

팽창된 시판 간장에 존재하는 효모의 분리 및 동정

김영성·경규항*

신홍전문대학 위생과, *세종대학교 식품공학과

Isolation and Identification of Yeasts Occurred in Inflated Commercial Soy Sauce

Young Sung Kim and Kyu Hang Kyung*

Department of Sanitation, Shin Heung Junior College

*Department of Food Science, Sejong University

Abstract

Gas formation, and container swelling and explosion during the distribution of commercial soy sauce is an important problem to be solved. Six yeasts were isolated from soy sauce returned because of container swelling. Three isolates (SS-1, SS-2, SP-1) formed film on soy sauce while others did not. Five isolates(SS-1, SS-2, SS-4, SP-1, SP-2) actively fermented soy sauce to produce gas and all were identified as *Zygosaccharomyces rouxii*, and one other isolate (SS-3) fermented soy sauce very weakly and was identified as *Candida globosa*.

Key words : gas, yeast, soy sauce.

서 론

간장은 대두를 이용한 발효식품으로 숙성과정중에 단백질의 가수분해로 생긴 아미노산의 감칠맛, 전분의 분해로 생긴 당의 단맛, 소금의 짠맛 및 알코올 발효와 유기산 발효로 생성된 향미성분들이 맛과 향의 조화를 이루고 있는 조미식품이다¹⁾.

간장제조업의 공업화가 되기까지는 주로 일반가정에서 전래적인 제조 방법에 따라 만들어져 자급자족하는데 그쳤으나, 시대적 변화와 생활 환경의 변화에 따라 그 소비도 자가생산품에서 점차 공장생산품(시판간장)으로 전환되어 왔다.

간장은 제조, 저장 및 유통과정중에 발효성 효모가 혼입되면 용기내에 침전이 생성되어 제품의 품질이 저하되고²⁾, 상품가치가 떨어지는 경우가 있고 가스가 많이 생기면 용기가 팽창되고, 심한 경우에는 폭발하기 때문에 시판간장에는 *p*-hydroxy benzoic acid ester류, benzoic acid, sodium benzoate, sorbic acid, ethanol 등의 보존료가 간장의 방미, 방부에 이용되고 있다^{3,4)}. 간장에 관한 연구로는 간장의 품질, 간장 중의 미

생물 분포, 간장의 원료 등 많은 연구가 있으나 시판간장의 품질을 저하시키는 가스발효효모에 관한 연구는 미진한 형편이다. 따라서 본 연구에서는 가스가 발생되어 용기가 팽창된 제품간장에서 가스발효 효모를 분리, 동정하여 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 가스발생 간장

가스가 발생되어 부풀어 오른 두 회사의 시판간장을 각 회사로부터 제공받아 시료로 사용하였다.

2. 미생물 배지

효모를 분리하기 위한 배지로는 PDA(NaCl 5% 첨가)를 효모 배양용 액체배지로는 YMPGSB(NaCl 18% 첨가)를 간장의 pH와 동일하게 조정하여 사용하였다.

3. 제균 간장

시판간장을 멸균된 membrane filter(0.45 μ m pore

size, 25mm diameter : Gelman Sciences)로 여과
제균하여 시료로 사용하였다.

4. 미생물의 분리

가스가 발생된 시판간장을 PDA평판배지(NaCl 5%
첨가)에 quadrant streaking법으로 접종하여 30℃에
서 96시간 배양시켰으며 미생물을 순수분리해 내기 위
하여 이 과정을 3번 반복하였다.

5. 가스 발생효모의 생육측정

접종 직후 및 배양 12시간마다 적당량씩 취하여 필요
한 경우에 알맞게 희석하여 620nm에서 흡광도(Spec-
trophotometer 120A, Shimazu Co.)를 측정하였고,
이 때 희석용액은 배지와 동일한 것을 사용하였다.

6. YMPGSB에서의 가스 발생 실험

분리된 균을 PDA(NaCl 5%)에 도말하여 30℃에서
96시간 배양한 것을 가스발생 실험균주로 사용하였다.
Screw cap tube에 Durham관을 넣고 YMPGSB
(NaCl 18%)를 20ml씩 분주하여 30℃에서 배양하면서
가스 발생 여부를 관찰하였다.

7. 제균 간장에서의 가스 및 막 발생 실험

YMPGSB에서 가스발생이 확인된 균주를 PDA
(NaCl 5%)에 도말하여 30℃에서 96시간 배양후
YMPGSB(NaCl 18%)에 접종하여 30℃에서 48시간
활성화시킨 후 종균으로 사용하였다.

Durham관을 넣은 screw cap tube에 제균 간장
20ml를 넣고 또한 YMPGSB(NaCl 18%)를 20ml씩
넣고 121℃에서 15분간 멸균하여 방냉시킨 후 활성화시
킨 효모를 1% 접종하고 30일 동안 가스발생과 산막형
성 유무를 관찰하였다.

8. ATB system에 의한 효모의 동정

분리된 효모는 ATB system(Bio Merieux SA/
69820 Marcy l'Etoile /France)을 사용하여 동정하였
다.

9. 일반성분 분석

총질소, 환원당, 알코올, 염분, 총산도 등의 일반성분
은 일본장유시험법¹²⁾에 따라서 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 가스 발생 간장의 일반성분

**Table 1. Characteristics of normal and swelled
commercial soy sauces**

Soy sauce	Characteristics						
	T.N. (%)	R.S. (%)	Alc. (%)	NaCl (%)	T.A. (ml)	pH	Color
A (Normal)	1.205	6.08	1.08	15.60	10.90	5.80	7.45
B (Normal)	1.740	5.80	2.30	15.08	26.04	5.10	10.00
A	1.201	Trace	0.16	15.04	8.15	5.90	8.84
B	1.747	1.72	1.12	14.52	25.55	5.45	15.85

T.N. : Total nitrogen

R.S. : Reducing sugar

B.A. : Buffer action

T.A. : Total acid, ml of 0.1N-NaOH

가스가 발생된 시판간장의 총질소, 환원당, 에탄올,
염분 등은 Table 1과 같았다. 정상적인 시판간장의 환
원당 함량은 보통 5% 이상인데 가스가 발생된 간장은
환원당의 함량이 감소하였다^{13,14)}. 이는 간장중의 미생
물이 생육하여 환원당이 소비된 것으로 생각되며, 박과
이¹⁵⁾의 보고와 유사한 경향을 나타냈다.

또한 정상적인 간장에 비해 가스가 발생된 간장에서
알코올의 함량이 줄어든 것은 산막효모가 알코올을 자
화한 것으로 추정되었지만¹⁶⁾, 산소가 없는 상태에서 효
모가 알코올을 자화한다는 것은 이론적으로 합당하지
않다. 간장에서 가스생성효모가 번식하면 알코올의 함
량이 증가할 것으로 예상된다. 아마도 생성된 가스가 분
출할 때 휘발성인 알코올을 동반하여 제거한 것이 아닐
까 추정한다. 이러한 현상은 주 등¹⁷⁾이 보고 한것과 유
사하게 나타났다.

2. 효모의 분리 및 형태학적 특징

가스가 발생된 간장에서 집락의 형태에 따라 6개의
효모를 분리하였고, 이들을 각각 SS-1, SS-2, SS-3,
SS-4, SP-1, SP-2로 명명하였다.

가스발생 간장에서 분리한 효모의 형태학적 특징은
Table 2와 같았으며 분리된 효모의 영양세포의 형태는
대부분 난형과 타원형을 이루었고, SS-1, SS-2, SP-1
는 집락의 색이 흰색이었고, 표면이 거칠었으며, 집락을
백금으로 처리할 때 부드러운 느낌을 주는 반면, SS-3,
SS-4, SP-2는 집락의 색이 크림색이었고, 표면이 윤기
가 있었으며 백금으로 처리할 때 다소 견고한 느낌을 주
었다.

3. ATB system에 의한 효모의 동정

Table 2. Cultural and morphological characteristics of the yeasts isolated from gas-formed soy sauces

Strains	Cultural and morphological characteristics					
	Color	Elevation	Surface	Shape	Consistency	Film formation
SS-1	white	raised	undulate	ovoid	soft	○
SS-2	white	raised	undulate	ovoid	soft	○
SS-3	cream	raised	glistening	ovoid	hard	×
SS-4	cream	raised	glistening	ovoid	hard	×
SP-1	white	raised	undulate	ellipsoidal	soft	○
SP-2	cream	raised	glistening	ellipsoidal	hard	×

분리된 효모를 ATB system에 의해 동정한 결과는 Table 3과 같았으며, Analytab Product Incorporation ; API identification program에 의해 동정한 결과 SS-1, SS-2, SP-1은 산막을 형성하는 *Zygosaccharomyces rouxii*로 동정되었고, SS-4, SP-2는 산막을 형성하지 않는 *Zygosaccharomyces rouxii*로 동정되었으며 SS-3는 *Candida globosa*로 동정되었다.

4. 분리효모의 생육도 측정

가스를 발생한 시판간장에서 분리된 효모를 YM-PGSB에서 생육을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같았으며, SS-1균은 48시간, SS-2균은 60시간, SS-3, SS-4균은 84시간, SP-1균은 96시간, SP-2균은 72시간 이후 각각 생육 정지기에 도달한 것으로 나타났다.

Table 3. Identification of yeasts isolated from commercial soy sauces swelled by gas formation

Substrates	Strains					
	SS-1	SS-2	SS-3	SS-4	SP-1	SP-2
Galactose	+	+	-	-	?	+
Actidione	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-	-	-	-	-
DL-Lactate assimilation	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	-	+	+
Trehalose	-	-	-	-	-	-
2-Keto-D-gluconate	-	-	+	-	-	-
α -Methyl-D-Glucoside	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	+	+	-	+
D-Xylose	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	-	-
Glycerol	+	+	+	-	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-
Palatinose	?	+	-	-	-	+
Erythritol	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Glucuronate	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-
Levulinate	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	+	-	-	-
Glucosamine	-	-	-	-	-	-
Identification	<i>Zygo. rouxii</i> (film yeast)	<i>Zygo. rouxii</i> (film yeast)	<i>Candida globosa</i>	<i>Zygo. rouxii</i>	<i>Zygo. rouxii</i> (film yeast)	<i>Zygo. rouxii</i>

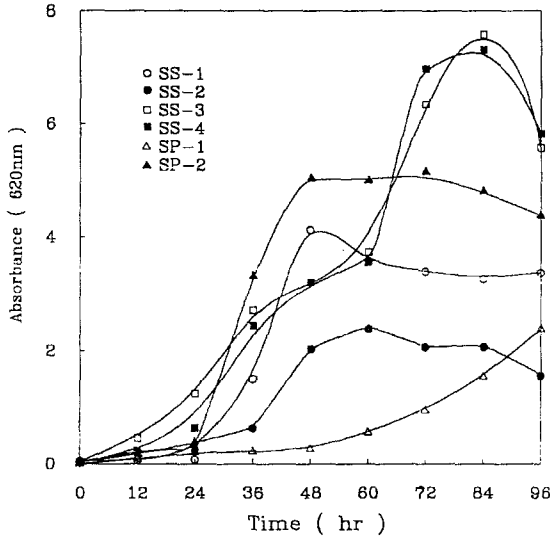


Fig. 1. Growth of yeasts isolate in YMPGSB.

5. 분리효모의 가스발생 확인 및 발효실험

1) YMPGSB와 제균 간장에서 가스 발생 확인

분리된 효모의 가스발생 실험을 한 결과(Fig. 2), YMPGSB에서는 분리된 효모들 모두 가스를 생성하였으나, SS-3효모는 제균 간장에서는 가스를 생성하지 못했다. YMPGSB에서는 가스생성이 빠르고 간장에서는 느린 이유와 SS-3효모가 간장에서 가스를 생성하지 못한 이유는 간장중에 들어 있는 T. N., ethanol, 각종 유기산 등에 의하여 가스 생성 효모의 생육이 저해받은 것으로 생각된다.

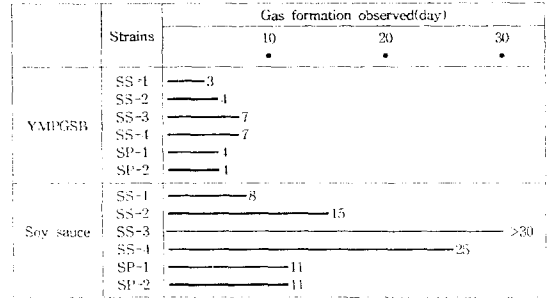


Fig. 2. The day of gas formation observed when isolated yeasts were incubated in soy sauce and YMPGSB at 30°C.

6. 분리효모들의 발효실험

가스발생 효모를 활성화시켜 YMPGSB과 제균 간장에 접종하여 5일과 15일 배양후 일반성분을 분석한 결과는 Table 4, 5와 같았다.

15일 배양후 YMPGSB나 제균 간장에서 NaCl, 총 질소, 아미노태 질소, pH, 색도의 변화는 없었으나, YMPGSB에서 환원당은 5일 후에 급격히 감소하였고, ethanol은 증가하였다. 환원당이 급격히 감소한 이유는 효모들이 가스와 ethanol을 생성하는데 사용한 것으로 생각된다. 제균 간장에서 환원당은 5일 후에 변화가 없었고, 산막형성 효모인 SS-1, SS-2, SP-1은 15일후 감소하였으나, 비산막성 효모인 SS-3, SS-4, SP-2는 변화가 없었다.

Ethanol은 5일 후에 변화가 없었고, 15일후에는 SS-1, SS-2, SP-1(산막성 효모)은 ethanol이 증가하였고, SS-3, SS-4, SP-2(비산막성 효모)는 약간 감소하

Table 4. Changes in composition of YMPGSB after incubation with the isolated yeasts

Strain	Days of incubation	NaCl (%)	T.N (%)	A.N (mg %)	R.S (%)	Ethanol (%)	pH	Col.
Control	0	16.96	0.13	0.23	1.67	0.00	5.04	0.05
SS-1	5	17.54	0.10	0.03	Trace	0.66	5.10	0.05
	15	17.23	0.09	0.03	Trace	0.46	5.12	0.04
SS-2	5	17.54	0.11	0.03	0.27	0.61	5.12	0.04
	15	17.11	0.11	0.05	Trace	0.53	5.19	0.05
SS-3	5	17.60	0.11	0.04	0.53	0.64	5.12	0.60
	15	17.11	0.10	0.06	Trace	0.72	5.19	0.05
SS-4	5	17.54	0.11	0.03	Trace	0.77	5.06	0.69
	15	17.00	0.11	0.06	Trace	0.70	5.19	0.06
SP-1	5	16.87	0.10	0.13	Trace	0.77	5.12	0.04
	15	17.93	0.11	0.04	Trace	0.65	5.21	0.06
SP-2	5	17.51	0.11	0.04	Trace	0.79	5.12	0.23
	15	17.11	0.10	0.04	Trace	0.68	5.24	0.07

T.N. : Total nitrogen
 A.N. : Aminotype nitrogen
 R.S. : Reducing sugar
 Col. : Color

Table 5. Changes in composition of soy sauce after incubation with the isolated yeasts

Strain	Days of incubation	NaCl (%)	T.N (%)	R.S (%)	Ethanol (%)	pH	Col.
Control	0	16.17	1.75	2.97	0.90	4.93	8.35
SS-1	5	16.66	1.76	3.05	0.83	4.93	8.66
	15	16.44	1.72	1.01	1.34	4.91	9.96
SS-2	5	16.71	1.77	2.87	0.82	4.93	9.14
	15	16.29	1.71	1.01	1.33	4.91	10.60
SS-3	5	16.60	1.74	3.07	0.80	4.93	8.80
	15	16.09	1.74	3.19	0.63	4.87	10.88
SS-4	5	16.83	1.77	3.07	0.79	4.93	9.10
	15	16.99	1.73	3.14	0.69	4.87	10.79
SP-1	5	16.42	1.76	3.14	1.13	4.91	8.88
	15	16.19	1.70	1.01	1.79	4.91	10.07
SP-2	5	16.48	1.76	3.12	1.06	4.92	8.42
	15	16.19	1.72	3.01	0.74	4.86	10.64

T.N. : Total nitrogen

A.N. : Aminotype nitrogen

R.S. : Reducing sugar

Col. : Color

었다.

환원당의 감소는 장¹⁸⁾과 김과 김¹⁹⁾의 보고와 같이 ethanol 발효 및 유기산 발효에 의해 포도당 등의 단당류가 소모되는 관계라고 생각되고, 김²⁰⁾은 숙성기간을 통해 ethanol의 생성이 없음에도 불구하고 당분이 감소한 것은 산막효모의 영양원으로 소모되므로 당분이 감소한 것으로 생각한다고 보고하였다.

요 약

시판 간장이 유통되는 동안에 가스가 형성되어 품질을 저하시키는 문제가 발생되고 있어서 가스가 형성된 시판간장에서 효모를 분리하여 동정하였다. 가스가 발생된 시판간장에서 6개의 효모(SS-1, SS-2, SS-3, SS-4, SP-1, SP-2)를 분리하였는데, 그 중 3가지(SS-1, SS-2, SP-1) 효모는 막을 형성하였고, 나머지(SS-3, SS-4, SP-2) 효모는 막을 형성하지 않았다. 분리된 효모중 SS-3를 제외하고는 간장에서 가스를 형성하였다. SS-3균주는 발효력이 약한 효모인 것 같다. SS-1, SS-2, SP-1는 *Zygosaccharomyces rouxii* var. *halomembranis*(산막효모)로 SS-4, SP-2는 *Zygosaccharomyces rouxii*(비산막 효모)로 동정되었고, SS-3는 *Candida globosa*(비산막 효모)로 동정되었다.

참고문헌

1. 이성우 : 고려이전의 한국 식생활사 연구, 향문사, 179 (1978).
2. 이택수, 주영하, 신보규, 유주현 : 제품간장의 보존에 관한

연구, *한국식품과학회지*, 7(4), 200 (1975).

3. 松山正直 : 耐鹽性酵母に関する研究, *味口會技術*, 103, 1 (1962).
4. Nagahama, T. and Imahara, H. : Studies on the Film-soja-yeast. *J. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 33(11), 949 (1959).
5. 大西博 : 醬油醸造と微生物(Ⅲ). *J. Jpn. soy sauce Res. Inst.*, 5(3), 129 (1979).
6. 이택수, 이석건 : 간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구, *한국농화학회지* 13(1), 97 (1970).
7. Nakase, T. : Spoilage of foods by yeasts. *J. Food hygiene. Jpn.*, 18(4), 309 (1977).
8. 中浜敏雄 : 酵母の産膜性と非産膜性, *J. Brew. Soc. Jpn.*, 70(9), 637 (1975).
9. 田中正男 : 減鹽醬油のガス發生原因について, *J. Jpn. soy sauce Res. Inst.*, 16(1), 4 (1990).
10. 장학길, 박승규, 경규항 : 농가식품조리가공 보존연구, *농영연-연조-2*, 16 (1988).
11. 문범수, 김복성, 이영민, 박윤민 : 醬油의防腐劑에 관한研究, *국립보건연구원보*, 251 (1969).
12. 井口信謙 : しょうゆ試験法, *日本醬油研究所* (1985).
13. 森治彦 : しょうゆの醸酵, *日本醸協*, 第66卷, 第4號
14. Hanaoka, Y. : Studies on preservation of soy sauce. *日本醸酵工學會誌*, 45(4), 312 (1967).
15. 박성오, 이택수 : 효모첨가에 의한 채래식 간장의 향기개선에 관한 연구, *서울여자대학논문집*, 제11호 (1982).
16. 好井久雄 : *みそ技術ハンドブック*, 全國味口會技術會 (1995).
17. 주영하, 유태중, 유주현 : 제품간장에서 분리한 산막효모에 관한 연구, *한국식품과학회지*, 7(2), 61 (1975).
18. 張智鉉 : 韓國간장의 담금中の化學的變化 및 담금期間에對하여, *한국농화학회지*, 6, 8 (1965).
19. 김형수, 김재욱 : 보리를 이용한 간장製造에 관한 연구, *한국농화학회지*, 29(2), 107 (1986).
20. 김상순 : *Aspergillus oryzae* 및 *Aspergillus sojae*를 이용한改良메주의 형상에 의한 醬類의 품질비교, *한국식품과학회지*, 10(1), 63 (1978)

(1997년 3월 14일 접수)