

간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구(제 3 보)

— 고농도 식염내성 효모의 분리동정 —

*이택수·이석건

(*샘표장유양조장 연구실·충남대학교 농과대학)

Studies on the Yeasts for the Brewing of Soy Sauce(3)

Isolation and Identification of Osmophilic Yeasts for Higher Concentration of NaCl

*Taik Soo Lee · Suk Kun Lee.

*Laboratory of Saimpyo Soy Sauce Brewery,
College of Agriculture, Choong Nam University
(Received July 7, 1970)

SUMMARY

This experiment was carried out to isolate osmophilic yeasts for higher concentration of NaCl than 20 per cent may affect greatly the fermentation of soy sauce. 6 strains of yeasts were selected from the soy sauce mashes at the fermentating periods and identified observing their morphological characteristics.

Their salt-resistance and effects upon the flavor of soy sauce were examined. The results obtained were as follows:

- (1) The strain T₃, T₅, and T₁₁, T₈, T₉, and T₁₀, selected were identified *Saccharomyces cerevisiae* group II, *Debaryomyces nicotianae*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces rouzii* and *Saccharomyces rosei*, respectively.
- (2) They were more salt-resistant on the liquid media than on the solid media in the case of cultures on the media containing more than 26 per cent of NaCl.
- (3) They were grown on the media containing 5-23 per cent of NaCl better than containing none of NaCl.
- (4) The strain T₃, T₈, T₉, and T₁₀ were grown on the media containing up to 28 per cent of NaCl, and T₅ and T₁₁ up to 32 per cent of NaCl in the case of liquid cultures.
- (5) Among them, the strain T₉ showed the best alcohol fermentation ability and the best fermentative flavor, and T₅, and T₁₁ formed moldy smell and pellicle.

서론

전보에서 저자등⁽¹⁾⁽²⁾은 간장국 및 간장덧중에 생육하는 효모를 계수 및 분리동정 한바 있다. 간장효모는 소위 "Osmophilic yeast"로서 Beer, Wine, 탁주 등의 양조효모와 구별되고 있는 것이다. 즉 간장

덧은 식염농도와 질소함량이 높으므로 어느정도 삼투압에 견딜수 있는 효모만 발육할수 있으며 기타의 일반효모들은 어느기간동안 생존하다가 도태되고 마는 것이다. 전보에서 저자등이 보고한바와 같이 간장국 및 간장덧에 생육하는 효모들중 대부분은 식염농도 18%에서 거의 억제되거나 겨우 생

존하는 정도였으며 20%이상의 식염농도하에서 생육하는 효모는 극소수에 불과하였다. 그런데 간장덧의 발효를 효율적으로 진행시키려면 고농도식염하에서 잘생육 하면서 Alcohol 발효를 하여 우수한 향기를 생성할수있는 특수성을 갖지 않으면 안된다. 간장의 내염성 효모에 관한 연구로는 佐藤等⁽⁶⁾, ⁽⁴⁾, ⁽⁵⁾의 간장효모의 내염성에 관계하는 영양인자 및 저해제의 영향에 대한 보고와 大西⁽⁶⁾의 *Saccharomyces rouzii*의 발육에 대한 고농도의 식염 및 질소영양 그리고 18% 식염배지에서 pH의 영향등에 대한 연구보고를 볼수있다. 佐佐木等⁽⁷⁾은 북해도내의 간장덧으로부터 분리한 효모의 내염성에 대하여 보고 하였으며 宋等⁽⁸⁾은 설탕간장덧과 산막부패한 간장으로 부터 분리한 3주의 산막효모에 대하여 보고한바있고 Mogi등⁽⁹⁾은 간장덧은 된장으로 부터 분리한 *Saccharomyces rouzii*에 대하여 연구보고 한바있다. 그런데 기왕에 보고된 내염성효모는 대개 식염농도 18~25%에서 생육하는 효모들이었으며 고농도 식염내성 효모에 관한 연구는 살펴볼수없다. 저자들은 분리배지로서 20%의 식염함유 한천배지를 사용하여 간장덧으로부터 고농도식염내성 효모의 분리를 시도한 결과 28~32%의 식염농도 하에서도 생육하는 효모를 얻었으므로 이들의 균학적성질을 살펴 동정하였으며 관능적으로 발효생성물의 풍미를 조사하여 그결과를 보고 하는 바이다.

실 험

1. 시료간장덧

전보⁽²⁾의 방법으로 담금하여 3개월 및 6개월 숙

성시킨 설탕간장덧을 시료로 하였다.

2. 효모의 분리

전보⁽²⁾와 동일한 배지에다 식염농도만 20%로 하여 20주의 효모를 분리하였다.

3. 분리균주의 선정

상기의 방법으로 분리된 20주의 효모들을 26% 식염함유 맥아즙배지에 접종하여 잘생육하는 효모 6주만을 선정하여 실험에 사용하였다.

4. 선정효모의 동정

선정된 효모들을 일반법에 따라 실험하고 Lodder等⁽¹⁰⁾의 방법에 의하여 동정하였다.

5. 내염성시험

맥아 및 맥아한천배지에 식염을 0, 5, 10, 15, 20, 23, 26, 28, 30, 32% 첨가하여 선정균주를 접종하여 1주내지~1개월간 배양하면서 관찰하였다.

6. 풍미시험

Hayduck 氏액과 *간장배지를 사용하여 선정균주를 접종후 각각 25°C로 5일간 배양하여 관능적으로 검사 하였다.

* Soy sauce medium(%)

glucose 5, Yeast ex. 0.5, Soy sauce 40.0, Bacto beef 0.5, KH₂ PO₄ 0.5, H₂O 100

결과 및 고찰

1. 선정된 효모의 균학적 성질 및 동정

선정된 6주의 효모에 대하여 균학적 제성질을 실험한 결과는 Table 1, 2, 3과 같다.

선정된 효모들의 배양상의 특징을 살펴보면 T₃와 T₉의 균주는 맥아즙의 액체배양이나 고체배양에 있어서 발육속도가 빨랐고 특히 맥즙 액체배양

Table 1. Morphological characteristics.

Items	Cells		Ascospore formation			Pseudo-mycelium	Vegetative reproduction
	Form	Size	Form	Size	Number per ascus		
T ₃	round	(2.25~3.0) μ	round	(1.75~1.5) μ	1	-	multilateral budding
T ₅	round or ellipsoidal	(3.0~6.0) μ (4.5×6.0)~ (3.0×4.5) μ	round	(1.5) μ	1	-	multilateral budding
T ₈	round	(2.25~3.0) μ	round	(1.5) μ	1	+	multilateral budding
T ₉	round	(3.0~6.0) μ	round	(1.5) μ	1-4 mostly 1	-	multilateral budding
T ₁₀	round or oval	(3.0~4.5) μ (3.0×3.75)~ (4.5×6.0) μ	round	(1.5) μ	1	-	multilateral budding
T ₁₁	round	(3.0~6.0) μ	round	(1.5) μ	1	-	multilateral budding

Table 2. Cultural characteristics.

Items Strains	Malt extract culture			Malt agar slant			Malt agar plate					
	Pellicle	Ring	Sediment	Color	Elevation	Surface	Form	Edge	Elevation	Surface	Color	Size
T ₃		##	##	thin cream	raised	smooth	round	entire	flat	dry smooth	thin cream	4~5mm
T ₅	Wr##		##	white	raised	dull	irregular	undulate	capitate	dry dull	white	7~8mm
T ₈		##	##	thin cream	raised	smooth	round	entire	raised	dry smooth	thin cream	4~5mm
T ₉		##	##	thin cream	raised	smooth	round	entire	raised	dry smooth	thin cream	6~7mm
T ₁₀		##	##	thin cream	raised	smooth	round	entire	flat	dry smooth	cream	5~6mm
T ₁₁	Wr##		##	white	raised	dull	round	undulate	capitate	dry dull	white	6~7mm

* Wr: wrinkled pellicle

Table 3. Physiological characteristics.

Items Strains	Sugar fermentation					Sugar assimilation					Ethanol utilization	KNO ₃ assimilation	Concentrated sugar medium (60%)	Splitting of arbutin
	GL	Ga	Su	Ma	La	GL	Ga	Su	Ma	La				
T ₃	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	±	-	+	-
T ₅	+	±	±	±	-	+	+	+	+	+	±	-	+	+
T ₈	+	+	+	-	-	+	+	+	±	-	-	-	+	-
T ₉	+	-	-	+	-	+	+	±	+	-	-	-	+	-
T ₁₀	+	-	+	-	-	+	±	+	±	-	±	-	+	-
T ₁₁	+	±	±	±	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+

* GL=glucose, Ga: galactose, Su: sucrose, Ma: maltose, La: lactose

에 있어서는 왕성한 Alcohol 발효작용을 하였다. 또한 T₅와 T₁₁은 맥즙 액체배양에서 Wrinkled creeping pellicle의 형성이 현저하고 Alcohol 발효 및 생육속도가 빠른 반면에 T₈과 T₁₀의 균주는 발효속도가 완만하였다.

이상의 균학적 제성질에 대한 실험결과를 Loder等⁽¹⁰⁾의 동정법에 의하여 동정한 결과 T₃의 균주는 *Saccharomyces cerevisiae* group II형에 유사하였고 T₅와 T₁₁의 균주는 *Debaryomyces nicotiana*형, T₈의 균주는 *Saccharomyces chevalieri*

Table 4. Growth condition of the selected 6 strains in malt extract and malt agar media of various NaCl concentration.

Cultures Strains	0		5		10		15		20		23		26		28		30		32	
	ME	MA	ME	MA	ME	MA	ME	MA	ME	MA	ME	MA	ME	MA	ME	MA	ME	MA	ME	MA
T ₃	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
T ₅	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
T ₈	##	+	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
T ₉	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
T ₁₀	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
T ₁₁	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
S.R.	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	+	##	+	##	##	##	##	##	##	##

* ME: malt extract culture, MA: malt agar slant, ##: good growth, #: growth, +: scanty growth, -: restrain S.R: *Saccharomyces rouzii* of Sendai (Japan)

형, T₉의 균주는 *Saccharomyces rouxii* 형, T₁₀의 균주는 *Saccharomyces rosei*로 각각 동정되었다.

2. 내염성

선정된 6주의 효모를 각식염농도의 Malt extract 및 Malt agar slant에 배양하여 내염성을 실험한 결과는 Table 4와 같다.

내염성효모로 선정된 6주의 분리효모는 모두 28%식염 함유 맥아즙 또 맥아즙 한천배지에서 생육하였으며 특히 T₅와 T₁₁의 균주는 32% 식염 함유 맥아즙에서도 생육하였다. 이들 효모는 일반적으로 무염배지에서는 생육이 다소 억제되었으며 5~23%의 식염첨가 배지에서는 생육이 왕성하였다. 한편 일본 SENDAI Misso 공장의 *Saccharomyces rouxii*는 무염배지에서도 잘 자랐으나 26%의 식염 함유 맥아즙배양에 있어서는 생육이 거의 억제되었다. 고농도의 식염배지에 있어서는 식염농도가 동일해도 액체배지에서 보다 고체배지에서 균의 생육을 더욱 저해 하였다. 일본 SENDAI Misso 공장에서 분양받은 *Saccharomyces rouxii*는 이와 반대였다.

佐佐木等⁽⁷⁾은 일본 북해도내 간장덧으로부터 분리한 효모중 20%식염 함유 Glucose potato agar 배지에서도 잘 생육하는 효모는 *Saccharomyces rouxii*를 비롯하여 *Torulopsis versatilis*, *Torulopsis etchellsii*, *Torulopsis famata*, *Debaryomyces halotolerans nov. sp* 등이라고 보고 하였으며 大西⁽⁸⁾는 일본 野田地方의 각장유공장 및 균주보존기관으로부터 수집된 효모를 18% 식염 함유 곡즙배지에 배양하여 내염성을 실험한 결과 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces acidifaciens*, *Torulopsis halophil-*

us, *Torulopsis nodaiensis*, *Torulopsis sake*, *Pichia farinosa* 등의 효모는 잘 생육하는 반면에 *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Trichosporon cutaneum* 등은 내염성이 약한 효모라고 보고 하였다.

한편 宋等⁽⁹⁾은 생표간장덧 및 산막부패한 간장으로 부터 분리한 3주의 산막효모를 각각 *Hansenula anomala*, *Zygosaccharomyces pichia* 및 *Zygosaccharomyces group*으로 동정하고 이들의 내염성을 실험한 결과 20%의 NaCl 함유 Yeast extract 배지와 26%의 식염 함유 간장배지에 접종후 20일만에 산막을 생성하였으며 식염농도 26%이상에서는 효모가 발육하지 못한다고 보고하였다.

이상의 실험결과들을 살펴볼때 저자등이 발효기의 생표간장덧 으로부터 분리한 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces cerevisiae group II*, *Debaryomyces nicotianae* 등은 28~30% 식염 함유 Malt extract, Malt agar slant 및 Yeast extract 등의 배지에서 모두 생육하는 고농도 식염내성 효모임을 알수있다. 분리선정 균주중 가장 우수균주인 T₉은 26% 식염 함유 액체배지 중에서도 Alcohol 발효작용이 왕성하고 오래동안 계속됨을 볼수 있었으나 SENDAI Misso 공장의 *Saccharomyces rouxii*는 18% 식염 함유 액체배지 중에서 Alcohol 발효작용이 억제되었다.

3. 풍미시험

선정된 효모들을 Hayduck 씨액과 간장배지에 배양하여 발효생성물의 풍미에 대한 시험을 한 결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Fermentative flavour and taste test by selected strains in Hayduck and Soy Sauce media.

Strains	Sources	Flavour	Taste	Note
T ₃	3month—mash	sweet	good	high alcoholic fermentation
T ₅	6month—mash	moldy smell	bad	wrinkled pellicle formation
T ₈	6month—mash	light sweet	good	
T ₉	6month—mash	alcoholic, sweet	superior	high alcoholic fermentation
T ₁₀	3month—mash	light sweet	good	
T ₁₁	3month—mash	moldy smell	bad	wrinkled pellicle formation
S.R	Sendai(Japan)	sweet	good	

발효생성물의 풍미에 있어서는 고농도 식염배지 중에서 Alcohol 발효력이 강한 T₉의 균주가 가장 우수하였고 T₅, T₁₁의 균주는 가장 불량하였으며 T₃, T₈, T₁₀, S.R의 균주는 비교적 우량한 편이

였다.

즉 *Saccharomyces rouxii* 형인 T₉은 간장발효에 있어서 가장 유용한 균주로서 이러한 균주의 이용에 관한 연구가 더욱 시급한 반면에 유용균주의

생육을 억제하고 산막과 부패취를 생성하는 고농도식염내성 유효효모의 생육을 억제하기 위한 연구가 또한 필요한 것이다.

요 약

간장의 발효에 지대한 영향을 미칠수 있는 고농도 식염내성 효모의 분리를 시도 했던바 발효기의 선택장간덧 으로부터 6주의 효모를 분리선정하고 이들의 균학적성질을 살펴 동정함과 동시에 내염성 및 간장의 풍미에 미치는 영향에 대하여 실험한 결과는 다음과 같다.

(1) 고농도식염내성효모로 선정된 6주의 효모중 T₃ 균주는 *Saccharomyces cerevisiae group II* 형, T₅와 T₁₁ 은 *Debaryomyces nicotianae* 형, T₈ 은 *Saccharomyces chevalieri* 형, T₉ 은 *Saccharomyces rouzii* 형, T₁₀ 은 *Saccharomyces rosei* 형으로 각각 동정되었다.

(2) 고농도의 식염함유 배지의 경우 고체배지에서보다 액체배지에서 이들 효모의 내염성이 더욱 높았다.

(3) 선정된 균주 모두가 무염배지에서 보다 5~23%의 식염함유 배지에서 잘생육하는 효염성의 효모들이었다.

(4) T₃, T₈, T₉, T₁₀ 등의 균주는 배지의 식염농도 28%까지 생육하였으며 T₅와 T₁₁ 은 32% 까지 생육하였다.

(5) 이들중 T₉의 균주가 Alcohol 발효력이 가장 강했으며 발효생성물의 풍미도 가장 우수하였다.

또한 T₅와 T₁₁ 은 Mold 취를 생성하며 산막을 형성하는 유효효모였다.

끝으로 본실험을 하는동안 시중 격려와 후원을 하여주신 선포장유양조장 박규희 사장님과 김정규 박승재 상무님께 심심한 사의를 표하는 바입니다.

參 考 文 獻

- 1) 李澤守, 李錫健: 韓國農化誌, 13, 97(1970)
- 2) 李澤守, 李錫健, 辛寶圭: 韓國農化誌, 13, 171(1970)
- 3) 佐藤正弘, 山田一彌, 植村定治郎: 日農化誌, 31, 492, 497 (1956)
- 4) 佐藤正弘, 植村定治郎: 日農化誌, 31, 675 (1957)
- 5) 佐藤正弘, 濟藤恭子, 植村定治郎: 日農化誌, 31, 680 (1957)
- 6) 大西博: 日野田醬油研究報告, 第二輯 (1961)
- 7) 佐佐木西二, 吉田忠: 日釀工誌, 44, 61, 158 (1966)
- 8) 宋錫勳, 金鍾協, 李啓瑚, 鄭允秀, 張建型: 陸技研報, 2, 32 (1963)
- 9) M.Mogi, T.Yokotsuka, H. Onishi, T. Sakasai, Y. Asao and H.Mori: Report of Noda Institute for Scientific Research, p. 43.49 (1963~1968)
- 10) J.Lodder and N.J.W. Kreger Van Rij: The yeasts, a taxonomic study. North Holland Publishing Co. (1967)