

Analysis of Microbial Diversity in Makgeolli Fermentation Using PCR-DGGE

Seung Jik Kwon¹, Tae-Young Ahn² and Jae Hak Sohn^{3*}¹Division of Bacterial Respiratory Infections, Korea National Institute of Health, Osong 363-951, Korea²Department of Microbiology, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea³Department of Bio-food material, College of Medical & Life Sciences, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received December 21, 2011 / Revised February 8, 2012 / Accepted February 23, 2012

Kumjungsansung-Makgeolli[®] is a traditional Korean rice wine that is fermented from traditional nuruk and rice. In this study, we performed the PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis targeting the 16S and 28S rRNA genes to characterize bacterial and fungal diversity during Makgeolli fermentation. The predominant bacteria in the PCR-DGGE profile during Makgeolli fermentation were *Lactobacillus* spp. (*Lactobacillus curvatus*, *L. kisonensis*, *L. plantarum*, *L. sakei*, and *L. gasser*), *Pediococcus* spp. (*P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. agglomerans*, and *P. pentosaceus*), *Pantoea* spp. (*P. agglomerans* and *P. ananatis*), and *Citrobacter freundii*; these were identified on the base of analysis of 16S rRNA gene sequences. The dominant bacterium during Makgeolli fermentation was *L. curvatus*. The predominant fungi in PCR-DGGE profile during Makgeolli fermentation were *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Asidia idahoensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, and *Torulasporea delbrueckii*, and these were identified on the basis of analysis of 28S rRNA gene sequences. The dominant fungal species during Makgeolli fermentation changed from *P. kudriavzevii* at 0-2 days incubation to *S. cerevisiae* at 3-6 days incubation. This study suggests that PCR-DGGE analysis could be a suitable tool for the understanding of microbial diversity and structure during Makgeolli fermentation.

Key words : Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), microbial diversity, 16S rRNA gene, 28S rRNA gene, Makgeolli

서론

막걸리는 한국의 민속주의 하나로 발효제와 전분질의 곡물을 이용하여 빚은 발효주로 알코올 함량이 6~8도인 저 도수의 알코올음료이다. 전통적으로 사용해온 발효제인 누룩은 대량 생산이 어렵고 다양한 microflora에 의해 막걸리의 품질안정성을 확보하는 데 어려움을 가지고 있어 1940년대 이후 발효제의 생산기간이 짧고 위생 및 당화력 등 품질 안정성이 높은 입국, 분국 및 효소제 등으로 발전해오고 있다[14]. 전분질의 곡물은 주로 쌀을 이용하고 있으나 좁쌀, 조, 기장 등도 활용되고 있으며[14,33,34,38] 최근에는 지역의 특산물인 구기자, 문맥동[1], 감초, 박하, 오미자[13], 백년초[25], 홍삼[37] 등을 첨가하여 소비자 기호를 높일 수 있는 다양한 막걸리가 생산되고 있다.

막걸리는 전분질의 곡물을 이용하여 발효되기 때문에 곡물의 종류에 따라 차이는 있지만 풍부한 탄수화물과 단백질을 포함하고 있으며 특히, 발효미생물인 유산균과 효모의 발효과정에서 생산된 유기산, 아미노산, 비타민, aromatic flavors 등으로 인하여 영양학적인 가치뿐만 아니라 독특한 맛과 향에

대한 특성이 보고되고 있다[19]. 또한 막걸리는 미생물의 발효과정 동안 생산된 산물로부터 향산화, 다양한 생리활성이 밝혀지고 있어 건강식품으로 그 가치가 재평가되고 있다[4,15, 21,29,30].

전통적인 미생물학적인 방법의 제한은 선택배지를 이용한 배양방법에 의해 세균, 유산균, 효모 등 미생물 군총의 변화에 한정되어 있으며 막걸리의 발효과정 동안 미생물군집의 구조와 다양성을 특성화하는 데 문제점을 안고 있다. 그러나 지난 수 십년 동안 분자생물학적 기술은 미생물군집의 구조와 다양성을 밝히기 위해 이용되었으며 미생물들은 16S 또는 28S rRNA gene과 같은 분자마커를 이용한 동정을 위해 흔히 사용되어 왔다[36]. 미생물생태학의 연구는 군집구조 연구를 위한 molecular fingerprinting 기술을 제공하는 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)와 temperature gradient gel electrophoresis (TGGE)의 도입으로 크나 큰 발전을 가져왔다[8]. DGGE분석에서 16S 또는 28S rRNA gene의 크기는 동일하나 서열이 다른 PCR산물을 분리할 수 있었으며 이 기술은 토양[28], 해양[2], 곤충[27], sludge [35] 등 다양한 환경에서 미생물의 dynamics 연구를 위해 광범위하게 적용되어 왔다. 또한 이러한 방법은 누룩[17], 김치[3], 와인[5,22], sausage [26], sourdough [24], coffee [23], 치즈[6]와 같은 식품의 발효과정에서 미생물의 다양성 연구를 위해 광범위하게 이용되어

*Corresponding author

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

E-mail : jhsohn@silla.ac.kr

왔다.

본 연구에서는 국내에서 유일하게 전통방식에 의해 생산되는 금정산성 막걸리의 발효과정에 따른 특성을 조사하였으며 특히, 16S와 28S rRNA 유전자를 이용한 PCR-DGGE분석을 이용하여 전통 막걸리의 발효과정 동안 미생물군집(세균과 진균) 구조와 다양성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

막걸리의 제조

막걸리의 제조는 (유)금정산성토산주에서 제조하는 금정산성 막걸리의 전통제조방식에 의해 조제하였다. 냉각순환 시스템이 설치된 1,000 l 용량의 스테인레스 용기에 증자된 멥쌀, 전통누룩((유)금정산성토산주 자체생산), 물을 첨가하여 혼합시켰다. 이후 25°C로 유지하여 6일간 발효시켰다. 시료는 0, 1, 2, 3, 5, 6일째에 발효조를 혼합한 후 2 l의 시료를 채취하여 냉장상태로 실험실에 운반한 후 미생물, 이화학 및 DGGE분석을 수행하였다.

미생물 계수 및 분리

균질화된 막걸리 1 ml를 생리식염수 9 ml에 첨가한 후 연속 희석법에 의해 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) glycerol용액에 현탁 한 후 -70°C에서 보존하였다.

이화학적 성분분석

pH는 pH meter (Mettler-Toledo, Switzerland)로 측정하였다. 총산은 1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH용액으로 적정하고 적정소비량에 0.009를 곱하여 시료 중의 산을 lactic acid로 계산하였다. 환원당은 Somogyi 방법 [12]에 의해 정량하였고 포도당농도로 환산하였다. 에탄올 함량은 발효액 100 ml에 증류수 30 ml을 넣어 증류시켜 증류액 70 ml에 증류수를 첨가하여 100 ml로 정용한 후 주정계 (Deakwang Inc., Korea)로 측정하였고 Gay-Lussac 표에 의해 15°C로 보정하여 % (v/v)로 표시하였다.

Total genomic DNA 의 추출 및 PCR

금정산성 막걸리로부터 세균과 진균의 genomic DNA 추출을 위해 잘 균질화된 30 ml 막걸리는 원심분리(15,000× g 4°C, 15 min)한 후 침전물을 회수하여 동결건조하였다. 동결건조된 분말을 막자 사발에 넣어 액체질소를 이용하여 세포파쇄를

하였으며 동일과정을 4회 반복하였다. Genomic DNA의 추출은 권과 손[17]에 기술된 방법에 의해 수행하였다. 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 증폭하였다[18]. 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 증폭하였다(<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 1분 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')[24]이었으며 PCR을 위한 조건은 다음과 같다. 94°C에서 3분 동안 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 denaturation 30초, 64~55°C touchdown으로 30 초, 74°C에서 extension 30 초 과정을 30 cycle 반복한 후, 74°C에서 7 분 동안 post-extension하였다. 28S rRNA gene으로 부터 DGGE-PCR을 위한 primer는 GC-clamp인 GCNL-1 primer (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')와 LS-2 primer (5'-ATT AAA CAA CTC GAC TC-3')[5] 이었으며 PCR을 위한 조건은 16S rRNA gene의 경우와 동일하게 수행하였다.

DGGE

DGGE는 Bio-Rad Dcode™ universal mutation detection system (Bio-Rad, USA)를 이용하였으며 권과 손[17]에 의해 기술된 방법에 의거하여 수행하였다.

DGGE band elution 및 sequencing

DGGE profile에서 나타난 band는 절단하여 E-tube에 담은 후 100 µl의 0.1x TE buffer를 넣고 4°C에서 overnight하였다. 용출된 밴드를 주형DNA로 사용하여 16S rRNA gene은

GC338F와 518R primer로, 26S rRNA gene은 GCNL-1, LS-2 primer를 이용하여 DNA를 증폭 하였다. 증폭된 산물은 Gel Purification Kit (Bioneer, Korea)로 정제 한 뒤 (주)코스모진텍에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다.

염기서열 분석

결정된 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[32]에 의한 alignment와 similarity를 통해 sequence data들을 비교하였다.

결과 및 고찰

미생물학적 요인

6일간의 막걸리 발효기간동안 세균과 진균의 수를 계수한 결과는 Fig. 1.과 같다. 세균 수는 초기 3.40×10^6 CFU/ml에서 2일째에 1.23×10^8 CFU/ml로 증가하였으며 5일째에 4.60×10^{10} CFU/ml 수준으로 최고값을 나타내었다. 사상성 진균은 초기 5.67×10^5 CFU/ml에서 2일째에 2.90×10^7 CFU/ml을 유지하였으며 이후 5일째에 10^5 CFU/ml이하로 급격히 감소되었다. 반면 효모의 수는 초기 6.67×10^4 CFU/ml을 시작으로 3일째에 1.01×10^9 CFU/ml 수준으로 도달을 하였으며 5일째에 최고치인 3.20×10^{10} CFU/ml을 나타내었다. 기존 보고에서 세균과 효모의 최적성장온도는 대부분 10^8 CFU/ml 수준으로 알려져 있으나[9,31], 본 연구의 결과에서 세균과 효모의 수는 기존 보고보다 약 2 order정도 높아 발효속도가 빠른 것으로 판단된다.

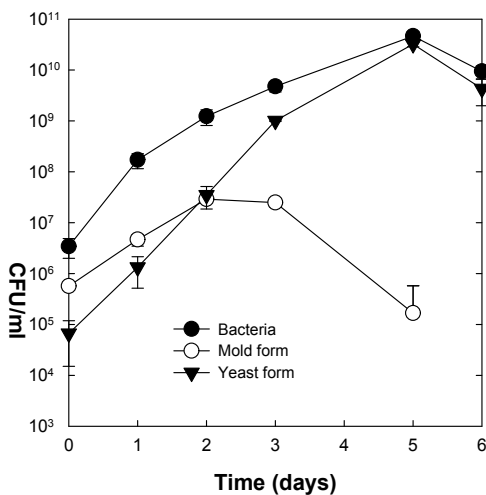


Fig. 1. Change of bacterial and fungal (mold and yeast form) numbers during *Makgeolli* fermentation.

이화학적 요인

막걸리 발효과정 중 pH, 총산도, 환원당 및 에틸알코올 함량의 변화는 Fig. 2와 같다. pH는 배양 0일째에 pH 6.5에서 발효 2일째에 pH 4 이하로 감소하였으며 발효종료일까지 pH 3.85~4.01을 유지하였다. 총산도는 0일째에 0.01%에서 지속적으로 상승하여 발효 6일째에 0.76%까지 증가하였다. 환원당은 0일째에 0.31%에서 2일째에 최대값인 6.21%까지 증가하였으며 그 이후 6일째에 0.8%까지 급격히 감소하였다. 에틸알코올 함량은 0일째에 0.48%에서 3일째에 2.1%까지 서서히 증가하여 5일째에 8.4% 그리고 6일에 10.8%로 급격히 증가하였다.

상기의 결과로부터 알코올의 생성은 pH 감소, 환원당의 증가로 효모의 성장과 알코올생산을 위한 최적조건이 성립된 후 3일 이후 알코올과 총산도의 증가라는 상관관계가 성립됨을 보여주었다. 또한 이러한 경향은 기존의 보고와 일치한다 [9,20].

막걸리 발효에서 PCR-DGGE에 의한 세균 다양성

막걸리의 발효기간동안 세균의 다양성을 연구하기 위해 시료로부터 DNA를 추출하여 PCR-DGGE를 수행한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 발효기간 동안 PCR-DGGE profile상에서 총 22개의 밴드가 검출되었으며(Fig. 3A), 각 band의 DNA로부터 염기서열을 결정하여 NCBI의 BLAST search를 통하여 similarity가 가장 높은 종으로 동정하였다(Fig. 3B). 그 결과 발효기간 동안 PCR-DGGE profile에서 확인된 세균은 유산균인 *Lactobacillus* 속(*L. curvatus*, *L. kisonensis*, *L. plantarum*, *L. sakei* 및 *L. gasserii*)이 5종, *Pediococcus* 속(*P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. agglomerans*, *P. pentosaceus*)이 4종 그리고 *Enterobacteriaceae* 과에 속하는 *Pantoea agglomerans*, *Pantoea ananatis*와 *Citrobacter freundii*을 포함하여 총 12종이 검출되었다. 발효기간 동안 세균의 변화는 발효 2일 전후로 구별되는 차이를 보였다. 즉 0~1일째에 band의 밀도를 기준으로 주된 우점종은 *P. acidilactici* (B7, B14), *Pantoea agglomerans* (B9), *L. gasserii*

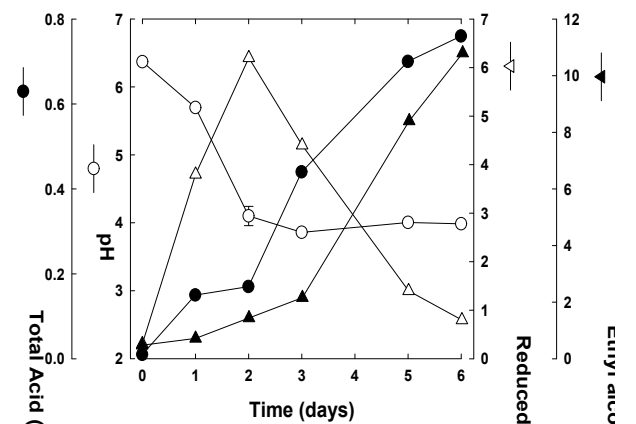


Fig. 2. Change of total acid, pH, reduced sugar and ethyl alcohol during *Makgeolli* fermentation.

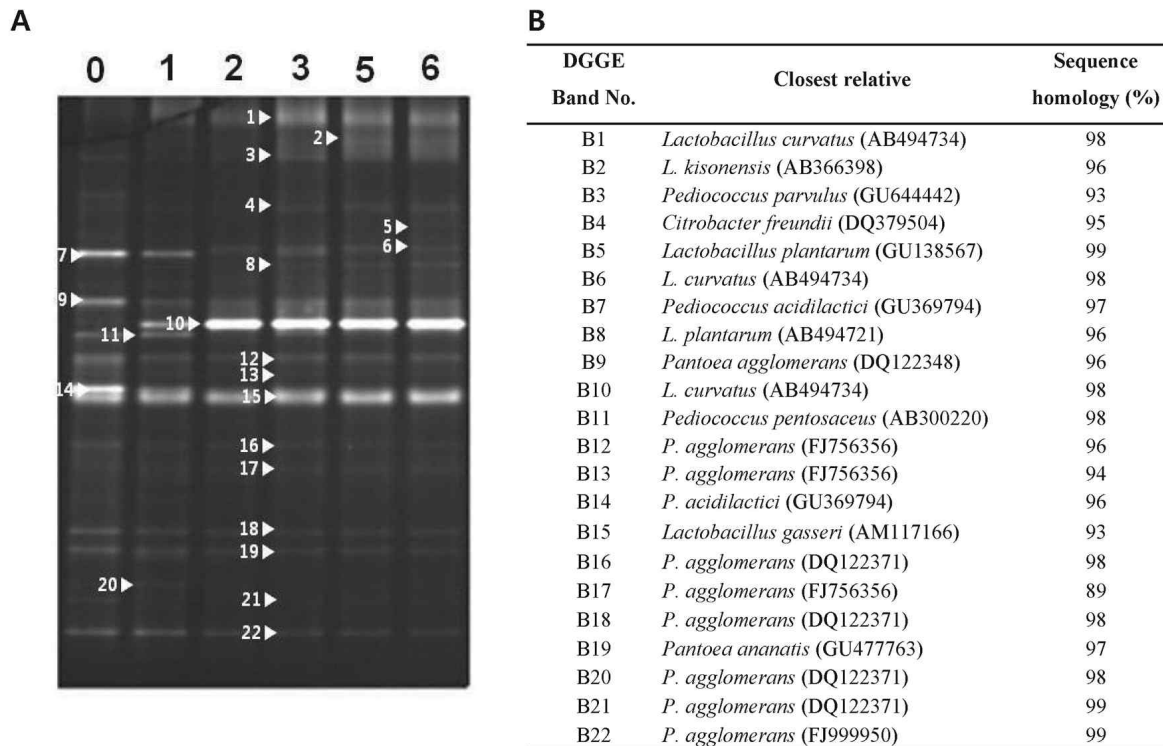


Fig. 3. DGGE profile of PCR-amplified 16S rRNA during *Makgeolli* fermentation carried at ambient temperature (A). Lane designation indicated the time of fermentation sampling (days). Bacterial identification was detected from the partial sequence of each band on DGGE profile (B).

(B15) 및 *P. pentosaceus* (B11)였다(Fig. 3A). 반면 발효 2일째에 주된 우점종은 *L. curvatus* (B10)와 *L. gasseri* (B15)로 나타났으며 이후 *L. curvatus* (B10)는 6일의 막걸리발효 종료까지 주된 우점종을 형성하였다. *P. acidilactici* (B7, B14), *P. pentosaceus* (B11), *Pantoea agglomerans* (B9, B12, B13, B16~B22)는 발효 2일 이후 band의 밀도가 희미하거나 검출되지 않았다. 발효 2일 이후 우점을 형성하지는 않았지만 검출된 균주는 *L. kisonensis* (B2), *P. parvulus* (B3), *Citrobacter freundii* (B4), *L. plantarum* (B5, B8)로 나타났다.

막걸리 발효 및 제품에서 주된 세균군은 유산균으로 알려져 있으며 진 등[10]은 막걸리로부터 103종의 유산균을 분리하여 동정한 결과 7종인 *Lactobacillus paracasei*, *L. arizonensis*, *L. plantarum*, *L. harbinensis*, *L. parabuchneri*, *L. brevis* 및 *L. hilgardii*을 보고한 바 있다. PCR-DGGE를 이용한 본 연구의 결과와 비교하여 *L. plantarum*을 제외하고 8종은 처음으로 확인되었다.

막걸리의 발효제인 누룩으로부터 분리된 유산균은 조와 하[11]에 의해 *Leuconostoc mesenteroides* 및 *L. casei*가 보고되었으며 권과 손[17]은 PCR-DGGE분석을 통하여 *Lactobacillus mucosae*, *L. plantarum*, *Pediococcus pentosaceus* 및 *Weissella cibaria*을 보고한 바 있다. 막걸리 발효과정 동안 주된 우점종인 *L. curvatus*와 *L. gasseri*는 bacteriocin을 생성하는 유산균으로 알

려져 있다[7]. 김 등[16]은 김치에서 분리된 유산균인 *L. curvatus*가 생산하는 bacteriocin이 김치발효 중 주된 microflora인 *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. helveticus*, *L. plantarum*, *L. monocytogenes* 및 *P. acidilactici*의 성장을 억제하는 것을 보고하였다. 이러한 측면에서 막걸리 발효과정에서 우점종을 형성한 *L. curvatus*와 *L. gasseri*는 초기 출현된 균주인 *P. acidilactici*, *Pantoea agglomerans*, *P. pentosaceus* 등의 성장을 제한하였을 가능성을 예측할 수 있다(Fig. 3A). 따라서 금정산성 막걸리는 *L. curvatus*와 *L. gasseri*에 의한 풍부한 유산균에 의해 향과 맛 그리고 식품의 안정성과 보존성 측면에서 타 막걸리와 비하여 그 차별성을 갖는 것으로 사료된다.

막걸리발효에서 PCR-DGGE를 이용한 진균의 다양성

막걸리의 발효기간 동안 시료로부터 진균의 변화를 관찰하기 위해 PCR-DGGE기술을 이용한 분석결과를 Fig. 4에 나타내었다. 발효기간 동안 총 18개의 구별되는band를 확인할 수 있었다. 또한 각 band로부터 DNA는 회수되어 염기서열을 결정하였으며 NCBI의 BLAST search를 통하여 similarity가 가장 높은 종으로 동정하였다(Fig. 4B). 그 결과 진균의 PCR-DGGE profile에서 확인된 종은 *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Asidia idahoensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomycopsis fibuligera* 및 *Torulasporea delbrueckii*로

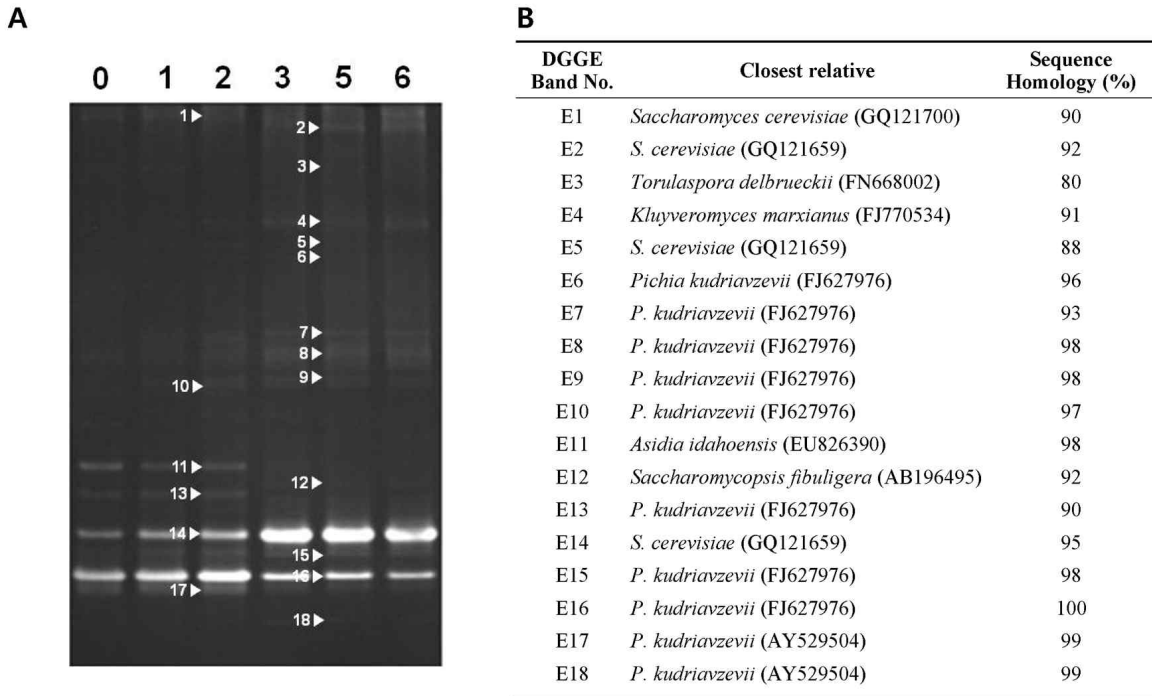


Fig. 4. DGGE profile of PCR-amplified 28S rRNA during *Makkgeolli* fermentation carried at ambient temperature (A). Lane designation indicated the time of fermentation sampling (days). Fungal identification was detected from the partial sequence of each band on DGGE profile (B).

6종이었다(Fig. 4B). 발효기간 동안 진균의 PCR-DGGE profile에서 구별되는 band 변화는 발효 3일 전후로 구분된다. 즉, 발효 0~2일 사이에 우점진균은 *P. kudriavzevii* (F16, F15, F17, F13)로 점진적으로 밀도가 증가되었으며 그 외 *S. cerevisiae* (F1, F14)와 *A. idahoensis* (F11)로 3종이 검출되었다. 발효 3일 이후 *P. kudriavzevii* (F16)는 급격히 band 밀도가 감소되었으며 반면 *S. cerevisiae* (F14)는 band 밀도가 급격히 증가하여 주된 우점 종을 형성하였다. 이는 Fig. 1에서 총 효모성 진균의 변화에서 주된 종의 변화를 PCR-DGGE분석을 통하여 예측할 수 있다. 반면 0일째부터 출현된 *A. idahoensis* (F11)는 3일부터 band의 밀도가 급격히 감소되었으며 *K. marxianus* (F4), *T. delbrueckii* (F2) 및 *S. fibuligera* (F12)의 band 밀도는 약하지만 확인된다. 누룩으로부터 유입된 사상성 진균은 Fig. 1에서와 같이 초기에 개체군이 증가하였으나 3일 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었으며 PCR-DGGE분석의 결과, 사상성 진균의 주된 우점 종은 *A. idahoensis*로 판단된다. 그러나 배양방법을 통하여 검출되어 분리된 종을 28S rDNA gene서열을 결정하여 NCBI의 BLAST search를 통하여 동정된 균주는 *Rhizopus microspores*, *R. azygosporus*, *Lichtheimia corymbifera*, *Mucor racemosus* 그리고 *Aspergillus oryzae* 등이 확인되어(자료 미제시) 배양초기 전분당화에 기여한 것으로 판단된다.

막걸리의 발효과정 중 배양방법에 의존하여 특정 미생물

군집의 변화만을 관찰할 수 있으나 종의 변화는 관찰할 수 없는 단점을 가지고 있다. PCR-DGGE분석은 막걸리의 발효과정 중 band profile과 각 band로부터 종을 신속하게 동정함으로써 미생물의 구조와 종의 변화를 함께 분석할 수 있는 장점을 가지고 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4). 본 연구에서 PCR-DGGE분석을 통하여 금정산성 막걸리는 전통누룩으로부터 유입된 총 9종의 유산균이 발효에 관여하며 이중 *L. curvatus*가 주된 우점 종을 형성한다는 사실을 알 수 있었으며 이들 유산균에 의해 생산된 풍부한 유기산에 의해 총산이 타 막걸리에 비하여 높은 특징을 갖는다는 사실을 확인할 수 있었다(Fig. 2, 3). 발효과정 중 당화를 주도하는 주된 우점균은 *A. idahoensis*이며 그 외 다양한 진균을 확인하였다. 또한 알코올발효를 주도하는 균은 *S. cerevisiae*로 나타났다. 특히, 금정산성 막걸리는 기존 주된 막걸리 제조업체에서 사용하는 발효제인 입국방식이 아닌 전통누룩을 이용한 단발효에 의한 국내 유일의 대표적인 전통 막걸리임을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 논문은 지식경제부 지역연고사업의 연구비 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다. 또한 본 연구를 위해 막걸리제조 및 시료채취에 도움을 주신 (유)금정산성토산주의 류

청길 대표님께 감사드립니다.

References

- Baek, S. Y., Y. G. Nam, J. I. Ju, and J. S. Lee. 2011. Changes of quality characteristics during storage of Gugija-Liriope tube Makgeolli made by *Saccharomyces cerevisiae* C-2. *Korean J. Mycol.* **39**, 122-125.
- 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.
- Cho, E. K., H. Y. Kim, H. J. Byeon, S. W. Kim, and Y. J. Choi. 2010. Nitrite scavenging and alcohol metabolizing activities of hot water extract from Makgeol and its angiotensin converting enzyme inhibitory effect. *J. Life Sci.* **20**, 768-774.
- 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.
- El-Baradei, G., A. Delacroix-Buchet, and O. Jean-Claude. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian domiati cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 1248-1255.
- Gálvez, A., H. Abriouel, R. L. López, and N. B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.* **120**, 51-70.
- Heuer, H. and K. Smalla. 1997. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities, pp. 353-373. In van Elsas, J. D., E. M. H. Wellington, and J. T. Trevors (eds.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
- Jeong, J. W., K. J. Park, M. H. Kim, and D. S. Kim. 2006. Quality characteristics of Takju fermentation by addition of chestnut peel powder. *Korean J. Food Preserv.* **13**, 329-336.
- Jin, J., S. Y. Kim, Q. Jin, H. J. Eom, and N. S. Han. 2008. Diversity analysis of lactic acid bacteria in Takju, Korean rice wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1678-1682.
- Jo, K. Y. and D. M. Ha. 1995. Isolation and identification of the Lactic acid bacteria from Nuruk. *Agri. Chem Biotechnol.* **38**, 95-99.
- Kang, K. H., B. S. Noh, J. H. Seo, and W. D. Hur. 1998. Food analysis. pp. 109-110, SungKyunkwan University Press. Seoul. Korea.
- Kim, J. H., S. Y. Lee, K. B. W. R. Kim, E. J. Song, A. R. Kim, M. J. Kim, K.W. Ji, I. S. Ahn, and D. H. Ahn. 2007. Effects of *Glycyrrhiza uralensis*, *Menthae herba*, *Schizandra chinensis* and chitosan on the self-life and quality of Takju. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 1436-1443.
- 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.
- Kim, S. and W. Cho. 2006. Effects of Takju (Korean turbid rice wine) Lees on the serum glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Food Culture* **21**, 638-643.
- Kim, S. K., E. J. Lee, K. Y. Park, and H. K. Jun. 1998. Bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* SE1 isolated from Kimchi. *J. Microbiol. Biotechnol.* **8**, 588-594.
- Kwan, S. J. and J. H. Sohn. 2011. Analysis of microbial diversity in Nuruk using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* **22**, 110-116.
- 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.
- Lee, J. S., T. S. Lee, S. O. Park, and B. S. Noh. 1996. Flavor components in mash of takju prepared by different raw materials. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 316-323.
- Lee, J. S., T. S. Lee, B. S. Noh, and S. O. Park. 1996. Quality characteristics of mash of takju prepared by different raw materials. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 330-336.
- Lee, H. S., K. H. Hong, K. H. Yoon, J. M. Kim, and S. M. Kim. 2009. Effect of Korean turbid rice wine (takju) less extract on blood glucose level in db/db mouse. *Korean J. Food Sci. Technol.* **23**, 109-113.
- Lopez, I., F. Ruiz-Larrea, L. Cocolin, E. Orr, T. Phister, M. Marshall, J. Vander Gheynst, and D. A. Mills. 2003. Design and evaluation of PCR primers for analysis of bacterial populations in wine by denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 6801-6807.
- 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.
- 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.
- Park, S. S., J. J. Kim, J. A. Yoon, J. H. Lee, B. O. Jung, and S. J. Chung. 2011. Preparation and quality characteristics of Takju (Rice Wine) with *Opuntia ficus-indica* var., saboten and Chito-oligosaccharide. *J. Chitin Chitosan* **16**, 164-169.
- 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.
- 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 socialwasp *Vespula germanica*. *Insect Mol. Biol.* **12**, 85-91.
- 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.
- Shin, M. O., M. H. Kim, and S. J. Bae. 2010. The Effect of

- Makgeolli on blood flow, serum lipid improvement and inhibition of ACE in vitro. *J. Life Sci.* **20**, 710-716.
30. Shin, M. O., D. Y. Kang, M. H. Kim, and S. J. Bae. 2008. Effect of growth inhibition and quinine reductase activity stimulation of Makgeoly fractions in various cancer cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **37**, 288-293.
31. Seo, M. Y., J. K. Lee, B. H. Ahn, and S. K. Cha. 2005. The changes of microflora during the fermentation of Takju and Yakju. *Korean J. Food Sci. Technol.* **37**, 61-66.
32. 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.
33. Woo, K. S., J. S. Lee, J. Y. Ko, S. B. Song, B. G. Oh, J. R. Kang, M. H. Nam, I. S. Ryu, and M. C. Seo. 2010. Physicochemical characteristics of Korean traditional wine fermented from foxtail Millet (*Setaria italica* Beauv.) and nuruk at different addition rates. *Korean J. Food Sci. Technol.* **42**, 298-303.
34. Woo, K. S., S. B. Song, J. S. Lee, J. Y. Ko, J. R. Kang, B. G. Oh, M. H. Nam, I. S. Ryu, and M. C. Seo. 2010. Physicochemical characteristics of Korean traditional wine made from proso millet (*Panicum miliaceum* L.) at different addition rates with two kinds of nuruk. *Korean J. Crop Sci.* **55**, 119-125.
35. 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.
36. 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.
37. Ye, E. J., S. J. Kim, C. H. Park, and M. J. Bae. 2005. Antioxidant and anticancer activities of Ginseng treated with traditional rice wine stream process method. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 599-604.
38. Yu, C. H., S. Y. Hong, and J. S. Koh. 2002. Zymological properties of foxtail millet win-making by isolated strain from nuruk. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 138-144.

초록 : PCR-DGGE를 이용한 막걸리발효에서 미생물 다양성 분석

권승직¹ · 안태영² · 손재학^{3*}

(¹국립보건연구원 질병관리본부, ²단국대학교 미생물학과, ³신라대학교 의생명과학대 바이오식품소재학과)

금정산성 막걸리[®]는 전통적인 수제누룩과 쌀로부터 발효된 한국의 전통적인 술이다. 본 연구에서는 막걸리 발효기간 동안 세균과 진균의 다양성을 특성화하기 위해 16S와 28S rRNA 유전자를 목적으로 하는 PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) 분석을 수행하였다. 막걸리 발효기간 동안 PCR-DGGE profile에서 검출된 세균은 16S rRNA 유전자 서열에 기초한 동정결과 *Lactobacillus* spp. (*L. curvatus*, *L. kisonensis*, *L. plantarum*, *L. sakei* 및 *L. gasser*), *Pediococcus* spp. (*P. acidilactici*, *P. parvulus*, *P. agglomerans* 및 *P. pentosaceus*), *Pantoea* spp. (*P. agglomerans* 및 *P. ananatis*) 그리고 *Citrobacter freundii*로 총 12종이었으며, 배양2일 이후 *L. curvatus*가 주된 우점 종을 형성하였다. 반면 PCR-DGGE profile에서 검출된 진균은 28S rRNA 유전자 서열에 기초한 동정결과 *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ascidia idahoensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomycopsis fibuligera* 및 *Torulaspora delbrueckii*로 6종이었으며 주된 우점 진균은 배양0일에서 2일에 *P. kudriavzevii*에서 배양 3일에서 6일에 *S. cerevisiae*로 전환되었다. 결과적으로 PCR-DGGE분석은 막걸리발효기간 동안 미생물의 구조와 다양성을 이해하는 데 유용한 도구임을 보여주었다.