

Article

제주·호남권 전통된장과 고추장의 미생물 군집구조의 분석

조성호^{1*} · 박해석¹ · 조승화¹ · 임은정¹ · 양호연¹ · 하광수¹ · 김은지¹ · 양승조² · 정도연¹

¹재단법인 발효미생물산업진흥원, ²주식회사 천랩연구소

Comparison of microbial community profiling on traditional fermented soybean products (*Deonjang*, *Gochujang*) produced in Jeonbuk, Jeonnam, and Jeju province area

Sung Ho Cho^{1*}, Hae Suk Park¹, Seung Wha Jo¹, Eun Jung Yim¹, Ho Yeon Yang¹, Gwang Su Ha¹, Eun Ji Kim¹, Seung Jo Yang², and Do Yeon Jeong¹

¹Microbial Institute for Fermentation Industry, Sunchang 56048, Republic of Korea

²ChunLab, Inc., Seoul 08826, Republic of Korea

(Received December 12, 2016; Revised December 28, 2016; Accepted December 28, 2016)

In order to evaluate the diversity of microbial population of Korean traditional *Deonjang* and *Gochujang* produced in Jeju, Jeonnam, and Jeonbuk province area, microbial communities were analyzed using next generation sequencing. In this result, the dominant bacteria of *Deonjang* in three area were *Bacillus amyloliquefaciens*, *Tetragenococcus halophilus*, and *Bacillus* was major dominant bacteria in Jeonnam (43.16%) and Jeonbuk (64.54%) area. But in Jeju area, *Bacillus* was 0.22%, which was significantly different from the other two. Equally, the dominant fungi of *Deonjang* in 3 area were *Candida versatilis*. Common fungus in Jeonnam and Jeonbuk area was *Candida* sp., respectively, 64.22% and 33.68% and *Micor* sp. was a common fungus in Jeonnam (15.66%) and Jeonbuk area (36.73%). But in Jeju area, *Candida* sp. and *Zygosaccharomyces rouxii* were dominant than mold. *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, and *B. amyloliquenfaciens* were the preminant bacteria in the traditional *Gochujang* in three regions. But there were no common dominant fungi in the 3 regions. *Aspergillus* sp. and *Rhizopus* sp. prevailed in Jeju and Jeonnam region, and *Zygosaccharomyces rouxii* predominated in Jeonbuk area. These results suggested that the difference in the samples collected for the study were

classified into similar groups according to the characteristics of each sample rather than regional characteristics.

Keywords: *Deonjang*, *Gochujang*, bacteria, fungi, metagenomics, pyrosequencing

된장과 고추장은 콩을 이용한 우리나라 고유의 전통발효식품으로 된장은 콩을 100% 이용하는 메주를 사용하여 제조하며, 고추장은 제조하는 방식, 담금 원료의 종류(Shin *et al.*, 1997) 및 코오지의 종류(Shin *et al.*, 2001)에 따라 미생물의 분포와 효소역가가 차이가 있다. 전통장류는 자연방식으로 제조하여 지역이나 제조자에 따라 최종제품 미생물의 종류와 분포의 차이가 발생한다고 알려져 있다(Shin *et al.*, 1997).

전통된장의 제조과정 중 세균군집구조의 변화를 분석한 종수준의 연구에서 메주에서는 *Bacillus siamensis*가 32.54%로 가장 높은 군집빈도를 보였으나 발효와 숙성 후에 *Bacillus amyloliquefaciens*가 63.64%로 가장 높은 우점종이 되었다고 보고 하였다(Kim *et al.*, 2011). 숙성 후 된장의 세균군집구조는 숙성 전에 비해 *Bacillus* 종들이 증가 되었으며 상위 5위까지 *Bacillus*종들이 전체군집의 92.2%를 차지하였다고 밝혔다(Kim *et al.*, 2011). 또한 Jung 등(2016)은 된장 발효 중 세

*For correspondence. E-mail: sunghyej3@nate.com;
Tel.: +82-63-650-2021; Fax: +82-63-653-9590

균군집의 기능적 특성 연구를 통해 *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Oceanobacillus*와 *Tetragenococcus* 속이 분포함을 보고하였다. 그 중 332일간의 숙성기간 동안 *Bacillus* 종들이 우점 하였으며, 108일 이후부터는 *Tetragenococcus* 속이 증가하면서 유기산과 바이오제닉아민(Biogenic amine)이 증가하였고, 179 일째 *Lactobacillus* 속이 증가함에 따라 GABA가 증가함을 보고하였다(Jung et al., 2016).

순창 전통고추장 총 29종에 대해 전통적인 분리배양 방식으로 미생물 분포도를 조사한 결과 29종 중 17종에서 *Bacillus licheniformis*, 11종에서 *Bacillus subtilis*가 지배 세균임을 확인하였다(Jin et al., 2007). 또한 Lee 등(1996)은 재래식 고추장의 발효숙성 중에 *Bacillus* 속 분포비가 38-50%를 보였다고 밝혔다.

최근에 차세대염기서열분석(NGS)기술을 이용하여 전통 발효식품에 대한 군집분석 연구들을 보면 전통된장의 발효과정 중 군집의 변화와 대사체의 상관성(Jung et al., 2016), 김치 발효 동안 군집의 변화와 유기산의 변화(Jung et al., 2011, 2013) 등이 있다. NGS기술은 각 시료에 특이적인 바코드시스템인 pyrosequencing에 도입되어 국내에서도 환경오염 분야, 발효식품 분야 등의 미생물군집 분석에 이 방법의 이용이 활발해 지고 있다(Kim et al., 2011).

우리나라 호남 지역은 농업이 발달하여 전통발효식품산업도 타 지역에 비해 발달 되었으며, 해안지대를 끼고 있어 발효에 적합한 지역으로 알려져 있다. 또한 제주도는 섬 지역으로 사면이 바다로 쌓였으며, 우리나라 제일 남단에 위치하여 제주도와 호남지역의 특이적인 기후 및 풍토 특성을 고려한 미생물 군집연구는 흥미로운 연구주제이다. 본 연구에서는 도서 지역인 제주도와 내륙이면서 바다를 접하고 있는 전라남도 그리고 한국의 대표적인 농업지역인 전라북도에서 생산되는 전통 장류(된장, 고추장)에 대한 세균과 진균에 대한 미생물 군집을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시료의 수집 및 보관

전통 된장(Deonjang, DO)은 전북권(Jeonbuk, JB) 7 점, 전남권(Jeonnam, JN) 3 점과 제주도(Jeju, JJ) 2 점을 수집하였고, 전통고추장(Gochujang, GO)은 전북권 5 점, 전남 3 점과 제주도 2 점을 수집하였다. 수집된 샘플은 중균을 이용하지 않은 자연 발효한 시료를 수집하여 냉장보관 후 사용하였다. 시료에 대한 기본 정보는 Table 1 과 같다.

미생물 군집의 DNA 추출

전통된장과 전통고추장으로부터 고품질의 DNA를 추출하기 위해 FastDNA spin kit for soil (MP Biomdicals)을 사용하였다. 추출된 genomic DNA의 품질을 검증하기 위해 1차적으로 분광광도계(Epoch, BioTek)를 이용한 DNA 흡광도를 측정(A260/280 ratio)하였고, 2차로 정밀한 농도 측정을 위해 PicoGreen (Invitrogen) 장비를 이용하여 DNA 농도를 측정하였으며 최종적으로 전기영동을 통해 추출한 DNA의 품질을 검증하였다. 추출한 DNA에서 세균군집은 16S rRNA 유전자의 V3-V4 region을 타겟으로 하는 primer set을 사용하여 증폭하였고, 진균군집은 Fungi ITS2 region을 타겟으로 하는 primer set를 이용하여 PCR을 수행하였다.

염기서열분석(Next Generation Sequencing)

추출된 total genome DNA를 주형(template)으로 16S ribosomal DNA amplicon 및 ITS2 amplicon을 확보하기 위하여 341F (CCTACGGGNGGCWGCAG), 805R (GACTACHVGGGTATCTAATCC)을 기반으로 하는 bacterial 프라이머(Herlemann et al., 2011)와 ITS-3F (CATCGATGAAGAACGCAGC) 그리고 ITS-4R (TCCTCCGCTTATTGATATGC)을 기반으로 하는 ITS2 프라이머(Schoch et al., 2012)를 사용하였고, 10 × Taq buffer, dNTP mixture (각 10 mM), 2 U Taq polymerase (ExTaq, TaKaRa), 10 mM의 barcoded fusion primers 그리고 10 ng의 주형 DNA를 넣고 PCR (C1000 Touch thermal cycler; Bio-Rad)을 실시하였다. PCR 반응은 초기 변성(initial denaturation) 95°C 3분, 변성(denaturation) 95°C 30초, 프라이머 결합(annealing) 55°C 30초, DNA 합성(extension) 72°C 30초, 변성부터 DNA합성 과정 25회 반복, 최종 신장(elongation) 72°C 5분의 조건에서 수행하였다. PCR된 시료는 전기영동을 통하여 확인하였으며 AgencourtAMPureXP Reagents beads (Bechman Coulter)를 이용하여 증폭산물 이외의 불순물들을 제거하였다. 정제된 PCR 산물은 동량 모아서 Bioanalyzer 2100 (Agilent)으로 증폭산물의 길이와 농도를 측정하였다. 최종 PCR 산물은 차세대염기서열 분석인 MiSeq 250 paired-end system (Illumina)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 Chunlab Inc.에서 수행하였다.

데이터 분석

해독된 염기서열은 평균 스코어 25 이상, 300 bp 이상인 것만을 대상으로 trimmomatic software verion 0.32 (Bolger et al., 2014)를 사용하여 품질을 검토하였고, 시료 별 바코드 정보를

Table 1. Information on samples collected in Jeju, Jeonnam, and Jeonbuk province area

Sample Name	Province Area	ID Number	Specification	Sample Name	Province Area	ID Number	Specification
	Jeju	GO1	Aging 1 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice, Tangerine (gamgyul)		Jeju	DO1	Aging 1 year, Natural fermentation, Yellow soybean
		GO2	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice			DO2	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean
		GO3	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice			DO3	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean
	Jeonnam	GO4	Aging 2 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice		Jeonnam	DO4	Aging 1 year, Natural fermentation, Yellow soybean
		GO5	Aging 1 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice			DO5	Aging 2 year, Natural fermentation, Yellow soybean
Gochujang		GO6	Aging 5 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice	Deonjang		DO6	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean
		GO7	Aging 2 year, Natural fermentation, Yellow soybean			DO7	Aging 5 year, Natural fermentation, Yellow soybean
		GO8	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice			Jeonbuk Sunchang	DO8
	GO9	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Glutinous rice		DO9	Aging 2 year, Natural fermentation, Yellow soybean		
	Jeonbuk Sunchang	GO10	Aging 2 year, Natural fermentation, Yellow soybean		Jeonbuk Gochang	DO10	Aging 1 year, Natural fermentation, Yellow soybean
						DO11	Aging 2 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Low-temperature Aging
						DO12	Aging 3 year, Natural fermentation, Yellow soybean, Rhus coriaria extract

기초로 하여 분류(sorting) 한 뒤, 프라이머 및 바코드 서열을 제거하여 최종 염기서열을 획득하였다. Chimera 염기서열은 UCHIME (Edgar *et al.*, 2010)를 사용하여 탐색 후 제거하였으며, 분류학적 식별은 Chunlab Inc.에서 제작한 원핵생물 동정 데이터베이스 EzTaxon-e (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>)을 이용하여 종 수준까지 동정하였다(Kim *et al.*, 2012). 각 시료에서의 operational taxonomic units (OTUs)는 CD-HIT (Fu *et al.*, 2012)을 사용하여 조사하였으며, 각 염기서열의 clustering은 Uclust (Edgar *et al.*, 2011)를 사용하여 최소 97% 염기서열

유사도를 기준으로 하였다. 이 후 각 시료의 분석은 Chunlab, Inc.에서 제공하는 전용 분석소프트웨어인 CLcommunity software를 사용하였다.

결과 및 고찰

전통된장의 미생물 분포 및 구조

지역 권역별로 시료의 세균 군집과 진균 군집 분석을 바탕

으로 계산된 통계분석 결과는 Table 2A와 2B 같이 요약하였다. 대부분의 시료에서 0.91 이상과 0.97 이상의 Good's Lib. Coverage를 보여 전체 세균 군집과 진균 군집을 파악하는데 충분한 read수를 얻었다. 또한 각 시료 별 종 추정치(OTUs) 개수는 된장의 세균은 1,105-2,287개, 진균은 129-846개로 분석되었다. 종 풍부도(Species richness) Chao1는 된장의 세균에서는 6,930-16,167, 진균에서는 365-2,946으로 계산되었다. 종 다양성(Species diversity) Shannon은 된장의 세균에서 1.52-4.70, 진균에서 0.96-3.62로 계산되었다.

된장의 세균분포도를 종(Species) 수준에서 차지하는 비율이 5% 이상인 종만 보면 *Bacillus amyloliquefaciens* (35.75%), *Tetragenococcus halophilus* (13.54%), *Lactobacillus rennini* (9.29%), *Bacillus licheniformis* (7.45%), *Enterococcus faecium* (6.65%)를 보였으며, *Bacillus* 속은 전체의 48.20%로 차지하

였다. 제주도 된장의 경우에는 *Tetragenococcus halophilus* (38.47%), *Lactobacillus vennini* (26.32%), *Oceanobacillus aidingensis* (13.42%), *Oceanobacillus locisalsi* (6.31%)를 차지하고 있었다. 전남 된장의 경우에는 *Bacillus amyloliquefaciens* (29.25%), *Enterococcus faecium* (19.95%), *Lactobacillus rennini* (18.06%), *Bacillus subtilis* (8.69%), *Tetragenococcus halophilus* (7.41%)를 나타내었다. 마지막으로 전북 된장의 경우는 *Bacillus amyloliquefaciens* (49.07%), *Bacillus licheniformis* (11.47%), *Tetragenococcus halophilus* (8.73%), *Clostridium marbusti* (7.13%)를 보였었다(Table 4A). 이러한 결과는 Fig. 1의 (1)에서 보듯이 각 된장 시료간의 세균 군집구조를 비교해 보기 위해 PCA분석과 UPGMA dendrogram 분석을 실시한 결과, 크게 군집구조의 유사성이 있는 2개의 그룹으로 묶였다. 하지만, 제주시료들과 전남 DO3, DO5 그리고 전북 DO8과 DO12 시료

Table 2. Microbial diversity indices of each fermented traditional *Deonjang*

(A) Bacterial diversity

Sample	Valid reads	OTUs ^a	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
JJ DO1	16600	1193	21300	11063	3.41	0.13	0.94
JJ DO2	16816	1294	16075	9306	3.93	0.07	0.94
JN DO3	16816	1733	26156	13327	4.68	0.04	0.92
JN DO4	19678	1127	17341	7974	2.94	0.18	0.96
JN DO5	17394	1296	13634	6930	4.06	0.07	0.95
JB DO6	17944	1109	15215	7666	3.33	0.16	0.95
JB DO7	19928	1134	14833	7375	1.52	0.66	0.95
JB DO8	17680	1477	16551	10765	4.70	0.03	0.94
JB DO9	15930	1105	16998	7790	3.26	0.15	0.95
JB DO10	18561	1613	18217	9042	3.60	0.15	0.94
JB DO11	19155	2064	28702	15506	3.69	0.16	0.92
JB DO12	19927	2287	24951	16167	4.49	0.05	0.91

^a OTUs, operational taxonomic units

(B) Fungal diversity

Sample	Valid reads	OTUs ^a	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
JJ DO1	19923	314	1301.88	968.39	1.92	0.35	0.99
JJ DO2	19918	656	3357.73	2175.29	3.09	0.14	0.98
JN DO3	19962	475	2032.86	1618.28	3.27	0.09	0.99
JN DO4	19956	129	461.33	365.14	0.96	0.70	1.00
JN DO5	19971	288	1131.02	1065.00	1.83	0.44	0.99
JB DO6	19915	691	2882.45	1981.11	3.62	0.08	0.98
JB DO7	19978	236	708.93	761.27	1.52	0.55	0.99
JB DO8	19946	648	3295.88	2541.16	2.87	0.14	0.98
JB DO9	19844	380	1719.82	1123.36	2.41	0.17	0.99
JB DO10	19972	846	3936.59	2946.87	3.04	0.23	0.97

^a OTUs, operational taxonomic units

는 PCA 분석에서는 유의한 그룹으로 묶이지 않았다. 3개 지역에서 공통적으로 우점하는 세균은 *B. amyloliquefaciens*와 *Tetragenococcus halophilus*이며, *Bacillus* 속은 전남권(43.16%), 전북권(64.54%)로 주요한 우점종이었다. 그러나 제주도는 *Bacillus* 속이 0.22%로 내륙과 제주도는 현저한 차이를 보여주었다.

된장의 진균 분포도를 종(Species) 수준에서 차지하는 비율이 약 5% 이상인 종만 보면 *Candida versatilis* (31.52%), *Mucor racemosus* (23.03%), *Candida apicola* (12.62%), *Debaryomyces hansenii* (7.61%), *Penicillium expansum* (6.10%), *Zygosaccharomyces rouxii* (5.04%), *Rhizopus stolonifera* (4.10%)를 보였다. 제주도 된장의 경우에는 *Candida versatilis* (39.86%), *Debaryomyces hansenii* (33.74%), *Zygosaccharomyces rouxii* (16.64%)를 나타내었다. 전남권의 경우, *Candida versatilis* (38.24%), *Candida apicola* (25.99%), *Mucor racemosus* (15.66%), *Penicillium expansum* (7.62%), *Rhizopus stolonifera* (5.65%)의 분포를 보였다. 마지막으로 전북권의 경우에는 *Mucor racemosus* (15.66%), *Candida versatilis* (38.24%), *Candida*

apicola (25.99%), *Penicillium expansum* (7.62%), *Rhizopus stolonifera* (5.65%)를 보였다(Table 4B). 이러한 결과는 Fig. 1의 (2)에서 보듯이 각 된장 시료간의 진균 군집구조를 비교해 보기 위해 PCA 분석과 UPGMA dendrogram 분석을 실시한 결과, 전북 DO4와 DO7 시료는 유사한 군집구조를 보여 같은 그룹으로 묶였으나, 나머지 시료들은 대부분 유의한 그룹으로 묶이지 않았다. 3개 지역에서 공통적으로 우점하는 진균은 *Candida versatilis*이었으며, *Candida* 속은 전남권(64.22%), 전북권(33.68%)이었고, *Mucor* 속은 전남권(15.66%), 전북권(36.73%)를 보이는 호남권의 주요한 우점종이었다. 그러나 제주도는 곰팡이 보다는 효모인 *Candida* 속과 *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종이었다.

본 연구를 통해 자연발효를 통해 제조된 된장에서 세균은 *B. amyloliquefaciens*와 *Tetragenococcus halophilus*, 진균 중 곰팡이는 *Mucor* 속, 그리고 효모는 *Candida* 속과 *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종임을 확인하였다. 그러나 본 연구를 위해 수집된 전통 된장에서는 공장형 된장 제조에 주로 사용하는 *Aspergillus oryzae*는 비우점균으로 밝혀졌다. 이러한 결과는

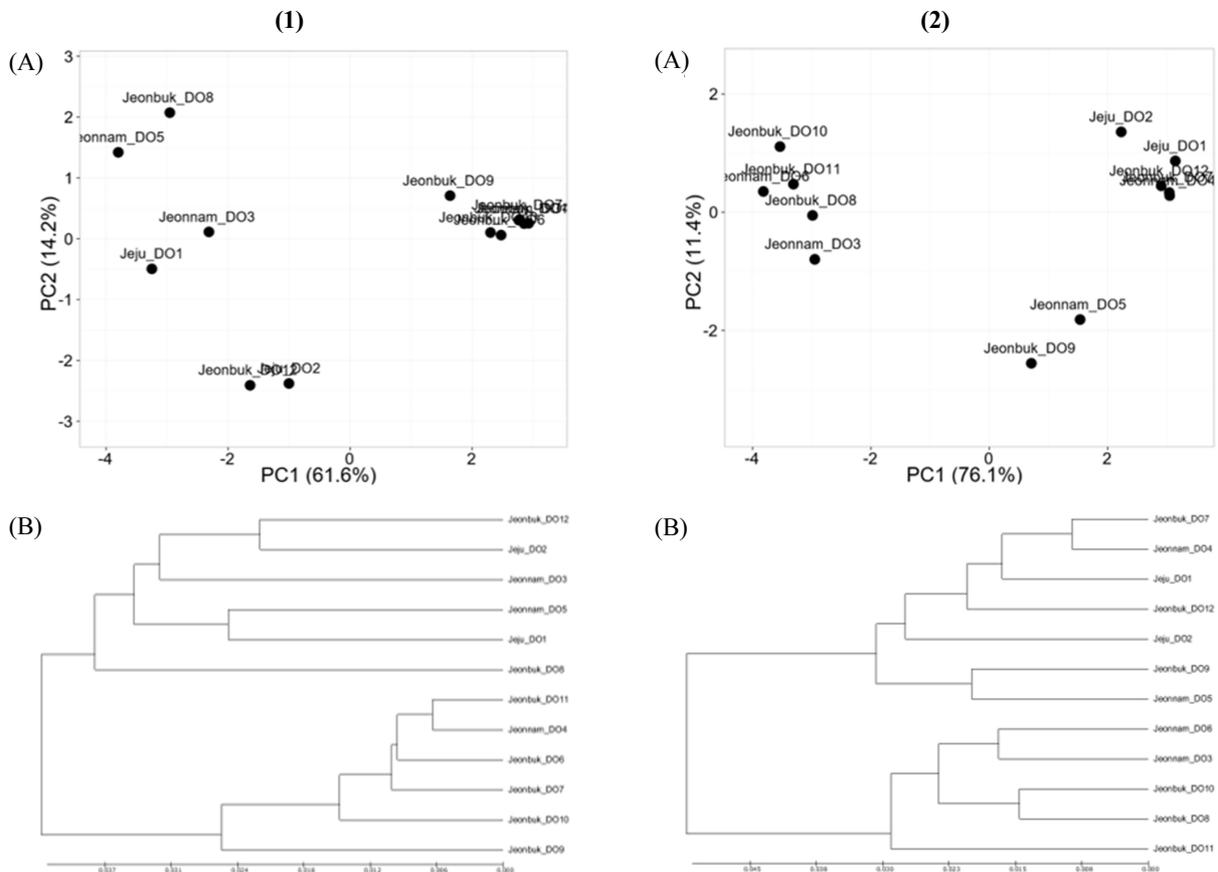


Fig. 1. Comparison of microbial community in Deonjang. (1) Bacteria, (2) Fungi.

숙성 후 된장에서 *Bacillus* 속의 상대적 균집빈도가 92.2%에 달하고 내염성 젖산균인 *Tetragenococcus halophilus*가 2.0%로 그 다음 순위였다고 보고한 결과와 비슷하였다(Kim et al., 2011). 또한 *Bacillus* 속은 된장 발효 0일차부터 332일차까지 주요한 우점종(약 40%)이며, 내염성, 호염성 세균인 *Oceanobacillus*와 *Tetragenococcus*가 된장 발효 108일차에 우점하였다는 결과와도 유사성을 보여준다(Jung et al., 2016).

전통고추장의 미생물 분포 및 구조

지역 권역별로 전통 고추장 시료의 세균 균집과 진균 균집 분석을 바탕으로 계산된 통계분석 결과는 Table 3A와 3B와 같이 요약하였다. 대부분의 시료에서 0.91 이상과 0.97 이상의 Good's Lib. Coverage를 보여 전체 세균 균집과 진균 균집을 파악하는데 충분한 read수를 얻었다. 또한 각 시료 별 종 추정치(OTUs) 개수는 고추장의 세균은 1,053-2,103개, 진균은 382-1,074개로 분석되었다. 종 풍부도(Species richness) 수치

(Chao1)는 고추장의 세균에서는 6,033-18,742, 진균에서는 820-4,558으로 계산되었다. 종 다양성(Species diversity) 수치(Shannon)는 된장의 세균에서 2.80-4.53, 진균에서 2.35-4.51로 계산되었다.

고추장의 세균분포도를 종(Species) 수준에서 차지하는 비율이 5% 이상인 종만 보면 *Bacillus subtilis* (26.06%), *Bacillus licheniformis* (20.95%), *Bacillus thermoamylovorans* (13.27%), *Bacillus amyloliquefaciens* (9.03%), *Thermoactinomyces vulgaris* (8.81%)를 보였으며, *Bacillus*가 전체의 80.02%를 차지하였다. 제주도 고추장의 경우에는 *Bacillus thermoamylovorans* (40.93%), *Bacillus subtilis* (19.29%), *Bacillus licheniformis* (17.15%)를 차지하고 있었다. 전남권 고추장의 경우에는 *Bacillus subtilis* (28.05%), *Bacillus licheniformis* (22.63%), *Bacillus amyloliquefaciens* (10.99%), *Enterococcus faecium* (9.39%), *Bacillus sonorensis* (8.38%), *Lactobacillus rennini* (6.22%)를 나타내었다. 마지막으로 전북권 고추장의 경우는 *Bacillus*

Table 3. Microbial diversity indices of each fermented traditional *Gochujang*

(A) Bacterial diversity

Sample	Valid reads	OTUs ^a	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
JJ GO1	17688	1053	10462	6033	3.61	0.11	0.96
JJ GO2	19775	1545	40391	13753	2.80	0.27	0.93
JN GO3	19508	2103	36608	18742	4.35	0.06	0.91
JN GO4	19187	1389	19716	10225	3.91	0.07	0.94
JN GO5	18995	1391	21378	11437	3.72	0.11	0.94
JB GO6	19222	1213	18548	9093	3.26	0.17	0.95
JB GO7	16701	1541	15779	7973	4.53	0.04	0.93
JB GO8	18362	1694	24150	13831	4.01	0.08	0.93
JB GO9	18399	1353	21002	10358	3.66	0.11	0.94
JB GO10	18952	1321	15382	7848	3.28	0.13	0.95

^a OTUs, operational taxonomic units

(B) Fungal diversity

Sample	Valid reads	OTUs ^a	ACE	Chao1	Shannon	Simpson	Goods Lib. Coverage
JJ GO1	19881	496	1022.46	820.14	2.35	0.30	0.99
JJ GO2	19879	463	734.44	717.63	3.36	0.12	0.99
JN GO3	19942	515	1149.05	1080.92	2.77	0.17	0.99
JN GO4	19986	755	3636.93	2145.67	2.70	0.26	0.98
JN GO5	19805	382	774.35	712.72	2.62	0.22	0.99
JB GO6	19951	880	6357.80	3916.57	2.52	0.29	0.97
JB GO7	19944	860	5174.85	4558.56	4.51	0.04	0.97
JB GO8	19972	1074	5722.61	3817.16	3.46	0.12	0.97
JB GO9	19952	877	4188.27	2847.74	2.51	0.39	0.97
JB GO10	19971	881	5589.33	3239.98	2.69	0.36	0.97

^a OTUs, operational taxonomic units

subtilis (27.59%), *Bacillus licheniformis* (21.48%), *Bacillus amyloliquefaciens* (10.20%), *Thermoactinomyces vulgaris* (17.17%), *Bacillus thermoamylovorans* (7.83%)를 보였다 (Table 5A). 이러한 결과는 Fig. 2의 (1)에서 보듯이 각 고추장

시료간의 세균 군집구조를 비교해 보기 위해 PCA 분석과 UPGMA dendrogram 분석을 실시한 결과, 전남 GO3, 전북 GO7 그리고 전북 GO8 시료들을 제외하고 나머지 고추장 시료들은 대체적으로 비슷한 세균 군집 구조를 보여 한 개의 큰

Table 4. Taxonomic classification at the species levels showing microbial community of each *Deonjang*

(A) Bacterial community

Taxonomy (species level)	JJ DO1	JJ DO2	JN DO3	JN DO4	JN DO5	JB DO6	JB DO7	JB DO8	JB DO9	JB DO10	JB DO11	JB DO12
<i>Kroppenstedtia_AJ251778_s</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.01	0.09	0.01	12.65	0.00	0.00
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.04	0.08	15.50	56.41	0.14	61.91	88.84	6.58	36.56	20.93	68.80	3.68
<i>Bacillus licheniformis</i>	0.04	0.13	3.85	3.74	0.04	9.19	4.14	0.89	0.19	44.16	8.49	0.07
<i>Bacillus sonorensis</i>	0.01	0.02	5.16	0.09	0.00	0.18	0.02	0.06	0.01	3.25	1.22	0.04
<i>Bacillus subtilis</i>	0.04	0.03	1.35	19.89	0.16	5.34	0.96	0.28	6.98	2.79	1.65	0.66
<i>Chromohalobacter beijerinckii</i>	1.15	0.01	0.15	0.02	4.24	0.11	0.00	0.03	0.01	0.28	0.00	0.00
<i>Clostridium marbusti</i>	0.01	4.23	0.02	0.06	0.17	0.01	0.00	3.24	31.36	0.48	6.63	0.00
<i>Clostridium pasteurianum</i>	0.00	0.00	0.00	9.34	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	1.96	0.02
<i>Enterococcus faecium</i>	0.02	0.18	14.40	1.46	33.29	2.77	0.03	14.07	0.29	0.30	0.03	0.00
<i>Erwinia billingiae</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	3.05	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Kosakonia cowanii</i>	0.00	0.00	0.15	0.00	0.49	0.00	0.00	4.34	0.02	0.00	0.04	0.00
<i>Lactobacillus remini</i>	30.67	15.02	19.91	0.00	24.57	0.01	0.00	1.21	0.09	1.88	0.06	0.00
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	0.01	0.02	0.66	0.00	3.98	1.47	0.00	0.95	0.11	0.01	1.22	0.02
<i>Oceanobacillus aidingensis</i>	0.01	23.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01	0.00	13.48
<i>Oceanobacillus locisalsi</i>	0.00	10.95	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	2.34
<i>Oceanobacillus oncorhynchi</i>	0.00	4.51	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.07
<i>Pseudomonas deceptionensis</i>	0.01	0.00	0.07	0.00	0.04	0.05	0.00	6.99	0.04	0.03	0.00	0.00
<i>Pseudomonas fragi</i> group	0.02	0.00	0.01	0.00	0.21	0.35	0.00	3.02	0.04	0.06	0.00	0.00
<i>Pseudomonas syringae</i> group	0.01	0.01	0.20	0.00	0.36	0.49	0.00	5.95	0.06	0.11	0.00	0.00
<i>Sporolactobacillus nakayamae</i>	0.00	0.09	0.02	0.00	0.13	0.03	0.00	0.10	13.61	0.23	0.08	0.00
<i>Staphylococcus cohnii</i>	2.69	13.51	4.53	0.04	0.17	0.00	0.00	0.44	0.05	0.22	0.01	22.59
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	56.75	10.02	11.21	0.12	6.93	0.97	0.05	10.67	1.55	1.02	0.06	36.82

(B) Fungal community

Taxonomy (species level)	JJ DO1	JJ DO2	JN DO3	JN DO4	JN DO5	JB DO6	JB DO7	JB DO8	JB DO9	JB DO10
<i>Candida apicola_3</i>	0.00	0.02	0.21	0.00	67.05	0.02	0.05	13.01	27.83	1.28
<i>Candida versatilis</i>	58.00	17.01	15.06	83.85	0.05	0.74	74.39	5.21	18.43	0.69
<i>Debaryomyces hansenii_2</i>	12.10	51.39	1.14	0.01	0.15	0.00	0.75	0.04	0.00	0.47
<i>Millerozyma_uc</i>	11.24	0.01	0.01	0.00	0.52	0.00	0.02	0.02	0.85	0.01
<i>Mucor racemosus_1</i>	0.30	4.49	33.27	0.07	7.18	21.99	0.88	59.93	18.03	53.65
<i>Penicillium expansum_1</i>	0.02	1.89	19.46	0.03	0.23	7.25	0.15	2.41	21.31	0.16
<i>Penicillium italicum_2</i>	0.00	0.00	0.03	0.00	0.57	0.22	0.01	5.51	0.02	0.02
<i>Penicillium solitum_1</i>	0.08	0.17	3.33	0.50	0.07	17.84	1.59	0.23	0.39	0.97
<i>Rhizopus stolonifer_6</i>	0.02	0.00	0.01	0.00	0.00	5.37	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Rhizopus stolonifer_7</i>	0.00	0.00	1.10	0.00	9.82	17.61	0.00	0.09	0.00	6.99
<i>Rhizopus stolonifer_8</i>	0.07	0.00	9.53	0.01	5.08	6.31	0.05	1.05	0.00	0.73
<i>Schwanniomyces capriottii_2</i>	0.01	0.05	0.00	0.00	0.00	0.01	0.08	0.06	0.02	7.69
<i>Wickerhamomyces anomalus_5</i>	0.00	0.02	0.01	0.04	0.00	0.01	0.00	0.01	6.11	0.01
<i>Zygosaccharomyces rouxii_5</i>	0.07	13.30	0.41	0.01	0.00	0.48	7.95	2.91	0.04	0.02
<i>Zygosaccharomyces rouxii_7</i>	11.93	6.01	0.00	0.00	0.00	0.05	0.31	0.13	0.11	0.03

군(group)으로 묶였으며, 이는 지역적인 특징보다는 각 시료의 군집 특성에 따른 것으로 사료된다. 3개 지역에서 공통적으로 우점하는 세균은 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*이며, *B. amyloliquefaciens*는 호남권에서만 우점종이었다. 전반적으로 고추장에서 *Bacillus* 속이 우점균이라는 내용과 일치되는 결과를 나타냈다(Lee et al., 1996; Jin et al., 2007; Nam et al., 2012).

고추장의 진균 분포도를 종(Species) 수준에서 차지하는 비율이 약 5% 이상인 종만 보면 *Zygosaccharomyces rouxii* (41.70%), *Aspergillus flavus* (14.49%), *Rhizopus arrhizus* (6.81%)를 보였다. 제주도 고추장의 경우에는 *Aspergillus flavus* (44.84%), *Candida* sp. (11.29%)를 나타내었다. 전남권의 경우, *Rhizopus arrhizus* (21.08%), *Aspergillus flavus* (14.41%), *Candida inconspicua* (8.62%)의 분포를 보였다. 마지막으로

Table 5. Taxonomic classification at the species levels showing microbial community of each *Gochujang*

(A) Bacterial community

Taxonomy (species level)	JJ GO1	JJ GO2	JN GO3	JN GO4	JN GO5	JB GO6	JB GO7	JB GO8	JB GO9	JB GO10
<i>Aneurinibacillus thermoaerophilus</i>	0.07	0.00	1.19	3.28	0.37	0.52	17.12	0.01	1.72	0.02
<i>Bacillus aerophilus</i> group	0.02	7.75	0.14	0.19	0.03	0.04	0.07	0.16	0.00	0.08
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.18	5.13	2.94	20.78	2.65	1.78	0.81	3.92	2.13	34.87
<i>Bacillus licheniformis</i>	10.58	17.96	13.87	21.39	19.07	18.16	12.54	9.39	33.00	18.56
<i>Bacillus pumilus</i> group	0.02	3.18	0.07	0.05	0.08	0.08	0.02	0.16	0.00	0.07
<i>Bacillus smithii</i>	1.19	0.00	8.01	0.46	0.01	0.97	12.10	0.05	2.65	0.05
<i>Bacillus sonorensis</i>	0.19	1.44	17.91	2.06	0.15	0.64	1.65	1.72	1.04	4.90
<i>Bacillus subtilis</i>	2.10	30.00	4.12	15.63	47.58	48.01	4.20	12.50	32.38	20.62
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	67.29	0.82	0.25	2.66	6.14	17.16	5.28	1.07	9.17	0.73
<i>Bacillus_uc</i>	5.28	1.15	1.14	1.34	2.04	2.30	1.37	0.83	2.45	1.87
<i>Bacteria_uc_s</i>	0.48	1.82	3.27	0.82	0.34	0.28	0.42	0.29	0.49	0.77
DQ129291_s	3.11	0.04	0.00	0.09	0.40	1.29	0.20	0.09	1.53	0.04
<i>Enterococcus faecium</i>	0.01	0.15	9.83	11.70	1.01	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	0.00	0.00	1.40	0.00	0.00	0.00	6.20	0.00	0.00	0.00
<i>Lactobacillus rennini</i>	0.04	0.08	14.93	0.00	0.01	0.00	0.21	0.00	0.00	0.00
<i>Thermoactinomyces daqus</i>	0.02	6.30	0.03	0.12	0.36	0.09	0.02	0.13	0.21	0.16
<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	0.00	0.00	0.03	0.08	0.01	0.09	7.44	51.70	4.95	9.07

(B) Fungal community

Taxonomy (species level)	JJ GO1	JJ GO2	JN GO3	JN GO4	JN GO5	JB GO6	JB GO7	JB GO8	JB GO9	JB GO10
<i>Alternaria</i> group	0.31	1.58	0.16	0.32	2.90	0.00	0.44	0.08	0.00	0.06
<i>Aspergillus flavus</i> _3	75.61	0.22	33.24	3.93	0.04	0.02	5.23	0.08	0.25	2.26
<i>Aspergillus versicolor</i> _2	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.01	6.26	0.04	0.02	0.17
<i>Candida inconspicua</i> _1	4.19	0.31	0.88	0.01	21.37	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00
<i>Candida versatilis</i>	0.07	0.02	0.05	0.01	0.02	0.08	5.38	0.97	0.11	0.01
<i>Candida_uc</i>	0.04	19.05	0.00	0.00	0.13	0.21	5.62	0.01	0.00	0.00
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> _1	0.02	5.59	0.12	0.05	0.01	0.00	0.29	0.01	0.01	0.00
<i>Cryptococcus magnus</i> _2	0.01	0.02	0.01	0.00	0.03	0.00	20.72	0.01	0.00	0.11
<i>Debaryomyces_uc</i>	0.01	0.01	0.07	0.00	0.01	0.01	5.82	0.00	0.01	0.00
<i>Eukarya_uc_s</i>	9.02	52.15	29.87	2.10	66.73	0.03	2.16	0.13	0.10	0.17
<i>Eurotiomycetes_uc_s</i>	0.07	0.01	0.03	21.76	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>Rhizopus arrhizus</i> _3	0.05	0.01	0.06	53.93	0.46	0.01	1.46	0.02	0.05	0.78
<i>Schwammomyces capriottii</i> _2	0.00	0.00	19.39	0.02	0.03	0.11	0.79	0.00	0.00	0.03
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> _5	0.01	0.43	0.35	0.02	0.05	59.80	3.98	29.12	7.12	2.71
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> _7	0.01	0.30	0.01	0.01	0.03	29.05	3.54	49.15	81.29	80.94

전북권의 경우에는 *Zygosaccharomyces rouxii* (85.20%)를 보였다(Table 5B). 이러한 결과는 Fig. 2의 (2)에서 보듯이 각 고추장 시료간의 진균 군집구조를 비교해 보기 위해 PCA분석과 UPGMA dendrogram 분석을 실시한 결과, 전북 GO6, GO8, GO9, GO10 시료들은 아주 비슷한 군집으로 묶였으며, 전남 GO4 시료를 제외한 나머지 고추장 시료들은 대체적으로 2개의 그룹으로 느슨하게 묶였다. 3개 권역의 고추장에서 진균의 경우는 공통적인 우점균이 없었으며, 제주도와 전남권은 곰팡이(*Aspergillus* 속, *Rhizopus* 속)가 우세하였고, 전북권은 효모(*Zygosaccharomyces rouxii*)가 우점종이었다.

본 연구에서 전북권 고추장은 순창 전통고추장 마을에서 2-5년간 숙성한 고추장을 시료로 하여 분석하였는데, 세균은 *Bacillus* 속이 75.37%를 점하였고, 진균은 효모가 89.7% 중에 *Zygosaccharomyces rouxii*가 85.20%를 차지하였다. 이러한 결과는 순창전통고추장 총 29종의 표본 중 17종의 지배세균이 *B. licheniformis*, 11종이 *B. subtilis*이었고, 효모가 25종 표본에서 검출되었는데 23종 표본에서 *Zygosaccharomyces pseudorouxii*이었고, 2종의 표본에서 *Zygosaccharomyces rouxii*이었다는 결과와 유사하였다(Jin et al., 2007).

적 요

전통방식으로 제조하는 전통 장류인 된장과 고추장은 제조하는 환경과 방법, 미생물 그리고 제조자에 따라 다양한 풍미와 특성을 나타낸다고 알려져 있다. 본 연구에서는 전통 된장과 전통 고추장의 미생물 분포도를 제주도(된장 2점, 고추장 2점), 전남권(된장 3점, 고추장 3점), 전북권(된장 7점, 고추장 5점)으로 구분하여 미생물(세균, 진균) 분포의 차이점과 유사점에 대해 차세대 염기서열 분석법을 이용하여 분석하였다. 분석시료는 종균을 이용하지 않고 자연발효 되었고, 1~5년간 발효 숙성된 제품으로 수집되었다. 전통 된장의 세균 분포도를 보면, 3개 지역에서 공통적으로 우점하는 세균은 *B. amyloliquefaciens*와 *Tetragenococcus halophilus*이었으며, *Bacillus* 속은 전남권(43.16%), 전북권(64.54%)에서 주요한 우점균이었다. 그러나 제주도의 시료는 *Bacillus* 속이 0.22%로 내륙과 제주도는 현저한 차이를 보여주었다. 진균 분포도를 보면, *Candida versatilis*는 3개 지역에서 공통적으로 우점하였으며, *Candida* 속은 전남권(64.22%), 전북권(33.68%)이었고, *Mucor* 속은 전북권(36.73%), 전남권(15.66%)의 주요한 우점종이었다. 그러나 제주도 시료는 곰팡이 보다는 효모인

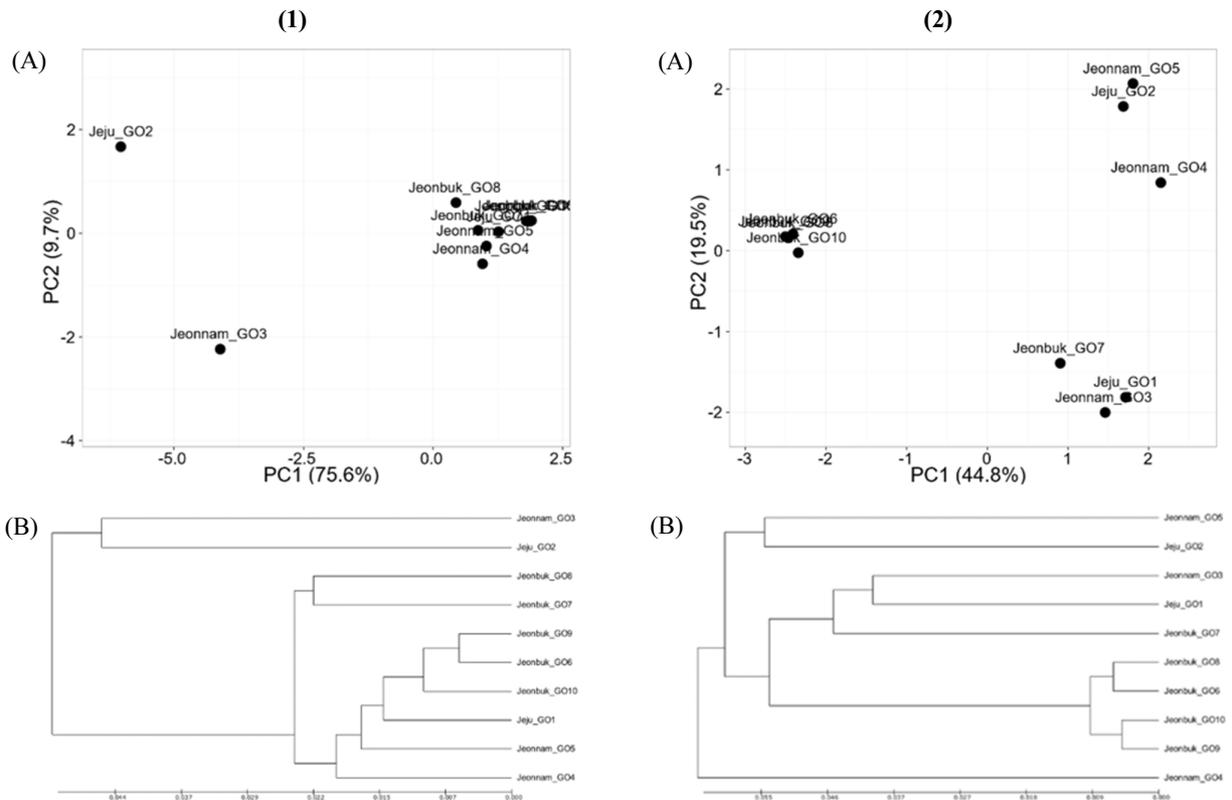


Fig. 2. Comparison of microbial community in Gochujang. (1) Bacteria, (2) Fungi

Candida 속과 *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점균이었다. 전통 고추장의 세균 분포도를 보면, 3개 지역에서 공통적으로 우점하는 세균은 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*이며, *B. amyloliquefaciens*는 호남권에서만 우점종이었다. 전반적으로 고추장에서 *Bacillus* 속이 우점균이라는 내용과 일치되는 결과를 나타냈다(Jin et al., 2007). 진균 분포도를 보면, 3개 권역의 고추장에서 공통적인 우점종이 없었으며, 제주도와 전남권은 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속이 우세하였고, 전북권은 *Zygosaccharomyces rouxii*가 우점종이었다. 이러한 결과는 본 연구를 위해 수집된 표본에서는 전통 된장과 전통 고추장은 지역적인 특징보다는 각 시료의 군집특성에 따라 유사 군이 형성된 것으로 사료되었다. 따라서 본 연구결과를 기반으로 하여 우리나라 전국적으로 표본을 수집하여 분석함으로써 보다 명확한 지역적, 시료 특성별 유사점과 차이점에 대한 미생물의 군집 분포도를 정의할 수 있을 것으로 예상되었다.

감사의 말

본 연구는 산업통상자원부가 지원하는 창의산업거점기관 지원사업 중 한국형유용균주산업화기반구축사업(과제번호 R0004073)으로 수행되었습니다.

References

- Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114-2120.
- Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460-2461.
- Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**, 2194-2200.
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., and Li, W. 2012. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics* **28**, 3150-3152.
- Herlemann, D.P., Labrenz, M., Jürgens, K., Bertilsson, S., and Waniek, J.J. 2011. Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J.* **5**, 1571-1579.
- Jin, H.S., Kim, J.B., and Lee, K.J. 2007. Major microbial composition and its correlation to the taste of *Sunchang* traditional *Kochujang*. *Korean J. Food Nutr.* **20**, 363-368.
- Jung, W.Y., Jung, J.Y., Lee, H.J., and Jeon, C.O. 2016. Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of *Deonjang*: A traditional Korean fermented soybean paste. *Front. Microbiol.* **7**, 827.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Jin, H.M., Hahn, Y.S., Madsen, E.L., and Jeon, C.O. 2013. Metatranscriptomic analysis of lactic acid bacterial gene expression during kimchi fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **163**, 171-179.
- Jung, J.Y., Lee, S.H., Kim, J.M., Park, M.S., Bae, J.W., and Hahn, Y.S. 2011. Metagenomics analysis of *Kimchi*, a traditional Korean fermented food. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 2264-2274.
- Kim, O.S., Cho, Y.J., and Lee, K. 2012. Introducing Eztaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**, 716-721.
- Kim, Y.S., Jeong, D.Y., Hwang, Y.T., and Uhm, T.B. 2011. Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method. *Korean J. Microbiol.* **47**, 275-280.
- Lee, J.M., Jang, J.H., Oh, N.S., and Han, M.S. 1996. Bacterial distribution of *Kochujang*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **28**, 260-266.
- Nam, Y.D., Park, S.L., and Lim, S.I. 2012. Microbial composition of the Korean traditional food "*Kochujang*" analyzed by a massive sequencing technique. *J. Food Sci.* **77**, 250-256.
- Park, J.A., Choi, N.C., and Kim, S.B. 2013. Analysis of microbial communities in animal carcass disposal soils. *J. Kor. Soc. Environ. Eng.* **35**, 503-508.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., and Levesque, C.A. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 6241-6246.
- Shin, D.H., Ahn, E.Y., Kim, Y.S., and Oh, J.Y. 2001. Changes in the microflora and enzyme activities of *Kochujang* prepared with different *Koji* during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* **33**, 94-99.
- Shin, D.H., Kim, D.H., Choi, U., Lim, M.S., and An, E.Y. 1997. Changes in microflora and enzymes activities of traditional *Kochujang* prepared with various raw materials. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 901-906.