

## 磷酸鹽이 乳酸菌의 生長에 미치는 影響

유 태 종 · 김 일 환\*

고려 대학교 농과 대학 식품 공학과, 주식 회사 서도 화학\*

(1979년 7월 14일 수리)

## Effects of Phosphates on the Growth of Lactic Acid Bacteria

Tae Jong Yu and Il Hwan Kim\*

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University,

Seo Do Chemicals Co., Ltd., Seoul\*

(Received July 14, 1979)

### Abstract

Effects of monosodium phosphate, disodium phosphate, trisodium phosphate,  $\alpha$ -polygel, sodium ultrametaphosphate and sodium tripolyphosphate on the growth of bacteria, pH and acidity in single culture of *Lactobacillus bulgaricus* and mixed-culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* were investigated. Phosphates exerted definite effect in enhancing the growth of the bacteria and acidity of the fermented milk. For the single-culture of *Lactobacillus bulgaricus* monosodium phosphate and sodium tripolyphosphate were most effective in terms of bacterial growth and acidity, whereas for the mixed-culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* monosodium phosphate and disodium phosphate showed the best results. In the presence of the phosphates, particularly of trisodium phosphate, the decrease of viable count of bacteria in fermented milk during storage was reduced significantly. The stability of the fermented milk prepared with the mixed-culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* was improved by the addition of phosphates, particularly of monosodium phosphate.

### 서 론

유산균은 1857년 Louis Pasteur에 의해 변질된 우유 중에서 발견되었으나<sup>(1)</sup>, 유산균 발효 식품은 이미 오래 전부터 인류의 식 생활에 있어서 밀접한 관계를 맺어 왔으며 최근 과학화 정책에 따른 식생활 개선에도 이 유산균 발효 식품은 중요한 위치를 차지하고 있다.

우리나라의 전통적인 주요 부식인 김치<sup>(2)</sup>나, 구미의 cucumber pickle, sauerkraut는 유산균 발효의 채소이며, 치즈 및 요구르트는 우유의 유산균 발효 식품<sup>(3)</sup>이다. 우유를 이용한 유산균 발효 음료는 우유 또는 분

유에 유산균을 접종하고 이에 향미제, 향료 등을 가하여 발효시킨 것이나 물로 희석한 것<sup>(4,5)</sup>으로서, 유산균인 간균(*Lactobacillus* 속)과 구균(*Streptococcus* 속)을 단독하거나 2종 이상을 사용하여 독특한 방향성이 있는 발효취와 산미 및 감미를 갖는 음료이다.

우리나라에는 현재 희석형 요구르트가 제조 이용되고 있는데 이는 요구르트에 비하면 무지유 고형 성분이나 산도가 상당히 낮은 반면 감미가 강한 것이 특징이다<sup>(4)</sup>. 이들 제품은 유통되는 동안에 외부 조건에 따라서 산도의 증가, 살아있는 유산균의 감소, 침전물의 생성 등 문제점이 있다. 희석형 요구르트에는 산미의 증진을 위하여 구연산을 첨가하는 경우도 있는 데 이는

유산균 수의 감소에 크게 영향을 미친다고 알려져 있다<sup>(6)</sup>. 또한 안정제로서 알긴산의 propylene glycol ester가 널리 쓰이고 있다<sup>(4)</sup>.

인산염은 식품 공업에서 pH 조정, 영양소, 산 (solid acid), 단백질과의 작용, 원료의 확산 등의 목적으로 널리 쓰이고 있는 식품 첨가물의 하나이다<sup>(7,8)</sup>. 인산염이 유산균 및 유산균 발효유에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 없는 형편이다. 본 연구는 인산염이 발효유의 산미 증진 및 안정제로서의 사용 가능성을 검토하는데 그 목적이 있으며 일차적으로 인산염이 유산균 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 단독 또는 혼합 배양시 생균수, 제품 pH에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 발효유의 저장중 인산염이 균수 감소에 미치는 영향도 아울러 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용 균주

고려대학교 농과 대학 식품 공학과에서 보관하고 있는 유산균 중 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*를 사용하였다.

### 종균의 배양

종균의 배양을 위한 배지의 조성은 skim milk 100 g, glucose 2 g, yeast extract 2 g 및 water 978 ml이었다. 이를 121°C에서 8분간 살균, 냉각한 후 유산균을 접종하고 39°C에서 정지 배양하되 pH 4.6에 도달한 것은 다시 3~4회 계대 배양을 되풀이 하여 사용하였다.

### 인산염이 유산균의 생장에 미치는 영향

10%의 skim milk (30 ml)를 screw-capped tube에 넣고 100°C에서 30분간 살균하고 39°C로 냉각한 후 2%의 종균을 접종하고 동일 온도에서 18시간 배양하면서 생균수, pH 및 산도를 측정하였다. 혼합 배양의 경우 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 혼합 비율은 1:1이었다.

인산염은 종균을 접종하기 전에 첨가하였으며 최적 첨가량은 인산염의 종류에 관계없이 0.2%이었다.

본 실험에 사용한 인산염은 국내에서 개발되어 시판되고 있는 식품 첨가용 제품으로서 그 종류는 다음과 같다. Orthophosphate: monosodium phosphate (MSP), Disodium phosphate (DSP), Trisodium phosphate (TSP) Polyphosphate: Sodium tripolyphosphate (Polygel (α-PG, polyphosphate의 혼합 제제), sodium (STPP), aultrameta phosphate (Sporix)

### 발효유의 저장 중 변화

*L. bulgaricus* 단독 및 *L. bulgaricus*와 *S. thermophi-*

*ilus*의 혼합 종균을 사용하여 39°C에서 각각 18 및 12시간 배양한 발효유를 25°C에서 7일간 저장하면서 생균수의 변화를 측정하였다. 또한 혼합 종균을 사용하여 제조된 발효유를 동일 조건에서 구연산(0.2%) 및 Sporix (0.2%)가 생균수에 미치는 영향도 아울러 검토하였다.

혼합종 균을 사용하여 제조된 발효유를 동량의 물로 희석, 균열화시킨 액(10 ml)을 눈금기 새겨진 원심분리관(15 ml 용량)에 넣고 500 및 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 또는 5°C에서 자연방치 할 때 curd 용적의 감소로부터 시료의 침강 정도를 상대적으로 비교하였다.

### 생균수의 측정

시료 1ml를 BCP-agar 배지(yeast extract 0.5%, peptone 0.25%, glucose 1%, bromocresol purple 0.003%, agar 1.5%, pH 6.8)에 접종 후 37°C에서 48시간 배양후 황색 colony를 측정하였다<sup>(9)</sup>.

### 산도 및 pH 측정

시료의 pH는 유청 부분을 취하여 Corning model-2 pH meter를 사용하여 측정하였다. 산도는 0.1 N-NaOH로 적정하여 다음식에 의해 유산으로 환산하였다<sup>(10)</sup>.

$$\text{유산(\%)} = \frac{0.1 \text{ N-NaOH 적정 ml} \times 0.009}{\text{시료 무게(g)}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

### 인산염이 *L. bulgaricus*의 생장에 미치는 영향

10%의 skim milk 용액에 각종 인산염을 첨가하고 요구르트의 주 발효균인 *L. bulgaricus*를 접종하여 배양하면서 생균수, pH 및 산도의 변화를 본 결과는 Fig. 1과 같다. 인산염은 *L. bulgaricus*의 생장을 촉진시켰으며 그 효과는 STPP, MSP, TSP, α-PG의 순으로 감소되었다. DSP 첨가구는 대조구보다 오히려 다소 낮은 생균수를 보였다. TSP 첨가구는 다른 인산염과는 달리 배양후 12시간까지도 대조구에 비해 다소 낮은 생균수를 보였으나 그후에 급격히 증가하는 독특한 양상을 보였다.

인산염은 모든 생물체의 필수적인 원소로서 phosphate 이온으로 이용된다<sup>(7)</sup>. Phosphate 이온은 체내에서 합성되지 않으므로 음식으로부터 흡수하여야만 한다. 인산염이 중합되어 생성된 tripolyphosphate는 체내에서 에너지 저장 물질인 adenosine triphosphate의 구성분으로 중요하다. *L. bulgaricus*의 배양액에 인산염을 첨가한 경우 생균수가 증가한 것은(Fig. 1) 첨가한 인산염이 유산균 대사에 영향을 주기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 인산염의 종류에 따라 그 효과가 다른 이유는

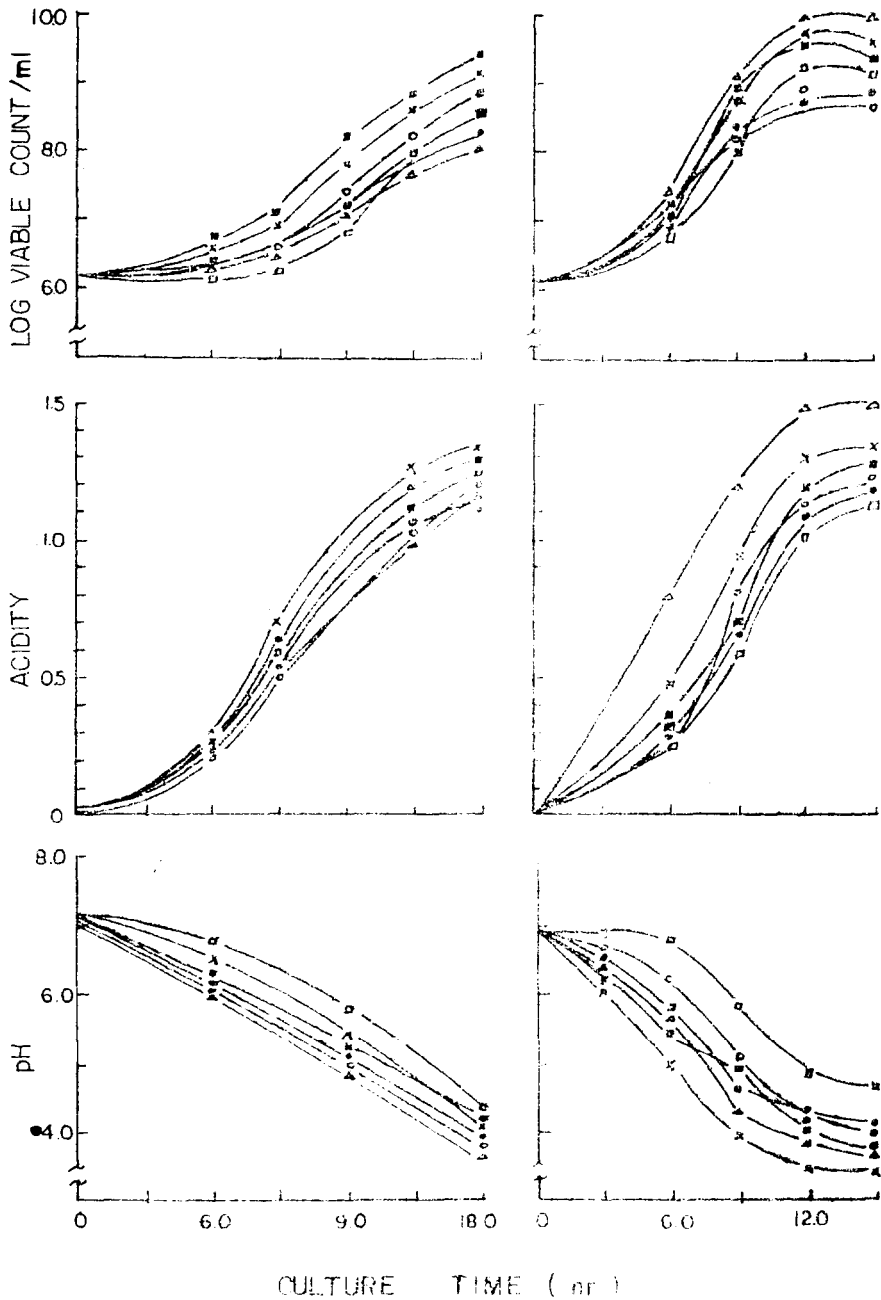


Fig. 1. Effect of various phosphates on viable count of bacteria, pH and acidity in single-culture of *L. bulgaricus* (left columns) and mixed culture of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* (right columns).

Control, ●-●; MSP, ×-×; DSP, △-△; TSP, □-□; α-PG, ○-○; STPP, ■-■

분명하지 않다.

산도의 변화는 균수의 성장과 거의 동일한 결과를 보였다. 즉 균수의 증가에 따라 산도도 같이 증가하였으며 인산 염이 산도에 미치는 영향도 균수 증가에 미치는 영향과 비슷하였다. 유산 발효 과정에서 유산균의 대사 활동은 유산균의 증가와 비례하며<sup>(6)</sup> 유당의 발효에 의해 생성된 유산으로 인하여 발효유의 산도는 증가하게 된다.

발효유의 pH는 산도가 증가됨에 따라 감소된다<sup>(6)</sup>. 인산 염을 첨가한 경우 인산 염의 종류에 따라 발효유의 pH는 대조구(pH 3.9)에 비하여 다소 차이가 있었으나 대체로 3.7~4.3의 범위로서 큰 차이는 없었다.

#### 인산염이 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 혼합 배양에 미치는 영향

*L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 혼합 균주를 인산 염을 첨가한 skim milk에 접종하여 배양하면서 생균수 pH 및 산도의 변화를 본 결과는 Fig. 1(right)과 같다. *L. bulgaricus* 단독 배양에 비하여 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 혼합 배양은 발효 속도에 현저한 차이를 나타내었으며 혼합 배양 9시간 이후에는 생균수가 단독 배양보다 거의 100배 가까이 많았다. 또한 혼합 배양의 경우 배양 12시간 이후에 steady state에 도달한 반면 단독 배양시에는 15~18시간 후에 steady state에 도달하였다.

인산 염이 혼합 균주의 성장 촉진에 미치는 효과는 DSP, MSP, STPP, TSP,  $\alpha$ -PG 순으로 이것은 단독 배양의 STPP, MSP, TSP,  $\alpha$ -PG의 순서와는 다소 다른 양상을 보였다. 특히 단독 배양시 유산균의 성장 촉진에 효과가 없었던 DSP가 혼합 배양시 효과가 가장 좋았으며 다른 인산 염의 경우는 대체로 차이가 없었다.

앞에서 언급한 바와 같이 인산 염의 종류에 따라 유산균의 증식 속도가 다른 이유는 알려져 있지 않으나 *L. bulgaricus* 단독 배양 및 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus* 혼합 배양에 미치는 영향은 인산 염의 종류에 따라 다른 것은 인산 염이 유산균의 증식에 미치는 영향이 유산균의 종류에 따라 다른 것으로 판단된다. *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus* 혼합 배양의 경우 *L. bulgaricus*는 casein으로부터 여러가지 아미노산(특히 valine)을 유리하므로서 *S. thermophilus*의 성장을 촉진한다고 알려져 있다<sup>(6)</sup>. 이러한 아미노산의 촉진 효과에 의하여 배양 초기에 *Streptococci*는 *Lactobacilli* 보다 훨씬 빠른 속도로 증식하나 이후에는 생성된 유산에 의하여 생장해를 받아 그 성장 속도가 감소하게 된다<sup>(6)</sup>.

따라서 *L. bulgaricus* 단독 배양시보다 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus* 혼합 배양시 인산염의 효과는 더욱 감할 것으로 보인다. 인산 염이 유산균의 증식 촉진에 미치는 효과가 분자량(즉  $P_2O_5$ 의 함량), 인산 염의 구조 또는 인산염의 완충작용에 의한 것인지는 앞으로 더 연구되어야 할 과제라 하겠다.

혼합 균주를 이용한 배양액의 산도는 대조구나 인산 염 첨가구나 큰 차이없이 균의 증식과 비례해서 배양후 12시간에 산도 1.1~1.3에 도달하고 이후에는 증가되지 않았다. 이와 같이 산도가 증가하지 않는 것은 배지중의 당류가 소모되고 생성된 산에 의하여 유산균의 번식이 저해받기 때문으로 보인다. 인산염이 산도 증가에 미치는 영향은 균의 증식과 대체로 같은 경향을 보였다.

혼합 균주를 사용하여 배양한 배양액의 pH는 단독 배양의 경우와 마찬가지로 배양의 산도가 증가할수록 급격히 감소하였다(Fig. 1). TSP를 제외한 인산 염 첨가구의 경우 배양액의 pH는 모두 대조구보다 다소 낮았는데 이는 인산 염에 의한 유산의 생산량과 관계가 있는 듯 하다.

발효유의 저장 증 변화

*L. bulgaricus* 단독 및 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus* 혼합 균주를 사용하여 제조된 발효유를 25°C에서

Table 1. Effect of various phosphates on viable count of bacteria in milks fermented with single strain of *L. bulgaricus* and mixed-strain of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* during storage at 25°C

Storage time (days)	Viable count ( $\times 10^8$ ) of											
	Single-culture						Mixed-culture					
	Control	MSP	DSP	TSP	$\alpha$ -PG	STPP	Control	MSP	DSP	TSP	$\alpha$ -PG	STPP
0	3.45	25.10	1.95	10.50	7.20	56.10	8.51	55.20	97.50	10.30	7.02	35.10
2	0.13	1.25	0.79	2.52	0.80	6.11	5.50	7.21	7.50	9.25	2.50	8.25
4	0.009	0.10	0.50	0.63	0.07	0.88	0.12	1.25	0.62	3.53	0.90	0.97
7	0.005	0.009	0.02	0.08	0.03	0.06	0.04	0.50	0.05	0.88	0.68	0.65

7일간 저장하면서 생균 수의 변화를 본 결과는 Table 1과 같다. 대조구(단독 배양)의 경우 저장 일수 2일만에 초기 균수의 약 94%가 감소하였다. 그러나 DSP 첨가군의 경우에는 약 60%의 감소를 보였다. 대체로 인산염을 첨가하는 경우 저장 일수 4일까지는 대조구보다 높은 균수를 보였으며 저장 일수 7일까지도 MSP를 제외한 하던 대조구보다 다소 높은 균수를 보였다.

혼합 배양한 경우 대조구의 균수는 저장 2일동안 34%의 균수 감소를 보였으며 이후 급속한 감소 현상을 보여 저장 4일 후에는 생균수가 초기 균수의 1.5%에 불과하였다. 그러나 인산염을 첨가한 경우에는 대체로 저장 일수 7일까지 대조구보다 높은 균수를 보였다.

발효유의 저장중 균수 감소에 미치는 인산염의 효과는 단독 배양의 경우 DSP, TSP, STPP, α-PG, MSP의 순이었고, 혼합 배양의 경우에는 TSP, α-PG, STPP, DSP, MSP의 순이었다(Table 1)..

희석형 요구르트의 산미 증진을 위하여 널리 쓰이는 구연산과 Na-ultrametaphosphate(Sporix)가 혼합 균주를 이용하여 제조된 발효유의 저장 중 균수 감소에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 대조구의 경우 저장 2일만에 약 86%의 균수가 감소하였고 4일 후에는 약 98%가 감소하였다. 구연산 첨가구는 저장 2일 후에 약 97%의 균수가 감소하여 대조구보다 낮은 수치를 보였다. 그러나 Sporix 첨가구는 저장 2일 후에 80%의 균수가

**Table 2. Effects of Na-ultrametaphosphate(Sporix) and citric acid on viable count of bacteria in milks fermented with mixed-strain of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus***

Storage time (days)	Viable count (×10 <sup>6</sup> )		
	Control	Sporix	Citric acid
0	10.80	10.80	10.80
2	1.68	2.16	0.35
4	0.14	0.63	0.08
7	0.06	0.13	0.008

감소하고 4일 후에는 약 86%의 균수가 감소하였으나 대조구나 구연산 첨가구에 비하여 높은 균수를 보였다.

**인산 염이 발효유의 침전에 미치는 영향**

희석형 요구르트는 유통 기간 중 외부 조건에 따라서 침전물의 생성등의 문제가 있다. 이러한 희석형 요구르트의 침전에 미치는 인산염의 영향을 알아보기 위하여 15 ml의 원심 분리관에 혼합 균주를 사용하여 제조된 발효유를 2배 희석한액(10 ml)을 넣고 원심 침강 또는

**Table 3. Effect of various phosphates on the curd sedimentation in milks fermented with mixed-strain of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus***

	Centrifuged at		Stored at 5°C for		
	500rpm	1000 rpm	2 days	4 days	7 days
Control	8.0	6.5	7.2	6.0	5.5
MSP	9.5	8.6	9.0	8.5	5.9
DSP	8.0	6.8	7.4	6.5	5.8
TSP	8.2	7.3	7.0	5.5	4.7
α-PG	9.0	8.0	8.2	7.2	6.0
STPP	8.0	6.5	7.5	6.3	5.2

Sedimentation value represents the height(expressed as ml) of curd sedimentation in fermented milk (10 ml) after centrifugation or during storage.

자연 방치후 침전 정도를 본 결과는 Table 3과 같다. 표에서 보는 바와 같이 발효유의 안정성에 가장 효과가 큰 인산염은 MSP이며 다음으로 α-PG이었다. TSP 및 DSP도 다소 안정 효과가 있었으며 STPP는 안정효과를 인정할 수 없었다.

희석형 발효유는 straight type 보다 침전이 더 잘 일어나는 데 이러한 침전 방지제로 propylene glycol alginate(PGA)가 흔히 쓰인다(4). PGA의 효과는 PGA 단백질 결합체에 다시 PGA가 흡착되어 결합체에 부의 하전으로 포위하여 전기적으로 2중층을 형성하기 때문으로 알려져 있다(11).

Table 3의 결과로 부터 인산 염은 희석형 발효유의 안정성에 효과가 있었다. 발효유의 단백질 수화는 발효유의 산도 및 염에 의하여 영향을 받는다고 알려져 있다(6). 즉 발효유의 산도 즉 pH가 4.6 이하에서는 단백질의 수화가 향상되며 우유의 염의 함량 특히 calcium 및 phosphate의 균형은 유침 분리에 중요한 역할을 한다. 본 실험에서 제조된 발효유의 pH는 4.6이하이었으므로 (Fig. 1), 인산 염이 발효유의 안정성에 미치는 영향은 phosphate의 함량에 기인하는 듯하다.

이상의 결과로 보아 *L. bulgaricus* 단독 배양의 경우 MSP와 STPP가 유산균의 증식 및 산도 측면에서 가장 효과적이었고, *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*의 혼합 배양의 경우에는 DSP와 MSP가 가장 효과적이었다. 인산 염을 첨가한 경우 발효유의 저장 중 균수의 감소는 대조구보다 훨씬 작았으나, 단독 배양의 경우 특히 DSP와 TSP가 효과적이었고 혼합 배양의 경우에는 TSP와 α-PG가 효과적이었다. 혼합 균주를 사용하여 제조된 발효유의 저장 중 안정성에 미치는 인산 염의 효과는 MSP가 가장 컸다.

인산 염의 종류에 따라 인산염이 유산균의 성장 및 발효유의 안정성에 미치는 영향이 다른 이유는 알려져 있지 않다. 그러나 인산 염은 유산균의 성장 영양소로서 뿐만 아니라 발효유의 물리적 성질(특히 consistency)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으므로<sup>(6)</sup> 앞으로 이에 대한 깊은 연구가 바람직하다고 보겠다.

### 요 약

인산 염(monosodium phosphate, disodium phosphate, trisodium phosphate,  $\alpha$ -polygel 및 sodium tripolyphosphate)이 *Lactobacillus bulgaricus* 단독 배양 및 *Lactobacillus bulgaricus*와 *Streptococcus thermophilus*의 혼합 배양(혼합비 1:1)에 미치는 영향을 검토하였다. 인산 염은 유산균의 성장을 촉진하였으며 특히 단독 배양의 경우 MSP와 STPP가, 혼합 배양의 경우 MSP와 DSP가 가장 효과적이었다. 산도도 유산균의 증식과 동일한 결과를 보였다. 배양액을 실온에서 저장하는 동안 생균 수의 감소는 인산 염 처리구가 대조구에 비하여 완만하였으며 단독 배양시 특히 DSP와 TSP가 효과적이었다고 혼합 배양의 경우 TSP와  $\alpha$ -PG가 가장 효과적이었다. 혼합 균주를 사용하여 제조된 발효유의 저장 중 안정성은 인산염 처리구가 대조구보다 좋았으며 특히 MSP가 가장 효과적이었다.

### 문 헌

- 1) 이용욱, 이원창 : 한국 환경 위생학 회지, 3(1), 1 (1976)
- 2) Kim, H. S. and Chun, J. K.: *J. Nuclear sciences Korea*, 6, 112 (1966)
- 3) Perry, K.D. and Sharpe, M.E.: *J. Dairy Res.*, 27, 267 (1960)
- 4) 정동효 : 발효와 미생물 공학, 제10장 선진 문화사 (1976)
- 5) 유태종 : 식품 미생물학, p. 194. 문운당 (1977).
- 6) Rasic, J. L. and Kurmann, J. A.: *Yoghurt*, Chap. 1, Technical Dairy Publishing House, Denmark (1978)
- 7) Ellinger, R. H.: *Handbook of Food Additives*, ed. by Furia, T. E. Chap. 15. Chemical Rubber Co., Ltd. (1972)
- 8) deMan, J. M. and Melnychyn, P.: *Phosphates in Food Processing*, AVI Publishing Co. (1971)
- 9) Hamdan, I. Y.: *J. Milk Food Technol.*, 34, 307 (1971)
- 10) Kim, S. U. and Park, M. Y.: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 5, 171 (1977)
- 11) 清田 夫 : 食品 衛生 研究, 15 (2), 25 (1965)