固定化菌體를 充鎭한 column型 reactor에의한 漁간장의 連續速成醱酵

農畜産物分析科

金聲俊・李主鉉・車京淑・朴芝賢・林采元

Continuous rapid fermentation of fish sauce by using column type reactor packed immobilized cells

Agro-livestock procducts analysis division, Health research section

S. J. KIM, J. H. Lee, K. S. Cha, J. H. Park, C. Y. Lim

Abstract

This study was designed to continuous rapid fermentation of fish sauce by using column type reactor which packed immobilized cells of lactic acid bacteria and yeasts.

The following results are obtained.

1. One kind of lactic acid bacteria and two kind of yeasts from conventional fermented solution were isolated, identified and designed as *Pediococcus halophilus* R−22, *Saccharomyces rouxii* R−60, and *Candida etchellsii* H−50 which produced the highest levels of lactic acid, ethylalcohol and 4−ehtylguaiacol.
2. Silica gel and sodium alginate(1 : 5) were selected to immobilized matrices of lactic acid bacteria and yeast cells among matrices. When the column type reactor packed each immobilized cells of *P. halophilus* R−22, *S. rouxii* R−60 and *C. etchellsii* H−50

were performed to fermentation for fish sauce of Srdine, the optimal conditions for fermentation was found the pH of 5.2, temperature of 30°C, 10% NaCl concentration and 0.02 : 0.06vvm in aeration ratio of air and nitrogen.

3. Each immobilized cells of *P. halophilus* R−22, *S. rouxii* R−60 and *C. etchellsii* H−50 packed the each column type reactor was produced 0.75% lactic acid, 2.5% ethylalcohol and 18㎎/ℓ 4−ethylguaiacol during 96 hours under the optimal conditions.
4. When immobilized *P. halophilus* R−22 by column type reactor was performed continuously fermentation, lactic acid was produced 0.62~0.64% during 25 days and then decreased gradually after 30 days. *S. rouxii* R−60 was produced the 2.1~2.5% ethylalcohol constantly for 35 days and also *C. etchellsii* H−50 was produced 14~16㎎/ℓ 4−ethylguaiacol for 35 days and then this products were decreased gradually after fermentation of 40 days.
5. Final products of fish sauce contained 1,721.6㎎% total nitrogen, 1,584.1㎎% amino −nitrogen, 0.75% lactic acid, 2.7% ethylalcohol and 18.2㎎/ℓ 4−ethylguaiacol.
6. Organoleptic test of final products showed that acceptance taste was worse, but acceptance flavor was better than that of compared commercial soy sauce.

In conclusion, these results indicated that fermentation of fish sauce by using column type reactor which packed immobilized cells is possible to production for only two weeks for rapid fermentation and it is stable to fermentation untill 50 days.

Ⅰ. 서 론

수산 식품중 어간장은 젓갈과 더불어 수산발효 식품으로 오래전부터 알려져 왔으나 간장의 품질이 대두간장에 비하여 맛이나 향기등이 개선되지 못하여 널리 이용되지 못하고 있는 실정이다.

어간장은 어류에 붙어있는 미생물이나 자체의 효소에 의하여 단백질을 분해하여 저분자의 펩티드와 아미노산을 생성하여 간장특유의 맛과 풍미를 내지만 어류의 비린냄새와 독특한 쓴 맛의 생성으로 인하여 간장으로서는 기호에 맞지않아 품질 개선등을 위한 연구가 요구되고 있다.

어류를 이용하여 어간장을 제조하는 연구로는 크릴[1], 고등어[2], 정어리[3,4,5] 및 말쥐치[6] 등을 재료로 하여 어간장의 속성 발효와 풍미 개선을 시도한 연구가 있으며 Saisithi 등은 어간장의 미생물과 화학성분의 변화[7]를 검토하였다.

어간장의 속성 발효에 관한 연구로는 숙성 온도를 높이는 방법[8,9], koji의 첨가법[10], 고압 산

분해법[11], 어육의 마쇄법[12], 해양 세균에서 분비하는 단백질 분해효소를 이용하는 방법[13] 그리고 어육에 효소를 첨가하여 발효하는 방법[9] 등이 제시되어 있으며 속성 발효와 동시에 첨가물에 의한 풍미를 개선하려는 연구도 시도되고 있으나 아직 미비한 실정이다.

한편, 발효기술의 발달로 균체 고정화 기술이 개발되어 bioreactor를 이용한 식품관련산업인 간장[14,15], 알코올[16,17,18], 맥주[19], 식초[20], 아미노산[21] 및 비타민[22] 등의 생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 발효기법은 고정화 균체를 장기간 사용할 수 있으며 연속 발효가 가능하여 제조공정을 단축 시키고 생산성을 높일 수 있고 오염을 방지할 수 있는 특징이 있다.[23]

간장을 발효할 때에 Hamada 등[24]은 *Zygosaccharomyces rouxii*를 고정화 시켜 air-lift column으로 연속발효를 시도하였고 Osaki 등[25]은 *Pediococcus halophilus, Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*를 각각 고정화하여 연속적 속성발효를 실시하여 좋은 결과를 얻었다고 하였다.

野田 등[10]은 麴을 고온에서 분해하여 *Zygosaccharomyces rouxii*와 *Candida versatilis*를 각각 고정화시켜 충진한 bioreactor를 이용한 경우 발효기간이 2주 정도 소요되는 속성간장을 연속적으로 제조할 수 있다고 하였다. 그리고 山田 등[26]은 정어리에 단백분해효소를 첨가하여 고정화 균체를 bioreactor에 충진하여 발효시켜 맛과 풍미가 우수한 속성간장을 발효하였다고 보고하였다.

이러한 일련의 연구를 종합해 볼때 간장의 발효에 관여하는 유산균과 효모를 잘 이용하면 어간장의 속성발효는 물론 간장의 풍미도 개선될 것으로 기대된다.

따라서 본 연구는 어간장의 속성발효와 풍미를 개선할 목적으로 정어리를 마쇄한 후 단백분해효소로 분해한 액에 미리 선별한 유산균인 *Pediococcus halophilus*, 그리고 효모인 *Saccharomyces rouxii*와 *Candida etchellsii*를 이용하여 column형 reactor로 간장의 속성발효 시험을 시도하였다.

II. 재료 및 방법

1. 균주의 분리 및 선별

1) 시료

(1) 어간장의 담금과 발효

어간장에서의 유산, 알코올 및 4-ethylguaiacol의 발효능이 우수한 균주를 선별하기 위하여 재료 정어리를 마쇄한 육 1kg에 대해 식염 150g, 물 600mℓ, Koji 300g 및 complex enzyme 2,000(Pacific Co.) 5g의 배합비율로 잘 섞은 후 3ℓ 플라스틱 용기에 넣은 다음 상온(25±5℃)에서 발효 2주 동안은 하루에 두번씩, 발효 3주 부터는 하루에 한번씩 저어주며 6개월까지 발효시켰다.

(2) 시료의 채취

정어리를 원료로 하여 어간장을 발효할때 발효 20~30일 경과시에는 유산균, 발효 2~3개월 경과 시에는 주발효효모, 그리고 발효 4~6개월 경과 했을때는 후숙효모의 균주분리용 시료로 사용하였다.[23]

2) 균주의 배양방법

발효 20~30일이 경과한 어간장 발효액을 일정량 취하여 멸균 증류수로 희석한 후 유산균 분리배지(어간장 10%, glucose 5.0%, polypeptone 0.5%, 식염 8%, agar 1.5%, pH 5.2)에서 37℃에서 3일간 배양한 후 유산균을 분리하였고, 2~3개월 경과한 발효액에서는 주발효 효모를, 4~6개월 경과한 발효액에서는 후발효 효모를 분리하기 위하여 각각의 발효액을 취하여 멸균증류수로 일정량 희석하여 효모분리용배지(어간장 10%, glucose 5%, yeast extract 0.5%, 식염 8%, agar 1.5%, pH 5.5)에서 30℃에 5~6일간 배양한 후 분리하였다.

3) 유산 생산능력이 우수한 균주의 선별 및 동정

유산균 분리배지에서 분리된 유산균을 다시 유산균 분리배지에 tooth pick로 계대하여 배양한 후 각 colony를 20㎖의 유산균 액체배지 시험관에 접종하여 37℃에서 2일간 배양한 후 배양액을 여과한 다음 유산을 정량하여 유산 생성량이 가장 많은 균주를 다시 300㎖의 삼각플라스크에 동 액체배지 120㎖를 넣고, 분리한 유산균을 접종하여 2~3일간 배양한 후 여과한 다음 유산을 정량하여 유산생산력이 가장 우수한 균주를 선별하였으며, *Bergy's Manual*의 방법[24]에 따라 동정하였다.

(1) 유산의 정량

각각의 배양액을 여과하여 10배 희석하여 Gas-Chromatography로 분석하였다.(Table 1)

Table 1. Conditions of GLC for lactic acid

Column	: 10% Polyethylene Glycol 6000, 60~80 mesh Terephthalic acid 3㎜×5m glass
Oven temperature	: 160℃
Injector temperature	: 200℃
Carrier gas	: N_2(50㎖/min.)
Detector	: FID

4) 알코올 발효능력이 우수한 균주의 선별 및 동정

알코올 발효배지(어간장 10%, 포도당 5%, yeast extract 0.5%, 식염 8%, pH 5.2)를 20㎖ 용량의 smith관에 분주하고 멸균한 후 2)에서 분리한 colony를 각각 동배지에서 30℃에서 6일 전배양한 배양액 0.1㎖를 접종하여 30℃에서 7~8일간 발효실험을 하였다. 알코올 발효능력이 있다고 판단되는 균주는 선별하여 300㎖ 삼각플라스크에 동액체 배지를 120㎖씩 각각 분주하고 여기에 전배양액을 2㎖씩 접종하여 30℃에서 7~8일간 발효시켜 membrane filter(0.45 ㎛)로 여과한 후 알코올을 정량하여 알코올 생성이 가장 많은 균주를 선별하였으며, 선별한 균주를 효모분리용배지(어간장 10%, glucose 5%, yeast extract 0.5%, agar 1.5%, pH 5.5)에서 30℃에 5~6일간 배양한 후 Lodder와 Kreger-ven Rij의 방법[20]에 따라 동정하였다.

(1) 알코올의 정량

Gas-Chromatography법에 의하여 측정하였다. 즉 각각의 배양액을 여과하여 25배 희석한 후 Gas-Chromatography에 2㎕를 주입하였고 내부 표준물질로는 cyclohexanol을 사용하였다 (Table 2).

Table 2. Conditions of GLC for alcohol analysis

Column	: 30% sorbitol 60~80 mesh shimalite 3㎜×6m stainless steel
Carrier gas	: N_2(22.5㎖/min.)
Oven temperature	: 120℃
Injector temperature	: 235℃
Detector	: FID

5) 4-etylguaiacol의 생산능력이 우수한 균주의 선별 및 동정

효모발효배지(어간장 10%, 포도당 5%, yeast extract 0.5%, 식염 8%, pH 5.2)를 20㎖ 시험관에 5㎖씩 취하고 멸균한 후 2)에서 분리한 후 발효효모를 접종하여 30℃에서 7~8일간 배양한 후 향기성분이 양호한 균주들을 선별하였다. 선별된 균주들로부터 향기성분의 생성을 확인하기 위하여 배양액 100㎖를 넣은 300㎖ 삼각플라스크에 선별된 균주를 각각 20㎖씩 접종한 후 30°C에서 7~8일간 배양하고 여과한 다음 4-ethylguaiacol을 정량하여 4-ethylguaiacol의 생산능력이 가장 우수한 균주를 선별하였으며, 선별한 균주를 효모분리용배지(어간장 10%, glucose 5%, yeast extract 0.5%, agar 1.5%, pH 5.5)에서 30°C에 5~6일간 배양한 후 Lodder와 Kreger-ven Rij의 방법[20]에 따라 동정하였다.

(1) 4-ethylguaiacol의 분석

마개가 부착되어 있는 20㎖ 시험관에 시료 5㎖, 식염 1g, 초산에칠 2㎖을 가하여 10분간 진탕시켜 추출한 후 5℃에서 원심분리 (4,000 rpm)하여 분리된 초산에칠층만을 분취한 다음(3

회반복) 내부표준물질로 2,3,5-trimethylphenol을 가하여 G.C.로 분석하였다.[36](Table 3)

Table 3. Conditions of GLC for 4-ethylguaiacol

Column	: Quadrex 007 BONDED Fused silica capillary column (0.25㎜×25m)
Column packing material	: PEG 20M
Injector temperature	: 200℃
Initial temperature	: 50℃
Final temperature	: 200℃
Carrier gas	: He
Detector	: FID

2. 어장유의 제조

1) 재료

정어리(*Sardinops melanostica* : 체중 75~83g, 체장 16~22cm)를 1990년 1월 5일 부산 자갈치시장에서 구입하여 사용하였다.

2) 시험방법

(1) 가수분해

정어리를 chopper로 마쇄하여 Table 4와 같은 배합비율로 하여 잘 섞은 후 50℃로 조절한 진탕항온수조에서 48시간 동안 가수분해[2,3]하여 여과하고 90℃에서 2시간 가열처리한 후 여과하여 고정화 균체의 발효원액으로 사용하였다.

Table 4. Material composition for preparation of fish sauce by sardine

Sardine paste	1000g
Koji	300g
Salt	150g
Water	600㎖
Complex enzyme 2,000	5g

3. 균체의 고정화

1) 고정화 담체의 조제

(1) Colloidal silica-알긴산소다 혼합물 담체의 조제

Colloidal silica(Snowtex 40 ; particle size 9~13nm, 40% SiO_2, Nisan Kagaku Co.)를 5N-HCl로 pH 7~8이 되도록 조절한후 3% 알긴산소다 용액을 가하여 colloidal silica 용액과

3% 알긴산소다를 1 : 5의 비율이 되도록 혼합하여 사용하였다.[35]

(2) 다당체 및 기타 담체의 조제

Agar, alginic acid, *k*−carrageenan 및 polyacrylamide 등은 일정한 농도로 만들어 사용하였다.[34,35]

2) 고정화법

분리동정된 유산균은 유산균 배지에서 37℃에서 3일간 배양하고 효모는 효모배지에 30℃에서 5~6일간 배양한 후 각각의 균체를 원심분리(4000 rpm)한 다음 균체를 모아 멸균증류수로 각각 2회 씻는다. 균체를 알긴산 식리카용액에 1 : 1의 비율로 혼합한 다음 23gauge의 주사기에 넣어 5% 염화칼슘용액에 떨어뜨려 bead를 만든 다음 4℃에서 보관하여 두고 사용하였다.

3) Column형 reactor에 의한 발효

간장의 연속발효장치는 유리로 만든 column형(용량 300㎖, 높이 30㎝, 직경 28㎜)의 유통식 reactor를 사용하였다. 본 발효장치는 소정의 균체고정화 bead를 무균적으로 충진한 다음 peristalic pump를 사용하여 밑에서 위로 발효원액을 공급하면서 발효하여 여과하도록 되어있다 (Fig. 1).

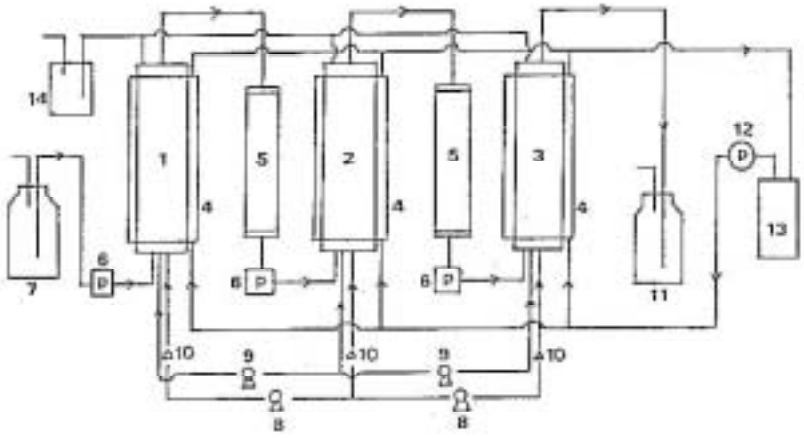

Fig. 1 Schematic diagram of the column type reactor

1. reactor packed immobilized cells of *P. halophilus* R−22
2. reactor packed immobilized cells of *S. rouxii* R−60
3. reactor packed immobilized cells of *C. etchellsii* H−50
4. water jacket, 5. ceramic filter, 6. peristalic pump
7. Koji hydrolyzate stock vessel, 8. air, 9. N_2 gas
10. air filter, 11. harvest tank. 12. pump, 13. warm water pool, 14. gas outlet

4. 분석법

1) 일반성분

수분은 상압가열건조법, 조지방은 Soxhlet법, 조단백질은 Semi-micro Kjeldahl법, 당은 Somogyi법, 염분은 Mohr법, 그리고 휘발성염기질소(VBN)는 미량확산법 등의 상법으로 정량하였고, 아미노태 질소는 동염법[30]으로 비색 정량하였다.

2) 생균수의 측정

Hematocytometer(Superior, made in Germany)로 측정하였다.

3) 관능검사

어간장 발효액의 관능검사는 12명의 관능검사 요원을 구성하여 5단계 평정법(5점 : 매우 좋다, 3점 : 보통이다, 1점 : 매우 나쁘다) 및 정량적 묘사분석시험법[30]을 이용하였으며, 예비적으로 관능검사 요원들에게 어간장 발효액을 제공하여 묘사토록 한 후 선정횟수가 많은 묘사를 추출하였다. 맛의 판단은 전체적인 기호도(total taste acceptance), 단맛(sweet), 쓴맛(bitter), 짠맛(salt), 생선비린맛(fishy), 간장맛(soy sauce taste), 신맛(sour taste)과 고소한 맛(cooked taste)으로 하였고, 냄새는 전체적인 기호도(total flavor acceptance), 간장냄새(soy sauce), 짠냄새(salty), 중화냄새(neutral odor), 생선비린냄새(fishy), 향긋한 냄새(fragrant), 역겨운 냄새(nasty odor)와 카라멜냄새(caramel odor)로 하여 평가하였다. 관능검사는 오전에 행하였으며 제시된 시료는 상온에서 3회 반복하여 평가하였다.(Fig. 2)

정량적 묘사분석 시험법
(Quantitative descriptive analysis)

성명 :　　일시 :　　년　　월　　일

앞에 제시한 어간장을 시식한 후 각 묘사에 대한 강도를 느끼는 대로 해당점수를 표시하여 주십시오.(*강도표시 0 : 존재하지 않는다. 1 : 겨우 알아낼 수 있는 정도. 2 : 약하다. 3 : 보통이다. 4 : 강하다. 5 : 아주 강하다.)

향기 및 냄새

간장냄새(soy sauce) :　　(　　)

중화냄새(neutral odor) :　　(　　)

생선비린 냄새(fishy) : ( )
향긋한 냄새(fagrant) : ( )
역겨운 냄새(nasty) : ( )
짠 냄새(salty) : ( )
카라멜냄새(caramel odor) : ( )

맛

단맛(sweet) : ( )
짠맛(salt) : ( )
쓴맛(bitter) : ( )
신맛(sour taste) : ( )
생선비린맛(fishy) : ( )
간장맛(soy sauce) : ( )
고소한 맛(cooked taste) : ( )

종합적 기호도

(*점수표시 1 : 매우 나쁘다, 3 : 보통이다, 5 : 매우 좋다.)

향(flavor) : ( )
맛(taste) : ( )

Fig. 2 Questionaire for sensory evaluation of fish sauce

Ⅳ. 결과 및 고찰

1. 균주의 선별 및 동정

1) 유산 생산능력이 우수한 균주의 선별 및 동정

시험방법에 따라 분리선별한 유산생산능력이 우수한 균주, R-22를 동정하기 위하여 그 형태학적 및 생리학적 성질을 표준균주인 *Pediococcus halophillus* JCM 5888과 비교하여 실험한 결과는 Table 5, 6과 같다.

Table 5. Morphological characteristics of strain R−22

Characteristics	R−22	*P. halophilus* JCM 5888
Diameter of colony(㎜)	1.0~2.4	1.0~2.5
Gram	+	+
Shape	spherical	spherical
Surface	smooth	smooth
Spore	not formed	not formed

Table 6. Physicological properties of strain R−22

Characteristics	R−22	*P. halophilus* JCM 5888
Growth at 35℃	+	+
40℃	−	−
50℃	−	−
Acid production from		
Arabinose	+	+
Ribose	+	+
Xylose	−	−
Rhamnose	−	−
Lactose	−	−
Maltose	+	+
Sucrose	−	+
Dextrin	+	−
Soluble starch	−	−
Glycerol	+	+
Mannitol	−	−
Sorbitol	−	−
Production of catalase	−	−
Hydrolysis of arginine	−	−
Vitamin reguirement		
Riboflavin	−	−
Pyridoxal	−	±
Folic acid	−	−

분리선별한 균주 R-22의 형태학적인 특성은 gram 양성으로 세포의 크기는 2~3μ이며 spore를 형성하지 않았고 미백색의 점질성 있는 colony이였다. 생리학적 성질을 *P. halophilus* JCM 5888과 비교해 보면 R-22는 sucrose는 분해하지 못하였으며 비타민 중에서 pyridoxal을 요구하지 않았다. 그외에는 *P. halophilus* JCM 5888과 비슷한 경향이었으며 특히 catalase를 생성하지 않았고 알기닌도 분해하지 않았다. 이상의 결과로 보아 분리선별된 균주 R-22는 *Pediococcus halophilus* R-22라고 명명하였다.

2) 알코올 발효능력이 우수한 균주의 선별 및 동정

Table 7과 8은 시험방법에 따라 분리선별한 알코올 발효능력이 우수한 균주 R-60을 동정하기 위하여 *Saccharomyces rouxii* IFO 1872를 표준균주로 하여 비교 시험한 결과이다.

Table 7. Morphological and cultural characteristics of strain R-60

Characteristics	R-60	*Saccharomyces rouxii* IFO 1872
Shape	oval	oval
Cell size(μ)	7.0~8.6	7.5~9.0
Ascospore	round	round
Ascus	2~4	1~4
Koji agar plate	creamy	creamy
Malt agar plate	grayish white	grayish white

Table 8. Physicological properties of strain R-60

Properties	R-60	*Saccharomyces rouxii* IFO 1872
Fermentation		
Glucose	+	+
Galactose	−	−
Sucrose	−	−
Maltose	v	w
Lactose	+	+
Rafinose	+	+
Assimilation		
Glucose	+	+
Galactose	w	+
Maltose	+	+

Sucrose	+	+
KNO_3	−	−
Vitamin requirements		
Thiamine	−	−
Riboflavin	−	−
Pyridoxine	−	−
Choline	−	−
Nicotinic acid	−	−
Pantothenic acid	+	+
Biotine	+	+

v ; very weak reaction w ; weak reaction

균주 R−60의 형태학적인 특성은 *Saccharomyces rouxii* IFO 1872과 비교해 보면 세포의 모양은 타원형으로 비슷하며, 세포의 크기도 거의 같고, 자낭포자의 수도 비슷하며 koji 및 malt한천배지에서 배양하였을 때 형태학적으로는 거의 비슷한 경향이었다.

그리고 생리학적인 성질에서는, 발효능력에서 표준균주와 비교해 볼때 maltose가 약간의 차이가 있고, 자화능력은 galactose에서 표준균주에 비해 자화능력이 약하였으며, 비타민 요구성에서는 *S. riuxii* IFO 1872와 같았다.

이 결과들을 종합하여 선별된 균주 R−60을 *Saccharomyces rouxii* R−60으로 명명하였다.

3) 4−ethylguaiacol의 생산능력이 우수한 균주의 선별 및 동정

시험방법에 따라 분리선별한 4−ethylguaiacol의 생산능력이 우수한 균주 H−50의 형태학적 및 생리학적 특성을 표준균주인 *Candida etchellsii* IFO 1229와 비교한 결과를 Table 9와 10에 나타내었다.

Table 9. Morphological characteristics of strain H−50

Characteristics	H−50	*Candida etchellsii* IFO 1229
Shape	globose	globose
Cell size(μ)	2~3	2~4
Ascospore	round	round
Ascus	1~4	1~3
Color	greyish white	greyish white
Surface	smooth	smooth
Edge	entire	entire

Table 10. Physicological properties of strain H−50

Properties	H−50	*Candida etchellsii* IFO 1229
Fermentation		
Glucose	+	+
Galactose	−	−
Sucrose	−	−
Maltose	+	+
Lactose	±	−
Assimilation		
Galactose	+	+
Sucrose	−	−
Maltose	+	+
Lactose	−	−
Raffinose	−	−
Soluble starch	−	−
Xylose	−	−
Arabinose	+	−
Ribose	−	v
Glycerol	+	+
Erythritol	−	−
Mannitol	v	v
Succinic acid	+	v
citric acid	±	−
KNO_3	+	+
Splotting of arbatin	−	−

± ; Somtimes strains give a positive or negative reaction

v ; very weak reaction

분리선별한 균주 H−50은 모양은 구형이었고 세포의 크기는 2−3μ이었으며 고체배양했을 때 희백색을 나타내면서 표면은 smooth하였다. 이러한 실험결과는 표준균류 *Candida etchellsii* IFO 1229와 비교하였을 때 형태학적으로 매우 비슷하였다.

한편 생리학적 특성은 당의 발효능력에서는 galactose, sucrose 등의 당은 발효하지 않아 *Candida etchellsii* IFO 1229와 비슷한 경향이었으며, 자화성에 있어서는 *Candida etchellsii*

IFO 1229와 비교해 보면 arabinose의 자화능력이 있는 것이 다를 뿐이었다. 그리고 citric acid의 자화능력은 균주 H-50은 약간 자화하고 *Candida etchellsii* IFO 1229는 자화하지 않았다.

이상의 결과로 보아 균주 H-50은 *Candida etchellsii* H-50으로 명명하였다.

2. 정어리의 일반성분

어간장을 담기 위하여 구입한 정어리의 일반성분은 Table 11과 같다.

Table 11. Chemical composition, nitrogen compounds, volatile basic nitrogen (VBN) of chopped whole sardine

Moisture(%)	76.1
Crude lipid(%)	5.8
Glucide(%)	0.34
Ash(%)	3.5
Total-Nitrogen(mg%)	1802.6
Free amino acid-N(mg%)	182.7
pH	6.0
VBN(mg%)	16

정어리 몸체를 마쇄한 육의 수분은 76.1%, 조지방은 5.8%, 그리고 당질은 0.34%이었으며, 총질소는 1,802.6mg%, 유리아미노태 질소는 182.7mg%이었다.

pH는 6.0, 휘발성 염기질소는 16mg%로 원료 정어리의 선도는 양호한 것으로 판단된다.

3. 정어리의 분해액의 성분

정어리를 마쇄한 육에 complex enzyme 2,000(specific activity, 2.06×10^4 Unit/㎎)을 0.5% 첨가하고 1N 수산화나트륨과 염산으로 pH를 6.0으로 조절한 후 52℃에서 8시간 가수분해하여 여과하고 90℃에서 2시간 가열 처리한 후 여과하여 지방과 침전물을 제거한 다음 얻은 분해액의 화학성분은 Table 12와 같다.

Table 12. Chemical composition of sardine hydrolyzate prepared from chopped whole sardine

	Raw whole sardine	Hydrolyzate by C.E. 2,000
Moisture(%)	76.1	78.4
Crude lipid(%)	5.8	0.2
Glucide(%)	0.34	0.28
Total−N(mg%)	1802.6	1763.1
Free amino acid−N(mg%)	182.7	1600.7
pH	6.0	5.4

C.E. 2,000 : Complex enzyme 2,000 obtained from Pacific Co.

정어리 마쇄육과 그것에 complex enzyme 2,000을 첨가하여 분해한 액의 성분을 비교해 볼 때 수분과 당질은 비슷하였으나 조지방은 정어리 마쇄육의 5.8%에 비하여 효소분해액이 0.2%로 적은 것은 효소로 분해한 후 여과하여 지방을 제거하였기 때문이다.

그리고 아미노태 질소가 효소분해액에서 1,600.7mg%로 높은 것은 단백질 분해효소에 의하여 아미노산이 많이 유리된 것으로 판단된다. 이러한 결과는 한 등[22,23]의 결과와 비슷한 경향이었다.

4. *P. halophilus* R−22, *S. rouxii* R−60 및 *C. etchellsii* H−50의 혼합배양에 의한 어간장의 발효

간장발효 시에 필수적으로 생성되는 유산균과 효모를 순수 분리하여 이들 균주의 혼합 배양액을 어간장의 알코올 발효에 이용하였을 때의 유산, 알코올 및 4−ethylguaiacol의 생성에 대하여 조사하였다.

Fig. 3은 어간장의 발효액 중에서 분리한 *P. halophilus* R−22, *S. rouxii* R−60 및 *C. etchellsii* H−50을 혼합배양하여 가수분해한 분해액에 접종하여 유산의 생성, 알코올 및 4−ethylguaicacol의 생성에 대하여 실험한 결과이다.

어간장을 96시간 동안 발효하였을 때 유산은 0.68%, 알코올은 1.25% 그리고 4−ethylguaiacol은 흔적 정도로서 일반적으로 유산균과 효모를 각각 단독배양했을 때[24,25]와 비교하면 유산뿐 아니라 알코올 및 4−ethylguaiacol도 모두 생성량이 낮은편이었다. 松本과 今井[26]은 유산균과 효모의 첨가에 의한 간장발효에서 각각 단독으로 첨가하는 것이 효과적이라고 하였다. 森[27]는 간장의 발효 중 발효 초기에는 유산균이, 발효 초기에서 중기에는 효모균 중 *Saccharomyces rouxii*가, 발효 후기에는 *Candida etchellsii* 및 *Candida versatilis*가 많았다고 하였다.

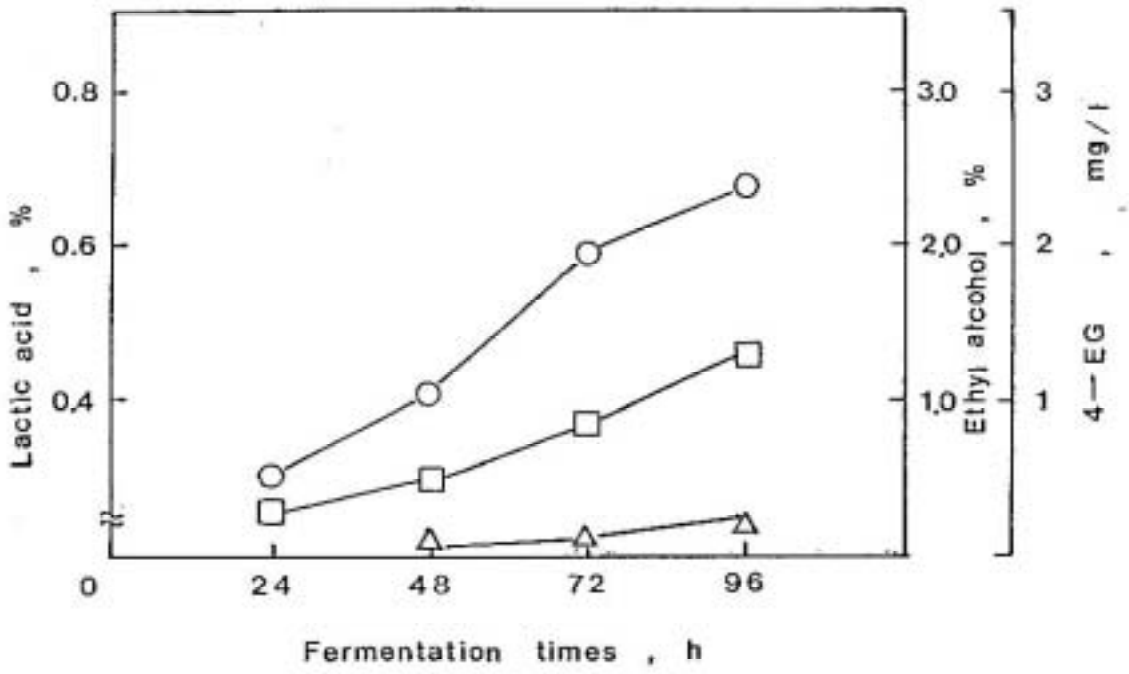

Fig. 3. Time course of lactic acid, ethylalcohol and 4-ethylguaiacol(4-EG) production by fermentation mixed with *P. halophilus* R-22, *S. rouxii* R-60 and *C. etchellsii* H-50

Lactic acid ; ○—○, Ethylalcohol ; □—□

4-EG ; △—△

野田 등[10]은 간장발효 중 유산균은 효모의 생육억제 물질을 분비하기 때문에 효모의 생육이 잘 이루어지지 않는다고 하였다. 본 실험 결과에서도 혼합배양하였을 때 유산, 알코올 및 4-ethylguaiacol의 생성이 낮았으므로 본 실험에서는 이들 균체를 고정화하여 각각 발효하여 실험하였다.

5. 고정화 균체의 발효조건

어간장의 연속발효를 하기 위하여 *P. halophilus* R-22, *S. rouxii* R-60 및 *C. etchellsii* H-50을 각각 고정화하여 column형 reactor에 충진시켜 각 고정화 균체의 발효조건을 검토하였다.

1) 고정화 담체의 선택

발효방법이 많이 개량되면서 식품분야에서도 bioreactor를 이용한 균체의 고정화 시스템에

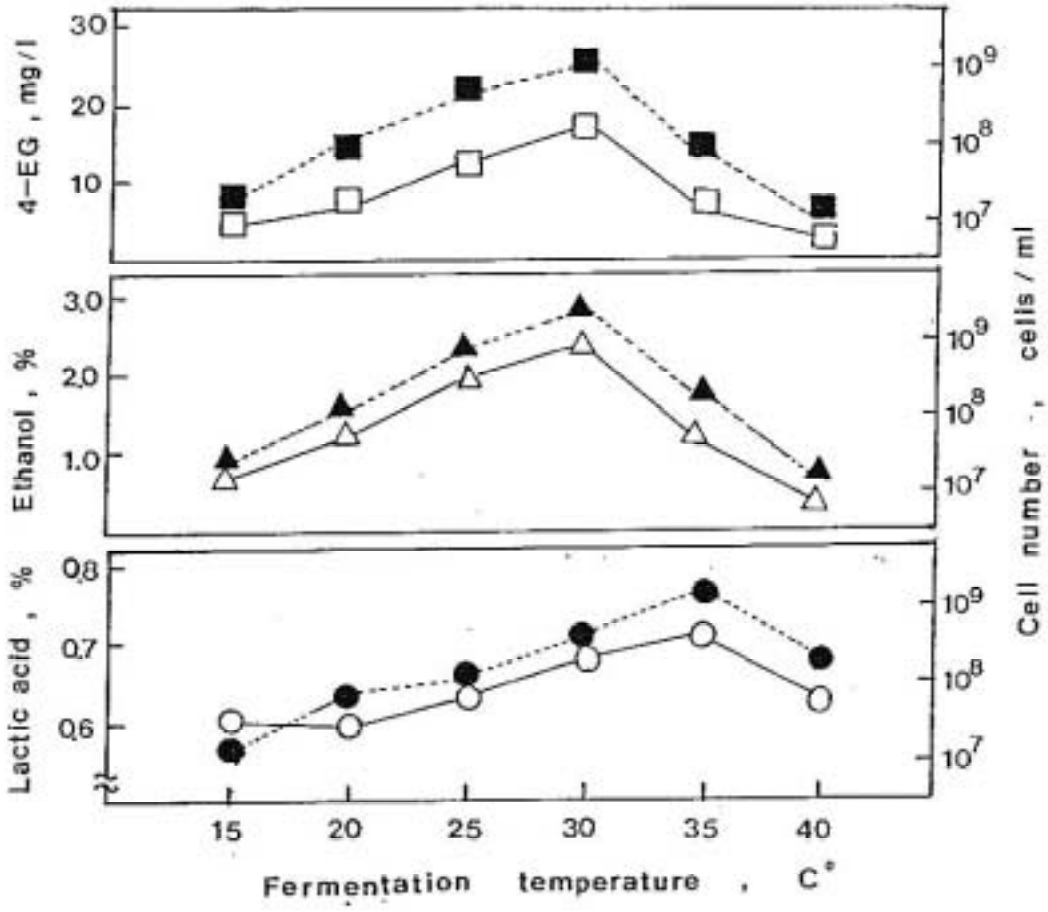

Fig. 4. Effects of temperature for fermentation of lactic acid, ethylalcohol and 4-ethylguaiacol(4-EG) during fermentation for 72hr.

P. halophilus R-22, lactic acid ; ○-○, cell number ; ●-●

S. rouxii R-60, ethylalcohol ; △-△, cell number ; ▲-▲

C. etchellsii H-50, 4-EG ; □-□, cell number ; ■-■

Saccharomyces rouxii R-60의 고정화 균체에 의한 ethylalcohol의 생성량은 30℃에서 가장 높았으며 온도에 따른 생균수도 30℃에서 가장 많았다. 이러한 결과는 여러편의 연구결과와 비슷하였다.[26,27,28] 野田 등[10]과 Hamade 등[11]은 *Zygosaccharomyces rouxii*에 의한 알코올 생성은 30℃에서 가장 높았다고 하였으며 본 결과와 비슷한 경향이었다.

Hamada 등[23]은 *Candida versatilis* 균체를 고정화하여 30℃에서 발효시킬 때 4-ethylguaiacol의 생성이 가장 높았다고 하였고 Horitsu 등[15]과 Osaki 등[17]은 *Candida*속의 고정화 균체에 의한 column형 발효의 조건은 30℃가 가장 좋았다고 하였다. 본 실험에서는 *Candida etchellsii*

H-50의 고정화 균체에 의한 4-ethylguaiacol의 생성과 생균수는 30℃에서 가장 높았고 15℃, 40℃에서는 대우 낮았다.

(2) pH의 영향

간장은 미생물에 의하여 기질이 분해되기 때문에 pH의 영향을 받게 된다. 본 실험에서는 *Pediococcus halophilus* R-22와 *Saccharomyces rouxii* R-60 및 *Candida etchellsii* H-50을 각각 고정화 하여 발효시킬 때 pH가 발효에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 *Pediococcus halophilus* R-22는 균체가 유산을 생성하므로 pH가 낮을수록 유산의 생성은 높았으며 생균수도 pH가 낮을수록 생육도가 좋았다.

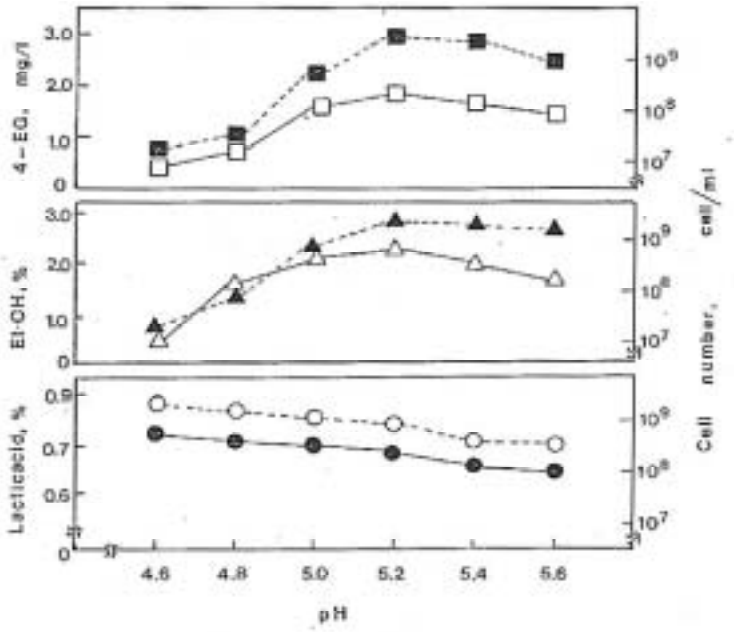

Fig. 5. Effects of pH fermentation of lactic acid, ethylalcohol and 4-ethylguaiacol(4-EG) during fermentation for 72hr

P. halophilus R-22, lactic acid : ○—○, cell munber : ●—●

S. rouxii R-60, ethylalcohol : △—△, cell munber : ▲—▲

C. etchellsii H-50, 4-EG: □—□, cell munber : ■—■

Saccharomyces rouxii R−60의 고정화 균체에 의한 발효시 pH가 낮으면 알코올의 생성량이 적고 pH 5.0~5.2일 때 가장 높았으며 pH가 더 높아질수록 알코올의 생성량은 다소 감소하였다.

Hamada 등[22]은 *Zygosaccharomyces rouxii*의 균체를 고정화하여 발효시 pH 4.5~5.5 부근에서 알코올의 생성량이 가장 높았다고 하였고, 野田 등[20]은 주발효 효모의 고정화 균체에서 pH 3.0에서는 알코올의 생성이 낮았으나 pH 4.8 부근에서 높았다고 하였다.

한편, 4−ethylguaiacol의 생성능은 *Candida etchellsii* H−50의 고정화 균체의 연속발효에서 pH가 5.2에서 가장 높았고, pH가 더 높으면 약간 감소하는 경향을 보여주고 있다.

野田 등[19]은 *Candida versatilis*의 고정화 균체에 의한 연속발효에서 발효액의 pH가 4.0~5.2일때 4−ethlguaiacol의 생성량이 가장 높았다고 하였다. Hamada 등[22]과 山田 등[20]은 *Candida versatilis*를 고정화한 균체를 이용하여 air−lift column reactor에서 pH 5.0에서 발효하였을 때 4−ethylguaiacol의 생성량이 가장 높았다고 하였다. 본 실험에서는 pH 5.0~5.4에서 4−ethylguaiacol의 생성량이 가장 높았으며 이들 연구와 비슷한 경향을 나타내었다.

(3) 식염의 영향

내염성 유산균 및 효모의 증식, 발효는 식염의 농도에 따라 영향을 받게된다[22,23].

정어리 분해액의 식염농도를 10%, 13% 및 16%로 각각 조정하여 30℃, pH 5.2에서 고정화 균체에 의한 발효를 실시하여 유산, 알코올 및 4−ethylguaiacol의 생성을 조사하였다.

Fig. 6은 *Pediococcus halophilus* R−22의 고정화 균체를 이용한 정어리 분해액의 발효 시,

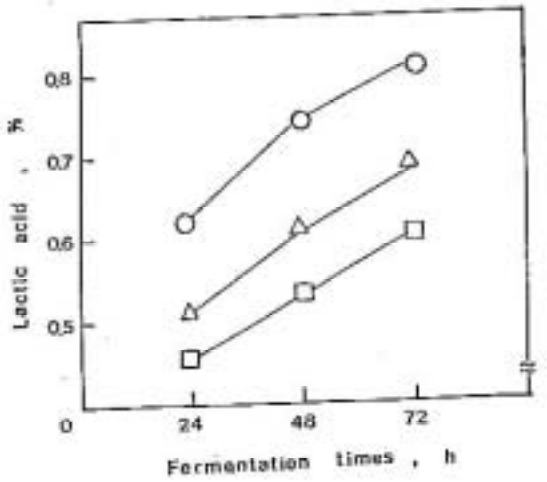

Fig. 6. Effects of NaCl concentration for lactic acid fermentation according to fermentation periods

NaCl concentration : 10% ; ○——○
13% ; △——△
16% ; □——□

식염의 농도에 따른 영향을 나타낸 것이다. 정어리 분해액에 식염을 10%, 13% 및 16%로 조절한 다음 column형 reactor로 발효한 결과 식염의 농도가 10%일 때가 lactic acid의 생성량이 가장 많았고, 13% 및 16%는 다소 낮았다.

Saccharomyces rouxii R-60의 고정화 균체를 이용한 정어리 분해액의 발효 시 식염의 영향에 대한 실험 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

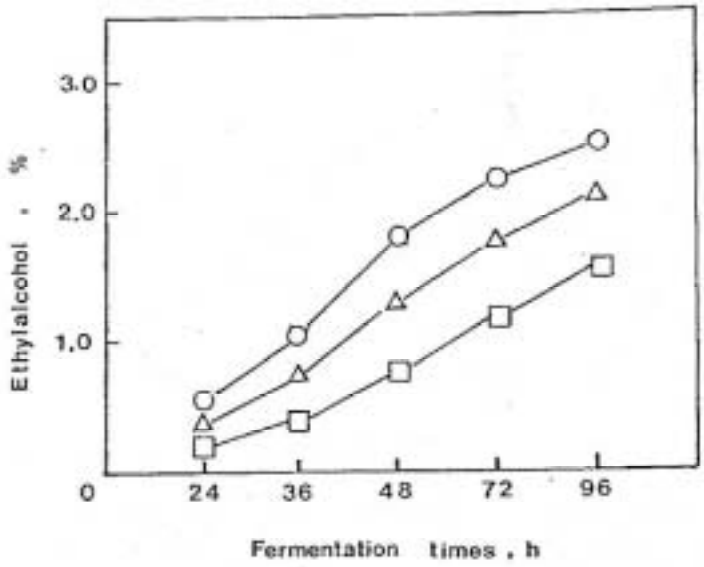

Fig. 7. Effects of NaCl concentration for ethylalcohol fermentation according to fermentation periods

NaCl concentration : 10% : ○—○
13% : △—△
16% : □—□

식염의 농도가 10%일 때 가장 알코올 발효가 좋았고 그 다음이 13%이었고 16%는 알코올 발효가 매우 낮았다. Hamada 등[20]은 *Zygosaccharomyces rouxii*의 발효시 식염의 농도가 13%와 15%일때보다 10%일때가 알코올의 생성량이 높았다고 하였고 野田등[20]은 식염을 10%와 16%로 조절하여 *Zygosaccharomyces rouxii*의 고정화 균체로 발효 시 10%일때가 알코올 생성량이 높았으며 16% 일때는 알코올 생성량이 극히 낮았다고 하였다. 이와 같은 결과는 본 실험 결과와 비슷한 경향이었다.

*Candida etchellsii*의 고정화 균체를 이용한 정어리 분해액의 발효 시 식염의 영향에 대한

실험 결과는 Fig. 8에서 보는 바와 같이 식염농도가 10% 일 때가 4-ethylguaiacol의 생성량이 가장 높았으며 그 다음이 13%, 16% 의 순으로 나타났다.

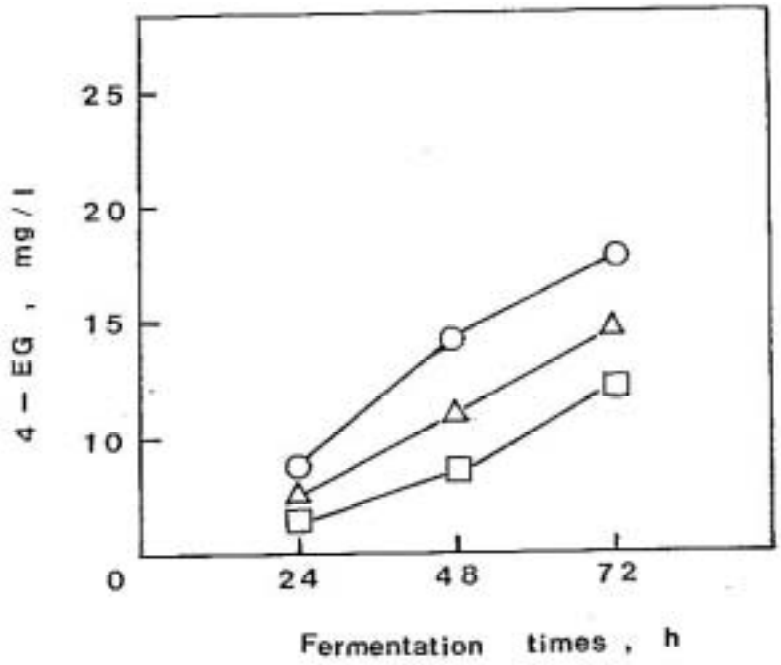

Fig. 8. Effects of NaCl concentration for 4-ethylguaiacol fermentation according to fermentation periods

NaCl concentration : 10% ; ○——○
13% ; △——△
16% ; □——□

橫塚 등[26,48]은 재래식간장의 후숙효모인 *Torulopsis*속에서 간장의 독특한 향기인 4-ethylguaiacol을 검출하였고, 小瀨 등[41]과 Hamada 등[20]은 *Candida versatilis*의 고정화 균체를 이용하여 발효하였을 때 10% 의 낮은 식염농도일 때에 4-ethylguaiacol의 생성은 높았다고 하였다.

(4) Aeration의 영향

간장의 발효에 있어서 유산균과 효모는 혐기성 조건 하에서 발효시키는 것이 이미 알려진 사실이다. 그러나 유산균인 *Pediococcus halophilus*나 *Saccharomyces rouxii*는 간장 발효 시 발생하는 탄산가스의 기포로 인하여 고정화 균체와 발효액의 접촉이 방해를 받게되며 고정화 gel의 leaching 현상이 생기게 된다.[14,15,22] 그러므로 이러한 종류의 발효에는 표면산화 및 발효액의 순환에 의하여 호기적 상태가 되기 쉽고, 결과적으로 발효 후의 향기성분의 이취가

생기며 간장의 색도도 변할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 발효조의 하부에서 일정 유량의 공기와 질소가스를 주입하면서 고정화 균체로서 발효를 실시하였다.

P. halophilus R−22의 균체를 고정화한 column형 reactor에서의 발효 결과를 Fig. 9에 나타내었다.

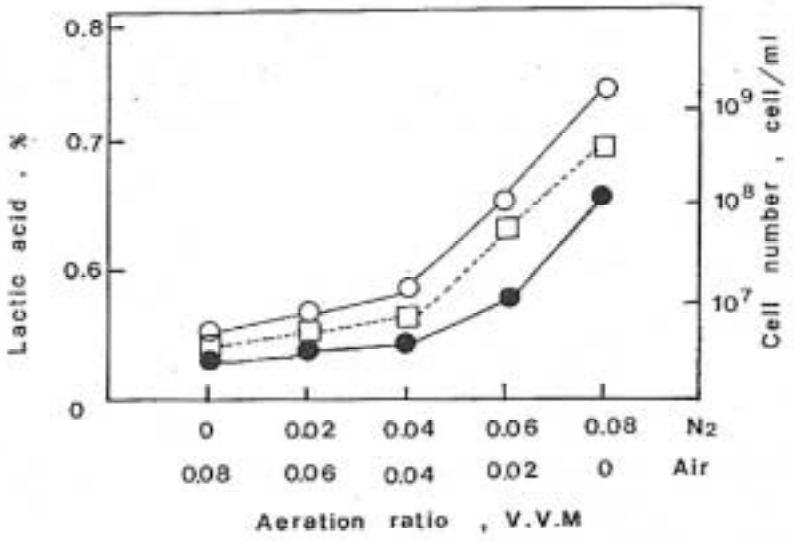

Fig. 9. Effects of aeration ratio on lactic acid fermentation by immobilized cell of *P. halophilus* R−22 in the column type reactor
lactic acid : ○—○, cell number in gel : □—□
cell number in fermentation liquid : ●—●

유산균의 발효시 공기의 통기없이 질소가스만 통기했을 때 유산의 생성이 가장 좋았으며, gel의 생균수도 가장 많았다.

S. rouxii R−60의 고정화 균체에 의한 column형 reactor에서 공기와 질소가스를 일정 비율로 통기하면서 알코올을 발효한 결과는 Fig. 10에서 나타낸 바와 같이 질소와 공기의 통기 비율이 0.02 : 0.06 v.v.m. 일때 알코올의 생성과 생균수도 증가하였으나, 공기를 0.08 v.v.m.으로 통기하거나 공기의 비율이 0.06 v.v.m. 보다 낮을 때는 알코올의 생성 및 생균수는 점차 감소하는 경향을 나타내고 있다.

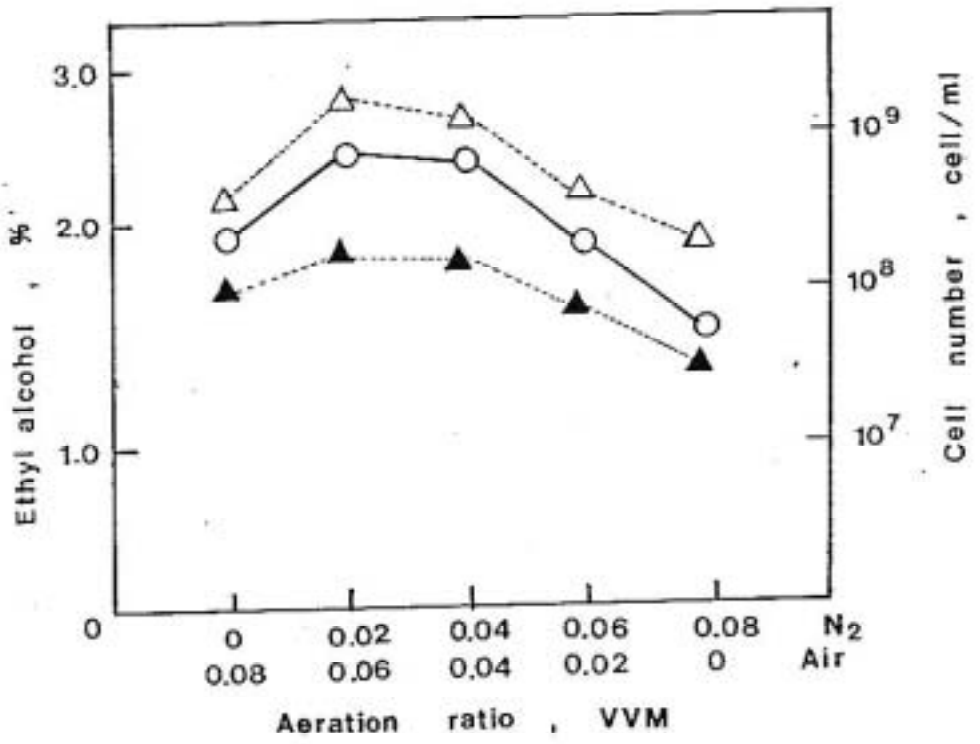

Fig. 10. Effects of aeration ratio on ethylalcohol fermentation by immobilized cells of *S. rouxii* R−60 in the column type reactor

ethylalcohol ; ○——○, cell number in gel ; △——△

cell number in fermentation liquid ; ▲——▲

野田 등[4]은 간장의 속성발효 시 질소가스의 주입은 알코올의 함량과 생균수의 증식에 큰 영향을 준다고 하였다. Hamade 등[7]도 간장의 발효 시 질소가스와 공기를 일정 비율로 주입하면 알코올의 생성량과 생균수가 증가한다고 보고하였으므로 본 실험결과와 비슷한 경향이 있다.

Fig. 11은 *C. etchellsii* H−50의 고정화 균체에 의한 column형 reactor에서 공기와 질소가스를 일정 비율로 통기하면서 발효시킬 때 4−ethylguaiacol의 생성과 생균수를 측정하여 나타낸 것이다.

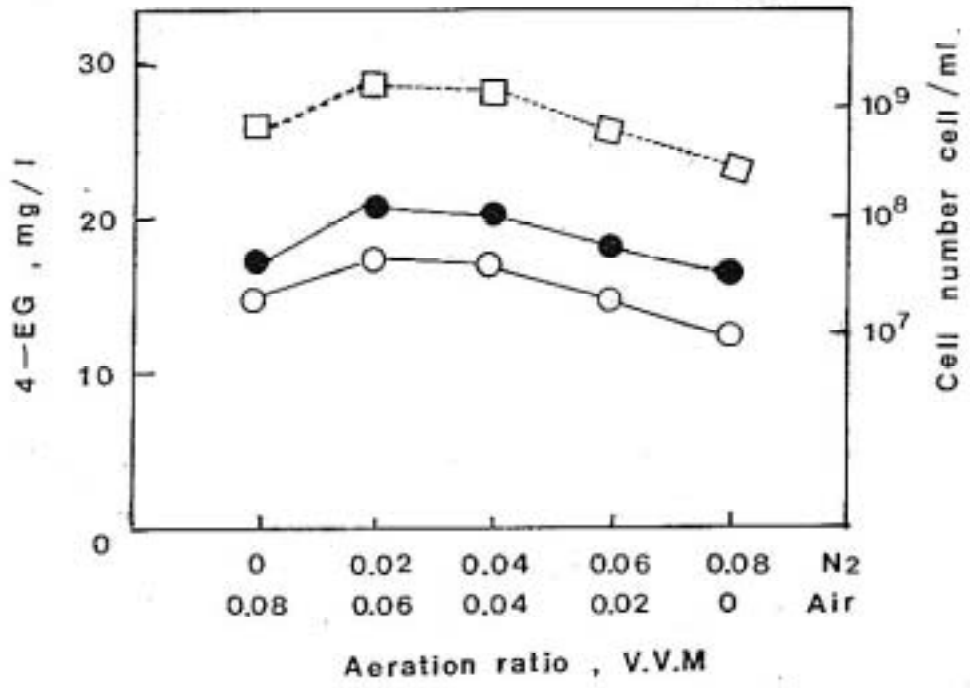

Fig. 11. Effects of aeration ratio on 4-ethylguaiacol(4-EG) fermentation by immobilized cells of *C. etchellsii* H-50 in the column type reactor
4-EG ; ○—○, cell number in gel ; □—□,
cell number in fermentation liquid ; ●—●

4-ethylguaiacol의 생성량과 생균수는 질소가스의 주입을 줄이고 공기의 주입을 늘일수록 증가하여, 질소가스와 공기의 주입비율이 0.02 : 0.08 일때 가장 높은 것으로 나타났다.

野田 등[14]은 질소가스와 공기 주입비율이 0.17 : 0.17 v.v.m. 일때 4-ethylguaiacol의 생성이 최고치에 도달하였다고 하였고, Hamada 등[23]은 질소가스와 공기의 주입비율이 0 : 0.08 v.v.m. 에서 0.06 : 0.02 v.v.m. 정도에서 4-ethylguaiacol의 함량이 높았다고 보고하였다.

이상의 결과로 보아 현재까지 재래식 간장을 발효할때 공기나 질소가스를 주입하지 않았으나 앞으로 적은량의 통기는 간장발효시 앞코율의 생성에 좋은 자료가 될 것이다.

6. Column형 reactor의 발효에서 얻은 어간장의 성분 분석

1) 일반성분, 총질소 및 아미노태 질소

정어리를 마쇄한 육을 가수분해시켜 여과한 후 *P. halophilus* R-22, *S. rouxii* R-60 및 *C.*

etchellsii H−50의 고정화 균체를 충진한 column형 reactor를 이용하여 최적조건 하에서 발효하여 얻은 어간장은 총질소가 1,721.6mg%, 아미노태 질소가 1,584.1mg%이였다.

한 등[9]은 고등어를 원료로 한 어간장의 제조에서 어간장 완제품의 총질소 함량은 1,621~1,641mg%, 아미노태 질소의 함량은 1,424−1,425mg%라고 하였다.

2) Alcohol 및 phenol성 성분

P. halophilus R−22, S. *rouxii* R−60 및 *C.etchellsii* H−50의 각각의 균체를 고정화하여 column형 reactor에서 발효하여 얻은 어간장의 알코올 및 phenol의 성분은 Table 14와 같다.

Table 14. Alcohols and phenolic compounds of fish sauce prepared by each immobilized cell of *P. halophilus* R−22, *S. rouxii* R−60 and *C. etchellsii* H−50

(mg/ℓ)

	Ethyl alcohol[1)]	n-propyl alcohol	Isobutyl alcohol	n-Butyl alcohol	Isoamyl alcohol	2-Phenyl ethanol	4-Ethyl guaiacol	4-Ethyl phenol
Fish sauce	2.7	4.6	8.8	trace	18.1	26.3	18.2	trace
Soy sauce[2)]	2.3	2.6	6.2	1.8	10.3	7.0	2.2	trace

1) : percentage

2) : Soy sauce(super grade) obtained from market

S. rouxii R−60의 고정화 균체에 의한 발효액은 ethylalcohol이 2.7%로 시판되는 특급간장의 2.3% 보다 약간 높았고 n−propylalcohol이 4.6mg/ℓ, isobutylalcohol이 8.8mg/ℓ로 시판 특급간장보다 높았으며, 특히 isoamylalcohol은 18.1mg/ℓ, 2−phenylethanol은 26.3mg/ℓ로 시판 특급간장의 10.3mg/ℓ, 7.0mg/ℓ보다 훨씬 많은 함량이었다. 野田 등[10]은 bioreactor를 이용한 간장의 연구에서 이러한 현상을 고정화 균체를 이용한 알코올 발효의 특징이라고 지적하였다.

그리고 간장 특유의 성분인 4−ethylguaiacol은 *C. etchellsii* H−50의 고정화 균체에 의한 발효에서 18.2mg/ℓ로 시판 특급간장의 2.2mg/ℓ에 비하여 약 8배 정도 높은 함량이었다.

7. 고정화 균체의 증식과 발효성

P. halophilus R−22, *S. rouxii* R−60 및 *C. etchellsii* H−50의 균체를 고정화하여 온도, pH, 식염의 농도 및 aeration등의 최적조건 하에서 column형 reactor로 발효하여 균체의 증식과 lactic acid, ethylalcohol 및 4−ethylguaiacol의 생산성을 검토하였다.

Fig. 12는 *P. halophilus* R−22의 고정화균체에 의한 발효시 생균수와 lactic acid 생성을 나타내었다.

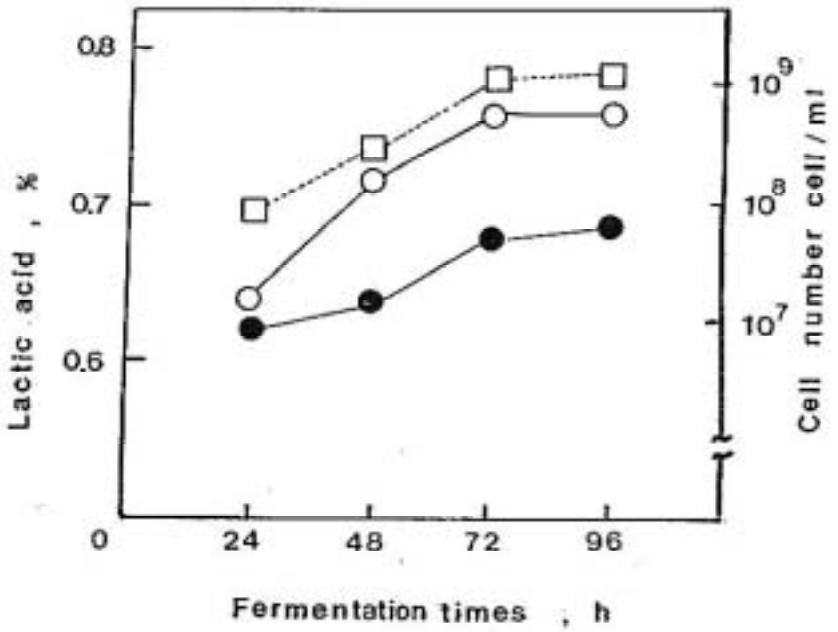

Fig. 12. Productivity of lactic acid fermentation by immobilized *P. halophilus* R−22 cells in the column type reactor

lactic acid ; ○—○, cell number in gel ; □—□

cell number in fermentation liquid ; ●—●

균체의 증식은 발효 24시간에서 72시간 까지는 증가하기 시작하다가 96시간 부터는 증가하지 않았다. 젖산은 발효개시 24시간부터 서서히 증가하다가 72시간 부터는 일정한 함량을 유지하였다. Osaki 등[28]은 간장 발효액에 의한 *P. halophilus*의 젖산 발효는 발효초기에는 젖산이 서서히 생성되다가 발효시간이 경과하면 일정량 유지하였다고 보고 하였다.

Fig. 13은 *S. rouxii* R−60의 고정화 균체에 의한 column형 reactor에서 최적조건 하에서 알코올 발효를 시킨 결과이다.

S. rouxii R−60의 균체고정화에 의한 gel과 발효된 용출액의 생균수는 발효시간의 경과에 따라 증가하다가 발효 96시간에서는 gel내는 1.8×10^8/㎖, 용출액은 1.0×10^7/㎖이였으며, 알코올 생성은 발효 96시간에는 2.3% 생성되었다. 재래식 간장의 경우 발효초기에는 알코올 생성이 거의 없으나 발효중기부터 생성되어 간장에는 약 2.0% 정도의 알코올이 생성되었다.

Fig. 14는 *C. etchellsii* H−50의 균체 고정화에 의한 4−ethylguaiacol의 생성과, gel내와 용출액의 생균수를 측정한 결과이다.

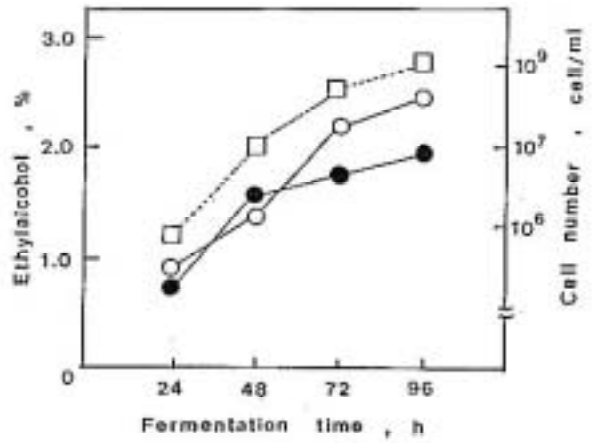

Fig. 13. Productivity of ethylalcohol fermentation by immobilized *S. rouxii* R−60 cells in the column type reactor

ethylalcohol ; ○—○, cell number in gel ; □—□

cell number in fermentation liquid ; ●—●

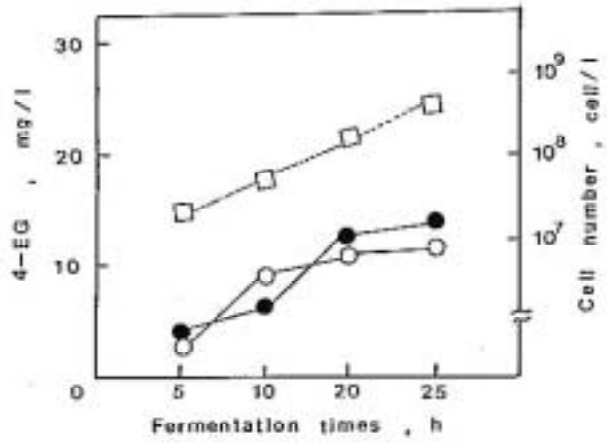

Fig. 14. Productivity of 4−ethylguaiacol(4−EG) fermentation by immobilized *C. etchellsii* H−50 cells in the column type reactor

4−EG ; ○—○, cell number in gel ; □—□

cell number in fermentation liquid ; ●—●

4-Ethylguaiacol의 함량은 발효 10시간부터 증가하다가 발효 20시간 이후 부터는 일정한 함량을 유지하였다. 고정화 균체에 의한 발효시 gel내와 용출액의 생균수는 4-ethylguaiacol의 생성과 비슷한 경향으로 생균수의 변화는 없었다.

일반적으로 재래식 간장의 발효에 있어서는 간장 발효초기에는 유산과 알코올이 많이 생성되고 4-ethylguaiacol은 발효 6개월이상의 기간이 경과되어야 비로소 생성된다.

4-Ethylguaiacol은 간장의 주요한 향기성분으로 간장의 후숙효모인 *C. etchellsii*와 *C. versatilis*에서 생성되며 간장에는 1~3 ppm정도 들어있다. 그러나 본 실험에서 *C. etchellsii* H-50을 균체 고정화하여 발효하면 발효 5시간 경과시에는 3 ppm정도가 생성되며, 발효 20시간 경과 시에는 약 12 ppm생성되었다.

이러한 실험결과는 간장의 독특한 향기성분을 생성하는 *C. etchellsii*나 *C. versatilis*의 고정화 균체를 column형 reactor에 넣어 발효시킨 결과와 비슷하였다[14,20]

8. Column형 reactor에 의한 연속발효

간장을 연속적으로 만들기 위하여 *P. halophilus* R-22, *S. rouxii* R-60 및 *C. etchellsii* H-50의 균체를 각각 고정화하여 column reactor에 충진한 다음 최적조건 하에서 50일간 발효하였다.

1) *P. halophilus* R-22의 고정화 균체에 의한 어간장발효 중 유산의 연속발효

P. halophilus R-22의 고정화 균체에 의한 유산의 연속발효는 Fig. 15와 같다.

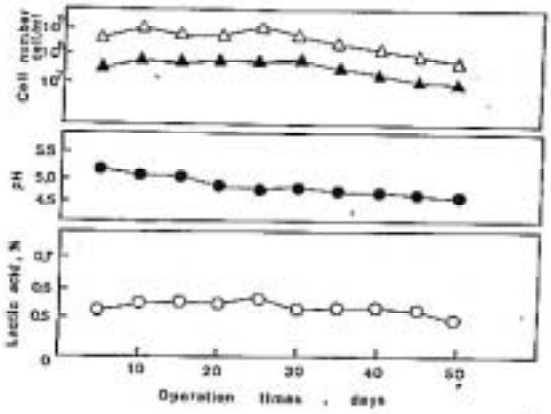

Fig. 15. Time course of continuous fish souce fermentation in column type reactor containing immobilized cells of *P. halophilus* R-22

△—△ ; cell mumber in gel

▲—▲ ; cell mumber in effluent

어간장 발효시 *P. halophilus* R−22의 균체 고정화에 의한 유산의 생성은 발효기간이 25일까지는 일정량 생성되다가 발효 30일부터는 약간 감소하는 경향이었다. pH는 발효를 시작할 때 pH 5.2였으나 발효기간이 경과할수록 pH는 점차적으로 낮아지는 것을 볼 수 있는데 이는 *P. halophilus* R−22로 발효 시 유산이 생성되기 때문이다.

Gel내와 유출액의 생균수는 발효 50일동안 큰 변화를 거의 찾아볼 수 없었다. 본 연구 결과는 小瀨 등[40]과 Osaki 등[23]의 간장 발효시 *P. halophilus*에 의한 연속발효의 연구결과와 비슷하였다.

2) *S. rouxii* R−60의 고정화 균체에 의한 어간장발효 중 알코올의 연속생산

S. rouxii R−60의 고정화 균체를 이용하여 column형 reactor에서 연속발효한 결과는 Fig. 16과 같다.

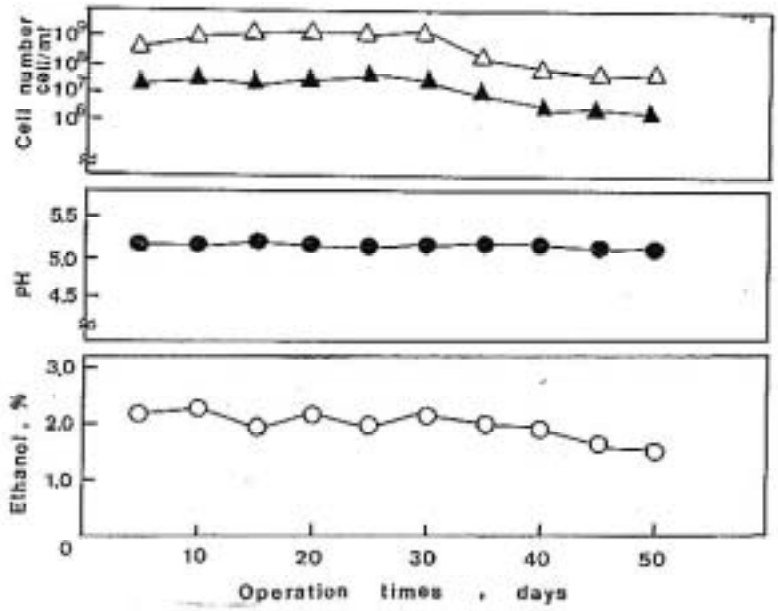

Fig. 16. Time course of continuous fish souce fermentation in column type reactor containing immobilized cells of *S. rouxii* R−60

△——△ ; cell mumber in gel

▲——▲ ; cell mumber in effluent

50일간 발효시 발효시작 5일부터 35일까지 알코올의 함량은 2.1−2.5% 정도로 안정적으로 생산되다가 35일부터는 약간 감소하기 시작하여 발효 50일 경과 시에는 1.7% 정도의 알코올이 생산되었다. 재래식 간장은 발효 3개월부터 알코올발효가 시작되어 발효 6개월 정도에서 2.0−2.5%의 알코올이 생성된다[30]. 알코올 발효기간 중 50일까지 pH는 거의 변화가 없었다.

장기간 발효로 인하여 gel내의 생균수가 발효 30일 이후부터는 감소하는 경향이 있는데 이는 발효과정 중 gel이 염분에 의하여 조금씩 붕괴되거나 gel내의 피막이 형성되어 gel과 기질의 접촉이 덜어지기 때문이다.

Hamada 등[20]은 *Zygosaccharomyces rouxii*의 고정화 균체를 air-lift column에 충진한 모델 실험에서 간장을 발효하여 50일동안 일정한 농도의 알코올이 생성되었다고 하였다.

小瀨 등[21]은 bioreactor를 이용한 *Zygosaccharomyces rouxii*의 고정화 균체의 80일간의 간장 발효 시 1.6~2.0%의 알코올을 얻었고, 재래식 간장보다 간장을 만드는 시간을 단축시켰다고 하였다.

Horitsu 등[15]은 효모의 고정화 균체에 의한 50일 동안의 발효에서 2.5%의 알코올을 생성하였고, 발효기간동안 알코올 생성에는 큰 변화가 없었다고 하였다.

그리고 생균수가 *S. rouxii* R-60의 고정화 균체에 의한 발효 30일까지는 gel내에는 1.0~4.0 $\times 10^9$/㎖, 유출발효액은 1.0~5.0$\times 10^7$/㎖로 안정된 상태였으나 발효 35일부터는 다소 감소하는 경향이었다. 이는 장기간 발효 중 gel의 붕괴와 고정화 균체와 기질의 접촉이 떨어지고 따라서 균체의 활성이 저하되기 때문이다.

3) *C. etchellsii* H-50의 고정화 균체에 의한 어간장 발효 중 4-ethylguaiacol의 생성

어간장 발효 시 *C. etchellsii* H-50의 균체고정화에 의한 4-ethylguaiacol의 생성은 Fig. 17에서 보는 바와 같다.

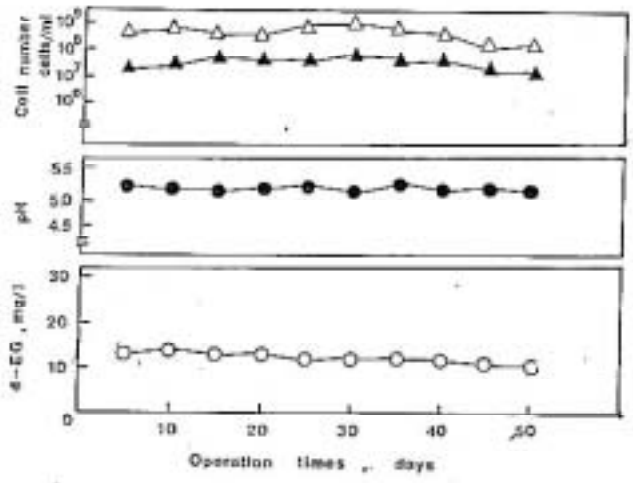

Fig. 17. Time course of continuous fish souce fermentation in column type reactor containing immobilized cells of *C. etchellsii* H-50

△——△ : cell mumber in gel

▲——▲ : cell mumber in effluent

4－ethylguaiacol의 생성은 발효 5일부터 30일까지는 14㎎/ℓ정도로 일정하게 생성되었으며, 발효 35일부터는 서서히 감소하기 시작하여 발효 50일에서는 10㎎/ℓ정도였다.

그리고 발효 중의 pH는 거의 변화가 없었으며, 발효 5일부터 30일까지는 생균수의 변화는 gel내는 1.0×10^{8}～4.0×10^{9}/㎖였고 유출액에는 2.0×10^{7}－1.0×10^{8}/㎖였다.

4－ethylguaiacol은 간장의 품질에 큰 영향을 주는 간장 특유의 향기성분으로 간장 발효 시 *Torulopsis* 속에서 생성된다고 하였다[13]

Hirotsu 등[10]은 *C. versatilis*의 균체고정화에 의한 bioreactor의 발효에서 공기와 질소를 일정량 주입하여 약 23㎎/ℓ의 4－ethylguaiacol을 얻었다고 하였고, Hamade 등[12]은 *C. versatilis*의 균체고정화에 의한 발효에서 약 18㎎/ℓ의 4－ethylguaiacol을 얻었다고 하였다.

野田 등[14]은 *C. versatilis*의 고정화균체에서 4－ethylguaiacol은 발효개시 24시간부터 생성되어 발효 7일째 최고에 달하다가 발효 16일부터는 일정한 량을 유지하였다고 보고하였다. 재래식 간장의 발효에서는 발효 6개월 이후에 1～3 ppm정도 생성되고 간장에도 1～3 ppm 정도 들어있다. 그러나 *C. etchellsii* H－50의 고정화균체의 bioreactor를 이용한 실험에서 4－ethylguaiacol을 다량 얻을 수 있으므로, 실제 산업적으로 활용한다면 우수한 품질의 간장을 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

9. 연속 발효에 의해 생산한 어간장의 관능 검사

정어리의 효소 분해액을 column형 reactor로 고정화 균체에 의하여 연속발효시킨 후 만들

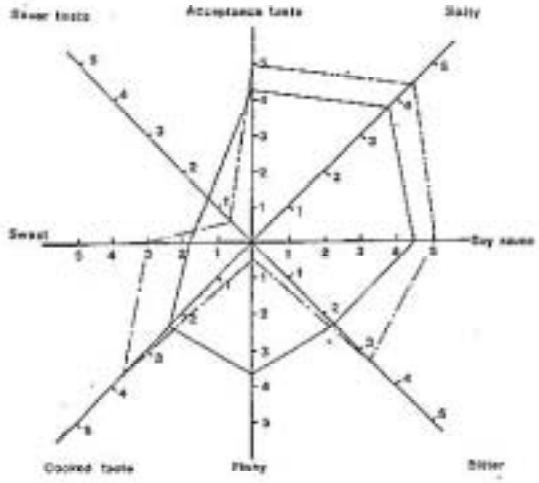

Fig. 18. QDA profiles of taste of fermented fish sauce

Fermented fish sauce ; ————

Commercial soy sauce ; —·—·—·—

어진 어간장을 시판 특급간장과 비교하여 정량적 묘사 분석법(Quantitative descriptive analysis, QDA)으로 맛과 냄새를 평가하였다.

Fig. 18에서와 같이 맛에 있어서 단맛, 쓴맛 및 짠맛은 시판간장이 강하였지만 생선 비린맛은 시판간장은 거의 없는 것에 비하여 어간장은 약간 강한 것으로 나타났다.

Fig. 19는 발효한 어간장과 시판 간장과의 향에 대하여 비교하였다.

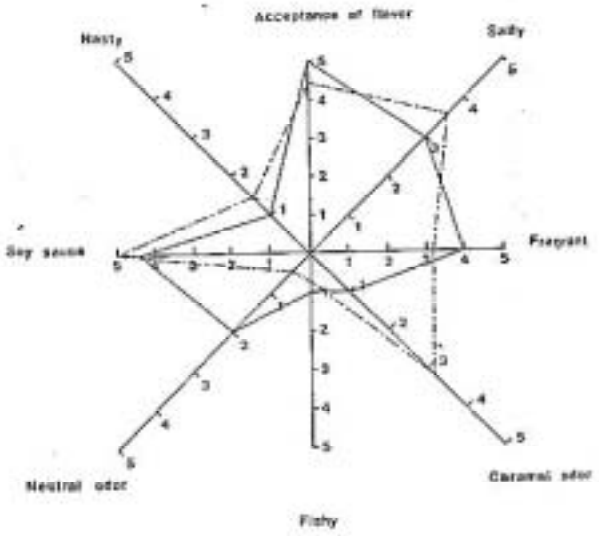

Fig. 19. QDA profiles of flavor of fermented fish sauce
Fermented fish sauce ; ————
Commercial soy sauce ; ——·——

향에서 카라멜 냄새는 시판간장이 어간장에 비하여 강하며 향긋한 냄새는 어간장이 강하였다.

종합적 기호도로 볼 때, 맛은 연속 발효에 의해 생산한 어간장이 시판간장보다 못하였으나 향은 시판 간장보다 좋은 결과가 나타났으며 이는 어간장 발효 중 ethylalcohol 및 저급 알코올류 그리고 4－ethylguaiacol의 함량이 높았기 때문이라 생각된다.

Ⅳ. 요 약

본 연구는 간장의 속성발효를 위한 방법의 하나로 정어리육을 효소에 의하여 분해하고, 분해액을 유산균과 효모의 균체를 고정화하여 이를 column형 reactor를 이용하여 연속적인 속성발효를 시도하였으며 그 결과는 다음과 같다.

1. 재래식 어간장 발효액에서 순수분리한 균주 중 분리동정하여 유산의 생성능이 우수한 균주를 *Pediococcus halophilus* R-22, alcohol 발효능이 우수한 균주를 *Saccharomyces rouxii* R-60, 4-ethylguaiacol의 생성이 우수한 균주는 *Candida etchellsii* H-50이라고 명명하였다.
2. 균체고정화 담체로는 silica gel : sodium alginate(1 : 5)가 적당하였고 *P. halophilus* R-22, *S. rouxii* R-60과 *C. etchellsii* H-50을 고정화하여 각각의 column형 reactor에 충전하여 발효시킨 결과 최적 조건은 pH 5.2, 온도 30℃, 식염농도 10% 그리고 공기와 질소 비율은 0.02 : 0.06 vvm이였다.
3. 발효 최적조건에서 96시간 경과시 *P. halophilus* R-22는 유산을 0.75%, *S. rouxii* R-60은 ethylalcohol을 2.5%, *C. etchellsii* H-50은 4-ethylguaiacol을 18mg/ℓ 생성하였다.
4. Column형 reactor에서 *P. halophilus* R-22의 고정화균체의 연속적 속성 발효시 유산의 생성은 발효 25일까지는 0.62-0.64%였고 30일 이후부터는 약간 감소하였다. *S. rouxii* R-60 고정화 균체의 연속적 속성 발효시 시작일부터 35일까지는 ethylalcohol이 2.1~2.5%로 거의 일정하게 생성되었고 40일 이후에는 약간 감소하였다. *C. etchellsii* H-50 고정화 균체의 발효에서는 35일까지는 4-ethylguaiacol의 함량이 14~16mg/ℓ로 거의 일정하게 생성되었으나 발효 40일 이후 약간 감소하였다.
5. Column형 reactor의 발효에서 얻은 어간장의 성분을 분석한 결과 총 질소는 1,721.6mg%, 아미노태 질소는 1,584.1mg%, 유산은 0.75%, ethylalcohol은 18.2mg/ℓ이었다.
6. 완제품 어간장을 시판 특급간장과 비교한 관능검사 결과는 맛은 시판간장보다 못하였으나 향은 더 좋은 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 고정화 균체를 충진한 column형 reactor에 의한 어간장의 연속 속성발효법은 2주 정도로 속성발효가 가능하였고 50일까지 연속발효도 가능할 것으로 판단된다.

참고 문헌

1. 李 熙昊, 趙 舜榮, 河 在浩, 朴 香淑, 權 七昱 : 크릴간장 製造에 관한 硏究, 韓國食品營養學會誌. 13, 97－106 (1984)
2. 한 봉호, 배 태진, 조 덕현, 김 종철, 김 병삼, 최 수일 : 酵素分解法에 의한 개량 魚醬油의 속성製造 및 品質에 關한 硏究, 韓國水產學會誌, 23(2), 109 (1990)
3. 한 봉호, 배 태진, 조 덕현, 김 종철, 김 병삼, 최 수일 : 효소 분해법에 의한 개량어장류의 속성 제조 및 품질에 관한 연구, 한국수산학회지, 23(2), 125 (1990)
4. 배 태진, 한 봉호, 조 덕현, 김 병삼, 이 현숙 : 효소 분해법에 의한 개량어장유의 속성 제조 및 품질에 관한 연구, 한국수산학회지. 23(5), 361 (1990)
5. 배 태진, 한 봉호, 조 덕현, 김 병삼, 이 현숙 : 효소 분해법에 의한 개량어장유의 속성 제조 및 품질에 관한 연구, 한국수산학회지. 23(5), 373 (1990)
6. 이 용효, 안 창범, 김 진수, 임 치원, 이 승원, 최 영에 : 말쥐치 잔사를 이용한 어간장 제조 및 제품의 정미성분, *J. Korean Soc. Food Nutr.*, 17(4), 326 (1988)
7. Saisithi, P., B. O. Kasemsarn, J. Liston and A. M. Dollar : Microbiology and chemistry of fermented fish, *J. Food Sci.*, 31, 105－110 (1966)
8. Tarky. W. O. P. Agarwala and G. M. Piggot : Protein hydrolysate from fish waste *J. Food Sci.* 38., 917 (1973)
9. Beddows. C. G. 1985. Fermented fish and fish products. In "Microbiology of Fermented Foods"(ed. Wood. B. J. B.) Vol. 2. Elsevier *Appl. Sci. Pube.* London. new York. pp. 1－39
10. Tagano. T. M. Nagamura and P. C. Sanchez : fish sauce in S. E. Asia. 5th *Int. Congr. Food Sci. and Technol.* Kyoto, Japan. P. 300 (1978)
11. Hall, G. M., D. Keeble. D. A. Ledward and R. A. Lawrie : Silage from tropical fish, 1. Proteolysis, *J. Food Technol.*, 20, 561－572 (1985)
12. Ooshiro, Z., T. Ok, H. Une and S. Hayashi : Study on use of commercial proteolytic enzymes in production of fish sauce, *Mem. Fac. Fish*, 62, 1－10 (1981)
13. Embisan, E. A : a shortcut to "patis" processing, *Small Industry Journal*, 10, 10－11 (1977)
14. 野田義治, 大橋和德, 楠田秀喜, 中野正路 : バイオリアクターを利用したし ようゆの硏究, 日本醬油硏究, 15(5), 177 (1989)
15. Horisu, M., Maseda, Y. and kawai, K. : A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts, *Agric. Biol. Chem.*, 54(2), 295 (1990)
16. K. d. Nam, M. H. Chio, W. S. Kim, H. S. Kim and B. H. Ryu : Simultaneous saccharifi-

cation and alcohol fermentation of unheated starch by free, immobilized and coimmobilized systems of glycoamylase and *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Ferment. Technol.*, (Japan), 66, 427 (1988)

17. Onaka, K., Okamoto, Y., Inoue, T., Kubo, S. ; Beer brewing with immobilized whole cells, *J. Food Sci.*, 50, 1289 (1985)
18. Mori, A. ; Production of vinegar by immobilized cells, *Process Biochem.*, 20, 67 (1985)
19. 류 병호, 김 혜성, 노 명훈, 박 법규, 정 종순, 배 기철 ; 세포융합과 고정화 시스템을 이용한 L-lysine의 생산성 향상, 한국식품학회지, 21(1), 154 (1989)
20. Yongsmith, B. and Chutima, K. ; production of Vitamin B_{12} by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels, *J. Ferment. Technol.*, 64(61), 593 (1983)
21. 中西一弘 ; 食品工業用 バイオリアクターの 現狀と 展望, 日本醬油研究, 16(3), 72 (1990)
22. Hamada, T., Ishiyama, T. and Motai, H. ; Continuous fermatation of soy sauce by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an airlift reactor, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 31. 346 (1989)
23. Osaki, K., Okamoto, Y., Akao, T., Nagata, S. and Takamatsu, H. ; Fermantation of soy sauce with immobilized whole cells, *J. Food sience*, 50, 1289 (1985)
24. 山田哲也, 木瀨古茂樹, 坪内一夫, 久 松眞 ; 醬油製造法 バイオリアクターロよる 研究, 三重大學生物資源紀要, 2, 17 (1989)
25. 森 治彦 ; 醬油の 酵母(その 動態と 育種), 日本醸造協會誌, 69, 303 (1971)
26. Sneath, P. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. ; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2, Williams and Wilkins, Baltimore (1986)
27. Lodder and Kreger-van Rij, N. J. W. ; The yeast, a toxonomic study, *Elsevier* (1984)
28. 横塚 保, 左左木正興, 布村伸作 淺尾保保夫 ; 醬油の 香, 7(1), 日本醸造協會誌, 75, 516 (1980)
29. Fukushima Y., Okamura K., Imai K. and Motai H ; A new immobilization technique of whole cells and enzyme with colloidal silica and alqinate, *Biotechnology and Bioengtineering*, 32, 584-594 (1988)
30. Spies, T. R. and D. C. Chambers. 1951. Spectrophotometric analysis of amino acid and peptides with their copper salt. *J. Biol. Chem.*, 191, 787-789.
31. 이철호 ; 제품개발을 위한 관능검사기술, 식품공업품질관리론, 유림문화사, p.170 (1982)
32. 野田文雄 ; 醬類 諸味中に あける 乳酸菌と 酵母の 拮抗現象に つえて, 日本醸造協會誌, 76 (10), 701(1976)
33. 松本 伊左尾, 今井誠一 ; 乳酸菌, 酵母の 添加時期および重か 醬油諸味の 醗酵ロ 與える 景響, 日本醸造協會誌, 80(4), 265 (1985)

34. 류병호 ; 酵母의 固定化에 의한 酒精醱酵, 종합식품연구소보, 2, 49 (1988)
35. B. H. Ryu and K. D. Nam ; Continuous alcohol fermentation using immobilized growing yeat cells, 韓國產業微生物學會誌, 248 (1987)
36. 濱田孝可, 茂田井實 ; 固定化 バイオリアクターに なる 醬油 醸造味液の 製造, 日本醸造協會誌, 84(2), 83 (1989)
37. 瀨津浩章 ; 醱酵固定化法を 導入した 醬油製造方法, *Bio-Industry*, 4(3), 198 (1987)
38. 瀨津浩章 ; 河野克典, 岡世田雄人, 河合啓一 ; セラミツクスリアケに なる 醬油の 新し 製造法(制2報), 日本農學會誌 昭化 制62年, 度大會講演要誌, p.139 (1987)
39. 横塚 保, 逆井利夫, 淺尾保夫 ; 醬油香味成分に 關すろ 研究, 日本農藝化學會誌, 41(9), 442 (1967)
40. 横塚 保, 逆井利夫, 淺尾保夫 ; 醬油香味成分に 關すろ 研究, 日本農藝化學會誌, 41(9), 428 (1967)
41. 小瀨古茂樹, 久 松眞, 山田哲也 ; バイオリアクターロ よろ 醬油製造法の 研究, 三重大學生物資源紀要, 2, 187 (1989)