

## 고정화된 *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90과 *Candida versatilis* BH-91를 이용한 Column형 reactor에서 간장의 연속적 속성발효

류병호\* · 조경자<sup>1</sup> · 채영주<sup>2</sup> · 진성현

경성대학교 식품공학과, <sup>1</sup>가정관리학과, <sup>2</sup>오복간장주식회사

### Continuous Rapid Fermentation of Soy Sauce by Immobilized *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90 and *Candida versatilis* BH-91 Using Column Type Reactor

Ryu, Beung-Ho\*, Kyung-Ja Cho<sup>1</sup>, Young-Ju Chae<sup>2</sup> and Seung-Heun Jin

Dept. of Food Science and Technology, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Home Economics, Kyungsoong University, Pusan 608-736, Korea

<sup>2</sup>Oh Bok Food Co., Pusan 604-070, Korea

**Abstract** — The aim of this study was to find out the rapid fermentation of soy sauce from koji hydrolyzate using column type reactor packed with immobilized yeast cells. Each immobilized cell of *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90 and *Candida versatilis* BH-91 in the packed column type reactor produced 2.8% ethyl alcohol and 18 mg/l 4-ethylguaiacol over 96 hours under the optimal condition. Continuous fermentation was performed by immobilized *Z. rouxii* BH-90 packed in column type reactor. Immobilized *Z. rouxii* BH-90 produced 2.30~2.85% ethyl alcohol during 30 days, and decreased gradually from 40 days to 80 days. Also *C. versatilis* BH-91 produced 4-ethylguaiacol at the constant rate of 16~18 mg/l and decreased gradually after 40 days. Final product of soy sauce contained 2.8% ethyl alcohol and 18 mg/l 4-ethylguaiacol. However, amino acid compositions of final products were consisted of predominantly glutamic acid, leucine, arginine, aspartic acid, lysine and valine, which were more than 50% of total amino acid.

간장은 우리 나라의 대표적인 조미식품으로서 전통적인 양조기술로 발효시키고 있으나, 발효기간이 장기간 소요되기 때문에 이를 해결 하고자 하는 연구가 요구되고 있다.

간장의 발효는 *Aspergillus sojae* 또는 *Aspergillus oryzae*의 포자를 접종시켜 배양한 후 고농도의 식염수를 첨가하여 분해한 액에 *Pediococcus* sp.에 의한 젖산 발효, 주발효 효모인 *Zygosaccharomyces* sp.에 의한 알코올 발효 및 후숙 효모인 *Candida* sp.에 의한 향기성분의 생성으로 발효가 끝나면 간장 특유의 향미를 갖는다(1-4). 그러나 간장은 발효기간이 장기간 걸리므로 발효기간을 단축하려는 연구가 이루어지고 있다. 간장의 발효에 관여하는 *Pediococcus halophilus*,

*Zygosaccharomyces rouxii*와 *Torulopsis versatilis*, *Candida etchellsii*를 고정화시켜 column형 발효조를 이용하여 간장 발효기간을 단축시키는 연구를 시도한 바 있다(5). 또한, *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Torulopsis versatilis*의 균체를 고정화한 bead를 bioreactor를 사용하여 간장의 속성발효가 가능하다고 보고하였다(6-8). 그리고 ceramic 담체를 이용한 bioreactor의 간장 발효에서 *Zygosaccharomyces rouxii*의 알코올 생성 및 *Candida versatilis*에서 간장 특유의 향기성분인 4-ethylguaiacol의 생성이 가능하였고, 단시일에 간장발효가 가능하다고 보고하였다(5, 9, 10).

이러한 일련의 연구를 검토해 보면 간장에 관여하는 주요 효모균인 *Zygosaccharomyces rouxii*와 후숙효모인 *Candida versatilis*을 잘 이용하면 간장 발효기간의 단축과 간장의 풍미도 개선될 것으로 기대된다. 따라서 본 연구는 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus so-*

**Key words:** Soy sauce, immobilized yeast cells, reactor

\*Corresponding author

jae을 사용하여 속성으로 만든 발효액을 사용하여(12) 알코올을 발효에 관여하는 주요 효모인 *Zygosaccharomyces rouxii*와 간장의 향기성분을 생산하는 후속효모인 *Candida versatilis*를 고정화시킨 후 각각의 고정화 균체를 충전시킨 column형 발효조에서 간장제조를 위한 연속발효의 조건 및 그 완제품의 성분에 대하여 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 미생물

*Zygosaccharomyces rouxii* BH-90과 *Candida versatilis* BH-91을 사용하였다(13).

#### 간장국의 제국법

증자한 탈지대두와 소맥분을 2 : 1의 비율로 혼합한 후 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus sojiae*의 종국을 가하여 잘 혼합시킨 다음 37°C에서 2일간 방치한 후 국으로 사용하였다(12).

#### 고온 분해법에 의한 국 분해액의 조제

간장국에 식염수를 두 배에 해당하는 물을 가하여 최종 식염의 농도가 15%가 되도록 조절하고 온도는 45°C에서 4~5일간 분해한 후 압착 및 멸균한 다음 국 분해액으로 사용하였다(12).

#### 균체의 고정화

분리 동정된 *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90과 *Candida versatilis* BH-91을  $1.0 \times 10^7$  cells/ml이 될 때까지 액체배지(생간장 10%, glucose 5% 및 NaCl 11%, pH 5.5)에 30°C에서 5일간 ( $1.0 \times 10^7$ /ml) 배양시킨 다음 원심분리하고 균체를 멸균 증류수로 2회 씻은 다음 colloidal silica 용액과 3% 알긴산 소다 용액=1 : 1의 비율(v/v)로 혼합한 후 23 게이지의 주사기에 넣어 이미 멸균된 0.5% 염화 칼슘용액에 적하하여 생성된 겔을 2회 멸균 증류수로 씻은 다음 4°C에서 24시간 안정시킨 후 사용하였다(8).

#### Column형 reactor의 장치

간장의 연속 발효장치는 유리로 만든 column형 (용량 300 ml, 높이 30 cm, 직경 28 mm)의 유동식 반응조를 2종류를 사용하였다. 본 발효장치는 소정의 균체 고정화 bead를 무균적으로 충전한 다음 peristaltic pump를 사용하여 밑에서 위로 발효 원액을 공

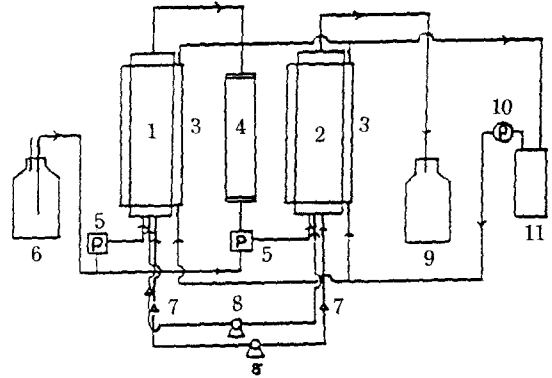


Fig. 1. Schematic diagram of the column type reactor. 1. Reactor packed with immobilized *Z. rouxii* HB-90, 2. Reactor packed with immobilized *C. versatilis* HB-91, 3. Water jacket, 4. Ceramic filter, 5. Peristaltic pump, 6. Koji hydrolyzate stock vessel, 7. Air filter, 8. Air compressor, 9. Harvest tank, 10. Pump, 11. Warm water pool.

급하면서 발효하여 여과한 후 제품으로 하였다(Fig. 1).

#### 알코올의 정량

배양액을 여과하여 25배 희석한 후 Gas-chromatography(Shimadzu GC R1-A)법에 의하여 측정하였다(14). 이때 내부 표준물질로는 cyclohexanol을 사용하였다.

#### 4-Ethylguaiaicol의 분석

마개가 부착되어 있는 20 ml의 시험관에 시료 5 ml, 식염 1g, 초산에칠 2 ml를 가하여 10분간 진탕시켜 추출한 후 5°C에서 원심분리(4,000 rpm)하여 분리된 초산 에칠층만 분취한 다음 내부 표준물질로 2,3,5-trimethyl phenol을 가하여 G.C.로 분석하였다(15).

#### 색조

시료를 일정하게 희석한 후 460 nm, 530 nm 및 610 nm의 흡광도를 측정하여 각 흡광도의 총 합계를 색력으로 나타내었고, 색조의 측정은 460 nm, 530 nm 및 610 nm에서 측정된 흡광도를 총 흡광도의 합계로 나눈 값을 백분율로 나타내었다(16).

#### 유리 아미노산

Spackman의 방법에 따라 아미노산 자동분석기(日本電子製, JLC-6AH, No. 310)로써 유리 아미노산의 조성을 측정하였다(17).

간장의 탁도(%)

시료를 여과한 후 시료 5 ml에 3 M-trichloroacetic acid 5 ml을 잘 혼합한 다음 50°C 에서 3시간 반응시킨 후의 탁도를 백분율로 나타내었다(18).

화입침전물(火入堆藏物)

시료를 65°C 에서 2시간 가열한 다음 85°C 에서 1시간 가열하고 냉각시킨 후 생성된 침전물을 여과하여 확인하였다(18).

결과 및 고찰

고정화균체의 증식과 발효성

*Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91을 담체(Colloid Silica gel : 3% 알킬산 소다=1 : 1의 비율)로 고정화시킨 후 pH 5.0, 온도 30°C, 식염의 농도 11% 및 aeration 0.06 vvm 등의 최적조건하에서의 균체의 증식과 발효성에 대하여 실험하였다(22). 본 실험에서는 이러한 최적조건하에서 발효조건을 구하기 위하여 고정화효모를 충전한 Column형 Reactor에 기질을 주입하면서 ethyl alcohol 및 4-ethylguaiacol의 생성량과 gel 및 유출액의 균수를 조사하였다. 이때의 발효조건은 고정화효모 gel을 200 g 충전하였고 기질의 유속은 200 ml/h로 조절하여 실험하였다. *Z. rouxii* BH-90의 균체 고정화에 의한 gel과 발효된 용출액의 생성수와 그에 따른 ethyl alcohol의 생성량을 나타내

었다(Fig. 2). 균체수는 발효시간의 경과에 따라 증가하다가 발효 96시간에서 gel내에는  $4.0 \times 10^8$ /ml, 유출액에서는  $5.0 \times 10^7$ /ml였으며 알코올 생성은 발효 72 시간에는 2.4%, 96시간에는 2.5%로 생성되었다. 한편, *Candida versatilis* BH-91의 균체 고정화에 의한 gel내 및 발효 유출액의 생성수와 4-ethylguaiacol의 생성에 대한 실험결과는 Fig. 3과 같다. 4-Ethylguaiacol의 함량은 발효 시작부터 10시간까지는 증가하다가 발효 20시간 이후부터는 일정한 함량을 유지하였다. 재래식 간장의 발효에 있어서는 간장을 6개월 이상 양조후에도 간장의 주요 향기성분인 4-ethylguaiacol은 1~3 ppm 정도 생성된다고 하였다(5). 그러나 본 실험의 결과에서는 *C. versatilis*의 균체 고정화에 의한 간장의 발효시 5시간의 짧은 발효 경과시에도 4 ppm 정도 생성되었으며 발효 20시간 경과 후는 약 17 ppm 정도의 높은 함량이 생성되었다. 이런 결과는 고정화 균체에 의한 4-ethylguaiacol의 생성에 대한 연구와 비슷한 경향이었다(10, 20-22).

본 실험에서는 알코올의 생성은 발효 5시간부터 서서히 생성하다가 발효 96시간에는 최고치에 도달하였으며 Yamada 등(10)의 연구와 비슷한 경향이었다.

Column형 reactor에 의한 연속 발효

간장을 연속적으로 발효하기 위하여 회분법으로

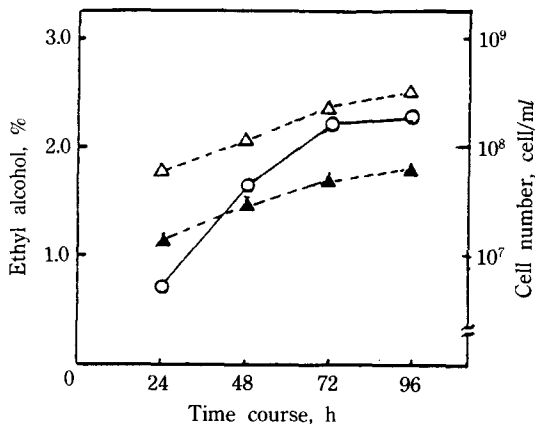


Fig. 2. Time course of alcohol fermentation by immobilized *Z. rouxii* BH-90 cells in the column type reactor. Condition were as follow: pH 5.0, temperature, 30°C, gas flow rate, air 0.06 vvm, substrate flow rate 20 ml/h. ethyl alcohol —○—, cell number: --△-- in gel, --▲-- in fermentation liquid.

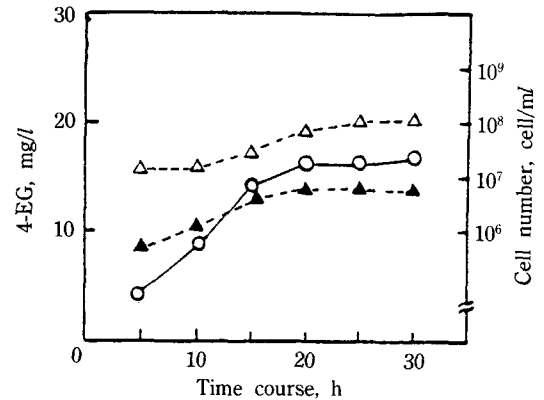
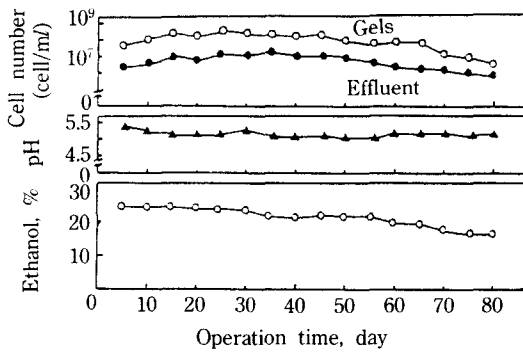


Fig. 3. Time course of 4-ethylguaiacol(4-EG) production by immobilized *C. versatilis* BH-91 cells in the column type reactor.

Condition were as follow: pH 5.0, temperature, 30°C, gas flow rate, air 0.06 vvm, substrate flow rate 20 ml/h.

4-ethylguaiacol —○—, cell number: --△-- in gel, --▲-- in fermentation liquid.

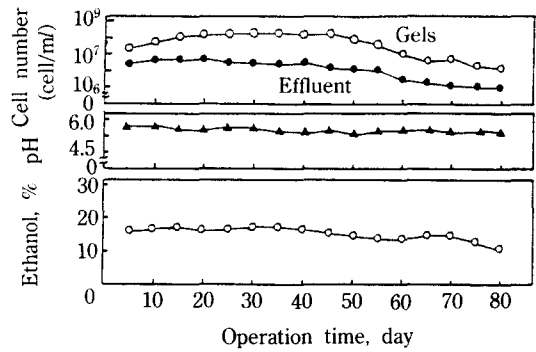


**Fig. 4. Time course of continuous soy sauce fermentation containing immobilized cells of *Z. rouxii* BH-90 in column type reactor.**

Conditions were as follow: pH 5.0, temperature, 30°C, gas flow rate, air, 0.06 vvm, substrate flow rate 20 ml/h.

구한 적정 발효조건 및 발효속도를 기초로하여 column형 reactor를 사용하여 연속발효를 실시하였다.

*Z. rouxii* BH-90의 고정화 균체에 의한 발효 중 알코올의 생성 실리카겔과 알긴산 소다의 혼합물을 고정화 담체로 하여 *Z. rouxii* BH-90의 고정화 균체에 의한 ethylalcohol의 발효를 실시하여 얻은 결과는 Fig. 4와 같다. 300 ml의 유리로 만든 column형 reactor에 고정화균체 gel을 200 g 충전한 후 하부에서 peristaltic pump로 발효원액을 시간당 20 ml씩 체류시간을 8시간으로 하여 공급하면서 실험하여 발효를 80 일간하였을 때의 알코올 생성, pH 및 생균수를 측정하였다. 알코올의 생성은 발효 시작일부터 30일까지는 2.3~2.5% 정도로 생성되었으며 30일 이후부터 55일까지는 2.1~2.2% 정도로 안정적으로 생성되었으며 60일에서 80일 사이에는 약간 감소하였다. 일반적으로 재래식 간장은 간장 숙성 3개월 이후부터 알코올이 생성되어 6개월 정도에서 2.0~2.5%의 알코올이 생성된다. *Z. rouxii* BH-90 고정화 균체에 의한 발효시 알코올의 생성은 발효시간부터 8일까지 최고 수준에 도달하였고 8일 이후로는 알코올의 함량이 약간 감소되는 경향이였으며 이는 고정화된 균체를 장기간의 발효과정 중 gel의 모양이 조금씩 붕괴되면서 gel내의 균체가 감소되고 장기간 공기의 공급으로 인하여 고정화 균체의 활성이 떨어지기 때문이다 (5, 22). pH는 발효 5일부터 80일까지 큰차이는 찾아볼 수 없었다. 발효기간 중 *Z. rouxii* BH-90의 생균수는 발효 5일부터 발효 50일 까지는 gel내에  $10^8$ /ml, 발효액은  $10^7$ /ml로 일정하게 유지하다가 발효 55일부터는 약간 감소하는 경향을 나타내었는데 이것은



**Fig. 5. Time course of continuous soy sauce fermentation containing immobilized cells of *C. versatilis* BH-91 in column type reactor.**

Conditions were as follow: pH 5.0, temperature, 30°C, gas flow rate, air, 0.06 vvm, substrate flow rate 20 ml/h.

장기간의 발효시 균체의 활성 저하가 원인일 것으로 추정된다.

Koseko 등(11)은 bioreactor를 이용한 *Z. rouxii*를 이용한 간장 발효를 80일간 실시하여 1.6~2.0%의 알코올을 얻었다고 하였고, 재래식 간장보다 훨씬 제조기간도 단축되었다고 하였다. Horitsu 등(6)은 효모의 고정화 균체에 의한 발효에서 알코올은 2.5% 정도 생성되었고 발효 50일 동안 알코올의 함량 변화는 거의 없었다고 하였다. Hamada 등(22)도 *Z. rouxii*의 고정화 균체의 air lift reactor에서 포도당을 첨가한 모델 실험에서 간장을 발효시켜 50일 동안 일정한 농도의 알코올이 생성되었다고 하였다. 발효 기간 중 *Z. rouxii* BH-90의 생균수는 발효 50일까지는 gel내에는  $1.0\sim4.0\times 10^8$ /ml, 유출 발효액은  $1.0\sim5.0\times 10^7$ /ml로 안정된 상태였으나, 발효 50일 이후부터 80일까지는 약간 감소하는 경향이였다. 이는 장기간 발효 중 gel의 붕괴와 고정화 균체의 활성이 저하되기 때문인 것으로 사료된다(10,11).

***C. versatilis* BH-91의 고정화 균체에 의한 간장 발효 중 4-ethylguaiacol의 생성**

간장 발효시 *C. versatilis* BH-91의 균체를 고정화하여 column형 reactor에 고정화균체 gel을 200 g 충전하고 발효원액은 시간당 10ml씩 주입하여 4-ethylguaiacol의 생성을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 4-ethylguaiacol의 함량은 5일부터 40일까지는 약간 감소하였으나 pH의 변화는 찾아볼 수 없었다. 고정화 균체의 발효 5일에서 40일 까지의 생균수의 변화는 gel내에  $1.6\times 10^7$ /ml~ $2.0\times 10^8$ /ml, 유출 발효액은 1.0

$\times 10^6/ml \sim 5.0 \times 10^6/ml$ 였고 50일에서 80일까지는 약간 감소하였다. 간장의 발효중 간장 특유의 향기인 4-ethylguaiacol은 *Torulopsis*속에 의하여 생성된다고 하였고(26, 27), 이는 간장의 품질에 큰 영향을 준다고 하였다. 野田 등(15)은 *C. versatilis* 균체의 고정화에 의한 4-ethylguaiacol의 생성은 발효 개시 24시간부터 생성되어 발효 7일째 최고치에 달하다가 약간 감소하였으나 16일간의 발효에서는 안정적으로 일정한 함량을 유지하였다고 보고한 바 있다. Horitsu 등(16)은 *C. versatilis*의 고정화 균체에 의한 4-ethylguaiacol은 발효 50일간 동안 2.3~2.5 ppm 정도로 일정량 생성하였다고 하였다. Hamada 등(22)은 *C. versatilis* 고정화 균체를 air lift reactor에 공기와 질소를 일정 비율로 주입하여 약 18mg/l의 4-ethylguaiacol을 생성하였다고 하였다. 본 연구에서는 1~3 ppm의 4-ethylguaiacol은 발효 5시간 정도면 충분히 생성될 수 있다. *C. versatilis* 고정화 균체로서 80일까지 장기간 발효하여도 4-ethylguaiacol의 생성에는 큰 지장이 없었다.

일반적으로 재래식 간장의 발효에서는 발효 6개월 이후에 1~3 ppm 정도 생성된다(20, 21). 그러나 *C. versatilis* BH-91의 고정화 균체에 의한 4-ethylguaiacol의 생성은 1~2시간 이내에 1~3 ppm의 생성이 가능하다. 이상의 결과로서 *C. versatilis*에 의한 4-ethylguaiacol의 생성은 실제 산업적으로 실용화가 가능한 것으로 생각된다.

**Table 1. Alcohols and Phenols production of soy sauce obtained by immobilization of *Z. rouxii* and *C. versatilis* cells**

	Ethyl Alcohol (%)	Alcohol (mg/l)					Phenols (mg/l)	
		A	B	C	D	E	F	G
Kogi Hydrolyzate	0.1	N.D	1.0	N.D	4.0	0.5	N.D	N.D
Fermented broth of <i>Z. rouxii</i>	2.8	2.1	8.8	2.0	28.0	30.0	N.D	N.D
Fermented broth of <i>C. versatilis</i>	2.6	4.6	4.9	N.D	18.6	27.4	18.0	trace
Raw Soy Sauce	2.5	2.5	6.4	3.0	10.3	7.2	4.3	trace

N.D: Not Detect

A: n-propylalcohol B: iso-butylalcohol C: n-butylalcohol  
D: isoamylalcohol E: 2-phenylethanol F: 4-ethylguaiacol  
G: 4-ethylphenol

### Column형 반응조의 발효에서 얻은 간장의 성분분석

**Alcohol 및 phenol성 성분 :** *Z. rouxii* BH-90와 *C. versatilis* BH-91의 균체를 각각 고정화하여 충전시킨 column형 반응조에서 발효하여 얻은 간장의 알코올 및 phenol 성분은 Table 1과 같다. *Z. rouxii* BH-90에 의한 발효액에서는 ethylalcohol 2.8%와 저비등점의 1가 alcohol인 n-propylalcohol 2.1 mg/l, isobutylalcohol 8.8 mg/l, n-butylalcohol 2.0 mg/l, isoamylalcohol 28.0 mg/l 및 2-phenylethanol 30 mg/l 생성되었다. 특히 isoamylalcohol과 2-phenylethanol은 재래식 간장보다 훨씬 많은 함량으로, 이것은 고정화 균체에 의한 특징으로 생각된다. 그리고 *C. versatilis*의 균체 고정화에 의한 4-ethylguaiacol이 재래식 발효에 의한 간장보다 약 4배 정도 높은 함량이었는데 이는 균체 고정화에 의한 발효의 특징이라고 생각된다. 재래식 간장의 발효액 중에는 유산균과 여러 종류의 효모에 의하여 숙성되면서 향기성분이 생성되는데 4-ethylguaiacol의 생성이 적은 것은 유산균과 각종 효모의 길항작용으로 인하여 생성이 억제되는 것이다.

**유리 아미노산의 함량 :** *Z. rouxii* BH-90와 *C. ver-*

**Table 2. Amino acids composition of soy sauce obtained by immobilization of *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells**

	Amino acids (mg%)	
	Fermented broth of <i>Z. rouxii</i> BH-90	Fermented broth of <i>C. versatilis</i> BH-91
Lys	230( 7.14)	228( 7.27)
His	84( 2.53)	81( 2.58)
Arg	284( 8.81)	280( 8.93)
Asp	272( 8.44)	270( 8.61)
Thr	220( 6.83)	191( 6.09)
Ser	210( 6.52)	210( 6.70)
Glu	410(12.72)	392(12.50)
Pro	120( 3.72)	102( 3.25)
Gly	104( 3.23)	113( 3.60)
Ala	180( 5.58)	182( 5.81)
Val	228( 7.07)	209( 6.67)
Met	63( 1.95)	60( 1.91)
Ile	191( 5.93)	184( 5.86)
Leu	340(10.54)	329(10.49)
Tyr	67( 2.07)	98( 3.13)
Phe	220( 6.83)	206( 6.57)
Total	3223 (100)	3135 (100)

**Table 3. Color intensity and color hue of soy sauce produced by immobilized of *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells**

	color intensity	color hue(O.D)		
		460	570	610
Fermented broth of <i>Z. rouxii</i> BH-90	0.533	0.342	0.140	0.051
Fermented broth of <i>C. versatilis</i> BH-91	0.565	0.353	0.150	0.062
Raw soy sauce	0.633	0.390	0.189	0.063

*satilis* BH-91의 균체를 각각 고정화시켜 얻은 간장 중의 유리 아미노산의 함량은 Table 2와 같다. *Z. rouxii* BH-90의 균체 고정화에 의하여 생성된 유리 아미노산 glutamic acid 12.72%, leucine 10.54%, arginine 8.81%, aspartic acid 8.84%, lysine 7.14%, 및 valine 7.07%로 전체 유리 아미노산의 약 55%를 차지하고 있다. 그리고 *C. versatilis* BH-91 균체의 고정화에 의한 발효시의 유리 아미노산도 glutamic acid 12.5%, leucine 10.49%, arginine 8.93%, aspartic acid 8.61%, lysine 7.27% 및 threonine 6.09%로 전체 유리 아미노산의 약 55%를 차지하고 있다. *Z. rouxii* BH-90와 *C. versatilis* BH-91의 고정화 균체의 발효시에 생성된 유리 아미노산의 함량은 매우 비슷한 경향을 나타내고 있다. 이러한 결과는 Noda 등(5)과 Koseko (11)이 보고한 유리 아미노산과 유사한 경향이었다.

**간장의 색조** : Table 3은 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91을 각각 고정화하여 발효하였을 때의 색도와 색조를 시판 장유와 비교하여 나타내었다. *Z. rouxii* BH-90의 고정화 균체의 색도는 0.533이었고, *C. versatilis* BH-91의 색도는 0.565로 큰 변화가 없었다. 색대도 큰 차이를 찾아볼 수 없었다. 생간장이 고정화 균체에 의한 발효액보다 색도와 색대가 다소 높은 것은 장시간의 발효중 공기와와의 접촉으로 인하여 착색이 다소 많이 형성된 것으로 사료된다. 이러한 결과는 Noda 등(5)의 결과와 비슷한 경향이었다.

**화입시 양금의 생성** : 화입은 효모의 살균, 향기의 숙성 및 부유물의 침전을 제거하기 위해서 하는 공정이다. *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91를 각각 고정화한 균체를 이용하여 대조 생간장과 비교한 결과는 Table 4와 같다. *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91로서 발효시킨 액과 3M-trichloroacetic acid (TCA)를 1 : 1로 혼합한 후 50°C 에서 3시간 반응시킨 결과 반응액의 탁도는 고정화 균체의 발효액과 큰

**Table 4. Sediment formed from soy sauce by heat treatment**

	Turbidity by TCA	Sediment by heat treatment	sediment (mg/l)
Koji hydrolyzate	16.0	+++	28
Fermented broth of <i>Z. rouxii</i>	18.3	+++	26
Fermented broth of <i>C. versatilis</i>	17.2	+++	24
Raw soy-sauce	24.2	++++	38

차이가 없으며, 이는 생간장의 TCA 탁도보다는 약간 적은 수치였고, 화입한 후의 부유물의 침전도 생간장에 비하여 낮은 수치였다.

Yamada 등(10)은 생간장의 부유 침전물은 화입온도와 시간에 비례한다고 하였으며 80°C 부근에서 가장 많은 침전물이 생성된다고 하였다. 본 실험의 결과는 Koseko(11)의 보고와 비슷하였다.

이상의 결과에 의하면 간장공장에서의 제조공정은 원료를 사입하여 알코올 발효 및 향기성분의 생성에 필요한 기간은 6개월~1년의 장기간이 필요한 것을 고려한다면, 재래식공정에 비하여 원료의 고온분해공정에서 약 1주일에 요하고 *Z. rouxii* BH-90의 균체 고정화에 의한 향기성분의 발효가 2~3일 정도 걸린다면 약 2주 정도면 간장을 만들 수 있으므로 균체의 고정화에 의한 발효법은 대단히 효과적이라고 할 수 있다.

## 요 약

간장의 숙성 발효를 위한 방법으로 간장 발효에 관여하는 효모를 고정화하여 이를 column형 reactor에 충전하여 국 고온분해액을 주입하면서 연속적으로 발효를 시도하였다. 균체의 고정화 담체로는 실리카겔 : 3% 알긴산소다(1 : 1의 비율) 혼합액을 사용하여 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91을 각각 고정화하여 column형 reactor에 충전하여 발효시킨 결과 *Z. rouxii* BH-90의 균체 고정화 column형 reactor에서는 발효 96시간 경과시 ethyl alcohol이 2.8% 생성되었으며 *C. versatilis* BH-91의 균체 고정화 column형 reactor에서는 4-ethylguaiacol은 18 mg/l가 생성되었다.

Column형 reactor에서 *Z. rouxii* BH-90 고정화 균체의 연속적 숙성 발효시 시작일로부터 30일까지는 ethyl alcohol이 2.5~2.8%로 거의 일정하게 생성되

었고, 40~80일에는 약간 감소하였다. *C. versatilis* 고정화 균체의 발효에서는 40일까지는 4-ethylguaiacol의 함량이 16~18 mg/l로 거의 일정하게 생성되었으나 발효 45일 이후 80일까지는 약간 감소하였다.

발효 종료 후의 제품을 분석한 결과 *Z. rouxii* BH-90의 발효액에서는 2.8%의 ethyl alcohol이 생성되었고, *C. versatilis* BH-91의 발효액에서는 18 mg/l의 4-ethylguaiacol이 생산되었다. 유리 아미노산의 함량은 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91의 각각의 발효액에서는 거의 비슷한 함량이었고, glutamic acid, leucine, arginine, aspartic acid, lysin 및 valine이 전체 아미노산의 50% 이상을 차지하고 있었다.

### 참고문헌

- 이태수, 이석진. 1970. 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구(제 1보). 한국농화학회지 **13**: 97-102.
- 이택수, 이석진, 신보규. 1970. 간장 발효에 관여하는 효모에 관한 연구(2보). 한국농화학회지 **13**: 171-176.
- 조덕현, 이우진. 1970. 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구. 한국농화학회지 **13**: 35-40 (1970).
- 이한창. 1963. 간장 효모에 대하여. 한국미생물학회지 **1**: 48-53.
- Noda, Y., K., Ohba, H., Kusuda and M., Nakada. 1989. studies on soysauce by bioreactor. *J. Brew. Soc. Japan* **15**: 177-190.
- Horitsu, M., Y. Maseda and K. Kawai. 1990. A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 295-302.
- Horitsu, H., M.R., Wang and K. Kawai. 1991. A modified process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. *Agric. Biol. Chem.* **55**: 269-271.
- Fukushima, Y., K., Okamura, K., Imai and H., Motai. 1988. A new immobilization technique of whole cells and enzymes with colloidal silica and alginate. *Biotechnol. Bioeng.* **32**: 584-594.
- Hamada, T., A., Sugishita and H., Motai. 1991. Continuous production of 4-ethylguaiacol by immobilized cells of salt tolerance *Candida versatilis* in an air lift reactor. *J. Ferment. Bioeng.* **69**: 166-169.
- Yamada, T., S., Koseko, K., Tsubouchi and K., Hisamatsu. . Studies on soysauce production by bioreactor. *Bull. Mie prefectural Institute of Technol.* **2**: 71-79.
- Koseko, S., M. Hisamatsu and T. Yamada. Studies on soysauce production by Bioreactor. *Bull. Mie Prefectural Institute of Technology*, **5**: 187-196.
- 류병호, 조경자, 채영주, 박춘옥. 1993. 간장의 속성 제조를 위한 간장국의 고온 분해. 한국영양식량학회 **22**: 215-221.
- 조경자, 박춘옥, 채영주, 김동석, 류병호. 1993. 간장의 덧에서 분리한 *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90과 *Candida versatilis* BH-91의 동정 및 특성. 경성대학교논문집 **14**: 179-191.
- Hamano, M., A., Okuhara, Y., Aoyama and N. Saito. 1971. Quantitative determination of acetic acid and ethyl alcohol in soy sauce with gas liquid chromatography. *Seasoning Science(Japan)* **18**: 72-78.
- Yokosuka, T., M. Sasaki, N., Nunomura and Y. Asao. 1980. Aroma of soy sauce. *J. Brew. Soc. Japan* **75**: 717-728.
- 류병호, 이병호. 1981. 페당밀 카라멜 색소제조시 첨가제가 색소의 성상에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 **10**: 93-101.
- Spackman, D.H., W.H. Stein and S. Moore. 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.* **30**: 1190-1198.
- 조경자. 1991. Column형 Reactor를 이용한 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91의 고정화에 의한 간장의 연속적 속성발효. Pp. 1-83, 효성여자대학교. 박사학위청구논문.
- Yokotsuka, T., M. Sasaki, N. Nunomura and Y. Asao. 1980. Aroma of soy sauce. *J. Brew. Soc. (Japan)* **75**: 717-823.
- Yokotsuka, T. 1985. Soy sauce biochemistry. *Advances in food research.* **30**: 195.
- Osaki, K., Y., Okamoto, T., Akao, S. Nagata and H. Takamatsu. 1985. Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* **50**: 1289-1292.
- Hamada, T., T. Ishiyama and H. Motai. 1989. Continuous fermentation of soy sauce by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an airlift reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 346-350.
- B.H. Ryu and K.D. Nam. 1987. Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells. 한국산업미생물학회지 **15**: 248-251.
- Durand, G. and J.M. Navrro. 1978. Immobilized microbial cells. *Process Biochem.* **B**: 14-23.
- Tanaka, H., M. Matsumura and I.A. Veliky. 1984. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate beads. *Biotechnol. Bioeng.* **26**: 53-58.
- Yokosaka, T., T., Sakasai and T. Asao. 19 . Studies on the flavous substances in shoyu. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* **41**: 428-423.
- Asao, Y., T. Sakasai and T. Yokotsuka. 1967. Studies on the Flavorous substances in shoyu. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **1**: 434-441.

(Received June 10, 1993)