

## 乳清과 豆乳 混合液에서의 乳酸菌 生育特性

金正煥 · 李炯周

서울대학교 食品工學科

## Growth Characteristics of Lactic Acid Bacteria in Whey-Soy Milk Mixtures.

Jeong-Hwan Kim and Hyong-Joo Lee

Department of Food Science & Technology, Seoul National University, Suwon

### Abstract

Growth characteristics of six lactic acid bacteria in whey-soy milk mixtures were investigated to obtain basic informations for processing cheese-like product by coprecipitation of whey and soy proteins. *Streptococcus cremoris* and *Lactobacillus acidophilus* produced more acid than other lactic acid bacteria both in whey-soy milk mixture and in soy milk. Lactic acid fermentation was accelerated in whey-soy milk mixture than in soy milk with all the lactic acid bacteria, and specially with *S. lactis* and *S. cremoris* in great extent. The number of viable cell of 1:1 mixed culture of *S. lactis* and *S. cremoris* in whey soy milk mixture was about 10 times than in soymilk. It was mainly the effect of lactose in the whey that increased the acid production by lactic acid bacteria in whey-soy milk mixture although the degree of acceleration depended on the ability of microorganism to use carbohydrates. The optimum amount of lactose added to soy milk to accelerate the acid production was 0.8g/100ml soy milk.

### 序 論

豆乳는 乳酸菌의 生育에 적합한 배지로 알려져 있으며 최근 두유를 원료로 한 醱酵食品 제조에 대한 관심이 높아지면서 두유에서의 유산균의 생육에 관한 많은 연구가 있었다. Gehrke와 Weiser<sup>1)</sup>는 *Streptococcus lactis*, *S. citrovorus*, *S. paracitrovorus* 등을 두유에서 배양할 때 우유배지에서 50% 정도로 酸을 생성함을 밝혔으며 Hang과 Jackson<sup>2)</sup>은 *S. thermophilus* 가 단시간내에 충분한 酸을 생성하여 두유를 응고시키는 것을 확인하고 이를 starter로하여 大豆 치즈를 제조하였다. Yamanaka, Matsouka 등<sup>3)</sup>도 *S. thermophilus* 가 두유에서의 酸생성에 적합한 균주임을 확인하였다. Angeles와 Marth<sup>4)</sup>는 *Lactobacillus delbrueckii*, *L. pentosus*, *L. dextranicum* 등이 두유에서 많은 酸을 생성하는 것을 밝혔으며 또한 두유에 glucose나 lactose 등을 첨가시 *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetylactis*, *L. hel-*

*veticus* 등에 의한 산생성이 촉진됨을 밝혔다. Hessel-tine과 Wang<sup>5)</sup>은 *Lactobacillus acidophilus*를 사용하여 大豆를 원료로한 발효식품을 제조하였으며 Mital과 Steinkravs<sup>6)</sup>는 탈지 두유보다는 두유가 유산균의 산생성에 적합함을 보고하였다. 최근에는 Pinthong 등<sup>7)</sup>이 *L. acidophilus*를 사용해서 두유를 원료로 한 yogurt를 제조한 바 있고 이때 두유에 glucose 1%, yeast extract 0.1%를 첨가하는 것이 산생성에 효과적임을 밝힌 바 있다. 본 연구에서는 乳清과 豆乳의 共同沈澱物로부터 치즈를 발효하기 위한 기초실험으로서 乳清-豆乳 混合液에서의 유산균의 生育특성을 조사하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

### 材料 및 方法

#### 材料 및 試藥

大豆는 시중에서 1日 1 품종을 구입하여 사용하였으며

乳清은 치즈 제조업체(서울우유 신갈공장)에서 얻은甘性乳清(sweet whey)을 4℃ 이하에서 보관하여 사용하였는데 유청의 pH는 최초의 5.9에서 저장중 약 4.5까지 떨어지므로 두유와 혼합전 두유의 pH인 6.6~6.7로 조정하였다. 각종 시약은 G. R. 또는 E. P. 등급의 것을 정제없이 사용하였다.

### 豆乳의 製造

불순물이 없게 정선한 콩 500g을 수도물로 2회 세척하여 증류수 1l를 가하고 실온에서 7~8시간 침지한 후 belender로 마쇄하였다. 마쇄시 증류수 4l를 가해주어 총 가수량이 원료의 10배가 되게한 다음 100℃에서 15분간 증자시키고 여과하여 두유 3.5l를 얻었다.

### 乳酸菌株

실험에 사용된 유산균들은 모두 C. Hansen lab. (Denmark) 제품으로 *Streptococcus lactis* (CHR. CHI), *Streptococcus* (CHR), *Streptococcus thermophilus* (CHR), *Lactobacillus acidophilus* (CH-27), *Lactobacillus bulgaricus* (CHR. CH 27) *Lactobacillus helveticus* (CH-1)의 6종을 사용하였다. 냉동보관 중인 각 균주를 멸균우유배지 100ml에 백금으로 접종하고 *S. lactis*와 *S. cremoris*는 30℃에서 나머지는 37℃에서 24시간 배양후 멸균우유배지에 3%접종하여 24시간 배양시킨 것을 실험에 사용하였다.

### 乳清-豆乳 混合液

유청의 pH를 두유와 같이 6.6~6.7이 되게 조정한 후 유청:두유의 비율이 1:1, 1:2, 1:3(v/v)이 되게 섞은 混合液 100ml를 121℃에서 15분간 멸균 처리 후 유산균 접종배지로 사용하였다.

### pH와 적정산도 측정

유청-두유 혼합액 또는 두유에서 유산균 배양시 일정 시간마다 pH와 적정산도를 측정하였다. pH는 pH미터로 측정하였고 적정산도는 배양액 일부를 취하여 0.1% 페놀프탈레인용 지시약으로 가한 후 0.1N NaOH로 적정하여 계산하였다.

### 生菌數 測定

배양액 1ml를 멸균수 9ml가 든 시험관에 옮기고 Vortex mixer로 섞은 후 10배로 희석된 용액 1ml를 다시 멸균수 9ml에 옮겨서 순차적으로 10배씩 희석된 시료를 얻은 후 標準平板培養法<sup>(1)</sup>에 의해서 생균수를 측정하였으며 생육배지로는 de Man, Rogosa and Sh-

arpe Agar배지에<sup>(1)</sup> sodium azid가 0.01%첨가된 것을 121℃에서 15분간 살균 후 사용하였다. 생균수는 30℃에서 48~72시간 배양한 후 colony counter로 측정하고 회석배율을 곱하여 나타내었다.

### 乳清 및 豆乳의 성분 分析

유청과 두유의 질소함량은 Micro Kjeldahl法<sup>(1)</sup>으로 측정하였으며 질소계수로 大豆 단백질 6.25유청 단백질은 6.38을 사용하였다. 수분함량은 Mojonnier방법<sup>(1)</sup>으로 측정하였고 粗脂肪은 콜로르모름-메타놀 추출법<sup>(1)</sup>으로 灰分과 糖의 함량은 AOAC방법<sup>(1)</sup>에 준하였다.

### 結果 및 考察

#### 乳清-豆乳 混合液에서의 酸生成

유청과 두유의 일반성분을 분석한 결과는 본 실험실에서 얻어진 전결과<sup>(1)</sup>와 거의 같았다. 유청-두유 혼합액에서 각 균주의 산 생성을 조사하기 위해 유청의 pH를 두유와 같게 조정한 후 유청:두유의 비율이 1:2가 되게 섞은 혼합액 100ml를 멸균처리 후 각 균주들을 3% 접종하여 *S. lactis*와 *S. cremoris*는 30℃에서, 나머지는 37℃에서 36시간 배양하면서 pH변화를 측정하고, 두유 100ml에도 같은 양의 균주를 접종하여 비교한 결과를 그림 1에 나타내었다. *S. lactis*는 36시간 배양 후 배지의 pH를 최초 6.4에서 4.3까지 떨어뜨렸으며 초기 12시간 이내에 최종 pH까지 도달하였다. 두유 배지에서 배양시 pH강하 정도는 완만하여 36시간 배양 후 pH 4.8를 나타내었다. *S. cremoris*의 경우도 *S. lactis*와 유사하나 16시간 이후 두유배지에서의 산생성이 *S. lactis*보다 다소 많은 편으로 나타나 배양 후 pH 4.5에 이르렀다. *S. thermophilus*는 두유에서의 산생성이 타 유산균에 비해 많은 것으로 알려져 있으나,<sup>(2)</sup> 본 실험에서는 확인되지 않았다. 이는 실험에 사용된 균주의 차이에 기인하는 것이라 생각된다. *L. bulgaricus*는 두유중의 少糖類를 이용하지 못해서 두유에서는 산을 생성치 못한다는 보고가 있으나,<sup>(1)</sup> 본 실험에 사용된 菌株는 36시간 배양 후 pH를 4.8까지 떨어뜨려 상당량의 산을 생성하였다. *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*는 배양 20시간 까지는 혼합액과 두유배지의 pH차가 근소하거나 *S. thermophilus*의 경우 오히려 두유배지의 pH가 낮았으나 20시간 이후에는 혼합배지의 pH가 더 빨리 저하되는 것으로 나타났는데 이것은 유청중의 성분에 의해 酸生成이 促進되나 이를 유산균이 이용하는데 시간이 필요한 것으로 추측된다. *L. acidophilus*는 두유에서의 酸生成이 우수한 균주로 보고되고 있는

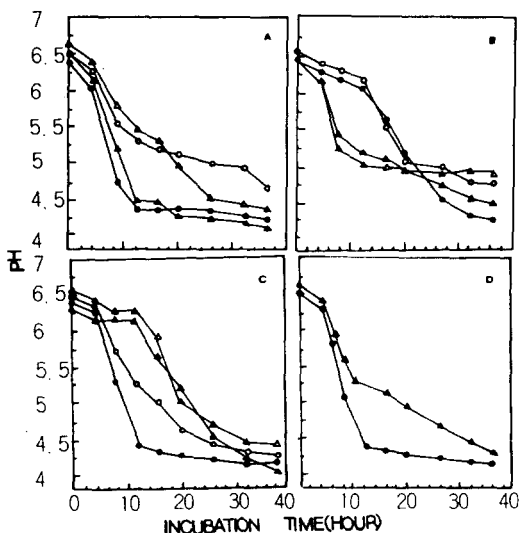


Fig. 1. pH changes of soy milk (SM) and whey-soy milk 1:2 mixtures (MX) inoculated with various lactic acid bacteria

- A)  $\triangle$ - $\triangle$  *S. cremoris* in SM
- $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$  *S. cremoris* in MX
- $\circ$ - $\circ$  *S. lactis* in SM
- $\bullet$ - $\bullet$  *S. lactis* in MX
- B)  $\circ$ - $\circ$  *L. bulgaricus* in SM
- $\bullet$ - $\bullet$  *L. bulgaricus* in MX
- $\triangle$ - $\triangle$  *S. thermophilus* in SM
- $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$  *S. thermophilus* in MX
- C)  $\triangle$ - $\triangle$  *L. helveticus* in SM
- $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$  *L. helveticus* in MX
- $\circ$ - $\circ$  *L. acidophilus* in SM
- $\bullet$ - $\bullet$  *L. acidophilus* in MX
- D)  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$  1:1 mixed culture of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* in MX
- $\bullet$ - $\bullet$  1:1 mixed culture of *S. lactis* and *S. cremoris* in MX

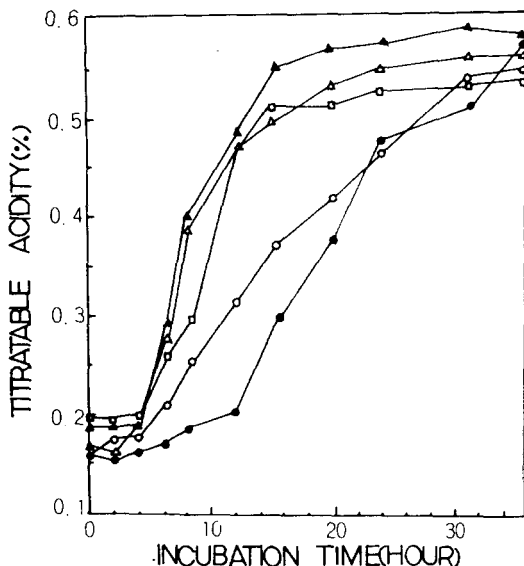


Fig. 2. Changes of titratable acidity in whey-soy (1:2) mixtures inoculated with lactic acid bacteria

- $\blacktriangle$ - $\bullet$  : *S. lactis*+*S. cremoris*,  $\bullet$ - $\bullet$  : *L. bulgaricus*,
- $\circ$ - $\circ$  : *L. bulgaricus*+*S. thermophilus*,
- $\triangle$ - $\triangle$  : *S. cremoris*,  $\square$ - $\square$  : *S. lactis*.

데<sup>13)</sup> 본 실험에서도 같은 경향이 나타났다. 즉 혼합액과 두유배지 각각에서 급격한 pH강하를 보여주고 있으며 38시간 배양 후의 pH는 각기 4.2, 4.3에 이르러 *S. cremoris*와 비슷한 값을 나타내고 있다. *L. acidophilus*와 *L. helveticus* 역시 1:2혼합배지에서의 酸生成이 두유배지에서 보다 많았으나 그 차이는 *S. lactis*나 *S. cremoris*의 경우보다 작았고, *L. helveticus*의 경우 배양초기에 특히 차이가 작았다. *S. lactis*와 *S. cremoris*의 1:1 혼합배양시 pH 강하정도는 단독 배양시 pH변화들의 중간치를 나타내었고, *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 1:1 혼합배양에서는 *S. thermophilus* 단독 배양시와 유사하였다.

유산균의 단독 또는 혼합배양시 유청:두유 1:2 혼합배지에서의 적정산도(TA)의 변화는 그림 2에 나타내었다. 시간에 따른 적정산도의 증가 경향은 대체로 pH변화와 일치하며 *S. lactis*와 *S. cremoris*의 1:1 혼합배양시 36시간 후에 산도는 0.59에 이르렀다. 이같이 pH 및 TA의 측정결과 유산균의 산생성이 두유에서보다 유청-두유혼합액에서 촉진됨을 알 수 있었고 특히 *S. lactis*와 *S. cremoris*의 경우 그 효과가 현저함을 알 수 있었다.

乳清-豆乳 혼합비율에 따른 산생성

유청과 두유의 혼합비율을 달리한 배지에서의 *S. lactis*와 *S. cremoris* 1:1 혼합배양에 의한 pH 변화는 그림 3에 나타내었다. 유청과 두유의 혼합비율이 1:1, 1:2, 1:3 일때 유산균의 산생성 정도에는 별 차이가

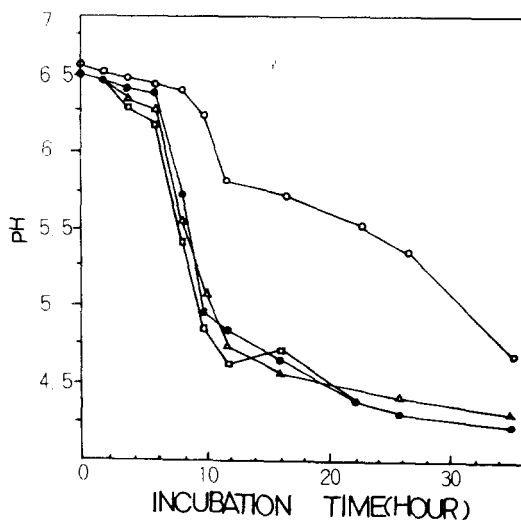


Fig. 3. pH changes in whey-soymilk mixtures inoculated with 1:1 mixed culture of *S. lactis* and *S. cremoris*

- $\circ$ - $\circ$  : soy milk,  $\square$ - $\square$  : 1:1 mixture
- $\triangle$ - $\triangle$  : 1:2 mixture,  $\bullet$ - $\bullet$  : 1:3 mixture

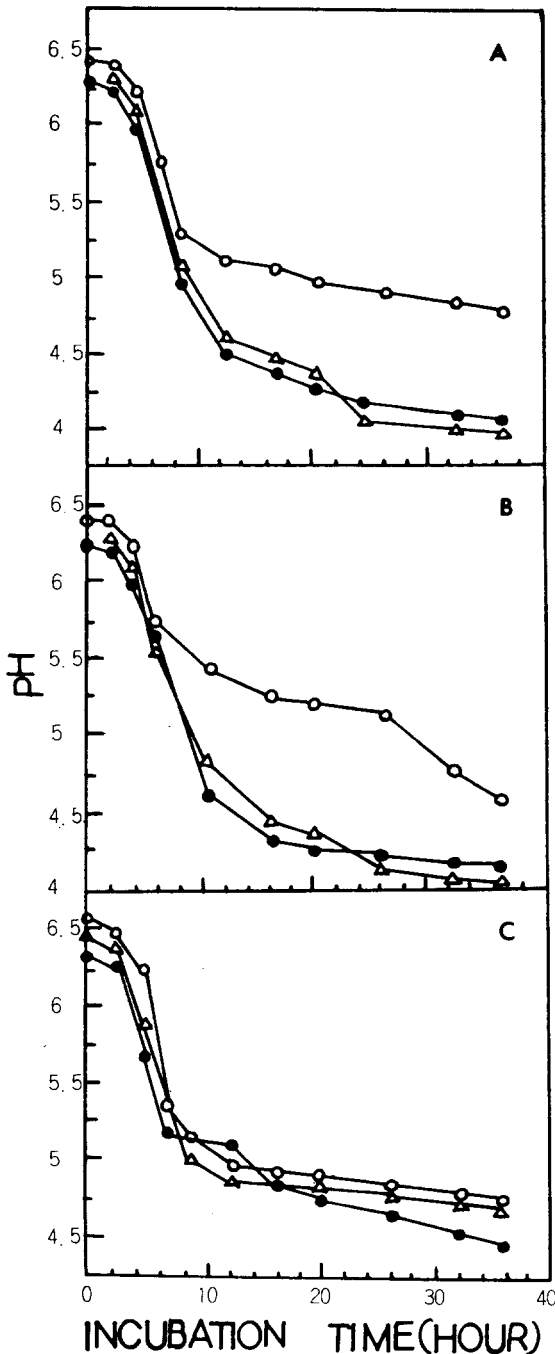


Fig. 4. Effect of lactose on acid production in various mixtures of whey, soymilk, and lactose A) *S. lactis*, B) *S. cremoris*, C) *S. thermophilus* ○—○; in soymilk, △—△; in soymilk fortified with 1.6g lactose, ●—●; in whey-soy (1:2) mixture

없으나 두유배지의 경우와는 모두 다 큰 차이를 나타내었다. 여기에서 유산균의 산생성을 촉진시키는 데는 소량의 유청만을 가해주어도 효과가 큰 것을 알 수 있었다.

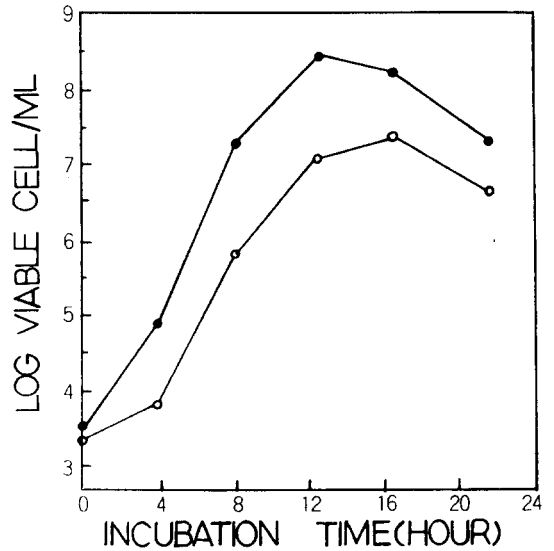


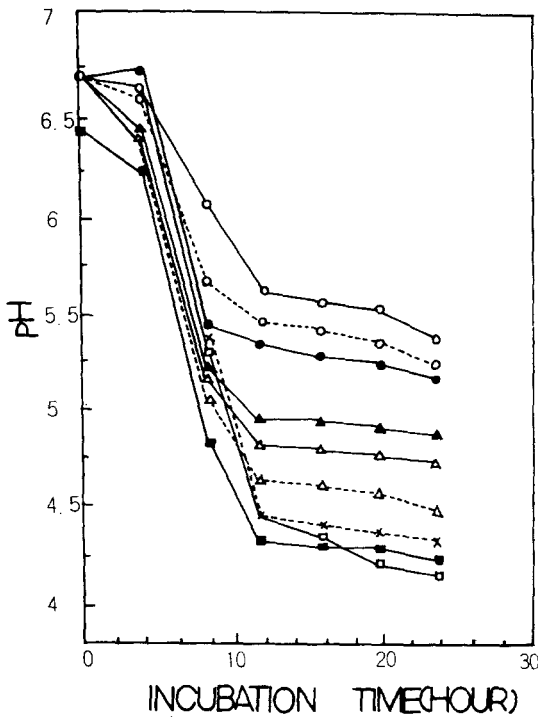
Fig. 5. Changes of viable cell count of 1:1 mixed culture of *S. lactis* and *S. cremoris* inoculated in soymilk and 1:2 mixture of whey and soymilk

○—○: in soy milk, ●—●: in 1:2 mixture

乳清에 의한 유산균 생육촉진

유청을 두유에 첨가시 유산균에 의한 산생성이 촉진되는 이유는 유청중에 존재하는 성분에 의해 유산균의 생육이 촉진되고 그 결과로 산생성이 촉진되는 것이라 생각되었다. Angeles 등<sup>(14)</sup>은 두유에 glucose나 lactose를 첨가시 *S. lactis*, *S. cremoris*에 의한 산생성이 촉진됨을 보고한 바 있으며, 또한 두유에 부분적으로 분해된 단백질을 첨가하면 *S. thermophilus*의 산생성이 촉진되었음을 보고하였다. 유청중 固形物의 상당량이 乳糖이고 유청 단백질도 상당량 들어있는 점을 고려할 때, 유청중의 유당 또는 유청단백질 분해물에 의해 유산균의 산생성이 촉진되었다고 우선 볼 수 있다.

유당에 의한 효과를 알아보기 위해 두유 100ml 당 유당 1.6g 씩을 첨가하여서 유청:두유 1:2 혼합배지에서와 같은 유당함량을 갖게한 뒤, 121°C에서 15분간 멸균처리하여 식힌 후 유산균을 3% 접종하여 앞에서와 동일한 조건에서 36시간 배양시 pH변화를 측정한 결과는 그림 4에 나타내었다. *S. lactis*와 *S. cremoris*의 경우 유당을 첨가해 준 배지와 유청:두유 1:2 혼합배지에서의 pH변화는 큰 차이가 없는 것으로 나타나 이들 균주의 경우에는 유청중의 유당에 의해 산생성이 촉진되었다고 생각된다. 그러나 *S. thermophilus*의 경우에는 유당첨가가 pH변화에 큰 영향을 주지 못한 것으로 나타났다. 한편 Micro Kjeldahl법에 의해서 두유와 1:2 혼합액의 12% TCA에 가용성인 질소함량을 측정된 결과 각기 0.042% 0.045%로 나타나 큰 차이가 없었다. 이상의 결과에서 주로 유청중의 유당에 의해서 유산균



**Fig. 6. Effect of added lactose on acid production by 1:1 mixed culture of *S. lactis* and *S. cremoris* inoculated in soy milk**  
 ○—○: no addition, ○—○: 0.05g/100ml,  
 ●—●: 0.1g, ▲—▲: 0.2g, △—△: 0.25g,  
 △—△: 0.3g, ×—×: 0.4g, □—□: 0.8g,  
 ■—■: 1:2 mixture

의 산생성이 촉진되었고 촉진되는 정도는 菌株에 따라 차이가 있다는 결론을 내릴 수 있었다. 원래 유청중에는 치즈 스타터로 첨가된 유산균의 여러 대사물이 포함되어 있고 이것이 나중 실험용으로 첨가된 乳酸菌의 생장촉진물로 작용했을 가능성도 있어 유청-두유 혼합액에서의 유산균 생육 촉진에 대해서는 더 많은 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

*S. lactis*와 *S. cremoris* 1:1 혼합배양액을 각기 두유배지와 1:2 혼합배지에 3% 접종하고 30°C에서 24시간 배양중 生菌數 변화를 측정한 결과는 그림 5와 같다. 접종시 두가지 배지에서의 균 농도는 거의 같았으나 배양이 진행됨에 따라 유청-두유 혼합액에서의 생균수가 두유에서의 그것에 비해 약 10배 정도 됨을 볼 수 있고 이에 따라 산생성이 촉진됨을 알 수 있었다. 이 같은 유청에 의한 산생성 촉진효과는 두유를 원료로 한 醱酵食品제조에 이용될 수 있으리라 생각된다. 그 예로 두유를 原料로한 요구르트 제조시 산생성을 촉진키 위해 glucose 등을 첨가하는 경우가 있는데 이 목적으로 유청을 사용하는 방법이 될 수 있을 것이다.

**유당의 첨가량에 따른 산 생성**

두유 100ml당 유당의 첨가량을 달리한 배지에 *S. lactis*와 *S. cremoris*의 1:1 혼합배양을 3% 접종했을 때, 배양시간에 따른 pH변화를 측정된 결과는 그림 6에 나타나 있다. 유당의 첨가량을 높일수록 비례하여 산생성도 증가하나 0.8g 이상 첨가시에는 첨가량을 늘려도 효과가 적으므로 두유 100ml당 0.8g의 유당을 첨가하는 것이 산생성을 촉진시키는데 적당하리라 생각된다.

**要 約**

乳清과 豆乳의 共同沈澱에 의해 치즈를 제조하기 위한 기초실험으로서 유청-두유 혼합액에서 6종의 유산균들의 생육특성을 조사하였다. *S. cremoris*와 *L. acidophilus*가 두유와 유청-두유 혼합액에서 다 같이 많은 산을 생성하였다. 그러나 모든 유산균들이 두유에서 보다는 유청-두유 혼합액에서 더 많은 산을 생성하였고 이것은 특히 *S. lactis*와 *S. cremoris*에서 현저하였다. *S. lactis*와 *S. cremoris* 혼합균주의 생균수는 두유에서보다 유청-두유혼합액에서 약10배정도 많았다. 유청-두유 혼합액에서 산생성이 증가되는 것은 유청중에 존재하는 유당의 효과에 주로 기인한 것으로 나타났다. 두유에서의 산생성을 촉진키 위해 첨가하는 유당의 적정량은 두유 100ml당 0.8g으로 밝혀졌다.

**文 獻**

- Gehrke, C. and Weiser, H. H. : *J. Dairy Sci.*, 31, 213 (1948)
- Hang, Y. D. and Jackson, H. : *Food Technol.*, 21, 97 (1967)
- 松岡博厚, 笹子謙治, 関口正勝 : 日本食品工業学会誌, 15, 103 (1968)
- Angeles, A. G. and Marth, E. H. : *J. Milk Food Technol.*, 34, 30 (1971)
- Hesseltine, C. W., Smith, M. and Wang, H. L. : *Develop. Appl. Microbiol.*, 8, 179 (1967)
- Mital, B. K. and Steinkravs, K. H. : *J. Food Sci.*, 39, 1018 (1974)
- Pinthong, R., Macrae, R. and Rothweell, J. : *J. Food Technol.*, 15, 647 (1980)
- Marth, E. H. (ed) : *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*, 14th ed. American Public Health Association, Washington, D. C. (1980)

9. Harrigan, W. F. and Mccance, M. E. : *Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology*, Academic Press, New York (1976)
10. A. O. A. C. : *Official Methods of Analysis*, 13th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C. (1980)
11. Atherton, H. V. and Newlander, J. A. : *Chemistry and Testing of Dairy Products*, Avi, Westport, CT (1977)
12. Osborne, O. R. and Voogt, P. : *The Analysis of Nutrients in Foods*, Academic Press, London (1981)
13. 김오섭, 김창한 : 한국미생물학회지, 7, 205 (1979)
14. 魏在峻, 李炯周 : 한국농화학회지, 26, 199 (1983)

---

(1984년 5월 10일 접수)