

濁酒酵母에 關한 研究(第1報)

濁酒酵母의 分離 및 同定에 對하여

朴 允 仲 · 李 錫 建 · 吳 萬 鎭

忠南大學校 農科大學

(1973. 4. 6. 수리)

Studies on Takjoo Yeasts (Part I)

Isolation and Identification of Takjoo Yeasts.

Yoon Joong Park · Suk Kun Lee · Man Jin Oh

College of Agriculture, Choong-Nam University.

(Received, April 6, 1973)

SUMMARY

The strains of 297 yeasts were isolated in TakJoo mashes of 12 breweries not using the cultivated yeast and then brewing test with each yeast were carried out.

The strains of 7 yeasts that have high fermentative ability among the isolated strains were selected and identified. The results obtained were as follows:

- 1) In the brewing test with the isolated yeasts of each brewery, average alcohol percentage of each mash had a little differences as 13.20~15.20 percentage.
- 2) In fermentative test, the isolated yeasts from the first stage mash and from the second stage mash showed a little differences in the average alcohol percentage of mash.
- 3) The fermentative test using the isolated yeasts based on TTC stain had a little differences.
- 4) Among 7 strains selected, strains: Dm-1, Dm-2, Y-1, and T-1 appeared TTC pink yeast; strains: C-1, C-2 and Gs-1 appeared TTC red one.
- 5) It was identified that strains: Dm-1, Y-1, C-1, C-2 and T-1 were *Sac. cerevisiae*; the strain Gs-1 were *Sac. pretoriensis*; strain D-2 were *Sac. rouxii*.

結 論

濁酒는 우리나라의 代表的인 在來酒로서 一般大衆에 愛用되고있는데 近來 濁酒의 製造는 原料나 담금方法에 있어서 많은 變化를 보게 되었다. 따라서 쌀과 麴子를 主原料로 했던 舊式의 濁酒에 比하여 現在의 濁酒는 釀造過程中的 微生物相의 變遷도 다르게 되었다고 생각된다. 現在 濁酒는 澱

粉質原料로서 밀가루, 옥수수가루 등을 使用하고 麴으로서 밀가루麴(所謂 粒麴), 밀기울麴(穀麴) 등을 使用하여 製造하고 있으며 醱酵를 比較의 高溫에서 進行시켜 短時日(一段醱1.5~2.5日, 二段醱2~4日)에 醱酵를 끝내고 있다. 이와같은 釀造上의 特徵때문에 濁酒釀造의 主醱酵에 關與하는 濁酒酵母는 다른 種類의 酵母에 比하여 濁酒釀造에 適合한 特性을 갖고 있다고 생각된다.

濁酒酵母에 關한 研究로서는 麴子에서 42株의

酵母를 分離하여 그 類緣關係를 檢討한 韓等의⁽¹⁾ 報告, 麴子 및 濁酒醪中の 酵母를 TTC 染色性에 따라 類別하고 醪에서 分離한 4株의 酵母의 菌學的 性質과 醱酵力을 比較檢討한 金⁽²⁾의 報告, 濁酒醪中の 酵母의 microflora를 檢討하고 麴子中에 있던 酵母가 醪에서 發見되지 않았다는 愼等⁽³⁾의 報告, 濁酒醪에서 分離한 11株의 酵母의 菌學的 性質을 檢討하고 alcohol 醱酵能을 比較한 金等⁽⁴⁾의 報告, 麴子 및 濁酒醪에서 分離한 19株의 酵母의 菌學的 性質을 檢討하고 醪中 酵母의 microflora를 調査한 李等⁽⁵⁾의 報告, 藥酒 및 濁酒에서 分離한 酵母 20株를 供試菌株로 하여 澱粉質原料에 對한 alcohol 生成試驗을 하고 그中の 6株에 對하여 生理的 性質을 檢討한 鄭等⁽⁶⁾의 報告가 있다 그러나 濁酒釀造에 適合한 優秀菌株의 檢索은 아직 不充分하며 더욱이 濁酒酵母의 特性에 關한 研究는 거의 찾아볼수 없다. 또한 現在 濁酒釀造에는 純粹培養酵母가 거의 使用되고 있지않다. 濁酒의 品質을 向上시키고 均一化하기 위해서는 于先 優秀한 濁酒酵母를 分離하여 使用할 必要가 있다. 著者等은 濁酒酵母에 關한 一連의 研究로서 今般大田 및 隣近地酒造場의 濁酒醪에서 297株의 酵母를 分離하고 flask에 依한 담금 試驗을 하였으며 그中에서 7株를 選定하여 이들의 菌學的 性質을 檢討하고 同定하였으므로 그 結果를 報告하는 바이다.

實驗 方法

1. 試料

大田市 및 隣接地의 12個 釀造場에서 一段 담금 1~1.5日 後의 醪와 二段담금 2日後의 醪을 試料로서 採取하였다.

2. 菌株의 分離

採取한 試料는 採取當日內에 菌株分離에 使用하였다. 試料는 滅菌水로 適當히 稀釋($10^5 \sim 10^8$ 倍稀釋)하고 그 一滴(0.05ml)을 下記의 平面培養用 合成培地上에 均一하게 塗布하여 30°C 에서 3日間 培養한 後 秋山⁽⁷⁾의 方法에 依하여 下記의 TTC 寒天을 重層하고 TTC染色性(red, red pink, pink) 別로 任意選擇한 集落에 白金線을 찢어넣어 菌을 分離하였다. 分離한 菌株는 麥芽汁寒天斜面上에 培養한 後 다음 試驗에 使用하였다.

a. 合成培地

Glucose 10g

Peptone 2g
Yeast ext. 1g
 KH_2PO_4 1g
 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.34g
Tap water 1l
Agar 20~25g
PH 5.5~5.7
Na-propionate 2g

b. TTC-agar

Glucose 0.5g
TTC 0.05g
Agar 1~1.5g
Water 100ml

3. 담금試驗

分離菌株 297株中에서 優秀菌株를 選定하기 위하여 다음 Table 1의 方法으로 담금하여 熟成醪의 酒度, 總酸, 揮發酸을 測定하고 官能試驗을 하였다.

(1) 酒母

試驗管(內徑 18mm)에 Ballg. 10° 麥芽汁 7ml씩을 分注하여 常法으로 殺菌한 後 分離菌株의 斜面培養에서 1 白金耳적을 取하여 接種하고 30°C 에서 24~48時間 培養한 後 培養液 2ml(ml當 酵母數 2.4×10^8)를 酒母로서 使用하였다.

(2) 原料의 蒸煮, 麴, 담금用水

原料 밀가루는 다음과 같이 處理한後 담금에 使用하였다. 即 밀가루(中力粉, 一等品)에 25%로 물을 撒水하여 잘 섞고 덩어리를 12mesh의 金網 위에서 문질어 부순다음 이것을 gauze를 덮은 金網위에 올려 놓아 autoclave에서 平壓으로 1時間 蒸煮한 後 金網위에서 부수어 使用하였다.

麴은 蒸煮밀기울에 *Asp.usamii* mut. *shirousamii*를 常法으로 培養한 것으로서 糖化酵素力價 SP 650의 것을 使用하였다.

담금用水는 現今 濁酒酒造場에서 使用하고 있는 所謂粒麴(*Asp. awamori* var. *Kawachii*)의 밀가루 麴中の 구연酸을 代身할수 있게 0.8%구연산(結晶)의 水道水溶液을 一段 담금液으로 使用하였다.

Table 1. Brewing method.

	In 1st. stage	In 2nd. stage
Flour steamed (dry wt.g)	20	80
Kuk(g)	0.6	2.4
Citric acid(g)	0.32	

Water (ml)	40	
Seed mash (ml)	2	
Vessel used	100ml Δ flask	500ml Δ flask
Ferment. temp.	20°C	30°C
Ferment. days	1.5	3

(3) 製成酒

醱酵을 終了한 醪에 對하여 150%의 水道水(15割水)을 加하여 製成하였다.

(4) 熟成醪의 酒度, 總酸度 및 揮發酸度

熟成醪의 酒度は 蒸溜法⁽⁸⁾으로 測定하였다. 總酸度 및 揮發酸度は 醪濾液에 對하여 一般法⁽⁹⁾으로 測定하고 醪濾液 10ml에 對하 0.1N-NaOH여 滴

定數로 表示하였다.

4. 選定菌株의 菌學的性質

優秀菌株로서 選定된 7株에 對하여는 3回の 平面培養을 되풀이하고 더욱 Lindner의 小滴培養法에 依하여 純粹分離한 後 Lodder⁽¹⁰⁾의 The Yeast, A taxonomic study에 依하여 菌學的性質을 檢討하고 同定하였다.

結果 및 考察

1. 分離酵母에 依한 담금試驗

297株의 分離酵母를 使用하여 담금하고 熟成한 醪의 酒度, 總酸度 및 揮發酸度を 測定하고 官能 檢査한 結果는 Table 2, 3, 4와 같다.

Table 2. Results of fermentative test of isolated yeasts based on each brewery

Breweries	No. of Yeasts isolated	Alcohol (Vol. %)			Total acidity (0.1N NaOH/ml/10ml)			Acidity of volatile acid			Quality	
		max.	min.	Average	max.	min.	Average	max.	min.	Average	No. of superior and ordinary mashes	No. of inferior mashes
HS	24	15.2	13.4	14.60	8.30	6.65	7.70	0.85	0.50	0.68	18	9
J	21	15.0	11.5	13.68	10.50	7.00	8.58	1.30	0.45	0.77	18	3
T	24	15.5	12.5	13.95	8.90	5.90	7.50	0.90	0.40	0.58	19	5
Gj	12	15.0	14.0	14.58	10.00	7.25	8.53	0.95	0.50	0.69	9	3
Y	8	15.6	14.6	15.07	7.75	6.50	7.55	0.90	0.50	0.66	5	3
Df	45	15.4	12.5	14.48	9.50	7.15	8.35	0.90	0.40	0.60	24	21
Ds	27	15.3	11.5	13.23	9.85	7.25	8.60	1.10	0.50	0.77	21	6
S	19	15.2	13.6	14.78	10.10	6.65	7.50	1.40	0.40	0.58	12	7
Hd	25	15.3	12.4	13.20	9.50	7.00	8.68	0.85	0.40	0.57	15	10
Gs	29	15.5	13.8	14.55	8.60	7.00	8.17	1.05	0.45	0.63	23	6
Dm	25	15.7	14.3	15.20	8.50	6.50	7.70	1.00	0.55	0.63	12	13
C	38	15.5	14.3	15.13	8.75	6.75	7.75	1.05	0.45	0.64	26	12

Table 2는 分離酵母를 使用하여 담금 試驗한 結果를 分離酒造場別로 區分하여 比較한 것인데 醱酵終了醪의 平均酒度 13.20~15.20, 平均總酸度 7.50~8.68, 平均揮發酸度 0.57~0.77로서 酒도에 있어서 酒造場別로 많은 差가 있었다. 이들 酒造場에서는 一定한 培養酵母를 使用하지 않고 있으며 濁酒釀造에 있어서는 酒造場周邊에 分布하고 있는 酵母가 關與하게 되는데 各 酒造場마다 醱酵에 關與하는 微生物群의 分布가 다르므로 醪의 酒度, 酸도가 다르게 되고 製成酒의 맛도 各各 다르게 된다고 생각된다.

Table 3은 分離酵母를 使用하여 담금 試驗한 結果를 分離醪(一段와 二段醪)別로 區分하여 比較한

것인데 醪의 酒度나 酸도에 있어서 큰 差가 없었다. 이것은 一段醪에 存在했던 酵母가 二段醪에서도 大部分 그대로 分布하여 醱酵에 關與하기 때문이라고 생각된다.

分離酵母의 醱酵成績을 TTC染色性 別로 調査한 結果는 Table 4에서 보는 바와 같이 酒도에 있어서 red 酵母가 平均 14.35度, redpink가 平均 14.18度, pink 酵母가 平均 14.13度로서 red 酵母가 多少 높았으나 TTC 染色性 別로 큰 差가 없으며 pink 酵母에서 最高의 酒度を 나타낸 菌株가 選定된 點等으로 보아 red, red pink, pink 酵母間의 醱酵能에는 別差가 없다고 생각된다.

總酸도에 있어서는 pink 酵母가 平均 8.40으로서

Table 3. Results of fermentative test of isolated yeasts based on kinds of mashes.

Mashes	No. of yeasts isolated	Alcohol (Vol. %)			Total acidity (0.1N NaOH ml/10ml)			Acidity of volatile acid (0.1N NaOH ml/10)			Quality	
		Max.	Min.	Average	Max.	Min.	Average	Max.	Min.	Average	No. of superior and ordinary mashes	No. of inferior mashes
1st. stage	154	15.6	11.5	14.08	10.50	5.90	8.20	1.40	0.40	0.66	100	54
2nd. stage	143	15.7	11.5	14.35	10.00	6.50	8.05	1.05	0.40	0.64	102	41

Table 4. Results of fermentative test of isolated yeasts based on difference of TTC strain.

TTC strain	No. of yeasts isolated	Alcohol (Vol. %)			Total acidity (0.1N NaOH ml/10ml)			Acidity of volatile acid (0.1N NaOH ml/10ml)			Quality	
		Max.	Min.	Average	Max.	Min.	Average	Max.	Min.	Average	No. of superior and ordinary mashes	No. of inferior mashes.
Red	130	15.5	11.5	14.35	10.50	5.90	7.95	1.10	0.40	0.66	92	38
Red pink	76	15.4	11.7	14.18	9.50	6.00	8.13	1.40	0.45	0.73	54	22
Pink	91	15.7	11.5	14.13	10.00	6.55	8.40	1.10	0.50	0.62	56	35

가장 높고 red pink 酵母가 平均 8.13, red 酵母가 7.95의 順으로 red 酵母가 낮은 傾向을 보였으며 揮發酸度에 있어서는 red pink 酵母가 平均 0.73으로서 가장 높고 pink 酵母, red 酵母의 順으로 낮은 傾向을 보였으나 TTC染色性向에 큰 差가 없었다. 菅野^(10,11) 등은 酵母와 酸度와의 關係에 있어서 pink 酵母는 red 酵母에 比하여 相當히 많은 酸을 生成한다고 報告한바 있는데 著者 등이 濁酒醪에서

比較한바에 依하면 pink 酵母의 生成酸度は red 酵母의 경우보다 顯著하게 높지 않았다.

2. 優秀菌株의 選定

分離한 297株를 使用하여 담금 試驗을 하고 醪의 酒度나 官能檢査에 있어서 優秀하다고 認定되는 7株를 選定하였다. 이들 選定酵母의 TTC染色性은 Table 5에 表示한바와 같으며 pink 酵母가 4株, red 酵母가 3株였다.

Table 5. TTC strain of selected yeasts.

strain No.	D _m -1	Y-1	C-1	C-2	T-1	G _s -1	D _m -2
TTC strain	Pink	Pink	Red	Red	Pink	Red	Pink

3. 選定酵母의 同定

優秀菌株로서 選定된 7株에 對하여 形態的, 生

理的性質을 實驗한 結果 Table 6, 7, 8, 9와 같다.

Table 6. Morphological data of selected strains.

Strains	Cell form		Ascospores		Pseudo-mycelium	Blastospore
	size	shape	Number	shape		
D _m -1	(3.5~7) × (4~8.5) μ	O.E	1~4	S	+	-
Y-1	(3~6) × (4~7.5) μ	E.S	1~4	S.E	+	-
C-1	(3~8) × (4~12.5) μ	O.E	1~4	S	+	+

C-2	(3~8.5) × (4.5~13) μ	E.C	1~4	S.E	+	-
T-1	(3~5) × (4~7) μ	S.E	1~4	S	-	-
G _s -1	(3~6) × (4~8.5) μ	E.S	1~2	S	-	-
D _m -2	(2.5~6) × (4~14) μ	E.S	1~3	S.E	+	-

O:Ovoid E:Ellipsoidal S:Spheroidal C:Cylindrical

Table 7. Cultural characteristics of selected strains.

Strain No.	D _m -1	Y-1	C-1	C-2	T-1	G _s -1	D _m -2
Formation of pellicle	-	-	-	-	-	-	-
Formation of ring or islet	-	-	-	-	-	weak ring	weak ring or islet
Formation of sediment	+	+	+	-	+	+	+
Splitting of arbutin	-	-	-	-	-	-	-
Assimilation of KNO ₃	-	-	-	-	-	-	-
Assimilation of ethylamine-HCl	-	-	+	-	+	-	+
Growth in Vitamin free medium	+	+	+	+	+	+	-
Cyclohexamide resistance	-	-	+	-	+	-	-
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	-	+
Growth on 50% glucose-YEA.	-	+	-	-	-	+	+
Growth on 60% glucose-YEA.	-	-	-	-	-	-	+

Table 8. Fermentation of carbohydrates.

Strains	D _m -1	Y-1	C-1	C-2	T-1	G _s -1	D _m -2
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	+	-
Trehalose	-	-	+	-	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)	+(1/3)	-
Melezitose	-	-	-	-	-	+	-
Inulin	-	+	-	-	-	-	-
Soluble starch	-	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	+	+	+	+	+	+	+

Table 9. Assimilation of carbon compounds.

	D _m -1	Y-1	C-1	C-2	T-1	G _s -1	D _m -2
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	+	-
L-Sorbose	-	-	-	-	+	+	-

Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
D-Ribiose	+	-	-	-	-	-	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	+	+	+	+	-	-
Glycerol	+	-	-	-	+	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	+	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-	+
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	+	-
Raffinose	+	+	+	+	+	+	-
Galactitol	-	-	-	-	-	-	-
Citric acid	-	-	-	-	-	-	-
D-Glucitol	+	+	+	-	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	+	+	+	+	+	-
Salicin	-	-	-	-	-	-	-
Melezitose	-	+	+	+	-	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-
Succinic acid	-	-	+	+	+	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	+
Soluble starch	-	-	-	-	-	-	-
α -Methyl-D-Glucoside	+	+	+	+	+	+	+
DL-Lactic acid	-	+	+	-	+	+	-
D-Mannitol	-	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-

以上の實驗結果를 Lodder (1971)의 分類同定法에 依하여 살펴보면 選定菌株 모두가 多極出芽法으로 번식하고 細胞는 大部分 圓, 卵, 橢圓形이고 1~4個의 孢子를 形成하고 窒酸鹽을 資化하지 않고 Glucose를 旺盛하게 醱酵하며 pellicle을 形成하지 않는點等으로 보아 이들 모두가 *Saccharomyces* 屬으로 同定되었다. 또한 이들中에서 strain D_m-1 Y-1, C-1, C-2 및 T-1을 Galactose, Sucrose, Maltose, Raffinose(1/3)은 醱酵하나 Soluble starch를 醱酵하지 못하며 Melibiose Cellobiose, Salcin을 資化하지 못하고 Arbutin을 分解하지 못하는點等으로 보아 *Saccharomyces cerevisiae*로 同定되었으며 strain G_s-1은 Sucrose, Maltose, Raffinose(1/3)을 醱酵하나 Galactose를 醱酵하지 못하며 Galactose를 資化하나 Cellobiose, Salcin을 資化하지 못하며 Arbutin을 分解하지 못하는點等으로 보아 *Saccharomyces pretoriens*로 同定되었다. 그러나 同定된 *Saccharomyces pretoriens*는 Lodder의

酵母分類書에 記載된 標準菌株와 比較할때 Cellobiose를 醱酵하는點이 特異하였으며 몇가지 炭素化合物의 資化도 달랐다. Strain D_m-2는 Sucrose, Maltose를 醱酵하며 Galactose, Raffinose를 醱酵하지 못하고 Ethylamine hydrochloride를 資化하며 60% glucose yeast extract agar에서 生育하는點等으로 *Saccharomyces rouxii*로 同定되었다.

要 約

培養酵母를 使用하지 않고있는 12個 酒造場의 濁酒醪에서 297株의 酵母를 分離하여 各菌株別로 酒母를 만들어 담금 試驗을 하였으며 그中에서 良好한 醱酵成績을 나타낸 7株를 優秀菌株로 選定하여 이들을 同定한 結果는 아래와 같다.

(1) 釀造場別로 分離한 酵母를 使用하여 담금 試驗한 結果, 醱酵醪의 酒度平均이 13.20~15.20로서 酒造場別로 相當한 差異가 있었다.

(2) 一段醪에서 分離한 酵母와 二段醪에서 分離

한 酵母는 醱酵試驗의 平均値에 있어서 別差를 나타내지 않았다.

(3) 分離酵母의 醱酵成績은 TTC 染色性別로 別差를 나타내지 않았다.

(4) 選定菌株 7株中 strain D_m-1, D_m-2, Y-1 및 T-1은 TTC pink 酵母로, strain C-1, C-2 및 G_s-1은 TTC red 酵母로 나타났다.

(5) 優秀菌株 7株를 同定한 結果 strain D_m-1, Y-1, C-1, C-2, 및 T-1은 *Saccharomyces cerevisiae*로, strain G_s-1은 *Saccharomyces pretoriensis*로, strain D_m-2는 *Saccharomyces roxii*로 同定되었다.

引用 文 獻

(1) 韓容錫, 金炅植 : 中央工業研究所報告. 9, 140

(1959)

- (2) 金燦祚 : 農化學會誌. 10, 69 (1968)
- (3) 愼鏞斗, 曹憲鉉 : 微生物학회지. 8, 53 (1970)
- (4) 金俊彦, 李培咸 : 微生物학회지. 8, 77 (1970)
- (5) 李周植, 李泰雨 : 微生物학회지. 8, 116 (1970)
- (6) 鄭基澤, 俞大植 : 微生物학회지. 9, 103 (1971)
- (7) 秋山裕一 : 日釀協誌. 58, 1155 (1963)
- (8) 山田正一 : 釀造分析法 p. 100, 108, 110, 産業圖書株式會社 (1958)
- (9) J. Lodder; The yeast, A taxonomic study. North-Holland Publishing Co. Amsterdam. London (1971)
- (10) 菅野信男 : 日釀協誌. 60, 83 (1965)
- (11) 菅野信男 : 馬宮功, 秋山裕一, 日釀協誌. 65, 902 (1970).