

파이로시퀀싱을 이용한 상업용 전통누룩의 미생물 군집분석

박지희 · 김성건¹ · 이용재¹ · 정장호*

세종대학교 조리외식경영학과, ¹미생물 자원센터, 한국생명공학연구원

Microbial community analysis of commercial *nuruk* in Korea using pyrosequencing

Ji-Hee Park, Song-Gun Kim¹, Yong-Jae Lee¹, and Chang-Ho Chung*

Department of Culinary Science and Foodservice Management, Sejong University

¹Microbial Resource Center/KCTC, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology

Abstract Microbial communities of four commercial Korean *nuruks* were analyzed by the 454 pyrosequencing method to correlate different characteristics of rice wine fermentation. The total and average sequencing reads of fungi in the four *nuruks* were 14,800 and 3,494, respectively. At the phylum level, *Ascomycota* was dominant in three *nuruks*, namely, SH, SS, and JJ, while *Zygomycota* was dominant in SJ. *Saccharomycopsis* was dominant in *nuruks* subjected to longer fermentation periods, such as SH and SS. The total and average sequence reads for bacteria were 31,485 and 7,871, respectively. Bacteria belonging to the phylum *Firmicutes* were dominant in all samples. SH showed several genera of lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and other minor bacteria. *Staphylococcus* and *Bacillus* were the dominant bacteria in JJ and SJ, respectively.

Keywords: pyrosequencing, *nuruk*, microbial communities, fungi, bacteria

서 론

누룩은 우리나라 전통 양조주의 당화제와 발효제를 겸비한 미생물 제제로서 전통술의 발효에 필수적인 원료이며 다양한 미생물이 생육하므로 녹말 당화력 뿐만 아니라 기타 미생물 대사물질이 생성될 수 있다. 이렇게 누룩 제조 시 생성되는 당화 및 기타 효소와 미생물들은 차후 알코올 발효에서 주류 품질이나 생산량에 영향을 미쳐 한국 발효주 제조에 있어 가장 중요한 요소라고 할 수 있다. 누룩은 사용 원료곡물, 곡물의 분쇄정도, 성형 형태, 색깔, 제조시기 등에 따라 여러 가지 종류로 나누어지고 그 제조법도 다양하다(1). 일반적인 제조방식의 누룩 제조는 밀 등 주재료를 증자 없이 적당량의 물과 함께 섞어 수분을 주고 원반 모양 등으로 성형하여 벚짚이나 공기 등에 존재하는 미생물들을 누룩 내외부로 번식시켜 숙성하고 이후 건조하는 방식으로 이루어져 있다(2).

과거 각 가정에서 누룩을 제조했을 때에는 누룩에 존재하는 미생물의 통제가 힘들었다. 일제 강점기 이후에는 선발된 종류의 곰팡이를 사용하여 누룩을 제조하는 방식으로 바뀌면서 누룩의 사용량은 급격히 줄어들었다. 따라서 1980년대 전국에 6곳이었던 기업형 누룩제조 회사가 현재에는 3곳 정도만 그 명맥을 유

지하고 있다(3). 생 전분으로부터 만들어진 누룩을 이용한 술 제조 방식은 미생물 통제의 어려움과 당화 및 알코올 수율이 낮다는 단점이 있으나 올리고당 등 미발효성 당과 식이성 섬유질 등의 기능성 물질이 생산된다는 점과 포도주 제조와 같이 다양한 종류의 술 제조가 가능하다는 장점을 간과할 수 없다(4).

누룩의 미생물 구성에 대한 연구는 일제 강점기에 일본인들에 의해 주로 연구되었다가 해방 이후 25년 동안에는 관련 연구가 없었던 것으로 파악된다. 그 후 1970년대부터 일부 연구자들에 의해 연구되어지다가(5) 최근 유전자 분석 등을 이용한 연구들을 통해 *Lichtheimia* (과거 일부 *Absidia*속으로 분류되었음)속, *Aspergillus*속, *Rhizopus*속, *Monascus*속, *Saccharomyces*속, *Saccharomycopsis*속 등의 곰팡이와 *Pediococcus*속, *Lactobacillus*속, *Weissella*속 등과 같은 젖산균, *Bacillus*속의 고초균 등의 다양한 세균이 생육하는 것으로 보고되고 있다(6-11).

전통주 연구에서는 재래누룩의 복잡한 미생물 군집이 발효 과정에 따른 당분(전분), 에탄올, 발효부산물의 농도변화 등 발효특성에 미치는 영향과 더불어 술의 맛, 향과 같은 관능적 특성에 미치는 영향을 밝히는 것이 중요하다. 저자들은 과거 본 실험에서 사용된 상업용 시판 누룩을 이용하여 단양주를 제조하여 그 발효특성을 보고 한 바 있어 그 당시 단양주 제조에 사용하였던 누룩을 파이로시퀀싱 방법을 이용하여 미생물군집을 확인하고 이들 누룩의 다양한 미생물이 주류발효에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

누룩

전통방식으로 누룩을 제조하는 곳에서 제조된 밀 누룩 4종류

*Corresponding author: Chang-Ho Chung, Department of Culinary Science and Foodservice Management, Sejong University, Seoul 05006, Korea
Tel: +82-2-3408-3222
Fax: +82-2-3408-4314
E-mail: cchung@sejong.ac.kr
Received September 5, 2017; revised October 17, 2017; accepted October 17, 2017

Table 1. Specification of commercial nuruk samples in this study (3)

Sample code	Ingredient	Water source	Form and dimension	Brief description for production
SH	wheat	underground	round, 20.5 cm (D)×2.5 cm (H)	Fermented for 3-4 weeks at 30°C in summer (or at 35°C in winter) then drying at 25°C for more than 30 days
JJ	wheat	underground	round, 20-22 cm (D)×5 cm (H)	Fermented for 15 days at 30°C in summer (or at 35°C in winter) then drying at room temperature for 45 days
SJ	wheat	city tap	round, 21 cm (D)	Fermented for 7-10 days at 37-40°C then drying at 40°C for 7-10 days
SS	wheat	underground	round, 35 cm (D)×2.0-2.5 cm (H)	Fermented first for 7 days at 38°C then switched to 30°C, then fermented for 7 days then drying

(SH, JJ, SS, SJ)를 구매하였다(3, Table 1). 이를 분쇄기(FM-909 W, Hanil, Seoul, Korea)로 분쇄 한 후 20메쉬(mesh) 체(test sieve 850 µm, Chunggye Industrial Co., Seoul, Korea)에 내린 후 이를 시료로 사용하였다.

누룩 DNA 추출

각 누룩 샘플을 0.5 g 취하여 토양(soil), 바이오필름(biofilm), 식품(food), fecal 용 DNA 추출키트(extraction kit, Cat. No. 6560-200, MP BIO)를 사용하여 제공된 방법에 따라 genomic DNA (gDNA)를 추출하였다. 추출된 gDNA 용액으로부터 DNA 정제키트(purification kit)을 이용하여 gDNA에 있는 부식산(humic acid)을 제거하였다.

PCR 증폭 및 파이로시퀀싱 방법

세균의 군집분석을 위해서 박테리아의 16S rRNA 유전자의 V1에서 V3 영역을 증폭하는 공통 프라이머를 사용하였다. Forward 프라이머는 V1-9F (5'-Linker-TCAG-AC-GAGTTGA TCMTG-GCTCAG-3')와 bifidobacterium를 증폭하기 위한 Bif16S-F (5'-Linker-TCAG-AC-GGGTTCGATTCTGGCTCAG-3')를 10% 첨가하여 구성하였으며 reverse 프라이머는 V3-541R (5'-Linker-TCAG-바코드-AC-WTTACCGCGGCTGCTGG-3')을 사용했다. Linker의 서열은 공히 CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC였다. 바코드는 4종류의 누룩 샘플로부터 증폭된 염기서열을 각각 구별하기 위해 각기 다른 7bp의 염기서열로 구성되어 있었다. 또한 진균류의 군집분석을 위해 EL-F (5'-ACCCGCTGAAYTTAAGCATAT-3') EL-R (5'-CTTGGTCCGTGTTCAAGAC-3')의 한쌍의 프라이머를 사용하여 26S rRNA gene의 D1-D2 영역을 증폭하였다(12). 중합효소연쇄반응(PCR)은 다음과 같은 조건으로 수행했다. 94°C에서 5분 동안 초기 변성 후, 94°C에서 30초간 변성단계(denaturation), 55-60°C에서 45초 동안 프라이머가 DNA에 결합하는 단계(annealing), 72°C에서 90초 동안 신장하는 단계(elongation)의 과정을 10회 반복하고, 같은 조건에서 프라이머가 DNA에 결합(annealing)하는 온도를 55°C로 고정시켜 추가적으로 20회의 과정을 더 반복하였다. 증폭된 DNA들은 수지층전담(resin column)으로 정제하여 이 중에 1 mg의 PCR산물을 Roche/454 GS FLX 타이터늄(titanium)을 이용하여 대량염기서열정보를 결정했다.

파이로시퀀싱 데이터 분석

454 파이로시퀀싱에 따라 생산된 raw data는 reverse 프라이머에 삽입된 바코드서열 정보에 따라 4개의 누룩샘플에 대하여 각각 박테리아와 진균류 군집으로 구분된 모두 8개의 순서 그룹으로 나누었다. 양쪽 말단에 존재하는 바코드, 연결자(linker), 프라이머 염기서열에 해당하는 부분들을 제거한 뒤, 그 결과로 얻어

진 염기단편 중에서 quality score가 25 이상이며 길이가 250 bp 이상 450 bp미만인 염기서열만 선택하였다. 박테리아 군집분석을 위하여 16S rRNA 유전자의 키메라 염기서열(chimeric sequence)은 chimera.uchime 프로그램을 이용하여 Silva DB (silva.gold.align.fasta)와 비교하여 제거하였다. 최종적으로 얻어진 고품질의 16S rRNA 서열의 계통분류를 위해서 16S rRNA gene similarity를 97% 기준으로 OTU (operational taxonomic unit)로 나누고 대표서열(representative seqs)를 얻은 뒤, 대표 서열을 RDP Classifier를 이용해서 greengene_13_5 16S rRNA gene database와 비교하여 taxonomic assign을 수행하였다. 진균류 군집분석을 위해서는 26S rRNA gene의 D1-D2 영역의 서열로부터 바코드, 연결자, 프라이머 염기서열을 잘라 냈다. 서열의 길이와 quality score를 기준으로 고품질 서열을 선택한 후, 키메라 염기서열을 배제하고 남은 서열을 CLcommunity software (Chunlab, Inc., Seoul)을 이용하여 균질 다양성(fungal diversity)분석을 수행하였다. 이때 OTU는 CD-HIT program을 사용하여 99% 유사도 기준으로 정의되었다. Rarefaction curve, Chao1과 Shannon index 등은 Mothur 플랫폼을 사용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

진균류 군집분석(fungal diversity)

진균류 특히 곰팡이와 효모의 경우는 다양한 아시아 발효식품의 제조에 사용되어 왔다. 이때 녹말과 같은 탄수화물은 곰팡이에서 분비되는 당화효소에 의해 당류가 생성되고 이를 이용하는 효모에 의하여 혐기적 상태에서 에틸알코올이 생성됨으로 진균류는 전통주의 특성을 부여하는데 중요한 역할을 한다고 할 수 있다. 상업용 4가지 누룩시료의 진균류 총 유효 sequencing read 수는 14,800였으며 후속 quality trimming, denoising, and chimera removal와 같은 작업을 통해 얻어 군집분석에 사용한 서열의 평균 sequence read 수는 3,494였다(Table 2). 누룩 내 진균류의 rarefaction 그래프 분석은 Fig. 1과 같다. JJ이 경우는 다른 시료들에 비해 가장 높은 OTU수를 보여 주었으며 그 뒤를 SJ시료가, 다음으로는 SH와 SS가 비슷한 경향을 보였다. 진균류를 분석한 누룩시료의 다양성(richness)과 평균성(evenness)를 나타내는 alpha diversity의 측정값을 Table 2에 나타내었다. Sequence similarity를 기반으로 측정된 종의 수(OTU: operational taxonomic unit; similarity 97%)를 비교할 경우 OTU의 개수는 990.0를 보인 JJ가 가장 높은 값을 보였으며 SH, SS의 경우 각각 275, 255 OTU를 보였다. 그룹 내 다양성(alpha diversity)을 측정하는 계수로 사용되는 Chao1 값으로 추정할 시판누룩의 평균 richness는 736이었다. 이 값은 Jung 등(10)의 막걸리 시료를 분석하여 얻은 20-100보다 2-10배 정도 더 많은 다양성을 나타냈다. 누룩의 발

Table 2. Number of observed diversity richness (OTUs), estimated OUT richness (Chao1), Simpson and diversity index (Shannon) for fungal 26S rRNA libraries derived from *nuruks*

	Number of reads	Number of OTUs	Chao1	Simpson	Shannon
SH	4319	275.0	389.4	0.015	4.64
JJ	5370	990.0	1539.9	0.004	6.07
SJ	1530	450.0	621.3	0.012	4.97
SS	3581	255.0	391.57	0.016	4.59

효기간이 상대적으로 짧은 JJ나 SJ에서 발견된 진균류의 다양성은 발효기간이 긴 SH와 SS보다 높은 값을 보였다. 이는 누룩의 발효초기에 다양성이 높은 진균류가 누룩발효가 진행됨에 따라 발효환경에 적응하는 진균류가 우점종을 차지하면서 다양성은 감소하는 것으로 판단된다. Simpson값을 이용하여 살펴 본 시판누룩의 diversity를 비교하였을 시 JJ가 가장 낮은 값을 보여 다른 시료에 비해 우점도가 떨어진다고 보여졌다. Shannon 값도 JJ의 값이 가장 높아 다른 시료보다 다양성이 높으며 평균적으로 고른(more even) 분포를 나타내었다. 최근의 분자생물학적 분석방법 이전에 선택배지, 현미경관찰, 화학적분석 방법 등을 통한 전통 연구방식을 통해 보고되었던 누룩 진균류 중 곰팡이는 주로 *Lichthemia*(이전에는 *Absidia* 명명되었음), *Rhizopus*, *Circinella*, *Actinomucor*, *Aspergillus*, *Cladosporium* 및 *Botryotrichum*속의 7속 17종의 사상균이 분리, 동정 되었다(13). 누룩 중의 사상균의 분포는 *Lichthemia*속에 속하는 미생물이 전국 모든 지역에서 가장 높은 빈도로 분리되었고, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus condidus*

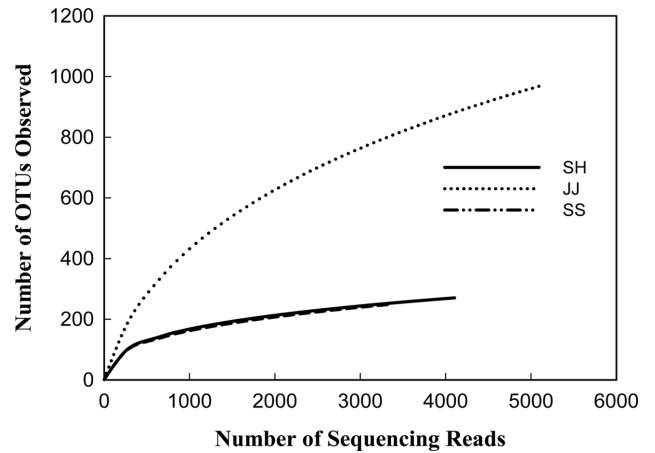


Fig. 1. Complete rarefaction curves for fungal communities of *nuruks*

와 *Rhizopus cohnii*가 비교적 고른 분포를 나타냈다. 이외에도 *Penicillium*속, *Mucor*속, 기타 *Aspergillus*속, *Botryotricum*속 그리고 *Cladosporium*속 등이 분리되었다(13).

최근 분자생물학적 미생물 동정방법에 의한 논문에서는 여전히 *Lichthemia*속이 가장 많은 빈도로 분리되었으며(2,6,7) 이외에도 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*속 등이 분리되었다. 이는 전통 누룩 제조방식의 경우 *Lichthemia*속 곰팡이가 주를 이루고 이외에도 *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*속 등이 혼재한 상태로 이들 곰팡이가 생산해 내는 액화 및 당화효소들과 이들로부터 생성될 수 있는 일부 단백질 분해효소들에 의해 차후 주류제조 시 곡물 중

Table 3. Fungal profile of commercially available *nuruks* at genus level

Phylum	Genus	SH	JJ	SJ	SS
Ascomycota	<i>Saccharomycopsis</i>	85.0			97.2
	<i>Pichia</i>	0.3	0.5	0.5	0.3
	<i>Monascus</i>		2.1		
	<i>Eupenicillium</i>		1.4		
	<i>Aspergillus</i>		0.1		
	<i>Didymella</i>			0.5	
	<i>Coniothyrium</i>			0.5	
	<i>Davidiella</i>			0.3	
	<i>Alternaria</i>			0.3	
	<i>Pleospora</i>			0.2	
	<i>Lewia</i>			0.2	
	<i>Phaeosphaeria</i>			0.1	
	<i>Chaetomium</i>			0.1	
	Other genera	0.7	74.2 ¹⁾	6.3 ²⁾	0.8
	Basidiomycota	<i>Wallemia</i>		4.5	
<i>Filobasidium</i>				0.1	
Other genera			0.5	1.4 ³⁾	0.1
Zygomycota	<i>Cryptococcus</i>			0.5	
	Other genera	0.1	0.5	73.1	
Other phyla		13.9	16.2	15.9	1.6
		100%	100%	100%	100%

¹⁾Contains unidentified fungi belonging to the family of *Trichocomaceae* (17.39%), and the order of *Eurotiales* (53.54%) and the class of *Eurotiomycetes* (1.94%); ²⁾Contains unidentified fungi belonging to the family of *Diatrypaceae* (0.33%), *Sporormiaceae* (0.2%), *Chaetomiaceae* (0.13%) and *Trichocomaceae* (0.13%), and the order of *Eurotiales* (3.92%), *Xylariales* (0.26%), *Pleosporales* (0.13%), and *Sordariales* (0.13%), and the class of *Eurotiomycetes* (0.13%); ³⁾Contains unidentified fungi belonging to the family *Hypsizygus* (0.13%)

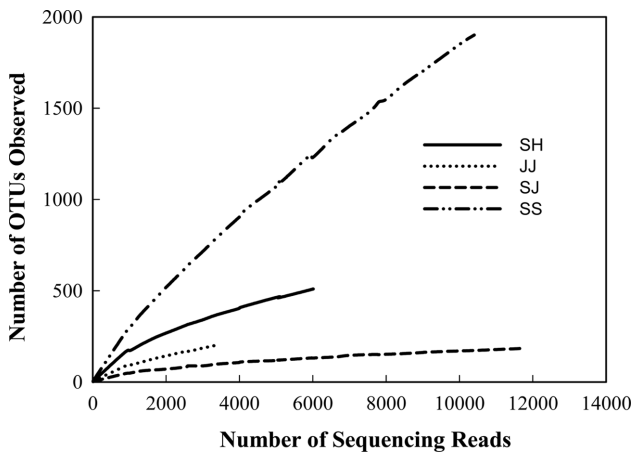


Fig. 2. Complete rarefaction curves for bacterial communities of nuruks

의 전분과 같은 고분자 탄수화물이 분해되어 저분자 당류가 생성됨으로서 그 분해나 생성과정이 다양하고 복잡하게 되어 *Aspergillus*속 곰팡이를 선별하여 주로 사용하는 입국방식으로 생산되는 주류제조보다는 발효의 다양성을 증대시킬 수 있을 것으로 보인다.

본 연구 결과, phylum 수준에서 73.7%의 접합균류(*Zygomycota*)가 우세한 SJ를 제외하고는 상업적으로 생산된 세 누룩에서 자낭균류(*Ascomycota*)가 우세한 것으로 확인되었으며 특히나 SH, SS의 경우는 각각 86.0, 98.3%의 자낭균류를 포함하였다(Table 3). 이는 Kim 등(11)이 전국에서 수집된 11종의 누룩들을 고체배지 상 곰팡이균들의 수를 콜로니형성단위(CFU)로 측정된 결과 높은 진균류밀도를 보인 누룩의 경우, 이들 대부분이 *Pichia anomala*, *P. kudriavzevii*, *Kluyveromyces marxianus* 및 *Saccharomycopsis fibuligera* 등 효모가 차지한다고 한 결과들과 일치하는 경향을 보였다. 또한 최근 Bal 등(8)은 누룩 제조과정의 보관온도를 달리 하여 누룩 내 미생물 파이로시퀀싱 군집분석을 한 연구에서 이들에 한 번씩 뒤집기를 하며 36°C로 30일 동안 제조할 경우 상대적으로 *Mucorales sp.*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus cibarius* 등이 우세균주로 나타난 반면, 초기 10일간 45°C로, 이후 나머지 20일간 35°C로 제조하였을 때 *Rhizomucor pusillus*, *Mucorales sp.*, 그리고 *Thermoascus crustaceus*가 우세균주로 특제한다고 보고한 바 있다. 이는 본 실험에서 상대적으로 제조온도가 높았던 SJ에서 *Rhizopus*속, *Mucor*속을 포함하고 있는 접합균류가 많은 분포를 하였던 것과 일치하는 결과를 나타냈다.

일반적으로 누룩은 생산지역 뿐 아니라 제조공정, 온도, 습도, 제조에 걸리는 시간의 차이에 따라 우세균과 균종이 결정되는데 본 연구에 사용된 시료의 제조방식(Table 1)에 따라 발효시간이 상대적으로 길었던 SJ와 JJ보다는 SH와 SS의 경우에서 *Saccharomycopsis*속 효모의 분포가 더 많았다. 또한 SJ의 경우는 본 연구에서 종명이 규명되지 않았지만 *Rhizopus*, *Mucor*속 등이 포함되어 있는 접합균류가 73.7%로 가장 높게 분포하였다.

가장 많고 다양한 균이 검출된 JJ에서는 *Aspergillus*속이 73.3%로 가장 많이 검출되었다. SH과 SS에서는 모두 *Saccharomycopsis*속이 각각 85.3, 97.5%로 가장 많이 검출되었으며 SJ에서는 *Mucorales*속이 56.7%로 가장 많이 검출되었다(Table 3). 과거 본 연구에 사용한 누룩들로 생산된 단양주의 특성을 살펴보았을 때(14), SS와 SH를 이용하여 제조된 단양주의 경우, 발효초기부터 15일 까지 알코올 발효가 SJ나 JJ곡자보다 월등히 높았다.

Table 4. Number of observed diversity richness (OTUs), estimated OUT richness (Chao1), Simpson and diversity index (Shannon) for bacterial 16S rRNA libraries derived from nuruks

	Number of Reads	Number of OTUs	Chao1	Simpson	Shannon
SH	6,004	173	439.2	0.889	4.72
JJ	3,378	93	242.5	0.705	2.89
SJ	11,701	48	96.5	0.184	0.95
SS	10,402	293	1572.7	0.740	4.67

이는 두 종류의 누룩에서 높은 분포를 보인 *Saccharomycopsis*속 진균류와 관련성이 있는 것으로 판단되었다. Kim 등(11)은 *Saccharomycopsis fibuligera*의 아밀레이스 활성이 분류 진균류 중 아밀레이스 활성이 가장 높았던 *Aspergillus niger*에 근접하였다고 보고하기도 하였다.

Kwon(15)의 PCR-DGGE연구에 따르면 산성누룩에서 분리된 진균류에는 *Aspergillus*속, *Saccharomycopsis*속, *Wickerhamomyces*속, *Torulapora*속, *Trichosporon*속 그리고 *Pichia*속으로 크게 6개의 group이 존재한다고 보고하였다. 파이로시퀀싱을 이용하여 진균류를 분석한 본 실험에서는 *Aspergillus*속, *Saccharomycopsis*속, *Wickerhamomyces*속 및 *Pichia*속 외에도 *Saccharomyces*속, *Clostridium*속, *Monasaceae*속 등 보다 다양한 진균류가 검출되었다.

세균류 군집분석(bacterial diversity)

누룩에서의 세균의 역할은 알코올 발효보다는 젖산세균에 의한 산도저하를 통해 주류의 품질 저하를 일으킬 수 있는 바람직하지 않은 세균들을 제어하고 다양한 유기산과 유리당 및 일부 단백질효소를 통한 유리아미노산 등을 생성하여 주류의 맛을 결정하는 역할을 한다고 볼 수 있다. 누룩 세균류의 rarefaction 그래프 분석은 Fig. 2와 같다. SS는 다른 시료들에 비해 가장 높은 OTU수를 보여 주었으며 그 뒤를 SH, JJ, SJ 순으로 나타냈다. 세균류를 분석한 alpha diversity의 측정값은 Table 4에 나타내었다. OTU를 비교할 경우 SS가 richness가 다른 누룩보다 높게 나타났으며 다양성 측정 계수인 Chao1도 가장 높게 나타났다. Simpson 계수로 판단했을 때 SJ의 값이 가장 낮아 개체수가 적은 OTU가 다수 존재함을 알 수 있었다. 또 Shannon 계수로 보았을 때는 SH, SS의 경우 값들이 높아 상대적으로 누룩 내의 세균류의 우점종들이 고르게 존재함을 알 수 있었다.

본 연구에서 분석한 16S rDNA reads 염기서열을 활용하여 Basic Local Alignment Search Tool (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 로 분석한 결과들을 살펴보면, phylum 수준에서는 모든 시료에서 *Firmicutes*문이 우세한 것으로 분석되었다(Table 5). Genus 수준에서 살펴 본 시료들의 원핵미생물의 분포는 SH의 경우 *Lactobacillus* (27.9%)속과 *Leuconostoc* (14.6%)속으로 많이 분포하는 것으로 나타났다. 기타 *Pediococcus* (10.7%)속과 이를 포함하는 *Lactobacillales*목과 *Leuconostocaceae*과 등 주로 젖산균들이 우세균주로 분포하였다. JJ와 SJ의 경우, 각각 *Staphylococcus* (73.9%)속과 *Bacillus* 유사군(95.1%)이 우세균으로 나타났다. Kwon과 Sohn(16)은 SS누룩을 연구한 실험에서 *Staphylococcus*속이 분리되었다고 보고한 바 있으나 우점종은 아니고 젖산균들이 많이 분포되었다고 보고하였다. 본 연구에서는 SS누룩의 경우 이들 균주는 분리가 되지 않았으나 오히려 JJ시료에서는 *Staphylococcus*속이 우점종으로 나타났다. 이는 누룩 수집 시기나 시료에 차이로 인한 균주분포가 우점종이 아닌 일부의 균주들에서 나타나는 차이로 판단하였다.

Table 5. Bacterial genus profile of commercially available *nuruks* at genus level

Phylum	Genus	SH	JJ	SJ	SS
<i>Actinobacteria</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	1.0	0.2	0.0	0.0
	Other genera	0.5	0.5	0.1	2.7
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacillus</i>	0.0	0.1	1.0	3.0
	<i>Pediococcus</i>	10.7	0.1	0.1	1.4
	<i>Lactobacillus</i>	27.9	0.0	0.1	3.0
	<i>Leuconostoc</i>	14.6	0.8	0.0	66.6
	<i>Clostridium</i>	0.0	0.0	1.3	0.1
	<i>Staphylococcus</i>	1.6	73.9	0.0	0.0
	Other genera	42.7 ¹⁾	16.1	95.3 ²⁾	11.6
<i>Proteobacteria</i>	<i>Ralstonia</i>	0.0	0.0	1.0	0.0
	Other genera	0.9	1.8	0.6	4.4
Other phyla		0.1	6.5	0.5	7.2
		100%	100%	100%	100%

¹⁾Contains 42.5% of unidentified bacteria belonging to the order of *Lactobacillales*, ²⁾95.1% of unidentified bacteria belonging to *Bacillaceae* family.

세균균집 측면에서 각각의 누룩은 서로 다른 특징을 보였다. SH는 유산균이 95.7%를 차지하는 우점종이었으며 SS도 유산균이 약 70%로 우점을 차지하고 있으나 *Leuconostoc*속이 66.6%를 차지하여 SH가 다양한 유산균이 골고루 분포한다고 말할 수 있었다. 이것이 다른 누룩에 비하여 향기를 나타내는 원인이라고 생각되었다. JJ는 *Staphylococcus*속이 약 74%를 차지하였으며, SJ는 *Bacillus*속이 약 95%를 차지하였다.

이전 연구(14)에서 JJ와 SJ누룩으로 제조된 단양주의 발효양상이 초기와 중기 알코올 발효가 늦었는데 이는 누룩에 상대적으로 적은 분포의 *Saccharomycopsis*속 진균류와 젖산균이 알코올 발효의 진행을 더디게 한 것으로 추측되었다. 또한, JJ로 제조된 단양주의 경우 상대적으로 발효기간 중 총 유리아미노산 함량이 다른 누룩을 이용하여 제조한 단양주보다 높게 나타난 점으로 보아 *Staphylococcus*속과 단백질 분해능과의 관계에 대한 연관성이 나타난 것으로 판단되어 이와 관련된 연구가 더 필요할 것으로 보인다. 누룩에서의 *Staphylococcus*속과 관련된 역할에 대한 연구는 많이 알려지지 않았으나 아프리카의 콩류발효 식품에서 단백질 분해능이 보고된 바 있다(17). 또한 한국 발효식품에서도 분리되어 보고된 바 있다(18).

1945년 이전 누룩 세균에 대한 고찰(13)에서 국내 누룩에서 분리된 세균으로는 5종의 *Bacillus*속과 4종의 *Micrococcus*속을 포함하여 9속, 17종이 분리동정되었고, 1945년 이후 누룩으로부터 분리된 세균들의 연구들은 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*속 등의 유산균들이 포함되면서 15속 39종이 분리되었다고 보고된 바 있다(5). 그러나 이들의 술덧 발효 중에 어떤 역할을 하는지는 밝혀지지 않았다. 이전 연구(14)에서 총 유리 아미노산함량의 경우 JJ, SS, SH누룩을 이용하여 제조된 단양주 순으로 많이 생성되었으며 SJ의 경우는 그 생성량이 가장 낮았다. 이는 다양한 세균의 분포를 통해 단백질의 분해능을 가진 세균의 활성에 있어 차이가 있었던 것으로 판단되었다.

JJ의 경우 우점속은 *Staphylococcus*속(73.9%)이었다. SH에서는 *Lactobacillus*속이 가장 많이 검출되었고 *Leuconostoc*속이 14.6%로 그 다음으로 많이 검출되었다. SJ에서는 *Bacillus*속이 95.10%를 차지하고 있어 미생물 분포의 상대적으로 가장 단순한 분포를 나타내어 미생물 분포의 다양성 면에서 떨어지는 것을 알 수 있었다. 가장 큰 diversity와 evenness를 보인 SS의 경우는 *Leuconostoc* (66.6%)과 *Lactobacillus* (3.0%)속 젖산균이 많이 분포한

다는 점에서 SH와 비슷하였으나, *Leuconostoc*속이 우점종으로 나타났다. 이 점에서 SH와 차이점을 보였다. 이는 이형젖산발효균인 *Leuconostoc*속이 차후 탁주와 같은 주류제조 시 우점종으로 특세할 경우 이형젖산발효에서 올 수 있는 아세트산(acetic acid), 젖산(lactic acid), 이산화탄소(CO₂) 및 만니톨(mannitol) 등의 발효산물을 통해 보다 다양한 맛을 제공하는데 동형젖산발효균인 *Lactobacillus*속들 보다 유리할 수 있을 것으로 판단된다. 이전 훈련된 패널을 통해 실시한 관능검사서에서 SH를 이용하여 제조된 단양주에서 과일향이 다른 누룩을 이용한 것들보다 유의적으로 높은 값을 나타내었고 또한 SS를 이용한 단양주 역시 JJ와 SJ보다 과일향이 높게 나타난 바 있어(14) 누룩에 다양한 젖산균들이 높게 분포할 경우 차후 알코올 발효에서 긍정적인 영향을 끼칠 수 있을 것으로 판단되었다.

Kwon과 Sohn(16)의 연구에 따르면 PCR-DGGE로 SS누룩에 존재하는 세균을 동정하였을 때 *Lactobacillus*속, *Weissella*속 그리고 *Escherichia*속, *Pantoea*속, *Staphylococcus*속 이렇게 5가지로 그룹이 나누었다. 파이로시퀀싱을 이용한 본 연구에서는 *Leuconostoc*속, *Lactobacillus*속, *Pediococcus*속과 같은 유산균 이외에도 방선균인 *Saccharopolyspora*속, *Proteobacteria*문에 속하는 *Ralstonia*속 등 다양한 원핵 미생물 균종이 검출되었다.

요 약

과거 전통방식으로 제조되는 4가지 상업용 시판누룩들을 파이로시퀀싱 방법을 이용하여 미생물균집을 확인하였다. 누룩시료의 진균류 총 유효 sequencing read수는 14,800이었으며 후속 quality trimming, denoising와 chimera removal와 같은 작업을 통해 얻은 평균 sequence read의 수는 3,494이었다. 진균류의 phylum 수준에서 SH, JJ, SS 시료에서는 자낭균류가 우세한 것으로 확인되었으나 SJ는 접합균류가 우세하였다. 발효력과 관계가 있는 것으로 알려진 *Saccharomycopsis*속 효모분포는 제조과정에서 상대적으로 발효시간이 길었던 SH와 SS의 경우에서 더 많았다. 세균류의 파이로시퀀싱결과 유효 sequencing read수는 31,485이었으며 평균 sequence read는 7,871이었다. 세균의 phylum 수준에서는 모든 시료에서 *Firmicutes*문이 우세한 것으로 분석되었다. SH의 경우 주로 *Lactobacillus*속, *Leuconostoc*속, 기타 *Pediococcus*속과 이를 포함하는 *Lactobacillales*목과 *Leuconostocaceae*과 등 젖산균들이 우

세균주로 분포하였다. JJ와 SJ의 경우, 각각 *Staphylococcus*속과 *Bacillus*속이 우세균으로 나타났다.

References

1. Bae SM. Traditional alcoholic drink manufacturing technology; *Takju Yakju*. pp. 81. Woogok Publishing Co, Korea (2002)
2. Yang SY, Lee JK, Kwak JK, Kim KH, Seo MJ, Lee YW. Fungi associated with the traditional starter cultures used for rice wine in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 54: 933-943 (2011)
3. Yu TS, Yu HY. Traditional Korean fermenter; *Nuruk* of original form and excellency. pp. 63-94. World Science Co., Ltd, Seoul, Korea (2011)
4. Yu TS, Yu HY. Traditional Korean fermenter; *Nuruk* of original form and excellency. pp. 176. World Science Co., Ltd, Seoul, Korea (2011)
5. Yu TS, Yu HY. Traditional Korean fermenter; *Nuruk* of original form and excellency. pp. 179-227. World Science Co., Ltd, Seoul, Korea (2011)
6. Song SH, Lee CH, Lee SH, Park JM, Lee HJ, Bai DH, Yoon SS, Choi JB, Park YS. Analysis of microflora profile in Korean traditional *nuruk*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 40-46 (2013)
7. Bal J, Yun SH, Song HY, Yeo SH, Kim JH, Kim JM, Kim DH. Mycoflora dynamics analysis of Korean traditional wheat-based *nuruk*. *J. Microbiol.* 52: 1025-1029 (2014)
8. Bal J, Yun SH, Yeo SH, Kim JM, Kim DH. Metagenomic analysis of fungal diversity in Korean traditional wheat-based fermentation starter *nuruk*. *Food Microbiol.* 60: 73-83 (2016)
9. Bal J, Yun SH, Choi MS, Yeo SH, Kim JM, Kim DH. Pyrosequencing reveals bacterial diversity in Korean traditional wheat-based *nuruk*. *J. Microbiol.* 53: 812-819 (2015)
10. Jung MJ, Nam YD, Roh SW, Bae JW. Unexpected convergence of fungal and bacterial communities during fermentation of traditional Korean alcoholic beverages inoculated with various natural starters. *Food Microbiol.* 30: 112-123 (2012)
11. Kim MS, Kim SI, Ha BS, Park HY, BaeK SY, Yeo SH, Ro HS. Diversity, saccharification capacity, and toxigenicity analyses of fungal isolates in *nuruk*. *Kor. J. Mycol.* 42: 191-200 (2014)
12. Van der Auwera G, Chapelle S, De Wchter R. Structure of the large ribosomal subunit RNA of *Phytophthora megasperma*, and phylogeny of the oomycetes. *FEBS Lett.* 338: 133-136 (1994)
13. Yu TS, Kim J, Kim HS, Hyun JS, Ha HP, Park MG. Bibliographical study on microorganisms of traditional Korean *nuruk* (Since 1945). *J. Korean Soc. Food Sci, Nutr.* 27: 789-799 (1998)
14. Park JH, Chung CH. Characteristics of *Takju* (a cloudy Korean rice wine) prepared with *nuruk* (a traditional Korean rice wine fermentation starter), and identification of lactic acid bacteria in *nuruk*. *Korean J. Food Sci.* 46: 153-164 (2014)
15. Kwon SJ. Analysis of microbial diversity in *Makgeolli* fermentation. MS Thesis. Dankook University (2010)
16. Kwon SJ, Sohn JH. Analysis of microbial diversity in *nuruk* using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* 22: 110-116 (2012)
17. Tamang JP, Kailasapathy K. Fermented Foods and Beverages of the World. pp. 323-352. In: Ethnic african fermented foods. Olasupo NA, Odunfa SA, Obayori OS. CRC press, Inc., London, England (2010)
18. Jang IT, Kang MG, Yi SH, Lim SI, Kim HR, Ahn BH, Lee JS. Physiological functionality of *nuruk*, *makgeolli* and *cheonggukjang* made with fungi and bacteria isolated from Korean traditional fermented foods. *Kor. J. Mycol.* 40: 164-173 (2012)