시판 배추김치 중 *Weissella cibaria* 박테리오파지의 분리 및 특성

강혜영 · 전덕영

전남대학교 식품영양과학부

Isolation and Characterization of *Weissella cibaria* Bacteriophage from Commercial Baechu-Kimchi

Hye-Young Kang and Deok-Young Jhon

Division of Food and Nutrition, Chonnam National University

ABSTRACT Lactic acid bacteria (LAB) originating from raw materials are involved in the production of kimchi, and the production of good quality kimchi depends on the proper growth of various LAB species. One of the important factors affecting the bacterial community succession is the presence of bacteriophages. In this study, LAB phages were isolated from commercially distributed baechu-kimchi (Chinese cabbage kimchi) using a plaque assay. To isolate the phages from commercial kimchi, a dominant species of LAB in the same kimchi was used as a host. All the isolated LAB belonged to *Weissella cibaria*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, and *Leuconostoc mesenteroides*. However, in the case of phage, only the *W. cibaria* phage (PWC) was isolated from commercial baechu-kimchi, and the detection rate was 27%. Transmission electron microscopy revealed that the length of the phage's head was 99 ± 4 nm, the width was 39 ± 4 nm, and the short non-contractile tail was 29 ± 5 nm. PWC released ~ 300 plaque forming units (PFU)/cell and took 2 h to kill and lyse *W. cibaria*. The decimal reduction time (D value) of this phage was 80 s at 50°C and it lost infectivity in 10 s at 60°C . PWC was unstable at a pH of 3.0, but was stable at pH 4.0~10.0 for 5 hours. When the isolated *W. cibaria* was used as a starter, the number of PWCs in the kimchi broth increased, and the decrease in the pH of kimchi was suppressed by the addition of the phage. This study is the first one to investigate the effect of re-infecting baechu-kimchi with bacteriophages isolated from commercial baechu-kimchi.

Key words: baechu-kimchi, bacteriophage, lactic acid bacteria, *Weissella cibaria*

서론

배추는 한국인이 즐겨 먹는 대표적인 채소이며 주로 김치의 형태로 섭취된다. 배추김치는 소금으로 절인 배추에 잎 사이마다 속재료를 넣어서 제조하는데 이 과정을 담금이라고 한다. 속재료는 인체에 유익한 재료로서 파, 고춧가루, 멸치젓갈과 함께 다진 마늘과 생강을 소량의 물과 섞어서 제조한다. 그다음 보통 $5\sim 20^\circ\text{C}$ 의 온도 범위에서 자연 발효 및 숙성시킨다. 담금 직후부터 모든 형태를 김치라고 하지만 보통은 젖산발효가 일어나 pH가 4.2 정도가 되었을 때 김치가 잘 익었다고 한다. 김치 발효에 일반적으로 관여하는 젖산세균은 보통 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 및 *Weissella* 속인 것으로 알

려져 있다(Kim과 Chun, 2005; Park 등, 2010; Hong 등, 2013). 이 중 *Weissella* 속은 김치의 초기 발효에 지배적이며 *Weissella cibaria*를 포함한다(Shin 등, 2020; Lee 등, 2005; Choi 등, 2002).

김치는 젖산발효가 그 맛과 풍미를 대부분 결정한다. 그러므로 자연 발효의 기전을 밝히는 일이 중요하다. 최근에는 상품 김치의 경우 김치 발효에 도움이 되도록 종균을 첨가하여 스타터 김치의 제조를 시작하고 있다. 이러한 스타터 김치의 제조에는 젖산발효에 영향을 주는 내외의 요인을 밝히는 일이 우선적이다(Lu 등, 2003). 그 요인 중 하나가 박테리오파지(또는 파지), 즉 박테리아를 감염 및 사멸시키는 바이러스이다.

파지는 캡시드 단백질의 머리 부분에 dsDNA, dsRNA,

Received 9 July 2021; Revised 21 July 2021; Accepted 26 July 2021

Corresponding author: Deok-Young Jhon, Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, 77, Yongbong-ro, Buk-gu, Gwangju 61186, Korea, E-mail: dyjhon@gmail.com

Author information: Hye-Young Kang (Graduate student), Deok-Young Jhon (Professor)

Copyright © 2021 by The Korean Society of Food Science and Nutrition. All rights Reserved.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ssDNA 또는 ssRNA의 한 가지 유형의 핵산만 있다. 꼬리 파지인 *Caudovirales* 목에는 3개의 과가 있으며 이는 수축성 긴 꼬리를 가진 *Myoviridae*, 비수축성 긴 꼬리를 가진 *Siphoviridae*, 그리고 비수축성 짧은 꼬리를 가진 *Podoviridae*로 더 나뉜다(Jurczak-Kurek 등, 2016). 그러므로 발효 식품 중에 파지가 존재한다면 그 증식이 김치의 품질에 영향을 미칠 것이 확실하다. 젖산세균에도 그 종류에 따른 파지가 알려져 있다. 특히 침채류나 축산물 식품 발효 과정 중 젖산세균 파지가 발견되어 그 특성이 확인되기도 하였다. 김치와 유사한 발효 식품인 소금에 절인 양배추에서 파지는 젖산세균의 생육 과정에 영향을 미쳤다(Lu 등, 2003; Barrangou 등, 2002). 발효 스타터 균주인 *W. cibaria*를 감염시키는 파지(*W. cibaria* phage; PWC)가 태국 Nham 소시지에서 분리되었다(Pringsulaka 등, 2011). *Weissella* 파지, *Leuconostoc* 파지 및 *Lactobacillus* 파지가 사우어크라우트로부터 검출되어 파지에 의한 젖산세균 천이가 확인되었다(Lu 등, 2012). 메타 게놈 분석 결과로 김치 발효 과정에서 파지 DNA가 풍부하다는 것이 알려졌다(Jung 등, 2011). 이는 박테리오파지가 김치 발효 동안 특정 젖산세균을 감염시켜 김치의 품질에 영향을 미칠 수 있음을 의미한다. 김치의 일종인 동치미의 발효 과정에서는 *W. cibaria*나 *Leuconostoc citreum* 파지가 젖산세균의 생존력과 개체군 역학에 영향을 미칠 수 있음이 알려졌다(Kong과 Park, 2019; Lee 등, 2010).

그러나 한국인이 가장 즐기는 배추김치 중 파지에 대해서는 아직 알려진 바가 많지 않다. 따라서 본 연구에서는 특히 시중에 유통 중인 배추김치 중의 파지에 관한 연구를 진행하였다. 해당 김치들로부터의 우점종 미생물 선별에 이어서 이들을 감염시키는 파지의 존재 여부를 그들 김치로부터 확인하였다. 그리고 그 파지의 주요 특성을 찾아냈으며 이들이 실제 김치 발효의 환경에서 해당 젖산세균을 사멸시키고 김치의 발효에 영향을 주는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

김치

젖산세균과 박테리오파지를 분리하기 위해 광주광역시 내의 가게나 식당에서 판매되는 배추김치를 구입하였다. 김치 발효 중 파지가 젖산세균을 감염시킬 수 있도록 시중에서 판매되는 소금에 절인 배추를 재료와 함께 사용하여 김치를 만들었다. 소금에 절인 배추의 염도는 1.5%(w/w)였다. 고추, 부추, 마늘, 생강, 수돗물의 양념 제조를 위한 무게 비율은 22:28:14:4:32였다. 배추김치는 소금에 절인 배추와 양념을 70:30의 무게 비율로 사용하여 제조하였으며 20°C에서 발효시켰다.

우점종 젖산세균의 분리

배추김치 중의 김치국물을 0.85% 멸균 식염수로 십진 희

석하였다. 각각의 희석된 용액 0.1 mL를 2% 탄산칼슘이 함유된 MRS(Difco, Sparks, MD, USA) 한천 평판배지에 접종하고 혐기성 GENbox 용기(bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)에서 30°C에서 48시간 동안 배양했다. 콜로니 수가 30개 이하인 평판으로부터 투명대를 나타내는 3개 이상의 콜로니를 무작위로 선택하여 순수배양한 후 액체 질소에 글리세롤 스톡으로 보관하며 실험에 사용하였다.

젖산세균의 동정

분리된 모든 젖산세균은 그람양성균이었으며 이들 모든 우점종 균주에 대하여 16S rRNA 유전자 염기 서열 분석(Solgent Co., Ltd., Daejeon, Korea)을 실시하였다. 범용 프라이머(27F; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' 및 1492R; 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')를 PCR 및 염기 서열 분석에 사용하였다. 계통수는 GeneBank(<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)의 BLASTn 프로그램을 사용하여 작성되었다.

박테리오파지에 대한 플라크 측정법

파지를 분리하거나 그 계수를 위하여 플라크 측정 방법을 사용하였다. Host 젖산세균은 MRS broth에서 24시간 동안 30°C에서 성장시켰으며 9~10 log CFU/mL 수준으로 사용하였다. 먼저 젖산세균 100 μ L와 파지 용액 100 μ L를 10 mM 염화칼슘을 함유한 멸균 MRS 한천(0.6%) 배지 3 mL와 혼합했다. 이 혼합물을 MRS plate agar에서 30°C, 24시간 동안 배양하여 파지 플라크를 형성시켰다. 박테리오파지의 수는 형성된 플라크 수로 나타냈으며 그 단위는 플라크 형성 단위(PFU/mL)로 표현하였다.

김치에서 박테리오파지 분리

김치국물을 3겹의 멸균 거즈로 여과하고 2,000 $\times$ g, 4°C에서 15분간 원심분리하였다. 100 μ L의 김치 상층액을 100 μ L의 MRS broth와 혼합한 후 10 mM 염화칼슘을 함유하는 3 mL의 멸균된 MRS 한천과 혼합하였다. 이 한천 용액을 MRS 한천 평판배지 위에 붓고 30°C에서 24시간 동안 배양하여 파지 플라크를 생성하였다. 10 μ L 피펫 팁을 이용하여 배양된 플레이트에서 플라크 부분을 취하여 200 μ L 증류수로 옮김으로써 박테리오파지를 분리하였다.

박테리오파지 계수를 위한 플라크 측정을 위해서는 김치 용액 대신 배양 현탁액(100 μ L)을 사용하여 위에서 설명한 방법으로 플라크를 생성했다. 파지의 증식을 위해서 남은 현탁액을 100 μ L 젖산세균이 포함된 MRS broth 1 mL에 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 0.45 μ m 주사기 필터(JET BIOFIL, Guangzhou, China)로 여과하고 -20°C에서 보관하였다.

투과 전자 현미경

파지 플라크를 터치하여 10 μ L 피펫 팁으로 파지를 취하

고 0.5 mL 증류수와 혼합하였다. 이 중 20 μ L의 파지 용액을 니켈 그리드(150 메쉬)의 탄소 필름에 흡수하고 인텟스텐 산(phosphotungstic acid, PTA) 용액에서 1분 동안 염색했다. 파인 PTA 용액은 여과지에 흡수되어 제거되었다. 완성된 그리드를 TEM(JEM-2100F electron microscope, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하여 200 kV의 가속 전압에서 분석하여 이미지를 얻었다.

1-단계 성장 곡선

파지 증식 양상을 확인하는 1-단계 성장 곡선은 Leuschner 등(1993)의 방법을 수정하여 구하였다. 1 mL의 젖산세균을 밤새 배양하고 MRS broth 중의 파지 용액 1 mL를 8 mL MRS broth와 혼합하고 30°C에서 10분간 두어 파지를 젖산세균에 흡착시켰다. 그 후, 혼합물로부터 1 mL씩을 30분 간격으로 회수한 다음 8,000 $\times g$ 에서 10분 동안 원심 분리하였다. 파지에 감염된 젖산세균 펠릿을 1 mL의 신선한 MRS broth에 현탁하고 증류수로 희석한 다음 플라크 분석을 시행하였다. 이 1-단계 성장 곡선으로부터 파지의 잠재기(latent period), 상승 기간(rise period) 및 방출량(burst size)이 계산되었다.

박테리오파지의 안정성

열 안정성 시험을 위해 Pringsulaka 등(2011)의 방법을 수정하여 사용하였다. 즉, 얇은 벽 튜브(MicroAmp, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)에 담긴 90 μ L의 멸균 증류수에 담긴 파지 용액 10 μ L(MRS broth 중 10^8 PFU/mL)를 각각 50, 60, 70°C의 온도로 예열하였다. 튜브를 10초 간격으로 회수하고 얼음 수조로 옮겼다. 튜브에 담긴 파지 용액 100 μ L를 취하여 희석하고 플라크 측정법으로 파지 수를 측정하였다.

pH 안정성을 위해 5 N HCl 및 5 N NaOH로 pH 값(pH 3.0, 4.0, 6.8, 9.0, 10.0)을 조정하여 MRS 액체배지를 멸균하였다. 0.1 mL의 파지 용액($\sim 10^8$ PFU/mL)을 각각의 pH로 조절된 MRS 액체배지에 도입하고 30°C에서 1시간 또는 5시간 동안 방치하였다. 플라크 측정법으로 *W. cibaria*를 감염시키는 파지를 계수하였다.

김치국물 중 박테리오파지의 증식

갓 만든 배추김치를 멸균된 거즈 3겹으로 걸러 12,000 $\times g$, 4°C에서 10분간 원심 분리한 후 상층액을 0.45 μ m 주사기 필터로 여과 멸균하였다. 이 여과액에 *W. cibaria*와 *W. cibaria* 파지(PWC)를 접종하고 20°C에서 8일 동안 발효시켰다. 0, 2, 4, 6, 8일간의 배양액으로부터 시료를 채취한 다음 0.85% 멸균 식염수로 희석했다. *W. cibaria*의 수(log CFU/mL)는 주입 평판법에 따라 계수되었다. 파지 수의 측정에는 4°C에서 10분 동안 2,000 $\times g$ 에서 원심분리하여 얻은 시료에 대한 플라크 측정 방법이 사용되었다.

통계 분석

실험 데이터는 독립적인 삼중 측정과 평균 $\pm$ 표준편차로 표시되었다. 통계 분석은 SPSS 12.0K(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 Student t-test로 수행되었다. $P < 0.05$ 일 때 유의성이 있다고 간주하였다.

결과 및 고찰

배추김치의 우점종 젖산세균

MRS 탄산칼슘 배지를 사용하여 9개의 시판 김치(A~I)로부터 30개의 우점종 젖산세균을 분리하였다. 이들 세균은 16S rRNA 유전자의 염기서열 분석 결과, 17개의 *Lactobacillus sakei*, 5개의 *Lactobacillus curvatus*, 6개의 *Leuconostoc mesenteroides*, 2개의 *Weissella cibaria*로 구성된 4종의 젖산세균 종류가 분포하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 1). 이는 파이로시퀀싱 분석을 했을 때 이들 3개의 속이 배추김치의 주요 젖산세균이라는 이전의 보고와 일치하였다(Park 등, 2012). 그리고 *L. sakei*가 광주 지역에 유통 중인 김치중 78%에서 우점종으로 나타날 정도로 점유율이 높은 것을 알 수 있었다. 그 다음으로는 *L. mesenteroides*가 여러 김치에서 우점종이었다. 따라서 시판되는 9종의 배추김치 중 5종(B, D, E, G, I)이 *L. sakei*가 주로 우점하였으며, H와 김치 F에는 각각 *L. mesenteroides*와 *L. cur-*

Fig. 1. Phylogram of lactic acid bacteria isolated from commercial bae-chu kimchis. Sequences of 16S rRNA genes of 30 bacterial strains from 9 kimchis (A~I) were analyzed by BLASTn program of GeneBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Strains of same species are grouped in a circle. Strains with asterisks (*) were used as hosts for further bacteriophage isolation.

vatus가 우점종이었다. 김치 C에서는 *L. sakei*와 *L. mesenteroides*가 우점종으로 검출되었다. 한편 김치 A는 *W. cibaria*를 비롯하여 *L. sakei*와 *L. mesenteroides* 모두 3종의 우점종을 갖고 있었다. 이들 미생물은 시판되는 배추김치의 발효에 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다. 그리고 시판 중인 김치 중에는 우점종이 1종인 경우가 78%로 아주 많았는데 김치가 숙성됨에 따라 어느 한 종류의 젖산세균으로 미생물의 천이가 일어날 가능성이 큰을 유통 중인 김치에서도 볼 수가 있다. 그런데 이들 4가지의 균종은 모두 김치의 우점종으로 보고된 바 있다(Chin 등, 2006; Jung 등, 2012; Lee 등, 2008; Shim과 Lee, 2008; Hong 등, 2013; Choi 등, 2002). 한편 *L. plantarum*은 김치 발효 미생물로 잘 알려져 있으며 프로바이오틱스 기능이 있으나(Lee 등, 2021) 이 실험에 사용된 김치에서는 우점종으로는 검출되지 않았다.

김치에서 박테리오파지의 분리

플라크 측정법을 사용하여 11개의 시판 김치에서 자연 상태로 존재하는 용균 파지를 분리했다. 분리된 4개의 균주 모두를 대상으로 박테리오파지의 분리를 실시하였다. 젖산 세균의 분리에 사용된 9개의 김치 시료 중에서는 *W. cibaria*가 우점종의 하나인 김치 A에서 *W. cibaria*를 숙주로 하는 박테리오파지(PWC)가 발견되었으며 2개의 다른 김치에서도 PWC가 검출되었다. 따라서 11개의 김치 중 *L. mesenteroides*, *L. curvatus*, *L. sakei* 파지는 검출되지 않았으며 오직 PWC만 검출되었는데 그 검출률은 27%였다. 따라서 PWC가 시중의 배추김치에는 가장 널리 존재한다고 생각할 수 있다. 이 PWC는 김치 A로부터 분리한 *W. cibaria*가 생육한 평판에서 플라크를 생성하였으며 크기는 작고 투명하며 둥근 모양이었다.

*W. cibaria*가 김치에서 자주 발견되는 젖산세균 중의 하나이기 때문에 *W. cibaria* 파지의 작용을 확인하는 것은 김치의 생산에 있어서 중요한 일이다. 한편, 김치로부터 *L. plantarum*에 대한 파지가 분리되고 특성 확인이 이루어졌으며 동시에 사우어크라우트에서도 *Lactobacillus* spp.와 *Leuconostoc* spp. 파지가 존재함이 알려진 바 있다(Yoon 등, 2002). *W. cibaria*의 파지에 대해서는 낙농 식품이나 소시지로부터 확인되기도 하였으며(Lee와 Park, 2017; Pringsulaka 등, 2011), 김치에서 분리된 PWC의 전체 계놈에 대한 보고가 있다(Kleppen 등, 2012). 이들 또한 시중의 마트에서 구매한 김치로부터 분리하였는데 이 실험에서 분리된 PWC도 이와 유사한 것으로 생각된다.

PWC의 형태학적 특성

PWC는 투과전자현미경(TEM)으로 관찰되었다(Fig. 2). PWC의 일반적인 모양은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. PWC는 짧고 비수축성 꼬리(길이 24~34 nm)와 머리(길이 95~103 nm×폭 35~43 nm)를 가지고 있다. 이러한 외관 정보에 따라 PWC를 *Podoviridae*로 분류하였다(Matthews,

Fig. 2. Transmission electron micrograph of *Weissella cibaria*-infecting phage. The phage was isolated from a commercial baechu-kimchi that the host bacteria, *W. cibaria* A3, also was isolated.

1979). 태국 소시지 Nham에서도 PWC(Φ22)가 분리되었다(Pringsulaka 등, 2011). Φ22는 92×50 nm 머리와 27 nm 비수축성 꼬리를 가졌다. Φ22는 *Podoviridae* 계열로 분류되었으며 Ackermann의 형태학적 분류에 따라 C2 Morphotype이다. 따라서 PWC와 Φ22는 형태적으로 같다는 것을 알 수 있다. Kleppen 등(2012)이 보고한 *W. cibaria* 파지 ΦYS61은 1주일 동안 발효시킨 배추김치에서 분리되었는데, 머리(85×36 nm)와 비수축성 짧은 꼬리(29 nm)를 가지고 있으므로 ΦYS61도 *Podoviridae* 계열로 분류되었다. 따라서 형태학적 측면에서 볼 때 PWC는 ΦYS61 및 Φ22와 같은 *Podoviridae* 계열이었다.

반면 발효 유제품에서 분리한 *W. cibaria* 파지 WCP30의 경우에는 20면체 머리와 비수축성 긴 꼬리를 가지고 있어 *Siphoviridae* 과로 분류되었다(Lee와 Park, 2017). 또한 동치미에서도 3종의 PWC가 분리되었으나 본 연구의 PWC와는 전혀 다른 것들인 *Siphoviridae*나 *Myoviridae* 과에 속하는 것으로 확인되었다(Lee와 Park, 2021). 따라서 형태학적으로 서로 다른 파지가 *W. cibaria*를 숙주 삼아 감염시키는 것이 확실하며 보관된 type 균주보다는 실제 김치의 발효에 관여하는 우점균을 감염시키는 파지가 실질적으로 더 중요하다고 할 수 있다.

PWC의 증식 특성

PWC의 감염주기는 1-단계 성장 곡선 실험으로 측정되었다(Fig. 3). PWC는 60분의 잠재기, 120분의 상승기 및 약 300 PFU/cell의 방출량을 가졌다. 이전에 보고된 다른 젖산 세균 파지는 10~140분의 잠재기(Allison과 Klaenhammer, 1998; Forde와 Fitzgerald, 1999)와 10 PFU/cell의 방출량(Casey 등, 1993; Josephsen 등, 1994; Keogh, 1973) 내지는 ~400 PFU/cell(Labrie와 Moineau, 2002)이었다. 김치에서 발견된 PWC인 ΦYS61은 잠재기가 40분, 방출량은 ~100 PFU/cell로 보고가 되었다(Kleppen 등, 2012).

Fig. 3. One step growth curve of bacteriophage infecting *Weissella cibaria*. Number of phages in infected bacterial cells were counted using plaque assay method. Results are expressed as mean $\pm$ SE (n=3).

W. cibaria 파지 중 하나인 $\Phi 22$ 는 110분의 지연, 70분의 상승, 그리고 방출량은 감염된 세포 당 약 55 PFU로 보고되었다(Pringsulaka 등, 2011). PWC는 외관상 $\Phi 22$ 와 비슷하지만, $\Phi 22$ 보다 지연 기간이 상대적으로 짧고 상승 기간이 길며 방출량이 더 크다. 따라서 PWC는 $\Phi 22$ 보다 빠르게 전파할 수 있다고 생각할 수 있다.

PWC의 열 안정성

PWC의 온도 안정성을 조사한 결과는 Fig. 4에 나타났다. PWC는 50°C의 조건에서 6.7 log PFU/mL가 180초 후에 4.9 log PFU/mL로 감소했다. 그러나 60°C에서는 10초 이후에는 완전히 비활성화 되었다. 70°C에서도 같은 결과를 보였다. PWC의 D 값은 50°C에서 80초로 계산되었다. 즉, PWC는 50°C에서 80초 동안 10%가 파괴되지 않고 남아 있지만 60°C에서는 10초 동안의 처리로 모두 불활성화되어 증식할 수 없다. 따라서 PWC의 증식을 억제할 필요가 있다.

Fig. 4. Thermal stability of *W. cibaria* phage. Phage solutions were preheated to temperatures of 50, 60, 70°C, respectively, and transferred to an ice water bath, diluted, and the PFU was measured by plaque assay. *W. cibaria* phage did not survive at 70°C.

Fig. 5. pH stability of *W. cibaria* infecting phage (PWC). Means with asterisk (*) are significantly different between paired samples by Student *t*-test ($P < 0.05$).

면 60°C 이상의 가열이 필요하다. 그러나 $\Phi 22$ 는 상대적으로 열 안정성이 높고 70°C 이상에서는 감염 활성을 잃었다. D 값은 70°C에서 88초, 80°C에서 15초였다(Pringsulaka 등, 2011). PWC는 $\Phi 22$ 와 모양이 비슷하고 *W. cibaria*를 감염시키지만, $\Phi 22$ 보다 낮은 온도에서 불활성화되기 때문에 온도에 더 민감함을 나타냈다.

PWC의 pH 안정성

PWC 감염 활성의 pH 안정성을 pH 3~10 범위에서 실험하였다(Fig. 5). PWC는 pH 4~10에서 1시간 처리하였을 때 숙주를 감염하여 생성되는 플라크 수의 감소가 미미하였다. 그러나 pH 3의 조건에서는 1/100 이하로 감소하여 그 폭이 컸다. 한편 5시간을 둔 후에는 pH 4~10에서는 약 50% 전후의 감소가 있는 반면 pH 3인 경우에는 파지가 전혀 검출이 되지 않았다. 즉, PWC는 pH 3.0에서는 불안정하고 pH 4~10에서는 비교적 안정적이므로 감염성을 유지함을 알 수 있었다. $\Phi 22$ 는 pH 3.0 또는 pH 4.0 이하에서 민감하다고 알려졌다(Pringsulaka 등, 2011). 따라서 PWC는 pH 3.0 근처에서 성장하기가 어렵다. 김치를 4°C에서 보관할 경우 pH는 4.5~5.7(Park 등, 2012)이므로 PWC는 김치 보관 시 어느 정도는 감염력을 갖고 있다고 할 수 있다. 그러나 이에 대하여는 향후 더 긴 시간의 영향을 실험한 결과가 요구된다.

배추김치 김치국물에서 PWC의 생육

실험에서 분리된 *W. cibaria*와 PWC가 실제로 배추김치에서 배양 및 증식되는지를 김치국물 실험을 통해 조사하였다. 김치국물 발효 중 *W. cibaria*(CFU/mL), PWC(PFU/mL) 및 pH의 변화가 Fig. 6에 제시되었다. 이 실험은 김치국물이 두 가지와 어떤 관계가 있으며 김치에 어떤 영향을 미치는지를 보여준다. 여과된 김치국물에서 8일 발효 동안 *W. cibaria*와 PWC는 전혀 나타나지 않았다. 이는 여과로 멸균한 김치국물에 *W. cibaria*가 없고 숙주 균주가 없어 PWC가

Fig. 6. Changes in numbers of *Weissella cibaria* (A), *W. cibaria* phage (A), and pH (B) in baechu-kimchi broth during fermentation. WC and PWC stand for *W. cibaria* and *W. cibaria* phage, respectively. Filtered kimchi broth was used as a control. During fermentation counts of *W. cibaria* (cfu), *W. cibaria* phage (pfu), and pH of the kimchi were measured.

발견되지 않았기 때문이다(data not shown). Fig. 6A의 *W. cibaria*만을 접종한 김치국물은 발효 2일까지 8 log CFU/mL까지 증가하고 발효 8일까지 그 수준을 유지하였다. *W. cibaria*와 PWC를 함께 접종한 김치국물에서는 PWC의 수는 발효 2일까지 약 8 log CFU/mL까지 증가했다. 그러나 그 후 발효 4일째에는 젖산세균은 약 100배 감소했으나 PWC는 오히려 100배 정도로 증가했다. 이것은 PWC가 숙주 균주 *W. cibaria*를 감염시키고 파괴했기 때문으로 보인다. 그러나 발효 6일부터는 젖산세균은 증가하고 PWC는 다시 감소했다. 즉, 시판되는 김치에서 분리된 우점종인 *W. cibaria*와 PWC는 김치국물에서 증식 가능하며, 이처럼 PWC가 용균 경로의 생활주기를 나타낸 것은 이 파지가 실제로 김치 중에서 *W. cibaria*를 감염시킬 수 있음을 나타낸다. 배추김치와 마찬가지로 다른 형태의 김치인 동치미 국물에서도 PWC가 *W. cibaria* KCTC 3807을 감염시키며 파지 양이 증가함에 따라 급속한 파괴를 동반했다(Kong 등, 2019). 또한, 파지의 존재에도 불구하고 상당 기간이 젖산세균이 생존함도 보여주었다.

미생물이 여과 멸균된 김치국물(대조군)이 발효 8일까지 pH 5.0으로 유지되지만 *W. cibaria*를 접종한 김치국물은 발효 2일째에 pH 4.5로 급격하게 감소하였다(Fig. 6B). 그런데 *W. cibaria*와 PWC를 동시에 접종한 경우에는 김치국물에서 발효 2일째는 pH 4.8로 감소하여 *W. cibaria*만 접종한 김치국물보다 pH의 감소폭이 낮았다. 그러나 발효 4일째

이후에는 pH 값이 대조군과 유사함이 관찰되었다. 이는 파지가 젖산세균에 의한 산 생성을 억제함을 나타낸다(Hur 등, 2015). 결론적으로 *W. cibaria* 파지의 첨가가 시판 배추김치의 우점종의 하나인 *W. cibaria*를 김치 생산의 스타터로 사용할 경우 김치의 pH 저하를 억제함으로써 김치 숙성을 제한적으로 연장시킬 수 있음을 알 수 있었다.

요 약

김치 제조에는 원료로부터 도입된 젖산세균이 관여하며 양질의 김치 생산은 다양한 젖산세균 종의 적절한 생육에 달려 있다. 박테리아의 천이에 중요한 요소 중 하나는 박테리오파지의 존재이다. 이 연구에서는 상업적으로 유통되는 배추김치에서 젖산세균 파지를 플라크 측정법을 사용하여 분리하였다. 상업용 김치에서 파지를 분리하기 위해 같은 김치 중의 우점종 젖산세균 종을 숙주로 사용하였다. 분리된 모든 젖산세균은 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* 및 *Leuconostoc mesenteroides*에 속하였다. 그러나 파지의 경우 시판 배추김치에 *W. cibaria* 파지(PWC)만 분리되었으며 그 검출률은 27%였다. 투과전자현미경으로 파지의 머리 길이가 99 ± 4 nm, 너비가 39 ± 4 nm 이고 짧은 비수축성 꼬리가 29 ± 5 nm임을 알 수 있었다. PWC는 방출량이 세포당 ~300 PFU이고 *W. cibaria*를 파괴하는 데 2시간이 걸렸다. 이 파지의 D 값은 50°C에서 80초였고 파지는 60°C에서는 10초만에 감염성을 잃었다. PWC는 pH 3.0에서 불안정했지만, pH 4.0~10.0에서 5시간 동안 안정적이었다. 분리된 *W. cibaria*를 스타터로 사용했을 때 김치국물에서 PWC의 수가 증가했으며 파지 첨가로 인해서 김치의 pH 감소가 억제되었다. 본 연구는 시판되는 배추김치에서 자체 감염 박테리오파지를 분리하여 김치 발효에 적용한 최초의 연구이다.

감사의 글

이 연구는 전남대학교의 지원으로 수행되었습니다.

REFERENCES

- Allison GE, Klaenhammer TR. Phage resistance mechanisms in lactic acid bacteria. *Int Dairy J.* 1998. 8:207-226.
- Barrangou R, Yoon SS, Breidt F, Fleming HP, Klaenhammer TR. Characterization of six *Leuconostoc fallax* bacteriophages isolated from an industrial sauerkraut fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2002. 68:5452-5458.
- Casey CN, Morgan E, Daly C, Fitzgerald GF. Characterization and classification of virulent lactococcal bacteriophages isolated from a cheddar cheese plant. *J Appl Bacteriol.* 1993. 74:268-275.
- Chin HS, Breidt F, Fleming HP, Shin WC, Yoon SS. Identification of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses. *J Microbiol Biotechnol.* 2006. 16:68-76.

- Choi HJ, Cheigh CI, Kim SB, Lee JC, Lee DW, Choi SW, et al. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from kimchi. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2002. 52:507-511.
- Forde A, Fitzgerald GF. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. *Anton Van Leeuwenhoek*. 1999. 76:89-113.
- Hong Y, Yang HS, Chang HC, Kim HY. Comparison of bacterial community changes in fermenting kimchi at two different temperatures using a denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *J Microbiol Biotechnol*. 2013. 23:76-84.
- Hur SW, Ko MS, Kim MR, Lee HR, Chung SJ, Cho MS. Physicochemical characteristics and sensory properties of commercial *Mukeunji* products. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2015. 44:702-708.
- Josephsen J, Andersen N, Behrndt H, Brandsborg E, Christiansen G, Hansen MB, et al. An ecological study of lytic bacteriophages of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated in a cheese plant over a five year period. *Int Dairy J*. 1994. 4:123-140.
- Jung JY, Lee SH, Kim JM, Park MS, Bae JW, Hahn Y, et al. Metagenomic analysis of kimchi, a traditional Korean fermented food. *Appl Environ Microbiol*. 2011. 77:2264-2274.
- Jung JY, Lee SH, Lee HJ, Seo HY, Park WS, Jeon CO. Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2012. 153:378-387.
- Jurczak-Kurek A, Gasior T, Nejman-Falenczyk B, Bloch S, Dydecka A, Topka G, et al. Biodiversity of bacteriophages: morphological and biological properties of a large group of phages isolated from urban sewage. *Sci Rep*. 2016. 6:34338. <https://doi.org/10.1038/srep34338>
- Keogh BP. Adsorption, latent period and burst size of phages of some strains of lactic streptococci. *J Dairy Res*. 1973. 40:303-309.
- Kim M, Chun J. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. *Int J Food Microbiol*. 2005. 103:91-96.
- Kleppen HP, Holo H, Jeon SR, Nes IF, Yoon SS. Novel podoviridae family bacteriophage infecting *Weissella cibaria* isolated from kimchi. *Appl Environ Microbiol*. 2012. 78:7299-7308.
- Kong SJ, Park JH. Effect of bacteriophages on viability and growth of co-cultivated *Weissella* and *Leuconostoc* in kimchi fermentation. *J Microbiol Biotechnol*. 2019. 29:558-561.
- Labrie S, Moineau S. Complete genomic sequence of bacteriophage ul36: Demonstration of phage heterogeneity within the p335 quasi-species of Lactococcal phages. *Virology*. 2002. 296:308-320.
- Lee D, Kim S, Cho J, Kim J. Microbial population dynamics and temperature changes during fermentation of kimjang kimchi. *J Microbiol*. 2008. 46:590-593.
- Lee JE, Lee NK, Paik HD. Antimicrobial and anti-biofilm effects of probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 isolated from kimchi. *Food Sci Biotechnol*. 2021. 30:97-106.
- Lee JS, Heo GY, Lee JW, Oh YJ, Park JA, Park YH, et al. Analysis of kimchi microflora using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*. 2005. 102:143-150.
- Lee KW, Park JY, Chun J, Han NS, Kim JH. Importance of *Weissella* species during kimchi fermentation and future works. *Korean J Microbiol Biotechnol*. 2010. 38:341-348.
- Lee S, Park JH. Characteristics on host specificity, infection, and temperature stability of *Weissella* phages from watery kimchi. *Food Sci Biotechnol*. 2021. 30:843-851.
- Lee YD, Park JH. Genomic analysis of WCP30 phage of *Weissella cibaria* for dairy fermented foods. *Korean J Food Sci An*. 2017. 37:884-888.
- Leuschner RGK, Arendt EK, Hammes WP. Characterization of a virulent *Lactobacillus sake* phage PWH2. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1993. 39:617-621.
- Lu Z, Breidt F, Plengvidhya V, Fleming HP. Bacteriophage ecology in commercial sauerkraut fermentations. *Appl Environ Microbiol*. 2003. 69:3192-3202.
- Lu Z, Perez-Diaz IM, Hayes JS, Breidt F. Bacteriophage ecology in a commercial cucumber fermentation. *Appl Environ Microbiol*. 2012. 78:8571-8578.
- Matthews REF. The classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*. 1979. 11:133-135.
- Park EJ, Chun J, Cha CJ, Park WS, Jeon CO, Bae JW. Bacterial community analysis during fermentation of ten representative kinds of kimchi with barcoded pyrosequencing. *Food Microbiol*. 2012. 30:197-204.
- Park JM, Shin JH, Lee DW, Song JC, Suh HJ, Chang UJ, et al. Identification of the lactic acid bacteria in kimchi according to initial and over-ripened fermentation using PCR and 16S rRNA gene sequence analysis. *Food Sci Biotechnol*. 2010. 19:541-546.
- Pringsulaka O, Patarasinpaiboon N, Suwannasai N, Atthakor W, Rangsiruji A. Isolation and characterisation of a novel *Podoviridae*-phage infecting *Weissella cibaria* N 22 from Nham, a Thai fermented pork sausage. *Food Microbiol*. 2011. 28:518-525.
- Shim S, Lee JH. Evaluation of lactic acid bacterial community in kimchi using terminal-restriction fragment length polymorphism analysis. *Kor J Microbiol Biotechnol*. 2008. 36:247-259.
- Shin JI, Oh SG, Bang MS, Jeong HW, Lee YJ, Lee SC, et al. Complete genome sequence of *Weissella cibaria* strain BM2, isolated from Korean kimchi. *Microbiol Resour Announc*. 2020. 9:e00534-20. <https://doi.org/10.1128/MRA.00534-20>
- Yoon SS, Barrangou-Pouey R, Breidt F, Klaenhammer TR, Fleming HP. Isolation and characterization of bacteriophages from fermenting sauerkraut. *Appl Environ Microbiol*. 2002. 68:973-976.