

## 순창고추장의 팽창 원인 효모의 분리 및 특성

진 호 상 · 이 경 자\*

전주대학교 생명과학부, \*전주기전여자대학 식품영양과

### Isolation and Characterization of a Volume-Expanding Yeast from Sunchang Gochujang

Hyo-Sang Jin and Kyung-Ja Lee\*

School of Life Science, Jeonju University, Chonju 560-759, Korea

\*Dept. Food and Nutrition, Chonju Kijeon Women's College, Chonju 560-701, Korea

#### Abstract

A strain of gas-producing and volume-expanding yeast was isolated from Gochujang made in Sunchang by the traditional ways and was identified to be a *Saccharomyces* sp. This yeast was detected only in malt among the several ingredients of Gochujang, which means that the volume-expanding yeast comes into Gochujang at the time of making products through malt, one of the major ingredients. However, boiling of the malt-saccharified rice could not prevent the occurrence of the volume-expanding yeast in Gochujang. This yeast was contained in the range of 5.67~7.75 log<sub>10</sub>CFU /g in products made and aged between 1 month and 3 year in Sunchang area.

Key words : Gochujang, volume-expanding, gas-producing, *Saccharomyces* sp.

#### 서 론

순창고추장은 예로부터 우수한 것으로 알려져서, 매년 13.6% 정도 생산량이 증가하고 있고 수출량도 증가되고 있어서 근래에는 이 지역의 주요 소득원으로 자리하고 있다<sup>1)</sup>. 생산량이 증가하면서 생산방식도 소규모의 생산에서 대규모의 공장 생산으로 바뀌고 있으며, 대량 생산에서는 품질의 균일성과 안정성이 필요하다. 그러나 상품의 운송 또는 저장 중에 부풀어 올라 제품의 신뢰성과 완성도를 떨어뜨려 공업화에 지장을 주고 있으며, 특히 수출과 같이 장기간의 운송이 필요한 경우에는 심각한 문제가 되고 있다.

코오지 고추장에서는 *Saccharomyces cerevisiae*, *Sac. oviformis*, *Sac. rouxii* 등의 우량 효모<sup>2)</sup>가, 재래식 고추장에서는 *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus oryzae* 등<sup>3)</sup>이 숙성에 관여하고, 이들 세균 및 효모들은 각종 효소를 분비한다<sup>4-6)</sup>. 그러나 고추장이 운송 및 저장 중 부풀어 오르는 증상의 원인과 해결책에 관

하여는 연구된 바가 거의 없다. 고추장의 팽창은 제품이 숙성되어 가는 과정 중에 미생물의 수가 증가하고, 이들이 생성하는 각종 가수분해효소에 의해 유리 아미노산과 당이 생성되며, 온도가 상승되는 과정 중 일부 미생물이 당과 아미노산을 발효하여 가스를 생성하기 때문으로 생각되나, 아직 가스생성 원인균들을 분리하려는 시도나 고추장에서의 역할, 오염경로 등에 대한 연구는 없었다. 다만 최근에 Lee 등<sup>7)</sup>은 변패된 고추장으로부터 가스생성 능력을 지니는 *Saccharomyces* sp.와 *Zygosaccharomyces* sp. 등 내열성 효모들을 분리하여 고추장의 팽창이 효모에 의한 것임을 시사한 바 있다.

본 연구에서는 고추장에서 문제가 되고 있는 팽창 문제를 해결하기 위한 기초 단계로서, 순창지역에서 생산된 고추장들로부터 고추장 팽창의 원인이 될 수 있는 효모를 분리하고, 이 균주가 고추장에 도입되는 경로를 추적하였기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료 및 배지

균 분리에 이용된 고추장은 순창지역에서 1994년 3월~1997년 5월에 전통적인 방법으로 생산된 제품들과 순창지역에서 구매한 원료들을 바탕으로 1996년 2월~1997년 2월에 실험제조한 것들이다. 고추장 제조방법은 찹쌀죽(찹쌀 20~25%)에 메주가루(5~10%)와 엿기름(3~5%)을 혼합하고, 60~65°C에서 4시간 당화시킨 후, 소금(10%)과 고춧가루(15~20%)를 섞는 방법을 사용하고, 숙성 및 저장은 용기에 담은 상태에서 노천 방임적으로 시행하였다(제조처: 순창골 전통식품, 제조자: 양삼철).

균주의 동정용 coenzyme Q<sub>6-9</sub>와 cycloheximide는 Sigma사 제품을, 배지의 제조에 사용한 원료들과 배지들은 Difco사 제품을 사용하였다.

### 2. 균주의 분리 및 계수

고추장을 일정량 취한 후 1/4 희석한 Ringer액에 10배씩 순차적으로 분쇄 희석하고, 10<sup>-2</sup>~10<sup>-5</sup> 사이의 희석액들을 두 조의 Tryptic soy agar(Difco) 또는 1/2역가의 YPD agar<sup>9)</sup> 평판들에 도말하고, 그 중 한 조는 호기성 배양기에서 1~4일, 다른 한 조는 CO<sub>2</sub>가스로 치환된 혐기배양조에서 3~4일 배양하였다. 고추장 중의 균수는 배양기에 나타난 집락들의 수를 바탕으로 계산하였고, 균주의 순수분리는 배양기상의 집락들 중 형태적 차이를 나타내는 것들을 분리 배양하여 냉장보관하면서 발효시험에 이용하였다.

### 3. 가스생성 및 팽창의 확인

분리된 균들의 가스생성력은 Durham관에서 glucose, maltose, saccharose 당용액을 이용하여 시험하였고<sup>9)</sup>, 고추장의 팽창력은 시험균의 액체배양액 2ml를 원심분리하여 모은 균체를 10g의 고추장에 섞고 시험관에 채운 다음 30°C와 37°C에서 배양하여 부푸는 정도를 관측하였다.

### 4. 효모의 계수

평판배지에서 세균을 억제하고 효모를 선택적으로 배양, 계수하기 위하여 배지의 pH를 4.5~5.0으로 조정하거나, 1% 아세트산 또는 0.8% 프로피온산을 세균의 생육 억제제로 첨가하였다<sup>10)</sup>. 산성배지를 위한 pH 조정은 멸균이 끝난 후에 2N HCl로 조정하였고, 유기산 배지는 유기산을 첨가한 후 5N NaOH를

첨가하여 pH를 6.5~7.0으로 조정한 후 멸균하였다.

### 5. 효모의 동정

Lodder의 분류법<sup>9)</sup>과 Yamada 등<sup>10-12)</sup>의 coenzyme Q에 의한 속의 구별법에 따랐다. Coenzyme Q를 분리하기 위하여 5l 플라스크에 500ml YPD배지를 넣고 25ml의 중배양액을 접종한 후 26.5°C에서 24시간 진탕배양하고 원심분리하여 균체를 모았다. 모은 균체는 1l의 새 플라스크에 옮기고 50ml의 증류수, 150ml의 메탄올, 5g의 pyrogallol, 20g의 NaOH를 가한 다음 리비히 냉각관을 부착하여 90°C에서 1시간 가열하였다. 분해액은 Büchner 깔대기에 옮기고 150ml의 헥산을 가하여 진탕한 다음 헥산층을 회수하는 과정을 3회 반복하여 헥산층을 모았다. 헥산을 감압건조시킨 후 약 1ml의 아세톤을 가하여 용출한 액을 벤젠용매를 사용하여 TLC(Silica gel) 분석하여 황색 밴드를 끊어낸 뒤, 다시 아세톤으로 용출하였다. 아세톤 용출액은 아세톤:물(5:1)의 용매로 Coenzyme Q<sub>6</sub>와 Q<sub>9</sub>을 기준액으로 하여 종이크로마토그래피한 뒤 0.2% 과망간산칼륨에 침지 발색한 후 Rf값을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 고추장 팽창 원인균의 분리

순창에서 전통적인 방법으로 제조, 숙성된 고추장으로부터 30°C의 호기적 및 혐기적 조건에서 13주 및 37°C의 호기적 및 혐기적 조건에서 각각 22주와 18주의 미생물을 분리하고 당발효에 의한 가스생성력을 시험한 결과를 Table 1에 제시하였다. 이들은 발효에 의한 가스생성력에서 분리조건에 따라 다른 특징을 나타내었다. 30°C에서 분리한 26주의 균들은 대부분 사카로오스를 발효하였지만 말토오스는 발효하지 않았고, 37°C에서 분리한 40주의 균들 중에는 말토오스를 발효하는 균들이 가장 많았고 다음은 사카로오스, 글루코오스의 순이었다. 또한 발효에 의한 가스생성력은 발효액 중의 염도에 의해 크게 영향을 받았으며, 시험균들은 염도의 상승에 따라 가스발생이 억제되어 10%의 염도에서는 30°C 호기적 조건에서 분리된 균들 중 2주가 각각 글루코오스만 가스생성을 나타내었으며, 혐기적 조건에서 분리된 균들 중에서는 2주가 글루코오스와 사카로오스 모두에서 가스생성을 나타내었다. 37°C 분리균들 중에서는 호기적 조건에서 분리한 균들 중 2주는 오직 말토오스에서, 나머지 2주는 말토오스와 사카로오스 모두에서 가스

**Table 1. Fermentation test for gas-producing strains among the microorganisms isolated from Sun-chang Gochujang**

NaCl concentration(%)	30℃						37℃					
	Aerobic(13 <sup>1)</sup> )			Anaerobic(13)			Aerobic(22)			Anaerobic(18)		
	Glu	Mal	Sac	Glu	Mal	Sac	Glu	Mal	Sac	Glu	Mal	Sac
0	2 <sup>2)</sup>	0	13	2	0	11	6	18	17	4	18	7
10	2	0	0	2	0	2	0	4	2	0	0	1

<sup>1)</sup> Total number of strains isolated on the indicated conditions. <sup>2)</sup> Number of strains that showed gas-producing activity among the tested strains.

를 생성하였고, 혐기적 조건에서 분리된 균들 중에서

**Table 2. Characteristics of the gas-producing and volume-expanding *Saccharomyces* sp. GE1**

Test	Results
〈Morphology〉	
Shape	oval
Reproduction	budding
Size(μm)	(2.0~3.5) × (3.0~4.5)
Ascospore	1~4
Pseudomycelium	-
〈Physiology〉	
Growth on YM	++
Growth in 100 ppm cycloheximide	+
Growth in 1 % acetic acid	-
Assimilation of nitrate	-
Coenzyme Q	Q <sub>6</sub>
〈Assimilation〉	
Glucose	+
Maltose	+
Saccharose	+
Lactose	-
Galactose	-
Raffinose	+
Trehalose	-
Ribose	-
Melibiose	-
Arabinose	-
Inositol	+
Fructose	-
Cellobiose	-
Sorbitol	+
Rhamnose	+
〈Fermentation〉	
Glucose	+
Saccharose	+
Maltose	-(+)
Lactose	-
Galactose	-

는 오직 1주만이 사카로오스에서 가스를 생성하였다.

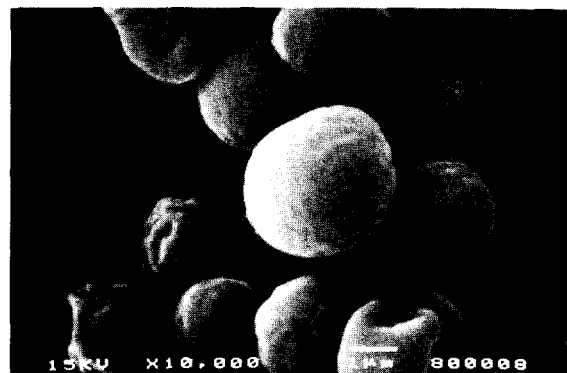
고염도의 조건에서도 가스생성을 보인 균주들을 고추장에 혼합하고 고추장의 팽창력을 확인하였을 때, 30℃ 혐기적 조건에서 분리된 1주의 경우만 팽창을 나타냈기 때문에, 이 균주를 고추장 팽창의 원인균으로 분리하였다.

한편 혐기적인 조건에서 분리한 균주들은 모두 호기적 조건에서 생육할 수 있었으며, 따라서 혐기적 조건에서 분리된 균들은 거의 대부분 통성 혐기성 균들로 판단된다.

**2. 팽창 원인균의 동정**

분리한 고추장 팽창균을 동정하기 위해 형태적, 생리적 특성을 관찰한 결과는 Table 2와 같다.

본 균은 효모로 나타났으므로(Fig. 1), Yamada 등<sup>10)</sup>에 의한 효모 속의 구별법에 따라 coenzyme Q를 확인하였을 때 본 균주는 Co Q<sub>6</sub>를 가지는 것으로 나타났다. 이에 따라 본 균주를 *Saccharomyces*인 것으로 추정하고, *Saccharomyces* sp. GE1(이하 GE1으로 칭함)으로 잠정 명명하였다.



**Fig. 1. Scanning electron micrograph of the gas-producing and volume-expanding yeast isolated from Sun-chang Gochujang.**

3. 팽창 원인균의 오염경로 추정

GE1이 어느 경로로 고추장에 유입되는지를 알아보기 위해 순창 지역으로부터 입수한 고추장 원료들의 균들을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 조사된 원료들 중 메주가루, 고추가루, 엿기름은 각각 7.04, 6.57, 7.56 logCFU/g의 균들을 포함하고 있었으나, GE1은 오직 엿기름에서만 검출되었고 그 수는 4.40 logCFU/g이었다. 따라서 GE1은 고추장의 제조 중에 원료로부터 유입되며, 주된 유입처는 엿기름임을 추정할 수 있었다.

4. 엿기름 열처리에 따른 팽창 원인균의 변화

엿기름에 GE1이 포함되어 있는 것이 확인되었으므로, 고추장 제조시 엿기름 당화액을 열처리하는 공정이 GE1의 발생에 미치는 영향을 살펴보았다. 침지한 찹쌀을 엿기름으로 당화한 후 직화로 졸여 고추장을 담은 것과 열처리하지 않고 담은 것을 25℃에 각각 저장하고 저장기간별 GE1의 변화를 확인한 결과 Table 4와 같았다. 열처리한 고추장은 열처리하지 않은 고추장에 비해 2개월 저장기간까지는 GE1수가 더 적었다. 그러나 그 차이는 4개월 이후 소실되었다. 따라서 GE1은 당화액의 열처리로 저장 초기의 균수가 상당량 감소되지만 원천적으로 발생이 억제되지는 않았다. 이러한 결과는 GE1이 엿기름 이외의 출처에 의하여도 유입되거나 혹은 엿기름에 포함된 가스생성

Table 3. Counts of the volume-expanding yeast and the other microorganisms found in the major ingredients of Gochujang

	Maeju	Hot pepper	Malt	Rice	Salt
Total number of microorganism	7.04 <sup>1)</sup>	6.57	7.56	<3.00	<3.00
Volume-expanding yeast	<3.00	<3.00	4.40	<3.00	<3.00

<sup>1)</sup> Counts expressed in logCFU/g.

Table 4. Effect of boiling of malt-saccharified rice on the counts of volume-expanding yeast

Treatment	Storage time(month)		
	2	4	6
Boiled	6.54 <sup>1)</sup>	8.72	8.65
Unboiled	7.23	8.67	8.32

Gochujang was stored at 25℃, <sup>1)</sup> Counts were expressed in logCFU/g.

균이 열처리에 의해 완전 사멸되지 않았기 때문으로 보이지만 정확한 유입경로를 알기 위하여는 더 세밀한 연구가 필요하다.

5. 저장온도에 따른 팽창 원인균의 변화

고추장의 GE1 수에 미치는 저장온도의 영향을 저장기간에 따라 살펴본 결과는 Table 5와 같다. 저장 4개월까지는 온도가 낮을수록 GE1 수는 낮았으나 6개월 후에는 그 차이가 소실되었고 최종 균수는 비슷하였다. 2개월 이상 저장된 고추장의 표면은 GE1의 생육을 나타내었고, 저장 온도가 높고 저장기간이 길수록 표면 생육은 더 왕성하였다.

6. 저장기간별 팽창 원인균의 변화

순창지역에서 전통적인 방법으로 제조, 저장되고 있는 고추장의 숙성기간 중 GE1의 변화를 조사한 결과는 Table 6과 같다. 고추장의 총균수는 제조후 3개월이 경과된 고추장에서 최고치를 나타내었고, 그 값은 10.67 logCFU/g이었으며 지배균은 세균이었다. 이후 감소되어 3년이 경과된 것에서는 약 6.00 logCFU/g 균이 검출되었다. 이러한 균수는 2~6개월 동안의 숙성기간 중 약 7.00 logCFU/g의 세균이 유지되었다는 김 등<sup>4)</sup>의 결과보다는 3 logCFU/g 이상이 더 많은 것으로 나타났다. GE1은 1개월~3년의 전 숙성기간 중 5.67~7.75 logCFU/g 범위로

Table 5. Effect of storage temperature on the counts of volume-expanding yeast

Temperature(℃)	Storage time(month)		
	2	4	6
Room temperature(5~25)	5.11 <sup>1)</sup>	6.58	8.95
15	5.53	7.00	8.20
20	7.83	7.65	8.18

<sup>1)</sup> Counts expressed in logCFU/g.

Table 6. Counts of total microorganisms and the volume-expanding yeast in Sunchang Gochujang

Aging time	Total microorganisms	Volume-expanding yeast
1 month	9.48 <sup>1)</sup>	5.75
3 months	10.67	7.11
6 months	10.63	7.75
1 year	7.89	6.40
2 years	6.23	5.76
3 years	6.00	5.67

<sup>1)</sup> Counts expressed in logCFU/g.

검출되어, 김 등<sup>1)</sup>이 조사한 순창 고추장 중 효모의 수보다 1 logCFU/g 정도가 더 높았으며, 균수의 증가 양상은 총균수와 같았으나 숙성기간이 지연됨에 따라 감소되는 정도가 총균수에 비해 적어서 제품에서 가스 생성균이 차지하는 비율은 점차 증가되었다.

한편 고추장의 팽창은 숙성 후 2개월부터 나타나는 현상인 것으로 조사되어 GE1이 유일한 가스생성균인 경우라고 가정한다면, 고추장의 팽창에 필요한 본균주의 수는 6.75~7.11 logCFU/g의 범위일 것으로 추정되었다.

## 요 약

순창지역에서 전통적인 방법으로 제조되는 고추장으로부터 순수분리된 66주의 균주들 중 가스생성과 고추장의 팽창력을 모두 보이는 1주의 균을 분리하고 *Saccharomyces* sp.로 동정하였다.

본 고추장 팽창균은 제조원료들 중 엿기름에서만 3.0 logCFU/g 이상으로 분리되어 고추장의 제조 중 엿기름 원료를 통해 유입되는 것으로 추정되었다. 그러나 엿기름 당화액을 열처리하여 담근 고추장은 열처리하지 않고 담근 고추장에 비해 저장 초기의 고추장 팽창균 수가 낮았으나 이러한 차이는 6개월 이후에 소실되었다. 고추장 팽창균은 순창지역의 제조업체에서 제조후 1개월에서 3년이 경과한 제품들 사이에서 5.67~7.75 Log<sub>10</sub>CFU/g의 사이로 분포하였다.

## 참고문헌

1. 농촌진흥청: 순창전통고추장 품질규격체계화 기술개발, 1994년도 내고장 새기술개발 사업보고서, p.5 (1995).
2. 이택수, 이석건, 김상순, Yoshida, T.: 고추장 숙성중의 미생물학적 연구(1보), *한국미생물학회지* 8, 151-162 (1970).
3. 이계호, 이묘숙, 박성호: 재래식 고추장 숙성에 미치는 미생물 및 그 효소에 관한 연구, *한국농화학회지*, 19, 82-88 (1976).
4. 김영수, 권동진, 구민선, 오훈일, 강통삼: 재래식 고추장 숙성 중 미생물과 효소력의 변화, *한국식품과학회지*, 25, 502-509 (1993).
5. 이종수, 권수진, 정성원, 최영준, 유진영, 정동효: 한국 재래식 된장과 고추장의 숙성 중 미생물 효소활성 및 주요 성분의 변화, *한국산업미생물학회지*, 24, 247-253 (1996).
6. 구민선, 김영수, 오훈일, 김종규: 고추장 향미생산 우수 균주 선발 및 동정, *한국산업미생물학회지*, 24, 439-444 (1996).
7. Lee, J.S., Choi, Y.J., Kwon, S.J., Yoo, J.Y. and Chung, D.H.: Screening and characterization of osmotolerant and gas-producing yeasts from traditional Doenjang and Kochujang, *Food and Biotechnology*, 5, 54-58 (1996).
8. Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B.: Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.61 (1982).
9. Kreger, V.R.: The Yeast, a Taxonomic Study, 3rd. ed., Elsevier Science, Amsterdam (1984).
10. Yamada, Y., Nojiri, M., Matsuyama, M. and Kondo, K.: Coenzyme Q system in the classification of ascosporeogenous yeast genera *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, and *Endomycopsis*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 22, 325-337 (1976).
11. Yamada, Y., Arimoto, M. and Kondo, K.: Coenzyme Q system in the classification of ascosporeogenous yeast genera *Schizosaccharomyces* and yeast-like genus *Endomyces*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 19, 353-358(1973).
12. Yamada, Y., Arimoto, M. and Kondo, K.: Coenzyme Q system in the classification of apiculate yeasts in the genera *Nadsonia*, *Saccaromycodes*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, and *Wickerhamia*, *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 22, 293-299(1976).

(1999년 7월 23일 접수)