

*Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 대두유의 당 변화

공인수 · 공재열 · 유주현*

부산 수산대학교 생물공학과, *연세대학교 공과대학 식품공학과

Changes of Oligosaccharide in Soymilk with Mixed Cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum*

In-Soo Kong, Jai-Yul Kong and Ju-Hyun Yu*

Department of Biotech. and Bioeng., National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

*Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120, Korea

Abstract

The oligosaccharide metabolism in soymilk was investigated by mixed culture with *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum*. When *Saccharomyces uvarum* was cultured in soywhey, change of oligosaccharide could be shown apparently. However, *Lactobacillus acidophilus* could not utilize oligosaccharide in soywhey for growth and lactic acid production. During the fermentation of mixed culture with *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces uvarum* was supposed to convert oligosaccharide to monosaccharide first and then *Lactobacillus acidophilus* to convert these produced monosaccharide to lactic acid.

Key words: oligosaccharide, soymilk, lactic acid, mixed culture

서 론

대두는 풍부한 단백질 자원이지만¹⁾ 대두유 가공중 지질의 산화 또는 분해에 의한 대두 특유의 불쾌취가 발생하고 비소화성인 galacto-oligosaccharide에 의한 flatulence 현상 때문에 식품으로 널리 이용되지 못하고 있다²⁻⁴⁾. 단지 아시아의 여러 나라에서만 간장, 된장, 두부, Tempe 등의 일부 식품에서만 사용되어 왔다. 대두유 가공중 생기는 불쾌취를 감소시키기 위한 연구가 행해져 왔으나 그 중 발효방법이 방향성 물질을 생성하여 대두 식품의 풍미를 증가시켜 주며 texture를 개선하는데 우수한 것으로 알려져 있다^{5,6)}. Kellogg에 의해서 처음으로 대두유를 젖산균에 의한 젖산 발효를 연구한 이후 젖산균을 이용한 발효대두 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^{2,3,7)}. Wang⁵⁾, Mital²⁾ 등은 *L. acidophilus*를 사용하여 대두유를 발효시켰을 때 발효 우유보다는 못하였지만 다른 젖산균과 비교하여 높은 산 생성을 보였으며 flavor, texture 등이 향상되었으나 젖산

발효에 널리 이용되는 *L. bulgaricus*는 대두유에 들어있는 sucrose와 다른 carbohydrate를 이용할 수 없기 때문에 생육과 산생성이 나쁜 것으로 알려져 있다.

대부분의 젖산균들은 일반적으로 glucose, fructose, galactose, lactose, maltose 등의 당류를 잘 이용하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 그러나 대두 중에는 주로 acidic polysaccharides, cellulosic material 등의 다당류와 sucrose, raffinose, stachyose 등의 과당류만이 함유되어 있을 뿐이다¹⁰⁾ (Fig. 1). 그러므로 젖산균의 생육과 산생성을 높이기 위해 발효성 당류를 첨가한 경우를 많이 볼 수 있다^{2,8,9,11)}. 대두유를 젖산균으로 발효시킬 때 발효성 당류의 첨가는 균의 생육과 산생성은 증가시킬 수 있었으나 섭취하였을 때 소화되지 않는 raffinose, stachyose 등의 비소화성 당류(flatulence factor)가 대두유 중에 그대로 남아 있는 것이 결점이다^{13,12)}. 대두유의 젖산 발효시 산도가 높고 풍미가 좋으면서 비소화성 당류인 raffinose, stachyose의 함량이 적거나 거의 없는 젖산 발효 대두유를 제조하기 위해서는 상호보완적인 혼합배양을 생각할 수 있다. 본 연구실에서는 대두유를 젖산균만으로 단독 배양할 때 갖는 결점들을 개선하기 위해서 젖산균의 효모 및 젖산균간의 혼합배양에 관한 연구결과를 보고하였다¹³⁻²⁰⁾. 그중 전보에서 invertase와 melibiase 활성이 높은 *S. uvarum*을 선정하여 *L. acidophilus*와 혼합발효를 행하여 대두유를 이용한 산생성 최적 조건을 검토하여 보고하였다¹⁸⁾. 본 연구에서는 전보에

Corresponding author: Kong, In-Soo, Department of Biotech. and Bioeng., National Fisheries University of Pusan, 599-1, Daeyon-dong, Nam-Ku, Pusan 608-737, Korea

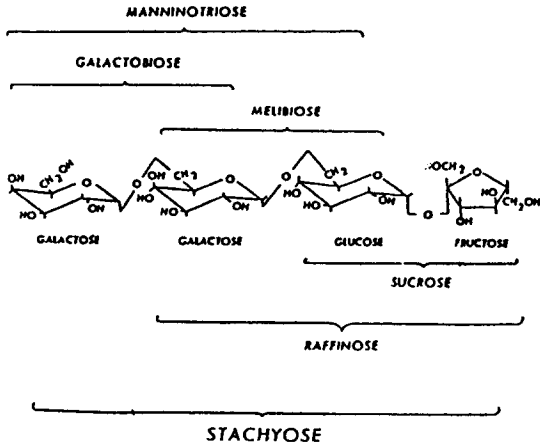


Fig. 1. Structure of stachyose

이어 *S. uvarum*과 *L. acidophilus*의 혼합배양 중에 일어나는 oligosaccharide의 대사과정에서 대두유에 포함되어 있는 당의 변화를 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에 사용한 *S. uvarum*(KFCC 32021), *L. acidophilus*(KFCC 12731)는 한국 중균협회로부터 분양받아 사용하였다. 보존용 배지로는 YM(yeast-malt extract) 배지를 효모에 사용하였고 젖산균의 경우 MRS 배지를 사용하였다.

대두유의 조제 및 Soywhey의 제조

대두유의 조제 및 soywhey의 제조는 Yu 등이 사용한 방법⁽¹³⁾을 사용하였다.

총 산도 측정⁽²¹⁾

대두유, soywhey에서 배양한 배양액 10 ml에 동량의 증류수를 첨가하고 0.5% phenolphthalein을 지시약으로 하여 automatic titrator(Kyoto electronics AT 107, Japan)를 이용하여 0.1 N NaOH로 중화적정하였다. 이때 소비된 NaOH 용액의 ml수를 총산도로 표시하였다.

배양액의 당분석

당 분석을 위한 시료의 재료는 Lew⁽²²⁾등의 방법에 따라 행하였다. 배양액 1 ml에 동량의 acetonitrile를 첨가하여 단백질을 변성시킨 후 제거하기 위하여 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 clarification kit(Waters Co.)을 통과시킨 액을 HPLC(Waters Co.)를 사용하여 발효과정 중의 당 변화를 분석하였다. 분석에 사용한 column으로는 μ Bondapak carbohydrate column을 사용하였으며 mobile phase로써 acetonitrile : water(70 :

Table 1. Effect of sugar addition on acid production by single and mixed culture in soymilk

Sugar	<i>S. uvarum</i> KFCC 32021	<i>L. acidophilus</i> KFCC 12731	Mixed culture
Control	2.1	0.7	4.2
Glucose	4.2	9.5	11.8
Fructose	2.8	9.0	10.5
Maltose	2.2	6.2	7.2
Lactose	2.5	9.2	9.3
Sucrose	3.9	2.4	10.3

30), detector는 IR detector R401을 사용하였다.

결과 및 고찰

산생성에 미치는 당의 영향

대두유에서 *L. acidophilus*가 이용하여야 할 당으로서 는 sucrose, melibiose, raffinose, stachyose와 같은 oligosaccharide가 대부분이다. 전보에서 보고한 바와 같이⁽¹⁸⁾ 대두유를 *L. acidophilus*로 단독 배양하는 것만으로는 산생성이 거의 없었다. 이는 *L. acidophilus*가 대두유에 존재하는 당을 잘 이용하지 못함을 보여주었다. 본 실험에서는 대두유에 여러가지 당을 2%(w/v) 첨가하여 산생성을 검토한 결과 Table 1에 나타난 것과 같이 glucose, fructose, maltose, lactose를 대두유에 첨가하여 *L. acidophilus* 단독 및 *S. uvarum*과의 혼합배양 결과 단독배양만으로도 높은 산생성을 보였다. 이는 대두유만을 단독배양하여 얻은 산생성량과 비교할 때 대두유에 존재하는 당은 이용하지 못하나 *L. acidophilus*가 이용할 수 있는 당을 첨가하면 첨가된 당만을 이용하여 발효를 하고 있는 것으로 보인다. 이와 같은 결과는 *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. lactis* subsp. *diacetylactis*, *L. casei*, *L. helveticus*를 대두유에서 배양할 때 glucose, lactose, whey power를 첨가하면 산의 생성이 증가된다는 Angeles⁽⁹⁾, Mital⁽²³⁾의 보고와 일치하였다. *L. acidophilus* 단독으로는 sucrose를 단당류와 같이 잘 이용하지 못하여 산생성량이 낮지만 *S. uvarum*과 혼합배양하면 다른 단당류와 같은 수준의 산생성을 보였다. 이와 같은 결과는 sucrose를 첨가하여 혼합배양하면 *S. uvarum*에 의해서 sucrose가 galactose와 fructose로 분해되어 이를 *L. acidophilus*가 젖산발효에 이용하는 것으로 생각되었다. 이와 같은 결과를 확인하기 위하여 MRS broth에 대두유에 존재하는 oligosaccharide를 첨가하여 산생성을 검토하였다.

대두유를 젖산발효에 이용하기 위해서는 대두유에 존재하는 sucrose, melibiose, raffinose, stachyose와 같은 oligosaccharide의 이용이 필수적이며 이를 위해서는 invertase, melibiase, galactosidase의 효소작용이 있어야만 한다.

대두유가 아닌 합성배지에서 *L. acidophilus*와 *S. uva-*

Table 2. Effect of sugar addition on acid production by single and mixed culture in MRS broth

Organism	Acidity (ml 0.1 N NaOH/10 ml culture)						
	Glucose	Galactose	Fructose	Sucrose	Melibiose	Raffinose	None ^a
<i>L. acidophilus</i> KFCC 12731	17.8	16.8	18.8	2.4	0	0	0
<i>S. uvarum</i> KFCC 32021	0.6	0.4	0.8	1.6	0.1	0.2	0.4
Mixed culture	15.4	14.2	15.8	11.0	0	4.6	0

^awithout sugar in MRS broth

*rum*의 당 이용성을 알아보기 위하여 MRS broth중 glucose 이외에 여러가지 당을 2%(w/v) 첨가하여 *S. uvarum*은 30°C, *L. acidophilus*의 단독 및 혼합배양은 37°C, 48시간 배양 후 산생성을 측정한 결과 Table 2에 나타난 바와 같이 glucose, galactose, fructose의 단당류를 첨가하였을 때는 *L. acidophilus*의 단독배양만으로도 높은 산생성을 보였다. 그러나 대두유에 많이 존재하고 있는 당인 sucrose를 첨가하여 *L. acidophilus* 단독배양했을 때는 산생성이 낮게 나타났으며 melibiose, raffinose를 첨가하면 전혀 산생성이 나타나지 않았다. 이와 같은 결과는 *L. acidophilus*가 대두유에 존재하는 oligosaccharide를 분해할 수 있는 효소의 활성이 낮거나 없는 것으로 생각된다. 그러나 *L. acidophilus*와 *S. uvarum*을 단당류와 oligosaccharide가 첨가된 MRS broth에서 배양한 결과 높은 산생성을 보였다.

Sucrose가 첨가된 경우 *L. acidophilus* 단독배양에서는 산생성이 낮았으나 *S. uvarum*과 혼합배양했을 때의 산생성은 단당류를 첨가했을 때의 산생성량에 가까운 높은 값을 보여주었다. 특히 raffinose가 첨가된 경우 *L. acidophilus* 단독배양으로는 전혀 산생성이 없었으나 혼합배양하면 산생성이 높게 증가되었음을 보였다. 이는 *L. acidophilus*는 단독배양에서 sucrose를 젓산발효에 조금 이용하며 melibiose, raffinose는 전혀 이용하지 못하였으나 혼합배양하면 *S. uvarum*에 의해서 sucrose, raffinose가 젓산 발효를 행하는 것으로 생각되었다.

Soywhey의 배양에 따른 당변화

*S. uvarum*이 Table 1, 2에 보여주듯이 sucrose를 가수분해하는 invertase, melibiose를 분해하는 melibiase 그리고 raffinose, stachyose 분자내의 α -galactosidic bond를 가수분해하는 α -galactosidase 활성이 있다면 stachyose, raffinose, melibiose, sucrose는 완전히 가수분해되어 galactose, glucose, fructose와 같은 단당류를 유리시킬 것으로 생각되어 이를 확인하기 위하여 soywhey에 *L. acidophilus*, *S. uvarum*을 단독 및 혼합배양하여 배양시간에 따라 soywhey의 당변화를 HPLC로써 분석하였다.

Fig. 2는 표준물질의 HPLC chromatogram으로 단독 및 혼합배양에 따른 당의 변화를 알아보기 위한 기준으로 사용하였으며 Lew⁽²²⁾의 결과와 일치하였다. Mannitotriose의 retention time은 Lew⁽²²⁾의 결과를 인용하였다.

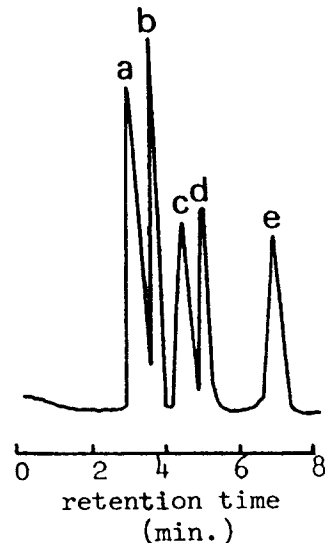


Fig. 2. HPLC chromatogram of sugars in standard solution

Retention time(min)	Sugar
a	monosaccharide (glucose + galactose)
b	sucrose
c	melibiose
d	raffinose
e	stachyose

Fig. 3에 나타난 바와 같이 soywhey 중에는 미량의 단당류(glucose, galactose, fructose)와 다량의 sucrose, stachyose, raffinose가 함유되어 있었다. *L. acidophilus*를 soywhey에서 8시간, 16시간 배양하여 분석한 결과 미량의 단당류만을 이용하였을 뿐 oligosaccharide는 전혀 이용하지 못하였다. 그러나 *S. uvarum*을 배양하여 분석하여 본 결과 Fig. 4에서 볼 수 있듯이 12시간까지 많은 양의 sucrose, melibiose, raffinose가 단당류로 분해되었고 stachyose도 약간 분해되어 단당류와 mannitotriose가 형성되었음을 보여주었다. 16, 20시간 배양에서는 sucrose는 모두 분해되었으며 stachyose도 많이 분해되어 mannitotriose가 많이 생성되었다. 이는 *S. uvarum*이 sucrose, raffinose, stachyose 분자내의 fructose 결합(α, β -1,2결합)을 가수분해하는 invertase 활성이 강하고 melibiose를 분해하는 melibiase 활성도 있다는 것을

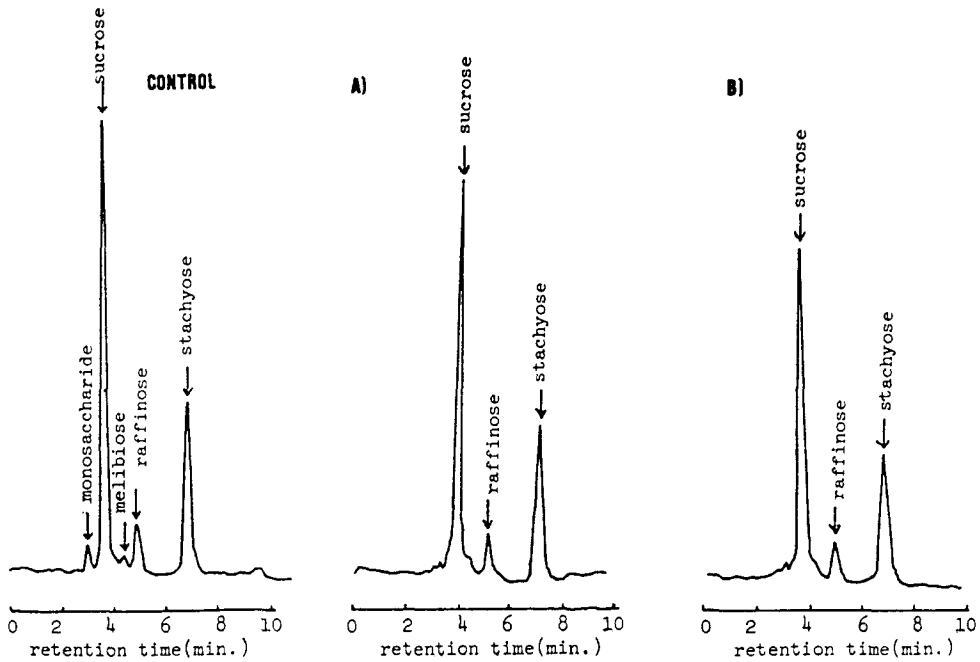


Fig. 3. HPLC chromatogram of free sugars in fermented soyhey by *L. acidophilus*
 control; soyhey
 A; fermented soyhey for 8 hrs
 B; fermented soyhey for 16 hrs

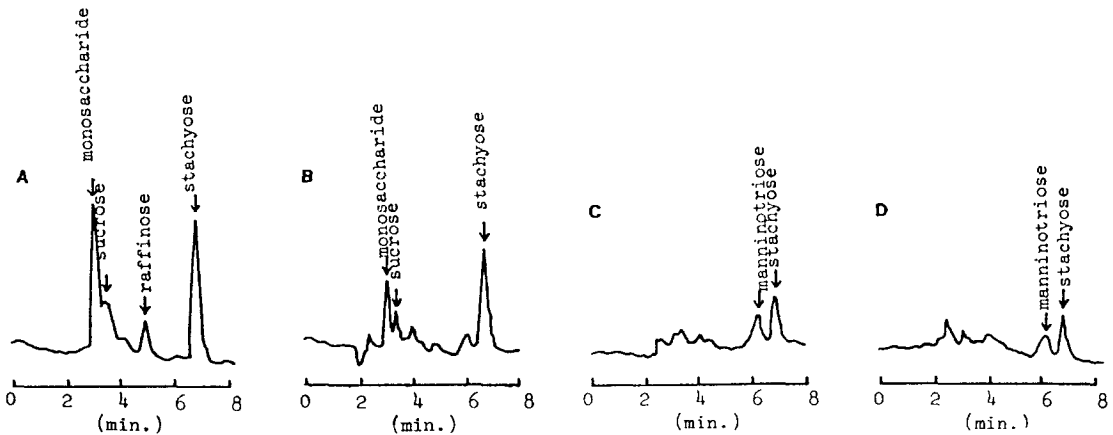


Fig. 4. HPLC chromatogram of free sugars in fermented soyhey by *S. uvarum*
 A: fermented soyhey for 8 hrs
 B: fermented soyhey for 12 hrs
 C: fermented soyhey for 16 hrs
 D: fermented soyhey for 20 hrs

보여주었다.

*S. uvarum*과 *L. acidophilus*를 혼합배양하여 나타나는 당변화를 분석한 결과 Fig.5에 나타나듯이 배양 후 4 시간까지는 soyhey에 존재하는 당에 변화가 없었으나 배양 후 8시간부터 sucrose가 분해하면서 단당류의 생

성이 현저하게 증가하게 되었다. 20시간 배양에서는 raffinose는 완전히 분해되었고 stachyose도 단당류와 manninotriose로 분해되었다. 20시간 배양 후 산도는 *L. acidophilus* 단독배양일 때 1.0, *S. uvarum* 단독배양일 때 1.2이었으나 혼합배양했을 때 4.0으로 산생성이 증가하

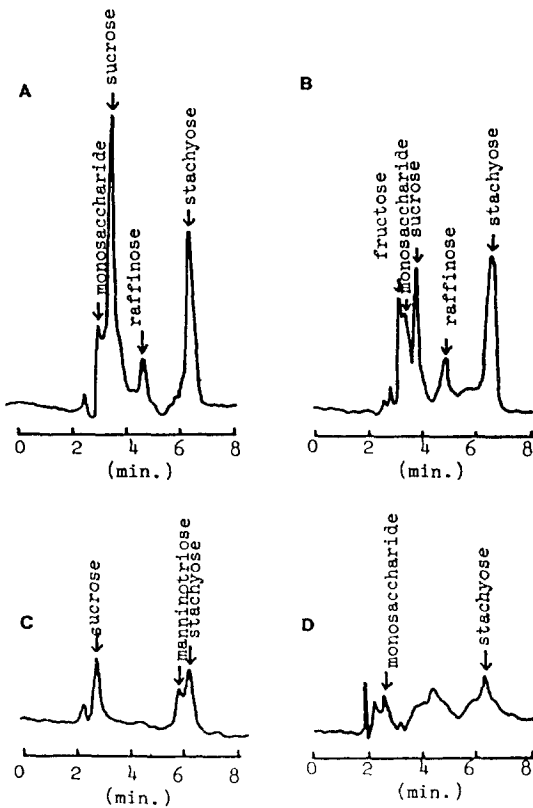


Fig. 5. HPLC chromatogram of free sugars in fermented soywhey by mixed culture of *S. uvarum* and *L. acidophilus*

- A: fermented soywhey for 4 hrs
- B: fermented soywhey for 8 hrs
- C: fermented soywhey for 16 hrs
- D: fermented soywhey for 20 hrs

었다.

당의 변화와 산생성의 결과로부터 *L. acidophilus*가 대두유에 존재하는 sucrose, raffinose, stachyose 등의 당류를 이용하지 못하였지만 이러한 oligosaccharide를 단당류로 분해할 수 있는 *S. uvarum*과 혼합배양함으로써 *S. uvarum*에 의해서 분해된 단당류를 *L. acidophilus*가 젖산발효에 이용하고 있다는 것을 알 수 있었다.

요 약

대두유의 oligosaccharide를 분해할 수 있는 *S. uvarum*을 이용하여 *L. acidophilus*와 혼합배양을 행하여 당대사의 상호작용을 검토한 결과 대두유에 glucose, fructose, galactose 등의 단당류를 첨가하여 *L. acidophilus* 단독배양만으로도 높은 산생성을 보여주었으며 혼합배양의 경우도 단당류를 잘 이용하였다. Sucrose가 첨가된 배지에서의 *L. acidophilus*의 단독배양에서는 산생성이 낮았으나 혼합배양을 했을 때는 다른 단당류만큼

증가되었다. 배양시간에 따른 soywhey의 당변화를 검토한 결과 *L. acidophilus* 배양에서는 당변화가 거의 없었으나 *S. uvarum*은 sucrose, stachyose, raffinose와 같은 oligosaccharide를 분해하고 있어 혼합배양중 oligosaccharide로부터 분해된 단당류를 *L. acidophilus*가 젖산발효에 이용하는 것으로 생각되었다.

문 헌

1. Bressani, R. and L.G. Elias: Processed vegetable protein mixtures for human consumption in developing countries. *Advances in Food Research*, **16**, 1(1968)
2. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: Flavor acceptability of unfermented and lactic fermented soymilks. *J. Milk Food Technol.*, **39**, 342(1976)
3. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: Utilization of oligosaccharides by lactic acid bacteria during fermentation of soymilk. *J. Food Sci.*, **40**, 114(1975)
4. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: Fermentation of soymilk by lactic acid bacteria. *J. Food Protection*, **42**, 895(1979)
5. Wang, H.L., K. Kraidie and C.W. Hesseltine: Lactic acid fermentation of soybean milk. *J. Milk Food Technol.*, **37**, 71(1974)
6. Printhong, R., R. Macrae and J. Rothwell: The development of a soya-based yoghurt: Acid production by lactic acid bacteria. *J. Food Technol.*, **15**, 647(1980)
7. Mital, B.K.: Fermentation of soymilk oligosaccharides by lactic acid bacteria. *Diss. Abst. Intern.*, **B35**, 880 (1974)
8. Kanda, H., H.L. Wang, C.W. Hesseltine and K. Warner: Yoghurt production by *Lactobacillus* fermentation of soybean milk. *Process Biochem.*, **11**(4), 23(1976)
9. Angeles, A.E. and E.H. Marth: Growth and activity of lactic acid bacteria in soymilk. *J. Milk Food Technol.*, **34**, 30(1971)
10. Kawamura, S. and M. Toda: Review of PL480 work on lactic acid bacteria in soymilk. *Tech. Bull. Fac. Agr., Kagawa Univ., Japan*, **18**, 138(1967)
11. Matsuoka, H., K. Sasago and M. Sekiguchi: Manufacturing of a cheese-like product from soybean milk. *Food Sci. Technol. (Tokyo)*, **15**, 103(1968)
12. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: Growth of lactic acid bacteria in soymilks. *J. Food Sci.*, **39**, 1018(1974)
13. Park, C.K., I.D. Lew and J.H. Yu: Effect of peptide on the mixed fermentation of *Lactobacillus helveticus* YM-1 and *Streptococcus lactis* ML3 in skim milk. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **14**, 487(1986)
14. Yoon, S.S., C.K. Park and J.H. Yu: Interaction of *Lactobacillus helveticus* YM-1 and *Streptococcus lactis* ML3 on the sugar fermentation in soymilk. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 42(1986)
15. Yoon, S.S., C.K. Park and J.H. Yu: Studies on the mixed culture of *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus* in milk-growth characteristics and culture conditions for the mixed culture. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **13**, 151(1985)
16. Yoon, S.S. and J.H. Yu: Identification of growth stimulatory compound in the mixed culture of *Lactobacillus*

- helveticus* YM-1 and *Streptococcus thermophilus* CH-1 in milk. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **18**, 492(1986)
17. Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and I.S. Kong: Lactic acid fermentation of soymilk by mixed culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Kluyveromyces fragilis*. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 162(1987)
 18. Kong, I.S., J.S. Lee, Y.J. Chung I.D. Lew, D.H. Oh and J.H. Yu: Lactic acid fermentation of soymilk by mixed cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 355(1987)
 19. Lew, I.D., J.H. Yu C.K. Park and I.S. Kong: Lactic acid fermentation of soymilk by mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Kluyveromyces fragilis*. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **19**, 263(1987)
 20. Yu, J.H., D.H. Oh, I.S. Kong, Y.S. Park and H.C. Lim: Study on mixed cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* in soymilk. *Korean J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 131(1988)
 21. 柳洲鉉, 梁漢喆, 鄭東孝, 梁 隆: 食品工學 實驗(II), 探求堂 p.446(1975)
 22. Lew, I.D.: Mixed culture of *Lactobacillus* and *Kluyveromyces fragilis* KFCC 35458 in soymilk. Ph.D. Thesis, Yonsei University, Korea (1987)
 23. Mital, B.K., Singh, R. and Singh, S.: Effect of carbohydrates and phosphates on acid production by lactic acid bacteria in soymilk. *J. Food Sci. Technol.*, **14**, 182 (1977)
-
- (1992년 10월 12일 접수)