

Comparison of Microbial Community Compositions between *Doenjang* and *Cheonggukjang* Using Next Generation Sequencing

Gwangsu Ha, JinWon Kim, Su-Jin Shin, Su-Ji Jeong, Hee-Jong Yang and Do-Youn Jeong*

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

Received September 16, 2021 / Revised October 5, 2021 / Accepted October 6, 2021

To profile the microbial compositions of Korean traditional fermented paste made from whole soybeans, *Doenjang* and *Cheonggukjang*, and compare their taxonomic differences, we analyzed the V3-V4 region of 16S rRNA of naturally fermented foods by using next generation sequencing. α -Diversity results showed that values indicating bacterial community abundances (OTUs) and richness (ACE, Chao1) were statistically significant ($p=0.0001$) in *Doenjang* and *Cheonggukjang*. Firmicutes was the most common phylum in both groups, representing 97.02% and 99.67% in the *Doenjang* and *Cheonggukjang* groups, respectively. *Bacillus* was the most dominant genus, accounting for 71.70% and 59.87% in both groups. Linear discriminant (LDA) effect size (LEfSe) analysis was performed to reveal the significant ranking of abundant taxa in different fermented foods. A size-effect threshold of 2.0 on the logarithmic LDA score was used for discriminative functional biomarkers. On the species level, *Bacillus subtilis*, *Tetragenococcus halophilus*, and *Clostridium arbusti* were significantly more abundant in *Doenjang* than in *Cheonggukjang*, whereas *Bacillus thermoamylovorans*, *Enterococcus faecium*, and *Lactobacillus sakei* were significantly more abundant in *Cheonggukjang* than in *Doenjang*. Permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA) showed that the statistical difference in microbial clusters between the two groups was significant at the confidence level of $p=0.001$. This research could be used as basic research to identify the correlation between the biochemical characteristics of Korean fermented foods and the distribution of microbial communities.

Key words : *Cheonggukjang*, *doenjang*, microbiome, next generation sequencing

서 론

전통 장류는 우리나라 국민의 주된 단백질과 지방의 공급원으로서 탄수화물을 주성분으로 하는 우리민족의 식문화에 큰 비중을 차지하고 있어 없어서는 안되는 중요한 식재료 역할을 하고 있다[13]. 청국장은 콩에 쪄 또는 고초균(*Bacillus subtilis*)을 접종하여 2-3일의 단시간 발효를 통해 제조되며, 된장은 자연발효 또는 코지균(*Aspergillus oryzae*)을 접종하여 제조한 메주를 소금물과 혼합하여 숙성을 통해 제조되는데, 된장과 청국장의 주원료는 콩이라는 공통점을 가지고 있다[8]. 특히 된장과 청국장은 콩으로부터 유도되는 다양한 생리활성 물질을 함유하고 있어 체중감소 및 지질저하[8], 항산화 효과[15], 항알러지 효과[1] 및 인체 암세포 성장 억제 효과[11] 등 다양한 가능성을 갖는 것으로 알려져 있다. 장류는 제조시 사용된 원료와 숙성기간, 발효조건 등의 요인에 따라 맛과 향, 품질

특성에 영향을 주며[10], 특히 발효과정 중 미생물이 생산하는 다양한 효소에 의한 작용이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[9]. 이에 따라 전통 장류의 제조 단계 및 숙성 정도에 따른 미생물 군집구조 변화를 종(species) 수준에서 분석한 연구가 수행된 바 있으며, 메주에서는 *Bacillus siamensis*가 32.5%로 가장 우점하는 종이였으나 발효 및 숙성 후 *Bacillus amyloliquefaciens*의 분포가 63.6%로 가장 우점하는 종이라 하였으며, 숙성 전에 비해 숙성 후 *Bacillus* 종들의 점유율이 증가되면서 상위 5%까지가 전체 군집의 92.2%를 차지한다고 보고한 바 있다[6]. 본 연구원에서 수행한 우리나라 지역별 전통 된장의 미생물 군집구조에 대한 분석 연구결과[2]에 따르면, *Bacillus amyloliquefaciens*와 *Tetragenococcus halophilus*가 호남지역과 제주지역에서 제조된 된장의 공통적인 우점균으로 나타났으나, 속(genus) 수준에서 미생물 군집 구조를 분석한 결과에서는 호남지역에서는 전체 미생물 군집 중 *Bacillus* 속 미생물이 43.2%-64.5%를 차지하였고, 제주 지역에서는 0.22%만을 차지하는 것으로 나타나 내륙지역과 해안지역에서 생산된 전통된장의 미생물 분포에 차이가 있는 것으로 보고한 바 있다. Hong 등의 연구 결과[4]에 의하면 비배양 분석법으로 DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 방법을 이용하여 청국장의 미생물 군집 구조를 분석한 결과 청국장 종류에 따라 *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens* 등의 *Bacillus* 속 미생물이 우점한다 보고하여 우리나라 전통 장류의 미생물 분포에 대한

*Corresponding author

Tel : +82-63-650-2000, Fax : +82-63-650-9590

E-mail : jdy2534@korea.kr

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.

연구가 진행되고 있으나 미생물 분석을 위한 시료의 수가 적어 분석결과가 제한적이며, 아직까지 된장과 청국장 미생물 분포 차이에 대한 체계적인 연구가 진행된 바가 없다.

따라서, 본 연구에서는 콩을 주원료로 *Bacillus* 군에 의해 발효되는 공통점을 가진 우리나라 전통 발효식품인 된장과 청국장의 미생물 군집구조를 차세대염기서열분석기술(Next generation sequencing)을 활용하여 비교분석하고, 된장과 청국장을 미생물학적으로 구분하기 위한 biomarker를 탐색하여 전통식품의 미생물 군집구조와 생리활성간의 상관관계를 규명하기 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

된장 및 청국장 시료의 수집

미생물 군집구조를 분석하기 위한 된장과 청국장 시료는 제품의 원료 및 제조지역, 발효 또는 숙성 기간 등의 특정 항목에 대한 편견(bias)을 제거하기 위해 전국에서 중균을 사용하지 않고 자연발효를 통해 생산되는 제품을 무작위로 수집하였다. 된장은 경기도 3종, 강원도 3종, 충청도 3종, 전라도 15종, 경상도 4종, 제주도 2종 총 30종을 수집하였으며, 청국장은 경기도 4종, 강원도 3종, 충청도 3종, 전라도 13종, 경상도 4종, 제주도 3종 총 30종을 수집하였다(Table 1).

된장, 청국장 시료의 total DNA 추출

수집한 된장과 청국장으로부터 total DNA를 추출하기 위해 PowerFood Microbial Kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하였으며, 제조사의 추출 방법에 따라 DNA를 추출하였다. 각 시료로부터 추출된 dsDNA의 농도를 정밀하게 측정하기 위해 Qubit 4 (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) 장비를 이용하였으며, Nanodrop One 분광광도계(Thermo-fisher scientific, waltham, Massachusetts, USA) 장비를 이용하여 흡광도를 측정(Abs260nm/Abs280nm ratio)한 후 1.5%

agarose 전기영동을 통해 최종적으로 DNA 품질을 검증하였다.

16S metagenomic library 제작 및 염기서열 분석

각 된장 및 청국장 시료로부터 추출한 total DNA에서 세균 군집 분석을 위해 16s RNA 유전자를 증폭은 V3-V4 region target primer set (forward : 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3', reverse : GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CT A ATC C-3') 와 KAPA HiFi HotStart Ready Mix (Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 pre-denaturation 5분, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 polymerization 30초 반응을 25회 반복한 후, 72°C에서 5분간 최종 extension 반응을 수행하였으며, AMPure XP (BECKMAN COULTER, Brea, California, USA) bead를 사용하여 증폭산물 이외의 불순물을 제거하였다. 증폭산물에 index를 붙이는 2차 PCR을 수행하기 위해 Illumina에서 제공하는 16S metagenomic sequencing library preparation 방법[5]에 따라 Nextera XT Index kit v2 (Illumina, San Diego, California, USA)를 사용하였다. PCR 반응 조건은 95°C에서 pre-denaturation 5분, 95°C에서 denaturation 30초, 55°C에서 annealing 30초, 72°C에서 polymerization 30초 반응을 8회 반복하였으며, 72°C에서 5분간 최종 extension 반응을 수행하였다. 각 시료로부터 제작된 library의 농도 및 순도 품질 검사를 수행한 후 동일한 농도(4 nM)로 희석하여 normalization하였으며, pooling을 통해 mixture를 제작한 뒤 MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) cartridge에 주입하여 MiSeq (Illumina) 장비를 통해 분석을 수행하였다.

데이터 분석

MiSeq 장비에서 생산된 FASTQ 파일은 EzbioCloud (Chunlab Inc.) 플랫폼의 16S-based microbiome taxonomic profiling

Table 1. Information on samples collected in respective province area

| Sample | Province area | Sample code | The number of samples |
|---------------|---------------|-------------|-----------------------|
| Doenjang | Gyeonggi | DO1 - DO3 | 3 |
| | Gangwon | DO4 - DO6 | 3 |
| | Chungcheong | DO7 - DO9 | 3 |
| | Jeolla | DO10 - DO24 | 15 |
| | Gyeongsang | DO25 - DO28 | 4 |
| | Jeju | DO29 - DO30 | 2 |
| Cheonggukjang | Gyeonggi | CH1 - CH4 | 4 |
| | Gangwon | CH5 - CH7 | 3 |
| | Chungcheong | CH8 - CH10 | 3 |
| | Jeolla | CH11 - CH23 | 13 |
| | Gyeongsang | CH24 - CH27 | 4 |
| | Jeju | CH28 - CH30 | 3 |

Symbols: DO: Doenjang, CH: Cheonggukjang

(MTP) software [3]를 통해 분석하였다. 각 시료에서 얻어진 read 중 PCR 과정에서 생산된 low quality, non-target, chimeric read는 제거 한 후 valid read를 97.0% 이상의 염기서열 유사도 기준으로 OTU clustering하여 시료 내 미생물 군집의 미생물 분포(composition), 다양성(diversity)과 종 풍부도(richness), 균등성(evenness)을 분석하였으며, β -diversity 분석을 통해 시료간의 상관관계 및 된장과 청국장 미생물학적 분류 수준에 따른 biomarker를 분석하였다. 또한, 된장과 청국장 미생물군집의 차이를 검증하기 위해 중심(mid point)과 산포(dispersion)를 비모수 다변량 통계 검정인 PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance) 분석[17]을 수행하였다.

결과 및 고찰

전통 된장 및 청국장 시료의 α -diversity 분석

시료별 세균 군집 분석을 바탕으로 산출된 통계분석 결과를 Table 2와 같이 요약하였다. 된장의 평균 valid read 수는 61677.73개, 청국장의 평균 valid read 수는 77594.93개를 확보하였으며, 대부분의 된장, 청국장 시료에서 99.8% 이상의 Good's coverage of library를 보여 전체 세균 군집을 파악하고 비교분석 하는데 신뢰성을 확보를 위한 충분한 read를 얻은 것으로 판단되었다. 된장과 청국장의 종 추정치(OTUs) 수는 각각 384.95, 102.43으로 계산되었으며, 종 풍부도(richness)를 나타내는 지표인 Chao1은 된장에서 291.11, 청국장에서 94.63으로 나타났다. 종 다양성(diversity)을 나타내는 지표인 Shannon은 된장에서 1.39, 청국장에서 1.60으로 나타났다. 된장과 청국장의 종 추정치 및, 풍부도, 다양성에 통계학적인 차이가 있는지 분석한 결과 OTUs와 Chao1의 p-value가 0.0001 이하로 나타나 된장 시료와 청국장 시료의 종 추정치와 종 풍부도가 통계학적으로 매우 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다. 이전의 연구 결과[14]에 의하면 청국장의 평균 OTUs, Chao1,

Shannon이 각각 85, 149.38, 3.02으로 분석된 바 있어 이와 유사한 결과를 얻었다. 또한, Kim 등의 연구결과[6]에 의하면 숙성 전 된장의 OTUs, Chao1, Shannon이 각각 48, 63, 2.08이었으나 숙성 후 221, 318, 3.22로 증가하였으며, 청국장의 숙성 기간에 따라 시료 내에 존재하는 종의 수와 풍부도, 종 다양성이 증가하는 것으로 판단된다. 된장은 24일의 숙성을 거치는 청국장보다 상대적으로 숙성기간이 길며[7, 8], 일반적으로 청국장 제조를 위한 원재료로 삶은 콩만을 사용하지만 된장은 염수와 메주를 사용하므로 된장은 제조공정에 따른 메주와 염수 등의 원재료로부터 유래한 미생물이 청국장에 비해 더 다양한 것으로 판단된다[6].

된장 및 청국장 세균 분포 분석

된장과 청국장의 세균 분포를 분석하기 위해 된장 30종, 청국장 30종의 그룹별 분류 후 평균값을 산출하여 그룹간 비교를 하였으며, 된장과 청국장의 세균 분포도를 미생물학적 분류단계 수준별로 차지하는 미생물의 비율을 Fig. 1에 나타냈다. 문(phylum) 수준에서 된장과 청국장에서 공통적으로 Firmicutes가 된장과 청국장에서 각각 97.02%, 99.67%를 차지하여 가장 우점하였으며, 속(genus) 수준에서는 된장과 청국장에서 Bacillus속이 된장과 청국장에서 각각 71.70%, 59.87%로 가장 우점하는 것으로 나타났다. 된장과 청국장 시료에 분포하는 유산균을 속 수준에서 분석한 결과 된장 시료에서는 유산균 계열의 미생물 중 Lactobacillus와 Leuconostoc 속은 나타나지 않았으나, 청국장 시료에서는 Lactobacillus와 Leuconostoc 속 미생물의 분포가 각각 10.56%, 4.53%로 청국장 시료 내에서 각각 3번째, 7번째로 우점하는 속으로 나타났다. 또한, Enterococcus 속 미생물의 경우 된장에서는 1.60%를 차지하였으나 청국장에서는 12.4%를 차지하는 미생물로 나타나 청국장의 Enterococcus 속 미생물이 약 7.8배의 높은 비율을 차지하는 것으로 나타났다. 종(species) 수준에서 된장에 가장 우점하는 미생물은 Bacillus subtilis (50.83%), Bacillus licheniformis (18.58

Table 2. Sequence summary and α -diversity indices

| Sample | ACE | Chao1 | Jackknife | OTUs |
|---------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------|------------------------|
| DO | 384.95±172.56 | 291.11±96.22 | 326.88±121.67 | 160.33±52.53 |
| CH | 102.43±33.68 | 94.63±29.84 | 102.08±34.53 | 80.77±29.13 |
| Significance | p<0.0001 | p<0.0001 | p<0.0001 | p<0.0001 |
| Sample | NPShannon | Shannon | Simpson | Phylogenetic diversity |
| DO | 1.40±0.45 | 1.39±0.45 | 0.41±0.15 | 349.93±103.96 |
| CH | 1.61±0.35 | 1.60±0.35 | 0.24±0.11 | 120.63±39.35 |
| Significance | p=0.069 | p=0.060 | p=0.004 | p<0.0001 |
| The number of valid reads | | Good's coverage of library (%) | | |
| DO | 61,677.73±5,501.13 | 99.87±0.04 | | |
| CH | 77,594.93±13,917.24 | 99.84±0.01 | | |

Data represented by the mean of each sample.

Symbols: DO: Doenjang, CH: Cheonggukjang

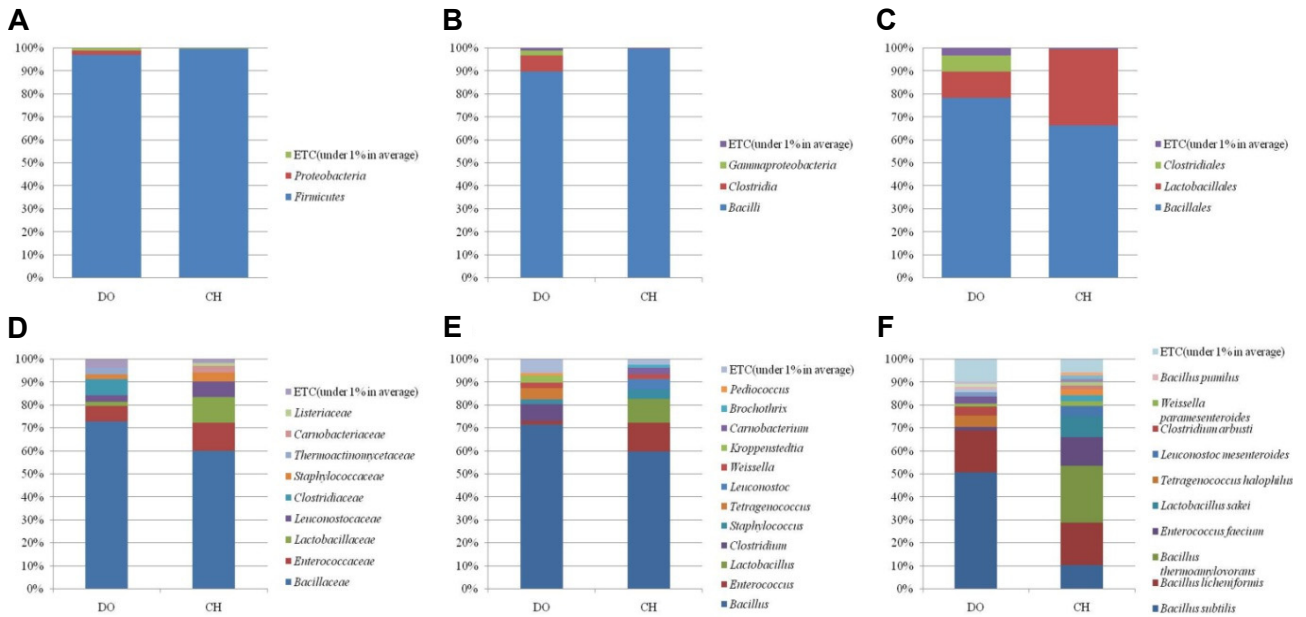


Fig. 1. Microbial composition and relative abundance in *Doenjang* (DO) and *Cheonggukjang* (CH) based on taxonomic levels of classification at phylum (A), class (B), order (C), family (D), genus (E), species (F).

%), *Tetragenococcus halophilus* (5.04%), *Clostridium arbusti* (3.95%), *Kroppenstedtia sanguinis* (3.00%) 순으로 나타났으며, 청국장에서는 *Bacillus thermoamylovorans* (24.73%), *Bacillus lichen-*

iformis (18.65%), *Enterococcus faecium* (12.38%), *Bacillus subtilis* (10.29%), *Lactobacillus sakei* (9.24%) 순으로 나타나 (Table 3) 생물학적 분류수준이 문(phylum)에서 종(species) 수준으로 낮

Table 3. Taxonomic classification at the phylum (A), genus (B) and species (C) levels showing microbial communities of each *Doenjang* and *Cheonggukjang*

| Taxonomic rank in phylum | Proportion (%) | |
|---------------------------|----------------|-------|
| | DO | CH |
| <i>Firmicutes</i> | 97.02 | 99.67 |
| <i>Proteobacteria</i> | 1.93 | 0.00 |
| ETC (under 1% in average) | 1.04 | 0.33 |

| Taxonomic rank in genus | Proportion (%) | |
|---------------------------|----------------|-------|
| | DO | CH |
| <i>Bacillus</i> | 71.70 | 59.87 |
| <i>Enterococcus</i> | 1.60 | 12.41 |
| <i>Lactobacillus</i> | 0.00 | 10.56 |
| <i>Clostridium</i> | 7.22 | 0.00 |
| <i>Staphylococcus</i> | 1.96 | 4.02 |
| <i>Tetragenococcus</i> | 5.16 | 0.00 |
| <i>Leuconostoc</i> | 0.00 | 4.53 |
| <i>Weissella</i> | 2.29 | 2.18 |
| <i>Kroppenstedtia</i> | 3.00 | 0.00 |
| <i>Carnobacterium</i> | 0.00 | 2.82 |
| <i>Brochothrix</i> | 0.00 | 1.39 |
| <i>Pediococcus</i> | 1.14 | 0.00 |
| ETC (under 1% in average) | 5.95 | 2.22 |

| Taxonomic rank in species | Proportion (%) | |
|------------------------------------|----------------|-------|
| | DO | CH |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 50.83 | 10.29 |
| <i>Bacillus licheniformis</i> | 18.06 | 18.65 |
| <i>Bacillus thermoamylovorans</i> | 0.00 | 24.73 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | 1.57 | 12.38 |
| <i>Lactobacillus sakei</i> | 0.00 | 9.24 |
| <i>Tetragenococcus halophilus</i> | 5.04 | 0.00 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> | 0.00 | 4.45 |
| <i>Clostridium arbusti</i> | 3.95 | 0.00 |
| <i>Weissella paramesenteroides</i> | 1.35 | 2.09 |
| <i>Kroppenstedtia sanguinis</i> | 3.00 | 0.00 |
| <i>Staphylococcus equorum</i> | 0.00 | 2.61 |
| <i>Bacillus smithii</i> | 0.00 | 2.61 |
| <i>Clostridium tyrobutyricum</i> | 1.78 | 0.00 |
| <i>Bacillus coagulans</i> | 0.00 | 1.57 |
| <i>Carnobacterium inhibens</i> | 0.00 | 1.46 |
| <i>Staphylococcus sciuri</i> | 0.00 | 1.38 |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i> | 0.00 | 1.38 |
| <i>Carnobacterium mobile</i> | 0.00 | 1.34 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1.32 | 0 |
| ETC (under 1% in average) | 9.52 | 5.81 |

Data represented by the mean of each sample
 Symbols: DO: *Doenjang*, CH: *Cheonggukjang*

아질수록 미생물 분포의 차이가 크게 나타나는 것으로 확인되었다.

전통 된장 및 청국장 시료의 β -diversity 분석

된장과 청국장 시료간의 세균 군집구조를 비교분석하기 위해 Bray-Curtis dissimilarity metric [12]을 기반으로 한 Principal coordinate analysis (PCoA) 분석과 UPGMA-dendrogram 분석을 수행하였다. 그 결과, 속 수준에서는 된장과 청국장 그룹의 클러스터 분리가 명확하게 나타나지 않았지만 종 수준에서는 된장과 청국장의 클러스터가 분리되는 것으로 나타났으며, 시료 간의 유사도를 확인하기 위해 UPGMA 방법을 이용하여 군집분석을 수행한 결과 속 수준에서 종 수준으로 미

생물학적 분류 수준이 낮아질수록 된장과 청국장 그룹의 클러스터가 명확하게 분리되는 것으로 나타났다(Fig. 2).

Beta set-significance 분석

된장과 청국장의 미생물 분포에 통계학적으로 차이가 있는지 분석하기 위해 Jensen-Shannon, Bray-Curtis 두 가지 distance metric 기반의 PERMANOVA 분석을 수행한 결과 *p*-value가 0.001로 나타나 '된장과 청국장 미생물 군집의 중심과 산포가 동일하다'는 귀무가설이 기각되어 된장과 청국장 미생물 군집 분포의 중심 또는 확산이 서로간에 다르다는 것을 확실히함으로써 된장과 청국장의 미생물 분포가 다르다는 것을 통계학적으로 검증하였다(Table 4).

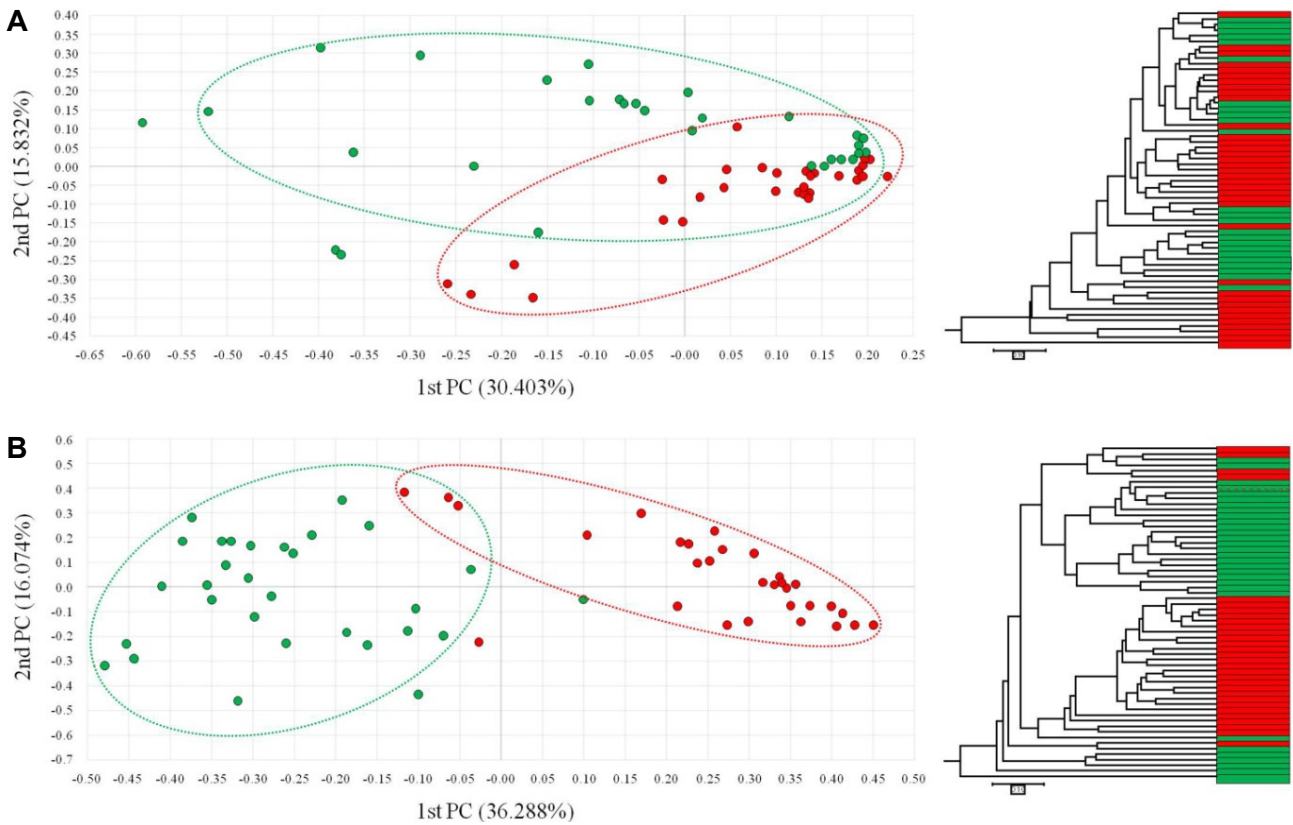


Fig. 2. Principal coordinate analysis and UPGMA clustering result based on Bray-Curtis dissimilarity metric of bacterial communities on genus (A) and species (B) level (red circle & bar : Doenjang, green circle & bar : Cheonggukjang).

Table 4. Permutational multivariate analysis of variance table for bacterial communities from Doenjang and Cheonggukjang

| Test | PERMANOVA | |
|-------------------------------------|--|------------------------|
| Hypothesis | Distributions of population is similar | |
| β -diversity distance metrics | Jensen-Shannon | Bray-Curtis |
| Sample size | 60 | 60 |
| Group size | 2 | 2 |
| Groups | Doenjang-Cheonggukjang | Doenjang-Cheonggukjang |
| Permutations | 999 | 999 |
| <i>p</i> -value | <i>p</i> =0.001 | <i>p</i> =0.001 |

Table 5. Biomarker analysis between Doenjang and Cheonggukjang using LEfSe analysis

| Taxon name | Taxon rank | LDA score (log 10) | p-value |
|-----------------------------------|------------|--------------------|----------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | Species | 5.28504 | <0.00001 |
| <i>Bacillus thermoamylovorans</i> | Species | 5.08476 | <0.00001 |
| Lactobacillales | Order | 5.04244 | 0.00127 |
| Enterococcus | Genus | 4.74042 | 0.00181 |
| <i>Enterococcus faecium</i> | Species | 4.73975 | 0.00200 |
| Bacilli | Class | 4.71431 | <0.00001 |
| <i>Lactobacillus sakei</i> | Species | 4.66495 | 0.00018 |
| Clostridiaceae | Family | 4.58766 | <0.00001 |
| <i>Clostridium</i> | Genus | 4.58766 | <0.00001 |
| Clostridiales | Order | 4.58516 | <0.00001 |
| Clostridia | Class | 4.58507 | <0.00001 |
| <i>Tetragenococcus</i> | Genus | 4.41186 | <0.00001 |
| <i>Tetragenococcus halophilus</i> | Species | 4.40232 | <0.00001 |
| <i>Clostridium arbusti</i> | Species | 4.33497 | <0.00001 |
| Thermoactinomycetaceae | Family | 4.21359 | <0.00001 |

Taxonomic biomarker 분석

문 수준의 미생물부터 종 수준의 미생물 까지 된장과 청국장의 상대적 균총 비율에 차이가 있어 각 미생물 군집을 대표하는 biomarker를 분석하기 위하여 선형 판별 분석 효과 크기 (Linear discriminant analysis effect, LEfSe) [16] 분석법을 이용하였다. 2.0 이상의 LDA (Linear discriminant analysis) score를 effect size로 하여 지표로 사용하였으며, LEfSe 분석 결과를 바탕으로 LDA score에 따른 상위 15종의 taxa와 p-value를 Table 5에 나타냈다. 그 결과 속 수준에서 *Enterococcus*, *Clostridium*, *Tetragenococcus*가 된장과 청국장의 미생물학적 차이를 나타냈으며, 종 수준에서는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus thermoamylovorans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus sakei*, *Tetragenococcus halophilus*, *Clostridium arbusti*로 나타났다. 종 수준에서 biomarker를 비교한 결과 *Bacillus subtilis*, *Tetragenococcus halophilus*, *Clostridium arbusti*는 상대적으로 된장에서 많이 분포하며, *Bacillus thermoamylovorans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus sakei*는 청국장에 상대적으로 많이 분포하는 것으로 나타났다. 해당 결과는 된장에서 *Bacillus* 속 미생물이 0.13%-93.96%를 차지하여 평균적으로 가장 많이 분포하며, *Tetragenococcus halophilus*와 *Clostridium arbusti*가 각각 0.00-56.75%, 0.00-6.91%를 차지한다는 결과[2, 6]와, 청국장에서 *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus* 속 미생물이 각각 64.00%-90.7%, 0.00%-9.5%, 0.00%-28.8%를 차지하여 평균적으로 가장 많이 분포한다는 연구 결과[14]와 유사하였다. 전통된장과 청국장을 미생물학적으로 구분하기 위한 biomarker를 분석한 결과 biomarker 미생물은 된장과 청국장 사이에 $p < 0.01$ 이하의 매우 유의한 수준의 차이가 있는 것으로 확인되었으며, 된장에서는 *Bacillus subtilis*, *Tetragenococcus halophilus*, *Clostridium arbusti*가 상대적으로 많이 분포하였고, 청국장에서는 *Bacillus thermoamylovorans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus*

*sakei*가 상대적으로 많이 분포하는 것으로 나타났다. 이러한 미생물은 된장과 청국장에서 높은 비율을 차지하므로, 각 전통장류의 생리학적 기능, 맛과 향 등에 크게 영향을 미칠 것으로 예상되지만, 아직까지 된장과 청국장 미생물 분포의 원인과 차이에 대한 연구가 제한적이므로, 향후 된장, 청국장 등의 전통장류의 생화학적 특성과 미생물간의 상관관계 규명을 위한 발효 및 숙성단계별 미생물 분포 변화에 대한 연구가 추가적으로 수행되어야 할 것이다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 농림축산식품부의 재원으로 한국농수산식품유통공사-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

- Ahn, S. K. and Hong, K. W. 2005. Hyaluronidase inhibitory activity of extracts from Doenjang, Chungkookjang and Miso. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1119-1123.
- Cho, S. H., Park, H. S., Jo, S. W., Yum, E. J., Yang, H. Y., Ha, G. S., Kim, E. J., Yang, S. J. and Jeong, D. Y. 2016. Comparison of microbial community profiling on traditional fermented soybean products (*Deonjang*, *Gochujang*) produced in Jeonbuk, Jeonnam, and Jeju province area. *Kor. J. Microbiol.* **53**, 39-48.
- Ha, S. M. and Chun, J. S. 2017. Introducing EzBioCloud:

- A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **67**, 1613-1617.
4. Hong, S. W., Lim, I. K., Kim, Y. W., Shin, S. M. and Chung, K. S. 2013. Denaturing gradient gel electrophoresis and culture-based analysis of the bacterial community in *Cheonggukjang*, a Korean traditional fermented soybean food from Gangwon province. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 515-520.
 5. Illumina. 2013. 16S metagenomic sequencing library preparation protocol: Preparing 16S ribosomal RNA gene amplicons for the Illumina MiSeq system. Part no. 15044223 Rev B. Illumina, San Diego, CA. https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf
 6. 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. *Kor. J. Microbiol.* **47**, 275-280.
 7. Ku, K. H., Park, K. M., Kim, H. J., Kim, Y. S. and Koo, M. S. 2014. Quality characteristics of *Doenjang* by aging period. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **43**, 720-728.
 8. Kwon, S. H., Lee, K. B., Im, K. S., Kim, S. O. and Park, K. Y. 2006. Weight reduction and lipid lowering effects of Korean traditional soybean fermented products. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **35**, 1194-1199.
 9. Lee, N. R., Lee, S. M., Go, T. H., Jeong, S. Y., Hong, C. O., Kim, K. K., Park, H. C., Lee, S. M., Kim, Y. G. and Son, H. J. 2013. Fermentation characteristics of Chungkookjang prepared using different soybean. *J. Environ. Sci. Int.* **22**, 723-732.
 10. Lee, S. H., Lee, M. Y., Lim, S. R. and Bae, J. H. 2013. Determination of amounts of benzoic acid and propionic acid in fermented soybean products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **45**, 565-570.
 11. Lim, S. Y., Rhee, S. H. and Park, K. Y. 2004. Inhibitory effect of methanol extract of Doenjang on growth and DNA synthesis of human cancer cells. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **33**, 936-940.
 12. Maziarsz, M., Pfeiffer, R. M., Wan, Y. and Gail, M. H. 2018. Using standard microbiome reference groups to simplify beta-diversity analyses and facilitate independent validation. *Bioinform* **34**, 3249-3257.
 13. Na, H. J., Cho, S. H. and Jeong, D. Y. 2020. Current status of the *Jangryu* industry and future development direction. *Food Sci. Ind.* **53**, 183-199.
 14. Nam, Y. D., Yi, S. H. and Lim, S. I. 2012. Bacterial diversity of *cheonggukjang*, a traditional Korean fermented food, analyzed by barcoded pyrosequencing. *Food Control.* **28**, 135-142.
 15. Oh, H. J. and Kim, C. S. 2007. Antioxidant and nitrite scavenging ability of fermented soybean foods (*Chunggukjang*, *Doenjang*). *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* **36**, 1503-1510.
 16. Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S. and Huttenhower, C. 2011. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Bio.* **12**, R60.
 17. Xia, Y. and Sun, J. 2017. Hypothesis testing and statistical analysis of microbiome. *Genes Dis.* **4**, 138-148.

초록 : 차세대 염기서열 분석법을 이용한 전통 된장과 청국장의 미생물 분포 분석

하광수 · 김진원 · 신수진 · 정수지 · 양희종 · 정도연*

((재)발효미생물산업진흥원)

본 연구는 우리나라 전통 장류인 된장과 청국장의 미생물 분포와 시료간의 미생물학적 차이에 대해 차세대 염기서열 분석법(NGS)을 이용하여 분석하였다. α -diversity 분석 결과 된장에서 종 추정치와 풍부도가 통계학적으로 유의한 수준으로 높은 것으로 나타났다. 세균 분포를 분석한 결과 문 수준에서 *Firmicutes*가 된장에서 97.02%, 청국장에서 99.67%를 차지하여 공통적으로 가장 우점하는 것으로 나타났으며, 속 수준에서는 된장과 청국장에서 *Bacillus*가 각각 71.70%, 59.87%를 차지하여 가장 우점하는 것으로 확인되었다. 된장과 청국장의 미생물 분포에 차이가 있는지 분석하기 위해 PERMANOVA 분석을 수행한 결과 된장과 청국장의 미생물 분포에 통계학적으로 유의한 수준으로 차이가 나는 것으로 나타났다. 각 된장과 청국장 미생물 군집을 대표하는 biomarker를 분석하기 위해 LEfSe분석을 수행한 결과 된장에서 *Bacillus subtilis*, *Tetragenococcus halophilus*, *Clostridium arbusti*가 상대적으로 많이 분포하였으며, 청국장에서는 *Bacillus thermoamylovorans*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus sakei*가 상대적으로 많이 분포하는 것으로 나타났다. 본 연구를 통해 콩을 주원료로 하는 우리나라 대표 전통장류인 된장과 청국장의 시료별 유사성과 차이점에 대한 미생물 분포를 정의하고 전통장류의 생화학적, 생리학적 특성과 미생물 분포의 상관관계를 규명하기 위한 기초 연구자료로 활용할 수 있을 것으로 기대된다.