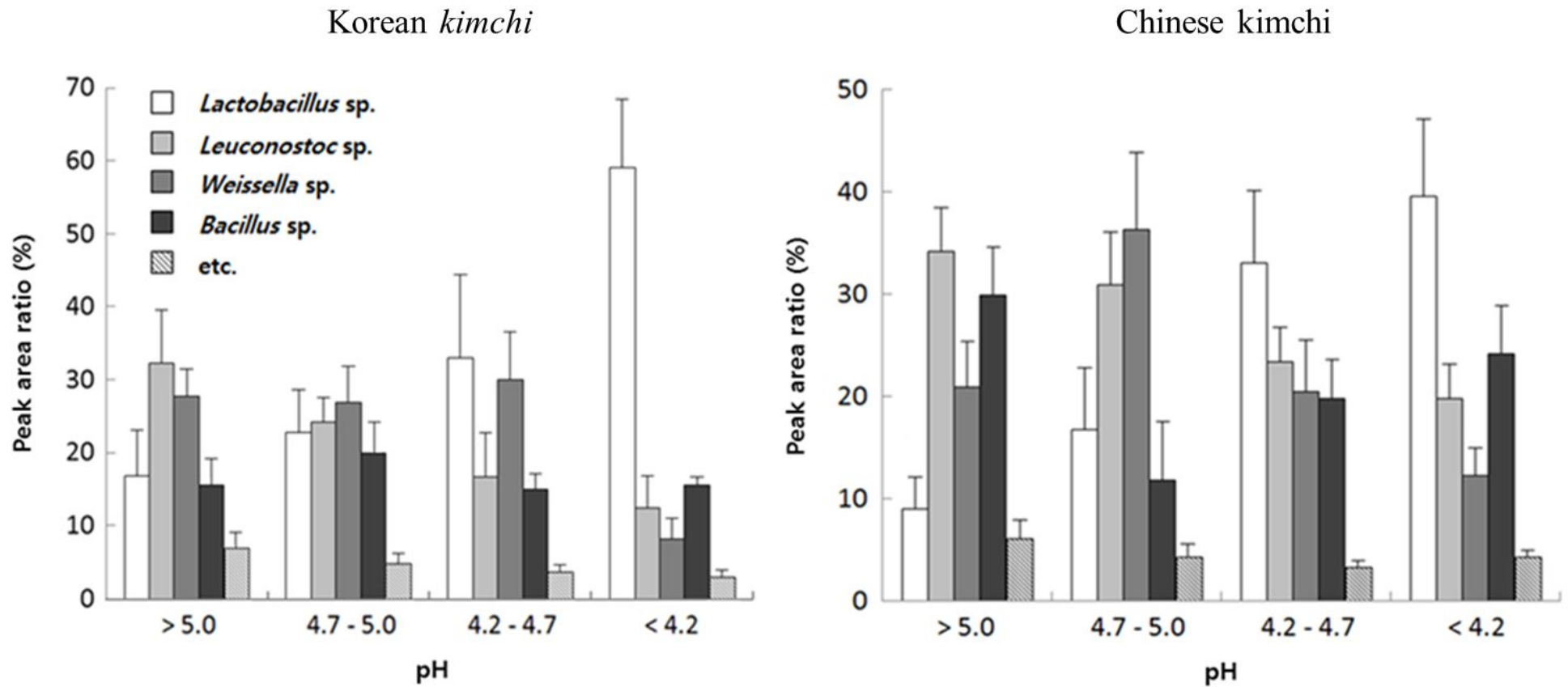


Fig. 5-6. Migration of bacterial communities in Korean *kimchi* and Chinese *kimchi* during fermentation.

Data are expressed as means \pm standard deviations from three independent experiments with same sample.

제 6 절 중국산 김치 판별기술의 유효성 검증

1. 연구 내용

발효 초기 한국산 및 중국산 김치의 bacteria 다양성 평가로부터 *Weissella soli*와 함께 *Serratia proteamaculans*가 중국산 김치에서 검출되지만, 한국산 김치로부터는 검출되지 않았다. 따라서 *W. soli*와 *S. proteamaculans*를 중국산 김치 판별을 위한 지표미생물로 결정하였고, 이들 미생물의 특이적 검출을 위한 PCR 검출법을 개발하였다.

지표미생물의 도출 과정에서 사용한 동일 김치시료를 이용하여 본 연구에서 개발한 지표미생물 특이적 검출법을 적용하여 중국산 김치 판별법의 유효성을 검증한 결과 *S. proteamaculans*가 한국산 김치에서도 검출된다는 결과를 얻게 되어 *S. proteamaculans*의 검출은 중국산 김치의 판별법으로 유효하지 않다는 결론에 도달했다.

한편 동일한 방법으로 *W. soli*의 검출을 중국산 김치 판별에 적용한 경우, 한국산에서는 검출되지 않았고, 중국산 김치에서만 검출된다는 결과를 얻었다. 그러나 중국산 김치로부터도 *W. soli*가 검출되지 않는 시료가 발생하여 *W. soli*의 검출법을 중국산 김치에 적용한 경우, 검출이 73% 수준에서 가능한 것으로 나타났다.

T-RFLP 분석을 한국산 및 중국산 김치에 적용하여 중국산 김치 판별법으로써의 적용가능성을 평가한 결과, 유의적인 차이를 발견하지 못하였고, 종(species) 수준에서의 미생물 군집 분석에는 적합하지 않은 것으로 나타났다.

본 연구자들이 수행한 연구 결과에서는 *recN* 유전자 특이적 PCR을 이용한 *W. soli*의 검출이 중국산 김치의 판별에 가장 높은 가능성을 나타내었기 때문에 *W. soli*의 검출을 시판 김치에 적용하여 중국산 김치의 판별에 대한 유효성을 검토해 보았다.

2. 재료 및 방법

개발기술의 유효성 평가를 위한 한국산 김치는 시판되고 있는 상품김치를 3개사를 대상으로 서로 다른 3개소의 대형마트에서 구입하였다. 중국산 김치는 중국에서 제조되어 수입된 것들을 경기도 안양시 소재의 농수산물 도매시장에서 한국산 김치의 구입시기와 동일한 시기에 수집하였다. 김치시료는 4절기를 고려하여 3, 6, 9, 12 월에 수집하였다. *W. soli*의 검출과 관련된 제반 실험법은 제 3 장, 3절에서 기술한 방법으로 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

시판 김치에 대한 *W. soli*의 검출 결과를 Table 6-1에 정리하였다. 총 36개 한국산 김치로부터 *W. soli*를 검출한 결과, 약 17% 수준인 6개의 시료로부터 검출되었고, *W. soli*의 검출은 제조사와 무관한 것으로 나타났다.

한편, 중국산 김치로 부터는 대부분의 시료로부터 *W. soli*가 검출되는 결과를 얻었고, 검출빈도는 86% 수준으로 나타났다.

본 연구에서 개발된 지표미생물 *W. soli*의 특이적 검출을 통한 중국산 김치 판별법의 신뢰도가 95% 이상을 달성하지 못했다는 점과 더불어 한국산 김치에서 지표미생물이 17% 수준에서 검출되었기 때문에 현 단계에서는 실용화를 추진하기에 적합하지 않다는 결론에 도달했다.

Table 6-1. Korean and Chinese *kimchi* samples collected for the verification of their origins.

Company	Sample	Korean <i>kimchi</i>				Chinese <i>kimchi</i>			
		1st	2nd	3rd	4th	1st	2nd	3rd	4th
A	1	-	-	-	-	-	○	○	○
	2	○	○	-	-	○	○	○	○
	3	-	○	-	-	○	-	○	○
B	1	-	-	-	-	○	○	○	-
	2	○	-	-	-	○	○	○	○
	3	-	-	-	-	○	-	○	○
C	1	-	-	○	-	○	○	○	○
	2	-	-	-	-	○	○	○	○
	3	-	-	○	-	○	○	-	○
Total		36				36			

Companies and samples are arbitrarily mentioned.

중국산 김치의 판별에 있어 시료 수집이 제한적으로 이루어져 다양한 지역으로부터 계속적으로 수입이 증가하고 있는 중국산 김치에 대한 판별 가능성을 논하기 어려운 수준이지만, 중국산 김치의 판별이 상당한 수준에서 이루어지고 있다는 점을 감안하면 향후, 중국산 김치의 판별에 기여하였다고 생각된다.

본 연구에서 수행한 특정 미생물의 특이적 검출을 이용한 중국산 김치의 판별은 지표미생물의 선정 과정에서 중국으로부터 수입된 배추와 부재료를 사용한 경우 및 소금에 절여 수입된 절임배추로 한국에서 제조한 김치에 대한 고려가 없었다는 점과 *W. soli*가 모든 중국산 김치시료로부터 검출되지 않고, 일부 한국산에서도 검출된다는 점에서 한계점을 가지고 있지만, 과학적 검증법이 없어 중국산 김치 판별이 불가능한 현 시점에서 미생물 군집의 차이를 이용한 새로운 과학적 검증법이 제시되어 그 가능성이 검토되었다는 점에서 의의를 가지고 있다.

2년차의 연구가 진행된 2010년 여름기간 동안의 장기간 강우로 일조량 부족이 발생하여 배추 작황이 좋지 않아 정부는 다량의 중국산 배추와 농산물을 중국으로부터 수입하였다. 따라서 완벽한 국내산 재료로 만들어진 공장김치의 수급에 어려움이 발생하였고, 한국산 김치의 수급에 상당량의 중국산 재료의 혼입이 예상된다. 결과적으로 1년차에 도출된 결과를 바탕으로 개발된 원산지판별기술을 한국산 김치에 적용한 결과, 개발된 기술이 제한적으로 적용된다는 결론에 도달했다. 따라서 본 연구에서 개발된 기술을 중국산 김치의 판별에 적용하기 위해서는 다양한 변수를 고려한 김치의 기업화를 위해서는 추가적인 연구를 통한 원산지판별기술의 검증이 요구된다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 연구개발 목표와 달성도

구분	연도	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
1차년도	2009	<제1세부과제> 한국산 및 중국산 김치 유래 bacteria의 다양성 분석을 통한 원산지판별법의 기반 확립	○ 한국산 및 중국산 김치 유래 bacteria의 다양성 분석 - 배양법에 의한 bacteria의 다양성 분석 - T-RFLP 분석에 의한 bacteria의 다양성 분석	100%
		<제1협동과제> 원산지별, 계절별 김치시료의 제조 및 공급	○ 중국산 김치의 지역별, 계절별 시료 수집 ○ 한국산 김치의 지역별, 계절별 시료 수집	100%
2차년도	2010	<제1세부과제> 중국산 김치 판별법 개발 및 원산지 판별법의 유효성 검증	○ 중국산 김치 판별을 위한 지표 bacteria 선정 및 특이적 PCR 검출법 개발 ○ 중국산 김치 판별을 위한 T-RFLP 분석법 개발 ○ 중국산 김치 판별기술의 유효성 검증	100%
	2010	<제1협동과제> 원산지판별법의 판별력 평가	○ 지표 bacteria 검출법 및 T-RFLP 분석법의 유효성 평가 ○ 각종 김치를 대상으로 원산지판별법의 판별력 평가	100%

제 2절 연구평가의 착안점

<제1 세부과제>

구분	세부연구목표	가중치	달성도
1차년	배양법 및 분자생물학적 동정에 의한 한국산 및 중국산 김치 유래 bacteria의 다양성 분석	40%	100%
	배양 비의존적 DNA 기반 T-RFLP 분석에 의한 한국산 및 중국산 김치 유래 bacteria의 군집 분석	40%	100%
	원산지별, 계절별, 발효과정별 김치 유래 bacteria의 차이 도출	10%	100%
	원산지별, 계절별, 발효과정별 김치 유래 bacteria 군집의 T-RFLP profile 도출	10%	100%
2차년	Bacteria 다양성 평가 결과의 비교 분석을 통한 지표 bacteria의 선정	10%	100%
	중국산 김치 판별을 위한 지표 bacteria의 PCR 검출법 개발	30%	100%
	중국산 김치 판별을 위한 T-RFLP 분석법 개발	30%	100%
	중국산 김치 판별을 위한 지표 bacteria 특이적 PCR 검출법의 유효성 검증	15%	100%
	중국산 김치 판별을 위한 T-RFLP 분석법의 유효성 검증	15%	100%

<제 1 협동과제>

구분	세부연구목표	가중치	달성도
1차년	중국산 김치의 지역별, 계절별 시료 수집	50%	100%
	한국산 김치의 지역별, 계절별 시료 수집	50%	100%
2차년	원산지판별법의 원산지별, 계절별 김치시료를 대상으로 한 유효성 평가 및 분석	40%	100%
	원산지판별법의 혼합김치 원산지 판별력 평가	30%	100%
	원산지판별법의 시판 음식점 수거 김치 원산지 판별력 평가	30%	80%

제 3 절 연구의 기여도

본 연구에서 수행한 특정 미생물의 특이적 검출을 이용한 중국산 김치의 판별은 지표미생물의 선정 과정에서 중국으로부터 수입된 배추와 부재료를 사용한 경우 및 소금에 절여 수입된 절임배추로 한국에서 제조한 김치에 대한 고려가 없었다는 점과 *Weissella soli*가 모든 중국산 김치시료로부터 검출되지 않는다는 점에서 한계점을 가지고 있지만, 미생물 군집의 차이를 이용한 새로운 과학적 검증법이 제시되어 그 가능성이 검토되었다는 점에서 의의를 가지고 있다.

본 연구를 통하여 구축된 김치발효 관련 미생물 다양성 평가법 및 특이적 검출법은 다양한 미생물의 영향을 받는 식품 및 농산물의 안전성 확보 및 전통식품의 새로운 해석에 크게 기여할 것으로 예상된다.

본 연구는 genomics에 기반을 둔 분자생물학적 방법론에 의한 미생물생태학과 식품미생물학의 성격을 동시에 가지고 있는 분야로 기초연구를 기반으로 산업적 적용을 추진하는 방향으로 진행되어, 향후 식품미생물 분야에서 새로운 연구 시도의 초석이 되었다고 생각한다. 따라서 타작물에서 품종 및 원산지 판별 기술 개발을 위한 모델 시스템으로 활용이 가능하며, 다른 경제 작물의 원산지 인증과, 가능하다면 품질까지도 인증할 수 있는 연구 분야로 확장될 것으로 생각한다.

계속적으로 수입 농산물이 증가하고 있는 시점에서 전통 발효식품 원산지판별법의 개발을 위한 지속적 후속 연구의 좋은 예가 될 수 있다.

김치 원산지판별법의 개발 과정에서 도출된 *Weissella* 속 유산균의 신속 정확한 검출 및 동정법은 판별키트로 제작되어 상용화 될 수 있다. 또한 *Weissella* 속 유산균은 최근 들어 김치 적숙기의 우점종으로 평가되고 있기 때문에 이들을 이용한 종균 발효법 개발과 종균 추적 시스템의 개발로 발전될 수 있다.

본 연구는 분자생물학적 방법에 의한 김치발효 관련 미생물 검출을 활용한 김치 원산지판별기술 개발이라는 산업적 응용 가능성을 지니고 있어 식품 안전성 확보 및 식품산업 발전에 기여할 수 있는 기초 인프라 구축 및 전문가 양성에 기여하였다고 생각한다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 실용화 계획

본 연구에서 개발된 <Weissella soli의 특이적 PCR 검출을 이용한 중국산 김치의 판별법>을 상업적으로 생산된 김치에 적용한 결과 86% 수준에서 중국산 김치를 판별할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 현 시점에서 실용화하기에는 다양한 조건에서 만들어진 김치시료를 대상으로 한 보완실험의 진행이 요구된다. 따라서 실용화를 위해서는 좀 더 신중한 접근이 필요한 것으로 사료된다.

2. 특허, 논문 등의 지식재산권 확보계획

2011년 현재까지 3편의 등재지와 1편의 외국학술지에 연구의 결과를 발표하였고, 향후 2편 이상의 국내 또는 국외 학술지에 논문을 게재할 예정에 있다. 그러나 연구결과가 산업적으로 실용화되기 위해서는 추가적인 보완이 필요하기 때문에 보완의 성과가 달성된 시점에서 특허를 출원할 계획에 있다.

3. 타연구에 활용 계획

2000년 이후에 집중적으로 진행된 배양 비의존적 방법에 의한 김치 미생물 연구의 결과로 김치발효 과정 중의 미생물 군총 천이에 대한 결과가 도출되어 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Leu. citrum*을 비롯한 *Leuconostoc* 속 유산균이 김치발효 초기에 우점하고, 중기에 들어서는 *Weissella koreensis* 와 *W. cibaria*를 중심으로 한 *Weissella* 속이 증가하고, 발효 후기에는 *Lactobacillus* 속 유산균이 우점한다는 결론이 일반화되고 있다. 특히 *Lactobacillus* 속 유산균 중, *Lb. sakei*는 발효 전 과정에서 다수 검출되지만, 발효 후기에 우점하는 것으로 나타났고, *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* 등도 검출되는 것으로 보고되었다.

김치발효 미생물에 대한 역할 및 김치발효 기작에 대한 이해가 높아지고 있고, 종균의 김치산업에서의 적용이 확대되고 있는 현시점에서 김치발효용 종균을 비롯한 김치발효 관련 우점종의 신속한 검출은 김치의 품질평가로 연결될 것으로 예상된다. 또한 *Weissella* 속 유산균은 최근 들어 김치 적숙기의 우점종으로 평가되고 있기 때문에 이들을 이용한 종균 발효법 개발과 종균 추적시스템의 개발로 발전될 수 있다.

제 6 장 참고문헌

- 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.
- Arahal, D. R., E. Sanchez, M. C. Macian, and E. Garay. 2008. Value of *recN* sequences for species identification and as a phylogenetic marker within the family “*Leuconostocaceae*”. *Int. Microbiol.* **11**: 33-39.
- 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.
- Benkerroum, N., M. Misbah, W. E. Sandine, and A. T. Elarki. 1993. Development and use of a selective medium for isolation of *Leuconostoc* spp. from vegetables and dairy products. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 607-609.
- 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.
- Bui, T. P. N., Y.-J. Kim, and D.-C. Yang. 2010. *Lactobacillus koreensis* sp. nov., isolated from the Kimchi, Korean traditional food. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* (in press) doi:10.1099/ijs.0.021386-0.
- 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.
- 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.

- 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.
- Cho, K. M., R. K. Math, S. M. Asraful Islam, W. J. Lim, S. Y. Hong, J. M. Kim, M. G. Yun, J. J. Cho, and H. D. Yun. 2009. Novel multiplex PCR for the detection of lactic acid bacteria during *kimchi* fermentation. *Mol. Cell. Probes.* **23**: 90-94.
- 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 leuconostocs in foodstuffs. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 279-284.
- 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.
- Chun, J., J.-H. Lee, Y. Jung, M. Kim, S. Kim, B. K. Kim, and Y.-W. Lim. 2007. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 2259-2261.
- 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.
- Dauga, C. 2002. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 531-547.
- 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.

Forney, L. J., X. Zhou, and C. J. Brown. 2004. Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 210-220.

Grimont, P. A. D. and F. Grimont. 1978. The genus *Serratia*. *Ann. Rev. Microbiol.* **32**: 221-248.

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.

Jeon, C.-G. 2009. Marketing analysis of the imported kimchi and challenges for the domestic kimchi industry. *Korean J. Food Marketing Economics* **26**: 79-101.

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. 2000a. Identification and characterization of *Leuconostoc gelidum*, isolated from kimchi, a fermented cabbage product. *J. Microbiol.* **38**: 132-136.

Kim, H., J. Chun, and H.-U. Han. 2000b. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1915-1919.

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.

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.

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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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. 2005a. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 143-150.
- Lee, M., M. K. Kim, M. Vancanneyt, J. Swings, S.-H. Kim, M. S. Kang, and S.-T. Lee. 2005b. *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1409-1413.
- 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.
- 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.
- 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/ijss.0.017418-0.
- 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.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, and D. P. Clark. 2009. *Brock Biology of Microorganisms*, pp. 419-423. 13th ed. Pearson Education Inc., San Francisco, CA, U.S.A.

- 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.
- 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.
- Mollet, C., M. Drancourt, and D. Raoult. 1997. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol. Microbiol.* **26**: 1005-1011.
- Monna, L., T. Omori, and T. Kodama. 1993. Microbial degradation of dibenzofuran, fluorene, and dibenzo-*p*-dioxin by *Staphylococcus auriculans* DBF63. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 285-289.
- 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.
- Roggenkamp, A. 2007. Phylogenetic analysis of enteric species of the family Enterobacteriaceae using the *oriC*-locus. *Syst. Appl. Microbiol.* **30**: 180-188.
- Shim, S. and J.-H. Lee. 2008a. 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.
- Shim, S. and J.-H. Lee. 2008b. Evaluation of lactic acid bacterial community in *kimchi* using terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 247-259.
- 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.
- Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 1-29.
- 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 primer. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3450-3454.

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.

Yang, J., Y. Cao, Y. Cai, and F. Terada. 2010. Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *J. Dairy Sci.* **93**: 3136-3145.

Yoon, J.-H., S.-S. Kang, T.-I. Mheen, J.-S. Ahn, H.-J. Lee, T.-K. Kim, C.-S. Park, Y. H. Kho, K. H. Kang, and Y.-H. Park. 2000. *Lactobacillus kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1789-1795.

Zeigler, D. R. 2005. Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1171-1179.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.