

韓國產 酵母의 分類學的 研究

—濁酒에서 分離된 酵母에 對하여—

金 俊 彥 · *李 培 咸

(三共産業社 研究室, *建國大學校)

Taxonomical studies of yeasts in Korea

—On yeasts isolated from Takju—

Jun On KIM and Bae Ham LEE*

(Laboratory, Sam Kong Industrial Co., *Department of Biology, Kunkuk University)

ABSTRACT

The author attempted the taxonomical studies on yeasts in Takju mash.

The samples used for the isolation of yeasts were collected from Takju breweries in Seoul.

The yeasts obtained from Takju were identified as follows using the methods of Lodder *et al.*: *Saccharomyces cerevisiae* group II, *Saccharomyces cerevisiae* group III, other group of *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula anomala* and *Pichia polymorpha*.

Saccharomyces cerevisiae II & III and other group *Saccharomyces cerevisiae* which were considered as wild yeasts have shown their major role in the fermentation process of Takju brewing.

It seems that *Hansenula anomala* has much connection with the flavour of Takju.

Other strains which are poor in their alcoholic fermentation and lower in activity of acid production are not considered to be important in Takju brewing.

緒 論

우리나라 濁酒는 開放式 醱酵에 依해 釀造되며 또 알콜醱酵를 目的으로 酒母 또는 麴子를 使用하고 있으므로 各種 微生物이 混在한다. 그 釀造過程에서 一般的으로 細菌類는 基質自體의 酸에 依하여 陶汰되고, 酵母類는 거의 陶汰되지 않고 野生酵母(裴, 1964; Kodama, 1964, 1966; Ouchi, 1967;

Takeda, 1967)로서 醱酵過程이나 酒質에 影響을 주고 있는 것이 많다고 思料되고 있다. 濁酒에 對한 科學的 研究로서는 濁酒의 成分分析(金, 1968) 液化 및 糖化에 關與하는 *Aspergilli*(李, 1968) 및 *Rhizopus*(李, 1968)의 分類學的 生理學的 研究 그리고 麴子에서 分離된 酵母의 分類學的 生理學的 研究(韓, 1959) 등이 調査된 바 있으나 濁酒 釀造에 關與하는 酒母類에 關한 研究는 (金

1968) 등이 報告한 外에는 거의 이루어지지 않고 있으며 더구나 濁酒 後酸酵 酵母에 對하여는 調査된 바 없다.

濁酒釀造에 關與하는 酵母에 關한 研究로는 1930年 武田(1963)이 우리나라 167個所에서 採取한 술덧에서 *Saccharomyces*, *Torula*, *Pichia*, *Mycoderma*를 分離 報告한 바 있으며 沈(1955)은 濁酒 술덧에서 分離한 *Saccharomyces formosensis*와 *S. shimonisi* 交配하여 酒精生成能에 優秀한 酵母를 얻은 바 있다. 1964年 裴(1964)는 藥濁酒用 酒母製造에 培養酵母를 添加함으로써 野生 酵母의 淘汰에 效果가 있음을 報告하였다. 그리고 金(1968)은 濁酒에서 分離한 4菌株을 分類學的 調査를 行하여 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Hansenula subpelliculosa*를 同定하고 이의 生理的 調査를 한 바 있다.

筆者들은 濁酒釀造에 關與하는 酵母類 特別 後酸酵에 關與하는 酵母類를 調査하고자 釀造場에서 仕込 48時間 經過된 濁酒를 採取, 酵母를 分離하여 同定하였고 이들의 酒精酸酵能을 測定하였기에 이에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

材料:

서울 市內 11個 濁酒工場에서 仕込後 48時間 經過된 것을 採取하였다. 酒精酸酵能을 測定하기 爲하여 市販되고 있는 小麥粉을 使用하였으며 酵素劑로는 糖化力이 600以上되는 粉麴을 使用하였다.

方法:

(1) 酵母分離方法

試料를 10,000倍, 100,000倍, 1,000,000倍로 稀釋한 懸濁液을 0.15 ml씩 synthetic medium에 滴下 擴散시켜 30°C에서 2~3日 培養하면서 나타난 colony를 稀釋法으로 純粹分離하였다. 但 pH는 5.5로 맞추었다.

(2) 酵母同定法

본 實驗은 Lodder(1967)의 方法에 따랐

으며 아래 項의 實驗은 新鮮한 malt extract agar에서 25°C 3日 前培養한 菌株를 使用하였다.

1. 榮養增殖의 特性

滅菌한 slide 上에 potato-glucose agar를 film 狀으로 하여 응고시킨 후 菌을 線狀으로 接種하고 滅菌한 cover glass를 덮어 petri dish에 넣는다. Petri dish에 滅菌水를 부어 濕度를 保存하면서 25°C 4日間 培養後 檢鏡하였다.

2. 細胞의 形態와 크기

Ballg. 15° malt extract broth에 25°C, 3日 培養한 것을 cell의 길이, 폭을 測定하고 形態를 檢鏡하였다.

3. Ascospore의 形成과 形態

各種 sporulation media(gypsum block, Gorodkova agar, V-8 agar potato medium, carrot medium)에 菌體를 3回 蒸留水에 水洗한 것을 一百金耳씩 接種하여 25°C 1個月 培養後 觀察하였다. 이때 ascospore 染色은 Möller 法으로 行하였다.

A. gypsum block

市販 石膏粉을 물로 반죽하여 높이 1.3 cm 直徑 6.5 cm 되게 製作 固化시켜 15 ml 정도 물이 든 petri pish에 넣고 autoclave에서 15 lbs 15分間 滅菌後 冷却시켜서 各 圓形 홈에 接種한.

B. Gorodkova agar

Glucose 2.5%, NaCl 0.5%, broth extract 1%, agar 3%, dist. water.

C. V-8 agar

Tomatoes, carrots, celery, beets, parsley, lettuce, spinach, water cress의 8가지 種類의 vegetable로 된 juice에 agar 2%를 添加한 것.

4. Ballistospore formation

滅菌한 slide glass 上에 各種 sporulation media를 film 狀으로 固化한 後 酵母를 線狀 移植한다. 한편 滅菌한 petri dish에 滅菌 slide glass를 놓고 그 위에 滅菌 硝子鉢을 놓은 후 前記 slide glass를 移植面이 下向

토록 포개어 놓고 25°C 5日 培養後 觀察하였다.

5. 形態學의 特性

Malt agar 에서 20°C, 1個月 培養後 觀察하였다.

6. Pellicle formation

Malt extract broth 에서 25°C, 每 6時間 마다 觀察하고 그 後는 2日, 3日의 區分으로 觀察하였다. 3日後는 17°C 에서 1個月 培養後 觀察하였다.

7. Fermentation

2% 糖液에 yeast extract 液 2滴 加하고 Durham tube 로 25°C 10日 까지 培養後 醱酵如否를 調査하였다. 但 raffinose 는 4% solution 으로 하였다.

8. Sugar assimilation

Sugar auxanographic method 로 25°C, 2日 培養後 觀察, 確認하였다.

9. 硝酸鹽의 資化性

Nitrate-auxanographic method 로 25°C 2日 培養後 觀察, 確認하였다.

10. 炭素源으로서의 ethanol

(NH₄)₂SO₄ 0.1%, KH₂PO₄ 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05% 의 基本培地를 減菌한 後 ethanol 含量이 3% 되게 넣고 5 ml 씩 test tube 에 分注하여 水洗한 酵母 一百金耳를 接種하여 25°C, 1週 培養後 觀察하였다.

11. Arbutin 의 splitting

Yeast extract broth 100%에 arbutin 0.5%, agar 2%를 넣고 溶解後 petri dish 에 分注 減菌後 接種하여 25°C 에서 各 2, 4, 6日 培養하면서 colony 周圍에 暗褐色 環 生成 如否를 觀察하였다.

12. Ester 生産性

Yeast extract (Ballg. 10°)에 glucose 5% 를 添加한 後 50 ml 씩을 Erlenmyer flask (500 ml 容)에 넣고 減菌 接種하여 25°C, 5日 培養後 냄새로 確認하였다.

13. Gelatin liquefaction

Malt extract(Ballg. 10°)에 gelatin 28% 를 넣고 test tube 에 10 ml 씩 分注한 다음

減菌 接種後 21°C 에서 1個月 培養後 觀察 하였다.

(3) 醱酵能 測定法

市販 小麥粉 1,000 g, 水道水 2,000 ml 에 液化酵素 0.5%를 添加하여 70°C 에서 1時間 液化시킨 후 다시 100°C 로 끓인다. 55°C 정도 식은 다음에 粉麴 50 g 를 添加하여 55°C 로 2時間 糖化시킨다. 그 基質을 500 ml flask 에 200 ml 씩 分注하고 여기에 酵母를 10⁴cell/ml 되게 넣고 Hayduck 장치로 CO₂ 發生量으로 醱酵能을 測定하였다.

結 果

Sample 11點으로 부터 酵母 28株를 分離하였으며 分離된 酵母를 color, surface, elevation, edge 및 colony 形態 그리고 細胞의 形態와 크기, pellicle 形態 등으로 11株를 選拔하였다. 形態의 調査(Table 1)를 한 結果를 본다면 우선 細胞의 形態와 크기에 서 菌株 T-1, 6, 8, 10, 13은 ovoid 이며 菌株 T-1, 6, 8, 10의 크기는 (2.5~6)×(3.5~8)μ, 菌株 T-3, 13의 크기는 (3.5~7)×(4~11)μ 이었다. 그리고 菌株 T-5, 11, 12의 모양은 ovoid 이며 (3~4)×(4~6)μ 의 크기를 가졌다.

菌株 T-2와 T-9의 細胞 모양은 elongate 가 大部分이며 ellipsoid 도 있었다. 또 菌株 T-2와 T-9의 크기는 elongate 가 (2.0~2.5)×(5.5~22)μ 과 2×(6~10)μ 이었으며 ellipsoid 는 (2~3)×(4~7)μ 과 3.5×(5~6)μ 이었다. Elongate 에서는 菌株 T-9이 菌株 T-2 보다 길이가 倍가 넘는 크기를 나타내고 있으며 ellipsoid 는 비슷한 크기를 나타내고 있다.

Ascospore 의 形成과 모양에서 모든 菌株가 round 의 모양을 나타냈고 ascus 의 數는 대개 1個를 가지고 있었다.

Pseudomycelium 은 菌株 T-2와 T-9에 서만 形成되었다.

Malt agar 에서 color 는 菌株 T-2만이 greyish-yellow 였으며 그외에 菌株는 thin-

yellow였다. Elevation 은 菌株 T-2만이 flat 였으며 그의 菌株는 convex 였다. Surface 는 全 菌株가 dry smooth 였다. Edge 는 菌株 T-9만이 filamentous 였으며 그의 菌株는 entire 였다.

또한 榮養增殖 狀態는 全 菌株가 multilateral budding 을 하였으며 ballistospore 는 全 菌株가 전혀 形成하지 않았다.

生理的 調査(Table 2)를 한 結果는 全 菌株가 carotinoid pigments, starch like compounds 를 生成하지 않았으며 酸 生成은 微弱하였다. Pellicle 形成에서 菌株 T-2와 T-9은 3일만에 形成되었지만 그 외의 菌株는 形成되지 않았다. 또 한 달 후에 觀察하여 보았더니 菌株 T-2와 T-9은 pellicle sediment 를 이루었으며 그의 菌株는 ring sediment 를 形成하였다.

硝酸鹽 資化는 菌株 T-2와 T-5, 11, 12에만 이루어졌으며 pigment 는 全 菌株가 生産하지 않았다.

Ester 生産은 菌株 T-2만이 하였으며 炭素源으로서의 ethanol 은 菌株 T-2, T-9

T-5, 11, 12에서 利用되었다. 그러나 菌株 T-2와 T-9보다 微弱한 結果를 나타내었다.

Arbutin 은 菌株 T-2, T-9, T-5, 11, 12에서 splitting 되었다.

Glucose, galactose, saccharose, maltose, raffinose 에서는 全 菌株가 醱酵를 하였으나 lactose 에서는 전혀 醱酵를 하지 않았다.

糖 資化性에서 glucose, galactose, saccharose, maltose 는 全 菌株가 資化하였음을 나타냈으나 lactose 는 菌株 T-9만이 資化하였다.

알콜 醱酵能에 關한 特性(Table 3)은 大部分 菌株가 24時間 經過時에 CO₂의 發生量이 높았다. 그러나 菌株 T-3, 13은 48時間 經過時에 CO₂의 發生量이 높았다. 또한 CO₂ 發生量을 total 로 본 結果에서는 菌株 T-5, 11, 12가 가장 높았으며 다음으로 菌株 T-1, 6, 8, 10 이었으며 T-3, 13, T-2의 順이며 菌株 T-9은 CO₂ 發生量이 가장 낮았다. 即 菌株 T-5, 11, 12가 알콜 醱酵能이 가장 좋았다.

Table 1. Various morphological properties of yeasts isolated from Takju

Strain No.	Shape and size of the cell		Ascospore formation and its shape		Pseudo-mycelium	Malt agar plate			
	Form	Size	Form	Number per ascus		Color	Elevation	Surface	Edge
T-1, 6, 8, 10	Ovoid	(2.5~6)×(3.5~8)	Round	Mostly 1	-	Thin yellow	Convex	Dry smooth	Entire
T-3, 13	Ovoid	(3.5~7)×(4~11)	Round	Mostly 1	-	Thin yellow	Convex	Dry smooth	Entire
T-2	Elongate Ellipsoid	(2.0~2.5)×(5.5×2.2) (2~3)×(4~7)	Ovoid Round	Mostly 1	+	Greyish white (yellow)	Flat	Dry smooth	Entire
T-9	Elongate Ellipsoid	2×(6~10) 3.5×(5~6)	Round	Mostly 1	+	Yellowish white	Convex smooth	Dry	Filamentous
T-5, 11, 12	Ovoid	(3~4)(4~6)	Round	Mostly 1	-	Thin yellow	Convex	Dry smooth	Entire

※ Sporulation media: Gypsum block, Gorodkova agar, Carrot, Potato.

Table 2. Various physiological properties of yeasts isolated from Takju

Strain No.	Pellicle		Assimilation of nitrate	Production of pigments	Production of ester	Sole source of ethanol	Splitting of arbutin	Fermentation*		Assimilation*		Identified as
	After 3 days	After 1 month						G. Ga. S. M. L. R.	G. Ga. S. M. L.			
T-1, 6 8, 10	-	Ring Sediment	-	-	-	-	-	++	++	++	++	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Group II
T-3, 13	-	Ring Sediment	-	-	-	+	-	++	++	++	++	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Group III
T-2	#	Pellicle Sediment	+	-	#	##	+	++	++	++	++	<i>Hansenula anomala</i>
T-9	#	Pellicle Sediment	-	-	-	#	+	++	++	++	++	<i>Pichia polymorpha</i>
T-5, 11, 12	-	Ring Sediment	+	-	-	+	+	++	++	++	++	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

* G:glucose, Ga:galactose, S: saccharose, M:maltose, L:lactose, R:raffinose

Table 3 The quantitative changes of carbon dioxide during Takju fermentation

Hrs. Strains No.									
	12	24	36	48	60	72	84	96	Total
1	117	432	206	127	111	184	37	78	1292
2	75	298	121	54	55	42	16	18	678
3	60	118	186	270	175	151	75	63	1098
5	143	517	305	357	192	107	72	50	1743
6	32	431	192	288	206	242	62	60	1513
8	71	207	120	125	76	70	61	55	781
9	82	206	13	98	43	40	20	18	580
10	80	181	143	112	170	101	67	42	896
11	17	163	270	220	52	50	23	17	812
12	125	495	288	209	135	96	45	40	1433
13	36	144	142	180	68	49	40	41	700

Note: Incubated at 30°C for 4 days

考 察

濁酒에서分離된菌株들의形態의特性과 (Table 1), 生理的 特性 (Table 2)으로 보아 各 菌株들은 Table 2 右端에 表示된 바와 같이 strains T-1, 6, 8, 10, 3, 13 은 *saccharomyces cerevisiae* 로 同定되며 Strain T-2는 *Hansenula anomala*, Strain T-9은 *Pichia polymorpha* 라고 생각된다. 그러나 Strains T-5, 11, 12는 Lodder의 taxonomical key 로서는 同定하기 困難하였다.

Nitrate 를 資化하는 性質을 除外하면 *Saccharomyces cerevisia* 와 類似하며 pellicle 이 形成되지 않는 點을 除外한다면 *Hansenula* 와 類似한 特性을 나타내고 있다. Pellicle 이 形成되지 않는 點으로 보아 酸素呼吸能이 왕성한 系統이 아니라는 點과 pseudomycelium 形成이 potato glucose agar 또는 corn meal agar 를 使用한 slide culture 에서 전혀 形成되지 않는 點으로 보아 *Hansenula* 라고 同定할 수 없다고 생각된다.

Saccharomyces cerevisiae 는 원래 nitrate 를 資化할 수 없는 (Lodder) 系統이나 Takeda(1966) 등은 *Saccharomyces cerevisiae*

도 呼吸系欠損菌株를 除하면 胞子를 形成하고 nitrate 를 資化할 수 있다고 한 點으로 볼 때 Strains T-5, 11, 12는 *Saccharomyces cerevisiae* 라고 생각된다.

그리고 本 實驗에서 *Saccharomyces cerevisiae* 라고 생각되는 菌株들의 cell size 를 比較해 볼 때 (Table 1) Strains T-1, 6, 8, 10 菌株들은 *Saccharomyces cerevisiae* group II에, Strains T-3, 13 菌株들은 *Saccharomyces cerevisiae* group III에 속한다고 생각된다. 이러한 特性들을 가진 菌株들은 우리나라 麴子에서 分離된 酵母(丁 1969)에서도 存在하는 것으로서 우리나라 全域에 널리 分布하고 있다고 생각된다. 따라서 濁酒의 主 酸酵에 重要な 役割을 담당하고 있다고 생각된다.

그리고 本 實驗에서 分離된 *Hansenula*는 酒母 또는 其他 여러 곳에서 由來되었을 것이라 생각되나 *Hansenula*는 強力한 ester 를 形成하므로 濁酒香臭에 重要な 役割을 할 것이라 생각된다. 그러나 *Pichia*는 알콜 酸酵能도 낮으며 酸의 生成도 낮은 것으로 濁酒釀造에 별 利得을 주고 있지 못하는 酵母라고 생각된다.

또한 本 實驗에서 分離된 *Pichia*, *Saccharomyces* 는 濁酒酸酵 開始後 48時間 經過된

試料에서 優占種을 이루고 있었던 것으로 보아 濁酒釀造에서 알콜醱酵能이 低劣한 野生酵母로서 釀造過程에 主役割을 하게 되므로 酒質을 低下시키는 結果를 招來하고 있다고 생각된다.

그리고 이러한 野生酵母를 抑除하기 위하여 Takeda(1966)는 培養酵母를 早期에 添加함을 주장하였으며, 稷도 培養酵母를 添加함으로써 野生酵母를 抑除시킬 수 있다.

고 주장하였다. 따라서 濁酒製造工程에서 一段 仕込부터 優良한 培養酵母를 添加함으로써 어느 정도 野生酵母를 陶汰시킬 수 있다고 생각된다.

그러나 開方式 醱酵을 行하고 있는 이상 野生酵母는 항상 存在한다고 생각된다. 따라서 우리나라 濁酒釀造 過程에 微生物學的管理가 매우 重要한 問題인 것으로 思料된다.

摘 要

서울 市內 11個 濁酒工場으로 부터 試料를 採取하여 酵母를 分離하였으며 選拔分離된 11株를 Lodder의 分類方法에 따라 同定한 結果 다음과 같았다.

1. 濁酒에서 分離된 酵母는 *Saccharomyces cerevisiae* group II, *Saccharomyces cerevisiae* group III, *Saccharomyces cerevisiae*의 一系統, *Hansenula anomala*, *Pichia polymorpha*로 同定되었다.
2. 分離 同定된 菌株中 *Saccharomyces*에 屬하는 酵母種이 알콜醱酵能이 좋고 48時間 經過된 試料에서 優占種을 이룬 것으로 보아 濁酒釀造의 主 醱酵에 關與하고 있는 酵母라고 생각된다.
3. *Hansenula anomala*는 알콜醱酵能은 좋지 않지만 ester 生成이 強力한 것으로 보아 濁酒香臭에 重要한 役割을 하는 것이라고 생각된다.
4. *Pichia*는 알콜醱酵能이 가장 낮았으며 香臭도 없는 것으로 보아 濁酒釀造에 別 所用이 없는 菌株라 생각된다.

REFERENCES

1. 裴商冕, 1964. 濁藥酒 酒母仕込 實驗報告, 稅政과 釀造界, 2, 76~78.
2. 丁聖九, 1969. 韓國產 酵母의 分類學的 研究 (麴子에서 分離한 酵母에 對하여). 未發表.
3. 韓容錫, 全靈植, 1959. 韓國產 醱酵菌에 對한 研究. 中央工業研究所 報告, 9, 140~146.
4. 稿谷義孝, 1967. 酵母의 培地에 對하여, 酵母學(岩波書店), 7~9.
5. 金燦祚, 1968. 濁酒釀造에 關한 微生物學的 및 酵素學的 研究. 農化學會誌, 10, 69~100.
6. Kodama, K., and T. Kyono, 1964. Studies on wild yeasts which thrive in "Sake-moto". *J. Ferment. Technol.*, 42, 739~745.
7. Kodama, K., T. Kyono, and S. Matsuyama, 1966. Studies on wild yeasts which thrive in "Sake-moto." *J. Ferment. Technol.*, 44, 8~13.
8. Lodder, J. and Kreger-van Rij., 1967. The yeasts, A taxonomic study. North Holland publishing Co., Amsterdam.
9. 李培成, 金尙材, 李浩源, 1968. 韓國產 *Aspergilli*에 對한 分類學的 研究. *Kor. Jour. Microbiol.* 6, 6~11.
10. 李培成, 印鉉周, 1968. 韓國產 *Rhizopus*屬의 分類學的 研究. *Kor. Jour. Microbiol.*, 6, 100~105.
11. Ouchi, K., S. Sugama, and K. Noshiro, 1967. Studies on yeasts in Rice Koji. *J. Ferment. Technol.*, 45, 889~897.
12. 沈相獻, 1955. 서울大學校 碩士學位論文集.

13. 武田義人, 1963. 台灣中央研究所 工業部報告. **44**, 1023.
14. Takeda, M., and T. Tsukahara, 1965. Studies on the yeasts in Rice Koji, *J. Ferment. Technol.*, **43**, 447~456.
15. Takeda, M., and T. Tsukahara, 1966. Studies on the yeasts in Rice Koji. *J. Ferment. Technol.*, **44**, 61~70.
16. Takeda, M., and T. Tsukahara, 1967. Studies on Yeasts, Fungi in a Sake Brewery. *J. Ferment. Technol.*, **45**, 918~941.