

## RecA 유전자 특이적 PCR을 이용한 전통 침채류 유래 유산균의 검출

심상민 · 이종훈\*

**PCR-Based Detection of Lactic Acid Bacteria in Korean Fermented Vegetables with *recA* Gene Targeted Species-Specific Primers.** Shim, Sangmin and Jong-Hoon Lee\*. Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Korea – Diversity of lactic acid bacteria involved in 5 Korean fermented vegetables (*Got kimchi*, *Dongchimi*, *Baechu kimchi*, *Oisobagi*, and *Chonggak kimchi*) was investigated using PCR-based method. PCR primer pairs targeted the *recA* gene were used for the detection of 7 species of lactic acid bacteria mainly found in *kimchi* and *Lactobacillus acidophilus* involved in dairy fermentation. *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus sakei* were detected in all samples tested but *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*, and *Lb. acidophilus* were not detected. *Lactobacillus brevis* and *Leuconostoc citreum* were detected only from *Baechu kimchi* and *Leuconostoc mesenteroides* was detected from *Got kimchi*, *Dongchimi*, *Baechu kimchi*, and *Oisobagi*. The difference of detected species from fermented vegetables may be originated from the difference of main materials. *Lb. plantarum* and *Lb. sakei* are supposed to be broadly involved in Korean fermented vegetables.

**Key words:** PCR, *recA*, lactic acid bacteria, fermented vegetable, *kimchi*

### 서 론

우리나라 고유의 대표적 발효 침채류인 김치는 재료에서 유래하는 미생물의 자연발효에 의해 고유한 풍미를 만들어 내며, 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 발효과정의 차이 때문이다[2, 8].

1939년 처음으로 김치발효에 관여하는 미생물에 대한 연구가 보고된 후, 현재까지 꾸준한 연구가 진행되어 *Leuconostoc* 속 및 *Lactobacillus* 속 등의 주발효 유산균뿐만 아니라 *Bacillus* 속 및 효모에 이르는 다양한 미생물에 대한 연구가 보고되었다[9, 12, 13, 15, 16].

2000년 이후에는 분자생물학적 방법에 의한 김치 유산균의 검출 및 동정에 대한 연구가 진행되어, 형태 및 생리학적 특성에 의한 고전적 동정법에 의해서 진행된 김치 유산균 연구와는 다른 결과들이 도출되면서 기존에 보고되었던 김치 발효의 주발효균과 산패균에 대한 인식이 달라지고 있다[3, 6, 14, 21]. 이러한 김치발효 관련 유산균 연구결과의 변화

는 (1) 근연 관계에 있는 유산균의 생리 및 영양 요구의 유사성에 의해 발생하는 고전적 동정법 적용 시의 오류뿐만 아니라, (2) 분자생물학적 방법론의 도입에 의한 유산균 분류 체계의 변화에 기인한다[4, 7, 18, 19, 22]. 따라서 김치산업의 발전 및 김치의 세계화에 필요한 과학적 기초지식의 확립을 위한 김치 유산균에 대한 연구는 분자생물학적 방법론에 의한 새로운 동정법을 기반으로 확대되어야 한다.

최근 들어 빠르고 정확한 미생물 검출을 위하여 지표유전자를 특이적으로 증폭하는 PCR이 많이 이용되고 있다. 16S ribosomal RNA 유전자(16S rDNA)가 지표유전자로 가장 많이 사용되고 있지만, 근연 관계에 있는 유산균의 16S rDNA 염기서열은 99% 이상의 높은 상동성을 가지고 있어 계통발생학적(phylogenetic) 동정 및 특이적 PCR 검출의 지표유전자로서 완벽하지 않은 것으로 보고되고 있다[1, 11, 17, 20]. 이러한 문제점의 보안을 위해, 16S rRNA 유전자와 23S rRNA 유전자의 사이에 존재하는 16S/23S rRNA intergenic spacer region (SR)이 동정에 이용되고 있으며[1, 17], *recA* 유전자 또는 ATPase 유전자 등의 단백질의 구조유전자를 지표유전자로 사용하는 예가 증가하고 있다[5, 20].

우리나라에서는 다양한 발효 침채류가 만들어지고 있지만 배추김치가 가장 많은 생산 및 유통의 비중을 차지하고 있어, 김치발효 미생물을 비롯한 김치 관련 연구는 대부분 배추김치에 편중되어 다른 침채류 발효 관련 미생물에 대한 연구는 부진한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 전통 침채류 5종(갓김치, 동치미, 배추김치, 오이소박이, 총각김치)의 발효에 관여하는 유산균의 다양성을 PCR을 이용한 *recA* 유전자의 특이적 검출에 의해 검토하였다.

\*Corresponding author

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

E-mail: jhl@kyonggi.ac.kr

## 재료 및 방법

### 균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 표준 유산균은 Korean Collections for Type Cultures (KCTC), Korean Culture Center for Microorganisms (KCCM), American Type Culture Collection (ATCC)으로부터 구입하였고(Table 1), Lactobacilli MRS 액체배지(Difco, USA) 또는 1.5% (w/v) 한천을 첨가한 고체 배지를 사용하여 37°C, 미호기성 조건에서 배양하였다.

### 특이적 검출을 위한 PCR primer

특이적 검출의 대상 유산균은 배추김치에서 주로 검출되는 것으로 보고된 유산균 7종과 대조구로 유제품 발효에 관여하는 *Lactobacillus acidophilus*를 선정하였다(Table 2). 특

이적 검출을 위한 PCR primer pair는 기준에 보고된 *recA* 유전자 특이적 primer pair를 검증한 후 사용하거나[20, 21], GenBank에 등록된 검출 대상 유산균 및 근연 관계에 있는 유산균들의 *recA* 유전자 염기서열을 ClustalX multi-alignment program (Higgins Laboratory, Ireland)을 이용하여 정렬한 후, 종(species) 수준에서 각 균주에 특이적인 부분을 선정하여 제작하였다(Table 2).

### Polymerase chain reaction (PCR)

PCR은 50 µl 반응계에서 DNA는 0.1 µg 이하로, 각 primer는 20 pmol의 농도로 하였으며, 0.25 mM dNTP와 0.5 U의 *Taq* polymerase (Roche, Germany)를 첨가한 후, UNO II thermal cycler (Biometra, Germany)를 사용하여 수행하였다. 각 유산균의 특이적 검출을 위한 PCR 온도조

Table 1. Reference strains used in this study.

No.	Reference strain	Strain designation
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	KCTC 3529 (ATCC 19254 <sup>T</sup> )
2	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>	KCTC 3530 (ATCC 19255 <sup>T</sup> )
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	KCTC 3505 (ATCC 8293 <sup>T</sup> )
4	<i>Leuconostoc citreum</i>	KCTC 3526 (ATCC 49370 <sup>T</sup> )
5	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCCM 40265 (ATCC 832)
6	<i>Lactobacillus brevis</i>	KCCM 40399 (ATCC 14869 <sup>T</sup> )
7	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	KCTC 3603 (ATCC 15521 <sup>T</sup> )
8	<i>Lactobacillus plantarum</i>	KCTC 3108 (ATCC 14917 <sup>T</sup> )
9	<i>Lactobacillus pentosus</i>	KCCM 40997 (ATCC 8041 <sup>T</sup> )
10	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	ATCC 700211 <sup>T</sup>

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

Table 2. Sequence of the oligonucleotide primers used for PCR amplification.

No.	Target species	Primer	Oligonucleotide sequence (5' → 3')	Product size (bp)	Accession No.	Reference
1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	LeuMF	AGACGAATTACTTTTGTCACAA	134	AJ621685	This study
		LeuMR	GATTTCCGGCACGAGGTAATAAT		AJ621686 AJ621687	
2	<i>Leuconostoc citreum</i>	LeuCF	GGCTGGTGGTACAGCAGCT	397	AJ621688	This study
		LeuCR	GAACCTTGAGCGCGCGTCCAC			
3	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LacAF	TGCCGAGGCACTTGGAGTA	329	NC_006814	This study
		LacAR	GACCACCCGGTGTGTTCCGGA			
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	LacBF	GTTGGATCCAGCCTATGCAACG	213	CP000416	This study
		LacBR	CGGGCTTGACAGCCACGTG			
5	<i>Lactobacillus sakei</i>	skF	CTAAGTATGCAACAGCACTTG	231	DQ307756	[21]
		skR3	CGTCCCTGATAATTTACGTAA			
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	planF	CCGTTTATGCGGAACACCTA	318	AJ286119	[20]
		pREV	TCGGGATTACCAAACATCAC			
7	<i>Lactobacillus pentosus</i>	penF	CAGTGGCGCGTGTGATATC	218	AJ286118	[20]
		pREV	TCGGGATTACCAAACATCAC			
8	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	paraF	GTCACAGGCATTACGAAAAC	107	AJ286120	[20]
		pREV	TCGGGATTACCAAACATCAC			

Table 3. PCR conditions.

Target species	Primer pair	Initial-denaturation	Denaturation	Annealing	Extension	Final-extension	Pause
<i>Leu. mesenteroides</i>	LeuMF/LeuMR			63.5°C 1min			
<i>Leu. citreum</i>	LeuCF/LeuCR			65°C 1min			
<i>Lb. acidophilus</i>	LacAF/LacAR			65°C 1min			
<i>Lb. brevis</i>	LacBF/LacBR	95°C	95°C	65°C 1min	72°C	72°C	4°C
<i>Lb. sakei</i>	skF/skR3	5 min	1 min	56°C 1min	1 min	5 min	
<i>Lb. plantarum</i>	planF/pREV			61°C 1min			
<i>Lb. pentosus</i>	penF/pREV			61°C 1min			
<i>Lb. paraplantarum</i>	paraF/pREV			61°C 1min			

건은 Table 3에 나타내었다. PCR 산물은 2% agarose gel을 사용하여 전기영동한 후, ethidium bromide 용액으로 염색하여 band를 확인하였다.

### 침채류 시료 및 DNA 추출

유산균 검출을 위한 갓김치, 동치미, 배추김치, 오이소박이, 총각김치 등의 침채류 시료는 서울, 수원, 안양 등의 대형마트와 재래시장에서 구입하였다. 멸균된 거즈를 이용하여 회수한 침채류 여과액 1 ml을 MRS 배지 4 ml에 접종하여 35°C에서 2시간 배양한 후, 원심분리하여 회수한 균체를 DNA 추출에 사용하였다. DNA 추출에는 Dneasy Tissue Kit (Qiagen, Germany)을 사용하였고, 추출한 DNA는 spectrophotometer를 이용하여 정량하였다.

### PCR 증폭 산물의 염기서열 결정

특이적 primer pair를 사용하여 증폭된 단편은 2% agarose gel로 전기영동한 다음, gel extraction kit (SolGent, Korea)를 사용하여 회수하였고, pGEM-T Easy vector (Promega, USA)를 사용하여 cloning하였다. 재조합 plasmid에 삽입된 단편의 염기서열은 수탁업체(SolGent)에 의뢰하여 결정하였다. 염기서열의 상동성 비교에는 nucleotide blast search(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)와 ClustalX multi-alignment program을 이용하였다.

### 결과 및 고찰

#### Primer pair의 유용성 확인

기존에 보고된 *recA* 유전자 특이적 primer pair skF/skR3, planF/pREV, penF/pREV, paraF/pREV를 이용하여 Table 1의 표준 균주들을 대상으로 PCR을 수행한 결과, 각각의 primer pair는 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paraplantarum*으로부터 특이적인 PCR 증폭 산물을 생성하였다. 그러나 그 외의 균주들로부터는 증폭 산물이 생성되지 않아, 이들 primer pair의 유용성이 재확인되었다(Fig. 1). 본 연구에서 설계한 LeuMF/LeuMR, LeuCF/LeuCR, LacAF/LacAR, LacBF/LacBR primer pair를 사용한 경우에도 검출 대상 균주 *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus brevis* 각각으로부터 특이적인 PCR 산물의 생성이 확인되었고, 증폭된 PCR 산물의 크기도 예상 크기와 일치하였다(Fig. 1). 이로써 기존에 보고된 4종의 primer pair와 새롭게 구축한 4종의 primer pair는 대상 유산균의 특이적 PCR 검출에 이용될 수 있음이 확인되었다.

#### 전통 침채류 유래 유산균의 특이적 검출

선정된 primer pair의 유용성이 확인됨에 따라, 갓김치, 동치미, 배추김치, 오이소박이, 총각김치로부터 직접 추출한 DNA를 template로 특이적 primer pair를 이용하여 PCR을

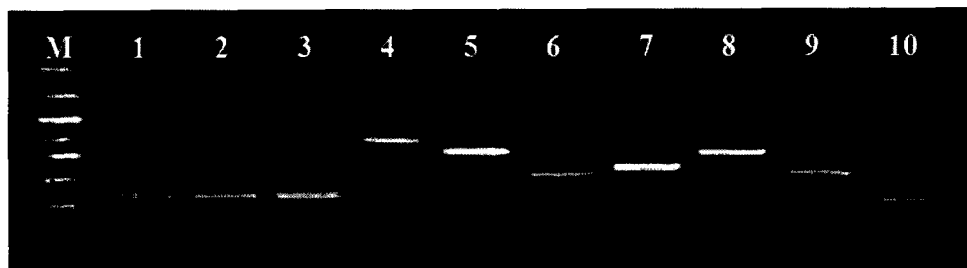


Fig. 1. PCR amplification of the *recA* gene from reference stains. Lanes: M; 50-1000 bp DNA size marker (Lonza, USA), 1; *Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* KCTC 3529, 2; *Leu. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530, 3; *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505, 4; *Leu. citreum* KCTC 3526, 5; *Lb. acidophilus* KCCM 40265, 6; *Lb. brevis* KCCM 40399, 7; *Lb. sakei* subsp. *sakei* KCTC 3603, 8; *Lb. plantarum* KCTC 3108, 9; *Lb. pentosus* KCCM 40997, 10; *Lb. paraplantarum* ATCC 700211.

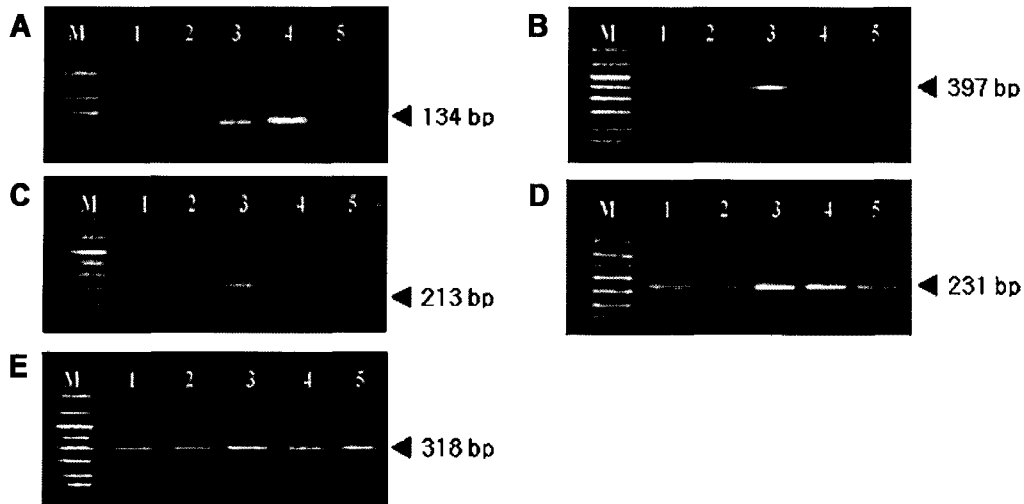


Fig. 2. PCR products obtained from the amplifications of the DNA extracted from kimchi samples. PCR primer pairs specific for A. *Leu. mesenteroides*, B. *Leu. citreum*, C. *Lb. brevis*, D. *Lb. sakei*, and E. *Lb. plantarum* were used for detection of each species. Lanes: M; 50-1000 bp DNA size marker (Lonza), 1; Got kimchi, 2; Dongchimi, 3; Baechu kimchi, 4; Oisobagi, 5; Chonggak kimchi.

Table 4. Kimchi samples and the detected species.

Kimchi sample	Detected species
Got kimchi (Mustard leaf kimchi)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Leu. mesenteroides</i>
Dongchimi (Watery radish kimchi)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Leu. mesenteroides</i>
Baechu kimchi (Cabbage kimchi)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leu. citreum</i>
Oisobagi (Cucumber kimchi)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Leu. mesenteroides</i>
Chonggak kimchi (Baby radish kimchi)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i>

수행하였다. 5종의 침채류 모두에서 *Lb. plantarum*과 *Lb. sakei*가 검출되었지만, *Lb. paraplantarum*, *Lb. pentosus*와 실험의 대조군인 *Lb. acidophilus*는 모든 시료로부터 검출되지 않았다. *Lb. brevis*와 *Leu. citreum*은 배추김치에서만 검출되었으며, *Leu. mesenteroides*의 경우 갓김치, 동치미, 배추김치, 오이소박이에서 검출되었다(Fig. 2, Table 4). *Lb. plantarum*과 *Lb. sakei*가 5종의 침채류 모두에서 검출된 점은 이들이 침채류 발효에 관여하는 주요 유산균이라는 최근의 결과와 일치한다[6, 21]. 그러나 *Lb. paraplantarum*과 *Lb. pentosus*는 배추김치에서 검출된 보고[10, 11, 21]가 있음에도 불구하고, 모든 시료에서 검출되지 않았다. 이러한 결과는 *Lb. plantarum*과 유전적으로 근연 관계에 있는 *Lb. paraplantarum*과 *Lb. pentosus*는 *Lb. plantarum*에 비해 상대적으로 매우 적은 수로 존재하는 것으로 추측된다.

본 실험에서 설계한 특이적 primer pair(Table 2)가 미생물 군집에 존재하는 표적 미생물을 정확히 검출하는 여부의 확인을 위해 증폭된 PCR 산물을 cloning하여 염기서열을 결정하였다. 각 primer pair에 의해 증폭된 PCR 산물의 염기서열은 Genbank에 등록된 표적 유산균의 *recA* 유전자 염기서열과 완전히 일치하였다(data not shown). 따라서 본 실험에서 구축한 primer pair는 미생물 군집에서의 대상 유산균의 특이적 PCR 검출에 문제가 없는 것으로 확인되었다.

GenBank에 등록된 16S rDNA 염기서열 정보에 비해

*recA* 유전자의 염기서열 정보가 현격히 적은 관계로, 많은 종류의 유산균을 검출의 대상으로 실험을 진행하지는 않았지만 침채류 발효에 관여하는 유산균은 침채류 종류에 따라 차이가 있는 것으로 추정된다. 이런 차이는 김치의 재료, 소금의 농도, 당의 양, 산소의 농도, 발효 온도와 시간 등 여러 요인에 의하여 발생하겠지만, 가장 큰 이유로는 주재료의 차이로 사료된다. 주재료가 김치의 풍미를 좌우하는 가장 큰 요인이지만, 발효에 관련한 유산균의 차이 또한 각기 다른 풍미의 원인이라는 점을 배제할 수 없는 것으로 확인되었다.

## 요 약

*recA* 유전자를 특이적으로 증폭하는 PCR을 이용하여 우리나라 전통 침채류 발효에 관여하는 유산균의 다양성을 검토해 보았다. 김치에서 많이 검출되는 유산균 7종 및 대조군으로 *Lactobacillus acidophilus*를 검출할 수 있는 특이적 PCR primer pair를 이용하여 전통 침채류 5종(갓김치, 동치미, 배추김치, 오이소박이, 총각김치)으로부터 추출한 DNA를 template로 PCR을 수행한 결과, 5종의 침채류 모두에서 *Lactobacillus plantarum*과 *Lactobacillus sakei*가 검출되었지만, *Lactobacillus paraplantarum*, *Lactobacillus pentosus*와 대조군인 *Lb. acidophilus*는 검출되지 않았다. *Lactobacillus brevis*와 *Leuconostoc citreum*은 배추김치에서만 검

출되었으며, *Leuconostoc mesenteroides*의 경우 갓김치, 동치미, 배추김치, 오이소박이에서 검출되었다. 주재료의 종류에 따라서 발효에 관여하는 유산균은 차이가 있는 것으로 추정되며, *Lb. plantarum*과 *Lb. sakei*가 우리나라 침채류 발효에 가장 널리 관여하는 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2007학년도 경기대학교 학술연구비(일반연구과제) 지원에 의하여 수행되었음.

### REFERENCES

- Berthier, F. and S. D. Ehrlich. 1998. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16/23 rRNA spacer region. *FEMS Microbiol. Lett.* **161**: 97-106.
- Cheigh, H. C. and K. Y. Pack. 1994. Biochemical, microbiological, and nutritional aspect of kimchi. *Crit. Rev. Food Sci. Nut.* **34**: 175-203.
- Choi, J.-Y., M.-K. Kim, and J.-H. Lee. 2002. Reevaluation of the change of *Leuconostoc* species and *Lactobacillus plantarum* during kimchi fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 166-171.
- Curk, M.-C., J.-C. Hubert, and F. Bringel. 1996. *Lactobacillus paraplantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **46**: 595-598.
- Giraffa, G. and E. Neviani. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* **67**: 19-34.
- 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.
- Klein, G., L. M. T. Dicks, A. Pack, B. Hack, K. Zimmermann, F. Dellaglio, and G. Reuter. 1996. Emended descriptions of *Lactobacillus sake* (Katagiri, Kitahara, and Fukami) and *Lactobacillus curvatus* (Abo-Elnaga and Kandler): numerical classification revealed by protein fingerprinting and identification based on biochemical patterns and DNA-DNA hybridization. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 367-376.
- 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 isolate. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 102-109.
- Lee, J.-H., M. Kim, D.-W. Jeong, M. Kim, J. H. Kim, H. C. Chang, D. K. Chung, H.-Y. Kim, K. H. Kim, and H. J. Lee. 2005. Identification of bacteriocin-producing *Lactobacillus paraplantarum* first isolated from kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**: 428-433.
- Lee, J.-H., M. Kim, and S. Um. 2004. PCR-based detection and identification of *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, and *Lactobacillus paraplantarum* in kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **13**: 754-757.
- 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.
- Shin, D.-H., M.-S. Kim, J.-S. Han, D.-K. Lim, and W.-S. Bak. 1996. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**: 137-145.
- 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.
- Song, Y.-L., N. Kato, C.-X. Liu, Y. Matsumiya, H. Kato, and K. Watanabe. 2000. Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus* species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **187**: 167-173.
- Stiles, M. E. and W. H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* **36**: 1-29.
- Torriani, S., C. A. Van Reenen, G. Klein, G. Reuter, F. Dellaglio, and L. M. T. Dicks. 1996. *Lactobacillus curvatus* subsp. *curvatus* subsp. nov. and *Lactobacillus curvatus* subsp. *melibiosus* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *sake* subsp. nov. and *Lactobacillus sake* subsp. *carneus* subsp. nov., new subspecies of *Lactobacillus curvatus* Abo-Elnaga and Kandler 1965 and *Lactobacillus sake* Katagiri, Kitahara, and Fukami 1934 (Klein et al. 1996, emended descriptions), respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**: 1158-1163.
- Torriani, S., G. E. Felis, and F. Dellaglio. 2001. Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus* and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primer. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3450-3454.
- 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.
- Zanoni, P., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, and M. D. Collins. 1987. *Lactobacillus pentosus* (Fred, Peterson, and Anderson) sp. nov., nom. rev. *Int. J. Sys. Bacteriol.* **37**: 339-341.

(Received Feb. 23, 2008/Accepted Apr. 12, 2008)