

淸國醬製造에 관한 研究 (第 1 報)

—有効細菌의 分離, 同定 및 優秀菌株 選定—

朴 啓 仁·成 絢 淳

(國立工業研究所 食品工業課)

Studies on the Chung-Kook-Jang Fermentation (I)

—Isolation and Identification of the Bacteria and Selection of the Best Strains for the Chung-Kook-Jang—

PARK Ke In, and Hyun Soon SUNG

(National Industrial Research Institute)

ABSTRACT

A study was carried out to investigate the bacteria during the Chung-Kook-Jang fermentation.

The results were summarized as follows;

- 1) The bacteria were isolated total 65 strains from the Natural Chung-Kook-Jang fermentation in 37°C incubator; 37 strains from sample K with rice straw and 28 strains from sample steamed soy bean only.
- 2) In first screening, 15 strains were selected by super protease activities among them; 8 strains from K and 7 strains from S.
- 3) In second screening, No. K-27 and No. S-16 were selected as the best strains for the Chung Kook-Jang fermentation, by panel-test among the first screenings.
- 4) No. K-27 and No. S-16, the selected best strains were classified and identified as variation of *Bacillus subtilis* by Bergey's manual.

緒 論

대두(大豆)와 대두가공식품은 채식을 주로하는 우리나라를 비롯한 동양사람들에게는 동물성 단백질식품에 필적할 수 있는 우량한 식물성 단백질식품으로서 영양학적 가치가 높으며 각종 필수아미노산을 골고루 함유하여 대두는 古來로 우리의 식생활에서 가장 중요한 단백질의 공급식품으로 식용되어 왔다.

대두는 그 조직이 전고할 뿐 아니라 함유 성분중에는 tyrosine inhibitor와 hemagglutinin(赤血球凝集要素)이 포함되어 소화흡수

에 난점이 있으나 이것들은 가열처리 등의 가공방법에 의하여 용이하게 파괴되어 各地方과 각 민족에 따라 기호에 알맞는 특색있는 여러종류의 대두식품을 제조하여 식용하고 있다. 예를 들면 우리나라의 경우 두부, 비지, 콩국, 삶은콩, 콩가루 및 자연발효에 의한 메주를 원료로 하여 간장, 된장, 청국장 등을 제조하여 식용하고 있다. 그중 청국장의 유래는 서기 683년에 기록된 중국의 古代史 三國史記 8卷 第8, 神女王 3年 2月條에 鼓方이라는 기록으로 보아 장시일의 역사를 가진 식품이며 高麗史誌 第34, 食兵 3 種에 기록되어 있는 것으로 보아서 이것

은 당시 중국에서부터 유래된 것으로 추측된다. 1611년 우리나라의 東醫寶鑑에 鹹鼓方이라든가 1715년 洪萬選著 山林經濟 중의 煎鼓醬法에 戰國醬이라는 명칭을 사용하였고 그 제조방법이 상세히 소개되어 있다. 오늘날 우리나라에서 청국장이라 부르게 된 것도 당시의 戰國醬이 淸나라로부터 전래되었다는 의미가 결드려져 후세에서는 이것을 청국장이라고 발음한데서 기인된 것으로 추측된다. 상기 古代史記중의 戰國醬제조법에 의하면 삶은 메주콩을 짚(藁)으로 만든 명식(甕)이든가 또는 짚으로 싸서 주방(溫室)에서 생사모양의 점질물이 발생할 정도로 발효되면 加鹽調味(漬鼓 또는 鹹鼓) 마쇄하여 식용하였다. 이것과 유사한 식품으로서 일본의 납두(納豆, Natto)라는 것이 있다. 이것은 山崎에 의하면 중국 유학승(留學僧)에 의하여 일본에 전파되었으며 그 제조방법도 1910년까지는 中國史記에 기록되어 있는 것과 대동소이하였다. 오늘날 일본의 납두와 우리나라의 청국장과의 차이점은 일본의 납두는 순수하게 분리 배양된 *Bacillus natto* 라는 미생물을 종균으로 하여 삶은 메주콩에 접종하여 일정한 조건하에서 일정시간 발효시켜 상품화한 것을 그대로 조미(調味)하여 식용함에 비하여, 우리나라의 청국장은 자가용(自家用)으로 삶은 메주콩을 일정한 보존조건하에서 자연발효로 48~72시간 내의 발효속성시켜 가염(加鹽)마쇄 한후 가열처리하여 식용하든가 또는 각종 향신료를 첨가하여 가열처리하든가 하여 발효후 반드시 가열조리하여 식용한다는 점등에서 차가 난다. 일본의 납두에 관한 과학적인 연구는 1894년 矢部規矩治의 납두의 세균학적, 효소학적, 연구를 비롯하여 1902년 門前, 須田, 米成 등의 보고, 1906년 澤村에 의하여 납두제조 주요미생물은 *Bacillus natto*라고 분리, 동정하여 명명하였고 1930년 村松 山口 1959년 林右市 등 일본의 납두제조와 납두균에 관하여는 수많은 연구보고가 발표되어 있다.

필자는 상기 우리나라의 대두가공식품 중

특히 간장, 된장에 관하여 흥미를 느껴 조사 연구한 결과 필자가 수집한 시료의 조사에 의하면 우리나라의 간장, 된장은 메주콩을 삶아서 만든 메주 덩어리가 30°C 전후의 실온에서 자연번식의 세균에 의하여 3~5개월이라는 장시간에 걸쳐서 발효되어 이것으로부터 제조된 것이 우리나라 고유의 간장, 된장임을 확인하였다. 또한 우리나라의 청국장도 상기 메주세균과 동일종류의 세균에 의하여 이루어지는 것으로 예상되나 우리나라의 청국장에 대하여서는 한편의 보문도 찾아 볼길이 없으며, 어떤 사람은 납두와 혼동시키는 이도 있으므로 우리나라의 청국장이 과연 일본의 납두와 같은 것인지, 불연이던 어떻게 다른 것인지에 관하여 흥미를 느껴 조사연구한 결과 청국장제조 과정중 유효세균을 분리하여 동정한바를 第1報로서 이에 보고한다.

## 材料 및 方法

### 1. 시 료

#### a) 대두(長端白豆)

본 시료는 방사선농학연구소에서 분양받은 것으로서 70년도산 장려 대두품종이다. 이 품종은 타품종에 비하여 단백질 및 지방의 함량이 많고 반당 수확량도 높아 재배상으로도 경제적으로나 유리한 품종으로 장려되고 있는 품종이다.

#### b) 볏짚(藁)

각종 청국장 발효균의 분리원으로 사용하기 위하여 여러지역으로 부터 수집한 후(특히 서울 주변을 중심으로) 신선한 것만을 선별하여 2~3cm의 길이로 절단하고 전부를 혼화하여 청국장제조시에 첨가하여 부착균주로 하여금 발효속성에 참여토록 하였다.

### 2. 청국장제조(세균분리용),

원료 시료대두(장단백목)를 정선하여 삶은(실온)에서 약 3배의 물을 가하여 달걀서 하루밤 방치한후(약 15시간) 속구리에 옮겨서 물기를 빼고 이것을 Fernbach type flask

에 적당량씩 분주면전하여 autoclave 에서 증자(蒸煮) (15lbs 에서 60 분간)하여 대두를 연화시키는 동시에 살균한다. 여기에 준비된 벗질을 가하여 잘 혼화시킨 후 면전하여 된 것을 "K"로 하고 동일 방법으로 벗질을 첨가하지 않고 면전(綿栓)없이 대기에 방치한 것을 "S"라 하여 37°C 부란기에서 72시간 발효숙성시킨후 세균분리용 시료 청국장으로 하였다.

### 3. 세균분리 및 동정

발효숙성 종료후(37°C에서 72 시간) 무균적 조건하에서 제품별 (K 품 및 S 품)로 각각 그 점질물을 채취하여 상법에 준하여 살균된 생리수에 희석하고 nutrient-broth 한천 배지를 사용하여 통상평판 분리배양를 수회 반복하여 청국장 발효숙성 과정중 관여 균주 전부를 분리 배양한후 Bergeys' manual에 준하여 균학적 성질을 조사 시험하여 동정하였다.

### 4. 단백질 분해력 측정

#### 1) 조효소액 조제

분리된 순수분리 배양 균주 각각에 대한 nutrient-broth 액체배지에 증식배양(37°C에서 48시간)를 하여 이 액을 원심분리(r.p.m 5000에서 20분간)한후 그 상등액을 각 균주의 조효소액으로 하여 력가측정용 시료로 하였다.

#### 2) 력가측정법

Folin's method에 준하여 측정하여 tyrosine 10 $\gamma$ 를 1단위로 표시하였다.

### 5. 우수균주선정

#### 1) 제일차 선별

통상평판배양법에 의하여 순수분리된 모든 균주에 대하여 Folin's method에 준하여 단백질분해력가를 측정한후 100단위 이상의 강력균주만을 선별하였다.

#### 2) 제 2차 선별

제 1차 선별에서 선택된 각 균주를 순수증식 배양하여 이들 균주를 단일균으로 처리 청국장을 제조하여 이에 대한 관능시험을 통하여 그 중에서 우수하다고 인정되는 것을

선별하였다.

#### 3) 최종선정

제 2차 선별균으로 조제된 제품의 비교는 관능시험에 의한 맛, 색택, 향취(방향성), 이취(잡취) 등의 종합 결과로 최적우수균주를 선정하였다.

## 結果 및 考察

청국장 발효숙성에 관여하는 세균을 순수 분리하여 이중에서 유효균을 동정, 선정하기 위하여 서울 주변을 중심으로 한 여러 지역으로부터 벗질(糞)를 채취 2~3cm의 짧은 길이로 절단하여 이것을 autoclave에서 증자한 면전 삼각후라스크내의 메주콩에 첨가하여 37°C의 부란기에서 청국장메주로 발효시킨 것을 K 품, 벗질을 넣지않고 개방된 삼각 후라스크내에서 자연 발효시킨 것을 S 품으로 하여 이들 각 제품의 점질물을 무균적으로 채취, 살균수에 넣어 충분히 흔들어 현탁액을 만든 다음 통상적인 희석법에 의하여 순수 분리한 결과 K 품으로부터 37종, S 품으로부터 28종, 계 65종을 분리하였다. 이들 각 분리균에 대한 분류학상의 균학적 제특성 즉 형태적, 배양적 및 생리적인 성질을 조사 실험한바는 표 1, 2, 3과 같다.

균학적 제특성 조사에 이어 이들 분리균 각각에 대한 단백질 분해력을 Folin's method에 준하여 조사한 결과는 표 4와 같다. 이중 력가가 100단위 이상의 균주만을 선별한 결과 K 품에서 8종(K-22, K-24, K-26, K-27, K-28, K-31, K-32, K-33)과 S 품에서 7종(S-5, S-8, S-11, S-13, S-16, S-18, S-24) 계 15종을 얻었다.

이들 단백질 분해력이 우세한 균주들을 autoclave에서 증자한 삼각후라스크내의 메주콩에 각기 단일균주로 접종하여 37°C, 72hr 발효시키면서 제 2차, 제 3차의 관능시험(맛, 향취, 색택, 점성도 등)을 행하여 최적 우수균주로 K-27과 S-16을 선정 선택하였다.

최적우수균주로 선정된 K-27과 S-16에 대한 균학적 제특성을 비교하기 위하여 수원농

**Table 1.** The Morphological Characteristics of the Isolated Bacteria from the Chung-Kook-Jang Fermentation.**Table 4.** Protease activities

	Vegetative cell		Spore		Gram staining	Motility	(1 Unit = tyrosin. 10 $\gamma$ )
	Shape	Size( $\mu$ )	Pre-sence	Size( $\mu$ )			
K-1	Rod	0.8~1.0×1.5~4.0	+	0.8~0.9×1.0~1.2	+	+	81.0
2	"	0.9~1.0×2.0~2.5	+	0.9×1.0	+	+	33.0
3	"	0.9~1.1×2.0~3.0	+	0.9×1.0~1.4	+	+	55.0
4	"	0.9~1.1×2.0~5.0	+	0.9~1.0×1.1~1.5	+	+	89.0
5	"	0.9~1.0×2.0~5.0	+	0.9~1.0×1.1~1.5	+	+	9.0
6	"	0.9~1.1×2.0~4.0	+	0.8~1.0×1.0~1.2	+	+	26.0
7	"	0.9~1.2×2.0~4.0	+	0.8~1.0×1.0~1.2	+	+	45.0
8	"	0.9~1.0×1.5~4.0	+	0.9~1.0×1.2	+	+	33.0
9	"	0.9~1.0×2.0~4.0	+	0.9×1.0~1.4	+	+	38.0
10	"	1.1~1.2×3.0~6.0	+	0.9×1.1~1.6	+	+	46.0
11	"	1.4~1.6×2.5~6.5	+	1.0~1.2×1.0~1.3	+	+	43.0
12	"	0.9~1.2×2.5~3.5	+	0.8×1.0~1.2	+	+	—
13	"	1.0~1.3×2.0~4.0	+	0.9×1.0~1.1	+	+	—
14	"	1.4~1.6×4.0~6.0	+	1.1×1.2~1.5	+	+	70.0
15	"	0.9~1.1×3.5~6.0	+	0.9×1.5	+	+	15.5
16	"	1.4~1.6×5.0~8.0	+	1.0×1.4~1.6	+	+	15.5
17	"	1.0~ ×3.5~6.0	+	1.0×1.2	+	+	14.5
18	"	1.1~ ×2.5~6.0	+	0.8×1.1	+	+	3.5
19	"	1.0~ ×3.0~6.0	+	0.9×1.0~1.2	+	+	14.5
20	"	0.9~1.1×2.0~4.5	+	0.8×1.2	+	+	19.0
21	"	0.8~0.9×3.5~4.5	+	0.9×1.0	+	+	81.0
22	"	0.9~1.0×2.0~3.0	+	0.8×1.1	+	+	108.0
23	"	0.9~1.1×2.0~3.0	+	0.9×1.0~1.2	+	+	32.5
24	"	0.7~0.8×2.0~3.0	+	0.8×1.0	+	+	136.0
25	"	0.9~ ×1.5	+	0.9×1.1	+	+	63.5
26	"	0.9~1.0×2.0	+	0.8×1.0~1.2	+	+	157.5
27	"	0.9~1.2×2.0~3.5	+	0.9×1.1~1.4	+	+	182.5
28	"	0.9~1.1×2.0	+	0.9×1.0~1.1	+	+	144.0
29	"	0.9~1.1×2.0~3.0	+	0.9×1.0~1.2	+	+	53.5
30	"	0.9~1.0×2.0~3.0	+	0.8×1.1~1.3	+	+	16.0
31	"	0.9~1.0×2.0~3.0	+	0.8×1.0~1.2	+	+	182.0
32	"	0.9~1.0×2.0~3.0	+	0.8×1.1~1.2	+	+	144.0

	Vegetative cell		Spore		Gram-staining	Motility	(1 Unit = tyrosin. 10 $\gamma$ )
	Shape	Size( $\mu$ )	Pre- sence	Size( $\mu$ )			
33	"	0.9~1.0×2.0~3.5	+	0.9×1.0~1.3	+	+	119.5
34	"	0.9~1.1×2.5	+	0.8×1.0~1.2	+	+	79.0
35	"	1.0~1.2×1.5~5.0	+	0.9×1.1	+	+	35.5
36	"	1.0~1.1×2.0~4.0	+	0.9~1.0×1.0	+	+	56.5
37	"	1.0~1.2×2.0~2.5	+	1.0×1.0~1.2	+	+	14.0
S-1	Rod	0.9~1.2×2.0~3.0	+	0.8~1.0×1.0	+	+	19.0
2	"	0.6~1.1×2.0~3.0	+	1.0×1.0~1.2	+	+	70.0
3	"	1.2~1.0×2.4~3.2	+	1.0×1.2~1.3	+	+	34.0
4	"	1.0~1.2×1.5~3.3	+	1.0×1.1	+	+	37.0
5	"	1.0~1.3×2.3~3.0	+	0.9×1.1~1.2	+	+	144.5
6	"	1.0~1.2×2.0~3.0	+	1.0×1.0~1.1	+	+	8.5
7							—
8	"	0.9~1.2×2.3~3.0	+	0.9×1.0~1.3	+	+	134.0
9	"	0.9~1.2×2.5	+	0.9×1.3	+	+	87.0
10	"	1.0~1.1×2.5~3.0	+	0.9×1.0~1.5	+	+	63.5
11	"	1.0~1.4×3.0~4.2	+	0.9×1.0~1.3	+	+	268.0
12	"	0.9~1.2×2.5~3.0	+	0.9×1.0~1.2	+	+	12.0
13	"	1.0~1.4×1.5	+	0.8×1.1	+	+	171.0
14	"	0.9~1.2×1.5	+	0.9×1.1	+	+	72.0
15	"	1.0~1.3×2.5~3.0	+	0.9×1.0	+	+	27.5
16	"	0.9~1.3×2.5~3.0	+	0.9×1.0~1.2	+	+	153.0
17	"	1.0~1.4×2.5~3.8	+	0.9×1.1~1.3	+	+	19.0
18	"	0.9~1.1×2.3~3.8	+	0.9×1.1~1.3	+	+	132.0
19	"	1.0~1.2×2.5~3.0	+	1.0×1.1	+	+	73.0
20	"	1.0~1.1×2.0~2.3	+	1.0×1.0~1.2	+	+	13.0
21	"	0.9~1.2×2.0~2.3	+	0.9×1.1	+	+	13.0
22	"	0.9~1.2×2.0~2.5	+	0.9×1.1	+	+	19.5
23	"	0.9~1.3×2.0~2.3	+	0.9×1.1	+	+	3.5
24	"	0.9~1.4×2.0~2.3	+	0.9×1.1	+	+	206.5
25	"	1.0~1.4×3.1	+	0.9×1.2~1.5	+	+	46.5
26	"	1.0~1.5×1.8~2.5	+	1.0~1.1×1.2	+	+	36.0
27	"	0.9~1.1×1.8~3.0	+	0.9×1.2	+	+	25.0
28	"	1.0~1.3×1.5~3.3	+	1.0×1.1~1.2	+	+	13.0

**Table 2.** The Cultural Characteristics of the Isolated Bacteria from the Chung-Kook-Jang Fermentation.

	Colony of Agar Plate					Growth in N-B			Gelatine Stab.		Agar Stroke (form)
	Form	Surface	Eleva- tion	Margine	Color	Surface	Clouding	Sedim- ent	Line of Puncture	Liquef- action	
K-1	IR	Ro.Mo	Ra	Un	O.W:Y	M	-	-	Be	In	Fili
2	CI	Ro.Mo	Con	"	Na	P	-	-	"	"	Sp
3	CI	Sm.Mo	"	Re	"	M	-	+	"	Cra	"
4	CI	Sm.Mo	Ra	"	Op	"	-	+	"	"	E
5	CI	Ro.Mo	Con	"	Na	"	-	-	"	"	"
6	IR	Sm.Mo	Ra	Er	O.	"	-	-	Fili	St	"
7	Rhi	" "	"	La	Se	"	-	-	"	Cra	Rhi
8	CI	" "	Con	Un	O.Na	"	+	-	Be	In	E
9	CI	" "	Um	"	Na	"	-	-	"	"	"
10	CI	" "	"	"	O.Na	P	-	-	"	"	"
11	CI	" "	Fla	Fil	O.Y	M	-	-	"	Cra	"
12	CI	" "	Con	En	Op	M	+	+	Fili	-	Fili
13	CI	" "	Ra	Un	"	-	+	-	"	In	"
14	CI	" "	Con	En	O.Du	M	-	+	"	St	E
15	CI	Ro. "	Um	Re	O.	-	+	+	Be	In	"
16	CI	Sm. "	Fla	"	Na	-	-	+	"	"	"
17	CI	Ro. "	Ra	"	O.	M	+	+	Fili	"	"
18	Rhi	" "	"	La	O.	P	-	+	Be	"	Fili
19	CI	" "	Con	Cu	Na	M	-	+	"	"	"
20	CI	" "	Ra	Re	O.	P	-	-	"	-	E
21	CI	" "	Fla	En	OP	M	-	-	Fili	-	"
22	CI	" Dr	"	"	O.	P	-	-	Be	In	"
23	IR	" "	Ra	Un	"	"	-	-	Fili	"	"
24	IR	" "	"	"	"	M	-	+	Be	St	"
25	Fil	" "	Fla	Fil	"	P	-	-	Fili	-	Sp
26	CI	Ro. "	"	Un	Se	"	-	-	"	St	E
27	Rhi	" "	"	"	O.	"	-	-	"	In	Rhi
28	Fil	" "	"	Fil	"	"	-	-	Be	"	E
29	CI	" "	"	Un	"	"	-	-	Fili	-	Sp
30	"	" Mo	Con	"	"	M	-	+	Be	-	E
31	"	" Dr	Fla	"	O.Du.Cr	P	-	-	"	In	Fi
32	"	" "	"	"	" " "	"	-	-	"	"	E
33	"	" "	"	"	" " "	F	-	-	Fili	"	F
34	"	" Mo	Con	"	O	"	-	-	"	"	E
35	"	" Dr	Fla	"	O.Du.Cr	"	-	-	Be	"	Sp
36	"	" Mo	Con	"	O.	P	-	+	"	"	E
37	Rhi	Sm. "	Umb	"	O.Du	-	+	+	Fili	Cra	Rhi

	Colony of Agar Plate					Growth in N-B			Gelatine Stab.		AgarStroke (form)
	Form	Surface	Eleva- tion	Margine	Color	Surface	Clouding	Sedim- ent	Line of Puncture	Liquefa- ction	
S-1	IC	" "	Ra	Re	Tr.Se	M	+	+	"	In	E
2	"	" "	"	Au	O.Se	"	+	+	Be	"	Fili
3	IR	Ro.Dr	"	Lo	O.Du	"	+		"	"	"
4	CI	Sm.Mo	Con	Un	O.OP.	"	+	+	"	"	E
5	"	" "	Umb	Re	O.Se	"	-	+	Fili	"	Fili
6	"	" "	Con	"	Tr.	"	+	+	Be	"	E
7											
8	CI	Ro.Mo	Ra	Un	O.Du.Cr	M	-	+	Be	In	E
9	Rhi	Sm."	"	La	O.	"	-	+	"	"	Fili
10	"	" "	"	"	O.	R	+	+	Fili	"	"
11	CI	" "	"	En	O.Du.Cr	M	-	+	Be	"	"
12	Rhi	Ro "	"	La	O.	R	+	+	Fili	"	"
13	CI	Sm."	Con	Un	O.Op.	M	+	+	"	"	"
14	"	" "	Fla	"	O.Se	"	-	+	Be	St	"
15	"	" "	"	"	O.Se	"	-	+	"	"	E
16	"	" "	Ra	La	O.	"	+	+	"	In	"
17	CI	" "	Fla	Un	O.Se	R	-	+	"	"	"
18	"	" Dr	Con	Re	Tr.Du	P	-	-	"	"	"
19	"	" Mo	Ra	"	O.Se	M	-	+	"	"	"
20	"	" Dr	Fla	Fil	O.Du.Cr	P	-	-	"	"	Sp
21	"	" Mo	Con	Re	O.Op	M	-	-	"	"	E
22	IR	" Dr	Fla	"	Tr.Du	P	-	-	"	"	"
23	CI	" "	"	"	O.Cr	"	-	-	"	St	Sp
24	"	" "	"	"	" "	"	-	-	"	Cra	"
25	"	" "	"	"	O.Cr	"	-	-	Fili	"	"
26	"	" Mo	Con	"	O.Na	M	-	-	Be	In	E
27	"	" Dr	Fla	"	O.Cr	P	-	-	"	"	Sp
28	"	" Mo	Umb	"	O.Op.	M	+	+	"	"	E

Abbreviation; +: growth or Positive, -: no growth or negative,

IR: irregular, CI: circular, Rhi: rhizoid, Fil: filamentous, Ro: rough, Sm: Smooth,

Mo: moist, Dr: dry, Ra: raised, Con: convex, Um: umbonate, Fla: flat,

Umb: Umbilicate, Un: undulate, Re: repand, Er: erose, La: lacerate, En: entire,

Cu: curled, Au: ausiculate, Lo: lobarlobulate, O: opaque, W: white, Y: yellow,

W-Y: white-yellow. Na: nacreous, Op: opalescent, Se: sebaceous, Du: dull,

Cr: cretaceous, Tr: translucent, M: membranous, P: pellicle, F: flocculent, R: ring,

Be: beaded, Fili: filiform, In: infundibuliform, Cra: crateriform, St: stratiform,

E: echinulate, Sp: spreading.

**Table 3.** The Physiological Characteristics of the Isolated Bacteria from the Chung-Kook-Jang Fermentation.

		Reaction				Litmus-Milk Reaction				Production					Relation to
		Starch-hydrolysis	Gelatine-hydrolysis	Methyl-Red	Vogesproskauer	Acid or alkaline	Reduction	Rennet	Peptonization	Indol	Ammonia	NO <sub>2</sub> from NO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> S	Catalase	Free O <sub>2</sub>
K-1	C	+	-	+	Al	+	-	+	-	+	##	-	+	A	
2	Red	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	-	-	"	
3	C	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	"	
4	"	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	-	"	
5	C-W	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	"	
6	C	+	-	+	"	+	+	+	-	+	###	+	+	A.M.F	
7	C-W	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	A.F	
8	C	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	A	
9	C-W	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	"	
10	"	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	A.An	
11	"	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	-	-	A.F	
12	"	-	-	+	"	+	-	+	+	+	-	+	+	A.M	
13	Blue	+	-	+	"	+	-	+	+	+	##	+	+	A	
14	C	+	+	-	"	+	-	+	-	+	##	-	+	A.F	
15	Red	+	-	-	"	+	-	+	-	+	##	-	+	A.F	
16	C-W	+	-	-	"	+	-	+	-	+	##	+	+	A.M.F	
17	C	+	+	-	"	+	-	+	-	+	##	-	+	A.M	
18	C	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	A.An	
19	C-W	+	+	-	"	+	-	+	-	+	##	-	+	A	
20	Blue	-	-	-	"	+	+	+	-	+	##	-	+	A.M	
21	"	-	-	+	"	+	+	+	+	+	##	+	+	A.	
22	C	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	-	+	A.F	
23	"	+	-	+	"	+	+	+	-	+	+	-	-	A	
24	"	+	+	-	"	+	+	+	-	+	##	-	-	A.F	
25	C-W	-	-	-	"	+	+	+	+	+	##	+	+	A.M	
26	C	+	-	+	"	+	+	+	-	+	##	+	+	A.F	
27	C-W	+	-	+	"	+	+	+	-	+	+	-	+	A	
28	C	+	+	+	"	+	+	+	-	+	###	-	+	A.M.F	
29	Red	-	+	-	"	-	+	+	-	+	##	-	-	A	
30	Blue	-	-	+	"	+	+	+	-	+	###	+	+	A.F	
31	C	+	-	+	"	+	+	+	-	+	###	-	+	A	



	Reaction				Litmus-Milk Reaction				Production					Relation to
	Starch-hydrolysis	Gelatin-hydrolysis	Methyl-Red	Vogesproskauer	Acid or alkaline	Reduction	Rennet	Peptonization	Indol	Ammonia	NO <sub>2</sub> from NO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> S	Catalase	Free O <sub>2</sub>
32	C	+	-	+	//	+	+	+	-	+	≡	-	+	A.F
33	Blue	+	-	+	//	+	+	+	-	+	≡	-	-	A
34	C	+	+	+	//	+	+	+	-	+	≡	-	+	A.M
35	Blue	+	-	+	//	+	+	+	+	+	≡	-	+	A
36	C	+	-	+	//	-	+	+	+	+	+	-	+	A
37	Blue	+	-	-	//	+	+	+	-	+	-	+	+	A
S-1	C	+	-	+	Al	+	+	+	-	+	≡	+	+	A.M
2	C-W	+	-	+	//	+	-	+	-	+	≡	+	+	A
3	C	+	-	+	//	+	+	+	-	+	≡	+	+	A
4	"	+	-	+	//	-	+	+	-	+	+	+	+	A
5	"	+	+	-	//	+	-	+	-	+	≡	-	+	A.M.F
6	"	+	-	+	//	+	+	+	-	+	≡	+	+	A.E
7														
8	C	+	+	-	//	+	-	+	-	+	≡	-	+	A.M.F
9	C-W	+	+	-	//	+	-	+	-	+	+	-	+	A
10	C	+	+	-	//	+	-	+	-	+	±	+	+	A.M
11	"	+	+	-	//	+	+	+	-	+	≡	+	+	A.M.F
12	Blue	+	+	-	//	+	-	+	-	+	≡	+	+	A
13	"	+	-	+	//	+	-	+	-	+	≡	-	+	A
14	C	+	+	-	//	+	-	+	-	+	≡	-	+	A.M
15	"	+	+	-	//	+	-	+	-	+	≡	+	-	A.F
16	C-W	+	+	-	//	+	-	+	-	+	≡	-	+	A.F
17	C	+	+	-	//	+	-	+	-	+	≡	-	+	A.E
18	"	+	-	-	//	-	+	+	-	+	+	+	+	A
19	"	+	-	+	//	+	+	+	-	+	≡	+	+	A.M.F.An
20	"	+	-	-	//	+	+	+	-	+	≡	+	+	A.F
21	"	+	-	+	//	+	+	+	-	+	≡	-	+	A.M
22	"	+	-	+	//	-	+	+	-	+	≡	-	+	A.M
23	"	+	+	-	//	+	+	+	-	+	≡	+	+	A.M
24	"	+	-	-	//	-	+	+	-	+	≡	+	+	A.M
25	"	+	+	-	//	+	+	+	-	+	≡	-	+	A.M
26	Red	+	-	+	//	+	+	+	-	+	+	-	-	A.M
27	C	-	-	-	//	+	+	+	-	+	≡	-	+	A.An
28	C-W	+	-	+	//	+	-	+	-	+	+	-	+	A

Abbreviation; C: clear, C-W: Clear(Wide zone), Red: redish, Blue: Blue, Al: alkaline, Ac: acid, A: aerobic, An: anaerobic, F: facultative, M: microaerophilols.

Table 5. The Comparison of the Cultural, Morphological and Physiological Characteristics of the Selected Strains, K-27 and S-16

Strain	Morphological Characteristics					Cultural Characteristics					Physiological Characteristics									
	Vegetative cell		Spore		Flagella	Colony of agar plate			Growth in N-B		Gelatin stab			Reaction		Voges-Proskauer				
	Size (μ)	Shape	Size (μ)	Presence		Gram-Staining	Motility	Surface	Elevation	Margine	Color	Surface	Clouding	Sediment	Line of Puncture		Liquefaction	Agar stroke (form)	Starch-hydrolysis	Gelatin-hydrolysis
S-16	0.9~1.3×2.5~3.0	Rod	0.9~1.0×1.0~1.2	++	++	+	Cl Rhi	Sm, Mo	Ra	Un	O, Du	P	+	Be	In	E	Cw	++	++	+
K-27	0.9~1.2×2.0~3.5	"	0.9~1.1×1.1~1.4	++	++	+	Rhi	Ro, Dr	Fla	Un	O, Du, Cr	P	+	Fili	In	Rhi	Cw	++	++	+
8-3-20	1.0~1.2×3.5~6.0	"	1.0~1.2	++	++	+	Rhi	Ro, Dr	Fla	Un	O, Du, Cr	P	+		In	E	Cw	++	++	+
1-1-33	0.9~2.0	"	0.9×1.0	++	++	+	Rhi	Ro, Dr	Fla	Un	Tr, Na	P	+		In	Rhi	Cw	++	++	+
429-1	0.9~1.0×2.5	"	0.8~1.1	++	++	+	IR	Ro, Dr	Fla	Un	O, Du	P	+		In	Rhi	Cw	++	++	+
429-3	0.9~1.0×2.5~3.5	"	0.9~1.1×1.1~1.4	++	++	+	IR	Ro, Dr	Fla	Un	O, Du	P	+		In	Rhi	Cw	++	++	+
429-4	0.9~1.0×2.5~4.5	"	0.8~1.0~1.2	++	++	+	Per	CI	Sm, Mo	Ra	En	O, Du	P	+	St.	Sp	Red	++	++	+
① <i>B. subtilis</i>	0.7~0.9×2~3.0	"	0.6~0.9×1~1.5	++	++	+	Per	CI	Ro, Sm	Ra	La	O, Du	P	+	St.	Sp	Cw	++	++	+
① <i>B. pumilis</i> *	0.6~0.7×2~3.0	"	0.5×1.0	++	++	+	IR	IR	Fla	Er	Tr	P	+		In	Sp	+	+	+	+
② <i>B. subtilis</i> *	0.5~2.0	"	0.5×1.5	++	++	+	IR	IR	Fla	Er	Lo	P	+		In	Sp	+	+	+	+
② <i>B. subtilis</i> **	0.5~2.0	"	0.5×1.5	++	++	+	Rhi	Rhi	Con	Lo		P, M	+		In	Sp	+	+	+	+
<i>B. natto</i>	0.9×1~3.0	"		+	+	+	Per			Lo		P	+		In	Rhi				
Sawamura				+	+	+	Per			De		P	+		In	Rhi				
③ <i>B. natto</i>	1.0×5~9.0			+	+	+	Per			Lo		P	+		In	Rhi				
Muramatus				+	+	+	Per			Lo		P	+		In	Rhi				
④ <i>B. natto</i>	0.8×3~5.0			+	+	+	Per			Lo		P	+		In	Rhi				
Kooro				+	+	+	Per			Lo		P	+		In	Rhi				

  

Acid or alkaline	Litmus milk-Reaction			Physiological Characteristics							Relation to			NOTE			
	Reduction	Renet	Peptonization	Indol	Ammonia	NO <sub>2</sub> from NO <sub>3</sub>	H <sub>2</sub> S	Catalase	Arabinose	Lactose	Potato-stant	Free O <sub>2</sub>	Temp.		pH	NaCl in (N-B)	
															7%	10%	
Al	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	37°C	5~9	good	a few		Same as <i>Bacillus subtilis</i> Var.
Al	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	37°C	5~9	good	a few		Same as <i>Bacillus subtilis</i> Var.
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	40°C	5~8	"	"	"	Adopted from Literatures.
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	40°C	5~8	"	"	"	Adopted from Literatures.
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	37	5~8	"	no.	no.	Japan IAM'S <i>Bacillus Natto</i> .
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	40	5~9	no.	no.	no.	Adopted from Literatures.
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	37	5~8	good	a few	"	(Same as <i>B. subtilis</i> )
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	37	5~8.6	"	"	"	(Same as <i>B. meценtricus</i> )
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	28~40	5~8.4	"	"	"	
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		higher than	"	"	"	
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	37	5.5	"	"	"	(Same as <i>B. subtilis</i> )
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	45		"	"	"	
"	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	40		"	"	"	

대 농화학사에서 분양받은 429-1 (Japan IAM' S *Bacillus Natto*), 429-3 (육군과학기술연구소에서 Natto 균으로 분리, same as *Bacillus subtilis*), 429-4 (상동, same as *Bacillus mesentericus*)의 3종과 본저자가 한국재래식 메주로부터 분리한 우수균주 1-1-33과 8-3-20 (same as *Bacillus subtilis*)의 2종과 비교조사 시험한바는 표 5와 같다.

선정된 균주 K-27 과 S-16의 분류학상의 균학적 재특성 조사 시험에서 보면 K-27의 재특성은 표 5에서 보는 바와 같이 거의 Bergey's manual의 *Bacillus subtilis*의 특성과 유사하나 단지 agar colony plate에서 Rhizoid form을 이르는 점과 agar slant에서도 또한 Rhizoid form을 갖는다는 상이한 특성을 보이고 있다. 이는 조덕현의 "한국재래식 간장의 발효미생물에 관한 연구중 한국재래식 메주의 발효미생물에 대하여"의 세균군의 조사보문에서 거의 대다수의 수적위치를 차지하는 것으로 분리, 동정 보고된 *Bacillus subtilis*의(※※)표 균주와도 일치되는 특성은 지닌 것으로 보며 이는 또한 본 저자가 한국재래식 메주로부터 분리한 우수균주와도 일치되는 특성을 보이고 있어 결과적으로 우리나라의 증자대두 발효숙성 과정중 유효균

을 동일한 것으로 추측할수 있으며 S-16의 재특성도 Bergey's manual의 *Bacillus subtilis* 변종의 특성과 거의 일치함을 보이고 있다. 일본 IAM'S의 *Bacillus natto*와의 비교에서는 colony agar plate에서 form상의 특이한 차를 보이고 있고 배양 및 생리적인 재특성에서는 대체적으로 대동소이 하였다.

담백질 분해력에 의하여 선별된 15종의 분리균을 각각 단일균주로 하여 발효시킨 청국장 메주는 대체적으로 암모니아취가 강하게 나는 반면 일반적으로 된장의 숙성취를 갖고 있었다. 이들 중에서 청국장 고유의 향취를 가지며 또한 점성도가 가장 왕성한 것으로서 K 품에서 K-27을 S 품에서 S-16을 각각 최적균주로 선정하였다. 이는 육군과학기술연구소에서 Natto 균으로 분리한 429-3(B-8)과 429-4(B-38) 및 일본 IAM의 Natto 균에 비하여 점성도 및 향취, 특히 담백질 분해력에서 우세함을 보였다.

결과적으로 볼때 우리나라의 증자대두의 발효숙성 과정중의 유효균으로는 역시 *Bacillus subtilis*균이 단연 우세함을 알 수 있으며 이중 우리 고유의 청국장 유효균도 또한 *Bacillus subtilis*균의 일종임을 알 수 있었다.

## 摘 要

물에 불린 메주콩을 일정량씩 삼각후라스코에 넣고 가압솥에서 가압 증자하여 냉각시킨 것에 일부는 벗짚을 혼입하여 면진을 하고, 일부는 면진없이 개방하여 37°C, 72hr 발효시킨 청국장메주로부터 청국장 발효에 관여하는 세균들을 순수 분리하여 이들에 대한 균학적 재 특성을 시험조사하고 각각 이들에 대한 담백질 분해력을 측정하여 이결과로부터 우수균주를 일차선별하고 이들 각 균주들을 단일 균주로 청국장 메주를 발효시켜 이들 각 제품에 대한 2차 3차의 관능시험을 행하여 최적 우수균주를 분리 동정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 벗짚(藁) 첨가 제품 K로부터 세균 37종, 무첨가(藁) 제품 S로부터 28종 계 65종을 순수 분리하여 이중 담백질 분해력에 의한 우수균주를 K로부터 8종, S로부터 7종, 계 15종을 선별하였다.

2) 일차 선별된 이들 15종의 균주를 단일균으로 하여 청국장메주를 발효시켜 관능시험을 통하여 No. K-27 과 No. S-16를 최적우수균주로 선택하였다.

3) 최종선정 선택된 이들의 분류학적 위치는 K-27 과 S-16 공히 Bergey'Manual에 의하여 *Bacillus subtilis*에 근사하므로 이들 각각의 균주를 *Bacillus subtilis*의 변종으로 동정하였다.

## 引用文獻

1. Breed S.R. Murray E.G.D & Smith, N.R. 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 7th ed. The Williams & Wilkins Co.
2. Difco Lab. *Difco manual*. 1953. 9th ed.
3. Kageyama K. 1955. *日釀工* 33 28, 111
4. Society of American bacteriologists 1957. *Manual of micrological methods*. McGraw-Hill book Co. N.Y.
5. Skermann, V.D.B 1967. A guide to the identification of genera of bacteria.
6. 三國史記(中國古代史). 8卷 第8 神文王 3年 2月條
7. 高麗史誌 第34 食兵 3.
8. 許浚 1611. *東醫寶鑑*
9. 洪萬選 1715. *山林經濟*
10. 山崎自治 1959. *日釀工* 37 249, 348
11. 矢部規矩治 1894. *日農學會報* 24 3
12. 門前, 須田, 米成 1902. *日藥學會誌* 240 321
13. 澤村眞 1906. *Bull. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo*. 7 101
14. 澤村眞 1913. *J. Coll. Agr. Imp. Univ. Tokyo* 5 189
15. 村松舜祐 1930. *日學術協會報告* 5 340
16. 山口正一郎 1944. *日農化* 20 519
17. 林右市 1959. *日釀工* 37 272, 233, 276.
18. 朴啓仁 未發表
19. 韓國科學技術研究所 食糧資源研究室 編 1971. *韓國食品研究文獻 總覽(1917~1968) 豆類編*. 韓國食品科學會刊
20. 京都大學 1957. *農藝化學實驗書*. 2卷 第12編 產業圖書株式會社刊
21. 東京大學 *實驗農藝化學* 上卷.
22. 赤堀四郎 編 1957. *酵素研究法* 1卷 164 朝倉書店
23. " 1957. " 2卷 第6章 Folins變法
24. 朴啓仁 1966. *國立工業研究所 報告* 16 97
25. 鄭泰錫外 1956. *과학회보* 1 19
26. " 1958. *Ibid* 3 75
27. 曹惠鉉 1970. *韓農化* 13 No.1 35
28. 光澤, 山本 1934. *日農化* 10 520
29. 吳祐吉 1937. *日農化* 13 295
30. 張智鉉 1969. *韓·食品科學會誌* 1 No.1 10
31. 張智鉉 1970 *韓 食品科學會誌* 2 No.1 36