

연구노트

전통간장으로부터 분리한 *Cladosporium* sp.과 *Sterigmatomyces* sp. 미생물의 동정 및 NaCl 농도에 따른 미생물 효소활성 분석

이남근^{1,2} · 류영준¹ · 여인철¹ · 박성준¹ · 권기옥² · 차창준¹ · 함영태^{1*}

¹중앙대학교 생명공학과, ²(주)상촌식품

Identification of Microorganisms, *Cladosporium* sp. and *Sterigmatomyces* sp., Proliferated on the Surface of Traditional Soy Sauce, and the Effect of NaCl Concentration on Their Enzymatic Activity

Nam Keun Lee^{1,2}, Young Jun Ryu¹, In-Cheol Yeo¹, Sung-Joon Park, Ki Ok Kwon², Chang-Jun Cha¹, and Young Tae Hahm^{1*}

¹Department of Biotechnology (BK21 program), Chung-Ang University
²Sangchon Food Product

Abstract Two strains, traditionally referred to as rock flower (*Bawhi-kot*) and buckwheat flower (*Memil-kot* or *Chile-Kot*), were isolated from stored traditional soy sauce and were identified by using the 18S ITS1/4 region sequences. The rock flower strain showed 99% of similarity with *Cladosporium* sp. and buckwheat flower strain was 99% identical with yeast *Sterigmatomyces halophilus*. Both strains were tentatively named *Cladosporium* sp. NK1 and *Sterigmatomyces halophilus* NK2, respectively. The optimal growth pHs and temperatures of both strains in a YPD broth medium were in the range of pH 5.0 to 7.0 and 22 to 27°C. Both strains were able to grow in more than 20% of NaCl. In the enzyme activity assay, high protease activity of *Cladosporium* sp. NK1 and *S. halophilus* NK2 were obtained in YPD containing 10% of NaCl. High amylase activities of both stains were in 15% and 5% of NaCl, respectively. Lipase activity was, however, not detected in both strains.

Keywords: rock flower, buckwheat flower, soy sauce, *Cladosporium* sp., *Sterigmatomyces halophilus*

서 론

간장은 우리나라에서 오랜 세월 동안 가정의 대표적인 조미식품으로 사용되어 왔으며, 꾸준한 연구를 통해 간장에는 항산화, 항암, 항고혈압 등에 효과가 있는 기능성 물질인 펩타이드, 갈변 물질, 이소플라본과 같은 폴리페놀 화합물이 확인되면서 최근에는 조미식품뿐만 아니라 기능성 식품으로의 가능성이 보고되고 있다(1,2). 간장의 향미 및 기능성 물질들은 발효 및 숙성과정에 따라 변화되며, 이러한 간장의 품질변화는 발효미생물들이 주요하게 작용하고 있다.

전통간장의 발효 및 숙성과정에 관여하는 주요 미생물은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus halophilus*, *Rhodotorula flava*, *Staphylococcus vitulus*, *Torulopsis datila*, 및 *Zygosaccharomyces rouxii*

등이 보고되어 있으며 이러한 미생물들은 대부분 메주로부터 기인된 것이다(3-5). 이와 같은 간장발효 미생물 연구는 간장의 품질을 향상하기 위한 방법 중에 하나로 종균에 대한 연구로 이어졌으며(6,7), *Z. rouxii*를 이용한 한식간장 제조공정 개선에 대한 연구에서 기존의 한식간장(총 질소 함량이 0.80%, 순 추출물 6.0% 이상)보다 저염화된 우수한 품질의 간장(1.2 kg 메주/15.5% 5L 소금물, 30°C에서 60일 발효)을 개발한 바 있다(7). 그러나 비록 한식간장이 양조간장에 비해 기능성 면에서 좋다 할지라도 여전히 식염 농도, 총 질소 함량, 발효기간, 및 향미 등의 문제로 양조간장보다 소비자의 기호도가 낮은 실정이다.

간장의 품질은 메주로부터 기인되는 발효 미생물들에 의해 주로 결정되지만 발효숙성 과정 중에 발생하는 미생물에 의해서도 영향을 받는다. 특히 발효숙성 중인 한식간장 표면에 녹흑색의 곰팡이 또는 흰색 곰팡이가 발생한 것을 볼 수 있는데 이는 오래전부터 바위꽃과 메밀꽃으로 각각 불리고 있으며, 이들이 발생한 간장은 맛이 좋다고 한다. 이런 관점에서 볼 때 간장의 품질을 향상시키기 위한 전통 발효숙성 미생물로서의 활용 가치가 있는 중요한 유전자원이라 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 아직 보고되지 않은 재래식 간장 숙성 미생물인 바위꽃과 메밀꽃 미생물을 분리동정하고 간장의 품질을 결정하는 효소들을 NaCl 농도별로 분석함으로써 향후 한국장류의 연구를 위한 기초자료로 제공하고자 한다.

*Corresponding author: Young Tae Hahm, Department of Biotechnology (BK21 program), Chung-Ang University, Anseong, Gyeonggi 456-756, Korea

Tel: 82-31-670-3064

Fax: 82-31-675-0406

E-mail: ythahm@cau.ac.kr

Received February 9, 2012; revised May 24, 2012;

accepted May 24, 2012

재료 및 방법

균주의 분리

바위꽃과 메밀꽃 미생물을 분리하기 위하여 경기 용인시 (주) 상촌식품에서 전통방식으로 숙성되고 있는 한식간장들을 이용하였다. 균 분리를 위하여 바위꽃과 메밀꽃이 발생한 항아리를 선별 한 후 균주의 표면을 멸균된 퓌를 이용하여 조심스럽게 채취하고 미리 준비된 yeast peptone dextrose (YPD) (BD Biosciences, Sparks, MD, USA) 고체배지에 접종하였다. YPD에 접종된 미생물은 37°C에서 5일 동안 배양하였으며, 이후 순수분리가 될 때까지 YPD 고체배지를 이용하여 계대배양을 실시하였다.

분리 균주들의 동정

바위꽃과 메밀꽃 미생물 동정은 18S rDNA ITS1/4 지역의 염기서열 분석으로 하였으며, 분석은 (주)솔젠트(Daejeon, Korea)에 의뢰하였다. PCR 및 sequencer는 각각 ABI 9700 PCR(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)과 ABI 3730XL DNA Analyzer(Applied Biosystems, USA)가 사용되었다. 분석된 바위꽃과 메밀꽃 미생물의 18S rDNA ITS1/4 지역의 염기서열과 GenBank로부터 얻은 유사성이 높은 염기서열을 Clustal W multiple alignment를 이용하여 정렬 후 계통학적 분석(phylogenetic analysis)을 실시하였다. 계통학적 분석은 Neighbor-Joining(8)을 이용하여 분석하였다. 진화적 거리는 Jukes-Cantor법을 이용하였으며, 1,000번의 재샘플링을 통하여 부트스트랩 값을 분석하였다. 이 같은 계통학적 분석에는 MEGA5 소프트웨어 프로그램을 이용하여 분석하였다.

온도, pH 및 NaCl 농도에 따른 생장 특성

온도에 따른 생장은 배양기의 온도를 22, 27, 32, 37°C로 맞춘 후 50 mL YPD 액체배지에 균을 50 µL씩 접종하고 5일 동안 180 rpm으로 교반 배양하면서 생장을 측정하였다. pH에 따른 생장 측정은 1 N HCl 및 NaOH를 이용하여 50 mL YPD 액체배지를 각각 pH 4, 5, 6, 7, 8로 맞춘 후 온도에 따른 생장 측정과 동일한 조건으로 생장 측정을 수행하였다. NaCl 농도에 따른 생장 측정에 있어서는 5, 10, 15, 20% NaCl이 각각 첨가된 50 mL YPD 액체 배지에 균을 50 µL씩 접종하고 180 rpm으로 25°C에서 5일 동안 교반 배양된 배양액으로 측정하였다.

효소활성 측정

분리된 미생물들의 효소활성 측정을 위한 시료로 5, 10, 15, 20% NaCl이 각각 첨가된 50 mL YPD 액체 배지에서 180 rpm으로 5일 동안 배양된 바위꽃과 메밀꽃 미생물의 상등액(12,000×g, 4°C, 20 min)을 이용하였다. 효소활성 측정에 있어서 protease 및 amylase 활성은 Park 등(9)의 방법에 따라 측정하였다. Protease 효소 활성 1 unit은 분당 1 µg tyrosine의 전환량으로 정의하였으며, amylase 효소 활성 1 unit은 분당 1% soluble starch의 감소량으로 정의하였다.

Lipase 효소활성 측정은 Kwon과 Rhee(10)의 방법을 변형하여 수행하였다. 0.3 mL 기질(5% olive oil(v/v), 5% gum arabic(w/v), 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0)과 0.2 mL 효소액을 혼합 후 250 rpm으로 교반하면서 37°C에서 30분 동안 반응하고, 0.2 mL 에탄올:아세톤(1:1, v/v)과 1 mL 이소옥탄 용액을 첨가하여 반응을 종결하였다. 이 후 종결 반응액에 0.2 mL copper 염색 시약을 첨가하고 강하게 교반한 다음 12,000 rpm으로 3분간 원심 분리하여 0.8 mL 상등액을 얻었다. 효소 활성 측정은 얻어진 상

등액을 사용하여 715 nm에서 측정하였다. 효소 활성 1 unit은 분당 0.01 흡광도 증가량으로 정의하였다.

관능평가

바위꽃과 메밀꽃 미생물 균주로 숙성된 간장의 품질을 평가하기 위하여, 된장에서 바로 가른 간장에 각 균주 0.2%를 접종하고, 실온에서 15일 동안 숙성시킨 후 (주)상촌식품 장류 식품명인 및 종사자와 중앙대 생명공학과 대학원생으로 구성된 패널들(9명)을 대상으로 관능평가를 실시하였다. 평가항목은 색, 향미, 맛, 선호도에 대하여 5점 척도법(아주 양호 5점, 양호 4점, 보통 3점, 나쁜 것 2점, 현저히 나쁜 것 1점)을 사용하였다.

통계처리

NaCl 농도에 따른 효소활성 측정 및 관능평가 결과는 SPSS program(ver, 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 이용하여 ANOVA 분산분석 후 유의차가 있는 경우, 다중비교법인 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

항아리에서 숙성 중인 한식간장의 표면에 발생한 바위꽃과 메밀꽃 미생물들을 순수 분리하여 형태를 관찰한 결과, 바위꽃 미생물은 심한 주름 및 분생포자를 형성하였으며, 균체색은 한식간장 표면에 발생한 바위꽃 미생물 색인 녹흑색과 같았다(Fig. 1A, B). 메밀꽃 미생물은 처음에는 광택이 없는 흰색의 콜로니를 형성하였다가 점차 연노란색으로 변화되었으며(Fig. 1C), 효모와 유사한 형태로서 서로 뭉쳐져 생장하였다(Fig. 1D). 이 미생물들의 18S rDNA ITS1과 ITS4 지역의 염기서열을 분석한 결과 바위꽃 미생물은 *Cladosporium* 종들과 99%의 유사성이 있었으며 대부분은 *C. sphaerospermum*이었다. 특히 *Cladosporium* 종들 중 *C. sphaerospermum*(EU570258), *C. cucumerinum*(HM148071), *C. lignicola*(AF393709)와는 바위꽃 미생물의 분석된 염기서열 502 bp 중 501 bp가 일치하였다(Fig. 2A). 메밀꽃 미생물은 *Sterigmatomyces halophilus*(AF444556)과 99%의 유사성을 보였으며, 메밀꽃 미생물의 분석된 염기서열 587 bp 중 583 bp가 일치하였다(Fig. 2B). 이러한 염기서열 분석에 따른 계통학적 분류 결과에 의해 바위꽃과 메밀꽃 미생물을 각각 *Cladosporium* sp. NK1과 *Sterigmatomyces halophilus* NK2로 명명하였다.

Cladosporium spp.과 *S. halophilus*는 주로 높은 염농도의 물에

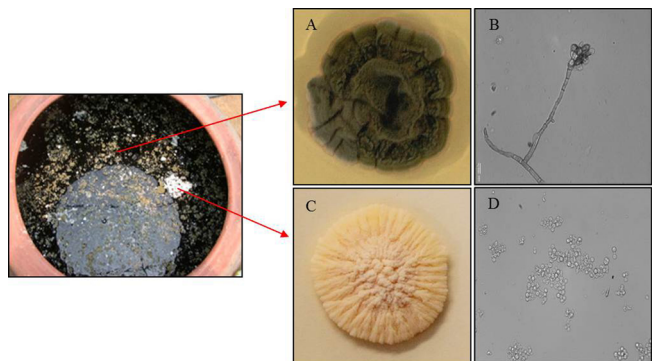


Fig. 1. Colony and microscopic morphology of rock flower (*Bawhi-kot*) and buckwheat flower (*Memil-kot*). A and B, colony and microscopic of rock flower; C and D, colony and microscopic morphology of buckwheat flower.

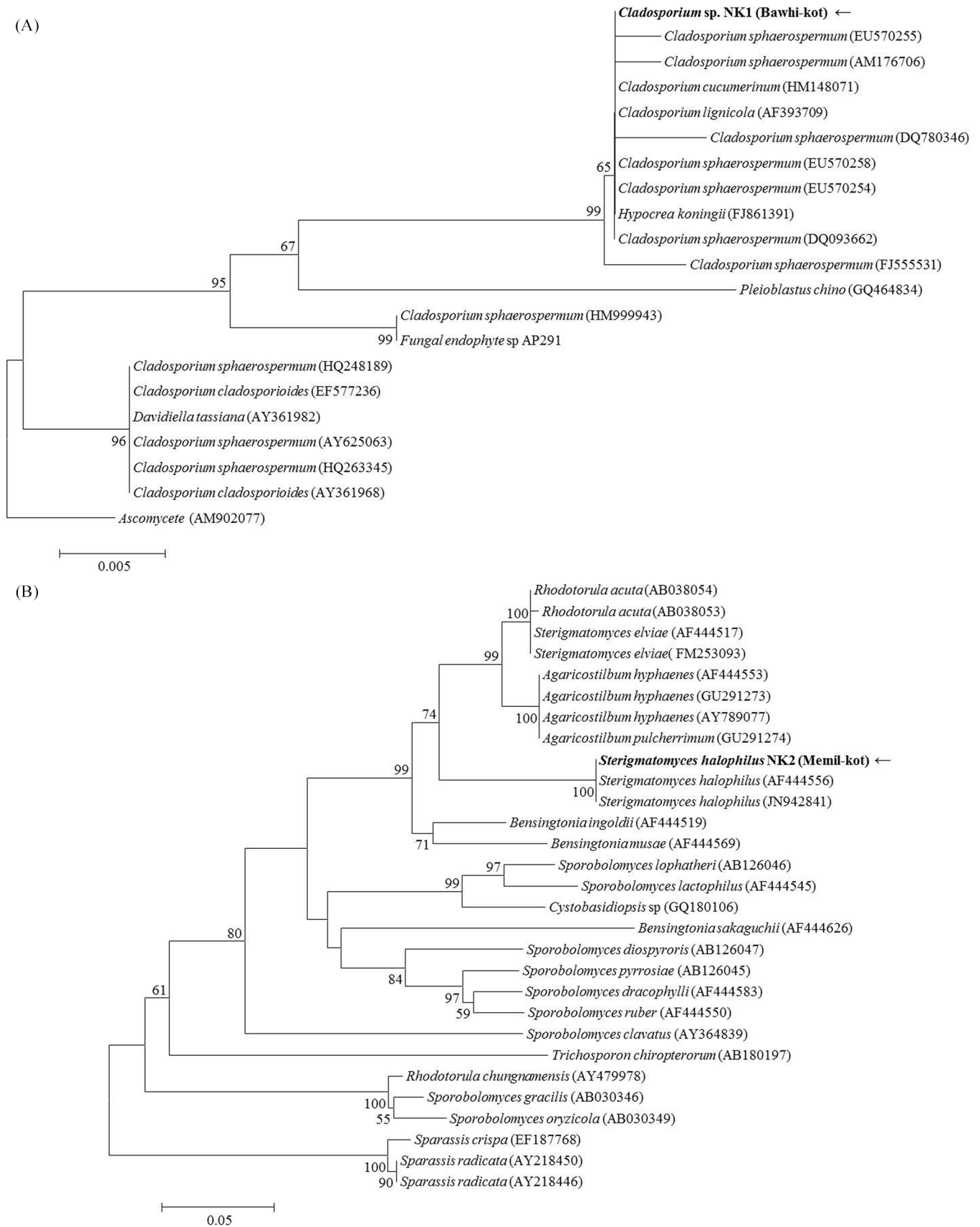


Fig. 2. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 18S rDNA ITS1/4 region gene sequences of rock flower (*Bawhi-kot*) and buckwheat flower (*Memil-kot*). A, rock flower; B, buckwheat flower. Bootstrap percentages over 50% (based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled datasets) are shown at nodes. Bar, 0.005 and 0.05 nucleotide substitutions per position.

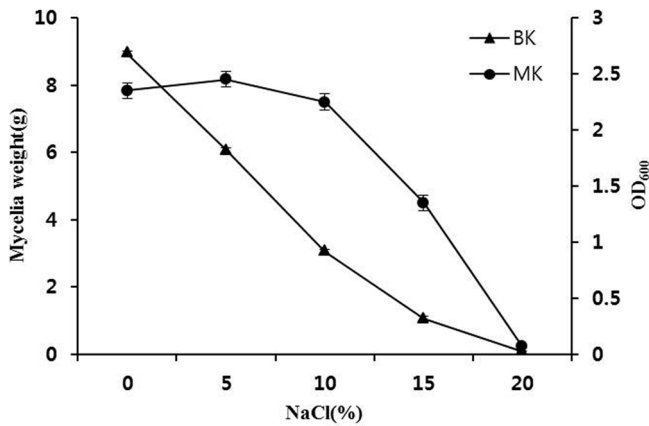


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the cell growth of *Cladosporium* sp. NK1 and *Sterigmatomyces halophilus* NK2. BK, *Cladosporium* sp. NK1 (*Bawhi-kot*); MK, *S. halophilus* NK2 (*Memil-kot*).

서 분리되고 있으며, *Cladosporium* 종들 중 *C. sphaerospermum* 은 콩 근류 곰팡이로써 식물의 성장과 관련이 있는 균주로 보고 되어 있고(11), *S. halophilus*는 된장에서 분리된 바 있다(12). 이의 *Cladosporium* spp.과 *S. halophilus*에 관련된 연구는 주로 계통학적 분류 연구가 수행되었다(13-15).

Cladosporium sp. NK1과 *S. halophilus* NK2의 YPD 액체 배지를 이용한 최적 성장 pH는 각각 pH 6과 pH 5-7이었으며, 성장 최적 온도는 각각 22-27°C와 22°C였다(data not shown). NaCl 농도에 따른 생장에 있어서 *Cladosporium* sp. NK1은 NaCl를 첨가하지 않은 YPD 액체배지에서 가장 잘 성장하였으며, NaCl 농도가 높아질수록 생장이 급격하게 감소하였다(Fig. 3). *S. halophilus* NK2는 10% NaCl이 첨가된 YPD 액체배지까지 매우 잘 성장하여 *Cladosporium* sp. NK1 보다는 내염성 균주임을 확인 할 수 있었다(Fig. 3).

NaCl 농도를 달리한 *Cladosporium* sp. NK1과 *S. halophilus* NK2의 생장에 따른 protease, amylase, lipase 효소활성에 있어서 두 균주의 protease 효소활성(Fig. 4A)은 모두 10% NaCl이 첨가된 YPD 배양액 시료(26.65±5.86과 31.25±1.76 U/mg protein)에서 가장 높은 protease 활성을 보여 주었으며 다른 NaCl이 첨가된 시료와 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$). *Cladosporium* sp. NK1과 *S. halophilus* NK2의 전체적인 활성은 10% NaCl 농도까지 활성이 점차 증가하다가 급격하게 감소하였고, 두 미생물간 NaCl 농도에 따른 protease 활성은 유의적 차이를 보이지 않았다.

Amylase 활성에 있어서 *Cladosporium* sp. NK1은 15% NaCl이 첨가된 YPD 배양액 시료에서 가장 높은 amylase 활성(4,583±117.37 U/mg protein)을 보였으며 다른 NaCl이 첨가된 배양액 시료와도 유의적 차이를 보였다($p < 0.05$)(Fig. 4B). 이외의 0, 5, 10, 20% NaCl 첨가된 배양액 시료에서는 3,166-4,083 U/mg protein 범위 내에서 활성이 측정되었으며 시료들간 유의적 차이

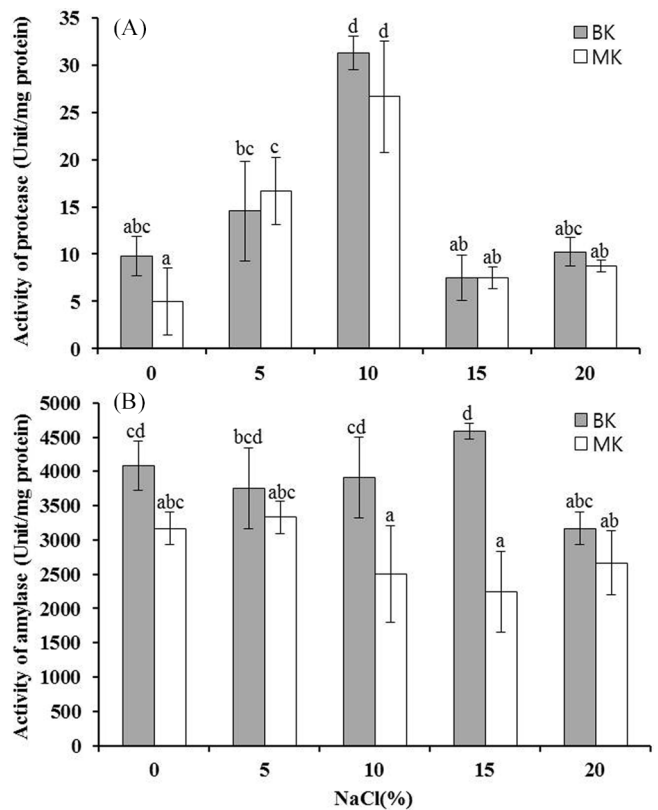


Fig. 4. Effect of NaCl concentration on enzyme activities of *Cladosporium* sp. NK1 and *Sterigmatomyces halophilus* NK2. A, protease activity of *Cladosporium* sp. NK1 and *S. halophilus* NK2; B, amylase activity of *Cladosporium* sp. NK1 and *S. halophilus* NK2; BK, *Cladosporium* sp. NK1 (*Bawhi-kot*); MK, *S. halophilus* NK2 (*Memil-kot*).

는 없었다. *S. halophilus* NK2의 amylase 활성은 *Cladosporium* sp. NK1 보다는 낮았으며, 2,249-3,333 U/mg protein 범위 내에 있었다. 가장 높은 amylase 활성을 보인 것은 5% NaCl이 첨가된 배양액 시료였으나 각 시료간 amylase 활성에 대한 유의적 차이는 보이지 않았다. Lipase 활성에 있어서는 *Cladosporium* sp. NK1과 *S. halophilus* NK2 모든 균주들에서 활성을 확인할 수 없었다.

NaCl 농도별 cell 생산량(Fig. 3)과 효소활성(Fig. 4A)을 비교했을 때, 효소활성은 두 균주 모두 cell 생산량 보다는 NaCl 농도에 따라 영향을 받으며, protease 활성이 amylase 활성 보다는 NaCl에 대한 영향을 크게 받는 것으로 사료된다. 이와 유사한 결과로는 한국재래간장에서 분리한 *B. amyloliquefaciens*의 혈전용해 효소활성이 cell 생산량보다는 NaCl 농도에 따라 영향을 받는다는 보고에서도 볼 수 있다(16).

분리된 두 균주로 간장을 숙성하였을 경우 균이 접종되지 않은 간장, *Cladosporium* sp. NK1이 접종된 간장, 그리고 *S. halo-*

Table 1. Sensory evaluation of soy sauces produced with *Cladosporium* sp. NK1 and *S. halophilus* NK2

Sample	Brown Color	Flavor	Taste	Overall acceptability
Regular soy sauce	3.15±0.21 ^a	3.05±0.07 ^b	2.95±0.07 ^c	2.85±0.07 ^b
Soy sauce NK1 (<i>Cladosporium</i> sp. NK1)	2.85±0.21 ^b	3.15±0.07 ^b	3.55±0.07 ^a	3.50±0.14 ^{ab}
Soy sauce NK2 (<i>S. halophilus</i> NK2)	3.00±0.00 ^{ab}	3.60±0.14 ^a	3.30±0.00 ^b	3.18±0.28 ^a

Means with the same letter in each superscript are not significantly different ($p < 0.05$).

philus NK2이 접종된 간장 사이 색, 향미, 맛, 선포도의 관능검사 결과, 15일 숙성 만으로는 품질에 큰 변화는 없었지만 *Cladosporium* sp. NK1 균주는 간장의 맛에서, *S. halophilus* NK2는 향미에서 가장 높은 점수를 받았으며 각 시료간 유의적 차이를 보였다(Table 1).

결론적으로 숙성중인 한식간장 표면으로부터 분리된 *Cladosporium* sp. NK1과 *S. halophilus* NK2는 높은 NaCl에서도 효소활성이 유지되며 또한 간장의 향미에 영향을 주는 균주로 확인되어 향후 간장을 발효 및 숙성시키기 위한 우수한 균주 개발의 기초 자료로 사용이 기대된다.

요 약

전통방식으로 숙성되고 있는 한식간장의 표면으로부터 분리된 바위꽃과 메밀꽃이라 불리는 미생물을 18S rDNA ITS1과 ITS4 지역의 염기서열을 분석한 결과, 각각 *Cladosporium* 종들과 *S. halophilus*의 염기서열과 높은 상동성을 보였다. 이에 따라 바위꽃 미생물은 *Cladosporium* sp. NK1로, 메밀꽃 미생물은 *S. halophilus* NK2로 명명하였다. YPD 액체 배지를 이용한 최적 생장 pH와 온도에 있어서 *Cladosporium* sp. NK1은 각각 pH 6과 22-27°C였고, *S. halophilus* NK2는 각각 pH 5-7과 22°C였다. *Cladosporium* sp. NK1은 NaCl을 첨가하지 않은 YPD 액체배지에서 가장 잘 성장하였으나, protease 및 amylase 효소활성에 있어서는 각각 10%와 15% NaCl이 첨가된 YPD 배양액 시료에서 가장 높았다. *S. halophilus* NK2는 10% NaCl이 첨가된 YPD 액체배지가 지 매우 잘 성장하였으며, protease 활성은 10% NaCl이 첨가된 YPD 배양액 시료에서, amylase 활성은 5% NaCl이 첨가된 배양액 시료에서 가장 높았다. *Cladosporium* sp. NK1과 *S. halophilus* NK2의 lipase 활성은 보이지 않았다. 간장의 관능평가 결과 *Cladosporium* sp. NK1 균주는 간장의 맛에서, *S. halophilus* NK2는 향미에서 유의적 차이를 보였다.

감사의 글

본 연구는 2011년도 농림수산식품부 식품기술개발사업에 의해 이루어진 연구결과로, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Moon GS, Cheigh HS. Antioxidative characteristics of soybean sauce in lipid oxidation process. Korean J. Food Sci. Technol. 19: 537-542 (1987)
2. Kim JS, Kim HO, Moon GS, Lee YS. Comparison of characteristics between soy sauce and black soy sauce according to the ripening period. J. East Asian Soc. Dietary Life 18: 981-988 (2008)
3. Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 27: 113-117 (1999)
4. Cho DH, Lee WJ. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation: A study on the microflora of fermented Korean maeju loaves. J. Korean Agr. Chem. Soc. 13: 35-42 (1970)
5. Lee WJ, Cho DH. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation: A study on the microflora change during Korean native soy-sauce fermentation. J. Korean Agr. Chem. Soc. 14: 35-42 (1971)
6. Kwon DJ, Ha DM. The effect salt concentrations on the production of volatile organic acids by *Zygosaccaromyces rouxii*, a soy sauce yeast. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 120-125 (1994)
7. Yoo JY, Kim HG, Kwon DJ. Improved process for preparation of traditional *ganjang* (Korean-style soy sauce). J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27: 268-274 (1998)
8. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425 (1987)
9. Park JW, Lee NK, Kim BY, Kim HK, Kwon KO, Hahn YT. Characterization of traditionally fermented Korean soybean paste, *eoyukjang*, and isolation of its microorganisms. Food Sci. Biotechnol. 19: 425-430 (2010)
10. Kwon DY, Rhee JS. A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay. J. Am. Off. Chem. Soc. 63: 89-92 (1986)
11. Hamayun M, Khan SA, Ahmad N, Tang DS, Kang SM, Na CI, Sohn EY, Hwang YH, Shin DH, Lee BH, Kim JG, Lee JJ. *Cladosporium sphaerospermum* as a new plant growth-promoting endophyte from the roots of *Glycine max* (L.) Merr. World J. Microbiol. Biot. 25: 627-632 (2009)
12. Kim TW, Lee JH, Kim SE, Park MH, Chang HC, Kim HY. Analysis of microbial communities in *doenjang*, a Korean fermented soybean paste, using nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. Int. J. Food Microbiol. 131: 265-271 (2009)
13. Zalar P, Hoog GS, Schroers HJ, Crous PW, Groenewald JZ, Gunde-Cimerman N. Phylogeny and ecology of the ubiquitous saprobe *Cladosporium sphaerospermum*, with descriptions of seven new species from hypersaline environments. Stud. Mycol. 58: 157-183 (2007)
14. Fell JW. *Sterigmatomyces*, a new fungal genus from marine areas. Anton. Leeuw. Int. J. G. 32: 99-104 (1966)
15. Guého E, Kurtzman CP, Peterson SW. Phylogenetic relationships among species of *Sterigmatomyces* and *Fellomyces* as determined from partial rRNA sequences. Int. J. Syst. Bacteriol. 40: 60-65 (1990)
16. Yun GH, Lee ET, Kim SD. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus amyloliquefaciens* K42 isolated from Korean soy sauces. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 31: 284-291 (2003)