

Metagenomic Analysis of *Jang* Using Next-generation Sequencing: A Comparative Microbial Study of Korean Traditional Fermented Soybean Foods

Ranhee Lee, Gwangsu Ha, Ho Jin Jeong, Do-Youn Jeong and Hee-Jong Yang*

Microbial Institute for Fermentation Industry (MIFI), Sunchang 56048, Korea

Received February 6, 2024 / Revised March 20, 2024 / Accepted March 22, 2024

Korean *jang* is a food made using fermented soybeans, and the typical products include *gochujang* (GO), *doenjang* (DO), *cheonggukjang* (CH), and *ganjang* (GA). In this study, 16S rRNA metagenome analysis was performed on a total of 200 types of GO, DO, CH, and GA using next-generation sequencing to analyze the microbial community of fermented soybean foods and compare taxonomic (biomarker) differences. Alpha diversity analysis showed that in the CHAO index, the species richness index tended to be significantly higher compared to the DO and GA groups ($p < 0.001$). The results of the microbial distribution analysis of the GO, DO, CH, and GA products showed that at the order level, *Bacillales* was the most abundant in the GO, DO, and CH groups, but *Lactobacillales* was most abundant in the GA group. Linear discriminant analysis effect (LEfSe) analysis was used to identify biomarkers at the family and species levels. *Leuconostocaceae*, *Thermoactinomyces*, *Bacillaceae*, and *Enterococcaceae* appeared as biomarkers at the family level, and *Bacillus subtilis*, *Kroppenstedtia sanguinis*, *Bacillus licheniformis*, and *Tetragenococcus halophilus* appeared at the species level. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) analysis showed that there was a significant difference in the microbial community structure of the GO, DO, CH, and GA groups ($p = 0.001$), and the microbial community structure of the GA group showed the greatest difference. This study clarified the correlation between the characteristics of Korean fermented foods and microbial community distribution, enhancing knowledge of microorganisms participating in the fermentation process. These results could be leveraged to improve the quality of fermented soybean foods.

Key words : Biomarker, fermented food, *jang*, microbiome, next generation sequencing

서 론

콩을 발효시켜 만든 장은 수천 년간 전해 내려온 한식문화의 기본이 되는 전통 발효식품이자 조미료이다[21, 22]. 콩 또는 메주를 주원료나 부원료로 사용하여 제조되는 대표적인 장류인 고추장, 된장, 간장, 청국장은 발효에 관여하는 박테리아, 효모, 곰팡이 등 다양한 미생물에 의해 대사산물의 구성과 맛, 향이 달라진다[34, 37]. 장은 대부분의 한국 음식에 간을 맞추고 풍부한 맛을 더하는데 사용되며 영양학적으로도 우수하여 장류에 포함된 미생물군의 기능적, 구조적 다양성에 대한 관심이 높아지고 있다[36]. 따라서 장류의 기능성 발달과 발효식품 품질 규격화를 위해 발효에 관여하는 미생물을 이해하는 것은 중요

하다[13].

최근 연구에서 차세대 염기서열 분석(NGS) 기술은 김치[27], 발효차[41], 치즈[28], 발효유[2] 등 발효식품의 미생물 군집 분석과 제조 및 숙성 과정 중 미생물 구성 변화에 대한 핵심적인 역할을 해오고 있다. 또한, NGS 방법은 배양 의존적 방법을 사용하여 검출하기 어려운 발효식품 미생물총 내 하위 우세 군집의 존재를 밝힐 수 있다[24]. 이러한 미생물 군집은 장류의 맛과 풍미를 차별화하는데 큰 역할을 하며, 하위 미생물군과 우세 미생물군의 상호 작용도 장류의 주요 풍미와 향의 발달에 중요한 역할을 할 가능성이 높다[11, 16].

전통 장류는 재료와 발효방법에 따라 분류되며 청국장은 콩에 소금을 넣지 않고 발효한 것이고, 된장, 간장, 고추장은 소금을 첨가하여 발효한 것이다. 또한 고추장은 콩(메주가루)에 고춧가루를 넣어 제조한다[17, 18]. 장을 만드는데 주된 원료인 콩의 단백질은 불용성이지만, 발효를 통해 용해성 아미노산 또는 펩타이드로 분해되며, 많은 아미노산과 작은 펩타이드가 식품에 감칠맛, 단맛, 짠맛 및 깊은맛(코쿠미)를 제공하는 미각 강화제 역할을 한다는 것은 잘 알려져 있다[7, 29]. 전통 장류는 지속적인

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2036, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : godfiltss@naver.com

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

연구를 통해 콩으로부터 유도되는 다양한 생리활성 물질을 함유하여 항산화 효과, 항알러지 효과, 체중감소, 지질저하 및 암세포 성장 억제 효과와 같은 효과가 밝혀졌다 [29].

우리나라 전통 콩 발효 식품인 된장[16, 25], 간장[9, 35], 고추장[30], 청국장[8]에 NGS 분석법을 적용하여 주요 미생물을 식별하고 특성화하려고 시도했지만 지금까지 보고된 결과는 단일 장류 또는 두 가지 장류의 미생물 군집을 비교 분석한 것으로 콩으로부터 발효된 네 가지 장류의 미생물 특성 차이를 비교한 연구는 보고된 바가 없다.

본 연구는 한국의 전통 콩 발효식품인 고추장, 된장, 청국장, 간장의 미생물 군집을 조사하고 비교하는 것을 목표로 한다. 또한, 네 가지 전통 장류를 비교하여 고유성에 가장 크게 기여하는 특성 미생물군을 식별하여 발효 과정에 참여하는 미생물에 대한 지식을 넓히고 발효 콩 식품의 품질을 향상시키는 데 도움이 되고자 한다.

재료 및 방법

장류 시료 수집

전통 장류의 미생물 다양성 및 군집 구조 분석을 위한 시료로 고추장 50종, 된장 50종, 청국장 50종, 간장 50종으로 총 200종의 시료를 수집하였다. 장류 유형에 따라 미생물 군집 구조의 일반화를 위해 원재료, 제조공정 및 제조 지역에 관계없이 중균을 사용하지 않고 재래식으로 제조된 시료를 수집하였다.

시료의 total DNA 추출

16S rDNA 염기서열 분석을 위해 총 200종의 시료의 total DNA를 추출하였으며, PowerFood Microbial Kit (QIAGEN Hilden, Germany)를 사용하여 제조사의 방법에 따라 진행하였다. Qubit 4 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) 와 Nanodrop One 분광광도계(Thermofisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA)로 각 시료로부터 얻은 total DNA의 농도 및 순도를 정밀하게 측정하였으며, 0.8% agarose gel 전기영동을 수행하여 최종 DNA 품질을 검증하였다.

16S metagenomic library 제작 및 NGS 분석

수집한 장류의 미생물 군집 분석을 위해 Illumina (Illumina, San Diego, California, USA)사의 16S metagenomic sequencing library preparation guide [10]에 따라 16S metagenomic library를 제작하였다. 16S rDNA 유전자 내 V3-V4 영역의 증폭을 위해 1차 PCR을 진행하였다. primer set (forward : 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3', reverse : 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG

ACA GGA CTA CHV GGG TAT CT A ATC C-3', N; A or C or G or T, W; A or T, H; A or C or T, V; A or C or G) 와 2x KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Basel, Switzerland)를 혼합하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 3분간 pre-denaturation을 수행하였으며, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 조건으로 25회 반복한 후, 최종 72°C에서 5분간 extension을 수행하여 1차 PCR 산물을 얻었다. PCR 산물의 정제를 위해 제조사의 매뉴얼에 따라 AMPure XP Bead (BECKMAN COULTER, Brea, California, USA)로 불순물을 모두 제거하였다. 각 시료별 분류를 위해 2차 PCR을 진행하였으며, Nextera XT Index kit v2 (Illumina)를 사용하였다. 각 library에 index를 붙이기 위한 PCR 반응 조건으로 95°C에서 3분간 pre-denaturation을 수행한 후, 95°C에서 30초간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 반응을 8회 반복한 후, 최종 72°C에서 5분간 extension 반응을 수행하였으며, AMPure XP Bead (BECKMAN COULTER)를 사용하여 library를 제외한 불순물을 모두 제거하였다. 최종적으로 Qubit 4 와 Nanodrop One 분광광도계를 통해 double-strand library의 농도 측정 및 순도를 분석하였으며, library의 크기(base pair)를 분석하기 위해 0.8% agarose gel 전기영동을 통해 품질검사를 하였다. 각 library의 농도를 모두 동일하게 희석하였으며(4 nM), Miseq platform (Illumina)에 따라 library와 PhiX control v3 (Illumina)를 혼합하여 MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) cartridge에 주입 후 paired-end 2x301 sequencing cycle 조건으로 염기서열을 분석하였다.

NGS 데이터 통계분석

시료의 Sequencing 데이터는 16S metagenomic library로부터 생산된 raw read를 가지고 있는 FASTQ 파일은 EzBioCloud 16S-based microbiome taxonomic profiling (MTP, Chunlab Inc.) [39]을 통해 분석되었다. Taxonomic assignment를 위한 database로 EzTaxon database PKSSU 4.0 version [1]이 사용되었다. PCR 과정에서 생산된 미생물 이외의 염기서열, 저품질 서열, 키메라 서열을 제거하여 군집분석을 위한 valid reads를 얻었으며, 각 reads를 임계값(유사도 97%) 기준으로 OUT로 clustering하여 시퀀싱 오류를 제거하였다. Single MTP browser를 통해 시료의 미생물 분포, 종 다양성(diversity), 종 풍부도(richness) 지표 및 Good's coverage of library를 산출하였다. 고추장, 된장, 청국장 및 간장 그룹 사이의 상관관계 분석을 위한 beta-diversity는 Comparative MTP analyzer를 이용하였으며, Bray-Curtis distance metric [6] 기반으로 principal coordinates analysis (PCoA), UPGMA-clustering 및 beta set-significance analysis를 수행하였다. 통계적으로 고추장, 된장, 청국장 및 간장 시료의 유의미한 차이를 나타내는 바이오

Table 1. Sampling area and aging period information for analysis samples

Production area	The number of samples			
	GO	DO	CH	GA
Gyeonggi-do	5	7	8	4
Gangwon-do	6	3	3	3
Chungcheongbuk-do	7	7	6	6
Chungcheongnam-do	5	8	6	6
Jeollabuk-do	8	10	11	7
Jeollanam-do	6	9	6	9
Gyeongsangbuk-do	5	2	4	6
Gyeongsangnam-do	3	2	3	4
Jeju-do	5	2	3	5
Total	50	50	50	50

Aging period (month)	The number of samples			
	GO	DO	CH	GA
0 to 5	8	10	47	21
6 to 10	15	12	3	14
11 to 15	11	16	0	11
16 to 20	7	7	0	0
20 to 25	8	4	0	0
26 to 30	0	0	0	0
31 to 35	0	0	0	0
36 to 40	1	1	0	2
over 41	0	0	0	2
Total	50	50	50	50

마커(biomarker)를 찾기 위해 linear discriminant analysis effect (LEfSe) 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

미생물 데이터 수집

전통 발효식품의 마이크로바이옴 분석을 위한 시료를 전국에서 수집하였으며, 장류 유형별 수집지역과 숙성 및 발효기간을 Table 1에 나타내었다. 모든 시료는 완제품으로 종균을 사용하지 않은 전통방식으로 제조한 제품을 구입하였으며, 제조지역, 숙성 및 발효기간의 차이는 고

려하지 않았다. 본 연구에서는 200개의 장류 시료로부터 저품질 서열, 모호한 서열과 키메라 서열을 제외하고 총 17,442,153개의 염기서열을 얻었으며, 97% 유사성을 기반으로 65,636개의 OTUs (Operational taxonomic units)를 식별하였다. 모든 시료에서 커버리지 지표(Good's coverage of library)가 99.5% 이상으로 시퀀싱 데이터의 read수가 샘플에 포함된 미생물 종을 모두 검출할 만큼 충분함을 확인하였다(Table 2).

전통 장류 시료의 alpha-diversity 분석

Alpha-diversity 분석은 샘플 그룹 내 다양성 분석[14]으로 다양한 알파 다양성 지수(OTUs, CHAO, Shannon, Simpson)를 기반으로 종 추정치, 풍부도, 다양성(richness) 및 균등성(evenness) 차이를 확인하였다. 수집된 장류 샘플의 평균 종 추정치 OTUs는 평균 419.56(고추장), 232.72(된장), 364.66(청국장), 295.78(간장)로 나타났으며, 고추장과 청국장 그룹 간 유의한 차이가 나타나지 않았다(Table 2). CHAO 종 풍부도 지수를 적용했을 때 고추장과 청국장 그룹 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않으며($p > 0.05$), 된장과 간장 그룹에 비해 종 풍부도 지수가 유의미하게 높은 경향을 보였다($p < 0.001$). 다양성과 균일성을 모두 테스트하기 위해 Shannon 과 Simpson 기반으로 측정된 알파 다양성 지수에서 모든 장류는 통계학적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다($p > 0.05$) (Fig. 1).

전통 장류의 미생물 군집 구성

전통 장류의 미생물 분포 분석을 위해 장류별 평균값을 산출한 후 비교하였으며, 미생물학적 분류 단계별로 차지하는 미생물의 비율을 Fig. 2에 나타냈다. 모든 장류는 문(phylum) 수준에서 Firmicutes (79.04–97.48%)가 가장 풍부하였으며, 강(class) 수준에서는 Bacilli (73.78–93.19%)가 공통적으로 가장 높은 비율을 차지하였다. 네 가지 장류는 문(phylum)과 강(class) 수준에서 서로 유사한 구성을 보였으나, 목(order) 수준에서 Bacillales가 고추장(76.48%), 된장(78.32%), 청국장(78.57%)에서 우세한 반면, Lactobacillales는 간장(41.87%)에서 가장 우세한 것으로 나타났다

Table 2. Sequence number and alpha diversity indices observed among four types of fermented foods

Sample	The number of samples	Good's coverage (%)	The number of total valid reads	OTUs	CHAO	Shannon	Simpson
GO	50	99.83±0.16	4,241,655	419.56±222.84 ^a	536.90±245.55 ^a	1.71±0.96 ^{a,b}	0.39±0.21 ^a
DO	50	99.93±0.04	4,583,535	232.72±152.27 ^b	274.28±167.23 ^b	1.58±0.65 ^b	0.38±0.19 ^a
CH	50	99.84±0.07	4,220,938	364.66±129.83 ^a	481.62±181.94 ^a	1.77±0.41 ^b	0.32±0.12 ^b
GA	50	99.92±0.05	4,396,025	295.78±185.49 ^c	344.73±194.72 ^c	1.93±0.75 ^c	0.33±0.19 ^c

Values of the mean and standard deviation are indicated

Symbols: GO: Gochujang, DJ: Doenjang, CH: Cheonggukjang, GJ: Ganjang

^{a-c}: Means with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$)

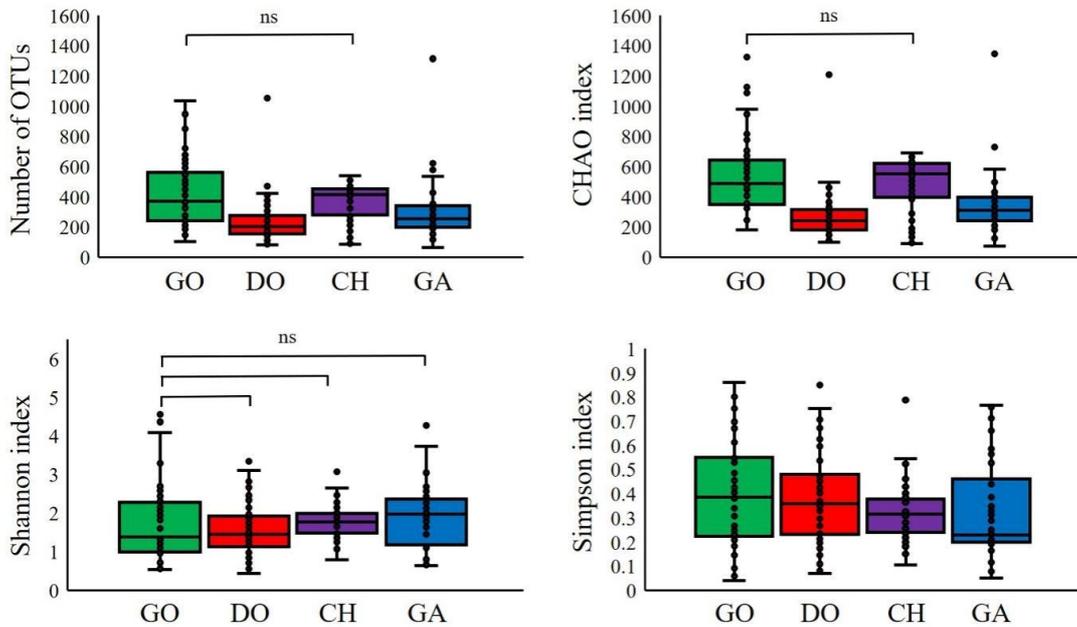


Fig. 1. Alpha-diversity assessed by species estimator (Operational taxonomic units, OTUs), richness (CHAO) and diversity (Shannon and Simpson). The boxes show the interquartile range and median, whiskers indicate the range. ns, not significant ($p>0.05$).

(Fig. 2C). 과(family) 수준에서 *Bacillaceae*가 고추장(70.98%), 된장(69.54%), 청국장(72.59%)에서 가장 우세하였고, *Enterococcaceae*는 간장(31.49%)에서 주요 미생물인 것으로 나타났다(Fig. 2D). 이러한 세균군은 된장, 간장 등 다양한 콩발효식품에서 자주 검출되며[34, 38], 특히 *Enterococcaceae*와 같은 *Lactobacillaceae* 계통의 미생물은 젖산을 주요 산물로 생산하여 맛과 풍미를 내는 것으로 알려져 있다[5]. 속(genus) 수준의 세균 분포는 고추장의 경우 *Bacillus* (70.06%), *Lactobacillus* (4.45%), *Staphylococcus* (2.44%), *Weissella* (2.12%), *Pediococcus* (1.97%) 가 상위 5종의 우점균으로 나타났으며, 된장에서는 *Bacillus* (67.79%), *Kroppenstedtia* (6.03%), *Tetragenococcus* (5.33%), *Clostridium* (4.00%), *Enterococcus* (3.06%) 순으로 우점하는 것으로 나타났다. 청국장은 *Bacillus* (72.1%), *Enterococcus* (9.39%), *Staphylococcus* (3.07%), *Lactobacillus* (2.65%), *Carnobacterium* (1.47%) 순이며, 간장에서는 *Tetragenococcus* (29.67%), *Bacillus* (21.05%), *Lactobacillus* (9.57%), *Chromohalobacter* (6.90%), *Staphylococcus* (4.44%)가 차지하여 상위 5종의 우점균으로 나타났다(Fig. 2E). 종(species) 수준에서는 고추장의 경우 *Bacillus subtilis* (42.17%), *Bacillus licheniformis* (19.89%), *Bacillus thermoamylovorans* (3.48%), *Enterococcus faecium* (1.70%), *Kroppenstedtia sanguinis* (1.44%)가 상위 5종의 우점균으로 나타났으며, 된장에서는 *Bacillus subtilis* (37.66%), *Bacillus licheniformis* (26.57%), *Kroppenstedtia sanguinis* (5.98%), *Tetragenococcus halophilus* (5.29%), *Enterococcus faecium* (3.03%) 순으

로 우점하는 것으로 나타났다. 청국장은 *Bacillus licheniformis* (30.92%), *Bacillus subtilis* (18.72%), *Bacillus thermoamylovorans* (18.11%), *Enterococcus faecium* (9.34%), *Lactobacillus sakei* (2.37%) 순이며, 간장에서는 *Tetragenococcus halophilus* (29.44%), *Bacillus subtilis* (11.75%), *Lactobacillus sakei* (6.82%), *Bacillus licheniformis* (6.72%), *Chromohalobacter beijerinckii* (6.27%)가 차지하여 상위 5종의 우점균으로 나타났다(Fig. 2F).

본 연구결과에 따르면 우리나라 전통 장류에는 다양한 미생물이 함유되어 있으며, 그 중 콩의 발효와 가장 관련 [16]이 높은 *Bacillus* 종은 벧짚으로부터 기원하여 콩의 발효가 진행되면서 우점종을 형성한 것으로 추정되며[19] 고추장과 된장, 청국장의 60%이상 차지하여 미생물 구성에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 발효식품에 존재하는 바실러스 속(*Bacillus spp.*)은 단백질 분해 효소를 생산하는 *Bacillus subtilis*와 마찬가지로 콩 단백질(글리시닌 및 β -콘글리시닌)을 가수분해하여 특정 생리활성 펩타이드를 생성하여 항고혈압, 항균, 항산화, 항당뇨 및 항암 활성과 같은 생리활성 특성을 나타내는 것으로 알려졌다[31]. 청국장은 다른 장류에 비해 프로바이오틱 미생물 중 *Enterococcus faecium* 과 *Lactobacillus sakei*가 상대적으로 많이 분포하였다. Lim (2020)의 연구 결과에 따르면 *Enterococcus faecium* KML12 및 *Lactobacillus sakei* MML23로부터 바이오제닉 아민(biogenic amine) 분해능이 확인되었다. 세균의 바이오제닉 아민 분해능은 아민 산화효소에 의해 산화적 탈아미노화(Oxidative deamination) 반응을 유

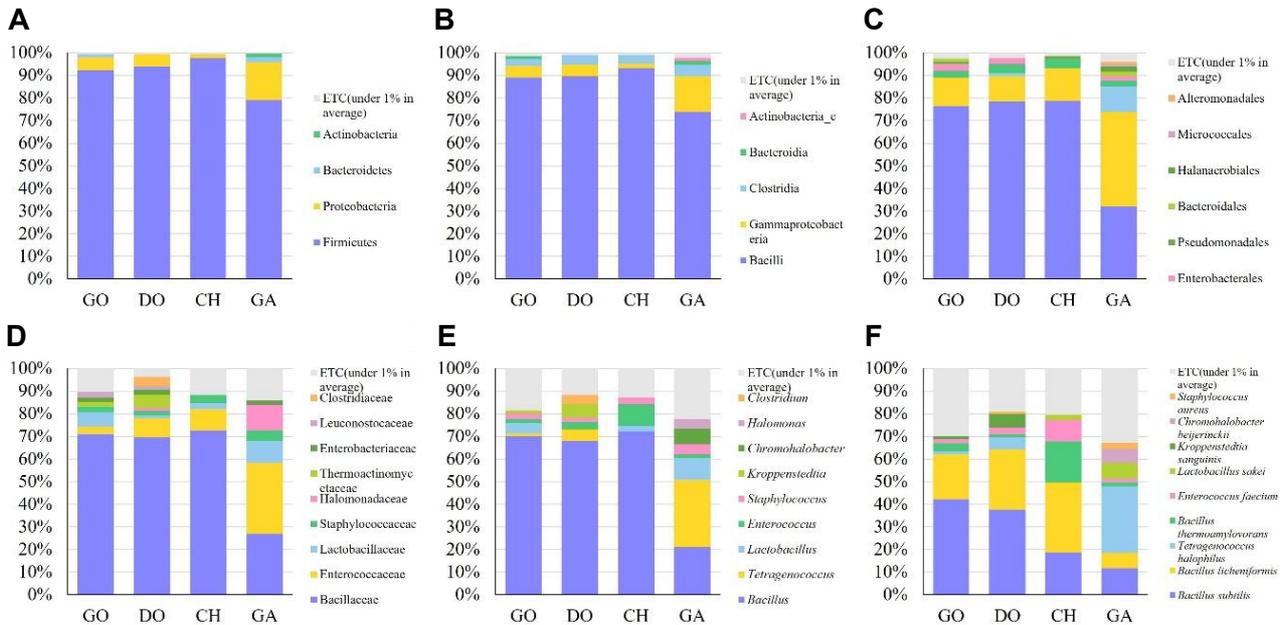


Fig. 2. Mean relative abundances of bacterial taxa by type of fermented foods at phylum (A), class (B), order (C), family (D), genus (E) and species (F) levels. Composition less than 1% were grouped into others.

도하여 나타난다고 밝힌 바 있어[23] 청국장의 바이오제닉 아민 감소에 도움을 줄 것이라 판단된다. 간장의 경우 이전의 연구결과와 유사하게 속 수준의 미생물 군집 분석에서 천일염의 우점군이라고 알려진 *Tetragenococcus* 및 *Chromohalobacter*가 매우 풍부한 것으로 나타났다[9, 40]. 간장과 된장에 우점하는 *Tetragenococcus halophilus*는 호염성 젖산균으로 높은 염분과 pH 조건에서 생존할 수 있으며[15], 아스파르트산, 글루탐산 및 디펩티드 N-숙시닐-글루탐산을 생산하여[40] 간장 및 된장과 같은 고염 발효 식품의 감칠맛과 풍미를 향상시키는 것으로 알려져 있다.

이러한 결과는 각 유형별 전통 장류의 미생물 분포가 장류 제조에 사용되는 콩 또는 메주, 염수와 같은 주원료와 부원료로부터 기인하여 우점하며, 완제품의 전체 미생물 군집 구조를 이루는데 큰 영향을 미쳐 제품 유형에 따른 미생물학적 특징을 이루는데 큰 역할을 하는 것으로 판단된다.

전통 장류 시료의 β -diversity 분석

β -diversity 분석은 샘플 그룹 간의 통계학적인 비교로 계통발생적 평가를 통해 미생물 구성 또는 구조의 변화를 측정함으로써 실험 그룹의 미생물 군집이 다른 그룹과 유의미하게 다른지 관찰할 수 있다[14]. 연구에 사용된 분석은 Bray-Curtis distance matrix를 기반으로 Principal coordinate analysis (PCoA) 와 UPGMA-dendrogram을 수행하여 각 장류 시료의 미생물 군집 간의 유사도를 시각화 하였다. 고추장, 된장, 청국장, 간장 시료들이 종 수준에서 식품 그룹별로 명확하게 그룹화(clustering) 되어 관찰되었다

(Fig. 3A). 간장 그룹이 가장 중심으로부터 멀리 퍼트려져 나타났는데, 발효된 콩이 주성분인 나머지 그룹과 달리 고염 환경에서 간장을 제조하는 방식이 세균의 군집 구조에 많은 영향을 미쳤을 것이라 사료된다. 또한 고추장, 된장, 청국장의 경우 종 및 속 수준에서 *Bacillus* 종이 전체의 65% 이상을 차지하여 cluster centroid의 산포도가 낮은 것으로 판단된다. 또한 UPGMA-clustering 분석 결과 시료 유형에 따라 대부분의 시료가 clustering되어 그룹 간의 연관성을 판단하는데 충분함을 확인하였다(Fig. 3B).

Beta set-significance 분석

Bray-Curtis distance metric 기반으로 PERMANOVA 분석을 통해 네 가지 장류의 미생물 분포에 통계학적으로 유의미한 차이가 있는지 분석하였다. 네 가지 그룹을 비교하기 위해 ‘고추장-된장’, ‘고추장-청국장’, ‘고추장-간장’, ‘된장-청국장’, ‘된장-간장’ 및 ‘청국장-간장’ 총 6개의 쌍별 비교(pairwise comparisons)를 실시하였다. ‘두 그룹의 미생물 군집은 동일하다’는 귀무가설(null hypothesis, H_0)과 ‘두 그룹의 미생물 군집의 분포는 다르다’는 대립가설(alternative hypothesis, H_1)을 설정하였으며, 가설검정을 수행한 결과 모든 p-value가 0.001로 나타났다. 따라서 네 그룹의 미생물 군집 분포는 동일하다는 귀무가설이 기각되었으며, 네 그룹의 미생물 군집 분포는 매우 유의미한 수준의 통계학적인 차이가 있다는 것을 검증하였다(Fig. 4).

Taxonomic biomarker 분석

각 그룹에서 특징적인 미생물을 식별하기 위해 선형

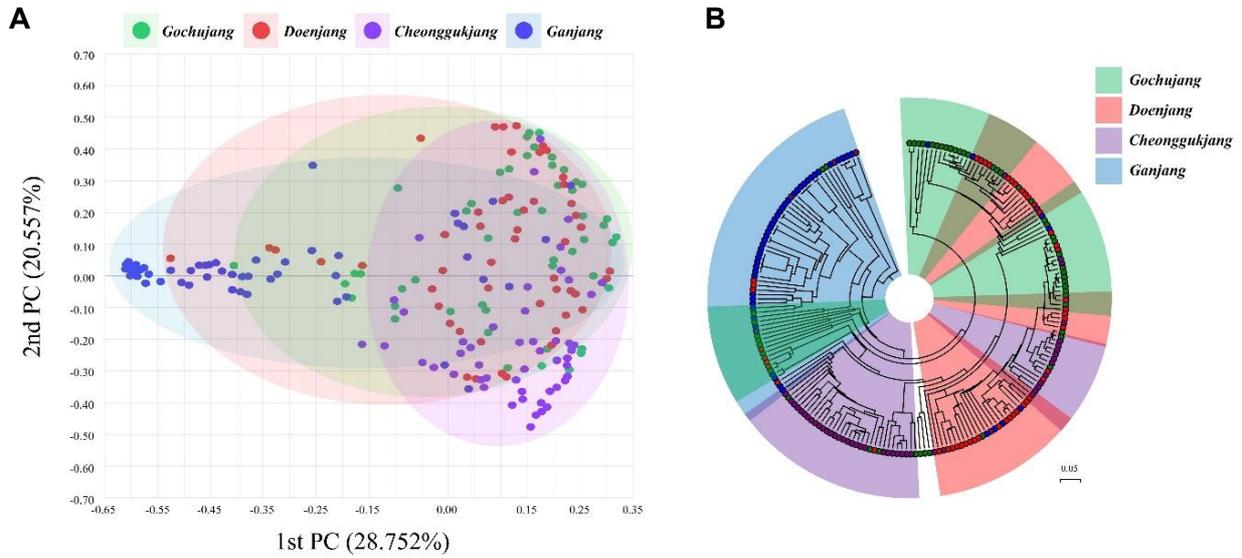


Fig. 3. Principal coordinate analysis (PCoA) plot (A) and UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) dendrogram (B) analysis results of microbial communities at the species level based on Bray-Curtis.

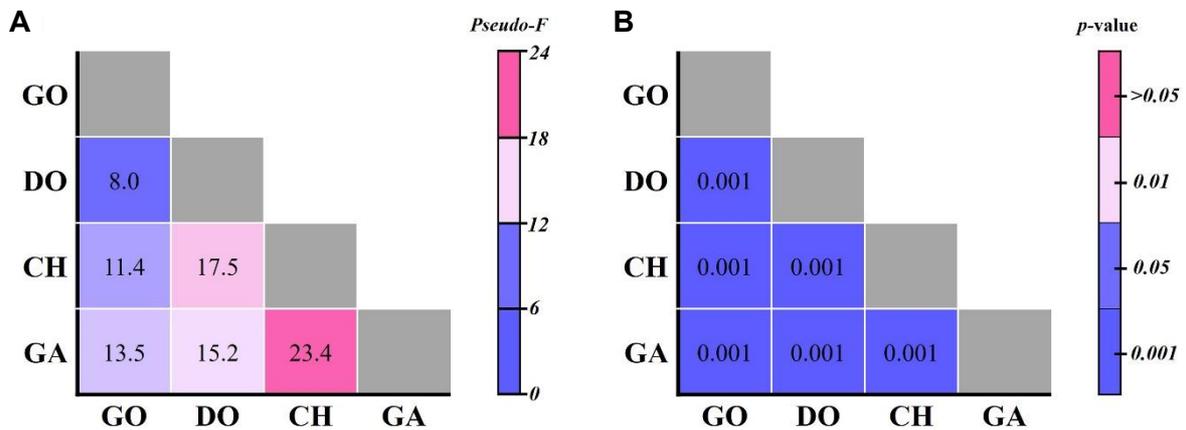


Fig. 4. Beta-significance analysis between two different types of fermented soybean foods. Results of pairwise PERMANOVA (Permutational analysis of variance) tests (A) and *p*-value (B).

판별 분석 효과 크기(Linear discriminant analysis effect, LEfSe) [32] 분석법을 사용하여 그룹 간의 특이적인 바이오마커 미생물과 중요도를 histogram으로 나타냈다. 군집 구조 차이에 많은 영향을 미치는 미생물을 구별하기 위해 LDA score threshold를 3.0으로 설정하였으며, LDA score 지수가 높을수록 그룹 사이의 미생물 군집 구조 차이에 큰 기여를 한다(Fig. 5). LEfSe 분석 결과 과 수준에서 고추장 그룹의 경우 *Leuconostocaceae*가 가장 특이적이고, *Thermoactinomycetaceae*는 된장 그룹의 바이오마커로 나타났다. 청국장 그룹은 *Bacillaceae*가 가장 특이적이며, 간장 그룹은 *Enterococcaceae*가 우세한 것으로 나타났다(Fig. 5A). 종 수준에서 고추장 그룹의 경우 *Bacillus subtilis*가 우세하였으며, *Kroppenstedtia sanguinis*는 된장 그룹에서 우세하며, 청국장 그룹은 *Bacillus licheniformis*가 가장

특이적이며, 간장 그룹은 *Tetragenococcus halophilus*가 상대적으로 높게 분포하여 네 가지 장류의 구조적 차이에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Fig. 5B).

미생물 분류수준과 상관없이 LDA score에 따라 고추장, 된장, 청국장 및 간장의 미생물 구성에 영향을 미치는 미생물과 taxon rank, *p*-value, relative abundances를 Table 3에 나타내었다. 속과 종 수준에서 네 가지 장류의 미생물 군집에 영향을 미치는 미생물은 고추장 시료에서 *Bacillus subtilis*가 많이 분포하였으며, 된장 시료는 특징적으로 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*가 상대적으로 많이 분포하였다. 고추장과 된장은 공통적으로 메주를 이용하여 제조하는데 메주에서 우점[20]하는 *B. sonorensis*는 거의 관찰되지 않은 반면, 메주에서 매우 낮은 수치로 존재하는 *B. subtilis* 와 *B. licheniformis*가 우세한 것을 확인하

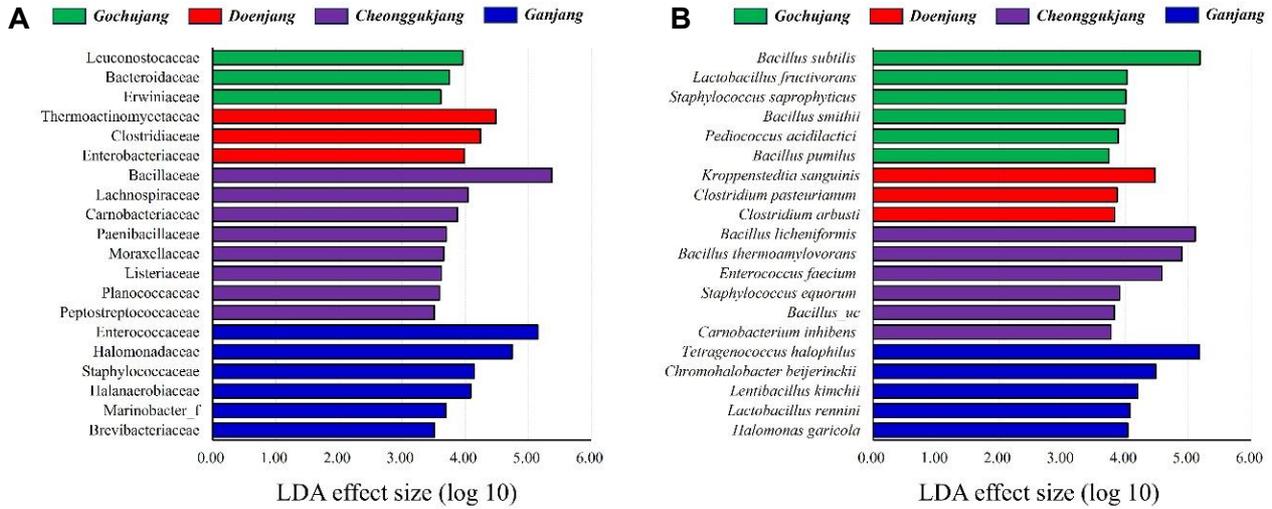


Fig. 5. LefSe (Linear discriminant analysis effect size) analysis of taxonomic biomarkers of four types of fermented foods. The relative abundance at family (A) and species level (B).

Table 3. Biomarker analysis fermented soybean foods using LefSe analysis

Taxon name	Taxon rank	LDA score (log10)	p-value	p-value (FDR)	Relative abundances (%)			
					GO	DO	CH	GA
<i>Bacillus</i>	Genus	5.41	<0.00001	<0.00001	70.06	67.79	72.10	21.05
Bacillales	Order	5.38	<0.00001	<0.00001	76.48	78.32	78.57	31.90
Bacillaceae	Family	5.37	<0.00001	<0.00001	70.98	69.54	72.59	26.81
<i>Bacillus subtilis</i>	Species	5.19	<0.00001	<0.00001	42.17	37.66	18.72	11.75
Lactobacillales	Order	5.19	<0.00001	<0.00001	12.50	11.32	14.62	41.87
<i>Tetragenococcus</i>	Genus	5.18	<0.00001	<0.00001	1.37	5.33	0.03	29.67
<i>Tetragenococcus halophilus</i>	Species	5.18	<0.00001	<0.00001	1.36	5.29	0.03	29.44
Enterococcaceae	Family	5.15	<0.00001	<0.00001	3.24	8.39	9.43	31.49
<i>Bacillus licheniformis</i>	Species	5.11	<0.00001	<0.00001	19.89	26.57	30.92	6.72
Bacilli	Class	4.99	<0.00001	<0.00001	88.98	89.63	93.19	73.78
Firmicutes	Phylum	4.97	<0.00001	<0.00001	92.18	93.89	97.48	79.04
<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Species	4.90	<0.00001	<0.00001	3.48	1.35	18.11	1.71
Proteobacteria	Phylum	4.87	<0.00001	<0.00001	5.70	5.30	1.94	16.76
Gammaproteobacteria	Class	4.84	<0.00001	<0.00001	5.20	5.22	1.88	15.81
Oceanospirillales	Order	4.74	<0.00001	<0.00001	0.90	1.23	0.00	11.31
Halomonadaceae	Family	4.74	<0.00001	<0.00001	0.89	1.23	0.00	11.30
<i>Enterococcus faecium</i>	Species	4.58	0.00021	0.00171	1.70	3.03	9.34	1.78
<i>Enterococcus</i>	Genus	4.58	0.00034	0.00264	1.74	3.06	9.39	1.82
<i>Chromohalobacter</i>	Genus	4.52	<0.00001	<0.00001	0.72	0.54	0.00	6.90
Thermoactinomycetaceae	Family	4.48	<0.00001	<0.00001	2.12	6.12	0.01	0.45

Symbols: GO, Gochujang; DJ, Doenjang; CH, Cheonggukjang; GJ, Ganjang

였다. 이는 고추장과 된장의 염분 농도가 약 10%에 달하는데[12], *B. subtilis*와 *B. licheniformis*는 높은 NaCl 농도에서 자랄 수 있는 반면 *B. sonorensis*와 같은 다른 *Bacillus* 속 미생물은 생육이 어렵기 때문에 판단된다[26]. 고추장과 된장의 차이는 크게 고춧가루 첨가로 나뉘며, 고추장은 평균적으로 고춧가루가 약 25% 함유되어 있다[18]. 이전의 연구[4]에 따르면 *Dennettia tripetala* (고추 열매) 추출물의 최소억제농도 측정 결과 *Bacillus* 속 미생물의 분

포가 *E. faecalis* 보다 2.5배 높음을 보고하였다. 따라서 된장, 청국장 및 간장에 비해 고추장 시료에서 *Enterococcus*의 발생률이 낮은 것은 고춧가루의 항균효과 때문이라고 사료된다. 청국장에서는 *Bacillus licheniformis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Enterococcus faecium*이 상대적으로 많이 분포하였다. 청국장을 제조할 때 *B. licheniformis*를 접종한 청국장에서는 *B. subtilis*를 접종한 청국장보다 불쾌취(취발성 향기성분)가 2배 이상 감소하였으며[33], 특히

청국장은 40-43°C에서 빠르게 발효되는 특성[3]때문에 고온에서 안정적으로 내열성 효소를 생산할 수 있는 *B. thermomycolovorans*가 우점하는 것으로 판단된다. 다른 장류들에 비해 간장에서는 최대 20% NaCl 농도에서 성장 가능한 호염성 유산균인 *Tetragenococcus halophilus*가 많이 분포하는 것으로 나타났다[15]. 따라서 *T. halophilus*는 간장에서 펩타이드의 가수분해 및 풍미 개선에 역할을 할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 콩을 주원료로 하는 전통 장류의 유형별 미생물 군집 구조와 미생물 군집 구조 차이에 큰 영향을 미치는 미생물을 분석하였다. 본 연구 결과는 향후 전통 발효식품 유래 미생물에 대한 연구, 상업적 활용을 위한 분리원 선택 및 미생물과 발효식품의 기능성에 대한 상관관계 등의 연구뿐만 아니라 전통 발효식품의 생물학적 안전성 및 품질을 향상시키기 위한 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 2024년도 농림축산식품부의 재원으로 한국농수산식품유통공사-2024년 장류 기능성 규명(안전성 모니터링)사업의 지원을 받아 수행된 연구임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Chun, J. S., Lee, J. H., Jung, Y. Y., Kim, M. J., Kim, S. I., Kim, B. K. and Lim, Y. W. 2007. Eztaxon: A web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16s ribosomal rna gene sequences. *Int. J. Syst. Evol.* **57**, 2259-2261.
- De Melo Pereira, G. V., De Carvalho Neto, D. P., Maske, B. L., De Dea Lindner, J., Vale, A. S., Favero, G. R., Viesser, J., De Carvalho, J. C., Góes-Neto, A. and Soccol, C. R. 2022. An updated review on bacterial community composition of traditional fermented milk products: What next-generation sequencing has revealed so far? *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **62**, 1870-1889.
- Dong, D. H. 2011. Utilization of soybean as food stuffs in korea. *Intechopen Com.* **1**, 81-110.
- Ejechi, B. and Akpomedaye, D., 2005. Activity of essential oil and phenolic acid extracts of pepperfruit (*dennetia tripetala* g. Barker; anonaceae) against some food-borne microorganisms. *Afr. J. Biotechnol.* **4**, 258-261.
- El-Ghaish, S., Ahmadova, A., Hadji-Sfaxi, I., El Mecherfi, K. E., Bazukyan, I., Choiset, Y., Rabesona, H., Sitohy, M., Popov, Y. G. and Kuliev, A. A. 2011. Potential use of lactic acid bacteria for reduction of allergenicity and for longer conservation of fermented foods. *Trends Food Sci. Technol.* **22**, 509-516.
- Gauch Jr, H. G. 1973. A quantitative evaluation of the bray-curtis ordination. *Ecology* **54**, 829-836.
- Gibbs, B. F., Zougman, A., Masse, R. and Mulligan, C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. *Food Res. Int.* **37**, 123-131.
- Ha, G. S., Kim, J. W., Shin, S. J., Jeong, S. J., Yang, H. J. and Jeong, D. Y. 2021. Comparison of microbial community compositions between doenjang and cheonggukjang using next generation sequencing. *J. Life Sci.* **31**, 922-928.
- Han, D. M., Chun, B. H., Feng, T., Kim, H. M. and Jeon, C. O. 2020. Dynamics of microbial communities and metabolites in ganjang, a traditional korean fermented soy sauce, during fermentation. *Food Microbiol.* **92**, 103591.
- Illumina. 2013. 16s metagenomic sequencing library preparation protocol: Preparing 16s ribosomal rna gene amplicons for the illumina miseq system. Part no. 15044233 Rev B. Illumina, San Diego, CA. http://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
- Jeong, D. M., Yoo, S. J., Jeon, M. S., Chun, B. H., Han, D. M., Jeon, C. O., Eyun, S. i., Seo, Y. J. and Kang, H. A. 2022. Genomic features, aroma profiles, and probiotic potential of the *debaryomyces hansenii* species complex strains isolated from korean soybean fermented food. *Food Microbiol.* **105**, 104011.
- Jiang, L., Shin, E. K., Seo, J. S. and Lee, Y. K. 2019. Development of standards for reducing the sodium content and salinity of korean fermented soybean sauces and representative korean foods high in sodium. *J. Nutr. Health.* **52**, 185-193.
- Jung, W. Y., Jung, J. Y., Lee, H. J. and Jeon, C. O. 2016. Functional characterization of bacterial communities responsible for fermentation of doenjang: A traditional korean fermented soybean paste. *Front. Microbiol.* **7**, 827.
- Jurasinski, G., Retzer, V. and Beierkuhnlein, C. 2009. Inventory, differentiation, and proportional diversity: A consistent terminology for quantifying species diversity. *Oecologia* **159**, 15-26.
- Justé, A., Lievens, B., Rediers, H. and Willems, K. A. 2014. The genus *tetragenococcus*. *Lactic acid bacteria* **1**, 213-227.
- Kim, M. J., Kwak, H. S., Jung, H. Y. and Kim, S. S. 2016. Microbial communities related to sensory attributes in korean fermented soy bean paste (doenjang). *Food Res. Int.* **89**, 724-732.
- Kim, S. H., Chung, K. R., Yang, H. J. and Kwon, D. Y. 2016. Sunchang gochujang (korean red chili paste): The unfolding of authenticity. *J. Ethn. Foods.* **3**, 201-208.
- Kim, S. H., Ko, J. and Kwon, D. Y. 2023. Jang, korean fermented soybean product, the result of endeavors of ancients for the best taste of korean diet. *J. Ethn. Foods.*

- 10, 33.
19. 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.
 20. Kim, Y. S., Kim, M. C., Kwon, S. W., Kim, S. J., Park, I. C., Ka, J. O. and Weon, H. Y. 2011. Analyses of bacterial communities in meju, a korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods. *J. Microbiol.* **49**, 340-348.
 21. Kwon, D. Y., Chung, K. R. and Jang, D. J. 2019. The history and science of chongkukjang, a korean fermented soybean product. *J. Ethn. Foods.* **6**, 1-17.
 22. Kwon, D. Y., Chung, K. R., Yang, H. J. and Jang, D. J. 2015. Gochujang (korean red pepper paste): A korean ethnic sauce, its role and history. *J. Ethn. Foods.* **2**, 29-35.
 23. Lim, E. S. 2020. Isolation and identification of biogenic amine-degrading probiotic lactic acid bacteria isolated from over-ripened kimchi. *Korean J. Food Preserv.* **27**, 754-768.
 24. Mayo, B., Tcc Rachid, C., Alegría, Á., Mo Leite, A., S Peixoto, R. and Delgado, S. 2014. Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. *Curr. Genomics* **15**, 293-309.
 25. Nam, Y. D., Lee, S. Y. and Lim, S. I. 2012. Microbial community analysis of korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **155**, 36-42.
 26. Palmisano, M. M., Nakamura, L. K., Duncan, K. E., Istock, C. A. and Cohan, F. M. 2001. *Bacillus sonorensis* sp. Nov., a close relative of *Bacillus licheniformis*, isolated from soil in the sonoran desert, arizona. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1671-1679.
 27. Park, S. E., Seo, S. H., Kim, E. J., Byun, S., Na, C. S. and Son, H. S. 2019. Changes of microbial community and metabolite in kimchi inoculated with different microbial community starters. *Food Chem.* **274**, 558-565.
 28. Planý, M., Kuchta, T., Šoltýs, K., Szemes, T., Pangallo, D. and Siekel, P. 2016. Metagenomic analysis of slovak bryndza cheese using next-generation 16s rdna amplicon sequencing. *Nova Biotechnol. Chim* **15**, 23-34.
 29. Qiao, Y., Zhang, K., Zhang, Z., Zhang, C., Sun, Y. and Feng, Z. 2022. Fermented soybean foods: A review of their functional components, mechanism of action and factors influencing their health benefits. *Food Res. Int.* **158**, 111575.
 30. Ryu, J. A., Kim, E. S., Kim, M. J., Lee, S., Yoon, S. R., Ryu, J. G. and Kim, H. Y. 2021. Physicochemical characteristics and microbial communities in gochujang, a traditional korean fermented hot pepper paste. *Front. Microbiol.* **11**, 620478.
 31. Sanjukta, S. and Rai, A. K. 2016. Production of bioactive peptides during soybean fermentation and their potential health benefits. *Trends Food Sci. Technol.* **50**, 1-10.
 32. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. and Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* **12**, 1-18.
 33. Seok, Y. R., Kim, Y. H., Kim, S., Woo, H. S., Kim, T. W., Lee, S. H. and Choi, C. 1994. Change of protein and amino acid composition during chungkook-jang fermentation using *Bacillus licheniformis* CN-115. *Appl. Biol. Chem.* **37**, 65-71.
 34. Shin, D. H. and Jeong, D. Y. 2015. Korean traditional fermented soybean products: Jang. *J. Ethn. Foods.* **2**, 2-7.
 35. Song, D. H., Chun, B. H., Lee, S., Son, S. Y., Reddy, C. K., Mun, H. I., Jeon, C. O. and Lee, C. H. 2021. Comprehensive metabolite profiling and microbial communities of doenjang (fermented soy paste) and ganjang (fermented soy sauce): A comparative study. *Foods* **10**, 641.
 36. Tamang, J. P., Shin, D. H., Jung, S. J. and Chae, S. W. 2016. Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front. Microbiol.* **7**, 578.
 37. Tamang, J. P., Watanabe, K. and Holzapfel, W. H. 2016. Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.* **7**, 377.
 38. Wei, C. L., Chao, S. H., Tsai, W. B., Lee, P. S., Tsau, N. H., Chen, J. S., Lai, W. L., Tu, J. C. Y. and Tsai, Y. C. 2013. Analysis of bacterial diversity during the fermentation of inyu, a high-temperature fermented soy sauce, using nested pcr-denaturing gradient gel electrophoresis and the plate count method. *Food Microbiol.* **33**, 252-261.
 39. Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S. J., Lim, J. M., Kim, Y. S., Seo, H. S. and Chun, J. S. 2017. Introducing ezbiocloud: A taxonomically united database of 16s rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.
 40. Zhang, L., Zhang, L. and Xu, Y. 2020. Effects of *tetragenococcus halophilus* and *Candida versatilis* on the production of aroma-active and umami-taste compounds during soy sauce fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **100**, 2782-2790.
 41. Zhao, M., Su, X. Q., Nian, B., Chen, L. J., Zhang, D. L., Duan, S. M., Wang, L. Y., Shi, X. Y., Jiang, B. and Jiang, W. W. 2019. Integrated meta-omics approaches to understand the microbiome of spontaneous fermentation of traditional chinese pu-erh tea. *Msystems* **4**, e00680-19.

초록 : 차세대 염기서열 분석을 활용한 장류의 메타지놈 분석 : 한국 전통 콩 발효식품에 대한 미생물 비교 연구

이란희 · 하광수 · 정호진 · 정도연 · 양희종*
 ((재)발효미생물산업진흥원)

한국의 장은 콩을 발효시켜 만든 식품으로 대표적인 종류로는 고추장, 된장, 청국장, 간장이 있다. 본 연구에서는 콩 발효식품의 미생물 군집을 분석하고, 각 장류의 유형에 따른 미생물 군집 구조 차이에 영향을 미치는 미생물(biomarker)과 분포 차이를 비교하기 위해 총 200종의 장류 시료를 next-generation sequencing을 통해 16S rRNA 마이크로바이옴 분석을 수행하였다. Alpha-diversity 분석 결과 종 풍부도를 나타내는 지수 CHAO는 고추장과 청국장에서 분석에서 된장과 간장 그룹에 비해 유의미하게 높은 경향을 보였다 ($p < 0.001$). 네 가지 장류의 미생물 분포 분석 결과 목(order) 수준에서 Bacillales가 고추장, 된장, 청국장 그룹에서 우세한 반면, 간장의 경우 Lactobacillales가 우세한 것으로 차이가 나타났다. LEfSe (Linear discriminant analysis Effect Size) 분석을 통해 전통 장류의 과(family)와 종(species) 수준에서 바이오마커를 분석하였다. *Leuconostocaceae*, *Thermoactinomycetaceae*, *Bacillaceae*, *Enterococcaceae*가 과 수준에서 장 유형에 따른 미생물 군집 구조 차이에 큰 기여를 하는 바이오마커로 나타났으며, *Bacillus subtilis*, *kroppenstedtia sanguinis*, *Bacillus licheniformis*, *Tetragenococcus halophilus*가 종 수준에서 네 종류의 발효식품을 미생물학적으로 분류할 수 있는 가장 중요한 특징으로 나타났다. PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) 분석 결과 네 가지 장류는 미생물 군집 구조가 통계학적으로 유의미한 차이가 나타났으며 ($p = 0.001$), 그 중 간장 그룹의 미생물 군집 구조가 가장 차이를 보였다. 본 연구의 결과는 한국 발효식품의 미생물학적 분포 특성과 장류 유형별 미생물 군집 구조차이에 영향을 미치는 미생물을 규명하였으며, 발효 과정에 참여하는 미생물에 대한 지식을 넓히고 발효 콩 식품의 품질을 향상시키는 데 도움이 될 것으로 기대한다.