

在來式 메주에 分布하고 있는 眞菌에 관한 調查 研究

朴景子 · 김영미 · 李培咸 · 李馥權

建國大學校 應用微生物學研究所

Fungal Microflora on Korean Home-made Meju

Kyoung Ja Park, Young Mi Kim, Bae Ham Lee, and Bok Kwon Lee

Lab. of Applied Microbiology, Kun Kuk University

Abstract

For this study 3 samples of the home-made meju and 3 samples of the improved meju were selected according to their characteristics. A total of 25 strains of true fungi were isolated from the samples of the home-made meju and identified by the Key of Alexopoulos and Raper, using a strain *Aspergillus oryzae* A-113 as a control. Amylolytic and proteolytic enzyme activities of the isolated strains were investigated and the results obtained were as follows.

1. The 25 strains from the home-made meju were identified into 2 *Aspergillus oryzae*, 14 *Asp. flavus*, 6 *Penicillium spp.*, 1 *Candida sp.*, 1 *Spicaria sp.* and 1 *Rhizopus sp.*
2. The 3 strains from the improved meju were all identified as *Aspergillus oryzae*.
3. *Aspergillus flavus*, A-B, from the home-made meju was found to be the strongest strain in α -amylase activity and also to be similar to the strains of *Aspergillus oryzae* from improved meju.
4. *Aspergillus flavus*, A-7, from the home-made meju was found to be the strongest strain in β -amylase activity and stronger than that from the improved meju.
5. *Aspergillus flavus* B-3, was found to be the strongest strain in protease activity and stronger than that from the improved meju.
6. Some of the strains from the home-made meju turned out to be harmful strains, such as *Penicillium spp.* which secrete antibiotics, *Asp. flavus* which secretes mycotoxin, *Candida sp.* which causes skin diseases, *Spicaria sp.* which is an insect pathogen.
7. *Rhizopus sp.* was also found but it has not been proved to be harmful.

緒 論

우리나라에 있어서 메주는 간장 또는 된장으로 蛋白質 供給源으로 매우 重要한 食品이라 할 수 있다. 그리고 메주는 1種의 醱酵食品이기도 하다. 그런데 在來式 메주에 관한 研究는 매우 不振하며 醱酵의 主動役割을 하는 微生物에 관한 分類學的 生態學的 酵素學的 面에서 볼 때 不明한 點이 많다. 그래서 本研究은 在

來式 메주의 微生物의 分布와 種類 및 微生物의 酵素의 活性을 調查하고 檢討한 것이다.

實驗材料 및 方法

1. 實驗材料의 選擇 및 調製

1977年 3月 18日~20日에 市販在來式 메주와 改良式 메주를 特徵에 따라 各 3點씩 選拔한 것과 比較區로서 建國大學校 應用科學研究所에서 選拔한 *Aspergillus oryzae* A-113으로 메주를 釀造하여 供試하였다.

메주의 釀造法

市販되는 메주用 大豆를 精選하여 하루밤 浸漬하였다가 물을 버리고 10 Lbs에서 60分동안 加壓蒸煮한 다음 40°C로 식힌後 *Aspergillus oryzae* A-113을 接種시켜 28°C에서 72時間 醱酵시킨後 乾燥시켰다.

2. 供試菌株

(1) 改良 메주에서 分離한 眞菌 3株(M-1, M-2, 및 M-3).

(2) 在來株 메주에서 分離한 菌株는 Sample A에서 8株(A-1~A-8), Sample B(B-1~B-8)에서 8株, 그리고 Sample C에서 9株(C-1~C-9) 合計 25株의 眞菌이 分離 供試되었다.

3. 使用培地

微生物의 分離에 使用한 培地는 다음과 같이 조제하였으며 細菌의 汚染을 막기 위하여 Chloramphenicol을 40~50ppm 使用하였다.

(1) Malt Extract Agar.

Malt Extract	25.0g
Agar	15.0g
Dist. Water	1,000ml

(2) Czapek's Agar

NaNO ₃	3.0g
K ₂ HPO ₄	1.0g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g
KCl	0.5g
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.01g
Sucrose	30.0g
Agar	18.0g
Dist. Water	1000ml

4. 實驗方法

(1) 메주중의 微生物分離 方法

메주 各 1g을 5ml의 滅菌수가 든 試驗管에 넣고 振盪하여 完全히 懸濁시킨 후 稀釋法에 依해 100배 0.5ml를 1000倍 稀釋시킨 것을 培地에 接種하였다. Czapek's agar를 40°C로 녹인 용액 20ml와 0.5ml 懸탁액을 均一하게 混合하여 凝固시킨후 30°±1에서 1週日間 培養하여 發育한 眞菌을 分離하여 Czapek's agar 斜面培地에 移植하여 保存하였다.

(2) 同定方法

接種에 使用된 菌株는 1週日 이상 培養된 균층을 사용하여 Czapek's agar plate와 Malt extract agar plate에 接種함과 同時에 slide culture를 만들어 形態學的으로 colony의 形態 및 發育 速度 등을 視察하였고 顯微鏡下에서 菌의 conidial head, conidium, vesicle, sterigmata 및 conidiophore의 形態와 크기 및 色의 形成을 Raper & Fennell(15)의 分類方法과 Alexopoulos(16)의 分類方法에 따라 分類 同定하였다.

(3) 澱粉 및 蛋白質分解酵素의 活性測定法

① 酵素劑의 製造

酵素劑로서 米麴을 製造하여 使用하였다.

米麴製造

白米를 하루밤 浸漬하였다가 물을 버리고 10 Lbs에서 1時間 加壓 蒸煮하여 식힌 후 在來式 메주에서 分離한 25(A-8株, B-8株, C-9株)와 改良式 메주에서 分離한 3株를 接種하여 28°C에서 72時間 醱酵시켜 얻은 麴을 乾燥시켰다.

② 澱粉液化 및 糖化 酵素의 活性測定

松山(17)의 α-amylase 및 β-amylase의 活性 測定法에 따랐다. 즉 Flask에 미리 200ml의 1% NaCl溶液을 넣고 約 70°C로 加溫하여 두었다가 거기에 100g의 米麴을 넣는다. 이 flask를 56°C의 恒溫水槽에서 60分間 糖化시킨 후 flask를 流水中에서 冷却시켜 濾過시키고 濾液을 mass cylinder에 取하여 容量을 測定하여 液化力으로 하고 bowling 糖度計로 測定한 度數를 糖化力으로 表示했다.

③ Protease의 活性測定

i) 粗酵素液의 調製法

試料 米麴 10g을 秤量하고 200ml들이 三角 flask에 넣고 純水 100ml을 加하여 室溫에 3時間 두고 때때로 振盪한 후 濾過하여 濾液을 酵素液으로 하였다.

ii) 基質溶液 및 試藥調製法

0.1% Casein溶液 : 0.5g의 milk casein을 秤量하여 500ml들이 三角 flask에 넣고 여기에 少量의 물을 加하여 濕潤시킨 후 물 50~100ml을 加하여 0.1N NaOH 溶解 15ml를 加하여 溶解 시켰다.

Casein 溶解後 0.1N HCl 溶液으로 PH 7.0~7.2로 調整하고 물을 加하여 全量을 500ml 되게 하였다.

沈澱劑 : 濃窒酸 50ml와 황산마그네슘 飽和液 200ml을 잘 混合했다.

iii) 酵素 活性測定法

10개의 試驗管에 0.1% casein溶液 5ml을 넣고 酵素液을 0.1, 0.2,1.0ml을 加하고 물을 加하여 全量

을 7ml되게 한 다음 이 시험관을 40°C의 溫水에 60分間 담구어 反應시킨 후 沈澱劑를 각 시험관에 1ml씩 加하여 振盪시켰다. Casein이 남아 있을 때에는 白濁하지만 完全히 分解하면 透明하게 되므로 조금 透明하게 되었을 때의 酵素液의 量을 確認하여 다음 式으로 力價를 計算하였다.

$$\text{力價} = \frac{5(\text{Casein mg})}{0.1 \times x}$$

x : 透明해진 경우의 최저 酵素液量

實驗 結果

1. 供試菌株의 同定

(1) 改良 메주에서 分離한 3株의 同定

改良 메주 3點에서 각각 분리한 眞菌은 모두 Table 1과 같은 特性을 가지고 있었으므로 *Aspergillus oryzae*로 同定하였다.

(2) 在來式 메주에서 分離된 25株의 眞菌의 同定

Table 1. Morphological characteristics of isolated fungi from the improved meju

Item	Character
Conidial Head	Globose to radiate very light yellow-green on malt agar
Conidiophores	Colorless roughened
Vesicle	Globose or flask shaped
Sterigmata	Uniseriate
Conidia	Globose and roughened
Colonies	Shifting to brown in age on czapek's agar

i) Septate hyphae를 가지고 conidiophore 및 conidia의 形成에 있어서 特有的한 *Aspergillious*型을 한 杼를을 第一次의으로 분리하였는데 samle A에서 5株 (A-1, A-3, A-4, A-7 및 A-8), sample B에서 4株 (B-1, B-2, B-3, 및 B-4), sample C에서 7株 (C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, 및 C-8) 함께 16株가 우선 *Aspergillus sp*로 同定되었다.

ii) Septat ehyphae를 가지고 conidiophore의 모양이 特異하게 *Penicilli*型을 한 菌株가 sample A에서 2株 (A-5, A-6), sample C에서 2株 (C-6 및 C-9) 함께 6株가 *Penicillium*으로 同定되었다.

iii) 其他 菌株들에 있어서는 形態的 特徵으로 酵母 모양을 한 菌株 1株 (B-5), conidiophore의 모양이

*Penicillium sp*와 같으나 conidium-bearing apparatus가 compact하고 phialides가 spreading한 모양으로 보아 *Spicaria sp.*로 同定되는 것이 1株 (B-6) 그리고 coenocytic hyphae를 가지고 있고 rhizoid가 있는 즉 *Rhizopus sp*로 同定되는 것이 1株 (A-3) 등으로 分類 同定되었는데 綜合하면 Table 2와 같다.

Table 2. The identification of the isolated fungi in this studies

Source	Strain No	Fungus
Sample A	A-1	<i>Aspergillus flavus</i>
	A-2	<i>Rhizopus sp.</i>
	A-3	<i>Aspergillus flavus</i>
	A-4	<i>Aspergillus flavus</i>
	A-5	<i>Penicillium sp.</i>
	A-6	<i>Penicillium sp.</i>
	A-7	<i>Asperillus flavus</i>
	A-8	<i>Aspergillus flavus</i>
Sample B	B-1	<i>Aspergillus flavus</i>
	B-2	<i>Aspergillus oryzae</i>
	B-3	<i>Aspergillus flavus</i>
	B-4	<i>Aspergillus flavus</i>
	B-5	<i>Candida sp.</i>
	B-6	<i>Spicaria sp.</i>
	B-7	<i>Penicillium sp.</i>
	B-8	<i>Penicillium sp.</i>
Sample C	C-1	<i>Aspergillus oryzae</i>
	C-2	<i>Aspergillus flavus</i>
	C-3	<i>Aspergillus flavus</i>
	C-4	<i>Aspergillus flavus</i>
	C-5	<i>Aspergillus flavus</i>
	C-6	<i>Penicillium sp.</i>
	C-7	<i>Aspergillus flavus</i>
	C-8	<i>Aspergillus flavus</i>
	C-9	<i>Penicilliums sp.</i>

Table 3. Morphological characteristics of *Aspergillus a flavus*.

Item	Character
Colonies	Not shifting to brown on czapek's agar
Conidial Head	Radiate light yellow quickly dark yellow green
Conidiophores	Heavy wall uncolored
Vesicle	Elongate globose
Conidia	Globose

(3) 分離된 Aspergilli의 種의 同定

Aspergilli 16株中 14株는 다음 Table 3에서 보는 바와 같은 特徵을 가지고 있으므로 *Aspergillus flavus* 로 同定되었다,

다음 16株中 2株는 앞의 Table 1에서 보는 바와 같은 特徵을 가지고 있으므로 *Aspergillus oryzae*로 同定하였다.

2. 澱粉 및 蛋白質 分解酵素의 活性

在來式 메주에서 分離한 25株中 *Candida*는 yeast이므로 제외한 24株와 改良式 메주의 3株와 A-113의 澱

Table 4. Three types of enzyme activity of used fungi

Strain No.	Fungus	Dextrinogenic amylase	Saccharogenic amylase	Protease
A-1	<i>Aspergillus flavus</i>	84	21	167
A-2	<i>Rhizopus</i> sp.	50	20	100
A-3	<i>Aspergillus flavus</i>	75	22	167
A-4	<i>Aspergillus flavus</i>	75	23	167
A-5	<i>Penicillium</i> sp.	—	—	—
A-6	<i>Penicillium</i> sp.	110	11	125
A-7	<i>Aspergillus flavus</i>	95	25	125
A-8	<i>Aspergillus flavus</i>	96.5	23	125
B-1	<i>Aspergillus flavus</i>	60	21	56
B-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	80	21	83
B-3	<i>Aspergillus flavus</i>	72.5	22	250
B-4	<i>Aspergillus flavus</i>	71	21	100
B-6	<i>Spicaria</i> sp.	45	7	250
B-7	<i>Penicillium</i> sp.	56	16	45
B-8	<i>Penicillium</i> sp.	84	18	63
C-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	96	14	125
C-2	<i>Aspergillus flavus</i>	54.5	18	250
C-3	<i>Aspergillus flavus</i>	61	20	50
C-4	<i>Aspergillus flavus</i>	63	20	100
C-5	<i>Aspergillus flavus</i>	63	21	50
C-6	<i>Penicillium</i> sp.	31	3	50
C-7	<i>Aspergillus flavus</i>	80	18	100
C-8	<i>Aspergillus flavus</i>	80	16	167
B-9	<i>Penicillium</i> sp.	95	15	63
M-1	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	11	125
M-2	<i>Aspergillus oryzae</i>	92	15	250
M-3	<i>Aspergillus oryzae</i>	97	15	83
A-113	<i>Aspergillus oryzae</i>	113	20	133

粉 및 蛋白質 分解酵素의 活性을 松山¹⁶⁾의 測定方法에 따라 測定한 結果 Table 4와 같은 成績을 얻었다.

(1) 澱粉液化型 酵素의 活性

麴으로부터 추출된 효소의 澱粉液化力을 비교해 보면 A-113이 가장 強했고 改良式 메주에 있어서 A-6, A-7, A-8, C-1, C-9도 強하였으나 B-6와 C-6는 대단히 弱했다.

(2) 澱粉糖化型 酵素의 活性

一般的으로 改良式 메주에는 分離한 菌株는 澱粉糖化力이 弱하고 在來式 메주는 強한 편이나 A-6, B-6, C-1, C-9, 菌株는 다소 弱하였으며 그 중에서도 B-1, C-6는 매우 糖化力이 弱했다.

(3) 蛋白質 分解 酵素의 活性

蛋白質 分解 活性은 B-1, B-2, B-7, B-8, C-3, C-5, C-6, C-9를 제외하고는 모두 強하였으며 그 중에서도 B-3, B-6, C-2, M-2는 대단히 強했다.

考 察

改良 메주의 主 醱酵菌은 全部 *Aspergillus oryzae*이며 또 實例로 日本式 醬類 釀造에서도 *Aspergillus oryzae*를 쓰고 있다. 그러나 本 實驗에서 在來式 메주에서 分離한 25株中에 Aspergilli가 16株인데 그중 2株만 *Aspergillus oryzae*이고 나머지 14株는 *Aspergillus flavus*였다.

이 *Aspergillus flavus*에는 Mycotoxin의 일종으로 毒性和 發癌性을 보이는 數種의 aflatoxin을 分泌하는 菌株 등이 있어서 問題가 되고 있는 것이 있다. 또 其他 菌株로 *Penicillium* sp는 抗生物質 分泌 菌株로 問題가 있으며¹⁶⁾, *Candida* sp는 人間의 皮膚菌으로 *Candidiasis*¹⁶⁾를 일으키는 것이 있고, *Spicaria* sp는 昆虫의 病原菌으로 蠶의 硬化病¹⁸⁾을 일으키게 하는 問題가 있는 菌類들이 메주에 많다는 것을 알 수 있었다. *Rhizopus*는 比較的 많이 메주에서 分離되나 有害롭다는 報告는 없다.

이들 菌株가 메주에서 生産한 酵素의 活性에 있어서 改良메주는 大體의으로 고르게 優秀한 편이었으나 在來式 메주에서 分離된 菌株들은 그 隔差가 매우 컸다. 在來式 메주에서 分離된 菌株中에서도 A-6는 澱粉液化活性이 매우 強하여 그 値가 90이 넘는 菌株가 A-7, A-8 및 C-9 등 4株있었다. 澱粉糖化活性에 있어서는 A~7 菌株가 가장 強하였고 20이 넘는 菌株는 A-1, A-2, A-3, A-4, A-8, B-1, B-2, B-3, B-4, C-3, C-4, C-5, 등 12株였으며 B-6는 가

장 弱하였다. 蛋白質 分解活性에 있어서는 100 이상인 것이 大部分이며 특히 250인 것이 B-3, B-6, C-2이며, B-7이 45로 가장 弱했다. B-6는 澱粉液化 및 糖化活性은 아주 弱했으나 蛋白質分解 活性이 아주 強한 것이 特異하였다.

在來式 메주에서 分離된 菌株中에서도 活性이 強한 菌株로 A-7과 A-8을 選拔하였으며 標準菌株인 A-113과 比較하여 볼 때 澱粉 液化 活性과 蛋白質 分解 活性이 약간 떨어지나 澱粉 糖化 活性은 더 強했다. 그러므로 在來式 메주에서도 優秀한 菌株를 選拔할 수 있으며 앞으로 많은 材料에서 選拔할 必要가 있는 것으로 思料되었다.

微生物이 人類와 密接한 關係를 맺고 있어 많이 利用하고 있는 반면에 被害를 입히고 있는 것도 잘 알려진 事實이다. 특히 이들중 數種의 眞菌들이 分泌하는 代謝產物이 肝에 有毒하고 發癌性을 內包하고 있다고 알려진 이래 mycotoxin에 對한 問題는 世界的으로 커다란 問題點으로 등장하였으며 醱酵食品을 常食하고 있는 東洋人에게는 더욱 重要한 것이다.

1961年 Sargeant¹⁹⁾ 등은 眞菌에 汚染된 動物사료를 攝取시킨 實驗動物에서 眞菌의 代謝物質에 依하여 病變을 招來한다고 報告하고 이는 *Aspergillus flavus*의 代謝產物이라 하고 이를 Aflatoxin이라 命名하였다. 1961年 Time²⁰⁾에 韓國 在來式메주에 *Aspergillus flavus*가 많다고 언급된 바 있고 李²¹⁾ 등은 *Aspergillus flavus*가 Aflatoxin을 分泌한다고 했으며 高²²⁾, 李²³⁾ 등도 우리나라 메주에서 分離한 *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp.에 속하는 菌株中 Aflatoxin을 分泌하는 菌株를 分離했다고 보고 하였다. 그리고 最近에 와서 李²⁴⁾ 등은 在來式 된장에 Aflatoxin G와 B가 檢出되었고 이들은 매우 耐熱性기어서 食品中에 오래 殘存할 可能性이 있다고 報告하였다.

本 實驗에서도 眞菌 25株中 *Aspergillus flavus*가 14株이었으며 *Penicillium* sp는 6株였다. 이런 微生物의 分布는 우리나라의 在來式 메주가 食品으로 매우 부적 당함을 입증하며 醱酵食品內에서 Mycotoxin 分泌菌株들의 汚染을 감안하여 볼 때 이들 菌株들의 汚染防止와 食品製造 過程中에서 Mycotoxin을 分泌치 않는 菌株를 利用하는 方法은 食品衛生學 및 食品微生物學의 인 面에서 매우 重要한 것이라 하겠다.

要 約

市販 在來式 메주와 改良式 메주를 特徵에 따라 各

3點씩 選定하고 建國大學校 應用科學研究所에서 選拔한 A-113(*Aspergillus oryzae*)을 標準菌株로 하여 메주를 製造하여 供試材料로 하고 여기서 分離한 眞菌들이 분리한 酵素活性을 檢討하였다.

1. 在來式 메주 3點에서 分離한 眞菌은 25 株였으며 *Aspergillus oryzae* 2株와 *Aspergillus flavus* 14株, *Penicillium* spp. 6株, *Rhizopus* sp 1株, *Candida* sp 1株, *Spicaria* 1株를 同定하였다.

2. 在來式 메주에서 澱粉液化活性이 가장 좋은 菌株는 A-8로써 *Aspergillus flavus* 中에서 選拔되었으며 改良메주에서 分離된 菌주와 비슷하다.

3. 澱粉糖化活性이 가장 좋은 菌株도 *Aspergillus flavus*에서 選拔되었으며 改良메주에서 分離한 것보다 優秀하였다.

4. 蛋白質 分解 活性이 가장 強한 菌株도 *Aspergillus flavus*에서 選拔되었으며 B-3은 改良메주에서 分離된 것보다 優秀하였다.

5. 在來式 메주에는 有用한 菌株도 分布되고 있으나 有害한 菌株도 함께 分布되고 있었다.

6. 有害한 菌株로서는 抗生物質을 分泌한다고 알려진 *Penicillium* sp., Mycotoxin을 分泌할 可能性이 있는 *Aspergillus flavus*, 皮膚腐菌일 수 있는 *Candida* sp. 그리고 昆虫의 病原菌으로 인정된 *Spicaria* sp. 등도 分布하고 있음을 알 수 있었다.

參考文獻

1. 張智鉉: 韓國農化學會誌, 9, 9(1968)
2. 高田平編: 調理科學(1967)
3. 尹瑞石: 韓國食品史研究, 新光出版社(1974)p. 166.
4. 上野敏勇: 朝督試, 2, 44(1927)
5. 金載勛, 趙成桓: 蛋白質分解細菌을 併用한 간장 製造에 關한 研究. 韓國農化學會誌, 18(1975)
6. Jo, Joo Seang: New Med. J (Seoul Korea)2(10) 85(1964)
7. 宋錫勳, 金鍾協, 李啓瑚, 鄭允秀, 張建型: 기술연 구보고, 2, 32(1963)
8. 張智鉉: 서울農業大學論文集 第一輯(1963)
9. 張智鉉: 韓國農化學會誌, 6, 8(1965)
10. 張智鉉: ibid, 3, 3+(1966)
11. 張智鉉: ibid, 8, 1(1967)
12. 조덕현, 이우진: 한국재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구, ibid, 13, 1(1970)
13. 李陽熙: 特許 216號 公告番號 70-133

14. 朱鉉主, 盧慎圭, 林茂鉉 : 細菌을 利用한 간장製造에 關한 研究. 食品科學會誌, 4, 4(1973)
15. Raper, K,B & D.L. Fennell; The Genus *Aspergillus*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore (1965). pp. 357-404.
16. Alexopoulos, C.J: Introductory Mycology, John Willey & sons, New York(1962)
17. 松山正宜 : 味噌麴의 Amylase protease 力價의 測定法, 日本釀造協會雜誌, 66, 10(1972)
18. 青木清 : 昆蟲病理學, 技報堂 (1957), p. 91
19. Sargent, K,O Kelly, J., Carnagham, R,B,A, and Allcroft, R Vecferinar, Record 73 : 1219(1961)
20. Time, May 9, 489, (1969)
21. 李培威 : 한국의 아플라톡신, 한국중균협회(1971)
22. 高春明, 柳駿 : 各種穀類 및 醱酵食品에서 分離된 眞菌類 및 Amylase生成에 關한 研究, 大韓微生物學會誌, 5, 1(1970)
23. 이장규, 김찬수, 김종우 : 한국산 쌀과 메주에서 Aflatoxin 생성진균분리, 대한미생물학회지, 10, 1 (1975)
24. 李瑞來外 二人 : 한국식품과학회 제 17차 학술발표회초록(1976).