

Pyrosequencing을 이용한 메주, 천일염, 된장의 곰팡이 군집 분석

이림기, 허소정, 정도원*

동덕여자대학교 식품영양학과

Received: May 14, 2019 / Revised: June 19, 2019 / Accepted: July 5, 2019

Fungal Microbial Community Profiles of Meju, Solar Salt, and Doenjang Using Pyrosequencing

Limgi Lee, Sojeong Heo, and Do-Won Jeong*

Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Republic of Korea

In order to evaluate the migration of fungi into doenjang from its materials, meju and solar salt, microbial communities were analyzed using pyrosequencing. Dominant fungi of meju were *Botrytis* spp. (57.94%) and *Dothiorella samentorum* (24.08%). Unidentified fungal species (37.53%), unassigned species (32.60%) and several fungal species of small portion were identified in solar salt. In doenjang, *Candida versatilis* were predominantly detected (92.62%). Non-halophilic mold were dominantly identified from meju (low-salt fermented soybean), while halophilic bacteria and archaea for solar salt and salt-tolerance fungi such as *C. versatilis* for doenjang (high-salt fermented soybean) were frequently detected. These results implied that most predominant fungal species might not be migrated from meju and/or solar salt into doenjang.

Keywords: Meju, solar salt, doenjang, fungal microbial community, pyrosequencing

된장은 단백질원인 콩을 주 원료로 하여 발효시킨 고염발효식품으로 독특한 향미와 맛으로 인한 기호성, 영양 및 기능성을 보유한 조미식품이다. 된장은 메주에 소금과 물을 첨가하여 약 1달에서 6개월 정도 발효 숙성하여 제조한다[1]. 된장의 원료가 되는 메주는 콩을 증자하여 성형한 후 볏짚으로 묶거나 볏짚 위에서 약 2달간 자연 발효한다. 메주는 발효과정에서 형성된 미생물들이 단백질 분해효소와 같은 효소를 제공하고 원료인 콩이 보유하고 있는 단백질의 분해와 같은 이화작용을 통해 독특한 향미와 맛을 제공한다. 발효된 메주는 된장의 원료가 되어 보유하고 있는 미생물, 효소, 영양소, 향, 맛 성분 등을 제공한다[2, 3]. 따라서 메주 발효에 관여하는 미생물의 종류와 분포는 메주 뿐만 아니라 된장의 품질에도 영향을 미친다고 알려져 있다.

지금까지 메주의 미생물 군집 연구결과 진균류로 *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Eurotium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*속이 주로 검출되었고, 세균에 있어서는 *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*

와 *Tetragenococcus*속이 주로 검출되었다[4, 5]. 특히, 진균은 메주의 단백질과 같은 거대분자를 분해하기 위한 여러가지 효소를 생산하는 이유로 메주 발효에 중요한 역할을 한다고 알려져 있고 이들의 기원을 확인하기 위해 콩, 볏짚과 같은 원료나 환경의 미생물 군집을 비교하였다[4]. 그러나, 메주의 곰팡이가 된장으로 천이가 되는지에 대한 연구는 부족한 실정이다. 특히 된장의 미생물군집의 기원에 대한 연구는 세균의 군집에 치중되어 있고 진균에 대한 연구는 미흡하다[6–8]. 따라서 본 연구에서는 진균의 ITS (internal transcribed spacer) 유전자 서열 분석에 기반을 둔 pyrosequencing을 이용하여 메주의 진균 군집 분석과 더불어 된장의 주요한 원료인 천일염, 그리고 된장의 진균 군집을 분석하여 진균 천이에 대한 연구를 확인하고자 하였다.

본 연구에 사용된 메주는 충청도 서산지역에서 2017년 11월에 전통적으로 제조하여 2달간 발효시킨 재래식 메주이며, 해당 메주를 이용하여 천일염을 첨가 후 된장을 제조하였고 3달간 발효 후 실험에 사용하였다. 메주, 천일염, 된장은 4°C에 저장하였다가 사용하였다. 각 시료는 PowerSoil DNA extraction kit (MOBIO, USA)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 곰팡이 ITS 서열의 PCR 증폭을 위해 프라이머 ITS3 (5'-X-AC-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAG

*Corresponding author

Tel: +82-2-940-4463, Fax: +82-2-940-4610

E-mail: jeongdw@dongduk.ac.kr

© 2019, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Table 1. Fungal diversity indices of meju, solar salt and doenjang.

Sample name	Total reads	High-quality reads	OTUs	Chao1	Shannon	ACE	Goods coverage
Meju	46,226,062	136,769	30	31.0	1.84	0.59	0.99
Salt	75,754,235	196,947	69	69.0	4.03	0.84	1.00
Doenjang	60,568,584	214,061	43	46.3	0.61	0.14	0.99

ACAGG-CATCGATGAAGAACGCAGC-3')과 ITS4 (5'-X-AC-GTCTCGTGGGCTCGGAG-ATGTGTATAAGAGACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC')를 이용하였다. X는 각 DNA 샘플의 8-nucleotide barcode와 AC는 barcode와 프라이머를 연결한 a linker 부위이다. PCR은 95°C에서 initial denaturation을 3분 실시하였고, 95°C 30초 denaturation, 55°C에서 30초 annealing, 72°C 30초 elongation을 25회 반복 수행 후 종결 반응을 위해 72°C 5분 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 Qiagen purification kit (USA)을 가지고 정제하였고, 각 시료 PCR 산물 1 mg을 pyrosequencing 진행하였다. Pyrosequencing은 Macrogen Inc. (Korea)이 MiSeq™ platform (Illumina, USA)을 사용하여 제조사의 매뉴얼대로 수행하였다.

Pyrosequencing 결과는 SeqPurge 프로그램 [9]을 사용하여 오류 교정을 실행하였고, FLASH [10]를 이용하여 하나의 서열로 조립하였다. Operational taxonomic units (OTUs)은 CD-HIT-OUT [11]를 이용하여 97% 이상의 서열 유사성을 갖는 서열끼리 군집화하여 종 수준의 OTU를 형성하였다.

시료의 진균 군집 분석을 바탕으로 계산된 통계분석 결과, 세 개의 시료에서 Goods Coverage가 0.99 이상으로 보임으로서 진균 군집 분석을 위한 충분한 read 수를 얻었다(Table 1). 각 시료 별 종 추정치(OTUs) 개수는 30-69개, 종 풍부도 (species richness) Chao1는 31-69개로 계산되었다. 종 다양성 (species diversity) Shannon은 0.61-4.03으로 계산되었다. 천일염의 Chao1과 Shannon 결과는 메주와 된장보다 높은 종의 다양성과 풍부도를 보였다. 메주는 종 풍부도 측면에서

가장 낮게 나왔고, 된장의 경우 종의 다양성이 가장 낮게 나왔다.

진균의 분포도를 종(species) 수준에서 차지하는 비율로 볼 때 메주는 *Botrytis* spp. (57.94%), *Dothiorella samentorum* (24.08%), *Dothidea* spp. (6.34%), *Gibberella zeae* (5.19%)의 순으로 보였다(Fig. 1). 일반적으로 메주의 우점진균으로 알려져 있는 *Mucor*속은 *Mucor racemosus* (2.28%)와 *Mucor mucedo* (0.04%)가 확인되었고, *Aspergillus*속은 *Aspergillus flavus* (0.94%)와 *Aspergillus pseudoglaucus* (0.06%)가 확인되었다(Table 2). 천일염의 경우에는 확인되지 않은 종 (37.53%)과 기타(32.60%)로 분류된 종이 가장 크게 차지하였고 *Botrytis* spp. (7.29%), *Saccharomycopsis fibuligera* (3.18%), *Cladosporium* spp. (2.69%), *Alternaria* spp. (1.75%)의 순으로 확인되었다. 그리고 21개의 종이 적은 비율로 검출되었다. 된장의 경우 20개의 종이 확인되었고, 그 중 *Candida versatilis* (92.62%)가 가장 크게 차지하였고 *Cladosporium* spp. (2.38%), *A. flavus* (1.18%) 순으로 확인되었다.

Botrytis spp.는 메주에서 우점으로 확인되었고 천일염에서 발견되었으나, 된장에서는 발견되지 않았다. *Botrytis cinerea*는 메주에서 분리 확인되는 진균 중 하나이며[12], 여러 종류의 protease를 생산하는 종이다[13]. 이러한 결과는 단백질이 많은 메주에서 단백질로부터 아미노산으로 분해하는데 기여할 것으로 추정할 수 있다. 메주에서 검출된 *D. samentorum*는 포도 줄기를 감염시키는 원인균으로 알려져 있으며[14], amylase, lipase 그리고 protease와 같은 외래분비효소를 많이 생산한다고 알려져 있다[15]. 해당 진균이 메

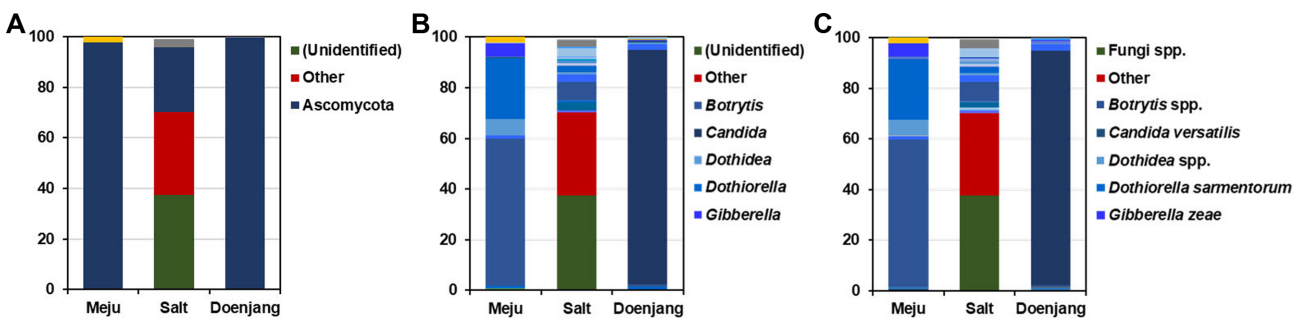


Fig. 1. Fungal taxonomic compositions in meju, solar salt and doenjang. Data portray (A) phylum-, (B) genus-, and (C) species levels of ITS regions pyrotagged gene sequences found in three samples. The ITS regions with more than 200 bp were classified using the CD-HIT-OUT at a 97% confidence threshold. The categories over 5% on relative abundance were shown in figure legends.

Table 2. Taxonomic classification at the species levels showing fungal microbial community of meju, solar salt, and doenjang.

Phylum	Genus	Species	Meju	Salt	Doenjang
(Unidentified)	(Unidentified)	Fungi spp.	0.02	37.53	0.02
Other	Other	Other	0.00	32.60	0.00
Ascomycota	(Unidentified)	<i>Sordariomycetes</i> spp.	0.00	0.80	0.00
	Other	Other	0.00	0.42	0.02
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria infectoria</i>	0.00	1.15	0.00
	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> spp.	0.08	1.75	0.14
	<i>Arthrinium</i>	<i>Arthrinium</i> spp.	0.67	0.00	0.06
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	0.94	0.37	1.18
	<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	0.06	0.00	0.12
	<i>Aureobasidium</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>	0.00	0.49	0.00
	<i>Botrytis</i>	<i>Botrytis</i> spp.	57.94	7.29	0.73
	<i>Candida</i>	<i>Candida</i> spp.	0.00	0.00	0.01
	<i>Candida</i>	<i>Candida versatilis</i>	0.00	0.00	92.62
	<i>Cladosporium</i>	<i>Cladosporium</i> spp.	1.48	2.69	2.38
	<i>Clonostachys</i>	<i>Clonostachys</i> spp.	0.01	0.00	0.00
	<i>Cytospora</i>	<i>Cytospora sacculus</i>	0.00	0.00	0.01
	<i>Dothidea</i>	<i>Dothidea</i> spp.	6.34	0.95	0.57
	<i>Dothiorella</i>	<i>Dothiorella sarmentorum</i>	24.08	2.23	0.00
	<i>Epicoccum</i>	<i>Epicoccum</i> spp.	0.50	0.24	0.75
	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium commune</i>	0.02	0.00	0.00
	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium</i> spp.	0.29	0.26	0.00
	<i>Gibberella</i>	<i>Gibberella zeae</i>	5.19	0.00	0.31
	<i>Hyphopichia</i>	<i>Hyphopichia burtonii</i>	0.00	0.93	0.03
	<i>Issatchenkia</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>	0.00	0.93	0.00
	<i>Neoerysiphe</i>	<i>Neoerysiphe nevoi</i>	0.00	0.80	0.00
	<i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora</i> spp.	0.00	0.00	0.01
	<i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora oryzae</i>	0.01	0.00	0.04
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> spp.	0.04	0.00	0.73
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium brevicompactum</i>	0.00	0.00	0.04
	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium pasqualense</i>	0.00	0.44	0.00
	<i>Saccharomyces</i>	<i>Saccharomyces mikatae</i>	0.00	0.38	0.00
	<i>Saccharomycopsis</i>	<i>Saccharomycopsis fibuligera</i>	0.00	3.18	0.00
<i>Stemphylium</i>	<i>Stemphylium</i> spp.	0.00	0.42	0.00	
Basidiomycota	(Unidentified)	<i>Sporidiobolales</i> spp.	0.00	0.47	0.00
	Other	Other	0.00	0.87	0.00
	<i>Filobasidium</i>	<i>Filobasidium</i> spp.	0.00	0.42	0.00
	<i>Fonsecazyma</i>	<i>Fonsecazyma mujuensis</i>	0.00	0.50	0.00
	<i>Rhodotorula</i>	<i>Rhodotorula</i> spp.	0.00	0.00	0.20
	<i>Tranzschelia</i>	<i>Tranzschelia discolor</i>	0.00	0.78	0.00
	<i>Vishniacozyma</i>	<i>Vishniacozyma victoriae</i>	0.00	0.20	0.00
Mucoromycota	<i>Mucor</i>	<i>Mucor mucedo</i>	0.04	0.00	0.00
	<i>Mucor</i>	<i>Mucor racemosus</i>	2.28	0.00	0.00
	<i>Rhizopus</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.01	0.00	0.00

주 발효에 관여한다는 결과는 찾을 수 없었지만 흙에서 검출된다는 결과와 효소 생산을 기반으로 판단해볼 때 메주의 발효 연관성에 대한 가능성을 유추할 수 있다. 그러나, 두 종의 진균이 식물병원균으로 먼저 알려져 있기 때문에 해당 종들이 발효된 메주에 존재했을 때 발효식품의 안전성 측면에서 연구가 필요하다. 그리고, 두 종이 메주에서 82.02%를 차지하고 있었음에도 불구하고 된장에서는 0.73%를 차지하는 것으로 보아 메주의 우점진균이 된장으로 천이 되지 않은 것으로 판단된다. 이런 결과는 내염성이 없는 두 종이 고염인 된장에서의 생육이 용이치 않았을 것으로 판단한다.

천일염의 경우는 확인되지 않은 종이 70.13%를 차지하고 있으며, 그 외 Ascomycota문에 포함되는 공기나 토양 중에 존재하는 곰팡이들이 검출되었다. 특이하게도 진균에 속하는 효모 중 *S. fibuligera*가 3.18% 검출되었으나, 이는 메주나 된장에서 모두 검출되지 않는 것으로 보아 천일염으로부터 천이가 일어나지 않은 것으로 판단된다.

된장에서 가장 많이 검출된 것은 *C. versatilis*로 92.62% 검출되었다. 해당 종은 여러 된장 및 발효콩에서 우점진균으로도 보고되었다[8, 16]. 무엇보다 *C. versatilis*는 고염에서 생육할 수 있는 내염성을 보였고, *C. versatilis* 유전체 분석은 세포내 글리세롤 합성과 환경으로부터 글리세롤 흡수를 통해 내염성을 보인다는 결과를 보였다[17]. 그리고 *C. versatilis*가 고염인 간장 발효에서 향기 성분 생산에 영향을 미친다고 알려져 있다[18, 19]. 이런 결과는 *C. versatilis*가 고염인 된장에서 생육과 동시에 된장의 향기 성분에 영향을 미칠 수 있는 중요한 우점진균 중 하나임을 유추할 수 있다. 그러나 해당 종은 메주와 천일염에서는 검출되지 않은 것으로 보아 두개의 원재료에 아주 미미한 정도로 존재하다가 고염인 환경에서 생육을 했거나, 다른 부재료에서 유래했을 것으로 추정된다. 결과적으로 우리는 된장의 발효에 있어서 주원료가 되는 메주가 지닌 우점진균이 된장으로 천이가 되어 영향을 미칠 것으로 예상하였으나, 된장의 진균은 메주의 우점 유무와 상관없이 염에 내성을 가지는 진균이 우점을 차지하여 발효에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

다만 특이하게도, 메주 및 된장의 우점진균으로 알려져 있고 상업적 된장 제조에 종균으로 사용되는 *Aspergillus oryzae*는 본 연구에서 사용한 서산에서 제조된 된장에서 검출되지 않았다. 그리고 조 등의 연구결과에서도 제주나 호남권 전통된장에서 *A. oryzae*는 비 우점진균으로 확인되었다[8]. 비록 진균의 군집 구조가 된장 시료간에 다양하게 나타난다는 사실은 이미 알려져 있으나, 해당 결과는 기존의 알려져 있는 *A. oryzae* 외에도 된장의 종균후보균으로 *C. versatilis*를 포함하여 신규 종균 후보의 존재를 예상할 수 있다. 그러나, 아직까지 *C. versatilis*는 발효용 종균으로 사용된 예가 없어 종균 후보로 분리된다 하더라도 식품원료목

록에 등재된 종이 아니므로 위해성 평가 및 식품의약품안전처의 사용 허가가 필요한 실정이다. 2010년 채택된 나고야 의정서가 2014년 발효됨에 따라 국내 미생물 자원의 보호 및 활용이 활성화되어야 한다. 이러한 차원으로 볼 때 우리의 전통 메주나 된장에서 분리되어 산업적으로 유용한 잠재성을 지닌 균에 대해서는 식품원료목록에 신규 등재를 위한 편리한 절차와 규정이 필요하며, 신규 종균에 대한 사용이 용이할 수 있도록 국가적 차원의 전략이 필요하다고 제안한다.

요 약

메주를 염수에 침지하여 된장을 만드는 과정 동안 진균의 군집 변화와 재료가 된 메주와 천일염의 균총 천이를 확인하고자 진균의 ITS (internal transcribed spacer) 유전자 서열을 기반으로 하는 pyrosequencing을 통해 미생물 군집을 확인하였다. 된장의 주요 원료인 메주는 *Botrytis* spp. (57.94%)와 *Dothiorella samentorum* (24.08%)가 우점종으로 확인되었다. 천일염은 확인되지 않은 종들이(70.13%) 검출되었고, 그 외 종들은 적은 비율로 다양하게 검출되었다. 된장은 진균 중 곰팡이가 아닌 효모인 *Candida versatilis* (92.62%)가 가장 높은 우점진균으로 확인되었다. 메주의 저염은 곰팡이 생육이 용이했고, 천일염은 고세균 또는 호염진균, 된장은 고염 효모의 생존에 용이했던 것으로 판단된다. 메주와 천일염의 우점진균이 된장의 균총에 직접적인 영향을 미치지 못하는 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This research was supported by the Dongduk Women's University grant of 2018.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Park K-Y, Hwang K-M, Jung K-O, Lee K-B. 2002. Studies on the standardization of doenjang (Korean soybean pastes): 1. Standardization of manufacturing method of doenjang by literatures. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **31**: 343-350.
2. Lee SS. 1995. Meju fermentation for a raw material of Korean traditional soy products. *Korean J. Mycol.* **23**: 161-175.
3. Yoo JY, Kim HG. 1998. Characteristics of traditional mejus of nation-wide collection. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 259-267.

4. Kim DH, Kim SH, Kwon SW, Lee JK, Hong SB. 2015. The mycobiota of air inside and outside the meju fermentation room and the origin of meju fungi. *Mycobiology* **43**: 258-265.
5. Jung JY, Lee SH, Jeon CO. 2014. Microbial community dynamics during fermentation of doenjang-meju, traditional Korean fermented soybean. *Int. J. Food Microbiol.* **185**: 112-120.
6. Jeong DW, Kim HR, Jung G, Han S, Kim CT, Lee JH. 2014. Bacterial community migration in the ripening of doenjang, a traditional Korean fermented soybean food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 648-660.
7. Kim YS, Jeong DY, Hwang YT, Uhm T-B. 2011. Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method. *Korean J. Microbiol.* **47**: 275-280.
8. Cho S, Park HS, Jo SW, Yim EJ, Yang HY, Ha GS, et al. 2017. Comparison of microbial community profiling on traditional fermented soybean products (deonjang, gochujang) produced in Jeonbuk, Jeonnam, and Jeju province area. *Korean J. Microbiol.* **53**: 39-48.
9. Sturm M, Schroeder C, Bauer P. 2016. SeqPurge: highly-sensitive adapter trimming for paired-end NGS data. *BMC Bioinformatics* **17**: 208.
10. Magoc T, Salzberg SL. 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* **27**: 2957-2963.
11. Li W, Fu L, Niu B, Wu S, Wooley J. 2012. Ultrafast clustering algorithms for metagenomic sequence analysis. *Brief Bioinform.* **13**: 656-668.
12. Shin D, Jeong D. 2015. Korean traditional fermented soybean products: Jang. *J. Ethnic Foods* **2**: 2-7.
13. Abidi F, Limam F, Marzouki MN. 2007. Purification and characterization of an alkaline protease Prot 1 from *Botrytis cinerea*: biodetergent catalyst assay. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **141**: 361-376.
14. Baskarathevan J, Jaspers MV, Jones EE, Ridgway HJ. 2012. Incidence and distribution of botryosphaeriaceous species causing dieback and decline in New Zealand vineyards. *Eur. J. Plant Pathol.* **132**: 549-560.
15. Esteves AC, Saraiva M, Correia A, Alves A. 2014. Botryosphaeriales fungi produce extracellular enzymes with biotechnological potential. *Can. J. Microbiol.* **60**: 332-342.
16. Qi W, Hou LH, Guo HL, Wang CL, Fan ZC, Liu JF, Cao XH. 2014. Effect of salt-tolerant yeast of *Candida versatilis* and *Zygosaccharomyces rouxii* on the production of biogenic amines during soy sauce fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **94**: 1537-1542.
17. Ruan L, Meng M, Wang C, Hou L. 2019. Draft genome sequence of *Candida versatilis* and osmotolerance analysis in soy sauce fermentation. *J. Sci. Food Agric.* **99**: 3168-3175.
18. Cao X, Hou L, Lu M, Wang C, Zeng B. 2010. Genome shuffling of *Zygosaccharomyces rouxii* to accelerate and enhance the flavour formation of soy sauce. *J. Sci. Food Agric.* **90**: 281-285.
19. Song YR, Jeong DY, Baik SH. 2015. Monitoring of yeast communities and volatile flavor changes during traditional Korean soy sauce fermentation. *J. Food Sci.* **80**: M2005-2014.