

연구노트

DGGE 방법과 배양법을 이용한 강원지역 전통 발효 청국장에서 미생물의 다양성 분석

홍성욱 · 임인규¹ · 김용우¹ · 신승미² · 정진섭^{1*}

농촌진흥청 국립축산과학원, ¹연세대학교 생명과학기술학부, ²청운대학교 호텔조리식당경영학과

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Culture-based Analysis of the Bacterial Community in *Cheonggukjang*, a Korean Traditional Fermented Soybean Food from Gangwon Province

Sung Wook Hong, In Kyu Lim¹, Yong Woo Kim¹, Seung-Mee Shin², and Kun Sub Chung^{1*}

National Institute of Animal Science, RDA

¹Division of Biological Science and Technology, Yonsei University

²Department Hotel Culinary and Catering Management, Chungwoon University

Abstract Bacterial communities derived from *cheonggukjang* and raw rice straw collected from a Mireuksan farm and a Heungup *cheonggukjang* in Gangwon province were investigated using both culture-based method and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis. Pure cultures, which were isolated from raw rice straw and *cheonggukjang* and cultured on tryptic soy agar plates (53-76 colonies per plate), were identified by analysis of 16S rRNA sequences. The traditional culture-based method and analysis of PCR-amplified 16S rRNA by DGGE revealed that for samples collected from the Mireuksan farm, *Pantoea agglomerans* and *Bacillus subtilis* were the predominant species in the raw rice-straw and *cheonggukjang*, respectively. For samples collected from the Heungup *cheonggukjang*, *Bacillus amyloliquefaciens* was the predominant species in both raw rice straw and *cheonggukjang*. Other microorganisms, including members of *Pantoea*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, and *Acinetobacter*, were also present in the raw rice-straw and *cheonggukjang*, as were bacteria that could not be cultured.

Keywords: bacterial community, *cheonggukjang*, pure culture, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

서 론

한국 전통 청국장은 메주콩을 10-20시간동안 더운 물에 불렀다가 물을 붓고 푹 끓여 익힌 다음, 볏짚을 첨가하여 40-45°C에서 2-3일간 발효하여 제조하고 있다. 청국장은 주로 볏짚 유래의 *Bacillus* 속과 같은 미생물에 의해서 제조되는 것으로 알려져 있는데 발효·숙성하는 과정 중에 발효미생물이 생산하는 protease 효소의 작용으로 단백질이 가수분해되어 peptide와 amino acid 등이 생성되어 소화하기 쉽고 영양적인 측면에서 효율이 높은 대두발효 식품이다. 쌀을 주식으로 하는 우리나라에서 청국장은 부족하기 쉬운 단백질과 지방의 중요한 공급원이며 된장과 비교하여 속성으로 발효시키고 간단히 제조할 수 있기 때문에 널리 이용해 왔다(1).

청국장의 발효과정 중에 생성되는 각종 생리활성 물질은 혈압

상승 억제효과(2), 면역증강(3), 항돌연변이(4), 항암효과(5), 항산화효과(6), 항균효과(7) 및 혈전용해능(8) 등과 같은 기능성을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 끈끈한 점질물 성분인 poly- γ -glutamate와 fructan이 생리활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(9). 청국장의 품질은 발효에 관여하는 미생물의 종류에 따라 다르며 청국장에서 분리한 미생물로는 *Bacillus subtilis*(10), *B. licheniformis*(11), *B. pumilus*(12), *B. amyloliquefaciens*(13) 등이 알려져 있다. Kwon 등(14)은 비배양방법인 randomly amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-DNA) 분석을 통해 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 등과 같은 청국장 발효미생물을 신속하게 동정하였다.

비배양방법 중에서 denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 방법에 의한 미생물의 동정은 생물체가 지니고 있는 유전자 중 보존적 결합서열(conserved region)을 확인 및 비교하여 동정하는 방법으로 배양법으로는 분리가 어려운 미생물까지도 동정이 가능하기 때문에 발효 미생물상 군집의 유전적 다양성을 규명할 수 있는 장점이 있다. DGGE 방법의 원리는 샘플에 포함되어 있는 미생물의 DNA를 분리한 후, universal primer를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR) 증폭시킨 다음, 증폭되어진 동일한 크기의 PCR 산물을 denaturing gradient gel에서 전기영동을 하면 시료가 이동되는 동안 각기 다른 농도의 urea와 formamide에 노출된다. 이때 이중나선의 DNA가 단일가닥으로 전환된

*Corresponding author: Kun Sub Chung, Division of Biological Science and Technology, Yonsei University, Wonju, Gangwon 220-710, Korea

Tel: 82-33-760-2252

Fax: 82-33-760-2183

E-mail: kschung@yonsei.ac.kr

Received January 8, 2013; revised May 6, 2013;

accepted May 6, 2013

다. 이렇게 전환되어지는 비율은 염기서열내의 G+C 함량 비율에 따라 달라지며, 같은 염기서열을 가진 DNA가 gel 상의 특정 위치에서 band 형태로 나타나게 되는 것이다. 이 방법은 적은 DNA 양으로도 PCR로 증폭함으로써 미생물 군총의 다양성을 더 정밀하게 조사할 수 있으며, 염기서열 분석을 통한 종 유사도의 확인과 우점종 분석이 가능하다(15).

본 연구에서는 전통적인 방법으로 제조한 청국장과 벗짚으로부터 배양방법을 사용하여 발효미생물을 분리 및 동정하고 동시에 비배양방법인 DGGE 방법을 이용한 청국장의 발효미생물 군집의 분포를 조사하여 배양방법에 의한 미생물 군집조사의 한계점을 보완하고 청국장 발효미생물 군집에 대한 기초자료를 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

청국장 시료

본 실험에서 사용된 청국장과 벗짚 시료들은 한국 전통식 방법으로 제조하고 있는 미륵산농원(Wonju, Korea)과 흥업토속 청국장(Wonju, Korea)에서 각각 구입하여 실험에 사용하였다.

미생물의 분리 및 동정

벗짚과 청국장 시료를 각각 취하여 멸균 생리식염수에 1:9 비율로 혼합한 후, homogenizer (Stomacher 400, Seward, England)를 사용하여 10분 동안 균질화한 후, 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액을 멸균 생리식염수로 십진희석한 후 tryptic soy agar (TSA; Difco, Detroit, MI, USA) plate에 100 µL씩 도말하여 37°C에서 18시간동안 배양한 후에 미생물 집락의 형태에 따라 서로 다른 미생물을 분리하였다. TSA plate당 100개 colony 정도가 얻어진 plate의 미생물은 모두 순수분리한 후, 16S rRNA 동정을 수행하였다.

시료의 genomic DNA 추출 및 PCR 증폭

미생물 분리에 사용한 현탁액을 원심분리(13,000×g, 10 min)하여 균체를 취하고 멸균된 생리식염수에 균체를 2회 세척한 후, DNeasy tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 16S rRNA gene 증폭을 위하여 GC clamp (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGG CACGGGGG-3')가 부착된 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')와 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') primer를 이용하였다 (16). PCR 반응시 Takara Perfect Premix (0.4 mM dNTP, 0.5 units Taq polymerase, 4 mM Mg²⁺이 함유된 PCR buffer) 10 µL에 DNA template (20 µg/mL) 1 µL, forward와 reverse primer (1.0 µM)를 각각 1 µL씩 넣고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 20 µL가 되도록 제조하였다. PCR 증폭은 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)으로 수행하였다. PCR 반응은 95°C에서 5분(initial denaturation), 94°C에서 45초(denaturation), 52°C에서 45초(annealing), 72°C에서 1분(extension)을 30 cycles 실시하였고, 72°C에서 5분간 최종 extension을 실시하였다. PCR 산물의 존재와 분자량을 확인하기 위해서 1×TAE buffer (40 mM Tris · HCl, 40 mM acetate, 1.0 mM EDTA)에 2% agarose를 넣고 녹인 후에 ethidium bromide을 첨가하여 gel을 만든 다음, loading 하여 100 V에서 60분간 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 후 UV-transilluminator (Korea Bio-Tech Co., Seongnam, Korea)를 이용하여 DNA band를 확인하였다.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) 분석

PCR을 이용하여 증폭된 DNA는 Bio-Rad DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)을 이용하여 8% (w/v) polyacrylamide gel (urea와 formamide의 첨가량을 달리한 30-70%의 gradient gel)을 만든 다음, loading 하여 60 V, 60°C에서 16시간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 GreenStar™ Nucleic Acid Staining (1:10,000 dilution) (Bioneer, Seoul, Korea)으로 염색하고 UV-transilluminator (Korea Bio-Tech Co.)를 이용하여 DNA band를 확인하였다. DGGE band의 intensity는 Gel-Pro analyzer 프로그램(Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA)을 사용하여 분석하였다.

염기서열 분석

16S rRNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 행하였다. 분리 미생물의 genomic DNA를 분리한 다음, 16S rRNA sequencing에 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하여 94°C에서 1분(denaturation), 51°C에서 1분(annealing), 72°C에서 1분 30초(polymerization)간 반응시키는 조건에서 PCR 증폭을 수행하였다. 한편, DGGE 전기영동 후 polyacrylamide gel에서 DNA band의 분리를 확인한 후, 메스를 이용하여 DNA band를 잘라내어 QIAEX II gel extraction kit (Qiagen)를 사용하여 DNA를 elution한 후, 341F와 518R primer를 사용하여 94°C에서 45초(denaturation), 52°C에서 45초(annealing), 72°C에서 1분(polymerization)간 반응시키는 조건에서 PCR 증폭을 수행하였다. 증폭된 산물은 T vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 결합시킨 후 형질전환 시켰다. T vector sequencing primer를 이용하여 염기서열 결정을 수행하였으며 그 결과는 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) program을 이용하여 GENBANK (NCBI, Bethesda, MD, USA)의 16S rRNA sequencing과 비교하여 동정하였다.

결과 및 고찰

배양방법에 의한 미생물의 분리 및 동정

청국장 발효의 starter로 사용하는 벗짚과 청국장 발효미생물 군집분석을 위해 시료를 멸균 생리식염수로 각각 희석하여 TSA 배지에 도말한 후, 배양하여 형성된 colony의 개수가 100 CFU/plate 전후되는 plate를 선발하여 모든 colony를 순수분리하였다.

미륵산농원(강원도 귀래면)의 벗짚시료에서 54개의 single colony를 분리하였고 청국장에서는 53개의 single colony를 분리하였다. 분리미생물은 16S rRNA sequencing 분석을 통해 동정하였으며, 그 결과는 Table 1A에 나타내었다. 벗짚에서 분리한 미생물의 동정결과, *Pantoea agglomerans* (65%)가 우점종을 나타내었고, *P. ananatis* (30%), *Bacillus subtilis* (5%)를 분리하였다. 청국장에서 분리한 미생물의 동정결과, *B. subtilis* (60%)가 우점종을 나타내었고 *B. circulans* (28%), *B. amyloliquefaciens* (12%)를 분리하였다. 흥업토속 청국장(강원도 흥업면)의 벗짚시료에서 68개의 single colony를 분리하였고 청국장에서는 76개의 single colony를 분리하였다. 분리미생물은 16S rRNA sequencing 분석을 통해 동정하였으며, 그 결과는 Table 1B에 나타내었다. 벗짚에서 분리한 미생물의 동정결과, *B. amyloliquefaciens* (57%)가 우점종을 나타내었고, *Acinetobacter* sp. (29%), *P. ananatis* (14%)를 분리하였다. 청국장에서 분리한 미생물의 동정결과, *B. amyloliquefaciens* (52%)가 우점종을 나타내었고 *B. circulans* (26%), *B. licheniformis*

Table 1. Identification of microorganisms isolated from raw rice-straw and cheonggukjang

	Source*	Closest relative	GenBank accession no.	Identity (%)	Proportion (%)
A	Raw rice-straw	<i>Pantoea agglomerans</i>	EU239137	98	65
		<i>Pantoea ananatis</i>	HQ236020	97	30
		<i>Bacillus subtilis</i>	HQ268531	97	5
	Cheonggukjang	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ268531	97	60
		<i>Bacillus circulans</i>	Y13064	97	28
		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GU323369	98	12
B	Raw rice-straw	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JF412546	99	57
		<i>Acinetobacter</i> sp.	JF710649	97	29
		<i>Pantoea ananatis</i>	JN613378	97	14
	Cheonggukjang	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JF412546	99	52
		<i>Bacillus circulans</i>	AY294319	98	26
		<i>Bacillus licheniformis</i>	JX912559	97	18
		<i>Acinetobacter</i> sp.	JF710649	97	4

*A, Mireuksan farm; B, Heungup cheonggukjang

The isolates were selected from tryptic soy agar plates with 53-76 colonies and identified by 16S rRNA sequence analysis. The highest similarity matches are presented. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) homology represents the percent identity and accession number of the sequence of the closest relative in the GenBank database.

(18%), *Acinetobacter* sp. (4%)를 분리하였다.

*P. agglomerans*는 그람음성 호기성간균이며, Enterobacteriaceae 과에 속하는 미생물로 보고되어 있다. 벧짚을 끓는 물에 30분동안 처리한 후, 백금이를 이용하여 TSA에 도말하여 배양한 결과, 포자를 생성하는 *Bacillus* species의 colony만이 확인이 되었는데, 이는 열처리 과정을 통해 *Pantoea* species는 사멸되는 것으로 사료되었다(data not shown). 따라서 벧짚을 청국장 발효 starter로 사용할 경우, 벧짚을 끓는 물에 넣어서 열처리한 후, 사용하는 것이 위생적인 청국장을 제조할 수 있을 것으로 사료되었다. Kim 등(10)은 청국장 발효에 관여하는 주요 미생물이 *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*로 보고하였는데, 이는 본 연구 결과와 유사하였다.

DGGE 방법에 의한 미생물의 분포조사

배양방법에 의해 분리되지 않는 미생물의 확인을 위해 청국장 과 벧짚시료로부터 미생물을 배양하지 않고 직접 genomic DNA를 추출하고 선발한 341F^{GC}와 518R universal PCR primer를 사용하여 PCR-DGGE를 수행하였다. 청국장과 벧짚에서 추출한 bacterial 16S rRNA는 DGGE 변성 구배 젤의 30-70% 농도에서 band 패턴이 가장 잘 분리되었다(Fig. 1). DGGE band로부터 16S rDNA fragments를 추출하여 16S rRNA sequencing 분석을 통해 미생물을 동정한 결과는 Table 2에 나타내었다.

미륵산농원에서 수집한 벧짚시료에서는 9개의 band를 확인하였고 미생물 동정결과, *Pantoea* sp., *Enterococcus durans*, *Enterobacter* sp., *P. agglomerans*, uncultured bacterium, *P. ananatis*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp.로 동정하였으며, 청국장 시료로부터는 9개의 band로 분리하였고 미생물 동정결과, uncultured bacterium, *B. licheniformis*, uncultured *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *Bacillus* sp., *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*로 동정하였다(Table 2A). 흥업토속된장에서 수집한 벧짚시료에서는 8개의 band로 분리하였고 미생물 동정결과,

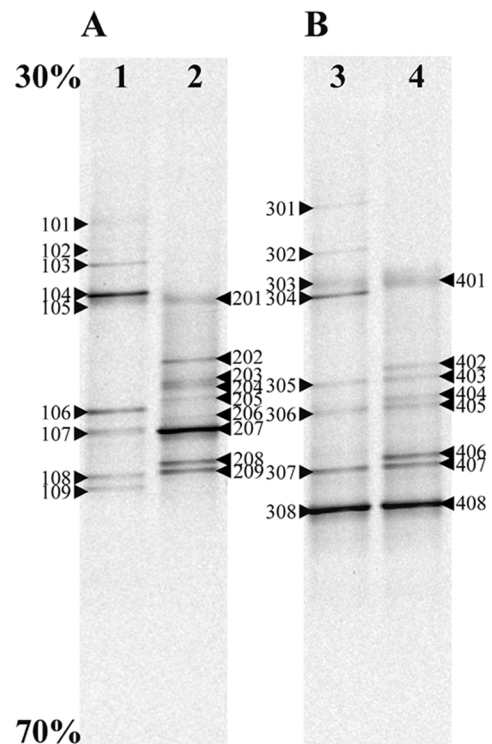


Fig. 1. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA fragments from raw rice-straw and cheonggukjang. A, Mireuksan farm; B, Heungup cheonggukjang; Lane 1 and 3, raw rice-straw; lane 2 and 4, cheonggukjang. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the 16S rRNA sequences was performed with the primers 341F^{GC} and 518R (see text for sequence). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis was performed with a 30-70% denaturing gradient.

Pseudomonas fulva, *P. agglomerans*, *Acinetobacter* sp., *P. ananatis*, *Bacillus* sp., *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*로 동정하였으며, 청국장 시료로부터는 8개의 band로 분리하였고 미생물 동정결과, *Acinetobacter* sp., *Bacillus* sp., uncultured bacterium, *B. subtilis*, *B. circulans*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*로 동정하였다(Table 2B).

DGGE band의 intensity가 높다는 것은 개체군의 수가 많다는 것을 의미하는데(17), 본 연구결과에서는 DGGE band의 intensity가 높은 *B. subtilis* (Band intensity 25.7%)와 *B. amyloliquefaciens* (Band intensity 27.3%) 미생물이 청국장 발효 우점미생물로 확인하였다. 수집한 벧짚과 청국장 시료로부터 직접 추출한 bacterial 16S rRNA 의 band는 DGGE gel 상에서 위치와 동정결과가 유사한 것을 확인할 수 있었다. 이는 벧짚에서 유래한 미생물이 청

국장의 발효에 관여한 것으로 사료된다. 벧짚에서는 *Bacillus* sp. 이외에 다른 속에 해당하는 미생물이 다양하게 분포한 반면에 청국장 시료에서는 대부분이 *Bacillus* sp. 미생물이 우점하는 것으로 확인되었다. 이는 전통방식의 청국장 제조는 주로 벧짚을 사용하는데, 끓는 물에서 열처리한 후, 사용하기 때문에 대부분 포자형성 미생물인 *Bacillus* sp.만 내열성 포자를 생성하고 청국장 발효시 발아하여 영양세포로 증식하여 발효에 관여하는 것이라 사료되었다.

DGGE와 배양방법에 의한 발효미생물 군집 비교분석

배양방법에 의한 발효미생물 군집 비교는 시료로부터 미생물을 분리하고 미생물의 형태학적, 생화학적 또는 유전학적 특성 등을 동정하기 위한 방법으로 수행되고 있지만 배지의 선택, 배

Table 2. Diversity of microorganisms identified from raw rice-straw and cheonggukjang by denaturing gradient gel electrophoresis analysis

Lane*	Band No.	16S rRNA sequence results	GenBank accession no.	BLAST similarity, %	Band intensity,%
A	101	<i>Pantoea</i> sp.	FJ872514	96	3.0
	102	<i>Enterococcus durans</i>	GU360731	95	2.7
	103	<i>Enterobacter</i> sp.	FJ493047	97	4.5
	104	<i>Pantoea agglomerans</i>	EU239137	97	20.6
	105	Uncultured bacterium	EF444059	95	4.8
	106	<i>Pantoea ananatis</i>	HQ236020	97	7.4
	107	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ268531	98	5.6
	108	<i>Bacillus</i> sp.	FJ930067	96	4.3
	109	<i>Rhodococcus</i> sp.	GU391522	97	3.6
	201	Uncultured bacterium	EF444059	96	4.8
	202	<i>Bacillus licheniformis</i>	GQ392052	97	4.2
	203	Uncultured <i>Bacillus</i> sp.	FJ435676	96	2.1
	204	<i>Bacillus subtilis</i>	EF488088	98	2.8
	205	<i>Bacillus</i> sp.	GQ392045	97	2.5
	206	<i>Bacillus licheniformis</i>	EU882848	97	1.6
	207	<i>Bacillus subtilis</i>	HQ268531	97	25.7
	208	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	GU323369	96	5.9
	209	<i>Bacillus circulans</i>	Y13064	98	6.4
	B	301	<i>Pseudomonas fulva</i>	JQ229796	97
302		<i>Pantoea agglomerans</i>	AY941841	95	4.0
303		<i>Acinetobacter</i> sp.	JF710649	98	4.8
304		<i>Pantoea ananatis</i>	JN613378	97	8.1
305		<i>Bacillus</i> sp.	JX575605	98	4.3
306		<i>Bacillus subtilis</i>	JN400257	97	4.0
307		<i>Bacillus licheniformis</i>	JX912559	96	6.1
308		<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JF412546	97	27.3
401		<i>Acinetobacter</i> sp.	JF710649	98	5.2
402		<i>Bacillus</i> sp.	HM566751	96	3.9
4	403	<i>Bacillus</i> sp.	JX575605	98	3.6
	404	Uncultured bacterium	FJ848513	96	3.8
	405	<i>Bacillus subtilis</i>	JN400257	97	3.7
	406	<i>Bacillus circulans</i>	AY294319	96	6.3
	407	<i>Bacillus licheniformis</i>	JX912559	97	6.1
	408	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	JF412546	98	26.4

*A, Mireuksan farm; B, Heungup cheonggukjang; Lane 1 and 3, raw rice-straw; lane 2 and 4, cheonggukjang.

The 16S rRNA sequences from the isolated strains and the 16S rRNA fragments from the DGGE bands were aligned with GenBank reference sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) by using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

양시간, 배양조건, 배양온도 등에 따른 환경적 요인들과 시료를 희석하는 과정에서 소수로 존재하는 미생물은 배양되지 못하는 단점을 가지고 있다. 배양방법에 의한 벗짚과 청국장 시료의 발효미생물 균집을 살펴보면, 전반적으로 시료에서 우점종을 차지하는 미생물이 대부분 분리되었으며 미생물 동정결과, 3-4종으로 구성되어 있었다. 강원도 귀래면의 미륵산 농원과 강원도 홍업면의 홍업토속 청국장으로부터 수집한 벗짚과 청국장에서 분리된 미생물의 분포를 살펴보면 벗짚에서는 *P. agglomerans*와 *B. amyloliquefaciens* 미생물이 높은 우점도를 나타내었고, 청국장 시료에서는 *B. subtilis*와 *B. amyloliquefaciens* 미생물이 높은 우점도를 나타내며 분리 및 동정되어 다양한 미생물은 분리되지 않는 배양방법의 한계를 보여주었다. 그러나, DGGE 방법은 이러한 배양방법의 단점을 보완함으로써 다양한 미생물의 존재를 확인할 수 있었다. 벗짚과 청국장 시료에 존재하는 미생물의 16S rRNA gene을 추출하여 universal primer를 이용해 PCR 증폭 후 DGGE를 수행함으로써 조금 더 빠르고 신속하게 미생물을 동정할 수 있었고 소수로 존재하는 미생물들도 확인할 수 있었다.

DGGE 방법에 의한 벗짚과 청국장 시료의 발효 미생물 균집을 살펴보면, 벗짚에서는 *Pantoea* sp., *Enterococcus durans*, *Enterobacter* sp., *P. agglomerans*, *P. ananatis*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp. *Pseudomonas fulva*, *Acinetobacter* sp., *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 등의 미생물을 확인하였고 청국장에서는 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp., *B. amyloliquefaciens*, *B. circulans*, *Acinetobacter* sp. 등의 미생물을 확인하였다. 그리고 배양방법으로는 분리되지 않는 uncultured bacterium과 uncultured *Bacillus* sp.도 확인하였다.

Farnleitner 등(18)은 DGGE 방법은 적은 양의 DNA를 PCR로 증폭하고 증폭된 DNA를 이용함으로써 종 다양성을 더 정밀하게 확인할 수 있는 방법이라고 보고하였고, Kim 등(19)은 더 다양한 미생물뿐만 아니라 배양을 통해서는 표현되지 않는 미생물까지도 확인할 수 있다고 보고하였다. 이처럼 DGGE 방법은 청국장 발효미생물의 균집을 조사하는데 있어서 빠르고 신속하며 다양한 미생물들을 확인할 수 있어 배양방법보다 효율적이지만 배양방법과 DGGE방법은 서로 분리되지 않고 같이 병행되어야 하는데 이는 배양방법을 통해서만이 분리미생물을 획득할 수 있기 때문이다.

요 약

전통적인 방법으로 제조한 청국장과 벗짚시료로부터 배양방법과 비배양방법인 DGGE를 이용한 청국장의 발효미생물 균집을 분석하였다. 배양방법에서는 미륵산농원의 벗짚과 청국장 시료에서 *P. agglomerans* (65%)와 *B. subtilis* (60%)가 우점미생물로 나타내었고, 홍업토속 청국장의 벗짚과 청국장 시료에서는 *B. amyloliquefaciens* (57%와 52%)가 우점미생물로 확인하였다. DGGE 분석에서는 미륵산농원의 벗짚과 청국장 시료에서 *P. agglomerans* (Band intensity 20.6%)와 *B. subtilis* (Band intensity 25.7%)가 우점미생물로 나타내었고 홍업토속 청국장의 벗짚과 청국장 시료에서는 *B. amyloliquefaciens* (Band intensity 27.3%, 26.4%)가 우점미생물로 확인하였다. 그 외에도 벗짚에서는 *Pantoea* sp., *Enterococcus durans*, *Enterobacter* sp., *P. ananatis*, *Bacillus* sp., *Rhodococcus* sp. *Pseudomonas fulva*, *Acinetobacter* sp., *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* 등의 미생물을 확인하였고 청국장에서는 *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *Bacillus* sp., *B. circulans*, *Acinetobacter* sp. 등의 미생물을 확인이 되었으며, 비배양 방

법을 이용한 청국장 발효미생물 균종 조사는 배양이 불가능한 미생물을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원(2009-2012)의 연구비 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 감사를 드립니다.

References

- Shon MY, Seo KI, Lee SW, Choi SH, Sung NJ. Biological activities of *chungkugjang* prepared with black bean and changes in phytoestrogen content during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 936-941 (2000)
- Shin ZI, Ahn CW, Nam HS, Lee HJ, Lee HJ, Moon TH. Fractionation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from soybean paste. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 230-234 (1995)
- Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. Isolation of immuno stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from *chungkook-jang* and fermentational characteristics of JB-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 291-296 (2004)
- Hong SS, Chung KS, Yoon KD, Cho YJ. Antimutagenic effect of solvent extracts of Korean fermented soybean products. *Food Biotechnol.* 5: 263-267 (1996)
- Benjamin H, Storkson J, Nagahara A, Pariza MW. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by dietary soy sauce. *Cancer Res.* 51: 2940-2942 (1991)
- Shon MY, Seo KI, Park SK, Cho YS, Sung NJ. Some biological activities and isoflavone content of *chungkukjang* prepared with black beans and *Bacillus* strain. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 662-667 (2001)
- Youn HK, Choi HS, Hur SH, Hong JH. Antimicrobial activities of viscous substance from *chongkukjang* fermented with different *Bacillus* sp. *J. Fd. Hyg. Safety* 16: 188-193 (2001)
- Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from *chungkook-jang*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1-5 (1995)
- Kameda Y, Oira S, Matsui K, Kanatomo S, Hase T. Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. *Chem. Pharm. Bull.* 22: 938-994 (1974)
- Kim YS, Jung HJ, Park YS, Yu TS. Characteristics of flavor and functionality of *Bacillus subtilis* K-20 *chungkukjang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 475-478 (2003)
- Lee MY, Park SY, Jung KO, Park KY, Kim SD. Quality and functional characteristics of *chungkukjang* prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional *chungkukjang*. *J. Food Sci.* 70: M191-M196 (2005)
- Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. Isolation of immuno stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from *chungkook-jang* and fermentational characteristics of JB-1. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 291-296 (2004)
- Kim SS, Lee JH, Ahn YS, Kim JH, Kang DK. A fibrinolytic enzyme from *Bacillus amyloliquefaciens* D4-7 isolated from *chungkookjang*; Its characterization and influence of additives on thermostability. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 31: 271-276 (2003)
- Kwon GH, Lee HA, Park JY, Kim JS, Lim JK, Park CS, Kwon DY, Kim YS, Kim JH. Development of a RAPD-PCR method for identification of *Bacillus* species isolated from *cheonggukjang*. *Int. J. Food Microbiol.* 129: 282-287 (2009)
- Fischer SG, Lerman LS. DNA fragments differing by single base-pair substitutions are separated in denaturing gradient gels: correspondence with melting theory. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 1579-1583 (1983)
- Walter J, Tannock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatosava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient

- gel electrophoresis and species specific PCR primers. *Appl. Environ. Microb.* 66: 297-303 (2000)
17. Watanabe T, Asakawa S, Nakamura A, Nagaoka K, Kimura M. DGGE method for analyzing 16S rDNA of methanogenic archaeal community in paddy field soil. *FEMS Microbiol. Lett.* 232: 153-163 (2004)
18. Farnleitner AH, Zibuschka F, Burtscher MM, Lindner G, Reischer G, Mach RL. Eubacterial 16S-rDNA amplicon profiling: a rapid technique for comparison and differentiation of heterotrophic plate count communities from drinking water. *Int. J. Food Microbiol.* 92: 333-375 (2004)
19. Kim MN, Bang HJ. Comparison of culture-dependent and DGGE based methods the analysis of marine bacterial community. *Korean J. Environ. Biol.* 24: 307-313 (2006)