

製品간장에서 分離한 產膜酵母에 關한 研究

朱 永 河 · 劉 太 鍾* · 柳 洲 鈜**

三星 食品工業株式會社 研究室

*高麗大學校 農科大學 食品工學科

**延世大學校 理工大學 食品工學科

(1975년 3월 3일 수리)

Studies on the Film forming Yeasts Isolated from Commercial Soy Sauce

by

Young-Ha Chu, Tai-Jong Yu* and Ju-Hyun Yu**

Lab. of Saim pyo foods Ind. Co., Ltd.

Department of Food Technology, College of Agriculture Korea University and*
Department of Food Engineering, College of Science and Engineering, Yonsei University**

(Received March 3, 1975)

Abstract

This study was conducted (1) to isolate the film-forming yeast from the commercially available soy sauce, (2) to identify the state of soy sauce fermentation by the use of yeasts, (3) to confirm characteristics of yeasts. The result were as follows.

1. These yeast strains in the soy sauce fermentation test showed full fermentation of whole sugar content, reduction of the pure extract and relative reduction in total nitrogen. Soy sauce color was somehow faded to lower the stability of soy sauce.
2. In anti-fungal activity test butylparaben at a higher level 60 ppm., sodium propionate 2.400 ppm, sodium benzoate 800 ppm., menadion 165 ppm, showed their anti-fungal effect, while alcohol did not show the effect in the 3% additive group.
3. The optimum sodium chloride concentration for these strains in the 2% G.Y.P. medium was 5% and optimum temperature was 30°C. The extinction temperature was 62°C for strain No-1 and No-3, and was 65°C for No-2 and No-4.
4. The film-forming soy sauce turned out in the gas chromatogram to possess much flavor of low boiling point as compared with the standard. These flavors were considered due to flavor spoilage of the soy sauce.
5. These isolated yeasts were identified *Saccharomyces rouxii* (film-forming yeast) in the Lodder's taxonomic study.

序 論

간장의 產膜酵母에 關해서 齊藤⁽¹⁾가 產膜酵母인 *Zygosaccharomyces japonicus* 및 *Pichia farinosa*, *Mycoderma*

및 *Torula* 屬菌株의 菌學的研究를 行한바 有고 西村⁽²⁾는 日本 全國에서 蒐集한 約 300種의 *Torula* sp., nov. sp. 8種, *Pichia moniliiformis* nov. sp. *Mycoderma saj-* nov. sp. *Pichia ovata* nov. sp. 의 11種의 產膜酵母를

取하여 gas chromatography 用 試料로 하였다.

Gas chromatography 條件은 Table 2 와 같으며 確認用標準物質은 *n*-pentane 에 稀釋하여 gas chromatography に 注入, 保持時間求하고 未知物質의 推定은 HOFF⁽¹⁴⁾ 들의 syringe method 를 應用하였다.

實驗結果 및 考察

1. 產膜酵母의 分離 및 酸酵

寒天平板培養法을 利用하여 市販 製品간장에서 分離

한 34菌株의 酵母量 鹽分 10%, 糖分 5%의 麵汁에서 酸酵試驗을 行하여 產膜形成能과 酸酵力を 實驗하였다. 이 實驗에서 產膜을 形成하고 酸酵力이 強한 酵母 4菌株를 選擇하여 本 實驗에 使用하였다. 葡萄糖으로 糖分濃度를 8.5%로 調整한 麵汁에서 이들 酵母의 酸酵實驗을 實施하였다. 그 結果는 Table 3 과 같다. 酸酵後 6日에 平均 2.58%의 最大 알코올 生成을 보였고, 殘糖은 0.72%로 糖酸酵率이 平均 91.5%에 이르렀다. 그 後부터는 糖酸酵率은 比較的 緩慢하였으나 生成된 알코올이

Table 3. Change of composition in Koji autolyzate by the yeasts

Strain No.	days	AIC. (%)	R-S (%)	Ratio (%)	T-A (%)	A-A (%)	NH ₂ -N (%)	Growth (O.D.)
1	6	2.2	0.77	90.9	2.48	0.04	0.01	0.47
	12	0.61	0.56	93.4	3.64	0.05	0.02	0.83
2	6	2.91	0.82	90.4	3.12	0.03	0.03	0.42
	12	0.21	0.41	95.0	4.09	0.05	0.05	0.76
3	6	2.51	0.45	94.7	3.41	0.02	0.02	0.51
	12	0.35	0.12	98.6	4.28	0.04	0.05	0.80
4	6	2.71	0.84	90.1	3.08	0.02	0.04	0.54
	12	0.45	0.63	92.6	4.83	0.02	0.07	0.81

Alc: Alcohol, R-S: Reducing sugar, Ratio: Fermentation ratio for the total sugar, T-A: Total sugar, A-N: Amino nitrogen, NH₂-N: Ammonium nitrogen, Growth: Photometric turbidity at 660 m μ .

急格히 減少하기 始作하여 14日경에는 모두 消失되는 現象을 나타냈다. 이 酵母들은 酸酵開始 2~3日째부터 培養液上面에 얇은 皮膜을 形成하기 始作하여 3~5日째는 完全히 주름잡힌 皮膜層을 이루었다. 이中 NO-2菌 實驗區와 간장釀造에 有用酵母로 알려져 있는 간장部에서 分離된 高濃度食鹽耐性의 非產膜酵母인 *Saccharomyces rouxii* Ta⁽¹⁵⁾와 比較實驗한 酸酵經過는 Fig. 1과 같다. 이들 酸酵液의 pH變化는 없었으나 分離된 No.2菌 接種區는 6日만에 2.91%로 最大的 알코올 含量을 보였고 14日만에 含有糖을 安全히 酸酵시켰다. 酸酵後期에는 生成알코올을 全部 賽化한 反面, *Saccharomyces rouxii* Ta 接種區는 酸酵後 24日에 4.6%의 最大알코올 값을 나타내었으며 酸酵後期까지 이 數值을 계속 雜持하였다. 以上과 같이 產膜酵母는 非產膜酵母에 比해 糖酸酵力과 알코올 賽化能이 強함을 알 수 있다.

2. 產膜酵母의 生育에 미치는 化學藥品의 影響

防腐劑로 알려져 있는 化學藥品을 使用하여 產膜酵母의 生育抑制에 關하여 實驗하였다. butylparaben(日本東京化成製 試藥)은 45 ppm 實驗區에서 20日만에 酵母가 生育하였으나 60 ppm에서는 30日以上 經過하여도 酵母生育은 보이지 않았고 日本和光製 化學純品은 80 ppm區에서도 効果가 없었다. sodium benzoate (E. Merk 製 試藥)는 600 ppm에서 10日만에 酵母生育을

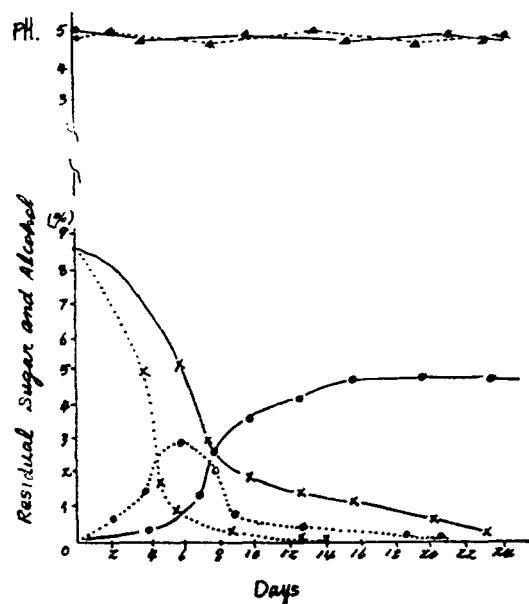


Fig. 1. Fermentation progress of the yeasts.

..... : Strain NO-2

— : *Saccharomyces rouxii* Ta

× : Residual sugar

● : Alcohol

▲ : pH

보인 반면 900 ppm 以上에서는 抑制되었다. 또한 sodium propionate(日本半井 化學製, 試薬)는 2400 ppm 以上에서 完全히 酵母의 生育이 抑制되었고 menadion (E. Merk 製試薬)은 165 ppm 이상, potassium sorbate(日本 Inuiu 制 試薬)는 500 ppm 以上, sorbic acid(Hoechst 製 試薬)는 300 ppm 以上 實驗區에서 酵母의 生育이 完全히

抑制된 反面 에틸 알코올(E. Merk 製 試薬)은 3% 添加區에서도 酵母의 生育이 旺盛하였다(Table 4).

江口⁽¹⁶⁾들은 간장中에 含有된 鹽分, 總窒素, 에틸알코올은 防腐力이 있고 總窒素와 알코올이 特히 效果가 있음을 報告하였다. 鹽分을 一定하게 한 경우의 防腐效果는 總窒素濃度와 알코올濃度와의 相關關係가 크고 特히

Table 4. Effect of food preservatives on growth of the film yeasts

No. of strains		1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 4
Preservatives	Days	5	10	15	20	25	30
Butylparaben	30	----	++++	++++	++++	++++	++++
	45	----	----	----	+++	+++	+++
	60	----	----	----	----	----	----
Sodium benzoate	400	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	600	----	+++	+++	+++	+++	+++
	800	----	----	----	----	----	----
Sodium propionate	1600	----	+++	+++	+++	+++	+++
	2000	----	----	+-+	+-+	+-+	+-+
	2400	----	----	----	----	----	----
Menadione	135	-++	+++	+++	+++	+++	+++
	150	----	+++	+++	+++	+++	+++
	165	----	----	----	----	----	----
Potassium sorbate	300	-++	-+-	+++	+++	+++	+++
	400	----	----	+++	+++	+++	+++
	500	----	----	----	----	----	----
Sorbic acid	100	----	++-	+++	+++	+++	+++
	200	----	----	+-+	+++	+++	+++
	300 (%)	----	----	----	----	----	----
Alcohol	1.0	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	2.0	-++	+++	+++	+++	+++	+++
	3.0	----	+++	+++	+++	+++	+++

+ : Growth, - : None growth.

總窒素 1.5%, 實驗區에서는 그 效果가 強하고 알코올 20%에서 完全히 防腐되었다고 報告하였다. 本實驗에서 는 총질소 1.5%, 알코올 4.0%의 添加區에서도 產膜酵母가 生育하였고 알코올냄새와 쓴맛을 나타내었다. 이와같이 에틸알코올에 對한 生育의 差異가 있는 것으로 보아 江口들이 實驗한 產膜酵母와는 性質이 一部가 다른을 알 수 있었다.

3. 產膜酵母에 依한 간장成分의 變化

產膜酵母에 依한 간장成分 및 香氣에 미치는 影響을 檢討할 目的으로 分離酵母를 接種하여 15日間 酵醇시켜 殘糖, 알코올, 固形分, 色 및 香氣成分의 變化를 酵醇日數別로 調査하였다. 初期에는 糖의 消費와 함께 알코올의 增加를 보였고, 색갈의 低下, 固形分의 激減을 나

타내었으며 酵醇後期에는 알코올의 資化現象으로 알코올이 모두 消失되었다. 總窒素도 多小 줄어든 경향을 보였다. 암모니아性窒素과 아미노性窒素의 含量은 別差異를 나타내지 않았다(Table 5). 酵醇 15日이 經過한 皮膜 간장의 上部空間까스의 gas chromatogram은 Fig. 2와 같다.

Chromatogram에 나타난 挥發性物質의 peak는 沸點 77°C(에칠알콜)以下인 物質이 標準 간장에서 4種, 皮膜形成 간장(No.-3 菌接種區)에서 7種이었고, 78°C 以上인 物質이 투試料에서 모두 3種이었다. 이들 挥發性香氣成分은 皮膜形成간장이 標準간장에 比해 量의으로도 많았다. 皮膜形成간장의 挥發性分은 升溫 36°C에서 acetaldehyde, 40.8°C에서 acetone 46.6°C에서 ethyl

Table 5. Analysis of the soy sauce in fermentation

Strains	Days	T-N (%)	R-S (%)	Alc (%)	Ex (%)	Color	pH	NH ₃ -N (%)	A-N (%)
Standard	1-15	1.39	3.0	0.5	13.03	4.7	4.7	0.24	0.62
NO-1	5	1.36	1.53	0.34	11.84	4.3	4.7	0.25	0.62
	10	1.35	—	0.47	10.25	3.9	4.7	0.26	0.58
	15	1.34	—	0.14	10.20	4.0	4.8	0.25	0.62
NO-2	5	1.37	1.41	0.35	11.34	4.45	4.8	0.25	0.64
	10	1.35	—	0.48	10.99	4.3	4.7	0.26	0.58
	15	1.34	—	0.05	10.84	4.1	4.8	0.25	0.63
NO-3	5	1.36	1.46	0.58	11.58	4.18	4.7	0.25	0.62
	10	1.35	—	0.52	11.44	4.1	4.7	0.25	0.56
	15	1.33	—	0.07	10.97	4.1	4.8	0.24	0.62
NO-4	5	1.35	0.78	0.44	11.24	4.45	4.7	0.25	0.62
	10	1.33	—	0.32	10.72	4.9	4.8	0.25	0.58
	15	1.34	—	0.02	10.63	4.1	4.8	0.25	0.57

T-N:Total nitrogen, R-S:Reducing Sugar,
Alc:Alcohol, Ex:Extract, NH₃-N:Ammonium nitrogen,
A-N:Amino nitrogen,
Color:Photometric turbidity at 660 m μ .

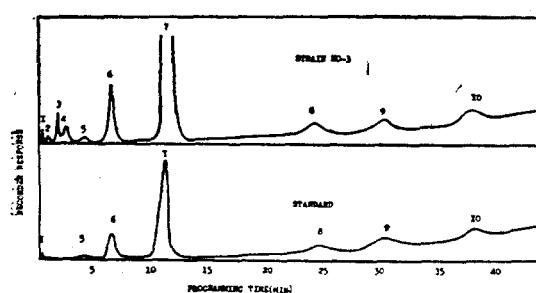


Fig. 2. Gas liquid chromatograms of volatile components.

Peak identities: 1, 2, 3, Unknown, 4. Acetaldehyde,
5. Acetone, 6. Ethyl acetate, 7. Ethyl alcohol, 8. Isobutyl alcohol, 9. Isoamyl acetate, 10. Isoamyl alcohol.
For conditions, see Table 2.

acetate, 62.2°C에서 ethyl alcohol, 102.4°C isobutyl alcohol, 120°C以上에서 isoamyl acetate, isoamyl alcohol이 確認되었고 peak 1, 2, 3은 未確認物質이다. 잘 익은 바나나의 主된 香氣成分은 isoamyl alcohol, isobutyl alcohol 및 그 ester 들임이 밝혀졌고^(17,18) 이들成分은 成熟過程에 合成되어 바나나의 香氣와 風味에 寄與하는 것이라고 McCarty⁽¹⁹⁾ 들이 밝힌바 있다. Moshonas⁽²⁰⁾ 들은 葡萄抽出物에서 32種의 挥發性香成分을 分離, 確認하였는데 이 가운데는 acetaldehyde, acetone,

ethyl acetate, isobutyl alcohol, isoamyl alcohol等의 香氣成分이 包含되어 있다. 本實驗에서 確認된 皮膜形成간장의 香氣成分은 低沸點의 物質이 標準간장에 比해 많으며 產膜酵母의 生育이 活發한 夏節期에는 常溫에서 도 挥發이 可能하다. 따라서 皮膜形成간장의異臭는 이들 低沸點의 香氣成分에 起因하는 것으로 生覺되며 未確認된 香氣成分 및 그特性에 對한 研究가 더進行 되어야 할 것이다.

4. 分離酵母의 性質 및 同定

1) 生理實驗

生理實驗用 培地로는 醬汁, Hayduck液 Hennenberg液 3種, Knopp液, Mayer液, 奶芽汁等을 使用하였는데 이들 培地에서는 培養初期부터 產膜을 形成하여 菌體量을 檢量하기가 困難하였다. 그래서 Lodder들이 菌體形態検査에 使用한 2% G.Y.P.液을 別用하였다.

(1) 最適食鹽濃度

食鹽濃度를 0~25%로 調節한 2% G.Y.P.液에서 分離酵母의 生育에 미치는 食鹽의 影響을 確認하고자 實驗하였다. 食鹽濃度 5%에서 酵母의 生育이 가장 旺盛하였고 食鹽無添加區와 10%添加區는 그보다 生育이 떨어졌으나 15%以上의 濃度에서는 酵母의 生育이 抑制되었다.

(2) 最適培養溫度

分離酵母의 最適培養溫度를 確認하기 위하여 10~37°C에서 이酵母들의 生育狀態를 實驗하였다. 10°C에서 25°C까지 培養溫度가 높아짐에 따라서 酵母의 生育이

以上의 實驗結果 分離한 產膜酵母들은 Lodder 의 份類法에 따라서 *Saccharomyces rouxii* (film-forming yeast)로 同定 되었다.

要 約

產膜酵母가 形成된 製品간장에서 產膜生成과 酵酶力이 強한 酵母를 分離하고 Lodder 들의 酵母分類法에 따라 *Saccharomyces rouxii* (film forming yeast)로 同定하였으며 이酵母들의 酵酶現象 및 生理的 特性은 다음과 같았다.

1. 간장酵酶實驗에서 간장中에 含有된 糖分을 모두 酵酶시켜 固形分은 減少되고 總窒素, 色度를 減少시켰다.
2. 防腐力實驗에서 butylparaben 은 60 ppm, sodium benzoate 800 ppm, sodium propionate 2,400 ppm, menadione 165 ppm, potassium sorbate 500 ppm, sorbic acid 300 ppm 以上의 濃度에서 이들菌의 生育이 抑制되었고 에칠팔룰 添加區에서는 3%에서도 防腐力이 없었다.
3. 2% (w/v) glucose·yeast extract peptone⁽¹²⁾ 培地에서 이들菌의 最適食鹽濃度는 5%, 最適培養溫度는 30°C, 死滅溫度는 NO-1, 3菌이 62°C (10分間 殺菌處理), NO-2, 4菌이 65°C 이었으며 最適 pH 는 5.0이었다.

4. Gas chromatography에 依한 皮膜간장의 香氣成分은 標準간장에 比해 低沸點의 物質이 많으며 이 成分들이 간장의 風味劣化에 寄與하는 것으로 생각되었다.

本實驗을 進行하는데 많은 協助를 해주신 晟亞食品工業株式會社 朴奎會社長, 朴承宰 專務理事, 金廷奎 常務理事와 研究室 職員들께 謝意를 表하는 바이다.

參考文獻

- 1) 斎藤賢道: 日本醱酵菌調査報告, 第 1回(1905).

- 2) 西村寅三: 日本內國稅叢纂, 45, 46, 47號(1910).
- 3) 高橋眞造, 濑川又夫: 日本農學會報 112號(1911).
- 4) 石丸義夫: 日釀學, 13, 295 (1935).
- 5) 茂木: 日本農藝化學會誌 15, 1221 (1939).
- 6) 茂木·中島, 安藤: 醐酵工學雜誌(日本) 29, 317 (1951).
- 7) 茂木, 中島, 安藤: 醐酵工學雜誌(日本) 30, 49 (1952).
- 8) 茂木, 中島, 安藤: 醐酵工, 酢醸誌(日本) 30, 152 (1952).
- 9) 茂木, 中島, 安藤: 醐酵工學雜誌(日本) 30, 194 (1952).
- 10) 大西, 茂木, 醐酵工學雜誌(日本) 30, 194 (1952).
- 11) Etchel, T. L. and Bell, T.A.: *Food Technol.* 4, 77(1950).
- 12) J. Lodder: *The Yeasts*, North-Holland Publishing Company, Amsterdam (1970).
- 13) 日本醬油技術會: 醬油分析法
- 14) Hoff, J.E. and Feit, E.E.: *Anal. Chem.* 36, 1002 (1900).
- 15) 李澤守, 李錫健, 朱永河: 韓國農化學會誌 14, 117 (1971).
- 16) 江口卯三夫, 沼上恒八: 醬油と技術 No. 661
- 17) Issenberg, P. and Wick, E.L: *Agr. Chem.* 11, 2 (1963).
- 18) McCarthy, A.I., Wyman, H. and Palmer, J.K: *J. Gas chromatog.* 2, 121 (1964).
- 19) McCarthy, A.I., Palmer, J.K., Shaw, C.P. and Anderson, E.E.: *J. Food sci.* 29, 279 (1963).
- 20) Moshonas, M.G., et al: *J. Agr. Food Chem.* 19, 119 (1971).
- 21) 李澤守, 李錫健: 韓國農化學會誌, 13, 193 (1970).