creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

碩士學位論文

브로콜리 표면 미생물 군집과 환경인자의 상관관계

濟州大學校 大學院

食品工學科

金 昭 延

2016年 8月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

브로콜리 표면 미생물 군집과 환경인자의 상관관계

指導敎授 朴 恩 珍

金 昭 延

이 論文을 工學 碩士學位 論文으로 提出함

2016年 8月

金昭延의 工學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 高 榮 煥 印

委 員 朱 洪 球 印

委 員 朴 恩 珍 印

濟州大學校 大學院

2016年 8月

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Relationship of bacterial communities associated with surfaces of broccoli with environmental factors

Soyeon Kim
(Supervised by professor Eun-Jin Park)

A thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for the degree of Master of Engineering

2016. 08.

This thesis has been examined and approved.

Young-Hwan Ko, Thesis director, Prof of Food Science and Engineering
Hong-Gu Joo, Prof of Veterinary Medicine
Eun-Jin Park, Prof of Food Science and Engineering

Aug. 2016

Department of Food Science and Engineering
GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

목 차

LIST OF FIGURES ····· Ⅰ
LIST OF TABLES ····· Ⅱ

Abstract ····· 1

1. 서 론 ····· 2

2. 재료 및 방법

2.1 브로콜리 시료 구매 및 채취····· 5
2.2 브로콜리 채취기간의 기후변화····· 10
2.3 브로콜리 시료 처리····· 10
2.4 생균수 측정····· 10
2.5 브로콜리 표면 미생물 군집 분석····· 11
2.5.1 DNA 추출····· 12
2.5.2 16S rRNA 유전자 증폭····· 13
2.5.3 454 pyrosequencing을 통한 염기서열····· 14
2.6 통계처리····· 14

3. 결과 및 고찰

3.1. 밭에서 채취한 브로콜리의 표면의 생균수와 채취기간 중 기후변화·· 15
3.2. 시판 브로콜리의 표면 미생물 생균수····· 27
3.3. 밭에서 채취한 브로콜리 표면의 미생물 군집 분석····· 33
3.3.1. 브로콜리 표면 미생물의 종 다양성 지수····· 33
3.3.2. 브로콜리 표면 미생물의 문 수준의 분포도····· 35
3.3.3. 채취 지역 간의 전체 군집 구조 비교····· 37

4. 결 론····· 40

5. 국문요약····· 42

참고문헌 ····· 43

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF FIGURES

Figure 1.	Photograph of broccoli sampling points·····	7
Figure 2.	Levels of Fumgi(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region····· ·····	21
Figure 3.	Levels of Aerobic bacteria(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region·····	21
Figure 4.	Levels of *Enterobacteriaceae*(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region·····	22
Figure 5.	Levels of *Escherichia*(log CFU/ mL) *coli* of broccoli cultivated in each region·····	22
Figure 6.	Levels of *Coliform*(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region·····	23
Figure 7.	Levels of *Listeria*(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region·····	23
Figure 8.	Levels of mean temperature(℃) of broccoli cultivated in each region·····	25
Figure 9.	Levels of precipitation(mm) of broccoli cultivated in each region·····	25
Figure 10.	Levels of sunshin(hr) of broccoli cultivated in each region·····	26
Figure 11.	Levels of relative humidity of broccoli cultivated in each region·····	26
Figure 12.	Levels of Aerobic bacteria(a) and Fungi(b)(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region·····	32
Figure 13.	Mean numbers of OTUs obtained from farm broccoli in each region·····	34
Figure 14.	Bacterial distribution at the phylum and Class level·····	36

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

LIST OF TABLES

Table 1. Address of broccoli cultivated in each region····· 6

Table 2. Cultivation type and sampled dates of broccoli in markets···· 8

Table 3. Microbiological analysis of brocoli cultivated in *Daejeong*···· 17

Table 4. Microbiological analysis of broccoli cultivated in *Hallim*····· 18

Table 5. Microbiological analysis of broccoli cultivated in *Jocheon*····· 19

Table 6. Microbiological analysis of broccoli cultivated in *Seongsan*···· 20

Table 7. Weather of broccoli cultivated in each region····· 24

Table 8. Microbiological analysis of conventional broccoli····· 28

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Abstract

This study investigated the possible correlation between the bacterial communities of broccoli surface and environmental factors by classifying broccoli from Jeju and from market based on its type of cultivation. Total viable cell count of broccoli from *Daejeong*, *Hallim*, *Jocheon, Seongsan* in *Jeju* has a significant difference. And the total numbers of bacteria and fungi, *E. coli* and *Enterobacteriaceae, Coliform* is proportional. The number of *Listeria* is the highest in *Seongsan* where has the highest the amount of rainfall among 4 areas. Study did an species diversity index analysis on the bacterial communities of broccoli surface by cultivation area. The result is that *Daejeong* is highest and *Jocheon*, *Seongsan*, *Hallim* followed. Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons from Jeju broccoli samples revealed that *Gammaproteobacteria* and followed by *Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria* and *Deltaproteobacteria* were the most abundantly represented phyla and class. Compared with all community structure between broccoli taken from the area, and the PC1(57.24%) results similar community structure of bacteria on *Seongsan* and *Hallim*, *Jocheon* and *Daejeong*. PC2(12.28%) results similar community of broccoli surface from *Seongsan*, *Jocheon* and *Hallim* , but different with that from *Daejeong*. They result that has a similarity about viable cell count and species diversity index between the two groups *Daejeong* and *Jocheon*, *Hallim* and *Seongsan*. Also, *Seongsan* that has the highest viable cell count is the highest amount of rainfall among 4 areas, while *Jocheon* that has the lowest viable cell count is the lowest amount of sunshine. These results show that bacterial core community in broccoli surface was mainly associated with relative humidity and soil environment. The relationship between cultivation farming and various environmental factors is considered in addition.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

1. 서론

최근 소비자들이 건강에 대해 관심을 가지게 되면서 식문화는 첨가물을 함유한 가공식품보다 자연식품, 특히 과채류에 대한 선호도가 증가하고 있다[Ahn YS and Shin DH, 1999]. 이에 따라 국내에서 농산물로 인해 발생한 식중독 사건은 2002년 78건(환자 수 2,980명)에서 2015년 330건(환자 수 5947)건으로 해마다 증가하고 있다[KFDA, 2016]. 식중독 사고의 원인으로는 생산, 유통, 보관, 가공 시 취급자 등 복합적인 요인이 있으며, 농산물 자체 내의 독성물질 또는 외부에 존재하는 병원성 미생물의 감염과 독성물질 생성으로 발생한다[Forsythe S J, 2010]. 특히 과채류는 주로 세척, 절단 등 최소한의 가공처리 후 섭취하고[Kroupitski Y et al., 2009], 재배 시 지면과 접촉해 있어 토양에서 유래한 미생물이 표면에 잔류할 가능성이 높다[Padagaa M et al,. 2000]. 이 외에 미생물은 가축의 분뇨, 먼지, 미숙퇴비, 관개 수 등 다양한 경로를 통해 유래된다[Burnett S L and Beuchat L R, 2001].

과채류는 수확과정 등에서 유입된 흙, 먼지와 품질저하 유발 미생물을 제거하는 세척과정을 거친다[Jeong SW, 1999]. 하지만 섬유질결에 따라 굴곡이 있거나 틈이 많은 복잡한 외부구조를 가지고 있어 세척 후에도 표면에 오염물이 잔존할 가능성이 높다[Padagaa M et al,. 2000]. 국립농산물품질관리원(NAQS)에 따르면 2015년도 시중에 유통중인 농산물 및 세척용수의 식중독균(*Escherichia coli, E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus, Salmonella, Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Listeria monocytogenes*) 7종 검출 결과 총 1101건 중 95건(8.6%)이 검출되었다. 95건 중 13건(1.2%)은 식중독을 일으키는 수준이였으며[NAQS, 2015], 품목별로 나누었을 때 생식채소류가 601건 중 1.5%(9건)로 가장 높았고, 가축 매몰 지역 농산물은 100건 중 1%(1건), 단순처리농산물은 350건 중 0.9%(3건)로 나타났다[NAQS, 2015].

국내에서는 유통 중인 신선편이 채소류[Bae YM et al., 2011], 신선편의 샐러드

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

와 유기농 채소류[Jo MJ et al., 2011], 양배추[Cho JI et al., 2004], 도시텃밭 옥상정원 재배 농산물[Kim JW et al., 2014], 재배 유형 및 유통경로별 과채류[Yu YM et al., 2007]의 식중독 미생물 오염도에 대한 연구가 진행되었고, 국내 유통중인 유기농 채소류[Jung KS et al., 2012]의 표면 미생물 동정 연구가 수행되었다. 선행 연구에서는 미생물 동정에 시료 전체를 분쇄 또는 균질 후 배양하는 배양의존적인 방법을 사용하였다.

표면 미생물 동정(同定, identification)은 배양 의존적인 방법과 배양 비의존적인 방법으로 나누어진다. 배양 의존적인 방법으로는 영양분조정배지를 이용하여 배양 하는 선택배지법과 배양 후 그 형태를 포자염색, 현미경 관찰 등을 통해 동정하는 염색법이 있다[Belkum AV, 1994]. 이 방법은 시료에 존재하는 미생물 중 배양이 불가능하거나 육안으로 관찰이 어려운 경우 부적합하며, 생육 미생물 집락 관찰, 균수 계수, 분리균의 생화학적 검증에 많은 인력이 필요하다는 단점이 있다[Cho KM. 2013]. 그 중 선택배지법은 변별력이 높다는 장점이 있으나 제조가 번거롭고, 배양하는데 보통 세균은 24-48시간, 효모 및 곰팡이는 72-120시간이 소요되는 단점이 있다[Cho KM. 2013]. 배양 비의존적인 방법은 주로 핵산(nucleic acid)을 기반으로 분석하며 그 종류로는 Fish(Fluorescence in situ hybridization)[Moter A et al., 2000], Denaturing gradient gel electrophoresis(DGGE)[Muyzer G et al., 1993], nucleic acid hybridization[Stackebrandt E et al., 1991], T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism)[Marsh T L, 1999], fluorescence in situ hybridization[Langendijk P S et al, 1995] DNA Microarray[Schena M. et al., 1995], quantitative real time PCR(Polymerase Chain Reaction)[Heid C. A. et al., 1996] 기법 등이 있다. 현재 주로 사용되는 PCR 기법은 미생물 DNA의 16SrRNA와 같은 특정 영역을 증폭시키는 원리의 동정 방법이다. PCR기법 중 하나인 colony PCR은 순수 배지에서 분리한 단일 colony를 증폭하는데 정확하게 colony만을 동정할 수 있으며 data base의 발달로 염기서열의 분석이 정확하다는 장점이 있지만 배지에 배양하는 시간이 소요되는 단점이 있다. DNA PCR은 미생물을 배양하여 DNA를 추출하거나 시료로부터 바로 DNA를 추출하여 PCR하

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

는 기법으로 나누어진다. 시료로부터 바로 DNA를 추출하는 기법을 메타지노믹스기법이라고 하는데, 이는 여러 요인으로 인해 배양이 불가능한 미생물을 분석할 수 있으며 미생물 유전자와 유전체를 포함한 환경 전체를 분석하는 것이 가능하다는 장점을 가지고 있다[Gilbert JA and Dupont CL, 2011]. 그 외에 target DNA의 증폭과 동시에 실시간 정량이 가능한 Q-PCR(Quantitative PCR), DNA 염기서열을 제한효소로 무작위로 절단하여 동시에 증폭하는 shot gun PCR 등이 있다[Venter JC et al., 2004].

제주도는 연평균 15.5℃의 온난한 기후로 겨울철 노지 월동이 가능하며 유기물이 함유되어있는 화산회토의 지대로 감귤 외에 당근, 양배추, 콜라비, 브로콜리 등이 재배된다[MIFAFF]. 그 중 브로콜리는 제주지역에서는 감귤폐원지의 작목제한으로 인해 대체작물로 재배하기 시작하였으며 월동이 용의한 지역 특성으로 그 재배면적이 크게 확대되었다[Choi JW et al., 2011]. 2000년 13ha에 불과한 제주지역 브로콜리 재배면적이 6년 후인 2006년에는 약 100배 증가하여 1,296ha를 차지하였다[Ko SB et al., 2008]. 제주 브로콜리는 10월부터 익년도 5월까지 재배되며[Choi JW et al., 2011], 전국 생산량의 70.6%, 재배면적의 76.5%를 점유하고 있다[MIFAFF, 2010]. 브로콜리는 십자화과에 속하는 채소로 우리나라에서는 녹색꽃양배추라고도 불리며 꽃봉오리(화뢰)와 줄기(화경)를 식용으로 이용한다. 브로콜리에는 비타민 C와 칼슘, 칼륨 등 무기질이 풍부하며 베타카로틴과 수용성 식이섬유가 함유되어 있다[Kim JY, 2009]. 또한 항산화 물질인 β-carotene, selenium, rutin, quercetin 등[Lee HS and Park YW, 2003]과 발암 억제작용을 하는 sulforaphane이 함유되어 있다[Kim MR, 1997]. 브로콜리는 데치거나 생으로 섭취하기 때문에[Lee HS and Park YW, 2003], 외부 표면 미생물의 분석이 필요하다.

이에 본 연구에서는 제주지역에서 재배되는 브로콜리와 유기농(有機農, organic farming)법, 무농약(無農藥, pesticide-free)농법 일반적인 농법, 으로 재배한 시판 브로콜리의 표면 미생물을 배양하여 동정하였다. 또한 재배되는 브로콜리의 표면 미생물과 기후 등 환경인자와의 상관관계를 조사하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2. 재료 및 방법

2.1. 브로콜리 시료 구매 및 채취

브로콜리는 각 지역마다 파종 시기에 따라 수확 시기가 결정된다. 파종 1달 후 2-3 cm로 자란 어린 순을 밭에 정식하고 약 30일이 지난 어린 브로콜리와 정식 후를 110-120일 내외의 성체 브로콜리 수확하였다. 본 연구에서 수확한 브로콜리 성체의 무게는 250-400 g 내외였으며, 어린 브로콜리의 무게는 80-120 g 이였다.

브로콜리를 채취한 밭의 지역과 채취일자는 Table 1에 나타내었다. 브로콜리를 생산하는 지역을 읍 단위로 나누어 각 읍별로 5-6 곳의 밭에서 시료를 채취하였다. Fig 1의 (a-1)과 같이 시료간의 거리는 밭의 크기에 따라 변의 길이가 약 20-30m인 정삼각형의 각 꼭지점에서 채취하였으며 밭의 중심을 삼각형의 중심점으로 하여 간격을 정하였다. 각 꼭지점에서 3송이의 단일 브로콜리를 채취하였고 그 반경은 1 m 내외로 하였다. 비가 오는 날에는 화뢰부분이 잎에 가려져 있는 브로콜리를 채취하였으며 화뢰위의 빗방울도 같이 채취하였다.

채취 시 손에 비닐장갑을 착용하고 70% ethanol(OCI company, Korea)로 채취용 칼과 손을 소독하였으며 1회용 멸균 봉투 안에 화뢰(花蕾, flower bud)부분 전체를 감싸 넣고 Fig 1의 (c)와 같이 화경(花莖, scape)을 잘라서 채취하였다. 브로콜리의 크기는 상대적으로 대정지역이 400 g 내외로 가장 컸으며 조천 지역이 250g 내외로 가장 작았다. 일반 브로콜리 농가에서는 날카로운 칼을 이용하여 화경부분을 15 cm 정도 남겨 채취하였으며 이는 모두 저온저장고로 옮겨져 4℃에서 냉장 보관하였다.

시중에 유통되는 브로콜리 시료는 일반 농법으로 재배한 브로콜리와 유기농법으로 재배한 브로콜리로 나누어 구입하였다. 구입기간은 2014년 11월 19일부터 2015년 11월 8일까지 이며 각 구입날짜와 판매처는 Table 2에 나타내었다. 구입한 브로콜리는 멸균백으로 포장하여 밀봉 후 4℃에서 냉장 보관하여 24시간 내에 실험을 진행하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 1. Address of broccoli cultivated in each region

Region	Samples	Dates Sampled	Address
Daejeong	A1	2014.11.01	*Sangmo-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si*
	A2-A3	2015.01.11.	*Ilgwa-ri, Daejeong-eup, Seogwipo-si*
	A4-A6	2015.01.24.	
Hallim	B1	2014.11.08.	*Sangdae-ri, Hallim-eup, Jeju-si*
	B2	2014.12.07.	
	B3-B5	2015.02.08.	*Sangmyeong-ri, Hallim-eup, Jeju-si*
Jocheon	C1	2014.12.03.	*Sinchon-ri, Jocheon-eup, Jeju-si*
	C2	2015.01.18.	
	C3-C5	2015.01.22.	
Seongsan	D1	2014.11.17.	*Goseong-ri, Seongsan-eup, Seogwipo-si*
	D2	2014.12.06.	
	D3-D6	2014.12.29.	*Onpyeong-ri, Seongsan-eup, Seogwipo-si*

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

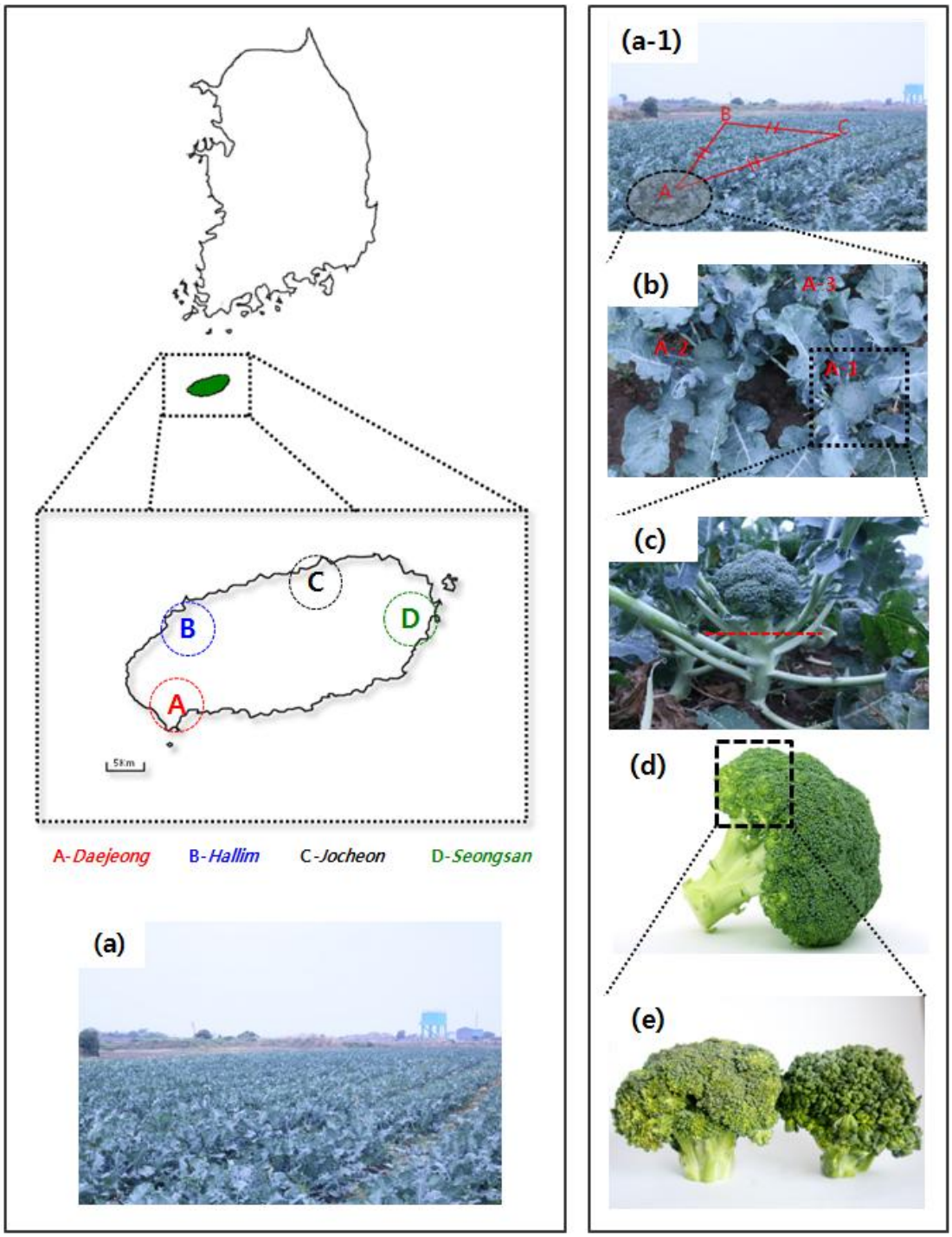


Figure 1. Photograph of broccoli sampling points

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 2. Cultivation type and sampled dates of broccoli in markets

Sample	Dates Sampled	Sampled Store	Sample	Dates Sampled	Sampled Store
C1	2014-11-19	Jeju Nonghyup hanaro	O1	2014-11-19	Jeju Nonghyup hanaro
C2	2014-11-19	Jocheon Nonghyup hanaro	O2	2014-11-19	Chorocmaeul
C3	2014-11-23	Jeju Nonghyup hanaro	O3	2014-11-23	Jeju Nonghyup hanaro
C4	2014-12-09	Jeju E-Mart	O4	2014-11-27	Jeju E-mart
C5	2014-12-23	Jeju Nonghyup hanaro	O5	2014-12-09	Neuyoungnayoung
C6	2014-12-23	Jeju Chukhyeop hanaro	O6	2014-12-23	Jeju E-mart
C7	2015-01-02	Soul Lotte mart	O7	2014-12-23	Neuyoungnayoung
C8	2015-01-06	Jeju Nonghyup hanaro	O8	2015-01-06	Chorocmaeul
C9	2015-01-23	Nawoori mart	O9	2015-01-23	Chorocmaeul
C10	2015-01-23	Jeju Nonghyup hanaro	O10	2015-01-23	Jeju Nonghyup hanaro

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

C11	2015-11-01	Jeju Chukhyeop hanaro	O11	2015-11-01	Hansalim
C12	2015-11-01	Jeju Nonghyup hanaro	O12	2015-11-01	Hansalim
C13	2015-11-01	Jeju E-mart	PF1	2015-11-01	Chorocmaeul
C14	2015-11-01	Nawoori Mart	PF2	2015-11-01	Jeju E-mart
C15	2015-11-01	Tamra Mart	PF3	2015-11-01	Jeju Nonghyup hanaro
C16	2015-11-08	Jeju E-mart	PF4	2015-11-08	Jeju E-mart
C17	2015-11-08	Nawoori Mart	PF5	2015-11-08	Hansalim
C18	2015-11-08	Jeju Chukhyeop hanaro	PF6	2015-11-08	Jeju Nonghyup hanaro
C19	2015-11-08	Tamra Mart	PF7	2015-11-08	Chorocmaeul
C20	2015-11-08	Jeju Nonghyup hanaro	PF8	2015-11-08	Hansalim

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.2. 브로콜리 채취 기간의 기후변화

브로콜리 채취 기간의 기후변화는 채취일자를 기준으로 전 1달간 조사하였고 월평균기온, 월 평균상대습도, 월 평균 일조량, 월 평균강수량을 Table 3에 나타내었다. 이는 한국 중앙행정기관인 기상청 통계자료를 기준으로 작성하였다.

2.3. 브로콜리 시료 처리

Fig 1의 (d)와 같이 브로콜리 3송이에서 각 10-13 g을 멸균 칼로 화뢰부분을 절단하여 브로콜리 작은 화뢰를 2-3송이 취한 후 시료의 총 무게가 30-40 g이 되도록 합하였다. 합한 브로콜리를 멸균 백에 넣고 Peptone(Sigma-Aldrich)으로 만든 0.1% Buffered peptone water(BPW)로 5-6배희석한 후 초음파 세척기(Powersonic420, Hwashin Technology, Korea)를 이용하여 40 KHz 에서 10분간 처리하였다.

2.4. 생균수 측정

각 처리 후 취한 액을 십진 희석하여 배지에 도말하는 plate count method로 생균수를 측정하였다. 총 호기성 세균 수와 총 진균 수는 TSA(Trypticase Soy Agar, Franklin Lakes, NJ, USA)와 PDA(Potato Dextrose Agar)를 이용하여 각각 37℃에서 24-48 시간, 20℃에서 72-120시간 배양하였다. *Salmonella*는 Mac Conkey와 XLD(Xylose lysine deoxycholate agar)를 이용하였으며 *Coliform*, *E. coli*, *Listeria*, *Enterobacteriaceae* 은 각각 CC(*Coliform)*, EC(*E.coli/Coliform*), EL(*Environmental Listeria),* EB*(Enterobacteriaceae)*의 페트리필름[Petrifilm, 3M, USA]을 이용하였다. *Salmonella*, *E. coli* 및 *Coliform*, *Listeria*는 37℃에서 24-48 시간 배양하였고 배양 후 배지에서 형성된 전형적인 콜로니를 계수하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.5. 브로콜리 표면 미생물 군집 분석

2.5.1 DNA 추출

DNA는 PowerSoil DNA Isolation Kit(MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 추출하였다. 브로콜리 시료 20 mL를 1 mL씩 20개의 tube에 나누고 이를 10,000 rpm으로 1분간 원심분리한 후 pellet을 합하여 DNA 추출에 사용하였다. 시료 300 μL를 취하여 2 mL 의 새 튜브에 넣고 셀을 녹여주는 SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)가 들어있는 C1시약(사용 전 60 ℃로 온도를 맞춘다) 60 μL를 넣어 vortex하였다. 그 혼합액을 bead 튜브에 넣고 수평으로 10분간 vortex하여 물리적으로 세포벽을 파괴하였다. 교반한 튜브를 12,000 rpm에서 30초간 원심분리 후 그 상등액 450 μL를 새로운 2 mL 튜브로 옮겨 담고, C2시약(DNA 순도를 높이기 위하여 유기 무기 물질을 침전 제거하는 역할)을 250 μL 첨가하여 vortex 후 4℃에서 5분간 냉장 보관하였다. 원심분리하여 가라앉은 고체를 제외한 상등액 600 μL를 취하여 새 2 mL 튜브에 넣고 200 μL의 C3(2차적인 유기 및 무기물질 제거역할)시약을 넣어 vortex 후 4℃에서 5분간 냉장 보관하였다. 원심분리하여 600 μL 를 새 2 mL 튜브에 넣고 1,200 μL의 C4(DNA가 높은 염농도에서 실리카막에 단단히 결합하는 원리. 고농도의 염용액)시약을 혼합하여 Spin filter 튜브에 넣고 원심분리 후 통과된 것들을 제거하였다. 500 μL의 C5(실리카막에 DNA의 결합은 유지하게 하면서 염, 남아있는 유기 및 무기물질을 제거하는 에탄올계 세정액)시약을 필터에 넣어 원심분리 시키고 통과 된 액을 제거하였다. 필터를 새로운 튜브에 옮기고 멸균증류수 50 μL를 필터 막에 넣은 후 5분간 방치하고 원심분리하여 DNA를 얻었다.

추출한 DNA는 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 수행하여 추출유무를 확인하였다. PCR-premix(iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)에 추출한 DNA 10 μL를 넣고 세균의 16S rRNA 유전자를 증폭하기 위한 primer(8F(5′- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG -3′), 1492R(5′-GG TTA CCT TGT TAC GAC TT-3′); 10 pmol) 2μL 넣고 증류수를 이용하여 최종용량을 20 μL로 맞추고 유전자 증폭기(GenePro Thermal Cycler, BIOER, Hangzhou, China)로 PCR

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

을 수행하였다. DNA의 16S rRNA 유전자 증폭은 94℃에서 2분간 예비가열을 하였고, 94℃에서 20초간 변성, 55℃에서 20초간 유전자 재결합, 72℃에서 1분 30초간 중합반응의 과정을 30회 반복 후 72에서 5분간 처리하였다. 증폭된 DNA는 1.5% agarose gel과 마커(100SiZer DNA Markers, iNtRON, Korea)를 이용하여 100V에서 15분동안 전기영동한 후 UV투영기(Gel documentation, Bio Free, Seoul, Korea)로 DNA크기와 증폭여부를 확인하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.5.2 16S rRNA 유전자 증폭

분석은 경희대학교 생물학과 미생물 생태학 실험실에서 수행하였다. 추출하여 얻은 브로콜리 표면 미생물 DNA 시료를 16S rRNA 유전자 특이적 primer set(799f, 1115r)을 이용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 사용한 primer set(799f, 1115r)은 추출 중에 얻어진 브로콜리의 진핵세포(眞核細胞, eukaryotic cell)과 엽록체(葉綠體, chloroplast) DNA를 제외한 표면 미생물 DNA만을 선택적으로 증폭하기위해 사용하였다[Chelius MK and Triplett EW, 2001]. Primer는 454-pyrosequencing library 제작용 adaptor와 시료 구분용 barcode를 앞에 붙여 놓음으로써, 다수의 시료를 일시에 분석할 수 있게 제작되었다(799f, 5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG AAC MGG ATT AGA TAC CCK G-3'; 1115r, 5'-CCA TCT CAT CCC TGC GTG TCT CCG ACT CAG AGG GTT GCG CTC GTT G-3').

PCR 반응용액은 template DNAs, primer set (0.2 μM), 2×PCR Master mix Solution (i-TaqTM, iNtRON biotechnology, Korea)을 섞어 만들었다. PCR 반응조건은 94 °C에서 3 분간 예비가열 후 94 °C에서 15초간 변성, 55 °C에서 45초간 유전자 재결합, 72 °C에서 1분간 중합반응의 과정을 28회 반복 하고 72 °C에서 8분간 처리하였다. 각 시료 당 총 4개의 반복시료를 만들고 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)을 이용하여 정제하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

2.5.3 454 pyrosequencing을 통한 염기서열

분석은 경희대학교 생물학과 미생물 생태학 실험실에서 수행하였다. 모든 시료는 Picogreen(Invitrogen, Carlsbad, CA, SA)을 통해 DNA양을 측정하고 454 pyrosequencing GS FLX Titanium(Roche 454 Life Sciences, Branford, CT, USA)을 통해 염기서열을 분석하였다. 확보된 염기서열은 QIIME software package v1.9.0[Caporaso JG et al., 2010]을 통해 분석하였다. 염기서열은 평균값 Q20 이하이거나, 6개 이상의 homopolymer를 가지거나, ambiguous base calls을 지니거나 또는 그 길이가 200 bp(base pair)보다 짧은 것은 초기에 제거하였다. 그리고 Denoiser를 통해 염기서열 통합화 과정을 진행하고 reverse primer 염기서열을 제거하였으며, USEARCH(v7.0)의 UCHIME algorithm을 통해 chimeric sequence를 추가적으로 제거하였다. 최종 생산된 양질의 염기서열은 97% 상동성을 기준으로 open-reference clustering(SortMeRNA_SUMACLUST method)을 수행하였다. Clustering을 통해 생산된 OTUs(operational taxonomic units)의 대표 염기서열을 추출하고, PyNAST를 통해 배열한 뒤, FastTree를 통해 phylogenetic tree를 구성하였다. 해당 정보를 조합하여 OTU table을 최종 구성하며, sequencing 양을 동일하게 맞추기 위해 시료당 387 sequences로 염기서열을 재추출하였다. OTU 중, “chloroplast” 또는 “unassigned” OTU는 OTU table에서 제거하였다. Greengene 데이터베이스를 기반으로, UCLUST-based taxonomy classifier를 이용하여 각 OTU를 명명하였다. Observed_OTUs를 바탕으로, 시료 간 다양성을 비교하였으며, UniFrac distance를 이용하여, 시료 간 미생물 군집을 비교하였다.

2.6 통계처리

모든 실험 결과는 3회 반복 측정 후 SPSS 통계분석 프로그램(SPSS 12.0K for window, SPSS Inc., Armonk, USA)을 이용하여 평균과 표준편차로 나타나었으며, 통계적 유의성은 Duncan’s multiple test로 검정하였다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3. 결과 및 고찰

3.1. 밭에서 채취한 브로콜리 표면의 생균수와 채취기간 중 기후변화

밭에서 채취한 브로콜리와 시판 브로콜리 표면의 총 호기성 세균, 총 진균, *Enterobacteriaceae*, *E. coli* 및 *Coliform*, *Listeria* 수는 Table 3-6에 나타내었다. 한림에서 채취한 브로콜리 표면의 호기성 세균 수는 평균 5.46±1.07 log CFU/mL 로 가장 높았으나 성산에서 채취한 브로콜리 표면 호기성 세균 수와 유의적으로 차이가 없었으며 조천에서 채취한 브로콜리의 표면 호기성 세균 수가 1.69±0.87 log CFU/mL로 유의적으로 가장 낮았다(Fig 2). 채취 지역에 따른 총 진균 수는 성산읍에서 채취한 브로콜리의 표면이 평균 6.20±1.57 log CFU/mL로 가장 많았으며 호기성 세균 수와 유사한 경향을 나타냈다(Fig 3).

*Enterobacteriaceae*는 동물과 인간의 장 속에 존재하는 그람 음성 세균으로 병원성을 가지는 *Coliform, E. coli* 및 *Salmonella* 등의 속이 포함된다(Jo MJ et al., 2011). *Enterobacteriaceae*는 성산과 한림에서 채취한 브로콜리가 2.96±0.76 log CFU/mL와 2.84±0.60 log CFU/mL로 유의적으로 차이가 없었고 조천에서는 총 15개의 시료 중 1개의(C31) 시료에서 1.30±0.00 log CFU/mL로 나타났다(Fig 4). *Coliform*은 동물과 인간의 장 속에 존재하며 검출 시 분변의 오염지표가 되는 유당 분해, 그람 음성, 무 아포 간균을 지칭한다(Jo MJ et al., 2011). *Coliform*은 성산과 한림에서 채취한 브로콜리가 2.89±0.51 log CFU/mL와 2.71±0.64 log CFU/mL로 가장 많았으며 유의적인 차이가 없었고 조천에서는 0.74±0.61 log CFU/mL로 가장 낮게 나타나 *Enterobacteriaceae*와 비슷한 결과를 보였다. *E. coli*와 *Enterobacteriaceae, Coliform*간의 서로 비례하였으며 각 지역별로 총 *E. coli*와 *Enterobacteriaceae, Coliform* 수는 성산 2.91±0.04 log CFU/mL, 한림 2.74±0.07 log CFU/mL, 대정 1.61±0.09 log CFU/mL, 조천 0.09±0.29 log CFU/mL의 순으로 나타났다. *Listeria* 수는 성산이 2.05±0.99 log CFU/mL로 가장 높았고 대정과 한림이 각각 1.47±0.44 log CFU/mL와 1.26±0.44 log CFU/mL로 유의적으로 차이가 없었으며 조천에서는 검출되지 않았다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

브로콜리 채취기간 중 기후변화는 Table 7에 나타내었다. 평균기온은 지역 간의 유의적인 차이가 없었으며 상대습도는 2개의 지역끼리 유의적으로 비슷하였다. 대정과 조천이 65.50 mm와 66.00 mm, 한림과 성산이 70.75 mm와 71.67 mm로 서로 비슷하였으며 총 호기성 세균과 진균 수에 비례하였다. 강수량은 대정과 조천이 70.85-76.63 mm로 유의적으로 차이가 없었지만 성산이 131.77 mm로 가장 높게 나타났고, 한림이 45.75 mm로 가장 낮게 나타났으며 강수량아 기장 높게 나타난 성산은 *Listeria* 수가 가장 높게 나타난 지역이였다. 생균수가 가장 낮게 나타난 조천읍은 일조량이 3지역에 비해 91.30 hr로 가장 낮게 나타났으며 이 지역은 *E. coli*와 *Enterobacteriaceae, Coliform*의 검출빈도가 가장 낮았고, *Listeria*는 전혀 검출되지 않았다.

브라질에서 재배한 상추의 표면 생균수와 환경인자간의 상관관계 연구에 따르면 기온이 높을수록, 강수량이 낮을수록 높은 미생물 수를 나타냈는데, 브라질의 기후는 고온 다습하여 제주도의 기후와 다르며 강수량도 1달에 16-24mm로 제주의 강수량보다 유의적으로 낮은 수치를 나타냈다[Ceuppens et al., 2014].

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 3. Microbiological analysis of broccoli cultivated in *Daejeong*

Sample	Aerobic bacteria	Fungi	Enterobacteriaceae	*Escherichia coli*	*Coliform*	*Listeria*
A11	5.46±0.34	5.50±0.43	2.39±0.00	2.37±0.00	2.28±0.00	-
A12	5.50±0.27	6.74±0.10		-	-	-
A13	4.57±0.33	4.32±0.08	1.62±0.00	-	2.10±0.00	1.56±0.00
A21	-	2.93±0.21	-	-	-	-
A22	2.58±0.28	2.58±0.71	-	-	-	-
A23	2.73±0.49	2.58±0.71	-	-	-	-
A31	3.06±0.28	4.38±0.34	-	1.08±0.00	1.38±0.00	1.48±0.00
A32	3.12±0.49	3.44±0.35	2.28±0.00	1.73±0.00	1.98±0.00	1.86±0.00
A33	2.62±0.00	3.43±0.07	-	-	0.78±0.00	0.78±0.00
A41	2.30±0.00	2.65±0.91	1.18±0.00	1.30±0.00	1.18±0.00	1.78±0.00
A42	2.74±0.00	2.55±0.53	1.40±0.00	-	-	1.00±0.00
A43	2.52±1.04	2.21±0.64	1.74±0.00	1.00±0.00	1.18±0.00	1.81±0.00
A51	2.48±0.25	2.95±1.10	1.48±0.00	1.40±0.00	1.30±0.00	1.81±0.00
A52	2.12±0.60	3.05±0.84	1.60±0.00	1.18±0.00	1.48±0.00	1.65±0.00
A53	2.26±0.79	3.05±0.81	1.65±0.00	1.60±0.00	1.65±0.00	1.78±0.00
A61	2.12±0.60	2.96±0.58	1.88±0.00	1.74±0.00	1.78±0.00	0.70±0.00
A62	2.55±0.78	2.54±0.00	1.74±0.00	1.65±0.00	1.74±0.00	1.93±0.00
A63	2.41±0.57	2.66±0.51	1.65±0.00	1.74±0.00	1.81±0.00	1.00±0.00

−: Not detected.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 4. Microbiological analysis of broccoli cultivated in *Hallim*

Sample	Aerobic bacteria	Fungi	*Enterobacteriaceae*	*Escherichia coli*	*Coliform*	*Listeria*
B11	4.30±0.49	4.76±0.07	2.19±0.26	4.23±0.00	4.28±0.00	1.08±0.00
B12	2.93±0.84	4.22±0.04	1.73±0.00	1.26±0.00	2.10±0.00	1.08±0.00
B13	3.76±0.14	3.90±0.16	2.89±0.00	2.79±0.34	2.52±0.00	0.78±0.00
B21	5.94±0.22	6.20±0.12	3.32±0.00	3.58±0.00	3.58±0.00	1.30±0.00
B22	5.61±0.12	6.88±0.22	2.72±0.25	2.81±0.00	3.58±0.00	1.88±0.00
B23	3.68±0.14	6.45±0.13	3.85±0.00	2.19±0.00	2.27±0.00	0.70±0.00
B31	4.04±0.44	4.92±0.25	2.78±0.00	2.90±0.00	2.85±0.00	1.65±0.00
B32	5.54±0.46	6.33±0.37	3.08±0.00	2.95±0.00	2.60±0.00	-
B33	5.59±0.09	7.23±0.33	2.86±0.00	2.95±0.00	2.70±0.00	-
B41	5.51±0.18	5.66±0.05	2.30±0.00	2.29±0.00	2.13±0.00	0.70±0.00
B42	6.58±0.17	6.04±0.19	2.00±0.00	2.16±0.00	2.23±0.00	1.00±0.00
B43	7.20±0.35	7.32±0.15	-	2.08±0.00	1.95±0.00	-
B51	6.46±0.22	5.36±0.35	3.26±0.00	2.85±0.00	2.78±0.00	1.48±0.00
B52	5.64±0.08	5.80±0.19	3.34±0.00	2.85±0.00	2.60±0.00	1.54±0.00
B53	7.92±0.33	7.27±0.32	3.45±0.00	2.90±0.00	2.49±0.00	1.98±0.00

−: Not detected.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 5.Microbiological analysis of broccoli cultivated in *Jocheon*

Sample	Aerobic bacteria	Fungi	*Enterobacteriaceae*	*Escherichia coli*	*Coliform*	*Listeria*
C11	1.30±0.00	0.70±0.00	-	-	-	-
C12	1.59±0.16	1.00±0.00	-	-	-	-
C13	1.65±0.07	0.70±0.00	-	-	-	-
C21	2.15±0.35	1.65±0.00	-	-	0.00±0.00	-
C22	2.26±0.31	1.65±0.00	-	-	-	-
C23	1.65±0.07	1.18±0.00	-	-	-	-
C31	2.92±0.87	3.12±0.16	1.30±0.00	1.30±0.00	1.18±0.00	-
C32	2.79±0.48	2.18±0.26	-	-	-	-
C33	2.75±0.17	2.37±0.30	-	-	-	-
C41	1.70±0.11	2.49±0.58	-	0.78±0.00	0.30±0.00	
C42	1.79±0.29	2.34±0.06	-	0.60±0.00	0.00±0.00	
C43	0.85±0.21	1.39±0.86	-	-	-	-
C51	1.10±0.28	1.60±0.00	-	-	-	-
C52	1.19±0.16	1.74±0.37	-	-	-	-
C53	0.60±0.00	0.60±0.00	-	-	-	-

-: Not detected.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 6.. Microbiological analysis of broccoli cultivated in *Seongsan*

Sample	Aerobic bacteria	Fungi	*Enterobacteriaceae*	*Escherichia coli*	*Coliform*	*Listeria*
D11	5.94±0.22	6.20±0.12	3.40±0.00	3.98±0.00	3.58±0.00	1.38±0.00
D12	5.61±0.12	6.88±0.22	2.80±0.25	2.89±0.00	2.82±0.00	1.95±0.00
D13	3.68±0.14	6.45±0.13	3.92±0.00	2.27±0.00	2.27±0.02	0.78±0.00
D21	4.52±0.36	6.20±0.12	3.32±0.00	3.90±0.00	3.51±0.00	1.30±0.00
D22	5.61±0.12	6.88±0.22	2.72±0.25	2.81±0.00	2.74±0.00	1.88±0.00
D23	3.68±0.14	6.45±0.13	3.85±0.00	2.27±0.00	2.19±0.02	0.70±0.00
D31	5.16±0.20	5.49±0.23	3.04±0.00	-	-	3.53±0.00
D32	4.35±0.17	4.80±0.14	-	-	-	3.45±0.00
D33	8.89±0.27	9.25±0.77	-	-	-	-
D41	2.87±0.18	4.82±0.23		-	-	-
D42	2.99±0.02	4.18±0.01	1.90±0.00	1.90±0.00	-	3.38±0.00
D43	2.70±0.43	4.01±0.01	-	-	-	-
D51	4.18±0.45	4.99±0.02	3.40±0.00	3.41±0.00	2.54±0.00	-
D52	2.77±0.10	4.72±0.03	2.37±0.00	2.11±0.00	-	-
D53	3.60±0.07	5.64±0.05	1.40±0.00	-	3.08±0.00	1.40±0.00
D61	7.31±0.23	7.24±0.51	-	-	0.00±0.00	2.95±0.00
D62	8.96±0.39	9.44±0.53	-	-	0.00±0.00	2.27±0.00
D63	7.46±0.21	7.93±0.45	3.40±0.00	3.41±0.00	3.28±0.00	1.74±0.00

-: Not detected.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

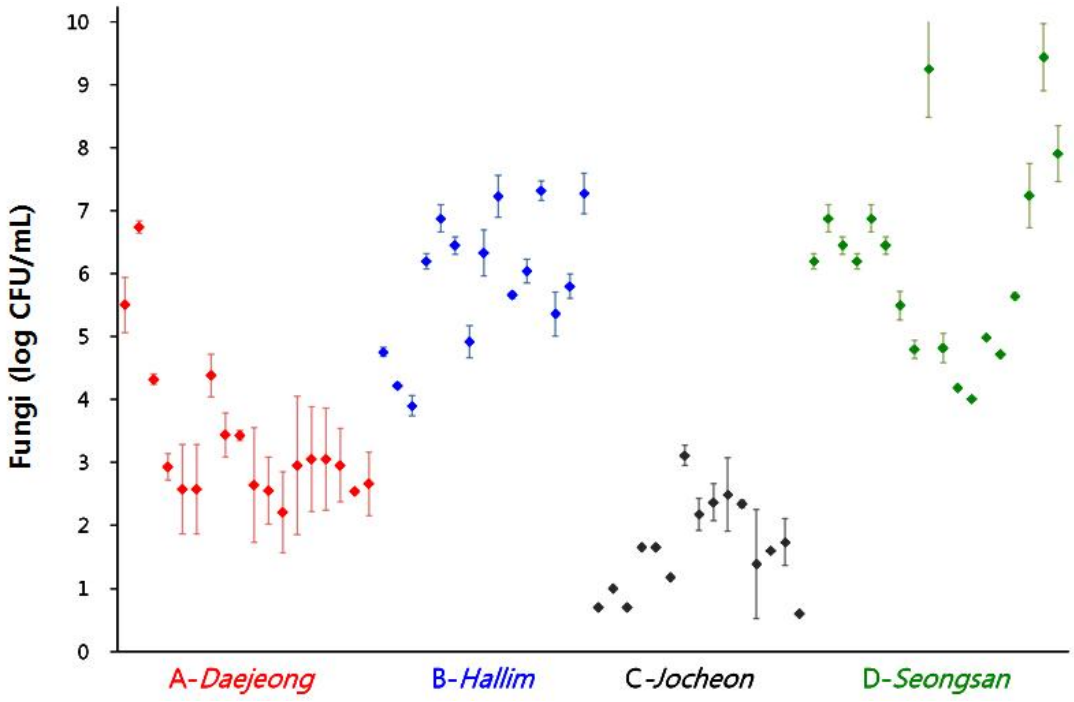


Figure 2. Levels of Fumgi(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region

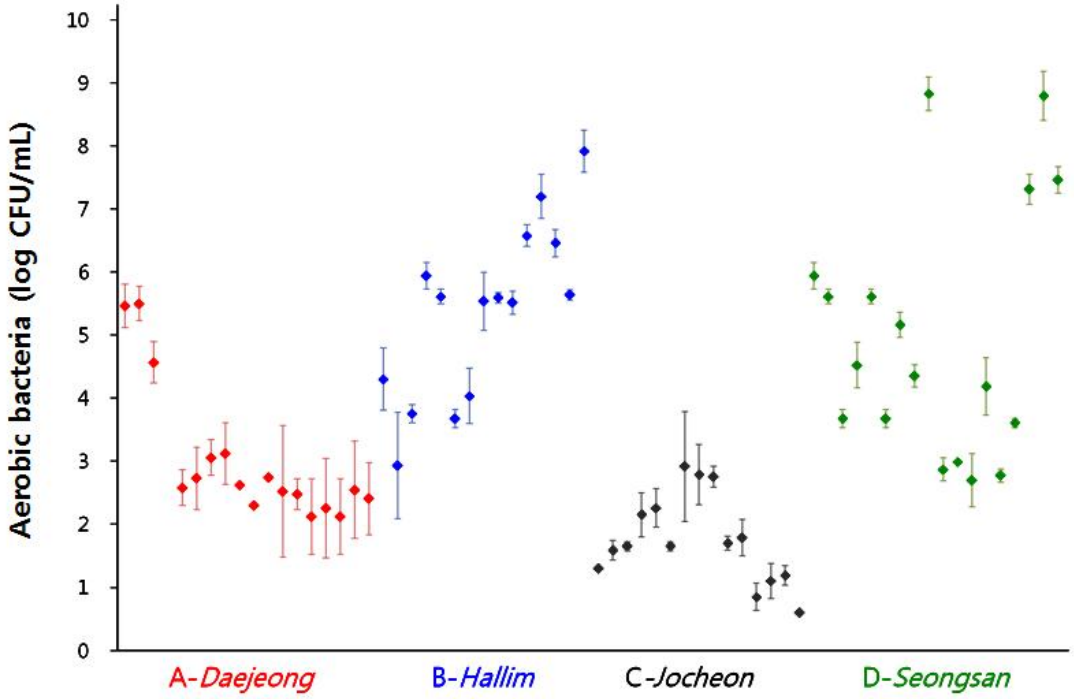


Figure 3. Levels of Aerobic bacteria(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

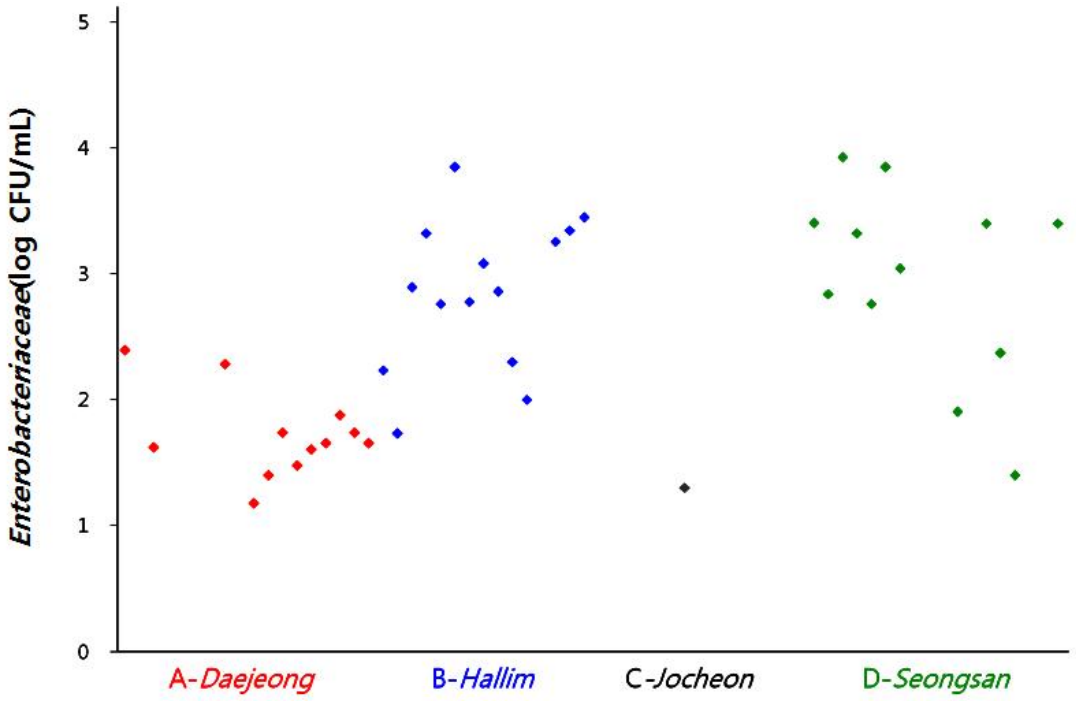


Figure 4. Levels of *Enterobacteriaceae*(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region

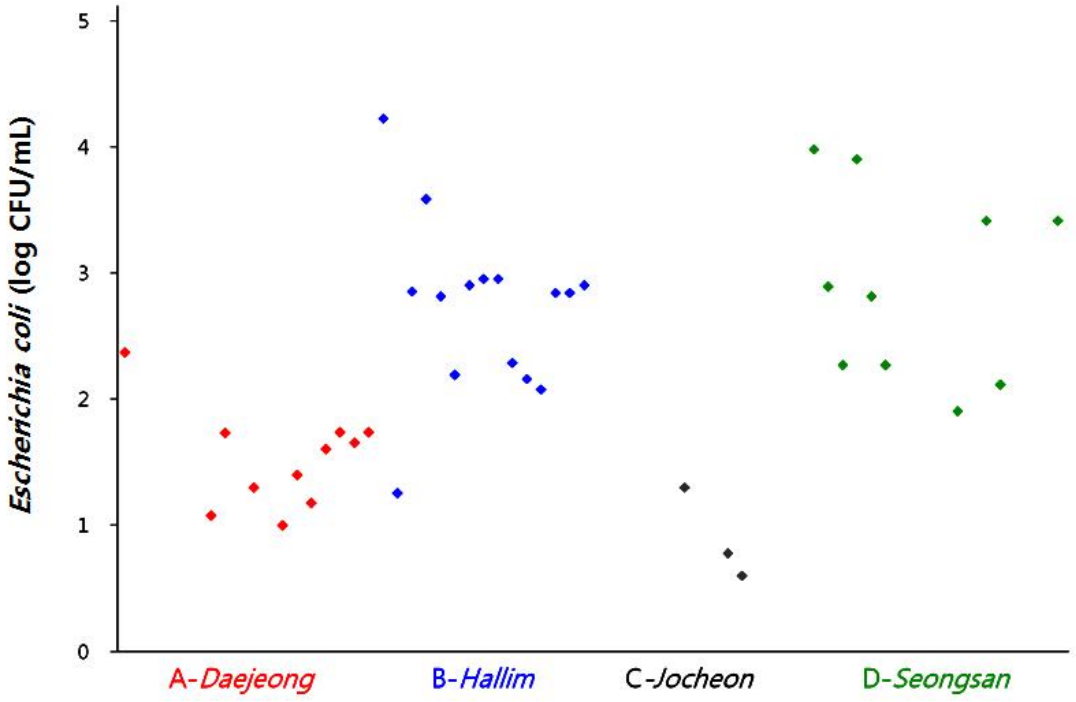


Figure 5. Levels of *Escherichia*(log CFU/ mL) *coli* of broccoli cultivated in each region

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

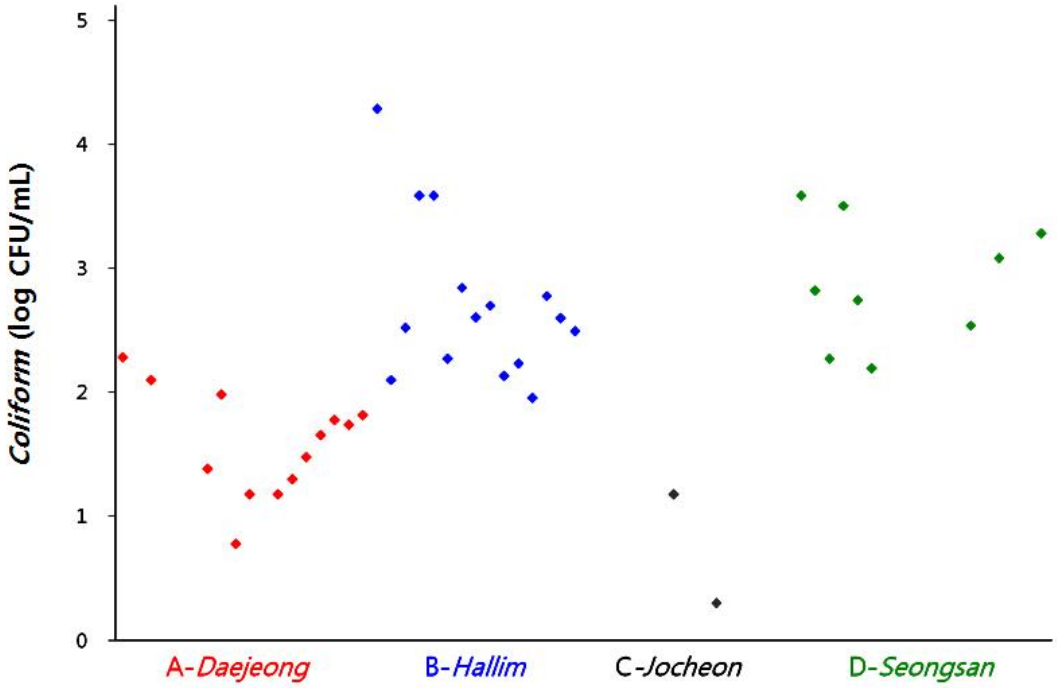


Figure 6. Levels of *Coliform*(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region

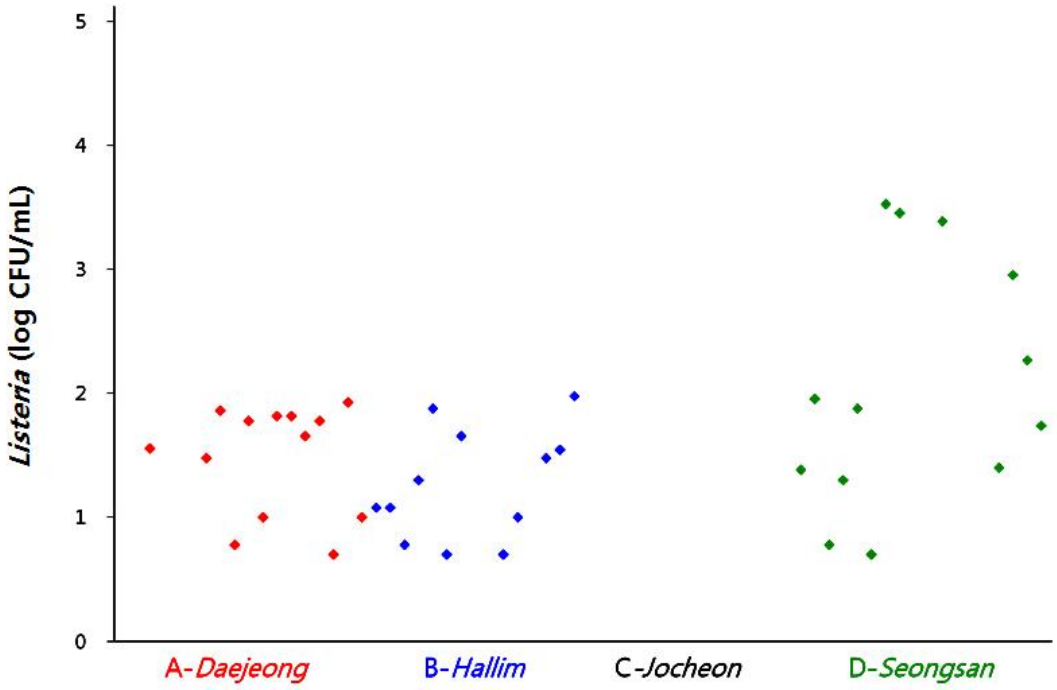


Figure 7. Levels of *Listeria*(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 7. Weather of broccoli cultivated in each region

Region	Dates Sampled	Month	Mean Temperature(℃)	Relative Humidity(%)	Precipitation (mm)	Sunshine (hr)
Daejeong	2014.11.01-2015.01.24	2014.10	20.1	68	52.6	237.7
		2014.11	15.0	67	96.1	211.2
		2014.12	7.7	64	54.1	194.5
		2015.01	8.4	63	80.6	197.4
		Average	12.80±5.87^{a}	65.50±2.38^{b}	70.85±8.60^{ab}	210.20±19.73^{a}
Hallim	2014.11.08-2015.02.08	2014.10	19.0	75	37.7	247.2
		2014.11	14.1	70	52.3	185.3
		2014.12	7.1	68	34.1	124.8
		2015.01	6.9	70	58.9	140.2
		Average	11.78±5.87^{a}	70.75±2.99^{a}	45.75±11.78^{b}	174.38±54.92^{a}
Jocheon	2014.12.03-2015.01.22	2014.11	13.9	68	100.3	117.5
		2014.12	7.3	64	47.2	62.2
		2015.01	7.4	66	82.4	94.2
		Average	9.53±3.78^{a}	66.00±2.00^{b}	76.63±27.02^{ab}	91.30±27.76^{b}
Seongsan	2014.11.17-2014.12.29	2014.10	18.8	74	203.9	213.3
		2014.11	13.3	71	114.6	183.4
		2014.12	5.9	70	76.8	150.8
		Average	12.67±6.47^{a}	71.67±2.08^{a}	131.77±65.27^{a}	182.50±31.26^{a}

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

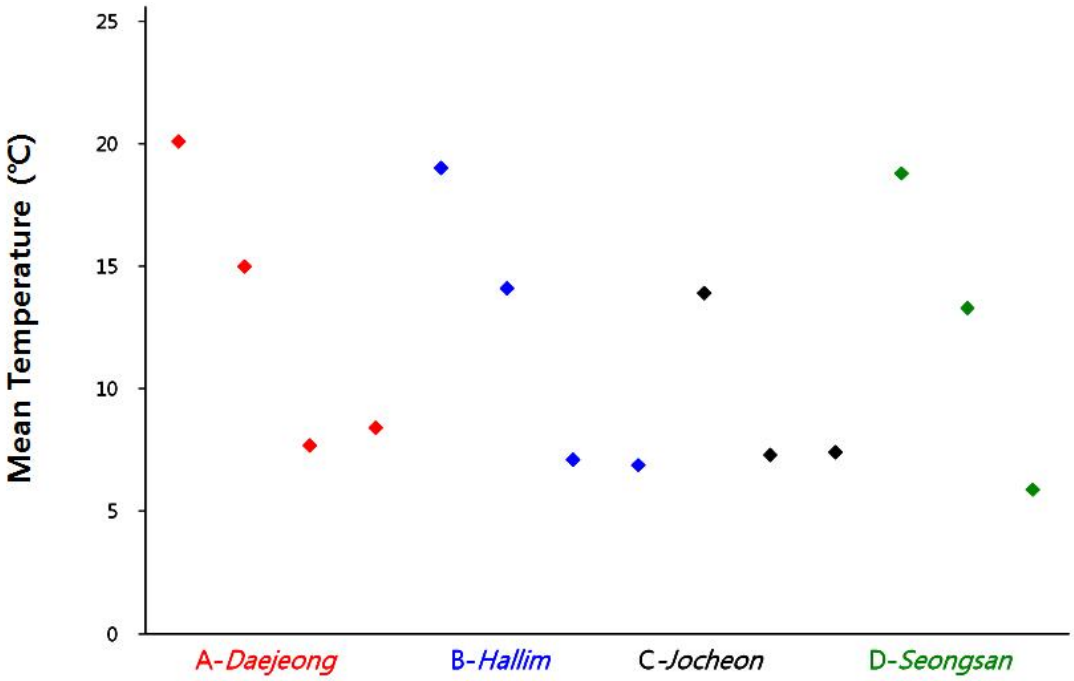


Figure 8. Levels of mean temperature(℃) of broccoli cultivated in each region

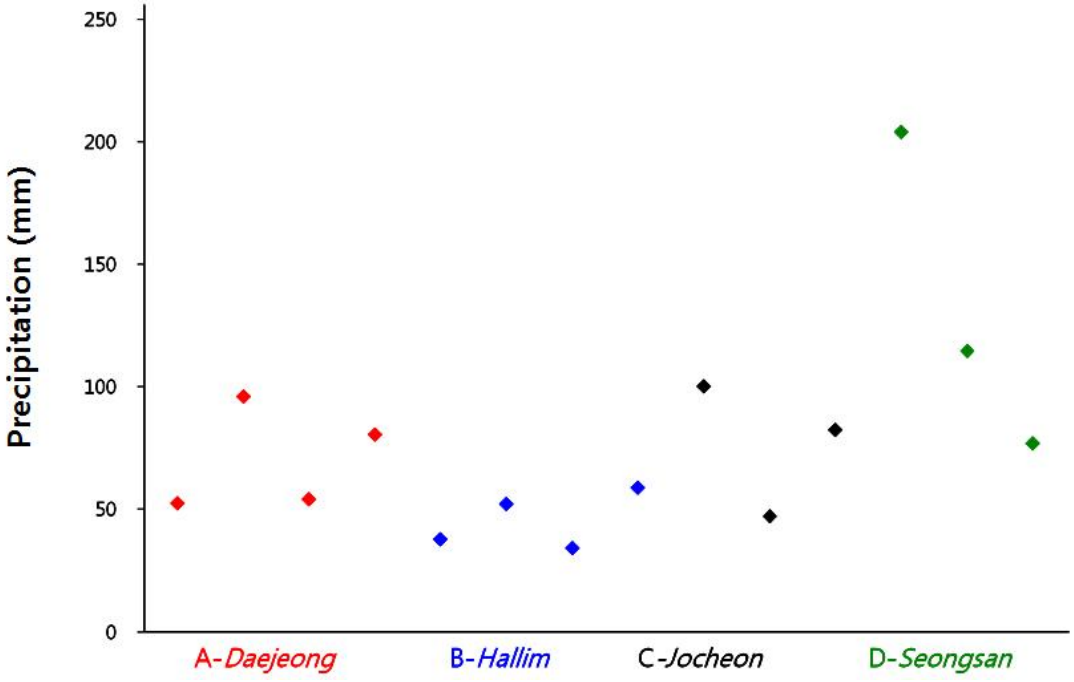


Figure 9. Levels of precipitation(mm) of broccoli cultivated in each region

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

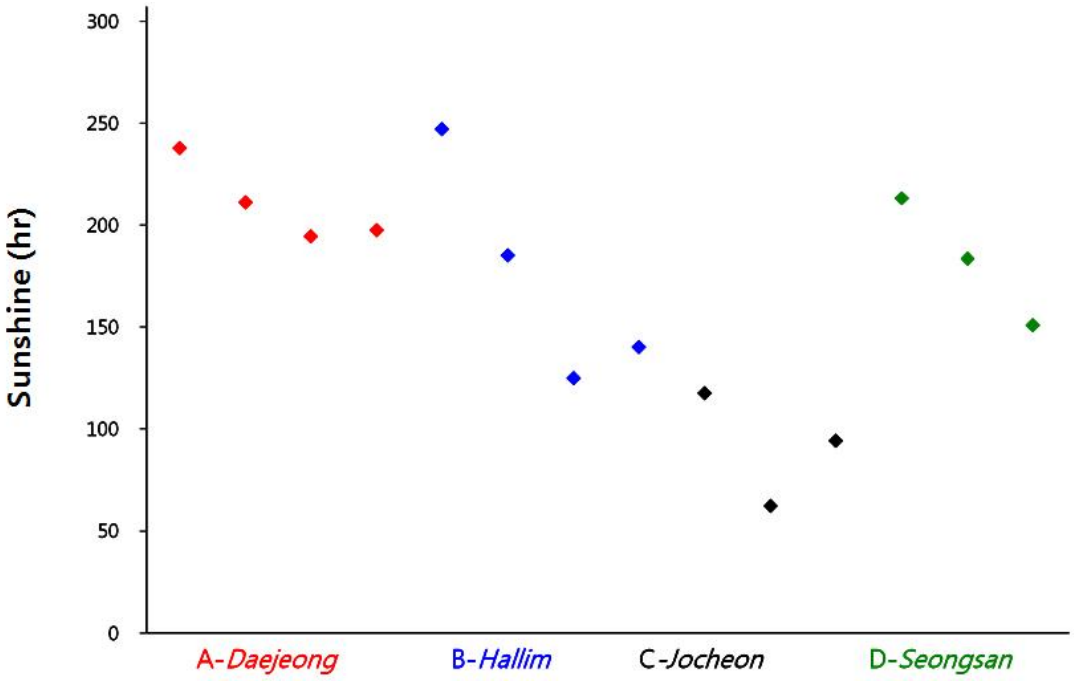


Figure 10. Levels of sunshin(hr) of broccoli cultivated in each region

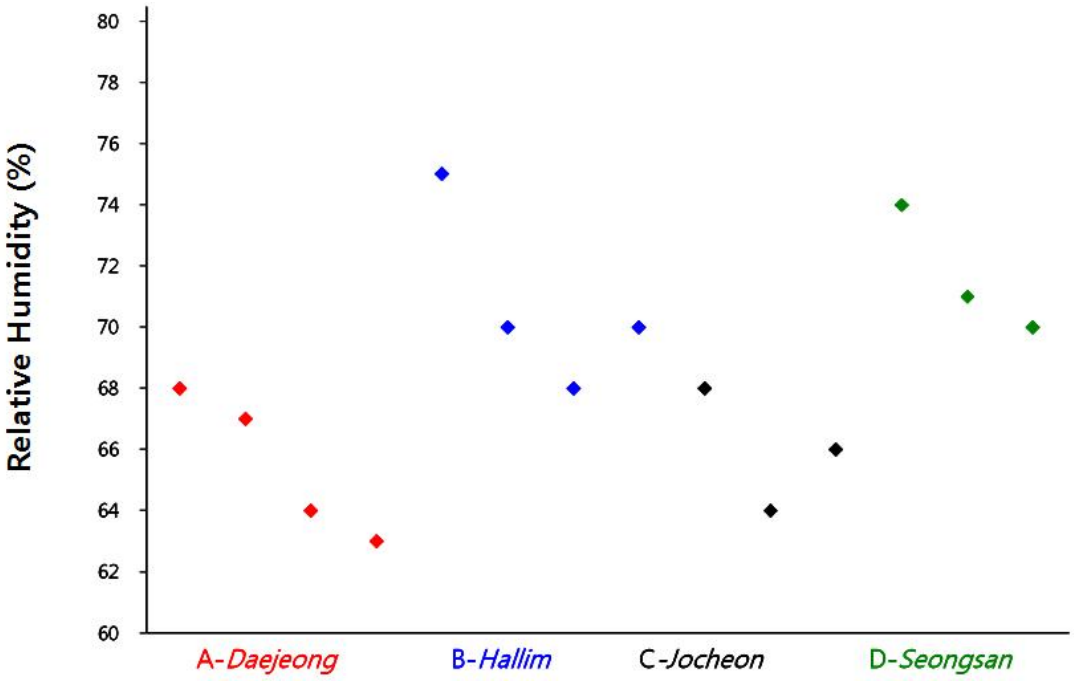


Figure 11. Levels of relative humidity of broccoli cultivated in each region

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.2.2. 시판 브로콜리의 재배방법에 따른 생균수

시판 브로콜리의 총 호기성 세균 수는 일반농법으로 재배한 브로콜리와 유기농법, 무농약농법으로 재배한 브로콜리는 유의적인 차이가 없었다(Fig 12). Choi CS et al.(2008)의 연구에서도 유기농채소와 일반채소의 총 세균 수가 6.91 log CFU/g과 7.04 log CFU/g으로 유의적인 차이는 없는 결과를 보였다. Bea YM et al.(2011)의 연구에서도 유기농 상추와 일반농법 상추의 총 세균수와 진균 수를 비교한 결과 유의적인 차이가 없는 결과를 나타냈다. 그 외로 Park WJ et al.(2014)에서도 유기농과 일반재배 상추에서 총 호기성 세균을 비교해 본 결과 유기농 상추 6.76±0.69 log CFU/g, 일반재배 상추 6.90±1.36 log CFU/g로 유의적인 차이가 없었다. 반대로 M Oliveira et al.(2010)의 연구에서는 상추의 호기성 세균 수는 일반 재배 상추 5.67±0.8 log CFU/g, 유기농 재배 상추 6.35±0.7 log CFU/g로 유기농 재배 상추가 유의적으로 높은 수치를 나타냈으며 효모 및 진균 수, *Enterobacteriaceae*수도 같은 결과로 나타났다.

*Enterobacteriaceae*와 *Coliform, E. coli* 수도 재배 방법 간에 유의적인 차이가 없었다. Park WH et al.(2014)의 연구에서도 유기농 상추와 일반재배 상추의 대장균군 수 비교 결과 각각 유기농 3.51±02.25 log CFU/g, 일반재배 3.92±2.51 log CFU/g로 유의적인 차이가 나타나지 않았다. *Listeria* 수는 유기농 브로콜리가 1.90±0.97 log CFU/mL, 일반농법 브로콜리가 1.03±0.61 log CFU/mL로 유의적으로 유기농 브로콜리가 더 높게 나타났다. Avik M et al.(2004)은 일반재배 농법 상추보다 유기농 상추에서 대장균이 더 많이 검출되었다고 보고하였다. 반대로 Loncarevic et al.(2005)은 일반농법으로 재배한 상추보다 유기농 상추에서 대장균이 더 적게 검출되었다고 보고하였다. Jung KS et al.(2011)은 가축 퇴비와 유기질 비료의 미생물을 비교하였는데, 가축분 퇴비 와 유기질 비료의 총 호기성 세균 수는 가축 퇴비가 유의적으로 5.09-9.68 g CFU/g로 유기질 비료 3.16-7.09±0.61 log CFU/g보다 높게 나타났다고 하였다.

모든 시료에서 *Salmonella*는 검출되지 않았는데, *Salmonella*는 토양의 온도, 습도, 토양종류, 자외선, 원생동물, 식물의 존재유무에 영향을 받으며[Jacobsen et al., 2012], 퇴비 등 가축분뇨와 연관이 있다고 알려진다[Franz E et al., 2005].

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 8. Microbiological analysis of conventional broccoli

Sample	Aerobic bacteria	Fungi	*Enterobacteriaceae*	*Escherichia coli*	*Coliform*	*Listeria*
C1	3.90±0.15	4.76±0.07	-	2.53±0.03	1.68±0.00	-
C2	3.56±0.20	4.22±0.04	1.20±0.00	2.77±0.21	3.47±0.63	1.08± 0.00
C3	4.77±0.27	4.90±0.16	1.46±0.61	2.47±0.14	2.74±0.00	-
C4	5.73±0.67	3.52±0.37	-	3.62±0.00	3.58±0.00	0.30± 0.00
C5	8.45±0.07	8.16±0.66	2.60±0.00	-	1.78±0.00	1.95± 0.00
C6	8.25±0.69	8.54±0.09	2.52±0.00	1.30±0.00	1.18±0.00	2.38± 0.00
C7	5.08±0.68	6.66±0.43	2.90±0.00	-	3.36±0.00	1.98± 0.00
C8	6.73±0.56	8.14±0.38	2.90±0.00	-	3.94±0.00	3.64± 0.00
C9	4.30±0.66	5.09±0.12	2.41±0.00	-	2.43±0.00	2.16± 0.00
C10	3.16±0.23	4.93±0.69	2.95±0.00	2.70±0.00	2.85±0.00	1.74± 0.00

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

C11	6.57±0.12	7.02±0.43	3.28±0.11	3.32±0.00	3.20±0.00	-
C12	4.33±0.04	4.52±0.19	1.70±0.74	1.90±0.00	2.22±0.00	-
C13	3.00±0.00	3.68±0.03	1.29±0.83	1.74±0.00	1.88±0.00	-
C14	2.37±0.26	2.54±0.14	0.70±0.00		0.70±0.00	-
C15	4.52±0.19	4.31±0.19	2.44±0.99	3.38±0.00	3.15±0.00	-
C16	4.38±0.03	4.65±0.06	2.85±0.00	1.40±0.00	2.85±0.00	-
C17	4.23±0.08	5.56±0.06	2.20±0.00	2.08±0.00	2.20±0.00	-
C18	4.55±0.00	4.63±0.39	3.32±0.00	3.41±0.00	3.32±0.00	-
C19	3.91±0.37	5.34±0.08	2.08±0.00	1.54±0.00	2.08±0.00	-
C20	5.36±0.09	5.36±0.17	3.32±0.00	2.48±0.00	3.32±0.00	-

-: Not detected.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Table 10. Microbiological analysis of organic and pesticide-free broccoli

Sample	Aerobic bacteria	Fungi	*Enterobacteriaceae*	*Escherichia coli*	*Coliform*	*Listeria*
O1	3.72±0.34	3.95±0.09	2.08±0.00	-	2.90±0.00	2.02±0.00
O2	5.19±0.42	5.17±0.13	2.18±0.00	2.32±0.21	2.08±0.00	1.32±0.00
O3	2.62±0.00	3.91±0.25	0.65±0.61	0.78±0.00	1.23±0.11	-
O4	3.03±0.00	3.98±0.28	-	3.41±0.00	3.30±0.00	0.70±0.00
O5	2.56±0.00	4.25±0.24	2.26±0.00	2.67±0.15	2.62±0.18	1.32±0.00
O6	8.00±0.12	8.39±0.22	1.85±0.00	-	-	0.70±0.00
O7	7.77±0.94	7.97±0.06	1.00±0.00	3.20±0.00	3.04±0.00	0.70±0.00
O8	2.50±0.28	3.75±0.06	-	0.70±0.00	0.70±0.00	1.00±0.00
O9	4.90±0.11	4.89±0.22	3.04±0.00	3.04±0.00	3.04±0.00	0.70±0.00
O10	2.70±0.00	4.23±0.10	1.88±0.00	2.08±0.00	2.10±0.00	1.88±0.00

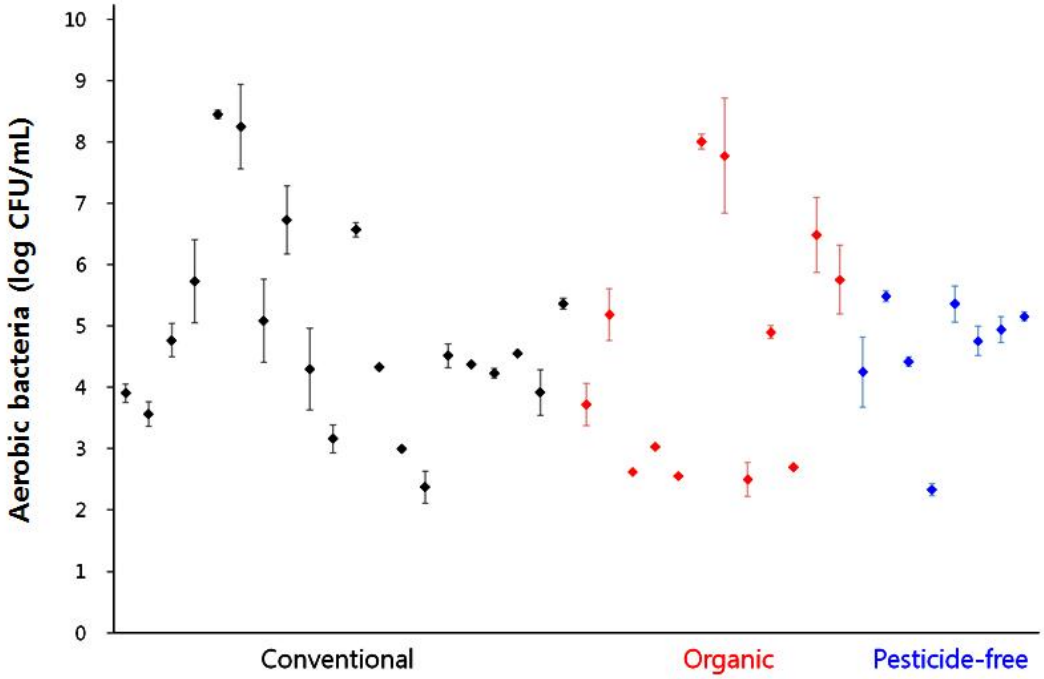
제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

O11	6.48±0.61	7.55±0.44	3.28±0.23	3.39±0.00	3.44±0.00	0.70±0.00
O12	5.75±0.56	6.28±0.43	3.37±0.05	3.45±0.00	3.41±0.00	1.00±0.00
PF1	4.25±0.57	4.55±0.15	3.13±0.25	1.30±0.00	1.60±0.00	-
PF2	5.48±0.09	6.25±0.68	3.26±0.03	3.32±0.00	1.60±0.00	-
PF3	4.42±0.08	4.60±0.13	1.41±0.57	1.70±0.00	1.65±0.00	-
PF4	2.33±0.10	2.39±0.14	1.95±0.00	1.65±0.00	2.19±0.00	1.60±0.00
PF5	5.36±0.29	5.84±0.17	2.06±0.00	2.10±0.00	1.74±0.00	1.60±0.00
PF6	4.76±0.24	4.79±0.12	3.52±0.00	3.43±0.00	3.52±0.00	1.18±0.00
PF7	4.94±0.21	5.28±0.14	2.60±0.00	2.70±0.00	2.78±0.00	2.59±0.00
PF8	5.16±0.08	5.17±0.24	2.78±0.00	2.70±0.00	2.60±0.00	3.32±0.00

-: Not detected.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

(a)



(b)

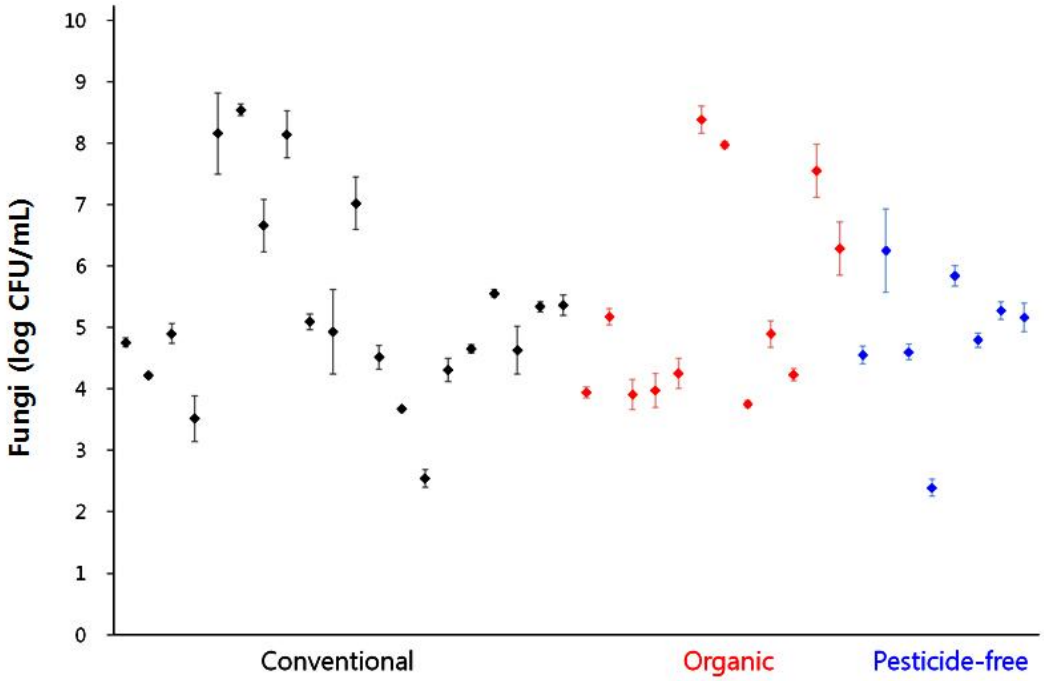


Figure 12. Levels of Aerobic bacteria(a) and Fungi(b)(log CFU/ mL) of broccoli cultivated in each region

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.2. 밭에서 채취한 브로콜리 표면의 미생물 군집 분석

3.2.1. 브로콜리 표면 미생물의 종 다양성 지수

본 연구에서 실험에 사용하기 위해 제주특별자치도를 4개의 읍, 22개의 밭, 총 66구역에서 브로콜리를 수집하였다. OTU(Operational Taxonomic Units)란 계통분류의 기본단위로 염기서열 97% 수준의 유사도를 기준으로 종(種, Species)을, 95% 수준의 유사도를 기준으로 속(屬, Genus)으로 분류하는 단위이다[Park SH et al., 2014]. 브로콜리 표면 미생물 군집을 97% 수준에서 OTU를 분류 · 명명하고 지역별로 채취한 샘플의 Observed_OTUs를 바탕으로 채취 지역 간 다양성을 비교하였다. 그 결과(Fig. 13) 대정읍에서 채취한 브로콜리의 OTUs가 가장 높았으며, 한림에서 채취한 브로콜리가 가장 낮게 나타났다. OTUs가 높게 나타났다는 것은 미생물을 분류하는 종, 속이 많은 것으로 다양성이 풍부하다는 것을 의미한다. Merete Wiken Dees et al.(2015)의 연구에서는 *Vestfold*와 *Buskerud*에서 채취한 잎채소의 표면 미생물 종 다양성을 파종 후와 채취직후로 비교해본 결과 파종후의 종 다양성이 채취직후보다 높았는데 기후와 관계는 없었다. 콩 재배시 토양의 세균군집 연구[Lee YM et al., 2015]에서는 다양성 지수는 계절의 변화에 따른 기온이 기인하였다고 추정하였는데 본 연구결과에서는 기온과는 관계가 없었지만 월평균 상대습도와 반대되는 결과를 나타냈다. 대정과 조천의 상대습도는 65.50±2.38%와 66.00±2.00%로 한림과 성산보다 유의적으로 5-6% 낮은 수치를 나타냈는데 종 다양성 지수가 높을수록 상대습도가 낮게 나타났다. 또한 종 다양성 풍부하였던 대정과 조천지역의 평균강수량은 70.85±8.60 mm와 76.63±27.02 mm로 유의적으로 비슷하였고 한림(45.75±11.78 mm), 성산(131.77±65.27 mm)과 유의적으로 차이가 있었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

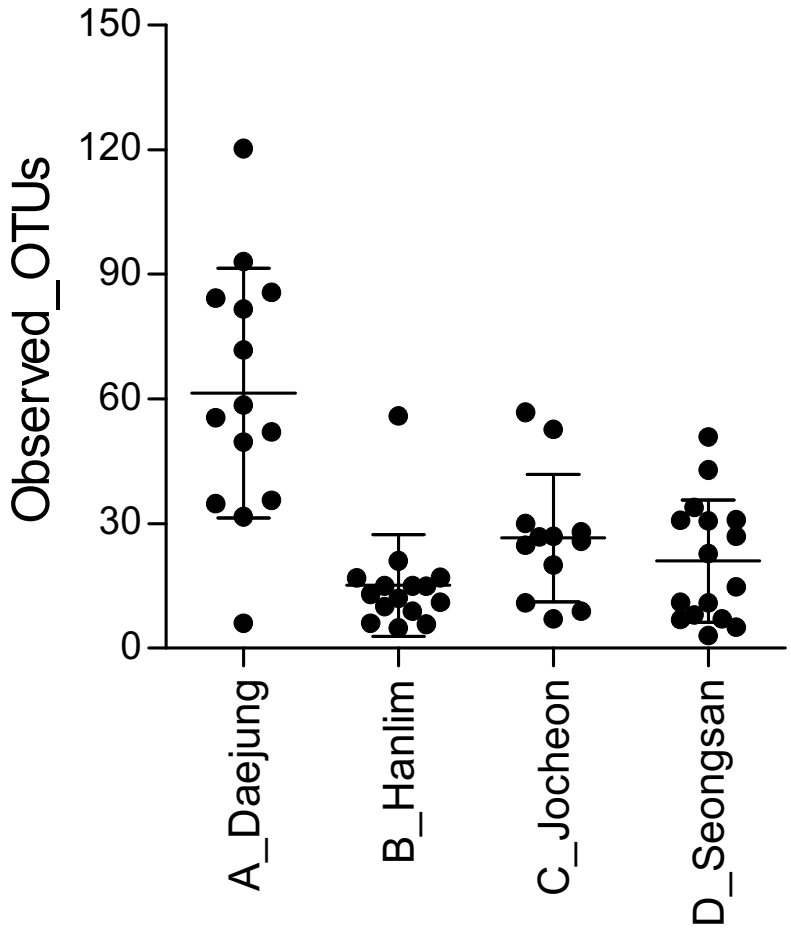


Figure 13. Mean numbers of OTUs obtained from farm broccoli in each region

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.3.2. 브로콜리 표면 미생물의 문 수준의 분포도

밭에서 채취한 브로콜리 표면 미생물의 채취지역 간 문(門, Phylum)과 강(綱, Class) 수준의 분포는 Fig. 14에 나타내었다. 밭에서 채취한 브로콜리 표면 미생물은 *Proteobacteria* 문이 대부분을 차지하였고 그 중 *Gammaproteobacteria* 강이 가장 우점하였다. *Gammaproteobacteria*는 한림에서 채취한 브로콜리의 85% 이상을 차지하였으며 성산에서 채취한 브로콜리에서는 85%를 차지하였다. 4개의 지역 중 *Gammaproteobacteria* 우점 다음으로 대정, 조천, 한림에서 *Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria* 순으로 우점하였으며 조천은 *Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria* 순으로 우점하였다. 그 외에 종 다양성이 가장 풍부하였던 대정지역에서는 *Firmicutes* 문, *Bacteroidetes* 문, *Actinobacteria* 문 순으로 우점하였다.

콩 근권의 핵심 세균 군집[Lee YM et al., 2015]의 연구에서는 본 연구와 같이 *Proteobacteria*가 우점을 차지하였고 *Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria* 순으로 우점을 차지하였다. Rastogi G et al.(2012)의 연구에서는 미국의 California 주와 Arizona 주의 11개의 도시에서 재배하는 상추의 표면 미생물 군집을 colony 계수와 PCR을 이용하여 조사하였는데 조사구역간에 미생물 군집의 차이는 없었고, *Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes*가 분리되었다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

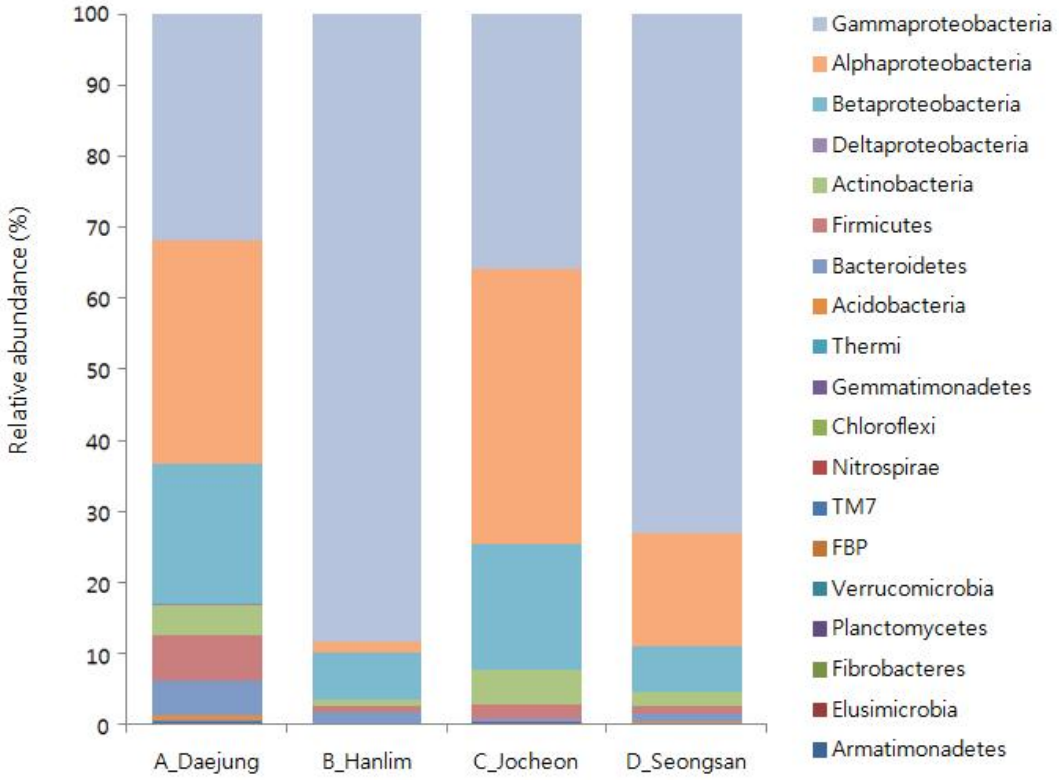


Figure 14. Bacterial distribution at the phylum and class level

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

3.3.3. 채취 지역 간의 전체 군집 구조 비교

밭에서 채취한 브로콜리 표면 미생물의 채취지역 간 전체 군집 구조 비교는 weighted UniFrac 분석으로 수행하였으며, 이 방법은 시료 간에 주좌표 분석(Principal Coordinate Analysis, PCoA)을 통해 유사도를 비교할 수 있는 방법이다[Lee YM et al., 2015]. PC1(57.24%)은 성산과 한림에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집이 조천과 대정에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집과 차이를 나타내었다. 지역 간의 미생물 군집 구조가 비슷하였던 지역의 위치를 제주특별자치도의 중심인 한라산을 기준으로 나타내었을 때, 한림은 서북쪽에 위치하였고 성산은 동남쪽으로 서로 60 km 떨어진 위치에 있었다. 대정은 서남쪽, 조천은 동북쪽으로 45 km 떨어진 위치에 있었다. 서로 상대습도는 대정과 조천이 66.50-66.00%, 한림과 성산이 70.75-71.67%로 각 2개의 지역이 유사한 결과를 보였으며 지역 간 미생물 군집 구조와 지역 간 상대습도가 비례하는 결과를 나타냈다. PC2(12.28%)는 성산과 조천, 한림에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집이 대정에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집과 차이를 나타냈다. Rastogi G et al.(2012)의 연구에서는 미국의 California 주와 Arizona 주의 11개의 도시에서 재배한 상추의 표면 미생물을 PCR을 통해 분석한 결과 지역 간의 군집 구조는재배지역과 품종간의 유의적인 차이가 없었다(Fig. 15).

제주도 토양종류와 특성에 의한 분류(Hyun HN, 2011)에 따르면 대정과 조천은 암갈색 비화산회토에 속하며 이 토양은 암갈색으로 유기물 함량과 양분 보유능력이 다른 지역에 비해 낮게 나타난다고 하는데 이는 작물이 필요한 영양분을 흡착하지 않고 흡수를 도와주기 때문에 작물 생장에 도움이 된다고 하였다. 한림지역은 농암갈색 화산회토로 자갈이 많고 흑색보다 진하지 않은 검은색 계통의 화산회토이며 자연비옥도가 낮고 토양이 인산을 흡착하는 성질이 강하기 때문에 농작물의 양분 결핍이 쉽게 일어나는 특징의 토양이다. 공극률은 토양 내 공간의 비율을 말하는데, 화산회토는 70% 내외의 공극률을 가지며 비화산회토는 50%의 공극률을 가져 비가 내릴 경우 화산회토는 지하수로 토양의 성분이 지하수로 유입 될 가능성이 있다고 하였다. 또한 화산회토는 투수속도가 빨라 물을 담아둘 수 없어 논농사가 불가능하며 그 외 작물도 잘 재배되지 않는다. 성산 지역은 흑

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

색 화산회토에 속하며 검은색을 띄며 토양의 깊이가 깊으나 인산을 흡착하는 힘이 일반토양에 비해 3배 강하여 작물양분이 결핍되기 쉬우며 농사가 잘되지 않는 지역이다. 이에 따라 작물의 생산성은 조천, 대정의 지역이 비화산회토로 작물을 생산할 수 있는 토양조건을 갖고 있으며 반면 한림과 성산은 화산회토로 강수량도 높으며 농작물 재배에 매우 척박한 특성을 가졌다. 이러한 토양 성질에 따라 대정과 조천은 다른 지역에 비해 종 다양성이 풍부하고 미생물의 생장에 유리하여 미생물 수가 높게 나타난 것으로 추정된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

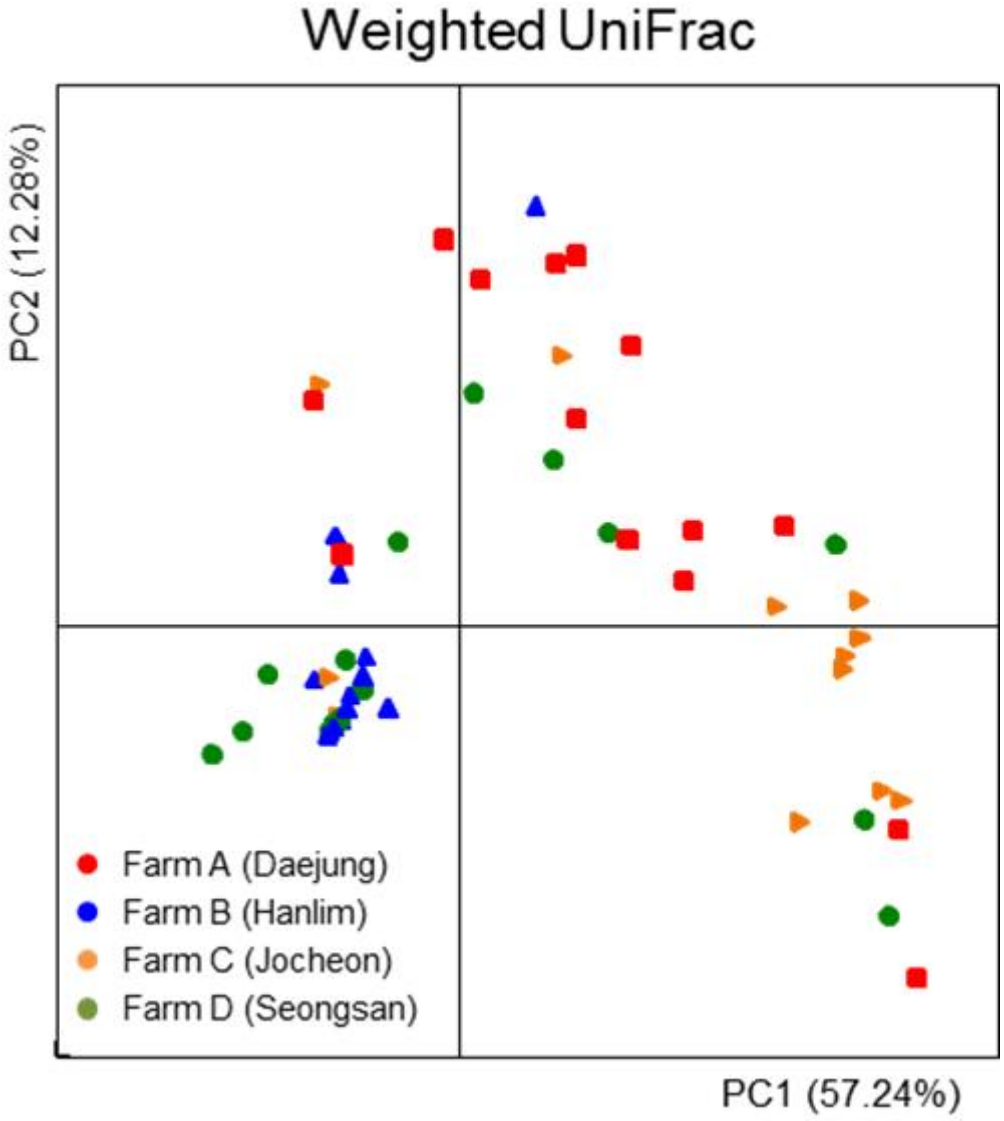


Figure 15. Principal coordinate analysis(PCoA) plot of samples using the unweighted UniFrac distance matric

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

4. 결 론

본 연구에서는 제주도에서 채취한 브로콜리와 시중에 판매되는 브로콜리를 재배유형별로 분류하여 표면 미생물의 군집 조성과 환경인자간의 상관관계를 조사하였다.

제주도의 대정, 한림, 조천 성산읍에서 채취한 브로콜리의 생균수는 지역 간에 유의적인 차이가 있었으며 총 호기성 세균수와 진균 수가 서로 비례하였다. 또한 *E. coli*와 *Enterobacteriaceae, Coliform*수도 서로 비례하는 결과를 나타냈으며 기후요인 중 월 평균 상대습도와 비례하는 결과를 나타냈다. *Listeria* 수는 성산에서 가장 높았으며 나머지 3지역 간의 유의적인 차이는 없었는데 성산은 4지역 중 가장 강수량이 높게 나타나 *Listeria*와 강수량간의 비례관계가 있는 것으로 추측되었다. 시판 브로콜리의 재배방법간의 표면 미생물 수의 차이는 없었다.

제주도의 4개의 읍에서 채취한 브로콜리 표면 미생물의 종 다양성 지수를 OTU로 나누어 분석한 결과 대정읍이 가장 높았고 조천읍, 성산읍, 한림읍 순서로 나타났다. 이는 월 평균 상대습도와 반대하는 결과를 나타내 미생물의 다양성 지수에 습도가 영향을 끼치는 것으로 추측된다.

브로콜리 표면 미생물을 문과 강 수준으로 동정한 결과 *Proteobacteria* 문이 대부분을 차지하였고 그 중 *Gammaproteobacteria* 강이 가장 우점하였다. 4개의 지역 중 *Gammaproteobacteria* 우점 다음으로 대정, 조천, 한림에서 *Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria* 순으로 우점하였으며 조천은 *Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria* 순으로 우점하였다. 그 외에 종 다양성이 가장 풍부하였던 대정지역에서는 *Firmicutes* 문, *Bacteroidetes* 문, *Actinobacteria* 문 순으로 우점하였다.

브로콜리 채취지역간의 전체 군집구조를 비교한 결과 PC1(57.24%)은 성산과 한림, 조천과 대정의 미생물 군집구조가 유사한 결과를 나타냈다. PC2(12.28%)는 성산과 조천, 한림에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집 구조가 유사하였으며 대정에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집과 차이를 나타냈다.

따라서 밭에서 채취한 브로콜리의 표면 미생물 수와 그 군집 조성은 지역 간의

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

차이가 있었으며 상대습도와 화산회토의 유무에 따른 토양특성이 영향을 끼치는 것으로 추측되며 기후 외에 재배농법 등 다양한 환경인자간의 관계 연구가 필요한 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

국문요약

제주도에서 채취한 브로콜리와 시중에 판매되는 브로콜리를 재배유형별로 분류하여 표면 미생물의 군집 조성과 환경인자간의 상관관계를 조사하였다. 제주도의 대정, 한림, 조천 성산읍에서 채취한 브로콜리의 생균수는 지역 간에 유의적인 차이가 있었으며 총 호기성 세균수와 진균 수, *E. coli*와 *Enterobacteriaceae, Coliform*수가 서로 비례하였다. *Listeria* 수는 성산에서 가장 높았으며 성산은 4지역 중 가장 강수량이 높게 나타났다. 시판 브로콜리의 재배방법간의 표면 미생물 수의 차이는 없었다. 재배지역에 따른 브로콜리 표면 미생물의 종 다양성 지수를 OTU로 나누어 분석한 결과 대정읍이 가장 높았고 조천읍, 성산읍, 한림읍 순서로 나타났다. 브로콜리 표면 미생물을 문과 강 수준으로 동정한 결과 *Proteobacteria* 문이 대부분을 차지하였고 그 중 *Gammaproteobacteria* 강이 가장 우점하였고, *Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria* 순으로 우점하였다. 브로콜리 채취지역간의 전체 군집구조를 비교한 결과 PC1(57.24%)은 성산과 한림, 조천과 대정의 미생물 군집구조가 유사한 결과를 나타냈다. PC2(12.28%)는 성산과 조천, 한림에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집 구조가 유사하였으며 대정에서 채취한 브로콜리 표면 미생물 군집과 차이를 나타냈다.

대정과 조천, 한림과 성산이 서로 생균수, 종 다양성 지수가 유사하게 나타났고 이는 평균상대습도, 화산회토 유무에 따른 토양특성이 영향을 끼친 것으로 추정된다. 또한 생균수가 가장 높았던 성산은 강수량이 4개의 지역 중 유의적으로 가장 높았으며 생균수가 가장 낮았던 조천은 4개의 지역 중 유의적으로 일조량이 가장 낮게 나타났다.

따라서 밭에서 채취한 브로콜리의 표면 미생물 수와 그 군집 조성은 지역 간의 차이가 있었으며 기후, 토양 등의 환경인자가 영향을 끼치는 것으로 추측되며 이외의 재배농법 등 다양한 환경인자간의 관계 연구가 필요한 것으로 사료된다.

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

References

Ahn YS, Shin DH. Antimicrobial effects of organic acids and ethanol on several foodborne microorganism. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1315-1323 (1999)

Avik M, Dorinda S, Elizabeth D, Francisco DG. Preharvest Evaluation of Coliforms, Escherichia coli, Salmonella, and Escherichia coli O157:H7 in Organic and Conventional Produce Grown by Minnesota Farmers. Journal of Food Protection. 5:864-1070(2004)

Bae YM, Hong YJ, Kang DH, Heu SG, Lee SY. Microbial and Pathogenic Contamination of Ready-to-eat Fresh Vegetables in Korea. Kor. J. Food Sci. Technol. 43: 161-168 (2011)

Belkum AV. DNA Fingerprinting of Medically Important Microorganisms by Use of PCR. Clin. Microbiol. 7: 174-184 (1994)

Burnett SL, Beuchat LR. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 27: 104-110 (2001)

Ceuppens S, Hessel ST, Rodrigues R de Q, Bartz S. Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in Brazil. International Journal of Food Microbiology181:67 - 76(2014)

Chelius MK and Triplett EW. The Diversity of Archaea and Bacteria in Association with the Roots of Zea mays L. Microbial Ecology 41:252-263(2001)

Cho JI, Kim KS, Bahk GJ, Ha SD. Microbial Assessment of Wild Cabbage and its Control. Korean J. Food Technol. 36: 162-167 (2004)

Cho KM. Microorganism identification using MALDI-TOF. Graduate School of Konkuk University(2013)

Choi CS, Lee MH, Lee KB, Choi SK, Kim SK, Kang JH, Tank HM. Micrological Evaluation of Organic and Inorganic Vagetavles. Chung Ang

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Journal of Human Ecology. 27:39-45(2008)

Choi JW , Lee, JH Kwak, Kim WB, Kim JG, Lee SK, Cho MA. Recent Research Status of Postharvest Management of Broccoli. Korean J. Int. Agric. 23: 497-502 (2011)

Forsythe SJ. Microbiology of safe food. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Oxford, United Kingdom(2010)

Gilbert JA, Dupont CL. Microbial Metagenomics: Beyond the Genome. Annual Review of Marine Science 3: 347-371 (2011)

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6: 986-994 (1996)

Hyun HN. Soil Environment, a Key to Open up Jeju Society and Culture. Environment and Food Safety for the Future Generation. KSEA's 30th Anniversary International Symposium(2011) 3-20

Jeong SW, Jeong JW, Park KJ. Microbial Removal Effects of Electrolyzed Acid Water on Lettuce by Washing Methods and Quality Changes during Storage. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 1511-1517 (1999)

Jo MJ, Jeong AR, Kim HJ, Lee NR, Oh SW, Kim YJ, Chun HS, Koo MS. Microbiological Quality of Fresh-Cut Produce and Organic Vegetables. Korean J. Food Sci. Technol. 43: 91-97 (2011)

Jung KS, Heu SG, Roh EJ, Lee DH, Yun JC, Kim KH. Prevalence of Pathogenic Bacteria in Livestock Manure Compost and Organic Fertilizer. Korean Society Of Soil Sciences And Fertilizer. 44(5):824-826(2011)

Jung KS, Roh EJ, Ryu KY, Kim WI, Park KH, Lee DH, Kim KH, Yun JC, Heu SG. Monitoring of Pathogenic Bacteria in Organic Vegetables from Korean Market. Korean J. Soil Sci. Fert. 45: 560-564 (2012)

Kim JW, Yu YM, Na WS, Baljii E, Choi IW, Youn YN, Lee YH. Monitoring of Biosafety of Agricultural Products from Urban Community Gardens and Roof Gardens in Korea. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 32: 400-407 (2014)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Kim JY, Park SH, Lee KT. Sulforaphane content and antioxidative effect of cooked broccoli. J. East Asian Soc. Dietary Life. 19: 564-569 (2009)

Kim MR, Lee KJ, Kim HY. Effect of Processing on the Content of Sulforaphane of Broccoli. Korean J. Soc. Food Sci. 13: 422-426 (1997)

Ko SB, Kim SB, Ko TS, Hong SY, Kang SG, Park YB. Varietal Evaluation of Broccoli Resistance to Downy Mmildew (Hyaloperonospora brassicae). Kor. J. Hort. Sci. Technol. 26 (SUPPL.) May(2008)

Kroupitski Y, Pinto R, Brandi MT, Belausov E, Sela S. Interactions of Salmonella enterica with lettuce leaves. J. Appl. Microbiol106:1879-1885 (2009)

Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, Raangs GC, Kamphuis GR, Wilkinson MH, Welling GW. Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization of Bifidobacterium spp. with Genus-Specific 16S rRNA-Targeted Probes and Its Application in Fecal Samples. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3069-3075 (1995)

Lee HS, Park YW. Screening of antioxidant-like components extractes from broccoli. Environ. J. Res., 8: 33-47 (2003)

Lee YM, Ahn JH, Choi YM, Weon HY, Yoon JH, Song JK. Bacterial core community in soybean rhizosphere.Korean Journal of Microbiology. 51(4):347-354(2014)

Loncarevic S, Johannessen GS, Rorvik LM. Bacteriological quality of organically grown leaf lettuce in Norway. Letters in Applied Microbiology. 41:186-189(2005)

Marsh TL. Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. Curr. Opin. Microbiol. 2: 323-327 (1999)

Merete Wiken Dees, Erik Lysøe, Berit Nordskog, May Bente Brurberg Bacterial Communities Associated with Surfaces of Leafy Greens: Shift in

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

Composition and Decrease in Richness over Time February 2015 Volume 81 Number 4 Applied and Environmental Microbiology 1530-1539

MOliveira,JUsall,IVinnas,MAnguera,FGatius,MAbadias.Microbiologicalqualityoffreshlettucefromorganicandconventionalproduction.FoodMicrobiology.27:679-684(2010)

Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J. Microbiol. Methods. 41: 85-112 (2000)

Muyzer G, Waal ECD, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700 (1993)

Padagaa M, Hearda GM, Paton JE, Fleet GH. Microbial species associated with different sections of broccoli harvested from three regions in Australia. Int. J. Food Microbiol. 60: 15-24 (2000)

Park SH, Choi HS, Kwon SY, Yoon SR. Comparative Performance Evaluation of OTU Binning Methods for Metagenomic Sequence Analysis. Communucations of the Korean Information Science Society32(3):46-53(2014)

Park WH, Ryu HY, Lim GY, Lee YD, Park JH. Microbial Prevalence and Quality of Organic Farm Produce from Various Production Sites. KOREAN J FOOD SCI TECHNOL. 46(2):262-267(2014)

Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Tech TV, Coaker GL, Leveau JH. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field-grown lettuce.The ISME Journal. 6:1812-1822(2012)

Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. Science. 270: 467-470 (1995)

Stackebrandt E and Goodfellow M. Nucleic acid techniques in bacterial

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

systematics.JOHN WILEY & SONS(1991)

Venter JC, Remington K, Heidelberg JF, Halpern AL, Rusch D, Eisen JA, Wu D, Paulsen I, Nelson KE, Nelson W, *etal.*:EnvironmentalgenomeshotgunsequencingoftheSargassoSea.*Science*2004, 304(5667):66-74.

Yu YM, Youn YN, Choi IU, Yuan X, Lee YH. Biological Hazard Analysis of Leaf Vegetables and Fruits According to Types of Cultivation and Distribution Systems. Korean J. Food Preserv. 14: 35-41 (2007)

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY