

메주발효에 관여하는 우량균주의 분리, 동정 및 생육특성

최경근 · 최승필* · 함승시* · 이득식**†

농협식품연구소

*강원대학교 바이오산업공학부

**동해대학교 외식산업학과

Isolation, Identification and Growth Characteristics of Main Strain Related to Meju Fermentation

Kyong-Keun Choi, Cheng-Bi Cui*, Seung-Shi Ham* and Deuk-Sik Lee**†

Food Research Institute of Nonghyup, Seoul 137-893, Korea

*School of Biotechnology and Bioengineering, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

**Dept of Food Service Industry, Donghae University, Donghae-shi 240-713, Korea

Abstract

This study was carried out to select Meju of a good quality through general composition analysis, organoleptic evaluation, and to conduct isolation, identification, and growth characteristics of main strain related to fermentation from selected Meju. Moisture and crude protein of Meju were 7.2~28.8% and 32.7~42.3%, respectively. The amino nitrogen contents of Kyongbuk and Chonbuk Mejus were 770.8 mg% and 239.9 mg%, respectively. And also, free amino acid and glutamic acid contents of Doenjangs made from Chonbuk and Kyongbuk Mejus were 4,169.6 mg% and 499.4 mg%, respectively. The result of sensory evaluation of Mejus collected from several regions showed Kyongbuk was the most suitable Meju in items of color, flavor, appearance and overall ($p < 0.05$). The typical properties of *B. licheniformis* NH20 strain isolated from Kyongbuk Meju showed gram positive, aerobic rod cell and motility. As major component among its cellular fatty acid composition, C_{15:0} anteiso fatty acid, C_{15:1} iso fatty acid, C_{17:0} anteiso fatty acid, and C_{17:0} iso fatty acid were 30.7, 28.9, 13.3 and 11.2%, respectively. It showed the same identification coefficient (0.653) compared to the standard strain. Therefore, it was identified to be *B. licheniformis* NH20 according to Bergey's Manual of Systematic Bacteriology and its fatty acid profiles. The optimum pH, temperature, salt content, and culture time of *B. licheniformis* NH20 were 7.0, 32°C, 2%, and 9 hours, respectively.

Key words: Meju, doenjang, *Bacillus licheniformis*, isolation, identification

서 론

우리나라의 전통식품 중 콩을 원료로 한 발효식품으로는 간장, 된장, 고추장 그리고 청국장 등의 장류가 있다(1-4). 이것들은 모두 미생물에 의하여 발효시킨 식품으로 영양학적 우수성과 기호성 및 기능성을 갖춘 세계적인 식품이다. 우리의 전통 장류는 오래전부터 메주를 이용해 만들어 왔으며 위생성과 안전성이 검증된 식품이라 할 수 있다. 전통 장류중 간장, 된장 등의 독특한 풍미와 구수한 맛은 주로 발효, 숙성 과정 중 효소작용에 의한 콩 단백질의 분해로부터 생성된 아미노산의 맛에 기인한 것이다. 전통 장류는 여러 종류의 균주가 작용하여 생성되는 발효식품으로 유익한 균과 그렇지 않은 균들이 혼재되어 발효되므로 원하지 않는 발효가 진행될 수도 있다. Kim과 Huh(5)는 재래식 메주에서 *Mucor*속,

*Rhizopus*속, *Penicillium*속 곰팡이 및 *Saccharomyces*속 효모를 분리하였고, Han과 Park(6)은 1958년에 재래식 메주로부터 *Aspergillus*속, *Mucor*속, *Rhizopus*속 곰팡이를 분리하여 그 형태적 특성을 조사하였다. Jung(7)은 재래식 간장에서 처음으로 세균을 분리 동정하여 6종을 확인하였으며, 그 종류로는 *B. pumilus*, *B. subtilis* var. *aterinus*, *B. licheniformis*, *B. citreus* var. *soya*, *Sarcina maxima* 그리고 *Pediococcus acidilactici*이다. 이와 같이 장류발효에 관여하는 미생물은 다양하며 어느 균주에 의해 발효되는가에 따라서 맛의 특성도 달라질 수가 있는 것이다. Park과 Kim(8)은 전국 여러 도시에서 채취한 메주를 표면, 표면안쪽 및 중심부로 나누어 미생물 분포상황을 조사한 결과, 총균수의 99% 이상이 세균이고 곰팡이는 한 시료의 표면에서 33%가 분포하고 있을 뿐 거의 1%이하였고, 효모는 일부 시료에서만 검출

†Corresponding author. E-mail: dslee@donghae.ac.kr
Phone: 82-33-520-9252. Fax: 82-33-521-9216

되었다고 하였다. 이는 주로 세균에 의해 발효된 경우이지만 곰팡이에 의해 발효되는 정도는 적다고 할 수 있다. 한국의 재래식 간장의 주발효 미생물군을 규명한 보고에서는 Lee와 Cho(9)가 호기성 세균인 *B. subtilis*와 *B. pumilus*, 유산균인 *P. halophilus* 및 *Leuconostoc mesenteroides*, 효모균인 *Rhotorula flava*, *Torulopsis datila*, *Saccharomyces rouxii*를 밝힌 바 있다. Cho와 Lee(10)는 한국의 재래식 메주의 발효 미생물을 분류하여 생태학적으로 조사하여, 곰팡이는 메주 덩어리의 표면층 부분에만 존재하며, 그 종류는 복잡하여 주요균종을 알기 어려우나 3종의 *Mucor*, 2종의 *Penicillium*, 각 1종의 *Scopulariopsis* 및 *Aspergillus*를 분리한 것을 보고하였으며, 특히 세균은 메주덩어리 전체에 골고루 조밀하게 분포되어 있었으며 덩어리 내부에는 세균만이 존재하는 것을 보고하였다. 즉, 세균은 단순하여 *B. subtilis*와 *B. pumilus*가 한국메주의 거의 모든 세균군을 형성하고 있어 한국메주의 발효 속성은 세균군의 발효에 의한 것이 아닌가 보고하고 있다. 또한 Kwon 등(11)은 분리한 미생물 중에서 *B. licheniformis*인 SSB3는 우수한 간장 향, *B. polymyxa*인 SSB4, *Bacillus* sp.인 SPB1, *B. brevis*인 SPC2 및 *B. licheniformis*인 SPC2-1은 우수한 된장 향을 각각 생성하였고, protease와 amylase도 상당수준 생성하였다고 보고하였다. 이와 같이 우리나라 장류 중 간장의 발효, 속성에 관여하는 단백질 분해 효소 등 가수분해 효소는 주로 *Bacillus*속 세균과 일부 곰팡이에서 유래된다는 것을 위의 연구 결과들로부터 알 수 있었다.

따라서, 국내 여러 연구자들이 연구한 결과를 종합해 보면, 메주에서 발효에 관여되는 주요균은 세균과 곰팡이가 대부분을 차지하고 있는 것으로 나타나고 있으나, 각 지역별 메주 발효에 관여하는 균주 또한 약간씩 다르게 보고되고 있다. 본 보고에서는 각 지역별 메주를 수거하여 관능상 메주에 영향을 주는 주요균을 분리 동정하고 생육특성을 실험하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

우수메주 선별

재래식메주와 된장은 1999년에 생산된 것으로 경기도 양평군의 지체농협(Kyonggi), 강원도 원주시의 원주농협(Kangwon I), 강원도 횡성군의 서원농협(Kangwon II), 전북 부안군의 상서농협(Chonbuk), 전남 강진군의 도암농협(Chonnam), 충북 제천시의 남제천농협(Chungcheong), 경북 안동시의 일직농협(Kyongbuk)에서 수거하여 분석에 사용하였다. 수거된 메주는 냉동고에 보관하면서 사용하였고, 된장의 시료는 수거된 메주균으로 공장에서 생산된 것을 이용하였다.

일반성분 분석

시료의 일반성분 분석은 Shin(12)의 방법에 따라 수분함량은 105°C 건조법, 조지방은 soxhlet추출법, 총질소 성분 분석(13)은 Kjeltac auto 1035 analyzer system(Foss Tecator

AB, Sweden)을 이용하였다. 즉, 시료 약 1~2 mL를 취하여 진한 황산용액 12 mL와 분해촉진제를 넣고 420°C에서 분해시키고, Kjeltac system 1035 distilling unit를 사용하여 증류한 후 0.1 N HCl용액으로 적정하여 소비된 0.1 N HCl의 mL수를 총질소로 환산하여 양을 구하였다. pH측정(Horiba, F-22)은 메주 10% 용액을 조제하여 측정하였다.

아미노태 질소

아미노태질소 분석(14)은 포르말린 적정법을 이용하였다. 전처리액 20 mL에 증류수 80 mL를 넣은 다음 0.1 N NaOH를 첨가하여 pH 8.4까지 조절한 후 중성 포르말린 20 mL를 넣고 다시 0.1 N NaOH로 pH meter를 이용 pH 8.4까지 적정하여 이때 소비된 0.1 N NaOH mL수를 아래의 계산식에 대입하여 그 함량을 산출하였다. 여기에서 상수 1.4는 0.1 N NaOH 1 mL에 해당하는 아미노태 질소의 mg 수이다.

$$\text{아미노태질소(mg\%)} = (\text{시료적정 mL} - \text{공시험 mL}) \times 1.4 \times F / \text{시료(g)} \times 100$$

유리아미노산

유리아미노산 분석(14)은 시료 간장을 아미노산 분석용 lithium citrate buffer로 20배 희석한 다음 0.45 μM membrane filter로 여과한 여액을 아미노산 자동분석기(Biochrom 20 Amino Acid Analyzer)에 주입하여 정량하였다. 즉, 유속은 buffer가 20 mL/h, ninhydrin이 20 mL/h, 온도구배는 35°C-74°C-80°C-37°C, 파장은 440, 570 nm, 컬럼길이는 4.6×250 mm, 주입량은 20 μL였다.

관능검사

메주의 품질을 조사하기 위하여 메주 평가에 훈련된 패널 10명을 선정하여 실험의 취지를 인식시킨 후 각 구별로 색, 향, 맛, 종합적 품질로 항목을 나누어 5점 평점법에 의한 관능검사를 실시하였다. 즉, 아주 좋다(5점), 좋다(4점), 보통이다(3점), 나쁘다(2점), 아주 나쁘다(1점)로 하였다. 관능검사는 각 패널에게 100 mL의 투명한 비이커에 20 mL의 증류수를 넣고 5 g의 메주를 희석 혼합한 후, 6개의 시료에 각각 3자리 난수를 부여하여 제시하고 유리봉을 사용하여 관능을 평가하도록 하였다. 결과의 통계처리는 minitab program을 이용하여 analysis of variance(ANOVA) test와 Duncan's multiple range test를 하였다.

균주의 분리

각 지역의 메주를 분석한 후 우수메주로 선발된 경북지역의 메주 시료를 1/2로 절단하고 내부층으로부터 시료를 채취한 후 90 mesh로 마쇄하고 멸균 생리식염수에 희석, 현탁하여 그 상등액을 trypticase soy agar(TSA, Difco Co.) plate에 도말한 후 각각 35°C에서 3일간 배양하여 생육이 양호하고 관능검사 성적이 우수한 균주를 선발하였다.

분리균주의 형태학적 및 생리학적 특성

선별된 균주를 48시간 동안 배양하여 주사전자현미경 관

찰을 통한 형태학적 특성 및 API Kit(API 50 CHB, Bio Merieux Co., France)를 통한 생리적 특성을 조사하였으며, Bergey (15)와 MacFaddin(16)의 방법에 준하여 특성을 조사하였다.

분리균주의 세포내 지방산 조성 측정

균주의 동정을 위해 세포의 지방산 조성을 측정(17)할 목적으로 trypticase soy broth agar(TSA) 배지(trypsinase soy broth 3.0%, agar 1.5%)에서 배양한 세포들을 집균하고 이들 세포의 지질로부터 지방산을 유리시키기 위해 배양균체 약 50 mg에 50% 메탄올과 15% NaOH를 첨가하여 100°C에서 30분간 가열하였다. 얻어진 조지방산에 메틸에스테르를 형성시키고 수상에서 유기상으로 지방산 에스테르를 추출한 후 유기 추출물을 수용상으로 세척하였다. 추출된 시료의 지방산 메틸에스테르는 가스 크로마토그래피(HP 6890, USA)에 의해 분석하였으며, 이들의 profile은 미생물동정 시스템 software(Microbial ID, Inc., Delaware, USA)를 이용하였다.

분리균주의 동정

선별된 균주의 형태학적 및 생리학적 특성 조사와 더불어 한국중균협회에 보관중인 2,000여 library 표준 균주의 지방산 조성과 비교조사하여 동정하였다.

분리균주의 최적 생육조건

최적생육온도 측정은 tryptone soya broth(TSB, Scharlau Chemie, S.A.)배지 10 mL에 *B. licheniformis*를 1백금이 접종하고 30°C, 32°C, 35°C, 37°C 및 40°C의 진탕 배양기(170 rpm, 16 h)에서 배양한 후 660 nm에서 optical density(O.D.) 값을 측정하였다. 최적생육을 위한 초기 pH 측정은 TSB배지 10 mL를 1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0으로 각각의 배지조성을 조정한 후, *B. licheniformis*를 1백금이 접종하고 32°C의 진탕배양기(170 rpm, 16 h)에서 배양한 후 660 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. 내염성 시험은 TSB배지를 염농도 0%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%, 7% 및 10%가 되도록 배지 조성을 한 후 *B. licheniformis*를 각각 1백금이 접종하고 32°C의 진탕배양기(170 rpm, 16 h)에서 배양한 후 660 nm에서 O.D. 값을 측정하였다. *B. licheniformis* 균주의 생육곡선은 5 L 발효조에 3 L의 대두즙 배지(5% 대두추출물 0.5%, glucose 0.5%, yeast extract 0.25%, pH 7.3)를 넣고 TSB 배지에서 16시간 동안 배양한 starter 100 mL를 접종하여 0.3 VVM(volume/volume/minute)의 통기속도와 450 rpm의 교반 속도로 통기 교반 배양시의 경시적 생균수 변화를 측정하였다.

결과 및 고찰

메주의 일반성분

한식간장 표준화를 위한 1차 작업으로 우수메주를 분리하기 위해 Table 1과 같이 전국의 농협 장류 가공공장에서 수집한 메주의 수분, 조단백질, 조지방 및 pH를 분석하였다. 수분

Table 1. Proximate composition contents of Meju collected from several regions

Regions	Crude protein (%)	Moisture (%)	Crude lipid (%)	pH
Kyonggi	42.3±0.1 ¹⁾	7.2±0.1	5.8±0.1	7.1
Kangwon I	39.7±0.2	28.8±0.2	6.3±0.1	6.9
Kangwon II	39.7±0.2	18.1±0.1	5.6±0.1	7.1
Chonnam	34.9±0.1	21.7±0.2	5.2±0.1	6.8
Kyongbuk	39.2±0.2	15.4±0.2	6.2±0.1	7.3
Chonbuk	37.8±0.2	20.2±0.2	6.5±0.1	7.4
Chungcheong	32.7±0.1	26.1±0.2	5.4±0.1	7.7

¹⁾Data were presented as means±standard deviation.

함량은 7.2±0.1~28.8±0.2%까지 분포되어 있었으며, 이것은 지역별로 선호하는 메주의 성상이 다르기 때문인 것으로 추정되었다. 조단백질 함량은 충청지방의 메주가 32.7±0.1%로 가장 낮았으며 경기지역의 것은 42.3±0.1%로 유의적(p<0.05)으로 가장 높은 값을 나타내었다. 조지방 함량에 있어서는 전남이 최저 5.2±0.1%에서 전북이 최고 6.5±0.1%의 값으로 각 지방간의 유의차는 큰 차이를 나타내지 않았으며, 이는 대두에 함유되어 있는 지방의 함유량이 비슷한데서 오는 결과로 사료되어진다. pH는 최고 7.7에서 최저 6.8로 중성부근의 값을 나타내었다. Fig. 1은 지역별 전통메주의 아미노태질소 함량을 비교한 것이다. 아미노태질소는 미생물에 의한 콩단백질의 분해정도를 나타내는 것으로 전북지역의 메주가 240±15 mg%로 가장 낮았고 경북지역의 메주가 771±32 mg%로 유의적(p<0.05)으로 가장 높았으며, 강원 II가 583±17 mg%로 그 다음으로 높았으며 나머지 지역의 강원 I, 전남, 충청지역들은 437±17, 430±28, 424±25 mg%로 비슷한 수치를 나타내었다. 따라서 아미노태질소 함량으로 미루어 보면 경북지역의 메주가 발효가 잘 된 것으로 판단되었다.

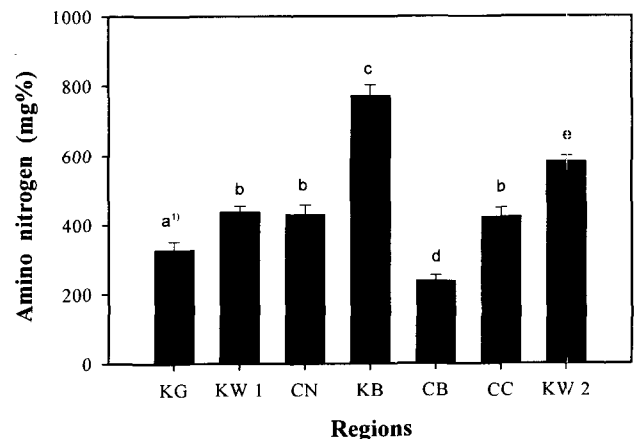


Fig. 1. Amino nitrogen contents of Meju collected from several regions.

KG: Kyonggi, KW 1: Kangwon 1, CN: Chonnam, KB: Kyongbuk, CB: Chonbuk, CC: Chungcheong, KW 2: Kangwon 2. All values are mean±SE (n=3).

¹⁾Bars with different letters are significantly different among group by Duncan's multiple range test in one way ANOVA (p<0.05).

국내 지역별 메주로 만든 된장의 아미노산 분석결과

우수메주를 선별하기 위한 작업으로 각 지역의 공장에서 각 지역별 메주로 만든 된장의 유리아미노산을 분석하였다. Table 2는 메주를 만든 공장에서 제조한 된장의 유리아미노산을 분석한 결과로 total amino acid는 전북지역 메주로 만든 된장이 4,169.6 mg%으로 가장 높게 나타났으며, 다음으로는 경북(4,091.5 mg%)>강원 I(3,936.1 mg%)>전남(3,330.0 mg%) 순으로 총아미노산 함량을 나타내었다. 특히 된장 맛에 크게 관여하는 지미성분의 하나인 glutamic acid는 경북(499.4 mg%)>강원 I(433.5 mg%)>전남(355.1 mg%)>경기(325.3 mg%) 지역 된장 순으로 나타났고, 감미를 나타내는 아미노산인 alanine은 강원 I(766.4 mg%)>전북(701.8 mg%)>충북(419.2 mg%)>경북(362.4 mg%) 순으로 나타났다. 된장의 유리아미노산 종류별 함량은 전반적으로 leucine, alanine, glutamic acid, valine, aspartic acid의 함량은 높은 반면, tryptophan, methionine, serine, threonine의 함량은 비교적 낮은 편이었다. 이와 같은 결과는 된장 숙성중 유리아미노산 조성을 밝힌 Park 등(18), Kim 등(19), Lee(20)의 보고와 유사한 값을 나타내었다.

국내 지역별 메주로 만든 된장의 관능검사 결과

Table 3은 지역별 메주의 관능검사 결과를 나타낸 것이다. 색상의 품질은 경북지역의 메주가 4.2로 평가되었으며 다른 지역의 결과와 유의성(p<0.05) 있게 우수한 것으로 나타났다. 냄새 평가에 있어서는 전남 지역을 제외한 대부분 모든 지역의 메주가 양호한 것으로 나타났으며, 외관과 전체적인 품질에 있어서는 경북 지역의 메주가 각각 4.1, 4.0의 평점으로 타 지역메주에 비해 유의적(p<0.05)으로 가장 우수한 것으로 평가되었다. 이와 같이 메주와 된장분석 자료 등을 종합적으로 검토하여 볼 때, 총아미노산 함량은 전북, 경북, 강원 I의 된장들이 각각 4,169.6 mg%, 4,091.5 mg%, 3,936.1 mg%로 유의적인 차가 거의 없었지만, 된장 맛에 영향을 가

Table 3. Sensory evaluations of Meju collected from several regions

Regions	Color	Flavor	Appearance	Overall
Kyonggi	3.2 ^{c1)}	3.7 ^a	3.4 ^c	3.5 ^b
Kangwon I	3.5 ^b	3.6 ^{ab}	3.5 ^b	3.5 ^b
Kangwon II	3.6 ^b	3.6 ^{ab}	3.4 ^c	3.5 ^b
Chonnam	3.0 ^c	3.2 ^c	3.5 ^b	3.3 ^c
Kyongbuk	4.2 ^a	3.8 ^a	4.1 ^a	4.0 ^a
Chonbuk	3.2 ^c	3.5 ^b	3.6 ^b	3.4 ^c
Chungcheong	3.7 ^b	3.8 ^a	3.6 ^b	3.7 ^b

¹⁾The same superscripts in same row are not significantly different among group by Duncan's multiple range test in one way ANOVA (p<0.05).

장 크게 미치는 glutamic acid의 함량은 경북지역 된장이 가장 높았고 종합적인 관능평점도 4.0으로 경북지역의 메주가 가장 우수한 것으로 나타났다. 따라서 경북지역의 메주를 균주 선발용 시료로 사용하였다.

경북지역산 메주로부터 균주의 분리

된장의 유리아미노산 조성 및 메주의 관능특성 분석에서 가장 우수한 것으로 선발된 경북 지역의 메주로부터 1차적으로 총 46개의 균주를 분리하였으며, 그 중 형태학적으로 분포도가 높은 집락을 중심으로 균주 7종을 2차적으로 선발하였다. 선발된 7종의 균주를 알메주 제조공정과 같은 방법으로 제조한 후, 알 메주의 관능특성을 5점 척도 관능검사로 평가하여 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 7종의 균주 중 D균을 접종하여 만든 알메주의 종합적인 관능특성이 3.7로 다른 균주로 만든 알메주보다 유의성있게 좋은 것으로 평가되었다. 따라서 경북지역 메주에서 분리한 D 균주를 우수 균주로 선발하였다.

분리균주의 형태적, 생리적 특성

경북지역에서 분리한 D균의 형태학적 특성은 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 gram 양성, 호기성 간균이며 운동성이 있었

Table 2. Free amino acid contents of Doenjangs made from Meju collected from several regions (unit: mg%)

Amino acids	Chonbuk	Kyongbuk	Kangwon I	Kangwon II	Kyonggi	Chonnam	Chungcheong
Aspartic acid	296.7	484.2	114.7	158.2	237.1	373.6	302.4
Glutamic acid	288.3	499.4	433.5	246.3	325.3	355.1	196.9
Serine	184.9	290.3	ND ¹⁾	38.7	164.0	207.8	62.2
Glycine	221.2	254.0	239.5	111.5	167.5	110.8	170.9
Threonine	172.6	217.2	ND	92.0	119.9	138.0	138.2
Alanine	701.8	362.4	766.4	273.5	277.1	330.6	419.2
Tyrosine	87.0	193.1	363.8	124.0	216.9	225.5	101.3
Valine	421.8	414.5	458.7	154.2	232.0	308.6	318.4
Methionine	82.7	70.3	119.2	33.5	40.2	67.3	58.1
Tryptophan	183.0	ND	ND	ND	ND	ND	162.8
Phenylalanine	333.8	295.3	332.3	162.9	207.9	304.7	246.1
Isoleucine	305.8	282.3	354.8	108.0	156.1	205.7	190.1
Leucine	542.2	499.0	502.9	204.9	328.2	457.9	392.8
Lysine	347.8	229.5	250.3	104.7	152.7	247.2	228.0
Total	4,169.6	4,091.5	3,936.1	1,812.4	2,624.9	3,330.0	2,987.4

¹⁾ND: not detected.

Table 4. Sensory evaluations of Meju fermented by various strains isolated from Kyongbuk Meju

Meju samples	Color	Flavor	Appearance	Overall
A	3.4 ^{b1)}	3.5 ^b	3.1 ^b	3.3 ^b
B	3.1 ^c	3.2 ^c	3.0 ^b	3.1 ^b
C	3.2 ^c	3.4 ^c	3.5 ^a	3.3 ^b
D	3.8 ^a	3.8 ^a	3.5 ^a	3.7 ^a
E	3.2 ^c	3.5 ^b	3.2 ^b	3.3 ^b
F	3.0 ^c	3.1 ^c	3.2 ^b	3.1 ^b
G	2.8 ^d	2.7 ^d	3.2 ^b	2.9 ^c

¹⁾The same superscripts in each row are not significantly different among group by Duncan's multiple range test in one way ANOVA (p<0.05).

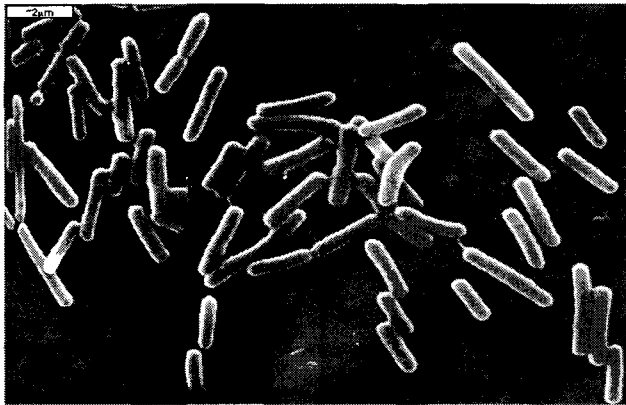


Fig. 2. Scanning electron microscopy of D strains isolated from Kyongbuk Meju (Magnification: ×7,500).

다. 생리적 특성을 알아보기 위해 API kit을 이용하여 당 대사를 분석한 결과, Table 5와 같이 49종의 당 중에서 glucose, fructose, galactose, glycerol, trehalose, glycogen 및 mannitol 등 28종이 양성반응으로 나타났으며, Bergey's 매뉴얼상의 *Bacillus* sp.의 특징과 일치하는 것을 알 수 있었다(15).

Table 5. Biological assimilation test by D strains isolated from Kyongbuk Meju

Carbon source	Growth	Carbon source	Growth
Glycerol	+ ¹⁾	Salicine	-
Erythritol	- ²⁾	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Saccharose	-
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	+
D-Fructose	+	Glycogen	+
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	+	D-Tagatose	+
Mannitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
Methyl-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-acetyl glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2-Ceto-gluconate	+
Arbutine	-	5-Ceto-gluconate	-
Esculine	+	Control	-

¹⁾+: positive, ²⁾-: negative.

분리균주의 지방산 조성

D균의 동정을 위해 미생물 동정시스템(microbial identification system, MIS)을 이용하여 지방산 분석을 행하여 그 결과를 Table 6에 나타내었다. 지방산의 조성은 주로 iso-branched fatty acid와 anteiso-branched fatty acid로 구성 되어 있었으며, C_{15:0} anteiso-fatty acid의 함량이 30.71%로 가장 높았으며, C_{15:1} iso-branched fatty acid는 28.92%, 그리고 C_{17:0} anteiso-branched fatty acid는 13.25%, iso-bran-

Table 6. The composition of cellular fatty acids produced by D strains isolated from Kyongbuk Meju

Retention time	Area	Area/Height	Name	%
6.530	854	0.034	14:0 ISO	0.65
7.040	728	0.033	14:0	0.55
7.990	38751	0.038	15:1 ISO	28.92
8.127	41199	0.038	15:0 ANTEISO	30.71
9.202	880	0.040	16:1 w7c alcohol	0.65
9.597	4968	0.040	16:0 ISO	3.66
9.811	2421	0.041	16:1 w11c	1.78
10.210	6381	0.042	16:0	4.69
10.877	3073	0.041	ISO 17:1 w10c	2.25
11.032	1745	0.043	Sum in feature 4	1.28
11.293	15349	0.039	17:0 ISO	11.22
11.451	18142	0.042	17:0 ANTEISO	13.25
12.933	3181	0.109	18:3 w6c (6,9,12)	0.00
13.672	532	0.032	18:0	0.39
			<i>Bacillus</i> sp. (unidentified strain isolated from Meju)	0.653
			<i>B. licheniformis</i> (identified strain by strain association)	0.653
			<i>B. subtilis</i> (identified strain by strain association)	0.391

ched fatty acid가 11.22%로 균체의 지방산 성분은 anteiso-branched fatty acid가 iso-branched fatty acid보다 다소 높은 함량을 나타내었다. 세포성 지방산 methyl ester 분석에 의한 identification coefficient가 0.6 이상일 경우 데이터베이스 속의 *Bacillus* 균종과 거의 완벽한 match를 이루어 매우 유용한 자료로서의 가치가 있으나 0.300보다 낮을 경우는 정확한 동정을 위한 자료로서 사용하기가 어렵다. 이를 한국 종균협회에 보관중인 2,000여 library의 표준균주와 비교하였을 때, 본 균주는 identification coefficient가 0.653으로서 *B. licheniformis*와 거의 같은 identification coefficient를 갖고 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서 분리한 D 균주의 형태학적 특성과 API kit를 이용한 생리적 특성 그리고 지방산 조성 등의 분석결과로부터 D 균주를 *B. licheniformis*로 동정하여 *B. licheniformis* NH20으로 명명하였다. Cho와 Lee(21), 그리고 Park과 Lee(22)는 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*가 메주에서 효소활성이 높다고 보고하였고, Shin 등(23) 또한 메주에서 protease역가가 우수한 균주로 *B. licheniformis*를 보고한 바 있으며, Kwon 등(11)은 *B. licheniformis*를 간장과 된장에서 우수 균주로 분리한 바 있다. 따라서 *B. licheniformis*가 한국 전통 장류에 있어서 보편적인 균주임을 알 수 있었으며, 본 실험에서도 관능적으로 우수한 메주로부터 균주를 분리, 동정한 결과로부터 간장에 맛을 내는 주 발효균은 *B. licheniformis*로 판단되었다.

***B. licheniformis* NH20의 최적 생육조건**

경북지역의 메주에서 선발한 균주 *B. licheniformis* NH20의 최적 생육온도를 측정하기 위해 온도를 달리하여 배양하면서 배양액의 O.D. 값을 측정한 결과를 Table 7에 나타내었으며, 32~35°C가 최적 생육온도 범위로 나타났다. 이것은 *B. licheniformis* 공시균주의 최적 생육온도가 30°C인 것과 비교하였을 때 2~5°C 정도의 차이가 있는 것으로 나타났다. 다음으로 pH가 *B. licheniformis* NH20의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과를 Table 8에 나타내었다. 생육 최적 초기 pH는 7.0~7.5이었고, pH 9.0 이상과 pH 5.0 이하에서는 생육이 급격히 저하되는 것으로 나타났다. 메주를 이용하여 간장 또

Table 7. The effect of temperature on the growth of *Bacillus licheniformis* NH20

Temp.	30°C	32°C	35°C	37°C	40°C
OD ¹⁾	0.67	1.05	1.03	1.02	0.89

¹⁾OD₆₆₀: Optical density at 660 nm.
Growth condition was showed at the materials and methods.

Table 8. The effect of pH on the growth of *Bacillus licheniformis* NH20

pH	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0
OD ¹⁾	0.00	0.76	1.04	1.23	1.42	1.33	0.96	0.79	0.08

¹⁾OD₆₆₀: Optical density at 660 nm.
Growth condition was showed at the materials and methods.

Table 9. The effect of NaCl concentration on the growth of *Bacillus licheniformis* NH20

Salt (%)	0	0.5	1	2	3	5	7	10
OD ¹⁾	1.02	1.11	1.17	1.21	1.20	0.84	0.03	0.00

¹⁾OD₆₆₀: Optical density at 660 nm.
Growth condition was showed at the materials and methods.

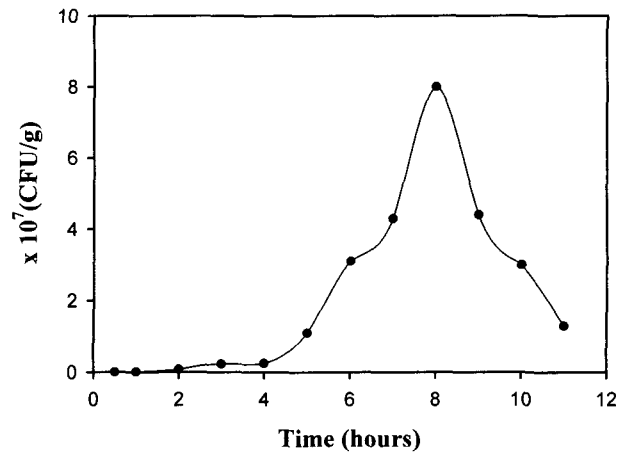


Fig. 3. Growth curve of *B. licheniformis* NH20 on the soybean extract medium.
Growth condition was showed at the materials and methods.

는 된장을 제조할 경우 식염을 첨가하게 되는데, 식염이 *B. licheniformis* NH20의 생육에 미치는 영향을 조사한 결과를 Table 9에 나타내었다. 즉, *B. licheniformis* NH20의 생육가능 염농도는 0~5%이었으며, 최적 염농도는 2~3%이었고, 7% 이상의 염 농도에서는 균의 증식이 어려운 것으로 나타났다.

***B. licheniformis* NH20의 최적 생육곡선**

B. licheniformis NH20 균주의 생육곡선은 Fig. 3에 나타낸 바와 같다. 초기 접종 후, 약 6시간이 지나면서 10⁷ CFU/g를 나타내었고 배양시간이 9시간 대에 8×10⁷ CFU/g으로 증식된 후 생육 최대치를 나타내었으며, 9시간이 지나면서 생균수가 서서히 감소하기 시작하였다. 따라서 *B. licheniformis* NH20 균주는 생육곡선에 나타낸 바와 같이 9시간 배양이 생육 최적조건이었다.

요 약

전국에 분포되어 있는 우수메주를 일반분석 및 관능평가를 통해 선발하고 선발된 메주의 우수 균주를 분리 동정하여 형태학적 생육특성을 조사하였다. 지역별 메주의 성분 분석 결과, 수분함량은 7.2~28.8%, 조단백질 함량은 32.7~42.3%의 범위를 나타내었다. 아미노태질소 함량은 경북지역의 메주가 770.8 mg%이었고, 전북지역 메주가 239.9 mg%로 가장 낮았다. 각 지역에서 생산된 메주로 만든 된장의 유리아미노산 함량은 전북 된장이 4,169.6 mg%, glutamic acid는 경북

이 499.4 mg%로 가장 높은 함량을 나타내었다. 그리고 메주의 관능검사 결과 경북지역에서 수거한 메주가 색상, 외관, 종합적 품질평가에서 타지역과 유의성($p < 0.05$) 있게 좋은 것으로 나타났다. 경북지역 메주에서 분리한 균의 형태학적 특성은 gram 양성, 호기성 간균이며 운동성이 있었다. 세포의 지방산 조성중 주요 성분의 함량은 $C_{15:0}$ anteiso 지방산이 30.7%, $C_{15:1}$ iso 지방산이 28.9%, $C_{17:0}$ anteiso 지방산이 13.3%, 그리고 $C_{17:0}$ iso 지방산이 11.2%를 나타내었다. 이 균주의 identification coefficient는 표준균주와 같은 0.653을 나타내었으며, Bergey의 매뉴얼과 지방산 profile에 따라서 분석한 결과 *B. licheniformis* NH20으로 동정되었다. *B. licheniformis* NH20의 최적 생육 온도는 32°C, 최적 초기 pH는 7.0, 최적 염도는 2%, 그리고 배양시간은 9시간이었다.

문 헌

1. Yang SH, Choi MR, Ji WD, Chung YG, Kim JK. 1994. The quality of *doenjang* (soybean paste) manufactured with *Bacillus brevis*. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 980-985.
2. Lee KH, Kim ND, Yoo JY. 1997. Survey on the manufacturing process of traditional *meju* for and of *kanjang* (Korean soy sauce). *J Korean Soc Food Nutr* 26: 390-396.
3. Park SK, Seo KI, Choi SH, Moon JS, Lee YH. 2000. Quality assesment of commercial *doenjang* prepared by traditional method. *J Korean Soc Food Nutr* 29: 211-217.
4. Kim GT, Hwang YI, Lim SI, Lee DS. 2000. Carbon dioxide production and quality changes in Korean fermented soybean paste and hot pepper-soybean paste. *J Korean Soc Food Nutr* 29: 807-813.
5. Kim SR, Huh DJ. 1954. Studies on improvement of traditional condiment (Research Report). National Defense and Science Institute. Vol 56, p 9277-9281.
6. Han YS, Park BD. 1957. Studies on the manufacturing of soysauce (part I); "*Aspergillus oryzae* from ordinary Meju and Gokja" In Research Report. Central Industrial Research Institute. Vol 7, p 51-56.
7. Jung YS. 1963. Microbiological studies of soysauce: identification and isolation of bacteria from traditional soysauce. *Korean J Microbiol* 1: 30-35.
8. Park KI, Kim KJ. 1970. Studies on manufacturing of the korean soysauce (part I) In Research Report. Central Industrial Research Institute. Vol 20, p 89-93.
9. Lee WJ, Cho DH. 1971. Microbiological studies of Korea native soysauce fermentation. *J Korea Agricultural Chemical Society* 14: 32-36.
10. Cho DH, Lee WJ. 1970. Microbiological studies of Korea native soysauce fermentation. *J Korea Agricultural Chemical Society* 13: 43-47.
11. Kwon OD, Kim JK, Jung YK. 1986. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soysauce and soybean paste. *J Korea Agricultural Chemical Society* 29: 47-51.
12. Shin HS. 1989. *Food Analysis* (Theory and Experiment). Shinkwong Press, Seoul. p 69-107.
13. Yonsei University. 1975. Engineering Division, Food Science and Technology, *Food Science and Technology Experiment*. Tamgudang, Seoul. p 725-727.
14. 日本醬類研究所. 1990. 試験法. 三雄舎印刷株式会社, 東京, 日本. p 140-150.
15. Butler JP. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Williams & Wilkins, Baltimore. Vol II, p 1104-1113.
16. MacFaddin JF. 1980. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. Williams & Wilkins, Baltimore. p 36.
17. Miller LT. 1982. Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acid. *J Clin Microbiol* 18: 861-867.
18. Park TW, Hwang KS, Park SW, Kim SH. 1959. A study on soybean paste (part III); change of free amino acid contents during aging process. *Kwayonshuibo* 4: 31-36.
19. Kim SY, Lee KD, Kim MH, Yoo CK. 1968. Investigation on amino acid contents of soybean paste. *Modern Medicine* 9: 183-190.
20. Lee CH. 1973. Studies on the amino acid composition of Korean fermented soysauce Meju products and the evaluation of the protein quality. *Korean J Food Sci Technol* 5: 210-215.
21. Cho DH, Lee WJ. 1970. Microbiological studies of Korea native soysauce fermentation: fermentation microorganism of Korea native soysauce Meju. *J Korea Agricultural Chemical Society* 13: 33-42.
22. Park SO, Lee TS. 1983. Studies on flavor components of traditional soybean paste by yeast addition. Collection of Papers, Seoul Women's University. Vol 12, p 329-334.
23. Shin YS, Kim YB, Yoo TJ. 1985. Taste improvement of soybean paste by addition of *Bacillus licheniformis* and *Saccharomyces rouxii* Korean. *J Food Sci Technol* 17: 8-14.

(2003년 4월 25일 접수; 2003년 7월 24일 채택)