

## Saccharomyces rouxii에 의한 아미노산 간장의 알코올 발효

최수복·권오성·남희섭·신재익·양한철\*

농심기술개발연구소, \*고려대학교 식품공학과

### Optimization for the Alcohol Fermentation of Hydrolyzed Vegetable Protein(HVP) Soy Sauce by *Saccharomyces Rouxii*

Soo-Bok Choi, Oh-Sung Kwon, Hee-Sop Nam, Zae-Ik Shin and Han-Chul Yang\*

Research and Development Center, Nong Shim, Kunpo

\*Department of Food Technology, Korea University, Seoul

#### Abstract

In order to improve the flavor quality of a soy sauce, hydrolyzed vegetable protein(HVP), it was subjected to ethanol fermentation by *Saccharomyces rouxii* and the effect of several environmental factors on the alcohol fermentation of *S. rouxii* in HVP was investigated. The NaCl content of HVP affected significantly on the growth of *S. rouxii*, showing growth inhibition above the value of 6%(w/v). The growth of *S. rouxii* was not inhibited by the coloring materials of HVP. The proper initial concentration of glucose for the growth of the yeast was ranged from 15%(w/v) to 25%(w/v). The optimal temperature for the growth and alcohol production was 25°C. The growth increased with the increasing rate of aeration, while alcohol concentration of fermented HVP showed its maximum value of 4.2%(w/v) at the aeration rate of 0.5 vvm.

Key words: hydrolyzed vegetable protein, alcohol fermentation, *Saccharomyces rouxii*, temperature, aeration rate

#### 서 론

단백질 원료를 산분해시켜 만드는 아미노산 간장은 양조간장에 비해 제조 기간이 짧고 단백질 원료 이용율이 높은 장점이 있는 반면 맛이 단조롭고 강한 초취가 나는 단점을 지니고 있다<sup>1, 2)</sup>. 양조간장이 아미노산 간장에 비해 향미가 우수한 이유 중의 하나는 양조간장에는 알코올이 적절한 농도가 존재하지만 아미노산 간장에는 알코올이 전혀 없기 때문인 것으로 알려져 있다<sup>3)</sup>. 따라서 일본에서는 양조간장에 사용되는 koji를 아미노산 간장에 첨가하여 숙성, 발효시키는 신식 간장 개발에 대한 연구가 오래전부터 진행되어 왔으며<sup>4, 5)</sup>, 한편으로는 아미노산 간장의 초취를 제거하고 간장의 맛과 향을 상승시킬 목적으로, 아미노산 간장을 직접 알코올 발효시키는 연구가 일부 진행되어 왔다<sup>6, 7)</sup>.

간장에서 알코올 발효에 중요한 역할을 하는 미생물은 *Saccharomyces rouxii*로<sup>8)</sup>, 지금까지 *S. rouxii*의 생육 및 알코올 발효특성에 관한 연구는 NaCl 농도<sup>9, 10)</sup>, 홍질소<sup>11, 12)</sup>, 탄소원 농도<sup>13)</sup> 및 질소원의 종류<sup>14)</sup>에 따른 영향

등이 연구되었으나 알코올 발효와 아미노산 간장의 풍미에 직접적인 영향을 줄 것으로 예상되는 발효온도 및 통기속도에 대한 연구는 없었다. 따라서 본 연구에서는 아미노산 간장의 향미 증진을 위해 알코올 발효를 시킬 때 아미노산 간장 중에 존재하는 NaCl, 색소물질 등 아미노산 간장의 구성물질이 *S. rouxii*의 생육에 미치는 영향과 초기 발효기질 농도, 발효온도, 통기속도 등의 환경적 요인이 *S. rouxii*의 알코올 생산성에 미치는 영향을 검토하였다.

#### 재료 및 실험방법

##### 사용균주

본 실험에 사용한 균주는 한국종균협회에서 분양받은 *Saccharomyces rouxii* IFO 1812로, YM 한천배지(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%, agar 2%)에서 32주마다 한번씩 계대배양하여 사용하였다.

##### 아미노산 간장의 제조

아미노산 간장은 탈지대두 1.2 Kg에 20% HCl 1.5 l를 가하여 102°C 에서 18시간 동안 가수분해한 후 NaCO<sub>3</sub>로 pH 5.2가 되게 중화한 다음 여과하여 제조하였다. 아미

Corresponding author: Zae-Ik Shin, Research and Development Center, Nong Shim, 203-1, Dangeongdong, Kunposi, Kyungkido 435-030, Korea

**Table 1. General composition of raw HVP**

Total nitrogen	3.10%
Amino nitrogen	1.79%
NaCl	21.50%
Pure extract	36.61%
pH	5.2
Color <sup>1)</sup>	7.6
Reducing sugar	0.03%

<sup>1)</sup>Color; total optical density at 500 nm

노산 간장의 일반성분은 표 1과 같다.

**배지 및 발효조건**

아미노산 간장, glucose를 각각 따로 121°C 에서 15분간 가압 멸균하여 500 ml Erlenmyer flask에 최종 농도가 각각 10%, 5% 되게 100 ml을 넣고 *S. rouxii*를 1~2 백금이 접종하여, 30°C, 200 rpm으로 24시간 진탕 배양하여 전 배양액으로 사용하였다. 본 배양은 아미노산 간장의 조성이 미치는 영향을 관찰하기 위해서는 전 배양과 같은 조성의 배지에 실험목적에 따라 NaCl을 농도별로 첨가한 후 전 배양액 5%(v/v)를 첨가하여 30°C, 150 rpm으로 진탕배양하였으며, 발효온도가 미치는 영향을 관찰하기 위하여서는 상기의 본 배양과 같은 조건에서 배양 온도를 변화시켜가며 진탕배양하였다. 또한 glucose 농도 및 통기속도의 영향을 관찰하기 위해서는, 아미노산 간장, glucose를 각각 따로 121°C 에서 20분간 가압 멸균하여, working volume 2.5 l의 jar fermentor(BIOFLO MODEL II, NEW BRUNSWICK SCIENTIC Co., U.S.A.)에 최종 농도가 각각 10%, 5% 되게 넣은 배지를 기본으로 하여 glucose의 농도 및 통기속도를 변화시켜가며 교반속도 500 rpm의 조건에서 배양하였다.

**아미노산 간장의 성분분석**

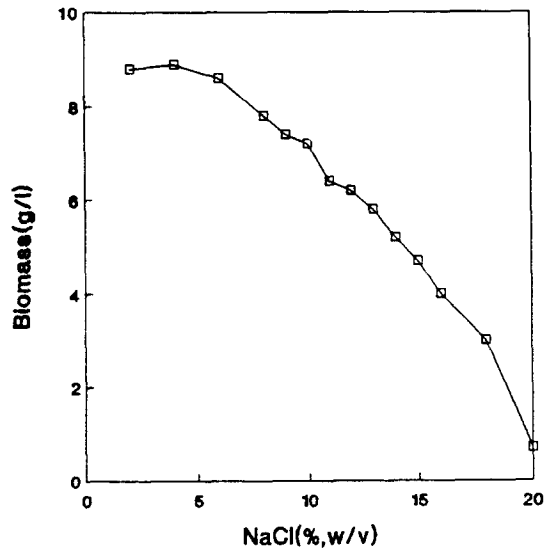
총질소, 아미노태 질소, 순고형분, 비중, NaCl 등의 분석은 장유시험법<sup>(9)</sup>에 의하였다.

**균체 생육 및 잔존당 측정**

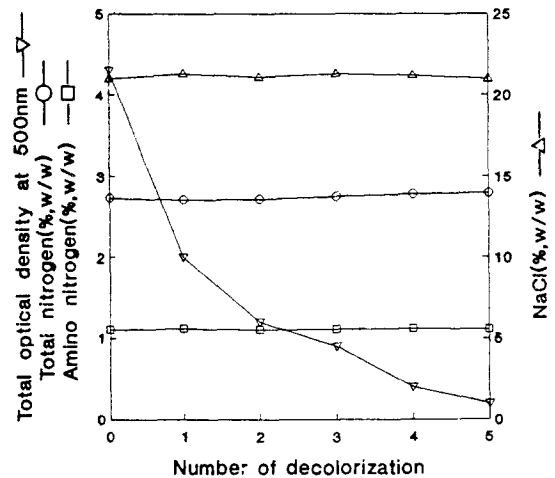
건조 균체량은 105°C 건조법<sup>(10)</sup>으로, 잔존당의 농도는 dinitrosalicylic acid법<sup>(11)</sup>으로 550 nm에서 측정하였으며 glucose를 표준으로 환산하였다.

**알코올 측정**

알코올 정량은 발효액 5 ml을 7,000×g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 얻은 후, 이 상등액을 gas chromatography(Hewlett Packard 5890 II; FID; steel column 6ft×1/8 inch, 10% carbowax 20 M; column 70°C, injector 170°C, detector 210°C; N<sub>2</sub> gas 30 ml/min)를 이용하여 분석하였다.



**Fig. 1. Effect of NaCl on the growth of *S. rouxii* in 5% glucose medium**



**Fig. 2. Decrease of total optical density of HVP treated with the activated carbon**

**결과 및 고찰**

아미노산 간장 성분이 *S. rouxii*의 생육에 미치는 영향  
아미노산 간장 제조과정 중 사용된 염산을 중화하는 과정에서 다량의 NaCl이 생성되며 이것이 *S. rouxii* 생육에 미치는 영향을 보았다. 10%의 아미노산 간장과 5%의 glucos를 함유한 배지에 NaCl을 20%까지 첨가하여 5일간 배양한 결과를 Fig.1에 나타내었다. 6%까지는 8.5 g/l로 균체생육에는 거의 영향을 주지 않았다. 6% 이상의 농도에서는 염의 농도가 높을수록 균체량은 감소하였으나 20%의 농도에서는 생육할 수 있었다. 이 결

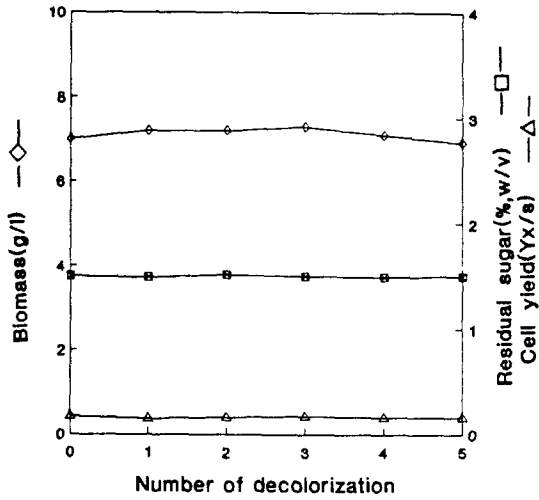


Fig. 3. Effect of decolorized HVP on the growth of *S. rouxii*

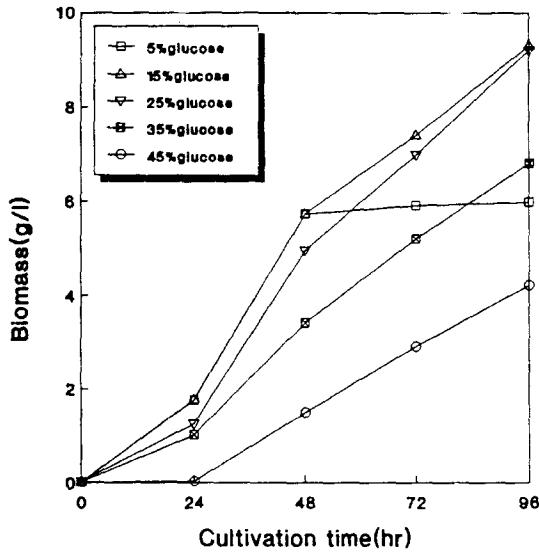


Fig. 4. Effect of glucose concentration on the growth of *S. rouxii*

과는 한 등<sup>(5)</sup>의 18%의 염농도에서도 균체 생육이 가능한 것과 유사한 결과를 나타내었다.

아미노산 간장의 색소물질이 *S. rouxii* 생육 저해에 미치는 영향을 보기 위해 아미노산 간장에 활성탄을 3% (w/v) 첨가하여 70°C에서 15분간 교반한 뒤 여과하여 탈색 간장을 제조하였다. 탈색 횟수에 따른 아미노산 간장의 성분변화를 분석한 결과, Fig. 2에 나타난 것과 같이, 총질소, 아미노태질소, NaCl 농도는 탈색 횟수에 관계없이 일정한 값을 나타낸 반면, total optical density (500 nm)는 탈색 횟수에 반비례하여 낮아졌고 활성탄을 5회 반복 처리하면 상당히 탈색하여 연황색을 나타내었

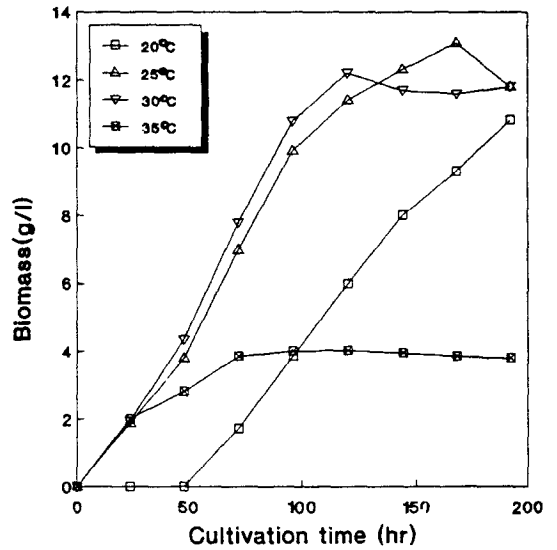


Fig. 5. Effect of cultivation temperature on the growth of *S. rouxii*

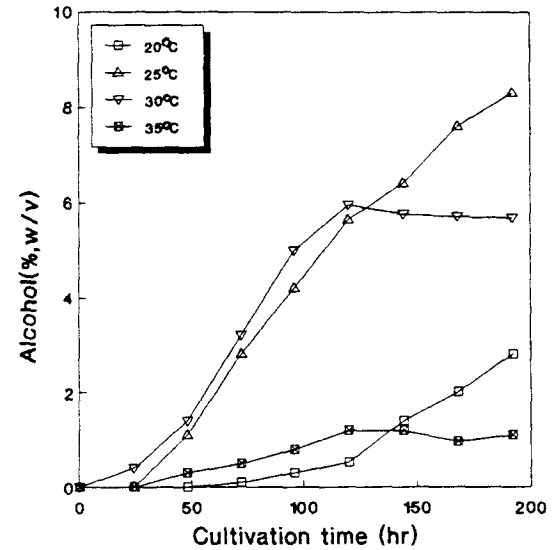


Fig. 6. Effect of cultivation temperature on the alcohol production of *S. rouxii*

다. 탈색 횟수별 각 아미노산 간장에 5% glucose 첨가하여 *S. rouxii*를 접종, 5일간 배양한 결과, 균체량은 7.2 ± 0.4 (g/l)로 거의 일정한 값을 보였다 (Fig. 3 참조). 따라서 아미노산 간장내 색소물질은 *S. rouxii*의 생육에 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

Glucose 농도의 영향

일반적으로 고농도의 탄소기질이 배지내에 존재할 때, 균체내 산화, 호흡에 관련되는 효소가 활성저해를 받을

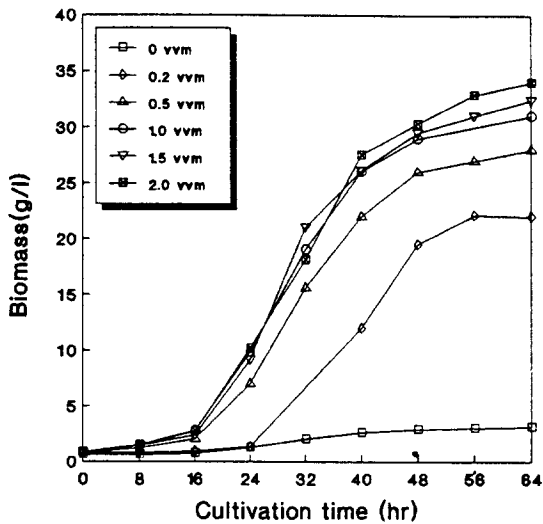


Fig. 7. Effect of aeration rate on the growth of *S. rouxii* in a batch fermentation

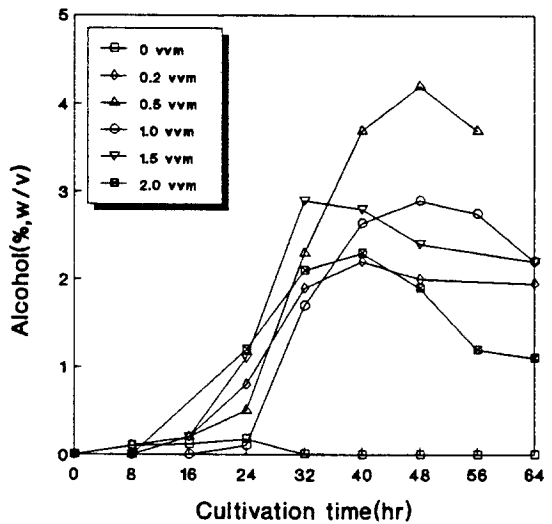


Fig. 8. Effect of aeration rate on the alcohol production of *S. rouxii* in a batch fermentation

뿐만 아니라, osmosis 현상에 의한 plasmolysis가 일어나 균체의 생육이 저해된다<sup>(12)</sup>. 따라서 균체 생육에 필요한 최적의 glucose 농도를 찾기 위해 10% 아미노산 간장에 glucose를 농도별로 첨가하여 4일간 배양한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Glucose 5%에서는 배양시간 48시간에 5.9 g/l의 최대 균체량을 나타내었으며, 그 후 균체 생육이 일어나지 않았다. 그러나 glucose의 함량이 증가하여 15%, 25%에서는 균체 생육이 계속되어 배양시간 96시간에는 약 9.3 g/l로 초기 glucose 농도가 높아짐에 따라 균체생육이 증가하였으나 초기 glucose 농도가 너무 높으면 오히려 균체 생육을 저해하여, 35% 및 45% glucose 농도에서는 각각 7.2 g/l, 5.7 g/l로 감소되었다. 따라서 균체 생육을 저해하지 않는 최대 glucose 농도는 25%임을 알 수 있었다.

#### *S. rouxii*의 생육 및 알코올 생성에 미치는 발효온도의 영향

발효온도가 *S. rouxii*의 생육 및 알코올 생성에 미치는 영향을 검토한 결과를 Fig. 5, 6에 나타내었다. 균체생육은 30°C에서 가장 큰 비성장속도(specific growth rate)를 나타내었으며 최대 균체량은 25°C에서 배양 7일째 13.5 g/l로, 30°C의 배양 5일째 나타냈던 최대 균체량인 11.8 g/l 보다 약간 높은 값을 나타내었다(Fig. 5 참조). 35°C에서는 균체의 생육도 낮았으며, 20°C에서는 유도기간이 상당히 길었으나 균체 생육은 지속적으로 일어나 배양 8일째 11.7 g/l로 비교적 높은 최대 균체량을 보였다(Fig. 5 참조). 따라서 최대 비성장속도를 나타내는 생육온도는 30°C이지만 최대 균체량을 얻기 위해서는 25°C가 적당함을 알 수 있었다. 한편, 알코올 생성은 25°C에서 배양 8일째 8.5%(w/v)으로 가장 높게 나타났

며, 20°C에서는 배양 8일째까지 지속적인 증가양상을 보였다(Fig. 6). 35°C일 때는 최대 알코올 함량이 배양 6일째 1.3%(w/v)로 낮은 값을 보였는데 이것은 발효온도가 높아지면 발효억제가 커진다는 Nagodawithana 등<sup>(12-14)</sup>의 결과와 일치함을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 아미노산 간장의 알코올 생성을 최대로 하는 발효온도는 25°C임을 알 수 있었다.

#### 통기속도(aeration rate)의 영향

*S. rouxii*의 최적 산소 요구성을 밝히기 위해 2.5 l jar fermentor를 이용하여 통기속도를 0~2 vvm으로 변화시키면서 균체의 생육 및 알코올 생성을 관찰하였다(Fig. 7, 8). 통기속도가 높을수록 균체 생육이 잘 이루어져, 실험 범위중 최대 통기속도인 2.0 vvm에서 배양시간 64시간에 40.6 g/l의 균체량을 보였다(Fig. 7). 반면, 통기속도가 낮아질수록 비성장속도 및 최대 균체량은 감소하는 경향을 보여, 통기를 전혀 하지 않을 때는(0 vvm) 균체 생육이 거의 일어나지 않았다. 알코올은 통기속도가 0.5 vvm일 때 가장 많이 생성되어 최대 알코올 농도는 4.2%(w/v)이었다(Fig. 8). 한편, 통기속도가 증가하면 알코올 생성은 점차 감소하여 통기속도 2.0 vvm에서 최대 알코올 농도는 2.3%(w/v)였다. 또, 통기속도가 0.2 vvm일 때도 알코올 생성은 줄어들었으며 통기를 전혀 하지 않을 때는 알코올 농도가 미량에 불과하였다(Fig. 8). 이는 Cowland 등<sup>(15)</sup>의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 이상의 결과에서 최대 알코올 발효를 위한 최적의 통기속도는 0.5 vvm임을 알 수 있었다.

#### 요 약

아미노산 간장의 풍미를 높이기 위해 *S. rouxii*에 의한

알코올 발효시 아미노산 간장내에 존재하는 NaCl, 색소 물질 및 glucose의 농도가 *S. rouxii*의 생육에 미치는 영향과, 발효온도, 통기속도 등 발효환경요인이 *S. rouxii*의 생육 및 알코올 발효에 미치는 영향을 관찰하였다. 아미노산 간장내 NaCl 6%(w/v)까지는 균체 생육에 영향을 미치지 않았으나, 그 이상의 농도에서는 생육을 저해하였으며, 아미노산 간장 중 존재하는 색소물질은 균체 생육에 영향을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. 또 아미노산 간장에 첨가된 glucose의 농도가 25%(w/v)까지는 균체 생육을 크게 저해하지 않았다. *S. rouxii*의 생육 및 알코올 발효의 최적 온도는 25°C이며, 최대 알코올 생성을 위한 최적 통기속도는 0.5 vvm이었다. 이때 아미노산 간장내 최대 알코올 농도는 4.2%(w/v)였다.

## 문 헌

- 永瀬一郎, 越田孝吉: しょうゆ醸造における醱酵微生物添加の効果. 調味科學, 16, 21(1969)
- 海田勇雄: 醬油. 綜合食科工業, 項星社盾生閣, 543(1970)
- 日野哲雄: アミノ酸液の製造と利用. 醬油醸造の最新の技術と研究, 日本醸造協會, 162-190(1972)
- 水沼武二: 醬油. 醸造の事典, 朝創書店, 406(1988)
- 한만숙: 효모발효에 의한 아미노산 간장의 Alcohol 생성에 관한 연구. 동덕여자대학교 논총, 10, 235(1980)
- 이택수, 이석건: 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구 (제 5보). 한국농화학회지, 14, 99(1971)
- 稻森和夫, 宮内謙吉, 内田一生, 吉野宏: 醬油諸味の醱酵におよぼす環境因子の研究(第 6報). 醬油, 9, 65(1983)
- 이석건: 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구(제 9보). 충남대학교논문집, 13, 165(1974)
- 日本醬油研究所編: レよらゆ試験法, 三雄舎印刷, 77 (1985)
- A.O.A.C.: Official methods of analysis., 13th ed., Association of official analytical chemists, Washington, D.C., p.189(1980)
- Miller, G. L.: Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing. *Anal. Chem.*, 31, 426(1959)
- Gray, W. D.: The acclimatization of yeast to high concentrations of glucose: the subsequent effect upon alcohol tolerance. *J. Bacteriol.* 52, 703(1946)
- Gray, W. D.: Studies on the alcohol tolerance of yeast. *J. Bacteriol.*, 42, 561(1941)
- Nagodawithana, T. W. and Steinkraus, K. H.: Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "Rapid fermentation", *Appl. Environ. Microbiol.* 31, 158(1976)
- Cowland, T. W. and Maule, D. R.: Some effects of aeration on the growth and metabolism of *S. cerevisiae* in continuous culture. *J. Inst. Brw.*, 72, 408(1966)

(1992년 2월 14일 접수)