



비살균 숙성 치즈의 미생물군총 분석에 이용되는 새롭게 개발된 분자생물학적 방법: 총설

†김동현¹ · †천정환^{1,2} · †김현숙³ · †이수경¹ · 김홍석¹ · 이주연⁴ · 임진혁¹ · 송광영^{1*} · 김영지¹ ·
강일병¹ · 정다나¹ · 박진형¹ · 장호석¹ · †서건호¹

¹건국대학교 수의과대학 식품안전건강연구소, ²미국식품의약품안전청 국립독성연구센터
³한양대학교 생활과학대학 식품영양학과, ⁴축산물안전관리인증원

Novel Molecular-Based Approaches for Analyzing Microbial Diversity in Raw-Milk Long-Ripened Cheeses: A Review

†Dong-Hyeon Kim¹, †Jung-Whan Chon^{1,2}, †Hyunsook Kim³, †Soo-Kyung Lee¹, Hong-Seok Kim¹,
Joo-Yeon Lee⁴, Jin-Hyuk Yim¹, Kwang-Young Song^{1*}, Young-Ji Kim¹, Il-Byung Kang¹,
Dana Jeong¹, Jin-Hyeong Park¹, Ho-Seok Jang¹ and †Kun-Ho Seo¹

¹Center for One Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Korea

²National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR 72079, USA

³Dept. of Food & Nutrition, College of Human Ecology, Hanyang University, Seoul 04763, Korea

⁴Korea Livestock Products HACCP Accreditation Service, Daegu 41256, Korea

Abstract

Various microflora, including lactic acid bacteria, are important and necessary components of various cheeses and have significant roles in cheese manufacturing and ripening. In general, the starter culture and secondary microflora could affect the physicochemical properties of various cheeses and could contribute to modifications during manufacturing and ripening. Therefore, during cheese manufacturing and ripening, microbial diversity may depend on continuous interactions among microflora and various environmental conditions. The microbial diversity of cheese is very complex and difficult to control using the classical microbiological techniques. However, recent culture-independent methods have been rapidly developed for microflora in cheese, which could be directly detected using DNA (and/or RNA) in combination with culture-dependent methods. Therefore, this review summarizes state-of-the-art molecular methods to analyze microbial communities in order to understand the properties that affect quality and ripening as well as the complex microbial diversity of various raw-milk, long-ripened cheeses.

Keywords: cheese, raw milk, long-ripened, lactic acid bacteria, culture-dependent, culture-independent

서론

미생물은 치즈의 필요한 구성성분이며, 치즈의 제조와 숙성동안에 가장 중요한 역할을 한다(Bottari *et al.*, 2013). 스타터와 2차 미생물군총은 치즈의 물리화학적 성질을 변화시키고, 치즈의 제조와 숙성동안에 발생하는 변화에 기여하기도

† These authors contributed equally to this study.

* Corresponding author: Kwang-Young Song, Center for One Health, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 05029, Korea. Tel: +82-2-450-4121, Fax: +82-2-3436-4128, E-mail: drkysong@gmail.com

하고, 반응하기도 한다. 미생물 수는 제조와 숙성동안에 미생물의 상호작용과 환경조건에 있어서 연속적인 변화의 영향하에 변화하며, 주어진 치즈의 특성은 또한 미생물 dynamic에 의존한다(Coppola *et al.*, 2000). 치즈에 존재하는 미생물균총은 복잡하며, 이들의 성장과 활력은 매우 중요하지만, 적어도 제어 가능한 공정이다(Neviani *et al.*, 2013).

과거에는 이러한 연구는 전통적인 미생물학 기술을 의존하였다. 하지만 배양방법은 시간이 많이 소요되며, 숫자가 적거나 또는 배양할 수 없는 균들이 존재할 때에는 배양단계에서 부정확한 결과를 나타내기도 하였다(Cremonesi *et al.*, 2011). 따라서 미생물 dynamic을 모니터링할 수 있는 독특한 도구로 사용되지는 않았다. 이러한 이유 때문에 치즈 미생물의 접근이 극적으로 변화하였다(Neviani *et al.*, 2013).

이 문제를 해결하기 위해서, DNA(또는 RNA)의 직접적인 분석에 근거한 비배양방법의 사용에 초점이 맞추어져서 급격하게 증가하고 있다(Duthoit *et al.*, 2003). 치즈 미생물의 연구에 이용되는 기술은 신속하고, 확실하고, 신뢰를 주며, 효과적인 방법을 제시한다(El Baradei *et al.*, 2007). 또한 이 기술은 낙농제품에 있어서 존재하는 미생물의 검출과 동정이 가능하여 치즈의 숙성과 품질에 있어서 영향을 주거나, 복잡한 미생물 생태계를 이해하는데 많은 이점을 제공할 수 있다(Neviani *et al.*, 2013).

따라서 본 총설논문에서 치즈의 미생물 균집의 철저한 분석을 위해서 사용되는 분자방법의 최근의 발전상황에 대한 전반적인 개요를 설명하였다. 더 나아가서 이탈리아의 유명한 비살균 장기숙성 치즈(예를 들면, Grana Padano와 Parmigiano Reggiano)를 중심으로 미생물을 연구하는데 비배양방법으로 사용되는 다양한 기술 등이 정리되었다. 본 총설 논문의 내용은 이미 발행된 다양한 문헌 및 자료 등을 정리하여 서술하였다.

비살균 장기숙성치즈의 미생물 조성을 분석하기 위한 분자생물학적 기술방법

오늘날 미생물균총의 전체적인 다양성을 확보하기 위해서 다양한 기술들이 이용되고 있다(Neviani *et al.*, 2013). 일반적으로 2가지의 방법으로 접근이 되고 있는데, 이것은 배양법과 비배양법으로 나눌 수 있다. 배양법 접근은 성장하는 세균에 의존하게 되며, 다음과 같은 단계를 포함한다. (1) 세균수를 개수(enumeration)하기 위해서는 미생물 배지에서 증식, (2) 분리, (3) 속과 종 수준까지 동정, (4) 종내 수준에서 생물형(biotype) 특성을 파악한다(Gatti *et al.*, 2008).

낙농산업에 있어서 유산균의 분리에 가장 적합하고 많이 사용배지는 MRS이다(de Man *et al.*, 1960). 그러나 이탈리아

치즈로부터 다양한 미생물학적 그룹의 회수를 극대화하기 위해서 배양배지의 조성성분 변화에 관한 많은 고려가 진행되었다(Gatti *et al.*, 2003; Fornasari *et al.*, 2006; Neviani *et al.*, 2009). 전통배지법은 일반적으로 대부분의 미생물을 검출하는 방법이다. 그러나 종(species)을 충분히 분리할 수 없다. 영양학적으로 완전한 배지도 원유 및 장기숙성치즈에 소수로 존재하는 *Staphylococcus thermophilus*와 같은 유산균과 같은 모든 미생물들을 다 검출할 수는 없다(Neviani *et al.*, 2013). 이런 이유 때문에 Fornasari *et al.*(2006)은 멸균탈지유청 스타터의 짧은 사전발효를 한 후 멸균탈지유청이 풍부한 M17에 배양함으로써 *S. thermophilus*의 배양가능성을 회복할 수 있다고 제안하였다. 이 방법은 Grana Padano 자연유청배양액에서 *S. thermophilus*를 분리하는 매우 좋은 방법이다. 배양배지(유청한천배지, WAM)에서 산성화되지 않은 fresh 유청의 사용은 Gatti *et al.*(2003)에 의해서 보고되었고, Parmigiano Reggiano 치즈를 위한 자연유청스타터의 전형적인 thermophilic lactobacilli와 streptococci의 분리와 계수에 이용될 수 있다.

소수의 미생물균총을 얻기 위해서 Neviani *et al.*(2009)은 치즈생산의 초기단계에 있어서(10^2 cfu/mL 이하) 치즈배지(치즈한천배지, CAM)를 사용하였다고 보고하였다. 24개월된 grated Parmigiano Reggiano 치즈로 배합된 배지는 생산과 숙성과정 중에 발생하는 영양학적인 이용가능성과 기술적인 매개변수에 있어서 변화에 더 좋게 적용할 수 있도록 미생물균총을 활성화시킨다(Neviani *et al.*, 2013). 특히 CAM에 있어서 숙성 중에 Parmigiano Reggiano에 있어서 미생물학적인 연속성장에 최적을 배지가 되는 것과 별개로 이것은 *Lactobacillus rhamnosus* 균주의 검출도 가능하다. 2일부터 20개월까지의 치즈에 지배적인 균주들은 전통배지에 있어서 이것이 소수일 때는 초기 단계에 있어서 거의 측정되지 않는다. 사용된 배양배지의 관계없이 분리에 관련해서 세균을 계수한 후 다음 단계는 형태학과 색깔에 있어서 차이를 보이는 균주를 선택하여 수행하였다. 다음으로, 다른 기술에 의해서 미생물 분리균들은 균주 수준에서 분별할 수 있고, 종간 수준까지도 분류되어질 수 있다. 미생물다양성을 분석하는 접근은 phenotyping과 genotyping 방법이 모두 포함된다. 전통적인 유산균은 표현형의 성질의 근거에 있어서 분리되어지고, 이들 방법은 속 또는 종 수준에서 분리하는데 낮은 재현성과 낮은 정확성과 같이 악영향을 끼친다는 결점을 가지고 있다. 더구나 생리학 및 생화학적인 검사는 종종 균주 수준에서 차별화할 수 있는 효과를 보이지 않는다. 왜냐하면 세균수는 종종 비슷한 영양요구량을 가지고 비슷한 환경 조건하에서 증식하기 때문이다. 따라서 동정(identification)을 주요한 목적은 표현형에서 더 민감하고 정확한 결과를 나타내는 유전자형 방법으로 옮겨가고 있다.

유산균 종들은 종특이적인(species-specific) 중합효소연쇄 반응, amplified ribosomal DNA restriction analysis(16S-ARDRA), 16S ribosomal RNA(rRNA) gene의 염기서열결정법에 의해서 유전자적으로 분리될 수 있다(Chagnaud *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2001; Bouton *et al.*, 2002; Vasquez *et al.*, 2005). 특별한 ARDRA(tRNA^{Ala}-23S rDNA-restriction fragment length polymorphism)은 최근에 Mancini *et al.*(2012)에 의해서 응용되었고, Grana Padano 치즈의 생산과 숙성동안 수집된 균주들을 동정하였다. 16S~23S rDNA의 특별한 절편의 제한에 근거한 이 방법은 낙농 유산균의 확인과 분리에 유효한 선택으로 제시하고 있다.

더 나아가서 최근에는 16S rRNA 바 다른 목표 유전자는 산성화된 자연 유청으로서 특별한 낙농 생태계에 있어서 존재하는 매우 가까운 균주들을 신뢰할 수 있을 정도로 구분할 수 있도록 제공한다(Cremonesi *et al.*, 2011). Bottari *et al.*(2013)의 최근 연구에서 phenylalanyl-tRNA 합성을 할 수 있는 phenylalanine 합성효소(pheS) 유전자는 분자표적으로 사용할 수 있다. 다중 real-time PCR을 위한 종 특이적인 프라이머를 설계하여 Parmigiano Reggiano 치즈 생산을 위한 29개의 자연 유청스타터에 있어서 thermophilic 유산균을 선별하였다. 제안되어진 방법은 매우 신속하고 효과적으로 DNA 사본수가 600개 미만에서도 평균 민감도를 가지며, 샘플에 존재하는 균들을 분석하였다(Neviani *et al.*, 2013). 따라서 thermophilic 스타터 배양액에 심지어 소수의 유산균 균총도 충분히 검출할 수 있다.

치즈 생산동안에 우세한 미생물로서 유산균의 중요성이 부여되는 것은 지난 10년간 종 수준에서 유산균을 분리하는 것 뿐만 아니라, 아종(subspecies) 수준에서 특별한 생물형의 특성에 관한 연구의 수가 증가하고 있음을 부여주고 있다(Neviani *et al.*, 2013). 그래서, 다양한 분자 typing 기술들은 치즈의 생산과 숙성동안에 분리된 유산균의 유전자형을 알기 위해서 광범위하게 응용되어지고 있다. 이들 중에서 가장 강력한 방법은 DNA fingerprinting 기술, 주요 대사물질과 연관된 단백질 암호화 유전자의 RFLP 그리고 16S rRNA, restriction enzyme analysis pulsed-field gel electrophoresis(REA-PFGE), randomly amplified polymorphic DNA(RAPD), amplified fragment length polymorphism(AFLP), 그리고 repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) 등이 있다(Giraffa *et al.*, 2003; Gala *et al.*, 2008; Lazzi *et al.*, 2009; Bove *et al.*, 2011; Herrero-Fresno *et al.*, 2012; Solieri *et al.*, 2012). 이들 기술들 가운데서 발견된 다른 차별적인 능력이 발견되었다(Neviani *et al.*, 2013). 모든 것 중에서 RAPD는 세균의 특성분석에 널리 사용되는 신속한 방법이며, 특히 낙농유제품에 있어서 유산균의 특성분석에 이용된다(Randazzo *et al.*, 2009; Monfredini *et al.*, 2012).

그럼에도 불구하고, 이 기술은 2가지 심각한 결점은 (1) 낮은 차별능력이고, (2) 낮은 재현성인데, 많은 연구자들의 보고에 의하면 실험실 내와 실험실 간에서도 차이를 보였다(Tyler *et al.*, 1997). 비교하면 REP-PCR은 비교적 재현성 높는데, 이것은 특별한 프라이머로 증폭을 하기 때문이다. 그러나 REP-PCR 또한 잠재적인 오염, artifacts, 다중 제어의 요구 등을 포함한 결정을 가지고 있다(Li *et al.*, 2009). 유전자형 방법 비교 연구에서 AFLP는 RAPD보다 더 우수한 차별능력을 보인다고 강조하였다(Clerc *et al.*, 1998). 최근, DiCagno *et al.*(2010)은 RAPD-PCR과 AFLP의 D Index가 각각 0.92와 0.99라고 보고하였다. Lazzi *et al.* (2009)에 의해 수행된 결과를 보면 AFLP는 같은 종의 균주 사이에서 유전형의 이질성 더 잘 보여주는 주었다.

Parmigiano Reggiano와 Grana Padano의 경우에 있어서 다양한 조사는 자연유청스타터 미생물군총의 분류의 다양성과 이질성에 대한 지식을 이해하는데 도움이 되었다(Neviani *et al.*, 2013). 이들 생태계, 생리학적 역할과 다른 항생물질에 대한 저항성을 특징짓는 미생물학 균주를 결정하는 연구가 여러 연구자들에 의해서 진행되었다(Rossetti *et al.*, 2009; Bottari *et al.*, 2013). 특히, 자연유청배양액의 thermophilic 미생물군총의 우점종인 *Lb. helveticus*의 생물다양성에 초점이 맞추어졌다(Andrighetto *et al.*, 2004).

*Lb. helveticus*는 우유 단백질에 대한 활성 단백질분해효소와 펩타이드 활성이 특별히 인정되고, 향미성분의 방출과 연관되어 균특이적 특성 때문에, 여기에 관해서 많은 연구가 진행되었다(Gatti *et al.*, 2008; De Dea Lindner *et al.*, 2009). *Lb. helveticus*에 있어서 단백질분해 효소 시스템과 아미노산 이화작용의 깊은 연구는 Broadbent *et al.*(2011)에 의해서 최근에 진행되었다. 비교계놈교배분석은 Parmigiano Reggiano과 Grana Padano 치즈처럼 다양한 곳에서 분리한 *Lb. helveticus*의 그룹에서 단백질분해와 아미노산 이화작용이 포함된 유전자 분포를 탐구에 이용된다. Parmigiano Reggiano와 Grana Padano 미생물에 있어서 많은 연구들은 특정 숙성시간에서 샘플을 채취하여 진행되었다. Parmigiano Reggiano와 Grana Padano 치즈의 생산과 숙성동안 미생물의 변화에 관한 많은 연구들은 숙성치즈에 있어서 비스타터 유산균(non-starter LAB, NSLAB)의 중요성을 강조하고 있다(Zago *et al.*, 2007; Monfredini *et al.*, 2012; Solieri *et al.*, 2012).

치즈 생태계의 특성을 나타내는 미생물을 분리하고, 특정 균주의 표현형을 결정하는 꼭 필요한 방법이 표준평판배양법에도 불구하고, 이것의 심각한 점은 완전한 미생물 집단의 과소평가라는 것이다(Giraffa and Neviani, 2001; Santarelli *et al.*, 2008). 사실 이런 접근에 의해서 가장 흔하게 발생하는 미생물은 밝혀지고, 그들 가운데 특정 배양 조건에 적응되어

저서 집락을 형성하여 검출할 수 있는 수준까지 자랄 수 있다(Neviani *et al.*, 2013).

비록 배양할 수 있는 미생물균종의 더 많은 회수가 되도록 새로운 배양 배지의 개발에 집중되어 개발되고 있을지라도, 스트레스 또는 대사활력 때문에 배양할 수 없는 상태에 있는 미생물들을 회수하는데 목적을 두고 많은 연구가 진행되고 있다(Neviani *et al.*, 2013). Gatti *et al.*(2006)은 형광현미경방법(fluorescence *in situ* hybridization, FISH)을 처음으로 응용하여 Grana Padano 치즈에 사용되는 자연유청스타터에서 미생물활력을 평가하였다. 미생물 세균 생존능력은 세균 생리학 적 활성화와 연관되어진 이 방법에 의하면 어떤 사전 분리 단계 없이 자연유청스타터로부터 직접 평가할 수 있다.

최근에는 전통적인 배양의존(culture-dependent) 방법과 관련된 편견 등을 고려하여, 자연표본으로부터 선택배양과 분리의 사용이 필요 없는 비배양의존(culture-independent) 방법으로 연구의 방향이 옮겨가고 있다(Neviani *et al.*, 2013). 사실, 배양에 의존한 방법에 의해서 주어진 환경의 미생물 조성을 연구하는 전통적인 방법은 미생물 또는 특정 소수의 계수를 밝혀내지 못한다는 것은 잘 알려져 있다. 이것은 수적으로 충분하게 많은 미생물 균주에 의해서 *in vitro*에서 경쟁되어 지거나 *in vitro*에서 성장할 수 없기 때문이다(Head *et al.*, 1998; Hugenholtz *et al.*, 1998). 이런 이유들 때문에 비배양접근은 식품제품의 미생물균종의 검출을 위해서 빠르고, 합리적인, 효과적인 방법으로 많은 고려가 되어지고 있다.

집단수준 연구는 어떠한 배양 단계 없이 DNA(또는 RNA) 직접 분석에 근거한 비배양방법이 많이 의존하고 있다(Neviani *et al.*, 2013). 각 낙농제품의 미생물균종은 고유의 특성을 가지고 있는데, 치즈생산과 숙성동안에 발생하는 환경요인의 연속적인 변화의 영향으로 미생물수의 구조는 변화가 된다(Coppola *et al.*, 2008). 빠르고 정확한 비배양방법은 미생물집단을 분석하는 적합하며 치즈 미생물을 더 자세하게 연구할 수 있는 가능성을 제고하여 주는데, 이것은 배양할 수 있고, 또는 배양할 수 없는 미생물을 검출할 수 있는 큰 이점이 있기 때문이다.

비배양평가는 전체 미생물수로부터 분리한 핵산 분석에 많이 의존하고 원하는 부분의 PCR 증폭을 사용한다(Quigley *et al.*, 2011). DNA는 분자연구에서는 가장 많이 이용되고 있는데, 왜냐하면 변성이 적고 손쉽게 이용할 수 있기 때문이다. 그러나 DNA에 근거한 기술들은 살아있는 미생물과 죽은 미생물을 구분할 수는 없다(Rudi *et al.*, 2005). 생존할 수 없는 미생물 검출을 배제하기 위해서, DNA에 근거한 기술들은 증식단계 또는 DNA 염색을 함께 이용한다. DNA 염색은 살아있는 미생물과 죽은 미생물을 구분할 수 있도록 사용되고 있는 EMA(ethidium bromide monoazide)와 PMA(propidium mono-

azide) 등이 이용되고 있다(Schaad *et al.*, 1995; Josefsen *et al.*, 2010). 대안적으로 RNA는 살아있는 세포에 특이적으로 이용될 수 있는데, 미생물집단의 구조와 기능성을 더 많이 이해할 수 있도록 활성 미생물균종을 측정 가능하게 한다(Bodrossy *et al.*, 2006).

DNA와 RNA를 사용한 비배양접근의 모든 경우에 있어서 결과는 추출효율에 의존한다(Neviani *et al.*, 2013). 사실, DNA는 모든 유전자형으로부터 회수되지 않을 수도 있으며, PCR 증폭은 부정확할 수도 있다. 따라서 모든 미생물 집단의 특성을 알기 위해서 모든 다른 형태의 미생물로부터 DNA(또는 RNA)를 추출할 수 있도록 적합한 실험방법이 반드시 개발되어야 한다(Bonaiti *et al.*, 2006). 그러나 어떤 유전자형은 아마도 기질에 있어서 낮은 균주 다양성, Matrix의 불충분한 균질 때문에 낮은 균주 이용성, 핵산 추출을 방해하거나 PCR 증폭을 억제하는 적절하지 않은 세포용해 때문에 여전히 검출될 수 없는 상태로 존재할 수도 있다(Jany and Barbier, 2008). 따라서 총미생물의 수를 대변하고, 높은 농도와 정제를 가지도록 DNA(또는 RNA) 추출의 향상은 치즈 matrix의 완전한 균질, 세포의 기계적 또는 효소 용해, 단백질 분해, 그리고 DNA 침전에 의해서 이루어질 수 있다(Duthoit *et al.*, 2003; El Baradei *et al.*, 2007; Parayre *et al.*, 2007).

치즈 matrix로부터 핵산의 추출한 후 대부분의 비배양방법은 원하는 부분을 PCR 증폭에 의존하고 있다. 따라서 다양한 미생물을 구별하는데 사용되는 유전자 또는 유전자 marker의 선별은 미생물 집단을 분자적으로 평가하기 위한 중요한 단계이다(Juste *et al.*, 2008). 세균과 진핵세균을 확인하기 위해서 자주 사용되는 target은 각각 16S와 26S rRNA 암호화 유전자이다(Florez and Mayo, 2006). 이것은 보존적이면서 높은 변이 영역 모두를 가지고 있는 선호대상 부분이다. 또한 넓은 범위의 분류학 수준까지 구분할 수 있으며, 일반적인 PCR 프라이머를 annealing site(DNA 상에서 프라이머가 달라붙는 target)로서 역할을 한다. pheS와 같은 다른 유전자들 또는 RNA polymerase B subunit는 치즈에서 세균을 분리하기 위해서 사용되고 있다(Martin-Platero *et al.*, 2009; Zago *et al.*, 2009). 어떤 경우에 있어서 PCR 증폭 결과는 각 균주마다 다양하게 나타나는 균주염기서열에 의한 증폭산물을 만든다. 다른 균주로부터 PCR 증폭산물은 주어진 균종의 실제 다양성을 측정할 수 있게 복제되고 염기서열되어질 수 있지만, 이런 방법은 높은 비용 때문에 특정 탐침자(probe)에 교잡 또는 겹 또는 모세혈관 분리에 의해서 일반적으로 식별되어진다(Delbes *et al.*, 2007; Neviani *et al.*, 2013).

치즈에 있어서 미생물 집단을 설명하기 위해서 이용되는 일반적인 기술은 다음과 같다. PCR-DGGE와 PCR-TTGE는 같은 크기의 PCR 증폭산물 분리에 의존하지만, 다른 염기서

열을 가지고 있다(Myers *et al.*, 1987; Yoshino *et al.*, 1991). 변성 acrylamide 겔에 있어서 DNA는 생산물의 길이, GC 함량, 뉴클레오티드 염기서열에 따라 녹는점이 결정되며, 녹는 영역(melting domain)으로 알려진 이산지역(discrete region)에서 부분적으로 변성되어진다. 따라서 같은 크기이지만 다른 염기서열을 가진 증폭산물은 그들의 녹는 영역의 녹는 형태에서의 차이에 근거해서 분리할 수 있다(Neviani *et al.*, 2013). PCR-DGGE에서의 변성조건은 화학적인 변성제(formamide와 urea)의 사용에 의존한다. 반면에 PCR-TTGE에서는 변성구배(denaturing gradient)는 화학물질 없이 시간이 지남에 따라 온도를 변화에 의해서 얻어지게 되며, 더 많은 재생할 수 있는 자료를 생산하게 된다(Jany and Barbier, 2008; Juste *et al.*, 2008). 더 나아가서 PCR-DG/TTGE의 분리는 일반적으로 표준균주와 비교하여 이동형태를 포함한 자료들을 비교하여 얻어진다(Ogier *et al.*, 2004). 그러나 이런 database들은 조사된 미생물 집단을 전적으로 대표하지 않기에 끊임없이 계속하여 최신정보가 요구되어진다. 이런 이유때문에 증폭산물(amplicon)은 또한 DG/TTGE acrylamide 겔로부터 직접 추출되어지고 염기서열되어진다. 따라서 표준균주의 자료들과 비교하여 일치되지 않는 비확인 자료들은 염기서열되어지고, 기존의 염기서열 자료들과 비교되어진다(Jany and Barbier, 2008).

PCR 산물의 전기영동에 의존하는 다른 기술인 SSCP-PCR로 치즈에 있어서 미생물학 집단의 분석에 이용되어진다(Delbes *et al.*, 2007). DGGE와 TTGE와 같이 이 방법은 비슷한 길이의 다른 DNA 절편의 분리를 허용하지만, DGGE/TTGE와의 차이점은 접힌 단일가닥 산물의 구조적 차이에 근거하여 PCR 산물을 분리한다. 변성후 단일가닥 DNA 절편은 뉴클레오티드 염기서열에 의존하여 분자내 상호작용을 결정하는 안전한 이차구조가 형성되는 비변성 acrylamide 겔에 놓이게 된다. 겔에 있어서 이들 2차 구조의 움직임에 근거해서 비슷한 분자량을 가진 산물들은 분리되고 보여지게 된다(Neviani *et al.*, 2013). 절편의 분리는 다른 싱글 단편(SSCP) 형태 또는 화학물질(DGGE) 변성 또는 열(TTGE) 변성의 discrete 지역의 정보에 따라서 얻어지고, 분석의 마지막 결과는 지문법(fingerprint)이다. 지문법은 많은 미생물 균주와 연관되어서 많은 밴드(band)로 구성되어져 있고, 분석되는 우유, 유산균, 중간생산물, 치즈 등의 미생물 확인에 이용된다. 각 균들의 마지막 동정은 각 밴드의 순수정제와 염기서열 그리고 이용 가능한 data base와 비교함으로써 얻어질 수 있다(Coppola *et al.*, 2008).

위에 언급된 방법 외에도 형광물질이 붙어있는 DNA 절편의 레이저 검출을 위한 자동염기시스템과 연관되어 있는 새로운 방법들이 지속적으로 증가하고 있다. 치즈 미생물 집단에 가장 일반적으로 사용되는 것은 terminal-RFLP와 length heterogeneity-PCR이다(Rademaker *et al.*, 2006; Bottari *et al.*,

2010). LH-PCR 분석은 16S ribosomal DNA 염기서열의 길이에 있어서 자연적인 변이에 근거해서 다른 미생물들을 구분한다(Ritchie *et al.*, 2000). 형광물질이 말단에 붙어 있는 PCR 산물들은 모세혈관 전기영동으로 분리되고, 자동염기염기배열장치를 가진 레이저유도형광에 의해서 검출된다. 다음으로, 다른 미생물로부터 유래된 증폭 염기서열의 상대적인 양은 측정되어질 수 있다(Suzuki *et al.*, 1998). T-RFLP는 제한효소를 가진 형광물질이 말단에 붙어있는 PCR 산물의 분해에 근거한다(Liu *et al.*, 1997). 증폭산물은 PCR 프라이머 하나 또는 모두에 염색이 결합되어 5'과 3' 모두 또는 하나에 붙어지게 된다. 분해된 산물은 표지된 절편의 레이저 검출을 할 수 있는 acrylamide 겔 또는 모세혈관 자동염기염기배열장치를 이용하여 전기영동으로 분해된다. 그리고 나서 주어진 집단의 다른 균주들의 분별은 표준샘플로부터 얻어진 종말제한 절편(TRFs) 프로파일의 database를 사용하여 가능하다(Dickie *et al.*, 2002). 이 시스템은 분해된 PCR 산물의 말단에 붙어있는 TRF를 검출할 수 있고, 그들의 크기는 샘플분석시 동시에 분석되어진 DNA 크기 표준의 사용을 근거로 하여 계산되어진다. 제한부위의 존재와 위치의 변이는 결과적으로 다른 TRF 길이를 가지는 다른 유전자형이다(Jany and Barbier, 2008).

SSCP-PCR 또는 T-RFLP와 달리 다른 증폭산물과 연관되어서 용출분획의 수집을 허용하는 기술은 변성 HPLC이다(Xiao and Oefner, 2001). 이 높은 처리량 자동 검출 시스템은 PCR-DG/TTGE 방법보다 매우 손쉽게 분리된 증폭산물의 직접 염기서열을 할 수 있다(Jany and Barbier, 2008). DHPLC는 치즈 제조시에 사용되는 자연유청배양액에 있어서 발견되는 세균다양성을 연구하고, 붉은 얼룩 치즈 표면에 있어서 효모를 분별하는데 사용되어진다(Ercolini *et al.*, 2008; Mounier *et al.*, 2009).

미생물들은 또한 정량적인 방법으로 측정되는 것이 요구되어질 때, 정량적인 real-time PCR이 사용되어진다(Neviani *et al.*, 2013). 전통적인 PCR과 비교하여 이 방법은 PCR을 한 후에 어떠한 추가적인 과정도 필요없이 PCR 산물을 실시간으로 검출을 확인할 수 있다. 보통 DNA 증폭은 형광물질의 방출로 연속적으로 관찰이 가능하다. 목적 DNA의 초기 농도는 형광물질이 배경수준 이상 증가될 때 사이클 주기로 정의되는 특징임계값주기와 연관이 있다. 끝으로, 목적 DNA는 주형 DNA의 정확한 농도는 임계값주기와 연관되어진 보정 커브를 사용하여 정량되어진다. 축적된 증폭산물은 형광 DNA결합 염색 또는 염기서열 특정 형광 탐침자로 구성된 다양한 화학물질로 검출될 수 있다(Juste *et al.*, 2008). DNA 대신 RNA를 목표로 하면, 역전사-qPCR은 또한 어떤 치즈에 대하여 특별한 관심이 되는 미생물 균주의 성장동력 및 신진대사활동을 연구하는데 이용될 수 있다(Falentin *et al.*, 2012).

비배양 방법은 미생물들이 다양한 환경변화가 일어나는 치즈의 제조와 숙성과정 중에 미생물 집단의 신속한 동력(dynamics)을 모니터링할 수 있는 능력이 단지 증명되었다(Juste *et al.*, 2008; Neviani *et al.*, 2013). 그러나 배양방법과 비배양방법은 같은 미생물집단일지라도 다른 결과를 보인다. 따라서 많은 연구자들은 두 가지 방법을 함께 사용하는 다상(polyphasic)의 접근법을 이용하면 미생물 집단의 구조의 보다 정확한 관점을 얻을 수 있기에 더 가치가 있을 것이다(Delbes *et al.*, 2007; Neviani *et al.*, 2013).

사실 많은 연구들은 배양방법과 비배양방법을 동시에 결합하여 사용하고, Parmigiano Reggiano와 Grana Padano의 미생물균총의 완전한 상태를 얻기 위해서 시도하고 있다. 예를 들면, Rossetti *et al.*(2008)은 표준평판배양법과 RT-LH-PCR을 동시에 사용하여 Grana Padano 제조에 사용되는 자연유청스타터 배양액으로부터 분리된 우점 유산균의 유전자형 균주 다양성과 균주 조성을 평가하였다. RT-LH-PCR은 또한 Grana Padano를 위한 자연유청스타터에서 대사적으로 활성 유산균을 쉽고, 신속하고, 재현성을 평가하는데 이전에는 사용되었는데, 이것은 유청 스타터 미생물 수에 있어서 다양한 기술적인 매개변수를 확인하기 위해서 이다(Santarelli *et al.*, 2008). 또한 Gatti *et al.*(2008)은 배양과 비배양 기술을 모두 사용하여 Parmigiano Reggiano 치즈 제조동안에 미생물학의 연속성을 조사하였다. 특히, 치즈 생산과 숙성의 다른 단계에서 온전한 세포 또는 용해된 세포들은 LH-PCR에 의해서 연구되었다. 전통적인 배지법과 균주분리를 PCR-DGGE과 rRNA 증폭산물의 염기서열과 결합한 다상의 접근법으로 12개월 숙성된 Parmigiano Reggiano에 있어서 우점 유산균 수의 다양성을 조사하는데 잘 이용되고 있다(Gala *et al.*, 2008).

분자수준에서 진행된 많은 연구들은 다양한 치즈의 미생물 조성을 조사하고, 치즈의 생산과 숙성 중에 미생물의 동태, 다양성, 특성을 가능한 정확하게 설명할 수 있도록 기여를 하였다. 그러나 단지 몇 개의 연구만이 원유에서부터 숙성된 치즈인 Parmigiano Reggiano와 Grana Padano에서 미생물균총이 새로운 분자방법을 이용하여 진행되었다(Neviani *et al.*, 2013).

비살균 숙성치즈의 미생물균총 분석을 위한 배양방법과 비배양방법의 이용

이탈리아에서 가장 널리 이용되는 치즈는 Grana Padano와 Parmigiano Reggiano이다. 이 치즈들은 비살균 장기숙성 치즈이다(Neviani *et al.*, 2013). Grana Padano와 Parmigiano Reggiano는 중요한 기술적인 역할을 하는 특별한 미생물학적 설정이 있다(Bottari *et al.*, 2010). 이 전통치즈는 모든 이탈리아 낙농

생산에서 가장 우수하며, 식품산업 경제에 대하여 중요한 위치를 차지하고 있다(Neviani *et al.*, 2013). Grana Padano 생산에 있어서 Parmigiano Reggiano로 다른 점은 고품질의 사일리지와 발효 사료가 소들에게 공급된다. 사일리지의 사용은 원유에서 어떤 포자형성 박테리아의 존재를 포함한다. 이런 이유 때문에 butyric 발효에 의해서 발생하는 치즈의 late blowing이 억제되기 때문에, vat 우유에 lysozyme의 첨가가 허용된다(Coppola *et al.*, 2000). 원유 냉장보관이 허용되며, Grana Padano는 반드시 농장에서 8°C로 보관된 비살균 원유로 만들어져야 한다(Neviani *et al.*, 2013).

치즈 vat 우유에 첨가되는 Parmigiano Reggiano와 Grana Padano에 사용되는 자연유청스타터는 유산균 수의 증가가 되어서 우유가 산성화가 된다(Cremonesi *et al.*, 2011). 송아지레닛 분말(고순도 카이모신의 준비된)의 첨가에 의해서 우유 응고가 발생되며, 원유는 32~34°C로 가열된다. 커드가 적절한 굳기에 도달하면 약 2~4 mm의 작은 알갱이로 분해하고, 그리고 교반하면서 53~56°C까지 가열한다. 산성화(4.0~4.3 SH/50에 가까워지면)와 함께 가열은 커드 입자의 적절한 조직의 형성을 촉진하며, 유청 배출을 하게 된다(Neviani *et al.*, 2013). 가열 마지막 부분에서 교반은 멈추고, 커드 입자는 서로 뭉쳐서 vat의 밑으로 가라앉게 된다. 이탈리아 사람들에 의해서 이 두 치즈에 전통적으로 붙여진 이름은 “grana”인데, 이것은 치즈 paste의 특정 구조에 기인한 것이며 특히, 거칠 질감이 특징이다(Zago *et al.*, 2007). 이 기술적인 단계에서 유청하에 남아있는 치즈들은 가열처리공정의 마지막 단계로 도달하게 된다(Neviani *et al.*, 2013). Vat로부터 옮겨진 커드는 성형틀에서 두 부분으로 나누어진다. 원통형에서 2일 간 형태가 만들어진 후, 소금농도와 형태의 크기에 따라서 달라지지만, 3주 동안 포화된 소금물에 담그면서 염지된다. 그리고, 염지된 치즈는 숙성실에 보관하게 된다. Grana Padano는 최소 9개월 그리고 Parmigiano Reggiano는 최소 12개월 숙성되는 동안에 치즈는 연속적인 물리적, 화학적 그리고 미생물학적 변화가 일어나며, 이것은 결국 관능특성과 연관되어진다. 이와 같은 딱딱한 입자 치즈는 일반적으로 30%의 수분과 70%의 영양소로 구성되어 있다(Neviani *et al.*, 2013).

Grana Padano와 Parmigiano Reggiano 제조에는 유산균의 dynamic 미생물 군집을 포함한다(Neviani *et al.*, 2013). 원유와 자연유청스타터(유청에서 확인되지 않은 thermophilic 스타터 배양액)에서 유래한 유산균은 치즈 제조와 숙성기간동안 매우 중요한 역할을 한다. 주로 당분과 단백질 분해 활동을 기반으로 여러 가지 생화학적 반응이 일어난다. 숙성과정 중에 발생하는 가장 복잡하고 가장 중요한 생화학 반응은 대부분이 단백질 분해이다. 이것은 우유 단백질이 분해되어 치즈 조직 형성에 기여를 하며, 유리 카르복실과 아미노 그

롭의 증가에 의해서 결합된 물을 통해서 수분활성을 저하하며, 그리고 아미노산의 deamination과 decarboxylation와 같은 다른 생화학적 반응을 위한 물질의 생성에 의해서 간접적으로 그리고 대부분 고미 펩타이드와 아미노산의 방출을 통해서 직접적으로 주어서 향미 생성을 촉진한다(Gatti et al., 2008).

치즈에 있어서 미생물의 생존, 성장, 생화학적 활력은 커드-치즈 환경에 있어서 물리화학적 변화에 반응하여 세균의 stress와 연관이 되어 있다. 원유와 자연스타터로부터 유산균은 같은 치즈 환경으로부터 선별되었으며, 이들 스스로가 숙성동안에 변화에 기여하게 된다(Neviani et al., 2013).

원유에서부터 숙성치즈까지 미생물군총

일반적으로 말하면 치즈의 미생물군총은 원유, 스타터 그리고 숙성 중에 환경으로부터 유래하게 된다. 숙성 중에 딱딱한 껍질의 존재는 정기적으로 청소된다(Rossetti et al., 2009; Rasolofa et al., 2010). 따라서 커드에서부터 숙성된 Grana Padano와 Parmigiano Reggiano 치즈까지 전개되는 미생물군총은 원유와 자연유청스타터에서 기인한 것이다. 반면, 우유는 영양요소의 더 많은 이용가능성과 비선택적인 온도에 의해서 특정지어지며, 또한 자연적으로 산성화된 유청은 영양학적으로 풍부하지만 pH와 온도 조건에 더 선택적이게 된다(Neviani et al., 2013).

1. 원유의 미생물군총

우유는 영양학이 풍부한 배지이고, 모든 미생물 그룹(병원성, 부패, 이용 가능한 미생물)은 일반적으로 식품 matrix와 연관되어져 있다(Settanni and Moschetti, 2010). Rasolofa et al.(2010)은 두 가지 분자지문방법, T-RFLP와 DGGE를 이용하여 열처리되지 않은 우유에서 우점 세균들을 관찰하였다. 여기에는 *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridia*, *Aerococcus*, *Facklamia*, *Corynebacterium*, *Acetobacger* 그리고 *Trichococcus* 등이다.

배양방법을 이용하여, Coppola et al.(2000)은 Parmigiano Reggiano 원유에서 mesophilic 유산균이 10^4 cfu/mL가 관찰되었지만, 반면에 De Dea Lindner et al.(2008)과 Neviani et al.(2009)은 거의 1 log 낮은 수준이라고 보고하였다. 그러나 이 변화는 계절에 영향을 받는다. Coppola et al.(2010)에 의해서 분리된 균들은 통성이형발효 mesophilic lactobacilli이다. 여기에는 *Lb. paracasei* subsp. *paracasei*, 그리고 어떤 균주들은 *Lb. paracasei* subsp. *tolerans*로 나타났다. 몇몇의 thermophilic 균들인 *Streptococcus thermophilus*, *Lb. helveticus*, 그리고 *Lb. delvruceckii* subsp. *bulgaricus* 등이 검출되었다. 어떤 경우에는

우유에서 *Lb. rhamnosus*를 검출할 수가 없었다. Neviani et al.(2009)에 의해 사용된 CAM은 MRS와 같은 전통배지보다 *Lb. rhamnosus*를 포함한 소수로 존재하는 유산균 검출에 효과를 보였다.

16S rRNA 유전자 염기서열에 의하면 대부분의 균주들은 *St. uberis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*와 subsp. *cremoris* 등이다. 다음으로는 *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*이며, 세 번째는 *Leuconostoc(Ln.) mesenteroides* subsp. *mesenteroides*와 *Lc. lactis* subsp. *cremoris* 또한 *Enterococcus* genus(*faecalis* and *E. faecium*)도 포함된다(Neviani et al., 2013). 최근에는 우유의 미생물군총을 연구하기 위해서 비배양방법이 이용된다. Grana Padano 원유의 샘플에서 Santarelli et al.(2012)에 의해서 fluorescence microscopy 방법으로 살아있는 세균 수가 평가되었다. 배양방법보다 무려 100배 이상 높은 값을 보였다. 배양방법은 어떤 샘플은 우유 중에서 단지 1%의 세균만을 검출하는 한계를 밝혀주는 결과이다. 원유샘플의 세균 조성은 LH-PCR에 의해서 밝혀지기도 하였다(Neviani et al., 2013).

2. 자연유청스타터의 미생물군총

자연유청스타터의 유산균 증식은 다양한 배지를 이용하여 표준평판법으로 하고, Grana Padano와 Parmigiano Reggiano 샘플을 위해서는 epifluorescence microscopy를 간접적으로 이용하였다. 이들 환경에서 MRS에서 집락 생성능력 같은 세균의 생존성은 평가되지 않았다(Neviani et al., 2009). WAM은 MRS보다 더 효과적이었지만, WAM 또한 자연 시스템의 복잡성(진행 중에 항상 일어나는 스트레스요인과 수적 평형 등)을 대표하기에는 불충분하다(Neviani et al., 2013).

24가지의 Grana Padano의 natural whey starter에서 우점 유산균들은 Rossetti et al.(2008)에 의해서 보고되었는데, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *St. thermophilus*, 그리고 *Lb. fermentum* 등이다. 가장 빈도가 높은 것은 *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*와 *St. thermophilus*이며, 두 번째는 단지 두 개의 *Lactobacilli*이다. 이 결과는 Santarelli et al.(2012)와 일치하였다.

Parmigiano Reggiano의 자연유청스타터 연구는 LH-PCR와 FISH(Bottari et al., 2010) 방법으로 수행되었다. LH-PCR electropherograms와 FISH 결과, *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* (또는 subsp. *lactis*), *St. thermophilus*, *Lb. fermentum* 등이 모든 샘플에서 검출되었다. Parmigiano Reggiano의 자연유청스타터는 크게 3가지 주요 유형분류체개로 나눌 수 있다. 첫째로 가장 일반적인 분류는 *Lb. helveticus*와 *Lb. delbrueckii*의 상호 비교 비율이며, 두 번째로는 *Lb. helveticus*가 우점균일 때, 마지막으로 다른 균들의 비율과 비교하여 *Lb. helveticus*와 *Lb. delbrueckii* 비율 함량이다(Bottari et al., 2010).

3. 커드에서 숙성치즈까지의 미생물 성장

치즈의 생산과 숙성 등을 고려하면 Grana Padano과 Parmigiano Reggiano의 유산균은 또한 스타터유산균(SLAB)과 NSLAB로 정의할 수 있다. 첫 번째는 제조과정 동안 산 생성을 하고 숙성과정에 기여하는 것이고, 그 다음 단지 숙성 동안 중요한 역할을 하는 것이다(Beresford *et al.*, 2001). 이것은 가장 일반적으로 그들의 기원에 따라서 분류하는 것이며, SLAB는 주로 숙성유청스타터에서 기원하며, NSLAB는 주로 우유에서 기원한다(Neviani *et al.*, 2013).

Grana Padano과 Parmigiano Reggiano의 제조시 SLAB로 주로 구성된 자연유청스타터를 우유에 접종함으로써 발효공정이 시작된다. 이것들은 염치과정(대략 20일 정도)과 숙성과정(Grana Padano는 최소 9개월이며, Parmigiano Reggiano는 최소 12개월)동안 변화하는 다양한 환경(예를 들면 산성, 산화적, 삼투압 그리고 영양적인 스트레스 등)에서도 자라고 생존한다(Neviani *et al.*, 2013). 이때 온도, 염농도, 물의 함량, pH의 변이는 각 치즈 생산 공정에 의해서 변화되어진다. 여건이 점점 불리해지면 SLAB의 생존이 감소하는데, 스타터 세포의 상당한 부분까지 자기분해가 진행된다. 이러한 이유로 SLAB는 유당 감소와 커드 산성화뿐만 아니라, 상당한 양의 박테리아 용해의 결과로 분비되는 세포내 아미노 펩티다제의 생산이 일어나며, 숙성동안 활성화된다(De Dea Lindner *et al.*, 2008). 세포내 효소와 다른 세포성분이 치즈 maxtrix로 이동은 치즈 카제인의 최종 단백질 분해를 측정함으로써 결정된다. 치즈 카제인 NSLAB 미생물군총의 성장을 위한 기질로 이동될 수 있는 아미노산을 생산한다. 마지막으로, 배양방법과 비배양방법은 숙성상태에서 토착 유산균주의 미생물 생태와 dynamics을 더 깊이 조사하는데 이용되고 있다(Neviani *et al.*, 2013). LH-PCR은 비배양방법의 통합된 참조로 사용되어 비살균 장기 숙성 치즈의 미생물군총을 확인하는 방법으로 중요하게 인식되어지고 있다.

결 론

발효식품과 같은 자연적인 생태계는 가능한 많이 전체적으로 검토되어야 한다. Grana Padano와 Parmigiano Reggiano에 있어서, 이들 치즈의 독특한 맛과 향을 생산해내는 가장 가치 있는 미생물학적 생물다양성의 주요 재원은 원유, 우유 탈지의 전형적인 방법, 자연유청스타터의 사용 등이다. 치즈에 있어서 미생물의 성장, 생존 그리고 생화학적 활력의 dynamics는 치즈 미생물군총의 한 부분으로서 단일 세균 집락(colony) 간의 상호작용과 식품 matrix에 있어서 물리화학적인 변화에 대응하여 스트레스 반응의 결과이다. 이들 상호작용의 실제 역할 및 세포 존재와 활력의 효과를 이해하기 위해서는 다른

분석 전략이 요구되어진다. 비록 전체적인 접근법을 사용하기에는 힘들지라도, 이들 처리공정의 이해를 높이기 위해서는 식품발효를 연구하기 위해서는 최소한 다양한 접근법이 요구되어진다. 이러한 관점에서 이런 접근법은 치즈 제조와 숙성의 다양한 단계에 따라서 살아있는, 살아있지만 배양할 수 없는, 손상된, 그리고 용해된 스타터 유산균, 비스타터 유산균에 의해서 영향을 받는 원유, 장기숙성치즈 연구가 필요하다. 본 총설논문에서 언급된 방법들은 완벽한 것으로 간주될 수는 없지만, 이 방법들을 지속적으로 개발되고, 성능이 향상된 것으로 대체될 수 있을 것이다. 그러나 우유에서 숙성 치즈로 변환하는 동안에 Grana Padano와 Parmigiano Reggiano의 미생물 생태학을 연구하는 가장 중요한 도구를 나타내는 치즈제조 처리공정 연구를 가능하게 한다. 표준평판 분석법으로는 한계가 있을지라도 제외되어서는 안된다. 사실, 배양 방법(culture-dependent)과 비배양(culture-independent) 방법에 의해서 얻어진 결과의 결합은 미생물 dynamic의 상태를 이해하는데 도움을 준다. 또한 이러한 방법들은 특정 형질을 위해서 선택될 수 있거나, 다른 장기숙성치즈의 관능검사 프로필을 향상시키는 스타터 배양액으로 사용되어질 수 있는 특수한 미생물을 분별이 가능하게 한다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2015R1A2A2A05001288) 및 2015년도 축산물안전관리인증원의 지원을 받아 수행된 연구임.

Disclaimer: The views expressed herein do not necessarily reflect those of the US Food and Drug Administration or the US Department of Health and Human Services.

참고문헌

1. Andrighetto, C., Marazzan, G. and Lombardi, A. 2004. Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of bio-diversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 38:400-405.
2. Beresford, M. R., Andrew, P. W. and Shama, G. 2001. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. *J. Appl. Microbiol.* 90: 1000-1005.
3. Bodrossy, L., Stralis-Pavese, N., Konrad-Koszler, M., Weilharter, A., Reichenauer, T. G. and Shofer, D. 2006. mRNA-based parallel detection of active methanotroph populations by

- use of a diagnostic microarray. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1672-1676.
4. Bonaïti, C., Parayre, S. and Irlinger, F. 2006. Novel extraction strategy of ribosomal RNA and genomic DNA from cheese for PCR-based investigations. *Int. J. Food Microbiol.* 107:171-179.
 5. Bottari, B., Agrimonti, C., Gatti, M., Neviani, E. and Marmiroli, N. 2013. Development of a multiplex real time PCR to detect thermophilic lactic acid bacteria in natural whey starters. *Int. J. Food Microbiol.* 160:290-297.
 6. Bottari, B., Santarelli, M., Neviani, E. and Gatti, M. 2010. Natural whey starter for Parmigiano Reggiano: culture-independent approach. *J. Appl. Microbiol.* 108:1676-1684.
 7. Bouton, Y., Guyot, P., Beuvier, E., Tailliez, P. and Grappin, R. 2002. Use of PCR-based methods and PFGE for typing and monitoring homofermentative lactobacilli during Comté cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 76:27-38.
 8. Bove, C. G., De Dea Lindner, J., Lazzi, C., Gatti, M. and Neviani, E. 2011. Evaluation of genetic polymorphism among *Lactobacillus rhamnosus* nonstarter Parmigiano Reggiano cheeses rains. *Int. J. Food Microbiol.* 144:569-572.
 9. Broadbent, J. R., Cai, H., Larsen, R. L., Hughes, J. E., Welker, D. L. and DeCarvalho, V. G. 2011. Genetic diversity in proteolytic enzymes and amino acid metabolism among *Lactobacillus helveticus* strains. *J. Dairy Sci.* 94:4313-4328.
 10. Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L. A., Marecat, A. and Mercenier, A. 2001. Rapid PCR based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Methods* 44:139-148.
 11. Clerc, A., Manceau, C. and Nesme, X. 1998. Comparison of randomly amplified polymorphic DNA with amplified fragment length polymorphism to assess genetic diversity and genetic relatedness within genospecies III of *Pseudomonas syringae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1180-1187.
 12. Coppola, R., Nanni, M., Iorizzo, M., Sorrentino, A., Sorrentino, E. and Chiavari, C. 2000. Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheese making and the first months of the ripening. *Lait* 80:479-490.
 13. Coppola, S., Blaiotta, G. and Ercolini, D. 2008. "Dairy products," in *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*, eds L. Cocolin and D. Ercolini (New York: Springer), 31-90.
 14. Cremonesi, P., Vanoni, L., Morandi, S., Silveti, T., Castiglioni, B. and Brasca, M. 2011. Development of a pentaplex PCR assay for the simultaneous detection of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, *L. helveticus*, *L. fermentum* in whey starter for Grana Padano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 146: 207-211.
 15. De Dea Lindner, J., Bernini, V., DeLorentiis, A., Pecorari, A., Neviani, E. and Gatti, M. 2008. Parmigiano Reggiano cheese: evolution of cultivable and total lactic microflora and peptidase activities during manufacture and ripening. *Dairy Sci. Technol.* 88:511-523.
 16. de Man, J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *J. Appl. Bacteriol.* 23:130-135.
 17. Delbès, C., Ali-Mandjee, L. and Montel, M. C. 2007. Monitoring bacterial communities in raw milk and cheese by culture-dependent and -independent 16S rRNA gene-based analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1882-1891.
 18. Di Cagno, R., Minervini, G., Sgarbi, E., Lazzi, C., Bernini, V. and Neviani, E. 2010. Comparison of phenotypic (Biolog System) and genotypic (random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR, and amplified fragment length polymorphism, AFLP) methods for typing *Lactobacillus plantarum* isolates from raw vegetables and fruits. *Int. J. Food Microbiol.* 143:246-253.
 19. Dickie, L. A., Xu, B. and Koide, R. T. 2002. Vertical niche differentiation of ectomycorrhizal hyphae in soils shown by T-RFLP analysis. *New Phytol.* 156:527-535.
 20. Duthoit, F., Godon, J. and Montel, M. 2003. Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA single strand conformation polymorphism analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3840-3848.
 21. El Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Ogier, J. C. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian Domiati cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1248-1255.
 22. Ercolini, D., Frisso, G., Mauriello, G., Salvatore, F. and Coppola, S. 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 124:164-170.
 23. Florez, A. and Mayo, B. 2006. Fungal diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional, Spanish, blue-veined Cabrales cheese, as determined by PCR-DGGE. *Int. J. Food. Microbiol.* 10:165-171.
 24. Fornasari, M. E., Rossetti, L., Carminati, D. and Giraffa, G.

2006. Cultivability of *Streptococcus thermophilus* in Grana Padano cheese whey starters. *FEMS Microbiol. Lett.* 257: 139-144.
25. Gala, E., Landi, S., Solieri, L., Nocetti, M., Pulvirenti, A. and Giudici, P. 2008. Diversity of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 125:347-351.
26. Gatti, M., Bernini, V., Lazzi, C. and Neviani, E. 2006. Fluorescence microscopy for studying the viability of microorganisms in natural whey starters. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:338-343.
27. Gatti, M., De Dea Lindner, J., De Lorentiis, A., Bottari, B., Santarelli, M. and Bernini, V. 2008. Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:6161-6167.
28. Gatti, M., Lazzi, C., Rossetti, L., Mucchetti, G. and Neviani, E. 2003. Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano cheese. *J. Appl. Microbiol.* 95:463-470.
29. Giraffa, G. and Neviani, E. 2001. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 19-34.
30. Giraffa, G., Lazzi, C., Gatti, M., Rossetti, L., Mora, D. and Neviani, E. 2003. Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR-RFLP of protein-coding genes. *Int. J. Food Microbiol.* 82:163-172.
31. Head, I. M., Saunders, J. R. and Pickup, R. W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35:1-21.
32. Herrero-Fresno, A., Martínez, N., Sánchez-Llana, E., Díaz, M., Fernández, M. and Martín, M. C. 2012. *Lactobacillus casei* strains isolated from cheese reduce biogenic amine accumulation in an experimental model. *Int. J. Food Microbiol.* 157:297-304.
33. Hugenholtz, P., Goebel, B. M. and Pace, N. R. 1998. Impact of culture independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180:4765-4774.
34. Jany, J. L. and Barbier, G. 2008. Culture independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiol.* 25:839-848.
35. Josefsen, M. H., Lofstrom, C., Hansen, T. B., Christensen, L. S., Olsen, J. E. and Hoorfar, J. 2010. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidiummonoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5097-5104.
36. Justé, A., Thomma, B. P. and Lievens, B. 2008. Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes. *Food Microbiol.* 25:745-761.
37. Lazzi, C., Bove, C. G., Sgarbi, E., Gatti, M., La Gioia, F. and Torriani, S. 2009. Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of *Streptococcus thermophilus*. *J. Microbiol. Methods* 79:48-54.
38. Li, W., Raoult, D. and Fournier, P. E. 2009. Bacterial strain typing in the genomic era. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:892-916.
39. Liu, W. T., Marsh, T. L., Cheng, H. and Forney, L. J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:4516-4522.
40. Mancini, A., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E. and Gatti, M. 2012. Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA Ala-23S rDNA-RFLP. *J. Microbiol. Methods* 91:380-390.
41. Martin-Platero, A. M., Maqueda, M., Valdivia, E., Purswani, J. and Martinez-Bueno, M. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats' milk cheese from Sierra Aracena. *Food Microbiol.* 26:294-304.
42. Monfredini, L., Settanni, L., Poznanski, E., Cavazza, A. and Franciosi, E. 2012. The spatial distribution of bacteria in Grana-cheese during ripening. *Syst. Appl. Microbiol.* 35: 54-63.
43. Mounier, J., Monnet, C., Jacques, N., Antoinette, A. and Irlinger, F. 2009. Assessment of the microbial diversity at the surface of Livarot cheese using culture-dependent and independent approaches. *Int. J. Food Microbiol.* 133:31-37.
44. Mucchetti, G. and Neviani, E. 2006. *Microbiologia e Tecnologia Lattiero Casearia, Qualità e Sicurezza*. Milano: Tecniche Nuove.
45. Myers, R. M., Maniatis, T. and Lerman, L. S. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155:501-527.
46. Neviani, E., Bottari, B., Lazzi, C. and Gatti, M. 2013. New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: the case of Grana

- Padano and Parmigiano Reggiano." *Frontiers in microbiology* 4:36.
47. Neviani, E., De Dea Lindner, J., Bernini, V. and Gatti, M. 2009. Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. *Food Microbiol.* 26:240-245.
 48. Ogier, J. C., Lafarge, V., Girard, V., Rault, A., Maladen, V. and Gruss, A. 2004. Molecular fingerprinting of dairy microbial ecosystems by use of temporal temperature and denaturing gradient electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5628-5643.
 49. Parayre, S., Falentin, H., Madec, M., Sivieri, K., Le Dizes, A. and Sohier, D. 2007. Easy DNA extraction and optimization of PCR-temporal temperature gel electrophoresis to identify the predominant high and low GC-content bacteria from dairy products. *J. Microbiol. Methods* 69:431-441.
 50. Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, F. G. and Cotter, P. D. 2011. Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 150:81-94.
 51. Rademaker, J. L. W., Hoolwerf, J. D., Wagendorp, A. A. and te Giffel, M. C. 2006. Assessment of microbial population dynamics during yoghurt and hard cheese fermentation and ripening by DNA population fingerprinting. *Int. Dairy J.* 16:457-466.
 52. Randazzo, C. L., Caggia, C. and Neviani, E. 2009. Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Methods* 78:1-9.
 53. Rasolofo, E. A., St-Gelais, D., La Pointe, G. and Roy, D. 2010. Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. *Int. J. Food Microbiol.* 138:108-118.
 54. Ritchie, N. J., Schutter, M. E., Dick, R. P. and Myrold, D. D. 2000. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1668-1675.
 55. Rossetti, L., Carminati, D., Zago, M. and Giraffa, G. 2009. A qualified presumption of safety approach for the safety assessment of Grana Padano whey starters. *Int. J. Food Microbiol.* 130:70-73.
 56. Rossetti, L., Fornasari, M. E., Gatti, M., Lazzi, C., Neviani, E. and Giraffa, G. 2008. Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. *Int. J. Food Microbiol.* 127:168-171.
 57. Roy, D., Sirois, S. and Vincent, D. 2001. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Curr. Microbiol.* 42:282-289.
 58. Rudi, K., Naterstad, K., Dromtorp, S. M. and Holo, H. 2005. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheese by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 40:301-306.
 59. Santarelli, M., Gatti, M., Lazzi, C., Bernini, V., Zapparoli, G. A. and Neviani, E. 2008. Whey starter for Grana Padano cheese: effect of technological parameters on viability and composition of the microbial community. *J. Dairy Sci.* 91:883-891.
 60. Schaad, N. W., Cheong, S. S., Tamaki, S., Hatziloukas, E. and Panapoulos, N. J. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology* 85:243-248.
 61. Settanni, L. and Moschetti, G. 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. *Food Microbiol.* 27:691-697.
 62. Solieri, L., Bianchi, A. and Giudici, P. 2012. Inventory of non starter lactic acid bacteria from ripened Parmigiano Reggiano cheese as assessed by a culture dependent multiphasic approach. *Syst. Appl. Microbiol.* 35:270-277.
 63. Suzuki, M., Rappe, M. S. and Giovannoni, S. J. 1998. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4522-4529.
 64. Tyler, K. D., Wang, G., Tyler, S. D. and Johnson, W. M. 1997. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 35:339-346.
 65. Vásquez, A., Molin, G., Pettersson, B., Antonsson, M. and Ahné, S. 2005. DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of *Lactobacillus casei/paracasei* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:430-441.
 66. Xiao, W. and Oefner, P. J. 2001. Denaturing high-performance liquid chromatography: a review. *Hum. Mutat.* 17: 439-474.
 67. Yoshino, K., Nishigaki, K. and Husimi, Y. 1991. Temperature sweep gel electrophoresis: a simple method to detect

- point mutations. *Nucleic Acids Res.* 19:3153.
68. Zago, M., Bonvini, B., Carminati, D. and Giraffa, G. 2009. Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR. *Syst. Appl. Microbiol.* 32:514-521.
69. Zago, M., Fornasari, M. E., Rossetti, L., Scano, L., Carminati, D. and Giraffa, G. 2007. Population dynamics of lactobacilli in Grana cheese. *Ann. Microbiol.* 57:349-353.
-

Received 3 January, 2016

Revised 1 February, 2016

Accepted 3 February, 2016