

전통 된장 및 간장의 숙성기간별 생육 미생물의 분리 및 동정

유승구* · 조원희 · 강수민 · 이선희
연세대학교 생명공학과

Isolation and Identification of Microorganisms in Korean Traditional Soybean Paste and Soybean Sauce. Yoo, Seung-Ku*, Won-Hee Cho, Su-Min Kang, and Sun-Hee Lee. Department of Biotechnology, College of Engineering and Bioproducts Research Center, Yonsei University, 134 Shinchon-Dong, Sudaemun-Ku, Seoul 120-749, Korea - As a basic study for quality improvement of Korean soybean paste and soybean sauce, we investigated on microflora of soybean paste and soybean sauce fermentation. Major microorganisms were isolated from the sample pastes and sauces, and identified systematically. Selected microorganisms were identified by MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography. Identification results showed that *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* and *Bacillus subtilis* were dominant in soybean paste and *Staphylococcus vitulus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, and *Lactobacillus fermentum* were dominant in soybean sauce. It seemed that these microorganisms played an important role in soybean paste and soybean sauce fermentation and could be used for the further studies such as protease and amylase activities.

Key words: Korean soybean paste, Korean soybean sauce, microflora, identification of microorganisms

한국의 재래식 장류는 예로부터 계승된 우리 나라의 대부발효식품으로서, 곡류단백질에서 부족 되기 쉬운 필수 아미노산 및 지방산, 유기산, 미네랄, 비타민류 등의 영양소를 보충해 줌으로서 영양학적으로도 중요한 기능을 가진다[21]. 우리나라 전통 장류에 대하여 최근까지 맛 성분의 특징 및 분포조사[22], 향기성분 분석[5, 14] 등의 특성 연구에 이어 항산화성[6-8], 항암 활성 등의 연구가 보고된 바 있으며 원료대체, 저장성 개선을 통한 장류의 품질개선에 대한 연구가 일부 진행되고 있다[4, 9].

전통 장류의 산업화 문제점을 해결하기 위해서는 먼저 우리나라의 메주와 현재 전통적인 방법에 준해서 제조하고 있는 장류 시료를 택해, 전통적인 발효 공정에 나타나는 미생물의 변화를 검토하여야 하며, 이들 미생물의 활용을 통한 장류의 제조와 공정 개발을 하는 것이 필요하다[11, 12, 19]. 그러나, 재래식 및 개량식 된장의 미생물군에 대한 연구[10, 13]는 단편적으로 이루어졌으나 우리 기호에 적합한 균주를 이용하여 된장을 제조하는 기술 및 연구가 이루어져 있지 않아 우리 고유의 장맛을 상업적으로 제조하기 어려운 상태이다. 따라서 발효과정 중에 사용 가능한 우수 균주를 개발함으로써 숙성기간을 단축하고 품질을 향상시켜 우리 고유의 양질 장류를 생산하는 것이 시급하다고 본다[18]. 이를 위해서는 우선 전통적인 발효과정에서 나타나는 미생물의 변화를 검토하고, 이들 미생물

을 분리, 확보 및 검토하여야 하며 나아가 복합적인 미생물의 활용을 통한 장류의 제조와 공정개발이 필요하다.

따라서 본 연구에서는 전통 장류의 제조공정 개선 및 전통 장류의 산업화에 필수적인 균주의 확보를 위하여, 전국에서 생산되는 유명 장류와 전통적인 방법으로 제조하는 장류를 수집, 보존하며 숙성 기간에 따른 장류 미생물의 군종의 변화를 검토하고, 우수 균주 후보를 탐색하였다.

재료 및 방법

전통 된장 및 간장 시료의 제조 및 보존

실험에 사용한 메주는 경기도 양평의 지체 농협, 강원도 홍천의 두메식품, 전라북도 순천의 오투기 식품으로부터 수집하였으며, 1997년 3월 11일 각각 고유의 방법으로 장을 담그었다. 두메 간장의 경우는 30일, 지체 간장과 오투기 간장의 경우 각각 60일 동안 숙성시키면서 10일 간격으로 각각 간장 시료를 2g씩 채취하였다. 간장을 분리하고 남은 메주박에 메주분과 식염을 혼합하여 된장을 담그었다. 두메 된장의 경우는 30일, 지체 된장과 오투기 된장의 경우는 각각 60일 동안 숙성시키면서 10일 간격으로 각각 된장 시료를 2g씩 채취하였다.

채취한 간장 시료를, 멸균한 생리 식염수(0.85% NaCl)와 1:9의 비율로 현탁한 후 2000~3000 rpm에서 2분간 원심분리하였다. 상등액을 새 튜브로 옮기고 멸균한 30% glycerol 1 ml을 첨가한 후 밀봉하여 -70℃에서 보존하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-2-361-2887, Fax. 82-2-362-7265
E-mail: skyoo@bubble.yonsei.ac.kr

된장 및 간장 시료로부터 미생물의 분리

숙성기간 중 10일 간격으로 시료를 각각 100 µl씩 채취한 다음, 생리 식염수를 사용하여 순차적으로 10¹~10⁵으로 희석한 후, 희석액 100 µl씩을 분리 배지에 도말하였다. 분리용 배지로는 일반 세균의 경우 nutrient agar (beef extract 0.3%, peptone 0.5 %, agar 2%, NaCl 2.5 %, pH 7.0), 곰팡이의 경우 Cook Rose Bengal Agar (dextrose 1%, peptone 0.5%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, rose bengal 0.0035%, agar 2%, pH 3.5-4.0, streptomycin 0.03 mg/l, pH 3.5-4.0), 효모의 경우 YM agar (yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%, agar 2%, pH 6.2)를, 젖산균의 경우 BCP 배지 (glucose 10%, peptone 5%, beef extract 3%, bromcresol purple solution(v/v) 20%, agar 2%, pH 7.0)를 사용하였다. 특히 젖산균의 분리시 일반 세균을 배지하기 위하여, Lactobacillus selection media (pancreatic digest of casein 1%, yeast extract 0.5%, monopotassium phosphate 0.6%, ammonium citrate 0.2%, dextrose 2%, polysorbate 80 0.1%, sodium acetate hydrate 2.5%, magnesium sulfate 0.575%, manganese sulfate 0.012%, ferrous sulfate 0.0034%, agar 1.5%, glacial acetic acid(v/v) 0.132%, pH 5.5)를 이용하여 2차 선별 과정을 거쳤다.

혐기성균의 분리를 위해 혐기 배양기에 질소가스를 주입한 후 일반세균과 젖산균의 경우 30°C에서 72시간, 곰팡이는 28°C에서 2-3일, 효모는 28°C에서 5-6일의 배양 조건에서 배양하여 시료에 존재하는 각각의 미생물을 분리하였다.

선별 배지를 통해 순수 분리한 미생물들은 계대 배양한 다음 균에 번호를 부여하였으며, 일부는 동결 보존하였다. 미생물 균체를 -30°C~-50°C에서 동결시킨 다음, 진공 펌프를 사용하여 10⁻²~10⁻³ mmHg의 조건에서 급격히 감압하여 승화와 증발에 의하여 수분이 1~3%가

되도록 충분히 건조시킨 후, 분산매(탈지유 20%)에 균체를 10⁹~10¹⁰ cells/ml의 농도로 현탁하여 ampule에 분주하고 감압 상태에서 ampule을 녹여서 밀봉하였다. Ampule은 5~7°C의 저온에서 보존하였다.

분리 미생물의 형태학적 분류 및 동정

숙성시간 별로 수집된 시료로부터 일반 세균의 경우 colony 색과 형상, 곰팡이의 경우 포자의 색과 형태, 배면색, 효모와 젖산균의 경우 군집의 형상을 현미경으로 관찰하여 대략적으로 1차 분류를 행하였다. 발효가 활발하게 일어나는 숙성 20일에 분리되는 균주 중, 형태학적으로 뚜렷이 구분되는 102주를 선택하고, Gas Chromatography(GC)를 이용한 Microbial Identification System(MIS) whole cell fatty acid analysis를 이용하여 동정을 실시하였다[1, 17]. 먼저 GC 분석을 위하여 미생물 시료의 전처리 과정을 행하였다. 실험 균주를 원심 분리하여 침전시킨 다음 메탄올에 현탁시킨 sodium hydroxide로 saponification 과정을 행하였다. 이를 다시 메탄올에 현탁시킨 6M hydrochloric acid로 methylation 한 후, hexane과 methyl-tert butyl ether(MTBE)로 추출하고 sodium hydroxide로 세척하였다. GC 분석을 통하여 준비한 미생물 시료가 가지고 있는 methyl ester 지방산 내의 연소되는 탄소를 측정하여, 미생물 동정의 자료로 사용하였다. 실험 균주 내 지방산 함량과 database 내에 저장되어 있는 identification library를 비교함으로써, 균주의 동정을 시도하였다.

결과 및 고찰

된장 및 간장 시료의 숙성 시기별 미생물 분포

된장시료의 경우 3개 회사 제품에 대해 숙성시기 별로 순수 분리한 균주는 총 215주였다. 이 중 일반세균 및 효모가 124주(58%)로 주종을 이루었으며, 곰팡이는 총 12주

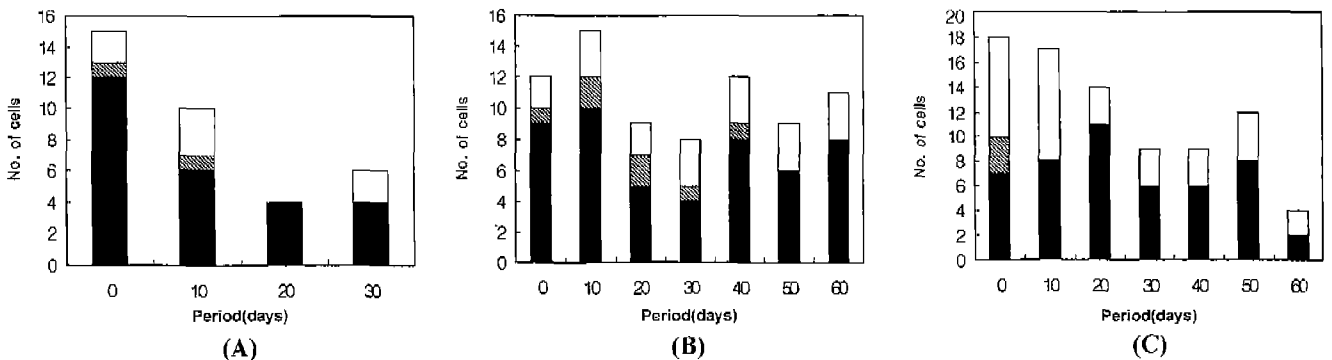


Fig. 1. Isolation of microorganisms by selection media from soybean paste. Microorganisms were isolated by selection media from the samples of different fermentation periods: ■, Bacteria and Yeast; ▨, Mold; □, *Lactobacillus*. A, Dume soybean paste; B, Jije soybean paste; C, Ottugi soybean paste.

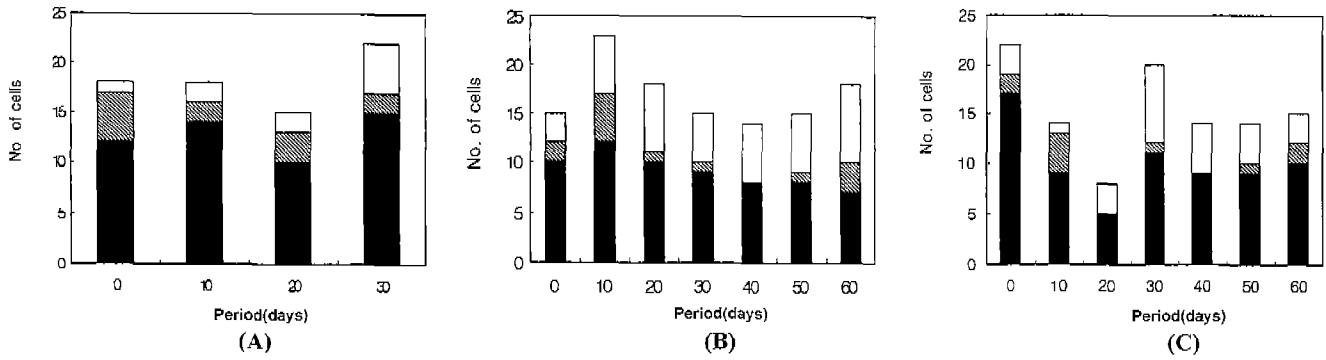


Fig. 2. Isolation of microorganisms by selection media from soybean sauce. Microorganisms were isolated by selection media from the samples of different fermentation periods: ■, Bacteria and Yeast; ▨, Mold; □, *Lactobacillus*. A, Dume soybean sauce; B, Jije soybean sauce; C, Ottugi soybean sauce.

(6%)가 분리되었는데 주로 숙성기간 0-20일 사이에 대부분이 검출되었고 숙성시기 후반에는 거의 검출되지 않았다. 젖산균의 경우 총 79주(37%)가 분리되었다(Fig. 1). 또, 숙성시기 별로 생균수를 측정된 결과 0-20일 사이에 일반세균, 효모, 곰팡이 등 대부분의 미생물이 생성되어 된장의 발효에 관여함을 알 수 있었다(data not shown).

간장 시료의 경우 3개 회사 제품에 대해 숙성기간 별로 순수 분리한 균주는 총 298주였다. 이 중 세균과 효모가 185주(62%), 방선균이 35주(12%), 젖산균이 78주(26%)로, 세균과 효모의 비율이 가장 높았다(Fig. 2). 또, 숙성기간 별로 생균수를 측정된 결과 전체적으로 숙성 20일 전후에 가장 높은 수치를 나타내어(data not shown), 이 때가 발효 기간 중 미생물의 생육이 가장 활발한 것으로 판단되었다.

주요 발효미생물의 탐색 및 동정

된장 시료의 경우 3개 회사 제품에 대하여 숙성시기별로 우점종 65균종을 분리하고 MIS whole cell fatty

acid analysis를 동정을 행하였다. Bacterial fatty acid의 GC 분석을 이용한 동정방법은, 이미 여러 논문을 통하여 확인된 바 있으며[2, 16, 20], 본 방법을 이용한 동정 결과는 species level까지 80%정도 신뢰할 수 있다고 보고되고 있다. 분석 결과 database 내의 identification library와 50%이상의 homology를 지니는 분리 균주는 26균종이며 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus atrophaeus*, *Micrococcus lylae*, *Cellulomonas flavigena* 등 총 6균종으로 동정되었다. 이들 균주가 된장의 발효에 영향을 주는 우수 균주로 생각되며, 이 중 *Bacillus licheniformis*(9주, 34.6%), *Bacillus pumilis*(7주, 26.9%) 그리고 *Bacillus subtilis*(6주, 23.1%)가 동정 대상 미생물 총 26균종 중 22균종으로 전체 균주의 84.5%를 차지하여 이들이 발효에 관여하는 주요 균주인 것으로 판단되었다(Table 1).

간장 시료의 경우 3개 회사 제품에 대해 숙성 기간별로 우점종 102 균종을 동정한 결과 data base system과 50% 이상의 homology를 가지는 분리 균주는 41주였다(Table

Table 1. Identification of microorganisms using MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography from soybean paste

Soybean paste	Periods (day)	Microorganisms identified						Total
		<i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Bacillus pumilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus atrophaeus</i>	<i>Micrococcus lylae</i>	<i>Cellulomonas flavigena</i>	
Dume	10	2	3	-	-	-	-	5
	20	-	2	-	-	-	-	2
	30	-	1	-	-	-	-	1
Jije	10	2	-	2	-	-	-	4
	20	1	-	2	-	-	-	3
	30	3	-	-	-	-	-	3
	40	1	-	-	-	-	-	1
Ottugi	10	-	-	2	1	-	-	3
	20	-	1	-	-	1	-	2
	30	-	-	-	-	1	-	1
	40	-	-	-	-	-	1	1

Table 2. Identification of microorganisms using MIS whole cell fatty acid analysis by gas chromatography from soybean sauce

Soybean sauce	Period (day)	Genus					Total
		<i>Bacillus</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Brevibacterium</i>	Others	
Dume	0	3	2	-	-	-	5
	10	2	2	-	-	1	5
	20	2	1	-	-	-	3
	30	-	1	-	-	-	1
Jije	0	1	-	-	1	1	3
	10	1	-	-	1	1	3
	20	-	2	-	2	-	4
	30	-	-	-	-	-	0
	40	1	1	-	-	-	2
	50	1	1	-	-	-	2
Ottugi	0	1	-	-	-	-	1
	10	1	-	1	-	1	3
	20	1	1	-	-	1	3
	30	-	-	3	-	1	4
	40	-	-	1	-	-	1
	50	-	-	-	-	-	-
	60	-	-	-	-	-	-

2). 이 중 *Bacillus*(15주, 37%), *Staphylococcus*(11주, 27%)와 같은 세균류가 압도적으로 많았다. 그리고, 지체 간장의 경우 총 15주 중 *Brevibacterium*이 4주였고, 오투기 간장의 경우 12주 중 젖산균이 5주 검출되었다. 결과를 종합해 볼 때, 세균 중에서는 *Staphylococcus vitulus*(9/41)와 *Bacillus subtilis*(7/41), *Bacillus pumilus*(4/41) 그리고 젖산균으로는 *Lactobacillus fermentum*(5/41)이 간장 발효를 주도하는 미생물인 것으로 생각되었다.

본 연구를 통한 장류의 미생물 탐색과 보존 및 이를 통한 생물자원의 보존은 고유의 전통식품의 제조를 위한 기술적 기반을 제공하며, 장류 발효과정에서의 microflora의 존재 양상을 검토하고, 주요 미생물을 분리, 확보함으로써 장류 제조공정의 개선을 가능하게 할 것으로 사료된다. 또한, 본 연구에서 분리한 간장 발효 관련 미생물의 protease와 amylase 활성을 측정하여 단백질 분해능과 전분 분해능이 우수한 효소를 생산하는 미생물을 선별하여 장류의 품질향상과 고급화의 연구에 활용할 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 기초 연구의 축적은 우리 고유의 장의 발효, 숙성에 관여하는 미생물의 동정 및 개량, 형질전환을 통하여 장류의 품질 개선과 신제품의 개발에 기여하며, 생물자원의 합리적인 이용과 보존을 할 수 있는 바탕이 되어, 전통 장류의 제품화와 산업화에 기여할 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 전통 된장 및 간장의 발효 숙성 과정에

서의 균총의 존재 양상을 종합적으로 검토하고, 주요 미생물을 분리, 동정하였으며 이를 체계적으로 보존 확보하였다. 숙성기간 별로 미생물의 생육 균수를 측정해 본 결과 된장의 경우는 숙성 20일 이내에, 간장의 경우는 숙성 20일을 전후하여 미생물의 수가 크게 증가하는 것으로 나타났으며 이 중 세균과 효모가 가장 많은 것으로 관찰되었다. 균주 동정의 결과 전통 된장의 경우는 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* 등의 3종이, 그리고 간장의 경우에는 *Staphylococcus vitulus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus* 그리고 *Lactobacillus fermentum* 등 4종이 발효 과정에서 발견되는 주요 균주로 탐색되었다.

이들 균주의 발효에 필수적인 단백질 분해능과 전분분해 효소활성을 측정하여 발효에 유용한 우수 균주를 선별 개발한 후 이를 장류 제조시 첨가하여 발효의 최적 조건을 확립하면 숙성기간을 단축하고, 장의 품질개선 및 우수 제품 개발과 공정개선을 유도할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말

본 연구는 농림수산부 특정연구과제 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Foster, J. L. M. and J. C. Fogleman. 1994. Bacterial suc-

- cession in necrotic tissue of agria cactus. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 619–625.
2. Gavin, S. E., R. G. Leonard, A. M. Briselden, and M. B. Coyle. 1992. Evaluation of the rapid CORYNE identification system for *Corynebacterium* species and other coryneforms. *J. Clin. Microbiol.* **30**: 1692–1695.
 3. Kamata, H. and Y. Sakurai. 1964. Color formation of soysauce. *Seasoning Science* **11**: 21–42.
 4. Kato, M. and Y. Sakurai. 1962. Studies on the mechanism of browning of soy beanproducts. *J. Agric. Chem. Soc.* **36**: 131–137.
 5. Kim, G. E., M. H. Kim, B. D. Choi, T. S. Kim, and J. H. Lee. 1992. Flavor compounds of domestic *Meju* and *Doenjang*. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**: 557–565.
 6. Kim, M. H., S. S. Im, S. H. Kim, G. E. Kim, and J. H. Lee. 1994. Antioxidative materials in domestic *Meju* and *Doenjang* 2. Separation of lipophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**: 251–260.
 7. Kim, M. H., S. S. Im, S. H. Kim, G. E. Kim, and J. H. Lee. 1994. Antioxidative materials in domestic *Meju* and *Doenjang* 3. Separation of hydrophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**: 604–613.
 8. Kim, M. H., S. S. Im, Y. B. Yoo, G. E. Kim, and J. H. Lee. 1994. Antioxidative materials in domestic *Meju* and *Doenjang* 4. Separation of phenolic compounds and their antioxidative activity. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **23**: 792–798.
 9. Kirimura, J. and N. Natsuya. 1969. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* **17**: 689–697.
 10. Lee, S. S., K. H. Park, K. J. Choi, and S. A. Won. 1993. Identification and isolation of Zygomycetous fungi on *Meju*, a raw material of Korean traditional soysauce. *Kor. J. Mycol.* **21**: 172–187.
 11. Marth, E. H. and M. P. Doyle. 1979. Update on molds: Degradation of aflatoxin. *Food Technol.* **33**: 81–89.
 12. Park, K. Y. and L. B. Bullerman. 1988. Aflatoxin production by *Aspergillus parasticus* and its stability during the manufacture of Korean soy paste and soy sauce by traditional method. *J. Food Prot.* **51**: 12–16.
 13. Park, J. S. 1992. Histological changes of *Doenjang* during the fermentation with different strains. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **24**: 477–481.
 14. Park, J. S., M. Y. Lee, K. S. Kim, and T. S. Lee. 1994. Volatile flavor components of soybean paste(*Doenjang*) prepared from different types of strains. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**: 255–260.
 15. Rosseel, P. and S. Lauwers. 1995. Evaluation of the MIDI system (fatty acid analysis) for the identification of anaerobes routinely isolated in a clinical lab, *World Congress on Anaerobic Bacteria and Infections*. International society for anaerobic bacteria, San Tuan, Puerto Rico.
 16. Sasser, M. and M. D. Wichman. 1991. Identification of microorganisms through use of gas chromatography and high-performance liquid chromatography, pp. 111–118. In W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg, and H. J. Shadomy (eds.), *Manual Clin. Microbiol.* American Society for Microbiology, Washington, D. C.
 17. Stoakes, L., T. Kelly, B. Schieven, D. Harley, M. Ramos, R. Lannigan, D. Groves, and Z. Hussain. 1991. Gas-liquid chromatographic analysis of cellular fatty acids for identification of Gram-negative anaerobic bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2636–2638.
 18. Teuber, M. 1993. Genetic engineering techniques in food microbiology and enzymology. *Food Rev. Int.* **9**: 389–409.
 19. Whang, C. I. and D. H. Kim. 1973. The antioxidant oxidations. *Korean J. Food Sci. Tech.* **5**: 84–89.
 20. Welch, D. F. 1991. Application of cellular fatty acid analysis. *Clin. Micro. Rev.* **4**: 422–438.
 21. Yang, S. H., M. R. Choi, J. K. Kim, and Y. G. Chung. 1992. Characteristics of the taste in traditional Korean soybean paste. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**: 443–448.
 22. Yang, S. H., M. R. Choi, J. K. Kim, and Y. G. Chung. 1992. Optimization of the taste components composition in traditional Korean soybean paste. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **21**: 449–453.

(Received September 2, 1998)