

배양 의존적 및 배양 비의존적 방법에 의한 홍어회 서식 미생물의 다양성 분석

이은정 · 김태형 · 김하근* · 이정기 · 곽한식 · 이종수
배재대학교 생명유전공학과

Analysis of Bacterial Diversity in Fermented Skate Using Culture-dependent and Culture-independent Approaches. Lee, Eun-Jung, Tae-Hyung Kim, Ha-Kun Kim*, Jung-Kee Lee, Hahn-Shik Kwak, and Jong-Soo Lee. Department of Life Science and Genetic Engineering, Paichai University, Daejeon 302-735, Korea – Fermented skate is a traditional Korean food popular in Southwestern area of Korea. It has a characteristic flavor and alkaline pH. In this study we tried to determine the microbial flora in fermented skate using two different approaches. In culture-independent method, we amplified V2 region of 16S rRNA gene by PCR and cloned them into pUC18 plasmid to construct 16S rDNA fragment library. BLAST searches for the sequences obtained from this library revealed that uncultured bacterium clone 054E11.b was the most dominant flora in this fermented fish. In culture-dependent method, we diluted suspension of skate and spreaded on MRS, PCA, and MacConkey plates. We identified colonies grown on those plates by using PCR amplification of V2 region of 16S rRNA and DNA sequencing. BLAST searches of those DNA sequences resulted in totally different species with the observations from the 16S rDNA library analysis. Discrepancies of results obtained from both approaches suggest that the agar plates used in culture-dependent method may be different from the real condition of fermented skate. Therefore, results from culture-independent approach using 16S rDNA fragment library analysis may reflect real microbial flora in fermented skate.

Key words: Fermented skate, microbial flora, 16S rRNA, PCR, DGGE

서 론

홍어회는 독특한 우리나라의 전통 발효 식품 중 하나이다. 홍어의 육질에는 요소와 트리메틸아민(trimethylamine oxide, TMAO) 성분이 다량 함유 되어 있으며, 발효 기간 중에 강한 암모니아 냄새가 난다. 이는 미생물에 의해 요소와 TMAO가 분해되어 생긴 암모니아 때문이다. 이때 생성된 암모니아는 위산을 중화시키고 체내에서 유해한 세균의 증식을 억제하는 작용을 한다[2]. 최근 홍어를 이용한 연구로 홍어의 생리활성이나 성분분석으로 국내산과 수입산 홍어회의 이화학적 및 미생물학적 특성, 발효 홍어의 품질 특성, 홍어 김치의 이화학적 및 미생물학적 특성 등 홍어의 기능성에 대한 연구가 이루어지고 있다[2, 3, 9, 10]. 그러나 홍어의 기능성에 대한 연구만큼 홍어에 존재하는 미생물에 관한 연구는 많이 부족한 실정이다. 홍어회는 숙성 전 pH 값이 7.0 이하이던 것이, 숙성되는 도중 요소의 분해로 생성된 암모니아의 영향 때문에 숙성된 홍어회는 pH 8.9-9.4 범위에 있다고 보고되었다[2, 10]. 국내유통 홍어회 제품의 미생물 및 이화학적 특성을 조사한 논문에 따르면 홍어회에 존재하는 미

생물의 총 균수는 4.8 log CFU/g부터 7.5 log CFU/g 사이에 있는 것으로 보고하였으며, 상세한 미생물의 분포에 대한 연구는 현재까지 전무하다[10].

선별적인 증식배양을 통해 자연계의 서식처에 있는 특정한 미생물을 증식하는데 필요한 조건을 충족시키기 어렵기 때문에, 생태계에 존재하는 미생물들을 실험실 조건에서 모두 배양할 수 있는 것은 아니다[16]. 지금까지 자연계에 존재하는 박테리아 중 0.1-10% 정도만이 실험실에서 분리되어 그 특성이 규명되었다고 알려져 있다. 따라서 생태계에 존재하는 미생물들을 집락용 배양을 형성시켜 순수 배양을 하는 배양 의존적 방법(culture-dependent)을 통해 수행된 미생물 연구는 뚜렷한 한계를 원천적으로 갖고 있다. 한편 환경에 존재하는 미생물을 확인하기 위해 중합효소 연쇄반응에 의해 증폭한 16S rDNA의 유전자 서열을 분석하는 배양 비의존적 방법(culture-independent)이 개발되어 배양 의존적 방법의 한계점을 보완해 주고 있다[1, 12, 13]. 최근 이루어진 기술적 진보에 의해 환경에 존재하는 미생물 집단의 프로파일링을 용이하게 할 수 있게 되었다. 배양 비의존적 방법을 이용하여 토양, 반추위, 배양토, 치즈 및 김치 등에 존재하는 미생물 집단을 분석하는 보고들이 활발하게 이루어지고 있다[4-7, 11]. 본 연구에서는 독특한 맛과 향을 가지는 발효 식품으로 즐겨먹고 있는 발효홍어(홍어회)의 미생물 다양성을 규명하기 위해, 한천 평판배지에서 미생물을 배양한 후

*Corresponding author

Tel: 82-42-520-5389, Fax: 82-42-520-5385

E-mail: hakun@pcu.ac.kr

동정하는 배양 의존적인 방법과 함께 16S 라이보솜 RNA의 V2 가변지역을 중합효소 연쇄반응으로 증폭한 후 16S rDNA 라이브러리를 구축하여 이를 분석하여 동정하는 배양 비의존적인 방법들을 동시에 사용하였다.

재료 및 방법

시료 및 DNA 추출

홍어 전문 식당에서 구입한 홍어회(20 g)를 30 mL의 PBS 완충용액(pH 7.0)으로 균질화 시켰다. 홍어회 현탁액을 제노믹 DNA 분리 키트(Solgent, Daejeon, Korea)를 이용하여 DNA를 추출했다. 추출한 DNA는 16S rDNA를 증폭하기 위한 중합효소 연쇄반응(PCR)의 주형으로 사용하였다.

PCR

홍어회 현탁액으로부터 추출한 DNA를 주형으로 사용하여, 16S rRNA 유전자의 V2 지역을 nested PCR로 증폭하였다. 1차 PCR 반응에는 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)와 1492R(5'-GGCTACCTGTTACGACT)을 프라이머로 사용하였다. 증폭된 DNA를 증류수로 100배 희석한 후, 희석한 DNA 1 μ L를 2차 PCR 반응의 주형으로 사용하였다. 16S rDNA 라이브러리 구축을 위해서 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG)와 518R(5'-ATTACCGCGTGTGCTGG) 프라이머 세트를, 그리고 DGGE 분석을 위해서는 338FGC(5'-CGCCCCGCCGCGCGGGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCA)와 518R 프라이머 세트를 사용하여 PCR 반응을 수행하였다[13, 15]. PCR 반응은 94°C에서 30초 간 변성, 45°C에서 30초 간 어닐링, 72°C에서 1분간의 신장반응을 1주기로 하여 30회 반복하였다.

16S rDNA 라이브러리 제작 및 염기서열 분석

HincII를 처리한 pUC18 1.0 μ L, 16S rDNA 1.0 μ L, 5X DNA 연결효소 완충용액 2 μ L, 증류수 5 μ L 그리고 DNA Quick ligase(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) 1 μ L를 혼합하여 10 μ L가 되도록 한 후, 5분 간 상온에서 DNA가 연결되도록 반응시켰다. DH5 α (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) competent cell 50 μ L에 ligation sample 1 μ L를 혼합하여 얼음에서 30분간 정지시켰다가 42°C에서 30초 간 열 충격을 주어 형질전환을 시켰다. 앰피실린(50 μ g/ml), X-Gal(40 μ g/ml) 그리고 IPTG(1 mM)이 들어 있는 LB 한천배지에 도말하여 집락이 형성되도록 하였다. 흰색 집락을 선별하여 3 mL의 TB 액체 배지에 접종하여 배양시켰다. 플라스미드 정제 키트(Solgent, Daejeon, Korea)를 사용하여 플라스미드를 분리한 후 DNA 염기서열결정을 하였다.

변성 구배 젤 전기영동 (DGGE)

CBS 시스템의 DGGE를 사용하여 PCR 산물을 분석하였다. 7M urea와 40%(v/v) formamide를 변성제 100%로 정하고, 8%(w/v)의 폴리아크릴아마이드 젤에 urea와 formamide 농도구배가 40%-80%로 형성되도록 하였다. 1X TAE를 사용하여 55°C에서 80 V로 16시간 동안 전기영동한 후 EtBr로 DNA를 염색하여 분석하였다.

평판배양

홍어회 현탁액을 LB 액체배지를 이용하여 10^{-3} - 10^{-7} 으로 연속희석을 하였다. 각각의 희석배수에서 희석액을 MacConkey 한천평판배지(pH 7.1), MRS 한천평판배지(pH 6.5), Plate Count agar(PCA, pH 7.0) 평판배지에 도말한 후 30°C에서 36시간 동안 배양하였다. 평판배지에서 형성된 집락을 338F와 518R 프라이머 세트로 PCR 반응을 수행하였다. 증폭된 산물의 염기서열을 결정한 후 BLAST를 이용하여 동정하였다.

계통수 분석

PCR 산물을 DNA 염기서열 분석을 하여 얻은 서열을 BLAST와 EZtaxon server version 2.1을 이용하여 균주를 확인하였다. 서열 정렬은 Bioedit를 사용하였다. 겹과 모호한 부분은 분석에서 제외했다. 계통수 분석은 neighbor-joining method를 이용하여 수행하였다[8, 12].

결과 및 고찰

16S rDNA 절편 라이브러리 분석에 의한 홍어회 서식 미생물의 분석

16S rDNA의 서열을 분석하여 미생물의 존재를 확인할 수 있는 배양 비의존적 방법은 실험실 조건에서 미생물을 분리하고 유지시키며 또한 증식시키는 과정 없이 특정한 생태계에 존재하는 미생물들을 확인할 수 있는 장점을 갖고 있다. 따라서 발효된 홍어(홍어회)에 존재하는 박테리아 집단의 다양성을 확인하기 위해, 338F와 518R 프라이머 세트를 이용한 PCR 반응에 의해 181bp 크기의 박테리아 16S rDNA 절편들을 증폭하였고, 이를 pUC18에 클로닝하여 라이브러리를 구축하였다. 또한 X-Gal과 IPTG가 첨가된 LB 한천 배지에서 흰색 집락을 형성하는 72개의 클론을 라이브러리로부터 무작위로 선별하여, 이들 클론으로부터 플라스미드를 각각 분리하였다. 72개의 클론으로부터 분리한 플라스미드들을 염기서열을 분석한 결과 63개의 플라스미드는 삽입된 절편 DNA가 들어 있었으나, 9개의 플라스미드에는 삽입된 절편 DNA가 없이 pUC18 자체가 분리되었다. 따라서 63개의 삽입 DNA 서열에 대해 NCBI의 BLAST를 이용하여 상동성을 조사함으로써 홍어회에 서식하는 미생물들을 동정하였다. 63개의 플라스미드들을 분석한 결과, 12종류의 DNA

염기서열을 발견하였다. 12종류의 염기서열들이 동일한 확률로 존재하는 것은 아니었다. 예를 들어 특정한 염기서열은 63개의 염기서열 중 36개의 클론에 동일한 삽입체가 들어 있어서 전체 라이브러리에서 $36/63=57.1\%$ 의 비율로 존재하고 있음을 알 수 있었다. 이들 36개의 클론들(클론 3, 4, 6, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 46, 50, 51, 56, 57, 58, 60, 62, 63, 64, 68, 69, 71, 72)의 염기서열을 BLAST를 이용하여 분석한 결과, 95%의 유사성을 갖고서 uncultured bacterium clone 054E11.b로 동정되었다. 6종류의 클론들(클론 7, 8, 21, 22, 54, 59)이 동일한 서열을 갖고 있었으며, 이들은 전체 라이브러리에서 $6/63=9.5\%$ 의 비율로 존재하고 있었다. BLAST 분석한 결과 이들은 100%의 유사성을 갖고 uncultured bacterium clone 13/4/10H로 동정되었다.

그 뒤를 이어 4종류의 클론(클론 2, 28, 40, 49)이 동일한 염기서열을 갖고 있음이 염기서열분석 결과 밝혀졌고, 이들 클론은 라이브러리에서 $4/63=6.3\%$ 를 차지하고 있으며, BLAST로 분석한 결과 100%의 유사성으로 uncultured bacterium clone PDTRIIOCT054로 동정되었다. 이밖에 9종류의 클론들은 1회씩만 나타났으며, 이들은 각각 uncultured bacterium clone nbt229e07, Adelle penguin guano bacterium 97, uncultured bacterium clone 004F02.b, uncultured bacterium 005F01.b, uncultured bacterium clone R2B18H, uncultured bacterium clone 043F04.g, uncultured bacterium clone 001H10.g, *Serpens flexibilis* strain ATCC 29606, *Psychrobacter* sp. J466로 동정되었다(Table 1).

이 결과로부터 *Serpens flexibilis* strain ATCC 29606, *Psychrobacter* sp. J466를 제외하고는 대부분 실험실에서 배양되지 않았던 박테리아들이 홍어회에 서식하고 있는 것

으로 추정할 수 있다. 특히 uncultured bacterium clone 054E11.b가 57.1%, uncultured bacterium clone 13/4/10H가 9.5% 그리고 uncultured bacterium clone PDTRIIOCT054가 6.3%의 비율로 나타남으로써 이들이 홍어회에서 우점군으로 존재하고 있다고 추정할 수 있다. 대장균, *Vibrio* 등 중성 식품에서 자라는 식중독 미생물 등이 본 실험에서 검출되지 않았는데, 이는 숙성된 홍어회는 pH 8.9-9.4 범위에 있어서 자라기 어려운 환경을 이루고 있기 때문인 것으로 판단된다 [10].

DGGE에 의한 16S rDNA 분석

발효홍어(홍어회)를 PBS 완충용액으로 현탁시킨 현탁액으로부터 분리한 DNA를 주형으로 사용하여 40-bp의 GC 클램프를 갖고 있는 338FGC와 518R 프라이머 세트를 사용하여, 16S rDNA 조각을 증폭하기 위한 PCR 반응을 수행하였다. 또한 12가지의 서로 다른 삽입체를 갖고 있는 클론들(클론 2, 3, 9, 7, 12, 18, 23, 26, 35, 52, 55, 67)에 대해서도 338FGC와 518R 프라이머 세트를 사용하여 각각 PCR을 수행하였다. 이들 PCR 산물을 포름아마이드와 요소 변성제가 들어있는 변성구배 아크릴아마이드 젤(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE)을 이용하여 전기영동을 수행하였다. DGGE로 DNA 조각을 분석하면 동일한 길이의 염기조각이라 하더라도 염기서열 차이에 따른 T_m 값의 차이에 의해 이중가닥이 녹아 단일가닥을 만들면서 서로 다른 위치에 DNA 띠를 형성하게 된다.

홍어회 현탁액으로부터 분리한 DNA를 주형으로 사용하여 얻은 PCR 산물과 12종류의 클론들로부터 증폭된 221-bp DNA 조각들을 함께 전기영동하여 상대적인 위치를 비교하였다(data not shown). 흥미 있게도 염기서열의 차이에도 불구하고 서로 다른 5종류의 클론인 3번, 7번, 9번, 18번, 52

Table 1. Bacterial flora of fermented skate identified from the 16S rDNA fragment library.

Putative Species	Clone No.	Related GenBank sequence	Similarity (%)	Proportion (%)
Uncultured bacterium clone PDTRIIOCT054	2, 28, 40, 49	GU185674.1	100	4/63=6.3
Uncultured bacterium clone 054E11.b	3, 4, 6, 10, 11, 14, 15, 16, 20, 25, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 37, 38, 41, 42, 43, 45, 46, 50, 51, 56, 57, 58, 60, 62, 63, 64, 68, 69, 71, 72	EU837945.1	95	36/63=57.1
Uncultured bacterium clone 13/4/10H	7, 8, 21, 22, 54, 59	FJ380169.1	100	6/63=9.5
Uncultured bacterium clone nbt229e07	9	EU538425.1	100	1/63=1.6
Adelle penguin guano bacterium 97	12	AY377492.1	100	1/63=1.6
Uncultured bacterium clone 004F02.b	18	EU837649.1	99	1/63=1.6
Uncultured bacterium 005F01.b	23	EU837694.1	99	1/63=1.6
Uncultured bacterium clone R2B18H	26	GQ423829.1	100	1/63=1.6
Uncultured bacterium clone 043F04.g	35	EU837382.1	100	1/63=1.6
Uncultured bacterium clone 001H10.g	52	EU837539.1	98	1/63=1.6
<i>Serpens flexibilis</i> strain ATCC29606	55,66,	GU269546.1	94	2/63=3.2
<i>Psychrobacter</i> sp. J466	67	GQ370385.1	98	1/63=1.6

번은 동일한 위치에서 띠를 형성하였다. 또한 서로 다른 2 종류의 클론인 17번과 55번도 동일한 위치에서 띠를 형성하였다. 동일한 박테리아에서 유래한 16S rDNA 조각도 rRNA 유전자의 중복성 때문에 다른 위치에서 DNA 띠를 형성하는 것이 보고된바 있다[14]. 서열이 다른 경우에도 16S rDNA 조각들이 동일한 녹는점을 가짐으로써, 동일한 위치에서 DNA 띠를 형성할 수도 있다[5]. 이 결과로부터 배양 비의존적 방법으로 미생물 다양성을 분석할 경우 16S rDNA 조각을 클로닝하여 라이브러리를 만드는 것이 DGGE보다 더 민감하게 미생물 집단에 대한 정보를 얻을 수 있다는 것을 알 수 있다.

배양 비의존적 방법에 의해 발효홍어로부터 동정된 균주들의 계통수 분석

증폭된 PCR 산물의 염기서열을 결정하여 얻은 데이터를 BLAST와 EzTaxon Server version 2.1을 이용하여 균주를 확인하였다.

16S rDNA 조각들의 라이브러리로부터 얻은 12종류의 클론들은 그람 음성 박테리아인 *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Azomonas*, *Azotobacter*, *Psychrobacter* 등 총 6가지의 속과 연관이 깊은 것으로 나타났으며 (Fig. 1), 대부분 *Pseudomonas* 속과 유사한 종으로 보인다.

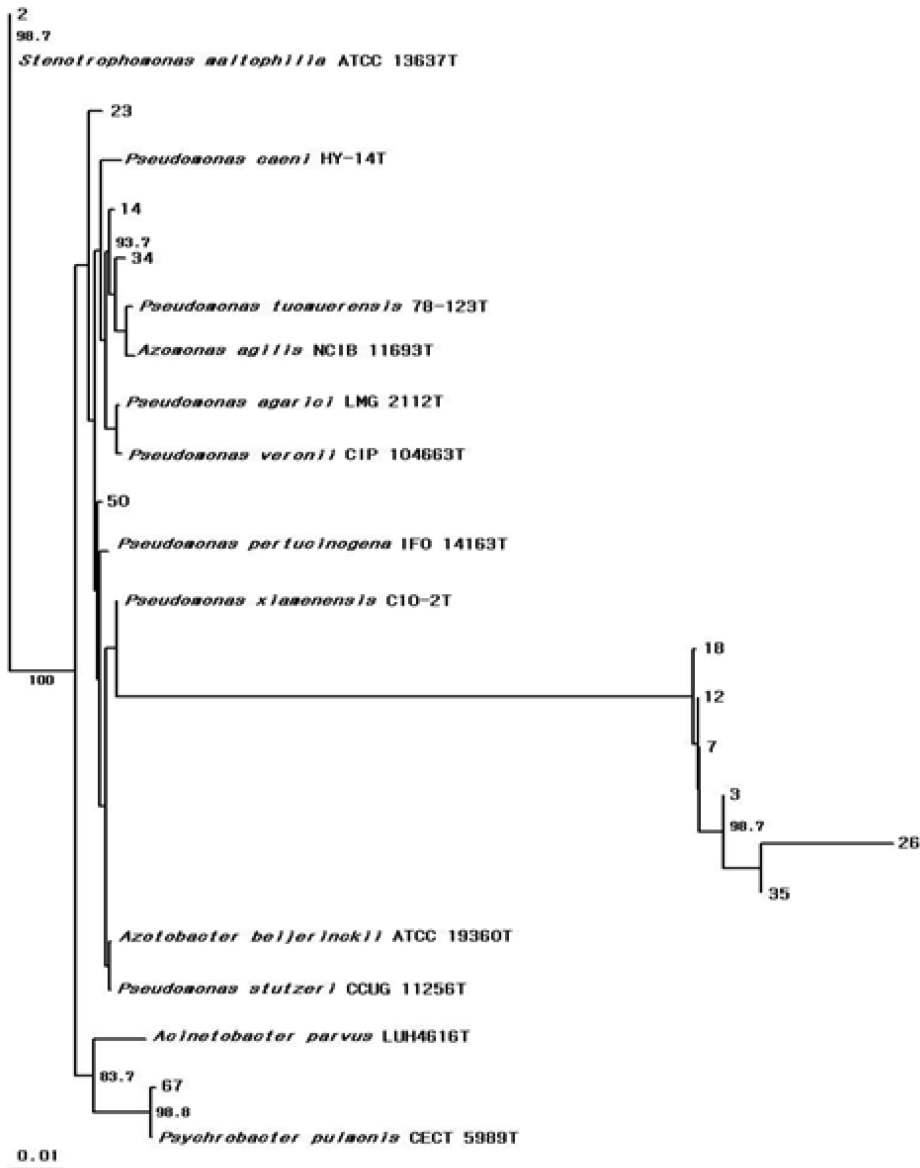


Fig. 1. Phylogenetic tree for the 16S rDNA sequences from the analysis of 16S rDNA fragment library which are constructed from suspension of fermented skate. Numbers above each node are confidence levels(%) generated from 1,000 bootstrap trees. The scale bar is in fixed nucleotide substitutions per sequence position. Individual clones are shown in numbers.

도말평판법에 의해 형성된 집락 분석

발효홍어(홍어회)에 서식하는 미생물들을 분리하기 위해, 홍어회를 PBS 완충용액을 사용하여 균질화 시켰다. 이 현탁액을 10^{-3} - 10^{-7} 배로 LB broth를 이용하여 연속희석을 했다. 희석된 시료들을 그람음성세균을 선별적으로 배양할 수 있는 MacConkey 한천평판배지, 유산균이 선별적으로 성장할 수 있는 MRS 한천평판배지, 그리고 전체 세균들이 성장할 수 있는 PCA 한천평판배지에 각각의 희석 배율에서 2장씩 도말한 후 30°C 배양기에 36시간 동안 배양하였다.

각각의 한천평판배지에서 형성된 집락을 접종 고리로 분리하여, 새로운 한천평판배지로 옮겨 원판을 만들었다. 총 23개의 집락들을 분리하였고, 이들을 대상으로 338F와 518R 프라이머 세트를 이용한 콜로니 PCR 반응을 수행하여 181 bp 크기의 16S rDNA 절편들을 증폭하였다. 증폭된 DNA 절편들을 아가로스 젤에서 전기영동을 한 후 QIAEX II를 사용하여 회수하여 DNA 염기서열을 결정하였다. 23개의 콜로니로부터 증폭된 16S rDNA 절편들을 분석한 결과, 14종류의 염기서열을 얻을 수 있었다. NCBI의 BLAST를 이용하여 상동성을 조사함으로써 홍어회에 서식하는 미생물들을 동정하였다. BLAST에 의해 상동성을 비교한 결과, 동정된 박테리아들은 *Pseudomonas* sp. KC-EP-S13, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *typhimurium* str. 14028S, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *Typhi* strain SRDF10, uncultured bacterium clone R4J3M4-H2, *Psychrobacter* sp. HTGH24, uncultured bacterium clone LaYa5a-70, uncultured *Leuconostoc* sp. Clone TKL42, *Staphylococcus equorum* strain SIP12, *Psychrobacter* sp. J466, uncultured bacterium clone R2J7M4_E4, uncultured bacterium clone nbw709f07c1, *Staphylococcus* sp. DHHS4, uncultured bacterium clone OKHOTSK-Bac-B38, uncul-

tured bacterium clone PDTRI1OCT044 등이 밝혀졌으며 이들 결과는 Table 2에 정리되어 있다. 이 결과를 16S rDNA 절편 라이브러리 분석에 의해 얻은 결과와 비교해 보았을 때, 두 가지 실험 방법에서 *Psychrobacter* sp. J466만이 모두 검출되고 나머지 박테리아들의 균종은 상이하다는 점이 특이하다. 예를 들어, 실험에 사용한 MRS, PCA 그리고 MacConkey 한천평판배지의 pH는 6.5-7.1로서 홍어회의 pH인 8.9-9.4와 상당히 다르며[2, 10], 또한 영양소의 조성도 차이가 있으므로 한천평판배지가 홍어회와 다른 성장환경을 제공하였을 것으로 추측된다. 따라서 홍어회에 존재하는 미생물 집단은 16S rDNA 라이브러리 분석 결과가 실제에 근접하게 반영하고 있다고 판단된다. 이들의 상세한 역할은 추후 수행될 연구에 의해 규명될 것으로 예상된다.

발효홍어로부터 도말평판법에 의해 동정된 균주들의 계통수 분석

PCR 산물을 염기서열을 결정하여 얻은 데이터를 BLAST 프로그램과 EzTaxon Server version 2.1을 이용하여 균주를 확인하였다. 배양 의존적 방법에서 분리한 14개의 균주들은 *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Kocuria*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Delftia*, *Exiguobacterium*, *Leuconostoc* sp. 등 총 11가지의 속과 연관이 깊은 것으로 나타났다(Fig. 2).

요 약

발효홍어(홍어회)에 존재하는 박테리아 집단의 다양성을 확인하기 위해, 박테리아의 16S rDNA 절편들을 증폭하고 클로닝하여 라이브러리를 구축하였다. 삽입 서열의 염기서열을 결정한 후, BLAST 분석에 의해 미생물 동정을 하였다.

Table 2. Bacterial flora of fermented skate identified from the colonies grown on various plates.

Putative Species	Clone No.	Related GenBank sequence	Similarity (%)
<i>Pseudomonas</i> sp. KC-EP-S13	M1, M3, M9	FJ711216.1	98
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> str. 14028S	M2, P1	CP001363.1	99
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>Enterica</i> serovar <i>Typhi</i> strain SRDF10	R3	GU826691.1	99
Uncultured bacterium clone R4J3M4-H2	M4, M6, M7, P3, P5, P10	GQ467782.1	98
<i>Psychrobacter</i> sp. HTGH24	M5	GQ169118.1	99
Uncultured bacterium clone LaYa5a-70	R1	GU291521.1	98
Uncultured <i>Leuconostoc</i> sp. Clone TKL42	R2	DQ103579.1	98
<i>Staphylococcus equorum</i> strain SIP12	R5	EU919275.1	97
<i>Psychrobacter</i> sp. J466	R6	GQ370385.1	98
Uncultured bacterium clone R2J7M4_E4	P4, P12	GQ467443.1	99
Uncultured bacterium clone nbw709f07c1	P6	GQ103092.1	98
<i>Staphylococcus</i> sp. DHHS4	P7	DQ659036.1	98
Uncultured bacterium clone OKHOTSK-Bac-B38	P11	GQ201939.1	99
Uncultured bacterium clone PDTRI1OCT044	P13	GU185652.1	98

*M, R, and P represent colonies obtained on MacConkey, MRS, and PCA plate respectively.

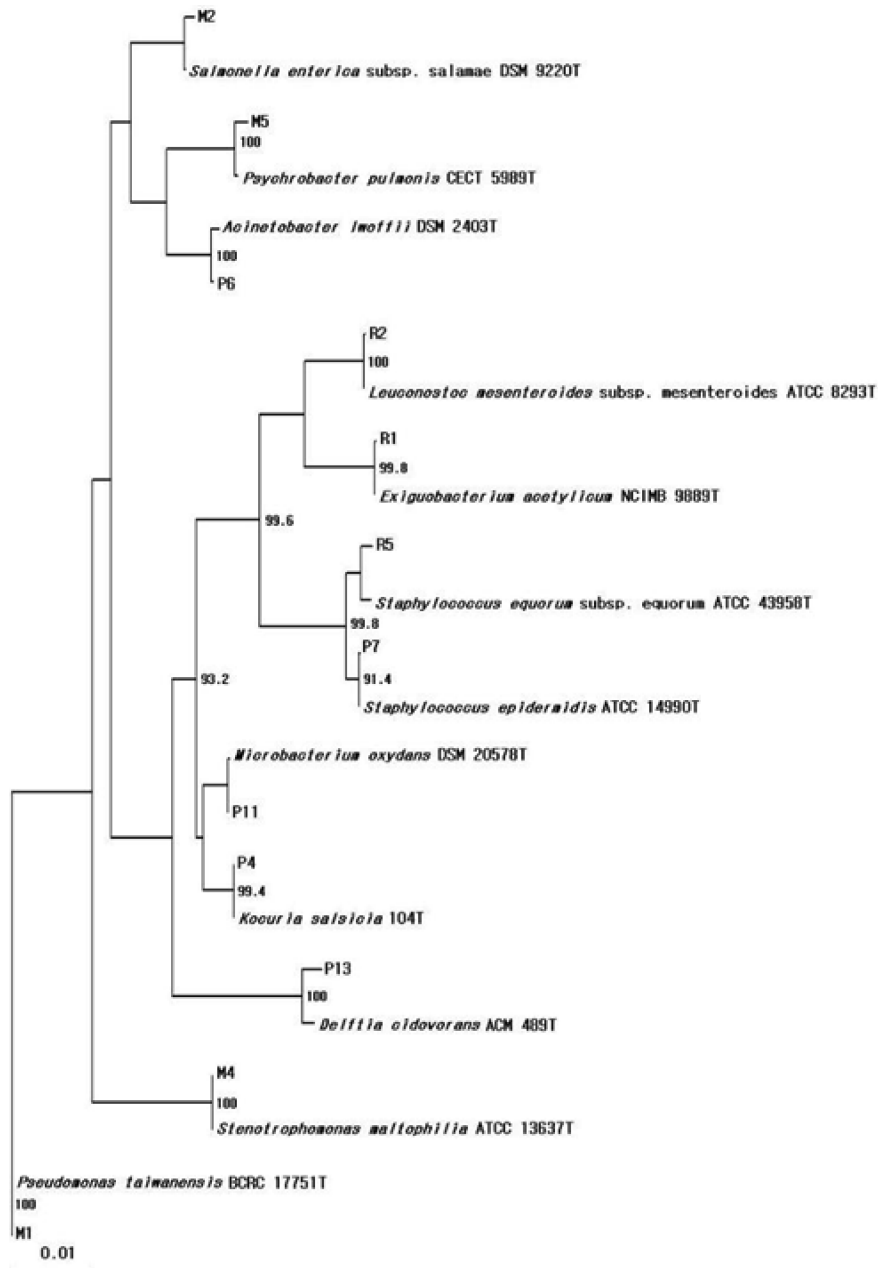


Fig. 2. Phylogenetic tree for the colonies grown on various agar plates. M, R, and P represent colonies grown on MacConkey, MRS, and PCA plate respectively. Numbers above each node are confidence levels (%) generated from 1,000 bootstrap trees. The scale bar is in fixed nucleotide substitutions per sequence position.

동일한 삽입서열 빈도를 계산하였을 때, 발효홍어(홍어회)에는 uncultured bacterium clone 054E11.b가 57.1% 나타남으로써 우점균으로 존재하고 있다고 추정하였다. 또한 발효홍어(홍어회) 현탁액을 한천배지에 도말하여 형성된 집락을 콜로니 PCR을 수행하였을 때, *Pseudomonas* sp. KC-EP-S13 등 12 종의 박테리아가 동정되었다. 배양 의존적 방법과 배양 비의존적 방법으로 홍어회를 분석하였을 때, *Psychrobacter* sp. J466만이 두 가지 방법에서 모두 검출되었고 나머지 박테리아들의 균총은 상이하였다.

REFERENCES

1. Amann, R. I., W. Ludwig, and K-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
2. Cho, H. S. and K. H. Kim. 2008a. Quality characteristics of commercial slices of Skate *Raja Kenojei*. *J. East Asian Soc. Dietary Life* **18**: 214-220.
3. Cho, H. S. and K. H. Kim. 2008b. Quality characteristics of

- cookies fortified with Skate (*Raja Kenojei*) Powder. *Korean J. Food Culture* **23**: 771-778.
4. Cho, K. M. and W. T. Seo. 2007. Bacterial diversity in a Korean traditional soybean fermented foods (Doenjang and Gangang) by 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Sci. Biotechnol.* **16**: 320-324.
 5. Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods* **56**: 297-314.
 6. Felske, A. L., A. D. Akkermans, and W. M. de Vos. 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprintings. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4581-4587.
 7. Ferris, M. J., G. Muyzer, and D. M. Ward. 1996. Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 340-346.
 8. Kim, S. Y. and Y. Adachi. 2007. Biological and genetic classification of canine intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Microbiol. Immunol.* **51**: 919-928.
 9. Kim, K. H. and H. S. Cho. 2008. Physicochemical and microbiological properties of Skate (*Raja kenojei*) Kimchi on the market. *Korean J. Food Culture* **23**: 235-242.
 10. Lee, E. J., J. E. Seo, J. K. Lee, S. W. Oh, and Y. J. Kim. 2008. Microbial and Chemical properties of Ready-to-eat Skate in Korean Market. *J. Food Hyg. Safety* **23**: 137-141.
 11. 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.
 12. Ludwig, W., O. Strunk, S. Klugbauer, N. Klugbauer, M. Weizenegger, J. Neumaier, M. Bachleitner, and K. H. Schleifer. 1998. Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis.* **19**: 554-568.
 13. Muyzer, G., E. C. De Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
 14. Nbel, U., B. Engelen, A. Fleske, J. Snadir, A. Wieshuber, R. Amann, W. Ludwig, and H. Backhaus. 1996. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **178**, 5636-5643.
 15. Sheffield, V. C., D. R. Cox, L. S. Lerman, and R. M. Meyers. 1989. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by polymerase chain reaction resulted in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**, 232-236.
 16. Staley, J. T. and A. Konopka. 1985. Measurement of in situ activities nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* **39**: 321-346.

(Received August 5, 2010/Accepted September 4, 2010)