

## Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism 분석을 이용한 김치발효 관련 유산균 군집의 평가

심상민 · 이종훈\*  
경기대학교 식품생물공학과

**Evaluation of Lactic Acid Bacterial Community in Kimchi Using Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. Shim, Sangmin and Jong-Hoon Lee\***. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea – Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis, one of rapid culture-independent microbial community analysis methods, was used to determine the lactic acid bacterial complexity and dynamics during kimchi fermentation at 15°C and 4°C. At both temperatures, the common presence of *Leuconostoc mesenteroides*, *Lc. inhae*, *Lc. kimchi*, *Weissella koreensis*, *W. cibaria*, *Lactobacillus sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, and *Lb. brevis* was predicted. *Lc. citreum* and *Enterococcus faecalis* were detected at 15°C and 4°C, respectively. *W. koreensis* predominated during the mid stage of kimchi fermentation whereas lactobacilli were dominants during later stage. *Lb. sakei* and *Lb. curvatus* became dominants regardless of fermentation temperature but the growth of *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, and *Lb. brevis* was restricted at psychrophilic temperature. Some species of leuconostocs were maintained until the later stage of kimchi fermentation.

**Key words:** T-RFLP, kimchi, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Lactobacillus*

### 서 론

우리나라 고유의 대표적 발효 침채류인 김치는 재료에서 유래하는 미생물의 자연발효에 의해 고유한 풍미가 만들어지며, 식이섬유, 비타민, 무기질 등을 공급해주는 우수한 식품이다. 김치의 종류는 주재료에 따라 배추김치, 동치미, 오이소박이, 갓김치, 총각김치, 파김치, 나박김치 등으로 다양하고, 같은 김치라도 지역마다 담그는 과정과 맛이 다르다. 이렇게 지역마다 맛이 다른 이유는 김치의 재료, 소금의 농도, 당의 양, 산소의 농도, 미생물의 수와 종, 발효 온도와 시간 등에 의해 결정되는 김치의 발효과정이 다르기 때문이다[4, 18].

김치의 품질에 영향을 미치는 주요한 요소 중의 하나인 김치발효 관련 미생물에 대한 연구는 발효 관련 미생물의 분리 및 동정을 중심으로 시작되어, 상품김치의 수요 증가에 따라 유통기간과 가식기간의 연장을 목표로 한 김치 산패균의 생육억제에 대한 연구로 진행되었고[1, 23], 상품김치의 품질 균일화를 위해 유제품 발효에서와 같이 우수 유산균을 김치발효의 종균(starter)으로 첨가하려는 시도가 진행되었다[3, 8, 12].

1939년 김치발효 관련 미생물에 대한 연구가 처음으로 보

고된 이후, 1984년 Mheen과 Kwon의 보고[25]를 시작으로 김치발효에 관여하는 미생물에 대한 연구가 본격적으로 진행되어 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *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[19, 24, 25, 27]. 특히 발효 후기에 검출되는 *Lactobacillus* 속 중에서 많은 수가 *Lb. plantarum*으로 동정되어, *Leuconostoc* 속은 김치에 풍미를 부여하는 유익균으로 *Lb. plantarum*은 산패균으로 인식되었다[19, 25]. 2000년 이후에는 김치유산균의 검출 및 동정이 분자생물학적 방법에 의해 진행되면서, 형태 및 생리학적 특성에 근거한 고전적 동정법에 의해서 진행된 연구와는 다른 결과들이 도출되어 기존에 보고된 김치발효의 주발효균과 산패균에 대한 인식이 달라지고 있고, 기존에 보고되지 않았던 다양한 유산균이 김치발효에 관여하는 것으로 나타났다[6, 14, 17, 26, 29]. 이러한 김치발효 관련 유산균 연구결과의 변화 요인으로는 1) 존재하는 모든 미생물 배양이 가능한 실제 조건과 동일한 미생물 선발용 인공배지의 부재, 2) 근연 관계에 있는 유산균의 생리 및 영양 요구의 유사성에 의해 발생하는 고전적 동정법 적용 시의 오류, 3) 16S ribosomal RNA 유전자 (16S rDNA) 염기서열을 이용한 계통발생학적(phylogenetic) 분류체계의 도입에 따른 유산균 분류체계의 변화[9, 28] 등을 들 수 있다.

계속적으로 증가하고 있는 여성의 사회 진출과 함께 김

\*Corresponding author

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

E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

치산업이 급속하게 발전하고 있는 현 시점에서 상품김치의 품질균일화 및 유통기간 연장을 위한 연구개발이 절실히 요구되고 있다. 이러한 결과의 도출을 위해서는 발효미생물의 제어에 필요한 발효과정 중 미생물 변화에 대한 이해가 우선되어야 한다. 최근 들어 미생물 환경(군집)의 이해에 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[20, 26]. 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.

본 연구에서는 다양한 맛 또는 일관된 맛의 김치 생산을 위한 미생물 제어시스템 개발 그리고 유통기간 연장을 목표로 한 김치의 저장 및 유지법 개발, 전통발효식품의 과학화 등에 필요한 미생물학적 기초자료 제공을 위하여 최근 들어 미생물 군집의 다양성 및 역동성의 모니터링에 빠르게 적용되고 있는 T-RFLP 분석을 김치발효 유산균 연구에 적용하여 김치발효 관련 미생물을 재평가하고, 식품미생물 분야에서의 T-RFLP 적용 가능성을 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 표준 유산균은 Korean Collections for Type Cultures (KCTC), Korean Culture Center for Microorganisms (KCCM)으로부터 구입하였고(Table 1), *Lactoba-*

*cilli* MRS 액체배지(Difco, USA) 또는 1.5% (w/v) 한천을 첨가한 고체배지를 사용하여 30°C, 미호기성 조건에서 배양하였다.

### 김치시료 및 DNA 추출

김치발효 관련 유산균 군집의 평가를 위한 김치시료는 수원시 소재 풍기식품으로부터 담근 즉시 구입한 포기김치를 적당한 크기로 잘라, 배추의 각 부위가 고르게 분포되도록 혼합하여 300 ml 용기에 소포장 하였으며, 가능한 혐기상태가 유지되도록 밀폐시켰다. 김치는 15°C 및 4°C에서 발효시켰으며, 15°C에서 발효시킨 김치는 7일과 15일째, 4°C에서 발효시킨 김치는 5주와 10주째에 멸균된 거즈를 이용하여 김치국물을 회수하였다. 김치국물을 원심분리하여 균체를 회수한 다음, DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Germany)을 사용하여 DNA를 추출하였고, 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

### T-RFLP 분석을 위한 16S ribosomal RNA 유전자 증폭

T-RFLP 분석에 필요한 16S rRNA 유전자(16S rDNA) 증폭에는 기존의 T-RFLP 분석에서 많이 사용된 eubacterial universal primer 27F (5'-AGA GIT TGA TCC TGG CTC A-3')와 본 연구그룹에서 bacteria의 16S rDNA 증폭을 위해 제작한 16R (5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AG-3')을 사용하였다. 대장균의 16S rDNA 염기서열 8-27 부분에 해당하는 forward primer 27F의 5'-말단은 phosphoramidite dye인 6'-carboxyfluorescein (6-FAM)으로 표식하였다(TaKaRa, Japan).

PCR 반응에는 PCR thermal cycler (TaKaRa)를 사용하였으며, 100 µL 반응계에는 300 ng DNA, 0.25 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany), 20 pmol의 primer를 첨가하였다. 반응조건은 95°C에서 5분 예비가열 후, 95°C 1분간 변성, 66.5°C 1분 annealing, 72°C 1분 중합반응의 과

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

Reference strain	5'-T-RF size (bp) <sup>a</sup>								Accession no.
	<i>Hae</i> III		<i>Mse</i> I		<i>Msp</i> I		<i>Tha</i> I		
	T-RF	DB	T-RF	DB	T-RF	DB	T-RF	DB	
<i>Enterococcus faecalis</i> KCTC 2011 (ATCC 29212)	320	321	601	604	563	566	244	247	AJ301831
<i>Enterococcus faecium</i> KCCM 12118 (ATCC 19434 <sup>T</sup> )	284	289	605	609	69	75	244	249	AB362603
<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM 40399 (ATCC 14869 <sup>T</sup> )	281	283	456	459	570	572	250	253	CP000416
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC 3108 (ATCC 14917 <sup>T</sup> )	326	327	456	459	570	572	250	253	DQ239698
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> KCTC 3603 (ATCC 15521 <sup>T</sup> )	332	333	613	616	575	578	256	259	NC_007576
<i>Leuconostoc citreum</i> KCTC 3526 (ATCC 49370 <sup>T</sup> )	306	310	195	200	551	555	57	61	AB362721
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> KCTC 3505 (ATCC 8293 <sup>T</sup> )	262	266	195	200	551	555	231	236	NC_008531
<i>Weissella cibaria</i> KCCM 41287 <sup>T</sup>	336	338	222	227	580	583	260	264	AF312874

<sup>T</sup>, type strain; KCTC, Korean Collections for Type Cultures; KCCM, Korean Culture Center for Microorganisms; ATCC, American Type Culture Collection.

<sup>a</sup>, T-RF, observed size of T-RF; DB, predicted size of T-RF from 16S rDNA sequence in database.

정을 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 purification system (SolGent, Korea)으로 회수, 정제한 후 -20°C에서 보존하였다.

### T-RFLP 분석

Agarose gel로부터 정제한 PCR 반응산물에 4염기서열 인식 제한효소 *Hae*III (TaKaRa), *Mse*I (NEB, England), *Msp*I (TaKaRa) 및 *Tha*I (Roche)을 각각 20 U 첨가하여, 최종 25  $\mu$ L 반응계에서 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 GeneScan 3.1 software의 Local Southern 방법에 의해 결정되었으며, standard DNA size marker로는 GS-500 ROX와 GS-1000 ROX를 사용하였다(Applied Biosystems). T-RFLP 결과에서 나타난 T-RF peak의 크기(size)는 분류학적 단위(Operational Taxonomic Unit, OTU)의 다양성을, peak의 높이는 정량성을 의미하는 것으로 간주하였다. 각 T-RF에 해당하는 OTU의 확인은 Ribosomal Database Project II (RDP-II) web site의 T-RFLP analysis program (TAP)을 이용하거나, 기존의 침채류에서 보고된 미생물 16S rDNA 염기서열을 RDP database와 GenBank database로부터 추출한 다음, webcutter 2.0 software를 이용하여 예상되는 T-RF의 크기를 직접 계산하였다.

## 결 과

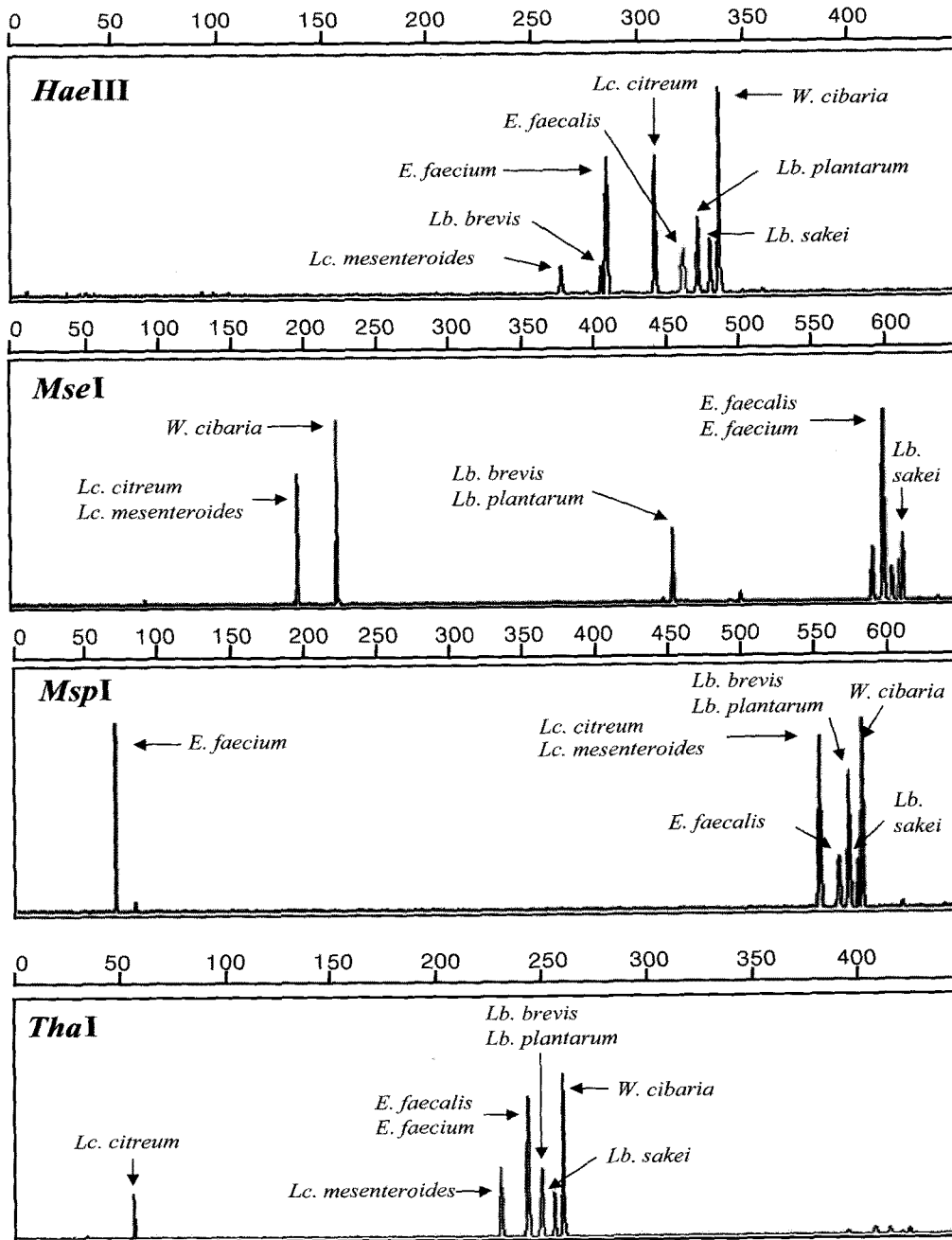
### 표준 유산균 T-RFLP 분석

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 8종의 표준 유산균으로부터 추출한 DNA를 적당히 섞어 T-RFLP 분석을 수행하였다. 사용한 제한효소에 따라 6~8개의 서로 다른 크기를 갖는 T-RF peak가 검출되어 본 실험에서 구축한 reverse primer가 김치유산균의 16S rDNA 증폭에 유용하게 작용하는 것으로 나타났고(Fig. 1), 측정된 T-RF의 크기는 TAP과 RDP database의 16S rDNA 염기서열로부터 산출된 해당 균주의 T-RF 크기와 0~6 bp 정도의 오차가 있는 것으로 나타났다(Table 1). T-RFLP 분석에서 한가지 제한효소를 사용하는 경우, 한 T-RF는 한개 이상의 분류군(taxon)을 대표하는 경우가 발생하여, 다양한 미생물이 공존하는 미생물 군집의 종(species) 수준에서의 다양성 파악에 장애요인이 되고 있다. 따라서 본 연구에서는 RDP database에 축적된 16S rDNA 염기서열을 이용하여 발생 가

능한 5'-T-RF의 크기를 검토한 다음, 가능한 종 수준에서의 다양성 파악을 극대화 시킬 수 있는 4종의 제한 효소 *Hae*III, *Mse*I, *Msp*I, *Tha*I을 선정하였다. *Hae*III를 제외한 3종의 제한효소로는 8종 유산균의 구분이 한번에 달성되지 않았지만, 제한효소에 의해 획득된 T-RF profile의 상호 비교를 통하여 각 T-RF에 해당하는 균주의 확인이 가능한 것으로 나타났다. 하지만 *Mse*I을 사용한 경우, 590, 605 bp 등의 예상하지 못한 T-RF들이 관측되었다. 이는 PCR 증폭과정에서 생성된 단일가닥 16S rDNA로 제한효소가 작용하지 못한 pseudo-T-RF일 가능성이 있으며, 제한효소가 완벽하게 작용하지 않아 발생한 *Leuconostoc citreum* 또는 *Enterococcus faecalis*의 T-RF일 가능성도 있다. *Tha*I으로 처리한 profile에서 *Lc. citreum*로 추정되는 T-RF의 상대적인 높이(면적비)가 *Hae*III에 의해 도출된 결과보다 조금 낮게 나타난 것을 제외하면, 대부분의 T-RF의 상대적 높이는 제한효소에 관계 없이 대체로 일관성 있는 결과가 도출되어 미생물 군집에서의 상대적인 정량성 언급이 가능한 것으로 확인되었다.

### 15°C 발효 김치의 T-RFLP 분석

15°C에서 7일간 발효한 김치시료의 경우, *Hae*III에 의해서 생성된 T-RF profile에서는 231, 256, 262, 281, 306, 326, 332 및 338 bp 등의 peak가 검출되었다(Fig. 2). 예상 T-RF의 크기와 실험치의 오차를 고려하여 각각의 T-RF에 해당하는 분류군(OTU)을 database에서 검토한 결과, 가장 높은 비중의 332 bp T-RF에 해당하는 OTU는 *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. graminis*로 예상된다. 이들 OTU는 *Mse*I, *Msp*I, *Tha*I에 의해서도 각각 612, 575, 256 bp 크기의 단일 T-RF를 형성하였고, 이들 T-RF는 각각의 T-RF profile에서 가장 높은 비중을 차지하였다. 다수의 제한효소를 이용하였음에도 불구하고, 이들 OTU는 99% 이상의 높은 16S rDNA 염기서열 상동성을 가지고 있어 16S rDNA 염기서열을 근간으로 한 T-RFLP 분석으로는 이들의 중간 구분에 한계가 있는 것으로 나타났다. 지금까지 보고된 연구에 따르면 *Lb. sakei*는 높은 빈도로 김치에서 검출되고 있고, *Lb. curvatus*도 검출되고 있다[6, 16, 20, 24]. 하지만 김치에서는 *Lb. graminis*는 검출된 바 없고, 본 연구자들의 조사 범위에서는 이 유산균이 주발효균으로 작용하는 발효식품도 발견하지 못했다. 따라서 *Hae*III에 의해서 생성된 332 bp T-RF에 해당하는 OTU는 대부분이 *Lb. sakei*이고 *Lb. curvatus*가 일부를 차지하는 것으로 추정된다. *Hae*III를 사용한 profile에서 두 번째로 높은 비중을 갖는 338 bp T-RF에 해당하는 OTU는 *Weissella cibaria*와 *W. koreensis*로 예상된다. 이들 OTU는 *Mse*I과 *Msp*I의 사용으로 구분되었고, *W. cibaria*보다는 *W. koreensis*가 군집에서 상대적으로 높은 비중을 차지하는 것으로 나타났다. *Hae*III profile에서 *Weissella* 속 다음으로 높은 비중을 차지하는 262 bp와 306 bp T-RF에 해당하는 OTU는 *Leuconostoc* 속으로 추정되며, 262 bp의 T-RF

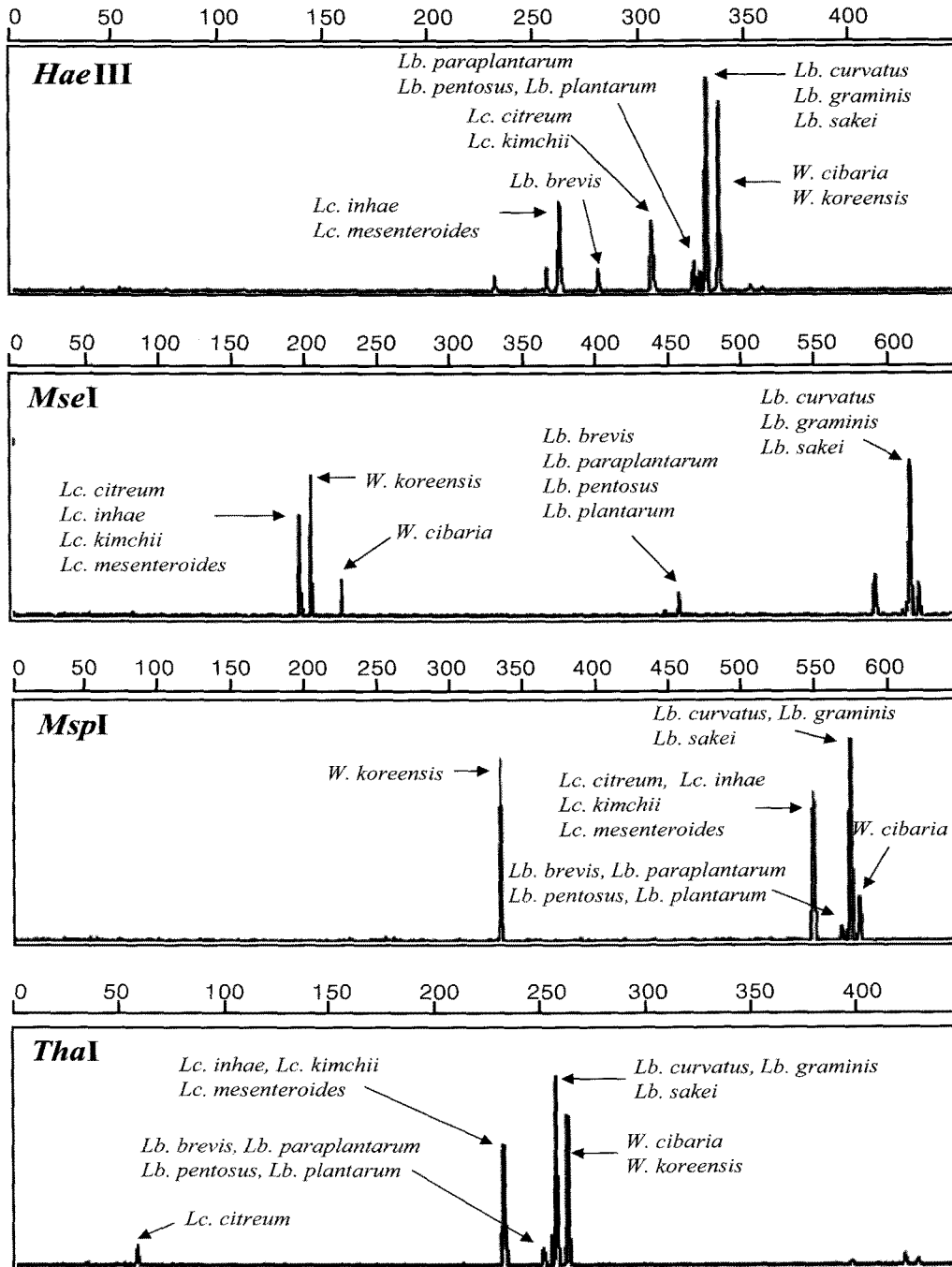


**Fig. 1. T-RFLP profiles of reference strains.** Terminal restriction fragments (T-RFs) were generated from *Hae*III, *Mse*I, *Msp*I, and *Tha*I digestion of 16S rDNAs amplified from the total DNA mixtures of reference strains. Each peak represents one or several bacterial species.

는 *Lc. inhae*와 *Lc. mesenteroides*로, 306 bp의 T-RF는 *Lc. citreum*과 *Lc. kimchii*로 추정된다. 군집 내에서 *Lc. inhae*와 *Lc. mesenteroides*가 차지하는 상대적 비중은 *Lc. citreum*과 *Lc. kimchii*보다 다소 높았으며, *Tha*I에 의하여 *Lc. citreum*의 60 bp T-RF가 단독으로 분리된 것을 제외하면 본 실험에서 사용한 제한효소에 의한 *Leuconostoc* 속 균주들의 종 수준 구분은 불가능했다. *Hae*III에 의한 T-RF profile중, 281 bp의 T-RF에 해당하는 OTU는 *Lb. brevis*로 예상되며, 326 bp의 T-RF에 해당하는 OTU는 *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*,

*Lb. paraplantarum*으로 추정된다. 이들 4종의 유산균은 다른 제한효소에 의해서는 분리되지 않았고, 15°C에서 7일간 발효시킨 김치의 미생물 군집에서 차지하는 비중은 높지 않은 것으로 나타났다. *Lb. plantarum* group으로 불리는 *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*, *Lb. paraplantarum*은 모두 김치에서 분리 및 검출된 바 있고[29], 99% 이상의 높은 16S rDNA 염기서열 상동성을 가지고 있어 T-RFLP 분석으로는 종간 구분이 힘든 또 다른 예라 할 수 있다.

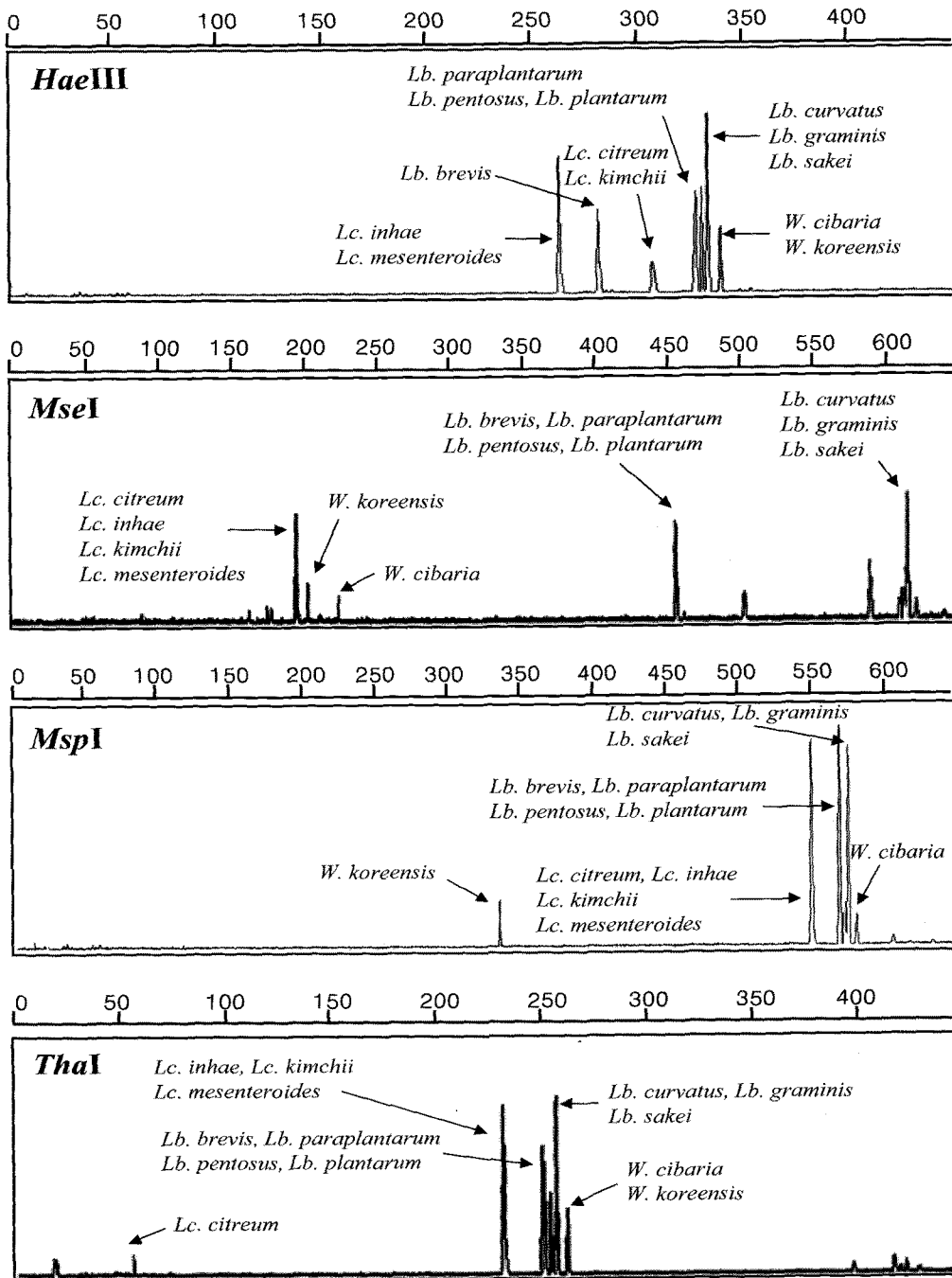
15°C에서 15일간 발효한 김치의 T-RF profile을 분석한 결



**Fig. 2.** T-RFLP profiles of the bacterial community in kimchi sample fermented at 15°C for 7 days. T-RFs were generated from *HaeIII*, *MseI*, *MspI*, and *ThaI* digestion of 16S rDNAs amplified from the total community DNA in kimchi sample. Each peak represents one or several bacterial species.

과, 미생물의 다양성은 거의 변하지 않았지만, 군집 내에서의 상대적 정량성 비교의 지표가 되는 peak 높이의 변화는 나타났다(Fig. 3). 7일간 발효한 김치에서 가장 높은 비중을 차지한 *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*로 추정되는 T-RF는 15일간 발효시킨 김치에서도 가장 높은 비중을 차지한 반면, 두번째 높은 비중을 차지한 *Weissella* 속 추정 T-RF는 발효가 진행됨에 따라 *Leuconostoc* 속 보다 낮은 수준으로 비중이 감

소하는 것으로 나타났다. 7일간 발효한 김치에서 가장 낮은 비중을 차지했던 *Lb. brevis*와 *Lb. plantarum* group 유산균은 발효가 진행됨에 따라 급격히 증가하여, 15일째의 *MseI* 과 *MspI*에 의한 T-RF profile에 의하면 군집에서 *Lb. sakei* 와 *Lb. curvatus*에 버금가는 높은 비중을 차지하는 것으로 확인되었다. Table 2에 15°C에서 7일, 15일간 발효한 김치 시료의 T-RFLP 분석에서 각 제한효소 처리로 검출된 실제



**Fig. 3.** T-RFLP profiles of the bacterial community in kimchi sample fermented at 15°C for 15 days. T-RFs were generated from *HaeIII*, *MseI*, *MspI*, and *ThaI* digestion of 16S rDNAs amplified from the total community DNA in kimchi sample. Each peak represents one or several bacterial species.

T-RF의 크기와 오차범위를 고려하여 선정된 유산균에 대한 database 상의 T-RF의 크기를 정리하였다.

**4°C 발효 김치의 T-RFLP 분석**

4°C 발효 김치의 T-RFLP 분석 결과는 15°C 발효 김치의 결과와 미생물의 다양성에는 큰 차이가 발견되지 않았지만 군집에서 차지하는 각 OTU의 상대적 비중에는 변화가 있

는 것으로 나타났다. 4°C에서 5주 발효한 김치의 경우, *HaeIII* T-RF profile에는 262, 307, 319, 326, 330, 338 bp의 peak가 검출되었다(Fig. 4). 가장 높은 비중을 차지하는 338 bp T-RF는 *W. cibaria*와 *W. koreensis*로 추정되며, *MseI*과 *MspI*에 의해 종 수준 구분이 가능했다. *W. koreensis*는 *MseI*과 *MspI*으로 절단한 경우, 각각 203, 335 bp의 T-RF를 생성하였고, 미생물 군집에서 차지하는 비중이 가장 큰 것

Table 2. Predicted species of T-RFs in kimchi samples fermented at 15°C for 7 and 15 days.

		5'-T-RF size (bp) <sup>a</sup>								Accession no.	Predicted species or phylotype	Detection (days)	
HaeIII		MseI		MspI		ThaI		7	15				
T-RF	DB	T-RF	DB	T-RF	DB	T-RF	DB						
262	266	195/196	200	552	555	231	236	AY675244	<i>Lc. inhae</i> LM 2630	○	○		
262	266	195/196	200	552	555	231	236	AB326298	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	○	○		
262	266	195/196	200	552	555	231	236	NC_008531	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	○	○		
281	283	456	459	569	572	250	253	CP000416	<i>Lb. brevis</i> ATCC 367	○	○		
306	310	195/196	200	552	555	57	61	AB362721	<i>Lc. citreum</i> NCDO 2787	○	○		
306	310	195/196	200	552	555	231	236	EU022367	<i>Lc. kimchii</i> PKB-045	○	○		
326/327	326	456	458	569	571	250	252	AB362736	<i>Lb. paraplantarum</i> NRIC 1733	○	○		
326/327	328	456	460	569	573	250	254	AB362758	<i>Lb. pentosus</i> NRIC 1837	○	○		
326/327	327	456	459	569	572	250	253	DQ239698	<i>Lb. plantarum</i> L5	○	○		
332	331	612/613	614	575	576	256	257	AM113778	<i>Lb. graninis</i> DSM 20719 <sup>T</sup>	○	○		
332	332	612/613	615	575	577	256	258	AM113777	<i>Lb. curvatus</i> DSM 20019 <sup>T</sup>	○	○		
332	333	612/613	616	575	578	256	259	NC_007576	<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	○	○		
338	338	225	227	580	583	261	264	AF312874	<i>W. cibaria</i> CHJ3 <sup>T</sup>	○	○		
338	338	204	206	335	335	261	264	AY035892	<i>W. koreensis</i> S-5673	○	○		

<sup>a</sup>, T-RF, observed size of T-RF; DB, predicted size of T-RF from 16S rDNA sequence in database.

으로 나타났다. 이에 반해 각각 224, 581 bp의 T-RF를 생성한 *W. cibaria*가 군집에서 차지하는 비중은 *W. koreensis*에 미치지 못하지만 *Leuconostoc* 속에 버금가는 수준으로 나타났다. *Leuconostoc* 속은 *Weissella* 속 다음으로 높은 비중을 차지하였고, *HaeIII*로 절단한 profile에서 262 bp T-RF에 해당하는 *Lc. Inhae* 및 *Lc. mesenteroides*와 307 bp에 해당되는 *Lc. kimchii*가 발효에 관여하는 것으로 나타났고, *Lc. kimchii*가 *Lc. inhae*와 *Lc. mesenteroides*보다 군집에서 차지하는 비중이 다소 높은 것으로 확인되었으며, 15°C 발효에서 검출되었던 *Lc. citreum*의 T-RF는 검출되지 않았다. 이들 *Leuconostoc* 속 균주들은 *MseI*, *MspI* 및 *ThaI*로 절단한 T-RF profile에서 각각 196, 555, 213 bp에서 검출이 되었으며, 종간의 구분은 이루어지지 않았다. 저온발효에서 *Lc. kimchii*의 검출은 아직 보고된 바가 없어, 저온발효의 우점종으로 결론 내리기에는 좀 더 집중적인 연구가 요구된다. *HaeIII* profile에서 330 bp T-RF는 15°C 발효에서 가장 높은 비중을 보인 *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*에 해당하고, 326 bp의 T-RF는 *Lb. plantarum* group에 해당하는 것으로 추정되며, *Lb. plantarum* group 보다는 *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*가 군집에서 우위에 있는 것으로 나타났다. 4°C 발효 김치에서는 15°C 발효 김치에서 검출되지 않은 *E. faecalis*로 예상되는 T-RF가 4종의 제한효소 profile에서 모두 검출되었다. 군집에서 높은 비중을 차지하지는 않았지만, 본 실험에서의 검출로 최근의 연구에서 검출되지 않았던 *Enterococcus* 속의 존재를 제시하였다는 점에서 의의를 찾을 수 있으며, 고온보다는 저온발효에 관여할 것으로 추정된다.

4°C 발효에서는 15°C에서 보다 시간에 따른 군집의 상대

적 정량성의 차이가 확연하게 나타났다. 4°C 발효 김치에서 나타난 가장 두드러진 변화는 5주에서 가장 높은 비중을 차지하였던 *Weissella* 속의 비중이 10주에서는 두드러지게 감소하고, *Lb. sakei* 등의 lactobacilli가 우점종을 형성하였다는 점이다. 하지만, 그 밖의 유산균들의 군집 내에서의 비중에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 5주 발효에서 비교적 낮은 비중을 차지하고 있었던 *Lb. plantarum* group 및 *E. faecalis*로 예상된 T-RF는 10주 발효에서도 큰 변화를 보이지 않았다. 15°C에서 큰 정량적 변화를 보인 *Lb. plantarum* group이 저온에서는 정량적인 변화가 없다는 사실은 *Lb. plantarum* group이 저온에서는 잘 성장하지 못한다는 기존 연구결과와 일치한다. 10주 발효시킨 김치에서는 5주 발효시킨 김치에서 검출되지 않았던 *Lb. brevis* 추정 T-RF가 아주 낮은 비중으로 검출되어 *Lb. plantarum* group과 함께 온도에 민감하게 반응하는 것으로 나타났다. Table 3에 4°C에서 5주 및 10주간 발효시킨 김치시료의 T-RFLP 분석 결과를 종합하여 각 제한효소 처리로 검출된 실제 T-RF의 크기와 오차범위를 고려하여 선정된 미생물의 대한 database의 T-RF의 크기를 정리하여 나타내었다.

15°C와 4°C에서 발효시킨 김치의 T-RFLP 분석에서 획득된 T-RF profile에는 TAP 또는 16S rDNA database를 이용하여 해당 미생물을 확인하기 어려운 T-RF의 존재가 일부 확인되었다. 이러한 T-RF가 나타난 원인으로는 1) PCR 증폭과정 중 생성된 단일기타의 16S rRNA으로부터 유래된 pseudo-T-RF의 검출, 2) 제한효소의 불완전한 작용에 의해 생성된 T-RF, 3) 해당 김치시료에는 아직까지 보고된 바 없는 16S rDNA database에 구축되지 않은 미생물의 존재 등으로 추정된다.

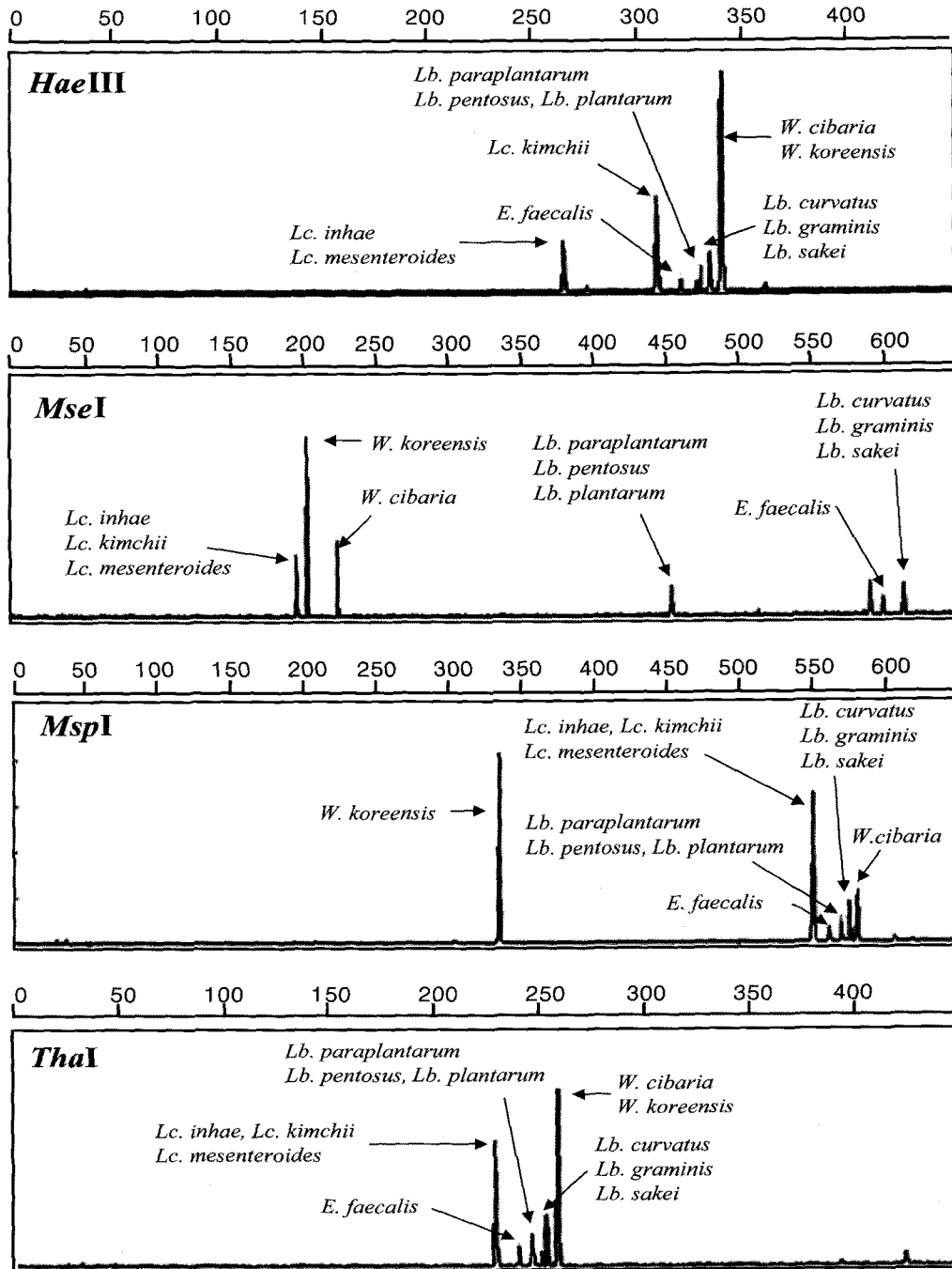


Fig. 4. T-RFLP profiles of the bacterial community in kimchi sample fermented at 4°C for 5 weeks. T-RFs were generated from *HaeIII*, *MseI*, *MspI*, and *ThaI* digestion of 16S rDNAs amplified from the total community DNA in kimchi sample. Each peak represents one or several bacterial species.

고찰

계통발생학적 분류체계 및 분자생물학적 방법론의 도입으로 얻어진 주목할 만한 성과는 *Lb. kimchii*[30], *Lc. kimchii* [15], *W. kimchii*[7], *W. koreensis*[21], *Lc. inhae*[13], *Tetragenococcus koreensis*[22]와 같은 신종 유산균의 발굴을 들 수 있다. 또한 기존에 주발효균과 산패균으로 인식되었던 *Lc.*

*mesenteroides*와 *Lb. plantarum*보다는 *W. koreensis*를 비롯한 *Weissella* 속 및 *Lb. sakei*가 발효온도에 관계 없이 김치 발효에 크게 관여하는 우점종이라는 사실이다.

분자생물학적 방법론이 적용된 김치미생물 연구에서도 *Leuconostoc* 속이 김치발효 우점종 중의 하나로 보고되고 있지만, 점차로 *Lc. mesenteroides*가 주발효균이라는 점에서는 상이한 결과들이 제시되고 있다. Kim 등[17]은 20°C에서 적



Table 3. Predicted species of T-RFs in kimchi samples fermented at 4°C for 5 and 10 weeks.

		5'-T-RF size (bp) <sup>a</sup>								Accession no.	Predicted species or phylotype	Detection (weeks)	
HaeIII		MseI		MspI		ThaI		5	10				
T-RF	DB	T-RF	DB	T-RF	DB	T-RF	DB						
262	266	196	200	551	555	231	236	AY675244	<i>Lc. inhae</i> LM 2630	○	○		
262	266	196	200	551	555	231	236	AB326298	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	○	○		
262	266	196	200	551	555	231	236	NC_008531	<i>Lc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293	○	○		
281	283	456	459	570	572	250	253	CP000416	<i>Lb. brevis</i> ATCC 367	○	○		
307	310	196	200	551	555	231	236	EU022367	<i>Lc. kimchii</i> PKB-045	○	○		
319/320	321	601	604	563	566	243	247	AJ301831	<i>E. faecalis</i> LMG 7937	○	○		
326	326	456	458	570	571	252/250	252	AB362736	<i>Lb. paraplantarum</i> NRIC 1733	○	○		
326	328	456	460	570	573	252/250	254	AB362758	<i>Lb. pentosus</i> NRIC 1837	○	○		
326	327	456	459	570	572	252/250	253	DQ239698	<i>Lb. plantarum</i> L5	○	○		
330/332	331	613	614	576/575	576	256/257	257	AM113778	<i>Lb. graminis</i> DSM 20719 <sup>T</sup>	○	○		
330/332	333	613	616	576/575	578	256/257	259	NC_007576	<i>Lb. sakei</i> subsp. <i>sakei</i> 23K	○	○		
330/332	332	613	615	576/575	577	256/257	258	AM113777	<i>Lb. curvatus</i> DSM 20019 <sup>T</sup>	○	○		
338	338	224	227	581	583	261	264	AF312874	<i>W. cibaria</i> CHJ3 <sup>T</sup>	○	○		
338	338	203	206	335/334	335	261	264	AY035892	<i>W. koreensis</i> S-5673	○	○		

<sup>a</sup>, T-RF, observed size of T-RF; DB, predicted size of T-RF from 16S rDNA sequence in database.

당히 숙성시킨 김치로부터 유산균을 분리하여 특이적 primer를 이용한 PCR, SDS-PAGE, 16S rDNA 염기서열 결정에 의해 동정한 결과, *Lb. sakei*가 *Lc. mesenteroides*보다 많이 검출된다는 결과를 제시하여 *Lb. sakei*가 김치발효의 주요균 중의 하나임을 제시하였다. DGGE를 이용한 김치미생물 생태계 평가에서도 유사한 결과들이 도출되었다. 4°C 김치발효 중 세균의 다양성과 변화양상을 DGGE로 분석한 결과 [26], *W. koreensis*는 발효 전과정에서 검출되었고, *Lb. sakei*는 발효 중기에 빠르게 증가하였다. *Leuconostoc* 속의 경우, *Lc. citreum*과 *Lc. mesenteroides*가 발효 초기에 검출되었고, 저온성인 *Lc. gelidum*이 발효 후기의 우점종으로 검출되어 *Lc. gelidum*의 저온발효 관련성이 확인되었지만, 초기에서부터 저온발효를 주도하는 미생물이라는 Kim 등 [14]의 결과와는 시간적으로 차이가 있다. 한편, 발효 후기의 우점종으로 알려진 *Lb. plantarum*과 *Lb. brevis*는 검출되지 않았다. 동일 연구그룹에 의하여 10°C 및 20°C 발효 김치에서의 미생물 역동성을 DGGE로 분석한 결과, *W. confusa*와 *Lc. citreum*이 발효 전과정에서 검출되었고, *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*는 발효 후반에 검출되는 것으로 나타났다 [20]. 적 속기를 지난 5종의 상품 김치로부터 직접 추출한 DNA로부터 16S rRNA 유전자를 증폭하여 구축한 clone library를 분석하여 김치에 존재하는 세균의 다양성을 조사한 결과에서는 *W. koreensis*가 가장 많이 검출되었고, *Leuconostoc* 속 및 *Lactobacillus* 속 유산균이 주를 이루는 것으로 나타났다 [16]. 하지만 검출된 *Leuconostoc* 속에서는 *Lc. mesenteroides* 보다는 다른 종이 다수 검출되었고, *Lactobacillus* 속 중에서는 *Lb. sakei*가 주를 이루며 *Lb. brevis*와 *Lb. curvatus*는 소수로 검출되었지만, *Lb. plantarum*은 검출되지 않았다. 4°C

및 15°C에서의 발효과정 중, *Lb. sakei*와 *Lb. plantarum*의 변화를 real-time PCR을 이용하여 준정량적으로 측정된 결과, 저온발효에서 *Lb. plantarum*의 생장은 현격히 감소하지만, *Lb. sakei*는 발효온도에 민감하지 않아 발효 후기까지 지속적으로 증가하는 것으로 나타났다 [29]. 이미 초기의 김치 미생물연구 [24, 27]에서 *Lb. plantarum*이 저온발효에서 검출되지 않는다고 제시된 바 있지만, 최근의 연구에서도 일관성 있게 *Lb. plantarum* group의 생장이 온도에 크게 영향을 받는 것으로 확인되었다.

15°C(중온) 및 4°C(저온) 김치발효의 중기 및 후기로 예상되는 시점에서 김치유산균의 상대적 정량성을 평가한 본 연구의 결과 또한 기존에 도출된 결과와 크게 다르지 않다. 15°C 발효 중기의 경우 *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*가, 4°C 발효 중기의 경우 *W. koreensis*가 최고 우위를 점하는 것으로 나타났고, 이들은 발효온도에 관계 없이 김치발효에 크게 관여하는 우점종으로 나타났다. 한편, 발효 후기에서는 온도에 관계 없이 *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*가 우점을 차지하게 되고, *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*가 차지하는 비중의 변화는 저온에서 더 확연하게 나타났다. 발효 온도에 따라 정도의 차이는 있지만, *W. koreensis*는 발효 초기에서 중기에 걸쳐, *Lb. sakei*와 *Lb. curvatus*는 발효 후기에 우위를 점하는 것으로 나타났다. 본 연구에서 *W. cibaria*는 *W. koreensis*보다는 낮은 수준이지만 발효 온도와 시간에 무관하게 검출되었고, 그 역동성은 *W. koreensis*와 거의 비슷한 양상을 나타냈다. 2002년 Choi 등 [7]이 김치에서 분리하여 등록한 *W. kimchii*는 2004년 *W. cibaria*에 통합되었고 [10], 최근의 연구에서는 *W. cibaria*가 다양한 발효 온도에서 검출되고 있다 [2, 5, 6]. *W. cibaria*는 발효 후기에 균집에서의 비중이 감소하는 양상

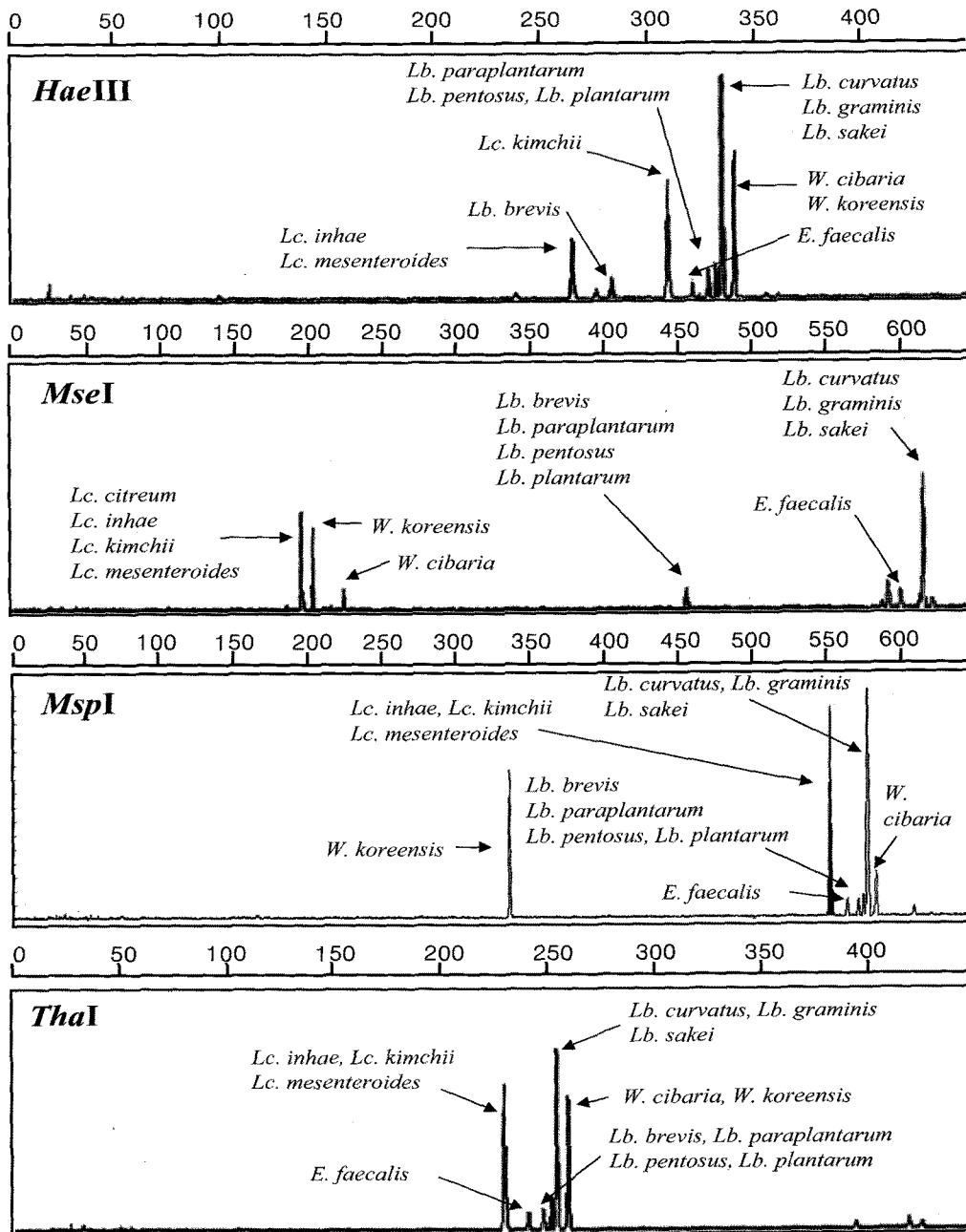


Fig. 5. T-RFLP profiles of the bacterial community in kimchi sample fermented at 4°C for 10 weeks. T-RFs were generated from *HaeIII*, *MseI*, *MspI*, and *ThaI* digestion of 16S rDNAs amplified from the total community DNA in kimchi sample. Each peak represents one or several bacterial species.

을 보이고 있어 *W. koreensis*와 함께 온도보다는 산에 의한 생육 영향을 받는 것으로 추정된다.

초기 및 중기의 발효를 주도하는 것으로 알려진 *Lc. mesenteroides*를 비롯한 *Leuconostoc* 속의 경우, 분자생물학적 방법론 도입 이후에 *Lc. kimchii* 및 *Lc. inhae*와 같은 신규 미생물이 발굴되었고, *Lc. carnosum*, *Lc. citreum*, *Lc. gasicomitatum*, *Lc. gelidum*, *Lc. lactis*와 같은 다양한 *Leuconostoc* 속 유산균이 김치발효에 관여하는 것으로 보고

되었다[5, 6, 16, 20, 26]. 본 연구에서 사용한 제한효소에 의해 *Leuconostoc* 속을 종 수준에서 구분할 수 있는 T-RF가 형성되지 않아 구체적인 정량성을 언급할 수는 없지만, *Lc. mesenteroides*, *Lc. inhae*, *Lc. citreum*, *Lc. kimchii*의 발효 관련성이 제시되었다. *ThaI*을 사용한 경우에는 *Lc. citreum*에 해당하는 단일 T-RF가 형성되어 그 존재가 규명되었지만, 군집 내에서의 비중은 크지 않은 것으로 나타났다. Choi 등[8]은 15°C 발효 김치로부터 5일간 colony를 선발하여 생

화학적 방법과 16S rDNA 염기서열 결정을 통하여 동정한 결과, 초기에는 *Lc. citreum*이 주발효균으로 발효를 주도하다가, 약 3일경부터 *W. confusa*로 추정되는 *Weissella* 속 유산균, *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*가 증식하기 시작하는 것으로 보고하였다. 본 연구에서 수행한 15°C 발효 김치에서도 Choi 등[8]이 검출한 유산균이 모두 검출되었고, 후기에 *Lb. plantarum* group이 크게 증식하는 것으로 나타났다. Choi 등[8]의 연구와 본 연구는 김치의 재료 및 제조환경, 시료의 채취시간이 상이하여 *Lc. citreum*이 초기발효를 주도하는 주발효균이라는 사실에 대한 결론을 내릴 수 없지만, 두 연구를 종합하면 15°C 발효에서는 *Lc. citreum*으로부터 *Weissella* 속, *Lactobacillus* 속으로 우점종이 변화한다는 결론에 도달하게 된다. 저온발효 김치에서 검출되는 것으로 알려진 *Lc. gelidum*은 본 연구에서는 검출되지 않았고, 최근 Bae 등[2]이 microarray를 이용하여 저온발효 김치로부터 유산균을 검출한 결과에서도 *Lc. gelidum*의 검출은 높지 않은 것으로 보고되었다. 따라서 *Lc. gelidum*의 검출은 발효온도뿐만 아니라, 재료나 제조과정 및 시기에 따른 영향이 관여하는 것으로 추정된다. 고전적 동정법에 의한 연구와는 달리 본 연구에서는 *Leuconostoc* 속이 발효 후기에도 상당한 비중을 차지하고 있는 것으로 나타났다. *Leuconostoc* 속의 경우 표현형에 의한 동정의 어려움이 많이 제기되었고[11], 고전적 동정법에 의하여 수행된 김치 유래 *Leuconostoc* 속 검출의 경우, dextran 및 산의 형성, 선택배지의 활용에 기반을 두었기 때문에 김치발효 초기에 *Leuconostoc* 속이 우점종을 점한다는 점과 산도의 증가에 따라 생육이 영향을 받는다는 사실에는 의문이 제기된다. 본 연구를 비롯하여 발효 후기에 *Leuconostoc* 속이 검출된다는 최근의 보고[2, 6, 26]를 고려하면, 16S rDNA의 염기서열 및 다형적 분류법(polyphasic taxonomy)에 기반을 둔 *Leuconostoc* 속 각 종의 김치발효 관련성에 대한 재평가가 요구된다.

Chin 등[5]은 발효 중기로 예상되는 pH 4 이상의 김치시료들로부터 37°C에서 유산균을 분리한 다음, 16S와 23S ribosomal RNA 유전자 사이에 존재하는 internal transcribed spacer region(ITS) 염기서열의 다양성 및 부분적 16S rDNA 염기서열 결정을 통하여 김치유산균의 다양성을 검토하였다. 이들의 연구에서도 *Leuconostoc* 속 및 *Weissella* 속 유산균이 다수 검출되었지만, 최근의 보고들과는 달리 *Lb. brevis*가 우점종으로 나타났다. 이 결과는 김치로부터의 유산균 선별 과정에서 배양온도 조건을 37°C로 설정함에 따라 발생한 결과로 추정된다.

Bae 등[2]은 genome-probing microarray를 이용하여 4°C 발효 김치의 유산균 변화를 김치로부터 DNA를 추출한 후 PCR 증폭과정 없이 검토한 결과, *Weissella* 및 *Leuconostoc* 속에 속하는 대부분의 종(species)이 검출되었고, 다수의 *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* 속

유산균이 검출되었으며 *Streptococcus* 속도 일부 검출되었다. 이 결과는 최근에 시도된 분자생물학적 방법에 의해서 검출되지 않았던 *Enterococcus* 및 *Pediococcus*, *Streptococcus*의 존재를 확인함으로써 PCR에 의한 16S rDNA의 증폭과정에서 발생하는 미생물 생태계의 왜곡을 제시한 한 예라고 할 수 있다. Microarray에 사용한 동일한 DNA를 PCR로 증폭한 후, DGGE로 분석한 결과 9종의 미생물이 검출되어 99 종이 검출된 microarray 결과가 편향적으로 축소되는 것을 확인하였다. Microarray 결과에서는 소수로 존재하는 많은 유산균 종을 확인하였다는 점에서 큰 의의를 가지고 있지만 *Weissella*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* 속 유산균이 김치발효에 주를 담당한다는 최근에 보고된 결과들과 큰 차이는 없는 것으로 나타났다.

김치발효 관련 유산균 연구의 가장 큰 변화 요인 중의 하나는 과거 *Lactobacillus* 속으로 분류되었던 일부 유산균들 및 *Lc. paramesenteroides*가 *Weissella* 속으로 재정리된 점을 들 수 있다[9]. 분자생물적 방법론의 도입 전에 도출된 초기 주발효균 *Lc. mesenteroides*의 많은 수가 다른 종의 *Leuconostoc* 속으로 추정되고, 후기발효의 주요균 *Lb. plantarum*을 비롯한 *Lactobacillus* 속 유산균의 다수의 동정에 오류가 있었을 것이며, 이들 중 일부는 *Weissella* 속으로 편입된 것으로 추정된다. 본 T-RFLP 분석에서 *Lb. sakei*, *Lb. graminis*, *Lb. curvatus* 간의 구분과 *Lb. plantarum* group 내에서의 구분, *Leuconostoc* 속의 종간 구분에 어려운 점이 나타났지만, Choi 등[8]에 의한 16S rDNA 염기서열에 바탕을 둔 분리군의 동정에서도 이러한 문제점의 해결은 완벽하지 않은 것으로 보고되었다. T-RFLP는 분리군을 동정하는 방법에 비해 군집에 존재하는 미생물을 정확히 규명하는 측면에서는 다소 떨어지지만, 군집의 다양성 및 역동성을 빠르게 규명하는 측면에서는 우수하다는 것을 보여준 한 예라 할 수 있다.

## 요 약

미생물 구조 및 집단 구성원의 변화를 배양에 의존하지 않고, 빠르게 평가할 수 있는 방법의 하나인 terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 분석을 김치 유산균 연구에 적용하여, 15°C 및 4°C 발효 김치에 관여하는 유산균의 다양성과 역동성을 검토하였다. 두 발효온도에서 공통적으로 *Leuconostoc mesenteroides*, *Lc. inhae*, *Lc. kimchii*, *Weissella koreensis*, *W. cibaria*, *Lactobacillus sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*, 및 *Lb. brevis*의 존재가 예상되었고, *Lc. citreum*과 *Enterococcus faecalis*는 각각 15°C와 4°C에서 검출되었다. *W. koreensis*는 중기발효에 우점을 점하였고, *Lactobacillus* 속은 발효 후기의 우점종으로 나타났다. *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*는 발효 온도에 관계 없이 우점종을 형성하였지만, *Lb.*

*plantarum*, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*와 *Lb. brevis*의 생육은 저온에서 잘 일어나지 않았다. 몇 종의 *Leuconostoc* 속 유산균은 발효 후기까지 생장이 유지되었다.

### 감사의 글

이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2007-313-F00124).

### REFERENCES

- An, D.-J., K. Lew, and K.-P. Lee. 1999. Effects of adipic acid and storage temperature on extending the shelf life of kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **8**: 78-82.
- Bae, J.-W., S.-K. Rhee, J. R. Park, W.-H. Chung, Y.-D. Nam, I. Lee, H. Kim, and Y.-H. Park. 2005. Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8825-8835.
- 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.
- Cheigh, H. C. and K. Y. Pack. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspect of kimchi. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **34**: 175-203.
- 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 analysis. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 68-76.
- Cho, J., D. Lee, C. Yang, J. Jeon, J. Kim, and H. Han. 2006. Microbial population dynamics of kimchi, a fermented cabbage product. *FEMS Microbiol. Lett.* **257**: 262-267.
- Choi, H.-J., C.-I. Cheigh, S.-B. Kim, J.-C. Lee, D.-W. Lee, S.-W. Choi, J.-M. Park, and Y.-R. Pyun. 2002. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 507-511.
- Choi, I.-K., S.-H. Jung, B.-J. Kim, S.-Y. Park, J. Kim, and H.-U. Han. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimchi, a fermented cabbage product. *Antonie van Leeuwenhoek* **84**: 247-253.
- Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos, and S. Wallbanks. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* **75**: 595-603.
- Ennahar, S. and Y. Cai. 2004. Genetic evidence that *Weissella kimchii* Choi et al. 2002 is a later heterotypic synonym of *Weissella cibaria* Bjorkroth et al. 2002. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**: 463-465.
- Jang, J., B. Kim, J. Lee, and H. Han. 2003. A rapid method for identification of typical *Leuconostoc* species by 16S rDNA PCR-RFLP analysis. *J. Microbiol. Methods* **55**: 295-302.
- Jin, H. S., J. B. Kim, Y. J. Yun, and K. J. Lee. 2008. Selection of kimchi starters based on the microbial composition of kimchi and their effects. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**: 671-675.
- Kim, B., J. 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, B.-J., H.-J. Lee, S.-Y. Park, J. Kim, and H.-U. Han. 2000. Identification and characterization of *Leuconostoc gelidum*, isolated from kimchi, a fermented cabbage product. *J. Microbiol.* **38**: 132-136.
- Kim, J., J. Chun, and H.-U. Han. 2000. *Leuconostoc kimchii* sp. nov., a new species from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 1915-1919.
- 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.
- 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.
- Lee, C.-W. 1997. Lactic acid fermented foods and their benefits in Asia. *Food Control* **8**: 259-269.
- 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, J.-S., G.-Y. Heo, J. W. Lee, Y.-J. Oh, J. A. Park, Y.-H. Park, Y.-R. Pyun, and J. S. Ahn. 2005. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **102**: 143-150.
- 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, M., M. K. Kim, M. Vancanney, J. Swings, S.-H. Kim, M. S. Kang, and S.-T. Lee. 2005. *Tetragenococcus koreensis* sp. nov., a novel rhamnolipid-producing bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 1409-1413.
- Lee, S.-H., N.-Y. Park, and W.-J. Choi. 1999. Changes of 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.
- 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.
- 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.
- 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.
27. 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.
28. Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 1-29.
29. 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.
30. Yoon, J.-H., S.-S. Kang, T.-I. Mheen, J.-S. Ahn, H.-J. Lee, T.-K. Kim, C.-S. Park, Y. H. Ko, 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.

(Received Oct. 13, 2008/Accepted Nov. 11, 2008)