

간장 발효에 관여하는 효모에 관한 연구 (제5보)

Saccharomyces rouxii T-9의 영양요구성(1)

질소원 및 무기염류의 영향에 대하여

*이 택 수 · 이 석 건

*샘표장유양조장 연구실 · 충남대학교 농과대학

(1971. 2. 20 수리)

Studies on the Yeasts for the Brewing of Soy sauce (5)

Nutritional requirements of *Saccharomyces rouxii* T-9 (1)

Influence of addition of nitrogen sources and inorganic salts

*Taik Soo Lee. Suk Kun Lee

*Lab. of Saimpyo Soy Sauce Brewery, College of Agriculture, Chung Nam University

(Received Feb. 20, 1971)

Summary

These experiment were conducted to study the effects of various nitrogen sources and inorganic salts upon the growth of *Saccharomyces rouxii* T-9, and the results obtained were as follows:

1) The strain showed the most rapid growth in the case of 2.5 to 5.0% addition of peptone as an organic nitrogen source, and 1.0% addition of $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ as an inorganic nitrogen source respectively to the media containing no NaCl.

2) Its growth was the most rapid in the case of 1.5% addition of yeast extracts as an organic nitrogen sources, and 5% addition of urea as an inorganic nitrogen source respectively to the media containing 20% of NaCl.

3) Its growth was the most rapid in the case of 1% addition of NaNO_3 as an inorganic salt to the media contining no NaCl, while to the media containing 20% or 26% of NaCl its growth was more rapid in the case of 5% addition of NaNO_3 than 1% addition.

4) Its growth was more rapid in the case of 0.5% addition of MgSO_4 and CaCl_2 respectively to the media containing 20% of NaCl than to the media containing no NaCl, and was rapid in the case of 1% addition of MgCl_2 to the media containing 26% of NaCl.

서 론

전보⁽¹⁾⁽²⁾에서 저자들은 발효기의 샘표간장덧 으로부터 6주의 고농도·식염내성 효모를 분리하여 동정하고 이들효모의 내염성 향기의 생성 및 배양 일반조건에 대하여 보고한바 있다 이어서 이들 고농도식염내성 효모중 간장발효에 가장중요한 역할을 하는 *Saccharomyces rouxii* T₉을 다량 증식배양하여 실제공업적인 간장담금에 이용할 목적으로 이효모의 영양 요구성에 대하여 검토 하였으며 제 1단계로 질소원 및 무기염류의 요구성에 대하여 실

험한 결과를 보고 하는 바이다.

실 험 방 법

(1) 공시효모: *Saccharomyces rouxii* T₉

(2) 공시배지: 기본배지로서 Lodder⁽³⁾의 인공배지를 사용하였다. 즉 glucose 5%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, 의 기본배지에 0, 20, 26%의 식염을 첨가한 배지를 사용했으며 KH_2PO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 를 시험하는 구에서는 해당무기염류를 제외한 배지조성은 기본배지에 준하였다.

(3) 공시 질소원 : 질소원으로서 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl , NH_4NO_3 , yeast ext., Bacto-vitamin free casamino acid, peptone, urea, glutamic acid, Bacto-beef, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 등을 사용하였다.

(4) 공시무기염류 : 무기염류로서는 KCl , Na_2SO_4 , KH_2PO_4 , NaNO_3 , MgSO_4 , MgCl_2 , CaCl_2 , LiCl 등을 사용했다.

(5) 배양 : 상기의 각배지를 동일한 내경의 시험관에 6ml씩 분주하여 가압 살균후 맥아즙한천 사면상에 30°C로 일주일간 전배양한 효모를 5cc의 살균생리 식염수에 1백금이 취하고 5분간 격렬히 진탕후 1적을 작배지에 접종하여 30°C로 10일간 정치배양 하였다.

(6) 발육도측정 : 배양액을 균일히 현탁하면서 3ml를 취하여 원심분리(3,000 rpm에서 20분간)하고 침전된 균체를 10ml의 증류수에 현탁하여 Hitachi spectrophotometer model 101로 파장 560 m μ 에서 혼탁도를 측정한 O.D (optical density)값으로 균체의 증식량을 비교 하였다.

결과 및 고찰

1. 질소원의 영향

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast ext. 등의 질소원을 0.1~5.0 % 농도로 0, 20, 26%의 식염 함유 기본배지에 첨가하고 공시균을 접종하여 30°C로 10일간 배양후 O.D값을 측정한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1. Influence of addition of various nitrogen sources to media for the growth of *Saccharomyces rouzii* T₉

Kind	Conc (%) added		control	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	5.0
	NaCl media (%)									
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0		0.19	0.20	0.24	0.27	0.31	0.33	0.38	0.45
	20		0.15	0.21	0.27	0.34	0.38	0.41	0.47	0.53
	26		0.12	0.19	0.22	0.25	0.27	0.31	0.33	0.37
NH_4Cl	0		0.20	0.36	0.40	0.49	0.52	0.47	0.35	0.20
	20		0.15	0.40	0.45	0.48	0.56	0.50	0.36	0.23
	26		0.12	0.32	0.29	0.27	0.22	0.21	0.21	0.17
NH_4NO_3	0		0.19	0.39	0.58	0.64	0.79	0.85	0.53	0.42
	20		0.14	0.55	0.75	0.63	0.55	0.46	0.31	0.28
	26		0.13	0.35	0.48	0.39	0.34	0.30	0.26	0.23
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0		0.19	0.23	0.35	0.95	0.78	0.53	0.36	0.26
	20		0.14	0.19	0.22	0.28	0.26	0.24	0.21	0.20
	26		0.11	0.21	0.25	0.26	0.27	0.21	0.20	0.16
Urea	0		0.20	0.22	0.24	0.26	0.29	0.34	0.37	0.38
	20		0.15	0.56	0.81	0.81	0.92	0.98	1.0	1.2
	26		0.11	0.41	0.59	0.80	0.88	0.89	0.93	1.05
Yeast ext.	0		0.20	0.92	1.21	1.26	1.15	0.86	0.71	0.48
	20		0.14	0.81	1.30	1.35	1.51	1.31	1.05	0.82
	26		0.12	0.76	0.95	1.28	1.15	0.98	0.75	0.56
Bacto-vitamin free casamino acid	0		0.19	0.21	0.25	0.33	0.34	0.37	0.35	0.30
	20		0.15	0.31	0.45	0.62	0.65	0.68	0.71	0.68
	26		0.12	0.28	0.45	0.47	0.51	0.53	0.55	0.58
Peptone	0		0.19	0.88	1.32	1.40	1.46	1.48	1.51	1.51
	20		0.14	0.44	0.60	0.51	0.47	0.35	0.30	0.25
	26		0.11	0.35	0.31	0.28	0.26	0.25	0.20	0.17
Glutamic acid	0		0.19	0.62	0.81	0.79	0.75	0.73	0.73	0.71
	20		0.14	0.57	0.46	0.46	0.44	0.41	0.40	0.28
	26		0.12	0.44	0.45	0.49	0.40	0.38	0.36	0.33

Bacto-beef	0	0.19	0.65	0.71	0.89	0.92	1.05	1.15	1.35
	20	0.15	0.45	0.80	0.95	1.02	1.10	1.25	1.28
	26	0.13	0.20	0.38	0.47	0.59	0.68	0.87	0.95

* Control: non-addition medium of nitrogen sources

(NH₄)₂SO₄나 yeast ext 등 각종 질소원의 농도를 각각 달리하여 식염 0, 20, 26% 함유배지에 첨가하고 *Saccharomyces rouxii* T₉의 생육에 미치는 영향을 실험한 결과 일반적으로 무기질소원 보다는 유기질소원의 첨가에 있어서 잘 생육 하였다. 특히 식염 20% 함유배지에 yeast ext.를 1.5% 첨가 했을때 균의 생육이 가장 좋았으며 peptone 은 무염배지에 2.5~5.0%첨가 했을때 가장 좋았다. 무기 질소원으로는 무염배지의 경우 질산안몬을 1.5~2.0% 첨가했을때 가장 좋았으며 20% 식염 함유배지의 경우는 urea 를 5% 첨가 했을때 무염 배지에서 보다도 생육이 월등히 양호 하였다. 大西⁽⁴⁾는 무염배지의 경우(7일배양) 질소원 으로서 (NH₄)₂SO₄, 젖산, 카제인 가수분해물을 첨가하였을때 *Saccharomyces rouxii*의 발육상태가 양호 하였고 식염 18% 함유배지의 경우 (14일배양) 젖산 안모니움, 카제인 가수분해물을 첨가했을때는 잘 생육하였으나 (NH₄)₂SO₄를 첨가한 경우는 생육상태가 극히 불량하다고 하였으며 특히 고농도 식염 배지에서 효모의 발육을 왕성히 하기 위하여는 buffer(구연산과 구연산카리 완충액)를 첨가할 필요가 있다고 하였다. 또한 질소원으로서 yeast extract, urea, casamino acid 등을 사용한 경우는 *Saccharomyces rouxii*의 polyalcohol 생산량이 증가

하였으나 (NH₄)₂SO₄를 첨가한 경우는 저하 되었다고 보고 하였으며 高橋⁽⁵⁾는 공시효모로 조제 amino acid(식염 5%첨가)으로부터 분리한 *Mycotorula* No. 1의 amino acid 및 vitamin 요구에 대한 보고에서 질소원으로 (NH₄)₂SO₄을 사용하였을 때는 vitamin을 첨가하여야 발육되고 *Saccharomyces sake*, 청주효모, alcohol 효모, Beer 효모등은 (NH₄)₂SO₄ 배지에서만 발육한다 하였고 佐藤等⁽⁶⁾은 내염성장유효모인 *Zygosaccharomyces major* St. *Kikkoman*의 생육에 미치는 영양인자로서 (NH₄)₂SO₄과 가제인 가수분해물을 첨가 하였을때 식염 무첨가및 2%식염함유 배지에서는 생육이 잘되었으나 6%의 식염함유배지 에서는 많은 저해를 받았다고 한바 있다. 이와같은 실험결과와 저자들의 실험결과와 비교할때 *Saccharomyces rouxii* T₉의 생육에 (NH₄)₂SO₄의 첨가는 무염배지나 식염배지에 별효과가 없었고 高橋⁽⁵⁾, 佐藤⁽⁶⁾ 등의 보고와는 다소상이하였고 urea나 yeast extract 등의 경우는 大西⁽⁴⁾의 보고와 다소 부합됨을 알수 있었다.

2. 무기염류 첨가의 영향

Na₂SO₄, KCl 등 각종 무기염의 농도를 달리하여 0, 20, 26%의 식염배지에 첨가하고 공시균을 접종하여 30°C로 10일간 배양후 O.D 값을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Influence of addition of inorganic salts to media for the growth of *Saccharomyces rouxii* T₉

Kind	Conc (%) added		Control	0.1	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	5.0
	NaCl media (%)									
KCl	0	0.18	0.21	0.35	0.40	0.32	0.24	0.21	0.19	
	20	0.14	0.18	0.20	0.24	0.30	0.34	0.35	0.38	
	26	0.11	0.15	0.19	0.21	0.27	0.22	0.19	0.16	
Na ₂ SO ₄	0	0.19	0.23	0.35	0.47	0.32	0.27	0.24	0.22	
	20	0.15	0.20	0.28	0.35	0.21	0.25	0.20	0.16	
	26	0.12	0.16	0.20	0.30	0.21	0.20	0.18	0.14	
KH ₂ PO ₄	0	0.18	0.23	0.38	0.39	0.43	0.36	0.31	0.24	
	20	0.15	0.20	0.29	0.40	0.38	0.36	0.33	0.22	
	26	0.11	0.18	0.28	0.36	0.34	0.31	0.31	0.20	
NaNO ₃	0	0.19	0.51	0.73	0.90	0.74	0.67	0.59	0.42	
	20	0.15	0.26	0.31	0.45	0.50	0.53	0.58	0.78	
	26	0.11	0.29	0.30	0.43	0.47	0.50	0.54	0.61	

MgSO ₄	0	0.20	0.19	0.26	0.28	0.31	0.37	0.44	0.30
	20	0.14	0.20	0.65	0.49	0.41	0.37	0.28	0.22
	26	0.12	0.25	0.26	0.29	0.30	0.31	0.33	0.19
MgCl ₂	0	0.19	0.21	0.22	0.24	0.27	0.30	0.35	0.25
	20	0.14	0.24	0.27	0.29	0.32	0.27	0.25	0.16
	26	0.12	0.60	0.48	0.26	0.24	0.23	0.21	0.19
CaCl ₂	0	0.19	0.33	0.55	0.37	0.36	0.30	0.27	0.19
	20	0.15	0.31	0.71	0.40	0.37	0.35	0.30	0.21
	26	0.11	0.32	0.35	0.38	0.45	0.48	0.50	0.65
LiCl	0	0.19	0.35	0.49	0.25	0.22	0.20	0.18	0.17
	20	0.15	0.21	0.29	0.32	0.36	0.48	0.65	0.30
	26	0.11	0.39	0.29	0.26	0.24	0.21	0.20	0.18

* Control: non addition medium of inorganic Salts.

KCl, Na₂SO₄ 등 8종의 무기염류를 각각의 농도로 배지에 첨가하고 *Saccharomyces rouzii* T₉의 생육에 미치는 영향을 실험한 결과 가장 효과가 있는 무기염으로는 NaNO₃로서 무염배지에는 1% 첨가했을 때 가장 좋았으나 20% 또는 26% 식염 함유배지의 경우에는 1% 첨가했을 때 보다도 5% 첨가했을 때 더욱 양호하였다. 특히 MgSO₄와 CaCl₂는 0.5% 첨가했을 때 무염배지에서 보다도 20% 식염 함유배지에서 더욱 효과가 있었으며 MgCl₂는 26% 식염 함유배지에 1% 첨가했을 때 가장 효과가 있었다. 기타 KCl, Na₂SO₄, KH₂PO₄, LiCl 등은 대략 0.5~1.0% 첨가했을 때 다소 효과가 있었다. 大西⁽⁴⁾는 *Zygosaccharomyces major*의 생육에 미치는 무기염류 첨가의 영향에 대한 실험에서 K⁺ < Na⁺ < Mg < Ca < Li, Cl⁻ < SO₄²⁻ < NO₃⁻의 순으로 독성이 강하며 KCl은 4Mol의 고농도를 첨가한 경우에도 발육상태가 양호하였고 NaNO₃, MgSO₄의 첨가도 양호한 편인데 반하여 LiCl은 0.5 Mol의 저농도에서도 발육이 완전히 저해 되었다고 보고한바 있다. 저자들이 분리한 *Saccharomyces rouzii* T₉과 비교할 때 NaNO₃, MgSO₄, LiCl 등의 효과는 大西⁽⁴⁾ 등의 보고와 다소 부합되었으나 KCl의 효과가 뚜렷하지 않은 점이 상이한 결과이었다.

요 약

Saccharomyces rouzii T₉의 생육에 있어서 질소 원 및 무기염류의 영향을 실험한 결과는 아래와

같다.

(1) 무염배지의 경우 유기질소원으로서 peptone을 2.5~5.0% 첨가했을 때 균의 생육이 가장 양호하였으며 무기질소원으로서 (NH₄)₂HPO₄를 1.0% 첨가했을 때 가장 양호하였다.

(2) 20% 식염 함유배지의 경우 유기질소원으로서 yeast ext.를 1.5% 첨가했을 때 가장 양호하였으며 무기질소원으로서 urea를 5% 첨가했을 때 가장 양호하였다.

(3) 무기염류로서 NaNO₃는 무염배지의 경우 1% 첨가했을 때 가장 양호하였으나 20% 또는 식염 함유배지의 경우에는 26% 첨가했을 때 보다 5% 첨가했을 때 더욱 양호 하였다.

(4) MgSO₄와 CaCl₂는 0.5% 첨가한 경우 무염배지에서 보다도 20% 식염 함유 배지에서 더욱 효과가 있었으며 MgCl₂는 26% 식염 함유배지에 1% 첨가 했을 때 가장 효과가 있었다.

참 고 문 헌

- (1) 李澤守, 李錫健: 韓國農化誌 13, 187 (1970)
- (2) 李澤守, 李錫健: 韓國農化誌 13, 193 (1970)
- (3) Lodder and N.J.W. Kreger-van Rij: The yeasts, a taxonomic study (1967)
- (4) 大南博: 日野田醬油研究報告 第2輯(1961)
- (5) 高橋雅弘: 日農化誌 28, 395, 398 (1954)
- (6) 佐藤正弘, 山田一彌, 植村定治郎: 日農化誌, 30, 492 (1956)