

Variations of Properties and Microbial Community during Fermentation of Makgeollics by Isolated Yeasts from Traditional Makgeollics

Myong Je Jeon¹, Min Kyung Jang², Sol Jee Lee², Sung Hwan Park¹, Mihyang Kim³, Jae Hak Sohn⁴, Han-Seung Lee⁴, Dong-Geun Lee^{1,2} and Sang-Hyeon Lee^{1,2*}

¹Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate School, Silla University, San 1-1, Gwaebop-dong, Sasang-gu, Busan 617-736, Korea

²Department of Pharmaceutical Engineering, Silla University, Busan 617-736, Korea

³Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

⁴Department of Bio-Food Materials, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received April 10, 2013 / Revised June 7, 2013 / Accepted June 14, 2013

Property changes and bacterial characterizations by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) were investigated during the fermentation of Makgeollics by 5 isolated yeast strains. Changes of pH were large between day 0 (pH 6) and day 2 (pH 3) and showed less variation after then. ANOVA analyses revealed that pHs were statistically different with fermentation times ($p < 0.001$), while strains ($p = 0.60$) did not. Acidities were changed from 0.19 to 1.04% and showed rather high increase from day 2, and fermentation times ($p < 0.001$) and strains ($p = 0.006$) represented statistical differences. All strains showed less than 0.150% at amino-type nitrogen contents except S strain showed 0.442% at day 8, and there were no statistical differences with fermentation times ($p = 0.4558$) and strains ($p = 0.3513$). Saccharinities of C strain were higher from day 4, and fermentation times ($p < 0.0001$) and strains ($p = 0.007$) showed statistical differences. Large variation of alcohol concentrations (%) were observed between day 0 (0%) and day 2 (10%) and showed less variation after day 2, and there was no statistical difference with strains. Dominant prokaryotes were *Lactobacillus fermentum* and *Pediococcus pentosaceus*, which producing acids and functional materials. Dominant eukaryote was *Saccharomyces cerevisiae*, which might be resulted from addition of yeasts.

Key words : Denaturing gradient gel electrophoresis, Makgeolli, property analysis, *Saccharomyces cerevisiae*, yeast strain

서 론

옛날부터 자가 생산되어 널리 이용되어 온 막걸리는 곡물을 원료로 하는 양조주의 하나로, 당화와 발효 공정을 통하여 생산되며 알코올 함량이 낮은 저도주의 일종이다. 막걸리는 원료 곡물의 종류에 따라 차이를 보이지만 탄수화물과 단백질을 포함하고 있으며 발효과정에서 생성된 각종 유기산, 아미노산, 비타민 등으로 영양학적 가치가 높다. 또한, 막걸리의 유기산과 aromatic flavors 등에 의한 독특한 맛과 향에 대한 특성이 보고되고 있다[7]. 막걸리는 발효공정의 표준화가 이루어져 있지 않아 발효균주, 원료곡물의 종류, 및 발효환경에 따라 막걸리마다 독특한 풍미를 나타내는 것으로 알려져 있다. 보통 막걸리의 주질은 알코올 농도, 총산, 향미성분 등이 관여하

는데[20], 전 등[13]은 전통막걸리들에서 알코올 발효에 관여하는 효모균주들을 순수 분리하였고 분리된 각각의 효모를 따로 배양하여 막걸리를 제조한 후 사용된 효모의 종류와 보관 온도 및 보관기간에 따른 막걸리의 물성변화에 대해 조사하였다.

현재까지의 막걸리에 관한 연구로는 첫째 발효균주에 대한 연구로 누룩과 막걸리의 미생물학적 연구[8]와 개량곡자의 제조 등 제국용 균주에 관한 연구[26] 등이 있다. 둘째 막걸리의 기능성에 관한 연구로 막걸리 분획물의 암세포 성장억제와 암예방에 관한 연구[27] 및 막걸리에서 항산화 물질의 분리[15] 등이 있다. 셋째 원료에 관한 연구로 원료별 막걸리에 대한 연구[21]와 함께 오이[16], 유자즙[29], 흑미[15] 등의 첨가에 따른 발효양상과 주질에 대한 보고 등이 있었다. 넷째 막걸리의 저장성에 관한 연구로 새로운 효모균주의 탐색[13], 막걸리에 대한 저온살균과[18] 고압처리[22] 및 키토산[14] 혹은 블루베리[12] 등을 첨가하여 저장성을 개선하고자 하는 연구가 보고되어 있다.

미생물 균집의 조성조사와 비교를 위한 방법으로 크게 배양법과 비배양법이 있는데, 배양법은 전체 균집구조를 파악할 수 없고 비배양법은 활성을 파악할 수 없는 한계가 있다[25]. 막걸

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5624, Fax : +82-51-999-5636

E-mail : slee@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

리 발효 미생물에 대한 연구는 주로 배양법으로 배지를 이용하여 미생물을 분리하고 특성을 파악하는 전통적인 방법들이 주를 이루고 있다[16]. 하지만 배양법은 시료에 존재하는 모든 미생물들을 배양하지 못할 뿐만 아니라 미생물의 형태 및 생화학적 특성만으로는 정확한 분류와 동정에 있어 한계가 있다[1].

비배양법을 이용한 미생물의 군집구조에 대한 연구는 molecular fingerprinting 기술을 이용하는 temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) 및 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)의 도입으로 비약적인 발전을 이루었다[9]. DGGE 분석은 크기는 동일하지만 서열이 다른 PCR 산물들을 개별적으로 분리할 수 있다. DGGE 분석을 이용하여 수돗물[19], 슬러지[28] 등 여러 시료 미생물의 동태학 연구가 보고되고 있으며, 김치[3], 치즈[7]와 같은 식품의 발효과정에서의 미생물 다양성을 파악하는데 이용되고 있다.

전 등[13]은 전통막걸리들에서 분리한 효모들을 이용하여 막걸리를 제조하였으며 막걸리 발효 후 보관기간과 온도에 따른 물성변화에 대한 연구를 통하여 4°C에서 10일까지 막걸리의 물성이 보존되는 저장성이 우수한 균주에 대해 보고하였지만, 발효과정 중의 막걸리의 물성변화나 미생물학적 변화는 파악하지 못했다. 권 등[17]은 누룩을 이용한 막걸리 발효과정에 DGGE를 이용하여 미생물 군집의 변화를 연구하였지만 저장성이 전 등[13]의 균주보다 길지 않다.

따라서 본 연구에서는 전통막걸리로부터 분리한 저장성이 우수한 효모 등을 이용하여 제조한 막걸리들의 발효과정에서의 물성변화를 조사하였으며, 또한 막걸리가 발효되는 동안 막걸리의 발효에 관여하는 미생물의 동태를 16S와 28S rRNA 유전자를 이용한 PCR-DGGE 기법을 이용하여 관찰함으로써 기존의 배양 의존적인 방법에서는 확인하지 못했던 미생물들의 변화추이와 미생물들의 다양성을 분석하고자 하였다.

재료 및 방법

막걸리 발효균주

본 연구에 사용된 발효균주들은 이전 연구에서 전통막걸리로부터 분리된 균주들이다[13]. 즉, 여러 지역에서 전통적인 방법으로 제조된 막걸리들로부터 YPD plate (yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%, agar 1.5%)를 이용하여 효모균들을 분리하여 순수 배양 후 18S rRNA 유전자 염기서열을 해석하여 모두 *S. cerevisiae*로 동정하였고, 대조균으로 사용한 빵효모를 C, 경남지역에서 수집한 솔잎함유 전통막걸리에서 분리한 효모를 F, 울산지역의 전통막걸리에서 분리한 효모를 U, 부산지역의 전통막걸리 3종에서 분리한 효모를 각각 S, K 및 R 효모로 명명하였다[13]. 순수 배양된 균주들은 실험에 사용할 때까지 10%의 DMSO가 첨가된 액체배지에 넣어 -70°C에서 보관하였다.

막걸리 제조 및 시료의 채취

쌀 8.8 kg을 1일 정도 물에 불리고 증기로 찌서 고두밥을 만든 후, 여기에 누룩(Chungmoo Fermentation Co. Ltd., Ulsan, Korea)을 첨가하여 골고루 잘 버무려 혼합하고 30°C에서 24시간 동안 당화과정을 수행하였다. 이를 5세트로 준비하여 각각의 멸균된 항아리에 넣고 확보된 5종의 효모균주들을 각각 따로 첨가한 후, 물 8.8 l를 넣어 뚜껑을 보자기로 덮고 온도를 유지하며 실온에서 8일간 발효를 진행하였다. 발효과정 중 2일 간격으로 각각의 막걸리 시료를 채취하여 막걸리의 물성, 미생물 및 DGGE분석을 수행하였다.

pH 및 총산 측정

막걸리 시료의 pH는 시료 50 ml를 취하여 pH meter (Radiometer Analytical, Lyon, France)로 측정하였다. 막걸리의 총산을 측정하기 위하여 시료 10 ml에 증류수를 가하여 100 ml로 희석한 후, 1% phenolphthalein (Sigma, USA)을 지시약으로 사용하여 0.1 N NaOH로 미적색(pH 8.3)이 될 때까지 적정하였다. 적정에 소비된 NaOH 양에 0.009를 곱하여 lactic acid의 양으로 환산하여 막걸리 시료 중의 총산을 측정하였다[18].

아미노태 질소 함량 측정

막걸리 시료의 아미노태 질소 함량은 Formol 법으로 측정하였다[2]. 막걸리 시료액 5 ml를 증류수로 희석하여 250 ml로 만들고, 이중 25 ml를 분취하여 여기에 formalin 용액(Sigma, USA) 20 ml와 물 20 ml를 섞은 다음, phenolphthalein (Sigma, USA)을 약 6방울을 첨가한 용액 25 ml을 섞은 후 0.05 N NaOH 용액으로 엷은 분홍색이 될 때까지 적정하였으며, 적정에 소비된 NaOH 양을 아미노태 질소 함량으로 표시하였다.

당도 측정

막걸리 시료의 당도는 당도 측정기(Wine Refractometer HI 96811, Hanna Instrument, RI, USA)를 이용하여 측정하였다.

알코올 함량 측정

막걸리 시료의 알코올 함량은 알코올 측정기(Portable Refractometer)를 이용하여 측정하였다.

통계처리

연구결과로 얻어진 자료는 Macintosh용 통계 프로그램인 Aabel 2 (Gigawiz Ltd Co., USA)을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였다. 분산분석(ANOVA) 후 Fisher's PLSD의 다중범위 유의성 검증을 실시하였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

총 genomic DNA의 추출

막걸리 시료로부터 총 genomic DNA의 추출은 phenol ex-

traction법에 의거하여 수행하였다. 막걸리 시료를 원심분리(3,000×g 30 min)한 후 상층액을 제거하고 lysis buffer (50 mM Tris-base, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 0.75 M sucrose) 1 ml를 첨가하였다. -80℃와 60℃의 water bath에서 각각 2분씩 총 3회 처리하여 세포벽을 파괴하였다. 여기에 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 용액 100 µl를 첨가한 후 60℃에서 15분간 반응시켰다. 시료에 RNase A (10 mg/ml) 10 µl를 첨가한 후 상온에서 5분간 반응시킨 후 원심분리(10,000×g 5 min)하여 상등액 750 µl를 취하였다. 이 상등액에 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (Bioneer Co., Korea)을 첨가하여 조심스럽게 혼합한 뒤 원심분리(10,000×g 5 min)하고 상등액 600 µl를 취하였다. 이 상등액에 다시 동량의 phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 조심스럽게 혼합한 뒤 원심분리(10,000×g 30 min)하고 상등액 500 µl를 취하였다. 이 상등액에 동량의 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)를 넣고 원심분리(10,000×g 5 min)하고 상등액 400 µl를 새 튜브에 옮기고 100% cold ethanol 1 ml와 3 M sodium acetate 40 µl를 첨가하여 -20℃에서 200분 이상 침전 과정을 수행하였다. 침전과정을 거친 시료를 원심분리(10,000×g 5 min)하여 상등액을 제거하고 70% cold ethanol 1 ml를 사용하여 세척한 후 상온에서 건조하였다. 최종적으로 DNA를 100 µl의 증류수에 용해시킨 후 0.3% agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인하였다.

Touchdown-PCR

막걸리 시료에 존재하는 미생물들을 분석하기 위하여 막걸리 시료로부터 추출한 DNA에 대하여 세균과 진균의 rDNA 유전자를 증폭시키는 universal primer를 이용하여 touchdown-PCR을 수행하였다[5, 23]. 세균의 경우는 16S rDNA의 V3 영역의 염기서열을 증폭하기 위하여 GC clamp가 부착된 gc338f (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG-3')와 518r (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3')을 primer로 사용하였다. 진균의 경우는 28S rDNA의 염기서열을 증폭하기 위하여 GC clamp가 부착된 GCNL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')과 LS-2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3')를 primer로 사용하였다[6]. PCR 반응은 94℃에서 3분간 초기 열처리한 후, 94℃에서 30초 동안 변성시키고 annealing 온도에서 30초, 74℃에서 30초간 신장 반응을 총 35회 수행한 후, 74℃에서 7분간 수행하였다. 초기 10회 동안의 annealing 온도는 64℃에서 시작하여 매 cycle 마다 1℃씩 감소되도록 설정하였고, 이후부터는 annealing 온도를 55℃로 고정하였다. PCR 증폭산물은 0.3% agarose gel을 이용한 전기영동으로 증폭된 단편을 확인한 다음, gel purification kit (EPLIS Co., Korea)를 이용하여 정제하였다.

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) 분석

Touchdown-PCR을 수행하여 얻은 PCR 증폭산물은 BioRad Dcode System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)을 이용한 DGGE를 수행하여 분석하였다. Denaturing gradient gel은 8% polyacrylamide 용액에 100% 변성제(7 M urea (Bio-Rad, Hercules, USA), 40% (v/v) formamide (Bio-Rad, Hercules, USA))를 30%에서 50%까지의 농도구배가 연속적으로 형성되도록 첨가하여 제작하였다. 제작된 denaturing gradient gel에 touchdown-PCR을 수행하여 얻은 증폭산물 30 µl를 loading하여 1× TAE 완충용액(40 mM Tris, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA, pH 8.0)에서 60℃, 80V 조건으로 13시간 동안 전기영동을 수행하였고, ethidium bromide로 염색한 후, UV 상에서 DNA 단편을 확인하였다.

염기서열 분석

Denaturing gradient gel 상에서 이동거리가 다른 밴드들로부터 DNA 단편들을 회수하기 위하여 각각의 밴드들을 멸균된 면도칼로 잘라낸 후 멸균된 3차 증류수에 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 방치한 다음 원심분리(10,000×g 5 min)하여 상층액을 취하였다. 각 밴드에서 회수한 DNA에 대하여 세균의 경우는 gc338f와 518r을, 진균의 경우는 GCNL-1와 LS-2를 primer로 사용하여 touchdown-PCR을 수행한 후 증폭된 PCR 산물을 PCR clean-up kit를 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물들은 DNA 염기서열 결정을 의뢰하였고(Cosmo Gene Tech, Korea), 결정된 염기서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA)의 BLAST를 사용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

막걸리 발효기간 중의 pH의 변화

전 등[13]은 각 효모균주가 나타내는 막걸리의 보관과정에서 물성의 변화를 관찰하기 위해 여러 지역에서 전통적인 방법으로 제조된 막걸리들을 수집하였다. 본 논문에서는 막걸리 발효에 일반적으로 사용되고 있는 빵효모인 C 균주와 전 등[13]이 전통막걸리에서 분리한 F, U, K, R, S 등 다섯 개의 *S. cerevisiae* 균주가 막걸리 발효과정에서 보이는 물성과 균집의 변화를 파악하고자 하였다.

Table 1은 접종된 균주별로 각 막걸리에서 나타나는 pH 변화를 측정된 결과이다. 전반적으로 연구에 사용된 균주들은 발효 2일째에 pH 감소를 보였다. C, F, U, K 균주는 8일째에, 그리고 R, S 균주는 6일째에 증가하는 양상을 보였다. 이원배치법의 분산분석(two-way ANOVA) 결과, 발효일자별로는 유의미한 차이가 있었지만($p < 0.001$), 균주별로는 차이가 없었다($p = 0.604$). 차이가 큰 0일째를 제외한 분산분석도 발효일자별로 통계적 차이를 보였지만($p = 0.001$), 균주별로는 통계적 차이

Table 1. Variation of pHs in Makgeollies during fermentation periods

Fermentation time (day)	Yeast strains					
	C	F	U	R	K	S
0	6.36±0.03	6.27±0.06	6.62±0.21	6.64±0.21	6.33±0.12	6.30±0.17
2	3.43±0.06	2.92±0.04	2.90±0.05	2.73±0.00	2.86±0.02	2.89±0.01
4	2.84±0.07	2.83±0.03	2.71±0.04	2.92±0.03	2.74±0.02	2.69±0.04
6	2.90±0.05	2.91±0.02	3.08±0.07	3.45±0.13	3.01±0.09	3.64±0.07
8	3.72±0.03	3.60±0.14	3.45±0.02	3.55±0.06	3.41±0.02	3.61±0.07

Results are represented as mean±SEM on three measurements.

가 없었다($p=0.595$). 전 등[13]은 같은 보관온도와 같은 보관기간일 때 빵효모 C와 비교하여 분리 균주별로 pH의 차이에 유의성이 있다고 보고하였지만($p<0.001$), 본 연구결과에서는 막걸리가 발효되는 동안에는 균주별로 pH 변화의 차이가 없음을 알 수 있었다. 전 등[13]은 본 연구와 동일한 균주들을 이용하여 발효를 완료한 후 보관 동안의 pH의 변화를 비교한 결과로 분리한 모든 효모균주들이 보관 0, 5, 10, 15일째 모두 빵효모 C에 비해 pH가 높았다고 보고하였는데, 본 연구에서는 Table 1과 같이 발효과정 중에는 균주별로 pH의 차이가 없었다.

막걸리 발효기간 중의 총 산의 변화

Table 2는 접종된 균주별로 각 막걸리에서 나타나는 산도의 변화를 측정된 결과이다. 전반적으로 연구에 사용된 균주들은 발효 2일째부터 산도의 증가를 보였다. C 균주의 산도 증가가 가장 컸으며, S 균주의 산도 증가가 가장 적었다. 분산분석(two-way ANOVA) 결과, 발효일자별($p<0.001$) 및 균주별($p=0.006$) 모두 유의미한 차이가 있는 것으로 나타났다. 차이

가 큰 0일째를 제외한 분산분석도 발효일자별($p<0.001$) 및 균주별($p=0.004$) 모두 통계적 차이가 있었다. 본 연구와 동일한 균주들을 이용하여 발효를 마친 막걸리는 전체 막걸리 시료가 온도와 균주에 무관하게 저장기간이 길어질수록 총산이 증가하였으며 사용된 ANOVA 분석결과 균주와 보관 온도별로 유의한 차이를 보여($p<0.001$) 본 연구결과와 유사하였다. 하지만 본 연구에서는 발효 일자별로 유의한 차이가 나타났지만, 이전 연구에서의 발효가 완료된 막걸리의 보관 기간별로는 차이가 없었다[13]. 이는 발효가 진행되면서 총산의 양이 증가하지만, 보관기간 동안에는 큰 차이를 보이지 않는다는 것을 의미한다.

막걸리 발효기간 중의 아미노태질소 함량의 변화

Table 3은 접종된 균주별로 각 막걸리에서 나타나는 아미노태질소 함량의 변화를 측정된 결과이다. F와 U 균주는 2일째 감소하였고 이후 큰 변화가 없었으며 S 균주는 8일째 큰 증가를 보였고 다른 균주들을 큰 변화를 보이지 않았다. 분산분석(two-way ANOVA) 결과 발효일자별($p=0.4558$) 및 균주별

Table 2. Variation of total acidities in Makgeollies during fermentation periods

Fermentation time (day)	Yeast strains					
	C	F	U	R	K	S
0	0.25±0.01	0.20±0.01	0.19±0.05	0.23±0.03	0.20±0.01	0.24±0.03
2	0.64±0.04	0.41±0.02	0.53±0.03	0.46±0.03	0.44±0.01	0.39±0.03
4	0.90±0.03	0.84±0.11	0.60±0.02	0.65±0.02	0.62±0.06	0.48±0.03
6	0.84±0.01	0.69±0.05	0.78±0.01	0.83±0.07	0.73±0.11	0.69±0.03
8	1.04±0.10	0.82±0.05	0.99±0.09	0.81±0.03	0.76±0.05	0.74±0.11

Results are represented as mean±SEM on three measurements.

Table 3. Variation of amino-type nitrogen contents (%) in Makgeollies during fermentation periods

Fermentation time (day)	Yeast strains					
	C	F	U	R	K	S
0	0.122±0.000	0.154±0.010	0.164±0.000	0.132±0.002	0.134±0.006	0.141±0.004
2	0.127±0.016	0.137±0.003	0.129±0.002	0.130±0.004	0.140±0.006	0.144±0.024
4	0.134±0.002	0.126±0.006	0.123±0.006	0.112±0.010	0.129±0.010	0.136±0.008
6	0.141±0.008	0.130±0.005	0.137±0.006	0.129±0.006	0.129±0.006	0.133±0.012
8	0.143±0.018	0.134±0.011	0.126±0.010	0.122±0.004	0.130±0.012	0.442±0.127

Results are represented as mean±SEM on three measurements.

($p=0.3513$) 모두 유의미한 차이는 없는 것으로 나타났다.

아미노태질소의 함량은 술의 영양적 가치와 함께 술의 향, 맛, 외양 등 관능적 측면에도 관여하지만[30] 양이 과다하면 느끼한 맛을 내어 주질을 하락시키며[4] 술덧의 아미노태질소 함량이 0.150% 이하의 범위에서 술맛이 상승된다고 알려져 있다[29]. 이런 관점에서 보면 다른 균주들과 달리 S 균주는 8일째 0.150%를 두 배 이상 초과하므로 발효기간을 단축시켜야 하는 것으로 판단되었다. 전 등[13]은 4, 18°C의 보관 온도에서는 15일까지 아미노태 질소의 함량이 0.15% 이하이며 25°C의 보관 온도에서는 10일 이후 0.15%를 초과하는 것으로 보고하였다.

막걸리 발효기간 중의 당도의 변화

Table 4는 접종된 균주별로 각 막걸리에서 나타나는 당도의 변화를 측정된 결과이다. 빵효모인 C가 발효 4일째부터 다른 균주들에 비해 높은 당도를 보였다. 분산분석(two-way ANOVA) 결과 발효일자별($p<0.0001$) 및 균주별($p=0.007$) 모두 유의미한 차이를 보였다. 차이가 큰 0일째를 제외한 분산분석도 발효일자별($p<0.001$) 및 균주별($p=0.003$) 모두 통계적 차이가 있었다. 양과 은[29]은 술덧의 알코올 함량이 가장 급격하게 증가하는 시기에 총 당 함량이 급격하게 감소한다고 보고하였고, 이는 당화 amylase의 작용에 의해 원료의 전분질이 당분으로 분해되면 효모가 당분을 영양원이나 발효기질로 이용하여 나타나는 현상이라고 보고하였다. 하지만 본 연구결과는 당도가 발효 2일째부터 8일째까지 전반적으로 증가하였으며 알코올의 함량이 발효 2일째에 급격한 증가를 보였고 그 이후 큰 차이가 없었다. 본 연구에서 당분이 생기는 속도가 당분의 발효속도보다 빨라서 이루어진 결과인지는 알 수 없었다. 본 연구에서는 별다른 처리하지 않은 쌀로 제조한 고두밥에 중국을

처리한 후에 효모균주를 첨가한 반면에 양과 은[29]은 입국과 효모로 제조한 술덧으로 쌀을 처리한 후 고두밥을 제조하고 누룩을 첨가하여 발효시킨 차이가 있다.

막걸리 발효기간 중의 알코올 함량의 변화

Table 5는 접종된 균주별로 각 막걸리에서 나타나는 알코올 함량의 변화를 일자 별로 측정된 결과이다. 모든 효모균주에서 발효 2일째 급격한 증가를 보였으며 그 이후에 큰 차이가 없었다. 분산분석(two-way ANOVA) 결과 발효일자별($p<0.0001$)로는 유의미한 차이를 보였지만 균주별로는 유의미한 차이는 없는 것으로 나타났다($p=0.1464$). 발효일자별의 유의미한 차이도 0일째의 자료를 제외하면 $p=0.7328$ 로 차이가 없는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 발효 2일째 알코올 함량이 10% 내외인 반면에 양과 은[29]은 4%였다. 발효 6일째 알코올 함량은 김 등[16]은 16%, 전과 이[12]는 10~13%, 양과 은[29]은 8%인 반면 본 연구는 10~11% 사이였다.

DGGE 분석

막걸리 시료의 미생물 다양성을 확인하기 위해 원핵생물의 16S rDNA의 V3 부위와 진핵생물의 28S rDNA의 D1-D2 부위를 degenerative primer로 증폭한 후 DGGE 방법을 이용하여 분석한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 막걸리 발효과정 중의 세균 변화는 접종된 효모균주에 상관없이 각각의 막걸리 시료에서 유사한 패턴을 나타내었다(Fig. 1). 특히 F, S, K, R 효모로 발효된 막걸리들에서 밴드의 수는 발효 0일과 2일째에 가장 많았고 4일 이후에는 4번과 5번 밴드가 관찰되지 않았으며 이후 동일한 패턴을 보였다. 2번과 3번 밴드는 주로 발효 0일부터 8일까지 관찰되었고 F, U, S, K 효모로 발효된 막걸리에서는 계속 관찰되었다. 빵효모(C) 막걸리의 경우는 다른 막걸

Table 4. Variation of saccharinities (brx) in Makgeollies during fermentation periods

Fermentation time (day)	Yeast strains					
	C	F	U	R	K	S
0	0.57±0.12	0.60±0.00	0.67±0.06	0.93±0.06	0.70±0.00	0.87±0.06
2	7.50±0.61	7.57±0.12	6.60±0.10	6.87±0.21	6.73±0.12	6.80±0.10
4	7.90±0.10	6.53±0.12	6.47±0.06	7.53±0.12	6.37±0.12	7.33±0.12
6	8.10±0.10	6.90±0.26	6.93±0.06	7.73±0.06	7.20±0.00	7.50±0.00
8	8.53±0.06	7.53±0.06	7.90±0.17	7.97±0.12	7.73±0.06	8.10±0.10

Results are represented as mean±SEM on three measurements.

Table 5. Variation of alcohol concentrations (%) in Makgeollies during fermentation periods

Fermentation time (day)	Yeast strains					
	C	F	U	R	K	S
0	0	0	0.5	0	0	0.5
2	11.0	11.5	11.5	10.0	10.5	11.0
4	11.0	11.5	10.5	12.5	9.0	9.0
6	11.5	10.5	10.0	10.5	10.0	10.0
8	12.0	10.5	11.0	10.5	10.0	10.0

Table 6. Identities of DNA bands obtained from DGGE profiles of 16S rDNA in Makgeollies

Band No.	Closest relative	% Identity	Accession number
1	<i>Enterobacter gergoviae</i>	90%	HQ242716
2	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97%	HQ834496
3	<i>Lactobacillus fermentum</i>	92%	CP002033
4	-	-	-
5	<i>Oryzae sativa</i>	86%	-

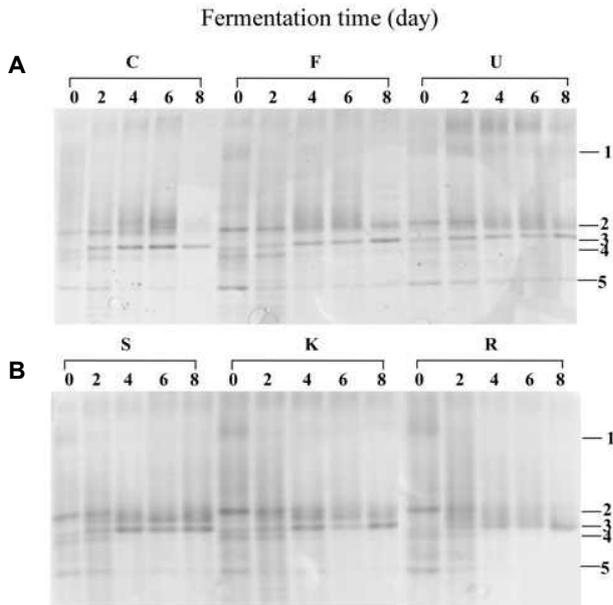


Fig. 1. DGGE profiles of 16S rDNA fragments from Makgeollies. C: commercial bread yeast, F: yeast isolated from Kyungnam traditional Makgeolli, U: yeast isolated from Ulsan traditional Makgeolli, S, K, R: yeasts isolated from Pusan traditional Makgeollies. DNA bands (number 1 to 5) were recovered from the gel and sequenced to identify the bacterial strains.

리들에 비해 밴드의 패턴이 단순하였으며, 발효 2일째부터 3번 밴드가 출현하였으나, 다른 막걸리들은 0일째부터 이 밴드가 출현하였다. 1번 밴드는 U 효모를 이용한 막걸리를 제외하고는 발효 4일째부터는 관찰되지 않았다.

Table 6은 Fig. 1에 나타난 각 밴드들을 염기서열 결정법을 통하여 동정한 결과이다. 가장 많이 검출된 2번 밴드의 16S rDNA 염기서열과 가장 유사한 서열을 나타내는 세균은 *Pediococcus pentosaceus*이었다. 이 세균은 그람 양성균의 운동성이 없고 포자를 형성하지 않는 혐기성 세균으로, 당을 이용하여 lactic acid를 생성하는 lactic acid bacteria에 속하며 pH 4.5~8.0 범위에서 성장한다[10]. 또한, 치즈, 식물, 고기 등의 발효균주로 사용되며 항균물질을 분비한다고 보고되어 있다[11]. 한편, 발효기간 동안 꾸준히 검출된 3번 밴드의 16S rDNA 염기서열과 가장 유사한 서열을 나타내는 세균은 *Lactobacillus fermentum*이었다. 이 세균은 발효식품에서 관찰

되는 그람 양성세균으로, 위산과 담즙에서도 생존이 가능하고 일부는 probiotic으로 작용하며 cholesterol 저해효과가 있다고 보고되었다[24]. 가장 많이 검출된 이 두 균주들은 막걸리의 산도증가에 기여함과 동시에 생리활성 등의 기능성 부가에 참여할 수 있을 것으로 판단된다. 발효 4일 이후에는 관찰되지 않았던 1번 밴드의 16S rDNA 염기서열과 가장 유사한 서열을 나타내는 세균은 *Enterobacter gergoviae*이었다. 이 세균은 장내 세균이다. 이는 원료인 쌀이나 종국에 존재했던 것이 검출되었을 가능성도 있지만 발효 4일 이후에는 관찰되지 않아 막걸리의 안전성에는 문제가 없는 것으로 판단되었다. 이 세균이 알코올에 의해 사멸한 것인지 산도 혹은 probiotics의 효과에 의해 사멸한 것인지는 확인할 수 없지만 막걸리 제조 시에 유의해야 할 세균이다. 한편, 이 실험에서는 세균의 16S rDNA를 증폭하였는데도 불구하고 5번 밴드에 해당하는 생물이 *Oryzae sativa*와 가장 높은 유사성을 나타내었는데, 이는 막걸리의 원료인 쌀에 해당하는 진핵생물이다. 하지만 이들 사이의 상동성이 86%이었으므로 높은 신뢰성을 나타내지는 않았다. 권 등[17]은 누룩을 이용한 막걸리 제조과정에서 원핵생물로서 *Lactobacillus*속 세균이 우점을 이루는 것을 확인하였으며, *Pediococcus pentosaceus*와 *Pantoea agglomerans* 등의 세균도 검출하였다. 본 연구에서 보다 권 등[17]의 연구에서 더 많은 종류의 세균들이 검출된 것은 막걸리 제조방법의 차이와 PCR primer의 차이 등이 원인인 것으로 판단된다.

진핵생물의 검출을 위한 28S rDNA의 분석 결과에서는 모든 막걸리 시료에서 하나 혹은 두 개의 밴드만이 검출되었다(Fig. 2). 이를 모두 회수하고 PCR 반응을 수행한 후 염기서열을 결정한 결과, 이 두 밴드의 염기서열과 가장 유사한 서열을 나타내는 생물은 *Saccharomyces cerevisiae*로 알코올발효에 관여하는 효모균이다(Table 7). *S. cerevisiae* 이외의 다른 진균들은 검출되지 않았는데, 이는 막걸리 제조과정에서 순수 배양된 *S. cerevisiae*를 첨가한 후 발효를 진행하여 이 균이 우점을 이루었기 때문인 것으로 추측된다. 권 등[17]은 누룩을 이용한 막걸리 제조과정에서 진핵생물로 *Pichia kudriavzevii*, *S. cerevisiae*, *Asidia idahoensis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Torulaspora delbrueckii* 등을 검출하였고, 발효 2일째까지 *P. kudriavzevii*가 우점을 이루었지만 3일 이후에는 *S. cerevisiae*가 우점을 이룬다는 것을 보고하였다. 본 연구에서는 순수 배양된 *S. cerevisiae*를 첨가하여 막걸리를

Table 7. Identities of DNA bands obtained from DGGE profiles of 28S rDNA in Makgeollies

Band No.	Closest relative	% Identity	Accession number
1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100%	JN637175
2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	97%	AB550108

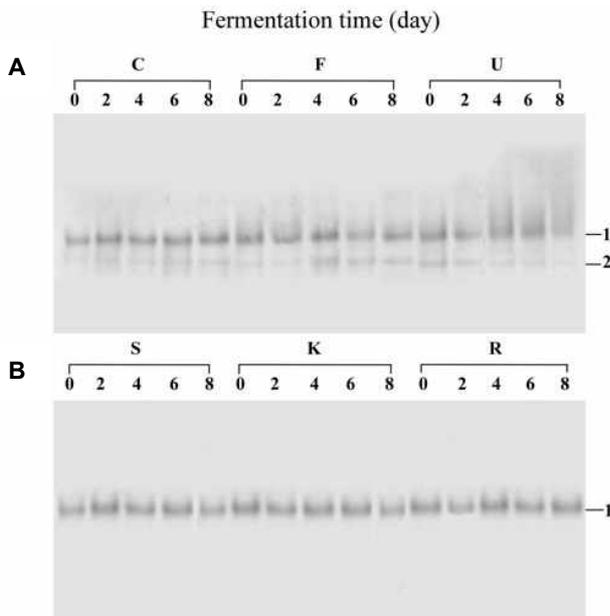


Fig. 2. DGGE profiles of 28S rDNA fragments from Makgeollies. C: commercial bread yeast, F: yeast isolated from Kyungnam traditional Makgeolli, U: yeast isolated from Ulsan traditional Makgeolli, S, K, R: yeasts isolated from Pusan traditional Makgeollies. DNA bands (number 1 and 2) were recovered from the gel and sequenced to identify the yeast strains.

제조하였기 때문에 발효초기부터 *S. cerevisiae*가 주로 검출되었지만, 권 등[17]은 다양한 진균들이 존재하는 누룩을 이용하여 막걸리를 제조하였기 때문에 발효초기에는 *S. cerevisiae*가 우점을 이루지 않았다. 따라서 막걸리 제조과정에서 배양된 *S. cerevisiae*의 첨가 여부에 따라 검출되는 진핵생물에 차이가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 권 등[17]은 *A. ichaensis* 등이 전분의 당화에 주된 역할을 하고 *S. cerevisiae*가 알코올 발효를 주도한다고 보고하였다.

References

- Amann, R. I., Ludwig, W. and Schleiffer, K. H. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**, 143-149.
- Association of official analytical chemists. 1965. *Official methods of analysis*. pp. 349, 10th ed., Association of official ana-

lytical chemists, Washington DC, USA.

- Chang, H. W., Kim, K. H., Nam, Y. D., Roh, S. W., Kim, M. S., Jeon, C. O., Oh, H. M. and Bae, J. W. 2008. Analysis of yeast and archaeal population dynamics in kimchi using denaturing gradient gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol* **126**, 159-166.
- Cheon, C., Rhee, I. S., Lee, S. K. and Kang, S. A. 2008. A study on the qualitative properties of traditional sake using allbanggae. *J Soc Food Sci Nutr* **37**, 784-791.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G. 2000. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol* **30**, 126-129.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. and Comi, G. 2004. Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Appl Environ Microbiol* **70**, 1883-1894.
- El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A. and Jean-Claude, O. 2007. Biodiversity of bacterial ecosystems in traditional Egyptian domiati cheese. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1248-1255.
- Han, E. H., Lee, T. S., Noh, B. S. and Lee, D. S. 1997. Volatile flavor component in mash Takju prepared by using different nuruks. *Korean J Food Sci Technol* **29**, 563-570.
- Heuer, H. and Smalla, K. 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., Wellington, E. M. H. and Trevors, J. T. (eds.), *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York, USA.
- http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/pedpe/pedpe.home.html
- Hu, Y., Xia, W. and Ge, C. 2006. Effect of mixed starter cultures fermentation on the characteristics of silver carp sausages. *World J Microbiol Biotechnol* **23**, 1021-1031.
- Jeon, M. H. and Lee, W. J. 2011. Characteristics of blueberry added *Makgeolli*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **40**, 444-449.
- Jeon, M. J., Kim, M., Lee, D. -G., Hwang, H. -J., Kang, M. S., Kim, B. K., Lee, S. W., Jang, H. and Lee, S. -H. 2012. Analysis of properties of Makgeollies made by isolated yeast strains from traditional Makgeollies. *Korean Soc Biotech Bioeng J* **27**, 21-27.
- Kim, M. J., Lee, S. Y., Kim, K. B., Song, W. R., Song, E. J., Kim, A. R., Kim, J. H., Ji, K. W., Ahn, I. S. and Ahn, D. H. 2007. Effect of chitosan of shelf-life and quality of Takju. *J Chitin Chitosan* **12**, 198-204.
- Kim, O. -S., Park, S. -S. and Sung, J. -M. 2012. Antioxidant

- activity and fermentation characteristics of traditional black rice wine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 1693-1700.
16. Kim, S., Kim, E., Yoon, S., Jo, N., Jung, S. -K., Kwon, S., Chang, Y. H. and Jeon, Y. 2011. Physicochemical and microbial properties of Korean traditional rice wine, Makgeolli, supplemented with cucumber during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **40**, 223-228.
 17. Kwon, S. J., Ahn, T. -Y. and Sohn, J. H. 2012. Analysis of microbial diversity in Makgeolli fermentation using PCR-DGGE. *J Life Sci* **22**, 232-238.
 18. Lee, C. H., Tae, W. T., Kim, G. M. and Lee, H. D. 1991. Studies on the pasteurization conditions of *Takju*. *Korean J Food Sci Technol* **40**, 194-200.
 19. Lee, D. -G., Lee, J. -H. and Kim, S. -J. 2005. Diversity and dynamics of bacterial species in a biofilm at the end of the Seoul water distribution system. *World J Microbiol Biotechnol* **21**, 155-162.
 20. Lee, D. P. 2006. Policy issues for the globalization of Korean traditional liquor. *Food Ind Nutr* **11**, 1-9.
 21. Lee, J. S., Lee, T. S., Noh, B. S. and Park, S. O. 1996. Quality characteristics of mash of *Takju* prepared by different raw materials. *Korean J Food Sci Technol* **28**, 330-336.
 22. Lim, S., Jwa, M. K., Mok, C., Park, Y. S. and Joo, G. J. 2004. Changes in microbial counts, enzyme activity and quality of foxtail millet *Takju* treated with high hydrostatic pressure during storage. *Korean J Food Sci Technol* **36**, 233-238.
 23. Muyzer, G., de Wall, E. C. and Uitterlinden, A. G. 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.
 24. Pan, D. D., Zeng, X. Q. and Yan, T. 2011. Characterization of *Lactobacillus fermentum* SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *J Sci Food Agric* **91**, 512-518.
 25. Röling, W. F. M., van Breukelen, B. M., Braster, M., Goelton, M. T., Groen, J. and van Verseveld, H. W. 2000. Analysis of microbial communities in a landfill leachate polluted aquifer using a new method for anaerobic physiological profiling and 16S rDNA based fingerprinting. *Microb Ecol* **40**, 177-188.
 26. Seo, M. Y., Lee, J. K., Ahn, B. H. and Cha, S. K. 2005. The changes of microflora during the fermentation of *Takju* and *Yakju*. *Korean J Food Nutr* **12**, 427-432.
 27. Shin, M. -O., Kang, D. -Y., Kim, M. -H. and Bae, S. -J. 2008. Effect of growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of Makgeolli fractions in various cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **37**, 288-293.
 28. Xia, S., Shi, Y., Fu, Y. and Ma, X. 2005. DGGE analysis of 16S rDNA of ammonia-oxidizing bacteria in chemical-biological flocculation and chemical coagulation systems. *Appl Environ Microbiol* **69**, 99-105.
 29. Yang, H. -S. and Eun, J. -B. 2011. Fermentation and sensory characteristics of Korean traditional fermented liquor (Makgeolli) added with citron (*Citrus junos* SIEB ex TANAKA) juice. *Korean J Food Sci Technol* **43**, 438-445.
 30. Yu, H., Ding, Y. S. and Mou, S. F. 2003. Direct and simultaneous determination of amino acids and sugars in rice wine by high performance anion exchange chromatography with integrated pulsed amperometric detection. *J Chromatogr* **11**, 721-728.

초록 : 전통막걸리에서 분리한 효모균주를 이용한 막걸리 발효과정 중의 물성 및 미생물 군집의 변화

전명제¹ · 장민경² · 이솔지² · 박성환¹ · 김미향³ · 손재혁⁴ · 이한승⁴ · 이동근^{1,2} · 이상현^{1,2*}

(¹신라대학교 일반대학원 생명공학과, ²신라대학교 제약공학과, ³신라대학교 식품영양학과, ⁴신라대학교 바이오식품소재학과)

전통막걸리들에서 순수분리한 효모균주 5종을 이용하여 각각 막걸리를 제조하면서 발효 시일에 따른 막걸리의 물성 변화와 PCR-DGGE를 이용하여 미생물 군집구조 변화를 조사하였다. 막걸리의 pH는 0일째 pH 6에서 발효 2일째 pH 3 정도의 큰 감소를 보였고 이후 큰 변화가 없었다. 발효일별로는 차이를 보였지만(ANOVA, $p < 0.001$) 균주별로는 차이가 없었다($p = 0.60$). 산도는 0.19~1.04% 범위였으며 발효 2일째부터 증가하였고 발효일자별($p < 0.001$) 및 균주별($p = 0.006$) 모두 차이가 있었다. C 균주의 산도 증가가 가장 컸으며 S 균주의 산도 증가가 가장 적었다. 아미노태 질소는 S 균주가 8일째 0.442%로 높은 값을 보였지만 다른 균주들은 모두 0.150% 이하를 나타내었다. 발효일자별($p = 0.4558$) 및 균주별($p = 0.3513$) 모두 큰 차이를 보이지 않았다. 당도는 빵효모균주인 C가 발효 4일째부터 다른 균주들에 비해 높았고 발효일자별($p < 0.0001$) 및 균주별($p = 0.007$) 모두 유의미한 차이를 보였다. 알코올 함량은 모든 효모균주에서 발효 2일째 10%의 급격한 증가를 보였으며 그 이후에 큰 차이가 없었다. 발효일자별($p < 0.0001$)로는 차이를 보였지만 균주별로는 차이는 없는 것으로 나타났다($p = 0.1464$). DGGE 밴드로 검출된 우점세균은 산성물질을 생산하며 기능성을 보이는 *Lactobacillus fermentum*와 *Pedococcus pentosaceus*였고, 우점진균은 *Saccharomyces cerevisiae*였는데 이는 효모균주 첨가에 의한 결과로 판단된다.