J Korean Soc Food Sci Nutr
45(7), 1035～1040(2016)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.7.1035

장수지역 전통된장의 미생물 군집 및 바실러스 세레우스 길항 효과

전두영[1] · 윤기복[1] · 윤연희[1] · 양수인[1] · 김중범[2]

[1]전라남도 보건환경연구원 미생물과
[2]순천대학교 식품공학과

Bacterial Community of Traditional Doenjang in Longevity Area and Antagonistic Effect against *Bacillus cereus*

Doo-Young Jeon[1], Gi-Bok Yoon[1], Yeon-Hee Yoon[1], Soo-In Yang[1], and Jung-Beom Kim[2]

[1]Division of Microbiology, Jeollanam-do Institute of Health and Environment
[2]Department of Food Science and Technology, Sunchon National University

ABSTRACT This study investigated the prevalence of foodborne pathogens and the bacterial community of traditional Doenjang collected from a longevity area in Korea as well as the antagonistic effect of traditional Doenjang isolates against *Bacillus cereus* to estimate the microbiological safety of traditional Doenjang. Aerobic bacteria showed 10^6～10^9 CFU/g, whereas coliform bacteria was not detected. Foodborne pathogens were not detected except *B. cereus*, which was detected in seven samples out of 10 Doenjang samples. A total of 327 isolates were identified from traditional Doenjang. The isolates consisted of *Bacillus subtilis* 155 (47.4%), *Bacillus licheniformis* 68 (20.8%), *Bacillus amyloliquefaciens* 46 (14.1%), and *Bacillus pumilus* 18 (5.5%). Antagonistic effect against *B. cereus* was detected in 20 (6.1%) of 327 isolates, which consisted of *B. subtilis* (12 strains), *B. amyloliquefaciens* (5 strains), and *B. licheniformis* (3 strains). The inhibitory zone for the antagonistic effect was 9.0～12.0 mm in diameter. Although a small amount of traditional Doenjang was tested in this study, these results indicated that the potential risk of *B. cereus* in traditional Doenjang is lower than generally presumed. It is necessary to monitor the antagonistic effect of traditional Doenjang isolates against *B. cereus*.

Key words: Doenjang, bacterial community, *Bacillus cereus*, antagonistic effect

서 론

고령화로 인하여 건강 장수에 대한 사회적 욕구가 증대되고 음식과 건강에 대한 사회적 관심도 빠르게 변화하고 있으며, 신토불이 식품 등 로컬 푸드의 중요성도 커지고 있다(1,2). 2012년도 전남 구례지역 장수노인들의 식생활 특성 조사 결과 대두 발효식품인 된장, 된장국 등의 섭취빈도(평균 5회/주)와 기호도(91.8%)가 높게 조사되는 등 전통장류에 대한 관심이 증대되고 있다(3). 우리나라 대두 발효 식품의 대명사로 지칭되는 된장은 콩을 주원료로 제조된 메주를 자연 발효한 식품으로 일상식탁에서 빼놓을 수 없는 장류 중 하나이다. 된장은 콩을 발효시켜 특유의 맛과 향을 가지고 있으며, 지방과 단백질 함량이 높아 영양학적으로도 매우 우수한 식품이다(4). 된장은 가정에서 전래적인 방법으로 제조한 전통된장과 식품공장에서 제조한 된장으로 구분된다. 전통된장의 경우 제조 방법상 자연에서 유래한 세균과 곰팡이가 복합적으로 작용하여 특유의 맛과 향을 내고, 식품공장에서 제조한 된장의 경우 숙성기간을 단축하고 풍미를 향상하기 위해 우수균주를 이용하여 생산하고 있다(5). 또한, 된장은 다양한 기능성 성분, 특히 항산화 성분의 공급원으로 가치가 우수하여 제조 방법의 표준화 및 기능성에 대한 많은 연구가 진행되고 있다(6,7). 지금까지 밝혀진 된장의 기능성은 항산화(7-10), 항돌연변이(11,12), 항암 및 혈당강하(11-13), 혈전용해(14) 등 다양하게 보고되고 대두로부터 전이된 tocopherol, isoflavone 및 phenolic acid 등의 생리활성물질을 많이 함유하고 있다(6,7).

*Bacillus cereus*는 다양한 식품에 오염되어 hemolysin BL(HBL), nonhemolytic enterotoxin(NHE), enterotoxin FM(EntFM), cytotoxin K(CytK) 등의 설사독소와 cereulide 구토독소를 생산, 설사와 구토를 일으키는 식중독균으로 임상증상은 통상 3일 내에 치료되는 것으로 보고되고 있다(15,16). 그러나 최근 *B. cereus* 식중독과 관련하여 사망자가 발생하는 등 *B. cereus* 위해성이 식품산업 전반에 걸쳐 증대되고 있는 것으로 보고되고 있다(17,18). 특히 된장 등 장류 안전성의 가장 중요한 문제점으로 *B. cereus*

Received 31 March 2016; Accepted 17 May 2016
Correspondence: Jung-Beom Kim, Department of Food Science and Technology, Sunchon National University, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea
E-mail: okjbkim@sunchon.ac.kr, Phone: +82-61-750-3259

오염이 제기됨에 따라 2006년 식품의약품안전처에서는 장류식품에 *B. cereus* 정량 기준을 도입해 안전관리를 시행하고 있다(19,20). 또한, 전통된장 68건 중 47건이 *B. cereus*에 오염되어 있다는 보고(21) 등 공장에서 제조한 된장에 비해 전통된장의 *B. cereus* 오염이 매우 높은 것으로 보고(22,23)되고 있어 전통된장 중 *B. cereus*에 의한 식중독 위험성이 상존한다고 하겠다. 그러나 현재까지 연구 결과를 살펴보면 된장의 항산화성(6-10,14)과 항암성(11-13) 등 기능성에 관한 연구만 이루어져 있고 전통된장에 대한 미생물학적 안전성 연구는 매우 미약한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라 장수지역에서 제조된 전통된장을 수집하여 식중독세균 오염도와 미생물 군집 현황을 분석하고, 분리된 미생물 군집의 *B. cereus* 길항 효과를 평가함으로써 전통된장의 미생물학적 안전성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 수집

본 연구에서 사용한 전통된장은 우리나라 장수지역인 구례군 산동면과 간전면에서 8종, 강진군 대전면에서 1종, 전북 순창장류밸리단지 내 기업체로부터 1종, 총 10종을 수집하였다. 된장의 수집기준은 전통방법으로 제조된 것으로 하였으며, 수집된 된장 시료는 냉장 보관하며 실험에 사용하였다.

위생지표세균 정량분석

위생지표세균 정량적 분석은 식품공전시험법 일반세균과 대장균군에 따라 실험하였다(24). 시료 25 g을 정량한 후 멸균생리식염수로 10배 희석한 다음 stomacher(BagMixer 400, Interscience, Breteche, France)를 이용하여 2분간 균질화하였다. 균질화된 시료는 멸균생리식염수를 이용하여 10배 계단 희석하였다. 일반세균수의 측정은 각각 희석된 시료 1 mL를 petrifilm aerobic count plate(3M, Seoul, Korea)에 분주하여 30°C에서 24시간 배양하였으며, 배양 후 petrifilm 위의 붉은색 집락을 계수하였다. 대장균군 실험은 petrifilm *E. coli*/coliform count plate(3M)에 각각 희석된 시료 1 mL를 분주하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 대장균군은 붉은색 집락 중 주위에 기포를 형성하고 있는 집락을 양성으로 간주하여 계수하였다.

식중독 미생물 정성분석

주요 식중독 원인균인 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *B. cereus*, *Salmonella* spp., pathogenic *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica* 등 12종에 대하여 real-time PCR(Fast real-time 7900, ABI, Foster, CA, USA)을 이용하여 정성분석 하였다. Real-time PCR은 20 pathogen multiplex real-time PCR strip kit(Kogene Biotech, Daejeon, Korea)을 이용 50°C에서 2분, 95°C에서 10분간 반응시킨 후 95°C에서 15초, 60°C에서 1분간 총 40 cycle을 반응시켰다. PCR 주형은 각각 시료 25 g을 225 mL Tryptic soy broth(Oxoid, Basingstoke, UK)에 접종한 후 37°C에서 16시간 배양하여 증균액을 열처리한 다음 원심분리 하여 상층액을 사용하였다.

미생물 군집 분석

전통된장의 미생물 군집을 분석하기 위하여 각각 시료 10 g을 멸균생리식염수 90 mL에 가한 후 10배 계단 희석하여 시료원액과 희석액을 Tryptic soy agar(TSA agar, Oxoid)에 도말한 다음 30°C에서 24시간 배양하였다. 각각 된장의 배양 결과 크기, 모양, 색상이 다른 40 집락을 무작위로 선택하여 유전자 염기서열 분석에 사용하였다. Genomic DNA 추출을 위하여 분리균주 한 백금이를 멸균증류수 1 mL에 접종하였다. 이 균액을 95°C heating block에서 10분간 가열한 후 4°C, 14,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 -70°C 냉동실에 보관하며 DNA 주형으로 사용하였다. 된장 분리균주의 유전자 염기서열 분석은 Universal primer 27F (*E. coli* numbering 8~27; 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(*E. coli* numbering 1492~1510; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 이용하여 분리균주의 16S rDNA 유전자 단편을 PCR(GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystem, Singapore, Singapore)로 증폭시켰다. PCR 증폭을 위해 사용된 반응용액은 PCR Premix (2× TOPsimple™ DyeMIX(aliquot)-Tenuto Ver. P561, Enzynomics™, Daejeon, Korea) kit을 사용하였다. BigDye Terminator(v.3.1) Sequencing kit(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 통해 정제한 PCR 산물은 (주)엔지노믹스사(Daejeon, Korea)에 의뢰하여 ABI3730xI DNA analyzer(Applied Biosystems)를 이용하여 sequencing 하였다. 염기서열 분석을 통하여 얻은 각 균주의 염기서열은 The National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)에서 제공하는 Advanced Blast Search 프로그램을 이용하여 GenBank database에 보고된 염기서열을 비교하여 동정하였다.

*B. cereus*에 대한 길항 효과 분석

본 연구에서 분리 동정된 327균주를 대상으로 식중독 원인균 중 하나인 *B. cereus*에 대한 길항능력을 시험하였다. 시험균액은 각각의 시험균주를 TSA(Oxoid)에 접종하여 30°C에서 24시간씩 2회 계대배양한 후 멸균생리식염수 3 mL에 2 McF가 되도록 농도를 조절한 다음 사용하였다. *B. cereus* 평판배지는 질병관리본부로부터 분양받은 *B. cereus*(NCTC 10841)를 사용하였다. 그리고 멸균된 paper disc (8 mm, Advantec, Kashiwa, Japan)에 각각의 시험균액 50 μL를 흡수시킨 후 *B. cereus* 평판배지에 올려놓고 30°C에

Table 1. Microbiological evaluation of traditional Doenjang

Aging period	Sample	Aerobic bacteria (CFU/g)	Coliform bacteria (CFU/g)
1	D1	4.0×10^7	ND[1)]
	D2	7.3×10^8	ND
	D3	4.5×10^7	ND
	D4	8.4×10^8	ND
	D5	3.2×10^6	ND
2	D6	2.6×10^6	ND
	D7	2.0×10^6	ND
3	D8	3.0×10^8	ND
	D9	1.2×10^6	ND
12	D10	2.8×10^8	ND

[1)]ND: not detected.

서 48시간 배양한 다음 disc 주변에 생성된 inhibition zone (mm)의 크기를 측정하여 길항 효과를 분석하였다.

결과 및 고찰

전통된장의 미생물학적 안전성

전통된장의 안전성을 평가하기 위해 위생지표세균인 일반세균과 대장균군을 실험하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 분변오염지표 미생물인 대장균군은 모두 불검출 되었으나 일반세균수의 경우 10^6~10^9 CFU/g의 분포를 나타내었다. 숙성기간별로는 숙성기간 2년인 D7에서 일반세균수가 2.0×10^6 CFU/g으로 가장 낮았으며, 숙성기간 1년인 D4에서 8.4×10^8 CFU/g으로 가장 높게 나타났다. 이러한 결과는 저염 된장 숙성 중 미생물과 효소 활성의 변화에서 대장균은 검출되지 않았다는 보고(5)와 한국 전통된장에서 호기성 세균 실험 결과 숙성기간 동안 10^7~10^9 CFU/g 정도로 검출되었다는 보고(25)와 유사한 결과였다. 또한, 전통된장별로 일반세균수 차이가 나는 것은 된장 제조 방법에 따른 차이로 판단된다. 전통된장은 대두를 물에 불려 찐 후 메주를 만들어 자연 상태에서 미생물이 번식할 때 각각 지역의 미생물 환경과 사용되는 물에 영향을 받는 것으로 생각된다. 전통된장에 대한 위생지표세균 실험 결과 대장균군이 불검출 되어 대장균군에 대한 위생 안전성은 확보된 것으로 판단되었다.

전통된장의 식중독균 오염도는 Table 2에 나타내었으며 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., pathogenic *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Vibrio* spp., *Yersinia enterocolitica* 등 11종의 식중독세균은 모두 음성을 나타내었다. 그러나 전통장류의 대표적 오염균인 *B. cereus*는 전통된장 10종 중 7종에서 검출되었다. 이러한 결과는 분석한 모든 된장에서 *Staphylococcus aureus*와 *Salmonella* spp. 등의 식중독균이 검출되지 않았다는 보고(26)와 된장 등 장류에서 가장 문제가 되는 식중독균이 *B. cereus*라는 보고와 일치하였다(21-23). 위생지표미생물과 식중독세균 실험 결과 장수지역 전통된장에 가장 문제가 되는 미생물은 *B. cereus*로 나타나 전통된장의 미생물학적 안전성 확보를 위해 *B. cereus* 제어가 중요한 것으로 판단되었다.

전통된장의 미생물 군집

전통된장의 미생물 군집 분석은 각각 분리균주의 16s rDNA 염기서열을 분석한 후 GeneBank와 비교 동정하였으며, 총 327균주가 동정되었다(Table 3). 전통된장에서 분리된 327균주 중 *Bacillus subtilis*가 155균주(47.4%)로 가장 많은 분포를 나타내었으며, *B. licheniformis* 68균주(20.8%), *B. amyloliquefaciens* 46균주(14.1%) 순으로 분포를 나타내었다. 전통된장별 분리균주의 종류는 D7 된장이 10종, D3 된장이 8종, D10 된장이 7종으로 다양하게 분리되었다(Table 4). 또한, 된장 고유의 향과 맛을 결정하고 protease 등의 효소를 생산하는 *B. amyloliquefaciens*와 *B. subtilis* 균주는 각각 10종류의 전통된장 전부에서 분리되었으며(27), *B. licheniformis* 균주는 전통된장 9종류에서 분리되는 등 가장 많은 분포를 나타내었다. 인체에 유해하지 않은 *Citrobacter youngae*와 토양, 퇴비, 온천, 사막 등에 서식하는 *Geobacillus stearothermophilus*는 전통된장 D7

Table 2. Detection of food borne pathogens in traditional Doenjang using real-time PCR

Food born pathogens	Doenjang									
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
Campylobacter jejuni	−[1)]	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Campylobacter coli	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Clostridium perfringens	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Vibrio cholerae	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Vibrio vulnificus	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Vibrio parahaemolyticus	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Listeria monocytogenes	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Salmonella spp.	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Bacillus cereus	+[2)]	+	−	+	+	+	−	+	−	+
Yersinia enterocolitica	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Staphylococcus aureus	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Pathogenic *E. coli*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

[1)]−: not detected. [2)]+: detected.

Table 3. Bacterial community profile of traditional Doenjang based on the 16s rDNA sequence

No	Bacteria species	Bacterial count	Bacterial ratio (%)
1	*Bacillus aerius*	1	0.3
2	*Bacillus aerophilus*	1	0.3
3	*Bacillus altitudinis*	1	0.3
4	*Bacillus amyloliquefaciens*	46	14.1
5	*Bacillus atrophaeus*	2	0.6
6	*Bacillus licheniformis*	68	20.8
7	*Bacillus methylotrophicus*	11	3.4
8	*Bacillus mojavensis*	1	0.3
9	*Bacillus pumilus*	18	5.5
10	*Bacillus safensis*	1	0.3
11	*Bacillus siamensis*	2	0.6
12	*Bacillus subtilis*	155	47.4
13	*Bacillus tequilensis*	1	0.3
14	*Bacillus vallismortis*	9	2.8
15	*Citrobacter youngae*	1	0.3
16	*Geobacillus stearothermophilus*	1	0.3
17	*Oceanobacillus oncorhynchus*	1	0.3
18	*Oceanobacillus sojae*	3	0.9
19	*Staphylococcus equorum*	2	0.6
20	*Staphylococcus nepalensis*	2	0.6
	Total	327	100

에서 분리되었고(28), 신선한 물에서 최초 분리 보고된 *Oceanobacillus oncorhynchi*는 D1 전통된장(29), 간장에서 최초 분리된 *Oceanobacillus sojae*는 D3, D8 전통된장에서 분리되었다(30). 이러한 결과는 된장발효의 주요 미생물이 *B. amyloliquefaciens*, *B. atrophaeus*, *B. methylotrophicus*, *B. mojavensis*, *B. subtilis*이고, 된장과 간장에 서식하는 주요 세균은 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. citreas* 등이었다는 보고와 일치하는 결과였다(28,31-33). 전통된장별 분리균주 분포가 다양한 것은 콩의 종류, 공기, 기후, 소금, 메주 발효 과정 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 실험 결과 분리된 327균주 중 317균주(96.9%)가 *Bacillus* spp.로 동정되었는데, 이러한 결과는 전통장류의 발효과정에 *Bacillus* spp.가 주로 관여한다는 보고(34)와 일치하는 결과였다.

숙성기간별 전통된장 중 균종분포를 살펴보면 1년 숙성된 된장에서는 *Bacillus* spp.가 12종, *Oceanobacillus* 2종, 내염성균인 *Staphylococcus nepalensis*가 1종 등 총 15종의 균주가 분리되었다. 2년 숙성된 된장에서는 *Bacillus* spp.가 8종, *Citrobacter youngae*, *Geobacillus stearothermophilus* 각각 1종씩 총 10종이 분리되었다. 3년 숙성된 된장에서는 *Bacillus* spp.가 5종, *Oceanobacillus sojae*, *Staphylococcus equorum* 각각 1종씩 총 7종균이 분리되었다. 가장 오래된 12년 숙성된 된장에는 모두 *Bacillus*만 7종 분포하였다. 이러한 결과는 숙성기간이 오래될수록 전통된장 발효균인 *Bacillus* spp.와 일부 내염성, 호염성, 고온성균들만이 전통된장에서 생존하기 때문으로 판단된다.

*B. cereus*에 대한 길항 효과

*B. cereus*는 토양, 곡류 등 자연계에 널리 존재하고, 특히 전통된장에 오염이 매우 높아 식품 위생학적 문제점으로 지적되고 있다(21-23). 따라서 전통된장에서 분리된 발효균주의 *B. cereus* 길항 효과를 평가함으로써 전통된장의 안전성을 평가하고자 하였다. 길항 효과 분석은 생육저지환의

Table 4. Frequency of bacterial species in traditional Doenjang

No	Bacteria species	Doenjang										
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	Total
1	*Bacillus aerius*	−[1)]	−	−	+[2)]	−	−	−	−	−	−	1
2	*Bacillus aerophilus*	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	1
3	*Bacillus altitudinis*	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	1
4	*Bacillus amyloliquefaciens*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
5	*Bacillus atrophaeus*	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	2
6	*Bacillus licheniformis*	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	9
7	*Bacillus methylotrophicus*	+	−	+	−	−	+	+	+	−	+	6
8	*Bacillus mojavensis*	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	1
9	*Bacillus pumilus*	−	+	+	+	−	−	+	−	−	+	5
10	*Bacillus safensis*	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	1
11	*Bacillus siamensis*	−	−	−	−	+	−	+	−	−	−	2
12	*Bacillus subtilis*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	10
13	*Bacillus tequilensis*	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	1
14	*Bacillus vallismortis*	+	−	−	−	+	+	+	+	−	+	6
15	*Citrobacter youngae*	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	1
16	*Geobacillus stearothermophilus*	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	1
17	*Oceanobacillus oncorhynchus*	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	1
18	*Oceanobacillus sojae*	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	2
19	*Staphylococcus equorum*	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	1
20	*Staphylococcus nepalensis*	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	1
	Total	6	5	8	5	6	6	10	6	4	7	

[1)] −: not detected. [2)] +: detected.

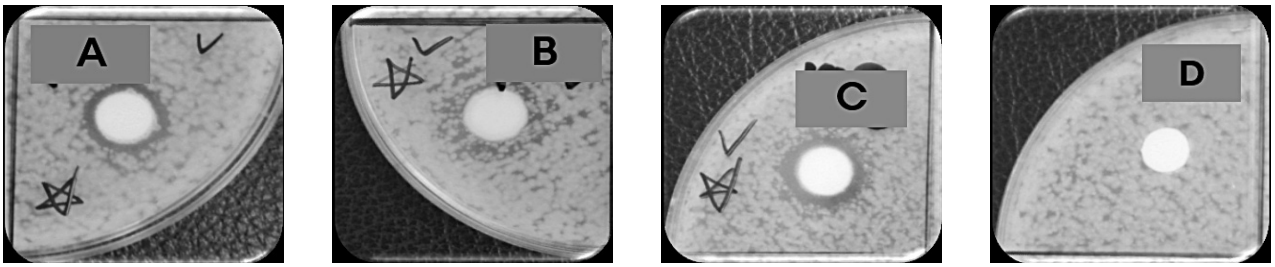

Fig. 1. Antagonistic effect of *Bacillus* spp. isolated from traditional Doenjang against *B. cereus* NCTC 10841. A: *B. subtilis*, B: *B. amyloliquefaciens*, C: *B. licheniformis*, D: non-activity.

Table 5. Antagonistic effect of *Bacillus* spp. isolated from traditional Doenjang against *Bacillus cereus*

Species	Aging period	Inhibition zone (mm)
Bacillus subtilis D1-1	1	10.3
Bacillus subtilis D1-2	1	10.7
Bacillus subtilis D1-3	1	11.7
Bacillus subtilis D4-1	1	11.7
Bacillus subtilis D4-2	1	11.3
Bacillus subtilis D4-3	1	10.7
Bacillus subtilis D5-1	1	9.0
Bacillus subtilis D10-1	12	9.0
Bacillus subtilis D10-2	12	10.0
Bacillus subtilis D10-3	12	9.7
Bacillus subtilis D10-4	12	10.7
Bacillus subtilis D10-5	12	11.0
Bacillus amyloliquefaciens D3-1	1	10.0
Bacillus amyloliquefaciens D5-1	1	9.3
Bacillus amyloliquefaciens D5-2	1	12.0
Bacillus amyloliquefaciens D7-1	2	11.0
Bacillus amyloliquefaciens D10-1	12	9.3
Bacillus licheniformis D7-1	2	9.3
Bacillus licheniformis D10-1	12	10.7
Bacillus licheniformis D10-2	12	11.0

생성 여부로 판단하였으며, 그 결과는 Table 5와 Fig. 1에 나타내었다. 분리균주 327균주 중 20균주(6.1%)에서 생육저지환이 관찰되었으며, 저지환의 크기는 9.0~12.0 mm로 나타났다. *B. cereus*에 대한 길항 효과를 나타낸 분리균주는 *B. subtilis*가 12균주로 가장 많았고, *B. amyloliquefaciens* 5균주, *B. licheniformis* 3균주 순으로 분포하였다. 균종별로 저지환의 크기는 *B. subtilis*에서 9.0~11.7 mm, *B. licheniformis* 9.3~11.0 mm, *B. amyloliquefaciens* 9.3~12.0 mm로 나타났다. 균종별 길항 빈도수를 살펴보면 *B. subtilis*가 155균 중 12균주(7.7%), *B. licheniformis* 68균주 중 3균주(4.4%), *B. amyloliquefaciens* 46균주 중 5균주(10.9%)로 나타났다. 이러한 결과는 청국장으로부터 *B. cereus*에 대한 길항균주 분리 결과, *B. subtilis* 1종을 분리하였다는 보고(35)와 비교하면 매우 많은 분리균주로서 전통된장의 경우 *B. cereus* 오염도가 식품공장 제조 된장에 비해 높지만 *B. cereus* 길항 효과를 나타내는 균주가 많은 것으로 판단된다. 이러한 실험 결과를 종합해 볼 때 전통된장에 오염된 *B. cereus* 위험성은 기존의 생각보다 낮을 것으로 판단되며, 향후 다수의 전통된장을 대상으로 한 *B. cereus* 길항 효과 실험이 필요한 것으로 판단되었다.

요 약

본 연구는 우리나라 장수지역에서 제조된 전통된장을 수거하여 식중독세균 오염도와 미생물 군집 현황을 분석하고, 분리된 미생물 군집의 *Bacillus cereus* 길항 효과를 평가함으로써 전통된장의 미생물학적 안전성을 평가하고자 하였다. 전통된장의 미생물학적 안전성을 평가하기 위해 일반세균, 대장균군, 식중독세균을 실험한 결과 일반세균수는 10^6~10^9 CFU/g의 분포를 나타내었고 대장균군은 불검출 되었다. 식중독세균 중 *B. cereus*는 전통된장 10개 중 7개에서 검출되었으나 기타 식중독균은 불검출 되었다. 실험 결과 장수지역 전통된장에 가장 문제가 되는 미생물은 *B. cereus*로 나타나 전통된장의 안전성 확보를 위해 *B. cereus* 제어가 중요한 것으로 판단되었다. 전통된장의 미생물 군집 분석결과 *Bacillus subtilis*가 155균주(47.4%)로 가장 높은 분포를 나타내었으며, *B. licheniformis* 68균주(20.8%), *B. amyloliquefaciens* 46균주(14.1%)로 높은 분포를 나타내는 등 총 327균주가 동정되었다. *B. cereus*에 대한 길항 효과를 평가한 결과 분리균주 327균주 중 20균주(6.1%)에서 9~12 mm 생육저지환이 관찰되었으며, *B. subtilis*가 12균주로 가장 많았고, *B. amyloliquefaciens* 5균주, *B. licheniformis* 3균주 순으로 분포하였다. 전통된장의 경우 *B. cereus* 오염도가 식품공장 제조 된장에 비해 높지만 *B. cereus* 길항 효과를 나타내는 균주가 많은 것으로 판단되었다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 전통된장에 오염된 *B. cereus* 위험성은 기존의 생각보다 낮을 것으로 판단되며, 향후 다수의 전통된장을 대상으로 한 *B. cereus* 길항 효과 실험이 필요한 것으로 판단되었다.

감사의 글

이 연구는 전라남도보건환경연구원 연구개발사업으로 수행된 결과로서 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kim MH, Chung HK. 2013. Development on native local food contents in *Damyang* through ancient writing storytelling. *Korean J Food Cult* 28: 261-271.
2. Kim MH, Chung HK. 2013. Development of local food content in *Jinan-Gun* and *Gurye-Gun* through storytelling. *Korean J Food Cult* 28: 145-157.
3. Gang GS, Park BJ, Yun SH, Kim IS, Bae JS, Kim HB, Lee HB, Park GN, Park BY, Lee JH. 2012. Characteristics of environment at the longevity village in Jeollanam-do. *The Report of Health and Environment Research* 23: 207-243.
4. Lee HT, Kim JH, Lee SS. 2009. Analysis of microbiological contamination and biogenic amines content in traditional and commercial Doenjang. *J Fd Hyg Safety* 24: 102-109.
5. Mok C, Song K, Lee JY, Park YS, Lim S. 2005. Changes in microorganisms and enzyme activity of low salt soybean paste (*Doenjang*) during fermentation. *Food Eng Prog* 9: 112-117.
6. Ahn JH, Park JA, Jo H, Woo I, Lee SH, Jang KI. 2012. Quality characteristics and antioxidant activity of commercial *Doenjang* and traditional *Doenjang* in Korea. *Korean J Food Nutr* 25: 142-148.
7. Choe GS, Lim SY, Choi JS. 1998. Antioxidant and nitrite scavenging effect of soybean, meju and doenjang. *Korean J Life Sci* 8: 473-478.
8. Kim MH, Im SS, Kim SH, Kim GE, Lee JH. 1994. Antioxidative materials in domestic Meju and Doenjang. 2. Separation of lipophilic brown pigment and their antioxidative activity. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 251-260.
9. Choi UK, Ji WD, Chung HC, Choi DH, Chung YG. 1997. Optimization for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 1039-1043.
10. Choi UK, Ji WD, Chung HC, Choi DH, Chung YG. 1997. Optimum condition for pigment production and antioxidative activity of the products by *Bacillus subtilis* DC-2 with response surface methodology. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 620-624.
11. Park KY, Moon SH, Baik HS, Cheigh HS. 1990. Antimutagenic effect of doenjang (Korean fermented soy paste) toward aflatoxin. *J Korean Soc Food Nutr* 19: 158-162.
12. Cui CB, Lee EY, Lee DS, Ham SS. 2002. Antimutagenic and anticancer effects of ethanol extract from Korean traditional *doenjang* added sea tangle. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 322-328.
13. Kim SH. 1998. New trends of studying on potential activities of *doenjang* fibrinolytic activity. *Korean Soybean Digest* 15: 8-15.
14. Lee SK, Heo S, Joo HK, Song KB. 1999. The study on isolation of fibrinolytic bacteria from soybean paste. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42: 6-11.
15. Agata N, Mori M, Ohta M, Suwan S, Ohtani I, Isobe M. 1994. A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiol Lett* 121: 31-34.
16. Schoeni JL, Wong AC. 2005. *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *J Food Prot* 68: 636-648.
17. Oh MH, Ham JS, Cox JM. 2012. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *Int J Food Microbiol* 152: 1-8.
18. Lund T, De Buyser ML, Granum PE. 2000. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Mol Microbiol* 38: 254-261.
19. Sun JK, Beak JH. 2008. The consuming tendency analysis of soybean paste market in Korea. *Korean J Food Marketing Economics* 25(3): 25-52.
20. Rho JD, Choi SY, Lee SJ. 2008. Quality characteristics of soybean pastes (*doenjang*) prepared using different types of microorganisms and mixing ratios. *Korean J Food Cook Sci* 24: 243-250.
21. Kim YS, Ahn YS, Jeong DY, Shin DH. 2008. Isolation and identification of *Bacillus cereus* from fermented red pepper-soybean paste (*kochujang*), and its heat resistance characteristics. *Food Sci Biotechnol* 17: 123-129.
22. Lim JS, Kim MR, Kim W, Hong KW. 2011. Detection and differentiation of non-emetic and emetic *Bacillus cereus* strains in food by real-time PCR. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 54: 105-111.
23. Kim CW, Cho SH, Kang SH, Park YB, Yoon MH, Lee JB, No WS, Kim JB. 2015. Prevalence, genetic diversity, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* isolated from Korean fermented soybean products. *J Food Sci* 80: M123-M128.
24. KFDA. 2015. *Food code*. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
25. Lee JS, Kwon SJ, Chung SW, Choi YJ, Yoo JY, Chung DH. 1996. Changes of microorganisms, enzyme activities and major components during the fermentation of Korean traditional *Doenjang* and *Kochujang*. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 24: 247-253.
26. Kim CR. 2006. Microbiological and sensory evaluations on sesame leaf of bio soybean paste. *J Fd Hyg Safety* 21: 218-222.
27. Kim YS, Jeong DY, Hwang YT, Uhm TB. 2011. Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method. *Korean J Microbiol* 47: 275-280.
28. Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH. 1999. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 27: 113-117.
29. Yumoto I, Hirota K, Nodasaka Y, Nakajima K. 2005. *Oceanobacillus oncorhynchi* sp. nov., a halotolerant obligate alkaiphile isolated from the skin of a rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), and emended description of the genus *Oceanobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 1521-1524.
30. Tominaga T, An SY, Oyaizu H, Yokota A. 2009. *Oceanobacillus soja* sp. nov. isolated from soy sauce production equipment in Japan. *J Gen Appl Microbiol* 55: 225-232.
31. Cho DH, Lee WJ. 1970. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation: a study on the microflora of fermented Korean Maeju loaves. *J Korean Agric Chem Soc* 13: 35-42.
32. Lee WJ, Cho DH. 1971. Microbiological studies of Korean native soy-sauce fermentation. A study on the microflora changes during Korean native soy-sauce fermentation. *J Korean Agric Chem Soc* 14: 137-148.
33. Kwon HY, Ryu HY, Kwon CS, Lee SH, Sohn HY. 2007. Optimization of culture conditions of *Bacillus pumilus* JB-1 for chungkook-jang fermentation in soybean boiling-waste liquor medium. *Kor J Microbiol Biotechnol* 35: 304-309.
34. Baek SY, Yun HJ, Choi HS, Koo BS, Yeo SH. 2010. Isolation and physiological characteristics of microorganisms producing extracellular enzymes from Korean traditional soybean sauce and soybean paste. *Kor J Microbiol Biotechnol* 38: 379-384.
35. Lee NK, Park JW, Cho IJ, Kim BY, Kwon KO, Hahm YT. 2008. Isolation of *Bacillus* spp. from *cheonggukjang* and its antagonistic effect against *Bacillus cereus*. *Korean J Food Sci Technol* 40: 669-673.