

TTC-agar 重層法에 의한濁酒酵母의 類別 및 그 消長에 관한 研究

金 燦 祚

(忠南大學校 農科大學)

Studies on the differentiation and the population changes of
Takju yeasts by the TTC-agar overlay technique

Chan Jo KIM

(College of Agriculture, Choong-Nam National University)

ABSTRACT

1. The yeasts in the two samples of Nuruk (mold wheat) which one prepared at the College of Agriculture, Choong-Nam University (S) and the other purchased at a market (T), were examined and counted. The yeasts were differentiated by the TTC(2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride)agar overlay technique that yields a varied shade of color. The results were: the population of yeasts in 1 g of Nuruk S was about 6×10^4 , 53.5% of which were TTC-pink yeasts, 13% TTC-red pink yeasts, 8% were TTC-red yeasts, and 16.5% TTC-white yeasts. In Nuruk T (1 g), the number of yeasts accounted for 14×10^4 and constituted of 42% TTC-pink, 21% TTC-red pink, 23% TTC-red and 9% TTC-white.

2. During the fermentation of Takju (Korean Sake) employing the Nuruk S and T the yeast flora throughout the brewing were observed in 12 hour intervals. TTC pink and red yeasts considered to be the major yeasts were isolated and cultured. The strains (1×10^5 /ml) were added to the mashes S and T in which pH was adjusted to 4.2 and the change of yeast flora was examined during fermentation. The results were:

a) The yeasts had showed a marked propagation since the period of 24 hours when the number was about 2×10^8 /ml mash in the plot S, 4×10^8 in 48 hours and $5 \sim 7 \times 10^8$ in the end period were observed. In the plot T the number was 4×10^8 in 24 hours and thereafter changed up and down maintaining $2 \sim 5 \times 10^8$ in the range.

b) Over 90% of the yeasts found in the mashes of S and T plots were TTC pink type while both TTC red pink and TTC red types held range of $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^7$ throughout the entire fermentation.

c) The population of TTC pink yeasts in the plot SP was as much as 5×10^8 , that is, twice of that of S plot at the period of 24 hours. The predominance in number continued until the middle and later stages but the order of number became about the same at the end.

d) Total number of the yeasts observed in the plot SR showed little difference from that of the plot SP. The TTC red yeasts added appeared considerably in the early stage but 3 days after the change in number was about the same as that of the plot S. In the plot TR the population of TTC red yeasts was predominant over the plot T in the early stage while there was no difference between two plots thereafter. For this reason even in the plot where TTC red yeasts were added TTC pink yeasts were predominant. TTC red yeasts observed in the present experiment showed continuing growth until the late stage but the rate was low.

e) In the plot TP, TTC pink yeasts were found to be about 5×10^8 in number at the period of 2 days and inclined to decrease thereafter. Compared with the plot T the number of TTC pink yeasts in the plot TP was predominant until the middle stage but became about the same at the later stage.

3. TTC pink yeasts that were predominant in number, two strains of TTC red pink yeasts that appeared throughout the brewing, and TTC red yeasts were identified. The results were as described below. TTC pink yeast (B-50P) and two strains of TTC red pink yeasts (B-54RP & B-60RP) were identified as the type of *Saccharomyces cerevisiae* and TTC red yeast (B-53R) were as the type of *Hansenula subpelliculosa*.

緒 論

濁酒酵母에 對한 研究는 韓國麴子 중에서 *Saccharomyces coreanus* 를 分離 命名한 바 있는 齊藤(1910)의 研究를 비롯하여 우리나라 119個所에서 蒐集한 麴子와 167個所에서 採取한 濁酒 술덧에서 各種 微生物을 分離하고 特히 *Saccharomyces* 屬에 對하여는 比較的 詳細한 形態學的 및 生理學的 實驗과 Dewar bulb에 依한 糖酸酵試驗을 施行하여 그 類緣關係를 調査한 武田(1930, 1934)의 研究, 藥濁酒술덧에서 分離한 酒靑酸酵 酵母, *Saccharomyces formosensis* 및 *Saccharomyces shimonisi* 를 交配시켜 勿酸酵力과 酒精生成能이 강한 酵母를 얻은 沈의 研究, 그리고 韓(1959, 1965) 등이 全國 14個所 麴子에서 42株의 酵母를 分離하여 이들의 酸酵力을 測定하고 그 糖酸酵性 및 形態와 集落의 特徵 등으로 類別한 研究

을 볼 수 있는 것이다. 筆者는 前報에 (Kim, 1963, 1967, 1968) 濁酒釀造中 糖類, 有機酸, amino 酸 및 fusel 油 등의 消長을 發見하였음에 이어서 濁酒釀造의 微生物學的 管理의 一面으로 酵母의 動態를 調査하기 爲하여 먼저 濁酒釀造에 가장 큰 微生物源인 “누룩”中의 酵母를 1963년에 秋山(1963^a, 1963^b) 등이 처음으로 淸酒酵母類別에 使用한 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) agar 重層法을 利用하여 그 形色別에 따라 類別計數한 다음 濁酒를 담금하여 經時的인 酵母의 消長을 같은 方法으로 測定하고 다시 이 實驗에서 主酵母라고 認定된 酵母를 一定量 添加한 담금에서 酵母의 消長을 計數하였으며 아울러 이들 主酵母를 同定하여 그 結果를 얻었으므로 여기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

(i) 忠南大學校 農科大學에서 製造한 누룩(以下 S라 함)

(ii) 韓國麵子株式會社 鳥致院 分工場製 누룩(以下 T라 함)

(iii) 市販白米 및 大田市 文化洞 井水

2. 實驗方法

S, T 兩 누룩中の 酵母群의 檢索 및 計數를 하고 아울러 이들 누룩으로 上下徑이 같은 20 l 들이 항아리에 담금溫度 20°C, 白米 : 누룩 : 級水 = 1 : 0.4 : 1.1 比率로 담금하여 22°C의 恒溫室에서 自然醱酵 및 培養酵母를 添加하여 7日間 醱酵시키면서 12時間마다 品溫, pH 및 總酸을 測定하고 水蒸氣 蒸溜法으로 alcohol을 定量하여 醱酵의 異常有無를 보면서 이들 술덧중의 醱酵群의 測定과 主酵母의 同定을 다음과 같이 하였다.

(i) 누룩中の 酵母 : S, T 兩 누룩을 各各均一하게 採取하여 滅菌한 mortar에서 잘 磨碎後 그 1g을 精秤하여 滅菌蒸溜水로 1,000, 5,000 및 10,000 倍로 順次 稀釋한 液을 秋山 B培地(秋山 1963, 1967) 平板上에 1滴(0.05 ml), 滴下하고 glass spreader로 塗抹하여 25°C에서 3日間 培養後 나타난 colony를 觀察 計數한 後 TTC-agar를 重層시켜 30°C에서 3時間 靜置後 나타나는 colony의 呈色으로 類別과 計數를 하였다.

(ii) 술덧中の 酵母 : 담금直後와 每 12時間의 兩 술덧을 여러 部位에서 均一하게 一定量 採取하여 順次 稀釋法으로 10萬倍 稀釋하고 그 1滴을 누룩에서와 같은 方法으로 滴下 塗抹培養하여 나타나는 colony를 觀察 計數하고 TTC-agar를 重層시켜 그 呈色에 따라 類別 計數하였다. 그리고 이 實驗에서 全期間을 通하여 越等하게 많은 數를 보인 TTC-pink(以下 TTC-P라 함) 酵母와 繼續存在한 TTC-red(TTC-R) 酵母의 兩菌株를 Bllg. 8°의 麥芽汁에 各各 3日間 前 培養後 haematometer로 酵母數를

計數하고 前記와 같이 담금한 兩 술덧中에 ml當 1×10^6 個의 酵母가 添加되게끔 接種하여(Akiyama and Sugama, 1967) S 술덧에 P 酵母를 加한 區(SP), R 酵母를 加한 區(SR), T 술덧에 P 및 R 酵母를 各各 加한 區(TP, TR) 및 培養酵母를 添加하지 않은 S 및 T의 2區, 모두 6區로 하여 이들 各區를 7日間 醱酵시키면서 12時間마다 같은 方法으로 酵母의 類別과 消長을 測定하였다.

(iii) 分離한 主酵母의 同定法 : 醱酵 全期間을 通하여 分離된 4株(B-50P, B-53R, B-54RP, B-60RP)를 Lodder (1952)와 飯塚(1963)의 方法에 따라 繁殖法, 細胞의 形態 및 크기, 擬菌糸의 形成, 孢子의 形成 및 그 形, 巨大聚落의 特徵, 菌膜과 酵母環 및 沈澱의 形成, 糖醱酵性, 糖同化性, 室酸鹽 및 ethanol의 資化性, ethanol과 乳酸 및 亞室酸鹽에 對한 耐性, gelatin 液化性, ester의 生成, 發育 및 醱酵에 있어서의 最適溫度 및 pH, 死滅溫度, 그리고 醱酵力(Kim, 1968) 등을 觀察 測定하여 同定하였다.

結果 및 考察

1. 누룩中の 酵母

누룩의 水分含量은 約 11~15%로서 이 중에는 接種한 *Aspergillus oryzae*系 곰팡이를 비롯해서 또한 種麴에서 由來되는 各種 微生物과 其他 培養 및 貯藏中에 自然附着 繁殖되는 여러 微生物群이 混合된 生態를 이루고 있는 것이라 하겠으며 이 중 酵母는 Table 1에서 보는 바와 같이 S 누룩 1g 中에는 約 6萬, T 누룩 1g 中에는 約 14萬이 存在하고 이中 TTC-P 酵母가 50% 內外로 優勢하였으며 其他 Red Pink(RP), Red(R) White(W) 酵母 等이고 이들 總數에 包含시키지 않은 *Rhodotorula* 屬으로 認定되는 酵母가 兩 누룩에서 各各 1萬 程度가 있어 이들이 술덧에 移行하여 7日 內외의 比較的 短期間에 熟成되는 濁酒 釀造에서 主役割을 하는 것 이라고 하겠다.

Table 1. The yeast flora in 1 g of Nuruk
(Unit: 1×10^3)

TTC color	Pink	Red pink	Red	White	Total
S	35	10	5	12	62
T	60	30	40	13	143

Table 2. Colony characters of yeast in Nuruk

Character	Form	Edge	Elevation	Surface	Color	Size
Pink	Irregular or round	Repand	Raised	Moist or dry	Milky white	3~4mm
Red pink	round	Entire	Raised	Dry	Milky white	3mm
Red	Circular	Entire	Raised	Smooth dry	Milky white	2~3mm
White	Round	Entire	Raised	Moist or dry	White	3~5~7mm

Rhodotorula 1.2%라고 發表한 바 있어 普通 麴中の 酵母群에 많은 差異가 있음을 알 수 있으며 그 酵母 總數는 누룩과 麴이 그 製造過程 및 形態에 큰 差異가 있으나 거의 같은 範圍에 있었다. 또한 管間(1963)은 淸酒 酵母協會 6, 7號菌 外에 野生酵母에도 TTC-red 를 나타내는 것이 있었다고 하였는데 筆者가 分離한 red 酵母도 *Hansenula* 에 屬하는 野生酵母이었다.

2. 술덧 醱酵期間中の 酵母의 消長

供試한 兩 濁酒 술덧中 酵母의 消長을 測定한 結果는 Table 3과 같으며 담금後 24時間 頃부터 酵母의 增殖이 뚜렷하여 술덧 每 ml 當 S 區에서는 2×10^8 이 넘고 48時間 頃에 4×10^8 程度가 되어 繼續하다가 後期에 가서 다시 增加의 傾向을 보여 $5 \sim 7 \times 10^8$ 이 되었으며 T 區에서는 24時間 頃에 이미 4×10^8 이 되어 그後 起伏을 보이면서 $2 \sim 5 \times 10^8$ 으로 消長하였다. T 區에서 初期에 더 많은 酵母가 增殖한 것은 누룩에서 더 많은 酵母가 移行한 것도 原因이 될 것이며 이 酵母의 增殖은 乳酸菌에도 影響을 주며 即 伊藤(1957) 등은 淸酒 酵母는 淸酒 乳酸菌의 生長 因子로서 nicotinic acid 系 物質을 分泌한다고 한 바 있어 술덧中の 乳酸菌 繁殖이 酵母의 增殖과 關聯이 있을 것이라 생각되고

그리고 TTC 反應 呈色別 colony 의 特徵은 Table 2와 같다.

한편 日本麴 1g 中の 酵母 總數를 秋山(1963)은 1.7~11.7萬이고 그 TTC 呈色群의 百分率을 R: 0.4~21.4%, P: 41.5~98.8%, W: 0~57.6% 村上 등은 平均 60萬으로 R: 14.5%, P: 32.8%, W: 51.5%,

酵母 自體의 消長은 坂本(1964) 등의 acid protease 가 酵母細胞를 崩壞시킨다는 實驗結果가 있으므로 술덧中の acid protease 力價와도 關係가 있지 않나 생각된다 그리고 이들 酵母의 TTC 反應 呈色에 따르는 類別 結果는 兩 區에서 다같이 釀造 全 期間을 通하여 P 酵母가 90% 以上을 차지하고 R 과 RP 酵母는 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$ 사이였으며 其他 W 酵母 및 *Rhodotorula* 등은 秋山(1962)이 淸酒 술덧에서 認定한 바와 같이 初期부터 淘汰되어 濁酒 술덧中の 酵母는 TTC-P 酵母를 爲主로 한 3~4群으로 純化됨을 보였다.

以上으로 本 實驗의 濁酒 釀造에는 TTC-P 酵母가 主로 關與하고 其他 RP 및 R 酵母 등이 多少 參與함을 알 수 있었다. 한편 이 主 酵母라고 認定한 P 酵母와 繼續 檢出된 R 酵母를 添加하여 釀造한 試驗區들中 SP 區에서는 24時間 頃에 S 區에 比해서 2倍가 되는 約 5×10^8 의 P 酵母가 檢出되어 中期末 頃까지 S 區보다 더 많은 數가 나타났으나 後期에서는 別差없는 數가 되었으며 SR 區에서는 初期에 R 酵母가 多少 많이 檢出되었으나 3日後부터는 R 酵母 添加에도 不拘하고 S 區와 別差없이 그렇게 많은 增殖을 보이지 않고 亦是 $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 사이였으며 TP 區에서도 P 酵母는 2日 頃에 이

미 5×10^8 이 되어 T區에 比해서 많고 其後 減少되는 傾向이나 T區보다는 많으며 後期에서는 T區와 別差없는 數가 됨을 보이고 TR에서도 R 酵母가 初期에는 T區에 比해서 많았으나 中期以後부터는 T區와 別

差없는 傾向이었다. 이와같이 R 酵母를 加한 區에서도 P 酵母가 훨씬 優勢함을 보이므로 本 實驗에서 檢出된 R 酵母는 濁酒釀造 期間中 繼續 生育하나 많은 增殖은 하지 않음을 알 수 있었다.

Table 3. The population changes of yeast flora during Takju brewing (Unit: 1×10^6)

Hours Yeast type		Sample													
		0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156
S	P	0.5	4	240	294	396	374	366	394	520	408	594	538	642	710
	RP				28	2		24	12	20	30	2	14	2	16
	R					2	16		10	2	12	2	8		4
	Total	0.5	4	240	322	400	390	390	416	542	450	598	560	644	770
SP	P	2	68	500	418	440	496	560	412	678	550	608	462	660	708
	RP		8		10		14	37	28	22	26	6	30		54
	R		2					5	2		5	2	8		8
	Total	2	78	500	428	440	510	602	442	700	581	616	500	660	770
SR	P	2	2	65	474	376	334	392	308	714	576	376	440	450	326
	RP				6	38	24	84	40	44	56	22	96	36	140
	R			5	6	4	14		4	2	8	6	4	4	14
	Total	2	2	70	486	418	372	476	352	760	640	404	540	490	480
T	P	2	4	376	312	358	230	334	206	210	184	306	156	472	210
	RP			28	34	44	66	10	18	14	24	18	18	28	32
	R					4	12	8	16	6	18	2	32		18
	Total	2	4	404	346	406	308	352	240	230	226	326	206	500	260
TP	P	2	14	472	558	520	354	360	280	358	292	438	534	428	184
	RP				2		46	36	40	22	14	8	44	32	58
	R												2		18
	Total	2	14	472	560	520	400	396	320	380	306	446	580	460	260
TR	P		4	296	556	398	300	264	240	130	170	218	226	134	256
	RP					18	36	74		38	28	8	92	50	120
	R		8	74	4	6	4		12	4	18	2	18	2	2
	Total		12	370	560	422	340	338	252	172	216	228	336	186	378

3. 分離酵母의 同定

供試 濁酒술덧에서 主 酵母라고 認定하여 分離한 酵母 4菌株(B-50P, B-53R, B-54RP, 및 B-60RP)를 同定한 結果는 다음과 같다.

(a) 繁殖: 4菌株가 모두 多邊出芽法으로 繁殖 하였다.

(b) 細胞의 形態및 크기: Table 4와 같이 大部分 圓, 卵 및 橢圓形이고 特히 B-53R은 主로 圓形이었으며 크기는 다같이 4~8 μ 사이였다.

Table 4. The shape and size of the isolated strain cells

Strains	B-50P	B-53R	B-54RP	B-60RP
Shape				
Form	Round ovoid or ellipsoid	Mostly round some ovoid	Round ovoid ellipsoid	Round ovoid
Size	6×8μ 6×8μ	4 or 6μ	6μ or 4~6×5~8μ	4~6μ 4×6μ

(c) 擬菌糸 : 4 菌株가 모두 형성하지 않았다.

(d) 孢子形成 및 그 形態 : Gorodkova 培地上에서 7日後에 4 菌株가 모두 形成하였고 그 形態 및 크기는 Table 5와 같다.

(e) 巨大集落의 特徵 : 麥芽汁 寒天平板과 麥芽汁 寒天斜面上에서의 特徵은 Table 6과 같으며 B-54RP는 colony 色이 B-50P보다 灰色味가 더 濃었다.

Table 5. The shape and size of ascospores of the 4 strains

Strain Spore	B-50P	B-53R	B-54RP	B-60RP
Form	Mostly round occasionally ovoid, ellipsoid	Mostly ovoid, occasionally reniform	Round	Round, ovoid or ellipsoid
Size	2.8×3μ 3×3.5μ	1.5~3μ	1.6~1.8μ 2~3μ	1.5~2.5μ
Numbers per ascus	Mostly 1, occasionally 2	Mostly 1, occasionally 2	Mostly 1	Mostly 1

Table 6. The macromorphological characteristics on the malt agar plate and malt agar slant of the isolated strains (3 day old at 25°C)

Media Character Strain	Malt agar plate						Malt agar slant				
	Form	Edge	Elevation	Surface	Color	Size	Color	Elevation	Surface	Edge	
B-50P	Round	Entire	Raised	Dry smooth	Thin cream	mm 4~5	Thin grayish creamy	Raised	Dry glossy	Entire	
B-53R	Round	Undulate	Raised	Dry smooth	White	5~6	Thin grayish white	Raised	Dry	Crenulate	
B-54RP	Round	Entire	Flat	Dry smooth	White	4~5	Thin creamy white	Raised	Dry glossy	Entire	
B-60RP	Round	Entire	Flat	Dry smooth	White	5~6	Thin grayish cream	Raised	Dry glossy	Entire	

(f) 糖酸酵性, 및 同化性 : 分離酵母의 菌株中 特히 B-53R는 糖酸酵性은 弱하고 同

化性은 強하여 顯著하게 他菌株와 差異가 있었으며 이들 結果는 Table 7과 같다.

Table 7. The characteristics of sugar fermentation and assimilation by the isolated strains (7 day old at 25°C)

Sugar Strain	Glc.		Man.		Gal.		Mal.		Suc.		Lac.		Mel.		Raf.		Dextrin		
	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	F	A	
B-50P	+	+	+	+	+	Slow	±	+	+	+	+	-	±	-	±	+ $\frac{1}{3}$	+	-	-
B-53R	+	+	+	+	-		±	±	±	+	+	-	-	-	-	+ $\frac{1}{3}$ Slow	±	-	+
B-54RP	±	+	+	+	±		+	±	+	+	-	-	-	±	±	+ $\frac{1}{3}$	+	-	-
B-60PR	±	+	+	+	±		±	+	+	+	-	+	-	±	±	+ $\frac{1}{3}$	+	-	-

Note: F=Fermentation, A=Assimilation.

(g) 窒酸鹽의 資化性, ester 生成能, gelatin 液化力 및 乳酸 및 亞窒酸鹽에 對한 耐性: 窒酸鹽의 資化는 B-53R 만이 하였으며 亞窒酸鹽의 耐性은 모두 強하였고 乳酸 耐性도 B-53R 가 가장 強하여 3%에서는 잘 발육하였으나 3.5%에서는 發育하지 못하였으며 gelatin 液化는 40일까지 모두 하지 않았고 B-53R는 麥芽汁 等の 培地에서 ester 生成이 強하였다.

(h) Ethanol 資化性 및 耐性: B-53R는 ethanol을 炭素源으로 하여 잘 生育하고 그것을 資化함을 보였으며 B-50P 및 B-54RP는 若干 資化를 하는 듯하고 B-60RP는 전혀 資化하지 못하였으며 ethanol 耐性은 培地에 따라 差異를 보여 Hayduck 液에서는 9%에서 모든 菌株가 發育하지 못하였으나 麥芽汁에서는 B-53R는 10%에서 거의 발육을 못하였고 其他 菌株들은 13%에서도 發育을 認定할 수 있었다.

(i) 其他 特徵: B-53R은 白色 乾燥性의

菌膜을 잘 形成하였고 B-50P, B-54RP 및 B-50RP는 15日後 頂 葉은 鳥嶺狀의 膜을 形成하였으며 酵母選은 B-53R 만이 形成치 않았고 器壁上昇性質은 B-53R은 顯著하였으나 其他는 거의 認定할 수 없었다. 液溷濁性은 B-53R에서는 認定되었으나 其他는 거의 認定할 수 없었으며 發育 最適溫度는 B-53R가 20~25°C였으며 其他는 25~30°C이고 發育 最適 pH는 B-53R가 pH 4.0~4.5 附近이었고 其他는 5.0附近이였으며 醱酵 最適溫度는 發育 最適溫度보다 多少 높은 傾向이었다. 그리고 60°C에서 5分間 處理함으로서 4 菌株가 모두 死滅됨을 보였다.

以上の 結果를 綜合하여 Lodder(1952)의 分類同定法에 依하면 B-50P, B-54RP, 및 B60-RP는 *Saccharomyces cerevisiae* 型이며 B-53R는 *Hansenula subpelliculosa* 型임을 알 수 있었다.

摘 要

(1) 忠南大學校 農科大學에서 製造한 누룩(S)과 市販 누룩(T)을 供試하여 그들중의 酵母를 檢索數하고 또한 TTC-agar 處理로서 그 呈色別에 따라 類別한 結果 S 누룩 1g 中の 酵母는 約 6×10⁴ 個로서 이中 TTC-pink 酵母: 56.5%, red pink 酵母: 16%, red 酵母: 8%, white 酵母: 19.5%이였으며 T 누룩 1gm 中에는 約 14×10⁴ 個로서 이中 pink: 42%, red pink: 21%, red: 28%, white: 9%이였다.

(2) S, T 兩 누룩으로 濁酒를 담글하여 (S區 및 T區) 釀造 全 期間中 12時間마다 酵母群의 消長을 測定하고 主 酵母라고 認定한 TTC-pink 와 red 酵母를 分離 培養하여 乳酸添加로 pH를 4.2로 調節

한 S, T 各區 술덧에 $1 \times 10^6/m$ 를 添加 釀造한 술덧 (SP, SR, TP 및 TR區) 中の 酵母群의 消長을 測定하여 얻은 結果는 다음과 같으며 이 實驗에서도 TTC 呈色別로 類別計數하였다.

(i) 酵母는 24時間頃부터 増殖이 뚜렷하여 술덧 每 m 當 S區에서는 約 2×10^8 이 되고 48時間頃에는 約 4×10^8 이 되어 繼續하다가 後期에 다시 增加되어 $5 \sim 7 \times 10^8$ 이 되었으며 T區에서는 24時間頃에 4×10^8 이 되었고 其後 起伏을 보이면서 $2 \sim 5 \times 10^8$ 으로 繼續하였다.

(ii) S, T 兩區 술덧中에서 消長한 酵母는 TTC—pink 酵母가 90% 以上을 차지하고 red pink 및 red 酵母는 全 釀造期間을 통하여 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^7$ 사이에서 消長하였다.

(iii) SP 區에서의 酵母는 24時間에 S區보다 2배가 되는 約 5×10^8 의 pink 酵母가 檢出되었으며 中期末頃까지는 S區보다 많은 數이었으나 後期에는 別差없는 數가 되었다.

(iv) SR 區에서 消長하는 總 酵母數는 SP 區와 大差 없었으나 添加해준 red 酵母는 初期에 多少 많이 檢出되고 3日後부터 S區와 別差없는 數로 維持되었으며 TR 區에서도 red 酵母가 初期에는 T區에 比해서 많았으나 中期以後부터는 T區와 別差없는 傾向이어서 red 酵母를 加한 區에서도 pink 酵母가 훨씬 優勢함을 보여 本 實驗에서 檢出된 red 酵母는 濁酒釀造에서 後期까지 繼續 生育은 하나 많은 増殖은 하지 않았다.

(v) TP 區에서 pink 酵母는 2日頃에 約 5×10^8 가 되어 T區에 比해서 많고 其後 減少되는 傾向이나 T區 보다는 많으며 後期에서는 亦是 T區와 別差없는 數가 되었다.

(3) 本 實驗에서 가장 많이 檢출된 TTC—pink 酵母와 繼續 나타난 2株의 red pink 酵母 및 1株의 red 酵母를 同定한 結果 TTC—pink 酵母 (B—50P)와 2株의 red pink 酵母 (B—54RP 및 B—60RP) *Saccharomyces cerevisiae* 型이었고 red 酵母 (B—53R)는 *Hansenula subpelliculosa* 型이었다.

REFERENCES

- Saito, K., 1910. Notizen über einige Koreanische Gärungsorganismen. *Cent. f. Bakt.* II. Abt. Bd. 26, S. 3:9.
- 武田義人, 1930. 朝鮮産 醱酵菌類の研究(第一報) 麴子中の *Saccharomyces* 屬に就て. 日農化誌, 6, 1023.
- 武田義人, 1934. 朝鮮産 醱酵菌類の研究(第二報) 醱中の *Saccharomyces* 屬に就て. 日農化誌, 10, 281.
- 沈相獻, 1955. 서울大學校 碩士學位論文.
- Hahn, Y. S., and K. S., Chun, 1959. Studies on the selection of the superior yeasts from Korean wine Kokjas (Part 1). *The Reports of Central Industrial Research Institute*, 9, 140.
- Hahn, Y. S., and K. J. Kim, 1965. Studies on the Korean Fermentable Microorganism (Part 3). *The Reports of National Industrial Research Institute*, 15, 22.
- Kim, C. J., 1963. Studies on the quantitative changes of organic acid and sugars during the fermentation of Takju. *J. Kor. Agri. Chem. Soc.*, 4, 33.
- Kim, C. J. 1967. Studies on Korean Sakes (Part 3). On the quantitative changes of fusel oil during the fermentation of Takju. Choongnam University the 15th Anniversary Thesis (Natural science), 6, 133.
- Kim, C. J., 1968. Studies on the components of Korean Sake (Part 2). Detection of the Free Amino Acids in Takju by paper partition chromatography. *J. Kor. Agri. Chem. Soc.*, 9, 59.
- Hurukawa T. and H. Akiyama, 1963. Microbiological control of Sake brewing (Part IV). On the TTC—Agar Overlay Method for Grouping of Yeasts (1). *J. Agri. Chem. Soc. Japan*, 37, 398.
- 秋山裕一, 1963. 酵母の平面培養法について. 清酒釀造の微生物管理法(その3). 日釀協誌, 58, 1155.
- Akiyama, H., and N. Sugama, 1967. The use of the TTC—agar—Overlay technique for the differentiation of sake yeasts. *J. Ferm. Tech.*, 45, 1093.
- Lodder, J., 1952. The yeasts, a Taxonomic study. North-Holland publishing Co.
- 飯塚廣, 後藤昭二, 1963. 酵母の同定法 日釀協誌, 21, VII—36~49.
- Kim, C. J. 1968. Microbiological and enzymological studies on Takju brewing. *J. Kor. Agri. Chem. Soc.*, 10, 69.
- 村上, 大脇, 橋本, 1962. 日釀協誌, 57, 1046.
- 菅間誠之助, 1963. 清酒釀母について. 日釀協誌, 58, 587.
- Ito, Y. *et al.*, 1957. Studies on the mixed association of microorganisms in the Sake brewing process. Part 1. Nutritional Investigation of Mixed Association between Sake yeasts and Sake *Lactobacilli* (1). *J. Agri. Chem. Soc. Japan*, 31, 779.
- Sakamoto, M. *et al.*, 1964. Enzymation of protein by microbial protease, and its utilization. (2) Relation of both sacch. sake and acid protease. *J. Ferment. Assoc. Japan*, 22, 523.
- 秋山裕一, 1962. 日釀協誌, 57, 564.