



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0022355
(43) 공개일자 2010년03월02일

(51) Int. Cl.

C12N 15/10 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0080991

(22) 출원일자 2008년08월19일

심사청구일자 2008년08월19일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

윤한대

경남 진주시 칠암동 284-2

조계만

경남 함양군 안의면 이전리 144

김종민

경상남도 통영시 광도면 황리 1130

(74) 대리인

이덕록

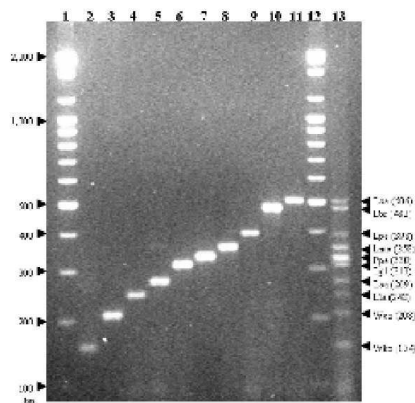
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인방법

(57) 요약

본 발명은 김치발효 관련 주요 젖산균 10종에 대해 특이적으로 확인할 수 있는 10종의 프라이머 세트를 제작하고, m-PCR의 조건을 확립한 후 각각 다른 온도(4도 및 8도, 15도, 25도)에서 발효되어지는 김치를 일정한 시간 간격으로 시료를 채취한 후, 선택배지를 사용한 균수의 변화 및 이화학적 성질의 변화를 조사하고 각각의 분리된 젖산균 96 클론에 대해서 m-PCR을 실시하는 한편 m-PCR로 확인되지 않은 클론은 16S rDNA로 확인하여 특이 젖산균 종의 변화양상을 확인하는 것으로 구성된 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 검출방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 방법은 김치와 같은 채소 절임식품에 관여하는 젖산균의 군집양상을 정확하고 신속하게 확인할 수 있어 미생물 확인에 시간과 비용을 절감할 수 있을 뿐만 아니라 김치 발효의 정확한 미생물 군중 확인을 통한 김치품질 조절의 도구로 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 및 2, 서열번호 3 및 4, 서열번호 5 및 6, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18, 및 서열번호 19 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 1쌍의 염기서열 또는 이들 각 염기서열과 상보적인 염기서열의 군에서 선택된 어느 하나 이상의 염기서열의 쌍을 포함하는 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인용 프라이머 세트.

청구항 2

김치발효 관련 젖산균에 대해서 확인할 수 있는 상기 제1항의 중 특이적 프라이머 세트를 제작하는 단계;
m-PCR의 조건을 확립한 후 4℃ 내지 25℃의 온도별 발효 중 김치를 일정한 시간간격으로 시료를 채취하는 단계;
선택배지를 사용한 균수의 변화를 측정하는 단계;
발효 중 이화학적 성질의 변화를 조사하는 단계;
각각 단계에서 분리된 젖산균 96 클론에 대해서 m-PCR을 실시하여 주요 10종의 젖산균을 확인하는 단계;
m-PCR로 확인되지 않은 클론은 16S rDNA로 확인단계; 및
최종 m-PCR를 검정하는 단계
로 이루어진 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 김치발효 관련 젖산균이 류코노스톡 칼노썸(*Leuconostoc carnosum*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 프란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 펜토슈스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*), 페디오코쿠스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) 및 바이셀라 코리엔시스(*Weissella koreensis*)인 것을 특징으로 하는 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 프라이머 세트를 이용한 m-PCR 조건에서, PCR 반응 혼합물(50 μ L)은 Super-therm DNA 중합효소(5.0 unit, JMR, Side Cup, Kent, UK) 1 μ L, primer(20 pmol) 각각 2 μ L, 2.5 mM $MgCl_2$ 를 함유한 PCR 반응 완충액(buffer) 5 μ L, 2.5 mM dNTP 5 μ L, 주형 DNA 5 μ L 그리고 증류수 30 μ L를 포함하며, 반응조건은 95℃에서 5분 동안 예열 단계를 거친 후 35 사이클 동안 수행되고, 각 사이클은 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 1분 동안 풀림, 72℃에서 2분간 신장 단계로 구성되며, 마지막 사이클은 72℃에서 10분간 신장 단계를 수행되는 것을 특징으로 하는 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 다중중합효소연쇄반응(m-PCR, multiplex polymerase chain reaction)을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 김치발효 관련 주요 젖산균 10종에 대해 특이적으로 확인할 수 있는 10종의 프라이머 세트를 제작하고, m-PCR의 조건을 확립한 후 각각 다른 온도(4도 및 8도, 15도, 25도)에서 발효되어지는 김치를 일정한 시간 간격으로 시료를 채취한 후, 선택배지를 사용한 균수의 변화 및 이화학적 성질의 변화를 조사하고 각각의 분리된 젖산균 96 클론에 대해서 m-PCR을 실시하는 한편 m-PCR로 확인되지 않은 클론은 16S rDNA로 확인하여 특이 젖산균 종의 변화양상을 확인하는 것으로 구성된 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 김치는 우리나라의 전통발효식품으로서 우리의 밥상에서는 빼 놓을 수 없는 필수적인 부식이다. 현재 국내 김치 총수요는 연간 15만 톤 정도이고 이 중 상품김치 수요는 계속 증가하여 2007년에는 전체 수요의 60% 이상인 약 100만 톤으로 추정되고 있다. 김치는 재료 및 방법, 계절, 지역에 따라 200여 가지의 종류가 있는 것으로 보고 되어져 있다. 한편, 1988년 서울올림픽 이후 김치는 세계적으로 널리 알려지게 되었고 2001년 코덱스(Codex Alimentarius)에 김치가 등록된 이후 세계적인 식품으로 각광받고 있으며, 수출 또한 증가하고 있는 추세이다.
- [0003] 김치 미생물에 관한 연구는 1939년에 처음 시작된 이래 현재까지 가장 많이 연구되고 있는 분야이다. 김치는 200여 종류의 박테리아와 몇 종류의 효모가 김치의 발효에 영향을 미치지만 대부분 젖산균에 의해서 김치발효 및 품질이 결정되어진다. 일반적으로 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)는 김치 발효가 가장 활발할 때 최고량에 달하여 김치의 신선한 맛을 부여하고 락토바실러스 프란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 높은 온도와 후숙기 발효과정에서 우점종으로서 김치를 산패하게 하는 원인균으로 알려져 있다. 즉, 류코노스톡 메센테로이데스와 락토바실러스 프란타룸은 좋은 맛과 과 성숙에 관련된 균으로 알려져 있다. 김치는 pH 4.2와 산도 0.6-0.8%로 발효되었을 때 향과 맛 그리고 씹는 느낌이 가장 좋으며, 김치의 일반적인 맛은 발효기간 중 여러 인자(pH 및 산도, 온도)의 영향을 받는다.
- [0004] 최근 김치발효 중 분자유전학적 방법을 통하여 김치발효 관여 미생물을 확인하려고 시도 중에 있다. 그 예로서 특징적으로 종 특이적 프라이머를 이용한 PCR, 단백질-SDS-PAGE, PCR-DGGE 기술, genome probing microarray, 16S rRNA 염기서열분석 등의 방법이 사용되어지고 있다.
- [0005] 종래 종 특이적 프라이머를 이용한 PCR 방법과 관련하여 대한민국 등록특허 제10-0706774호 "김치 젖산균 동정용 프라이머 및 프라이머 셋"에는 특정한 단일 또는 복수의 김치 젖산균과 종 특이적으로 반응하는 프라이머 및 그 조합을 이용하여 김치 및 절임류 등에서 많이 발견되는 젖산균의 동정에 있어서 생화학적 방법이 안고 있는 문제, 즉, 시간이 많이 소요되고 부정확한 단점을 극복하여 신속하고도 정확한 균종의 동정을 가능하게 하고 있다.
- [0006] 한편 m-PCR이 1988년 처음으로 고안된 이래, 동시에 같은 증폭반응에서 두 개 혹은 그 이상의 종을 증폭할 수 있는 방법으로 한 번의 반응으로 한 개 이상의 목표서열을 동시에 증폭할 수 있어 시간과 노력을 절약할 수 있는 장점이 있다. 두 개내지 세 개의 특이 프라이머를 사용하여 김치의 젖산균을 확인 방법은 보고되어 있으나, 김치 주요 발효 젖산균인 10종의 균에 대한 특이 프라이머 제작 및 m-PCR의 방법은 전무한 상태이다.
- [0007] 이러한 다중효소중합반응(mPCR)을 이용한 기술로는 대한민국 등록특허 제10-0775641호 "다중효소중합반응 방법을 이용한 기능성 식품으로부터유산균 검출방법"에 특이 프라이머를 이용하여 락토바실러스 속 2종과 비피도박테리움 속 2종의 4가지 다른 젖산균을 한 번의 반응으로 구분해 낼 수 있어서 단일 또는 이중 PCR과 비교해 볼 때, 시간과 비용을 줄일 수 있는 효과가 있으며, 상기 프라이머를 이용하여 검사체 내에 혼재되어 있는 락토바실러스 속 균종과 비피도박테리움 속 균종을 동시에 신속, 정확하게 동정할 수 있어, 건강식품 및 의약품의 원료개발 및 프로바이오틱 제품의 표기시스템의 신뢰도를 모니터링할 수 있는 방법이 개시되어 있다.
- [0008] 김치의 발효기간 중 미생물 집단의 연구는 학문적 가치뿐만 아니라 김치 발효의 정확한 이해를 통해 김치의 산업적 생산에서 품질을 조절할 수 있는 매우 중요한 지표이다.
- [0009] 따라서 본 발명자들은 김치 발효중 젖산균을 확인함에 있어 상기와 같은 종래의 문제점을 극복하기 위하여 예의 연구를 거듭한 결과 10종의 주요 김치발효 젖산균의 특이적 프라이머를 제작, m-PCR의 조건을 확립하고 이를 통하여 김치발효 중 젖산균의 변화양상을 관찰함으로써 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 김치발효 관여 미생물을 보다 정확하게 확인함에 있어 김치발효 중 젖산균을 효과적으로 검출할 수 있는 방법 및 상기 방법에 이용하기 위한 프라이머 및 프라이머 세트를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0011] 상기와 같은 본 발명의 목적은 김치발효 관련 주요 젖산균 10종에 대해 특이적으로 검출할 수 있는 10종의 프라이머 세트를 제작하고, m-PCR의 조건을 확립한 후 각각 다른 온도(4도 및 8도, 15도, 25도)에서 발효되어지는

김치를 일정한 시간 간격으로 시료를 채취한 후, 선택배지를 사용한 균수의 변화 및 이화학적 성질의 변화를 조사하고 각각의 분리된 젖산균 96 클론에 대해서 m-PCR을 실시하는 한편 m-PCR로 확인되지 않은 클론은 16S rDNA로 확인하여 특히 젖산균 종의 변화양상을 확인함으로써 달성되었다.

- [0012] 본 발명은 서열번호 1 및 2, 서열번호 3 및 4, 서열번호 5 및 6, 서열번호 7 및 8, 서열번호 9 및 10, 서열번호 11 및 12, 서열번호 13 및 14, 서열번호 15 및 16, 서열번호 17 및 18, 및 서열번호 19 및 20으로 구성된 군으로부터 선택된 1쌍의 염기서열 또는 이들 각 염기서열과 상보적인 염기서열의 군에서 선택된 어느 하나 이상의 염기서열의 쌍을 포함하는 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 확인용 프라이머 세트를 제공한다.
- [0013] 본 발명은 또한 김치의 발효과정 중 발효와 관련된 젖산균의 군집양상을 m-PCR을 이용하여 정확하고 신속하게 확인하는 방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명에 따른 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균의 확인 방법은
- [0015] 김치발효 관련 주요 젖산균 10종에 대해서 확인할 수 있는 종 특이적 프라이머(primer)를 제작하는 단계;
- [0016] m-PCR의 조건을 확립한 후 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 발효 중 김치를 일정한 시간간격으로 시료를 채취하는 단계;
- [0017] 선택배지를 사용한 균수의 변화를 측정하는 단계;
- [0018] 발효 중 이화학적 성질의 변화를 조사하는 단계;
- [0019] 각각 단계에서 분리된 젖산균 96 클론에 대해서 m-PCR을 실시하여 주요 10종의 젖산균을 확인하는 단계;
- [0020] m-PCR로 확인되지 않은 클론은 16S rDNA로 확인단계; 및
- [0021] 최종 m-PCR를 검정하는 단계
- [0022] 로 구성된다.
- [0023] 본 발명의 방법에 따르면 m-PCR를 사용하여 김치발효 중 젖산균의 군집양상을 정확하고 신속하게 확인함으로써 미생물 확인에 시간과 비용을 절감할 수 있을 뿐만 아니라 김치 발효의 정확한 미생물 확인을 통한 김치의 산업에 미생물의 표준화를 제시하여 김치 품질을 조절할 수 있을 것으로 기대된다.
- [0024] 본 발명에 따른 김치발효 관련 주요 젖산균 10종은 여러 문헌(학술지 및 김치관련 연구보고서, 서적 등)을 참고로 하여 선택된 류코노스톡 칼도눔(*Leuconostoc carnosum*) 및 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 프란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 펜토슈스(*Lactobacillus pentosus*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*), 페디오코쿠스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*), 마이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) 및 바이셀라 코리엔시스(*Weissella koreensis*)이다.
- [0025] 상기 10종 젖산균에 대해서 특이 유전자 선택하고 이로부터 특이 프라이머를 제작하였다.
- [0026] 본 발명에 따른 m-PCR의 조건은 공시균주를 이용하여 확립하였다. 공시균주는 한국유전자은행(KCTC) 및 한국중균협회(KCCM), 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 획득한 공시균주 및 김치로부터 직접 분리하여 보관하고 있던 균주를 사용하였다.
- [0027] 상기 확립된 m-PCR를 이용하여 실제 김치발효 중 젖산균의 변화양상 관찰을 위한 김치재료는 경남 거창군에 위치한 대상 종갓집 김치를 사용하여 4도 및 8도, 15도, 25도에서 발효시키면서 일정한 간격으로 시료를 채취하였다.
- [0028] 김치 발효 중 pH의 변화는 pH 측정기(MP220, pH meter, UK)를 사용하였고 산도는 pH 8.2까지 중화하는데 소요되는 0.1N NaOH용액 소비량을 측정한 후 젖산으로 환산하여 측정하였고 아래의 계산 방식으로 환산한 후 젖산에 대한 백분율(%)로 표기하였다.
- [0029] 산도(% , 젖산) = $0.009 \times 0.1N \text{ NaOH의 량(ml)} \times F \times 100/\text{시료량(ml)}$
- [0030] 상기식에서 F는 0.1N NaOH 인자이다.
- [0031] 염도는 염도계(Atago Co., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였으며 환원당은 밀러(Miller, 1959)의 디니트로-

살익시레이트(Dinitro-salicylate, DNS) 방법으로 측정하였다. 한편, 김치발효 중 9 종의 유기산 변화는 고속액체크로마토그래피(HPLC, Perkin-Elmer 200 series)를 이용하여 분석하였다.

[0032] 김치발효 중 총 생균수의 변화는 트리픽 소이 한천배지(Tryptic Soy agar, TSA, Difco, Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA), 총 젖산균수는 락토바실러스 MRS 한천배지(Lactobacilli MRS agar, MRSa, Difco), 류코노스톡은 PES 한천배지(Yeast extract 0.5 g, tripticase peptone 5.0 g, sucrose 20.0 g, MgSO₄7H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 1.0 g, phenyl ethyl alcohol 2.5 g, (NH₄)SO₄ 2.0 g, agar 15.0 g per of liter, PESA), 페디오코쿠스는 엔테로코쿠스 한천배지(m Enterococcus agar, m-ENTA, Difco)를 사용하여 측정하였다.

[0033] 상기 락토바실러스 MRS 한천배지에서 자란 젖산균 중 임의적으로 96 클론을 선택하여 새 락토바실러스 MRS 한천배지에 옮겨 마스터 플레이트(master plate)를 만들고 이로부터 게놈 DNA를 분리하고 이를 주형으로 하여 m-PCR를 행하여 10종의 젖산균을 확인하고, 확인되지 않은 클론은 16S rDNA PCR를 수행한 후 염기서열을 결정하고 미국국립생물정보센터(NCBI) 데이터 베이스를 이용한 젖산균을 확인하였다. 각각의 젖산균 종에 대한 생균수 계산은 아래의 계산에 따라 측정하였다.

[0034] 특이 젖산균 생균수(log cfu/mL)

[0035] = (확인된 특이 젖산균 클론수/분리 96 클론수) × 100

[0036] = (특이 젖산균 백분율%/100) × MRS 한천배지 상의 총 젖산균수

[0037] 최종적으로 m-PCR로 확인된 젖산균수와 16S rDNA로 확인한 젖산균수를 조사하여 발효단계별 m-PCR의 효율을 결정하였다. 효율 검정은 아래와 같은 계산방식으로 행하여 백분율(%)로 표기하였다.

[0038] m-PCR의 효율(%)

[0039] = (m-PCR에 의한 확인 젖산균 클론수/분리 96 클론수) × 100

[0040] 본 발명의 방법은 상기와 같은 김치발효 중 젖산균의 확인 뿐만 아니라, 다른 채소 절임식품 및, 유제품, 육제품 등의 발효제품이나 발효과정 중의 젖산균 확인하는데 이용할 수도 있다.

효 과

[0041] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 다중중합효소연쇄반응을 이용한 김치발효 중 젖산균 검출방법에 따르면 김치와 같은 채소 절임식품에 관여하는 젖산균의 군집양상을 정확하고 신속하게 확인할 수 있어 미생물 확인에 시간과 비용을 절감할 수 있을 뿐만 아니라 김치 발효의 정확한 미생물 균종 확인을 통한 김치품질 조절의 도구로 사용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0042] 이하에서 본 발명의 바람직한 실시형태를 실시예를 참고로 보다 구체적으로 설명한다. 하지만 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0043] **실시예 1: 공시균주 확보**

[0044] 학술지 및 연구보고서, 서적 등을 참고로 하여 류코노스톡 칼노슘 및 류코노스톡 메센테로이데스, 락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 프란타룸, 락토바실러스 펜토슈스, 락토바실러스 사케이, 락토코쿠스 락티스, 페디오코쿠스 펜토사세우스, 바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스(Weissella koreensis)의 주요 10종 젖산균을 본 발명의 m-PCR 반응을 위하여 선택하였다.

[0045] 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 15종의 젖산균들은 한국유전자은행(KCTC) 및 한국종균협회(KCCM), 한국농업미생물자원센터(KACC)로부터 수집하였고, 바이셀라 코리엔시스(*Weissella koreensis*) W602는 김치로부터 직접 분리한 후 동정하여 보관하고 있던 균주를 사용하였다. 모든 젖산균들은 락토바실러스 MRS 액체/한천배지에 접종하여 28℃에서 24시간동안 배양한 후 G-spinTM Genomic DNA Extraction kit(iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)를 사용하여 게놈 DNA 추출하고 m-PCR의 주형으로 사용하였다.

[0046] <표 1>

[0047] 본 발명에서 사용한 젖산균의 종 및 수집원, 약어

젖산균 종	수집원	약어
<i>Leuconostoc carnosum</i>	KCTC 3525	Lca
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	KCTC 3530	Lme
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteriodes</i>	KACC 10770	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>ceremoris</i>	KACC 10555	
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	KACC 11229	
<i>Lactobacillus brevis</i>	KACC 10553	Lbr
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCTC 3104	Lpl
<i>Lactobacillus plantarum</i>	KACC 10552	
<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	KACC 10771	
<i>Lactobacillus pentosus</i>	KCCM 35472	Lpe
<i>Lactobacillus sakei</i>	KCTC 3603	Lsa
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	KCCM 40104	Lla
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	KCTC 3507	Ppe
<i>Weissella confusa</i>	KCTC 3499	Wco
<i>Weissella koreensis</i>	W602	Wko

[0049] 실시예 2 : 10종 젖산균의 특이 프라이머 제작

[0050] 10종의 주요 젖산균 확인을 위한 새로운 종 특이적 프라이머 제작은 각각 NCBI 데이터 베이스로부터 검색하여 하기 표 2에 나타난 바와 같이 류코노스톡 칼노숨 확인을 위하여 DNA-depent RNA polymerase로부터 506 bp, 류코노스톡 메센테로이데스 확인을 위하여 alcohol/acetaldehyde dehydrogenase로부터 358 bp, 락토바실러스 브레비스 확인을 위하여 surface layer protein로부터 482 bp, 락토바실러스 프란타룸 확인을 위하여 cadmium/manganese transport ATPase로부터 313 bp, 락토바실러스 펜토슈스 확인을 위하여 recominase A로부터 398 bp, 락토바실러스 사케이 확인을 위하여 putative lipase/esterase로부터 269 bp, 락토코쿠스 락티스 확인을 위하여 tributyrin esterase로부터 248 bp, 페디오코쿠스 펜토사세우스 확인을 위하여 esterase/lipase로부터 330 bp, 바이셀라 콘푸사 확인을 위하여 D-alanine: D-alanine ligase로부터 208 bp 와 바이셀라 코리엔시스 확인을 위하여 maltose phosphorylase로부터 154 bp을 기초로 하여 설계하였다. 모든 primer는 Bioneer사 (Daejeon, Korea)에서 합성하였다.

[0051] <표 2>

[0052] 본 발명을 위하여 제작한 10종의 젖산균 프라이머 유전자 서열 및 PCR 산물의 생성 길이

프라이머 이름	서열번호	프라이머 유전자 서열 (5' → 3')	목표 젖산균 종/ 유전자 (Accession 번호)	PCR 산물 (bp)
LcaF	1	GAT TGT TGC TGC AGG TAT CGA GAA G	<i>L. carnosum</i> / DNA-depent RNA polymerase (X95811)	506
LcaR	2	TCC AAC GTA TCT GTG ACA GAC AAT AGC		
LmeF	3	GAG CCG TTA TTC AAG CAC CAA TC	<i>L. mesenteroides</i> / Alcohol-acetaldehyde dehydrogenase (AY804189)	358
LmeR	4	CCT GCG CCT TGA TAG TTT AAC AAG		
LbrF	5	AAA GCC AGG TAC TGT TAA GGG TGC	<i>L. brevis</i> / Surface layer protein (AY040846)	482
LbrR	6	AAC CAT CAG CCT TAG TGT CAG CG		
Lp1F	7	AAG GCC GTA GTC AGT CGT CTA TGG	<i>L. plantarum</i> / Cadmium-manganese transport ATPase (AF136521)	313
Lp1R	8	TCA ACCA CAC GAA TAT CAG CCG G		
LpeF	9	TCC GGT TTA CGC GGA ACA TTT	<i>L. pentosus</i> / Recombinase A (AJ621666)	398
LpeR	10	CCT TGA TTT GTT CAG CAC GAC G		
LsaF	11	TTA AAG GCA TTA GCT GAA GGC TGT	<i>L. sakei</i> / Putative lipase-esterase (YP_395501)	274
LsaR	12	CGC CAT GGT GGC CAC GAT		

LlaF	13	TTG CAT GGA ATG AGC GGA AAC	<i>L. lactics</i> / Tributylin esterase (AF157484)	248
LlaR	14	TAT CCT CCC ATT GAT AAA CCA GCG		
PpeF	15	CTT TGT GCC CGG TGG ATC CT	<i>P. pentosaceus</i> / Esterase-lipase (ZP_00323987)	330
PpeR	16	AAA GGC TGC AAT GTA GTT GAT GCT A		
WcoF	17	AAG CGT ATC TTG AAC CAA GCT GG	<i>W. confusa</i> / D-alanine: D-alanine ligase (U08910)	208
WcoR	18	GCA AAG CGT CCT TAA CAC CAG C		
WkoF	19	TCT GCC GAA GCT TGA CCG G	<i>W. koreensis</i> / Maltose phosphorylase (this study)	154
WkoR	20	GCC GAA TTA AGT AGT GTA AAG TCA AAT G		

[0054] 실시예 3 : 공시균주에 대한 m-PCR 확인

[0055] m-PCR은 thermalcycler(PC802, Astec, Japan)을 이용하여 수행하였다. PCR 반응 혼합물(50 μ L)은 Super-therm DNA 중합효소(5.0 unit, JMR, Side Cup, Kent, UK) 1 μ L, primer(20 pmol) 각각 2 μ L, 2.5 mM $MgCl_2$ 를 함유한 PCR 반응 완충액(buffer) 5 μ L, 2.5 mM dNTP 5 μ L, 주형 DNA 5 μ L 그리고 증류수 30 μ L를 포함한다.

[0056] m-PCR은 95℃에서 5분 동안 예열 단계를 거친 후 35 사이클 동안 수행하였다. 각 사이클은 94℃에서 30초간 변성, 60℃에서 1분 동안 풀림, 72℃에서 2분간 신장 단계으로 구성된다. 마지막 사이클은 72℃에서 10분간 신장 단계를 수행하였다.

[0057] 동일한 PCR 조건으로 단일(single) PCR 분석을 수행하였다. PCR 산물은 전기영동법으로 분석하였다. PCR 산물 10 μ L를 2.5% 아가로스 겔(agarose gel)에 주입한 후 1× TAE 완충액에서 80 볼트(volt)로 6시간 동안 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 겔은 1 /mL 에티뮴 브로마이드(EtBr, ethidium bromide) 용액으로 30분간 염색한 후 Gel Documentation System(Model GelDoc 1000, Bio-Red, USA)의 CCD-카메라에서 관찰하였다. PCR 산물의 분자크기는 100 bp DNA ladder(Bioneer Inc., Seoul, Korea)의 표준 마이크를 통하여 확인하였다.

[0058] 공시균주의 PCR 산물들은 각각 154 bp(Wko, *W. koreensis*), 208 bp(Wco, *W. confusa*), 248 bp(Lla, *L. lactics*), 269 bp(L, *L. sakei*), 313 bp(Lla, *L. Lac. plantarum*), 330 bp(Ppe, *P. pentosaceus*), 358 bp(Lme, *L. carnosum*)로 관찰되었다. 모든 종 특이적 프라이머 쌍들은 예상했던 크기의 단일 PCR 산물을 생산했고, 설계된 프라이머들은 종 특이성을 나타내었다(도 1 참조).

[0059] 실시예 4 : 김치발효 중 이화학적 성질의 변화

[0060] 본 발명에서 사용한 김치는 경남 거창군에 위한 대상 종갓집 공장에서 포기김치 4,000 g을 얻은 후 김치는 1000 mL 용기에 옮겨 각각 4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃에서 발효시키면서 일정 시간간격으로 시료를 채취하여 실험을 수행하였다.

[0061] 일정간격으로 채취한 김치시료를 믹서기로 갈고 여과과정을 거친 후 pH 미터기로 pH를 측정하였다. 20 mL의 여과과정을 거친 김치 주스는 pH 8.2 $\pm$ 0.2의 0.1N NaOH용액으로 적정하여 산도를 측정하였고 염도는 염도 측정기로, 환원당의 측정은 DNS법으로 실시하였다.

[0062] 4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃에서 숙성된 배추김치의 각각 pH와 산도는 비교되었다. pH의 감소와 산도의 증가는 온도의 증가에 따라 영향을 받았다. 각각 4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃에서 96 및 54, 30, 24일 숙성된 후 pH는 초기(0 일) 6.7에서 4.16 및 3.92, 3.79, 3.48로 감소하였다. 반면에 산도는 각각 0.24%(0 일)에서 1.14 및 1.12, 1.35, 1.54%로 증가하였다(도 2 참조).

[0063] 배추김치 숙성동안에 환원당과 염도는 발효 0일에는 43.07 g/L와 3.3%이었고, 각각 4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃에서 발효(96 및 54, 30, 24일)시킨 후에는 14.48 및 15.25, 15.41, 15.31 g/L와 2.7 및 2.6%로 감소하였다. 특히 환원당의 수준은 배추김치 숙성기간 동안 42(4℃) 및 18(8℃), 12(15℃), 6(25℃)일에서 현저하게 감소되었다(도 3 참조).

[0064] 실시예 5 : 김치발효 중 유기산 함량의 변화

[0065] 본 실시예에서는 김치의 발효 중 유기산은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 5 mL의 김치 주스를 모은 후 원심분리

하였다. 1 ml의 상등액을 0.45 μ m Minipore PVDF 필터에서 여과한 후 10 μ L 주입하여 분석하였다. 사용된 HPLC 기기는 Perkin-Elmer 200 series였고 분석 칼럼은 TSKgel ODS-100V(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μ m, Tosoh Corp., Tokoy, Japan) 이용하였다. 이동상은 0.1% H₃PO₄ 용액을 40도에서 분당 1 ml/min을 흘려보 보내면서 분석하였다. 다양한 유기산들은 UV 검출기 210nm에서 측정하였다. HPLC분석에서, 유기산은 대략 3.1분부터 22.8분까지 범위에서 검출 되었다. 유기산의 양은 25 및 50, 75, 100 ppm으로 만들어진 표준용액을 이용하여 검량선을 작성하여 계산하였다.

[0066] 김치 발효 기간 동안 전체 유기산 함량은 숙성 0일에는 13.48 g/L 이었고, 각각 4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃에서 발효(95 및 54, 30, 24일)시킨 후에는 29.07, 24.07, 32.62, 38.48 g/L로 크게 증가하였다.

[0067] 김치발효 동안 젖산의 수준은 숙성 0일에는 3.74 g/L이었고, 숙성이 끝난 후에는 18.09, 10.52, 18.35, 20.5 g/L로 현저하게 증가하였다(표 3 참조).

[0068] <표 3>

[0069] 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 김치발효 기간 동안의 유기산 함량의 변화 양상

온도 (°C)	유기산 함량 (g/L)	발효 기간 (day)									
		0	12	24	36	42	48	60	72	84	96
4	Acetic	1.13	1.84	3.15	4.47	5.47	6.25	6.54	5.67	5.53	4.82
	Ascorbic	0.12	0.16	0.18	0.20	0.15	0.14	0.16	0.15	0.13	0.13
	Citric	4.87	3.54	1.21	2.04	1.92	1.15	1.02	1.20	1.35	1.19
	Lactic	3.74	5.54	14.94	17.02	17.35	18.14	18.53	18.68	17.91	18.09
	Malic	1.18	3.08	0.65	0.81	0.58	0.79	0.71	0.69	0.76	0.74
	Oxalic	0.37	0.89	0.95	0.71	0.98	0.80	0.72	0.88	1.17	1.12
	Succinic	1.17	1.65	1.54	1.52	2.19	2.45	2.50	2.16	2.36	2.56
	Tartaric	0.80	0.47	0.40	0.59	0.35	0.39	0.51	0.43	0.43	0.42
	Total	13.38	17.17	23.03	27.36	28.99	30.12	30.69	29.86	29.64	29.07
8		0	6	12	15	18	21	24	36	42	54
	Acetic	1.13	1.79	2.47	3.22	4.42	4.46	5.12	5.61	5.36	4.73
	Ascorbic	0.12	0.09	0.10	0.14	0.19	0.20	0.22	0.20	0.18	0.22
	Citric	4.87	4.48	4.31	2.97	2.51	2.46	2.97	4.41	3.55	3.72
	Lactic	3.74	5.42	8.51	11.28	13.27	13.86	14.43	12.77	12.72	10.53
	Malic	1.18	0.84	1.36	0.85	0.80	0.57	0.77	0.75	0.80	0.90
	Oxalic	0.37	1.04	0.96	1.25	1.06	1.36	1.28	1.02	1.05	0.77
	Succinic	1.17	1.09	2.21	1.77	1.17	3.78	3.99	3.05	2.98	2.92
	Tartaric	0.80	0.74	0.63	0.61	0.46	0.58	0.45	0.58	0.80	0.49
	Total	13.38	15.49	20.54	22.08	23.86	27.28	29.22	28.39	27.44	24.27
15		0	3	6	9	12	15	18	21	24	30
	Acetic	1.13	1.53	3.44	4.56	4.39	5.70	4.96	6.38	6.59	5.63
	Ascorbic	0.12	0.13	0.15	0.22	0.22	0.19	0.15	0.18	0.32	0.24
	Citric	4.87	5.41	3.63	4.83	4.71	4.45	4.91	4.44	4.35	3.71
	Lactic	3.74	5.80	12.86	16.05	18.72	20.22	20.60	19.52	18.82	18.35
	Malic	1.18	0.46	0.73	1.90	1.32	1.89	2.08	2.50	2.13	2.04
	Oxalic	0.37	0.67	0.55	0.71	0.95	1.04	0.92	1.12	1.03	0.78
	Succinic	1.17	1.86	1.47	1.84	1.75	1.85	1.61	1.25	1.46	1.40
	Tartaric	0.80	0.82	0.57	0.76	0.62	0.52	0.42	0.59	0.53	0.47
	Total	13.38	16.69	23.40	30.87	32.69	35.85	35.65	35.97	35.23	32.62
25		0	1	3	6	9	12	15	18	21	24
	Acetic	1.13	1.26	3.74	4.56	4.19	4.80	4.85	4.81	4.78	4.76
	Ascorbic	0.12	0.15	0.20	0.17	0.16	0.19	0.15	0.20	0.18	0.19
	Citric	4.87	6.15	5.42	5.09	5.10	5.37	5.78	4.88	4.82	4.72
	Lactic	3.74	8.58	13.18	20.42	25.52	27.69	27.35	24.54	20.64	20.50
	Malic	1.18	1.24	1.59	1.07	0.82	2.37	1.92	2.59	2.59	2.54
	Oxalic	0.37	0.73	0.78	0.79	0.81	0.86	0.84	0.89	0.93	0.90
	Succinic	1.17	1.53	2.21	2.20	2.65	3.48	3.38	4.84	4.43	4.12
	Tartaric	0.80	0.62	0.59	0.59	0.64	0.71	0.58	0.81	0.74	0.75
	Total	13.38	20.28	27.70	34.88	39.89	45.46	44.85	43.56	39.11	38.48

[0070]

[0071] 실시예 6: 김치 발효기간 동안 미생물상의 변화

[0072] 본 실시예에서는 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 김치발효 중 총 생균수의 변화는 트리픽 소이 한천배지(TSA), 총 젖산균수는 락토바실러스 MRS 한천배지(MRSA), 류코노스톡은 PES 한천배지(PESA), 페디오코쿠스는 엔토로코쿠스 한천배지(m-ENTA)를 사용하여 측정하였다.

- [0073] 4℃에서 발효된 경우, 총 생균수 총량 및 총 젖산균수, 페디오코쿠스 균수는 42일까지는 점차적으로 증가하였고(각각 12.39, 12.32, 8.83 log cfu/mL) 그 이후 96일까지 감소하였다. 한편, 류코노스톡 균수는 발효 36일째(8.2 log cfu/mL) 최대치에 도달하였고 그 이후 96일까지 감소하였다.
- [0074] 8℃의 경우, 총 생균수 총량 및 총 젖산균수 그리고 류코노스톡 균수는 36일째(12.32, 12.28, 9.40 log cfu/mL)까지 빠르게 증가하였고, 그 이후 54일(10.70, 10.48, 6.67 log cfu/mL)까지 감소하였다. 또한, 페디오코쿠스 균수는 발효 24일째의 최고 7.81 log cfu/mL 까지 증가한 후 감소하였다.
- [0075] 15℃의 김치발효에서는 총 생균수 및 총 젖산균수의 수준은 각각 초기(발효 0일)에서 6.15, 5.23 log cfu/mL에서 21일째 13.7 및 13.44 log cfu/mL로 현저하게 증가하였고, 그 이후 발효 중에 급격히 감소하였다. 류코노스톡과 페디오코쿠스 균수는 발효 15일째 최고 9.46 및 8.91 log cfu/mL 만큼 증가하였고 그 후 30일까지(7.95, 6.63 log cfu/mL) 동안 감소하였다.
- [0076] 최종 25℃에서 발효한 김치에서 총 생균수 및 총 젖산균수는 현저하게 증가하여 발효 15일째 최고 13.5 및 13.4 log cfu/mL까지 증가하였으며, 그 후 점차적으로 감소하였다. 류코노스톡과 페디오코쿠스 균수는 각각 12일 및 15일째 발효에서 최고 9.65 및 9.72 log cfu/mL까지 증가하였다(도 4 참조).
- [0077] **실시예 7 : 김치발효 중 젖산균 종의 변화**
- [0078] 본 실시예에서 특이 젖산균 종의 변화를 김치발효 동안 m-PCR과 16S rDNA를 이용하여 관찰하였다.
- [0079] 각 시료는 96개 콜로니씩 분석하였다. 우선 상기 실험 예1에 기술된 m-PCR를 행하여 10종의 젖산균을 확인하고, 확인되지 않은 클론은 16S rDNA PCR를 수행한 후 염기서열을 결정하고 미국국립생물정보센터(NCBI) 데이터 베이스를 이용한 젖산균을 확인하였다. 16S rDNA 유전자 단편 증폭을 위해 사용된 PCR 프라이머는 5'-CGGAGAGTTTPATCCTPG-3(순방향), 5'-TACGGCTACCT TPTTAGCGAC-3(역방향). 16S rDNA 유전자는 추출된 DNA, Super-Term DNA 중합효소(JMR, Side Cup, Kent, UK), 1.5mM MgCl₂, 2mM dNTP 그리고 primer를 포함해 최종부피 50 μL로 PCR 수행에 의해 증폭되었다.
- [0080] PCR 조건은 30cycle(94℃에서 3분간 변성, 60℃에서 1분 동안 풀림, 72℃에서 2분간 신장)로 수행되고 72℃에서 10분간 최종 신장 단계를 거쳐 끝났다. 약 1,500 bp PCR 산물은 전기영동을 거친 후 gel extraction kit(iNTRON Biotechnology, Suwon, Korea)을 사용하여 분리하였다. PCR 산물은 직접 pGEM-T Easy vector(Promega, WI, USA)에 클로닝한 후 재조합된 클론들을 무작위로 선발하였다. DNA 염기서열 결정은 PRISM Ready Reaction Dye terminator와 primer cycle sequencing kit(Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CN, USA)를 사용한 사슬종결법(dideoxy-chain termination method)로 수행하였다. 시료들은 automated DNA sequencer(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 통해 분석되었고, 16S rDNA 상동 염기서열 검색은 NCBI 생물정보학사이트의 블라스트 엔(Blast N)을 사용하였다.
- [0081] 분리 젖산균들은 류코노스톡 중 5개(류코노스톡 칼노슘, 류코노스톡 시트레움, 류코노스톡 가시콰이타툼, 류코노스톡 게리툼, L류코노스톡 메센테로이데스), 락토바실러스 중 5개(락토바실러스 브레비스, 락토바실러스 프란타툼, 락토바실러스 펜토슈스, 락토바실러스 사케이, 락토바실러스 쿨바투스), 락토코쿠스 중 1개(락토코쿠스 락티스), 페디오코쿠스 중 1개(페디오코쿠스 펜토사세우스), 바이셀라 중 2개(바이셀라 콘푸사, 바이셀라 코리엔시스)이 관찰되었다.
- [0082] 초기 발효일(0 일)의 경우, 젖산균 군집은 류코노스톡 칼노슘은 0.33 log cfu/mL, 류코노스톡 시트레움은 0.71 log cfu/mL, 류코노스톡 메센테로이데스는 0.38 log cfu/mL, 락토바실러스 프란타툼은 0.16 log cfu/mL, 락토바실러스 사케이는 1.58 log cfu/mL, 락토코쿠스 락티스는 1.26 log cfu/mL, 페디오코쿠스 펜토사세우스는 0.16 log cfu/mL, 바이셀라 콘푸사는 0.65 log cfu/mL로 분포하였다.
- [0083] 김치 4℃ 발효의 경우, 류코노스톡 칼노슘 및 류코노스톡 시트레움, 락토코쿠스 락티스, 바이셀라 콘푸사는 42일째까지 감소한 후 그 후 관찰되지 않았고 류코노스톡 메센테로이데스는 숙성 36일째(2.82 log cfu/mL)까지는 증가했으나 그 이후 감소하여 0.70 log cfu/mL 있었다. 락토바실러스 사케이는 빠르게 증가하여 발효 72일째에 최대 6.66 log cfu/mL까지 도달하였다. 바이셀라 코리엔시스는 숙성 36일째(0.52 log cfu/mL) 처음 나타난 후 발효기간 동안 점점 증가했다.
- [0084] 8℃에서 발효되는 동안 류코노스톡 칼노슘 및 류코노스톡 시트레움, 락토코쿠스 락티스, 바이셀라 콘푸사는 발효 12일(0.08 log cfu/mL), 15일(0.28 log cfu/mL), 15일(0.28 log cfu/mL), 18일(0.09 log cfu/mL)까지 감소했고, 그 후 발효 기간 동안 관찰되지 않았다. 류코노스톡 메센테로이데스는 숙성 12일째(3.36 log cfu/mL)까지

크게 증가하였고, 그 후 숙성 54일(0.87 log cfu/mL)까지 점점 감소하였다. 락토바실러스 프란타룸은 발효 42일 까지 최대 1.08 log cfu/mL로 천천히 증가한 후 김치 발효 기간 동안 일정하게 유지가 되었다(발효 종점 1.09 log cfu/mL). 락토바실러스 사케이는 숙성 73일째까지 빠르게 증가하여 최대 7.92 log cfu/mL 있었다. 바이셀라 코리엔시스는 숙성 12일(0.08 log cfu/mL)에 처음 나타났고, 그 후 발효 기간 동안 54일(2.7 log cfu/mL)까지 현저하게 증가하였다.

[0085] 15℃ 발효의 경우, 류코노스톡 칼노숨 및 류코노스톡 시트레움, 락토코쿠스 락티스, 바이셀라 콘푸사의 수준은 발효 9일(0.24 log cfu/mL), 18일(0.28 log cfu/mL), 18일(0.42 log cfu/mL), 9일(0.2 log cfu/mL)까지 감소하였고, 그 후에는 관찰되지 않았다. 류코노스톡 메센테로이데스는 발효 9일(2.86%)까지 증가하였고, 그 후 감소하여 발효 종점기(30일)에는 관찰되지 않았다. 락토바실러스 프란타룸은 발효 24일째 5.83 log cfu/mL로 최대치에 도달하였다. 락토바실러스 사케이는 숙성 12일에는 최대 2.30 log cfu/mL로 증가하였고 그 이후 서서히 감소하였다. 류코노스톡 가시콰이타툼은 발효 9일째 처음 나타났으며, 발효 21일에 최대 1.4 log cfu/mL까지 증가하였다. 바이셀라 코리엔시스는 역시 발효 9일째 처음 나타났으며, 그 후 숙성기간동안 30일(3.4 log cfu/mL)까지 현저하게 증가하였다.

[0086] 25℃ 김치발효의 경우, 류코노스톡 칼노숨 및 락토코쿠스 락티스, 바이셀라 콘푸사의 수준은 숙성 3일째 각각 0.22 및 0.45, 0.22 log cfu/mL 있었고, 류코노스톡 시트레움은 발효 6일째 0.25 log cfu/mL로 감소하였다. 류코노스톡 가시콰이타툼은 발효 3일째 처음 나타나 12일째 최대 1.36 log cfu/mL로 증가하였으며, 그 후 숙성 21일(0.72 log cfu/mL)까지 감소하였다. 류코노스톡 메센테로이데스는 발효 1일째 최대치 2.57 log cfu/mL을 나타낸 후 서서히 감소하였다. 락토바실러스 프란타룸은 발효 15일(8.16 log cfu/mL)까지 빠르게 증가하였고, 그 후에는 점점 감소하였다. 락토바실러스 사케이는 발효 1일에는 최대 2.36 log cfu/mL로 증가하였고, 그 후 서서히 감소하였다. 바이셀라 코리엔시스는 발효 3일째 처음 나타났으며, 그 후 숙성기간동안 21일(3.08 log cfu/mL)까지 빠르게 증가하였다(표 4 참조).

[0087] <표 4>

[0088] 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 김치발효 기간 동안의 젖산균의 변화 양상을 나타낸 결과

온도	젖산균 종	발효 날짜(log cfu/ml) ^a									
4도		0	12	24	36	42	48	60	72	84	96
	총균수(log cfu/ml)	5.23	5.99	7.34	12.32	12.37	11.08	10.82	10.49	9.23	8.41
	<i>L. carnosum</i>	0.33	0.25	0.38	0.26	0.12	0	0	0	0	0
	<i>L. citreum</i>	0.71	0.75	0.61	0.26	0.12	0	0	0	0	0
	<i>L. gasicomitatum</i>	0	0	0	0.9	0.78	0.34	0.11	0	0	0
	<i>L. gelidum</i>	0	0	0.15	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. mesenteroides</i>	0.38	1.7	2.0	2.82	1.96	0.92	0.68	0.66	0.77	0.70
	<i>L. brevis</i>	0	0	0	0.38	0.38	0	0.11	0	0	0
	<i>L. curvatus</i>	0	0.06	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. pentosus</i>	0	0	0	0	0	0.23	0.23	0	0	0
	<i>L. plantarum</i>	0.16	0.25	0.23	1.03	1.3	1.15	0.9	0.87	0.87	0.97
	<i>L. sakei</i>	1.58	1.49	1.74	4.73	5.55	6.47	6.65	6.66	5.09	4.24
	<i>L. lactic</i>	1.26	0.93	1.38	0.52	0.38	0	0	0	0	0
	<i>P. pentosaceus</i>	0.16	0.25	0.31	0.26	0	0	0	0	0	0
8도	<i>W. confusa</i>	0.65	0.31	0.54	0.64	0.38	0	0	0	0	0
	<i>W. koreensis</i>	0	0	0	0.52	1.4	1.96	2.14	2.3	2.55	2.51
		0	6	12	15	18	21	24	36	42	54
	총균수(log cfu/ml)	5.23	7.49	8.48	8.89	9.27	9.86	11.30	12.28	11.93	10.48
	<i>L. carnosum</i>	0.33	0.31	0.08	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. citreum</i>	0.71	0.48	0.44	0.28	0	0	0	0	0	0
	<i>L. gasicomitatum</i>	0	0	0	0.37	0.48	0.62	0.47	0.26	0.12	0.1
	<i>L. gelidum</i>	0	0	0.08	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. mesenteroides</i>	0.38	2.88	3.36	1.72	1.17	1.03	1.06	1.15	0.99	0.87
	<i>L. brevis</i>	0	0	0	0.28	0	0.21	0.11	0	0	0
	<i>L. curvatus</i>	0	0	0	0	0	0	0.11	0	0	0
	<i>L. pentosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. plantarum</i>	0.16	0.32	0.53	0.56	1.08	0.93	1.06	1.02	1.12	1.09
	<i>L. sakei</i>	1.58	2.49	3.27	4.76	5.2	5.65	6.82	7.92	7.06	5.72
	<i>L. lactic</i>	1.26	0.7	0.18	0.28	0	0	0	0	0	0
15도	<i>P. pentosaceus</i>	0.16	0	0	0	0.09	0	0	0	0	0
	<i>W. confusa</i>	0.65	0.31	0.44	0	0.09	0	0	0	0	0
	<i>W. koreensis</i>	0	0	0.08	0.65	1.16	1.33	1.67	1.93	2.64	2.7
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	30
	총균수 (log cfu/ml)	5.23	6.92	8.54	11.48	12.04	13.22	13.43	13.44	12.41	11.04
	<i>L. carnosum</i>	0.33	0.57	0.36	0.24	0	0	0	0	0	0
	<i>L. citreum</i>	0.71	0.93	0.62	0.6	0.76	0.56	0.28	0	0	0
	<i>L. gasicomitatum</i>	0	0	0	0.6	0.76	0.83	1.11	1.4	1.03	0.92
	<i>L. gelidum</i>	0	0.15	0.18	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. mesenteroides</i>	0.38	2.32	2.67	2.86	1.51	1.37	1.26	0.71	0.26	0
	<i>L. brevis</i>	0	0	0.36	0	0.51	0.56	0.28	0.28	0.65	0.57
	<i>L. curvatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. pentosus</i>	0	0	0	0.24	0.76	0.55	0.98	0.7	0.12	0
	<i>L. plantarum</i>	0.16	0.58	1.58	2.92	3.58	4.42	4.89	5.81	5.83	5.23
	<i>L. sakei</i>	1.58	0.93	1.59	2.23	2.3	2.17	1.5	1.4	1.17	0.92
	<i>L. lactic</i>	1.26	0.8	0.62	0.84	0.88	0.83	0.42	0	0	0
	<i>P. pentosaceus</i>	0.16	0.2	0.18	0.11	0	0	0	0	0	0
	<i>W. confusa</i>	0.65	0.44	0	0.24	0	0	0	0	0	0
	<i>W. koreensis</i>	0	0	0	0.48	1.0	1.93	2.71	3.14	3.35	3.4

[0089]

25도		0	1	3	6	9	12	15	18	21	24
	총젖산균수(log cfu/ml)	5.23	7.48	10.62	12.01	12.47	13.03	13.40	13.06	12.69	11.42
	<i>L. carnosum</i>	0.33	0.23	0.22	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. citreum</i>	0.71	0.54	0.55	0.25	0	0	0	0	0	0
	<i>L. gasicomitatum</i>	0	0	0.33	0.88	1.17	1.36	1.26	1.08	1.05	0.72
	<i>L. gelidum</i>	0	0.07	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. mesenteroides</i>	0.38	2.57	2.46	1.36	0.91	0.4	0.56	0.13	0	0
	<i>L. brevis</i>	0	0	0.45	0	0.52	0.68	0.7	0.82	1.05	0.95
	<i>L. curvatus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>L. pentosus</i>	0	0	0.11	0.25	0.52	0.68	0.28	0.13	0	0
	<i>L. plantarum</i>	0.16	0.39	3.56	6.79	7.65	8.15	8.16	7.87	7.22	6.32
	<i>L. sakei</i>	1.58	2.36	2.16	1.98	0.91	0.55	0.71	0.69	0.53	0.35
	<i>L. lactic</i>	1.26	0.7	0.45	0	0	0.13	0	0	0	0
	<i>P. pentosaceus</i>	0.16	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<i>W. confusa</i>	0.65	0.62	0.22	0	0	0	0	0	0	0
	<i>W. koreensis</i>	0	0	0.11	0.5	0.79	1.08	1.73	2.34	2.84	3.08

[0090]

[0091] 실시예 8: m-PCR 효율의 검정

[0092] 본 실시예에서는 최종적으로 m-PCR로 확인된 젖산균수와 16S rDNA로 확인한 젖산균수를 조사하여 발효단계별 m-PCR의 효율을 검정하였다.

[0093] 모든 온도에서 발효가 진행됨에 따라 m-PCR의 효율은 증가하였다. 4도의 경우 미숙기 86.5%에서 적숙기 89.4%, 산패기에는 100% 효율을 나타내었으며, 8도의 경우 적숙기에는 94.8%, 산패기에는 99.0% 이며, 15도의 경우 적숙기에는 90.6%, 산패기에는 91.7% 이며, 25도의 경우에는 적숙기 91.7%, 산패기 93.7%의 효율을 나타냈었다(도 5 참조).

도면의 간단한 설명

[0094] 도 1은 본 발명에서 제작한 10종의 김치발효 관여 젖산균의 다중중합효소연쇄반응 후 전기영동한 결과를 나타낸 것이다.

[0095] 도 2는 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 김치발효 기간 동안의 pH와 산도의 변화 양상을 나타낸 결과이다. 도 2A는 4℃에서 발효, 도 2B는 8℃에서 발효, 도 2C는 15℃에서 발효, 도 2D는 25℃에서 발효를 나타낸 결과이다.

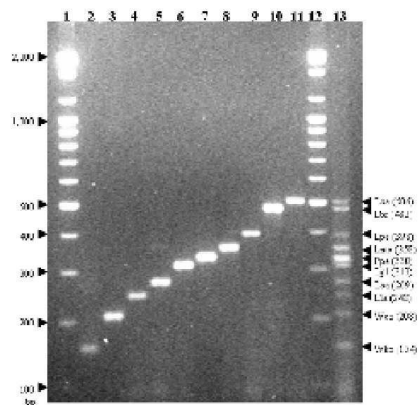
[0096] 도 3은 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 김치발효 기간 동안의 환원당과 염도의 변화 양상을 나타낸 결과이다. 도 3A는 4℃에서 발효, 도 3B는 8℃에서 발효, 도 3C는 15℃에서 발효, 도 3D는 25℃에서 발효를 나타낸 결과이다.

[0097] 도 4는 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 김치발효 기간 동안에 선택배지를 사용하여 총균수(TSA) 및 총 젖산균수(MRSA), 류코노스톡 균수(PESA), 페디오코쿠스 균수(m-ENTA)의 변화 양상을 나타낸 결과이다. 도 4A는 4℃에서 발효, 도 4B는 8℃에서 발효, 도 4C는 15℃에서 발효, 도 4D는 25℃에서 발효를 나타낸 결과이다.

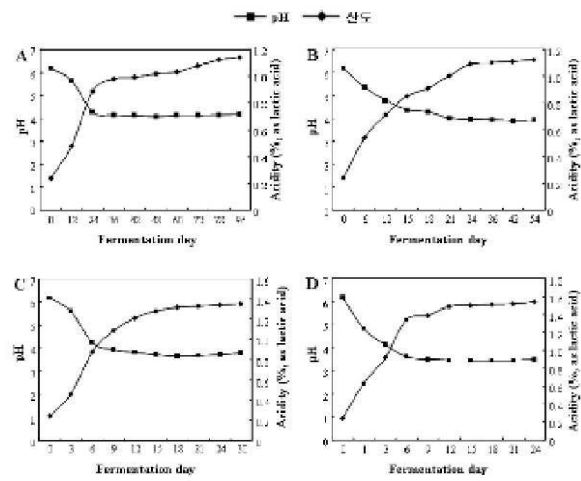
[0098] 도 5는 온도별(4℃ 및 8℃, 15℃, 25℃) 김치발효 단계에 따른 본 발명의 다중중합효소연쇄반응의 효율을 나타낸 결과이다.

도면

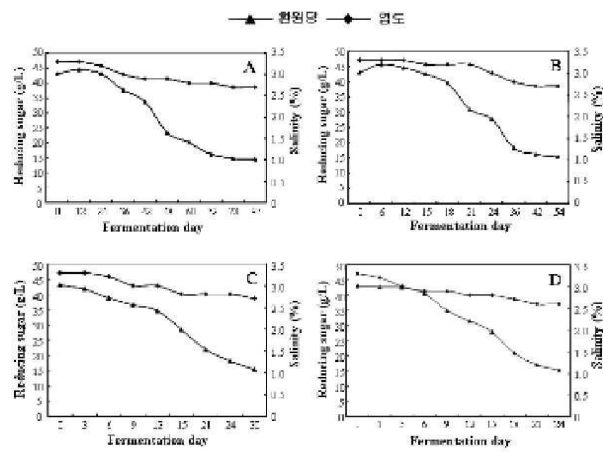
도면1



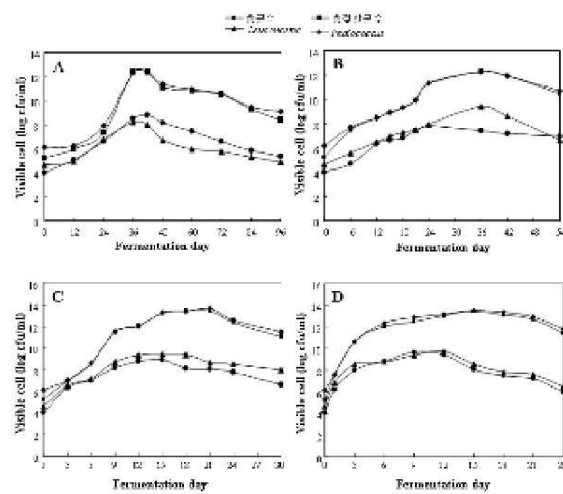
도면2



도면3



도면4



도면5

