

韓國 在來式 간장 및 된장에서 分離한 細菌의 特性

權 五 陳 · *金 鍾 奎 · 鄭 永 健

영남대학교 농축산대학 식품가공학과, *영남대학교 농축산대학 응용미생물학과
(1986년 4월 22일 수리)

The Characteristics of Bacteria Isolated from Ordinary Korean Soy Sauce and Soybean Paste

Oh Jin Kwon, *Jong Kyu Kim and Yung Gun Chung

Department of Food Science and Technology and *Department of Applied Microbiology, College of Agriculture and Animal Science, Yeungnam University, Taegu, Korea

Abstract

The bacteria were isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. After isolation, we investigated the bacteria which produces the characteristic flavor of ordinary Korean soy sauce and soybean paste, nothing the aroma, presence of amino acids, and free sugars. The results were obtained as follows.

The bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste were various *Bacillus* species. The isolated bacteria produced characteristic odors: "Meju" odor, the characteristic saline odor of ordinary Korean soy sauce or ordinary Korean soybean paste odor, and enzymes: protease and amylase. The good characteristic saline odor of ordinary Korean soy sauce was produced by *Bacillus licheniformis*(SSB3). The good odor of ordinary Korean soybean paste was produced by *Bacillus polkmyxa*(SSB4), *Bacillus* species(SPB1), *Bacillus brevis*(SPC2), and *Bacillus licheniformis*(SPC2-1).

서 론

한국 재래식 간장과 된장은 독특한 향과 맛을 가지고 있어 모든 가정에서 담그어 상용하는 발효 식품이다. 이러한 간장과 된장에 대한 연구¹⁻¹³⁾는 많다.

메주와 간장중에 서식하는 세균³⁻⁷⁾은 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. citreus*, *Micrococcus caseolyticus*, *Sarcina maxima*, *Pediococcus acidilactici* 및 *Staphylococcus aureus* 등이고, 사상균은 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*,

Penicillium kaupscinskii, *Mucor abundans* 등이며 효모는 *Rhodotorula flava*, *Torulopsis versatilis*, *Torulopsis dattila*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces acidifaciens* 등이 보고되어 있다. 김등¹⁴⁾은 간장 발효 중에 서식하는 균들 중에서 일종의 *Bacillus* sp.가 된장 향기를 생성하고, *Torulopsis* sp.가 일본 간장향을 생성함을 보고하고 있다. 또 송등¹⁵⁾은 간장 중에 생존하는 *Bacillus* sp.가 생성한 향기가 gas chromatogram과 향기의 관능검사상 재래식 된장향과 비슷하고 *Mucor* sp.의 생성향기는 된장향과 약간 비슷하며 *Penicillium* sp.의 생성향기는 된장향과는 아주 상이함을 보고하고 있

다. 그러나 한국 재래식 간장의 독특한 향기인 잔냄새를 비롯한 간장 및 된장의 향기와 맛의 생성에 어떤 미생물이 관여할 수 있는지에 대해서는 보다 더 자세한 연구가 필요하다. 그래서 저자들은 우선 간장과 된장의 맛에 크게 영향을 미치는¹⁶⁻¹⁷⁾ 아미노산과 유리당을 생성하고, 간장 및 된장의 향기를 생성할 수 있는 균들을 규명하기 위하여 간장 및 된장에서 세균들을 분리하고, 분리균들이 생성한 protease와 amylase의 활성을 조사하고, 생성향기의 芳香을 조사하였다. 이 때 芳香은 많은 향기성분의 조합에 의해 독특한 향을 나타내기 때문에 분리균이 생성한 향기의 냄새는 배양기의 head space의 향기를 관능검사로 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료

재래식 방법에 의해 제조 숙성된 일반 가정의 간장과 된장을 수집하여 세균 분리용 시료로 하였다.

2. 실험방법

1) 세균의 분리 및 동정

세균의 분리는 일반법¹⁸⁾에 따랐으며, 사용배지 조성은 Table 1과 같다. 동정은 Bergey's manual 8판¹⁹⁾에 따랐다.

Table 1. Composition of the medium used for the isolation of bacteria

Beef extract	0.1(%)
Peptone	1.0
Glucose	1.0
NaCl	2.0
Agar	2.0

pH was adjusted in 7.0.

2) 효소역가

효소역가는 향기생성배지 (Table 2)에 균을 접종한 후, 그 배양액을 효소액으로하여 측정하였으며 향기생성배지의 soybean extract는 Fig. 1과 같이 조제하였다.

Protease의 역가는 Uehara 등²⁰⁾의 방법 (Fig. 2)에 따라 측정하였고, amylase의 액화력 (dextrinizing power)과 당화력 (saccharifying power)은

Table 2. Medium composition for flavor producing

Glucose	1.0(%)
Polypepton	0.5
Yeast extract	0.5
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄	0.01
NaCl	2.0
Soybean extract	10.0

pH was adjusted in 7.0

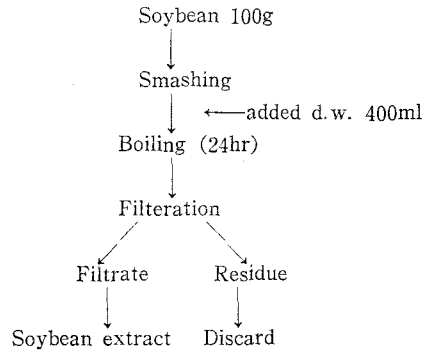


Fig. 1. Preparation of the soybean extract.

Fuwa²¹⁾의 방법 (Fig. 3, Fig. 4)에 준하였다.

3) 향기의 관능검사

분리균이 생성한 향기는 향기생성배지에 균을 접종하여 35°C에서 5, 8, 10, 12, 15일 및 20일간 각각 배양한 후, head space의 향기를 한국공업규격 KSA-7002²²⁾에 따라 혼련시킨 panel 6인으로 관능검사를 시행하였다.

0.6% Casein solution 1ml + Enzyme solution 0.2ml

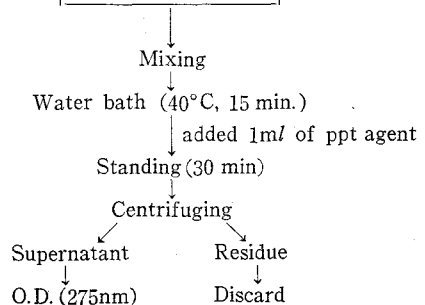


Fig. 2. Measurement of protease activity.

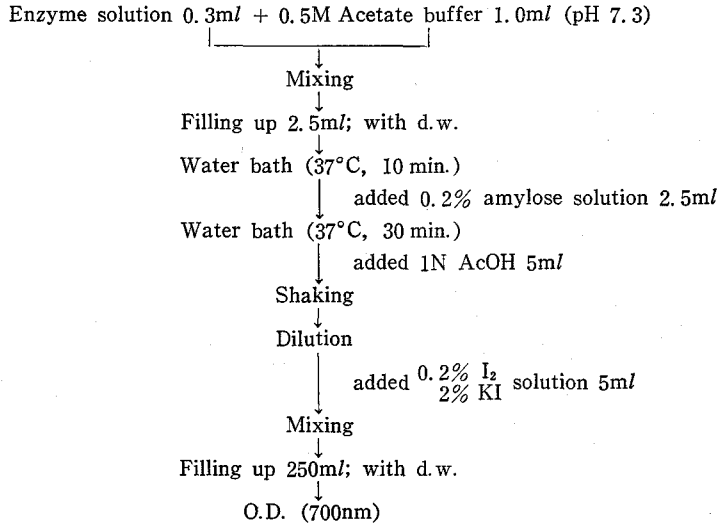


Fig. 3. Measurement of amylase activity. (Dextrinizing power).

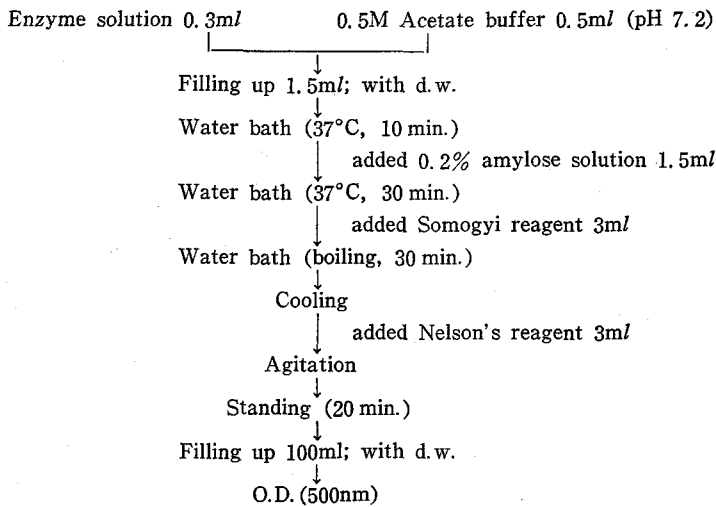


Fig. 4. Measurement of amylase activity. (Saccharifying power).

결과 및 고찰

1. 세균의 분리 및 동정

제래식 간장에서 9주, 된장에서 6주를 각각 분리하였다. 분리된 15균주에 대한 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특징을 조사한 결과는 Table 3과 같다.

SSA₁, SSA₂, SSA₃, SSA₄, SSA₅, SSA₆, SSB₁, SSB₃, SPB₁, SPB₄, SPC₁, SPC₂₋₁ 및 SP₃C는 gram 양성이고, 호기성 간균이며 catalase test에

서 양성이고, spore를 형성하므로 *Bacillus* species 이었다. SSB₄는 gram 음성이며 간균이고, SPC₂는 gram variable이며 간균이었지만 catalase test가 양성이며 spore를 형성하여 *Bacillus* species의 특징과 일치하였다. 분리균들 중 SSA₁, SSB₃와 SPC₂₋₁은 Starch 액화능과 nitrite 반응이 양성이었고, hippurate 반응은 음성이었으며 0.02% azide에 생육하지 않았다. 이는 Bergey's manual¹⁹⁾상의 *B. licheniformis*의 특징과 일치하였다. SSA₂와 SSA₆는 starch 액화능과 nitrite 반응이 음성이고, hippurate 반응은 양성이며 기타의 특징도 B.

Table 3. The characteristics of isolates

Characteristics	Strains															
	SSA 1	SSA 2	SSA 3	SSA 4	SSA 5	SSA 6	SSB 1	SSB 3	SSB 4	SPB 1	SPB 4	SPC 1	SPC 2	SPC 2-1	SPC 3	
Morphological																
Form	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	rod	
Motility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gram strain	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	V	+	+	
SF	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Growth in 2% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
5%	∕	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	
7%	∕	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	
10%	∕	+	+	+	+	+	-	+	-	d	-	+	-	-	d	
Cultural																
0°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
3°C	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	d	+	-	-	
0.02% Azide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Physiological																
SD	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
SH	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	d	+	
CH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
NP	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	d	+	+	
IP	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	
Gas from glucose	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Gas from mannitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
Acid from glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	
Acid from mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
EY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
CU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
PT	-	d	d	-	d	d	+	-	-	-	+	-	-	-	-	
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
HH	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Note: SF: Spore Formation, SD: Sabour and Dextrose agar, SH: Starch Hydrolysis, CH: Casein Hydrolysis, NP: Nitrate Production, IP: Indol Production, EY: Egg Yolk reaction, CU: Citrate Utilization, PT: Phenylalanine Test, VP: Voges-Proskauer test, VP*: Production of alkaline reaction in V-P broth
 +: Positive for 90~100% of strains, -: Negative for 90~100% of strains, V: Character inconstant in one strain, d: Reactions differ, positive for 11~89% of strains

*pumilus*와 일치하였다. SSB₁과 SPB₄는 starch 액화능과 nitrite 반응이 양성이고, 10% NaCl 함유배지에서는 자라지 않았으며 그 외의 생리학적 특징이 *B. subtilis*와 일치하였다. SSB₄는 starch 액화능이 있었으며 3°C에서는 생육하였으나, 5% NaCl 함유배지에서는 생육하지 않아 *B. polymyxa*의 특징과 일치하였다. SPC₂는 starch 액화능이 음성이므로, 5% NaCl 함유배지에 생육하지 않았으나, 3°C에서는 생육하였으며 glucose가 함유된 배지에서

gas를 생성하지 않아 *B. brevis*의 특징과 일치하였다. SSA₃, SPB₁ 및 SPC₃는 형태 및 배양학적 특징이 Bergey's manual⁽¹⁹⁾ 상의 *B. licheniformis*와 일치하였으나, SSA₃는 glucose가 함유된 배지에서 gas가 소량 생성되었고, phenylalanine test에서 약한 양성이 나타났으며 SPB₁과 SPC₃는 10% NaCl 함유 배지에서 생육이 다소 억제된 점이 *B. licheniformis*와 다른 점이다. SSA₄와 SPC₁은 phenylalanine test에서 음성을 나타내었고, SPC₁

은 3°C에서 다소 성장한 점이 *B. pumilus*와 달랐다. 그리고 SSA₅는 전반적으로 *B. subtilis*와 일치하지만, 10% NaCl 함유 배지에서 생육하였고, phenylalanine test에서 약한 양성을 나타낸 점이 *B. subtilis*와 다른 점이다.

2. 효소역가

분리균들이 생성한 protease의 역가는 Table 4와 같다. protease의 생성력은 모든 분리균들이 다소 차이를 나타내었다. 효소생성 배지의 조성은 다르지만 동일방법²⁰⁾으로 역가를 측정했을 때 *B. natto* IAM이 생성한 protease는 64,900 unit이고, *B. subtilis* 6,160이 생성한 protease는 2,400unit로 나타났다. 모든 분리균들은 *B. natto* IAM이 생성한 protease보다는 역가가 낮았다. *B. subtilis*인 SPB₄의 경우 *B. subtilis* 6,160보다 생성 protease의 역가가 높게 나타났다. *B. polymyxa*인 SSB₄와 *Bacillus* sp.인 SPC₁의 생성 protease는 *B. subtilis* 6,160의 생성 protease보다 역가가 낮았으나, 거의 비슷한 unit를 나타내었고 그 외의 분리균들은 *B. subtilis* 6,160의 경우보다 protease의 역가가 낮았다. 그러나 분리균의 생성 protease의 역가가 낮은 경우라도 배양 25일째까지 상당한 protease의 활성이 지속되어 실제 재래식 간장과 된장에 함유하는

Table 4. Activity of protease in the culture broth

Strains	Fermentation Periods			
	5	10	15	25
SSA1	276	152	764	828
SSA2	828	1,040	1,284	1,208
SSA3	208	633	835	616
SSA4	596	1,132	744	828
SSA5	560	728	1,076	1,652
SSA6	856	984	1,508	1,420
SSB1	720	308	1,212	1,368
SSB3	576	544	356	172
SSB4	36	548	608	1,968
SPB1	64	120	356	776
SPB4	1,892	2,420	3,288	2,152
SPC1	1,872	1,052	1,174	1,668
SPC2	1,152	812	568	536
SPC2-1	311	1,064	852	760
SPC3	608	668	1,592	1,128

아미노산양을 충분히 생성할 수 있을 정도라 사료된다.

amylase의 역가는 Table 5와 같이 모든 분리균들이 amylase를 생성하였다. 재래식 간장 및 된장 중 glucose의 평균 함량^{23,24)}은 각각 1.4mg/ml 및 1.9mg/g인 점을 고려할 때 분리균이 생성한 amylase의 당화력은 간장 및 된장 중에 함유한 glucose를 생성할 수 있는 충분한 능력이 있으리라 추론된다. 그러나 분리균들 중 *B. polymyxa*인 SSB₄, *Bacillus* sp.인 SPB₁ 및 *B. subtilis*인 SPB₄가 생성한 amylase의 당화력은 비교적 높고, *B. pumilus*인 SSA₂와 *Bacillus* sp.인 SPC₃가 생성한 amylase의 당화력은 낮았다. 분리균들이 생성한

Table 5. Dextrinizing power and saccharifying power of amylase in the culture broth

Strains		Fermentation Periods			
		5	10	15	25
SSA1	D.P*	2.81	2.52	4.37	8.38
	S.P**	1.00	3.49	4.37	5.46
SSA2	D.P	3.18	6.14	6.54	6.14
	S.P	1.05	3.40	3.71	3.21
SSA3	D.P	3.96	5.98	5.88	5.76
	S.P	1.05	1.12	4.12	3.61
SSA4	D.P	2.52	8.53	8.53	7.46
	S.P	1.10	1.29	3.27	4.82
SSA5	D.P	8.27	8.61	9.78	9.64
	S.P	0.97	3.40	3.61	4.83
SSA6	D.P	0.00	1.15	6.05	3.58
	S.P	1.05	2.58	4.51	2.07
SSB1	D.P	6.97	9.26	9.80	9.86
	S.P	1.04	2.53	3.18	3.82
SSB3	D.P	3.60	8.98	7.56	6.18
	S.P	0.97	3.25	4.12	3.27
SSB4	D.P	0.00	0.00	1.69	0.10
	S.P	1.07	3.27	3.71	6.84
SPB1	D.P	5.18	8.16	9.98	8.65
	S.P	0.97	4.12	5.59	6.08
SPB4	D.P	9.98	9.84	6.30	9.96
	S.P	3.26	3.27	5.51	6.33
SPC1	D.P	2.52	2.62	2.93	3.80
	S.P	3.27	4.78	5.59	4.31
SPC2	D.P	9.13	9.86	9.84	8.98
	S.P	3.31	3.87	5.51	2.02
SPC2-1	D.P	6.71	9.22	9.80	9.68
	S.P	3.49	3.51	3.52	5.72
SPC3	D.P	3.50	9.88	8.39	7.35
	S.P	1.47	3.52	3.23	3.22

*: Dextrinizing power
 **: Saccharifying power

amylase의 액화력은 분리군주에 따라 차이가 많았다. *Bacillus* sp.인 SPB₁과 *B. subtilis*인 SPB₄가 생성한 amylase의 액화력은 다른 분리군에 비해 높았고, *Bacillus* sp.인 SSA₃ 및 SPC₁과 *B. polymyxa*인 SSB₄가 생성한 amylase의 액화력은 다른 분리군보다 낮았다.

3. 분리군의 생성향기

분리군이 생성한 향기의 芳齣은 Table 6과 같다. 군에 따라 생성 향기의 향이 다소 차이가 있었다. 일반적으로 간장에서 분리된 군은 재래식 간장의 독특한 향기인 짠 간장향을, 된장에서 분리된 군은 재래식 된장향을 주로 생성하는 경향이 있었다. 그러나 간장에서 분리된 *B. subtilis*인 SSB₁과 *B. polymyxa*인 SSB₄가 생성한 향기는 된장향을, 된장에서 분리된 *Bacillus* sp.인 SPB₃가 생성한 향기는 메주향을 나타내었다. *B. licheniformis*인 SSC₃가 생성한 향기는 재래식 간장향에 비해 좋은 짠 간장향이었으며, *Bacillus* sp.인 SSA₃, SSA₄ 및 SSA₅가 생성한 향기는 보통 정도의 짠 간장향이었으며 *B. licheniformis*인 SSA₁과 *B. pumilus*인 SSA₂와 SSA₆는 약한 짠 간장향을 각각 생성하였다. *B. polymyxa*인 SSB₄, *Bacillus* SP.인 SPB₁,

*B. brevis*인 SPC₂ 및 *B. licheniformis*인 SPC₂₋₁은 재래식 된장향에 비해 구수한 된장향을 생성하였고, *B. Subtilis*인 SSB₁과 *Bacillus* SP.인 SPC₁는 보통 된장향을 생성하였다. *B. subtilis*인 SPB₄는 약한 된장향을 생성하였다. 간장 및 된장에서 분리된 *Bacillus* sp.들은 각각 메주향, 짠 간장향(한국 재래식 간장의 독특한 향기) 및 된장향등을 생성하는 경향이었고, 특히, *B. licheniformis*인 SSB₃는 재래식 간장향에 비해 좋은 짠 간장향을, *B. polymyxa*인 SSB₄, *Bacillus* sp.인 SPB₁, *B. brevis*인 SPC₂ 및 *B. licheniformis*인 SPC₂₋₁은 재래식 된장향에 비해 구수한 된장향을 각각 생성하였다. 또한 분리군들은 protease와 amylase도 상당수준 생성하므로 한국 재래식 간장 및 된장의 맛과 향기생성에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.

요 약

간장과 된장 중에 서식하는 세균이 한국 재래식 간장과 된장의 독특한 향기와 주 맛성분인 아미노산과 유리당을 생성할 수 있는지를 알기 위해 연구하였다. 한국 재래식 간장과 된장 중에서 분리된 세균은 모두 *Bacillus* species이었다. 분리군은

Table 6. The aroma of flavors produced by isolates

Strains	Fermentation periods					
	5	8	10	12	15	25
SSA1	SM	SM	SM	SM	SM	SS, W
SSA2	SM	SM	SM, F	SM	SM, S	SS, W
SSA3	S	SM	SM	SS	SS, W	SS, W
SSA4	S	SS	SS, W	SS, W	SS, W	SM, S
SSA5	SM	SM	SM, S	SM	SS	SS, W
SSA6	SM, F	SM, S	SM, P	SM	SM	SS, W
SSB1	SM, F	SM, S	SS, W	SP	SP, W	SP, W
SSB3	SM, W	SM	SS, W, N	SS, W	SS, W	SS, S
SSB4	S, F	SP, N	SP, N	SP, N	SP, T	SP
SPB1	SS, W	SP, W	SP, W	SP, S	SP	SP
SPB4	SM, F	SM, W	SP, W	SM, W	SM	SM, S
SPC1	SM, P	SM, S	SM, F	SM	SM	SP
SPC2	SM	SM, S, F	SP, W	SP, W	SP, W	SP, N
SPC2-1	SM	SM	SP, W	SP, W	SP, W, P	SP, N
SPC3	SM, W	SM	SM, S	SM, S	SM	SM, S

Note: S: Soybean, SM: Soybean Malt, SS: Soy Sauce, SP: Soybean Paste, F: Fermentation, W: Week, S: Strong, N: Nice, P: Poor, T: Tart.

각각 메주향, 한국 재래식 간장의 독특한 향인 잔 간장향 및 된장향을 생성하고, protease와 amylase를 생성하므로 한국 재래식 간장 및 된장의 맛과 향기 생성에 크게 기여하리라 사료된다. 특히, *B. licheniformis*인 SSB₃는 좋은 잔 간장향을, *B. polymyxa*인 SSB₄, *Bacillus* sp.인 SPB₁, *B. brevis*인 SPC₂ 및 *B. licheniformis*인 SPC₂₋₁은 우수한 된장향을 각각 생성하였고, protease와 amylase도 상당수준 생성하였다.

사 사

본 논문은 한국과학재단 연구비에 의해 이루어진 연구 중 일부임.

참 고 문 헌

1. 이택수, 신보균, 주영하, 유주현 : 산업미생물학회지, 1 : 79(1973).
2. 이제문, 안순복, 김유삼, 홍윤명, 유주현 : 산업미생물학회지, 2 : 89(1974).
3. 李甲湘, 鄭東孝 : 한국식품과학회지, 5 : 163(1973).
4. 李宇鎮, 曹眞鉉 : 한국농화학회지, 14 : 137(1971).
5. 조덕현, 이우진 : 한국농화학회지, 13 : 35(1970).
6. 鄭允秀 : 한국미생물학회지, 1 : 30(1963).
7. Kiuchi, K., Suzuki, O., Ohta, T., Sato, E. and Ebine, H.: Nippon shokuhin kogyo Gakkaishi, 25 : 508(1978).
8. 李鍾珍, 高漢水 : 한국식품과학회지, 8 : 247(1976).
9. 이철호 : 한국식품과학회지, 8 : 19(1976).
10. 朱鉉圭, 盧愼圭, 林戊鉉 : 한국식품과학회지, 4 : 276(1972).
11. 金載勳, 趙成桓 : 한국농화학회지, 18 : 1(1975).
12. 박계인, 성현순, 윤종호 : 국립공업연구소보고, 21 : 105(1971).
13. 金載勳, 趙武濟 : 한국농화학회지, 14 : 19(1971).
14. 김종규, 정승용, 송재영, 장진규 : 영남대학교부설 자원문제연구소 연구논문집, 5 : 83(1986).
15. 송재영, 안철우, 김종규 : 산업미생물학회지, 12 : 147(1984).
16. 金鍾奎, 이낙훈, 李富權, 鄭承鏞 : 경상대학교농업자원이용연구소 농업연구소보, 18, 73(1984).
17. 金鍾奎, 鄭永健, 梁成鎬 : 산업미생물학회지, 13 : 285(1985).
18. Harrigan, W.F., Micance, E.: Laboratory methods in Food and Dairy Microbiology (1976).
19. Buchanan, R.E., Gibbons, N.E. etc: Bergey's manual of Determinative Bacteriology(8th) (1974).
20. Uehara, H., Yoneda, Y., Yamane, K. and Maruo, B.: Journal of Bacteriology, 119 : 82(1974).
21. Fuwa, H.: The Journal of Biochemistry, 41 : 583(1954).
22. 한국공업진흥청장 : 관능에 의한 품미검사법, KSA 7002, (1977).
23. 김종규 : 경상대학교부설 농업자원이용연구소 농업연구소보, 18 : 85(1984).
24. 梁成鎬 : 영남대학교 박사학위논문(1985).