

간장발효에 관여하는 효모에 관한 연구(제2보)

—간장 덧 중에 생육하는 효모에 대하여—

*이택수, 이석건, *신보규
*새표장유 양조장, 충남대학교 농과대학

(1970. 6. 1. 수리)

Studies on the Yeasts for the Brewing of Soy Sauce(2)

Isolation, identification and classification of the yeasts in the soy sauce mash

*Taik Soo Lee. Suk Kun Lee. *Bo Kyu Shin.

*Saimpyo Soy Sauce Brewery. College of Agriculture, Chung Nam University

(Received June 1. 1970)

SUMMARY

The yeasts in the soy sauce mash were isolated and identified, and they were classified by coloring with the treatment of TTC(2, 3, 5, triphenyltetrazolium chloride) agar and counted in process of time. The results obtained were as follows:

a) The number of ordinary and osmophilic yeasts in 1 ml. of the soy sauce mash showed a tendency to be increased from the mashing to the mature stages and to decrease in the aging stages: 127×10^3 immediately after mashing, 86×10^3 1 month after, 356×10^3 3 months after, 1250×10^3 6 months after and 65×10^3 2 years after mashing in the case of ordinary yeasts, and 0 after mashing, 40×10^3 1 month after, 81×10^3 3 months after, 358×10^3 6 month after and 23×10^3 2 years after mashing in the case of osmophilic yeasts.

b) 50 strains of yeasts were isolated from the soy sauce mash optionally in process of fermentation period, and they were identified as 7 genera and 18 species: 10 strains of *Saccharomyces rouxii*, 1 strain of *Saccharomyces marxianus*, 3 strains of *Saccharomyces rosei*, 1 strain of *Saccharomyces fermentati*, 6 strains of *Saccharomyces mellis*, 1 strain of *Saccharomyces acidifaciens*, 1 strain of *Saccharomyces pastori*, 3 strains of *Pichia polymorpha*, 2 strains of *Hansenula anomala*, 1 strain of *Hansenula saturnus*, 2 strains of *Hansenula suaveolens*, 5 strains of *Nadsonia fulvescens*, 8 strains of *Debaryomyces hasenii*, 1 strain of *Debaryomyces nicotianae*, 1 strain of *Debaryomyces kloeckeri*, 2 strains of *Torulopsis sake*, 1 strain of *Torulopsis holmii* and 1 strain of *Candida pelliculosa*.

c) Distribution of yeasts according to the fermentation period was as follows:

i) *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces rosei*, *Pichia polymorpha*, *Debaryomyces hasenii*, *Torulopsis sake*, *Candida pelliculosa*, *Debaryomyces*

nicotianae, *Nadsonia fulvescens*, *Hansenula suaveolens* and *Hansenula saturnus* were found in the early stages of fermentation.

ii) *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces pastori*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces acidifaciens* and *Debaryomyces hansenii* appeared in the mature stages.

iii) *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces mellis*, *Nadsonia fulvescens*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces kloeckeri*, *Torulopsis sake* and *Torulopsis holmii* were distributed in the aging stages.

d) TTC white yeasts were found in abundance in the early stages of fermentation and TTC red yeasts appeared more than 50 per cent in the mature and aging stages.

e) The yeasts belonging to *Saccharomyces mellis* and *Saccharomyces pastori* were classified as TTC red yeasts, *Saccharomyces acidifaciens* were red pink, *Hansenula saturnus*, *Debaryomyces kloeckeri*, and *Torulopsis holmii* were pink, *Saccharomyces marxianus* and *Nadsonia fulvescens* were white and the others were the same as the description in the previous report. *Saccharomyces rouxii* were classified for the most part as TTC red yeasts, and while some of them were red pink.

f) Species of yeasts in the soy sauce mash were similar to those in the soy sauce koji, but the latter were not osmophilic and in the former case, the osmophilic yeasts were increased in process of fermentation period.

서 론

저자들은 전보⁽¹⁾에서 간장국 제조과정중에 생육하는 효모를 계수 및 분리동정 한바있다. 이어서 이와같이 제조된 국으로 담금한 간장덧이 정상적으로 발효숙성 하는동안 실제 관여하는 효모의 분포와 동태를 밝히고저 담금후 간장덧을 경시적으로 취하여 즙액의 일반성분을 조사함과 동시에 단계적으로 간장덧중에 생육하는 효모를 계수및 분리 동정하는 실험을 계속 하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

실 험

1. 시료간장덧

전보의 방법으로 제국한 간장국을 길이 80cm 직경 40cm의 항아리에 넣고 18%의 식염수를 전 원료에 대해 2배정도가하고 균일하게 혼합한다음 담금온도 25°C로 하여 30°C의 항온실에서 6개월간 자연발효 시킨 간장덧과 2년 숙성된 간장덧을 시료로 하였다.

2. 효모균수의 측정

전보⁽¹⁾의 방법에 준하여 시료간장덧 중의 효모균수를 측정 하였다. 평판고체배지로는 다음의 A, B 배지를 함께 사용 하였다.

A: glucose 2.5%, yeast ext. 0.5%, KH₂PO₄

0.5%, 생간장 10%, NaCl 0.5%, Na-propionate 0.2%, agar 2.0%, pH 5.0

B: A배지의 NaCl 농도 0.5% 대신에 10%로 하고 기타는 A 배지와 동일함

3. 효모의 분리

담금직후(이하 strain number A로 표시), 담금 1개월(이하 B), 숙성 3개월(이하 C), 숙성 6개월(이하 R), 후숙 2년(이하 S)된 간장덧에서 전보의 방법에 준하여 각각 10주의 효모를 분리 하였다.

4. 분리효모의 동정

분리된 효모들을 Lodder⁽²⁾의 방법에 의하여 실험하고 그결과로 동정 하였다.

5. 시료간장덧 즙액의 일반성분

간장의 일반분석은 장유분석법⁽³⁾에 기재된 방법에 따라 행하였으며 색도및 B.A의 측정법은 아래와 같다.

(1)색도 : 저자들이 설정한 회색법에 의하여 측정 하였다 즉 일정한 표준색도와 동일한 색도를 나타낼때까지 회색한 배율로 표시 하였다.

표준색도 : N/100 I₂액 40ml를 직경약 1.8cm 되는 시험관에 취하고 0.1% dextrine 용액 1.5ml를 가하여 나타나는 색도를 표준색도로 한다. 이것은 시일의 경과에 따라 색도가 변하므로 측정할때 만 들어야 하며 방부제를 넣어 밀봉해두면 장시간 사

용할수있다.

측정법 : 표준색 tube 와 동일한 직경의 시험관에 시료간장 1ml 를 취하고 표준색과 동일한 색도를 나타낼때까지 10ml 용 mess pipett 으로 증류수를 가한다 이때 증류수의양을 Xml 라하면 색도는 1+X이고 만약 색도가 희박한 시료를 5ml 취했을 때의 색도는 $\frac{5+X}{5}$ 로 산출된다 또한 극히 진한 색도를 측정할때는 표준색보다 다소진하게 임의 희석한다음 이것을 표준색 tube 와 동일한 직경의 tube 에 5ml 취하고 표준색과 동일한 색도를 나타낼때 까지 증류수로 희석하고 이때 소요된 증류수

의 양을 Xml 라고 하면 색도는 $(1+\frac{X}{5}) \times$ 희 색배수이다.

(2) Buffer action: 간장자체의 pH 와 간장 10ml 에 N/10 NaOH 6ml 를 가한후의 pH차로서 표시하였다.

결과 및 고찰

1. 간장종의 효모균수

담금직후, 담금후 1개월, 3개월, 6개월, 2년된 간장덧에서 생육하는 효모를 단계적으로 일반 효모와 내염성효모로 대별하여 계측하고 TTC 정색에 의하여 유별한 결과는 Table 1 과 같다.

Table I. The yeast flora in one ml of soy sauce mash (Unit 10⁶).

Item The kinds of soy sauce mash TTC Color	Ordinary yeast					Osmophilic yeast				
	1-D	1-M	3-M	6-M	2-Y	1-D	1-M	3-M	6-M	2-Y
White	24	78	28	95	20	—	36	4	36	6
Red	38	—	258	895	33	—	—	51	250	12
Red pink	45	3	49	170	12	—	1	15	65	3
Pink	20	5	21	90	—	—	3	11	7	2
Total	127	86	356	1,250	65	—	40	81	358	23

※ (D=day, M=month, Y=year)

(1) 일반효모

A 배지를 사용하여 간장덧 1ml 중에 존재하는 효모의 수를 측정한 결과 담금직후의 덧에 약 13만, 1개월덧에 약 9만, 3개월덧에 약 35만, 6개월덧에 125만, 2년된 간장덧에서는 6만 5천의 효모수가 존재 하였다. 6개월 숙성된 간장덧에서 효모수가 가장많이 존재하였고 2년된 후숙기의 간장덧에서 가장적게 나타났다. 즉 담금초에서 6개월까지 상승 하였다가 후숙기에 감소되는 경향을 보여주고 있다 한편 TTC정 색반응에 있어서는 초기에는 TTC white가 많았고 숙성기 이후는 TTC red효모가 많았다. 森口等⁽⁴⁾은 환대두와 탈지대두의 비교시험에서 환대두를 간장원료로 사용하였을 시는 담금직후의 간장덧에서 ml당 $1 \times 10^6 \sim 334 \times 10^6$ 의 효모가 존재하고 탈지대두를 사용하였을시는 1165×10^6 으로 간장원료에 의하여 균수가 상이하다 하였고 本間等⁽⁵⁾은 신식 2호장유 양조에 대한 효모의 공업적 이용에 있어서 효모의 무첨가구에서는 10일 된덧에서 $1,400 \sim 9.9 \times 10^6$, 30 일 덧에서 $3,800 \sim 1.4 \times 10^6$, 60 일 덧에서 $4,400 \sim 8.5 \times 10^6$ 개의 효모가 존재하고 효모의 첨가구에서는 10일 덧에서 100

$\sim 9.8 \times 10^6$, 30 일 덧에서 $1,400 \sim 2.1 \times 10^6$, 60 일 덧에서 $71,000 \sim 9.2 \times 10^6$ 개로서 효모의 첨가구에서 효모의 수가 증가된다는 것을 보고 하였고 今井等⁽⁶⁾은 탈지대두와 gluten meal의 신식 2호 양조 비교 시험에서 gluten meal를 사용한 경우는 1×10^6 , 탈지대두를 사용한 경우는 1×10^4 개의 효모가 존재한다고 보고 하였다. 町⁽⁷⁾는 간장덧의 천연과 온양의 비교연구에서 천연양조시 20 일 된덧에서 4,900, 63 일된 덧에서 99,000, 107 일된 덧에서 60,000, 194 일된 덧에서 130만, 1년덧에서 47,000개의 효모가 존재하고 온양시는 20 일 덧에서 1,700, 63 일된덧에서 47,000, 107 일된 덧에서 34,000, 194 일된 덧에서 360개의 효모가 존재한다고 하였다. 즉 온양시 보다 천연에서 효모의 수가 증가된다 하였고 담금초에 효모수가 증가 하였으나 후숙기에 감소된 경향을 볼수 있었다고하였다. 한편 Nishimura 공장에서는 온양 담금 했을때의 효모수는 $260 \sim 7.4 \times 10^4$ 으로 나타났다고 보고 하였다. 池邊等⁽⁸⁾은 NK 식 담백처리법으로 원료를 처리하여 기계제국한 국으로 공업적 양조 시험시의 미생물의 동태에 관하여 보고 한바 있다. 즉 담금

1개월 덧에서 2천~12만, 3개월 덧에서 8천~2만 5천, 6개월 덧에서 110만~460만, 1년된 덧에서 0~6천 6백개의 효모가 존재 하였으며, 초기부터 6개월 까지는 증가 현상을 나타 내었다가 후기에는 전혀 존재하지 않거나 감소하였다고 보고 하였다. 이상의 결과를 저자들의 실험결과와 비교할때 생표간장덧중의 효모수는 비교적 적은편이었다고 볼 수 있다. 이것은 환경과 지역 그리고 제국 덧 덧의 관리상태에 따라 상당한 차이를 가져 오는것이라 생각된다 특히 일본 간장에서 제국할때 효모가 첨가된복합체의 종국을 사용하고 또한 담금후 별도로 효모를 배양 첨가 하기때문에 발효기간중 효모수가 많으며 우량한 제품을 얻을수 있는 것이다. 이러한 전지에서 볼때 우리나라에서도 재래의 방법을 탈피하고 효모이용에 관한 연구를 행하여야 할것이다. 한편 전보⁽¹⁾에서 보고한바와 같이 제국중 자연시식 하는 효모수는 제국일수의 경과와 함께 증가되며 출국시에 가장 많았다. 그러나 이들은 15~18%의 식염농도에서 대부분 생육이 억제 되므로 담금후 초기에는 국으로 부터오는 일반효모와 담금후에 공기중으로 부터오는 이들 일반효모가 어느기간까지는 생존하나 시일의 경과와 함께 도태되고 내염성효모가 점차 생육하게 되는것으로 생각된다.

(2) 내염성효모

분리배지로서 B 배지를 사용하여 간장덧 1ml 중에 존재하는 내염성효모의 수를 살피본 결과는 담금직후의 덧에서 0, 1개월 간장덧에서 4만, 3개월 간장덧에서 약 8만, 6개월 간장덧에서 약 36만, 2년된 간장덧에서 약 2만개의 효모가 존재하였고, A 배지로 분리 했을때와 마찬가지로 6개월된 간장덧에서 가장많이 존재하고 담금초기에는 전혀 존재 하지 않았으며 후속기에는 감소되는 경향을 볼수 있었다. 한편 TTC 정색반응에 있어서는 담금 1개월시는 TTC white 효모가 90%, 숙성기 이후는 TTC red 가 52.1~69.5%로서 가장 우세함을 알수 있었다. 本間等⁽⁶⁾은 효모의 무침가구에서는 10일된 덧에서 내염성효모가 $150 \sim 8.6 \times 10^5$, 30일덧에서 $2,900 \sim 3.3 \times 10^5$, 60일덧에서 $1,300 \sim 5.1 \times 10^5$ 개의 효모가 존재하고 효모의 첨가구에서는 10일 덧에서 $550 \sim 9.2 \times 10^4$, 30일덧에서 1만 1천~120만, 60일 덧에서 $410 \sim 1.9 \times 10^6$ 개의 효모가 존재 한다고 보고 하였고, 梅田等⁽⁹⁾은 3일국과 4일국의 비교양조 시험에서 3일국은 담금시 효모수가 10^6 에서 담금후 20일경에 10^6 까지 상승하였

다가 다시 감소하는 경향을 나타냈으며 4일국에서는 담금시 10^6 에서 4개월 경과후 10^4 으로 감소하였다가 6개월 경과후에 다시 10^6 으로 상승하며 3일국 담금덧이 4일국담금덧보다 일반적으로 효모수가 많다고 보고 하였다. 芳賀等⁽¹⁰⁾은 기계제 국한 국을 냉온담금에 의한 장유양조 시험에서 8°C로 냉온담금한 경우는 담금초에 50만, 1개월덧에 60만, 3개월덧에 45만, 6개월덧에 7만 4천개의 효모가 존재하며 상온($26 \sim 28^\circ\text{C}$)으로 담금한 경우는 담금초에 650만, 1개월 덧에 1600만, 3개월 덧에 80만, 6개월덧에 13만개의 효모로서 냉온담금시는 상온담금시 보다 효모수가 적다고 하였으며, 町⁽⁷⁾은 천연시 담금 20일덧에 0, 63일덧에 0, 107일 덧에 1만 5천, 194일 덧에 5만 4천, 1년된 덧에 212만개의 효모가 존재하고 온양담금 에서는 20일덧에 0, 63일덧에 4만 7천, 107일 덧에 2만 2천, 194일 덧에 2만천으로 나타났고 Nishimura 공장 간장덧 에서는 0~28만개의 효모가 존재 한다고 보고 하였다. 伊藤⁽¹¹⁾는 각종 기계장치를 설비하여 합리적인 저온제국과 온도관리로서 양조기간을 단축시키는 시험에서 1개월 덧에 $105 \sim 1.0 \times 10^7$, 3개월 덧에 36만~230만, 5개월 덧에 7만 7천, 1년된덧에 21만~91만으로 초기에서 많은 수를 나타내었다가 차차 감소하는 경향을 보였다고 보고한바 있다. 遠藤等⁽¹²⁾은 간장덧의 pH변화와 미생물에 대한 연구에서 항온형 덧에서는 pH의 저하시에 균수가 증가하고 방온형 덧에서는 온도가 상승후에 균수가 증가 한다고 하였으며 坂口⁽¹³⁾는 *Saccharomyces rouxii*의 생육범위는 18% 식염농도하에서 pH 3~5로 제한된다고 보고 하였다. 池邊⁽⁸⁾은 1개월 덧에 4만 6천~80만, 3개월 덧에 2천 9백~11만, 6개월 덧에 4천~33만, 10개월 덧에 0~62만의 효모가 존재 한다고 보고 하였다 이상의 보고된 결과를 살펴볼때 효모를 첨가하고 있지않는 생표간장덧에는 내염성 효모가 상당히 적은것을 알수 있다. 宋等⁽¹⁴⁾은 간장중의 산막효모는 식염농도 26% 이상에서 전연 생육하지 못한다고 하였고, 張⁽¹⁵⁾은 저장간장중 12년된 개량식간장에는 828만, 20년된 재래식간장에는 248개, 7년된 재래식덧 2년과 5개월된 개량식간장에서는 0, 7개월된 재래식간장 에서는 582개의 효모수를 나타 내었다고 보고한바 있다. 그러나 저자들이 실험한 간장덧의 경우에는 2년된 덧에도 ml 당 2만 3천개의 효모가 존재 하였으며 내염성효모 중에는 26%의

고식염농도하에서 생육하는 것도 볼수있었다. 시료간장덧이 정상적인 발효를 하고있는가의 여부를 확인하기 위하여 전발효기간을 통하여 15일

간격으로 일반성분을 분석한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. The chemical composition in sample soy sauce.

Composition	Days													
	1	15	30	45	60	75	90	105	120	135	150	160	180	2-year
Specific gravity(at 15°C)	18.25	20.25	21.42	22.3	22.5	23.0	21.2	21.5	20.6	21.5	22.0	22.5	22.5	22.0
NaCl concentration(%)	18.14	18.14	18.14	17.99	18.14	18.43	18.14	18.43	18.14	17.99	18.14	18.43	18.43	18.43
Total nitrogen (%)	0.58	0.92	1.16	1.18	1.23	1.34	1.30	1.38	1.36	1.28	1.30	1.30	1.44	1.46
Extract(%)	6.5	10.2	13.07	16.41	15.36	16.54	15.32	14.0	13.5	12.5	13.5	13.5	14.2	13.5
pH	5.9	5.8	5.4	5.7	5.0	4.9	4.8	4.9	5.0	4.8	4.7	4.9	5.0	4.7
B.A	2.0	2.0	1.8	1.9	1.6	1.2	1.2	1.0	1.2	1.5	1.3	1.2	1.0	1.2
Color	—	—	0.3	0.52	0.75	1.0	1.2	1.4	1.7	1.9	2.0	2.3	2.5	5.2

2. 분리효모의 균학적 성질 및 동정

담금후 단계적으로 간장덧에서 분리한 50 주의 효모에 대하여 생리적 및 형태적 제성질을 실험한 결과는 Table 3, 4 및 5와 같다.

Table 5. The grouping of the isolated 50 strains by TTC reaction.

TTC color	strain number
White	B ₇ , B ₈ , C ₁ , C ₉ , A ₉ , B ₂ , A ₅ , B ₄ , B ₁₀ , B ₃ , B ₅ , B ₉ , S ₁₃ , S ₁₄ , A ₂
Red	A ₃ , A ₇ , C ₁₀ , R ₅ , R ₇ , R ₉ , R ₁₀ , S ₁₅ , A ₁₀ , C ₅ , C ₈ , C ₆ , C ₇ , R ₆ , R ₈ , S ₁₆ , S ₁₇ , C ₄
Red pink	C ₃ , S ₁₄ , C ₂ , A ₁ , A ₄ , A ₆ , B ₁ , R ₁ , R ₂ , R ₄ , S ₄ , R ₃
Pink	A ₈ , S ₈ , B ₆ , S ₁₂ , S ₁₀

이상의 실험결과를 Lodder⁽²⁾의 동정법에 의하여 동정한 결과 제 1 group은 *Saccharomyces rouxii* 형, 제 2 group은 *Saccharomyces marxianus*,

제 3 group은 *Saccharomyces rosei*, 제 4 group은 *Saccharomyces fermentati*, 제 5 group은 *Saccharomyces mellis*, 제 6 group은 *Saccharomyces acidificiens*, 제 7 group은 *Saccharomyces pastori* 형에 유사하였고, 제 8 group은 *pichia polymorpha* 형이었으며, 제 9 group은 *Hansenula anomala*, 제 10 group은 *Hansenula saturnus*, 제 11 group은 *Hansenula suaveolens*, 제 12 group은 *Nadsonia ful-*

escens, 제 13 group은 *Debaryomyces hanseni*, 제 14 group은 *Debaryomyces nicotianae*, 제 15 group은 *Debaryomyces kloeckeri*, 제 16 group은 *Torulopsis sake*, 제 17 group은 *Torulopsis holmii*, 제 18 group은 *Candida pelliculosa*로 각각 동정되었다.

3. 간장덧종의 효모분포

간장덧 숙성과정중에 생육하는 효모들을 단계적으로 분리하여 동정한 결과 *Saccharomyces rouxii* 10주, *Saccharomyces marxianus* 1주, *Saccharomyces rosei* 3주, *Saccharomyces fermentati* 1주, *Saccharomyces mellis* 6주, *Saccharomyces acidificiens* 1주, *Saccharomyces pastori* 1주, *Pichia polymorpha* 3주, *Hansenula anomala* 2주, *Hansenula saturnus* 1주, *Hansenula suaveolens* 2주, *Nadsonia fulvescens* 5주, *Debaryomyces hanseni* 8주, *Debaryomyces nicotianae* 1주, *Debaryomyces kloeckeri* 1주, *Torulopsis sake* 2주, *Torulopsis holmii* 1주, *Candida pelliculosa* 1주 등 7속 18종으로 분류되었으며 그 분포 상황은 Table 6과 같다

상기의 결과와 같이 간장덧의 진숙성기간을 통하여 *Saccharomyces rouxii*는 10주로서 가장많은 분포를 보였으며 *Debaryomyces hanseni*, *Saccharomyces mellis*, *Nadsonia fulvescens* 등속도 많이 출현 되었으며 기타의 속들은 약간씩 출현된것을 볼수있다. 齊藤⁽¹⁶⁾(17) 滿田⁽¹⁸⁾ 西村⁽¹⁹⁾ 喜多⁽²⁰⁾ 高橋⁽²¹⁾ 石丸⁽²²⁾ 등은 일반간장덧으로부터 간장 유용 균인 *Zygosaccharomyces major*, *Zygosaccharomyces soja* 와 간장의 유해균인 *Zygosaccharomyces salsus*,

Table 3. The microbiological characteristics of the isolated 50 strains in the soy sauce mash.

Group	Strains	Cells	Spore	PM	Cultures		Fermentation Gu. Ga. Su.M.L.	Assimilation Gu. Ga. Su. M.L	KNO ₃	EtOH	Splitting of arbutin
					Malt ext.	Malt agar					
1	A ₃ , A ₇ , C ₃ , C ₁₀ , R ₅ , R ₇ , R ₉ , R ₁₀ , S ₁₄ , S ₁₅	round, oval (3.0~5.0) ×(4.5~8.0)μ	round 1-4	-	R. Sd.	S. Cr. Ri. Gl.	+ - - + -	+ + ± + -	-	-	-
2	A ₂	oval (3.0~7.5) × (4.5 ~9.0)μ	oval 1-4	+	R. Sd.	S. Cr. Gl.	+ + + - -	+ + + - - +	-	+	+
3	A ₁₀ , C ₅ , C ₈	round (3.0~6.5)μ	round 1-3	-	R. Sd. Is.	S. Cr. Gl.	+ - + - -	+ - + - - +	-	±	-
4	C ₂	round, oval (3.0~7.0) × (3.0 ~8.0)μ	round 1-2	-	R. Sd. Is.	S. Cr. Ri. Gl.	+ ± + + -	+ - + + -	-	-	-
5	C ₆ , C ₇ , R ₆ , R ₈ , S ₁₆ , S ₁₇	round (2.5~4.5)μ	round (2-3)	-	R. Sd.	S. Cr. Wr.	+ - - - -	+ ± - - -	-	-	-
6	R ₃	round (3.0~4.8)μ	round 1-4	+	R. Sd.	D. Cr. S. Gl.	+ - - - -	+ + - - -	-	+	-
7	C ₄	round (2.3~5.0)μ	round 1-4	-	R. Sd.	S. Cr. Gl. F.	+ - - - -	+ - - - -	-	-	-
8	A ₆ , B ₄ , B ₁₀	oval (2.3~3.0) × (4.5 ~6.0)μ	round 1-2	+	R. Sd. Is. Tp. Wp.	Wh. F. Wr.	+ + + + -	+ + + + -	-	+	+
9	C ₁ , C ₉	round, oval (2.5~3.6) × 2.5 ~6.0)μ	hat shape 1-4	+	Wp. Sd. Cp.	Wy. D. Wr.	+ + + + -	+ + + + -	+	+	+
10	B ₆	round, oval (3.3~4.0) × (3.8 ~5.7)μ	oil drop 1-2	+	Wp. Sd.	Wy. D. Ri. Wr.	+ - + - -	+ + + - -	+	+	+
11	B ₇ , B ₈	round, oval (3.0~4.8) × (2.3 ~3.5)μ	round 1-2	+	Wp. Sd.	Wh. Ri. Wr. D.	+ - + ± -	+ ± + ± -	+	+	+
12	B ₉ , B ₅ , B ₉ , S ₁₃ , S ₁₄	round, oval (2.5~4.5) × (4.2 ~5.3)μ	oil drop 1-2	-	Tp. Wp. Sd.	S. Cr. D.	+ + + + -	+ + + + -	-	+	-
13	A ₁ , A ₄ , A ₆ , B ₁ , R ₁ , R ₂ , R ₄ , S ₄	round, oval (2.8~3.5) × (4.5 ~5.5)μ	round 1-2	-	D. P. Sd. Cp.	Cr. D. Ri.	+ - - - -	+ + + + -	-	+	±

14	B ₂	round, oval (2.6~4.0) × (2.7 ~5.0) μ	round 1-2	-	Wp. Sd. Cp.	Wr. Ri	± ± ± ± ± -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15	S ₁₂	round, oval (3.3~4.5) × (2.7 ~3.3) μ	round 1-2	-	R. Sd.	Wy. Ri.	- - - - -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	A ₈ , S ₈	round, oval (3.75~4.5) × (4. 5~6.5) μ	-	-	R. Is. Tp. Sd.	Gl. S.	+ ± ± ± ± -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
17	S ₁₀	round, oval (3.0~3.8) × (2.3 ~3.0) μ	-	-	Sd.	Cr. S.	+ - ± + -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
18	A ₉	round, oval (3.0~5.0) × (4.8 ~5.6) μ	-	+	Wp. Sd.	Wy. D.	+ + + + -	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

※ Malt ext.: malt extract culture, Malt agar: malt agar streak culture, Gu: glucose, Ga: galactose, Su: sucrose, M: maltose, L: lactose, PM: pseudo mycelium, +: positive, -: negative, KNO₃: KNO₃ assimilation, EtOH: ethanol utilization, R: ring, R: ring, Sd: sediment, Is: islets, P: pellicle, Cp: creeping, Wp: wrinkled pellicle, Tp: thin pellicle, Ri: raised, S: smooth, Gl: glistening D: dull, F: flat, Wr: wrinkled, Cr: cream, Wh: white, Wy: white to yellowish

Table 4. Growth condition of the isolated 50 strains in the malt media of variety NaCl concentration.

NaCl (%)	strain number
0~10	(#): All strains
15~18	(#): A ₇ , R ₉ , S ₁₇ , S ₄ , A ₈ , A ₂ , A ₅ , S ₁₀ , B ₄ , R ₁₀ , C ₈ , R ₂
20	(#): S ₁₄ , C ₇ , A ₄ , A ₆ , S ₁₄ , R ₉ , S ₁₂ , S ₁₅ , S ₈ , A ₁₀ , A ₉ , C ₉ , S ₁₆ , C ₄ , C ₂ , R ₄ , C ₅ , R ₇ , A ₃ , (+): S ₁₃ , C ₆ , C ₃ , A ₁ , R ₅ , R ₆ , R ₈ , C ₁ , B ₃
26~28	(#): B ₇ , B ₈ , (#): C ₁₀ , R ₁ , (+): B ₅ , B ₉ (#): B ₆ , B ₁₀ , (+): B ₁ , B ₂

※ #: good growth, +: growth, -: scanty growth

Table 6. The distribution of yeasts of isolated 50 strains in soy sauce mash.

1-D		1-M		3-M		6-M		2-Y	
Species	Numbers	Species	Numbers	Species	Numbers	Species	Numbers	Species	Numbers
<i>Saccharomyces rouxii</i>	2	<i>Pichia polymorpha</i>	2	<i>Saccharomyces rouxii</i>	2	<i>Saccharomyces rouxii</i>	4	<i>Saccharomyces rouxii</i>	2
<i>Saccharomyces marzianus</i>	1	<i>Hansenula saturnus</i>	1	<i>Saccharomyces rosei</i>	2	<i>Saccharomces mellis</i>	2	<i>Saccharomyces mellis</i>	2
<i>Saccharomyces rosei</i>	1	<i>Hansenula suaveolens</i>	2	<i>Saccharomyces fermentati</i>	1	<i>Saccharomyces acidifaciens</i>	1	<i>Nadsonia fulvescens</i>	2
<i>Pichia polymorpha</i>	1	<i>Nadsonia fulvescens</i>	3	<i>Saccharomyces mellis</i>	2	<i>Debaryomyces hansenii</i>	3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	3	<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	<i>Saccharomyces pastori</i>	1			<i>Debaryomyces kloeckeri</i>	1
<i>Torulopsis sake</i>	1	<i>Debaryomyces nicotianae</i>	1	<i>Hansenula anomala</i>	2			<i>Torulopsis sake</i>	1
<i>Candida pelliculosa</i>	1							<i>Torulopsis holmii</i>	1

Zygosaccharomyces japonicus 를 분리동정 한바있고 佐佐木等⁽²³⁾⁽²⁴⁾은 일본 북해도 지방의 간장덧중에 생육하는 효모의 분포및 분류에서 7속 23종의 효모를 동정한바 있다. 즉 *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces fructuum*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces mellis*, *Debaryomyces halotolerans sp. nov.*, *Hansenula anomala*, *Hansenula subpelliculosa*, *Torulopsis sake*, *Torulopsis gropengiesseri*, *Torulopsis bacillaris*, *Torulopsis famata*, *Torulopsis versatilis*, *Torulopsis anomala*, *Torulopsis etchellsii*, *Torulopsis magnoliae*, *Torulopsis nadaensis*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida solani*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Sporobolomyces roseus*, 등이었으며 *Saccharomyces rouxii*는 모든 sample 중에서 가장많이 존재하였고 간장발효에 가장 중요한 유용효모라고 보고한바 있는데 저자들의 실험결과와 비교할때 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces mellis*, *Hansenula anomala*, *Torulopsis sake*를 제외하고 기타의 효모들은 다소 상이한 분포를 보여 주었다. 또한 大西⁽²⁵⁾는 일본각지의 균주보존 기관 으로부터 수집된 간장효모와 간장덧으로부터 분리된 효모를 동정한 결과 공시균주의 대부분은 *Saccharomyces rouxii* 였으며 담금초기의 간장덧에는 *Torulopsis famata*, *Pichia farinosa*, *Trichosporon behrendii*, *Candida polymorpha*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida rugosa*, *Trichosporon cutaneum*

등이 생육하며 발효기의 간장덧에는 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces acidifaciens*, 후숙기의 간장덧에는 *Torulopsis halophilus*, *Torulopsis nadaensis*, *Torulopsis versatilis*, *Torulopsis etchellsii*, *Torulopsis sphaerica*, *Torulopsis sake* 등의 효모가 생육한다고 보고하였다. 즉 담금초기에는 *Torulopsis* 와 *Candida* 속, 발효기에는 *Saccharomyces* 속 발효후기에는 *Torulopsis* 속이 간장 발효의 주인공이라고 보고하였다.

저자들의 실험결과에 있어서는 담금초기에 *Saccharomyces rouxii*, *Debaryomyces hansenii*, *Nadsonia fulvescens* 등의 효모가 분리되었고 발효기에는 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces mellis* 등, 후숙기에는 *Saccharomyces rouxii*, *Torulopsis sake* 등의 효모가 분리되었다. 즉 *Saccharomyces rouxii*는 전발효기간을 통하여 분리되었으며 특히 발효기에 가장많이 출현 되었고 *Torulopsis* 속은 3주로서 출현이 적었으며 기타의 속들은 전혀 상이한 분포였다.

전보⁽¹⁾에서 보고한바와 같이 간장국 효모중 가장 우세하였던 *Hansenula anomala*와 *Pichia polymorpha*는 이들의 대부분이 식염농도 15~18%에서 거의 억제되므로 실제간장덧 숙성에 큰영향을 미치지 못하고 담금초기에는 잔존하나 숙성기간의 경과와 함께 도태되는 것이라고 생각 된다. 한편 *Saccharomyces rouxii*는 간장국 또는 간장덧 숙성기간을 통하여 가장많이 존재 하며 국중의 것은 비교적 식염내성이 약하였으나 이들의 대부분

이 내염성인고로 간장발효에 주로 관여하는 효모로 생각된다.

또한 간장덧 중에 생육하는 효모를 TTC 정색반

응에 의하여 유별한 결과를 백분률로 표시하면 Table 7 과 같다.

Table 7. The ratio(%) of yeast groups in the soy sauce mash by TTC reaction.

The kinds of soy sauce mash	TTC Color			
	White	Red	Red pink	Pink
1-D	18.9 (-)	29.9 (-)	35.6 (-)	15.8 (-)
1-M	90.7 (90)	- (-)	3.5 (2.5)	5.8 (7.5)
3-M	7.8 (4.9)	72.4 (62.9)	13.7 (18.5)	6.1 (13.7)
6-M	7.6 (10.5)	71.6 (69.5)	13.6 (18.1)	7.2 (1.9)
2-Y	30.8 (26.8)	50.7 (52.1)	18.5 (13.4)	- (8.7)

※ () : Osmophilic yeast

간장덧이 1개월 경과시에는 white 효모가 우세하였고 발효기 및 후숙기에는 red 효모가 50% 이상으로 우세하였으며 pink 효모는 0~15.8% 로서 가장 적었다. 국중효모의 TTC 정색반응은 TTC white 가 60%내외로 가장 많은 비율을 나타내었고 red 가 5.6~11.1%로서 가장 적었는데 간장덧중의 효모에서는 red 효모가 가장 많이 나타났다. 이와 같은 결과는 *Saccharomyces rouxii* 등이 TTC red 이며 이들은 발효기간중 증가하기 때문이라고 생각 된다.

또한 분리동정된 효모들의 TTC 정색반응에 의한 유별은 *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces pastori* 는 TTC red 로 나타났고 *Saccharomyces acidifaciens* 는 red pink, *Hansenula saturnus*, *Debaryomyces kloecckeri*, *Torulopsis holmii* 는 pink, *Saccharomyces marxianus*, *Nadsonia fulvescens* 는 white 로 각각 나타났으며 *Saccharomyces rouxii* 중에서도 C₃, S₁₄ 와 같은 균주는 red pink 로 나타난것을 볼수 있었고 기타의 속들은 전보와 동일하게 나타났다.

요 약

간장덧중에 생육하는 효모를 경시적으로 계수 및 분리동정 하고 TTC 정색에 의하여 유별한 결과는 다음과 같다.

(1) 간장덧 1ml중에 생육하는 일반효모의 수는 담금직후 127×10^3 , 1개월후 86×10^3 , 3개월후 356×10^3 , 6개월후 1250×10^3 , 2년후 65×10^3 개로 나타났고 내염성효모수는 담금직후 0, 1개월후 40×10^3 , 3개월후 81×10^3 , 6개월후 358×10^3 , 2년후 23×10^3 개 로서 일반효모와 내염성효모 다 같이 담금초에서 숙성기 까지 상승하였다가 후숙

기에서 감소하는 경향을 보였다.

(2) 간장덧으로 부터 경시적으로 임의 분리한 50주의 효모를 동정한 결과 *Saccharomyces rouxii* 10주, *Saccharomyces marxianus* 1주, *Saccharomyces rosei* 3주, *Saccharomyces fermentati* 1주, *Saccharomyces mellis* 6주, *Saccharomyces acidifaciens* 1주, *Saccharomyces pastori* 1주, *Pichia polymorpha* 3주, *Hansenula anomala* 2주, *Hansenula saturnus* 1주, *Hansenula suaveolens* 2주, *Nadsonia fulvescens* 5주, *Debaryomyces hansenii* 8주, *Debaryomyces nicotianae* 1주, *Debaryomyces kloecckeri* 1주, *Torulopsis sake* 2주, *Torulopsis holmii* 1주, *Candida pelliculosa* 1주 등 7 속 18종으로 동정 되었다.

(3) 담금기간에 의한 효모의 분포는 담금초에 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces rosei*, *Pichia polymorpha*, *Hansenula suaveolens*, *Hansenula saturnus*, *Debaryomyces hansenii*, *Torulopsis sake*, *Candida pelliculosa*, *Debaryomyces nicotianae*, *Nadsonia fulvescens* 등이 생육하고 숙성기에 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces pastori*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces acidifaciens*, *Debaryomyces hansenii* 등이 생육하고 후숙기에는 *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces mellis*, *Nadsonia fulvescens*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces kloecckeri*, *Torulopsis sake*, *Torulopsis holmii* 등이 생육하였다.

(4) 담금초기에는 TTC white 효모가 많이 나타났고 발효기와 후숙기에는 TTC red 효모가 50% 이상을 차지 하였다.

(5) 동정한 이들 효모를 TTC 정색에 따라 유별한 결과 *Saccharomyces mellis*, *Saccharomyces pastori*는 TTC red로, *Saccharomyces acidifaciens*는 red pink, *Hansenula saturnus*, *Debaryomyces kloecckeri*, *Torulopsis holmii*는 pink, *Saccharomyces marxianus*, *Nadsonia fulvescens*는 white로 각각 나타났고 기타는 전보의 결과와 같았다. *Saccharomyces rouxii*는 대부분이 red였으나 red pink로 나타난 것도 있었다,

(6) 간장덧중에 생육하는 효모의 종류는 국중에 생육하는 효모의 종류와 거의 비슷하게 나타났으나 국효모는 대부분이 내염성이 없었고 간장덧중의 효모는 발효기간의 경과에 따라 내염성 효모수가 증가 되었다.

끝으로 본실험을 하는동안 시중지도를 하여주신 충남대학교 박윤중 박사님께 감사드리며 격려와 후원을 하여주신 샘표 장유양조장 박규희 사장님과 김정규, 박승재 양상무님께 심심한 사의를 표하는 바입니다.

참 고 문 헌

- (1) 李澤守, 李錫健: 韓國農化誌 13, 97 (1970)
- (2) Lodder and N.J.W. Kreger-van Rij: The yeasts, a taxonomic study (1967)
- (3) 醬油分析法: 日本醬油技術會 p. 3 (1966)
- (4) 森口繁弘, 川口東一: 日調味科學誌 9, (4) 39 (1961)
- (5) 本間伸夫, 今井誠一, 田代友藏, 桑原美智子: 日調味科學誌 11, (3) 12 (1964)
- (6) 今井誠一, 若林昭, 鈴木態雄: 日醬油と技術 506, 1741 (1966)
- (7) 町美根子: 日調味科學誌, 13, (3) 1(1966)
- (8) 池邊日出男, 福承慶二, 大木規章, 堀孝一, 守江洋子, 鹽田榮臣, 阿部新一: 日醬油と技術 637, 2871 (1970)
- (9) 梅田勇雄, 中村清, 佐佐木重夫, 芳賀宏: 日醬油と技術 531, 1961 (1967)
- (10) 芳賀宏, 佐佐木重夫, 中村清, 梅田勇雄: 日調味科學誌 14, (5) 1 (1967)
- (11) 伊藤寬: 日調味科學誌 13, (3) 22 (1966)
- (12) 遠藤勝之, 高橋甫: 日調味科學誌 15, (4) 1 (1968)
- (13) 坂口建二: 日調味科學誌 13, (3) 31 (1966)
- (14) 宋錫勳, 金鍾協, 李啓瑚, 鄭允秀, 張建型: 陸技研報 2, 32 (1963)
- (15) 張智鉉: 韓國農化誌 9, 9 (1968)
- (16) 齊藤賢道: 東京稅務監督局報告 8, 12 (1905)
- (17) 齊藤賢道: 醱酵菌調查報告 第一回 (1905)
- (18) 滿田隆一: 日農學會報 96號 (1910)
- (19) 西村寅三: 日國稅彙纂 45, 46, 47 號 (1910)
- (20) 喜多原逸: 日工化誌 14, 109 (1911)
- (21) 高橋偵造, 湯川又夫: 日農學會報 112 號 (1911)
- (22) 石丸義夫: 日釀造學雜誌 13, 295 (1935)
- (23) 佐佐木西二, 吉田忠: 日釀工誌 44, 61, 158 (1966)
- (24) 佐佐木西二, 吉田忠, 福山達彦, 西澤郁夫: 日調味科學誌 11, (1) 26 (1964)
- (25) 大西博: 野田醬油研究報告 第2輯 (1961)