



## 막걸리의 Synbiotics 기능성 발효를 위한 유산균 선발 및 이의 적용

이애란 · 김혜련 · 김재호 · 안병학 · 이장은\*

한국식품연구원 우리술연구센터

### Isolation of Lactic Acid Bacteria and Its Application for Synbiotics Makgeolli Fermentation

Ae Ran Lee, Hye Ryun Kim, Jae-Ho Kim, Byung-Hak Ahn, and Jang-Eun Lee\*

Korean alcoholic beverages research center, Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea

**Abstract:** Makgeolli, also known as Takju, contains various non-filtered floating matters such as carbohydrate, protein and whole microorganism cell compounds which cause high synbiotics functionality. In the present study, we have developed lactic acid bacteria (LAB) and the fermentation process to improve synbiotics functionality to Makgeolli. We isolated LAB from commercial Makgeolli products and they were identified as 5 kinds of the following strains: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* and *Pediococcus acidilactici*. Among the 5 strains, we finally selected the *Lactobacillus plantarum* JS1 (KFCC11566P) as a probiotics for synbiotic Makgeolli through the fermentation characteristics, pH level resistances and bile salt resistance tests. Also, we established the Makgeolli fermentation processing to increase *L. plantarum* JS1 with other abnormal symptoms during the fermentation period. The optimal processing conditions were inoculation of the *L. plantarum* JS1 during the first processing stage at the 0.012% rate of rice, together with koji and non-steamed rice at 25°C of fermentation temperature. Therefore, this result can be applied to increase the synbiotics functionality of Makgeolli, through the use of *L. plantarum* JS1 (KFCC11566P) and its optimal fermentation processing.

**Keywords:** makgeolli, lactic acid bacteria, synbiotics

## 서 론

막걸리는 곡류와 누룩을 사용하여 병행발효로 제조한 전통주로서, 발효 후 술덧을 걸러 외관이 백탁이며, 감미, 산미, 신미, 고미, 산미가 고르게 조화된 알코올 함량 6~8%의 전통술이다. 특히 막걸리는 술덧의 원료인 부유물, 즉 발효산물 전체가 여과되지 않은 상태로 최종제품에 함유되어 있어 발효 후 맑게 여과된 약주나 청주보다 높은 건강기능성을 갖는다고 알려져 있다(Lee *et al.*, 2011b; Kim *et al.*, 2012b; Kim *et al.*, 2013). 이러한 막걸리의 부유물질은 미생물 균체인 효모와 유산균을 포함하여 원료 및 발효산물 유래의 전분다당체, 올리고당, 유기산, 펩타이드 등과 각

종 유용 생리활성 물질을 포함하고 있다(Lee *et al.*, 2011a).

최근 막걸리는 알코올 도수가 낮고, 유산균 · 식이섬유 등의 영양학적 측면에서 매우 우수하여 소비자들에게 좋은 반응을 얻고 있으며(Mozzi *et al.*, 2012), 막걸리의 기능성이 최근 규명되기 시작하면서 국내뿐만 아니라 일본, 중국 등 해외에서도 크게 인기를 끌어 수출이 급격히 증가되고 있다. 그러나 현재까지 막걸리에 대한 연구는 영양학적 가치 측면에서 단편적으로 진행되어 왔고 국가 주도의 체계적인 연구는 전무한 실정으로 최근 막걸리 관심도가 높은 것에 비하여 아직 연구량과 기술의 축적은 대단히 부족한 실정이다. 따라서 최근 막걸리 열풍에 합당한 양조미생물, 양조용 원료, 품질, 위생, 제조공정의 표준화, 우수성 구명 등에 관한 폭넓은 연구가 요구된다.

유산균을 이용한 probiotics 기능성 향상은 이미 많은 문헌과 연구에서 입증되었고 이를 활용한 식품분야가 점점 확대되고 있다(Leroy and De Vuyst, 2004; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010). 특히 최근에는 장내에서의 probiotics와 prebiotics 기능을 조합한 synbiotics 기능이 주목 받으면서 발효유, 치즈, 건강음료, 소스, 건강기능식

\*Corresponding author: Jang-Eun Lee, Korean Alcoholic Beverages Research Center, Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea.

Tel: 82-31-780-9367, Fax: 82-31-709-9876

E-mail: jelee@kfri.re.kr

Received December 20, 2013; Revised January 13, 2014;

Accepted January 16, 2014

품 등의 다양한 형태로 제조되어 synbiotics 시장이 크게 성장하고 있다(Nagpal *et al.*, 2012). 유산균은 그 자체로 probiotics 기능을 하면서, 동시에 대장에서 prebiotics의 역할인 장내 미생물의 제한과 유용미생물의 생육을 개선함으로써 synbiotics 기능을 하는 대표적인 synbiotics 균주이다(Suskovic *et al.*, 2001; Kolida and Gibson 2010). 이러한 유산균을 식품으로 섭취할 수 있는 대표적 식품은 장류, 젓갈, 김치, 발효유 등 여러 가지가 있으나 synbiotics 식품의 장점인 이미 효능이 알려진 개량된 probiotics를 이용할 수 있다는 점을 이용하여, 많은 probiotics를 함유하고 있는 유가공 식품이 synbiotics 시장에서 크게 성장하였고 상당부분을 차지하고 있다. 최근 synbiotics 시장은 음료, 건강기능식품까지 점차 그 영역을 넓혀가고 있는 가운데, 주류에서는 젖산균과 원료유래 부유물질을 동시에 함유하는 막걸리가 강한 synbiotics 기능을 나타낼 수 있는 제품으로 꼽히고 있다. 이미 막걸리의 기능성은 항염증(Bae *et al.*, 2011), 혈당개선(Lee *et al.*, 2009), 혈행 및 지질개선(Shin *et al.*, 2010) 등을 비롯한 기타 많은 연구(Lee and Shin, 2011)로 건강성이 입증되고 있으나, 유산균을 포함한 막걸리의 synbiotics에 대해 연구한 사례는 아직 없다.

따라서 본 연구에서는 막걸리의 synbiotics 기능성을 향상시키기 위하여 유산균을 선별하고 이를 이용한 막걸리 최적 발효공정을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 유산균과 발효공정은 기존 막걸리의 synbiotics 기능을 더욱 향상시켜 막걸리 산업의 부가가치를 증가시킬 수 있을 것이다.

## 재료 및 방법

### 유산균 분리 및 동정

국내 시판되고 있는 막걸리 중 전분질 원료 이외의 부재료가 첨가되지 않은 막걸리 15종을 구입하여 유산균을 분리 및 동정하였다. 수집된 막걸리 중 발효제로 입국을 사용한 막걸리가 7종, 입국과 누룩을 사용한 막걸리가 7종, 개량누룩을 사용한 막걸리가 1종 이었고 막걸리의 원료는 백미가 대부분이었으며, 일부 찹쌀, 밀, 소맥분을 병행사용하였다. 유산균 분리를 위해 amphotericin B(sigma)가 함유된 MRS 한천배지를 사용하였으며, 준비된 시료를 희석하여 도말한 후 35°C에서 36시간 배양하여 single colony를 분리하였다. 분리한 유산균의 동정은 16s rDNA sequencing 방법을 이용하여 실시하였다. 회수한 샘플을 균일하게 혼합하여 1 mL을 취한 후 saline 용액에 단계 희석하여 배양한 후 순수분리가 확인된 균주 각각의 whole genomic DNA를 분리한 후 PCR을 이용하여 증폭하였다. primer는 518F(CCAGCAGCCGCGGTAATACG)와 800R(TACCAGGGTATCTAATCC)을 이용하여 증폭하였고, PCR조건은 95°C에서 5분 예비가열 후, 94°C에서 45초 변성, 55°C에서 1분 재결합, 72°C에서 1분 중합반응의 과정을 35회 반복하고 마지

막 72°C에서 10분간 처리하였다. PCR product의 분석은 ABI 3730XL sequencing 기계를 이용하였다. 분석이 된 염기서열을 BioEdit 프로그램을 이용하여 alignment시킨 후 그 결과를 NCBI의 data base와 비교하여 동정하였다.

### 유산균 선별을 위한 탁주 제조

막걸리의 담금은 병행복발효로 실시하였다. 담금용 백미는 철원 오대쌀을 구입하여 사용하였고, 효모는 건조효모(*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용하였다. 1단 담금은 증자미(고두밥), 누룩, 효모, 양조용수를 넣은 뒤 각각의 유산균을 접종하여 발효시켰고, 2단 담금을 위해 증자미와 양조용수를 첨가하였다. 급수율은 160%이며 25°C에서 9일간 발효시켰다.

### 성분 분석

pH는 pH meter(D-50, HORIBA, Japan)를 사용하여 측정하였고, 산도는 시료 10 mL에 0.1% phenolphthalein을 지시약으로 하여 0.1 N NaOH 용액으로 적정하고 소비된 용액의 양을 acetic acid로 환산하여 표시하였다. 당도는 당도계(Pocket PAL1, ATAGO, Japan)를 이용하여 측정하였다.

### 관능검사

기호도는 10명을 대상으로 외관, 향, 맛 그리고 전체적인 기호도 총 5항목에 대하여 9 point likert scale(1점: 매우 싫음, 5점: 보통, 9점: 매우 좋음)로 실시하였다.

### 내산성 및 내담즙성 실험

선발된 유산균의 내산성은 Clark 등(1993)의 방법을 변형하여 측정하였다. 1 N의 HCl을 *Latobacillus* MRS broth에 pH가 각각 2.0, 3.0, 4.0 그리고 6.5가 되게 첨가하여 준비하고 35°C에서 24시간 배양한 균주를 1% 접종하여 5시간 배양하면서 2시간 간격으로 샘플링한 후 MRS한천 배지에 도말하여 배양한 후 균체수를 계수하였다.

내담즙성 실험은 0, 0.1, 0.3, 0.5%의 bile salt(Sigma, USA)가 첨가된 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer(pH 7.0)에 35°C에서 24시간 배양한 균주를 1% 접종하여 5시간 배양하면서 2시간 간격으로 샘플링한 후 pH내성과 동일한 방법으로 균의 생존율을 조사하였다.

### 막걸리 공정개발을 위한 담금설정

Synbiotics 기능성이 증진된 막걸리 제조공정을 확립하기 위하여 국종류, 원료전처리, 발효온도를 달리하여 4가지(누룩+증자한 쌀, 누룩+무증자 쌀, 입국+증자한 쌀, 입국+무증자 쌀)담금 유형을 설정하였으며, 담금별 발효 온도 조건은 23, 25, 28°C로 하여 각 2반복으로 진행하였다. 막걸리 공정개발을 위한 담금용 백미는 철원 오대쌀을 구입하여 사용하였고, 효모는 실험실에서 분리한 Y271-2(*S. cerevisiae*)

를 이용하였으며, 누룩은 진주곡자(당화력 300sp), 입국은 조은곡식(당화력 60sp), 조효소제는 한국효소(당화력 1800sp)에서 구입하여 사용하였다.

1단 담금은 누룩과 증자한 쌀을 이용한 막걸리의 경우 증자미(고두밥) 350 g과 누룩을 122.5 g을 첨가하였고, 누룩과 무증자쌀을 이용한 막걸리는 물에 불린 쌀 350 g을 곱게 간 후 누룩 122.5 g과 조효소제 20.4 g을 첨가하였으며, 입국을 주원료로 만든 막걸리는 입국 350 g 첨가하였다. 급수율은 쌀량의 200%였으며 효모는 쌀량의 0.06%를 접종하였고 유산균은 *L. plantarum* JS1을 MRS액체 배지에 배양한 후 원심분리하여 회수한 pellet을 쌀량의 0.012% 접종하였다. 각각을 혼합하여 25°C에서 2일간 발효시킨 후 2단 담금하였다. 2단 담금은 누룩과 증자한 쌀을 이용한 막걸리의 경우 증자미(고두밥) 700 g 첨가하였고, 누룩과 무증자쌀을 이용한 막걸리는 물에 불린 쌀 700 g을 곱게 간 후 첨가하였으며, 입국과 증자한 쌀로 만든 막걸리는 입국 312.5 g과 증자미(고두밥) 387.5 g 첨가하였으며, 입국과 무증자쌀을 이용한 막걸리는 입국 312.5 g과 물에 불려 곱게 간 쌀 700 g, 조효소 7.5 g을 첨가하였다. 급수율은 쌀량의 200%였으며 각각을 혼합하여 25°C에서 5일간 발효시키면서 유산균의 생육을 조사하였다.

#### 발효 중 유산균의 측정

막걸리 발효 중 유산균수의 측정은 채취한 시료를 멸균 회석액(0.85% NaCl)으로 10진 회석법에 따라 회석한 후 chloramphenicol 0.025%와 bromocresol purple 0.02%가 첨가된 MRS 고체배지에 35°C에서 36시간 배양한 후 생성된 노란색의 colony를 계수하였다.

### 결과 및 고찰

#### 막걸리로부터 유산균의 분리 동정

시중에서 유통되고 있는 10종의 막걸리로부터 유산균을 분리한 후 동정한 결과, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*와 *Pediococcus acidilactici*의 5종의 유산균으로 확인되었다. Kwon 등(2012)은 막걸리에서 PCR-DGGE에 의한 세균 다양성을 조사한 결과 5종의 *Lactobacillus*속, 4종의 *Pediococcus*속, 그리고 12종의 *Enterobacteriaceae*과의 유산균을 검

출하였다(data not shown). 그 외 Kim 등(2012a)이 보고한 시판막걸리에서 분리, 동정한 *Lactobacillus* 6종, Jin 등(2008)이 막걸리에서 보고된 *Lactobacillus* 7종으로 미루어 막걸리에는 *Lactobacillus*속과 *Pediococcus*속이 우점 유산균인 것으로 사료된다.

#### 분리된 유산균을 접종한 막걸리의 발효특성

발효과정 중 *Lactobacillus paracasei*와 *Pediococcus acidilactici*를 접종한 막걸리는 4.0 이상의 대조구보다 높은 pH value를 가졌으나, *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. casei*를 접종한 막걸리는 3.5 수준의 낮은 pH value를 보였다. 반면 총산도는 각 균주 간 큰 차이가 있어 *L. brevis*, *L. casei*, *L. plantarum* 순으로 높았고, *P. acidilactici*와 *L. brevis*는 대조구와 비슷한 값을 보였다(Table 1). 각 유산균 접종군별로 다소 차이는 있었으나 분리된 5종의 유산균을 접종한 막걸리는 발효과정 중 정상범위의 pH, 총산도, 알코올 생성을 나타내 특이사항을 보이지 않는 정상발효범위의 발효과정을 거쳤다.

#### 유산균을 접종하여 발효시킨 막걸리의 관능검사

유산균을 접종하여 제조한 막걸리의 관능검사 결과 맛 기호도와 전체적 품질 기호도에서 각 그룹 간 유의적인 차이가 나타났다(Table 2). *L. casei*, *L. plantarum*, *P. acidilactici*를 접종한 막걸리가 유의적으로 가장 높은 맛 기호도를 보였으며, *L. casei*와 *L. plantarum*를 접종한 막걸리는 다른 균주에 비해 유의적으로 다소 높은 전체적 품질 기호도를 보였다. 따라서 막걸리의 발효특성과 관능특성을 바탕으로 *L. casei*와 *L. plantarum*를 1차 선발하였으며, 각각 *L. casei* JS13와 *L. plantarum* JS1으로 명명하였다.

#### 선발된 유산균의 pH 및 담즙산염 내성

막걸리에는 여과되지 않은 전분, 올리고당, 미생물 균체 등 prebiotics로 이용될 수 있는 물질이 이미 많이 존재하고 있다. 따라서 막걸리의 synbiotics 기능성 향상을 위해 가장 먼저 충족되어야 할 조건은 probiotics 균주의 생존성이다. 유산균이 기능성 probiotics가 되기 위한 필수조건은 pH 3.0 이하의 낮은 pH 조건의 위장을 통과하여 생존해야 하며, 소화효소가 많은 담즙이 존재하는 환경에서 생존해야만 한다(Ko et al. 2013). 따라서 선발된 유산균 *L. planta-*

**Table 1. Chemical composition of Makgeolli (fermented with Nuruk) depending on the different isolated LAB inoculation**

LAB strains	pH	Soluble solids (°Brix)	Total acid (% w/v)	Reducing sugar (g/L)
<i>Lactobacillus casei</i>	3.28	5.1	0.45	6.53
<i>Lactobacillus paracasei</i>	4.39	3.1	0.07	2.76
<i>Lactobacillus plantarum</i>	3.37	4.4	0.41	5.43
<i>Lactobacillus brevis</i>	3.48	7.2	0.54	14.48
<i>Pediococcus acidilactici</i>	4.28	3.1	0.10	2.89
No LAB inoculation	3.96	3.0	0.08	2.57

**Table 2. Organoleptic characteristics of Makgeolli (fermented with Nuruk) depending on the different isolated LAB inoculation<sup>1)</sup>**

LAB strains	Appearance	Flavor	Taste** <sup>2)</sup>	Overall quality* <sup>2)</sup>
<i>Lactobacillus casei</i>	6.7±1.5	4.1±1.6	6.0±0.8 <sup>a</sup>	4.7±1.7 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5.9±0.9	2.6±1.8	4.9±1.2 <sup>ab</sup>	3.1±1.8 <sup>b</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6.6±1.3	4.0±1.2	5.4±0.8 <sup>a</sup>	4.1±1.1 <sup>ab</sup>
<i>Lactobacillus brevis</i>	6.6±1.3	3.7±2.3	3.9±0.7 <sup>b</sup>	3.3±1.7 <sup>b</sup>
<i>Pediococcus acidilactici</i>	5.9±1.2	2.7±1.4	5.0±1.0 <sup>a</sup>	3.0±0.8 <sup>b</sup>
No LAB inoculation	6.0±1.4	5.0±1.6	5.7±1.3 <sup>a</sup>	5.1±1.7 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Means±S.D. (n=7)<sup>2)</sup>Values with different superscripts are significantly different by Duncan's multiple ranges test at \*\**p*<0.01 and \**p*<0.05.**Table 3. Acid tolerance of different isolated LAB**

Lactic acid bacteria	pH	Incubation time (hours)		
		1	3	5
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	2	5.0×10 <sup>4</sup>	ND <sup>1)</sup>	ND
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		ND	ND	ND
KCTC3104 <sup>2)</sup>		ND	ND	ND
KCTC3545 <sup>3)</sup>		ND	ND	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	3	2.0×10 <sup>7</sup>	8.4×10 <sup>6</sup>	7.6×10 <sup>4</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		2.7×10 <sup>6</sup>	1.3×10 <sup>6</sup>	2.6×10 <sup>3</sup>
KCTC3104		2.0×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>6</sup>	3.4×10 <sup>4</sup>
KCTC3545		8.0×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>	1.4×10 <sup>4</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	4	6.2×10 <sup>7</sup>	2.5×10 <sup>7</sup>	7.8×10 <sup>5</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		8.1×10 <sup>6</sup>	1.7×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>5</sup>
KCTC3104		2.3×10 <sup>7</sup>	1.4×10 <sup>7</sup>	4.4×10 <sup>5</sup>
KCTC3545		1.9×10 <sup>7</sup>	6.3×10 <sup>6</sup>	5.0×10 <sup>5</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	6.5	1.9×10 <sup>7</sup>	2.2×10 <sup>9</sup>	2.6×10 <sup>9</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		1.2×10 <sup>7</sup>	2.3×10 <sup>9</sup>	2.0×10 <sup>9</sup>
KCTC3104		4.9×10 <sup>7</sup>	2.2×10 <sup>9</sup>	2.3×10 <sup>9</sup>
KCTC3545		4.4×10 <sup>7</sup>	2.1×10 <sup>9</sup>	2.8×10 <sup>9</sup>

<sup>1)</sup>Not detected.<sup>2)</sup>*Lactobacillus plantarum* sp.<sup>3)</sup>*Lactobacillus helveticus***Table 4. Bile tolerance of different isolated LAB<sup>1)</sup>**

Lactic acid bacteria	Bile salt (%)	Incubation time (hours)		
		1	3	5
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	0	1.9×10 <sup>6</sup>	1.6×10 <sup>6</sup>	3.6×10 <sup>5</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		2.4×10 <sup>6</sup>	1.9×10 <sup>6</sup>	1.5×10 <sup>6</sup>
KCTC3104 <sup>3)</sup>		2.8×10 <sup>6</sup>	2.2×10 <sup>6</sup>	1.1×10 <sup>6</sup>
KCTC3545 <sup>4)</sup>		2.6×10 <sup>6</sup>	8.1×10 <sup>5</sup>	1.4×10 <sup>6</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	0.1	1.5×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>3</sup>	2.9×10 <sup>3</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		1.7×10 <sup>4</sup>	3.6×10 <sup>3</sup>	ND <sup>2)</sup>
KCTC3104		1.2×10 <sup>4</sup>	4.0×10 <sup>3</sup>	3.3×10 <sup>3</sup>
KCTC3545		2.7×10 <sup>4</sup>	3.7×10 <sup>3</sup>	3.3×10 <sup>3</sup>
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	0.3	1.1×10 <sup>2</sup>	3.7×10 <sup>1</sup>	1.3×10 <sup>1</sup>
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		1.6×10 <sup>2</sup>	ND	ND
KCTC3104		3.4×10 <sup>3</sup>	1.3×10 <sup>2</sup>	1.0×10 <sup>2</sup>
KCTC3545		4.2×10 <sup>3</sup>	3.7×10 <sup>1</sup>	ND
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1	0.5	1.1×10 <sup>2</sup>	ND	ND
<i>Lactobacillus casei</i> JS13		7.3×10 <sup>1</sup>	ND	ND
KCTC3104		1.0×10 <sup>2</sup>	ND <sup>a</sup>	ND
KCTC3545		7.7×10 <sup>1</sup>	2.3×10 <sup>1</sup>	ND

<sup>1)</sup>Different isolated LAB was incubated in 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer (pH 7.0) containing at 35°C for 5 hr.<sup>2)</sup>Not detected.<sup>3)</sup>*Lactobacillus plantarum* sp.<sup>4)</sup>*Lactobacillus helveticus*

*rum* JS1과 *L. casei* JS13의 내산성과 담즙산 내성도를 조사하였고 결과는 Table 3, 4와 같다. 아울러 선발된 유산균의 내성을 상대적으로 비교하기 위하여 KCTC(Korean Collection for Type Culture)에서 분양 받은 KCTC 3104(*L. plantarum*)와 KCT C3545(*L. helveticus*)를 함께 조사하였다. 대조구로 사용된 pH 6.5로 보정한 배지에서 1시간 배양 시 각 균주의 생균수는  $10^7 \sim 10^8$  CFU/mL이었고 5시간 배양 시 배양 초기와 비교하여 약 1.5~7.3% 증가하였다. 반면, pH를 4.0, 3.0 및 2.0으로 보정한 배지에서는 배양시간이 경과함에 따라 생균수가 감소하였으며, 특히 pH 2.0에서 1시간 배양했을 때 *L. plantarum* JS1을 제외한 나머지 균주들은 대조구와 비교해 약 99% 사멸하였다. *L. plantarum* JS1 경우 pH 2.0과 3.0에서 1시간 배양 시 생균수가 각각  $10^4$ ,  $10^7$  CFU/mL을 나타내어 다른 세균주와 비교했을 때 가장 높은 내산성을 가진 것으로 판단하였다(Table 3).

담즙산에 대한 내성을 측정하기 위하여 담즙산을 0~0.5%로 첨가한 배지에서의 생균수를 조사한 결과는 Table 4와 같다. 담즙산을 0.1% 첨가했을 경우 1시간 배양 시 모든 균의 생균수가  $10^4$  CFU/mL 수준이었으나 배양시간의 경과에 따라  $10^3$  CFU/mL로 감소하였고, 특히 *L. casei* JS13의 경우 5시간 배양시 생균수가 99% 감소하는 것으로 나타났다. 담즙산을 0.3% 첨가했을 경우 1시간 배양 시 생균수는  $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL 수준이었으나 배양시간이 경과함에 따라 감소하여 배양 3~5시간 후 *L. casei* JS13와 KCTC3545 (*L. helveticus*)균주의 생균수가 99% 감소하였다. 반면, *L. plantarum* JS1와 *L. plantarum* KCTC 3104균주에서 각각  $10^1$ ,  $10^2$  수준의 생균수를 보였다. Jeon 등(2010)의 보고에 따르면 *L. brevis*의 내담즙성 실험결과 담즙을 첨가하지 않은 대조구와 비교했을 때 배양 15시간 전까지 모든 첨가구에서 생육에 저해를 받았으나, 담즙에 대한 적응기간을 거친 15시간 이후부터는 오히려 대조구보다 생육이 활발하게 일어나며, *Lactobacillus* 균주들은 비교적 담즙산에는 약하나 몇 종류의 균주는 강한 담즙산 내성을 보인다고 보고하였다. 또한 Shin 등(1999)은 내산성을 보인 균주는 십

이지장에서 분비되는 비교적 산성이 강한 담즙에도 역시 내성을 나타내는 특성을 지닌 것으로 보고하였다. 이러한 결과를 바탕으로 낮은 pH와 담즙에 대한 강한 내성을 지닌 균주로 *L. plantarum* JS1을 선발하였다.

#### 막걸리 공정개발을 위한 담금 설정에 따른 유산균의 변화

선발된 *L. plantarum* JS1을 접종하여 담금 설정에 따른 균체량의 변화를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 누룩과 증자한 쌀을 이용하여 제조한 막걸리의 경우 23, 25°C에서 발효시켰을 경우 균체량이 발효 3일차  $10^6$  CFU/mL에서 발효 5일차  $10^{10}$  CFU/mL까지 증가하다 발효 7일차에는  $10^8$  CFU/mL로 감소한 반면, 28°C에서 발효시킨 막걸리의 경우 상대적으로 적은 균체량을 보였으나 발효 5일차  $10^8$  CFU/mL까지 서서히 증가한 후 발효 말까지 유지되었다. 누룩과 증자하지 않은 쌀을 이용하여 발효시킨 막걸리의 경우 23, 28°C에서 발효시켰을 때 발효 3일차  $10^7$  CFU/mL에서 발효 5일차  $10^{10}$  CFU/mL까지 증가하다 발효 말에 감소한 반면, 25°C에서 발효시켰을 경우 발효 5일차  $10^{10} \sim 10^{11}$  CFU/mL까지 증가한 후 발효 7일차  $10^8$  CFU/mL로 감소하였다. 또한 입국과 증자한 쌀을 이용하여 발효시킨 막걸리의 경우 23°C에서 발효시켰을 경우 초기  $10^7$  CFU/mL에서  $10^8$  CFU/mL까지 증가한 후 발효 말까지 유지하였고, 25°C에서 발효시켰을 경우 초기  $10^7$  CFU/mL에서  $10^8$  CFU/mL까지 증가한 후 발효 말  $10^6$  CFU/mL로 급속하게 감소하였다. 입국과 증자하지 않은 쌀을 이용하여 발효시킨 막걸리의 경우 발효 초기  $10^5 \sim 10^6$  CFU/mL로 상대적으로 낮은 수치를 보였으나 발효 5일차  $10^{10} \sim 10^{11}$  CFU/mL로 급속하게 증가하였다. 특히, 25°C에서 발효시켰을 경우 발효 말까지 *L. plantarum* JS1의 균체량을  $10^8 \sim 10^9$  CFU/mL 수준으로 유지하였다.

발효초기 *L. plantarum* JS1을 효모와 함께 접종한 막걸리의 이상발효 여부를 알아보기 위해 발효과정 중 효모의 생육을 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 누룩과 입국을 발효제로 사용하고 증자미로 28°C에서 발효한 막걸리가 발효과

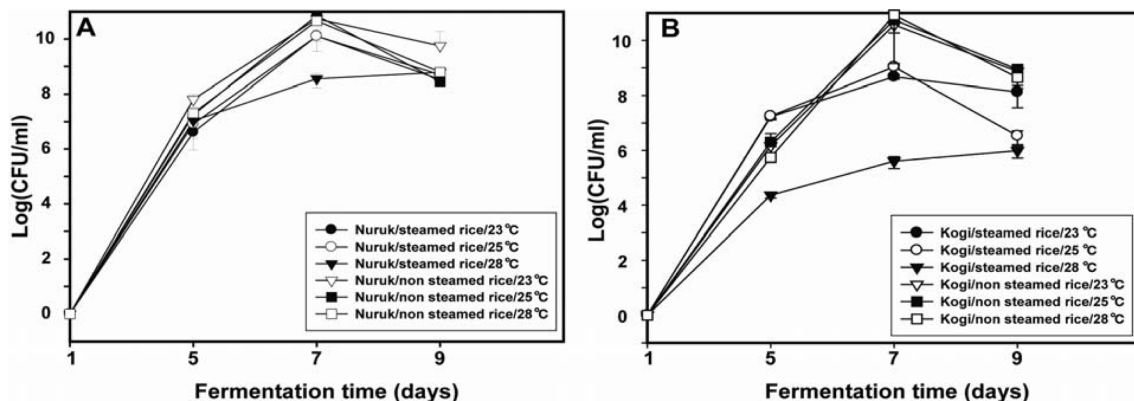


Fig. 1. Viable *Lactobacillus plantarum* JS1 cell number of Makgeolli during fermentation with Nuruk (A) and Koji (B).

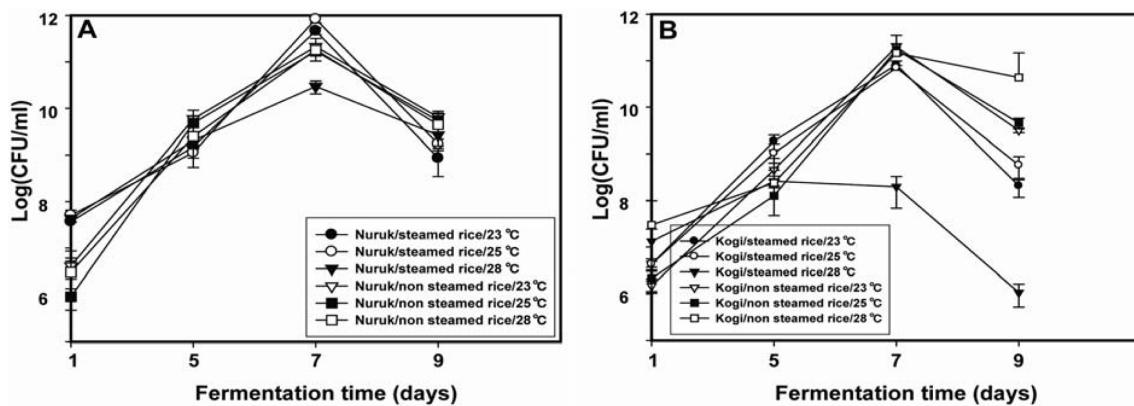


Fig. 2. Viable yeast cell number of Makgeolli during fermentation with Nuruk (A) and Koji (B).

Table 5. Optimal fermentation condition for synbiotics Makgeolli production

Materials	First input	Second input	Calculation
Non steamed rice	-	5.25	-
Koji (60sp, kg)	3.5	1.75	30 sp/g
Water (L)	7	14	200%
Yeast (g)	52.5	-	0.06% of rice weight
<i>Lactobacillus plantarum</i> JS1 (g)	10.5	-	0.012% of rice weight
Fermentation temperature (°C)	25	25	-
Fermentation time (days)	2	7	-

정 중 효모의 생육이 감소하는 경향을 나타낸 것 이외에는 모든 실험구에서 효모의 생육이 정상적으로 유지되었다.

따라서 발효과정 중 효모의 생육을 저해하지 않으면서 (Fig. 2), 이상징후를 보이지 않고 최종 *L. plantarum* JS1의 균체량이 높은 공정, 즉 발효제로 입국을 사용하고 무증자 쌀을 이용, 25°C에서 발효시킨 조건을 막걸리의 synbiotics 기능향상을 위한 최종 공정으로 설정하였다(Table 5).

## 요 약

막걸리의 synbiotics 기능성을 향상시키기 위하여 유산균을 선발하고 이를 이용한 막걸리 최적 발효공정을 개발하였다. 막걸리에서 분리한 유산균은 *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*와 *Pediococcus acidilactici*의 5종의 균주로 확인되었으며, 이들 중 발효특성, pH 내성 및 담즙산염 내성 평가를 통해 막걸리의 probiotics로서 *Lactobacillus plantarum* JS1 (KFCC11566P)를 최종 선발하였다. 또한 최적 발효조건 설정을 위해 누룩과 입국의 발효제 사용여부, 원료의 증자여부, 발효조건 등을 토대로 발효과정 중 효모의 생육을 저해하지 않으면서 이상발효 현상을 보이지 않고 최종 *L. plantarum* JS1의 균체량이 높은 공정을 설정하였다. 최종 개발된 공정은 *L. plantarum* JS1을 쌀의 0.012% 첨가량으로 효모와 동시에 접종하고, 발효제로 입국을 사용하며, 무증자쌀을 이용, 25°C에서 발효시키는 방법으로, 이를

막걸리의 synbiotics 기능향상을 위한 최적 공정으로 설정하였다.

## 감사의 글

본 연구는 한국식품연구원 주요사업(ER136000)에 의해 수행된 연구 결과의 일부로, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Bae SH, Choi JW, Ra KS, Yu KW, Shin KS, Park SS, and Suh HJ (2011) Anti-complementary activity of enzyme-treated traditional Korean rice wine (Makgeolli) hydrolysates. *J. Sci. Food Agric.* **92**, 1756-1770.
- Clack PA, Cotton LN, and Martin JH (1993) Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: II-tolerance to simulated pH of human stomachs. *Cult. Dairy Prod. J.* **28**, 11-14.
- Jeon CP, Kim YH, Lee JB, Jo MS, Shin KS, Choi CS, and Kwon GS (2010) Physiological characteristics and angiotensin converting enzyme inhibitory activity of *Lactobacillus brevis* HLJ59 isolated from salted shrimp. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **46**, 9-14.
- Jin JB, Kim SY, Jin Q, Eom HJ, and Han NS (2008) Diversity analysis of lactic acid bacteria in Takju, Korean rice wine. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1678-1682.
- Kim BK, Kang MS, Jeon MJ, Lee SH, and Kim MH (2013) Effects of makgeolli and makgeolli precipitate on hepatotoxic-

- ity and serum lipid content in rats. *J. Life Sci.* **23**, 282-289.
- Kim HR, Lee AR, Kim JH and Ahn BH (2012a) Microbial dynamics of commercial Makgeolli depending on the storage temperature. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1101-1106.
- Kim YH, Min JH, Kang MG, Kim JH, Ahn BH, Kim HK, and Lee JS (2012b). Physicochemical properties, lactic acid bacteria content and physiological functionalities of Korean commercial Makgeolli. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **40**, 325-332.
- Ko KH, Liu WI, Lee HH, Yin J, and Kim IC (2013). Biological and functional characteristics of lactic acid bacteria in different Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **42**, 1226-3311.
- Kolida S and Gibson GR (2010) Synbiotics in health and disease. *Annual Review* **2**, 373-393.
- Kwon SJ, Ahn TY, and Shon JH (2012) Analysis of microbial diversity in makgeolli fermentation using PCR-DGGE. *J. Life Sci.* **22**, 232-238.
- Lee HS, Yoon KH, Kim JM, and Kim SM (2009) Effect of Korean turbid rice wine (takju) less extract on blood glucose level in db/db mouse. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **23**, 109-113.
- Lee SJ, Kim JH, Jung YW, Park SY, Shin WC, Park CS, Hong SY, and Kim GW (2011a). Composition of organic acids and physiological functionality of commercial makgeolli. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **43**, 206-212.
- Lee SJ and Shin WC (2011b) Physiological functionalities of makgeolli (Korean paradox). *Food Sci. Ind.* **44**, 1-11.
- Leroy F and De Vuyst L (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* **15**, 67-78.
- Mozzi F, Ortiz ME Bleckwedel J, Vuyst LD, and Pescuma M (2012) Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* **54**, 1152-1161.
- Nagpal R, Kumar A, Kumar M, Behare PV, Jain S, and Yadav H (2012) Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *Fems Microbiology Letters* **334**, 1-15.
- Rattanachaikunsopon P and Phumkhachorn P (2010). Lactic acid bacteria: Their antimicrobial compounds and their uses in food production. *Annals of Biological Research* **1**, 218-228.
- Shin MO, Kim MH, and Bae SJ (2010) The effect of makgeolli on blood flow, serum lipid improvement and inhibition of ACE in vitro. *J. Life Sci.* **20**, 710-716.
- Shin MS, Kim HM, Kim GT Huh CS, Bae HS, and Baek YJ (1999). Selection and characteristics of *Lactobacillus acidophilus* isolated from Korean feces. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **37**, 495-501.
- Suskovic J, Kos B, Goreta J, and Matosic S (2001) Role of lactic acid bacteria and bifidobacteria in synbiotic effect. *Food Technol. Biotechnol.* **39**, 227-235.