

*Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*의 동시 고정화에 의한 Air Bubble Column Reactor에서 간장의 연속적 속성 생산

† 류 병 호

경성대학교 식품공학과

(접수 : 2003. 8. 14. 게재승인 : 2003. 12. 24.)

Continuous rapid Production of Soy Sauce by Coimmobilized Mixed Culture system of *Zygosaccharomyces rouxii* and *Candida versatilis* using Air Bubble Column Reactor

Ryu, Beung-Ho†

Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University, Pusan 608-736, Korea

(Received : 2003. 8. 14. Accepted : 2003. 12. 24.)

This study was designed to find out the rapid fermentation of soy sauce from koji hydrolyzates using air bubble column reactor packed with coimmobilized mixed culture system. Continuous rapid production was performed by coimmobilized *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91. Coimmobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90 and *Candida versatilis* BH-91 mixture cells in the column reactor produced 2.8% ethyl alcohol and 18 mg/L 4-ethylguaiacol over 96 hours under the optimal conditions. Coimmobilized cells produced 2.30~2.4% ethyl alcohol during 30 days, and decreased gradually from 40 days to 70 days. Also coimmobilized cells produced 4-ethylguaiacol at the constant rate of 16~18 mg/L and decreased gradually after 40 days. Final product of soy sauce contained 2.4% ethyl alcohol and 18 mg/L 4-ethylguaiacol. However, amino acid compositions of soy sauce were consisted of predominantly glutamic acid, leucine, arginine, aspartic acid, lysine and valine, which were more than 50% of total amino acid.

Key Words : *Zygosaccharomyces rouxii*, *Candida versatilis*, coimmobilized cells, Soysauce

서 론

간장은 우리의 식생활에 없어서는 안될 특유의 조미료로서 모든 요리에 사용되고 있으나 발효 방법이 복잡하고 숙성기간이 장기간 소요되기 때문에 문제가 되고 있다.

간장의 발효는 국 원료에 *Aspergillus sojae* 또는 *Aspergillus oryzae*의 포자를 접종시켜 배양한 후 고농도의 식염을 첨가하여 젖산 발효, 주발효 효모에 의한 알코올 발효 및 후숙 효모에 의한 향기 성분의 생성으로 6개월 내지 1년 정도의 숙성시켜야 간장 특유의 향미를 갖는다(1, 2).

간장의 양조는 미생물을 이용하는 발효 공업의 근간이 되는 기술이지만 수많은 미생물에 의해서 숙성되고 발효 기간이 장기간을 요하므로 공정 개선을 위한 연구 개발이 요구되고 있다. 제국 분해과정을 단축시키기 위하여 국균 등으로 분해 시키지 않고 국을 단시간 내에 분해하는 protease나 amylase 등 역가가 높은 효소를 사용하여 고온 분해하여 숙성 기간을 단축시킬 수 있다(3, 4). 이와 같이 발효 공정을 개선하고 속성 발효를 하기 위한 방법으로 간장의 주 효모균을 일정한 담체에 고정화시켜 bioreactor에 충전하여 분해된 제국을 기질로 하여 간장의 숙성 기간을 단축하려는 연구가 시도되고 있다. 발효기간을 단축시키기 위하여 젖산균, 주 발효 효모 및 후숙 효모 등을 일정한 조건 하에서 선정된 담체에 균체를 고정화시킨 후 bioreactor에 이들 고정화 균체를 각각 충전시킨 다음 분해된 제국을 일정한 유속을 유지하면서 장기간 발효시켜 제품을 생산하는 공정으로 그 소요기간

† Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University, Pusan 608-736, Korea
Tel. : +82-51-620-4712
E-mail : bhryu@star.ks.ac.kr

은 15일 내지 20일 정도로 짧은 기간에 발효가 이루어진다(5-7). 또한 주 발효 효모와 후숙 효모를 동시에 균체에 고정화하여 이 bead를 bioreactor에 충전하여 발효시키면 간장의 속성 발효가 가능하다고 보고하였다(8-11).

그러나 앞으로 연구되어야 할 과제는 간장의 발효에 관여하는 효모를 고정화할 때 고정화 담체의 선정과 Column형 bioreactor에 bead를 충전하여 분해된 재료를 공급할 때 장기간 운전하면 기질이나 염분에 의하여 bead가 손상이 가거나, 높은 염분 때문에 bead가 파괴되는 경우가 허다하여 담체의 개발이 요구된다(11-13).

이러한 일련의 연구로서 간장에 관여하는 주 효모균으로 알코올 생성 균주인 *Zygosaccharomyces rouxii*와 후숙 효모로 4-ethylguaiacol 생성 균주인 *Candida versatilis*를 잘 이용하면 간장 발효기간의 단축과 간장의 풍미도 개선될 것으로 기대된다(14-16).

따라서 본 연구는 간장 발효시 연속적 속성으로 간장을 생산하기 위한 공정을 개선할 목적으로 알코올 발효에 관여하는 주요 효모인 *Zygosaccharomyces rouxii* BH-10과 간장의 향기 성분을 생산하는 후숙 효모인 *Candida versatilis* BH-91의 균체를 각각 동일 비율로 혼합하여 동시에 고정화시킨 후 고정화 균체를 air bubble column 발효조에 충전시킨 다음 간장 생산을 위한 연속 발효의 조건 및 그 완제품의 성분에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

간장국의 제국법

증자한 탈지 대두와 소맥분을 2 : 1의 비율로 혼합한 후 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus sojae*의 종국을 가하여 잘 혼합시킨 다음 37°C에서 2일간 방치한 다음 국으로 사용하였다(13).

고온 분해법에 의한 국 분해 액의 조제

삶은 콩과 밀가루 1 kg과 간장국 100 g을 혼합한 후 최종 식염 농도가 18%가 되도록 식염수를 붓고 complex enzyme 2,000 (태평양) 5 g을 첨가한 후 45°C에서 4-5일간 분해하고 압착 여과하여 국 분해 액으로 하였다(3).

균체의 고정화

Zygosaccharomyces rouxii BH-90과 *Candida versatilis* BH-91을 각각 1.0×10^7 cells/ml이 될 때까지 액체 배지 (생간장 10%, glucose 5% 및 NaCl 11%, pH 5.5)에 30°C에서 5일간 (1.0×10^7 /ml) 배양시킨 다음 원심분리하고 균체를 멸균 증류수로 2회 씻은 다음 각각의 균체를 colloidal silica 용액과 3% 알긴산 소다 용액을 1 : 1의 비율 (v/v)로 가하여 잘 섞이게 한 후 23 게이지의 주사기에 넣어 이미 멸균된 0.5% 염화칼슘 용액에 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 사용하였

다. 본 발효장치는 고정화 균체 bead를 무균적으로 충전한 다음 peristaltic pump를 사용하여 밑에서 위로 발효 원액을 공급하면서 발효하였다.

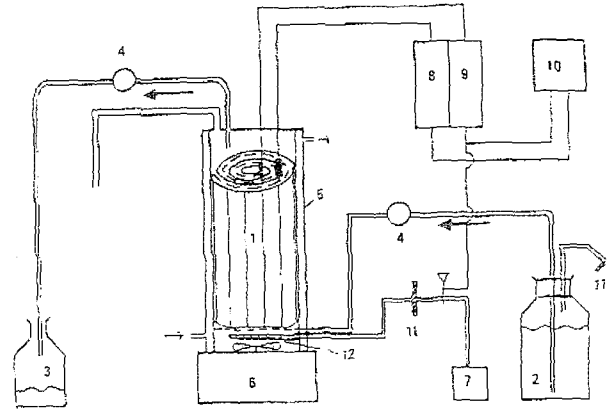


Figure 1. Schematic diagram of continuous production of soy sauce by air bubble column reactor for factor. 1, reactor, 2, medium reservoir, 3, product reservoir, 4, peristaltic pump, 5, water jacket, 6, stirrer, 7, air pump, 8, pH meter, 9, dissolved oxygen meter, 10, recorder, 11, air filter, 12, air sparger

알코올의 정량

배양액을 여과하여 25배 희석한 후 Gas-chromatography (Shimadzu GC R1-A)법에 의하여 측정하였다(18). 이 때 내부 표준물질로는 cyclohexanol을 사용하였다.

4-Ethylguaiacol의 분석

마개가 부착되어 있는 20 mL의 시험관에 시료 5 mL, 식염 1 g, 초산에칠 2 mL을 가하여 10분간 진탕시켜 추출한 후 5°C에서 원심분리 (4,000 rpm)하여 분리된 초산 에칠층만 분리한 다음 내부 표준물질로 2,3,5-trimethyl phenol을 가하여 G.C로 분석하였다(16).

알코올의 정량

배양액을 여과하여 25배 희석한 후 Gas-chromatography (Shimadzu GC R1-A)법에 의하여 측정하였다(18). 이 때 내부 표준물질로는 cyclohexanol을 사용하였다.

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 측정 한 흡광도를 총 흡광도의 합계로 나눈 값을 백분율로 나타내었다(3).

유리 아미노산

Spackman의 방법에 따라 아미노산 자동 분석기 (日本電子製, JLC-6AH, No.310)로서 유리 아미노산의 조성을 측정하였다(19).

간장의 탁도 (%)

시료를 여과한 후 시료 5 ml에 3M-trichloroacetic acid 5 ml을 잘 혼합한 다음 50℃에서 3시간 반응시킨 후의 탁도를 백분율로 나타내었다(20).

화입침전물(火入沈澱物)

시료를 65℃에서 2시간 가열한 다음 85℃에서 1시간 가열하고 냉각시킨 후 생성된 침전물을 여과하여 확인하였다(3).

결과 및 고찰

고정화균체의 증식과 발효성

Z. rouxii BH-90과 *C. versatilis* BH-91을 각각 배양한 다음 각 균체를 1 : 1의 비율로 혼합한 후 담체 (colloid silica gel : 3% 알킬산 소다 = 1 : 1의 비율)로 동시 고정화시킨 후 생성된 beads를 사용하여 pH 5.0, 온도 30℃, 식염의 농도 11% 및 aeration 0.06 vvm 등의 최적조건 하에서 동시 고정화 효모를 충전한 air bubble column reactor에 기질을 주입하면서 ethyl alcohol 및 4-ethylguaiacol의 생성량과 beads 및 유출액의 균수를 조사하였다. 이 때의 조건은 고정화 효모 bead를 column reactor에 250 g 충전하였고 기질의 유속은 20 mL/h로 조절하여 실험하였다. *Z. rouxii* BH-90와 *C. versatilis* BH-91의 동시의 균체 고정화에 의한 beads과 발효된 용출액의 생균수와 그에 따른 ethyl alcohol의 생성량을 나타내었다 (Fig. 2).

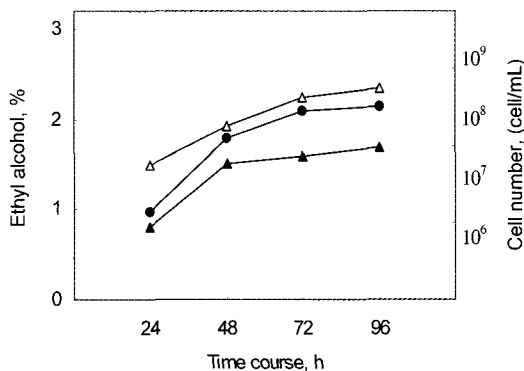


Figure 2. Operation times of alcohol fermentation by coimmobilization of *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells mixture in the column reactor. Conditions were as follow: pH 5.0. temperature, 30℃, air flow rate, air 0.06vvm, substrate flow rate 20mL/h., ethyl alcohol -●-, cell number; -△-, in gel, -▲-, in fermentation liquid.

균체수는 발효시간의 경과에 따라 점차 증가하다가 발효 96시간에서 beads 내는 4.0×10^8 /mL이었고, 유출액에서는 5.0×10^7 /mL이었다. 알코올 생성은 발효 시간에 따라 약간씩 증가하다가, 96시간에는 2.6%로 가장 많이 생성되었다. 4-Ethylguaiacol의 함량은 발효 시작부터 48시간까지는 증가하다가 발효 72시간 이후부터는 일정한 함량을 유지하였다 (Fig. 3). 재래식 간장의 발효에 있어서는 간장을 6개월 이상 양조 후에도 간장의 주요 향기성분인 4-ethylguaiacol은 1~3 ppm 정도 생성된다고 하였다(5). 그러나 본 실험의 결과에서

는 *Z. rouxii*와 *C. versatilis*의 균체의 동시 고정화에 의한 간장의 발효시 24시간의 짧은 발효 경과 시에도 약간 생성되었으며 발효 72시간 경과 후는 약 19.2 mg% 정도의 높은 함량이 생성되었다. 이런 결과는 고정화 균체에 의한 4-ethylguaiacol의 생성에 대한 연구와 비슷한 경향이였다(2, 10, 11). *Z. rouxii* 및 *C. versatilis*을 각각 단독으로 고정화하여 실험한 결과와 비슷하였다(9, 17).

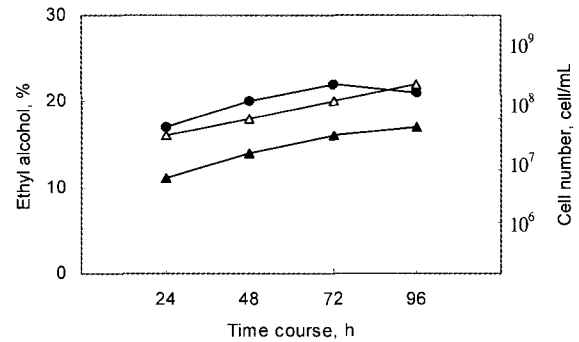


Figure 3. Operation Times of 4-ethylguaiacol(4-EG) production by coimmobilization of *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells mixture in the air bubble column reactor. Condition were as follow:pH 5.0 temperature, 30℃, air flow rate, air 0.06 vvm, substrate flow rate 20ml/h. 4-ethylguaiacol -●-, cell number; -△-, in gel, -▲-, in fermentation liquid.

본 실험에서는 알코올의 생성은 발효 24시간부터 서서히 생성하다가 발효 96시간에는 최고치에 도달하였으며 Yamada 등(9)의 연구와 비슷한 경향이였다.

Air bubble column reactor에 의한 ethylalcohol의 생성

간장을 연속적으로 발효하기 위하여 회분법으로 구한 적정 발효조건 및 발효속도를 기초로 하여 동시 고정화 균체를 column reactor에 충전하여 연속발효를 시도하였다.

Z. rouxii BH-90와 *C. versatilis* BH-91과의 동시 고정화 균체로 만들어 실리카겔과 알긴산 소다의 혼합물 (1 : 1)을 고정화 담체로 하여 *Z. rouxii* BH-90의 고정화 균체에 의한 ethylalcohol의 발효를 실시하여 얻은 결과는 Fig. 4와 같다. 300 mL의 유리로 만든 air bubble column reactor에 고정화균체 beads를 250 g 충전한 후 하부에서 peristalic pump로 발효원액을 시간당 20 mL씩 체류시간을 8시간으로 하여 실험한 결과 발효를 70일간 하였을 때의 알코올 생성, pH 및 생균수를 측정하였다. 알코올의 생성은 발효 시작일부터 30일까지는 2.0~2.4% 정도로 감소하면서 안정적으로 생성되었으며 30일 이후부터 55일까지는 2.0~2.1% 정도로 약간 감소하였으나 안정적으로 생성되었으며 60일 이후에는 약간 감소하였다. 일반적으로 재래식 간장은 간장 숙성 3개월 이후부터 알코올이 생성되어 6개월 정도에서 2.0~2.5%의 알코올이 생성된다(16). *Z. rouxii* BH-90와 *C. versatilis* BH-91의 동시 고정화 균체에 의한 발효시 알코올의 생성은 발효시작부터 7~8일까지 최고 수준에 도달하였고 10일 이후로는 알코올의 함량이 약간 감소되는 경향이였으나 안정적이였다. 그러나 알

코를 생성이 약간 감소하는 것은 고정화된 균체를 장기간의 발효과정 중 beads의 모양이 조금씩 붕괴되면서 beads내의 균체가 감소되고 장기간 공기의 공급으로 인하여 고정화 균체의 활성이 떨어지기 때문이다(13, 14). pH는 발효 10일부터 70일까지 큰 차이는 찾아볼 수 없었다. 발효기간 중 이들 균주의 생균수는 발효 10일부터 발효 50일까지는 beads 내는 10^8 /mL, 발효액은 10^7 /mL로 일정하게 유지하다가 발효 50일부터는 약간 감소하는 경향을 나타내었는데 이것은 장기간의 발효시 균체의 활성 저하가 원인일 것으로 추정된다.

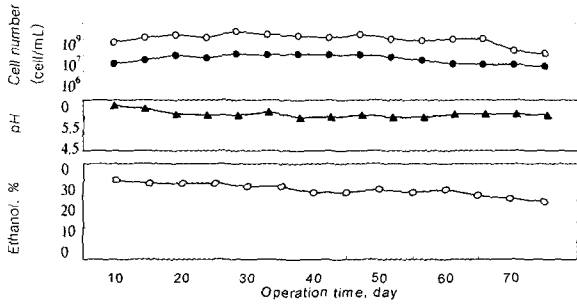


Figure 4. Operation times of ethylalcohol production by coimmobilized cells of *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells mixture in air bubble column reactor. Conditions were as follow; pH 5.0 temperature, 30°C, air flow rate, air. 0.06 vvm. substrate flow rate 20mL/h.

Koseko 등(15)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(5)은 효모의 고정화 균체에 의한 발효에서 알코올은 2.5% 정도 생성되었고 발효 50일 동안 알코올의 함량 변화는 거의 없었다고 하였다. Hamada 등(11)도 *Z. rouxii*의 고정화 균체의 air lift reactor에서 포도당을 첨가한 모델 실험에서 간장을 발효시켜 50일 동안 일정한 농도의 알코올이 생성되었다고 하였다. 본 실험 결과 발효 기간 중 *Z. rouxii* BH-90와 *C. versatilis* BH-91의 동시 고정화에 의한 발효 50일까지는 bead 내에는 생균수는 $1.0\sim 3.0 \times 10^8$ /mL, 유출 발효액은 $1.0\sim 5.0 \times 10^7$ /mL로 안정된 상태였으나, 발효 50일 이후부터 70일까지는 약간 감소하는 경향이였다. 이는 장기간 발효 중 bead의 붕괴와 고정화 균체의 활성이 저하되기 때문인 것으로 사료된다(9, 15).

동시고정화 균체에 의한 Air Bubble Column reactor에서의 4-ethylguaiacol의 생성

간장 발효시 *Z. rouxii* BH-90, *C. versatilis* BH-91 혼합 균체를 동시 고정화하여 column형 reactor에 고정화균체 gel을 250 g 충전하고 발효원액은 시간당 20 mL씩 주입하여 4-ethylguaiacol의 생성을 조사하였다. 4-ethylguaiacol의 함량은 평균 16~18 mg/L이었고 10일부터 40일까지는 약간 감소하였으나 pH의 변화는 찾아볼 수 없었다(Fig. 5). 고정화 균체의 발효 10일에서 40일까지의 생균수의 변화는 beads 내는 1.6×10^7 /mL~ 2.0×10^8 /mL, 유출 발효액은 1.0×10^6 /mL~ 4.0×10^6 /mL이었고 50일에서 70일까지는 약간 감소하였다. 간장의 발효 중 간장 특유의 향기인 4-ethylguaiacol은

Torulopsis 속에 의하여 생성된다고 하였고(26, 27), 이는 간장의 품질에 큰 영향을 준다고 하였다. Yokosuka 등(16)은 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(15)은 *C. versatilis*의 고정화 균체에 의한 4-ethylguaiacol은 발효 50일간 동안 2.3~2.5 ppm 정도로 일정량 생성하였다고 하였다. Hamada 등(11)은 *C. versatilis* 고정화 균체를 air lift reactor에 공기와 질소를 일정비율로 주입하여 약 18 mg/L의 4-ethylguaiacol은 발효 5시간 정도면 충분히 생성은 *C. versatilis* 고정화 균체로서 70일까지 장기간 발효하여도 4-ethylguaiacol의 생성에는 큰 지장이 없었다.

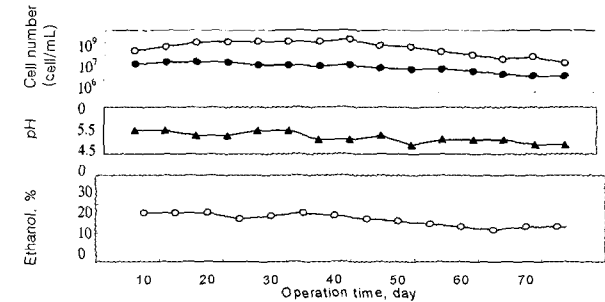


Figure 5. Operation times of 4-ethylguaiacol (C4-EG) production by coimmobilized cells of *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells mixture in air bubble column reactor. Conditions were as follow: pH 5.0, temperature, 30°C, air flow rate, air. 0.06 vvm. substrate flow rate 20mL/h.

일반적으로 재래식 간장의 발효에서는 발효 6개월 이후에 1~3 ppm 정도 생성된다(21). 그러나 *Z. rouxii* BH-90와 *C. versatilis* BH-91의 혼합 균체의 동시 고정화에 의한 동시 고정화 조건 하에서 일정 농도의 4-ethylguaiacol의 생성이 가능하므로 실제 산업적으로 실용화가 가능한 것으로 생각된다.

유리 아미노산의 함량

Z. rouxii BH-90 and *C. versatilis* BH-91의 혼합 균체를 동시 고정화시켜 얻은 간장중의 유리 아미노산의 함량은 Table 1과 같다. 동시 균체 고정화에 의하여 생성된 유리 아미노산은 총 3,160 mg였으며 이들 아미노산 중 glutamic acid 12.72%, leucine 10.31%, arginine 8.98%, aspartic acid 8.67%, lysine 7.21%, 및 valine 6.81%로 전체 유리 아미노산의 약 55%를 차지하고 있다. 이러한 결과는 Noda 등(4)과 Koseko(15)이 보고한 간장 중 유리 아미노산과 유사한 경향이였다.

간장의 색조

Table 2은 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91 혼합 균체를 동시 고정화하여 발효하였을 때의 색도와 색조를 시판 간장과 비교하여 나타내었다. *Z. rouxii* BH-90와 *C. versatilis* BH-91 고정화 균체의 색도는 0.573이었으나 시판 간장은 0.64로 색력은 약간 차이가 있었다. 그러나 색대는 570과 610 nm에서 약간의 차이는 있었다. 생간장이 동시 고정화균

체에 의해 생산된 간장보다 색도와 색대가 다소 높은 것은 장시간의 발효 중 공기와의 접촉으로 인하여 착색이 다소 많이 형성된 것으로 시료된다. 이러한 결과는 Noda 등(4)의 결과와 비슷한 경향이였다.

Table 1. Amino acids composition of soy sause obtained by coimmobilization of *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells mixture

Amino acids (mg %)	
Fermented broth of <i>Z. rouxii</i> BH-90	
Lys	228 (7.21)
His	82 (2.59)
Arg	284 (8.98)
Asp	274 (8.67)
Thr	196 (6.21)
Ser	210 (6.64)
Glu	412 (13.03)
Pro	116 (3.67)
Gly	110 (3.49)
Ala	176 (5.57)
Val	215 (6.81)
Met	62 (1.97)
Ile	190 (6.02)
Leu	326 (10.31)
Tyr	68 (2.15)
Phe	211 (6.68)
Total	3,160 (100)

Table 2. Color intensity and color hue of soy sauce produced by coimmobilized *Z. rouxii* BH-90 and *C. versatilis* BH-91 cells mixture

	color intensity	color hue (O.D)		
		460	570	610
Fermented broth of coimmobilized beads	0.573	0.356	0.146	0.071
Raw soy sauce	0.642	0.390	0.189	0.063

화입시 양금의 생성

화입은 효모의 살균, 향기의 숙성 및 부유물의 침전을 제거하기 위해서 하는 공정이다. *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91 혼합 균체를 동시 고정화시킨 beads 균체를 발효시킨 액과 3 M-trichloroacetic acid (TCA)를 1 : 1로 혼합한 후 50℃에서 3시간 반응시킨 결과 반응액의 탁도는 고정화 균체의 발효액과 큰 차이가 없으며, 이는 생간장의 TCA 탁도보다는 약간 적은 수치였고, 화입한 후의 부유물의 침전도 생간장에 비하여 낮은 수치였다.

Yamada 등(9)은 생간장의 부유 침전물은 화입온도와 시간에 비례한다고 하였으며 80℃ 부근에서 가장 많은 침전물이 생성된다고 하였다. 본 실험의 결과는 Koseko(15)의 보고와 비슷하였다.

이상의 결과에 의하면 간장공장에서의 제조공정상에서 알코올 발효 및 향기성분의 생성에 필요한 기간은 6개월~1년의 장기간이 필요한 것을 고려한다면, 재래식공정에 비하여 원료의 고온 분해 공정에서 약 4일에 요하고 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91의 혼합 균체를 동시 고정화에 의하여 향기성분이 10일 정도 소요되어 생성되므로 약 2주 정도면 간장을 만들 수 있으므로 균체의 고정화에 의한 발효법은 대

단히 효과적이라고 할 수 있다.

Table 3. 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 coimmobilized beads	13.6	+++	25
Raw soy-sauce	24.2	++++	38

요 약

간장의 숙성 발효를 위한 방법으로 간장 발효에 간여하는 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91 혼합 균체를 동시 고정화하여 이를 air bubble column reactor에 충전하여 국 고온 분해액을 주입하면서 연속적으로 발효를 시도하였다. 균체의 고정화 담체로는 실리카겔 : 3% 알긴산소다 (1 : 1의 비율) 혼합액을 사용하여 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91을 동시 고정화하여 air bubble column reactor에 충전하여 발효시킨 결과 발효 96시간 경과시 ethyl alcohol이 2.4% 생성되었으며 4-ethylguaiacol은 18 mg/L가 생성되었다.

Air bubble column reactor에서 *Z. rouxii* BH-90과 *C. versatilis* BH-91 혼합균체의 동시 고정화 beads의 연속적 숙성 발효시 시작일로부터 30일까지는 ethyl alcohol이 2.5~2.8%로 거의 일정하게 생성되었고, 40~70일에는 약간 감소하였다. 그리고 동시 고정화 균체의 발효에서는 40일까지는 4-ethylguaiacol의 함량이 16~18 mg/L로 거의 일정하게 생성되었으나 발효 45일 이후 70일까지는 약간 감소하였다. 발효 종료 후의 제품을 분석한 결과 동시 고정화 균체의 발효액에서는 2.4%의 ethyl alcohol이 생성되었고, 18 mg/L의 4-ethylguaiacol이 생산되었다. 유리 아미노산의 함량은 glutamic acid, leucine, arginine, aspartic acid, lysin 및 valine이 전체 아미노산의 50% 이상을 차지하고 있었다.

REFERENCES

- Lee, H. C. (1963), Yeast of Soy sauce, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **1**, 48-53.
- Yokotsuka, T. (1985), Soy sauce biochemistry, *Advances in Food Research* **30**, 195.
- Ryu, B. H., K. J. Cho, Y. J. Chai, and C. O. Park (1993), Thermal koji hydrolysis for rapid fermentation of soy sauce, *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **22**(2), 215-221.
- Noda, Y. K., H. O. Kusnda, and M. Nakada (1989), Studies on soy sauce by bioreactor, *J. Brew. Soc. Japan* **15**, 177-190.
- Horitsu, M., Y. K. Maseda, and C. Kawai (1990), A new process of 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.
- Yamada, T., S. Koseko, and K. Hisamatsu (1995), Studies on soy sauce prodction by bioractor, *Bull. Mie prefectual institute of Technol.* **2**, 71-79.
- Osaki, K., Y. Okdamoto, T. Akao, S. Nagata, and H. Takamatsu (1985), Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells, *J.*

- Food Sci.* **50**, 1289-1292.
11. Hamada, T., T. Ishiyama, and H. Motai (1989), Continuous fermentation using by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in and airlift reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 346-350.
 12. Durand, G. and J. M. Navrro (1978), Immobilized microbial cells, *Process Biochem.* **B**, 14-23.
 13. Tanaka, H., M. Matsumura, and I. A. Veliky (1984), Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate beads, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 53-58.
 14. Hamada, T., A. Sugishita, and H. Motyai (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.
 15. Koseko, S., M. Hisamatsu, and T. Yamada. (1992), Studies on soy sauce production by bioreactor, *Bull. Mie Prefectral institute of Technol.* **5**, 187-196.
 16. Yokosuka, T., M. Sasaki, N. Nunomura, and Y. Asao (1980), Aroma of soy sauce, *J. Brew. Soc. Japan* **75**, 717-728.
 17. Cho, K. J., C. O. Park, Y. J. Chae, D. S. Kim, and B. H. Ryu (1993), Isolation and characteristic properties of *Zygosaccharomyces rouxii* BH-90 and *Candida versatilis* BH-91 isolated from soy sauce mash, *Bull. of Kyungshung Univ.* **14**, 179-191.
 18. Hamano, M., A. Okhara, 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.
 19. Spackman, K. H., W. H. Stein, and S. Moore (1958), Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids, *Anal. Chem.* **30**, 1190-1198.
 20. Ryu, B. H. and Lee, B. H (1981), Properties caramel colors prepared by wastmolasses, *J. Kor. Soc. Food Nutr.* **10**(2), 93-101.
 21. Yokosaka, T., T. Sakasai, and T. Asao (1995), 19 Studies on the flavous substances in shoya, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **41**, 428-423.
 22. Asao, Y., T. Sakasai, and T. Yokotsuka (1967), Studies on the flavorful substances in shoyu, *Nippon Nogeikagaku Kaishi* **1**, 434-441.
 23. B. H. Ryu and K. D. Nam (1987), Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeast cells, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* **15**, 248-251.