

## 막걸리에서 분리한 Lactic Acid Bacteria (LAB)의 다양성 분석과 $\gamma$ -aminobutyric acid 생산능 연구

이혜림 · 강기원 · 서동호<sup>1</sup> · 정종현<sup>1,2</sup> · 정동현 · 김계원<sup>3</sup> · 박선영<sup>4</sup> · 신우창<sup>4</sup> · 심형석<sup>5</sup> · 박천석\*  
경희대학교 식품생명공학과 및 생명자원과학연구원, <sup>1</sup>한국식품연구원, <sup>2</sup>한국원자력연구원,  
<sup>3</sup>한경대 양조연구센터, <sup>4</sup>국순당 연구소, <sup>5</sup>배혜정 누룩도가

### Diversity of Lactic Acid Bacteria (LAB) in *Makgeolli* and Their Production of $\gamma$ -Aminobutyric Acid

Hye-Lim Lee, Ki-Won Kang, Dong-Ho Seo<sup>1</sup>, Jong-Hyun Jung<sup>1,2</sup>, Dong-Hyun Jung, Gye-Won Kim<sup>3</sup>,  
Sun-Young Park<sup>4</sup>, Woo-Chang Shin<sup>4</sup>, Hyung-Seok Shim<sup>5</sup>, and Cheon-Seok Park\*

Department of Food Science & Biotechnology and Institute of Life Sciences & Resources, Kyung Hee University

<sup>1</sup>Korea Food Research Institute

<sup>2</sup>Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI)

<sup>3</sup>Brewing Research Center, Hankyong National University

<sup>4</sup>Kooksoondang Brewery Co., Ltd.

<sup>5</sup>Baehaejungdoga Co., Ltd.

**Abstract** *Makgeolli* is made from rice or flour, yeast, and *nuruk*, a fermentation starter. The flavor of *makgeolli* is affected by sugars, amino acids, organic acids and volatile flavor compounds produced by various microorganisms. In this study, lactic acid bacteria (LAB) were isolated from unsterilized *makgeolli* samples collected from several provinces in Korea, and then later identified. Under anaerobic conditions, LAB density ranged from  $5.0 \times 10^6$  to  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL; yeast density ranged from  $2.5 \times 10^7$  to  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL. Of the LAB isolated from *makgeolli*, 1,126 were analyzed using restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis of 16S rRNA, which allowed for classification into five groups. Of the 1,126 LABs tested, 130 produced  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA).

**Keywords:** *makgeolli*, LAB, PCR-RFLP, GABA

## 서 론

한국의 전통주인 막걸리는 누룩이나 코지, 고두밥, 밀, 호모 등의 여러 가지 재료를 이용하여 제조된다(1). 막걸리는 감(甘)미, 산(酸)미, 고(苦)미, 신(新)미, 삭(澁)미의 오미가 고루 조화된 특유의 지미와 청량미를 지닌 우리 고유의 발효주이다. 이러한 막걸리에는 비타민 B, lysine, leucine, arginine 등의 영양분과 더불어 ethylacetate, amylacetate, ethylcaproate 등의 향미성분이 풍부한 것으로 보고되었다(1). 또한 막걸리에 들어있는 malic acid, succinic acid, citric acid 등의 풍부한 유기산은 막걸리 특유의 새콤한 맛을 내어 갈증을 해소시켜 주는 역할을 하며, 장내에서 유용한 역할을 하는 젖산균이 다량 함유되어 있고 최근에는 막걸리에 항암성분이 존재한다고 보고된 바 있다(2). 특히 막걸리 발효 과정

동안 미생물이 생산하는 다양한 산물들이 항산화 작용과 인간의 생리활성을 촉진시키는 특징을 가짐으로써 건강식품으로서의 가치가 재평가 되고 있다(3).

전통적인 막걸리는 전분질을 다량 포함하는 곡물에 물을 배합하여 고두밥을 만든 후, 자연적으로 미생물이 번식된 누룩과 효모를 첨가하여 발효시켜 제조한다(4). 누룩은 자연적으로 서식된 미생물과 이들 미생물이 생산하는 효소를 포함하는 복합 발효체라 할 수 있다. 이러한 누룩이 수행하는 반응 중 가장 대표적인 것은 누룩에 포함된 미생물이 생산하는 당화효소에 의하여 막걸리의 발효 중에 전분을 포도당으로 전환시키는 것이다(5). 또한 누룩에 포함되어 있는 다량의 미생물들에 의해 많은 유기산 및 아미노산 등이 생산된다. 이러한 누룩은 그 누룩을 제조하는 장소와 원료의 종류에 따라 각기 다양한 종류의 미생물들이 생육하게 된다(6). 이렇게 누룩에 존재하는 미생물의 종류에 따라 효소의 활성, 유기산 생성 능력, 알코올 발효능이 다양해지는데, 이는 막걸리의 휘발성 풍미 성분, 맛, 색상 등의 품질 특성에 큰 영향을 끼친다(7). 기존 연구 결과에서 누룩으로부터 분리한 균주들은 *Mucor*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Saccharomyces*, *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* spp. 등이 알려져 있다(5,8).

유산균(lactic acid bacteria; LAB)은 Gram 양성균으로 catalase

\*Corresponding author: Cheon-Seok Park, Department of Food Science & Biotechnology and Institute of Life Sciences & Resources, Kyung Hee University, Yongin, Gyeonggi 446-701, Korea  
Tel: 82-31-201-2631  
Fax: 82-31-204-8116  
E-mail: cspark@khu.ac.kr  
Received December 2, 2014; revised February 3, 2015;  
accepted February 4, 2015

음성이며 cytochrome이 존재하지 않는다. 일반적으로 혐기성 미생물이지만 젖산(lactic acid) 존재 하에서는 산소에 어느 정도 견딜 수 있는 특징이 있다(9). 유산균은 전통적으로 *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus*의 5가지 속으로 구성되어 있으며(10), 최근에는 *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella* 등도 넓게 유산균에 포함시키고 있다. 식품의 발효에서 유산균은 젖산과 유기산을 생성하는 중요한 역할을 하는데, 젖산은 부패를 효과적으로 막을 수 있게 하고 유기산은 발효식품의 맛을 좋게 변화시킨다. 유산균은 알코올음료, 유제품, 발효된 채소 등의 다양한 발효식품에서 종균(starter)으로 사용되고 있으며(11-14), 또한 최근에는 항균제, 항암제, 대장암의 예방, 면역증진 등의 건강에 긍정적인 효과가 보고되고 있다(15). 발효주로부터 유산균의 분리와 동정에 관한 연구 결과, *Lactobacillus casei*, *Lb. fermentum*, *Lb. nagelii*, *Lb. plantarum*, *Lb. citreum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Weisella cibaria*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*, *Pediococcus pentosaceus*, *Ped. damnosus*, *Ped. acidilactici*와 같은 균들이 일본 발효주인 *Shochu*와 red wine 등에서 확인되었다(16,17). *Lac. lactis* subsp. *cremoris*, *Lac. lactis* subsp. *lactis*, *Lb. acidophilus*, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*과 같은 유산균들은 항균성 물질을 생산하는 것으로 보고가 되었다(18). 발효기간 동안 유산균은 젖산과 더불어 bacteriocin, bacteriocin과 비슷한 물질이라고 알려져 있는 다양한 항균성 물질들을(bacteriocin-like inhibitory substance, BLIS) 생산하며, lactocin 27, lactacin B, helveticin J, plantacin B 등의 항균성 물질이 보고되었다(19-23).

최근에는 미생물의 분류와 동정에서 모든 박테리아의 대표적인 conserved region인 16S rRNA가 주로 사용된다(24). 기존 연구에서 16S rRNA PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 방법을 통해 타이완의 대표적인 발효식품인 *Jiangsun*으로부터 *Lb. plantarum*, *E. faecium*, *Lac. lactis*를 분리하였고(25), 김치로부터 *Leuconostoc* strain을(26), red wine으로부터 *O. oeni*, *Leu. mesenteroides*, *Lb. plantarum*을 성공적으로 분리하였다(27). RFLP 분석은 DNA 염기서열의 molecular profile을 비교할 수 있고, DNA 염기서열 분석없이 정보를 제공해주는 간단한 방법으로 알려져 있다(27). 이외에도 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)와 temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) 같은 방법들이 사용되고 있다(3).

GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid)는 인간의 뇌와 척추에 존재하는 신경전달물질 중의 하나로 비 단백질 아미노산이다(28). GABA는 L-glutamate의 영구적인 탈 탄산화를 촉진하는 glutamate decarboxylase (GAD)에 의해 생산되는 mechanism을 가지고 있다(29,30). 인간에 있어 GABA는 안정효과, 발작, 파킨슨병, 전신근강직증후군, 조현병, 불면증, 우울증 등의 신경장애, 만성 알코올 관련 증상 등의 자율신경장애 증진과 항암효과 등의 특징을 보여준다(31-36). GABA는 유산균을 종균으로 사용하여 생산하는 유제품과 같은 발효식품에서 생성되며, *Lb. brevis*, *Lb. plantarum*이 GABA를 생성하는 균으로 잘 알려져 있다(37,38).

따라서 본 연구에서는 16S rRNA 유전자의 염기서열과 PCR-RFLP방법을 사용하여 국내 여러 지방에서 생산, 판매되고 있는 생막걸리로부터 유산균을 분리, 동정 및 분석을 실시하고, 이들 유산균의 다양성을 살펴보았다. 또한 분리된 유산균들의 GABA 생성능력을 확인하여 막걸리 유래 유산균의 산업적 응용에 기초 자료가 될 수 있도록 연구하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용된 막걸리들은 경기도 수원 일대 대형마트에서 판매되는 여러 종류의 국내산 생 막걸리를 구입하여 사용하였다. 유산균과 효모는 시중 막걸리로부터 분리하였고, 유산균의 분리는 0.01%의 nystatin 이 포함된 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) agar 배지가(39,40), 효모의 경우 YM (Yeast Malt Broth) agar 배지가 사용되었다. GABA 생성을 확인하는 방법으로는 5%의 MSG (monosodium glutamate)가 포함된 MRS 배지를 사용하였다. MSG, GABA를 포함하는 모든 시약들은 reagent grade로 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다.

### 세균과 효모 생균수 측정

한국의 여러 지역에서 제조된 18가지의 막걸리를 얻은 후, 0.8% NaCl을 포함하는 식염수를 사용하여 샘플을  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 로 희석하여 배양한 후 유산균의 수를 측정하였고,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ 로 희석하여 배양한 다음 효모의 수를 측정하였다. 유산균의 경우 변형된 0.01% nystatin (Merck Co., Darmstadt, Germany)이 포함된 MRS agar 배지에 샘플을 도말하였고 anaerobic jar (BBL, Cockeysville, MD, USA)와 GasPak (BD GasPak™BBL, Becton Dickinson and Company, NJ, USA)을 이용하여 혐기성 조건에서 30°C에서 48시간 배양하였다. 효모의 경우 YM agar 배지에 도말한 후 30°C에서 12시간 배양하였다. 배양 후에 임의로 100개의 유산균 colony를 선별하여 새로운 MRS agar 배지에 접종한 후 30°C에서 12시간 배양하였다.

### Genomic DNA의 추출 및 PCR

유산균의 genomic DNA는 genomic DNA purification kit (Solgent, Seoul, Korea)를 이용하여 분리하였고, 분리한 genomic DNA에서 16S rRNA gene을 증폭하여 PCR 산물을 획득하였다. 16S rRNA gene을 증폭하기 위해 colony PCR 방법을 이용하였고(41), PCR primer는 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 GIT ACG ACT T-3')를 이용하였다. PCR은 thermal cycler (ASTEPC PC-320, ASTEC Inc, Fukuoka, Japan) 기기를 사용하여 수행하였다. 증폭을 위한 프로그램은 다음과 같다. 94°C에서 5분 동안 pre-denaturation 한 후, 94°C에서 denaturation 40초, 53°C에서 annealing 40초, 72°C에서 extension 2분 과정을 30 cycle 반복한 후, 72°C에서 7분 동안 post-extension하였다. 반응산물은 0.8% agarose gel 상에서 전기영동을 실시하여 ethidium bromide로 염색하여 확인한 다음 Gel Purification Kit (Bioneer, Seoul, Korea)를 이용하여 정제하였다.

### PCR-RFLP를 이용한 미생물의 동정

정제한 단편은 제한효소 *Alu I*, *Hha I*, *Sau3A I* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)를 사용하여 37°C에서 12시간 동안 enzyme digestion을 실시하였다. 그 후 2% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 단편을 확인하였다. 정제한 증폭단편의 제한효소 처리에 의해 생성되는 DNA의 RFLP 패턴을 확인하여 최종적으로 미생물의 동정에 이용하였다.

### 대장균(*Escherichia coli*)의 형질전환과 유산균의 염기서열 분석

염기서열 분석을 위하여 *E. coli* DH10B를 이용하여 형질전환

을 수행하였다. 배양 후 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리한 후, Luria-Bertani (LB) ampicillin agar 배지에서 12시간 동안 배양하였다. 그 후 white colony만 선별하여 5 mL LB broth에서 12시간 동안 배양하였다. 균주를 회수한 후 plasmid DNA 분리를 수행하였고, 염기서열 분석은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하였다. 분석된 염기서열은 총 4개의 search program (NCBI, EBI, DDBJ, Eztxon)으로 검색하여 유산균을 동정하였다.

#### DNA 염기서열 결정과 상동성 및 유연관계 분석

PCR을 통해 얻은 gene의 염기서열은 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit와 ABI377 PRISM (Perkin Elmer Co., Lombard, IL, USA)를 이용하였다. 16S rRNA 염기서열은 BLAST search program (NCBI, EMBL, DDBJ)을 이용하여 염기서열 결과에 대한 서열간의 유사성을 확인 및 분석하였다. 계통학적 분석은 높은 점수 strain의 BLAST 결과를 기반으로 실시하였고 Clustal X 프로그램을 이용하여 sequence alignment를 실시하였다. 근린결합 분석에 의한 phylogenetic tree 작성 및 분석에는 MEGA4 version 4.0 프로그램을 이용하였다.

#### LAB로부터 GABA 생성 확인

GABA 생성 확인을 위해 2,000개의 LAB colony를 5% MSG (monosodium glutamate)가 포함된 5 mL MRS 배지에 접종한 후 (42), 30°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양된 LAB를 1.5 mL 원심분리관으로 옮겨 13,000 rpm에서 1분간 원심분리를 실시하였고, 그 후 상등액을 이용하여 TLC 분석을 실시하였다. GABA 분석은 silica gel 60 F<sub>254</sub> thin layer chromatography plate (Merck Co., Darmstadt, Germany)를 이용하여 TLC 분석을 실시하였다. 전개 용매는 *n*-butanol:acetic acid:water=3:2:1 (v/v/v)을 사용하였으며 전개 후 건조시킨 다음 dipping solution (0.4% ninhydrin-acetone)을 이용하여 발색시켜 110°C에서 건조하여 확인하였다.

### 결과 및 고찰

#### 세균과 효모 생균수 측정

국내에 시판되고 있는 18종의 막걸리 유산균 총 수를 확인한 결과 F를 제외한 모든 샘플에서 유산균 수가 10<sup>6</sup> CFU/mL 이상으로 확인되었다(Fig. 1). 약타주 발효과정 중 미생물 균총 변화

를 확인한 연구에서 유산균의 경우 최종 10<sup>6</sup> CFU/mL로 조사되었고 기존의 연구와 비교해 보았을 때, 대체적으로 본 연구에서의 유산균 수 차이가 거의 없는 것을 확인하였다(43). F 샘플의 경우 다른 샘플들과 달리 유산균 수가 적게 확인되었는데, 이는 F 샘플의 제조 공정 상 pH를 3.5까지 떨어뜨리는 과정이 포함되어 유산균을 포함한 여러 미생물의 증식을 억제하기 때문인 것으로 생각된다. 효모균의 수는 약 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/mL로 각 샘플마다 유사한 효모수가 관찰되었다(Fig. 1). 누룩을 이용한 막걸리 발효 과정에 관한 연구에서 효모의 경우 10<sup>8</sup> CFU/mL로 확인되었고(44), 시판 막걸리의 저장기간에 따른 품질 특성 및 미생물의 변화에 관한 연구에서는 효모수가 10<sup>7</sup> CFU/mL로 확인되었는데(45), 본 연구와 비교하였을 때 효모 수의 차이는 유산균과 마찬가지로 기존 연구와 차이가 없는 것을 확인하였다. F 샘플의 경우 유산균의 경우와는 다르게 효모의 균수는 다른 샘플들과 차이가 없는 것으로 확인이 되었다.

#### PCR-RFLP를 이용한 미생물의 동정

막걸리에 존재하는 미생물을 분류하기 위해 PCR-RFLP 방법을 이용하였다. 이 때 16S rRNA 유전자를 이용하여 유전자 분석을 실시하였는데 이 유전자는 세균 종의 수직적인 유전적 특징을 갖는 계통 유전학적 관계를 결정할 수 있는 좋은 방법이다. 16S rRNA PCR 결과 18종의 막걸리로부터 총 1,126개의 유산균 균주에서 1,531 bp 크기의 유전자를 증폭하였고, 이를 3가지 제한효소로 처리하였을 때 총 5가지의 패턴이 관찰되었다(Fig. 2). 패턴 분류별 미생물의 수를 확인하여 각각의 막걸리에 존재하는 유산균 분포 차이를 확인하였다. 1번과 2번 패턴의 경우 전체 막걸리 중에서 가장 많은 비율인 77.62%가 관찰되었는데 이는 1번과 2번 패턴을 가지는 유산균이 시중에 판매되고 있는 막걸리에 가장 많이 분포되어 있는 우점종으로 존재한다는 것을 의미한다(Table 1). G, H, M의 경우 주로 3번 패턴이 우점종으로 확인되었는데 G, H의 경우에는 경기도에서, M은 충청북도에서 생산된 제품이었으며 이를 통해 막걸리의 유산균 분포도는 생산 지역에 의한 연관성은 적은 것으로 판단된다. 또한 같은 제조사인 B, R의 경우 1번 패턴의 유산균이 B에서는 확인되었지만 R에서는 관찰되지 않았는데 이러한 패턴의 차이는 제조회사가 같아도 막걸리 제조에 이용하는 재료의 차이 및 발효 조건의 차이에 따라 유산균의 균총에 차이가 생길 수 있다는 것으로 설명할 수 있다.

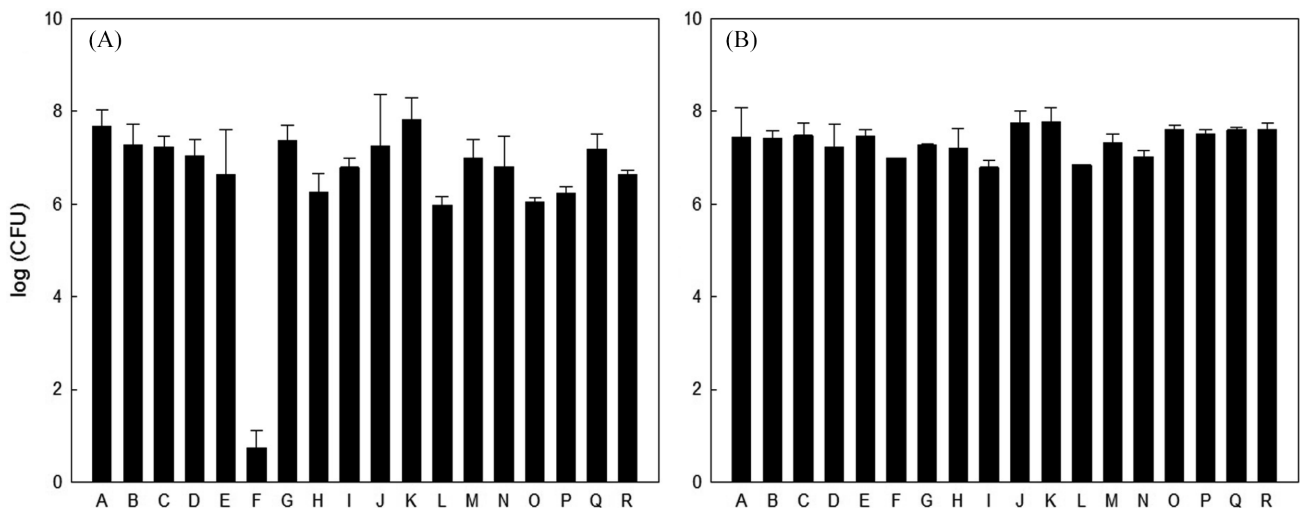
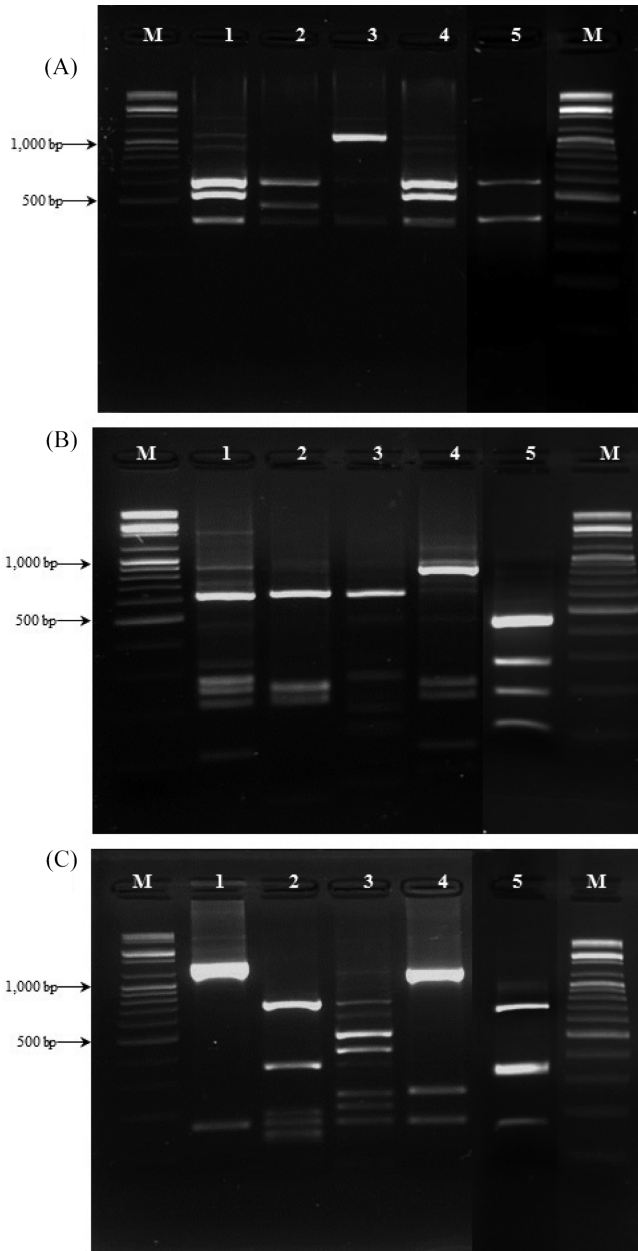


Fig. 1. LAB (A) and yeast (B) population from makgeolli.



**Fig. 2. Result of restriction enzyme digestion: (A) *Hha* I, (B) *Alu* I, and (C) *Sau*3A I treatment.** Amplified PCR products were loaded 2.0% agarose gel using electrophoresis after restriction enzyme treatment. M; 100 bp DNA ladder, lane 1-5, different restriction enzyme digestion patterns.

**유산균의 DNA 염기서열 분석**

염기서열 분석을 위해 National Center for Biotechnology Information (NCBI)에서 제공하는 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 염기분석 프로그램과 Genbank database를 이용하여 수행하였다. 16S rRNA 염기 분석 결과, 패턴 1의 경우 *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus*로 확인되었고 10가지 subspecies로 분류되었다. 패턴 2의 경우 *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*로 확인되었고 9가지 subspecies로 분류되었다. 패턴 3의 경우 *Lb. crustorum*으로, 패턴 4의 경우 *Lb. brevis*, 5번 패턴은 *Lb. fermentum*으로 확인되었고, 이들의 상동성은 98% 이상으로 확인되었다 (Table 2). 개량 누룩을 이용하여 막걸리 발효를 수행하여 SDS-

**Table 1. Frequency of LAB isolate from different *makgeolli* samples in 5 PCR-RFLP patterns**

<i>Makgeolli</i> Samples	PCR-RFLP Pattern				
	1	2	3	4	5
A	17	3		40	
B	44	40			
C	27	21			
D	52	37			
E	87	3			
F	30	4			
G			43		
H		6	88		
I	44	33			1
J	13	38		4	
K	8	33	4		
L	72	8		4	
M	1	9	48		
N	8	33	1	1	15
O	17	32			2
P	2	35			
Q	33	12		1	
R		72			
Number of the isolates	455	419	184	50	18
Frequency of occurrence (%)	40.41	37.21	16.34	4.44	1.60

PAGE로 유산균 단백질 패턴을 확인한 연구에서 *Lb. plantarum*이 우점종으로 발효에 관여함이 확인되었고(44), 누룩으로 막걸리 발효를 한 제품에 관한 연구에서 *Lb. pseudomesenteroides*, *Lb. paracasei*, *Lb. arizonensis*, *Lb. plantarum*, *Lb. harbinensis*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *Lb. fermentum*의 총 9종이 동정되었다고 보고되었다(46,47). 또한 시중 입국으로 제조한 막걸리의 균총을 확인한 연구에서는 *Lb. plantarum*과 *Lb. crustorum*이 우점종으로 확인되었다(48). 이를 통해 본 실험의 결과와 기존의 연구 결과가 대체로 부합한 것을 확인할 수 있었다. 특이한 것은 각 생막걸리 샘플의 경우 유산균의 우점종이 일반적으로 2-3개 내외로 정해져 있다는 사실이며(Table 1), 한 샘플 내에서는 이들 우점종이 막걸리의 맛과 풍미에 중요한 역할을 할 것임을 짐작할 수 있다.

**유연관계 분석**

막걸리로부터 분리한 유산균의 염기서열을 이용하여 phylogenetic tree를 제작하였다(Fig. 3). 패턴 1은 *Lb. plantarum/pentosus* 그룹으로 확인되었고, 근원관계의 경우 14개 샘플에 존재하였으며 대체로 샘플이 근접한 근원관계를 형성한 것을 확인하였다. *Lb. plantarum/pentosus*로 확인된 유산균들은 2가지의 type strain과 근접한 근원관계를 형성한 것을 확인할 수 있었으나, 염기서열 확인결과와 함께 비교하면 크게 두 그룹에 속해있지만 각각 다른 10개의 subspecies로 분류된다는 것을 확인할 수 있다. 이는 각 생 막걸리마다 같은 종이 존재하지만 그 종들은 차이가 미세하게 존재함을 의미한다. 패턴 2는 *Lb. casei/paracasei/rhamnosus* 그룹으로 확인되었고, 16개 샘플에 존재하는 것을 확인하였다. 계통수 분석을 통한 샘플별 균주의 분포를 보면 *Lb. plantarum/pentosus* 그룹과 마찬가지로 샘플마다 발견된 미생물이 다양한

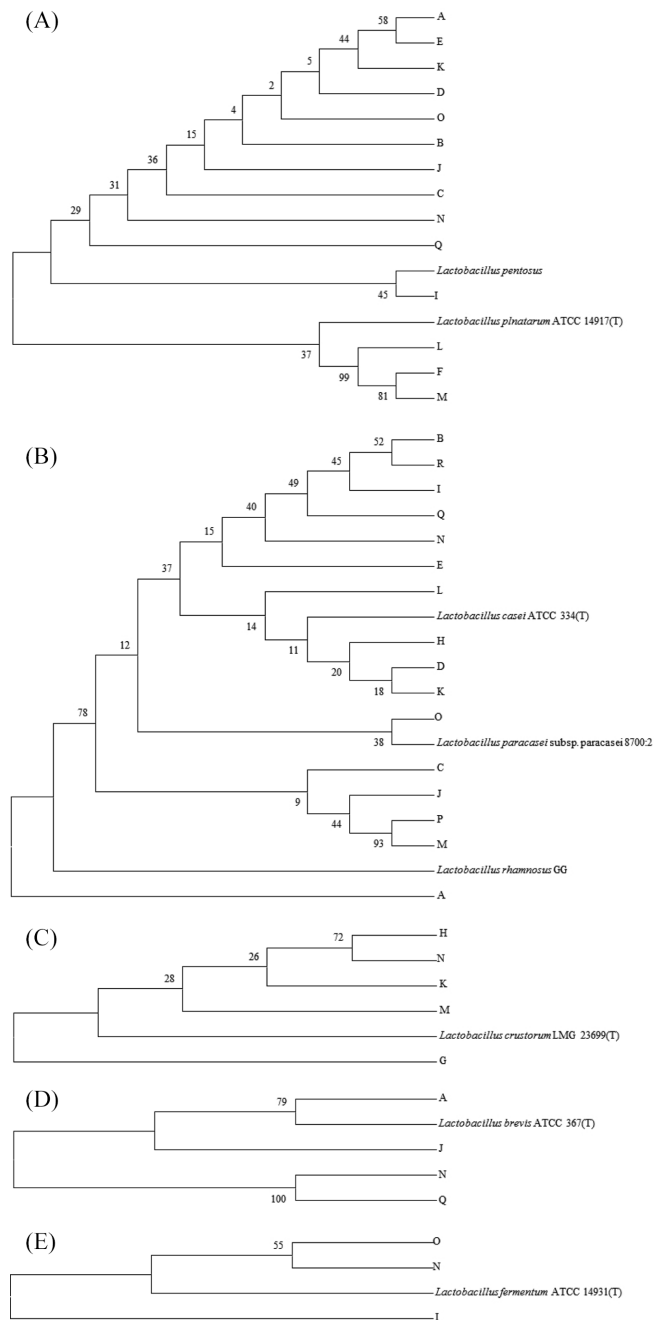
**Table 2. Comparison of 16s rRNA sequence homology of LAB in 5 PCR-RFLP patterns**

Pattern	Species-identification	Identity (%)	GenBank accession No.
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	CP002222.1
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	AB362755.1
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	AB362768.1
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	FJ386491.1
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	EU621849.1
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	AB362652.1
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	GU552552.1
1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	FJ386491.1
1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99	AB362758.1
1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	99	FJ386571.1
2	<i>Lactobacillus casei</i>	99	FM177140.1
2	<i>Lactobacillus casei</i>	99	CP001084.1
2	<i>Lactobacillus casei</i>	99	AY091596.1
2	<i>Lactobacillus casei</i>	99	HQ293086.1
2	<i>Lactobacillus casei</i>	99	AB008204.1
2	<i>Lactobacillus casei</i>	99	GQ395613.1
2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	AB362761.1
2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99	DQ462440.1
2	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	99	EU184020.1
3	<i>Lactobacillus crustorum</i>	99	AM285454.1
3	<i>Lactobacillus crustorum</i>	99	AM285453.1
3	<i>Lactobacillus crustorum</i>	98	FJ645924.1
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	AB362619.1
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	AB362618.1
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	CP000416.1
4	<i>Lactobacillus brevis</i>	99	AY974809.1
5	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99	AB362626.1

subspecies로 존재한다는 것을 확인할 수 있었다. 이 또한 마찬가지로 phylogenetic tree 결과로는 크게 3가지 그룹으로 분류되지만 염기서열 분석 결과와 함께 비교하면 각각 다른 9개의 subspecies로 분류된다는 것을 확인할 수 있었다. 패턴 3은 *Lb. crustorum*으로 확인되었고 5개의 샘플에서 확인되었으며, G, H, M 샘플이 우점종인 것을 확인할 수 있었다. 또한 균주들 모두 type strain과 계통적 차이가 있는 것을 확인하였다. 패턴 4의 경우 4개의 샘플에서 발견되었으며 *Lb. brevis*로 확인되었다. Type strain 기준으로 A, J와 N, Q의 두 분류로 나눌 수 있었다. N과 Q에서 분류된 미생물은 동일한 미생물로 확인되었는데 제조된 지역이 각각 부산과 강원도로 미생물이 지역에 영향을 받지 않는 것을 확인하였다. 패턴 5의 경우 유산균 중 가장 낮은 비율을 차지하였고 *Lb. fermentum*으로 확인되었으며, 이 미생물들은 적은 종류의 샘플에서 낮은 비율로 확인되었다. 결론적으로 본 실험에 사용된 국내에서 생산되는 생막걸리에 포함되어 있는 유산균 균총은 5가지의 부류로 구분이 되었으며, 우점종으로는 *Lb. plantarum/pentosus*와 *Lb. casei/paracasei/rhamnosus*가 가장 많이 발견되는 것으로 확인되었다.

**유산균으로부터 GABA 생성 확인**

본 실험에서 GABA 생성 확인을 위해 TLC 분석을 실시하였고, 분석 결과 막걸리로부터 1,126 종류의 유산균 중 130개의 유



**Fig. 3. Phylogenetic tree of (A) *Lactobacillus plantarum/pentosus*, (B) *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*, (C) *Lactobacillus crustorum*, (D) *Lactobacillus brevis*, and (E) *Lactobacillus fermentum*.**

산균에서 GABA 생성물을 확인하였다. GABA를 생산하는 유산균의 경우 *Lb. plantarum*이 90종류로 가장 많았으며 *Lb. casei*가 29종류로 확인되었다. 이들 두 종류 균의 경우 총 8개의 제품에서 확인되었다. 또한 *Lb. brevis*의 경우 11종류, 1개의 제품에서 확인되었다(Table 3). Park은 발효식품인 김치로부터 분리한 유산균의 GABA 생성 연구에서 *Lb. brevis*, *Lb. plantarum* 균이 GABA를 생산하는 것을 확인하였고(38), Yokoyama는 술의 찌꺼기로부터 분리한 유산균의 GABA 생성 연구에서 *Lb. brevis* 균이 GABA를 생산하는 것을 확인하였다(49), 또한 Komatsuzak는 일본 전통식품인 funa-sushi로부터 분리한 *Lb. paracasei* 균이 GABA

**Table 3. GABA production from LAB isolated from makgeolli samples**

Sample ID	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. casei</i>
A	11		
B		4	2
E			14
F		18	
I		8	5
K		8	1
N		7	2
O		9	3
P		2	1
Q		34	1

를 생산한다고 하였다(50), 이는 본 연구와 비교하였을 때 비슷한 양상이며, GABA 생산능이 확인된 유산균을 사용하여 막걸리 제조에 이용한다면, GABA를 함유한 막걸리 제조가 가능할 것이라 판단된다.

### 요 약

본 연구에서는 시중에 유통 중인 한국전통 발효주인 막걸리로부터 유산균을 분리하였다. 분리된 유산균을 동정하기 위해 16S rRNA 부분을 PCR하여 RFLP법으로 패턴을 분류하여 그룹을 나누었다. 유산균 총 수를 확인한 결과 F를 제외한 모든 샘플에서 10<sup>6</sup> CFU/mL 이상으로 확인되었고, 효모균의 수는 약 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> CFU/mL로 기존의 연구와 비교해 보았을 때, 대체적으로 차이가 거의 없는 것을 확인하였다. 나누어진 패턴을 토대로 염기서열 분석 결과 총 5종의 유산균을 확인 할 수 있었고, 5종의 유산균은 *Lb. plantarum/pentosus*, *Lb. casei/paracasei/rhannosus*, *Lb. crustorum*, *Lb. brevis*, *Lb. fermentum*으로 확인되었다. 기존 연구에서 막걸리로부터 동정된 유산균으로는 *Lb. pseudomesenteroides*, *Lb. paracasei*, *Lb. arizonensis*, *Lb. plantarum*, *Lb. harbinensis*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. brevis*, *Lb. hilgardii*, *Lb. fermentum*이 있는데, 선행 연구들과의 가장 큰 차이점으로는 *Lb. crustorum*이 분리되었고, 우점종으로 확인된 *Lb. plantarum/pentosus*와 *Lb. casei/paracasei/rhannosus*와 같은 경우 다양한 subspecies가 존재함을 확인할 수 있었다. 또한 *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Lb. paracasei*에서 GABA가 생성됨을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 막걸리로부터 유산균을 분리, 동정하고, 분리한 유산균의 GABA 생성능력을 규명함으로써, 차후 유산균 분리 및 다양한 기능성 물질 탐색을 할 수 있을 것이라 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 농림기술관리센터의 연구비지원(No. 110098-03-3-HD110)에 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

### References

- Kim JH, Lee DH, Lee SH, Choi SY, Lee JS. Effect of *ganoderma lucidum* on the quality and functionality of Korean traditional rice wine, *yakju*. J. Biosci. Bioeng. 97: 24-28 (2004)
- So MH, Lee JW. *Takju* brewing by combined use of *Rhizopus japonicus-muruk* and *Aspergillus oryzae-muruk*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 25: 157-162 (1996)

- Kwon SJ, Ahn TY, Sohn JH. Analysis of microbial diversity in *makgeolli* fermentation using PCR-DGGE. J. Life Sci. 22: 232-238 (2012)
- Yun HJ, Choi HS, Hong SB, Koo BS, Yeo SH. Screening and characteristics of useful fungi for brewing from commercial *nuruk* in Chungcheong provinces. Microbiol. Biotechnol. Lett. 38: 373-378 (2010)
- Kim CJ. Microbiological and enzymological studies on *takju* brewing. J. Korean Soc. Appl. Bi 60: 69-99 (1968)
- Seo WT, Cho HK, Lee JY, Kim B, Cho KM. Quality characteristics of wheat-rice *makgeolli* by making of rice *nuruk* prepared by *Rhizopus oryzae* CCS01. Korean J. Microbiol. 48: 147-155 (2012)
- Lee YJ, Yi HC, Hwang KT, Kim DH, Kim HJ, Jung CM, Choi YH. The qualities of *makgeolli* (Korean rice wine) made with different rice cultivars, milling degrees of rice, and *nuruks*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 41: 1785-1791 (2012)
- Kim HR, Kim JH, Bae DH, Ahn BH. Characterization of *yakju* brewed from glutinous rice and wild-type yeast strains isolated from *nuruks*. J. Microbiol. Biotechn. 20: 1702-1710 (2010)
- Tamang JP. Himalayan Fermented Foods: Microbiology, Nutrition, and Ethnic Values. CRC Press, London, UK. p. 22 (2010)
- Yoo HJ, Lee SS, Lee DS, Kim HB. Isolation of *Lactobacillus plantarum* HB1 from *tongchimi* and its nitrite-scavenging effect. Korean J. Microbiol. 39: 192-196 (2003)
- Antara NS, Sujaya IN, Yokota A, Asano K, Aryanta WR, Tomita F. Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of 'urutan', a balinese indigenous fermented sausage. World J. Microb. Biot. 18: 255-262 (2002)
- Leroy F, Vuyst LD. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci. Tech. 15: 67-78 (2004)
- Kim MJ, Chun JS. Bacterial community structure in kimchi, a Korean fermented vegetable food, as revealed by 16S rRNA gene analysis. Int. J. Food Microbiol. 103: 91-96 (2005)
- Shin MS, Han SK, Ryu JS, Kim KS, Lee WK. Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K232 isolated from kimchi. J. Appl. Microbiol. 105: 331-339 (2008)
- Chang JH, Shim YY, Cha SK, Chee KM. Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from kimchi. J. Appl. Microbiol. 109: 220-230 (2010)
- Endo A, Okada S. Monitoring the lactic acid bacterial diversity during *Shochu* fermentation by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. J. Biosci. Bioeng. 99: 216-221 (2005)
- Spano G, Lonvaud-Funel A, Claisse O, Massa S. In vivo PCR-DGGE analysis of *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* populations in red wine. Curr. Microbiol. 54: 9-13 (2007)
- Martirosyan AO, Mndzhoyan SL, Charyan LM, Akopyan LG, Nikishchenko MN. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from sour milk products *narine*, *karine*, and *matsun*. Appl. Biochem. Micro. 40: 178-180 (2004)
- Joerger MC, Klaenhammer TR. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. J. Bacteriol. 167: 439-446 (1986)
- Upreti GC, Hinsdill RD. Production and mode of action of lactacin 27: Bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob. Agents Ch. 7: 139-145 (1975)
- Barefoot SF, Klaenhammer TR. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microb. 45: 1808-1815 (1983)
- West CA, Warner PJ. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. FEMS Microbiol. Lett. 49: 163-165 (1988)
- Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microb. 55: 1901-1906 (1989)
- Poblet M, Rozès N, Guillamón JM, Mas A. Identification of acetic acid bacteria by restriction fragment length polymorphism analysis of a PCR amplified fragment of the gene coding for 16S rRNA. Lett. Appl. Microbiol. 31: 63-67 (2000)

25. Chen YS, Wu HC, Liu CH, Chen HC, Yanagida F. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *Jiangsun* (fermented bamboo shoots), a traditional fermented food in Taiwan. *J. Sci. Food Agr.* 90: 1977-1982 (2010)
26. Kim BJ, Lee JH, Jang JC, Kim JH, Han HG. *Leuconostoc inhae* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Micro.* 53: 1123-1126 (2003)
27. Sato H, Yanagida F, Shinohara T, Yokotsuka K. Restriction fragment length polymorphism analysis of 16S rRNA genes in lactic acid bacteria isolated from red wine. *J. Biosci. Bioeng.* 90: 335-337 (2000)
28. Jow F, Chiu D, Lim HK, Novak T, Lin S. Production of GABA by cultured hippocampal glial cells. *Neurochem. Int.* 45: 273-283 (2004)
29. Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4: 446-452 (1999)
30. Bown AW, Shelp BJ. The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* 115: 1-5 (1997)
31. Aoki H, Furuya Y, Endo Y, Fujimoto K. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched *Tempeh*-like fermented soybean (GABA-*Tempeh*) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotech. Bioch.* 67: 1806-1808 (2003)
32. Pearl PL, Hartka TR, Cabalza JL, Taylor J, Gibson MK. Inherited disorders of GABA metabolism. *Future Neurol.* 1: 631-636 (2006)
33. Oh CH, Oh SH. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *J. Med. Food* 7: 19-23 (2004)
34. Oh SH, Soh JR, Cha YS. Germinated brown rice extract shows a nutraceutical effect in the recovery of chronic alcohol-related symptoms. *J. Med. Food* 6: 115-121 (2003)
35. Okada T, Sugishita T, Murakami T, Murai H, Saikusa T, Horino T, Onoda A, Kajimoto O, Takahashi R, Takahashi T. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *J. Jpn. Soc. Food Sci.* 47: 596-603 (2000)
36. Wong CGI, Bottiglieri T, Snead OC. GABA,  $\gamma$ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Ann. Neurol.* 54: S3-S12 (2003)
37. Park KB, Oh SH. Production and characterization of GABA rice yogurt. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 518-522 (2005)
38. Park KB, Oh SH. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresource Technol.* 98: 312-319 (2007)
39. Yang YL, Lo HJ. Mechanisms of antifungal agent resistance. *J. Microbiol. Immunol.* 34: 79-86 (2001)
40. Collins EB, Hardt P. Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* 63: 830-832 (1980)
41. Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *J. Appl. Microbiol.* 89: 511-516 (2000)
42. Cho YR, Chang JY, Chang HC. Production of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from *Kimchi* and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 104-109 (2007)
43. Seo MY, Lee JK, Ahn BH, Cha SK. The changes of microflora during the fermentation of *takju* and *yakju*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 37: 61-66 (2005)
44. Seo DH, Jung JH, Kim HY, Kim YR, Ha SJ, Kim YC, Park CS. Identification of lactic acid bacteria involved in traditional Korean rice wine fermentation. *Food Sci. Biotechnol.* 16: 994-998 (2007)
45. Kwon YH, Lee AR, Kim JH, Kim HR, Ahn BH. Changes of physicochemical properties and microbial during storage of commercial *makgeolli*. *Korean J. Mycol.* 40: 210-214 (2012)
46. Jin J, Kim SY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. Diversity analysis of lactic acid bacteria in *takju*, Korean rice wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18: 1678-1682 (2008)
47. Kim SY, Yoo KS, Kim JE, Kim JS, Jung JY, Jin Q, Eom HJ, Han NS. Diversity analysis of lactic acid bacteria in Korean rice wines by culture-independent method using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Food Sci. Biotechnol.* 19: 749-755 (2010)
48. Kim HR, Lee AR, Kim JH, Ahn BH. Microbial dynamics of commercial *makgeolli* depending on the storage temperature. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 1101-1106 (2012)
49. Yokoyama S, Hiramatsu JI, Hayakawa K. Production of  $\alpha$ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 95-97 (2002)
50. Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 22: 497-504 (2005)