

대두유에서의 *Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces cerevisiae*의 혼합배양에 관한 연구

유주현^{1*}·오두환¹·공인수¹·박영서¹·임홍철²

¹연세대학교 공과대학 식품공학과 ²캘리포니아대학교 생물공학과

Study on Mixed Cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* in Soymilk

Yu, Ju-Hyun^{1*}, Doo Hwan Oh¹, In Soo Kong¹, Young Seo Park¹, Hong Chul Lim²

¹Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

²Department of Biochemical Engineering, University of California, USA

Lactobacillus acidophilus KFCC12731 and *Saccharomyces cerevisiae* KFCC32017 were incubated together in soymilk and the conditions for acid production were investigated. The acid production of *Lactobacillus acidophilus* was much higher when this organism was incubated with *Saccharomyces cerevisiae* in soymilk than when it was incubated alone. Optimum acid production by the mixed cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* was achieved with the following conditions; a temperature of 34°C, a 3:7-8:2 (OD 660) ratio of *Lactobacillus acidophilus* to *Saccharomyces cerevisiae* at inoculum, a 1.5% level of sucrose fortification or a 2.0-3.0 % level of skim milk powder fortification and a culture time of 12 hours or more.

대두는 동물성 단백질에 비하여 함유량 아미노산이 적은 것을 제외하고는 영양적으로 손색이 없는 풍부한 단백질 자원이다(1). 그러나 대두는 대두유 가공중 지질의 산화 또는 분해에 의한 대두 특유의 불쾌취가 발생하고(2) 비소화성 과당류인 galacto-oligosaccharide에 의한 flatulence 현상 때문에 식품으로서 널리 이용되지 못하고 있다(3, 4). 그러므로 대두유 가공중 불쾌취를 감소시키기 위한 연구가 많이 행하여져 왔다. 그중 발효 방법이 방향성 물질을 생성하여 대두식품의 풍미를 주며 texture를 개선하는데 가장 우수한 것으로 알려져 있다(5, 6). 최근 젖산균을 이용하여 발효 대두 제품을 개발하려는 연구가 많이 진행되어 왔는데 발효 대두유의 기호성은 풍미, 맛, 색깔, texture 등 여러 요인들에 의해 결정되며 이러한 요인들은 사용하는 젖산균의 종류에 따라 크게 영향을 받는다고 알려져 있다(7, 8). 또한 Mital 등(9)은 대두유의 젖산 발효시 산생성이 충분해야 한다고 하였으며 이 산생성은 균체수, 균생육 속도, 당이용성에 의해서 결정된다고 하였다(4). 그

러나 Patel 등(10)은 대두유의 젖산균 단독발효로는 대두 특유의 냄새를 완전히 제거할 수 없다고 하였고 이는 비소화성 과당류인 galacto-oligosaccharide가 그대로 남아 있기 때문인 것으로 알려져 있다(6). 한편, 효모중에는 galacto-oligosaccharide를 분해할 수 있는 것이 있고 유제품의 향기성분으로 알려진 diacetyl과 같은 방향성 물질을 생성한다는 보고가 있다(11). Yu 등은 대두유를 *Lactobacillus bulgaricus*로 단독발효시키는 것보다 *Kluyveromyces fragilis*와 혼합배양함으로써 젖산 발효시 산생성이 잘 된다고 보고하였고(12) 대두유의 *Streptococcus lactis*를 단독배양하는 것보다 *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. helveticus* 또는 *L. plantarum*과 혼합배양하는 것이 젖산 생성이 많았으며(13, 14) 탈지유에 *S. thermophilus*와 *L. helveticus*를 각각 단독배양하는 것보다는 혼합배양하는 것이 젖산의 생성이 많았다고 하였다(15, 16). 또한 *L. acidophilus*(17, 18)와 *L. bulgaricus*(19) 등의 젖산균을 대두유에서 발효시킬 경우 단독배양하는 것보다 *K. nigricans*

Key words: Mixed culture, lactic acid fermentation, soymilk

* Corresponding author

또는 *S. uvarum*과 혼합배양하는 것이 산생성이 높았다고 하였다. 따라서 대두유의 젖산발효에서 효모를 젖산균과 혼합배양함으로써 산생성, 풍미개선 및 대두취의 제거 등의 효과를 얻고 비소화성 과당류의 분해능이 부족한 젖산균의 결함을 보완해 줄 수 있을 것으로 기대된다. 본 연구에서는 대두유에 *Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces cerevisiae*를 혼합배양하여 젖산 발효시 효모에 의하여 젖산의 생산이 촉진되는 발효 조건을 검토하여 그 결과에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 균주는 한국중균협회에서 분양 받은 *Saccharomyces cerevisiae* KFCC 32017과 여러 종의 젖산균 가운데 대두유에서 산생성능이 비교적 우수한 *Lactobacillus acidophilus* KFCC 12731을 선택하여 사용하였다. 젖산균의 보존용 배지로는 MRS 한천배지, 효모의 보존용 배지로는 YM 한천배지(12)를 사용하였다.

실험방법

대두유의 조제, 종균의 배양과 접종, 균체량의 측정, 산도의 측정법은 Yu 등이 사용한 방법(12)을 사용하였다.

결과 및 고찰

젖산균과 *S. cerevisiae*의 단독 또는 혼합배양

Yu 등(12)은 대두유에 *L. bulgaricus*를 단독배양한 것에 비해 *K. fragilis*를 혼합배양함으로써 젖산생성이 2.9배 증가한다고 보고하였다. Table 1에 나타낸 바와 같이 대두유에 여러 종류의 젖산균과 *S. cerevisiae*를 단독 또는 혼합배양한 결과 *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *Streptococcus lactis*를 단독배양하는 것보다 *S. cerevisiae*와 혼합배양하는 것이 젖산의 생성량이 많았다. 그중에서 *L. acidophilus*는 *S. cerevisiae*와 혼합배양함으로써 젖산발효가 7.7배 증가하였다. 따라서 젖산균으로서 *L. acidophilus*를 선정하여 *S. cerevisiae*와의 혼합배양 조건을 검토하였다.

Table 1. Lactic acid fermentation by single and mixed cultures of lactic acid bacteria and *S. cerevisiae* KFCC 32017 in soymilk

			single culture	mixed culture
<i>L. bulgaricus</i>	KFCC	35463	2.0	3.8
<i>L. acidophilus</i>	KFCC	12731	0.7	5.4
<i>L. casei</i>	KFCC	32821	0.7	4.7
<i>L. casei</i>	YIT	9018	0.7	3.1
<i>L. brevis</i>	IFO	3345	1.2	3.6
<i>L. delbrueckii</i>	KFCC	35468	1.0	2.8
<i>S. lactis</i>	KFCC	32406	0.9	5.0

젖산발효에 미치는 배양시간의 영향

대두유에 *L. acidophilus*와 *S. cerevisiae*를 각각 0.5% (OD 660)씩 접종한 후 혼합배양하여 이들에 의한 산생성을 조사하였다. Fig. 1은 34°C에서 36시간 배양에서의 산생성을 나타낸 것으로 12시간 이후에서 산생성이 가장 좋았다.

젖산발효에 미치는 온도의 영향

산의 생성에 미치는 온도의 영향을 알아보기 위하여 25~37°C의 범위에서 배양온도를 달리하여 산생성량을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 대두유에 *L. acidophilus*를 단독배양하였을 경우 34°C에서 최대 산생성을 나타내었다. 효모와 젖산균을 혼합배양하

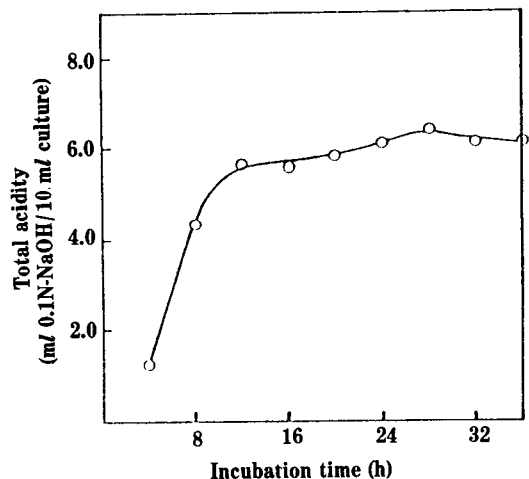


Fig. 1. Effect of incubation time on lactic acid fermentation by mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. cerevisiae* KFCC 32017 in soymilk.

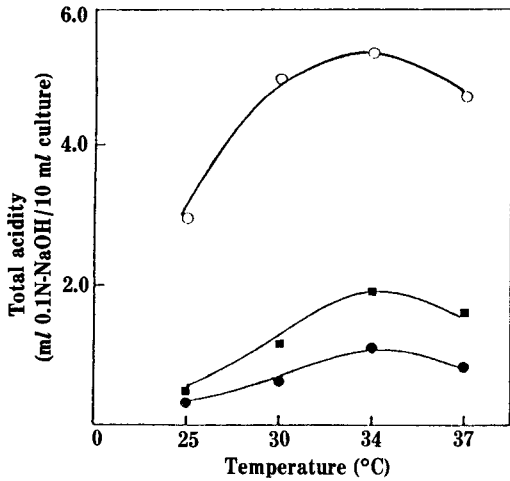


Fig. 2. Effect of temperature on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. cerevisiae* KFCC 32017 in soymilk.

- *L. acidophilus* KFCC 12731
- *S. cerevisiae* KFCC 32017
- Mixed culture

였을 경우에도 배양온도가 34°C일 때 최대 산생성을 나타내었고 이때 산생성량은 단독배양에 비해 4배 이상 많았다. 이는 Yu 등(12)이 보고한 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*의 혼합배양시 최적온도인 35°C와 유사한 결과이다.

접종 비율의 영향

*L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 혼합발효할 경우

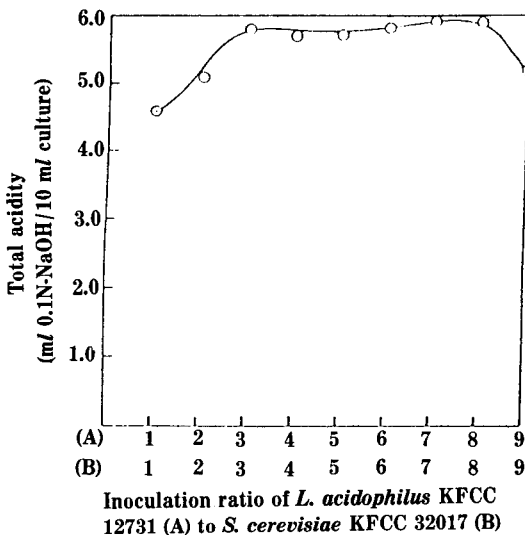


Fig. 3. Effect of inoculation ratio of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. cerevisiae* KFCC 32017 on lactic acid fermentation in soymilk.

젖산의 생성량은 두 균의 접종 비율에 의하여 달라진다고 하였다(12). *L. acidophilus*와 *S. cerevisiae*를 대두유 증에서 발효시킬 때 두 종균의 접종 비율을 다르게 하여 검토한 결과 Fig. 3과 같았다. 최적 젖산 생성을 위한 *L. acidophilus*와 *S. cerevisiae*의 최적 접종 비율은 OD 660 값으로 3:7~8:2로 광범위하게 나타났다.

탄소원의 영향

*S. cerevisiae*와 *L. acidophilus*로 24시간 혼합발효한 대두유의 산도는 6.0으로 비교적 낮은 편이었다. 이것은 젖산균이 대두유 중에 존재하는 당류 전부를 이용한다 할지라도 충분한 산생성을 하는데는 그 양이 부족하기 때문이라고 생각된다(10). 따라서 많은 양의 산을 생성하기 위해서는 대두유 중에 당류를 첨가함으로써 가능하다고 생각된다. 또한 탄소원의 종류와 농도에 따라 젖산의 생성량이 변하므로 대두유에 여러 종류의 탄소원을 2% 농도로 첨가하여 젖산의 생성을 검토하였다. Table 2에 나타난 것과 같이 산의 생성은 *L. acidophilus* 단독배양시 대두유에 sucrose, glucose, maltose, lactose를 각각 첨가함으로써 대조유의 산도 0.8에 비하여 많이 생성되었다. 그중에서 glucose를 첨가하였을 경우는 산도가 8.6으로 10배 이상 증가되었다. *S. cerevisiae*의 경우 산의 생성은 첨가된 당의 종류에 영향을 적게 받았다. 그러나 젖산균과 효모를 혼합배양할 경우는 단독배양의 경우에 비하여 당의 첨가유무에 관계없이 산의 생산이 많았다. 첨가한 당 중에서 sucrose 또는 glucose를 첨가함으로써 충분한 산의 생성을 얻을 수 있었다. 이때의 산도는 각각 8.4, 10.1이었다. 젖산생성과 동시에 상쾌한 감미를 부여하는 sucrose를 선택하여 산생성에 미치는 sucrose 농도의 영향을 검토한 결과는 Fig. 4와 같았다. *L. acidophilus*와 *S. cerevisiae*를 단독배양하였을 경우

Table 2. Effect of sugar on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. cerevisiae* KFCC 32017 in soymilk.

	control	sucrose	glucose	maltose	lactose
<i>L. acidophilus</i> KFCC 12731	0.8	1.2	8.6	7.8	7.7
<i>S. cerevisiae</i> KFCC 32017	2.0	2.8	2.8	2.4	1.9
Mixed culture	5.4	8.4	10.1	9.2	8.2

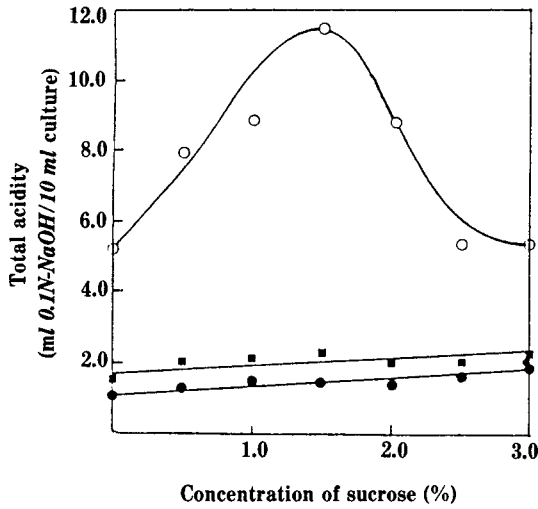


Fig. 4. Effect of sucrose concentration on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. cerevisiae* KFCC 32017 in soymilk.

- *L. acidophilus* KFCC 12731
- *S. cerevisiae* KFCC 32017
- Mixed culture

산의 생성은 첨가한 sucrose의 농도에 영향이 적었고 이때의 산도는 2.0 이하였다. 그러나 이 두 균을 혼합배양하였을 경우는 첨가한 sucrose의 농도에 따라 산생성량의 변화가 많았다. 최적 산생성을 위한 sucrose의 첨가 농도는 1.5%이었고 이때 산도는 젓산균 단독배양에 비하여 6배 이상이었다. 이 결과는 대두유에 *L. bulgaricus*와 *K. fragilis*를 혼합배양하였을 경우의 최적 산생성을 위한 첨가당의 농도 1.0-1.5%와 유사한 결과를 나타냈다(12). 혼합배양시 sucrose를 첨가함으로써 산생성량이 증가하는 것은 sucrose가 *S. cerevisiae*에 의하여 *L. acidophilus*가 발효시킬 수 있는 glucose와 fructose로 가수분해되기 때문이라고 생각할 수 있다.

Skim milk 농도의 영향

Wang 등(8)은 cheese 제조와 요구르트 제조에 지금까지 사용되고 있는 방법과 젓산균들을 그대로 이용하여 두유만을 발효하였을 경우 풍미개선이 불충분하다고 하였다. Yamanaka 등(20)은 대두단백수용액을 *L. bulgaricus*와 *S. thermophilus*로 혼합배양할 때 탈지분유 10%(w/v)와 아미노산 0.07%(w/v)를 첨가하여 대두취를 억제시켰다. Dimove 등(21)은 우유를 *S. thermophilus*로 젓산발효시킨

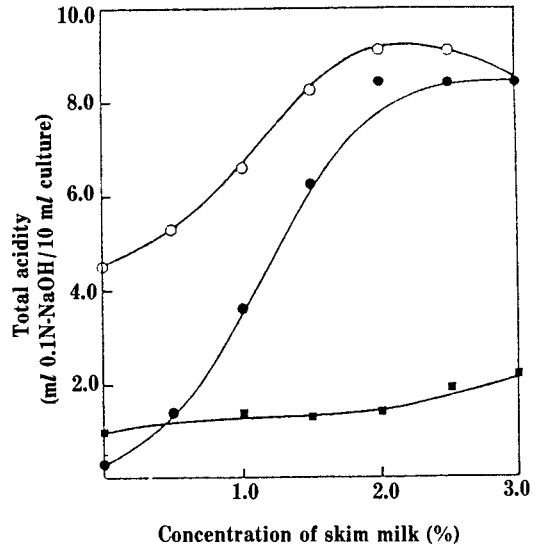


Fig. 5. Effect of skim milk concentration on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. cerevisiae* KFCC 32017 in soymilk.

- *L. acidophilus* KFCC 12731
- *S. cerevisiae* KFCC 32017
- Mixed culture

다음 두유와 혼합하여 풍미가 우수한 sour soy milk를 제조하였다고 한다. 한편 Yamanaka 등(20)은 *S. thermophilus*, *S. faecalis*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* 등의 젓산균으로 10% 환원 탈지유를 발효시킬 때 두유를 첨가한 경우가 첨가하지 않은 경우보다 산생성이 높았으며 두유의 첨가효과는 70%(v/v)까지 좋았다고 한다. 이와같이 풍미개선과 산생성을 높이기 위하여 두유에 탈지유를 0~3.0%(w/v) 범위의 농도로 첨가한 다음 34°C에서 24시간 젓산발효시켜 탈지유 첨가량에 따른 산생성에 대하여 검토하였고 그 결과는 Fig.5와 같았다. *L. acidophilus*만을 단독배양하였을 경우 그리고 *S. cerevisiae*와 혼합배양한 경우 모두 두유보다 skim milk를 첨가한 두유에서 산생성량이 많았다. 2.0%(w/v) 농도까지 skim milk의 첨가량이 증가함에 따라서 산생성량도 증가하였으며 그 이상의 농도에서는 변화가 없었다. Yu 등(12)은 *L. bulgaricus*만을 단독배양하였을 경우와 *K. fragilis*와 혼합배양한 경우 모두 skim milk를 1.5% 농도까지 첨가했을 때 첨가량이 증가함에 따라 산생성량이 급격히 증가하였으며, 이때의 산생성량은 *L. bulgaricus*로 단독배양한 경우보다 *K. fragilis*와 혼합배양한 경우가 많

Table 3. Effect of sucrose and skim milk on lactic acid fermentation by single and mixed cultures of *L. acidophilus* KFCC 12731 and *S. cerevisiae* KFCC 32017 in soymilk.

	control	sucrose (1.5%)	skim milk (3.0%)	sucrose + skim milk
<i>L. acidophilus</i> KFCC 12731	0.8	1.3	10.2	10.0
<i>S. cerevisiae</i> KFCC 32017	2.0	2.3	2.2	2.2
Mixed culture	5.6	12.0	10.6	12.1

았다고 한다.

이상의 결과로부터 대두유에 sucrose와 skim milk를 첨가하여 젓산발효할 경우 산의 생성량이 많았으므로 대두유에 sucrose 1.5%, skim milk 3.0%를 단독 또는 혼합하여 첨가하여 34°C에서 24시간 배양하여 산생성량을 비교하였다. Table 3에 나타난 것과 같이 *S. cerevisiae*와 *L. acidophilus*를 단독배양하였을 경우 산생성은 각각 2.2, 10.0으로 sucrose와 skim milk의 혼합첨가 영향이 적었다. 위 두 균을 혼합배양하였을 경우 산생성은 대두유만을 이용한 배지에서 5.6, sucrose를 1.5% 첨가한 배지에서 12.0, skim milk를 3.0% 첨가한 배지에서는 10.6이었고 sucrose 1.5%와 skim milk 3.0%를 동시에 혼합한 배지에서는 12.1이었다. 이 결과로부터 대두유 중에 sucrose와 skim milk를 단독으로 첨가한 것과 혼합 첨가한 것의 산생성량은 비슷하다는 것을 알 수 있었다.

요 약

Lactobacillus acidophilus KFCC 12731 과 *Saccharomyces cerevisiae* KFCC 32017을 두유 배지에 접종하여 산생성 조건을 검토하였다. *L. acidophilus*를 단독배양하는 것보다 *S. cerevisiae*와 혼합배양하는 것이 산생성이 많았다. 이 두 균을 대두유 배지에 혼합배양하였을 경우 최적조건은 다음과 같았다. 두유에 sucrose를 1.5% 또는 skim milk를 2.0~3.0% 첨가하고 *L. acidophilus*와 *S. cerevisiae*의 접종 비율은 OD 600 값으로 3 : 7~8 : 2가 되게 접종하여 34°C에서 12시간 이상 배양할 때 산생성이 최대가

되었다.

참고문헌

- Bressani, R., and L.G. Elias: *Advances in Food Research*, **16**, 1 (1968).
- Rackis, J.J., D.H. Honing, D.J. Sessa and H.A. Mosser: *Cereal Chem.*, **49**, 586 (1972).
- Steggerda, F.R., E.A. Richards and J.J. Rackis: *Soc. Exph. Biol. Med.*, **121**, 1235 (1966).
- Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Food Protection*, **42**(11), 895 (1979).
- Hesseltine, C.W.: *Mycologia*, **57**, 149 (1965).
- Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Food Sci.*, **39**, 1018 (1974).
- Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Milk Food Technol.*, **39**(5), 342 (1976).
- Wang, H.L., L. Kraidie and C.W. Hesseltine: *J. Milk Food Technol.*, **37**(2), 71 (1974).
- Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Food Sci.*, **40**, 114 (1975).
- Patel, A.A., W.M. Wahgmare and S.K. Gupta: *Proc. Biochem.*, **10**, 9 (1980).
- Collins, E.B.: *J. Dairy Soc.*, **55**, 1012 (1972).
- Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and I.S. Kong: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 263 (1987).
- Park, C.K., I.D. Lew and J.H. Yu: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 487 (1986).
- Park, C.K., I.D. Lew, S.S. Yoon and J.H. Yu: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 42 (1986).
- Yoon, S.S., C.K. Park and J.H. Yu: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 151 (1985).
- Yoon, S.S. and J.H. Yu: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **18**, 492 (1986).
- Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and I.S. Kong: *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 162 (1987).
- Kong, I.S., J.S. Lee, Y.S. Chung, I.D. Lew, D.H. Oh and J.H. Yu: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 355 (1987).
- Lew, I.D., J.H. Yu, C.K. Park and I.S. Kong: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 263 (1987).
- Yamanaka, Y. and S. Okumura: *U.S. Patent*, 3,535,117 (1970).
- Dimove, N., O. Dazhondzhorova and A. Kozhev: *Khranit. Promst.*, **29**(5), 12 (1980).

(Received February 26, 1988)