KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 19, No. 3 (1987)

*Lactobacillus bulgaricus*와 *Kluyveromyces fragilis*의 혼합배양에 의한 두유의 젖산발효

유주현 · 류인덕* · 박정길 · 공인수

연세대학교 공과대학 식품공학과, *충주공업전문대학 식품공업과

Lactic Acid Fermentation of Soymilk by Mixed Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Kluyveromyces fragilis*

Ju Hyun Yu, In Deok Lew*, Chung Kil Park and In Soo Kong

Department of Food Engineering, College of Engineering, Yonsei University, Seoul

**Department of Food Technology, Chung-Ju National Technical College, Chung-Ju.*

Abstract

Lactobacillus bulgaricus (KFCC 35463) and *Kluyveromyces fragilis* (KFCC 35458) were inoculated together in soymilk, and then growth characteristics, acid production and the conditions suitable for acid production were investigated. *L. bulgaricus* produced more acid and the rate of acid production was more rapid when this organism was incubated with *K. fragilis* in soymilk than when it was incubated singly. Studying the conditions suitable for acid production in soymilk, optimum acid production by the mixed cultures of *L. bulgaricus* and *K. fragilis* was achieved with a temperature of 35~37°C, a 1:2 (O.D.660) ratio of *L. bulgaricus* to *K. fragilis* at inoculum, a 1.0% level of sucrose fortification or a 1.5% level of skim milk powder fortification and a culture time of 24hr. Under these conditions the amount of acid produced by the single culture of *L. bulgaricus* and the mixed cultures of *L. bulgaricus* and *K. fragilis* were 0.14% and 0.41%, respectively, in soymilk, 0.13% and 0.70%, respectively, in soymilk fortified with 1.0% level of sucrose. These indicate that the amount of acid produced by mixed cultures is about 2.9-fold greater in soymilk and about 5.4-fold greater in soymilk fortified with 1.0% level of sucrose than that produced by the single culture of *L. bulgaricus*. The amount of acid produced in soymilk fortified with 1.5% level of skim milk powder was 0.84% level for both of the single culture of *L. bulgaricus* and the mixed cultures of *L. bulgaricus* and *K. fragilis* after 24hr incubation. However, the amount of acid produced by the mixed culture with *K. fragilis* was greater than that produced by the single culture of *L. bulgaricus* onlv in soymilk fortified with lower levels of skim milk powder than 1.5%.

서 론

두유는 음료로서 가공되고 있으며 그 소비량도 점점 증가하는 추세에 있으나 그중에는 섭취하였을 때 소화되지 않고 대장에 있는 장내미생물에 의해 메탄, 수소, 탄산가스등으로 분해되어 장내에 가스를 차게하는 raffinose, stachyose등의 비소화성 과당류가 함유되어 있고[1-9] 특히 대두 특유의 불쾌취(beany flavor)를 가지고 있는 것이 결점이다.

따라서 두유중에 함유되어 있는 이러한 비소화성 과당류와 대두 특유의 불쾌취를 제거 또는 감소시켜 다량 섭취시에도 소화에 지장이 없으며 대두취가 없고 풍미가 좋은 대두식품 특히 두유음료를 제조하려는 연구가 국내외적으로 활발히 진행되었다.

두유의 제조시 대두취의 발생을 억제하기 위한 방법으로는 대두의 열처리를 통한 lipoxygenase의 불활성화[10-12] 또는 대두취를 발생시키는 기질 역할을 하는 기질을 제거하기 위한 지질의 완전추출법 등이 이용되었고 또한 생성된 대두취를 제거하는 방법으로는 수증기증류, 진공증류등의 증류법[14]과 대두취 성분이 대두단백질에 결합되어 있다고 보고 이 결합을 분해하기 위한 단백질 분해효소 처리법등[14] 여러 방법이 이용되었다. 그러나 가장 가능성이 있는 방법은 발효방법으로 알려져 있다.[15-24]

두유의 풍미를 개선하기 위하여 1934년 Kellog[25]가 처음으로 두유를 젖산균(*Lactobacillus acidophilus*)으로 발효시키는 연구를 시작한 이후 많은 연구자들에 의해 발효유제품 제조에 오랫동안 사용해온 젖산균들을 사용하여 두유를 젖산발효시키는 연구가 국내외적으로 활발히

진행되었다.[17,26-37]

Wang등[34]과 Mital[38]및 Steinkraus와 Mital[16,17]은 젖산발효 두유의 기호성은 풍미, 맛, texture등 여러 요인에 의하여 결정되며 이러한 요인은 사용하는 젖산균의 종류에 따라 크게 영향을 받는다고 하였다. 이 연구자들은 여러 젖산균 중 *L. acidophilus*로 발효한 두유는 젖산함량이 높은 발효우유보다는 못했지만 풍미, 맛, 색깔및 texture가 다른 젖산균으로 발효한 대두유에 비하여 좋았다고 하였으며[34,39] Pinthong등[40]은 *L. bulgaricus* 단독으로 발효한 두유가 *Streptococcus thermophilus* 단독 또는 *L. bulgaricus*와 함께 혼합발효한 두유보다 풍미가 좋았다고 보고하고 있다.

한편 젖산발효두유는 산도가 높아야 풍미가 좋다는 것이 여러 연구자들의 일치된 의견이다.[18,27] Angeles와 Marth[41], Mital과 Steinkraus[27,42]에 의하면 두유의 젖산발효시 산생성은 균체수, 균 생육속도와 당 이용성에 의하여 결정된다고 하였으며 대부분의 젖산균들은 일반적으로 glucose, fructose, galactose, lactose, maltose등의 당류를 잘 이용하는 것으로 알려져 있다.[43] 그러나 대두 중에는 주로 acidic polysaccharides, arabinogalactans, cellulosic material등의 다당류와 sucrose, raffinose, stachyose등의 과당류만이 함유되어 있을 뿐이다.[44,45] 그러므로 젖산균의 생육과 산생성을 높이기 위해 발효성 당류를 첨가한 경우를 많이 볼 수 있다.[16-18,41,46,47]

두유를 젖산균으로 발효시킬 때 발효성 당류의 첨가는 균의 생육과 산생성은 증가시킬 수 있으나 섭취하였을 때 소화되지 않고 장내에 가스를 차게하는 raffinose, stachyose등의 비소화성 과당류가 두유 중에 그대로 남아있는 것이 결점이다.[16,27,37] 그리고 두유의 젖산발효에 대한 많은 연구가 있으나 두유를 젖산균 단독으로 발효할 경우 산도가 높으면 풍미는 개선되지만 대두취는 완전히 제거되지 않는다는 의견이 지배적이었다.[17,26,34-36] 따라서 두유의 젖산발효시 산도가 높고 대두취가 없으며 풍미가 좋으면서 비소화성 과당류인 raffinose, stachyose의 함량이 적거나 없는 젖산발효두유를 제조하기 위해서는 상호보완적인 혼합배양 방법을 생각할 수 있다. 그러므로 본 연구에서는 두유를 젖산균만으로 단독배양할 때 갖는 결점들을 없애기 위하여 두유의 젖산발효에 비교적 적당하다고 보고된 *L. bulgaricus*[40]를 효모인 *Kluyveromyces fragilis*와 혼합배양하여 일차적으로 생육특성과 산생성에 대하여 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 효모는 한국종균협회에서 분양받은 *Kluyveromyces fragilis* 5균주 중에서 soywhey에서 생육상태가 가장 좋은 균주를 선정하여 *Lactobacillus*속 젖산균들의 산생성 촉진효과를 확인한 후 *Lactobacillus bulgaricus* KFCC 35463과의 혼합배양에 사용하였다. 균주의 보존용 배지로는 효모의 경우 YM 한천배지를 사용하였고 젖산균의 경우 121℃에서 20분간 가압멸균한 10% (*W/v*) 환원탈지유 배지에서 12시간 배양한 후 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

두유의 조제

미국산 대두를 세척한 다음 동량의 증류수(*ml/g*)를 가하여 60~65℃의 온도에서 증류수가 거의 흡수될 때까지 팽윤(soaking)시킨 후 7.5배의 거의 끓는 증류수를 나눠 첨가하면서 Waring blender에서 5분동안(저속에서 3분, 고속에서 2분) 갈은 후 여과포로 여과하여 시험관에 분주하고 120℃에서 10분동안 멸균하여 5℃ 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

Soywhey의 조제

두유에 1N-HCl을 가하여 pH를 4.2로 조절한 다음 5℃ 냉장고에서 6시간 정치하여 침전된 단백질을 여과지(Toyo No. 5C)로 여과 제거하고 그 여액의 pH를 1N-NaOH를 사용하여 원 두유의 pH 6.60~6.70으로 다시 환원시킨 다음 15분간 자비하여 실온까지 냉각하였다. 침전된 열불안정성 단백질을 여과지(Toyo No. 5C)로 다시 여과 제거하여 soywhey를 만들었다. 이 soywhey를 시험관에 분주하고 120℃에서 10분간 멸균한 다음 5℃ 냉장고에 보관하면서 사용하였다.

Starter의 배양과 접종

실험에 사용할 효모는 별도로 조제한 soywhey에서, 젖산균은 MRS 액체배지에서 12~14시간마다 2회 이상 계대배양한 후 다시 1회 더 계대배양하여 660*nm*에서의 흡광도가 정확히 0.30이 될 때까지 증식시켰다. 혼합배양시 두 균의 접종비율을 다르게 할 경우는 두 균주 배양액의 O. D.$_{660}$ 값이 서로 일정비율이 되고 그 합이 0.60이 되도록 증식시켰다. 그 다음 실험용 배지에서 단독배양할 경우에는 1.0%(*v/v*), 혼합배양할 경우에는 각각 0.5%(*v/v*)를 접종하여 전체 접종량이 1.0%(*v/v*)가 되도록 하였다.

Soywhey에서의 균체의 생육측정

12~14시간마다 3회 계대배양한 효모와 젖산균의 배양액을 soywhey 10*ml*를 넣은 시험관에 단독 또는 혼합

접종하여 37℃에서 배양하면서 일정시간 간격으로 660*nm*에서의 흡광도를 측정하여 균체의 생육량으로 나타내었다.

총산도 측정법

37℃에서 일정시간 발효한 soywhey 또는 두유를 10*ml*씩 취한것에 10*ml*의 증류수를 가하고 phenolphthalein을 지시약으로 사용하여 0.1N−NaOH(F=1,000) 용액으로 pH 8.3까지 Automatic titrator(Kyto electronics AT 107, Japan)를 이용하여 중화적정하였다. 이때 소비된 0.1N−NaOH의 소비 *ml*수를 적정산도(titratable acidity)로 표시하였다.

결과 및 고찰

젖산발효 균주의 선정

*L. bulgaricus, L. helveticus*등의 젖산균들은 두유 중의 raffinose, stachyose는 물론이고 sucrose 조차도 발효하지 못하기 때문에 두유에서 생육과 산생성이 불량하다고 알려져 있다.[16, 34, 37, 48] 그 이외의 젖산균들도 균주에 따라서 sucrose는 발효하나 raffinose, stachyose등은 이용하지 못하므로 두유에서의 생육과 산생성이 우유에서보다 떨어진다고 하였다.[16, 41] 이들 젖산균들을 두유에서 각각 혼합배양한 경우도 산생성이 증가하지 않았다.[16] 따라서 두유에서 생육이 잘 안되는 젖산균의 결함을 혼합배양에 의해 보완해 줄 수 있는 효모의 선정을 위해 *Kluyveromyces fragilis* 5균주를 사용하였다.

Sugimoto[49]는 탈지두유로부터 soyprotein isolate와 열불안정성 wheyprotein 조제과정의 부산물인 soywhey는 건물중량으로 조단백 2.88%, 조지방 0.75%, 조회분 21.5%, 유기산 6.56%, 탄수화물 58.10%를 함유하고 있으며 이 탄수화물의 대부분은 사람이나 일반 가축들이 섭취할 때 flaturance를 유발하는 galacto−oligosaccharides와 sucrose로 구성되어 있다고 하였다. 그러므로 이러한 화학적 조성을 가진 soywhey에서 생육이 잘 되는 효모를 선정하면 raffinose, stachyose와 같은 비소화성 과당류를 분해할 수 있다고 생각되어 soywhey 배지에 *K. fragilis*를 접종하여 배양한 후 균의 생육을 경시적으로 검토하였다.

*K. fragilis*의 생육속도는 Fig. 1에서 보는바와 같이 균주에 따라서 차이가 있었으며 그 중에서도 KFCC 35458과 KFCC 32422가 다른 균주에 비하여 생육이 빨랐다. 그것은 이 두 균주가 soywhey 중의 당류를 잘 이용하기 때문이라고 생각되었다. 따라서 soywhey에서 생육속도가 가장 빠른 *K. fragilis* KFCC 35458을 선정하여 젖산

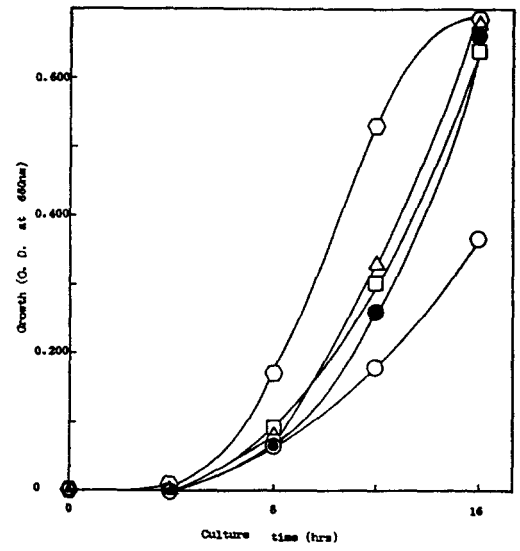

Fig. 1. Growth of *Kluyveromyces fragilis* Strains in soywhey at 37°C

○ : *K. fragilis* KFCC 35455
○: *K. fragilis* KFCC 35458
△ : *K. fragilis* KFCC 32422
□ : *K. fragilis* KFCC 35457
● : *K. fragilis* KFCC 32007

균과 혼합배양시의 산생성 촉진효과를 조사한 결과는 Table 1과 같다.

K. fragilis KFCC 35458과 혼합배양한 것은 Table 1에 나타난 것과 같이 젖산균을 단독배양한 것보다 산생성량이 많았으며 산생성 촉진효과가 있었다. *L. casei* IFO 3012를 제외하고는 200% 이상의 효과가 있었다. 이들 젖산균 중 두유에서 생육이 빠른 *L. casei* IFO 3012도 *K. fragilis* KFCC 35458과 혼합배양하므로서 산생성 촉진효과가 142%나 상승되었다. 그러므로 *K. fragilis* KFCC 35458을 *L. bulgaricus* KFCC 35463과의 혼합배양에 사용할 균주로 결정하였다.

균의 생육과 산의 생성에 미치는 단독배양과 혼합배양의 영향

두유에서 *L. bulgaricus*를 단독배양하는 것보다 *K. fragilis*와 혼합배양하므로서 산의 생성이 증가하므로(Table 1) 혼합배양시 어떠한 상호작용으로 산의 생성이 촉진되는지를 알아보기 위하여 soywhey에서 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 단독 또는 혼합배양하여 경시적으로 각 균체의 생육상태와 pH의 변화를 검토한 결과 Fig. 2에 나타난 것과 같다.

*L. bulgaricus*를 단독배양하였을 경우 균 생육속도와 pH 강하속도는 *K. fragilis*를 단독배양한 것에 비하여 늦

Table 1. Effect of single and mixed cultures on lactic acid fermentation by lactic acid bacteria at 37°C for 24 hrs

Strains		Titratable acidity (%)		Stimulation (%)
		Single culture (A)	Mixed culture with *K. fragilis KFCC 35458(B)*	(B/A×100)
L. bulgaricus	KFCC 35463	0.14	0.41	293
L. acidophilus	KFCC 12731	0.17	0.43	253
L. casei	IFO 3012	0.31	0.44	142
L. casei	KFCC 32828	0.20	0.47	235
L. casei	IFO 9018	0.20	0.47	235
K. fragilis	KFCC 35458	0.18	0.18	100

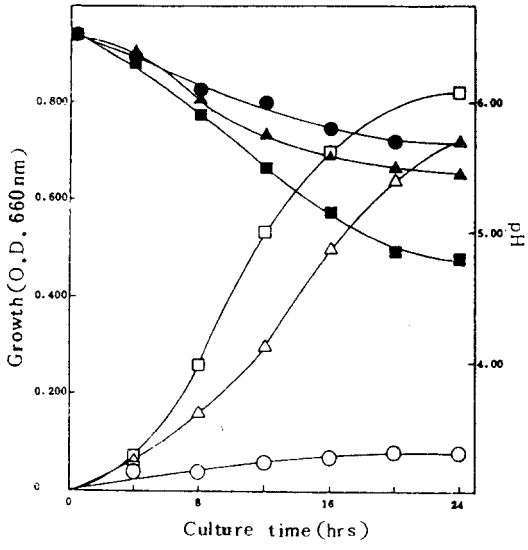

Fig. 2. Effect of single and mixed cultures of *K. fragilis KFCC 35458* and *L. bulgaricus KFCC 35463* on growth and lactic and fermentation in soywhey at *37°C*
Growth
○ : *L. bulgaricus* △ : *K. fragilis*
□ : *L. bulgaricus* and *K. fragilis*
pH
● : *L. bulgaricus* ▲ : *K. fragilis*
■ : *L. bulgaricus* and *K. fragilis*

었다. 그러나 이 두 균을 혼합배양하므로서 그들의 속도는 *K. fragilis*를 단독배양한 것보다 빨랐다. 혼합배양시 24시간 배양하였을 때의 균체량은 0.82(O.D. 660)로서 *L. bulgaricus* 단독배양시 보다도 10배, *K. fragilis* 단독배양시 보다 1.1배 많았다. 그리고 24시간 발효한 soywhey의 pH는 *L. bulgaricus*로 발효한 것이 pH 5.7, *K. fragilis*로 발효한 것이 pH 5.45, 이 두 균으로 혼합발효한 것이 pH 4.8로서 혼합발효한 것이 가장 낮았다.

젖산발효에 미치는 두유와 soywhey의 영향

두유 중의 수용성 물질이 젖산발효에 영향을 주는지를 알아보기 위하여 pH 4.2 침전단백질과 열불안정성 단백질을 제거시킨 soywhey 또는 두유에 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 단독 또는 혼합배양하여 경시적으로 산생성량을 검토한 결과는 Fig. 3과 같다.

두유와 soywhey를 사용하였을 때의 산생성속도는 양쪽 모두가 *L. bulgaricus*보다 *K. fragilis*가 빠르고 이들보다 이 두 균을 혼합배양한 것이 빨랐다. 혼합배양시

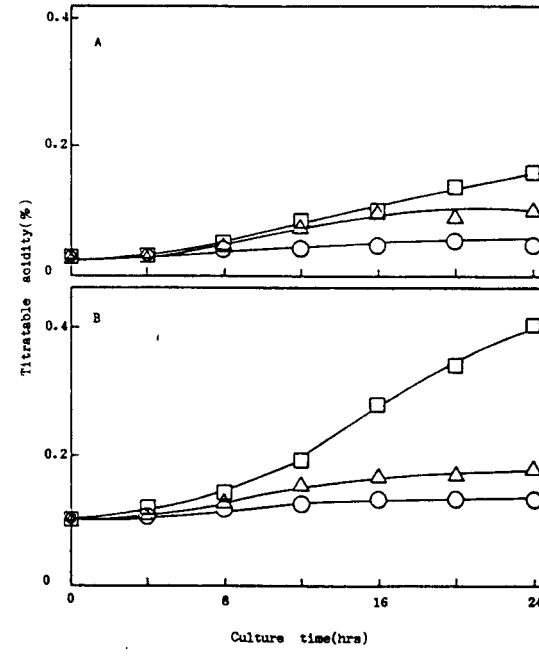

Fig. 3. Effect of soywhey and soymilk on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. bulgaricus KFCC 35463* and *K. fragilis KFCC 35458* at 37°C
A : Soywhey B : Soymilk
○ : *L. bulgaricus* △ : *K. fragilis*
□ : *L. bulgaricus* and *K. fragilis*

24시간 배양했을 때의 산의 축적량은 두유를 사용한 것이 soywhey를 사용한 것보다 2.5배 많았다. 그리고 *L. bulgaricus*로 단독배양한 것에 비하여 2.9배 많았다. 24시간 발효한 두유의 산도는 *L. bulgaricus*로 발효하였을 경우 0.14%, *K. fragilis*로 발효하였을 경우 0.18%이었고 이 두 균으로 혼합발효하였을 경우는 0.41%로서 두 균으로 각각 단독 발효한 경우보다 높았다. 이와 같이 혼합발효시 두유를 사용하는 것이 soywhey를 사용하는 것보다 산생성이 좋으므로 이후의 실험에서는 두유를 사용하여 발효조건을 검토하였다. 젖산균의 산생성은 생육관련형이므로[26] 젖산균의 생육을 산생성량으로 추정하였다.

*L. bulgaricus*는 두유 중의 당류를 이용하지 못하므로 두유 중에서 생육과 산생성이 불량하다고 보고되고 있으며[16,34,37,48] Fig. 3에서도 같은 결과를 보여주고 있다. 그러나 *K. frggilis*와 혼합배양시킬 때 산생성이 높아지는 것은 *K. fragilis*에 의해 과당류가 분해되어 생성된 단당류 또는 대두단백질이 분해되어 생성된 peptide 또는 아미노산등이 *L. bulgaricus*의 젖산발효를 촉진하기 때문이라고 생각할 수 있다.

효모와 젖산균간에 이러한 상호작용이 일어나는 현상은 빵류[50-62], 장류[53,54], 주류[55,56], 발효류[57-64]등의 발효식품의 제조 경우에서도 찾아볼 수 있다. Sugihara 등[51]과 Kline와 Sugihara는 Sanfrancisco sour dough bread 제조과정 중 빵반죽의 발효에서 *Torulopsis holmii*와 젖산균, 초산균 사이에 공생관계가 존재한다고 하였다. Kefir는 lactic acid, ethanol 그리고 미량의 CO_2를 함유하고 있는 alcohol성 젖산발효유제품(alcohol acid milk drink)으로서 우유, 양유, 염소유등에 kefir grains을 starter로 접종하여 제조한다.[58-60] Riviere등[61]에 의하면 kefir 제조에 starter로 사용하는 kefir grains내에는 *T. holmii*와 *L. brevis*가 공생관계를 유지하면서 생육하고 있다고 하였다. 따라서 *L. brevis*는 우유에서 생육하지 못하지만 *T. holmii*가 공존할 때는 잘 자라며 *T. holmii*의 생육상태도 *L. brevis*의 영향을 받는다고 하였다. Peppler와 Frazier[62], Vnilever[63], Devoyod[64]등은 cheese starter와 cheese에서 효모가 젖산균의 생육에 현저한 영향을 주고 있다고 하였다.

따라서 두유발효시 *L. bulgaricus*로 단독배양한 것보다 *K. fragilis*와 혼합배양한 것이 산생성이 높은 것은 이 두 균사이에 상호작용이 있기 때문이라고 생각되었다.

온도의 영향

산의 생성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 25℃~50℃의 범위에서 온도변화에 따른 산생성량을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다.

두유에서 *L. bulgaricus*를 단독배양할 경우 배양온도가 45℃일 때 최대 산생성을 나타냈으며 *K. fragilis* 를 단독배양할 경우는 배양온도가 30℃일 때, 그리고 두 균을 혼합배양하였을 경우는 35℃와 37℃ 사이의 온도범위에서 최대의 산생성을 나타내었다.

*L. bulgaricus*와 *K. fragilis*의 접종비율의 영향

*L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 두유 중에서 혼합배양시 두 균의 접종비율이 산생성에 미치는 영향을 조사한 결과 Fig, 5에 나타난 것과 같다.

*L. bulgaricus*와 *K. fragilis*의 접종비율(O. D. $_{660}$ 값)을 1 : 2로 하였을 때 산생성량이 가장 많았다. 이 비율보다 *K. fragilis*의 접종비율을 더 높일 경우 산생성량은 서서히 감소하나 이와 반대로 *L. bulgaricus*의 접종비율을 더 증가시키면 산생성량이 급격히 감소하였다. 이러한 결과로 두유에서 혼합배양시 *L. bulgaricus*의 젖산발효는 *K. fragilis*에 대한 의존성이 매우 크다는 것을 알 수 있었다.

배지의 조성과 배양조건은 혼합배양시 두 균사이의 상호작용 형태를 결정짓는다고 하였다.[65-67] Schulz와 Stephan[68]은 sour dough의 발효과정에서 발효온도는 효모와 젖산균의 비율에 영향을 준다고 하였다. 즉 효모와 젖산균의 비율이 25℃에서는 1 : 6, 30℃에서는 1 : 14,

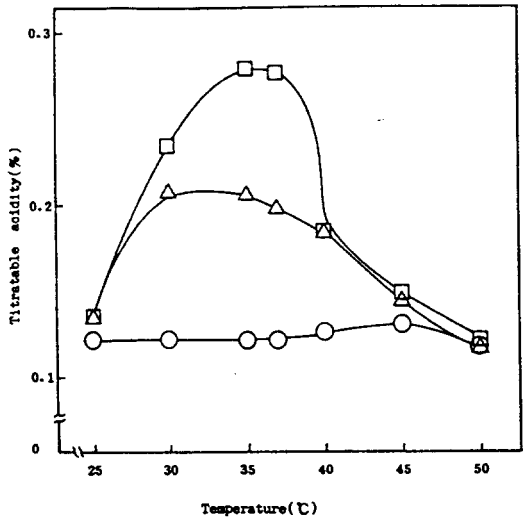

Fig. 4. Effect of temperature on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. bulgaricus KFCC 35463* and *K. fragilis KFCC 35458* in soymilk for 16 hrs

○ : *L. bulgaricus* △ : *K. fragilis*
□ : *L. bulgaricus* and *K. fragilis*

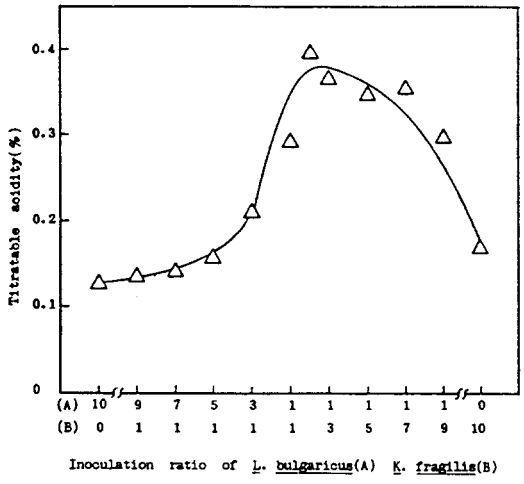

Fig. 5. Effect of inoculation ratio of *L. bulgaricus KFCC 35463* and *K. fragilis KFCC 35458* on lactic acid fermentation in soymilk at 37°C for 16 hrs

35℃에서는 1 : 100이라고 하였다. 따라서 최적 젖산발효를 위한 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*의 접종비율은 배양온도가 37℃일 경우에 한해서 O.D. 값이 1 : 2일 때 최대의 산생성을 나타낸다. 배양온도가 바뀌면 이 접종비율도 달라질 것으로 생각된다.

Sucrose의 영향

*L. bulgaricus*와 *K. fragilis*로 24시간 혼합발효한 두유의 산도는 0.41%로서(Fig. 3) 비교적 낮은 편이었다. 이것은 젖산균이 두유 중에 존재하는 당류(sucrose, raffinose, stachyose) 전부를 이용한다고 할지라도 충분한 산생성을 하는데는 그 양이 부족하기 때문이라고 생각된다.[26] 따라서 많은 양의 산을 생성하기 위해서는 두유 중에 어떠한 당류를 첨가하므로서 가능하다.

Wang 등[34]은 산미와 감미의 균형은 젖산발효두유의 기호성에 영향을 준다고 하였다. 따라서 발효두유에 상쾌한 감미를 주고 젖산생성량을 높이는데는 sucrose가 적당하다고 생각되었다. 두유에 sucrose를 0.5~3.0% (*w/v*) 범위에서 각 농도가 되게 첨가하여 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 단독 또는 혼합배양시 산생성에 미치는 sucrose 농도의 영향을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다.

*L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 단독 배양하였을 경우는 두유에 sucrose를 첨가하지 않은 것이나 첨가한 것이나 산생성량에는 영향을 주지 못했다. Sucrose의 첨가량이 증가함에 따라 산생성량이 약간씩 증가한 것은 실험에 사용한 Sucrose 중에는 invert sugar가 약 0.15% 함유되어 있기 때문이라고 생각되었다. 이 두 균을

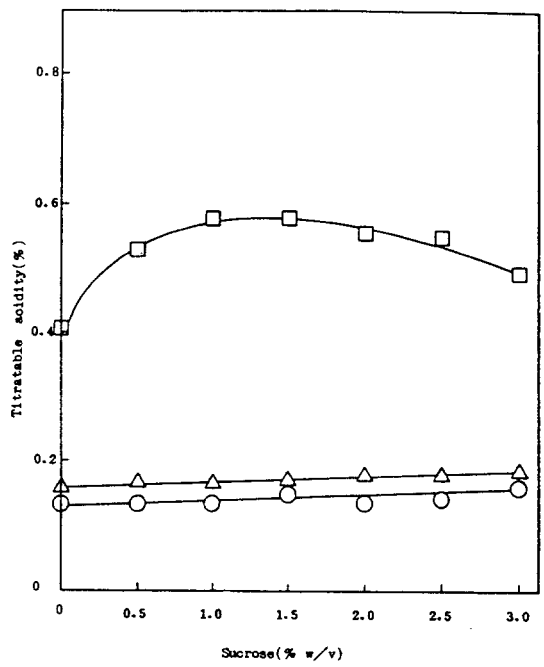

Fig. 6. Effect of addition sucrose concentration on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. bulgaricus KFCC 35463* and *K. fragilis KFCC 35458* in soymilk at 37°C for 24 hrs
○ : *L. bulgaricus* △ : *K. fragilis*
□ : *L. bulgaricus* and *K. fragilis*

혼합배양하였을 경우는 두유에 sucrose를 첨가하지 않은 것보다 첨가한 것이 그리고 *L. bulgaricus*만을 단독배양한 것보다 산생성량이 훨씬 많았다. 그리고 최대 산생성을 위한 sucrose의 농도는 1.0~1.5% 수준이 적당하였다. 그 이상의 농도로 첨가한 경우는 첨가량이 증가함에 따라서 산생성량이 서서히 감소하는 경향을 보여주었다. Angeles와 Marth[41]는 두유에 sucrose를 1.0% 농도가 되게 첨가하였을 때 *S. thermophilus*의 생육과 산생성이 약간 저해되는 경향을 나타낸다고 하였다. 그러므로 혼합배양시 두유에 sucrose를 1.0~1.5% 이상 첨가시 산생성량이 약간 감소하는 경향을 나타내는 것은 이 농도 이상에서는 균체의 생육과 산생성이 억제되기 때문이라고 생각되었다. 그리고 두유에서 *L. bulgaricus*를 단독배양시 sucrose 첨가여부가 산생성에 영향을 주지 않는 것은 *L. bulgaricus*가 sucrose를 이용하지 못하기 때문이라 생각되며 혼합배양시 두유에 sucrose를 첨가하므로서 산생성량이 증가하는 것은 sucrose가 *K. fragilis*에 의하여 *L. bulgaricus*가 발효시킬 수 있는 glucose와 fructose로 가수분해되기 때문이라고 생각할 수 있다.

두유 대신에 soywhey를 사용했을 경우에도 혼합배양시 sucrose의 첨가여부가 산생성량의 증가에 영향을 주는지를 알아보기 위하여 soywhey와 두유에 sucrose를 각각 1.0%씩 첨가하여 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*의 단독 또는 혼합배양에 의한 산생성량을 경시적으로 검토하였다. 이때 혼합배양시의 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*의 접종비율(O.D. 값)은 1 : 2로 하였다.

그 결과 Fig. 7에 나타난 것과 같이 *L. bulgaricus*로 단독배양시의 산생성량은 soywhey와 두유 중 어느 것을 사용한 경우도 sucrose의 첨가 영향은 없었다. 이러한 결과는 sucrose를 첨가하지 않은 soywhey 또는 두유를 사용한 결과(Fig. 3)와 동일하였다. *K. fragilis*와 혼합배양하였을 때의 산생성량은 soywhey를 사용하였을 경우 sucrose를 첨가한 것과 첨가하지 않은 것을 비교하면 서로 차이가 없었다. (Fig. 3) 그러나 두유를 사용하였을 경우는 sucrose를 첨가한 soywhey 또는 sucrose를 첨가하지 않은 두유를 사용한 것(Fig. 3)에 비하여 산생성속도가 빠르고 산생성량이 많았다. 혼합배양시 24시간 배양하였을 때의 산의 축적량은 sucrose를 첨가한 두유를 사용한 것이 sucrose를 첨가한 soywhey를 사용한 것보다 4.7배, sucrose를 첨가하지 않은 두유를 사용한 것보다 1.7배, *L. bulgaricus*로 단독 배양한 것보다 5.4배 많았다. sucrose를 1.0% 첨가한 두유에서 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*의 단독 또는 혼합배양시 24시간 발효하였을 때의 산도는 각각 0.13%, 0.20%, 0.70%이었다.

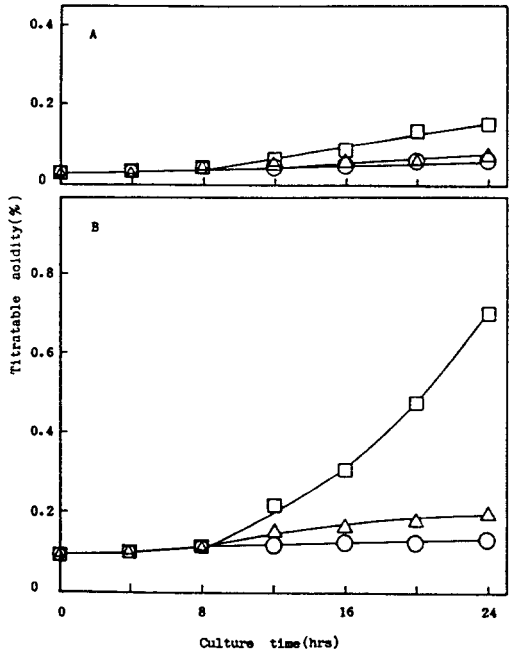

Fig. 7. Time course of lactic acid fermentation of soywhey and soymilk with the addition of 1% sucrose by single and mixed cultures of *L. bulgaricus KFCC 35463* and *K. fragilis KFCC 35458* at 37°C

A: Soywhey B: Soymilk
○ : *L. bulgaricus* △ : *K. fragilis*
□: *L. bulgaricus* and *K. fragilis*
Inoculation ratio of *L. bulgaricus* and *K. fragilis* ; 1 : 2

탈지분유의 영향

Wang 등[34]은 cheese 제조와 요구르트 제조에 지금까지 사용되고 있는 방법과 젖산균들을 그대로 이용하여 두유만을 발효하였을 경우는 풍미개선이 불충분하다고 하였다. Yamanaka 등[69]은 대두단백수용액을 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*로 혼합배양할 때 탈지분유 10%(w/v)와 아미노산 0.07%(*w/v*)를 첨가하여 대두취를 억제시키려고 시도하였다. Dimove 등[70]은 우유를 *S. thermophilus*로 유산발효시킨 다음 두유와 혼합하여 풍미와 점조성이 우수한 sour soymilk를 제조하였다고 한다. 한편 Yamanaka 등은 다른 연구에서 *S. thermophilus, S. faecalis, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. casei* 등의 젖산균으로 10% 환원탈지유를 발효시킬 때 두유를 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 산생성이 높았으며 두유의 첨가효과는 70%(*v/v*)까지 좋았다고 하였다. 이것은 역으로 두유에 10% 환원탈지유를 30%(*v/v*) 수준까지 첨가할 때 산생성이 촉진될 수 있음을 간접적으로 말해주고 있다.

이와 같이 풍미개선과 산생성을 높이기 위해 두유발효시 탈지분유가 첨가되었다. 그러므로 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 단독 또는 혼합배양시 첨가된 탈지분유가 산생성에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위하여 두유에 탈지분유를 0.5~3.0%(*w/v*) 범위의 농도로 첨가하여 37℃에서 24시간 배양하였을 때 탈지분유 첨가량에 따른 산생성량을 조사하였다.

그 결과 Fig. 8에 나타난 것과 같이 *L. bulgaricus*만을 단독배양한 경우 그리고 *K. fragilis*와 혼합배양한 경우 모두 두유보다 탈지분유를 첨가한 두유에서 산생성량이 많았다. 0.5%(*w/v*) 농도의 첨가까지는 탈지분유의 첨가량이 증가함에 따라서 산생성량도 급격히 증가하였으며 1.5%(*w/v*) 이상의 첨가에서는 아주 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 그리고 두유에 탈지분유 첨가량을 1.5% 이하로 하였을 때의 산생성량은 *L. bulgaricus*로 단독배양한 경우보다 *K. fragilis*와 혼합배양한 경우가 많았다. 그러나 탈지분유 첨가량을 1.5% 이상으로 하였을 경우의 산생성량은 *L. bulgaricus*로 단독배양한

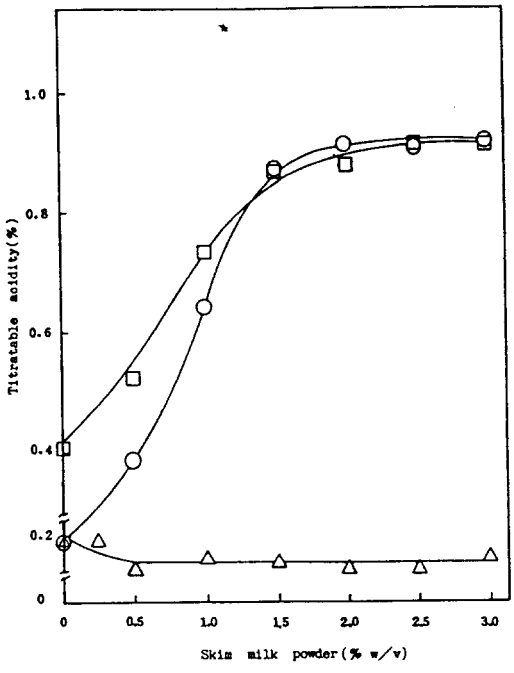

Fig. 8. Effect of addition skim milk concentration on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. bulgaricus KFCC 35463* and *K. fragilis KFCC 35458* in soymilk at 37°C for 24 hrs

○ : *L. bulgaricus* △: *K. fragilis*
□ : *L. bulgaricus* and *K. fragilis*

경우와 *K. fragilis*와 혼합배양한 경우가 차이가 없이 거의 같은 수준을 나타내었다. 이상의 결과로부터 산생성량을 증가시키기 위한 탈지분유의 첨가량은 *L. bulgaricus*를 단독배양한 경우와 *K. fragilis*와 혼합배양한 경우 다 같이 1.5%(*w/v*)가 적당하다고 생각되었다. 1.5% 탈지분유를 첨가한 두유를 24시간 발효하였을 경우의 산도는 Fig. 8에서와 같이 *K. fragilis*로 단독발효한 것이 0.15%, *L. bulgaricus*로 단독발효한 것과 *K. fragilis*와 혼합발효한 것 모두 0.84% 수준을 나타내었다.

Feniksova 등[72]은 *K. fragilis*는 lactose를 분해하는 β-galactosidase 활성이 있다고 하였다. 이 효모의 β-galactosidase는 pH 6~7의 중성 부근에서 그 활성이 높다고 하였으며 곰팡이의 β-glactosidase는 pH 4~5의 산성쪽에서 활성이 크다고 하였다. 그러므로 두유에 탈지분유를 1.5이하로 첨가하였을 때 산생성량이 *L. bulgaricus*를 *K. fragilis*와 혼합배양한 것이 단독배양한 것보다 많은 것은 *K. fragilis*가 lactose를 glucose와 galactose의 단당류로 가수분해하고 이 단당류를 *L. bulgaricus*가 쉽게 이용하여 젖산발효하기 때문이라고 생각되었다. 그러나 탈지분유를 1.5% 이상으로 첨가시 산생성에 차이가 없는 것은 발효두유의 산도가 높아짐에 따라서 *K. fragilis*의 β-galactosidase 활성이 감소하기 때문이라고 생각되었다.

두유에 탈지분유를 1.5% 이하로 첨가하였을 때 산생성량이 *L. bulgariaus*로 단독발효한 경우보다 *K. fragilis*와 혼합발효한 경우가 많으므로 이러한 결과를 다시 확인하기 위하여 탈지분유를 1.0% 첨가한 두유에서 *L. bulgaricus*를 단독 또는 *K. fragilis*와 혼합배양하여 경시적으로 산생성량을 검토한 결과는 Fig. 9와 같다.

산생성속도는 젖산균을 단독배양하는 것보다 혼합배양한 것이 훨씬 빨랐다. 그리고 24시간 배양하였을 때의 산도는 젖산균으로 단독배양한 것이 0.63%, 혼합배양한 것이 0.76%이었다. 혼합배양함으로서 단독배양한 것보다 1.2배나 산의 생성이 많았다.

요 약

Lactobacillus bulgaricus KFCC 35463과 *Kluyveromyces fragilis* KFCC 35458을 두유 배지에 접종하여 생육과 산생성의 특성을 조사한 결과 두유를 *L. bulgaricus*로 단독발효하는 것보다 *K. fragilis*와 혼합발효하는 것이 산생성량이 많고 산생성속도가 빨랐다. 이 두 균을 혼합배양하여 산생성을 높이기 위한 배양조건을 검토한 결과

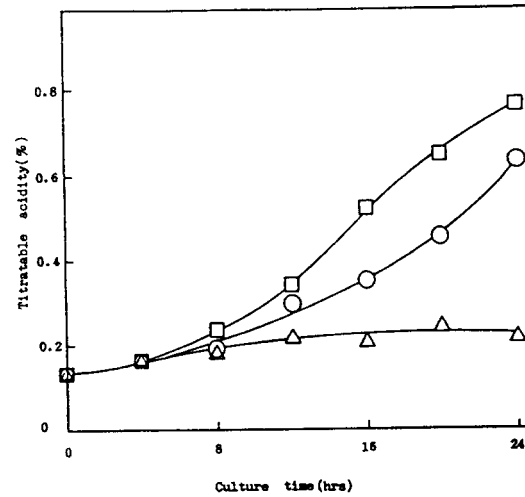

Fig. 9. Time course of lactic acid fermentation in soymilk with the addition of 1% skim milk by single and mixed cultures of *L. bulgaricus KFCC 35463* and *K. fragilis KFCC 35458* at 37°C

○ : *L. bulgaricus* △ : *K. fragilis*
□ : *L. bulgaricus* and *K. fragilis*

는 다음과 같았다. 두유에 sucrose를 1.0% 또는 탈지분유를 1.5% 첨가하고 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis* 를 O. D.$_{660}$ 값으로 1 : 2가 되게 접종하여 35~37℃의 온도에서 24시간 배양하는 것이 효과적이었다. *L. bulgaricus*를 단독 또는 *K. fragilis*와 혼합배양할 때의 산도는 각각 0.14%와 0.41%로서 혼합배양한 것이 2.9배 높았다. sucrose를 1.0% 첨가한 두유를 사용하였을 경우는 각각 0.13%와 0.70%로서 혼합배양한 것이 5.4배 높았다. 그리고 두유에 탈지분유를 1.5% 첨가하였을 경우는 단독배양한 것과 혼합배양한 것 모두가 0.84% 수준이었고 탈지분유를 1.5% 이하로 첨가하였을 때만 단독배양한 것보다 혼합배양한 것이 산도가 높았다.

사 의

본 연구는 아산 연구재단 연구비 지원으로 일부 수행되었으며 이에 깊이 감사를 드립니다.

문 헌

1. Steggerda, F.R., E.A. Richards and J.J. Rackis;: *Soc. Exptl, Biol. Med.*, **121**, 1235 (1966)
2. Rackis, J.J., D.J. Sessa and D.H. Honing: *ARS*, **71**-35, USDA, p. 100 (1967)
3. Murphy, E.L.: *ARS*, **74** 50, USDA, 86 (1969)
4. Rackis, J.J., D.J. Sessa, F.R. Steggerda, T. Shimizu, J. Anderson and S.L. Pearl: *J. Food Sci.*, **35**, 634 (1970)
5. Cristofaro, E., F. Mottu and J.J. Wuchrmann: *Sugars in Nutrition*, (edited by Sipple, H. and K. Mcnutt) Academic press, New York, Chap. 20 (1974)
6. Rackis, J.J., D.H. Hong, D.J., Sessa and F.R. Steggerda: J. Agr. Food Chem., **18**(6), 977 (1970)
7. Hellendoorn, E.W.: *Food Technol.* **23**, 87 (1969)
8. Steggerda, F.R.: *Ann. New York Acad. Sci.*, **150**, 57 (1968)
9. Steggerda, F.R. and J.F. Dimmick: *Am. J. Clin, Nutr.*, **19**, 120 (1968)
10. Wilkens, W.F., L.R. Mattick and D.B. Hand: *Food Technol.*, **21**, 1630 (1967)
11. Mattick, L.R. and D.B. Hand: *J. Agr. Food Chem.*, **17**(1), 15 (1969)
12. Mustakas, G.C., W.J. Albrecht, J.E. McGhee, L.T. Black, G.N. Bookwalter and E.L. Griffith: *J. Am. Chem. Soc.* **46**, 623 (1969)
13. Steinkraus, K.H.: *U.S. Patent*, 3,721,569 (1973)
14. Fujimaki, M., S. Arai and E. Tamaki: *Food Technol.*, **22**, 889 (1968)
15. Hessltine, C.W.: *Mycologia*, **57**, 149 (1965)
16. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Food Sci.*, **39**, 11018 (1974)
17. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. milk Food Technol.*, **39**(5), 342 (1976)
18. Kanda, H., H.L. Wang, C.W. Hesseltine and K. Warner: *Process Biochem.*, **11**(4), 23 (1976)
19. Martinelli, A.F. and Hesseltine: *Food Technol.*, **18**, 167 (1964)
20. Steinkraus, K.H., Y.B. Hwa, J.P. Van Buren, M.I. Provvidenti and O.B. Hand: *Food Res.*, **25**, 777 (1960)
21. Steinkraus, K.H., J.P. Van Buren, L.R. Hackler and D.B. Hand: *Food Technol*, **19**. 63 (1965)
22. Steinkraus, K.H., C.Y. Lee and P.A. Buck: *Food Technol*, **19**, 119 (1965)
23. Umeda, I., K Nakamura, M. Yamato, Y. Nakamur: *U.S. Dept. Agri. Fimal Tech. Repor*, PL 480 UR-A-11 (40), 21 (1969)
24. Hesseltine, C.W. and H.L. Wang; *Chemistry and Technology*, Vol. 1, Avi. Publishing Co. Inc., Vol. 1, 389 (1972)
25. Kellog, J.H.: *U.S. Patent*, 1,982,941 (1934)
26. Patel, A.A., W.M. Waghmare and S.K. Gupta: *Proc. Biochem.*, **15**(7), 9 (1980)
27. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. of Food Sci.*, **40**, 114 (1975)
28. Matsuoka, H., K. Sasago and M. Sekiguchi; *J. Food Sci. Technol. (Tokyo)*, **15**, 103 (1968)
29. Lee, J.S., P.J. Han and K.B. Suh: *Korean J. Food Sic. Technol.*, **4**(3), 194 (1972)
30. Kim, O.S. and C.H. Kim: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **16**(2), 143 (1984)
33. Kim C.S. and H.S. Shin: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **3**, 57 (1971)
34. Wang, H.L., Kraidie and C.W. Hesseltin: *J. Milk Food Technol.*, **37**(2), 71 (1974)
35. Hang, Y.D. and H. Jackson: *Food Technol.*, **21** 95 (1967)
36. Hang, Y.D. and H. Jackson: *Food Technol*, **21**, 97 (1967)
37. Breed, R.S., E.G.D. Murray and N.R. Smith: *Bergey's manual of determinative Bacteriology*, Bailliere, Tindall and Cox., London, 7th ed., (1974)
38. Mital, B.K.: *Diss. Abstr. intern.*, B 35, 880 (1974)
39. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Milk Food technol.*, **39** (5), 342 (1976)

40. Pinthong, R.R. Macrae and J. Rothwell: *J. Food Technol.*, **15**, 647 (1980)
41. Angeles, A.E. and E.H. Marth: *J. Milk Technol.*, **34**, 30 (1971)
42. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Food Prot.* **42**, (11) 895 (1979)
43. Hammer, B.W. and F.J. Babel: *Dairy Bacteriol.* John Wiley and sons, Inc., New Yrok, 4th ed., (1957)
44. Kawamura, S. and M. Toda: *Tech. Bull. Fac. Agr.*, Kagawa Univ., Japan, 18, 138 (1967)
45. Aspinall, G.O., R. Bigbie and J.E. Mckay: *Cereal Sci. Today*, **12**, 233 (1967)
46. Kothari, S.L.: *Indian J. Microbiol.*, **13**, 109 (1973)
47. Kothari, S.L.: *Indian J. Microbiol.*, **15**, 18 (1975)
48. Rogosa, M. and M.E. Sharpe: *J Appl. Bacteriol.*, **22**, 329 (1959)
49. Sugimoto, H.: *J. Food Sci.*, **39**, 934 (1974)
50. Nakamura, L.K. and P.A. Hartman: *J. Bacteriol.*, **81**, 519 (1961)
51. Kline, L. and T.F. Sugihara: *Appl. Microbiol.*, **21**, 459 (1971)
53. Wood, B.J., O.S. Cardenas, F.M. Yong and D.W. Menulty: *Lactic Acid Bacteria in Beverage and Food*, (edited by Carr, J.G., C.V. Cutting and G.C. Whiting) Academic Press, London, p.325 (1975)
54. Noda, F., K. Hayashi and T. Mizunuma: *App. Environ. Micorbiol.*, **40**(3), 452 (1980).
55. Ito, Y., M. Matsaki and T. Uemura: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **31**, 779 (1957)
56. Ito, Y. and T. Uemura: *J. Agr. Chem. Soc. Japan.*, **31**, 783 (1957)
57. Geimberg, S.G.: *Trudy vologodak Moloch. Inst.*, No. **14**, 251 (1956)
58. Kosikowski, F.: *Cheese and Fermented Milk Foods*, Edwards Bros., Ann Arbor, Michigan (1966)
59. Chandan, R.C., J.F. Gordon and D.A. Walker: *Proc. Biochem*, **5**(2), 13(1969)
60. Anon: *Milk Ind.*, **62**(5), 26 (1968)
61. Riviere, J.W.M., P. Kooiman and K. Schmidt: *Arch. Microbiol.*, **59**, 269 (1967)
62. Peppler, H.J. and W.C. Frazier: *J. Bacteriol.*, **43**,181 (1942)
63. Unilever, N.V.: *Neth Pat Appl.* 69-10198, (1970)
64. Devoyod, J.J., M. Desmazeaud, D. Melcion, C. Degas and C. Auiault: *Le Lait*, **51**,399 (1971)
65. Megee, R.D., J.F. Drake, A.G. Fredrickson and H.M. Tsuchiya: *Canadian J. Microbiol.*, **13**, 1733(1972)
66. Dubos, R. and A. Kessler: *The 13th Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, England, p. 1 (1963)
67. Young, G., R.I. Krasner and P.L. Yudkofsky: *J. Bacteriol.*, **72**, 525 (1956)
68. Schulz, A. and H. Stephan: *Brotu. Gaback*, **12**, 22 (1958)
69. Yamanaka, Y. and S. Okumura: *U.S. Patent*, 3,535,117 (1970)
70. Dimov, N., O,. Dazhondzhorova, A. Kozhev: *Khranit. Promst*, **29** (5),12 (1980)
71. Yamanaka, Y. and N. Furukawa: *J. Food Sci. Technol (Tokyo)*, **17**, 456 (1970)
72. Feniksova, R.V., A.S. Tikhomirova, A.N. Kulikova and V.D. Kuznetsov: *Mikrobiologiya*, **37**,988 (1968)

(1987년 3월 11일 접수)