KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 50, No. 4, pp. 400~406 (2018)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2018.50.4.400

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

탁주와 약주의 이화학적 특성 및 미생물 군집 분석

구옥경[1,2] · 임은섭[3] · 이애란[4] · 김태완[4,*]
[1]경상대학교 식품영양학과, [2]경상대학교 농업생명과학원, [3]과학기술연합대학원대학교, [4]한국식품연구원

Microbial diversity and physicochemical properties of takju and yakju

Ok Kyung Koo[1,2], Eun Seob Lim[3], Ae-Ran Lee[4], and Tae Wan Kim[4,*]
[1]*Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University*
[2]*Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University*
[3]*Department of Food Biotechnology, Korea University of Science & Technology*
[4]*Korea Food Research Institute*

Abstract Takju and yakju are traditional Korean alcoholic beverages that are prepared by fermentation of glutinous rice with nuruk, a cereal starter containing various bacteria, fungi, and yeast. In this study, physicochemical and microbial properties of a total of 12 commercial takju and yakju samples were analyzed; their pH, sweetness, and alcohol content were varied, depending on the type of alcohol, from pH 3.64-4.8, 5.1-24.8°Bx, and 4.6-18.5%, respectively. Microbial communities were analyzed with 16S rRNA amplicon sequencing using MiSeq system. At the phylum level, *Firmicutes* (86.2%) was the most dominant, followed by *Proteobacteria* (8.08%), *Actinobacteria* (2.56%), and *Cyanobacteria* (3.13%). Lactic acid bacteria, including *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, and *Weissella* were also frequently detected. Among eukaryotes, *Saccharomyces cerevisiae* was the most dominant in these samples.

Keywords: takju, yakju, microbial community, amplicon sequencing

서 론

탁주와 약주는 우리나라 대표 전통 발효주로 찹쌀 또는 멥쌀이 주원료이며 누룩을 첨가하여 누룩에 의한 녹말 당화과정과 미생물 발효가 동시에 진행되는 병행복발효주의 방식으로 제조된다. 이때 발효시킨 상태 또는 거칠게 여과하여 혼탁하게 물과 희석시킨 것이 탁주이며, 이를 여과시켜 그대로 마시는 술이 약주이다. 탁주는 막걸리라고도 하는데 발효시킨 술덧을 65°C 이상에서 30분 이상 살균한 탁주 또는 생탁주로 섭취하며 주정도는 6-8%, 약주는 10-13%이다(Lee 등, 2004). 1963년 정부 식량정책으로 주로 밀을 사용하였으나 탁주 고유의 풍미가 감소되었고, 1980년말 쌀을 이용한 생산이 허용되면서 쌀을 포함하여 찹쌀, 좁쌀, 기장 등 다양한 곡물 외에도 구기자, 고추, 지역 특산물 첨가를 통해 다양한 탁주가 생산되고 있다. 풍부한 탄수화물과 단백질을 발효원으로 하는 탁주는 유기산 함유로 갈증을 해소시키고, 아미노산과 각종 비타민으로 신진대사를 원활하게 하며, 휘발성 풍미성분으로 독특한 향과 맛을 제공해 준다(Kwon 등, 2012a).

전통적인 발효제인 누룩은 지역에 따라 다양한 미생물 확보에 의해 주질 다양성을 확보할 수 있으나 대량생산이 어렵고 제조과정 중 다양한 미생물의 혼입으로 제품의 균일성과 수율 확보에 어려움이 있다. 따라서 1940년대부터 찐 쌀에 *Aspergillus luchuensis* 등 배양균이 함유된 입국, 밀가루로 만드는 분국 등을 사용하여 당화력을 향상시켜왔다. 이 때 *Saccharomyces cerevisiae* 등의 발효력이 강한 스타터가 첨가됨으로써 알코올 발효에 의한 품질안전성을 향상시킬 수 있게 되었으나 제품의 획일화와 풍미가 떨어지는 단점이 있으므로 누룩과 배양균을 함께 발효에 이용하고 있다. 이에 *Rhizopus* 속, *Aspergillus* 속, *Mucor* 속 등의 곰팡이, *Saccharomyces* 속의 효모와 *Bacillus* 속, 유산균, 초산균 등 다양한 균류가 전통주의 풍미를 향상시키는 역할을 하고 있다(Chai 등, 2015; Park과 Chung, 2014; Seo 등, 2005).

최근 차세대염기서열 분석기법의 개발로 다양한 전통 발효식품의 미생물 분포에 대한 보다 정확한 분석이 가능해졌다. 과거 미생물을 분리·동정하여 주요 미생물만 확인이 가능하였으나 이러한 기술의 발달로 분리가 어려운 미생물까지 확인할 수 있게 되었으며 세균과 효모, 곰팡이까지 함께 분석이 가능하게 되었다. 현재까지 다양한 누룩의 미생물 군집에 대한 분석이 이루어졌으나 탁주와 약주의 최종 상품에 존재하는 미생물의 분포에 대한 연구는 제한적으로 이루어졌다. 따라서 본 실험에서는 국내의 대표적인 전통 발효주의 미생물학적 품질을 평가하기 위해 전국 각 지역에서 시판되고 있는 탁주와 양조에 존재하는 미생물의 분포를 분석하고 이해하고자 한다.

재료 및 방법

시료 수집

수도권, 충청, 강원 지방의 중소기업형 소규모 양조장 12곳에서 백국을 발효제로 사용하고 효모를 첨가한 탁주 5종, 전통누룩

*Corresponding author: Tae Wan Kim, Ph.D., Research Group of Traditional Food, Korea Food Research Institute, Wanju, Jeonbuk 55365, Korea
Tel: +82-63-219-9368
E-mail: ktwco@kfri.re.kr
Received June 7, 2018; revised July 19, 2018;
accepted July 20, 2018

을 사용하였으며 비발효성 고형 성분들을 여과한 약주 7종에 대해 포장 전 최종 제품을 멸균통에 약 100 mL 수거하여 냉장조건에서 실험실로 직접 운반하였으며 이화학적, 미생물학적 분석은 24시간 이내에 진행하였다.

이화학 분석

시료의 pH는 시료 50 mL를 취하여 pH meter (D-50, HORIBA, Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다. 시료의 총 산은 시료 10 mL에 0.1% phenolphthalein (DaeJung Chemicals & Metals Co., Ltd., Daegu, Korea) 지시약을 사용하여 0.1 N NaOH (Samchun pure chemical. Co., Ltd., Pyeongtaek, Korea) 용액으로 적정하여 미적색이 될 때까지 소비된 NaOH 용액의 양에 0.009를 곱하여 아세트산 양으로 환산하여 표시하였다. 알코올 함량은 잘 교반한 탁주 100 mL을 취하여 증류수 100 mL과 섞어 냉각기가 연결된 증류장치에서 증류 한 후, 증류액이 80 mL이 되면 물을 가하여 100 mL로 적용한 다음, 밀도계(DMA 4500A, Anton Paar GmbH, Graz, Austria)를 이용하여 측정하였다. 당도는 당도계 (Pocket PAL1, ATAGO, Kyoto, Japan)를 이용하여 측정하였다.

미생물 분석

총균수는 곰팡이 생육억제를 위해 0.01%의 Amphotericin B (Sigma Aldrich Co., St Louis, MO, USA)를 첨가한 PCA (Plate Count Agar, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 배지에 희석한 시료를 도말한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 효모와 곰팡이의 경우 세균 억제와 곰팡이 균사체 발육억제를 위하여 0.01% chloramphenicol (Sigma Chemical Co.) 및 0.3% sodium propionate (Junsei chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 첨가하여 만든 PDA (Potato dextrose agar, Difco Laboratories) 배지에 희석한 시료를 도말한 후 30°C에서 24시간 배양하였다. 혐기성균의 분리에는 Amphotericin B (Sigma Aldrich Co.)를 0.01% 첨가한 MRS agar (BD, Sparks, MD, USA) 배지에 희석한 시료를 도말 후 30°C의 혐기 상태에서 48시간 배양하였다.

총 genomic DNA 추출

시료에 존재하는 미생물의 genomic DNA 추출은 PureLink® Genomic DNA kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하였으며 제공된 방법을 참고하여 추출하였다. 시료를 원심분리하여 상층액을 버린 후, lysozyme 분해 완충용액(25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton X-100) 180 μL를 첨가하여 37°C에서 1시간 배양하였다. Proteinase K 20 μL와 genomic lysis/binding buffer 200 μL를 순서대로 첨가한 후 stainless steel beads (5 mm, Qiagen, Hilden, Germany)를 넣고 Mini-BeadBeater-16 (BioSpec products, Bartlesville, OK, USA)을 이용하여 30초간 vortexing을 하였다. 이후 55°C에서 30분간 배양한 후 에탄올 200 1 μL를 취한 뒤, spin column에 상층액을 넣고 원심분리(10,000×g, 1 min)하였다. 추가 세척과정을 거친 후 column의 membrane에 남은 DNA를 증류수에 용해시킨 후 0.8% agarose gel을 이용하여 전기영동으로 확인하였다.

메타게놈 시퀀싱

각 샘플은 일루미나 16S 메타게놈 시퀀싱 라이브러리 프로토콜에 따라 준비하였다. DNA의 총량과 품질은 PicoGreen과 Nanodro을 이용하여 측정하였다. 세균의 군집분석은 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자의 V3-V4 영역을 증폭하는 프라이머(forward: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3', reverse: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3')를 사용하였고, 진균의 군집분석은 internal transcribed spacer (ITS) 유전자의 ITS3-ITS4 영역을 증폭하는 프라이머(forward: 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCATCGATGAAGAACGCAGC-3', reverse: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용하여 PCR 증폭하였다. 이어서 다중 인덱스와 일루미나 시퀀싱 어답터 부착을 위해 limited-cycle amplification을 8 cycle 진행하였다. 최종 산물은 PicoGreen으로 정규화와 통합하였고, TapeStation DNA Screentape D1000 (Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 라이브러리 사이즈를 확인하였다. 메타게놈 염기서열 분석은 Macrogen에 의뢰하였으며 MiSeq™ Platform (Illumina, San Diego, CA, USA)을 사용하였다.

시퀀싱 데이터 분석

메타게놈 시퀀싱 결과는 MSR (MiSeq Reporter)로 FASTQ 파일을 생성하고, BWA를 사용하여 PhiX 시퀀스를 제거하였다. 각 샘플별 paired-end data는 FLASH 1.2.11 (Magoc 등, 2011)를 사용하여 분류하였다. 세균은 총 시퀀스가 440-465 bp인 고품질 서열을, 진균은 총 시퀀스가 300-430 bp인 고품질 서열을 취했다. 얻어진 시퀀스는 CD-HIT-OTU (Li 등, 2012)를 사용하여 시퀀스 에러로 간주되는 낮은 품질의 시퀀스, 모호한 시퀀스, 키메라 시퀀스 등을 제거하고, 97% 이상의 서열 유사도를 바탕으로 군집화하여 종 수준의 OTU (operational taxonomic units)를 선발하였다. 각 OTU의 대표서열은 각각의 데이터베이스(세균: RDP release 11, 진균: UNITE 6.0)에 UCLUST (Edgar 등, 2010)를 수행하였고, 유사성이 가장 높은 것의 유기체 구분 정보로 분류 할당 하였다. 이를 바탕으로 QIIME v1.8 (Caporaso 등, 2010)을 이용하여 미생물 군집 분석을 수행하였다. 샘플 내 미생물 군집의 종 다양성과 균등도 확인을 위해, Shannon index, inversed simpson Index를 산출하고, rarefaction curve, Chao1으로부터 alpha diversity를 분석하였다. Weighted unifrac distance를 바탕으로 샘플간 beta diversity를 분석하고, PCoA, UPGMA tree로부터 샘플간 상관관계를 분석하였다.

결과 및 고찰

탁주와 약주의 이화학 특성

탁주의 알코올 함량은 4.6-6.92%, 약주의 경우 알코올 함량이 13.37-18.49로 높게 나왔으며 탁주의 pH는 3.65-4.17, 약주는 pH 4.36-4.80의 분포로 약주에서 다소 높은 경향을 보였다(Table 1). 발효 중 생성되는 알코올은 탁주와 약주의 주원료인 쌀 또는 밀 녹말당을 누룩과 효모 스타터에 의한 분해 과정 중에 생성된 것으로 pH와 환원당은 낮아지며 알코올 함량은 발효가 진행됨에 따라 증가한다. 그 결과 생성되는 알코올과 유기산은 탁주와 약주의 맛과 풍미를 결정하며 미생물 군집 또한 변화하게 된다 (Kwon 등, 2012b).

탁주와 약주의 미생물학적 특성

일반 세균수는 탁주의 경우 2.83-7.59 log CFU/mL의 분포를 보였으며 약주의 경우 높은 알코올 함량으로 1.53-4.78 log CFU/mL로 다소 낮은 경향을 보였다(Table 1). 효모수는 탁주에서 4.69-7.96 log CFU/mL, 약주는 2.38-2.68 log CFU/mL, 곰팡이의 경우 탁주는 3.62-5.46 log CFU/mL, 약주에서는 거의 검출되지 않거나

Table 1. Physicochemical and microflora analyses of yakju and takju

Sample	Physicochemical analysis				Microorganisms (Log CFU/mL)		
	pH	Titratable acidity	Brix	Alcohol (%v/v)	Total aerobic count	Yeast	Fungi
SBK14	4.36	6.5	17.3	16.3	1.53	2.45	ND*
YHK16	4.39	9	24.8	14.6	4.78	ND	ND
SJK17	4.68	7.3	15.5	18.5	2.90	2.68	2.45
YDK18	4.65	8.5	23.3	15.9	ND	2.38	ND
WJK19	4.5	7.2	21.7	16.3	3.49	2.62	ND
HSK21	4.8	7.4	24.2	17.4	ND	ND	ND
NCK22	4.42	8.5	21.8	13.4	ND	ND	ND
CWK8	3.65	3.9	6	6.56	2.83	ND	ND
CYK10	3.64	4.6	7.1	6.92	4.53	4.69	3.62
CJK26	3.83	5	6.8	6.41	7.43	7.68	4.38
YPK31	4.17	5	6.6	6.15	6.73	7.68	5.46
CAK33	3.96	2.9	5.1	4.6	7.59	7.96	5.18

*ND: Not detected

Table 2. Number of sequence analyzed, operational taxonomic unit (OTUs), estimated OUT richness (Chao1), Shannon and Simpson diversity indices, and estimated sample coverage (Good's coverage) for bacterial 16S rRNA amplification from yakju and takju

Sample	Number of reads	OTUs	Chao1	Shannon	Simpson	Good's Coverage
SBK14	335,280	53	54.2	2.97	0.82	0.99
YHK16	242,048	28	32.2	0.33	0.08	1.00
SJK17	286,932	64	67.3	2.25	0.68	0.99
YDK18	356,659	51	54	1.79	0.58	1.00
WJK19	536,719	60	64	2.71	0.79	1.00
HSK21	267,396	40	51	0.98	0.45	1.00
NCK22	337,883	61	70	2.97	0.80	0.99
CWK8	424,463	37	42.6	2.33	0.74	0.99
CYK10	124,952	27	27	1.27	0.37	0.99
CJK26	105,631	36	36	3.01	0.82	1.00
YPK31	404,768	32	34	1.81	0.69	1.00
CAK33	423,101	57	57	3.17	0.84	0.99

2.45 log CFU/mL로 상대적으로 낮게 나왔다. 탁주는 약주에 비해 미생물 함량이 높아 저장성이 낮으며 후발효 진행과 효모의 자가분해에 의해 저장기간이 오래될수록 녹말의 분해로 인한 고형물 형성으로 주질이 떨어질 수 있기 때문에 저온살균 후 제품화하여 판매하기도 한다(Kwon 등, 2012a). Kwon 등(2012a)의 경우 5일 발효 후 막걸리의 세균수는 10.7 log CFU/mL, 효모는 10.5 log CFU/mL 로 매우 높았으며 곰팡이는 5.00 log CFU/mL 이하로 나왔다. Seo 등(2005)의 경우 탁주의 일반세균수, 효모, 곰팡이가 각각 8.38, 8.51, 2.30 log CFU/mL 검출되었으며 약주의 경우 각각 5.94, 7.23 log CFU/mL, 그리고 곰팡이의 경우 검출되지 않았다. Kwon 등 (2012)은 막걸리의 일반 세균수와 효모수를 분석하였는데 그 결과 각각 6.71, 6.09 log CFU/mL의 함량을 나타냈다. 이러한 미생물 함량의 차이는 첨가 제조 원료, 입국, 누룩에 따라 달라질 수 있다. 효모수는 탁주에 비해 약주에서 2-5 log CFU의 급격한 차이를 보이는데 이는 효모의 생육한계 알코올 농도가 12%이기 때문인 것으로 판단된다(Lee 등, 2010). 곰팡이는 일반 세균수와 효모균수에 비해 낮게 나왔는데, 이는 Seo 등 (2005)의 연구 결과와 같이 일반 세균수와 효모수의 경우 증가 또는 유지하는데 비해 곰팡이의 경우 초기 밑술에 6.78 log CFU/mL 정도 존재하다가 발효 종료 단계에서 2.30 log CFU/mL로 감소하는 것으로 보아 발효 초기에 작용하다가 발효가 진행될수록 pH 감소로 인한 곰팡이의 사멸에 기인한 것으로 판단된다.

미생물 군집분석: alpha와 beta diversity

총 3,845,832 bacterial 16S rRNA sequence reads를 확보하였다. 평균 OTUs는 약주의 경우 51, 탁주는 38이었으며 Good's coverage는 0.99-1.00였다(Table 2). 시료별로 종 다양성(species richness)이 상이하게 나왔으나 대체로 약주에서 YHK16을 제외하고 더 다양한 균의 분포를 보였다. 이는 백국(*Aspergillus luchuensis*)과 효모를 첨가한 탁주와 달리 약주는 전통방식으로 제조한 누룩을 사용하였기 때문으로 판단된다. 또한 시료별 다양성은 사용되는 누룩에 차이에 의해 기인하며 이는 Bal 등(2015)과 Jung 등(2012)에서도 누룩의 제조방식이나 원재료에 따라 미생물 군집의 분포가 매우 상이하다는 것을 확인하였다. Chao1으로 표현되는 미생물 richness의 경우 27-70으로 다양하였으며 종 다양성의 지표인 Shannon diversity index는 CJK26과 CAK33이 각각 3.01, 3.17로 가장 높았고, 균등성 지수인 Simpson diversity index 또한 각각 0.82, 0.84로 가장 높게 나왔다.

Weighted (편중된) unifrac distance matrices에 따른 PCoA (Principal Coordinates Analysis)분석 결과 PC1, PC2, PC3에서 각

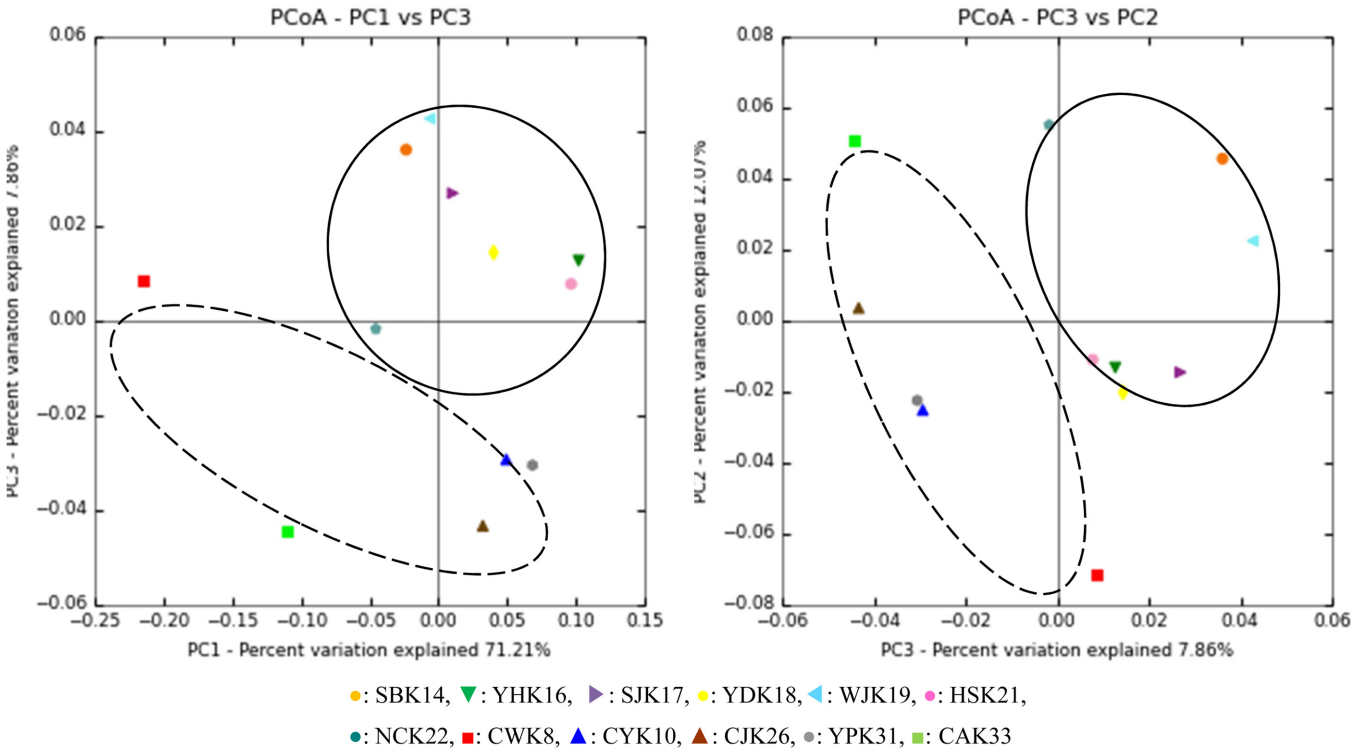

Fig. 1. Weighted unifrac matix based on principal coordinate analysis (PCoA) results of the bacterial communities of takju (black dot line) and yakju (black line).

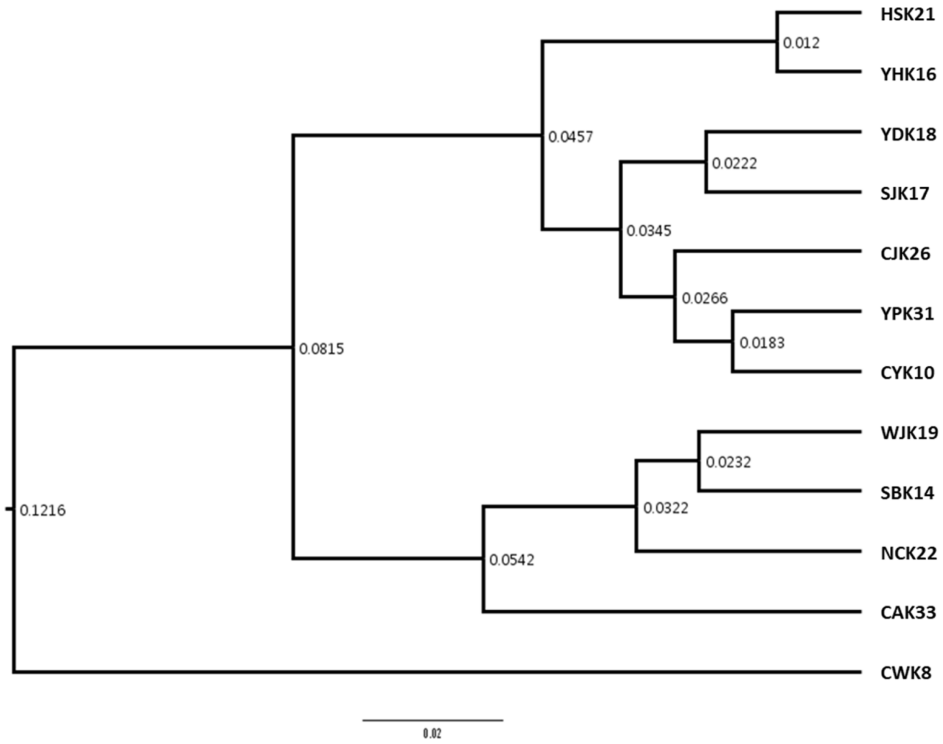

Fig. 2. A hierarchical cluster tree based on using unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) of takju and yakju. The scale bar indicates the distance between clusters in UniFrac units.

각 71.2, 12.1, 7.86%의 통계학적 유의성을 보였다(Fig. 1). 이때 시료별 차이가 있었으며 특히 주종에 따라 클러스터별로 분리되었다. 또한 unweighted (비편중된) 데이터 기반 UPGMA tree에 따르면 역시 주종에 따른 클러스터된 결과를 보이고 있다(Fig. 2). 약주 SBK14와 WJK19, YHK16과 HSK21의 경우 PCoA 분석과 UPGMA 결과 시료간 유사도가 높은 것으로 확인되었으며 미생물 분포뿐만 아니라 각 시료별로 당도와 알코올 함량에 있어 유사한 결과가 확인되었다. 탁주 CWK8과 CAK33은 유사도가 낮

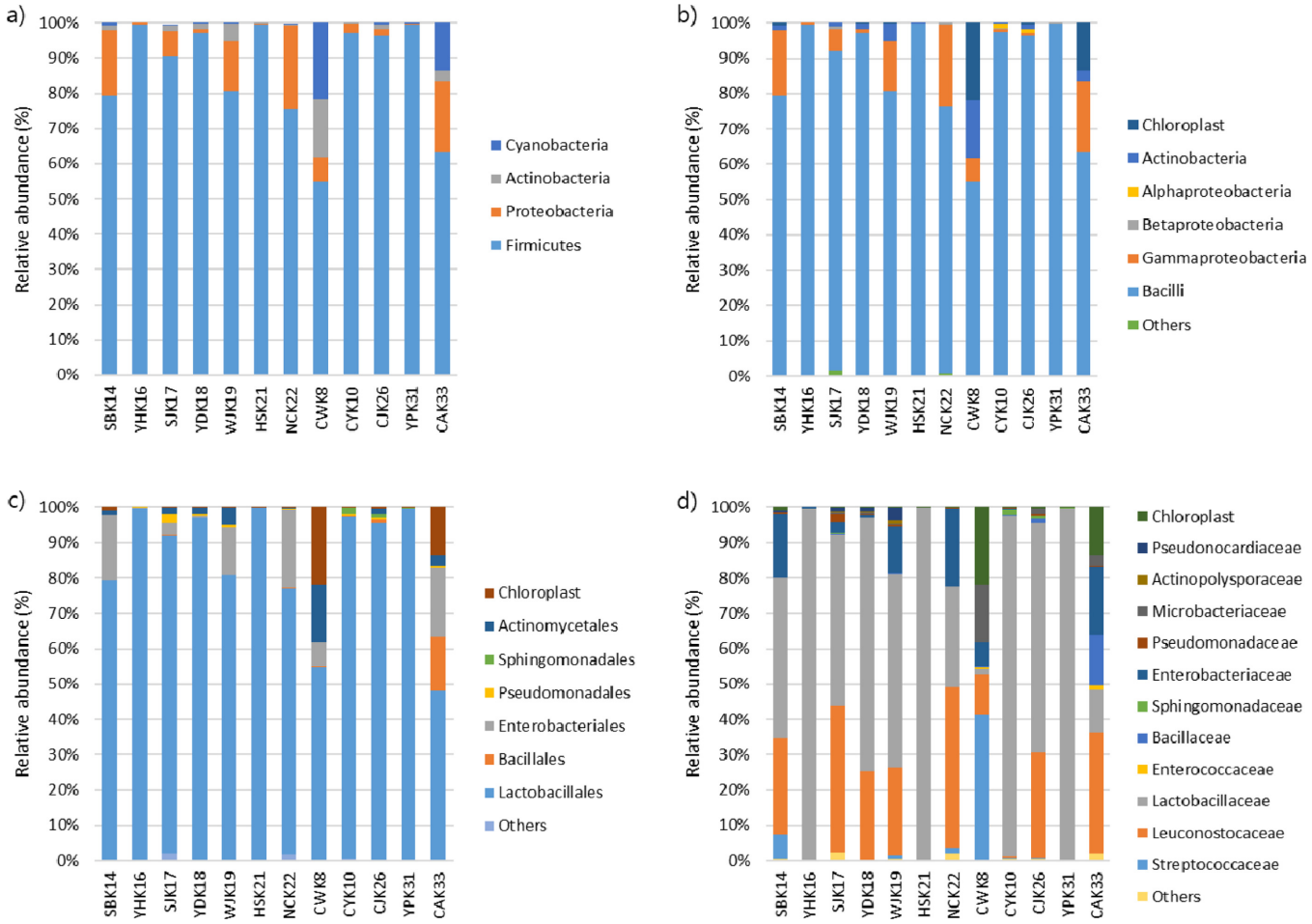

Fig. 3. Taxonomic composition analysis of the bacterial community of takju and yakju at the (a) phylum, (b) class, (c) order, and (d) family level. Relative abundance with >1% of the total sequence is indicated.

은 독립된 결과를 나타냈으며 YPK31, CUK10, CJK26의 경우 유사도가 높은 것으로 나왔다. CAK33의 경우 백미와 팽화미를 주재료로 사용하여 CWK8은 살균탁주로 65°C 이상 30분 이상 저온가열하여 제조함에 기인한 것으로 판단된다.

미생물 군집 분석-세균류

각 시료에 대한 16S rRNA 염기서열 분석 결과 시료별 미생물 분포는 상이하였으나 공통적으로 문(Phylum) 수준에서 *Firmicutes* (86.2%), *Proteobacteria* (8.08%), *Actinobacteria* (2.56%), *Cyanobacteria* (3.13%)가 검출되었으며 이는 누룩에 대한 미생물 군집 분석한 선행 연구 결과(Bal 등, 2015; Chai 등, 2015; Jung 등, 2012)와 유사한 것으로 확인되었다(Fig. 3). 특히 *Firmicutes*가 가장 많이 분포하고 있으며 탁주는 54.9-99.4%, 약주는 75.6-99.7%의 분포를 나타냈다.

Firmicutes 문은 *Bacilli* 강, 그 중에서 대부분의 유산균을 포함하고 있는 *Lactobacillales* 목의 세균이 확인되었으며 탁주는 47.8-99.4%, 약주의 경우 75.5-99.7%의 높은 비율을 보였다(Fig. 4). 반면 CAK33의 경우 *Bacillales* 목이 15.5% 확인되었으며 특히 *Bacillus* 속 14.1%, *Staphylococcus* 속이 0.33%로 나타났다. *Lactobacillus* 속의 경우 탁주 1.39-99.42%와 약주 28.25-99.6%의 분포를 나타냈다. 이때 *Lactobacillus* 속이 전체 균주의 99%이상을 차지하는 CYK10, YPK31, YHK16, HSK21의 경우 당도가 다른 주류보다 상대적으로 높았다. 이러한 결과는 Jin 등(2008)에서도 확인되었으며 다양한 탁주에 존재하는 유산균을 분리한 결과 *L. paracasei, L. arizonensis*가 우점하였으며 그 외에도 *L. plantarum, L. harbinensis, L. parabuchneri, L. brevis, L. hilgardii* 등의 존재를 확인하였다. Kwon 등(2012b)의 경우 PCR-DGGE 분석법을 통해 *L. curvatus*의 우점을 확인하였다. *Lactococcus* 속은 CWK8 (41.27%), SBK14 (6.83%)을 제외하고 모두 2% 이하의 낮은 비율을 보였다. *Leuconostoc* 속은 탁주 0.01-10.61%, 약주 0.05-38.19%로 그 분포가 다양하였다. *Weissella* 속은 *Lactobacillus* 속이 낮게 검출된 시료 CJK26, CAK33, SBK14, NCK22에 각각 27.5, 29.8, 17.8, 36.8%가 검출되었다. 모든 제품에서 유산균이 우점하였고 이러한 전통주의 유산균의 우점은 술의 향과 맛을 부여하고 식품 안전성 및 보존성에 중요한 역할을 한다.

*Cyanobacteria*의 경우 평균 3.13% 정도 검출되었는데 이는 누룩의 미생물 군집을 분석한 선행 연구에서도 검출되었다(Bal 등, 2015; Kwon 등, 2012b). *Cyanobacteria*의 경우 특히 밀 우점종으로 누룩의 제조 원료로 사용되는 밀에 기인한 것으로 판단된다(Ganter 등, 1991). *Cyanobacteria*와 *Chloroplast*의 경우 탁주 CWK8과 CAK33에서 각각 21.8%과 13.6%가 확인되었는데 주원료가 백미로 다른 시료에 비해 백미의 함량이 높은 시료이다. 이들은 발효 초기 곡물 내에 존재하다가 발효의 진행에 따라 그 분포의 차이를 보이는 것으로 판단되며 이는 선행연구에서 상업용

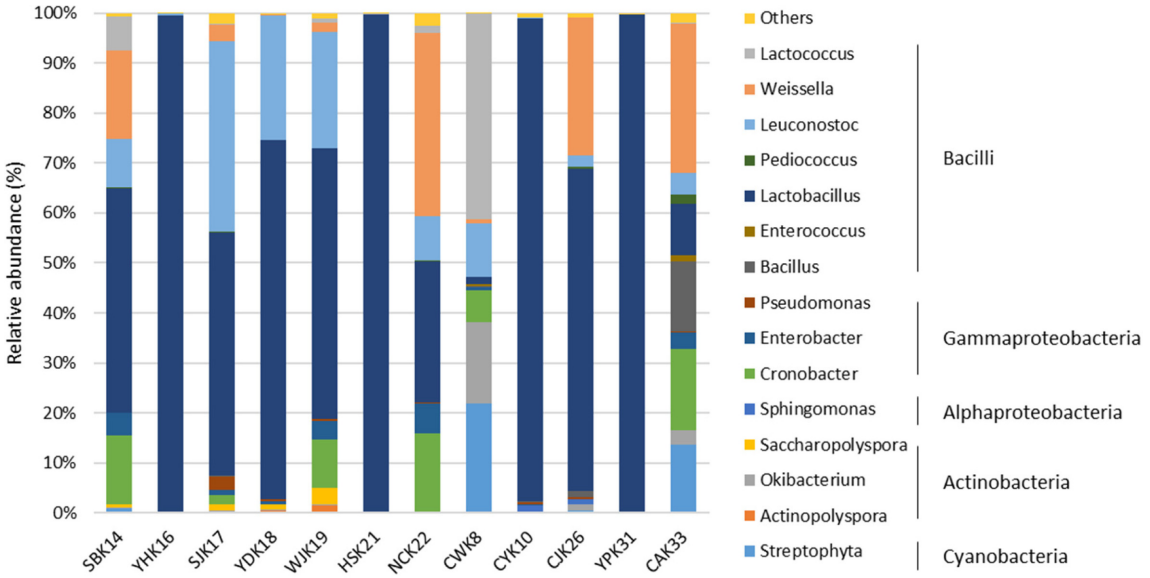

Fig. 4. Taxonomic composition analysis at the genus level of each bacterial community of takju and yakju. Relative abundance with >1% of the total sequence is indicated.

또는 전통 누룩에 *Cyanobacteria*와 *Proteobacteria*가 우점하고 있다가 발효 과정 중 *Firmicutes*와 *Actinobacteria*가 증가하는 경향을 보였다(Bal 등, 2015).

*Gamma-proteobacteria*는 토양, 식물 등을 포함한 환경에 주로 분포하는 균으로 탁주는 0.02-20.0%, 약주는 0.32-23.0%를 차지하고 있었다. *Cronobacter*속이 검출된 시료가 다수 있었으며 특히 CWK8 (6.24%), CAK33 (16.3%), SBK14 (13.9%), WJK19 (9.57%), NCK22 (15.6%)가 검출되었다. *Cronobacter*속은 장내세균과에 속하며 특히 *C. sakazakii*의 경우 건조한 환경에도 잘 살아남아 분유에 오염되어 영유아 식중독의 원인균으로 해당 균의 동정은 제조 과정 중 위생상 문제가 있을 수 있는 것으로 판단된다(Kalyantanda 등, 2015). *Enterobacter*속 또한 장내세균으로 CAK33 (3.19%), SBK14 (4.50%), WJK19 (3.69%), NCK 22 (6.00%) 등이 확인되었다. Kwon 등(2012b)의 경우 *Pantoea agglomerans*, *P. ananatis*, *Citrobacter freundii*를 포함하여 *Enterobacteriaceae*목 12종이 검출되었다.

미생물 군집 분석-진균류

진균류는 모든 시료에서 효모 *S. cerevisiae*가 100%를 차지하고 있었으며 시료 YDK18에서만 *Kazachstania unispora* 1.79% 존재하는 것으로 확인되었다. 이는 *Saccharomycetaceae*과에 속하며 *S. cerevisiae*와 함께 식품의 발효에 이용된다. 특히 *K. unispora*는 와인 발효 중 산패취를 유도하는 효모로 포도즙에서 발견되는 효모이다(Jood 등, 2017). 이와 같은 결과는 Chai 등(2015)의 막걸리 시료에서도 나타났으며 곰팡이는 검출되지 않았고 *S. cerevisiae*, 효모 스타터만 검출되었다. *Aspergillus* 속 등의 곰팡이는 발효 초기에 급격히 감소한 것으로 추정되며 이러한 현상은 *S. cerevisiae*에 의해 불검출의 가능성 이외에도 알코올 함량의 증가에 따른 *S. cerevisiae* 저항성 증가와 함께 기인한 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 국내 수도권, 충청, 강원 등지의 중소기업형 소규모 양조장에서 생산되는 탁주와 약주의 미생물 군집 분포를 차세대 염기서열 분석기법을 이용하여 조사하였다. 각 시료별로 미생물 분포에 따른 품질의 차이를 나타냈으며 특히 백미 또는 소맥분을 주로 사용한 탁주와 달리 약주는 찹쌀과 백미를 주원료로 사용하여 각각 독특한 주질과 미생물 분포에 영향을 주었다. 주요 검출 미생물로 진균류는 *S. cerevisiae*가 대부분을 차지하였으며 세균의 경우 *Firmicutes*문에는 유산균인 *Lactobacillus, Leuconostoc, Lactococcus, Weisella* 속 등이 우점종으로 확인되었다. 곡물인 원재료에 의해 *Cyanobacteria* 문의 *Chloroplast* 속과 제조 환경에 의한 유입으로 추정되는 *Cronobacter* 속, *Enterobacter* 속 또한 검출되었다. 이러한 다양한 미생물의 분포는 제조 지역, 주원료, 그리고 제조 방법에 기인할 것으로 판단되며 명확한 상관관계는 확인할 수 없었으나 본 연구 결과 유통과정의 제품 안전성 확보를 위해 양조장별 미생물 관리가 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부 재원으로 한국식품연구원의 지원(E0170701)을 받아 수행된 연구이며 이에 감사드립니다.

References

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)

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. Nat. Methods 7: 335-336 (2010)

Chai CH, Lim GS, Kim YJ, Oh SW. Microbial community changes in Makgeolli during brewing. J. I. Brewing 121: 304-308 (2015)

Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. Bioinformatics 26: 2460-2461 (2010)

Gantar M, Kerby NW, Rowell P, Obreht Z. Colonization of wheat (*Triticum vulgare* L.) by N_2-fixing *Cyanobacteria*: I. A survey of soil Cyanobacterial isolates forming associations with roots. New

Phytol. 118: 477-483 (1991)
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)
Jood I, Hoff JW, Setati ME. Evaluating fermentation characteristics of *Kazachstania* spp. and their potential influence on wine quality. World J. Microbiol. Biotechnol. 33: 129 (2017)
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)
Kalyantanda G, Shumyak L, Archibald LK. *Cronobacter* species contamination of powdered infant formula and the implications for neonatal health. Front. Pediatr. 3: 56 (2015)
Kwon SJ, Ahn TY, Sohn JH. Analysis of microbial diversity in makgeolli fermentation using PCR-DGGE. J. Life Sci. 22: 232-238 (2012a)
Kwon YH, Lee AR, Kim JH, Kim HR, Ahn BH. Changes of physicochemical properties and microbial during storage of commercial makgeolli. Kor. J. Mycol. 40: 210-214 (2012b)
Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J. Ultrafast Clustering Algorithms for Metagenomic Sequence Analysis. Brief. Bioinform. 13: 656-668 (2012).
Lee HS, Park CS, Choi JY. Quality characteristics of the mashes of takju prepared using different yeasts. Korean J. Food Sci. Technol. 42: 56-62 (2010)
Lee SB, Yang JY, Kim JK, Ko KH, Oh SH. Fundamentals of Food Fermentation. pp. 205. Hyoil, Seoul, Korea (2004)
Magoc T, Salzberg SL. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. Bioinformatics 27: 2957-2963 (2011)
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. Technol. 46: 153-164 (2014)
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)