

## 누룩과 입국을 달리한 막걸리에서 항균활성을 가진 미생물의 분리동정

이준기<sup>1</sup> · 조현주<sup>1</sup> · 윤진아<sup>2</sup> · 정강현<sup>1</sup> · 송병춘<sup>3</sup> · 김경임<sup>4</sup> · 안정희<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>서울과학기술대학교 식품공학과, <sup>2</sup>배화여자대학교 식품영양과  
<sup>3</sup>건국대학교 식품생명과학부, <sup>4</sup>혜전대학교 호텔외식조리계열

### Isolation and Identification of Microorganisms with Antimicrobial Activity in Makgeolli of Different Kinds Koji and Nuruk

Jun-Ki Lee<sup>1</sup>, Hyeon-Ju Jo<sup>1</sup>, Jin-A Yoon<sup>2</sup>, Kang-Hyun Chung<sup>1</sup>,  
Byeong Chun Song<sup>3</sup>, Kyoung Im Kim<sup>4</sup>, and Jeung Hee An<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Food Science and Technology, Seoul National University of Science & Technology, Seoul 139-743, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Food & Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 110-735, Korea

<sup>3</sup>Div. of Food Bioscience, Konkuk University, Jeonbuk 380-701, Korea

<sup>4</sup>Div. of Hotel Culinary Arts & Foodservice, Hyejeon College, Chungnam 350-702, Korea

**ABSTRACT** In this study, we evaluated fermentation characteristics of microorganism with antimicrobial activity in makgeolli made from various kinds of koji and nuruk during fermentation. The pH of nuruk groups decreased compared to the koji groups after 3 days of fermentation. Acidity and alcohol contents of nuruk groups significantly increased compared to the koji groups. The total sugar contents of the koji groups were significantly higher than those of the nuruk groups after 15 days of fermentation. Sensory scores of koji groups (DKB) were higher than those of other samples. Antimicrobial activities of nuruk group (GND and ANF) against *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Bacillus cereus* were significantly higher compared to the koji group. ST-1, isolated from (Geumjeonggu nuruk D), showed the highest antimicrobial activity and was identified as *Paenibacillus polymyxa* strain RCP6 based on 16S rRNA sequencing. Our result suggest that *Paenibacillus polymyxa* from nuruk group produces a bacteriocin-like substrate with antimicrobial activity.

**Key words:** nuruk, koji, makgeolli, antimicrobial activity, *Paenibacillus polymyxa*

## 서 론

누룩은 각종 전분 분해효소가 풍부하여 효율적인 당화를 유도하는 효소제로서의 역할뿐만 아니라 효모의 증식으로 알코올 발효계의 역할을 수행하므로 주로 병행복 발효식으로 한국 전통 양주에 향과 맛을 내는 것으로 알려져 있다(1). 그러나 입국에서 사용되는 *Aspergillus kawachi*는 포자의 색이 희고, 유기산과 내산성 당화효소를 생산하므로 이를 탁주양조에 사용하면 술덧의 pH가 안전한 산성을 유지하고 양조시간이 단축되며 알코올 수율도 높아지게 된다(2). 일반적으로 입국은 탁주의 독특한 향이 없고 아미노산의 함량이 낮으며 입국에서 오는 유기산의 신맛이 지나치게 강하여 누룩으로 제조했을 때와 같은 조화로운 향미를 나타내지는 못하는 것으로 평가되고 있다(2). 누룩에 대한 생리활성에 대한 연구로는 누룩을 섭취 시 혈청 cholesterol치를 낮춘다는 연구(3), 누룩에서 스테롤을 분리하여 암세포를 억제

하는 연구(4), 누룩에서 분리된 killer toxin 생산균주 *Pichia anomala* K15의 천연 항균성 물질 특성 연구가 보고되었고(5), 누룩의 메탄올 추출물로 RAW 264.7 세포에서 산화질소의 생산을 억제하는 연구(6) 등의 누룩을 활용한 생리활성 기능적 측면을 보는 연구들이 활발히 이루어지고 있다. 그러나 누룩에서 박테리옌을 가진 미생물에 대한 동정연구는 아직 부족하다.

현재 박테리옌에 대한 연구는 유전적 조절의 기초연구로부터 식품저장성 효과에 이르기까지 광범위하게 이루어지고 있다(7). 이러한 박테리옌은 세균에 의하여 생합성된 후 세포 밖으로 배출된 화합물들로서 이들은 대부분 주로 생성균과 같은 속(genus)이나 종(species) 등의 몇몇 균주들에 대해서만 항균활성을 나타내 비교적 좁은 항균활성 범위를 가지고 있는 것으로 알려지고 있다(8). 때문에 식품부패나 식중독 등에 관여하는 세균, 효모, 곰팡이 등의 미생물에 대해 총체적으로 적용 가능한 넓은 범위의 항균력을 지닌 천연식품보존제의 개발이 요구된다. 주로 그람양성균의 생육저해를 할 수 있는 유산균 박테리옌과 달리(9), *Paenibacillus*가 생산하는 박테리옌은 그 항균활성 범위가 매우

Received 15 October 2013; Accepted 15 March 2014

\*Corresponding author.

E-mail: anjhee@kku.ac.kr, Phone: +82-43-840-3584

넓고 다양한 특성을 지니고 있다(10). *Paenibacillus*는 다당류나 향균물질 등 여러 유용물질을 생산하는 것으로 알려진 그람 양성 세균이다(10). *Paenibacillus* 속의 균들은 다양한 종류의 향균물질을 생산하고(11), *Paenibacillus*에서 *Paenibacillus koreensis* KCTC 2393T와 *Paenibacillus ehimensis* IFO 15659T가 항미생물 효과를 가지고 있으며(12), *Paenibacillus* sp. strain B2에서 polymyxin B<sub>1</sub>과 threonine, phenylalanine, leucine, 2,4-diaminobutyric acid로 구성된 분자량이 1,184.7 Da인 향균물질이 보고되었다(13). 또한 *Paenibacillus polymixa*에서 새로운 lantibiotic과 polymixin을 생산하는 균주가 보고되었다(14).

본 연구에서는 누룩과 입국 종류를 달리하여 만든 막걸리에서 발효 과정 중 변화되는 이화학적 특성을 비교 분석하였으며 주정발효 중에 정상적인 발효를 저해하는 오염균들의 생육을 방지하고 발효식품의 저장기간을 연장하기 위하여 누룩과 입국에서 만든 막걸리에서 박테리오신의 특성을 가진 미생물을 분리동정 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

막걸리 제조 원료로 여주 이천 쌀을 구입하여 사용하였다. 효모는 건조효모(SAF-INSTANT, Lille, France)를 사용하였고, 경기도 화성시 입국(Hwaseongsi koji A, HKA), 충청남도 당진군 입국(Dangjingung koji B, DKB), 충청북도 청주시 입국(Cheongjusi koji C, CKC), 부산광역시 금정구 누룩(Geumjeonggu nuruk D, GND), 광주광역시 광산구 누룩(Gwangsangu nuruk E, GNE), 경상북도 안동시 누룩(Andongsi nuruk F, ANF)을 구매하여 사용하였다.

### 막걸리 담금

막걸리에 사용된 쌀(2 kg)은 세척하여 5시간 동안 물에 침지한 후, 체에 밭쳐 60분 동안 물기를 제거한 다음 쌀을 찹쌀에 넣고 100°C에서 50분 동안 증자하고 10분 뜸을 들인 후 고두밥을 만들었다. 누룩막걸리는 고두밥을 빠르게 식히고 10 L의 유리병에 고두밥(2 kg), 효모(14 g), 누룩(400 g), 생수(5 L)를 넣고 골고루 섞어주었다. 입국막걸리는 고두밥(2 kg), 효모(14 g), 입국(200 g)을 골고루 섞어 25°C 인큐베이터에 15일간 보관하여 사용하였다.

### pH, 산가 함량 측정

pH측정은 conical tube에 여과한 시료 5 mL를 넣어 pH meter(HI 8014, Hanna Instruments, Keysborough VIC, Australia)로 측정하였고, 산가 함량 측정은 국제청의 주류 분석규정(15)에 명시된 내용으로 하였다. 여과한 시료 10 mL에 1% phenolphthalein(Daejung Chemicals & Metals Co., Ltd., Gyeonggi, Korea) 지시약을 2~3방울 첨가한 후 0.1 N NaOH 용액(Daejung Chemicals & Metals Co.)을

담홍색이 나타날 때까지 적정하여 적정 소비량을 측정한 후 시료 중의 총산을 초산 함량(%)으로 환산하였다.

### 총당, 알코올 함량 측정

알코올 함량 측정은 메스실린더에 시료 100 mL를 취한 후 500 mL 삼각플라스크에 옮긴 후에 증류수 10 mL를 3회 나누어 시료를 담았던 100 mL 메스실린더에 씻은 후 그 액을 500 mL 삼각플라스크에 합친 후 알코올 함량을 측정하였다. 증류액이 70 mL가 되면 중지하고 증류수 30 mL를 보충하여 메스실린더 눈금이 100 mL가 되도록 정용한 후 잘 흔들어 20°C로 온도를 맞추어 주정계로 측정한 후 주류 분석법(15) 표에 의거하여 환산하였다. 총당 함량 측정은 phenol-sulfuric acid법으로 측정하였다(16). 막걸리 시료 1 mL를 정용 플라스크에 넣고 증류수로 1,000배 희석한 후 vial에 2 mL를 취한 후 5% phenol(Daejung Chemicals & Metals Co.) 용액 1 mL를 넣고 혼합시켰다. 여기에 95% sulfuric acid(Daejung Chemicals & Metals Co.) 5 mL를 천천히 가하여 발열시킨 후 30분 동안 상온 방치한 다음 spectrometer(Genesys 10-S, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA)를 이용하여 470 nm에서 흡광도를 측정한다. 당 정량은 glucose를 표준물질로 사용하여 standard curve로 환산하였다.

### 총균수 측정

총균수 측정은 막걸리 시료를 균일하게 섞어 1 mL를 멸균한 생리 식염수에 10진희석법에 따라 희석하고 희석된 시료 1 mL와 plate count agar(pancreatic digest of casein 5.0 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1.0 g, agar 15.0 g, distilled water 1.0 L; Difco Co., Detroit, MI, USA) 20 mL를 petri dish에 균일하게 잘 혼합한 후 37°C에서 24~48시간 동안 배양하여 총균수를 계수하였다.

### 관능검사

관능검사는 색, 단맛, 신맛, 쓴맛, 향, 목넘김, 전반적 기호도의 항목으로 7점 척도법으로 서울과학기술대학교 학생 20명을 선정하여 실시하였다.

### 막걸리의 항균활성

막걸리 시료 100 mL를 농축수기에 담아 이를 rotary vacuum evaporator(R-114, Buchi Co., Flawil, Switzerland)로 농축하여 알코올을 분해시킨 후 시료를 다시 동결건조(freezing dryer, Ilshin Co., Seoul, Korea) 하였다. 분말화된 시료를 증류수에 녹여서 최종 농도 10 mg/mL로 맞춘 후에 paper disk(8 mm)를 이용하여 항균 실험을 실시하였다. 즉 배지를 굳힌 다음 *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp, *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* 각각의 균들을 100 µL씩 도말한 후 paper disk(8 mm)를 배지 위에 놓고 향균물질을

가하였다. 37°C 인큐베이터에서 24시간 동안 균을 배양한 후 paper disk 주위에 생기는 clear zone의 생성 유무를 확인하였다.

**분리된 균주의 향균활성**

균에 해당하는 평판배지에 균주를 streaking 하여 배양한 후 배양된 각 균주를 백금이로 취해 각각 5 mL의 액체배지에 접종한 후 shaking incubator(Lab Companion Model SI-600R, Jeio Tech Inc., Seoul, Korea)에서 37°C로 배양하고 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 측정된 흡광도 값이 0.2를 기준으로 하여 배양한 후 실험에 사용하였다. 각각의 평판배지에 상기의 균주 100 µL를 멸균된 삼각봉을 이용하여 균을 고르게 도말배지에 흡수시킨 후 배지의 표면 위에 멸균된 8 mm paper disc를 올려놓고 분리된 ST-1균을 40 µL를 주입하여 완전히 흡수시킨 다음 37°C incubator에서 24시간 배양하였다.

**16S rRNA 유전자 염기서열 및 계통관계 분석**

균주 ST-1(GND)을 NB 배지에 접종하여 37°C 진탕배양기에서 180 rpm으로 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포 1 mL를 10,000 rpm에서 원심분리 후 상층액을 제거하여 cell re-suspension solution 300 µL를 pellet 현탁하고 lysozyme(100 mg/mL) 2 µL 혼합한 후 인큐베이터에서 (37°C, 1시간) 반응시켰고 10,000 rpm에서 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 다시 cell lysis solution 300 µL를 pellet 현탁하였고 RNase A(4 mg/mL) 1.5 µL를 혼합하여 인큐베이터에서(37°C, 1시간) 반응시켰다. 이후 실온에서 5분간 방치 후 protein precipitation solution 100 µL 첨가하여 1분 이상 vortexing 하였고 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 100% isopropanol 300 µL가 들어 있는 새로운 tube에 첨가하여 inverting을 50회 하였고 다시 10,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 이후 80% ethanol 500 µL 첨가하여 inverting 한 후 10,000 rpm에서 1분간 원심분리 하여 상층액을 제거 하였고 동일한 방법으로 한 번 더 수세하여 남은 ethanol을 pipette으로 완전히 제거한 후 상온에서 10~15분간 건조하였다. DNA hydration solution을 20~100 µL 첨가 후 vortexing을 5초간 하였고 DNA elution agarose gel에 전기영동 하여 농도 확인 후 4°C에서 보관하였다. 세균의 16S rDNA를 증폭하기 위해 genomic DNA와 27F, 1492R, 805R로 이루어진 프라이머를 사용하여 이미 알려진 방법에 따라 PCR을 수행하였고 (주)솔젠트(대전, 한국)에 염기서열 분석을 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 BLAST(<http://BLAST.ncbi.nlm.nih.gov>) 프로그램을 이용하여 동정하였다.

**통계분석**

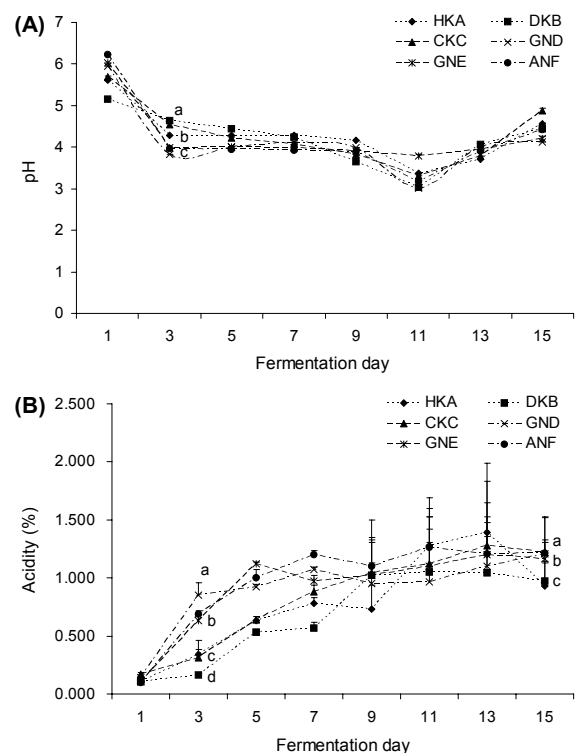
모든 값은 SPSS Version 18.0 package program(SPSS

Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 시험구의 평균과 표준편차를 산출하고 Duncan법을 이용하여 각 시험구간의 유의차를 5%( $P<0.05$ ) 유의수준에서 검증하였다.

**결과 및 고찰**

**누룩과 입국을 달리한 막걸리의 pH, 산도 측정**

누룩과 입국을 달리한 막걸리의 발효 과정 중 pH(A)를 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 입국균으로 담근 직후 pH는 HKA 5.61, DKB 5.16, CKC 5.69였으며 누룩균으로 담근 직후 pH는 GND 5.94, GNE 6.03, ANF 6.21로 나타났다. 이후 3일째 급격히 감소하여 HKA 4.28, DKB 4.65, CKC 4.55, GND 3.83, GNE 3.98, ANF 3.97로 a(DKB, CKC), b(HKA), c(GND, GNE, ANF)로 실험군 간에 유의적 차이가 나타났다. 5일째부터는 변화 없이 일정한 수준의 pH를 나타내었고 최종 pH는 HKA 4.57, DKB 4.45, CKC 4.87, GND 4.13, GNE 4.2, ANF 4.43으로 실험군 간에 유의적 차이는 나타나지 않았다. 입국과 누룩의 종류에 관계없이 pH는 큰 차이를 보이지 않았다. pH의 차이는 함유되어 있는 유기산 종류에 따른 수소이온의 해리도에 의한 것이며(16), pH의 저하는 부패균에 의한 오염방지 역할을 함과 동시에



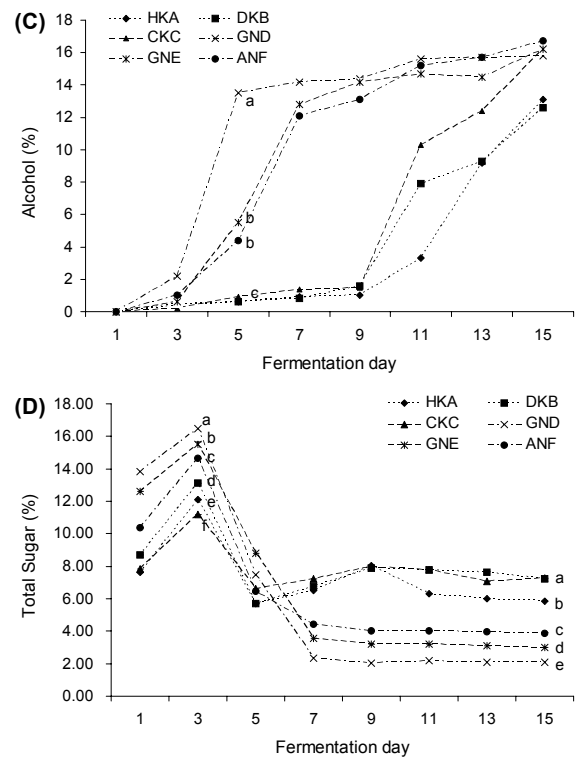
**Fig. 1.** Changes in pH (A) and acidity (B) of makgeolli added koji and nuruk during fermentation period. Values are mean± standard deviations of triplicate determination. Different letters in the same fermentation day (a-d) are significant differences ( $P<0.05$ ). HKA, Hwaseongsi koji A; DKB, Dangjingung koji B; CKC, Cheongjusi koji C; GND, Geumjeonggu nuruk D; GNE, Gwangsangu nuruk E; ANF, Andongsi nuruk F.

활발한 효모균의 증식을 가져와 정상적인 발효가 일어나게 한다(17). 술덧에 생육하는 미생물에 의해서 유기산의 생성이 빠르게 진행됨에 따라 발효 2일째부터 pH가 낮아지는 것으로 사료된다(18). 담금 직후부터 발효 11일까지 감소하다가 증가하는 이유는 발효가 진행됨에 따라 생성되는 유기산과 알코올이 서로 반응하여 ester와 같은 향미 형성 등에 이용되므로 pH가 증가하는 것으로 보인다(19). 이는 누룩 종류를 달리하여 담금한 탁주 발효 과정 중 술덧의 품질특성(20)과 비슷한 경향을 보였다.

누룩과 입국을 달리한 막걸리의 발효 과정 중 산도(B)를 측정된 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 담금 직후 산도는 HKA 0.110%, DKB 0.110%, CKC 0.170%, GND 0.140%, GNE 0.110%, ANF 0.100%로 실험군 간에 유의적인 차이를 보여주지 않았다. 이후 발효 5일 HKA 0.630%, DKB 0.530%, CKC 0.640%, GND 0.920%, GNE 1.120%, ANF 1.000%로 GNE에서 가장 높은 값을 보여주었으며 모든 산도가 증가됨을 보여주었다. 이후 점차 증가하는 경향을 보여주었으며 15일째 HKA 0.933%, DKB 0.975%, CKC 1.224%, GND 0.972%, GNE 1.167%, ANF 1.212%로 실험군 간에 입국을 첨가한 막걸리와 누룩을 첨가한 막걸리 간에 유의적 차이를 보여주었다. 발효기간 동안 pH 변화와 총산의 함량 변화를 보면 총산 함량은 증가하고 있으나, pH가 낮아지지 않는 이유로는 단백질 분해로 아미노산이 증가하여 완충능력을 높여주었기 때문이라고 보고되었으며(21), 총산의 변화는 막걸리의 성분 변화를 쉽게 알 수 있는 요인일 뿐만 아니라, 알코올 생성과정에서 복합적으로 생성되므로 막걸리의 발효 진행 상황을 알 수 있는 지표성분이 된다(22). 이는 누룩 종류를 달리하여 담금한 탁주 발효 과정 중 술덧의 품질특성(20)과 비슷한 경향을 보였다.

#### 누룩과 입국을 달리한 막걸리의 알코올, 총당 함량

Fig. 2는 누룩과 입국을 달리한 막걸리의 발효 과정 중 알코올(C)을 측정된 결과이다. 담금 직후 알코올 함량은 0%에서 시작하여 담금 3일째 HKA 0.4%, DKB 0.5%, CKC 0.2%, GND 2.2%, GNE 0.6%, ANF 1%로 D에서 가장 높은 알코올 함량이 나타났다. 발효 5일 HKA 0.6%, DKB 0.6%, CKC 0.9%, GND 13.5%, GNE 5.5%, ANF 4.4%로 GND에서 가장 높은 값이 13.5가 나왔다. 이후 15일 HKA 13.1%, DKB 12.6%, CKC 16.2%, GND 15.8%, GNE 16.2%, ANF 16.7%로 ANF에서 16.7%로 가장 높은 값을 나타내었다. 누룩으로 만든 막걸리가 입국으로 만든 막걸리에 비해 알코올 함량이 더 높았다. 여기서 보이는 입국과 누룩의 알코올 함량 차이는 탁주의 주질을 좌우하는 가장 중요한 성분으로(23), 원료에 대한 누룩 중의 효소나 술덧 중에 생육하는 효모의 활성도 및 탄수화물의 비율이 상이하면 에탄올의 함량 차이가 나타난다고 보고되어 있는 것(24)과 같이, 본 연구에서도 당함량(성분)이 다르기 때문에 에탄올 생성에 함량이 달라져 알코올 함량 증가의 차이가 나타나는 경향을 보였다.



**Fig. 2.** Changes in alcohol (C) and total sugar (D) of makgeolli added koji and nuruk during fermentation period. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different letters in the same fermentation day (a-f) are significant differences ( $P<0.05$ ). Samples are the same as in Fig. 1.

누룩과 입국을 달리한 막걸리의 발효 과정 중 총당(D)을 측정된 결과를 Fig. 2에 보여주었다. 담금 직후 총당은 HKA 7.62%, DKB 8.72%, CKC 7.82%, GND 13.82%, GNE 12.60%, ANF 10.36%이었으며 3일째 급격히 증가하여 HKA 12.10%, DKB 13.11%, CKC 11.17%, GND 16.47%, GNE 15.52%, ANF 14.64%로 나타났다. 이후 GND, GNE, ANF에서는 7일까지 감소한 후 꾸준히 유지되는 경향을 보였으며 HKA, DKB, CKC에서는 증가하는 경향을 보였다. 15일째 HKA 5.87%, DKB 7.20%, CKC 7.25%, GND 2.10%, GNE 3.00%, ANF 3.88%로 나타났다. 입국과 누룩 간의 차이를 보여주었다. 탁주에서 당분은 미생물의 발효기질로 이용되어 에탄올을 생성하며 술 향기 생성과 감미에도 영향을 주는 중요 성분이다(20). 입국에서 나온 미생물의 탄수화물 분해능이 좋기 때문에 총당 함량이 더 높은 것으로 사료되며 관능검사 결과 입국으로 만든 막걸리의 단맛 부분에서 높은 기호도가 나왔다.

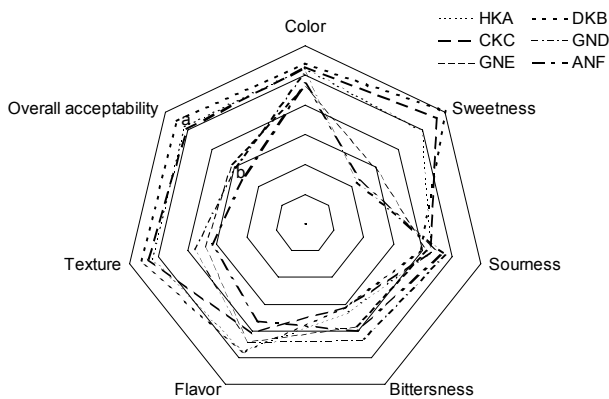
#### 누룩과 입국을 달리한 막걸리의 총균수 측정

누룩과 입국을 달리한 막걸리의 발효 과정 중 총균수를 측정된 결과는 Table 1과 같다. 담금 직후 총균수는 HKA  $36.67 \pm 5.86 \times 10^8$ , DKB  $8.33 \pm 5.03 \times 10^5$ , CKC  $264 \pm 9.9 \times 10^7$ , GND  $275.67 \pm 22.72 \times 10^8$ , GNE  $60.67 \pm 7.02 \times 10^7$ ,

**Table 1.** Changes in microbial cell counts of makgeolli added koji and nuruk during fermentation period

Day	Makgeolli					
	HKA	DKB	CKC	GND	GNE	ANF
1	3.67±0.59 × 10 <sup>9c</sup>	8.33±5.03 × 10 <sup>5d</sup>	2.64±0.10 × 10 <sup>9c</sup>	2.76±0.23 × 10 <sup>10b</sup>	6.07±0.70 × 10 <sup>8c</sup>	2.89±0.74 × 10 <sup>13a</sup>
3	1.16±0.80 × 10 <sup>10b</sup>	1.34±0.15 × 10 <sup>13a</sup>	1.03±0.15 × 10 <sup>12a</sup>	3.7±0.70 × 10 <sup>10b</sup>	3.05±0.08 × 10 <sup>13a</sup>	2.10±0.26 × 10 <sup>12a</sup>
5	2.48±1.01 × 10 <sup>11b</sup>	3.13±0.12 × 10 <sup>13a</sup>	3.14±0.14 × 10 <sup>13a</sup>	3.4±0.46 × 10 <sup>9c</sup>	4.80±0.40 × 10 <sup>8d</sup>	4.90±0.70 × 10 <sup>9c</sup>
7	2.88±0.72 × 10 <sup>14a</sup>	1.84±0.08 × 10 <sup>13b</sup>	3.27±1.07 × 10 <sup>14a</sup>	3.30±0.62 × 10 <sup>6d</sup>	3.83±0.47 × 10 <sup>8c</sup>	2.50±0.70 × 10 <sup>5d</sup>
9	2.70±0.21 × 10 <sup>12a</sup>	9.60±0.12 × 10 <sup>9c</sup>	8.40±1.97 × 10 <sup>11b</sup>	3.87±0.12 × 10 <sup>5d</sup>	3.30±0.44 × 10 <sup>8c</sup>	8.33±8.39 × 10 <sup>4d</sup>
11	1.83±0.45 × 10 <sup>9b</sup>	3.30±0.85 × 10 <sup>8c</sup>	7.67±0.10 × 10 <sup>11a</sup>	3.50±0.36 × 10 <sup>5d</sup>	4.70±1.50 × 10 <sup>8c</sup>	3.67±2.89 × 10 <sup>4d</sup>
13	3.30±0.42 × 10 <sup>7b</sup>	1.10±0.40 × 10 <sup>8a</sup>	4.67±1.80 × 10 <sup>8a</sup>	3.33±0.32 × 10 <sup>4c</sup>	5.13±1.72 × 10 <sup>6b</sup>	3.87±1.99 × 10 <sup>4c</sup>
15	3.43±0.12 × 10 <sup>6a</sup>	4.33±1.53 × 10 <sup>5b</sup>	1.33±1.53 × 10 <sup>5a</sup>	3.30±1.00 × 10 <sup>4c</sup>	4.27±1.57 × 10 <sup>6a</sup>	2.05±0.50 × 10 <sup>4c</sup>

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts in a row (a-d) are significant differences ( $P<0.05$ ). Samples are the same as in Fig. 1.



**Fig. 3.** Sensory evaluation of makgeolli with different levels of koji and nuruk. Samples are the same as in Fig. 1.

ANF 289±73.54×10<sup>11</sup>으로 발효 1일 F에서 가장 큰 값이 나타났다. 발효 7일째의 총균수는 HKA 288±71.53×10<sup>12</sup>, DKB 183.5±7.78×10<sup>11</sup>, CKC 326.67±107.04×10<sup>12</sup>, GND 33±6.24×10<sup>5</sup>, GNE 38.33±4.73×10<sup>5</sup>, ANF 25±7×10<sup>4</sup>으로 HKA와 GND에서 발효기간 중 가장 큰 값을 나타내었고 7일 이후 감소하는 경향을 보여 발효 15일째의 총균수는 HKA 34.33±1.15×10<sup>5</sup>, DKB 4.33±1.53×10<sup>5</sup>, CKC 1.33±1.53×10<sup>5</sup>, GND 33±1×10<sup>3</sup>, GNE 42.67±15.7×10<sup>5</sup>, ANF 20.5±4.95×10<sup>3</sup>으로 나타났다. 이와 같은 결과는 누룩보다 입국에서 총당과 환원당 함량이 높은 것으로 나타나기 때문에 입국 막걸리에 비해 누룩 막걸리의 미생물 수가 줄어든 것으로 보인다.

**누룩과 입국을 달리한 막걸리의 관능검사 결과**

누룩과 입국을 달리한 막걸리의 관능검사 결과는 Fig. 3에 나타내었다. DKB는 색, 단맛, 향, 목넘김에서 기호도가 높았고 GND는 신맛과 쓴맛에서 기호도가 높았다. 전반적 기호도에서 HKA 5.15, DKB 5.46, CKC 5.04, GND 2.96, GNE 3.15, ANF 2.58로 B에서 가장 높은 값이 나왔지만 통계적으로 누룩과 입국 간의 유의적 차이를 보여주었고 입국에서 더 맛이 좋다는 결과를 얻었다.

**누룩과 입국을 달리한 막걸리의 항균활성**

누룩과 입국을 달리한 막걸리의 항균활성 결과를 Table 2에 나타내었다. Paper disc agar diffusion법에 따라 clear zone 유무를 관찰하였다. 동결건조 한 시료 최종 농도 10 mg/mL로 주입하였다. HKA에서는 *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*에서 10 mm의 clear zone이 형성되었고, CKC에서는 *Salmonella enterica*에서 10 mm, *Escherichia coli*에서 10 mm, *Bacillus cereus*에서 10 mm의 clear zone이 형성되었다. GND에서는 *Salmonella enterica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* 9 mm의 clear zone이 형성되었다. GNE에서는 *Salmonella enterica*에서 12 mm, *Bacillus subtilis*에서 10 mm, *Bacillus cereus*에서 9 mm의 clear zone이 형성되었고, ANF에서는 *Salmonella enterica*에서는 12 mm, *Basillus subtilis*에서 10 mm, *Escherichia coli*에서는 10 mm, *Bacillus subtilis*에서 11 mm의 clear zone이 형성되었다. DKB에서는 아무런 활성이 나타나지 않았다. 따라서 clear zone 유무에

**Table 2.** Antimicrobial effect of makgeolli added koji and nuruk

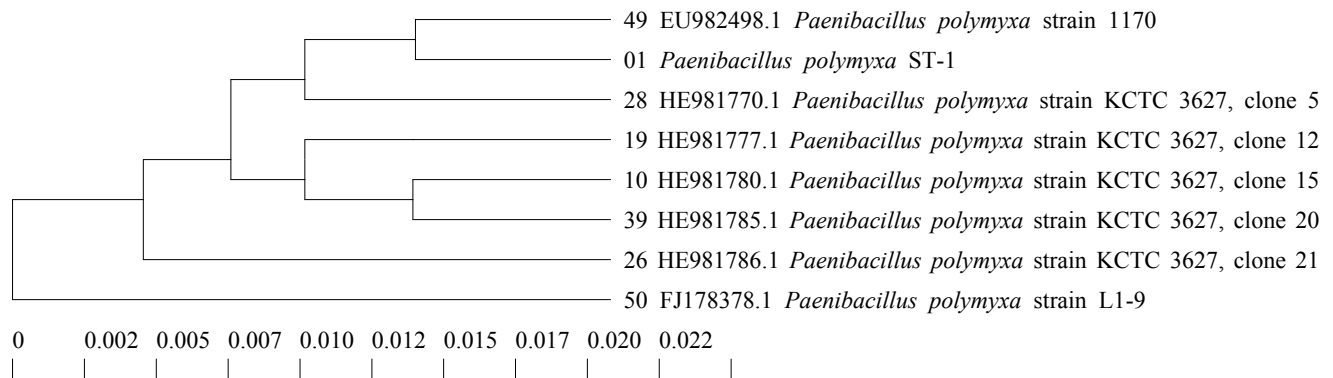
Bacterial stains	Makgeolli (clear zone: mm)					
	HKA	DKB	CKC	GND	GNE	ANF
<i>Salmonella enterica</i>	—	—	9±0.1 <sup>c</sup>	10±0.1 <sup>b</sup>	12±0.1 <sup>a</sup>	12±0 <sup>a</sup>
<i>Bacillus subtilis</i>	—	—	—	—	10±0.1 <sup>a</sup>	10±0.1 <sup>a</sup>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10±0.1 <sup>a</sup>	—	9±0.1 <sup>b</sup>	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	10±0.1 <sup>a</sup>	—	9±0.1 <sup>b</sup>	10±0.1 <sup>a</sup>	—	10±0.1 <sup>a</sup>
<i>Shigella flexneri</i>	—	—	—	—	—	—
<i>Bacillus cereus</i>	—	—	—	10±0.1 <sup>a</sup>	9±0.1 <sup>b</sup>	11±0.1 <sup>a</sup>

Paper disk 8 mm. Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts in a row (a-c) are significant differences ( $P<0.05$ ). Samples are the same as in Fig. 1.

**Table 3.** Antimicrobial effect of bacterias isolated from makgeolli

	Bacterial stains (clear zone: mm )					
	<i>S. enterica</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>B. cereus</i>
ST-1	12±0.1 <sup>a</sup>	—	—	11±0.1 <sup>b</sup>	—	10±0.1 <sup>c</sup>
ST-2	—	12±0 <sup>a</sup>	—	11±0 <sup>b</sup>	—	—
ST-3	—	9±0 <sup>a</sup>	—	—	—	—
ST-4	—	10±0 <sup>a</sup>	—	—	—	—
ST-5	—	9±0 <sup>a</sup>	—	—	—	—

Values are mean±standard deviations of triplicate determination. Different superscripts in a row (a-c) are significant differences ( $P<0.05$ ).

**Fig. 4.** Phylogenetic tree of *Paenibacillus polymyxa*. ST-1 isolated from nuruk based on 16S rRNA sequence.

따른 막걸리 샘플에 대한 항균활성을 평가한 결과 GND(누룩균)와 ANF(누룩균)에서 가장 좋은 항균력이 있는 것으로 나타났다. *P. polymyxa* 균은 토양에서 분리하여 *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella boydii*, *E. coli* (EHEC), *Vibrio cholerae*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus* 균에서 항균력이 있는 것으로 보고되었다(25).

#### 누룩과 입국을 달리한 막걸리의 항균활성 미생물 분리동정

항균력이 가장 좋은 GND, ANF에서 항균활성이 있는 미생물을 분리동정 하여 9 colony를 분리하고 그중에서 GND에서 분리된 ST-1의 항균활성 실험 결과는 Table 3에 나타내었다. ST-1은 *Salmonella enterica*에서는 12 mm, *Escherichia coli*에서는 11 mm, *Bacillus cereus*에서는 10 mm로 clear zone이 형성되는 것으로 보아 강력한 항균활성을 보여주었다. 최종 선별한 항균활성을 가지는 균주인 ST-1을 plate count agar를 이용하여 37°C에서 1일간 순수 배양한 후 16S rRNA 유전자 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석 결과(Fig. 4), *Paenibacillus* sp.의 종을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 *Paenibacillus polymyxa* strain RCP6과 99%의 상동성을 나타내었다.

## 요 약

누룩균과 입국균을 달리 첨가하여 제조한 막걸리의 발효 중의 이화학적 특성과 항균활성을 조사하였고 발효 과정 중 항균활성이 있는 미생물을 동정하였다. 발효 3일째 pH 결과는 누룩균이 입국균에 비해서 낮았다. 그러나 산도와 알코올의 함량은 발효 15일째에서 누룩균이 입국균에 비해서 유의적으로 높았다. 총당과 총균수는 입국으로 만든 막걸리가 누룩으로 만든 막걸리보다 더 높게 나타났다. 관능검사 평가 결과, 색, 단맛, 향, 목넘김, 전반적 기호도는 입국균(DKB)이 가장 우수하게 나타났다. 항균활성 결과 누룩 샘플 GND, ANF에서 *Salmonella enterica*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*에서 항균력이 나타난 미생물을 동정하였다. 균주 ST-1은 GND에서 분리하여 16S rRNA 염기서열에 기초하여 동정한 결과 *Paenibacillus polymyxa* strain RCP6과 99%의 상동성을 보였다. 따라서 *P. polymyxa* ST-1은 항진균활성과 항세균활성을 가진 bacteriocin-like substances를 생산함을 알 수 있고 이와 같은 새로운 항미생물 물질은 천연식품보존제 및 사료보존제뿐만 아니라 항생제 대체 의약품으로도 활용이 기대되며, 이를 위하여 향후 이 물질들의 보다 정확한 구조 및 특성을 규명하는 연구가 필요하다.

## 감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원 고

부가 식품기술개발사업(112123-3)에 의해 이루어진 것임.

REFERENCES

1. Lee HH, Lee JH, Ko YJ, Park MH, Lee JO, Ryu CH. 2009. Changes in allergenicity and quality of *Nuruk* during fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 76-82.
2. So MH. 1999. Characteristics of a modified *Nuruk* made by inoculation of traditional *Nuruk* microorganisms. *Korean J Food & Nutr* 12: 219-225.
3. Yoon CG, Chae SN, Huh NE, Kim HS, Yu TS. 1999. Effects of *nuruk* or wheat bran supplemented diet on the serum levels of cholesterol and activities of hepatic oxygen free radical metabolizing enzymes in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 212-217.
4. Lee DY, Lee SJ, Kwak HY, Jung L, Heo J, Hong S, Kim GW, Baek NI. 2009. Sterols isolated from *nuruk* (*Rhizopus oryzae* KSD-815) inhibit the migration of cancer cells. *J Microbiol Biotechnol* 19: 1328-1332.
5. Jung HK, Park CD, Lee GD, Park SC, Park HH, Hong JH. 2007. Characteristics of *Pichia anomala* K15 producing killer toxin isolated from traditional *Nuruk*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1077-1082.
6. Eun KJ, Jung SK, Lee SJ, Lee KW, Kim GW, Lee HJ. 2008. *Nuruk* extract inhibits lipopolysaccharide-induced production of nitrite and interleukin-6 in RAW 264.7 cells through blocking activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Microbiol Biotechnol* 18: 1423-1426.
7. Han KS, Oh SJ, Jeon WM, Imm JY, Rheem SS, Kim SH. 2002. Development of bacteriocin preparations from lactic acid bacteria against *Salmonella* using an experimental design for mixtures. *J Korean Dairy Technol Sci* 20: 1-8.
8. Chang M, Chang HC. 2006. Enhancement of bacteriocin production by *Bacillus subtilis* cx1 in the presence of *Bacillus subtilis* ATCC6633. *Kor J Microbiol Biotechnol* 34: 221-227.
9. Yang EJ, Chang HC. 2007. Characterization of bacteriocin-like substances produced by *Bacillus subtilis* MJ1. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 339-346.
10. Jung HK, Park SC, Park BK, Kim SD, Nam DH, Hong JH. 2008. Characteristics of the antibacterial substance produced by *Paenibacillus polymyxa* JB115. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 65-69.
11. Shin ES, Kwon SI, Yoo KH. 2007. Optimization of culture conditions for the production of antibacterial activities by *Paenibacillus polymyxa* DY1 isolated from soil. *Korean J Environ Biol* 24: 342-348.
12. Kim DS, Bae CY, Jeon JJ, Chun SJ, Oh HW, Hong SG, Baek KS, Moon EY, Bae KS. 2004. *Paenibacillus elgii* sp. nov., with broad antimicrobial activity. *Int J Syst Evol Microbiol* 54: 2031-2035.
13. Selim S, Negrel J, Govaerts C, Gianinazzi S, van Tuinen D. 2005. Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. *Appl Environ Microbiol* 71: 6501-6507.
14. He Z, Kislá D, Zhang L, Yuan C, Green-Church KB, Yousef AE. 2007. Isolation and identification of a *Paenibacillus polymyxa* strain that coproduces a novel lantibiotic and polymyxin. *Appl Environ Microbiol* 73: 168-178.
15. NTSTSI. 2008. *Manufacturing guideline of takju and yakju*. National Tax Service Technical Service Institute, Seoul, Korea. p 195-198.
16. Kong MH, Jeong ST, Yeo SH, Choi JH, Choi HS, Han GJ, Jang MS, Chung IM. 2011. Determination of ginseng *Yakju* quality using different percentages and application dates of ginseng. *J East Asian Soc Dietary Life* 21: 207-214.
17. Kim JY, Yi YH. 2010. pH, acidity, color, amino acids, reducing sugars, total sugars, and alcohol in puffed millet powder containing millet *takju* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 42: 727-732.
18. Park SS, Yoon JA, Kim JJ. 2010. Quality properties of *Takju* (rice wine) added with kidney bean. *J East Asian Soc Dietary Life* 20: 575-581.
19. Jin TY, Lee WG, Lee IS, Wang MH. 2008. Changes of physicochemical, sensory and antioxidant activity characteristics in rice wine, *yakju* added with different ratios of *Codonopsis lanceolata*. *Korean J Food Sci Technol* 40: 201-206.
20. Han EH, Lee TS, Noh BS, Lee DS. 1997. Quality characteristics in mash of *takju* prepared by using different *nuruk* during fermentation. *Korean J Food Sci Technol* 29: 555-562.
21. Jeon MH, Lee WJ. 2011. Characteristics of blueberry added *Makgeolli*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 444-449.
22. Lee TJ, Hwang DY, Lee CY, Son HJ. 2009. Changes in yeast cell number, total acid and organic acid during production and distribution processes of makgeolli, traditional alcohol of Korea. *Kor J Microbiol* 45: 391-396.
23. Lee SM, Lee TS. 2000. Effect of roasted rice and defatted soybean on the quality characteristics of *Takju* during fermentation. *J Nat Sci* 12: 71-79.
24. Jin TY, Wang MH, Yin Y, Eun JB. 2008. Effect of *Citrus junos* peel on the quality and antioxidant activity of traditional rice wine, *Jinyangju*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 76-82.
25. Shin ES, Lee HM, Lee BK, Kim SH, Kwon SI, Yoo KH. 2007. Identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* DY1 isolated from Korean soil with new antibacterial activity. *Kor J Microbiol* 43: 47-53.