

메주에서 분리한 검은 *Aspergillus* 균주의 동정

홍승범* · 김대호 · 김선화 · 방나래 · 권순우

국립농업과학원 농업미생물과

Identification of Black *Aspergillus* Strains Isolated from Meju

Seung-Beom Hong*, Dae-Ho Kim, Seon-Hwa Kim, Narae Bang and Soon-Wo Kwon

Korean Agricultural Culture Collection, Agricultural Microbiology Div. National Academy of Agricultural Science, RDA, Suwon 441-853, Korea

ABSTRACT : Black *Aspergillus* is important fungus for oriental fermentation industry. Black *Aspergillus* was frequently isolated from Korean traditional Meju, a fermented soybean starting material for soy sauce and soybean paste. Thirty three strains were isolated from 98 finished Meju collected in various regions of Korea from 2008 to 2011, and 21 strains were isolated from in-process Meju at various farms from 2010 to 2011. The isolated black *Aspergillus* were identified using DNA sequences of partial β -tubulin and calmodulin genes. Of 54 black *Aspergillus* strains, 14 strains were identified as *A. luchuensis* and the others were composed of *A. niger* (n = 21), *A. tubingensis* (n = 10), and *A. welwitschiae* (n = 9).

KEYWORDS : *Aspergillus luchuensis*, *Aspergillus niger*, Black *Aspergillus*, Black koji mold, Meju

검은 *Aspergillus*는 동양의 발효산업에 중요한 균으로서 이 중에서 식품제조에 사용되는 균을 흑국균이라고 한다 (Murakami, 1976; Kitamoto, 2002). 여러 종의 *Aspergillus*가 흑국균으로 보고되었으나 산업적으로 유용한 흑국균은 주로 *Aspergillus luchuensis*, *A. niger*, *A. tubingensis*인 것으로 보고되고 있다 (Yamada *et al.*, 2011). 이 중에서 특히 *A. luchuensis*는 우리나라의 막걸리와 일본의 소주, 그리고 중국의 보이차(普洱茶) 제조의 주요균으로 알려져 동양의 발효산업에 매우 중요한 균으로 인식되고 있다 (Hong *et al.*, 2013).

메주는 한식의 기본 조미료인 된장, 간장을 만드는 주요

재료로서 메주의 발효가 된장, 간장의 맛을 좌우한다고 알려져 있다. 콩을 삶아서 다양한 모양으로 빻은 메주는 말리고 띄우는 과정 동안 다양한 미생물에 의하여 발효된다. 세균, 효모, 곰팡이 등이 메주의 발효에 관여되는 데 이 중 곰팡이는 콩의 단백질, 지방, 탄수화물의 거대분자들을 아미노산, 지방산, 당류 같은 작은 분자로 만드는 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Lee *et al.*, 1995). 1990년대 중반에 메주에 서식하는 곰팡이들에 대하여 조사되었으나 (Lee, 1995) 분리방법상의 문제(제한된 배지를 사용한 희석평판법 이용)와 동정의 문제(형태적 방법만 사용)로 인하여 메주곰팡이 동정에 대한 재작업이 진행되고 있다 (Hong *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2012; Hong *et al.*, 2013).

Lee 등 (1995)이 메주의 곰팡이에 대하여 전체적인 조사를 실시하였으나 검은 *Aspergillus*는 보고되지 않았다. 하지만 전술한 바와 같이 흑국균은 막걸리, 소주와 같은 술의 제조, 보이차와 같은 음료의 제조에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 메주에 어떤 검은 *Aspergillus*가 얼마나 존재하는지를 밝히고 이들을 분리하여 미생물자원센터에 보존함으로써, 장류 또는 주류 제조의 활용에 기반을 제공하고자 하였다.

검은 *Aspergillus* 33 균주를 2008년부터 2011년까지 전국적으로 수집한 98개의 완성메주로부터 희석평판법과 직접분리법에 의하여 분리하였다. 희석평판법을 위하여는 DRBC[32 g

Kor. J. Mycol. 2013 June 41(2): 132-135
http://dx.doi.org/10.4489/KJM.2013.41.2.132
pISSN 0253-651X
©The Korean Society of Mycology

*Corresponding author

E-mail : funguy@korea.kr

Received June 11, 2013

Revised June 16, 2013

Accepted June 18, 2013

Ⓢ 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.

rose-bengal chloramphenicol agar base (Oxoid CM0549), 0.002 g dichloran, 0.1 g chloramphenicol, 1 L distilled water]와 DG18 [31.5 g dichloran-glycerol agar base (Oxoid CM0729), 220 g glycerol, 0.1 g chloramphenicol, 1 L distilled water] 배지를 사용하였고 직접분리법에는 MEA [50 g malt extract agar (Oxoid CM0059), 1 L distilled water] 배지를 사용하였다(Hong *et al.*, 2011). 추가로 2010년부터 2011년 동안, 발효과정에 있는 메주로부터 21 균주의 검은 *Aspergillus*를 분리하였는데, 메주에서 검은 *Aspergillus*로 보이는 부분을 핀셋으로 집어서 MEA 배지에 도말하는 방법으로 분리하였다. 분리된 균주는 단포자 분리법으로 순수 분리하였으며 사면배지 시험관에 배양한 후에 4°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

확보된 54균주의 검은 *Aspergillus*를 동정하기 위하여 형태적 특성과 분자적 특성을 함께 사용하였다. 형태적 특성으로 MEA, CYA [35 g Czapek dox broth (Difco 233810), 5 g yeast extract, 15 g agar, 1 L distilled water] 배지상에서의 균주 생장 모습과 MEA 배지에서 자란 균주의 광학현미경에 의한 세부

구조를 관찰하였다. 분자적 동정을 위하여 β -tubulin 유전자 염기서열을 사용하였으며 β -tubulin 유전자 분석으로 동정이 명확하지 않은 KACC 46492와 46882 균주의 동정을 위하여 calmodulin 유전자 염기서열도 함께 분석하였다. β -tubulin의 PCR 증폭을 위하여 bt2a, bt2b 프라이머를(Glass and Donaldson, 1995) 사용하였으며 calmodulin 유전자 분석을 위하여 cmd5, cmd6 프라이머를 사용하였다(Hong *et al.*, 2005). 해독된 염기서열은 Hong 등(2013)에서 사용된 검은 *Aspergillus* 표준균주와 함께 분석하였다. 분자적 동정을 위하여 MEGA version 5.1 (Tamura *et al.*, 2011) 프로그램을 사용하였으며 균주간 거리는 Tamura-Nei 상수 거리계산모델을 사용하였고 Neighbor-joining 유연관계도를 작성하였다.

β -tubulin 유전자 분석에 의하여 메주에서 분리된 54균주는 *A. niger* 21균주, *A. luchuensis* 14균주, *A. tubingensis* 10균주, *A. welwitschiae* 9균주로 동정되었다(Table 1, Fig. 1). 이 중에서 KACC 46492와 46882 균주는 β -tubulin 유전자 분석에서는 *A. niger*와 *A. welwitschiae* 사이에서 불확실한 위치를 보였으나

Table 1. Black *Aspergillus* strains isolated from Meju

<i>Aspergillus</i> species	Strain no.	Meju source (Meju no.)	<i>Aspergillus</i> species	Strain no.	Meju source (Meju no.)
<i>A. luchuensis</i>	M29	Yangpyeong (#4)	<i>A. niger</i>	M639	Jecheon (#56)
	M532	Hoingseong (#49)		M654	Sunchang (#57)
	M2009	Yongin (#172)		M701	Sunchang (#61)
	M2093	Yongin (#172)		M826	Andong (#77)
	M2096	Yongin (#217)		M2108	Buan (#87)
	M2097	Yongin (#225)		M2110	Gongju (#89)
	M2098	Yongin (#228)		M2111	Gongju (#89)
	M2099	Sunchang (#249)		KACC 46497	Yangpyeong (#91)
	KACC 46491	Sunchang (#276)	<i>A. tubingensis</i>	M100	Haenam (#7)
	M2103	Yongin (#318)		KACC 46498	Hoingseong (#51)
	M2104	Anseong (#79)		M1001	Yeoju (#37)
	KACC 46490	Yongin (#80)		M1003	Yeoju (#38)
	M2106	Yongin (#80)		M1004	Yeoju (#38)
	M2113	Yangpyeong (#93)		M1005	Pocheon (#42)
<i>A. niger</i>	M44	Yangpyeong (#4)		M1006	Anseong (#73)
	M224	Cheongwon (#12)		M2095	Yongin (#173)
	M267	Goisan (#16)		KACC 46499	Sunchang (#250)
	KACC 46493	Ichon (#36)		M2101	Sunchang (#248)
	M458	Ichon (#36)	<i>A. welwitschiae</i>	KACC 46492	Haenam (#7)
	M478	Yangju (#44)		M268	Goisan (#16)
	KACC 46494	Hoingseong (#51)		KACC 46882	Haenam (#27)
	M561	Hoingseong (#51)		M504	Buan (#46)
	KACC 46495	Gimpo (#52)		M672	Sunchang (#58)
	M581	Gimpo (#52)		M792	Sunchang (#72)
	M602	Kimcheon (#53)		M1002	Yeoju (#37)
	M619	Iksan (#54)		KACC 46496	Goisan (#81)
	M630	Gimcheon (#55)		M2109	Buan (#87)

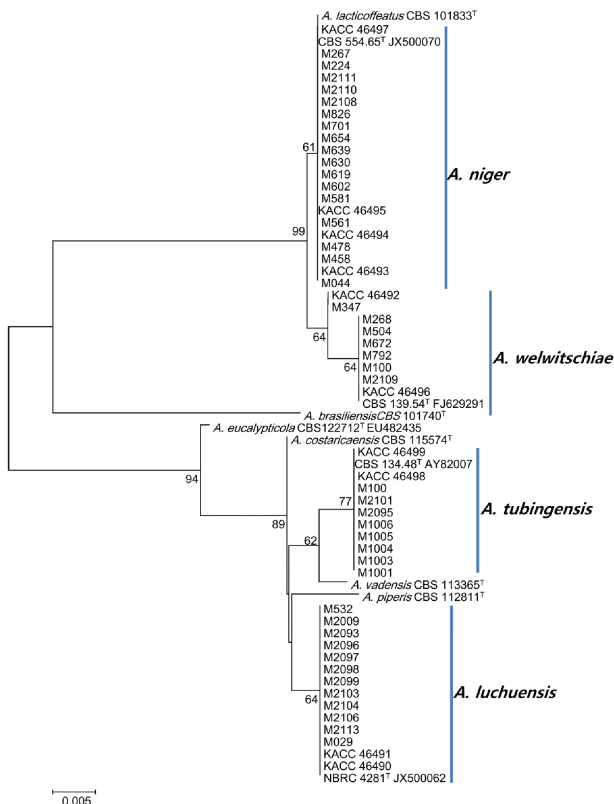


Fig. 1. Neighbor-joining tree depicting taxonomic position of black *Aspergillus* strains from Meju. The tree is based on DNA sequences of β -tubulin gene. Numbers at the nodes are bootstrap values greater than 60 and the subscript T after strain no. denotes type strain of the species.

calmodulin 유전자 분석에서 *A. welwitschiae*와 같은 그룹을 형성함으로써(테이터 미제시) *A. welwitschiae*로 최종 동정되었다.

*A. welwitschiae*는 표현형적으로는 *A. niger*와 구분되지 않으며 오로지 β -tubulin과 calmodulin의 유전자 염기서열에 의하여 구분되는 계통학적인 종(pylogenetic species)이다(Perrone et al., 2011; Hong et al., 2013). 하지만 메주 분리군의 β -tubulin 유전자 분석에서 *A. niger*와 *A. welwitschiae*의 중간에 위치하는 군주가 발견됨으로써 *A. welwitschiae*의 종으로서의 존재가치에 대한 재검토가 요구된다.

메주로부터 분리된 *A. niger*, *A. luchuensis*, *A. tubingensis*, *A. welwitschiae*의 4 종은 형태적으로는 서로 구분할 수가 없었다. 그리고 메주에서의 발생 특성에서도 차이가 없었다. 심지어는 같은 메주에서 서로 다른 종이 분리되기도 하였는데 M29와 M44 군주는 경기도 양평의 4번 메주에서 분리되었으나 M29는 *A. luchuensis*로 M44는 *A. niger*로 동정되었다. M1001, M1002 역시 여주의 37번 메주에서 분리되었으나 M1001은 *A. tubingensis*, M1002는 *A. welwitschiae*로 동정되었다.

이들 종은 형태적으로는 서로 구분이 되지 않지만 분자적으로 명확히 구분되고(Fig. 1) 또한 서로 다른 2차 대사산물을 생성하는 것으로 알려져 있다. *A. niger*와 *A. welwitschiae*의 경

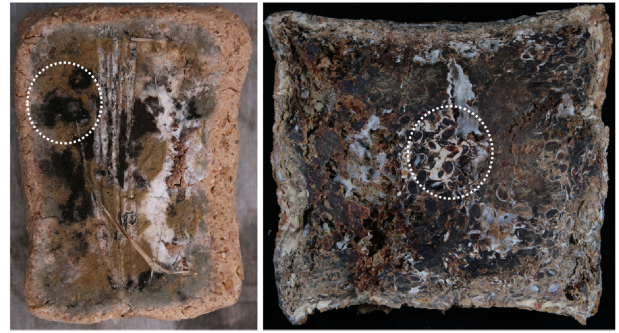


Fig. 2. Black *Aspergillus* on Meju. Left, *A. luchuensis* M2093; Right, *A. niger* KACC 46495.

우에는 ochratoxin을 생성할 수 있는 반면에 *A. tubingensis*와 *A. luchuensis*는 이를 생성하지 못하는 것으로 알려져 있다(Hong et al., 2013). 특히 *A. luchuensis*는 세균의 오염을 막는 유기산을 생성하는 반면에 인체에 해가 되는 어떤 독소도 생성하지 않는 것으로 알려져 있다.

검은 *Aspergillus*는 메주 발효 후기에 고온으로 띄울 때에 발생한다. 일반적으로는 메주 표면과 갈라진 틈 사이에 발생하나 경우에 따라서는 내부에서 대량으로 자라기도 한다(Fig. 2). 이 경우에 공기가 충분하지 않을 때에는 포자를 형성하지 않고 균사상태로 자라기 때문에 흰색으로 자란다. 일반적으로 메주의 곰팡이는 메주의 콩과 콩사이의 공극에 자라는데 검은 *Aspergillus*의 경우에는 공극 뿐만이 아니라 콩의 내부까지 자라는 것이 관찰되었다(Fig. 2). 이것은 검은 *Aspergillus*의 발효 능력이 콩사이의 공극에서만 자라는 곰팡이에 비해서 우수하다고 해석할 수 있다.

일반적으로 장류업체에서는 메주의 검은곰팡이를 좋아하지 않는다. 검은곰팡이 중에는 *Aspergillus* 외에도 메주가 제대로 건조가 되지 않아서 발생하는 *Rhizopus*도 있다. *Rhizopus*는 주로 메주 발효 초기의 건조 과정에서 생기기 때문에 검은 *Aspergillus*와 쉽게 구분된다(Hong et al., 2012). 메주 발효 후기에 발생하는 검은 *Aspergillus*는 양면성이 있는 것으로 판단된다. 먼저 이들 중에 *A. niger*와 *A. welwitschiae*는 ochratoxin을 만들 수 있기 때문에 주의를 기울여야 한다. 한편 *A. tubingensis*나 *A. luchuensis*는 인체에 해로운 독소를 만들지 않으며 특히 *A. luchuensis*는 탄수화물, 지방, 단백질의 분해력이 높은 것으로 나타났다(비제공 자료). 하지만 자연상태에서 이 종들을 구분하여 선택적으로 메주에서 배양하는 것은 어려운 것으로 판단된다. 따라서 메주에서 분리된 검은곰팡이 중에서 발효력이 뛰어난 군주를 선발하여 제어된 환경에서 이 군주를 활용할 수 방법을 강구할 수 있을 것으로 생각된다.

본 실험에 사용된 군주는 농업미생물은행(Korean Agricultural Culture Collection, KACC; <http://www.genebank.go.kr>)에 장기보존 되어 있으며 산업적인 활용을 위한 연구용으로 제공된다.

적 요

검은 *Aspergillus* 속균은 동양의 발효산업에서 매우 중요한 곰팡이로서 식품산업에 관련된 검은 *Aspergillus*를 흑국균이라고 한다. 흑국균은 *A. luchuensis*, *A. niger*, *A. tubingensis*로 구성이 되어 있는데 이 중에서 *A. luchuensis*는 동양의 발효산업에서 매우 중요한 곰팡이로 알려져 있다. 우리나라 전통 된장과 간장의 주요 원료가 되는 메주에서도 검은 *Aspergillus*가 흔히 발견되었다. 33균주의 검은 *Aspergillus*가 2008년부터 2011년 사이에 전국적으로 수집한 98개의 완성메주로부터 분리되었고 추가로, 발효과정에 있는 메주로부터 검은 *Aspergillus* 21균주를 분리하였다. β -tubulin과 calmodulin 유전자 염기서열 분석을 통하여 이들을 동정한 결과 이들은 *A. niger* 21균주, *A. luchuensis* 14균주, *A. tubingensis* 10균주, *A. welwitschiae* 9균주로 동정되었다. 이 중 *A. luchuensis*는 생장이 활발하고 단백질, 지방, 탄수화물 분해력이 높은 것으로 조사되어 이들의 산업적 응용에 대한 추가의 연구가 필요한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 국립농업과학원 과제(no. PJ00866601)의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Glass, N. L. and Donaldson, G. C. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1323-1330.
- Hong, S. B., Lee, M., Kim, D. H., Varga, J., Frisvad, J. C., Perrone, G., Gomi, K., Yamada, O., Machida, M., Houbraeken, J. and Samson, R. A. 2013. *Aspergillus luchuensis*, an industrially important black *Aspergillus* in East Asia. *PLoS ONE*. 8:e63769.
- Hong, S. B., Kim, D. H., Lee, M. A., Baek, S. Y., Kwon, S. W., Houbraeken, J. and Samson, R. A. 2012. Zygomycota associated with traditional *Meju*, a fermented soybean starting material for soy sauce and soybean paste. *J. Microbiol.* 50:386-393.
- Hong, S. B., Kim, D. H., Lee, M., Baek, S. Y., Kwon, S. W. and Samson, R. A. 2011. Taxonomy of *Eurotium* species isolated from *Meju*. *J. Microbiol.* 49:669-674.
- Hong, S. B., Go, S. J., Shin, H. D., Frisvad, J. C. and Samson, R. A. 2005. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*. 97:1316-1329.
- Kitamoto, K. 2002. Molecular biology of the Koji molds. *Adv. Appl. Microbiol.* 51:129-153.
- Lee, S. S., Sung, C. K., Yu, G. W., Oh, C. H. and Yu, H. G. 1995. Studies on safety and classification of microorganisms related to Korean traditional *Meju*. Pp. 391-464. In Yu, J. Y. (ed.). Study on the commercial scale production of *Meju* for Korean fermented soybean products. Research report of Ministry of Science and Technology. Korea.
- Lee, S. S. 1995. *Meju* fermentation for a raw material of Korean traditional soy products. *Kor. J. Mycol.* 23:161-175. (in Korea).
- Murakami, H. 1976. Origin of strain of the Black *Aspergilli* - Taxonomic studies on Japanese industrial strains of the *Aspergillus* (Part 25). *J. Soc. Brew. Japan*. 71:956-959. (in Japanese).
- Perrone, G., Stea, G., Epifani, F., Varga, J., Frisvad, J. C. and Samson, R. A. 2011. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. awamori*. *Fungal Biol.* 115:1138-1150.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28:2731-2739.
- Yamada, O., Takara, R., Hamada, R., Hayashi, R., Tsukahara, M. and Mikami, S. 2011. Molecular biological researches of Kuro-koji molds, their classification and safety. *J. Biosci. Bioeng.* 112:233-237.