

## 전주 생 밀 막걸리의 산패 원인균의 분리 및 동정

박순희 · 이슬 · †진효상  
전주대학교 대체의학대학원 영양식품요법

### Isolation and Identification of Acid-forming Bacteria from a Fresh Wheat *Makgeolli* in Jeonju

Soon-Hi Park, Seul Lee and †Hyo-Sang Jin

Dept. of Alternative Medicine and Alternative Medicine, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea

#### Abstract

This research was carried out in order to discover acid-forming bacteria during fermentation of *Makgeolli*, as *Makgeolli* loses its commercial value due to overproduced acidic materials. In *Makgeolli* kept at 25°C, a sudden increase of acidity as well as the disappearance of yeast cells occurred at day 6, whereas the total cell count and bacterial type remained unchanged; the result implies that a succession of bacterial types, including acid forming bacteria, occurred. Two acid-forming bacteria were isolated from acidified *Makgeolli* and were identified as *Acetobacter pasteurianus* and *Lactobacillus casei*. When fresh and heat-treated *Makgeolli* were inoculated with *Acetobacter pasteurianus* and/or *Lactobacillus casei*, the greatest amount of acid was formed in *Makgeolli* inoculated with *Acetobacter pasteurianus* and *Lactobacillus casei* and also in *Makgeolli* with *Acetobacter pasteurianus* alone. This result indicates that *Acetobacter pasteurianus* is the main acidifier; furthermore, it shows the synergy effect in acid formation with *Lactobacillus casei*.

Key words: *Makgeolli*, acid-forming bacteria, *acetobacter pasteurianus*, *Lactobacillus casei*

#### 서 론

한국 고유의 전통주인 막걸리 소비량은 1970년대 중반부터 감소하기 시작하여 1980년대 이후 주류의 소비패턴 변화로 인해 감소가 지속되었다. 그런데 2000년대 초반부터 술에 대한 다양한 기호도와 고급화가 일어나고, 전통문화로의 회귀현상이 고조되면서 소비량이 증가되고 있다(Chang JH 1989). 농림수산식품부는 막걸리 시장이 2010년 5,200억 원 규모에서 2012년엔 무려 1조 원 규모의 거대시장이 될 것으로 전망하고 있다(Jung 등 2011). 이와 함께 막걸리 애용가들이 늘어나게 되고, 이들은 살균 막걸리보다 비 살균 막걸리를 선호하면서 주질의 개선, 저장성의 향상, 포장용기 개선 등 기술이 요구되고 있다(Jwa 등 2000). 막걸리의 저장성을 향상시키는 기술 개발은 막걸리 산패의 원인과 기전을 이해해야 하지만,

아직 이에 대한 연구는 거의 없다. 막걸리의 산패는 저장 중 증가하는 유기산 때문이며, 유기산은 맛을 내는 성분으로서 막걸리 고유의 신선함을 부여하나, 과잉 생성되면 상품가치를 상실하게 된다(Jung BK 2007; Lee HO 2008). 특히, 유기산 중 초산은 이러한 산패의 주원인이며, *Acetobacter*에 의한 것이다. *Acetobacter*는 당과 알코올을 산화시키며(Cha 등 1994), 맥주, 과일주, 포도주, 청주 등의 주류를 산패시키고, 효모에 의한 주 발효 직후 젖산균에 이어 나타난다(J Ames 2000).

Seo 등(2005)은 막걸리 발효 중 젖산균에 의해 pH가 저하되고 산도가 증가한다고 보고하였고, Min 등(2011)은 비살균 막걸리 저장 중 시간이 지남에 따라 효모와 젖산균수 감소에 대해, So 등(1999)은 막걸리 양조 중 미생물과 중요성분 변화에서 젖산균수 감소에 대하여, Lee & Lee(1970)는 막걸리 슬릿 중의 미생물 분류에 대하여, Kim 등(2011)은 시중 유통 막

† Corresponding author: Hyo-Sang Jin, Dept. of Alternative Medicine and Alternative Medicine, Jeonju University, Jeonju 560-759, Korea. Tel: +82-63-220-2326, Fax: +82-63-220-2054, E-mail: jin@jj.ac.kr

겉리의 유기산 조성상과 생리활성에 관해 보고한 바 있다. 이러한 연구들은 막걸리 발효 중 젖산균과 막걸리 산도의 관계를 지적하였지만, 아직 막걸리의 산패 원인균으로서 초산균을 분리한 연구는 없다. 초산균은 오직 식초 발효에서만 연구된 바 있고, *Acetobacter aceti* 집중 균수가 막걸리 식초 발효에 미치는 효과(Kim MY 2011)에 대해 보고되었을 뿐이다.

본 연구는 막걸리의 장기 저장 중 산도 변화로 고유의 맛을 저해하는 원인균을 찾아 이를 개선시켜 저장성을 높이고자 했다. 그동안 산도 변화에 관한 선행연구는 주로 젖산균에 대한 것(So 등 1999; Seo 등 2005)이 주를 이루었으나, 산패의 주 원인균으로 단정하기에 미흡한 부분이 많다.

이에 따라 본 연구는 막걸리의 장기 보존 중 산패 원인은 초산균에 의한 영향이 클 것으로 추측하고, 그 원인균을 찾아 분리, 동정한 후 산도 변화를 조사하였다. 동정한 산패 원인균이 밝혀지면 그 억제 수단을 찾을 수 있게 되고 이것이 막걸리의 산패를 방지하여 막걸리 유통기간이 연장되고, 소비자들의 소비패턴에 맞는 양질의 맛 유지와 품질의 균일화에 기여할 것이라고 생각한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

막걸리는 전주 생 밀 막걸리(비 살균막걸리)로 전주시 교동 한옥마을 도매상에서 공장 출하 시 바로 구입하여 사용하였다.

### 2. 막걸리의 산도 측정

산도는 막걸리 10 ml에 1% 페놀프탈레인 용액 2방울 넣고 잘 흔든 뒤 분홍색으로 변색될 때까지 소비된 0.1 N NaOH 소비량을 바탕으로 식 (1)에 의하여 구하였다(Kim 등 2007).

$$\text{산도} (\% \text{ 초산}) = \frac{0.006 \times \text{NaOH 소비량} \times \text{NaOH 역가}}{\text{시료의 부피}} \times 100$$

식 (1)

### 3. 막걸리의 균총 분석과 저장

막걸리는 고온(25~28℃)에서 단기간 발효했을 경우를 말하며(Technical service institute of National Tax Service 1997), 발효가 진행되면서 생성된 총산은 막걸리의 맛, 냄새와 직접 관련되며, 저장성에 영향을 준다(Hong HG 1984). 막걸리 산패 원인균을 찾기 위해 25℃에서 8일간 저장하면서 발효 기간 중의 균총 변화를 24시간마다 관찰하였으며, 균총 분석은 평판 도말법에依하였다. 연속 희석법으로 희석된 막걸리 25 μl를 20 ml YPD(Yeast extract 2.5 g, Peptone 5 g, Dextrose 5 g,

agar 5 g; Difco, Spark, MD, USA)와 20 ml MRS(Lactobacilli MRS broth 9.75 g, agar 5 g; Difco, Spark, MD, USA) 평판 배양 배지에 도말하고, 30℃ incubator(Han Baek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 2일간 배양한 뒤 생성되는 colony의 형태, 색, 크기로 분류하였고, 현미경 관찰에 의해 균의 종류를 구별했다. 실험 결과, 탁주의 균총 분석에서 가장 큰 균총 다양성을 보인 YPD 평판 배양 배지를 사용하였다. 종류별로 분류된 균은 각각 순수 분리한 후, 동결배지(10% glycerin) 0.3 ml에 현탁하고 glass bead tube에 넣어 -60℃에서 동결 보관하면서 사용하였다(Kirsop & Snell 1984).

### 4. 산 생성 원인균의 분리

순수 분리한 각각의 균은 CaCO<sub>3</sub>를 1 g 첨가한 YPD와 MRS 평판 배양 배지에 도말하고, 30℃에서 3일간 배양하면서 투명대의 생성 여부를 관찰하였다. 분리균의 산 생성력은 투명대의 크기를 비교 확인하였다.

### 5. 분리된 산 생성 균 첨가가 막걸리에 미치는 영향

산 생성 균을 5 ml MRS broth 배지에 접종하여 30℃에서 2일간 배양하였고, 막걸리 50 ml에 배양액 1 ml(2%)씩을 주입하고, 30℃에서 6일간 저장하면서 산도를 관찰하였다.

### 6. 막걸리 산 생성 원인균의 동정

균주의 동정은 16S rRNA 염기서열을 Database 균주들의 것과 비교하여 결정하였다. 세균의 DNA는 Wizard genomic DNA purification kit(Promega. Co., Madison, WI, USA)를 이용하여 분리하고, 16S rRNA gene은 PCR(polymerase chain reaction)에 의해 9F(5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGITACGACTT-3')을 사용하여 증폭하였다. PCR 반응조건은 ① 94℃ 5 min; ② 94℃ 30 sec; ③ 55℃ 30 sec; ④ 72℃ 1 min 30 sec; ⑤ 72℃ 5 min로 하였으며, ②~④의 조건을 35 cycle 반복하였다. PCR 반응이 끝난 시료는 Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-up System(Promega. Co., Madison, WI, USA)을 이용하여 정제한 후 염기서열을 Bioneer사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 결정하였다. 균주는 염기서열을 BLAST와 MSU Ribosomal Database Project를 사용하여 분석한 결과를 바탕으로 동정하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 저장 중 막걸리의 산도 변화

막걸리를 25℃에서 저장하면서 산도 변화를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 저장 1일째 산도가 0.52%에서 3일째 0.56%로 소량 증가하다가, 6일째부터 급격히 증가하여 8일째 1.13%

로 최고점에 도달했다. 적정산도는 발효생성물의 정도를 나타내는 지표로서, 발효저장식품의 신선도 판정에 중요한 척도로 사용되고 있다(Lee 등 1995). 총 산 함량이 많으면 이상 발효에 의해 막걸리가 산패된 것으로 여겨진다(Park & Lee 2002). 따라서 본 실험에서 막걸리는 25°C에서 6일째 급격한 산도 증가로 산패됨을 알 수 있었다.

2. 저장 중 막걸리의 미생물 분석

효모의 수는 저장 2일째부터 감소하기 시작하여 6일째 완전 사멸하였다. 효모를 제외한 균종수(Variety, No. of species)는 효모수가 감소하면서 증가하였지만 6일 이후에는 변화가 없었다. 총 균수는 8.39(log CFU/g)에서 3~4일째 9.69로 증가하였으나, 6일째 다시 감소하였다. 8일째 8.66으로 변화가 크지 않았다.

이 그래프는 막걸리의 산패, 총 균수의 변화, 효모수의 변화, 균종수의 변화가 서로 연관성이 있음을 보여준다. 즉 막걸리의 산도는 효모가 사멸하는 6일째 급격히 증가하는 것으로 보아 막걸리의 산패는 효모의 사멸과 연관이 있으며, 이는 Min 등(2011)이 보고한 ‘저장 중 효모균수의 감소’와 비슷한 결과를 나타냈다. 효모가 사멸했지만 균종수와 총 균수는 변화가 없는 것을 볼 때 효모의 사멸을 시점으로 산 생성 균이 많이 생성되었음을 암시한다(Fig. 1).

3. 산 생성균의 분리와 막걸리에서 효과

25°C에서 8일간 관찰한 산패 막걸리에서 13균주를 분리하고, CaCO<sub>3</sub>를 첨가한 YPD와 MRS 평판 배양 배지에서 산 생성 활성을 비교 관찰하였다. JM8YS2가 배양 3일째 가장 큰

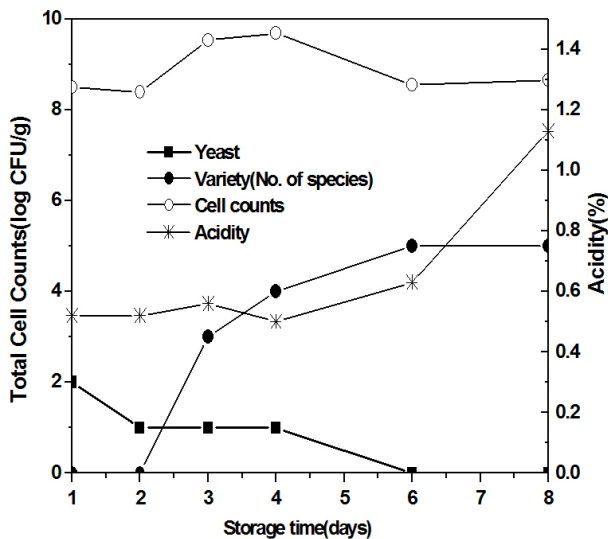


Fig. 1. Changes in total cell counts, bacterial variety and acidity of Makgeolli during storage at 25°C.

Table 1. Acid producing activities of the microorganisms isolated from the acidified Makgeolli

Bacterial strains	Size of clear zone(mm)					
	MRS(CaCO <sub>3</sub> )			YPD(CaCO <sub>3</sub> )		
	1 day	2 day	3 day	1 day	2 day	3 day
JM1YS2	-	-	-	-	-	-
JM3YS1	±	±	+	±	±	±
JM3YS2	-	-	-	-	±	±
JM3YS3	±	+	++	-	±	±
JM3YS4	-	-	±	±	±	±
JM4YS1	-	±	++	±	+	++
JM4YS2	±	+	+++	±	±	±
JM4YS3	-	-	±	-	±	±
JM4YS4	-	-	+	±	-	-
JM6YS4	-	-	+++	±	±	-
JM8YS1	-	±	+	±	+	++
JM8YS2	-	-	++	+	++	+++
JM8YS4	±	+	++	±	±	±

-: None, ±: very weak(<9 mm), +: weak(9~12 mm), ++: moderate (12~15mm), +++: strong(> 15 mm)

투명대를 형성했고, 그 외 투명대가 큰 JM4YS1과 투명대가 약한 JM3YS2와 JM4YS3를 분리하였다(Table 1).

산 생성이 강한 JM8YS2, JM4YS1와 산 생성이 약한 JM3YS2, JM4YS3를 시판 막걸리에 각각 따로 접종하고, 30°C에서 6일간 저장하면서 산도를 관찰하였다. 산도는 JM8YS2가 저장 5

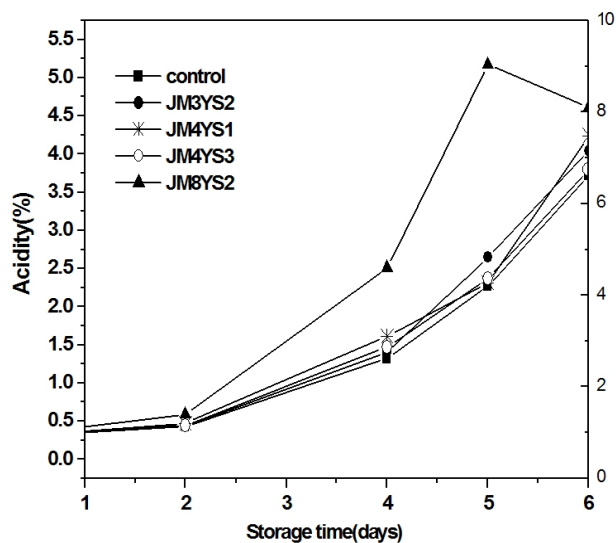


Fig. 2. Acidity of Makgeolli treated with the isolated microorganisms during storage at 30°C. Makgeolli 50 ml was inoculated with 1 ml (2%) MRS culture.

일차까지 0.27%에서 5.17%로 증가 폭이 가장 컸다. 대조구, JM3YS2, JM4YS1와 JM4YS3는 0.27%에서 3.00%까지 증가하면서 비슷한 양상을 보였다(Fig. 2).

JM8YS2가 다른 균에 비해 산도가 월등히 높게 나타나 막걸리 산패의 주 원인균 중의 하나가 JM8YS2임을 확인할 수 있었다.

#### 4. 막걸리 산 생성 원인균의 동정

막걸리 산패의 주된 원인균인 JM8YS2는 동정하기 위해 순수 분리하는 중 두 균의 혼합체로 밝혀졌다. 이 두 균은 *Acetobacter pasteurianus*와 *Lactobacillus casei*로 각각 동정되었다. Sung CK(1998)은 소곡주에 존재하는 젖산균 *Lactobacillus* A, B 가 시어집의 원인균임을 보고한 바 있으나, 젖산균과 초산균에 의한 산패는 아직 보고된 바 없다.

#### 5. *A. pasteurianus*와 *L. casei*의 생 막걸리에서의 산패 효과

두 균의 시판 막걸리에서 산패 효과를 관찰하기 위해 생 막걸리 50 ml에 *A. pasteurianus*와 *L. casei*를 각각 그리고 혼합하여 2% 되도록 접종하고, 30°C에서 7일간 저장하면서 산도, 균총 분석을 하였다. 산도 변화는 *A. pasteurianus* 단독 접종인 경우 0.32%에서 6.03%로 크게 증가하였지만, *L. casei*는 0.32%에서 3.50%로 산 생성이 약하였다. 두 균을 혼합한 경우, 산도의 변화는 0.32%에서 6.38%로 *A. pasteurianus* 단독 접종한 경우보다 산 생성이 약간 더 많은 것으로 나타났다(Fig. 3). 이러한 결과로 보면 초산균인 *A. pasteurianus*가 주 산패균이며, 젖산균 *L. casei*와 공존하면서 산 생성에서 synergy 효과를

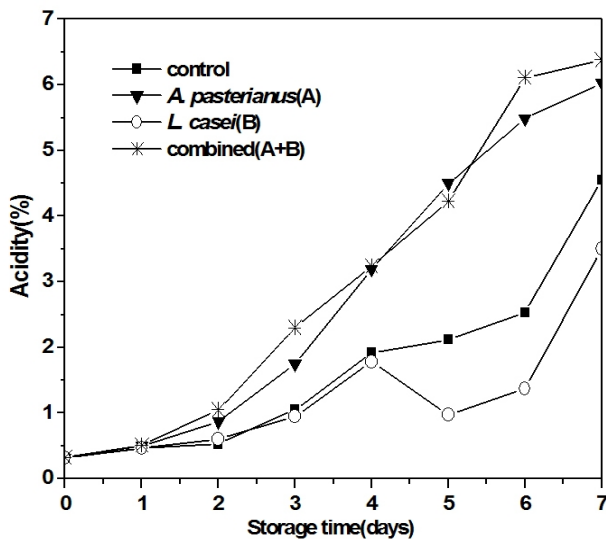


Fig. 3. Acidity of fresh Makgeolli treated with *A. pasteurianus* and/or *L. casei* during storage at 30°C.

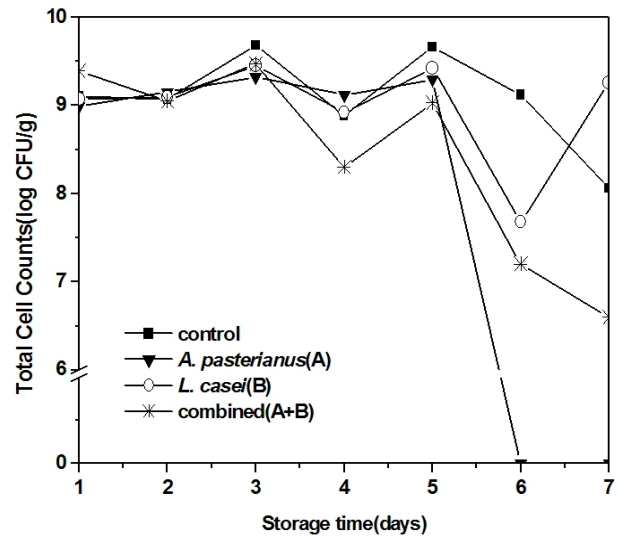


Fig. 4. Total cell counts of fresh Makgeolli treated with the *A. pasteurianus* and/or *L. casei* during storage at 30°C.

나타내는 것으로 보인다.

총 균수 변화를 보면, *A. pasteurianus*의 경우, 저장 1일째 8.99(log CFU/g)에서 5일째까지 균수가 유지되다가 6일째부터는 완전 사멸하였다(Fig. 4). *L. casei*는 대조구와 같이 배양 일 수에 따라 증가와 감소를 반복하다가 7일째 생균수가 1일째와 비슷하게 유지되었다. 혼합 접종인 경우 1일째 9.40에서 7일째 6.60으로 크게 감소하였다. 이러한 결과는 막걸리의 총균수가 막걸리의 산도에 의존함을 보여준다.

#### 6. *A. pasteurianus*와 *L. casei*의 열처리 막걸리 산패효과

막걸리 산패시 *A. pasteurianus*와 *L. casei*가 각각 독자적으로 산패를 일으키는지, 막걸리에 있는 타 균에 의해 산패를 일으키는지를 확인하기 위해 생 막걸리를 1 kg/cm<sup>2</sup> 121°C(Steam Sterilizer, HS-9090, Han Shin Medical Co., Ltd., Seoul, Korea)로 멸균하고, 이 열처리 막걸리 50 ml에 *A. pasteurianus*와 *L. casei*를 각각 그리고 혼합하여 2% 되도록 접종했다. 30°C에서 7일간 저장하면서 산도, 균총 분석하면서 생 막걸리와 비교 관찰하였다.

초산균인 *A. pasteurianus*를 첨가한 열처리 막걸리의 산도는 0.32%에서 2.74%로 크게 증가되었다(Fig. 5). *A. pasteurianus*와 *L. casei*를 혼합 접종한 열처리 막걸리는 *A. pasteurianus* 단독 첨가에 비해 산 생성이 높았고, *L. casei*는 0.32%에서 0.35%로 거의 증가되지 않았다. 생 막걸리의 결과와 마찬가지로 열처리 막걸리에서도 대조구와 *L. casei* 첨가구는 산 생성을 유도하지 못하는 반면, *A. pasteurianus* 단독 첨가와 *L. casei*와 혼합 첨가는 산 생성을 크게 유도하여 *A. pasteurianus*가 산패 원인균 중의 하나임을 알 수 있다. 총 균수에서도 *A. pasteurianus*

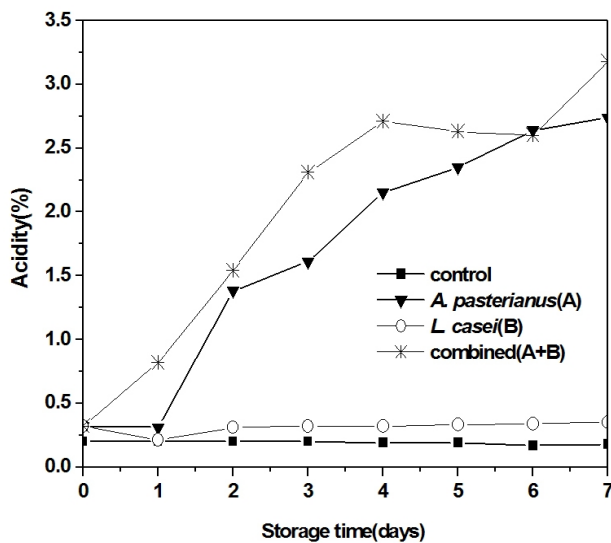


Fig. 5. Acidity of heat-treated *Makgeolli* treated with *A. pasteurianus* and/or *L. casei* during storage at 30 °C.

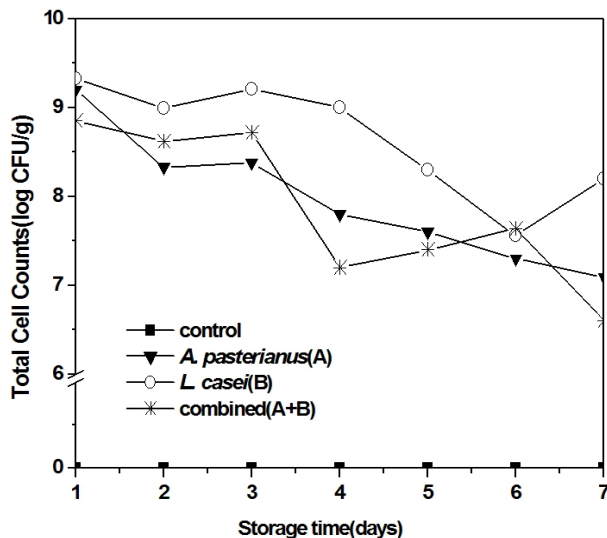


Fig. 6. Total cell counts of heat-treated *Makgeolli* treated with *A. pasteurianus* and/or *L. casei* during storage at 30 °C.

첨가 막걸리의 경우, 저장 1일째 9.20(log CFU/g)에서 6일째 7.30, 7일째 7.09로 감소했다. 대조구는 균의 성장이 없었고, *L. casei*는 1일째 9.33에서 7일째 8.20까지였다. 혼합 접종한 경우 1일째 8.85에서 7일째 6.60까지 감소했다(Fig. 6).

### 요약 및 결론

시판 막걸리의 유통 중 산패 원인균을 찾고자 시도한 결과를 요약하면 다음과 같다. 첫째, 막걸리를 실온 25°C에 저장

했을 때 3일째까지는 소량 증가하다가 6일째 0.63%, 8일째 1.02%로 산도의 급격한 증가와 동시에 효모의 완전 사멸로 막걸리 본연의 맛을 상실하였다. 둘째, 6~8일째 산도가 크게 증가하지만 균종수가 5종으로 일정하고, 총 균수가 6일째 8.55에서 8일째 8.65로 일정한 것은 산 생성균이 나타나는 등 균 종류의 변화를 의미한다. 이는 막걸리의 산패가 특정 산패 균이 발생하는 데 원인이 있음을 알 수 있다. 셋째, 산패된 막걸리에서 산 생성력이 가장 큰 균을 분리하였고, *A. pasteurianus*와 *L. casei*로 분리 동정되었다. 넷째, 막걸리를 30°C에서 7일간 저장하면서 *A. pasteurianus*와 *L. casei*를 각각 그리고 혼합하여, 생 막걸리 및 열처리 막걸리에 접종하였다. 생 막걸리에서의 산도 변화를 보면 *A. pasteurianus* 접종구가 저장 1일째 0.32%에서 7일째 6.03%로, *L. casei* 접종구는 0.31%에서 3.50%로 나타났으며, 혼합 접종구는 0.32%에서 6.38%로 나타나 *A. pasteurianus* 접종구와 혼합 접종구에서의 산 생성이 크게 증가하였다. 열처리 막걸리에서도 생 막걸리와 마찬가지로 *A. pasteurianus* 접종구와 혼합 접종구의 산 생성이 크게 증가하여 *A. pasteurianus*가 주 산패균이고, *A. pasteurianus*는 *L. casei*와 혼합될 때 산 생성에서 synergy 효과를 나타내었다.

### 참고문헌

- Blast. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>. 2010.9.3 방문
- Cha YJ, Park KJ, Kim DK, Chun HS, Lee BK, Kim KH, Lee SY, Kim SJ. 1994. Isolation and characterization of cellulose producing *Acetobacter xylinum* KI strain. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* 22:571-576
- Chang JH. 1989. History of Korean spirits. *Korean J Dietary Culture* 4:271-274
- Hong HG. 1984. The effect on the composition of takju of addition of nuruk under varied conditions. MS Thesis, Seoul Women's University. Seoul. Korea
- J Ames M Jay. 2000. Modern Food Microbiology. 6th ed. pp. 149-152. APAC Pub.
- Jung BK. 2007. Studies on Takju brewing with red yeast rice. MS Thesis, Seoul National University of Science and Technology. Seoul. Korea
- Jung EK, Kim SJ, Joo NM. 2011. Consumption and satisfaction evaluation of *Takju* among consumers ages 20 to 29. *J Korean Diet Assoc* 17:47-57
- Jwa MK, Lim SB, Song DJ, Kim BO. 2000. Quality changes of commercial *Yakju* and *Takju* during storage. *Cheju Journal of Life Science* 3:3-9

- Kim JH, Lee SJ, Jung YW, Park SY, Shin WC, Park CS, Hong SY, Kim GW. 2011. Composition of organic acids and physiological functionality of commercial *Makgeolli*. *Korean J Food Sci Tec* 43:206-212
- Kim JH, Lee SY, Kim KBWR, Song EJ, Kim AR, Kim MJ, Ji KW, Ahn IS, AH DH. 2007. Effects of *Glycyrrhiza uralensis*, *Menthae herba*, *Schizandra chinensis* and chitosan on the shelf-life and quality of *Takju*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36:1436-1443
- Kim MY. 2011. Effect of inoculation level of starter culture (*Acetobacter aceti*) and acetic acid addition on fermentation of *Makgeolli* vinegar. MS Thesis, Konkuk University. Seoul. Korea
- Kirsop BE, Snell JJS. 1984. Maintenance of Microorganisms. pp. 35-40. Academic Press. London
- Lee CH, Kim GM. 1995. Determination of the shelf-life of pasteurized Korean rice wine, *Yakju*, in aseptic packaging. *Korean J Food Sci Technol* 27:156-163
- Lee HO. 2008. Studies on Takju brewing with birch sap. MS Thesis, Seoul National University of Science and Technology. Seoul. Korea
- Lee JS, Lee TW. 1970. Studies on the microflora of *Takju* brewing. *Korean J Microbiol* 8:116-133
- Min JH, Baek SY, Lee JS, Kim HK. 2011. Changes of yeasts and bacterial flora during the storage of Korean traditional *Makgeolli*. *Kor J Mycol* 39:151-153
- MSU Ribosomal Database Project. <http://rdp.cme.msu.edu>. 2010. 9.3 방문
- Park CS, Lee TS. 2002. Quality characteristics of *Takju* prepared by wheat flour *Nuruks*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 296-320
- Seo MY, Lee JK, Ahn BH, Cha SK. 2005. The changes of microflora during the fermentation of *Takju* and *Yakju*. *Korean J Food Sci Technol* 37:61-66
- So MH, Lee YS, Noh WS. 1999. Changes in microorganisms and main components during *Takju* growing by a modified *Nuruk*. *Korean J Food & Nutr* 12:226-232
- Sung CK. 1998. Development of natural food preservatives from agricultura products. Ph.D. Thesis, Chungnam National University. Daejeon. Korea
- Technical Service Institute of National Tax Service. 1997. Manufacturing Guideline of Alcoholic Beverages. pp.83-176

---

접 수 : 2012년 10월 19일  
 최종수정 : 2012년 12월 3일  
 채 택 : 2012년 12월 4일