

## 간장의 微生物學的 研究

## 在來式 간장에서의 細菌의 分離 및 同定

鄭 允 秀

(陸軍技術研究所)

## Microbiological Studies on Soysauce

## Isolation and Identification of Bacteria from soysauce to brew by Conventional Process

Chung, Yun Su

(Army Research and Testing Laboratory)

(1963. 1. 10. 受理)

## SUMMARY

Ten(10) strains of aerobic bacteria and two(2) strains of microaerobic bacteria were isolated out of soysauce which was brewed by the conventional process. The following bacteria were identified by studying their morphologies and physiological characters.

*Bacillus pumillus-R-2*; *Bacillus subtilis* var., *aterimus-S-1*; *Bacillus licheriformis* var-S-2; *Bacillus subtilis-T-1*; *Sarcina maxima-T-2*; *Pediococcus acidii lactici-Z-2*; *Bacillus citreus* var., *soyaB-Z-5*.

T-2 and Z-5 of the isolated bacteria were found good in growth even in the 24%-salted density, and Z-5 was more vigorous than T-2 though stinking.

S-1 produced black-brown pigment from the medium containing various kinds of carbohydrate and the medium of soysauce which are available to S-1.

## 緒 論

在來式 간장은 植物性 蛋白質의 醱酵 食品으로서 食品料理에 없어서는 안될 調味料인 同時에 食餌이었기 때문에 옛부터 韓國民들의 饌으로 愛用을 받아오던 食品 중에 하나이었다. 原料로는 大豆 및 食鹽水이고 麴菌, 酵母, 細菌類의 作用으로 酸化, 還元, 分解, 合成 등의 化學的인 反應의 變化로 熟成되는 것이었다. 따라서 一般적으로 이것은 아직 우리 나라 全般의 地方과 都市에 큰 差異없이 各 家庭의 主婦들이 通俗的인 在來方法에 準하여 釀造되고 있다. 그러나 여기에 대한 微生物學的 研究는 極히 微弱하였고 특히 細菌에 關한 研究는 거의 없었다. 細菌은 그 作用이 複雜하여 장유의 品質의 特色의 貴重한 部分을 左右하기 때문에 沈湮當時 細心한 注意를 한다. 그러함에도 불구하고 여름철이 되면 그 동안 맛이 좋던 간장이 갑자기 變敗가 와서 不快한 臭氣를 發散하므로 利用하기에 困難을 가져오는 수가 있고 甚할 境遇에는 버리기까지 한다. 그러므로 筆者는 우선 여기에 對한 細菌學的인 研究의 必要를 느끼어 推究 증變敗의 黑褐色 色素 生産菌을 各 1株 그리고 그 외

細菌 10株를 分離하여 이들의 形態 및 生理學的 特性 要因을 究明 推定하였기에 茲에 報告하는 바이다.

改良醬油에 대한 研究者들의 그 동안의 細菌學의 研究業績을 살펴보면 다음과 같다. 1897年 西村(1)는 모로미 중에서 一種의 Gelatin 液化菌을 分離報告하였고, 1898年 高棟(2)는 모로미중에 6種의 細菌을 分離하여 菌學의 究明 및 實地 應用的 結果 장유의 熟成은 酵素 및 細菌의 共同作用에 依한다고 報告하였다. 1905年 齊藤氏(3)는 모로미 중에서 *Bacterium soya*, *Sarcina Hamaguchiae*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesentericus vulgatus*, *Sarcina* sp., *Micrococcus aurantiacus*, *Thermobacterium* sp. 등 7種을 分離하였다. 그중 *Bacterium Soya*, *Sarcina Hamaguchiae*는 濃厚한 鹽度에 대한 抵抗力이 강한 乳酸菌이었고 그 외 5種은 釀造에는 거의 關係가 없는 것이었다고 明示하였다. 1910年 梅野(1)는 全國 鎔鹽地의 모로미에서 乳酸菌 1種 醋酸菌과 酪酸菌 各 1種과 *Sarcina* 2種을 分離하여 形態 및 生理學的 性質을 推究하여 장유는 細菌의 作用을 받음이 없이는 그 完全한 風味를 發揮하지 못한다고 밝혔다. 1926年 松本壽次(5, 6, 7, 8, 9)는 各地方의 釀造場의 모로미 중에서 다

음과 같은 細菌을 分離하여 生理學的 性質을 究明 推定하였다. *Bacillus mesentericus vulgatus* Flügge var., *Bacillus subtilis* Ehrenberg var., *Bacillus pumilus* (A. Mayer et Gotthel) var., *Granulobacter Saccharobutyricum* Beijerinck var., *Bacterium acetosum* Henneberg var., *Bacillus mesentericus propioni*, *Bacillus mesentericus fuscus* Flügge var., *Bacillus mesentericus ruber globig* var., *Bacillus mesentericus* (Henneberg) var., *Bacterium aciti Lactici soya* 등 12種의 菌은 好氣性菌이었고 *Granulobacter Saccharobutyricum* Beijerinck, *Saccharobacillus pastrianum* (van Laer), *Bacillus megatheroides* (Henneberg), *Bacillus panis* (vogel) 등 4種은 嫌氣性菌이었다. 따라서 耐熱性細菌 *Bacillus thermophilus aerobins oprescu*와 低溫發育細菌 각각 1種을 分離하여 報告하였다. 1933年 石丸(10)은 도로미 중에서 數百株의 細菌을 分離하여 그중 28株를 選擇하여 形態 및 生理學的 特性을 研究하고 이들 細菌에 의한 香味, 色 및 化學的 性分の 變化를 調査 研明해서 各菌의 特性을 明示하였고 나아가서 장유熟成時의 役割을 闡명한 바 있었다.

選擇된 28株의 菌은 다음과 같다.

*Bacillus vulgatus*, *Bacillus mesentericus fuscus*, *Bacillus mesentericus niger*, *Bacterium citrius A*, *Bacterium citrius B*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus nondiasticus-1*, *Bacillus nondiasticus-2*, *Bacillus alocligens*, *Bacillus megatheroides*, *myrococcus Soya liquefaciens*, *Myrococcus aurantiacus*, *Myrococcus flavus tardigradus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus Soya gasformans*, *Bacillus panis*, *Bacillus Soya nonliquefaciens*, *Bacillus delbreücki*, *Bacterium Soya. pediococcus acidi Lactici*, *pediococcus acidi lactici B*, *pediococcus albus*, *pediococcus albus B*, *Myrococcus acidi lactici*, *Myrocollus candicans* 등이다. 이와 같이 日本 等地에서는 매우 活發하게 研究하였으나 우리 나라에 있어서는 在來式 간장 뿐만이 아니라 改良式에 있어서도 그 研究報告가 드물었다.

**實驗材料 및 方法**

**材 料**

서울市, 慶北, 忠南地方의 一般民家에서 담은 간장을 試料로 7點을 採取하였다.

採取當時의 pH, 鹽度, Amino-N의 測定值를 綜合表示하면 Table I 과 같다.

**Table I**

Sample No.	Collective Places of Sample	pH	Salt %	Total amino-N mg/cl. oog
Q	Keung-Buk, Sun-san	5.8	27.42	257.0
R	Keung-Buk, Sun-san	6.4	26.47	237.0
S	Seoul, Roreang-jin	4.4	31.06	182.0
T	Seoul, Sinsul-dong	5.8	25.21	364.0
U	Seoul, Roreang-jin	5.4	28.10	451.5
X	Cheung-Num, Chean-an	6.2	33.25	284.9
Z	Keoun-Buk, Kimchen	6.8	26.71	175.0

**使用培地 및 分離方法**

Nutrient agar, yeast extract peptone glucose agar, Koji extract agar, (14, 15, 16, 17)를 使用하여 streak plate method와 pour plate method(13, 19, 20, 21)를 兼用해서 菌分離와 純粹分離를 각각 시도하였고, 分離된 菌들에 대하여는 形狀 크기 Gram染色性(12) 運動性(12) 孢子染色(12) 鞭毛(11) 形成能을 反復實驗하여 確認하였다.

**試 驗 方 法**

**固體培養**

Nutrient agar, yeast extract peptone glucose agar Koji extract agar, potato media 에서 斜面 및 穿刺培養하여 發育狀을 檢討하였다.

實驗 結果는 Table II 와 같다.

**液體培養**

上記 3 media, (pH 7.0), Litmus milk broth(pH 6.8); malt extract broth(pH 6.8, Bllg10.); peptone water(pH 7.0);

Soya-souce(5~10倍稀釋), Henneberg lactic acid Bacteria broth; Hennerberg acetic acid Bacteria broth, Litmus glucose broth;

등에서 生長 有無 및 被膜形式, 混濁 沈澱量 등의 狀態를 觀察하였다. 그 實驗結果는 Table III 와 같다.

**食鹽濃度에 對한 抵抗力**

Medium 2에 Sodium chloride를 각각 16%, 20%, 22%, 23%, 24%, 씩씩 첨가하여 分離한 各菌을 接種하여 溫度32°C에서 生長狀態를 比較 觀察하였다. 그 結果는 Table IV와 같다.

**溫度的 影響(13)**

Medium-2(pH 7.0)에서 24時間 培養(32°C) 한 菌體同量액을 白金耳로 接種하여 20°C, 28°C, 32°C, 45°C 50°C 등으로 調節한 incubator에 24~48時間 incubation시켜 比較觀察한 結果 發育 最適溫度, 即

28~35°C 사이에서 全菌이 잘 자람을 確認하였다. 그 實驗結果는 Table V와 같다.

**pH의 影響**

Media 2 에 IN의 鹽酸 및 苛性氫液을 添加하여 pH 5.0, 6.2, 7.0, 7.6, 8.2, 9.0, 으로 調節하여 여기에 各菌株을 同量씩 接種해서 31°C에서 繁殖狀態를 比較觀察하였다. 그 實驗結果는 Table V와 같다. 但 pH는 殺菌 후 無菌의으로 補正하였다.

**澱粉糖化作用(32, 24)**

無糖 peptone水에 0.2%의 可溶性澱粉을 添加하여 常法대로 試驗管에 分注하고 autoclaving 한 다음 各菌株을 同量接種해서 32°C에서 18時間 incubation한 後 沃度呈色反應을 實施하였다. 그 實驗結果는 Table VI과 같다.

**蛋白質分解作用(23, 24, 25, 26)**

pH를 7.0으로 調節한 20% Gelatin添加 固體培地를 溶解해서 試驗管에 分注滅菌後 固화시켜 30°C에서 穿刺培養하여 液化有無를 觀察하였다. 그 實驗結果는 Table VI과 같다.

**Catalase Test(23)**

Nutrient agar에 18時間 斜面培養한 菌體를 中試驗管에 3%의 過酸化水素水 3cc를 넣고 白金耳로 菌體를 따넣어서 잘 混合한 후 觀察하였다. 그 實驗結果는 Table VI 같다.

**硝酸鹽의 還元(23, 24, 25, 26)**

Nutrient agar에 0.1%의 硝酸加里를 添加한 培地에 細菌을 接種해서 32°C에서 5日間 培養한 後 Sulphoanilic acid- $\alpha$  naphthylamin method에 의한 p-Sulphobenzene-azo- $\alpha$  naphthylamine의 赤色有無를 觀察하였다. 그리고 Nessler's Reagent로 Ammonia 生

成有無를 檢討하였다. 그 實驗結果는 Table VI과 같다.

**Indol生産(24)**

Salkowski-北里의 方法에 의하여 Tryptophane이 含有한 peptone water에 各菌을 接種하여 22°C 48時間 培養 후 0.01%의 亞硝酸加里溶液 0.5ml을 加하고 濃硫酸 3~4滴을 加해서 混合하여 赤色 및 赤紫色有無를 보았다.

그 實驗結果는 Table VI과 같다.

**硫化水素(23, 24)**

醋酸鉛寒天에 (pH 6.5) 穿刺培養 (32°C)하여 黑變有無를 觀察하였다. 그 實驗結果는 Table VI과 같다.

**糖類로부터의 酸生産(21, 24, 25, 26)**

各種炭水化物的 醱酵能을 檢討하기 위하여 Barsikow medium에 2%의 糖과 0.2%의 B, T, B(1/當12ml 比率)를 適當量 添加하여 滅菌 후 各菌株을 接種하고 32°C로 調節한 incubator에서 1~2週間 培養하면서 繼續 觀察하였다. 그 實驗結果는 Table VI과 같다.

**結果 및 考察**

**培養의 特徵**

試料 7點에서 分離된 12菌株에 대하여 Medium-2에 의한 平面培養基上에서 form, surface, elevation, edge 등을 각각 檢索하고 Media 1, 2, 3에 의해서는 全菌株의 color 및 光澤을 調査하였다. 同時에 Malt agar (pH 5.0, Temp=32°C) 및 potato media (Temp.=32°C)에서도 하였다. 그리고 上記 培養基에서 斜面培養 및 穿刺培養을 하여 菌의 生長條件을 檢討하고 液體培養基와 간장 稀釋(5~10 dilution) 培地에서도 各菌株의 特性을 觀察하였다. 이를 綜合하면 Table II와 같다

Table II. Culturing, characteristics of isolates on the solide media

Strain No.	Colony and color on agar media								Growing on			Pigment P		
	Form	Surface	Elevation	Edge	NUA	KO. A	Y. P. G. A	Potato	A. S	ASI	Ma. A	KO. A	NU. A	Y. P. GA
Q-3-1	PunF	ROU	COX	Ent	Gr. W. N. Lt	Gr. W. K. Lt	Wte. N. Lt	B. G. W. N. Lt	+	+++	-	-	-	-
R-2	IRE	"	RAD	UDE	Wte. Lt	Wte. Lt	Wte. Y. Lt	Gr. W. Lt	+	++	-	-	-	-
S-1	"	"	"	IOE	D. Br. N. Lt	Wte. N. Lt	Br. N. Lt	Br. Y. N. Lt	+++	++++	+	DB. r	D Br	D Br
S-2	CiR	"	COX	Ent	Wte. N. Lt	"	Wte. N. Lt	Gr. W. N. Lt	++	++++	+	-	-	-
T-1	SPi	"	"	"	"	"	"	Gr. W. N. Lt	+	++++	-	-	-	-
T-2	Pun. F	Smo	"	"	Wte. Lt	Gr. Lt	Go. Y. Lt	No. Gth	+++	+++	-	-	-	-
U-2	IRE	"	RAD	UDE	Gr. W. Lt	"	Whe. Lt	Gr. W. K. Lt	+	+++	-	-	-	-
U-3	CiR	ROU	COX	Ent	"	"	Wte. K. Lt	"	++	+++	-	-	-	-
U-1	IRD	"	RAD	CUD	Go. W. Lt	Y. W. Lt	Wte. N. Lt	Wte. Y. Lt	+	++++	-	Y	-	-
X-1	Pun. F	"	COX	Ent	Gr. W. Lt	Wte. Lt	Whe. Lt	Gr. W. K. Lt	+	++++	-	-	-	-
Z-2	CiR	Smo	RAD	UDE	Wte. Lt	"	"	"	+++	++	+++	-	-	-
Z-5	"	"	COX	Ent	Go. W. Lt	Go. Y. Lt	Go. Y. Lt	Go. Y. K. Lt	+	+++	+	-	-	-

**Note:** PunF; Puncti-form, IRE: iregular, CIR; circular, Spi; spindle. Rou; rough. Smo; Smooth, CUD: curled, NUA; nutrient agar, KOA: Koji extract agar, Y.P.G.A; yeast extract peptone glucose agar Gr.W: gray white, N.Lt; No, light, whe; White, Lt;light, D.Br: dark brown, Y;yellow, Go.W; golden white, Kit: weak light, Gr; gray, Y.W: yellow white, Go.Y; golden yellow, Wte, Y; White yellow, Br;Brown, Bg.W;B rownish gray white, G.W; gray white, Br.y; Brownish yellow, Gth; growth, Ma.A; malt agar, product.P; product pigment, AS: agar stab, A.SI; agar slant.

**Table III.** Culturing characteristics of isolates on the liquide media.

Strain No.	C.T.	Nutrient broth	Yeast extract pepton glucose broth		Koji extract broth			HL. M.		HA. M.		PW	Dilute soybean souse				C.T.	MB
			f	u	se	f	u	se	f	u	se		f	u	se	U		
													5T	10T	5T	10T		
Q-3-1	24	++ + -	- + +	+ + +	+ + +	+ + +	+ + +	- + +	- + +	- + +	+	+++	++	+++	++	24	-	
	48	+++ + -	+++ (+)	+++	+++	+++	+++	- + +	- + +	- + +	+	+++	++	+++	++	48	-	
	72	+++ + -	- ++	+++	+++	+++	+++	+ + +	+ + +	+ + +	+	+++	++	+++	++	72	-	
																	96	-
R-1	24	- + -	- + +	- + +	- + +	- + +	- + +	- + +	- + +	- + +	+	++	+	+	+	24	-	
	48	+ + -	(+) +++	+++	+++	+++	+++	- + +	- + +	- + +	+	++	+	+	+	48	+	
	72	+ + -	(-) +++	+++	+++	+++	+++	- + +	- + +	- + +	+	++	+	+	+	72	++	
																	96	++
S-1	24	++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+ + -	+ + -	+ + -	++	++	++	+	+	24	-	
	48	++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+ + -	+ + -	+ + -	++	++	++	+	+	48	+	
	72	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+++ - -	+ + -	+ + -	+ + -	++	++	++	+	+	72	++	
																	96	++
S-2	24	+ - -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+ + -	+ + -	+ + -	+++	++	+++	++	+++	24	-	
	48	++ - -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+ + -	+ + -	+ + -	+++	++	+++	++	+++	48	+	
	72	+++ - -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+ + -	+ + -	+ + -	+++	++	+++	++	+++	72	+	
																	92	++
T-1	24	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+ + -	+ + -	+ + -	+	+++	+++	+++	++	24	-	
	48	+ + -	+ (+)	+++	+++	+++	+++	+ + -	+ + -	+ + -	+	+++	+++	+++	++	48	-	
	72	++ + -	++ + -	+++	+++	+++	+++	+ + -	+ + -	+ + -	+	+++	+++	+++	++	72	-	
																	92	-
T-2	24	± + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+	+	+	+	+	24	-	
	48	± + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+	+	+	+	+	48	-	
	72	± + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+	+	+	+	+	72	-	
																	92	-
U-2	24	- - -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+ + -	+ + -	+ + -	+	++	+	++	++	24	-	
	48	+++ - -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+ + -	+ + -	+ + -	+	++	+	++	++	48	-	
	72	+++ - -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+ + -	+ + -	+ + -	+	++	+	++	++	72	-	
																	92	-
U-3	24	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	± + -	± + -	± + -	+	+	++	++	++	24	-	
	48	++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	± + -	± + -	± + -	+	+	++	++	++	48	-	
	72	++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	± + -	± + -	± + -	+	+	++	++	++	72	-	
																	96	-
U-1	24	- ++ +	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+ + -	+ + -	+ + -	+	+	++	+	+	24	-	
	48	++ ++ -	(+) +++	+++	+++	+++	+++	+ + -	+ + -	+ + -	+	+	++	+	+	48	-	
	72	++ ++ -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+ + -	+ + -	+ + -	+	+	++	+	+	72	-	
																	96	-
X-1	24	- - -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	± + -	± + -	± + -	+	++	++	+++	+++	24	-	
	48	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	± + -	± + -	± + -	+	++	++	+++	+++	48	-	
	72	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	+++ ++ -	± + -	± + -	± + -	+	++	++	+++	+++	72	-	
																	96	-
Z-2	24	- ++ +	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+	+	+	+	+	24	++	
	48	± +++ +	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+	+	+	+	+	48	++	
	72	± +++ +	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+++ + -	+	+	+	+	+	72	+++	
																	96	++++
Z-5	24	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+	+	+	++	++	24	-	
	48	- + +	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+	+	+	++	++	48	-	
	72	- + +	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	- + -	+	+	+	++	++	72	-	
																	96	-

**Note:**C. T; cultural time, f;film, Cl; cloudy, Se;Sediment. HLM; Henneberg lactic acid Bacteria media(pH 6.8), HAM; Henneberg acetic acid Bacteria media (pH 6.3), PW; pepton water, MB; Malt extract Broth (pH 5.7)

形態學의 特徵

分離한 全菌株를 Nutrient agar에 培養한 후 Spore의 有無(24時間培養) Gram性, Flagella의 有無(18時間培養) 染色性을 調査한 結果 大部分이 桿菌이었으

며 그의 兩端은 둥글었다. 그런데 그중 2菌株만이 球菌이며 通性嫌氣性이었다. 全菌株의 形態性을 살펴 보면 다음과 같다.

Table IV. Morphological characteristics of isolates

Strain No.	Size of bacteria	Form	Motility	Gram	Spore	Flagella
Q-3-1	0.38~0.5 × 1.2~5.4μ	Bacillus	-	+	+	-
R-2	0.38~0.44 × 1.2~2.3μ	"	+	+	+	+
S-1	0.38~0.5 × 1.3~2.3μ	"	+	+	+	+
S-2	0.38~0.5 × 8.1~2.3μ	"	-	+	+	-
T-1	0.38~0.5 × 1.5~2.3μ	"	-	+	+	-
T-2	0.25~0.37μ	Coccus	-	+	-	-
U-2	0.38~1.2 × 2.1μ	Bacillus	+	+	+	+
U-3	0.38 × 1.2~2.1μ	"	+	+	+	+
U-1	0.38 × 1.2~2.8μ	"	+	+	-	-
X-1	0.25 × 1.2~2.4μ	"	+	+	-	+
Z-2	0.25 × 0.4μ	Coccus	-	+	-	-
Z-5	0.3 × 1.2μ	Bacillus	-	-	-	-

各溫度, 鹽度, pH에 있어서의 發育條件

각 菌株에 대한 發育至適條件의 特徵은 Table V와 같다.

Table V. Developmental conditions of isolates

Strain No.	Growing on each Salt concentration					Growing on each pH.						R. Tem OT
	15%	20%	22%	23%	24%	5.0	6.0	7.0	7.6	8.2	9.0	
Q-3-1	+	+	-	-	-	++	+++	+++	+++	++	++	28-32°C
R-2	+	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	"
S-1	+	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	++	"
S-2	+	-	-	-	-	++++	++++	+++	+++	++	-	"
T-1	+	-	-	-	-	+++	+++	++++	+++	++	+	30-35°C
T-2	+	+	+	+	+	++++	++++	+++	++	++	+	"
U-2	+	-	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	++	"
U-2	+	-	-	-	-	++	+++	+++	++++	++	+	"
U-1	+	-	-	-	-	+++	+++	++++	+++	+++	+++	"
X-1	+	-	-	-	-	++	+++	++++	+++	+++	++	"
Z-2	+	-	-	-	-	++++	+++	++	+	++	-	"
Z-5	+	+	+	+	+	+	++++	+++	+++	+++	++	"

Note: R. Tem; Relation of temperature, OT; Optimum temperature

分離 菌株에 대한 發育至適條件 試驗結果 15%의 鹽度含有培地에서는 全菌株에 大部分인 9 菌株가 (Q3~1, S-2, Z-2 除外) 48時間內에 發育하였으며 나머지 3菌株 即 Q-3-1은 72時間만에, S-2는 5일만에 각각 發育하였고 그러나, Z-2만은 15%에서 3일 후에 겨우 發育하다가 그 이상은 發育치 못하고 정지하였다. 反面에 특히 T-2와 Z-5 이 두 菌株는 24%의 높은

鹽度에서도 잘 자랐다. pH에 있어서는 alkali 側에서 보다 酸性側에서 比較的菌의 發育狀態가 좋았다.

溫度에 있어서는 28~35°C 사이에서 다른 溫度에 서보다 全菌株가 잘 자랐다.

生理學의 特徵

各菌株의 生理學的 實驗結果를 綜合하면 Table VI와 같다.

Table VI. Physiological characteristics of isolates

Strain No.	growig on				test of				production of					
	STL	LM	Gel	LGB	VP	MP	NO <sub>2</sub>	C	Ind	H <sub>2</sub> S	NH <sub>3</sub>	acid from glucose	Gas	
Q-3-1	+	P	SL	SR	=	-	-	+	-	-	+	-	-	
R-2	-	P	SL	SR	+	-	-	++	-	-	+	-	-	
S-1	+	P	SL	RD	-	-	++	+++	-	-	+	+	-	
S-2	+	P	S	RD	-	-	+	+++	-	-	++	+	+	
T-1	+	P	SL	SR	++	-	++	++	-	-	+	+	+	
T-2	-	NP	C	AR	+	++	-	(-)	-	-	-	+++	-	
U-2	+	P	SL	AR	++	-	+++	+	-	-	++	++	+	
U-3	+	P	CL	SR	+	+	+++	+	-	-	++	-	+	
U-1	+	P	CL	RD	++	-	+++	+	-	-	++	++	+	
X-1	+	P	CL	RD	±	+	+++	+	-	-	++	++	+	
Z-2	-	CD	C	RD	+	±	±	-	-	-	-	+++	+	
Z-5	-	NP	C	SR	-	-	-	+++	-	-	+	+	+	

Note: StL; Liquefaction of starch LM; Litmus Milk, P; peptonized, NP; No peptonized, cd; curdled, Gel; Liquefaction of gelatin, S; statiform, C; crateri form, CL; Liquefaction of crateriform, LGB; Liomus glucose broth, SR; Surface red, Rd; Reduced, AR; all red, VP; poges proskauer, MR; Methyl red, No 2; Nitrite from nitrate. C; catalase, Ind; indol. +; Positive, -Negative.

炭水化物類로부터의 酸生成

각 菌株의 炭水化物 醱酵實驗 結果는 Table VII과 같다.

Table VII. Acid producibility from carborhydrates the isolates

strain No.	A	X	F	Ma	Ga	S	L	Me	ML	Gl	Rh	R	De	St	In	Sa
Q-3-1	+	-	±	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-
R-2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
S-1	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
S-2	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
T-1	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
T-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
U-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
U-3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	±	+
U-1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
X-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	±	+
Z-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Z-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: A; arabinose, X; xylose, F; fructose, Ma; mannose Ga; galactose, S; sucrose, L; Lactose, Me; Maltose, ML; mannitol GL; glycelol, Rh; Rhamnose, R; Raffinose De; dextrin, St; starch, In; inulin, Sa; Salicin,

以上 각 菌株에 대한 形態 및 生理學的 實驗結果를 基本으로 標徵 및 類緣關係를 Bergy manual 및 石丸에 依據하여 推定(27)하면 다음과 같다.

R-2는 Gram positive 桿菌으로서 motile 및 spore 形成能이 있었다. spore는 菌體의 中央部位에 있어서 Swollen type가 아니었다.

starch의 液化能과 Nitrite 反應 등이 Negative이며 Lactose 醱酵도 Negative였다. 또한 그 外形態 및 生理學的 實驗結果가 *Bacillus pumillus*와 一致함이 많았

다. 그러나 R-2는 Potato media에서 Color가 Grayish-white에 가까웠고 鹽度에 있어서는 15%까지 發育能이 좋다. 以上으로 미루어 보건대 *Bacillus pumillus*와 相近 類似하였다.

S-1는 形態 및 生理學的 實驗의 結果가 *Bacillus subtilis* var. *aterimus*와 符合하는 點이 많았다. 그러나 크기 및 鹽度에 있어 多少差異를 나타냈었다. 특히 S-1은 利用할 수 있는 炭水化物 含有地에서 黑色色素을 生産하는 것이 上記 species와 같았다. 그

러나 이 Species는 Bergy Manual에 明示된 바에 의하면 10~12%의 鹽度에까지 生長한다고 하였다. 그러나 反面에 S-1은 15%의 鹽度까지도 生長을 잘 하였다.

以上 S-1은 上記 species와 生理學的 實驗과 形態學的 實驗에 多小 一致되지 않은 點은 있으나 이 Species에 屬하는 Strain인 것 같다.

S-2는 Gelatin 液化力이 없었고, V.P와 M.R 反應이 Negative現象을 나타냈다. 糖酸酵에 있어서는 arabinose와 xylose를 醱酵 못하였다. 以上の 것 등을 除外하면 Bergy manual의 *Bacillus licheriformis* var. 와 實驗値가 거의 符合하였고 石丸가 分離한 菌과는 *Bacillus panis*와 實驗結果가 S-2는 가까웠다. 그리고 *Bacillus licheriformis* var., 는 鹽度5-8% 까지는 잘 자란다고 Bergy manual에 明示된데 反하여 S-2는 15% 까지 잘 자랐으며 nonmotile 이었다. 以上の 點으로 미루어 볼 때 多小의 差異가 確然하므로 *Bacillus licheriformis* var와는 좀 다른 variety가 아닌가 한다.

T-1은 Gram positive bacillus이며 Spore를 形成하였고 Gelatin 液化能이 있었다. 그러나 motile는 negative 現象을 나타냈다. 그리고 生理學的 特性 등에 있어서는 *Bacillus subtilis*와 一致하였다. 以上 諸形態 및 生理學的 實驗結果를 綜合하여 미루어 보건대 T-1은 多小 다른 點은 있으나 大體의으로 이 Species와 類似하였다. 특히 T-1은 15%의 鹽度에서 生長能이 좋았다.

T-2는 크기에 있어 Bergy manual에 記載된 *Sarcina maxima*와 多小 差異를 나타냈으나 그의 形態 및 生理學的 實驗에 있어서는 거의 이 species와 符合하였다. 특히 Litmus milk를 凝固 못하는 點은 一致하였다. 그러나 筆者가 分離한 Strain, T-2는 上記 Species와는 다른 鹽度 즉 24%의 높은 鹽度 含有培地에서도 잘 자랐다. 이것 등으로 미루어 볼 때 本菌은 *Sarcina maxima*와 좀 다른 Variety인 것 같다.

U-2, U-3, X-1 이 3 Strain中 X-1의 Spore 形成有無가 疑問視 될 뿐이고 그의 形態 및 生理學的 實

驗 등에 있어서는 모두 *Bacillus lichesiformis*와 一致되는 점이 많았다. 그러나 이것들은 각각 同一한 Strain인 것 같이는 않은 것 같다.

Z-2는 Litmus milk를 凝固하였으며 V.P 反應이 Positive이었다. 反面에 Gelatin 液化와 Catalase 反應은 Negative 現象을 나타냈다.

그리고 크기에 있어서는 *Pediococcus acid lactici*와 고 糖酸多小 差異를 나타냈으나 生理學的 實驗結果는 一致되는 점이 많았다.

以上の 諸實驗結果를 綜合해서 미루어 볼 때 上記 species와 類似하였다.

Z-5는 石丸가 分離報告한 *Bacillus citreus* var., *SoyaB* 와 形態 및 生理學的 實驗結果가 그이 符合하였는데 反하여 Z-5는 24%의 高鹽度에서 잘 자랐다. 그리고 이 strain은 간장 稀釋培養基에 接種培養했을 때 不快한 臭氣를 甚히 發散하였다. 以上の 諸實驗結果를 미루어 推定컨대 上記 Species에 屬하는 菌種인 것 같으나 좀 다른 菌인 것 같고 韓國在來式 간장의 腐敗菌이 아닌가 한다.

即 *Bacillus citreus* var., *soyaB*는 20%의 鹽度까지 자라는데 反하여 Z-5는 24%의 高鹽度에서 잘 자랐다. 그리고 이 strain은 간장 稀釋培養基에 接種培養했을 때 不快한 臭氣를 甚히 發散하였다. 以上の 諸實驗結果를 미루어 推定컨대 上記 Species에 屬하는 菌種인 것 같으나 좀 다른 菌인 것 같고 韓國在來式 간장의 腐敗菌이 아닌가 한다.

Q-3-1, U-1는 同定中 變異現象이 너무 激甚하므로 各種 實驗結果가 正確치 않은 感이 들어 Species까지의 推定結果를 割愛키로 하였다.

以上으로서 改良간장 중에서 松本와 石丸등 그의 많은 研究者들이 分離報告한 장유醱酵에 關與하는 細菌들과 그 外類似菌들을 우리 나라 在來式간장에서 分離하였고, 그렇지 않은 즉 보다 높은 鹽度에서 자라는 菌도 分離하였다. 그런데 그중 T-2와 Z-5 이 두 菌株는 24% 以上の 鹽度에서도 生長이 可能함을 發見하였다.

그러나 Gelatin 液化力은 없었고 反面에 Catalase activity는 相當히 活의이었다. 또 Z-5를 各種 液體培地와 특히 간장 稀釋液에 接種하여 Incubation 후에는 臭氣가 相當히 甚하였다.

## 總 括

1. 在來法에 準하여 담근 간장에서 好氣性細菌 10株와 通性嫌氣性 細菌 2株를 分離하여 그의 形態 및 生理學的 特性을 究明한 結果 다음과 같은 菌으로 同定 하였다. *Bacillus pumillus* R-2; *sacillus sustilis* var., *aterimus* S-1; *Bacillus licherifomis* var S-2; *Bacillus subtilis* T-1; *Sarcina maxima* T-2; *Pediococcus acid lactici* Z-2; *Bacillus citreus* var *SoyaB* Z-5.
2. 分離同定한 菌株 中 *Sarcina maxima* T-2와 *Bacillus citreus* var *SoyaB*-Z-5, 는 24%의 높은 鹽度에서 發育이 良好한 菌임을 發見하였다. 그러나 Z-5는 T-2보다 높은 鹽度含有 培養基에서 生長이 좋은 反面에 惡

臭을 심히 發散하는 菌이었다.

3. *Bacillus subtilis* var. *aterimus* S-1은 發化 할 수 있는 糖含有 培養基에서와 그리고 간장 固體培養基 및 液體培養基에서 顯褐色 生産性 菌株였다.

### 文 獻

1. 西村榮十郎; 農科大學 學術報告, 1897, 第3卷, 第4號.
2. 高橋楠吉; 東京化學會誌, 1898, 19帖, 8冊.
3. 齊藤堅道; 醱酵菌報告, 1905, 第1回.
4. 梅野寅二郎; 農學會報 1910, 90號.
5. 松本憲次; 日本釀造協會雜誌., 1926, 第21卷 第10號.
6. " 日本釀造協會雜誌., 1928. 第22. 第2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10號.
7. " 日本釀造協會雜誌., 1928. 第23. 第1. 5. 6. 7. 8. 9. 10號.
8. " 日本釀造協會雜誌., 1929. 第24. 第1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12號.
9. " 釀造試驗所報告., 1926. 99號, 104號, 109號.
10. 百丸義夫; 日本農藝化學會誌., 1928. 第9卷, 859~304, 953~1004, 1143~1183.
11. Gray, P. H. H.; J. Bacterio, 1926. 12, 273~274.
12. BURKE, VICTOR; J. Bacterio, 1922. 7. 159~182.
13. WEISER, R. S., and C. M. OSTEROUO; J. Bacterio, 1945. 50. 413~439.
14. BREWER, J. H.; Science, 95, 387. 1972.
15. BACLIMANN, BARBARA, and R. H. WEAV-ER; J. Bacterio, 1947. 54, 28.
16. BARTHOLOMEW, J. W. and W. W. UMBEIT; J. Bacterio, 1944. 48, 567~578.
17. CLARKE, P. H., and COWAN; J. Gen. Microbiol, 1953. 8, 397~407.
18. FELLERS, C. R., and R. W. CLOUGH; J. Bacterio, 1923. 10. 105~133.
19. FABRIZIO, ANGELINA, and R. H. WEAVER; J. Bacterio. 1947. 54, 69.
20. TITSLER, R. P., and L. A. SANDHOLZER; J. Bacterio, 1936. 31, 575~589.
21. GUNSALUS, I. C., B. L. HORECKER, and W. A. WOOL; Bacteriol. Revs., 1955. 19, 79~128.
22. KOSER, S. A., and R. H. GALT; J. Bacterio, 1926. 11, 293~303.
23. 傳染病研究所學友編; 細菌實習提要 1953. 137~169.
24. SOCIETY of AMERICAN BACTERIOLOGISTS, M. J. PELCZAR, F. A. WEISS; Manual of microbiological methods, 1957. 37~197.
25. 金浩植·黃圭贊; 科연휘보, 1959. 4. 56.
26. 黃圭贊·鄭允秀·金浩植; 科연휘보, 1960. 5. 51.
27. BREE, R. S., MURRAY, E. G. D. and SMITH N. R.; Bergys manual of determinative Bacteriology (7th ed.) Williams, and Wilkins. Co., Baltimore, Md., 1957.