

전통주 양조에 적합한 *Lactobacillus brevis* JBE 30 균주의 특성

허 준¹ · 류명선¹ · 전새봄¹ · 오현화¹ · 정도연² · 엄태봉^{1*}

¹전북대학교 자연과학대학 생명과학과, ²발효미생물산업진흥원

Characterization of *Lactobacillus brevis* JBE 30 as a Starter for the Brewing of Traditional Liquor

Jun Heo¹, MyeongSeon Ryu¹, SaeBom Jeon¹, HyeonHwa Oh¹, Young Sang Kim²,
DoYoun Jeong³, and Tai-Boong Uhm^{1*}

¹Department of Biological Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Republic of Korea

²Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 595-804, Republic of Korea

(Received September 11, 2014 / Accepted September 25, 2014)

For the collection of starters suitable for the brewing of traditional liquor, an alcohol-resistant strain of lactic acid bacteria with low level of acid production was isolated from traditional fermented soybean lumps. The strain named as JBE 30 was identified as *Lactobacillus brevis* by 16S rRNA sequence analysis and additional biochemical tests. The strain could grow well at a MRS medium containing 8% (v/v) ethanol for 96 h of cultivation at 30°C. The final pH after cultivation was 4.5. It also inhibited the growth of food spoilage and pathogenic bacteria including *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. These results showed that *Lactobacillus brevis* JBE 30 could be used as a promising starter in brewing process of traditional liquor.

Keywords: *Lactobacillus brevis*, ethanol resistance, fermentation, lactic acid bacteria, traditional liquor

전통주는 막걸리, 약주, 소주를 일컫는 말로서 맥주, 포도주와 다르게 병행 복발효 방식으로 발효되는 한국 고유의 술이다. 병행 복발효는 당화와 에탄올 발효가 같은 발효조 안에서 동시에 일어나는 발효 방식으로 두 생화학적 과정을 수행하는 미생물 및 관련 효소가 함유된 누룩을 필수적으로 사용한다. 누룩은 비살균 상태로 성형하여 자연 상태에 존재하는 다양한 미생물들이 존재하기 때문에, 순수 곡류를 살균하여 단일 균종을 접종하는 일본의 koji와 다르다(Yu *et al.*, 1996; Bae *et al.*, 2007). 전통주의 발효는 기본적으로 누룩의 *Aspergillus amylase*에 의한 전분의 당화 과정과 효모에 의한 환원당의 에탄올 전환 과정으로 구성된다. 따라서 전통주 양조에 발효 주 미생물인 곰팡이와 효모에 관한 연구는 많았지만, 상대적으로 유산균에 대한 연구는 부족한 상황이었다(Yu *et al.*, 1996; Lee and Yu, 2000). 최근 유산균이 probiotics의 특성을 비롯한 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 알려지고 전통주 양조 과정 중 발효조절, 오염방지, 향미 형성 등의 긍정적인 영향에 대한 연구가 진행되면서(Gilliland, 1990; Herich and Levkut, 2002; Seo *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007; Masood *et al.*, 2011) 유산균에 대한 연구의 중요성 및 필

요성이 부각되고 있다. 발효에서 유산균 역할은 유기산을 생성하여 효모가 잘 자랄 수 있는 약산성 환경을 만들고, 유기산을 비롯한 유산균 생성 항균 물질이 양조 과정 초기에 유해균을 억제하는 역할을 하며, 유기산이 에탄올과 결합하여 에스테르(ester) 향 미성분을 생성하는데 관여한다. 이형젖산발효를 하는 *Lactobacillus*의 경우 에탄올, 젖산, 초산을 생산하고 이들 산의 일부가 ethyl acetate 또는 ethyl lactate 등으로 전환됨이 알려져 있다(de Revel *et al.*, 1999).

현재까지 전통주 양조에 적합한 유산균 균주는 에탄올 내성, 젖산 생성 능력, 항균 활성, 산 내성을 기준으로 하여 선발해 왔다(Lee, 2000; Bae *et al.*, 2007; Baek *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2013). 이 기준에 따라 선발된 유산균들은 대부분 산 생성능이 우수하여 배양액의 pH를 4.0 미만으로 감소시켰다. 그러나 발효 초기에 유산균에 의한 과도한 산 생성은 효모의 성장과 에탄올 발효를 저해하여 전통주의 산패 원인이 된다(Lindgren and Dobrogosz, 1990; Kim and Park, 1996; Lee, 2000; Park *et al.*, 2007, 2012). 이의 해결을 위해 식품의약품안전처가 고시한 GRAS (Generally recognized as safe) 유산균으로서, 에탄올의 존재 하에서 산 생성이 제어된 균주의 선발이 필요하였다. 이 연구에는 이러한 조건에 부합하는 유산균을 선발하여 전통주 양조용 유산균으로 사용하는데 목표를 두었다.

*For correspondence. E-mail: tbuhm@chonbuk.ac.kr; Tel.: +82-63-270-3439; Fax: +82-63-270-3362

재료 및 방법

균주의 분리

전통 방식으로 제조한 가내 제조 메주와 누룩 64종과 시중에 유통 중인 막걸리 및 누룩 96종을 구입하여 1 g을 취해 펩톤액 (0.1% peptone + 0.85% NaCl)으로 희석하였다. 희석한 시료를 0.005% bromocresol purple (5',5''-dibromo-o-cresolsulphthalein)이 첨가된 MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) agar (Difco, USA) 배지 표면에 도말하여 30°C에서 48시간 배양하였다. 배양 후 주변에 노란색 환을 형성하는 집락들은 새 MRS 고체 배지 표면에 희석 도말하여 배양한 뒤 단일 집락들을 분리하였다.

전통주 제조 적합 균주의 선별

분리한 523종 유산균주의 에탄올 내성을 확인하기 위하여 10% 에탄올(v/v)이 첨가된 MRS 액체배지에 분리한 균주 배양액 2%(v/v)를 접종하여 30°C에서 48시간 동안 진탕 배양하였다. 배양 후 배지 상에서 육안으로 현탁도가 증가한 균주 244종을 1차로 선별하였고, 선별 균주들 중 동일 배양 조건에서 pH 값이 4.0 이하로 내려가지 않는 균주 26종을 선별하였다. 이 균주들 중 배양액의 pH가 가장 높았던 JBE 30 균주를 최종 선별하였다.

분리 균주의 동정

생화학적 특성에 따른 동정은 API 50 CHL kit (bioMérieux, France)를 사용하여 제품 매뉴얼에 따라 분석했고, 얻어진 결과들은 on-line bacteria database인 apiweb software (bioMérieux)를 사용하여 분류군의 생화학적 특성을 비교 계산한 뒤 동정하였다. 16S rRNA 유전자의 염기 서열에 의한 동정을 위해 universal primer로 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1,492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')을 사용하여 16S rRNA 유전자를 증폭하고, 이 PCR 산물을 정제한 후 염기 서열을 해독하였다. 이 염기 서열을 이용하여 BLASTN search (Zhang et al., 2000)와 Ribosomal Database Project (version 11)의 SeqMatch program에서 서열 일치도가 높은 표준 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 얻었고, 염기 서열간의 상호 비교를 위해 CLUSTAL W (Thompson et al., 1994)를 사용했다. 계통도 분석은 균주들의 16S rRNA 유전자 염기서열들을 정렬하고 chromatogram의 비교와 수작업으로 공백 부분을 최소화되게 보정한 후 Tamura-Nei 모델에 기초한 Maximum Likelihood 방법 (Tamura and Nei, 1993)을 사용하여 작성하였다. 산출한 각각의 계통수에서 각 분지에 대한 통계적 신뢰도를 산출하기 위해 bootstrap 분석을 1,000회 실행하였으며, 계통 분석과 bootstrap 분석은 MEGA program (Tamura et al., 2011)을 사용하였다.

에탄올 농도에 따른 JBE-30 균주의 증식특성

JBE 30 균주의 에탄올 내성 한계를 확인하기 위해 에탄올 농도(0-12%)를 달리한 MRS 액체 배지에서 30°C에서 72시간 배양시킨 다음 620 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또한 에탄올 농도에 따른 배양 중 증식 특성을 확인하기 위하여, MRS 액체배지의 에탄올 농도를 0%, 8%, 10%, 12%로 조절한 뒤 2.6×10^7

CFU/ml의 균을 접종하여 30°C에서 96시간 동안 진탕 배양하였으며, 배양 시간 별로 생균수, pH 및 총산도를 측정하였다. 균수는 배양액을 펩톤액으로 연속 희석하여 0.005% bromocresol purple이 첨가된 plate count agar (PCA, MB Cell, Korea) 배지에 도말한 뒤 30°C에서 48시간 동안 배양하여 형성된 집락을 계수하였다. 총산도는 1% phenolphthalein을 지시약으로 사용하고 0.1 N NaOH로 적정하여 소비된 NaOH 소비량을 유기산(%)으로 환산하여 다음 식으로 계산하였다(Yu et al., 1991).

$$\text{유기산 함량(\%)} = 0.1 \text{ N NaOH 적정량(ml)} \times \text{계수}(0.007) \times \text{희석배수} / \text{시료량(ml)}$$

항균 활성 측정

JBE 30 균주는 MRS 액체 배지에서 30°C에서 200 rpm으로 48시간 동안 진탕 배양하고 원심분리(10,000 × g, 10분) 후 상등액을 취하였다. 식품 부패 유해균으로 *Bacillus cereus* ATCC 11778, ATCC 14579, ATCC 27348, KACC 13064, KACC 13066, KACC 13752, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Staphylococcus aureus* KACC 10778, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Enterococcus faecalis* ATCC 35038, *Micorococcus luteus* KACC 13377, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 균주를 사용하였다. 유해 균주를 NB (Nutrient Broth, Difco, USA) 배지에 30°C에서 24시간 200 rpm으로 진탕 배양시킨 후 100 μl (약 1.5×10^6 CFU)를 취해 NA (Nutrient agar, Difco, USA) 고체배지에 골고루 도말 하였다. 표면에 6 mm paper disc를 올려놓은 뒤 JBE 30 균주의 배양액(1×10^9 CFU/ml)으로부터 원심분리한 상등액 20 μl를 분주하여 30°C에서 24시간 동안 배양하고 paper disc 주위에 형성된 투명환을 측정하여 항균력을 확인하였다. 유기산 이외의 다른 요인에 의한 항균활성 여부를 확인하기 위해 JBE 30 균주의 배양 상등액을 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH를 6.0으로 조절한 다음 동일한 방식으로 항균활성을 확인하였다.

통계 분석

모든 측정 실험에서 얻어진 값들은 평균±표준편차로 나타내었다. 에탄올 농도에 따른 증식 특성 및 항균 활성에 관한 실험의 통계처리는 SPSS program (version 16.0, SPSS, USA)의 one-way ANOVA를 실시하였으며 각 그룹간의 유의적인 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

전통주 제조 적합 균주 선별

총 123종의 시료들로부터 bromocresol purple (pKa 6.3)을 첨가한 MRS 배지를 사용하여 유산균으로 추정되는 산 생성 집락 523종을 분리하였다. 이들 중 10% 에탄올이 첨가된 MRS 배지에서 생육가능하며 배양액 pH가 4.0 이상이었던 26종을 고른 뒤, 배양액의 pH가 4.5로 가장 높았던 JBE 30 균주를 최종 선정하였다. 전통주는 발효 후 에탄올의 농도를 최대로 높일 필요가 있기 때문에 에탄올 발효에 영향을 주는 유산균 배양액의 최종

Table 1. Biochemical properties of the strain JBE 30 using the API 50 CHL kit

Active ingredients					
Glycerol	-	D-Manitol	-	D-Raffinose	-
Erythritol	-	D-Sorbitol	-	Amidon (starch)	-
D-Arabinose	-	Metyl- α D-Mannopyranoside	-	Glycogen	-
L-Arabinose	+	Metyl- α D-Glucopyranoside	-	Xylitol	-
D-Ribose	+	N-Acetylglucosamine	+	Genitobiose	-
D-Xylose	+	Amygdalin	-	D-Turanose	-
L-Xylose	-	Arbutin	-	D-Lyxose	-
D-Adonitol	-	Esculin, ferric citrate	-	D-Tagatose	-
Methyl-D-Xylopyranoside	-	Salicin	-	D-fucose	-
D-Galactose	+	D-Cellobiose	-	L-fucose	-
D-Glucose	+	D-Maltose	+	D-Arabitol	-
D-Fructose	+	D-Lactose	-	L-Arabitol	-
D-Manose	-	D-Melibiose	+	Potassium gluconate	+
L-Sorbose	-	D-Saccharose (sucrose)	-	Potassium 2-ketogluconate	-
L-Rhamnose	-	D-Trehalose	-	Potassium 5-ketogluconate	+
Dulcitol	-	Inulin	-		
Inositol	-	D-Melezitose	-		

pH 값은 중요하다. 효모보다 빠르게 증식하는 젖산균은 술 빚기 초기에 pH를 낮춰 누룩 내 잡균의 증식을 막고 효모 증식을 위한 최적 pH (5.0-5.5)에 도달되게 한다. 이때 최적 pH 조건에서 효모는 빠르게 8-10%까지 에탄올을 생산하면서 오염 미생물들은 사멸하게 된다. 그러나 발효 초기에 젖산균이 과도한 산을 생산하여 pH를 4.0 이하로 떨어뜨리는 경우, 효모는 세포 내 pH의 일정한 항상성을 유지하기 위해 수소이온 펌프를 계속 작동해야 하고 이에 따라 에너지의 소비가 커져 에탄올 생산은 감소한다(Narendranath *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002). Narendranath 등(2005)은 pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5로 조정한 35% maltodextrin 배지에서 *Saccharomyces cerevisiae*를 48시간 배양했고 이때 에탄올의 생

산량이 각각 13% (v/v), 15%, 15.5%, 15.8%로서 pH 4.0에서 에탄올 감소폭이 큰 것을 발견하였다. *Saccharomyces cerevisiae*의 최적 에탄올 생산 pH가 5.3으로 보고된 결과(Shafaghat *et al.*, 2010)로부터, 선발한 26종 가운데 최종 pH가 가장 높았던 JBE 30를 에탄올 생산에 적합한 균주로 선정하였다.

분리 균주의 동정

API 50 CHL kit를 사용한 JBE 30 균주의 50가지 생화학적 특징은 Table 1에 요약되어있으며, 이 결과들을 apiweb software에서 검색한 결과 *L. brevis* 생화학적 성질과 100% 일치하였다. *L. brevis*는 이형 젖산발효 유산균(heterofermentative lactic acid

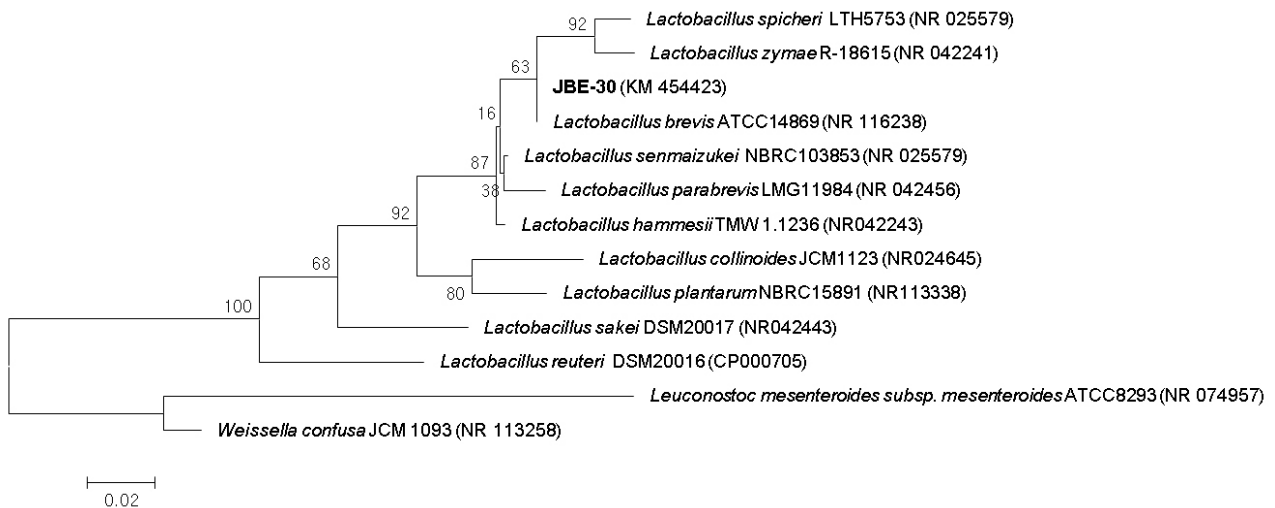


Fig. 1. Phylogenetic tree constructed from comparative analysis of 16S rRNA gene sequences showing the relationships of JBE 30 with other type strains. Bootstrap values (percentage from 1,000 replicates) are indicated at the nodes. The scale bar indicates the nucleotide change per site.

bacteria)으로서 육탄당 뿐 아니라 오탄당을 대사하여 acetate와 lactate를 생산할 수 있는 능력을 가지는 것으로 보고 되었다 (Kandler, 1983).

RDP (Ribosomal Database Project)의 SeqMatch 프로그램을 통해 두 균의 16S rRNA 유전자 염기 서열과 가장 가까운 표준 균주들을 선정한 뒤 MEGA program에서 계통도를 분석하였다 (Fig. 1). 그 결과 JBE 30 균주는 type strain인 *L. brevis* JCM 1059 과 가장 가까운 근연관계로 16S rRNA 유전자의 염기 서열 상동성은 99.5% (1,362 bp/1,369 bp)였다. 따라서 생화학 분석과 계통학적 분류를 고려하여 JBE 30 균주를 *L. brevis* JBE 30 (GenBank accession no. KM454423)으로 명명하였다. 식품의약품안전처가 제정한 식품 첨가물 규격(http://fse.foodnara.go.kr/origin/search_data_list.jsp)에 따르면 유산균들 중 *L. brevis*는 GRAS 균주로 등록되어 있다.

에탄올 농도에 따른 JBE-30 균주의 배양특성

분리된 균주의 에탄올 내성 한계를 확인하기 위해 에탄올 농도를 달리한 MRS 액체 배지에서 30°C에서 72시간 배양시킨 다음 균체 농도를 3회 반복하여 비교하였다. 그 결과 8% 에탄올 농도까지는 증식에 유의적인 차이가 없었으나 9%에서 감소하기 시작했고 10% 이상에서는 급격한 감소를 보였다(Fig. 2). 이러한 결과는 막걸리에서 분리했던 *L. casei*의 경우 6% 에탄올이 첨가된 배지에서 정상적인 증식과 달리 10% 이상의 에탄올 함유 배지에서는 증식이 거의 정지되었다는 보고(Baek et al., 2012)와 유사하였다.

균수 증식에 급격한 변화를 보였던 8%, 10%, 12% 에탄올 농도의 MRS 액체 배지에서 배양 시간에 따른 생균수, 총산도, pH를 3회 반복하여 측정하였으며 그 평균 값을 비교하였다(Fig. 3). 에탄올이 없는 배지에서 초기 생균수, 총산도, pH는 각각 2.6×10^7 CFU/ml, 0.21%, 6.4였으나, 24시간 배양에서 1.0×10^{10} CFU/ml, 0.82%, pH 4.5였고 48시간 배양에서 1.9×10^{11} CFU/ml, 0.91%, 4.5로 배양기간 중 가장 높은 총산도에 도달하였다. 이후 72시간 배양에서 1.2×10^{10} CFU/ml, 0.86%, 4.5, 96시간 배양에서 5×10^9 CFU/ml, 0.82%, 4.5로 총산도는 조금 감

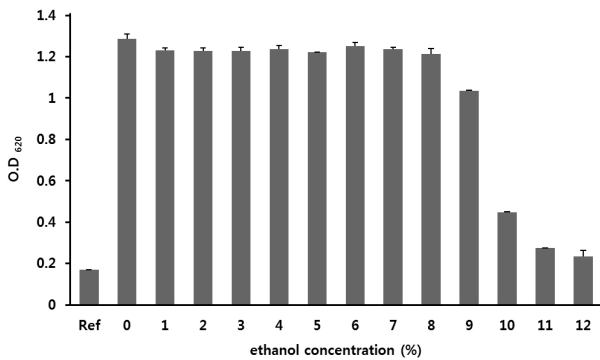


Fig. 2. Growth of *L. brevis* JBE 30 in the MRS broth with different concentrations of ethanol. Data represent mean±SD of three replications. Error bars indicate standard error.

소한 반면 pH는 24시간, 48시간, 72시간 배양에서와 같은 4.5를 그대로 유지했다. 총산도가 변함에도 불구하고 pH는 일정하게 유지되었는데 이는 배양 기간 동안 생성되는 주 유기산인 젖산과 초산의 함량 비율의 변화일 수 있다. 젖산과 초산의 pKa 값은 각각 3.86과 4.76으로 젖산에 대한 초산의 함량비가 변할 때 총산도와 pH 간의 차이가 생긴다. 한편 8% 에탄올 농도에서 24시간 배양 후 생균수, 총산도, pH는 각각 4.0×10^8 CFU/ml, 0.32%, 5.8였고, 48시간 배양에서 1.3×10^{10} CFU/ml, 0.67%, pH 4.9, 72시간 배양에서 2.0×10^{10} CFU/ml, 0.88%, 4.5, 96시간 배양에서 1×10^9 CFU/ml, 0.85%, 4.5였다. 72시간 배양 후에는 에탄올이 없는 배지의 pH와 같은 4.5에 도달된 후 96시간 배양 때까지 그대로 유지하였는데, 이는 72시간 배양 후 최종 pH가 3.74로 떨어진 *L. casei* 균주의 산 생성능과 비교되었다(Baek et al., 2012). 또한 배양 72시간까지 총산도는 계속 증가하였으나 24시간 이후에 증가 폭은 더 컸으며 이 경향은 pH 저하에서도 비슷했다. 이러한 결과는 8% 에탄올 함유 배양액에서 JBE 30의 생육 속도가 느려지기는 했지만 72시간까지 지속적인 증식이 이루어져, 총산도와 pH가 에탄올이 없는 배양액에서와 같은 값에 도달했음을 의미한다. 따라서 이 균주는 약 8%의 에탄올 농도까지 내성을 지닌 유산균으로 보인다. 또한 48시간 만에 효모의 최적 에탄올 생산 pH인 5.3에 가까운 4.9에 도달된 결과를 볼 때, 이 균주는 8% 미만의 에탄올이 생성되는 배양 초기에 효모의 최적 배양 pH가 되게 하여 효모에 의한 에탄올의 빠른 생성과 그 생산량 증가를 유도할 것으로 예상되었다. 반면 10% 에탄올 농도에서 배양 시 24시간까지 생균수가 약간 증가하다 이후 감소되었으며 48시간 이후 산 생성이 거의 정지되어 총산도와 pH는 각각 0.26-0.28, 5.8-5.9 범위를 유지했다. 12% 에탄올 함유 배지에서 총산도 및 pH는 배양 초기 값과 거의 변화가 없었다.

항균활성 측정

전통주에 사용하는 누룩은 자연계에 존재하는 다양한 미생물들이 함께 존재하므로 발효초기 동안 식품 부패균이나 유해균들

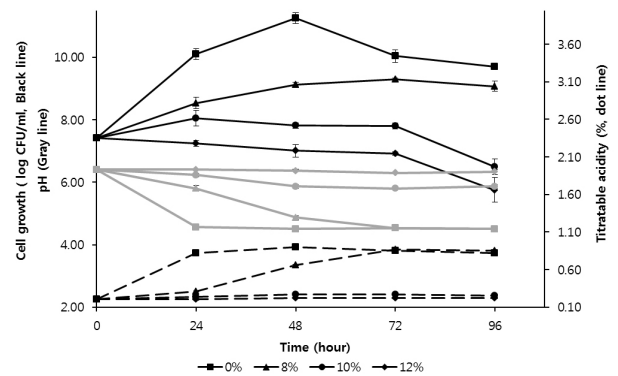


Fig. 3. Growth (Black line), titratable acidity (dot line), and pH (Gray line) of *L. brevis* JBE 30 in the presence of ethanol. *L. brevis* JBE 30 was grown in MRS broth at 30°C. (■) without ethanol; (▲) 8% ethanol; (●) 10% ethanol; (◆) 12% ethanol. Experiments were performed in triplicate, figure represent mean±SD, and Error bars indicate standard deviation (SD).

Table 2. Antibacterial spectra of the culture supernatants from *L. brevis* JBE 30 by using paper disc diffusion assay. Data represent mean±SD of two replications

Test strain	Relative inhibition zone ¹⁾
<i>Bacillus cereus</i> KACC 10004 (ATCC 27348)	1.47±0.06 ^{bc}
<i>Bacillus cereus</i> KACC 10097 (ATCC 11778)	1.47±0.60 ^{bc}
<i>Bacillus cereus</i> KACC 11240 (ATCC 14579)	1.55±0.54 ^{bc}
<i>Bacillus cereus</i> KACC 13064	1.39±0.35 ^c
<i>Bacillus cereus</i> KACC 13066	1.50±0.27 ^{bc}
<i>Bacillus cereus</i> KACC 13752	1.65±0.04 ^{bc}
<i>Enterococcus faecalis</i> KACC 11304 (ATCC 35038)	1±0 ^d
<i>Escherichia coli</i> KACC 13821 (ATCC 11775)	1.65±0.31 ^{bc}
<i>Micrococcus luteus</i> KACC 13377	1.66±0.2 ^{bc}
<i>Listeria monocytogenes</i> KACC 10764 (ATCC 15313)	2.2±0.07 ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KACC 10259 (ATCC 10145)	1.6±0.13 ^{bc}
<i>Staphylococcus aureus</i> KACC 10778	1.5±0.61 ^{bc}

¹⁾ Halo diameter (mm)/paper disc diameter (mm)

^{a-d} Value with different superscript letter within the same row are significantly different by Tukey's range test ($p < 0.05$).

의 증식 가능성이 상존한다. 유산균에 속하는 균들은 유기산, hydrogen peroxide, bacteriocin 등의 다양한 물질들을 합성하여 항균작용을 나타내는 것으로 알려져 있다(Lindgren and Dobrogosz, 1990). JBE 30이 유해균 증식억제에 적합한 균주인지 확인하기 위해 항균활성을 paper disc diffusion assay를 이용하여 측정하였다(Table 2).

12종의 유해균주에 대한 항균 활성을 확인한 결과 *Enterococcus* 를 제외한 11종의 유해균주에 대한 항균활성을 확인할 수 있었고 이들 중 *Listeria* 균주에 대해 가장 높은 항균활성을 가졌다. 한편, JBE 30 균의 배양액을 pH 6.0으로 조절한 뒤 원심 분리하여 얻은 상등액을 처리했을 때 유해균에 대해 항균력은 없거나 미미한 수준이었다. 이 결과들은 생산된 항균 물질이 중성 pH에서 항균 활성을 가지지만 산성에서 활성을 잃든지(Baek *et al.*, 2012), 또는 유기산 생성으로 인한 pH 저하 때문(Kim and Lee, 2013)일 수도 있다. JBE 30 균주가 유기산을 생성하며 내산성이 갖는 *Enterococcus* 균주에 대해서만 항균 활성을 갖지 못한 특징을 볼 때, 유기산 생성으로 인한 pH의 변화가 JBE 30 균주의 항균 활성의 한 요인일 것으로 추정되었다. JBE 30 균주의 유해균들에 대한 넓은 항균 범위는 누룩에서 유래된 비발효성 유해세균들을 감소시킬 수 있으므로, 발효 동안 이들 균에 의한 부패를 억제하는데 효과적인 것으로 보인다.

적요

전통주 양조에 적합한 종균 선발의 일환으로 에탄올 저항성 및 산 생성능이 낮은 한 유산균주를 전통 메주에서 분리하였고, 생화학적 동정 및 16S rRNA 유전자 염기 서열의 분석 결과 유산균인 *Lactobacillus brevis*로 동정되었다. 8% (v/v) 에탄올을 농도 별로 첨가한 MRS 배지에 이 균주를 30°C, 96시간 배양한 결과 잘 생육하였으며, 배양 후 최종 pH는 4.5까지 감소하였다. 이 균주는 또한 식품 부패 및 병원성 균들인 *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Micrococcus luteus, *Pseudomonas aeruginosa*에 대해 증식 억제능을 나타냈다. 이 결과들로부터 *L. brevis* JBE 30은 전통주 양조에 적합한 종균으로 사용 될 수 있음을 보였다.

감사의 말

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업[세부과제명: 증류주 제조에 적합한 종균 선발(효모, 유산균) 및 제조기술 개발, 세부과제 번호: PJ00999004]의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

Bae, K.H., Shin, K.S., Rye, H.Y., Kwon, C.S., and Sohn, H.Y. 2007. Identification and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from the fermentation broth of Korean traditional liquor, Andong-Soju. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 310-315.

Baek, H., Choi, M.S., and Oh, K.H. 2012. Characterization and antibacterial activity of *Lactobacillus casei* HK-9 isolated from Korean rice wine, Makgeolli. *KSBB J.* **27**, 161-166.

de Revel, G., Martin, N., Pripis-Nicolau, L., Lonvaud-Funel, A., and Bertrand, A. 1999. Contribution to the knowledge of malolactic fermentation influence on wine aroma. *J. Agri. Food Chem.* **47**, 4003-4008.

Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 175-188.

Herich, R. and Levkut, M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med. Czech.* **47**, 169-180.

Jang, D., Park, S., Lee, H., Pyo, S., and Lee, H.S. 2013. Isolation of the alcohol-tolerant lactic acid bacteria *Pediococcus acidilactici* K3 and S1 and their physiological characterization. *Kor. J. Food Preserv.* **41**, 442-448.

Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**, 209-224.

Kim, H.R. and Lee, J.H. 2013. Selection of acid-tolerant and hetero-fermentative lactic acid bacteria producing non-proteinaceous anti-bacterial substances for Kimchi fermentation. *Kor. J. Microbiol.*

- Biotechnol.* **41**, 119–127.
- Kim, I.H. and Park, W.S.** 1996. Comparison of fermentation characteristics of Korean traditional alcoholic beverage with different input step and treatment of rice and *Nuruk* (Korean-style bran Koji). *Kor. J. Diet. Cul.* **1**, 39–348.
- Lee, J.H. and Yu, T.S.** 2000. Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Nuruk*. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 359–365.
- Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J.** 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**, 149–164.
- Masood, M.I., Qadir, M.I., and Shirazi, J.H.** 2011. Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings. *Crit. Rev. Microbiol.* **37**, 91–98.
- Narendranath, N.V. and Power, R.** 2005. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 2239–2243.
- Narendranath, N.V., Thomas, K.C., and Ingledew, W.M.** 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 171–177.
- Park, C.D., Jung, H.K., Park, H.H., and Hong, J.H.** 2007. Identification and fermentation characteristics of lactic acid bacteria isolated from *Hahyangju Nuruk*. *Kor. J. Food Preserv.* **14**, 188–193.
- Park, S.H., Lee, S.L., and Jin, H.S.** 2012. Isolation and identification of acid-forming bacteria from a fresh wheat *Makgeolli* in Jeonju. *Kor. J. Food. Nutr.* **25**, 951–956.
- Seo, M.Y., Lee, J.K., Ahn, B.H., and Cha, S.K.** 2005. The changes of microflora during the fermentation of *Takju* and *Yakju*. *Kor. J. Food. Sci. Technol.* **37**, 61–66.
- Shafaghat, H., Najafpour, G.D., Rezaei, S.P., and Sharifzadeh, M.** 2010. Optimal growth of *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860) on pretreated molasses for ethanol production: Application of response surface methodology. *Chem. Ind. Chem. Eng. Quar.* **16**, 199–206.
- Tamura, K. and Nei, M.** 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* **10**, 512–526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S.** 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **28**, 2731–2739.
- Thomas, K.C., Hynes, S.H., and Ingledew, W.M.** 2002. Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 1616–1623.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J.** 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Yu, J.H., Jin, H.S., and Back, Y.J.** 1991. Lactic fermentation of soymilk by mixed culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Saccharomyces uvarum*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 413–418.
- Yu, T.S., Kim, H.S., Hong, J., Ha, H.O., Kim, T.Y., and Yoon, I.W.** 1996. Bibliographical study on microorganisms of *Nuruk* (Until 1945). *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **25**, 170–179.
- Zhang, Z., Schwarz, S., Wagner, L., and Miller, W.** 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* **7**, 203–214.