

## 누룩으로부터 젖산세균의 분리 및 특성

이 정 훈·유 대 식†  
계명대학교 미생물학과  
(접수 : 2000. 7. 7., 게재승인 : 2000. 8. 22.)

## Identification and Characteristics of Lactic Acid Bacteria Isolated from Nuruk

Lee, Jung Hun and Tae Shick Yu†  
Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea  
(Received : 2000. 7. 7., Accepted : 2000. 8. 22.)

Three lactic acid bacteria (C-1, K-3 and T-1 strain) were isolated from Nuruk, and characterized subsequently. They were useful strains for production of lactic acid and their growth was inhibited at 10% ethanol, pH 4. These strains were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NR C-1, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3, and *Pediococcus pentosaceus* NR T-1, respectively, by morphological, physiological and biochemical characterization. *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1 showed the highest lactic acid productivity. *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3 showed stable lactic acid productivity and its growth was inhibited at pH 4. *P. pentosaceus* NR T-1 had lower lactic acid productivity than the other two bacteria, but it could not grow at 10% ethanol, pH 4. The lactic acid productivity of these three strains in MRS broth were higher than that in Skim milk media. The optimum pH and temperature for the lactic acid production of the three strains were 30~32°C and pH 6.0~6.8. Glucose was the optimal carbon source for the lactic acid production. In terms of antagonism, *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1 showed somewhat inhibitory effects against some Gram positive rod and cocci such as *Lactobacillus brevis* and *Streptococcus mitis*. And *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3 showed the inhibitory effects against *Streptococcus mitis*, but *P. pentosaceus* NR T-1 didn't show any inhibitory effects against tested strains.

**Key Words** : *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NR C-1, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3, Nuruk, Nuruk lactic acid bacteria, *Pediococcus pentosaceus* NR T-1

### 서 론

일제시대 당시 민족문화 말살정책의 일환인 주세령과 1960년초 청주 이외의 술에 쌀 사용을 금지하는 양곡관리법에 의해 주류관련 연구가 위축되었으며, 이에 따라 전통주에 대한 연구가 부진한 상태였다. 더욱이 경제발전으로 식생활 수준 향상과 기호도의 다양화에 따른 주류소비의 고급화와 주류수입 완전개방 및 관세인하로 외국산 주류가 빠른속도로 국내시장을 점유해 가고 있다. 최근에 민족전통주에 관심을 갖게되어 안동소주 등이 국가적 차원에서 개발되고 있다. 그러나 뒤늦게 사회적 관심속에서 전통주에 대한 개발연구가 수행되고 있으나, 아직까지 이에 대한 연

구의 부진으로 전통주 개발의 표준화가 이루어지고 있지 않고 있다.

전통주의 양조에 사용되는 누룩의 역할과 표준화는 양조학에서 매우 중요시되는 과제이다. 누룩(1)은 당화와 발효의 양기능을 가진 한국의 약주, 탁주의 제조시 당화제로서 필수적인 원료이다. 누룩의 제조는 생소맥을 적당히 분쇄하고, 그 생소맥량의 20%내외의 물을 넣어 직경 30-32 cm 크기의 원반형으로 성형하여, 30°C 전후의 국실에서 12~13일간 자연적으로 곰팡이를 번식시켜 제조한다. 누룩에 번식한 곰팡이의 독특한 냄새를 제거하고, 당화력과 액화력을 안정화시키기 위해 약 60일간 숙성시킨다. 미생물학적 측면에서 볼 때 누룩은 원료 소맥에 부착된 미생물과 공기중의 다양한 야생미생물의 집식체로서 곰팡이, 효모, 젖산균과 일반세균 등의 미생물들이 생육하고 있다. 이들 미생물 중 곰팡이는 당화과정에 관여하는 amylase와 hemicellulase 등의 효소원으로 이용되며, 효모는 발효제로 에탄올을 생산하고, 젖산균은 발효초기에 pH의 저하

†Corresponding Author : Department of Microbiology, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea  
Tel : 82-53-580-5252 , Fax : 82-53-580-5164  
E-mail : tsyu@kmucc.kmu.ac.kr

에 의한 유해세균의 오염을 방지하기도 하나 발효후기에는 술의 산패세균으로도 알려져 있다. 누룩곰팡이와 효모에 대한 연구는 여러편이 보고되어 있으나, 누룩중의 젖산세균에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 더욱이 지금까지 발표된 일부 젖산세균에 대해서 학자들사이에 다른 결과를 제시하여 논란이 되고 있다. 누룩(곡자)로부터 *Leuconostoc mesenteroides*(2), *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*(3), *Pediococcus acidilactici*(3), *P. pentosaceus*(4), *P. damnosus*(4), *Lactobacillus plantarum*(3, 4), *L. murinus*(3), *L. coprophilus*(4), *L. collinoides*(4), *L. brevis*(4), *L. casei*(2), *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*(4) 및 *Enterococcus faecium*(3) 등의 젖산세균이 분리되었다. 그러나 누룩에서 유래되는 이들의 젖산세균 및 종균(starter)로서의 역할은 아직 충분히 조사되어 있지 않다. 한편 젖산세균 종균의 개발을 위한 연구로서 *L. paracasei* subsp. *paracasei*(4, 5), *L. sake*(4), *L. plantarum*(4)과 *Leu. oenos*(4)는 포도주에서 감산효과를 나타내어 산패를 방지할수 있는 세균으로 알려져 있으며, 자가분해물에 의하여  $\alpha$ -rice의 분해를 촉진하는 *L. sake* L5는 청주 등의 당화촉진균으로서 이용가능성을 제시하여 주고 있다. 또한 항효모물질인 F 16-2(4, 6)에 저항하고 그것을 잘 분해하지 않는 *Saccharomyces sake* 7-2와 *S. sake* 7-2의 발효에 영향을 미치지 않는 *L. sake*의 개발도 혼합배양 종균으로 가능성을 제시하여 주고 있다. 그러나 지금까지 누룩에 관한 연구는 술의 양조시 산패방지를 위하여 *Enterococcus*(4)를 사용할 정도이다. 따라서 술의 양조시 산 생성능력이 우수한 젖산세균 중 10%에 탄을 부근에서 생육이 정지되며, 최종제품의 산패요인이 되지 않으며, 알코올 생성 효모와 다른 젖산세균의 생육에 대한 세균생육억제물질을 생산하는 젖산세균의 개발이 요구된다.

이상의 요구에 부응하기 위하여 시판누룩으로부터 젖산세균을 분리하여 그의 특성을 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 시료

Gram 염색을 위한 Bactident Aminopeptidase는 Merk Co. 제품을 사용하였으며, malt extract와 Tween 80은 Difco Co. 제품을 사용하였다. 전국 10개 지역의 시판중인 누룩 21점을 젖산세균의 분리원으로 사용하였다.

젖산세균의 분리 및 증식용배지는 Lactobacilli MRS agar(7)를, *Streptococcus* 및 *Pediococcus* 선택배지로 m-Enterococcus agar(8)와 Slanetz와 Bartley 배지(8)을, *Leuconostoc* 선택배지로 phenylethanol sucrose agar(9, 10)를 사용하였으며, 적정산도 측정에 MRS broth와 10% skim milk 배지를, 동형·이형젖산발효의 양상(11)을 검토하기 위해 glucose-Na<sub>3</sub>-CaCO<sub>3</sub> agar(1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% glucose, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.5% CaCO<sub>3</sub>, 1.5% agar, pH 6.8)와 MHM-CaCO<sub>3</sub> agar(Table 1)를, 당발효능시험에는 기본배지(0.2% peptone, 0.5% NaCl, 0.03% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.008% bromthymol blue, 0.2% agar, pH 7.0)를 사용하였다.

Table 1. Composition of MHM-CaCO<sub>3</sub> agar medium.

Tryptone	10.0 g
Yeast extract	7.0 g
Beef extract	2.0 g
Glucose	5.0 g
Fructose	5.0 g
Maltose	2.0 g
Sodium gluconate	2.0 g
Diammonium citrate	2.0 g
Sodium citrate	2.0 g
Tween 80	20 mL
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.05 g
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01 g
Mevalonate lactone	0.03 g
Cystein hydrochloride	0.5 g
CaCO <sub>3</sub>	5.0 g
Agar	15.0 g
Ethanol	40 mL
H <sub>2</sub> O	960 mL
pH	5.4

### 균주의 증식도 측정

균주의 증식도는 멸균된 MRS 배지로 영점을 조정한 후, 분광광도계 (Pharmacia LKB-Biochrom 4060)를 사용하여 660 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 표시했다.

### 누룩 젖산세균의 분리

누룩젖산세균을 분리하기 위해 누룩을 분쇄하여, 0.85% 생리식염수에 현탁하고 희석하여 젖산세균선택배지에 시료를 각각 도말하고, 30℃에서 3일간 평판배양하였다. 각 선택배지에서 균주를 분리하여, 분리균의 산생성 유무를 확인하기 위해 0.04% bromocresol purple(BCP)가 첨가된 Lactobacilli MRS agar에 접종하고, 변색 유무를 확인하여 젖산균들을 추정, 분리하였다. 분리균주들을 20% glycerol용액에 현탁하여 deep freezer(-50℃)에 보관하면서 실험시 2회 계대배양하여 사용하였다. 분리균주의 동형젖산발효와 이형젖산발효의 검토는 Jay(12)의 방법에 준했으며 glucose-NaNO<sub>3</sub>-CaCO<sub>3</sub> 한천배지와 MHM-CaCO<sub>3</sub> 한천배지를 사용했다. 분리균주는 Bergey's Manual of Systemic Bacteriology vol. 2(13)와 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9 ed)(14)에 준하여 동정했다.

### 젖산함량 측정

젖산함량의 측정은 MRS 배지에서 30℃에서 24시간 발효시킨 발효액 10 mL와 동량의 증류수를 혼합하고, 이 혼합액에 0.5% (W/V) phenolphthalein 3방울을 첨가했다. 이 용액을 0.10 N NaOH로 중화 적정하였다. 이 때 소비된 NaOH의 mL수를 다음식을 이용하여 젖산%로 환산하였다(18).

$$\text{젖산}(\%, \text{W/V}) = \frac{\text{적정량}(\text{mL})^* \times 0.009^{**}}{10} \times 100$$

\* 배양후 적정수-배양전 적정수, \*\* 젖산계수

**Table 2.** The characteristics of all lactic acid bacteria isolated from Nuruk.

Strains	Characteristics		
	Acid production	Growth on 10% ethanol	Growth on pH 4
C - 1	1.35	-	weakly growth
C - 5	0.65	-	-
C - 6	0.55	-	weakly growth
C - 7	0.60	-	-
C - 8	0.71	-	-
C - 9	0.69	-	+
H - 1	0.63	-	+
H - 2	0.78	-	+
P - 1	0.61	-	+
K - 1	0.63	-	+
K - 3	0.98	-	-
T - 1	0.95	-	-
T - 3	0.66	weakly growth	-
T - 4	0.60	-	-
KU - 1	0.73	-	+
KU - 2	0.62	-	weakly growth

### Dextran 생성능력

Sucrose 배지(15)(solution A: 3% casein, 2.4% sodium acetate, 2%  $K_2HPO_4$ , 1.1% glucose, 1% yeast extract, 0.1% NaCl, 0.1% L-Cystine, 0.1% sodium thioglycollate, - solution B: 10% sucrose, sol. A와 sol. B를 동량으로 혼합하여 pH 7.1로 조정) 5 mL에 분리균을 접종하고, 30°C에서 1~2일간 배양했다. 배양액을 원심분리한 상등액 0.1 mL와 sodium acetate 0.3 mL를 혼합하여, 이 혼합액에 acetone 0.32 mL, ethanol 0.48 mL와 methanol 0.6 mL를 따로 넣어 혼합하여 혼탁의 유무를 관찰했다. 시험관 3개 모두 혼탁하거나, acetone 시험관만 또는 알코올 시험관만 혼탁되어 있을 때 dextran이 생성되었다고 판정하였다.

### 항균력 시험

분리동정된 균주의 배양액이 다른 미생물에 대한 항균력(16, 17)을 검토하기 위해 분리균주를 MRS 배지에 접종하여 30°C에서 24시간 배양했다. 이 배양액을 4°C, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 그 상등액을 회수하고 항균력 검정에 이용하였다. 시험균으로 *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mitis*, *Escherichia coli*, *S. cerevisiae*를 사용했으며, 시험균의 배양액 1%를 각각 접종한 MRS soft agar위에 LB soft agar를 부어 건조시켰다. 건조된 배지위에 분리균주의 배양액의 상등액을 10  $\mu$ L씩 확산법인 paper disk법으로 점적하여 24시간 배양시켜 생육억제환의 생성여부로 판정하였다.

## 결과 및 고찰

### 젖산 세균의 분리

MRS 한천배지, m-Enterococcus 배지와 phenylethanol sucrose 배지를 사용하여 누룩으로부터 60개의 세균을 분리하고, Gram 염색 및 catalase test를 실시하고 BCP가 첨가

된 MRS agar에서 젖산세균으로 추정되는 48개의 균주를 선별했다. 이들 세균의 산 생성능력을 측정하고 10% 에탄올과 pH 4부근에서의 생육여부를 검토하였다. 안 등(4)에 의하여 분리된 40개 균주 중 4개 균주만이 10% 에탄올에서 생육이 억제되었다. Table 2에 나타난 바와 같이, 본 연구에서는 48개 균주 중 12개 균주의 생육이 억제되었다. 또한 안 등(4)은 pH 3.6에서는 95개의 젖산세균 중 3개 균주만이 생육이 가능하였고, pH 6.5에서는 모두 생육하였는데, 본 연구에서는 pH 4에서 48개의 젖산 세균 중 13개 균주가 생육이 가능하였다. 이들 균주 중에서 청송누룩에서 분리된 젖산 세균 중 MRS 배지에서 생육한 C-1균주와 금복주 누룩에서 분리된 젖산 세균 중 Slanetz와 Bartley 배지에서 생육한 K-3균주, 그리고 춘천누룩에서 분리된 젖산 세균 중 phenylethanol sucrose 배지에서 생육한 T-1균주는 산 생성능력이 비교적 높을 뿐 아니라 10% 에탄올과 pH 4부근에서 생육이 정지되어 본 연구의 목적에 부합하여 3개의 젖산세균을 실험균주로 사용했다.

본 연구에서는 특이하게 젖산간균은 전혀 분리되지 않았는데, 연구에 사용된 누룩은 제조된지 2년 이상 저장된 누룩으로서 수분활성이 일반누룩에 비해 아주 낮은 상태였다. 그래서 비교적 수분활성이 높은 간균보다는 구균의 생존가능성이 큰 것으로 판단되며, 누룩의 열악한 외부 환경조건에서 젖산 간균보다 젖산 구균의 적응력이 높은 것을 알 수 있었다.

### 실험균주의 동정

C-1균주는 Gram 양성이며 catalase 음성 구균으로서 생육최적온도는 30°C, 생육최적 pH는 6.8이었다. 또한 이 균주는 운동성이 없고, MRS 배지에서 gas를 생성하지 않아 동형젖산발효를 하는 것으로 보이며 기타 생리·생화학적 시험에 의해 *Lactococcus* 속으로 판정하였다. C-1균주는 당발효성 시험 결과는 *S. lactis*와 비슷한 양상을 보였으나, *S. lactis*는 maltose에 대해 빠른 양성반응을 나타내나, C-1균주는 비교적 늦은 양성을 나타냈으며, *S. lactis*가 lactose에 양성을 나타내었으나 C-1균주는 음성을 나타내었다. 그리고 4.5% NaCl에서 생육이 가능하고, 45°C에서는 생육이 불가능하여 *S. lactis*와는 다소 다른 특징을 나타내므로 C-1균주를 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NR C-1으로 동정하였다(Table 3).

K-3균주는 Gram 양성이며, catalase 음성 구균으로서 생육최적온도는 28°C이며, 생육최적 pH는 6.8이었다. 또한 K-3균주는 운동성이 없고, 분리된 3개 균주 중 유일하게 MRS 배지에서 gas를 생성하여 이형젖산발효를 하는 것으로 보이며, sucrose로부터 dextran을 생성하였다. K-3균주의 생육은 4°C에서 미약하지만 생육할 수 있었으나, 40°C에서는 생육이 불가능하였다. 그리고 pH 9.5에서 생육이 가능하였으며, 기타 생리·생화학적 시험에 의해 *Leuconostoc* 속으로 판정하였다. 그리고 K-3균주는 sucrose, ribose와 lactose 등으로부터 산을 생성하고 rhamnose로부터는 산을 생성하지 않아 K-3균주를 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3로 동정하였다.

T-1균주도 C-1균주와 K-1균주와 같이, Gram 양성이며,

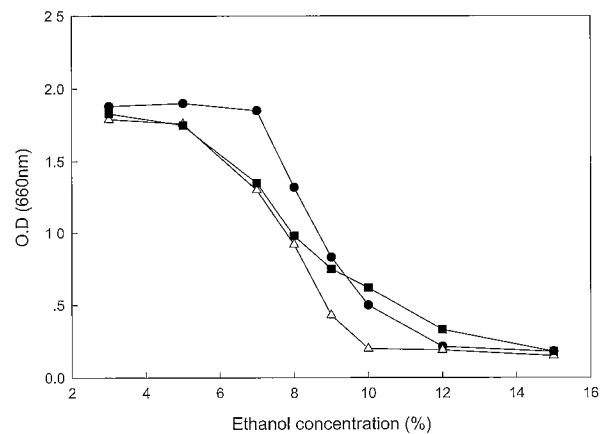
**Table 3.** Morphological, physiological and biochemical characteristics of C-1, K-3 and T-1 isolated from Nuruk.

Characteristics	C-1	K-3	T-1
Cell form	cocci	cocci	cocci
Cell size	0.7~1.0 $\mu$ M	0.8~1.2 $\mu$ M	0.78~2.0 $\mu$ M
Cell arrangement	pairs, short chains	pairs, long chains	pairs, terads
Motility	-	-	-
Gram reaction	+	+	+
Facultative anaerobes	+	+	+
Gas from glucose	-	+	-
Catalase test	-	-	-
VP test	-	-	-
Oxidase test	-	-	-
Formation of indole	-	-	-
Nitrate reduced	-	-	-
Dextran formation	-	+	-
Hydrolysis of gelatin	-	-	-
Optimal temperature	30°C	25~30°C	30°C
Optimal pH	6.5~7	6.8	7.0
Growth at 4.5% NaCl	+	+	+
6.5% NaCl	weakly growth	+	+
6.8% NaCl	-	-	+
7% NaCl	-	-	+
Growth at 4°C	-	weakly growth	-
10°C	+	+	-
15°C	+	+	+
37°C	+	+	+
40°C	+	-	+
45°C	-	-	weakly growth
Growth at pH 3.0	-	-	-
pH 3.5	+	-	-
pH 4.0	+	-	+
pH 4.5	+	+	+
pH 8.5	+	+	+
pH 9.0	+	+	-
pH 9.5	-	weakly growth	-

catalase 음성 균주으로 운동성이 없고, 생육최적온도는 30°C이며 생육최적 pH는 6.8이었다. MRS 배지에서 gas를 생성하지 않아 동형젖산발효를 하는것으로 추측되며, sucrose로부터 dextran을 생성하지 못하고, gelatin을 가수분해하지 못하였다. 분리된 3개 균주 중 유일하게 T-1균주가 7% 이상의 NaCl농도에서 생육이 가능하였으며, 45°C에서도 유일하게 생육이 미미하나 가능하였다. T-1균주는 특이하게 pH 9 이상에서는 생육을 하지 않으며, 기타 생리·생화학적 시험에 의하여 이 균주를 *Pediococcus*속으로 판정하였다. 더욱이 당발효능력 시험에서 maltose, ribose와 arabinose로부터는 산을 생성하였으나, lactose와 sucrose로부터는 산을 생성하지 못하는 등의 특성으로부터 T-1균주를 *P. pentosaceus* NR T-1로 동정하였다.

**에탄올 농도에 따른 생육 저해도**

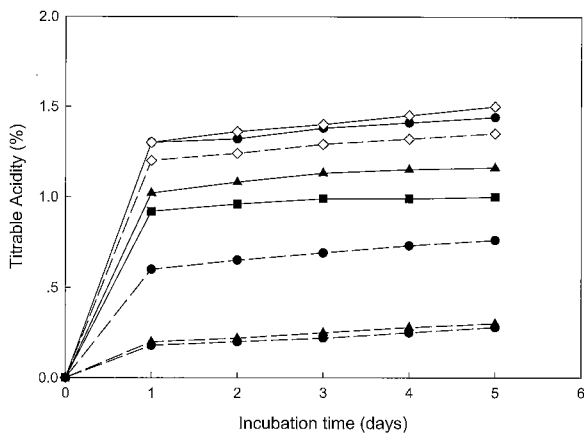
Figure 1에 나타난 바와 같이, 8% 에탄올에서 *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주는 생육이 약 30% 감소되었고, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3와 *P. pentosaceus* NR T-1균주는 7.5% 에탄올에서 생육이 약 30% 감소되었다. 그리고 10% 에탄올에서는 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3균주는 생육이 86% 감소되었고, *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주는 77%, *P. pentosaceus* NR T-1균주는



**Figure 1.** Effect of various concentrations of alcohol on the growth of the strains isolated from Nuruk.

The strains were incubated at 30°C for 30 hours, and MRS broth medium (pH 6.8) adjusted various alcohol concentration was used. Symbol: ●, *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1; △, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3; ■, *P. pentosaceus* NR T-1.

70% 생육이 감소되어 3개의 젖산 세균 모두 생육이 크게 저해되는 것으로 나타났다.



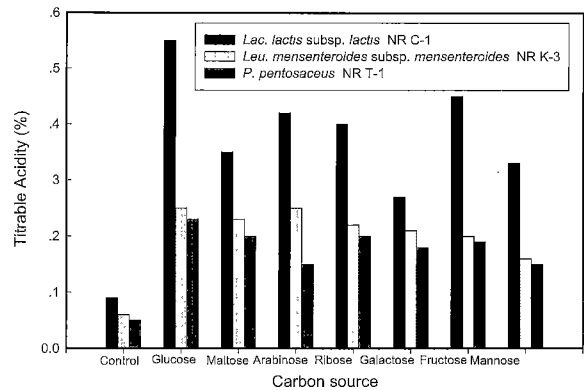
**Figure 2.** Changes of lactic acid production by the strains isolated from Nuruk on the MRS broth(pH 6.8) and skim milk media. The strains were incubated at 30°C for indicated days. Symbol : ●, *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1; ▲, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3; ■, *P. pentosaceus* NR T-1; ◇, *L. bulgaricus*. — : MRS brot --- : Skim milk media

**젖산생성에 미치는 배지의 영향**

분리 동정된 3개의 젖산세균의 증식 및 젖산생성에 대한 배지의 종류를 검토한 결과, Figure 2에 나타난 바와 같이, 분리된 젖산세균들은 skim milk 배지에서 보다 MRS 배지에서 산 생성능력이 높게 나타났다. 대표적 젖산간균인 *L. bulgaricus*는 두 배지에서 산 생성능력에 큰 차이를 보이지 않았고, 유 등(18)에 의하면 젖산세균은 배양 1일째 전체 산 생성량(for 5 days)의 95% 이상을 생성한다고 하였는데, 이 균주와 분리 동정된 3개의 실험 균주는 모두 배양 1일째, 총산 생성량(for 5 days)의 90% 이상을 생성하였다. 특히, MRS 배지에서의 산 생성능력을 100%로 했을시 skim milk 배지에서는 *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주는 55%, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3균주는 85%, 그리고 *P. pentosaceus* NR T-1균주는 80%정도 감소하였다. 이는 이들 균주들이 까다로운 영양요구성을 나타낸다고 판단된다. 일반적으로 질소원은 젖산세균의 생육에 이용되며, 탄소원은 산 생성에 이용된다고 알려져 있다. Skim milk 배지(19)는 lactose, galactose, 소량의 glucose, casein 그리고 무기염류가 포함되어 있으나, skim milk 배지는 MRS 배지에 비해 glucose의 함량이 적어 3개의 실험균주 모두 젖산생성능력이 현저하게 저하된다고 보여진다.

**젖산생성에 미치는 온도의 영향**

분리 동정된 균주의 젖산 생성능력에 대한 온도의 영향을 검토한 결과, 30~37°C에서 3균주 중 *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1 > *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3 > *P. pentosaceus* NR T-1 순으로 산 생성능력이 높게 나타났다. 특히 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3균주는 40°C에서 균생육이 정지되어 산을 생성하지 못하였으나, *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주와 *P. pentosaceus* NR T-1균주는 40°C에서도 높은 산 생성능력을 나타내어 적정산도가 각각 1%와 0.8%를 나타내었다(결과 미 기재).



**Figure 3.** Effect of various sugars on the lactic acid production of the strains isolated from Nuruk. The strains were incubated for 30 hours at 30°C, and the basal medium contained various carbon source (2%) was used.

**젖산생성에 미치는 pH의 영향**

분리 동정된 실험균주의 젖산 생성능력에 미치는 초기 pH의 영향을 검토한 결과, pH 4에서 *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주는 적정산도가 0.6%로서, 다른 2개의 실험균주에 비해 50%이상 높은 젖산 생성능력을 나타내었고, *P. pentosaceus* NR T-1균주는 0.3%, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3균주는 0.18%의 적정산도를 나타냈다. *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주는 pH 6에서 1.2%의 적정산도를 나타내어 분리균주 중 가장 높은 젖산 생성능력을 나타내었으며 *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3균주는 0.8%의 적정산도를 나타내어 오히려 0.78%의 적정산도를 나타낸 *P. pentosaceus* NR T-1균주보다 약간 높게 나타났다(결과 미 기재).

**젖산생성에 미치는 탄소원의 영향**

분리 동정된 실험균주의 젖산생성에 미치는 탄소원의 영향을 검토한 결과, *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주는 glucose > fructose > arabinose 순으로 젖산 생성능력이 높게 나타났으며, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3균주는 glucose > arabinose > maltose 순으로 나타났다. *P. pentosaceus* NR T-1균주는 glucose > maltose > ribose 순으로 나타남을 알 수 있었다(Figure 3). 실험균주에 의한 젖산 생성에 glucose가 가장 양호한 당이란 결과는 술의 양조시 이용되는 당화제의 최종산물이 glucose이므로 실험균주가 젖산세균의 종균으로의 이용 가능성을 제시해주고 있다.

**항균력 시험**

분리 동정된 3개의 젖산세균을 주류 발효에 사용할시 유해균의 오염방지와 공생하고 있는 효모의 생육을 저해하는지를 검토하기 위해 항균력을 검토했다. 김 등(16)은 *Lac. lactis* subsp. *lactis*는 *E. coli*에 대해 생육저해효과를 나타낸다고 보고 하였는데, 본 연구에서 *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주는 같은 Gram 양성세균인 *L. brevis*와 *Streptococcus mitis*의 생육을 저해 했으나, *E. coli*의 생육은 저해하지 못하였다. *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3균주는 *Streptococcus mitis*에만 생육저해

Table 4. Antimicrobial spectrum of culture broth of the strains isolated from Nuruk.

Tested strains	Inhibition		
	<i>Lac. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NR C-1	<i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> NR K-3	<i>P. pentosaceus</i> NR T-1
<i>Lactobacillus brevis</i>	+	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-	-	-
<i>Bacillus subtilis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus mitis</i>	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Hansenula anomala</i>	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	-

효과를 나타내었고, *P. pentosaceus* NR T-1균주는 생육저해효과를 나타내지 못하였다(Table 4). 실험균주에 의한 항균력이 낮은 pH에 의해 생육이 저해되는 것으로 볼 수 있지만, 항균성물질에 의한 생육저해작용으로도 볼 수 있으므로 항균성 물질을 정제할 필요성이 대두된다. 더욱이 실험에 사용된 3개의 젖산세균의 환경적응능력과 유용한 2차 대사산물의 생산가능성은 생리 기능적측면에서도 이용 가능성이 매우 높다고 사료된다.

### 요 약

시판누룩으로부터 젖산 생성능력이 우수하고 10% 에탄올 및 pH 4부근에서 생육이 정지되는 젖산세균 C-1, K-3 와 T-1균주를 분리, 동정했다. 분리된 C-1균주를 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NR C-1로, K-3균주를 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3로, 그리고 T-1균주를 *Pediococcus pentosaceus* NR T-1으로 각각 동정하였다. *Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1균주와 *P. pentosaceus* NR T-1은 동형젖산발효로 젖산을 생성했으며, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3는 이형젖산발효로 젖산을 생성하였다. 실험균주 모두 cell size는 0.7~2.0 $\mu$ m 크기의 구균이 었다.

*Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1은 MRS 배지와 skim milk 배지에서 높은 젖산 생성능력을 나타내었으며, 분리 동정된 3균주 모두 skim milk 배지에서보다 MRS 배지에서 젖산 생성능력이 우수했다. 그리고 생육온도 30~32 $^{\circ}$ C 와 pH 6~7부근의 조건에서 분리균주 모두 높은 젖산 생성능력을 나타내었으며, 이들 젖산세균은 glucose를 이용하여 공통적으로 높은 젖산 생성능력을 나타내었다.

*Lac. lactis* subsp. *lactis* NR C-1은 Gram 양성세균인 *Lactobacillus brevis*와 *Streptococcus mitis*의 생육을, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* NR K-3는 *Streptococcus mitis*의 생육을 저해했다. 그러나 *P. pentosaceus* NR T-1은 실험에 사용된 모든 시험균주의 생육에는 아무런 영향을 미치지 않았다.

### REFERENCES

1. Yu, T. S., H. Y. Kim, J. Hong, H. P. Ha, T. Y. Kim, and L. W. Yoon (1996), Bibliographical study on microorganism of Nuruk, *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25**, 170-179.
2. Shin, Y. D. and D. H. Cho (1970), A Study on the microflora changes during Takju brewing, *Kor. Jour. Microbiol.* **8**, 53-64.
3. Jo, K. Y. and D. M. Ha (1995), Isolation and identification of the lactic acid bacteria from Nuruk, *Agri. Chem. Biotechnol.* **38**, 95-99.
4. An, B. H., J. S. Chung, W. S. Park, M. K. Lee, and S. E. Chung (1995), Isolation and identification of lactic acid bacteria from traditional Korean Nuruk, *In Scientific approaches on Korean traditional fermented foods. Reports of Ministry of Science and Technology*, p108, Korea.
5. Yu, V. N. and D. I. C. Wang (1991), Extractive fermentation for lactic acid production, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 521-527.
6. Neo, J. W. and Kreger-van Rij (1984), *The yeast*, **2**, 52-99, Academic Press, London.
7. Ohara, H., K. Hiyama, and T. Yoshida (1992), Non-Competitive product inhibition in lactic acid fermentation from glucose, *J. Ferment. Bioeng.* **36**, 773-776.
8. Difco Laboratories (1984), *Difco Manual*, p346.
9. Kim, E. S., E. Y. Jung, E. H. Kim, and D. H. Jung (1998), Properties of acid tolerance of acid-resistant mutant *Leuconostoc mesenteroides* which was improved as Kimchi starter, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 102-109.
10. Kim, E. S., E. Y. Jung, E. H. Kim, D. H. Jung, and O. S. Yi (1998), Strain improvement of *Leuconostoc paramesenteroides* as a acid-resistant mutant and effect on Kimchi fermentation as a starter, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 151-160.
11. Atlas, R. M. (1993), *Handbook of Microbiological Media*, edited by L. C. Parks, p711, CRC Press, Boca Raton.
12. Jay, M. J. (1992), *Modern Food Microbiology*, p231-255, Chapman and Hill, New York.
13. Peter, H., A. Sneath, N. S. Mair, and J. G. Holt (1996), Section 12. Gram-positive cocci. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, **2**, 999-1100.
14. Peter, H., A. Sneath, J. T. Staley, R. C. W. Berkeley, N. R. Krieg, and J. G. Holt (1994), Gram-positive cocci. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. p527-533.
15. Ha, D. M. and J. S. Park (1995), Characterization and identification of lactic acid bacteria from Kimch, *Reports of Ministry of Science and Technology*, Korea. p341-382.

16. Kim, S. K., S. J. Lee, Y. J. Baek, and Y. H. Park (1994), Isolation of bacteriocin-producing *Lactococcus* sp. HY 449 and its antimicrobial characteristics, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 259-265.
17. Yoo, J. Y., I. S. Lee, K. S. Chung, and Y. J. Nam (1991), Isolation and properties of bacteriocin-producing microorganisms, *Kor. J. Appl. Microbiol.* **19**, 8-13.
18. Yu, J. H., H. S. Jim, and Y. J. Back (1991), Lactic fermentation of soy milk by mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Saccharomyces uvarum*, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 413-418.
19. Rasic, J. L. and J. A. Kurmann (1978), *Yoghurt fermented fresh milk products*, **1**, p25-87, Technical Dairy Publishing House.