

두유에서 *Saccharomyces uvarum* 과 *Lactobacillus acidophilus*의 혼합배양

공인수·이정수·정용준·류인덕*·오두환·유주현

연세대학교 공과대학 식품공학과, *충주공업전문대학 식품공학과

Lactic Acid Fermentation of Soymilk by Mixed Cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum*

In-Soo Kong, Jung-Soo Lee, Yong-Joon Chung,
In-Deok Lew*, Doo-Whan Oh and Ju-Hyun Yu

Dept. of Food Engineering, Yonsei University, Seoul

* Dept. of Food Technology, Chung Ju National Technical College, ChungJu

Abstract

Among the several lactic acid bacteria, *Lactobacillus acidophilus* showed the highest acid production when it was cultured mixed with *Saccharomyces uvarum* in soymilk. The highest acid production was obtained in 16 hrs of cultivation when the inoculation ratio of *L. acidophilus* and *S. uvarum* was 2:1 and the temperature was 30~37°C. The acid production was greatly enhanced by the addition of 2.0% sucrose. However, skim milk was not stimulatory in mixed culture. During mixed culture in soymilk, acid production was affected by the enzymatic reaction of yeast.

서 론

대두는 풍부한 단백질 자원이지만 콩냄새와 flatulence를 일으키는 것때문에 널리 이용하지 못하고 있다. 대두 식품을 발효에 의해서 성공적으로 이용하는 데 사용된 미생물로는 곰팡이로서 *Rhizopus oligosporus*^(1,2), *Neurospora sitophila*⁽³⁾, *Aspergillus oryzae*⁽⁴⁾가 있으며 세균으로서 *Bacillus natto*⁽⁵⁾등이 보고되었다. Gehrke⁽⁶⁾는 젖산균을 이용하여 두유를 발효시킨 결과 두유가 젖산균의 생육에는 좋으나 우유에 비하면 산의 생성이 부족하다고 보고하였으며 여러 연구자들에 의해 이는 우유의 젖산발효와는 생화학적 작용기작과 대사산물에 많은 차이가 있다고 보고되었다⁽⁷⁻⁹⁾.

두유에는 우유와는 달리 미생물이 이용할 수 있는 당으로써 sucrose 및 raffinose, stachyose와 같은 α -(1→6) galactoside linkage를 하고 있는 소당류가 대부분이다. 따라서 두유 발효에서 젖산발효만을 위한 연구가 진행되려면 산생성을 높이기 위해서 대두의 소당류 이용이 필수적이어서 소당류를 젖산균이 이용가능한 단당류나 sucrose로 분해해 줄 수 있는 α -galactosidase, melibiase, invertase등의 효소활성

이 요구되고 있다. Mital 등⁽¹⁰⁾은 여러 젖산균을 대상으로 α -galactosidase의 활성을 검토하였으나 *L. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L. salvarius subsp. salvarius*의 세포내에만 존재하고 있으며 이러한 젖산균을 사용하여 두유를 발효시킬때 젖산균은 생육하지만 산생성이 높지 않으며 flavor와 texture도 바람직하지 못한 것으로 보고하였다. 최근 본 연구실에서는 젖산균만의 단독배양이 갖는 결점을 보완하기 위하여 효모인 *K. fragilis*를 사용하여 젖산발효에 일반적으로 사용하는 젖산균과의 혼합발효를 행하여 발효중에 일어나는 소당류의 대사과정, 두유의 젖산발효중에 생기는 생화학적 상호작용에 대한 연구결과를 보고하였다.^(11,12) 계속해서 본 연구에서는 invertase와 melibiase활성이 높은 *S. uvarum*을 선정하여 젖산균과의 혼합발효를 행하여 두유를 이용한 산생성 최적조건을 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

본실험에 사용한 효모와 젖산균은 한국종균협회로부터 분양받아 사용하였다. 보존용 배지로는 YM (yeast-malt extract) 배지를 효모에 사용하였고 젖

산균은 MRS배지를 사용하였다.

생육배지

1) 두유(soy milk)의 제조

대두를 세척한 후 증류수를 가하여 65°C에서 증류수가 완전히 흡수될때까지 팽윤(soaking)시킨후 대두중량의 7.5배에 달하는 끓는 증류수를 첨가하면서 5분간 homogenization시키고 여과한 후 여과액을 121°C, 10분간 멸균하여 사용하였다.

2) Soywhey의 제조

두유에 1N-HCl을 가하여 pH4.2로 조절한 후 5°C에서 6시간 방치하였다. 침전물을 원심분리하여 제거하고 상등액을 1N-NaOH로 pH6.6~6.8로 조절하여 끓인 후 냉각하여 생기는 침전물을 제거한 액을 soywhey로하여 121°C, 10분간 멸균하여 사용하였다.

Starter의 접종과 배양

*S. uvarum*은 YM배지에서 30°C, 16~24시간 배양하였으며 *L. acidophilus*는 MRS배지에서 37°C, 16~24시간 배양하여 starter로써 사용하였다. Starter의 접종은 단독배양의 경우 1% (v/v)를 접종하였으며 혼합배양의 경우 젖산균과 효모를 비율에 따라 접종하였다.

총산도 측정⁽¹³⁾

두유, soywhey에서 배양된 배양액 10ml에 농량의 증류수를 첨가하고 0.5% phenolphthalein을 지시약으로하여 0.1N NaOH로 적정하여 소비된 NaOH 용액의 ml수를 총산도로 표시하였다.

효모배양액의 제조

Moon⁽¹⁴⁾의 방법을 변형하여 제조하였다. 두유 배지에서 일정시간 배양하여 얻은 효모배양 두유를 1N-lactic acid 용액으로 pH4.2가 되도록 조절하여 단백질을 응고시킨 후 4°C, 20분간 원심분리(18,000×g)하여 상등액을 얻었다. 상등액을 1N-NaOH로 pH6.6으로 조절하여 침전되는 미량의 단백질을 원심분리(18,000×g, 50분)하여 제거하고 상등액을 여과지로 여과한 후 membrane filter(pore size 0.45μm)로 제균된 액을 배양액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

사용균주의 선정

두유에서 젖산균 단독 및 효모와 혼합배양하여 산의 생성을 검토한 결과 Table 1과 같았다.

젖산균을 단독배양했을때의 산도는 *L. leichmanii*, *L. brevis*가 높아 1.2를 나타냈으나 *L. casei*, *L. acidophilus*는 *S. uvarum*과의 혼합배양시 산도가 4.2로써 젖산균의 단독배양시보다도 600%의 상승효과를 보았다. 그러므로 본 연구에서는 혼합배양에 *L. acidophilus*를 선정하여 사용하였다.

접종비율에 의한 영향

Lew⁽¹⁵⁾은 두유에 젖산균효모 효모와 젖산균의 접종비율이 산생성에 크게 영향을 미친다고 보고하였으며 Moon⁽¹⁴⁾도 젖산균만의 혼합배양시 접종비율에 따라 균 재생육과 산생성량에 영향이 있다고 보고하였다.

Table 1. Comparison of single and mixed cultures on lactic acid fermentation in soymilk by lactic acid bacteria

Strains	Total acidity (ml 0.1N-NaOH/10ml culture)		
	Single culture (A)	Mixed culture with <i>s. uvarum</i> KFCC 32021 (B)	((B)/(A)) %
<i>L. casei</i> KFCC 32405	0.7	1.2	170
<i>L. casei</i> KFCC 32821	0.7	2.7	390
<i>L. plantarum</i> KFCC 11322	1.1	1.2	110
<i>L. acidophilus</i> KFCC 12731	0.7	4.2	600
<i>L. leichmanii</i> KFCC 11357	1.2	1.1	90
<i>L. brevis</i> KFCC 12737	1.2	1.5	125
<i>L. delbrueckii</i> KFCC 35468	1.0	1.2	120
<i>S. lactis</i> KFCC 32406	0.9	3.6	400
<i>S. uvarum</i> KFCC 32021	1.5	—	—

*S. uvarum*과 *L. acidophilus*의 혼합배양시 접종비율에 따른 산생성 변화는 Fig. 1과 같았다. 접종비율 1:2로 하였을때 산생성량은 가장 높았으며 1:3, 1:4일때도 커다란 차이를 보여주지 않았다.

배양시간의 영향

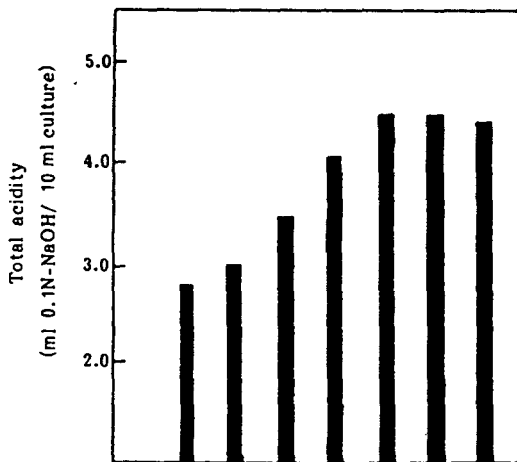
두유에서 배양시간에 따른 산생성을 검토한 결과 Fig. 2와 같았다. *L. acidophilus* 단독배양의 경우 12~20시간에서 가장 높은 산도를 보였고 그 이후는 감소하였으나 혼합배양의 경우 16시간부터 높은 산도를 계속 유지하고 있었다.

온도의 영향

산생성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 25~40°C의 범위에서 각각 배양한 결과 Fig. 3과 같았다. 단독배양시 *S. uvarum*은 생육 최적온도인 30~35°C에서 *L. acidophilus*는 37°C에서 산생성이 가장 높았으나 혼합배양의 경우 30~37°C에서 일정한 산생성을 보였으며 40°C에서 급격하게 산생성이 감소하였다.

Sucrose의 영향

두유만을 사용하여 *L. acidophilus* 단독 및 *S. uvarum*과의 혼합배양에서 얻을 수 있는 최대의 산도는 각각 2.0, 4.0 이었다. 그러므로 두유의 젖산발효



Inoculation ratio of *L. acidophilus* KFCC 12731 (A) and *S. uvarum* KFCC 32021 (B)

Fig. 1. Effect of inoculation ratio of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. uvarum* KFCC 32021 on lactic acid fermentation in soymilk

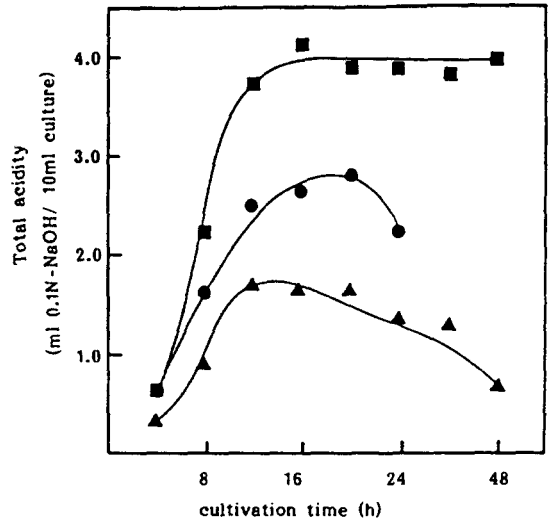


Fig. 2. Effect of cultivation time on lactic acid fermentation by mixed culture of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. uvarum* KFCC 32021

○ : *S. uvarum* KFCC 32021
 ▲ : *L. acidophilus* KFCC 12731
 ■ : Mixed culture

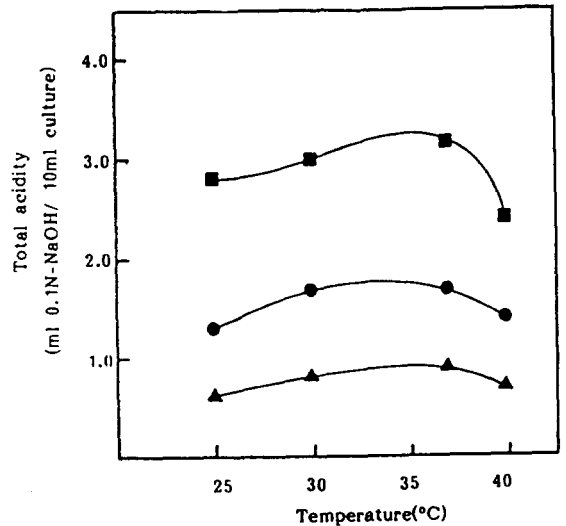


Fig. 3. Effect of temperature on lactic acid fermentation by single and mixed culture of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. uvarum* KFCC 32021 in soymilk

○ : *S. uvarum* KFCC 32021
 ▲ : *L. acidophilus* KFCC 12731
 ■ : Mixed culture

시 산생성 증가를 위해서는 두유 이외의 다른 종류의 당을 첨가해 주는 것이 필요하다고 생각되었다. Wang 등⁽¹⁵⁾은 젖산균 단독에 의한 두유의 젖산발효에서 산도

와 감마의 적당한 균형은 대두발효유의 기호성을 좌우하며 이를 위해서 두유에 sucrose를 첨가할때 산도의 증가뿐만 아니라 상쾌한 산미를 부여했다고 보고하였다. 본 실험에서도 두유와 soywhey에 sucrose를 농도별로 첨가하여 단독 및 혼합배양을 행한 결과 Fig. 4·5에 나타난 바와같이 두유와 soywhey에서 젖산균 단독배양의 경우 sucrose의 농도가 증가하여도 산도에는 별다른 변화가 없었으나 효모와 혼합배양 했을때는 sucrose의 농도를 1.5% 이상 첨가하였을 때 높은 산생성을 보였다. 이와 같은 결과는 *L. acidophilus*가 sucrose를 잘 이용하지 못하는 것으로 생각되었으며 *S. uvarum*과 혼합배양시 sucrose를 첨가하면 산생성이 증가하는 것은 sucrose가 *S. uvarum*에 의해서 *L. acidophilus*가 이용할 수 있는 당으로 분해되기 때문인 것으로 추측되었다. 또한 두유와 soywhey에 sucrose를 첨가하여 혼합배양 하였을때 soywhey보다는 두유에 sucrose를 첨가하였을때 높은 산생성을 보였다. 이같은 결과는 soywhey 제조시 두유로부터 침전되는 단백질과 peptide가 혼합배양에서 균의 생육등에 영향을 미치기 때문인 것으로 생각되었다.

Skim milk의 영향

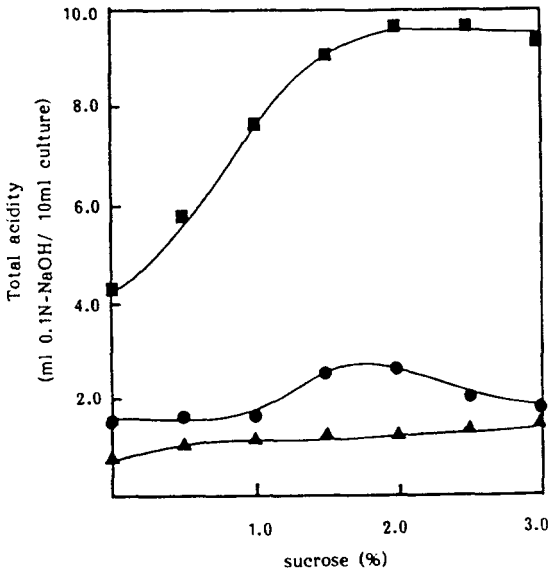


Fig. 4. Effect of sucrose concentration on lactic acid fermentation by single and mixed culture of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. uvarum* KFCC 32021 in soy milk

- : *S. uvarum* KFCC 32021
- ▲ : *L. acidophilus* KFCC 12731
- : Mixed culture

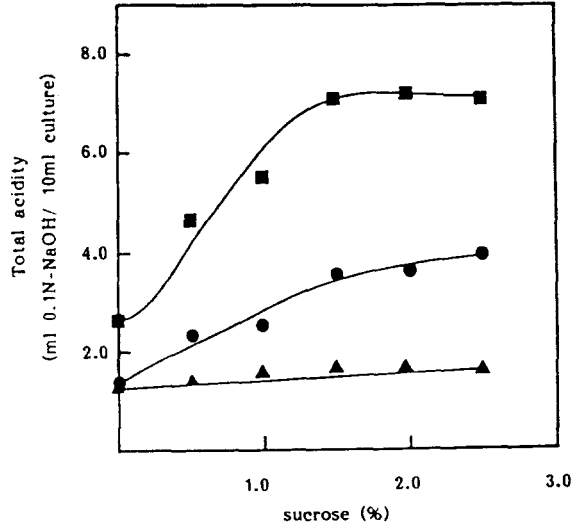


Fig. 5. Effect of sucrose concentration on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. uvarum* KFCC 32021 in soywhey

- : *S. uvarum* KFCC 32021
- ▲ : *L. acidophilus* KFCC 12731
- : Mixed culture

두유와 soywhey에 skim milk의 첨가 산생성에 미치는 영향을 검토하였다. *S. uvarum*의 단독배양에서는 skim milk의 첨가가 증가함에 따라서 산생성은 증가하였으나 *L. acidophilus* 단독배양 및 *S. uvarum*과의 혼합배양에서는 Skim milk 첨가량이 3.0%까지 산생성 경향이 같은 수준으로 급격히 증가하였다. (Fig. 6·7) 이같은 결과는 *S. uvarum*에 의해서 산생성이 증가된 것이라기 보다는 *L. acidophilus*에 의한 skim milk의 이용때문인 것으로 생각되었다.

두유에 sucrose 2%, skim milk 3%를 첨가하여 혼합배양한 결과 Table 2에 나타난 바와같이 각각을 첨가하여 얻은 산생성보다 높게 나타났으며 두유만을 혼합배양하여 얻은 산생성에 비하여 약4배 이상의 산생성 증가를 보였다.

S. uvarum 배양여액의 영향

*S. uvarum*의 두유 배양여액이 *L. acidophilus*의 두유 젖산발효에 영향을 미치는지의 여부를 검토하였다. 특히 효모 배양여액에 의한 산생성 촉진효과가 효모가 두유에서 배양될때 생산하는 소당류 분해효소에 의한 것인지를 알아보기 위해 각시간별로 두유에서 배양한 효모 배양여액을 여과하여 100°C, 10분간 열처리한 것과 열처리하지 않은 배양여액을 두유에 10% 첨가하여

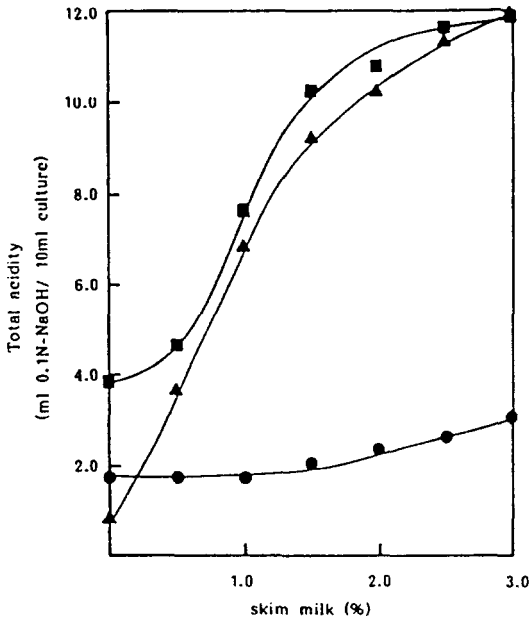


Fig. 6. Effect of skim milk concentration on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. uvarum* KFCC 32021 in soymilk

- : *S. uvarum* KFCC 32021
- ▲ : *L. acidophilus* KFCC 12731
- : Mixed culture

*L. acidophilus*를 접종하여 산생성을 측정하였다. Table 3과 같이 열처리를 하지않은 효모 배양여액을 첨가할 경우 배양시간이 오래된 배양여액을 첨가하면 *L. acidophilus*의 단독배양에 의한 산생성이 점차 증가하였다. 48시간 배양한 효모 배양여액을 첨가하면 *L. acidophilus*의 단독배양만으로도 혼합배양하여 생성되는 산도를 얻을 수 있었다. 그러나 배양여액을 열처리했을 경우 산생성의 증가는 전혀 없었다. 이같은 결과는 열처리를 하지않은 효모의 두유 배양여액에는 두유에 존재하는 소당류를 분해할 수 있는 효소가 배양시

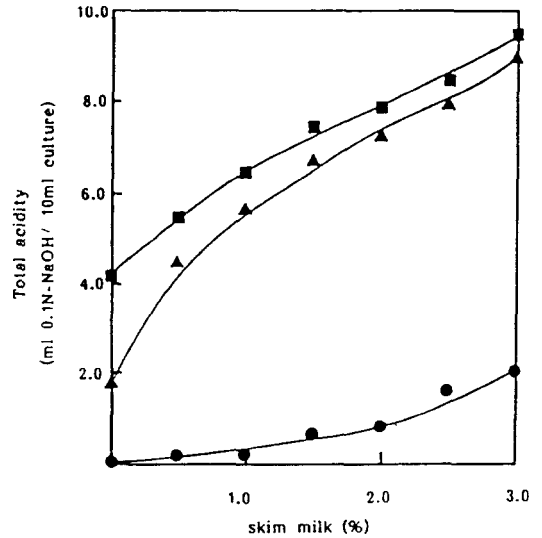


Fig. 7. Effect of skim milk concentration on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. uvarum* KFCC 32021 in soywhye

- : *S. uvarum* KFCC 32021
- ▲ : *L. acidophilus* KFCC 12731
- : Mixed culture

간에 따라 점차 증가된 양이 존재하지만 열처리를 할 경우에는 쉽게 이같은 효소가 불활성화 됨으로써 산생성 촉진 효과를 잃어버리기때문인 것으로 생각되지만 이와같은 확인은 계속 연구가 되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

*Saccharomyces uvarum*과 *Lactobacillus acidophilus*를 두유에서 단독 및 혼합배양하였을때 산생성에 미치는 조건을 검토하였다.

접종비율에 의한 산생성은 *L. acidophilus*와 *S.*

Table 2. Effect of skim milk and sucrose on lactic acid fermentation in soymilk by single and mixed culture of *S. uvarum* KFCC 32021 and *L. acidophilus* KFCC 12731

	Total acidity (ml 0.1N-NaOH/10ml culture)			
	Control	Sucrose (2%)	Skim milk (3%)	Sucrose (2%) + Skim milk (3%)
<i>S. uvarum</i>	1.7	3.3	3.0	3.9
<i>L. acidophilus</i>	0.8	1.6	11.6	11.8
<i>S. uvarum</i> + <i>L. acidophilus</i>	3.3	10.3	11.8	14.6

Table 3. Effect of heat treatment of fermented soymilk filtrate on lactic acid fermentation by *L. acidophilus* KFCC 12731

Incubation time (hrs)	Lactic acid production			
	No heat treatment		Heat treatment	
	ml 0.1 N-NaOH/ 10 ml culture	stimulation (%)	ml 0.1 N-NaOH/ 10ml culture	stimulation (%)
0	0.7	100	0.5	100
12	2.8	400	0.6	120
24	3.1	443	0.6	120
48	3.8	543	0.5	100

Volume of fermented soymilk filtrate to media : 10% (v/v)

Heat treatment condition of fermented soymilk filtrate by *S. uvarum* KFCC 32021 : at 100°C for 10 min.

Lactic acid fermentation condition by *L. acidophilus* KFCC 12731 at 37°C for 24 hrs.

*uvarum*의 접종비가 2:1일때 가장 높은 산도를 보였으며 배양시간은 16시간부터 높은 산도를 유지하였다. 배양온도는 37°C가 가장 좋았으며 두유에 sucrose를 첨가하여 단독배양하면 산생성의 증가는 없었으나 혼합배양한 결과 산도가 증가하였다. Sucrose 2%와 skim milk 3%를 첨가하여 혼합배양하면 두유만을 사용하여 혼합배양한 것에 비하여 약4배의 산생성 증가를 보였다. *S. uvarum*의 두유 배양여액을 열처리하지 않고 두유에 첨가하여 *L. acidophilus*를 단독배양하면 단독배양만으로도 높은 산생성을 보여주었으나 열처리한 배양여액이 첨가된 두유에 *L. acidophilus*를 단독배양하면 산생성의 증가가 전혀 나타나지 않았다.

감사의 말

본 연구는 아산연구재단 연구비 지원으로 일부 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

문헌

- Martinelli, A.F. and dHesseltine, C.W.: *Food Technol.*, **18**, 167 (1964)
- Steinkraus, K.H., Hwa, Y.B., J.P. Van Buren, Provident, M.I. and Hand, D.B.: *Food Res.*, **25**, 777 (1960)
- Steinkraus, K.H., Lee, C.Y. and Buck, P.A.: *Food Technol.*, **19**, 119 (1965)
- Umeda, I., Nakamura, K., Yamamoto, M. and Nakamura, Y.: U.S. Dept. Agric. Final Tech. Report PL480 UR-A-11(40), 21(1969)
- Hesseltine, C.W. and Wang, H.L.: *Chemistry and Technology*, vol. 1, Avi Publishing Co., p389 (1972)
- Gehrke, C. and Weiser, H.H.: *J. Dairy Sci.*, **31**, 213 (1948)
- Mital, B.K. and Steinkraus, K.H.: *J. Food Sci.*, **39**, 1018 (1974)
- Ariyama, H.: *U.S. Patent*, **3,096** 177 (1973)
- Rogosa, M. and Sharpe, M.E.: *J. Appl. Bacteriol.*, **22**, 329 (1959)
- Mital, B.K., Shallenberger, R.S. and Streinkraus, K.H.: *Appl. Microbiol.*, **26**, 787 (1973)
- Yu, J.H., Park, C.K. and Lew, I.D.: Abstract, 37th Ann. Meeting, *Kor. Soc. Food Sci. Technol.* (1986)
- Yu, J.H., Park, C.K. and Lew, I.D.: Abstract, 28th Ann. Meeting, *Kor. Soc. Appl. Microbiol.* (1986)
- Park, C.K., Lew, I.D., Yoon, S.S. and Yu, J.H.: *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **19**, 42 (1987)
- Moon, N.J. and Reinbold, G.W.: *J. Milk Food Technol.*, **39**, 37 (1976)
- Wang, H.L., Kridei, L. and Hesseltine, C.W.: *J. Milk Food Technol.*, **37**, 71 (1974)

(1987년 3월 27일 접수)