

## Analysis of Microbial Diversity in Nuruk Using PCR-DGGE

Seung Jik Kwon<sup>1</sup> and Jae Hak Sohn<sup>2\*</sup><sup>1</sup>Division of Bacterial Respiratory Infections, Korea National Institute of Health, Osong 363-951, Korea<sup>2</sup>Department of Bio-food material, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received November 25, 2011 / Revised January 25, 2012 / Accepted January 25, 2012

Nuruk plays a significant role in the flavor and quality of *Takju* and *Yakju*, which are produced through saccharification and alcohol fermentation by various microorganisms. In this study, we identified microbial strains isolated from a plate count and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis targeting the 16S and 28S rRNA genes, in order to characterize bacterial and fungal diversity in Sansung Nuruk. The numbers of bacteria and fungi in Nuruk were  $1.5 \times 10^9$  CFU/g and  $2.2 \times 10^8$  CFU/g, respectively. The 16S rRNA gene sequence indicated that the predominant bacteria in the isolates and PCR-DGGE profile of Nuruk were *Kocuria* spp., *Pantoea* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Weissella* spp., *Staphylococcus* spp., endophytic bacterium, uncultured *Gamma-proteobacteria*, uncultured *Cyanobacteria*, and *Actinobacteria*. Dominant bacteria from the PCR-DGGE profile were *Pediococcus pentosaceus* and uncultured *Cyanobacteria*. The 28S rRNA gene sequence indicated the predominant fungi in the isolates and PCR-DGGE profile to be *Trichomonascus* spp. *Pichia* spp., *Torulasporea* spp., *Wickerhamomyces* spp., *Sacharomycopsis* spp., *Lichtheimia* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp. *Aspergillus* spp., and *Cladosporium* spp. Dominant fungi from the PCR-DGGE profile were *Pichia kudriavzevii* and *Aspergillus oryzae*. The PCR-DGGE technique was used for the first time in this study to assess a microbial community in Nuruk and proved to be an effective protocol for profiling microbial diversity.

**Key words** : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Nuruk, 16S rRNA gene, 28S rRNA gene, Takju

## 서 론

누룩은 우리나라의 전통주인 탁주 및 약주의 양조에 있어서 쌀 등의 전분질 원료를 분해하는 amylase를 비롯한 각종 가수분해효소를 공급하고 효모와 발효관련 미생물의 접종원으로 중요한 역할을 하고 있으며 이는 종류나 질에 따라 주질에 미치는 영향이 매우 크다[5].

누룩 미생물에 관한 연구는 1900년대 초부터 시작하여 세균, 효모 및 진균 등 다양한 종이 영양배지를 이용하여 분리·동정되었다. 유 등[26]의 보고에 따르면 1906년에서 1945년 사이에 다양한 세균(4속 16종), 효모(8속 29종) 그리고 사상균(12속 59종)이 보고 되었으며 이후 분류·동정기술의 발달에 의해 세분화된 종들이 추가적으로 보고되었다[4,5,6,8,9,19,20,21,24]. 누룩으로부터 유산균의 분리·동정은 누룩이 탁주의 발효에 있어 전분의 가수분해와 알코올발효에 대한 역할 외에 탁주가 발효식품으로서 영양학적 가치를 높이는 데 주요한 역할을 하였다[5,19].

분자생물학적 기술은 미생물군집의 구조, 다양성을 밝히기 위해 이용되었으며, 미생물들은 16S 또는 28S rRNA gene과 같은 분자마커를 이용한 미생물의 동정을 위해 흔히 사용되어

왔다[25]. DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 분석에서 크기는 동일하나 서열이 다른 DNA 증폭자 (amplicons)를 분리할 수 있었다. 이러한 기술은 토양[18], 해양[1], 곤충[17], sludge [23] 등 다양한 환경에서 미생물의 dynamics 연구를 위해 광범위하게 이용되고 있다. 또한 이러한 방법은 김치[2], 와인[3], sausage [16], sourdough [13], coffee [12]와 같은 식품에서 yeast 다양성 연구에도 이용되어왔다.

본 연구에서는 16S와 28S rRNA 유전자를 이용한 PCR-DGGE 기술을 이용하여 탁주제조를 위한 전통누룩의 미생물 군집 다양성에 대한 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

## 누룩의 전처리

누룩시료로는 (유)금정산성토산주에서 산성막걸리 생산을 위해 제조된 산성누룩을 사용하였다. 시료의 균질화는 누룩 10g을 분쇄하여 이루어졌으며 이중 2g은 미생물계수를 위해 그리고 2g은 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 분석을 위해 이용하였으며 나머지는 균주 보관용 -70℃ 냉동고에 보관하였다.

## 미생물 count 및 분리

균질화된 누룩 1g을 생리식염수 9 ml에 첨가하여 연속희석

## \*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5629, Fax : +82-51-999-5458

E-mail : jhsohn@silla.ac.kr

법으로 희석한 후 일반세균은 Plate Count Agar (PCA; Difco, USA) 배지에 진균은 Potato Dextrose Agar (PDA; Difco, USA) 배지에 도말하여 접종하였다. 배양은 25°C에서 수행하였으며 PCA는 3일간 그리고 PDA는 5일간 배양 한 후 성장된 집락 (colony)을 계수하였다. 미생물의 분리는 성장된 집락의 모양과 색을 기준으로 동일배지를 이용하여 분리하였으며 순수 분리된 균주는 20% (v/v) glycerol에 현탁 한 후 -70°C에서 보존하였다.

#### Total genomic DNA의 추출

누룩으로부터 세균과 진균의 genomic DNA 추출을 위한 세포파쇄를 위해 균질화된 누룩 1 g을 막자 사발에 넣고 액체 질소를 이용하여 세포파쇄를 하였으며 동일과정을 4회 반복 하였다. Genomic DNA의 추출은 hot phenol extraction법 [11]에 의거하여 수행하였으며 그 방법은 다음과 같다. 액체질소에 첨가한 파쇄된 시료 0.25 g은 Lysis buffer (50 mM Tris-base, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.75 M sucrose) 1 ml, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 100 µl를 첨가한 후 60°C에서 15분간 반응하였다. 시료에 RNase A (10 mg/ml)를 10 µl첨가한 뒤 상온에서 5분 반응시킨 후 원심분리(16,000×g 10 min)하여 상등액 750 µl를 취하였다. 동량에 phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 혼합한 후 원심 분리(16,000×g 10 min)를 통하여 상등액 600 µl를 취하였다. 이 상등액에 동량의 chloroform: isoamyl alcohol (24:1)를 넣고 원심 분리한 후 상등액 400 µl를 빈 튜브에 옮기고 100% cold ethanol 1 ml, 3 M sodium acetate 40 µl를 첨가하여 -20°C에서 200분 이상 정치하였다. 이후, 튜브를 원심분리(14,000×g 10 min)한 후 상등액을 제거하고 70% cold ethanol 1 ml를 사용하여 혼합한 후 원심 분리하여 상등액을 제거하고 건조하였다. 최종적으로 100 µl의 증류수에 용해한 후 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 한 후 ethidium bromide (EtBr)로 염색하여 확인하였다.

#### Polymerase Chain Reaction (PCR)

누룩으로부터 얻어진 총 genomic DNA를 주형으로 하여 16S rRNA와 28S rRNA gene을 증폭하여 PCR산물을 획득하였다. 세균은 16S rRNA gene 증폭을 위한 universal primer인 27F primer (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R primer (5'-GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 이용하여 증폭하였으며[7], 증폭을 위한 프로그램은 다음과 같다: 94°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 denaturation 30초, 56°C에서 annealing 15초, 74°C에서 extension 1분 과정을 30 cycle 반복한 후, 74°C에서 5분 동안 post-extension 하였다. 진균은 28S rRNA gene의 증폭을 위한 D1/D2영역의 eukaryotic universal primer인 LROR primer (5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC-3')와 LR5 primer (5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3')를 이용하여 증폭하였으며(Vilgaly,

<http://www.biology.ducke.edu/fungi/mycolab/primers.htm>), 증폭을 위한 프로그램은 다음과 같다: 94°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 denaturation 30초, 56°C에서 annealing 15초, 74°C에서 extension 50초 과정을 30 cycle 반복한 후, 74°C에서 5분 동안 post-extension하였다. 반응산물은 1.5% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 EtBr로 염색하여 확인 한 다음 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)를 사용해 정제하였다.

#### DGGE-PCR

DGGE-PCR은 세균과 진균의 경우 모두 16S rRNA와 28S rRNA gene의 증폭산물을 주형으로 nested-PCR과 touch down PCR을 병행하여 수행하였다. 16S rRNA gene으로 부터 DGGE-PCR을 위한 primer는 GC-clamp인 338F-GC primer (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 518R primer (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')[15]이었으며 PCR을 위한 조건은 다음과 같다. 94°C에서 3 분 동안 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 denaturation 30초, 64~55°C touchdown으로 30초, 74°C에서 extension 30초 과정을 30 cycle 반복한 후, 74°C에서 7분 동안 post-extension하였다. 28S rRNA gene으로 부터 DGGE-PCR을 위한 primer는 GC-clamp인 NL-1 primer (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')와 LS-2 primer (5'-ATT AAA CAA CTC GAC TC-3')[3]이었으며 PCR을 위한 조건은 16S rRNA의 경우와 동일하게 수행하였다.

#### DGGE

DGGE는 Bio-Rad Dcode™ universal mutation detection system (Bio-Rad, USA)를 이용하여 수행하였다. DGGE running 조건은 두 경우 모두 8%의 polyacrylamide gel을 사용하였고 denaturant의 농도는 16S rRNA gene 일 때 40~60%, 28S rRNA gene 일 때 35~55%로 제작 하였으며 두 경우 모두 50 V로 14 hr 동안 전기영동하여 EtBr로 염색한 후 UV를 이용하여 확인하였다[2].

#### DGGE band elution 및 sequencing

산성누룩의 Total DNA DGGE running에서 관찰 되는 16S rRNA gene, 28S rRNA gene band pattern에 의해 band로 판단한 부분을 E-tube에 담은 후 100 µl의 TE buffer를 넣고 elution 과정을 진행하였다. -70°C와 60°C를 번갈아 가면서 열렸다 녹였다를 2번 반복하여 DNA가 용출 되도록 유도하고 4°C에서 overnight 하였다. 용출된 밴드를 주형 DNA로 사용하여 16S rRNA gene 대상은 338F-GC, 518R primer, 28S rRNA gene 대상은 GCNL-1, LS-2 primer를 이용하여 DNA를 증폭하였다. 증폭된 산물은 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)

로 정제 한 뒤 (주)코스모진텍에 의뢰하여 sequencing을 수행하였다.

순수 분리된 미생물의 동정

순수분리된 세균을 PCA에 도말하여 25℃에서 2일간 배양한 후 Insta Gene Matrix (Bio-Rad, USA)를 이용한 colony PCR을 수행하였다. 증폭을 위한 반응은 누룩의 total genomic DNA를 이용한 16S rRNA gene의 경우와 동일한 조건으로 수행하였다. 진균의 경우 PDA에 도말하여 25℃에서 5일간 배양한 후 균체를 액체질소로 균질화 하였으며, PCR 증폭은 누룩의 total genomic DNA를 이용한 28S rRNA gene의 경우와 동일한 조건으로 PCR을 수행하였다. 세균과 진균의 PCR산물은 (주)코스모진텍사(한국)에 의뢰하여 sequencing을 수행하였다.

염기서열 분석

확보된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI)의 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 에 등록되어 있는 database를 사용하여 검색하였으며, 높은 유사성을 가지는 염기서열을 기초로 하여 group별로 정리한 후, PHYDIT (developed by Dr. J. Chun, version 3.2) 운영프로그램을 이용하여 CLUSTAL\_X software, version 1.64b[22]에 의한 alignment와 similarity를 통해 sequence data들을 비교하였다.

결과 및 고찰

누룩 내 미생물의 수와 순수 분리된 종의 동정

(유)금정산성토산주의 누룩에서 일반세균은  $2.7 \times 10^9$  CFU/g, 진균은  $3.5 \times 10^8$  CFU/g으로 나타났다(Fig. 1). 세균 수는 진균 보다 약 10배 높게 나타났다. 김과 고[10]의 보고에 따르면 전국에서 수집한 35종의 전통누룩에서 진균의 수는  $6.4 \times 10^5 \sim 4.5 \times 10^7$  CFU/g수준으로 나타났으며 본 결과에서 진균의 수가 다소 높게 나타났다. 배양된 plate에서 대표 종과 PCR-DGGE profile에서 우점종과의 비교를 위해 상기 계수된 plate로부터 colony의 형태적인 차이에 의해 대표성을 갖는 세균 4종과 진균 8종을 순수분리하였다. 분리균을 대상으로 16S 및 28S rRNA gene염기서열을 결정하였으며 NCBI의 Gnenbank에 등록된 미생물과의 BLAST search를 통하여 가장 높은 유사성을 나타낸 종을 대상으로 동정한 결과는 Table 1에 나타내었다. 4종의 분리세균은 Actinobacteria인 *Kocuria rhizophila*, *K. halotolerans*, Proteobacteria인 *Pantoea agglomerans* 그리고 유산균인 *Pediococcus pentosaceus*로 동정되었다. 8종의 분리된 진균은 조상균인 *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus microspores* (2종), 자낭균류인 *Aspergillus oryzae*, *Cladosporium cladosporioides*, 그리고 효모성 진균인 *Trichomonascus farinosus*, *Pichia kudriavzevii* 로 동정되었다.

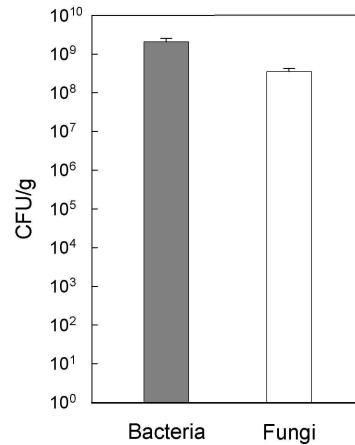


Fig. 1. Numbers of bacteria and fungi in traditional Nuruk.

Table 1. Identification of bacteria and fungi isolated from traditional Nuruk

Isolated strain No.	Closest relative (GenBank Accession No.)	Sequence homology (%)
Bacteria		
B1	<i>Kocuria rhizophila</i> (AP009152)	99
B2	<i>Pantoea agglomerans</i> (GU477762)	99
B3	<i>Pediococcus pentosaceus</i> (AB481102)	99
B4	<i>K. halotolerans</i> (DQ979377)	98
Fungi		
F1	<i>Lichtheimia corymbifera</i> (FJ345350)	99
F2	<i>Mucor racemosus</i> (AJ271061)	98
F3	<i>Rhizopus microspores</i> (AB363776)	98
F4	<i>Trichomonascus farinosus</i> (DQ442685)	95
F5	<i>Cladosporium cladosporioides</i> (GU214409)	99
F6	<i>Pichia kudriavzevii</i> (EF550222)	100
F7	<i>Aspergillus oryzae</i> (AP007172)	99
F8	<i>R. microspores</i> (AB363776)	97

DGGE를 이용한 세균의 다양성 분석

누룩으로부터 얻어진 total genomic DNA로부터 16S rRNA gene을 이용한 nested-PCR을 수행하였으며 세균의 다양성을 알아보기 위해 DGGE를 수행 하여 Fig. 2A에 나타내었다. DGGE분석 결과 16개의 구분되는 band를 확인하였으며 그 중 3개의 band가 다른 band들에 비하여 밀도가 높게 나타나 주된 우점균으로 판단되었다. 각 band의 DNA를 회수하여 염기서열을 결정한 후 NCBI의 BLAST search를 통하여 유사성이 높은 종을 대상으로 동정한 결과를 Fig. 2B에 나타내었다. 그 결과 *Lactobacillus*속(2종), *Pediococcus*속, *Weissella*속(2종), *Staphylococcus*속, *Pantoea*속(2종)으로 나타났으며 그 외 uncultured bacterium, endophytic bacterium, uncultured *Cyanobacteria*와 *Actinobacteria*로 총 9속을 확인할 수 있었다. 또한 누룩 내 세균들 중에서 유산균이 많은 비율을 차지하였다. DGGE profile에서 band의 밀도를 비교하였을 때 주된 우

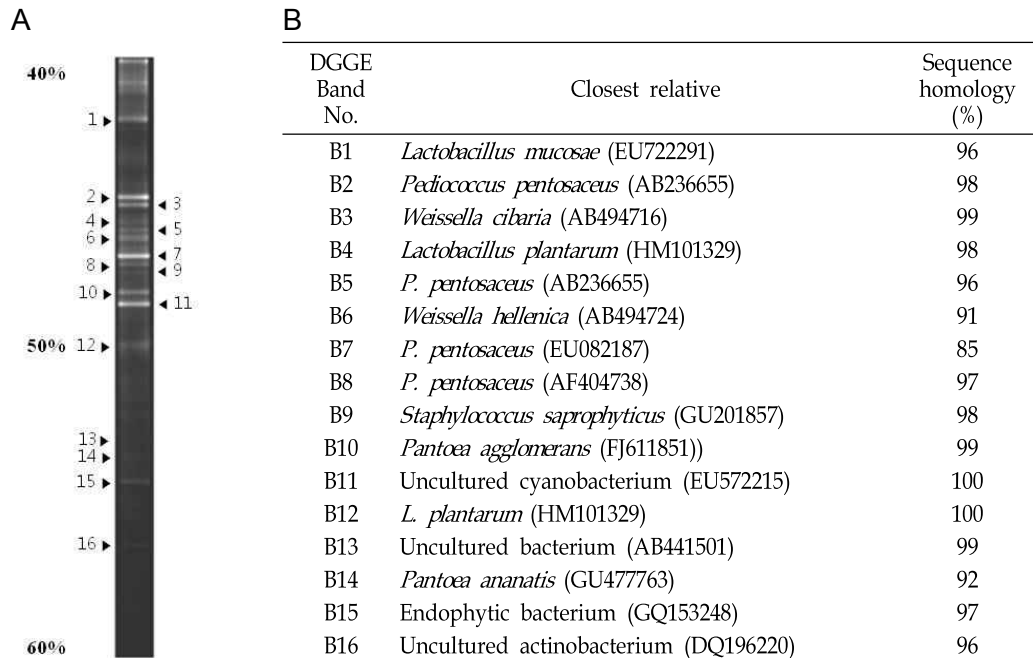


Fig. 2. DGGE profile of PCR-amplified 16S rRNA synthesized from the DNA extract of traditional Nuruk. (A) DGGE profile. (B) List of bacterial strains identified from the sequence of each DGGE band.

접세균은 *Pediococcus pentosaceus* (B2와 B7) 그리고 비배양균인 *Cyanobacteria* (B11)로 판단된다. DGGE profile과 비교하여 PCA배지로부터 분리된 세균(Table 1)은 *P. pentosaceus*와 *Pantoea agglomerans*였으며 그 외는 일치하지 않았다. 특히 배양에서 분리된 Actinobacteria인 *Kocuria rhizophila*와 *K. halotolerans*는 DGGE profile에서 동일 종은 검출되지 않았으나 uncultured actinobacterium이 검출되었다. 또한 DGGE방법은 PCR방법에 의존하기 때문에 검출한계인  $10^4$  cells 이하의 낮은 개체수로 인하여 검출되지 않은 것으로 사료된다. 국내에서 보고된 누룩 세균은 *Bacillus*, *Micrococcus*, *Mycoplana*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterococcus*으로 총 11개의 속[5,19,24,26]이며 기존에 보고된 2개의 속 외에 본 연구에서 새로 7속을 확인할 수 있었다.

국내 누룩에서 분리된 세균으로는 1945년 이전 국내 누룩 세균에 대한 고찰에서 *Bacillus*속(3종), *Micrococcus*속(4종), *Mycoplana*속(1종), *Erwinia*속(2종)이 동정되었다고 보고하였다[26]. 신과 조[19]는 *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Aerobacter*속, *Pseudomonas* 속 등의 세균을 보고하였다. 양과 이[24]는 산성누룩에서 *Micrococcus varians*, *Bacillus subtilis*를, 그리고 조와 하[5]는 국내 누룩 유산균으로 *L. mesenteroides*, *Pediococcus acifilactici*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus murinus*, *Enterococcus faecium*을 보고하였다. DGGE 분석결과와 비교할 때 *L. plantarum*을 제외한 대부분의 세균은 누룩에서 처음으로 보고된 종으로 판단된다.

누룩에서 순수분리된 균주와 비교하였을 때 DGGE 분석결과와는 누룩 세균군집의 다양성을 보다 효율적으로 확인할 수 있었을 뿐만 아니라 종간의 풍부성(richness)의 상대적인 비교를 간접적으로 확인할 수 있었다(Table 1; Fig. 2).

#### DGGE를 이용한 진균의 다양성 분석

누룩으로부터 얻어진 total genomic DNA로부터 28S rRNA gene을 이용한 nested-PCR을 수행하였으며 누룩 진균의 다양성을 알아보기 위해 DGGE를 수행 하여 Fig. 3A에 나타내었다. 그 결과 DGGE profile에서 총 8개의 구분되는 band를 확인하였으며 2개의 band가(E7과 E8) 상대적으로 밀도가 높아 우점균으로 판단된다.

각 band로부터 DNA를 회수하여 염기서열을 결정 한 후 NCBI BLAST search를 통하여 유사성이 높은 종을 대상으로 동정한 결과 Fig. 3B에 나타내었다. 그 결과 누룩 진균은 *Pichia* 속, *Torulasporea* 속, *Wickerhamomyces* 속, *Sacharomycopsis* 속, *Aspergillus* 속으로 5개의 속이었다. 이는 기존에 보고된 누룩 진균의 속인 *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Absidia*, *Penicillium*, *Monascus*, *Amycolmyces*, *Saccharomyces*, *Endomyces*, *Pichia*, *Hansenulas*, *Torulopsis*, *Candida* [4,6,8,9,20,21,24,26]와 비교하여 (유)금정산성토산주에서 생산되는 누룩의 DGGE 결과에서 사상성 진균인 *Aspergillus oryzae*를 제외한 종은 검출되지 않았으나 효모성 진균인 *Sacharomycopsis fibuligera*, *Torulasporea delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Trichosporon asahii*는 누룩진균으로 처음 확인할 수 있었다. 또한 DGGE 분석에서

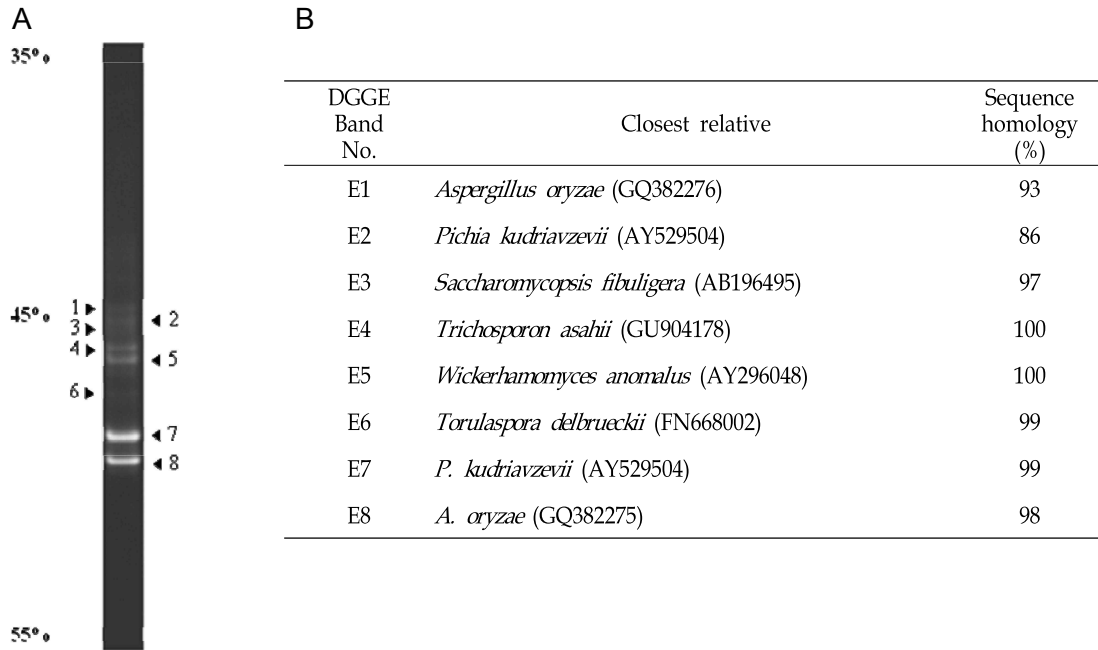


Fig. 3. DGGE profile of PCR-amplified 28S rRNA synthesized from the DNA extract of traditional Nuruk. (A) DGGE profile. (B) List of fungal strains identified from the sequence of each DGGE band.

높은 밀도를 보인 E7은 *Pichia kudriavzevii* 그리고 E8은 *A. oryzae*로 동정되어 (유)금정산성토산주의 누룩에서 주된 진균으로 나타났다.

누룩으로부터 분리된 진균은 총 8종으로 효모성 진균이 2종 그리고 조상균이 4종 그리고 자낭균이 2종으로(Table 1) DGGE 분석결과와 비교하였을 때 *P. kudriavzevii* 와 *A. oryzae* 인 2종만이 일치하였다. 이러한 종간의 불일치는 성장배지에서 분리된 진균들의 경우 성장된 균체의 형태적인 특성에 기초하여 분리하였기 때문으로 사료된다. 누룩에 존재하는 세균, 효모 및 사상성 진균의 세포(포자를 포함)로부터 total genomic DNA를 추출하기 위해 세포파쇄는 액체질소 균질화 방법을 적용하였다. 일반적으로 성장세포보다는 포자의 파괴 효율이 다소 낮을 수는 있지만 Fig. 3에서 *A. oryzae*가 주된 우점종 중의 한 종으로 검출되어 사상성 진균의 세포 또는 포자 파쇄에 문제점은 낮은 것으로 판단된다. 시료에 존재하는 미생물의 검출효율에 있어 PCR-DGGE 기술은 시료 내에 종의 개체수가 10<sup>4</sup> cells 이하일 경우 검출되지 않는 한계성을 갖고 있어[14], 배양방법에 의해 분리된 사상성 진균은 낮은 개체수로 인하여 검출되지 않은 것으로 판단된다.

본 연구로부터 PCR-DGGE를 이용한 분자학적 기법은 누룩에서 세균, 효모 및 진균의 다양성을 설명하는 데 유의한 분석 방법임을 확인하였다. 세균의 경우 배양 가능한 8종과 비배양 균인 4종의 존재를 확인하였다. 또한 진균의 경우 다양한 효모와 사상성 진균의 존재를 확인하였다. 반면 PCR-DGGE방법의 종의 검출한계성으로 낮은 개체수의 종까지 설명하는 데는

한계성이 있음을 확인하였다. 그러나 PCR-DGGE기술은 누룩 내 존재하는 종의 다양성을 효율적으로 설명하고 있어 누룩 내 존재하는 유용한 미생물자원의 확보 그리고 누룩의 기능, 품질평가 및 개량누룩의 개발 등을 연구하는 데 유용한 방법으로 활용할 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

본 논문은 지식경제부 지역연구사업의 연구비 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

### References

- Bowman, J. P., S. A. McCammon, J. A. Gibson, L. Robertson, and P. D. Nichols. 2003. Prokaryotic metabolic activity and community structure in Antarctic continental shelf sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2448-2462.
- Chang, H. W., K. H. Kim, Y. D. Nam, S. W. Roh, M. S. Kim, C. O. Jeon, H. M. Oh, and J. W. Bae. 2008. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* **126**, 159-166.
- Cocolin, L., L. F. Bisson, and D. A. Mills. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* **189**, 81-87.
- Ha, D. M., D. C. Kim, S. M. Hong, and C. W. Lee. 1989. Identification and properties of starch utilizing yeasts isolated from Nuruk. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **32**, 408-415.

5. Jo, K. Y. and D. M. Ha. 1995. Isolation and identification of the Lactic acid bacteria from Nuruk. *Agri. Chem Biotechnol.* **38**, 95-99.
6. Jung, H. K., C. H. Park, G. D. Lee, S. C. Park, H. H. Park, and J. H. Hong. 2007. Characteristics of *Pichia anomala* K15 producing killer toxin isolated from traditional nuruk. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1077-1082.
7. Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp. 115-175, In Stackebrandt, E. and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematic*, John Wiley & Sons. New York.
8. Lee, S. H., H. J. Jung, S. H. Yeo, H. S. Kim, and T. S. Yu. 2004. Characteristics of  $\alpha$ -amylase of a new species *Aspergillus coreanus* NR 15-1. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 301-307.
9. Kim, H. S., J. S. Hyun, J. Kim, H. P. Ha, and T. S. Yu. 1998. Enzymological characteristics and identification of useful fungi isolated from traditional Korean nuruk. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 456-464.
10. Kim, J. Y. and J. S. Kho. 2004. Screening of brewing yeasts and saccharifying molds for foxtail millet-wine making. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **47**, 78-84.
11. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of DNA from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **3**, 208-218.
12. Masoud, W., L. B. Cesar, L. Jespersen, and M. Jakobsen. 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* **21**, 549-556.
13. Meroth, C. B., W. P. Hammes, and C. Hertel. 2003. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 7453-7461.
14. Mills, D. A., E. A. Johannsen, and L. Cocolin. 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4884-4893.
15. Muyzer, G., E. D. Waal, and A. G. Uitterlinden. 1993. 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.
16. Rantsiou, K., R. Urso, L. Iacumin, C. Cantoni, P. Cattaneo, G. Comi, and L. Cocolin. 2005. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1977-1986.
17. Reeson, A. F., T. Jankovic, M. L. Kasper, S. Rogers, and A. D. Austin. 2003. Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespa germanica*. *Insect Mol. Biol.* **12**, 85-91.
18. Sharma, S., Z. Szele, R. Schilling, J. C. Munch, and M. Schlöter. 2006. Influence of freeze - thaw stress on the structure and function of microbial communities and denitrifying populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2148-2154.
19. Shin, Y. D. and D. H. Cho. 1970. A study on the microflora changes during Takju brewing. *Korean J. Microbiol.* **8**, 53-64.
20. So, M. H. and Y. S. Lee. 2009. Effects of culture conditions of *Rhizopus* sp. ZB9 on the production of saccharifying amylase during the preparation of rice koji. *Korean J. Food Nutr.* **22**, 644-649.
21. Suh, M. J. and K. H. Nho. 1987. Studies on the screening and properties of raw starch saccharifying microorganism. *Korean J. Mycol.* **15**, 169-174.
22. Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **25**, 4876-4882.
23. Xia, S., Y. Shi, Y. Fu, and X. Ma. 2005. DGGE analysis of 16S rDNA of ammonia-oxidizing bacteria in chemical - biological flocculation and chemical coagulation systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 99-105.
24. Yang, J. Y. and K. H. Lee. 1996. Shelf-life and microbiological study of Sansung Takju. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 779-785.
25. Yeates, C., M. R. Gillings, A. D. Davison, N. Altavilla, and D. A. Veal. 1998. Methods for microbial DNA extraction from soil for PCR amplification. *Biol. Proced. Online* **1**, 40-47.
26. Yu, T. S., H. S. Kim, H. P. Ha, T. Y. Kim, and I. W. Yoon. 1996. Bibliographical study on microorganisms of Nuruk (Until 1945). *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**, 170-179.

---

**초록 : PCR-DGGE를 이용한 누룩에서의 미생물 다양성 분석**권승직<sup>1</sup> · 손재학<sup>2\*</sup>

(1국립보건연구원 질병관리본부, 2신라대학교 의생명과학대 바이오식품소재학과)

누룩은 탁주와 약주의 제조를 위한 당화효소와 알코올발효를 위한 미생물의 공급원으로서 제품의 맛과 품질을 결정하는 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 산성누룩의 세균과 진균의 다양성을 조사하기 위해 순수분리 종과 16S 및 28S rRNA gene를 대상으로 한 PCR-DGGE를 이용한 분석을 수행하였다. 누룩 내 세균의 수는  $2.7 \times 10^9$  CFU/g이었으며 순수분리와 PCR-DGGE 분석에서 우점종은 *Kocuria* spp., *Pantoea* spp., *Lactobacillus* spp., *Pediococcus* spp., *Weissella* spp., *Staphylococcus* spp. 그 외 endophytic bacterium, uncultured gamma-proteobacteria, uncultured *Cyanobacteria*와 *Actinobacteria*였다. PCR-DGGE profile에서 주된 우점종은 *Pediococcus pentosaceus*와 uncultured *Cyanobacteria* 이었다. 누룩 내 진균의 수는  $3.5 \times 10^8$  CFU/g이었으며 순수분리와 PCR-DGGE 분석에서 우점종은 *Trichomonascus* spp., *Pichia* spp., *Torulaspota* spp., *Wickerhamomyces* spp., *Sacharomycopsis* spp., *Lichtheimia* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Aspergillus* spp., *Cladosporium* spp.였다. PCR-DGGE profile에서 주된 우점종은 *Pichia kudriavzevii*와 *Aspergillus oryzae*이었다. PCR-DGGE 기술은 본 연구에서 누룩의 미생물군집을 평가하기 위해 처음으로 사용되었으며 미생물 다양성을 설명하는 데 효과적임을 입증하였다.