

저염 발효오이로부터 16S rDNA-PCR과 RFLP분석을 통한 부패균의 신속한 확인

† 김 재 호 · ¹장 혜 영

경성대학교 생물학과, ¹고신대학교 생명과학부
(접수 : 2003. 3. 15., 게재승인 : 2004. 2. 22.)

16S rDNA-PCR and RFLP Analysis for rapid Identification of Spoilage Bacteria from low Salt Cucumber Brine

Jae-Ho Kim† and Hye-Young Jang¹

Department of Biology, Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

¹Division of Biological Sciences, Kosin University, Busan 606-080, Korea

(Received : 2003. 3. 15., Accepted : 2004. 2. 22.)

The aim of this study was to isolate and identify the spoilage bacteria in the low salt cucumber brine. The PCR amplicons comprising a portion of the 16S rRNA gene of the isolated colonies were directly sequenced and the untrimmed whole sequencing results of the unknown strains were aligned with the type strains using BLAST of NCBI. Then Sequence Aligner and Sequence Match of RDP confirmed the outcome. The identified isolates were eight species and belong to three genera: *Clostridium*, *Lactobacillus*, and *Bacillus*. The RFLP pattern of the 16S rRNA gene of isolates verified the identified species. From now on the complex spoiling process of low salt fermented cucumber could be analyzed using the isolated species individually or with certain combinations.

Key Words : Spoilage bacteria, low salt cucumber brine, 16s rDNA-PCR

서 론

건강에 대한 관심의 증대로 인한 저염식품의 개발 필요성에 맞추어 오이발효에 염의 농도를 낮추게 되면 정상적 일차발효 후에 이차발효가 진행됨으로써 결국 부패하게 된다. 오이의 발효는 주로 5-8%의 염에서 이루어지며 발효 후 저장은 8-16%에서 이루어져 왔다(1). 최종적인 식품에 염의 농도를 낮추는 가장 경제적인 방법은 발효와 저장과정에서 처음부터 가능한 최소한의 염을 사용하는 것이며 이 방법은 발효과정을 통한 미생물상의 변화에 대한 이해를 바탕으로 부패균의 생장을 억제할 수 있어야만 적용할 수 있다.

오이발효는 염의 농도이외에도 온도나, pH와 같은 환경요인에 절대적인 영향을 받는 야생의 미생물들에 의한 결과이며 전 과정은 몇몇 단계로 구분된다(2). 시작단계에서

는 다양한 그람음성균이나 그람 양성균들이 관여할 수 있으며 이때는 초기배양균을 첨가하여 조절이 가능하다. 다음은 주 발효단계로서 젖산균과 효모에 의하여 당이 산으로 전환되는 과정이며 발효된 오이를 오래 보관하기 위해서는 이 때의 미생물상을 가능한 한 안정되게 유지하여야 한다. 그러나 낮아진 pH로 젖산균이 억제되고 남아있는 당이 있을 때 미생물상은 안정을 유지하지 못하고 이차발효로 진행되며 특히 염의 농도가 낮을 때는 부패균이 더욱 잘 자라게 된다(3). 저염 발효오이의 장기 보관을 위해서는 이 이차발효 과정에 관여하는 미생물상을 파악한 후 부패균의 생장을 선택적으로 억제할 수 있어야 한다. 그러나 무기상태에서 진행되는 오이의 이차발효에서 복잡하고 다양한 미생물상의 구조를 이해하기는 쉽지 않으며 세포구조나 화학적인 분석에 바탕을 둔 방법의 사용은 거의 불가능한 일이다. 최근에 미생물상의 구조를 이해하기 위하여 16S rRNA 유전자를 이용하는 다양한 방법들이 보고되고 있다(4-7).

본 연구에서는 장기간에 걸쳐 다양한 균의 복합적 작용으로 진행되는 저염 발효오이의 부패 과정을 이해하기 위

† Corresponding Author : Department of Biology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

Tel : +82-51-620-4644, Fax : +82-51-627-4115

E-mail : jhkim@star.ks.ac.kr

하여 이에 관련된 균을 분리 동정하였다. 부패발효액을 무기배양하여 균을 분리하고 이들의 16s rRNA 유전자 부분을 universal primer(8)를 이용한 PCR로서 증폭하여 서열분석하고 그 결과를 이용하여 신속하고 정확하게 동정 하였다(9). 형태적으로 다른 균으로 분리되었던 46종류의 균은 모두 *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Bacillus* 속에 속하는 8종으로 판명되었다.

본 연구의 결과는 미생물균의 복합적 성장 결과인 부패현상을 분리동정된 각 종을 이용함으로써 개별적 단위로 나누어 연구할 수 있게 한다. 각 종의 생화학적 특성과 성장조건, 대사생성물 등에 대한 개별적인 연구는 이들이 부패를 일으키는 이차발효 과정에서 어떻게 순차적으로 작용하며 각각의 역할이 무엇인지를 이해하게하여 저염발효 오이의 안정적 보관 방법 개발에 공헌하리라 예상된다. 또 동정과정에서 sequencing 결과 전체를 이용하는 점과 RDP를 통한 확인과 RFLP를 이용한 검증은 동정 결과에 대한 신뢰도를 한층 증가시킨다고 생각된다.

재료 및 방법

생장배지

균의 분리를 위한 생장배지는 발효오이즙 (Fermented cucumber slurry : FCS)을 사용하였다. 오이 발효는 칼슘아세테이트 용액에 직경 2.5-3.0 cm 정도의 오이를 NaCl의 첨가없이 담그고 *Lactobacillus plantarum* MOP3(10)를 10^6 cfu/ml 정도로 접종하여 시작하였다. 약 2주의 발효 후에 pH가 3.4 정도로 떨어지면 오이들을 분쇄기로 갈고 마형겉으로 걸러 즙으로 만들었다. 균질화된 오이즙을 다시 원심분리 (10,000 x g, 20분)하여 상등액만을 고압멸균하였다. 멸균된 오이즙은 필요에 따라 5 M의 NaCl 과 6 N의 NaOH로서 염의 농도와 pH를 조정하여 사용하였다.

배양조건과 균의 분리

균의 분리와 배양을 위한 모든 과정은 10%의 CO₂와 10%의 H₂, 80%의 N₂를 포함한 무기배양기 (Coy Laboratory, Grass Lakes, M.) 속에서 진행되었다. 배양을 위한 접종시료는 0% NaCl에서 발효된 후 약 1년이 경과하여 용액이 혼탁하거나 용기 내의 압력이 높아지는 등 부패의 징후를 확실히 보이는 저염오이 발효액을 사용하였다. 2 ml의 시료는 18 ml 의 FCS 배지에 접종되어 30°C의 무기배양기에서 10일간 활성화 된 후 SLA (sodium lactate agar) 와 MLA (modified sodium lactate agar) 배양접시 상에서 분리되었다. SLA는 1 L당 카제인, 10.0 g; sodium lactate, 10.0 g; 효모추출물, 10.0 g; K₂HPO₄, 0.25 g; agar, 15.0 g을 포함하고 있으며 MLA는 1 L당 카제인, 5.1 g; sodium lactate, 60% syrup, 20.0 ml; 효모추출물, 10.0 g; K₂HPO₄, 0.75 g; 포도당, 0.75 g; soybean meal, 0.9 g, NaCl, 1.5 g, agar, 15.0 g을 포함하고 있다(11). 형성된 균체는 순수분리가 될 때까지 수차의 계대배양을 거쳤으며 최종적으로 분리된 균체는 동정이 이루어질 때 까지 액체배지에서 유지되었다.

Universal Primers를 이용한 16S rDNA의 증폭

DNA의 증폭을 위한 PCR은 Breidt(5)의 방법을 따랐으며 사용한 primer는 16S rDNA의 공통서열에 바탕을 둔 universal primer쌍인 bak11w와 bak4(12-14)를 사용하였다. 정 방향 primer, bak11w는 *E. coli* 16S rDNA의 8-25 위치에 해당되는 AGTTTGATCMTGGCTCAG 서열이며, 역방향 primer, bak4는 *E. coli*의 1522-1540 위치에 해당되는 AGGAGGTGATCCARCCGCA 서열을 갖는다. 각각은 16S rRNA 유전자의 양 끝의 공통서열에 선별적으로 결합된다. PCR 반응액 100 µl에는 증류수 70 µl 이외에 10 x PCR buffer (Promega), 10 µl ; 25 mM MgCl₂ (Sigma), 10 µl ; dNTP (Promega), 1 µl ; DNA, 4 µl ; Taq DNA polymerase, 1 µl (5 U/µl, Promega)가 들어있고 여기에 각 primer, 50 µmol (2 ul) (Sigma-Genosys Biotechnologies Inc., Woodland, TX)이 첨가되었다. PCR 반응은 RoboCycler 96 Gradient Temperature Cycler (Stratagene, La Jolla, CA.)에서 94°C로 5분간의 분리과정(15)을 거친 후 1 µl 의 Taq polymerase와 75 µl의 미네랄 오일을 첨가하였다. 증폭과정은 94°C, 1분 ; 55°C, 5분; 72°C, 2분을 25회 시행하였으며 72°C, 5분과 6°C, 5분으로 마무리 하였다.

제한효소처리와 서열분석

PCR 생성물의 제한효소 처리는 각각 다른 목적으로 서열분석 전후에 두 번 시행되었다. 서열분석 전의 첫 번째에는 분리된 모든 균 중에서 서열분석을 해야 할 균을 찾기 위한 처리였으며 두 번째의 서열분석 후에는 균의 증명이 밝혀진 후 동정된 표준균의 database 서열정보를 이용한 제한효소 지도와의 일치여부를 확인하기 위하여 수행되었다. 먼저, 분리된 모든 균들의 PCR 생성물을 *Rsa* I으로 처리하고 전기영동하여 band의 위치나 수효가 서로 다른 모습을 보이는 것만 서열분석하였다. 두 번째의 서열분석으로 동정된 균주의 검정을 위한 처리는 *Rsa* I 이외에 *Sau3A* I과 *Hinf* I을 처리하였다.

서열분석은 PCR 생성물을 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen Inc, Valencia, CA.)으로 씻은 후 Davis Sequencing, LLC(Davis, CA.)로 보내 ABI 377 DNA Sequencer로 자동분석하였으며 primer는 PCR에서의 동일한 것을 사용하였다.

결과 및 고찰

균의 분리와 PCR

발효오이즙 (FCS) 배지에 접종된 시료는 10일간 활성화 된 후 SRA와 MRA 상에서 2개월에 걸친 계대배양을 통하여 MLA에서는 27종, 또 SLA에서는 19종으로 모두 46종의 균이 분리되었다. SLA에서 분리된 종의 수에 비하여 MLA에서 50% 더 많은 종이 분리된 것은 MLA에는 탄소원으로 SLA에는 없는 포도당을 갖는 등 훨씬 높은 영양의 허용성 때문이라고 생각된다. 16S ribosomal DNA는 분리된 모든 종으로부터 얻어진 DNA를 주형으로 universal primer를 이용한 PCR로서 증폭되었다. PCR 생성물은 *E. coli* 16S rDNA의 8-25 위치에 해당되는 bak11w (AGTTTGATCMTGGCTCAG)와 1522-1540에 해당되는 bak4 (AGGAGGTGATCCARCCGCA) 사이의 단편으로서 전기영동 결과는 예상된 대로 1.5Kb 정도의 균일

한 크기로 나타났다. Fig. 1은 PCR의 결과를 확인한 일부를 보여주는 것이며 증폭되지 않은 7번을 제외한 모두가 거의 비슷한 1.5Kb 위치에 단일한 band를 보여준다.

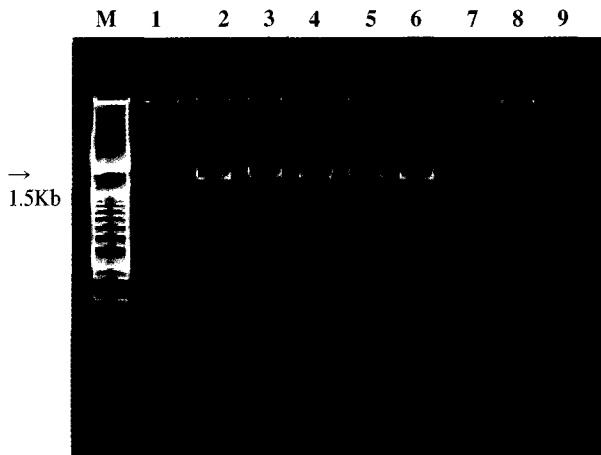


Figure 1. PCR products.

16S rDNA 서열분석과 분리종의 동정

분리된 46종의 PCR생성물은 서열분석의 중복을 피하기 위하여 4염기 (GT/AC)를 인식하는 *Rsa* I 제한효소로 절단되어 gel 상에서 서로 비교되고 동일한 경우는 대표적인 것만 선택함으로써 모두 20종을 서열분석하였다. 분석은 한 번에 대개 700-800 서열을 확인함으로써, 1.5Kb의 16S ribosome 유전자 서열은 *Bak11w*과 *Bak4*를 사용한 양 방향의 결과를 합했을 때 중앙의 중첩되는 부분과 함께 전체를 확인할 수 있었다. 분석 결과 얻어진 서열의 약 절반에서 primer 부분의 서열도 확인되었으며 *Bak4*를 사용한 역방향 생성물의 서열결과는 EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite(16))을 이용하여 상보적인 서열로 전환하여 대입하였다.

밝혀진 서열을 이용한 종의 확인은 단지 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 gapped alignment program인 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), 2.2.6(16-18)을 이용하였고 이것은 GenBank와 함께 EMBL (European Molecular Biology Laboratory), DDBJ (DNA Data Bank of Japan), PDB (Protein Data Bank)등의 database와 연동되어 분석되었다(19). Table 1은 도출된 BLAST 결과를 요약한 것으로 도출된 종들은 모두 높은 bit score와 E값 0.0을 나타내므로 높은 신뢰도를 보였다. 밝혀진 결과는 다시 ribosome의 유전자 정보만을 집중적으로 관리하는 RDP (Ribosomal Database Project-II)에서 Sequence Aligner, v1.7로서 재확인하였다(20). Sequence Aligner는 2003년 6월 입력 당시 34,362 종류의 원핵 small subunit rRNAs 서열 정보를 이용하고 있었다(21, 22). Table 2는 Sequence Aligner의 결과이며 밝혀진 종은 BLAST의 도출 결과와 모두 일치하였다.

Sequence Aligner로서 약 800 염기 길이의 서열분석 결과를 그대로 입력하였을 때, *S_ab*는 나중에 *Lactobacillus brevis* L63으로 밝혀진 D37785에서의 0.548부터 *Bacillus*

cereus ATCC10702로 밝혀진 BCY15053의 0.946까지의 다양한 범위에서 나타났다(Table 2의 첫째 열). 반면에 RDP의 Sequence Match (v 2.7)를 이용하여, 분석된 서열결과와 동정된 표준군의 database 서열과를 비교하여 완전히 일치하는 부분을 찾아가는 동안에는 서열의 길이가 짧아질수록 *S_ab* (similarity index)값이 증가함을 보여주고 있다(Table 2의 둘째 열). D37785 한 종을 제외한 나머지 전체에서 완전한 일치 (*S_ab* = 1.000)를 보이는 100 내지 575 염기 길이의 서열이 있음이 밝혀졌다.

Table 1. The output of BLAST

GenBank Identifier/Accession #	Organism	16S rRNA (bp)	bit score	E value
gi 49130 emb X68176.1 CBAT43	<i>Clostridium butyricum</i>	1513	1029	0.0
gi 49133 emb X68179.1 CBDSM7	<i>Clostridium beijerinckii</i>	1510	1267	0.0
gi 28271521 emb AL935258.1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1519	1390	0.0
gi 2342500 dbj D37785.1	<i>Lactobacillus brevis</i>	1503	898	0.0
gi 14583099 gb AF385770.1	<i>Lactobacillus casei</i>	1518	1380	0.0
gi 7621503 gb AF243146.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1517	1398	0.0
gi 10129890 dbj AB048252.1	<i>Bacillus pumilus</i>	1548	1275	0.0
gi 27803693 gb AY176771.1	<i>Bacillus cereus</i>	1500	1285	0.0

Table 2. Output of sequence align and sequence match at RDP

Short-ID	Sequence Align output		Sequence Match output		Full name
	Intact input Sequence (bp) / <i>S_ab</i>	Trimmed or matched sequence (bp) / <i>S_ab</i>	Perfect matched sequence (bp) / <i>S_ab</i>		
C.beijeri2	823 /0.776	650/0.920 600/0.926 500/0.973	400/1.000		<i>Clostridium beijerinckii</i> DSM 791 (T).
C.butyric2	840/ 0.610	448/0.922 400/0.913 300/0.908	200/1.000		<i>Clostridium butyricum</i> ATCC 43755
L.pentosus	843/0.847	-	575/1.000		<i>Lactobacillus pentosus</i> JCM 1588
D37785	839 /0.548	381/0.877 300/0.887 200/0.878 100/0.804	-		<i>Lactobacillus brevis</i> L63
D86517	773/0.864	696/0.920 578/0.961 496/0.977 383/0.971 300/0.962 221/0.948	100/1.000		<i>Lactobacillus casei</i> subsp. casei ATCC 393 (T).
L.rhamnos2	855/0.806	552/0.976 500/0.973 400/0.982	313/1.000		<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JCM 1136 (T).
AB020208	837/0.780	527/0.940 500/0.946 400/0.969 300/ 0.960 200/ 0.964	100/1.000		<i>Bacillus pumilus</i> OM-F6
BCY15053	772/0.946	700/0.946 600/0.946 500/0.950	400/1.000		<i>Bacillus cereus</i> ATCC10702

위의 방법으로 확인된 20종의 서열은 모두 3속에 속하는 8종으로 판명되었으며 그들은 각각 *Clostridium butyricum*, *Clostridium beijerinckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*이었다.

동정된 종의 RFLP에 의한 검정

분리된 종의 동정을 위해 sequencing에 사용한 것과 동일한 PCR 결과물을 제한효소 *Hinf* I, *Sau3A* I, *Rsa* I로 처리하여 생성된 단편의 수와 길이를, 동정 결과 확인된 표준균의 저장된 database 서열정보에서 얻은 제한효소 지도와 비교하여 일치여부를 검정한 결과 8종의 동정 결과는 모두 정확한 것으로 확인되었다.

Table 3. The calculated fragment size of the identified strains by GeneTool

	<i>Rsa</i> I fragment size	<i>Sau3A</i> I fragment size	<i>Hinf</i> I fragment size
<i>C. butyricum</i>	405, 356, 264, 174, 148, 145, 10	962, 287, 237, 10, 6	992, 325, 185
<i>C. beijerinckii</i>	448, 405, 353, 148, 145	1196, 287, 10, 6	989, 325, 185
<i>L. plantarum</i>	906, 355, 149, 146	1365, 175, 10, 6	976, 377, 203
<i>L. brevis</i>	906, 355, 148, 146	1126, 239, 174, 10, 6	891, 377, 117, 85, 85
<i>L. casei</i>	888, 355, 146, 132	698, 340, 168, 132, 116, 55, 12	976, 286, 186, 73
<i>L. rhamnosus</i>	884, 355, 146, 131	699, 340, 298, 167, 12	976, 355, 185
<i>B. cereus</i>	485, 406, 354, 146, 50	813, 298, 238, 86, 6	976, 336, 104, 25
<i>B. pumilus</i>	501, 453, 406, 149, 18, 12	695, 296, 187, 175, 119, 51, 10, 6	605, 372, 334, 203, 25

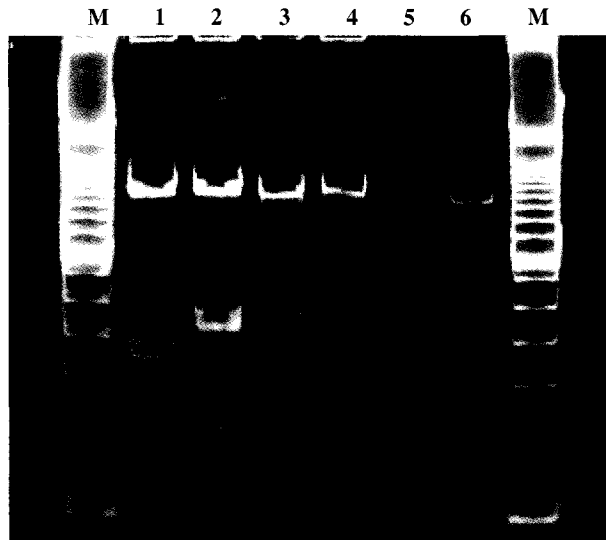


Figure 2. *Hinf* I digestion, M: 100 bp ladder, 1: *C. butyricum*, 2: *L. plantarum*, 3: *L. brevis*, 4: *L. casei*, 5: *B. pumilus*, 6: *B. cereus*.

Table 3은 RDP의 database 서열정보를 바탕으로 하여 PCR에서 사용한 두 primer에 해당하는 서열 사이의 정보를 GeneTool 2.0(23)에 입력하여 각각의 제한효소로 처리했을 때 생성될 수 있는 단편의 수와 길이를 보여주고 있다. 한편, Fig. 2-4는 PCR생성물을 *Hinf* I, *Sau3A* I, *Rsa* I로

처리하여 실제로 얻어진 결과를 보여주고 있다. 두 경우를 비교할 때, RDP의 Database에 입력된 정보를 바탕으로 한 가상의 결과는 실제 PCR생성물을 이용한 결과와 정확히 일치하고 있다. 다만 몇 가지 유의해야 할 점으로 *L. brevis*을 *Hinf* I로 절단한 결과(Fig. 2, lane 3)에서는 세 개의 예상된 밴드 이외에 200-300 bp사이에서 제한효소의 불완전한 작용으로 인한 결과로 생각되는 두 개의 연한 밴드가 더 보이고 있으며, 또 전체 길이에서 수 염기 정도의 차이만 있는 두 경우나 혹은 전체길이가 50 bp보다도 더 짧은 단편들끼리는 agarose gel 상에서는 잘 구별되지 않는다는 점이다. 이런 것으로 *B. pumilus*의 *Sau3A* I 처리 결과에서(Fig. 3, lane 5) 하나의 밴드로 보이는 187 bp와 175 bp 절편이 있으며 *C. beijerinckii*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei* 등의 *Rsa* I 처리의 가장 짧은 절편(Fig. 4)에서 148 bp와 145 bp, 149 bp와 146 bp, 148 bp와 146 bp, 146 bp와 132 bp 등이 모두 구별되지 않고 하나의 밴드로 나타난다는 점이다.

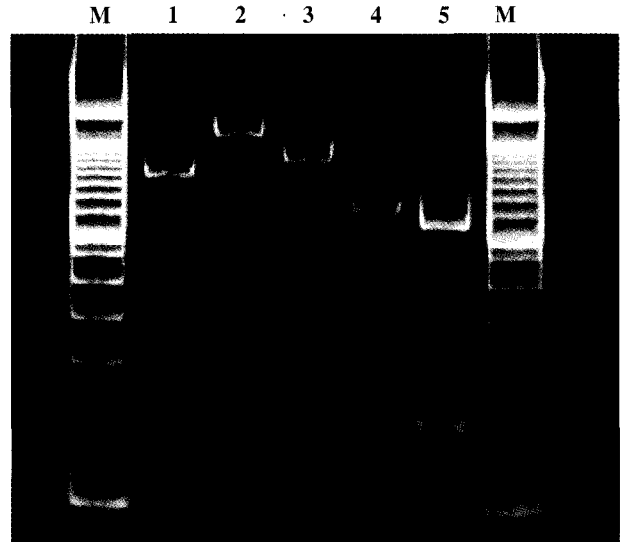


Figure 3. *Sau3A* I digestion, M: 100 bp ladder, 1: *C. butyricum*, 2: *L. plantarum*, 3: *L. brevis*, 4: *L. casei*, 5: *B. pumilus*.

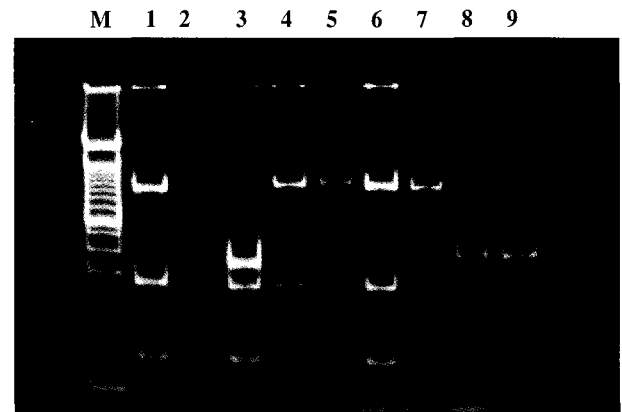


Figure 4. *Rsa* I digestion, M: 100 bp ladder, 1: *L. rhamnosus*, 2: *L. plantarum*, 3: *C. beijerinckii*, 4: *L. plantarum*, 5: *L. brevis*, 6: *L. plantarum*, 7: *L. plantarum*, 8: *B. pumilus*, 9: *B. pumilus*.

확인된 8종 간의 진화학적인 근연관계는 PCR 생성물에서 얻은 16s rRNA 유전자 서열들을 EBI (European Bioinformatics Institute(24))의 Clustal W(20)로서 유사성을 비교한 후 Phylogram으로 확인하였다(Fig. 5).

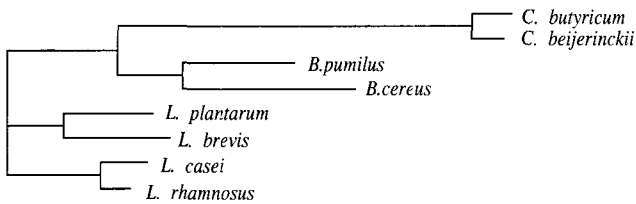


Figure 5. Phylogram tree graph of identified eight isolates.

요 약

건강에 대한 관심의 증대로 인한 저염식품의 개발 필요성에 맞추어 오이발효에 염의 농도를 낮추게 되면 정상적 일차발효 후에 이차발효가 진행됨으로써 결국 부패하게 된다. 장기간에 걸쳐 다양한 균의 복합적 작용으로 진행되는 저염 발효오이의 부패 과정을 이해하기 위하여 이에 관련된 균을 분리 동정하였다. 부패발효액을 무기배양하여 균을 분리하고 이들의 16s rRNA 유전자 부분을 universal primer를 이용한 PCR로서 증폭하여 서열분석 하였다. 분석된 800 염기 길이의 서열 전체를 그대로 이용하여 NCBI의 BLAST로서 유사종을 찾고 RDP의 Sequence Aligner와 Sequence Match에서 재확인하여 분리된 균을 3속 8종으로 동정하였다. Database 내의 표준균 서열을 기반으로 한 제한효소 지도와 동정된 균의 PCR 생성물의 제한효소 처리 결과(RFLP)를 비교하여 동정 결과를 실험으로 검증 하였다. 동정과정에서 sequencing 결과 전체를 이용하는 점과 RDP를 통한 확인과 RFLP를 이용한 검증은 동정 결과에 대한 신뢰도를 한층 증가시켰다. 또 분리된 8종은 개별적 특성의 조사나 적절한 조합을 이룰 때의 상호 의존도 등을 조사할 수 있게 함으로써 여러 균에 의한 복합적 과정인 부패를 순차적 혹은 요인별로 나누어 살펴보는 연구를 가능하게 한다.

감 사

본 연구는 경성대학교의 연구년제에 의하여 주 저자가 2001년 9월에서 2002년 8월 동안에 North Carolina State University (USA)에 Visiting Professor로 방문한 기간 동안에 주로 진행되었으며 두 기관에 감사드립니다.

REFERENCES

- Fleming, H. P., R. L. Thompson, and R. F. McFeeters (1996), Assuring microbial and textural stability of fermented cucumbers by pH adjustment and sodium benzoate addition, *J. Food sci.* **61**(4), 832-836.
- Fleming, H. P., K. H. Kyung, and F. Breidt (1995), Vegetable fermentations, In *Biotechnology*, H. -J. Rehm and G. Reed., Eds., pp629-661, VCH Publishers, Inc., New York.
- Fleming, H. P., L. C. McDonald, R. F. McFeeters, and E. G. Humphrie (1995), Fermentation of cucumbers without sodium chloride, *J. Food Sci.* **60**(2), 312-315, 319.
- Avaniss-Aghajani, E., K. Jones, D. Chapman, and C. Brunk (1994), A molecular technique for identification of bacteria using small subunit ribosomal RNA sequences, *Biotechniques* **17**(1), 144-149.
- Breidt, F. and H. P. Fleming (1996), Identification of lactic acid bacteria by ribotyping, *J. Rapid Methods Automation Microbiol.* **4**, 219-233.
- Jensen, M. A., J. A. Webster, and N. Straus (1993), Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphism, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 945-952.
- Hall, V., T. Lewis-Evans, and B. I. Duerden, (2001), Identification of actinomycetes, Propionibacteria, Lactobacilli and Bifidobacteria by amplified 16S rDNA restriction analysis, *Anaerobe* **7**, 55-57.
- McCabe, K. M., Y. H. Zhang, B. L. Huang, E. A. Wagar, and E. R. B. McCabe (1999), Bacterial species identification after DNA amplification with a universal primer pair, *Mol. Gen. Met.* **66**, 205-211.
- Kullen, M. J., R. B. Sanozky-Dawes, D. C. Crowell, and T. R. Klaenhammer (2000), Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex, *J. Appl. Micro.* **89**, 511-516.
- McDonald, L. C., D. H. Shieh, H. P. Fleming, R. F. McFeeters, and R. L. Thompson (1993), Evaluation of malolactic-deficient strains of *Lactobacillus plantarum* for use in cucumber fermentations, *Food Microbiol.* **10**(6), 489-499.
- Atlas, R. M (1993), Handbook of Microbiological Media. p.816 and p.482, CRC Press. Inc., Boca Raton, FL.
- Dasen, G., J. Smutny, M. Teuber, and L. Meile (1998), Classification and identification of propionibacteria based on ribosomal RNA genes and PCR System, *Appl. Microbiol.* **21**, 251-259.
- Goldenberger, D. (1997), Detection of bacterial pathogens in clinical specimens by broad-range PCR amplification and direct sequencing of part of the 16S rRNA gene, MS Thesis, Dept. of Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.
- Greisen, K., M. Loeffelholz, A. Purohit, and D. Leong (1994), PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid, *J. Clin. Microbiol.* **32**, 335-351.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Sinsky, and T. J. White (1990), PCR protocols. In *A guide to methods and applications*. pp3-12, Academic Press, San Diego, CA.
- <http://sunflower.bio.indiana.edu/bioweb>.
- Altschul, S. F., L. Thomas, A. A. Schiffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman (1997), Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman (1990), Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.
- <http://rdp.cme.msu.edu>
- Cole J. R., B. Chai, T. L. Marsh, R. J. Farris, Q. Wang, S. A. Kulam, S. Chandra, D. M. McGarrell, T. M. Schmidt, G. M. Garrity, and J. M. Tiedje (2003), The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy, *Nucleic Acids Res.* **31**(1), 442-443.
- Maidak, B. L., J. R. Cole, T. G. Lilburn, C. T. Parker Jr, P. R.

- Saxman, R. J. Farris, G. M. Garrity, G. J. Olsen, T. M. Schmidt, and J. M. Tiedje (2001), The RDP-II(Ribosomal Database Project), *Nucleic Acids Research* **29**, 173-174.
23. <http://www.biotoools.com>
24. <http://www.ebi.ac.uk>
25. Thompson J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson (1994), CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.