

Bifidobacterium과 기타 장내 세균에 의한 두유 배양 비교

이세경·손현수*·지근역

한림대학교 식품영양학과, *주식회사 정식품 기술연구소

Comparison of Cultured Soymilk by *Bifidobacterium* and Various Human Intestinal Bacteria

Se Kyung Lee, Heon Soo Son* and Geun Eog Ji

Department of Food Science and Nutrition, Hallym University

*Research Institute of Jung Food Company

Abstract

Soymilk was cultured by various human large intestinal bacteria and lactic acid bacteria; *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium perfringens* and *Escherichia coli*. Among them, only *B. longum* utilized raffinose and stachyose actively which are major oligosaccharides present in soymilk by producing active α -galactosidase and produced greatest acid. Number of colony forming unit of *B. longum* reached 1.5×10^8 after 16 hr culture in soymilk. Also *Bifidobacterium longum* produced the highest level of α -galactosidase, β -galactosidase and α -glucosidase in soymilk during culture.

Key words: *Bifidobacterium*, soy milk, raffinose, stachyose, α -galactosidase

서 론

콩은 영양가가 높은 양질의 식품으로 평가받고 있다⁽¹⁾. 근래에 두유를 이용한 요구르트 제조에 관한 연구⁽²⁾가 다수 수행되었으며 주로 이용된 균은 *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* 및 *Streptococcus thermophilus* 등이었고 발효 대두유의 풍미, 맛, 색깔, texture 등에 관한 연구가 이루어졌다. 콩단백질도 우유의 casein과 마찬가지로 발효후 curd가 형성되고 발효후의 flavor는 발효전의 flavor보다 더 짙이 좋아졌다고 보고된 바 있다^(3,4,6). 한편 대두의 주된 당인 raffinose와 stachyose에 대하여는 현재까지 서로 다른 관점에서 연구되어 왔다. 이들은 인체의 소화계에서 분해되지 않고 대장까지 도달하는 올리고당들로 일련의 보고에 의하면 이들은 대장에서 미생물 군중에 의하여 대사되어 가스가 생산되기 때문에 복부팽만의 원인 물질이라는 주장이 있다^(5,7,8). 다른 한편으로는 최근 일부학자들을 주축으로 하여 연구된 결과로써 두유중에 올리고당이 장내균주 중 유익성 균주인 *Bifidobacterium*의 증식을 선택적으로 증가시켜 장내균총의 건강을 증진시키는 기능성 올리고당이라고 발표^(9,10)하여 전자의 보고들과 상반되는 주장을 제기하

였다. *L. acidophilus*는 raffinose와 stachyose를 이용하는 능력이 거의 없기 때문에 최근 국내에서는 두유 요구르트 중의 올리고당을 제거하기 위하여 *L. acidophilus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양을 시도하여⁽⁵⁾ 이들 당을 제거하는 연구보고를 발표한 바 있다. 본 연구에서는 *Bifidobacterium longum*을 비롯하여 *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium limosum*, *L. acidophilus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* 등을 사용하여 두유에서 배양을 비교하였고 pH, 총산, 올리고당 이용성 등을 살펴보았다. 본 연구는 이들 주요 장내균종이 두유 올리고당을 이용하는 정도를 제시하고 요즈음 주목받고 있는 *Bifidobacterium*을 이용한 발효음료 제조에의 기초 자료로 활용할 수 있을 것이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용한 *B. longum* ATCC 15707, *Bac. fragilis* ATCC 25285, *Eu. limosum* ATCC 8486, *Cl. perfringens* ATCC 13124, *E. coli* ATCC 11775 등은 ATCC (American Type Culture Collection)으로부터 분양받았고 *L. acidophilus* KCTC 3145는 한국과학기술연구원 유전자 은행에서 분양받았다. 보존용 배지는 일반적으로 BHI배지⁽¹¹⁾를 사용하였고 혐기성 배양은 Ji 등⁽¹²⁾의 방법에 준하였으며 *Lactobacillus*는 MRS(Difco)를 사용하여 배양하였다.

Corresponding author: Geun Eog Ji, Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Okcho-dong, Chunchon, Kangwondo 200-702 Korea

Table 1. Substrates for activity measurement of enzymes

Enzymes	Substrates
α -glucosidase	PNP- α -glucoside
β -glucosidase	PNP- β -glucoside
α -galactosidase	PNP- α -galactoside
β -galactosidase	ONP- β -galactoside
β -xylosidase	PNP- β -xyloside

대두유의 조제

대두유의 조제는 유⁽¹³⁾의 방법을 사용하였다.

총산도 및 pH 측정

대두유 또는 배양액 10 ml를 0.1 N NaOH로 중화 적정하여 이때 소비된 NaOH 용액의 ml수를 총산도로 표시하였다. pH는 Corning pH meter(Model 255)으로 측정하였다.

배양액의 당분석

당 분석을 위한 시료의 처리는 다음과 같이 행하였다. 즉 4 ml의 배양액을 원심분리한 후 상등액에 10% lead acetate·3H₂O 1 ml를 가한후 침전물을 제거하고 다시 상등액에 10% oxalic acid를 가하여 생성되는 침전물을 제거하였다. 상등액을 0.45 μ m의 Acrodisc membrane filter(Gelman Sciences)로 여과한 후 methanol과 증류수로 세척 및 활성화시킨 Sep-Pak 18 Cartridge에 시료를 통과시켜 시료중의 지질, 색소, 염류 등을 제거하였다. 분석에 사용한 HPLC column으로는 Carbohydrate Analysis Column(Ginsco, U.S.A.)을 사용하였으며 이동상으로 acetonitrile : water(90 : 30), detector는 RI detector를 사용하였다.

배양액의 glycosidase 역가 실험

각 배양액의 glycosidase 역가는 박 등⁽¹¹⁾의 방법을 이용하여 조사하였다. 이때 각 효소들의 역가를 측정하기 위한 기질은 Table 1과 같았다. 각 효소의 1 m unit은 주어진 반응조건에서 1분당 1 nmole의 PNP(para-nitrophenol) 또는 ONP(ortho-nitrophenol)를 유리시키는 효소의 양으로 정의하였다.

결과 및 고찰

배양액의 총산도 및 pH의 변화

본 연구에서 사용된 균주중 *B. longum*과 *L. acidophilus*는 유산균 제품에 널리 이용되며 장내에서 유익한 균주로 알려져있고 *E. coli*와 *Cl. perfringens*는 장내에서 유해성이 인정되어 있는 균주이다⁽¹⁴⁾. *Bac. fragilis*와 *Eu. limosum*은 아직 유익성과 유해성에 대한 종합적인 평가가 이루어져 있지 않은 장내에서의 균총의 평형

Table 2. Changes in pH and acidity in cultured soymilk by various intestinal bacteria

Microorganism	pH, Acidity(ml 0.1 N NaOH/10 ml culture)		
	8 hr	16 hr	48 hr
Control	6.4, 1.6	6.4, 1.6	6.4, 1.6
<i>B. longum</i>	5.1, 3.8	4.2, 9.0	4.1, 11.2
<i>E. coli</i>	5.7, 2.6	5.7, 2.7	5.7, 2.7
<i>L. acidophilus</i>	5.1, 3.3	3.9, 8.6	3.9, 9.6
<i>Eu. limosum</i>	5.9, 2.1	5.8, 2.3	5.8, 2.4
<i>Bac. fragilis</i>	6.2, 2.2	5.7, 2.7	5.2, 3.7
<i>Cl. perfringens</i>	5.1, 5.4	4.8, 6.8	4.7, 7.3

및 대사에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다⁽¹⁵⁾. 이들 균들에 대한 두유 배양중의 총산도 및 pH의 변화를 Table 2에 나타내었다. 조사된 균들중 *Eu. limosum*이 총산을 제일 낮게 생산하였으며 pH의 저하능력도 가장 낮았다. pH는 *L. acidophilus*가 가장 많이 떨어뜨렸으며 산도의 증가는 *B. longum*이 가장 많이 일으켰다. 참고로 *Bifidobacterium*의 총균수를 조사하였는데 ml 두유배양액중 8.0×10^5 의 균수를 접종하였을때 8시간 배양에서 1.2×10^8 이었고 16시간 배양에서 1.5×10^8 에 다달았으며 48시간 배양후에는 6.0×10^7 으로 떨어졌다. 배양후기에 pH의 감소와 아울러 *Bifidobacterium*의 균수가 감소된 것으로 생각된다. 본 연구에서는 두유 이외의 성분은 전혀 첨가하지 않았기 때문에 앞으로 *Bifidobacterium*을 이용한 두유 요구르트 제조를 실용화 시킬 경우에는 *Bifidobacterium*의 성장 촉진 및 사멸 방지방법 개발, 산도의 조절 및 관능성의 증진, 제품의 안정성 등에 관하여 보다 자세한 연구가 필요하다고 할 것이다. *Bifidobacterium*과 *Lactobacillus*는 장내에서 산도를 증가시키고 pH를 감소시키는 유해세균을 비롯한 다른 장내균들의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 결과를 보면 조사된 다른 균주들에 비하여 *B. longum*과 *L. acidophilus*가 산도의 증가 및 pH의 저하를 가장 촉진시켰고 이는 두유 배양액에 다른 미생물이 혼재할 경우 그들의 증식을 억제시킬 것으로 생각된다.

두유 올리고당의 이용성, α -galactosidase 및 기타 glycosidase 생산성

두유 배양액 중의 raffinose와 stachyose는 2일 배양까지 오직 *B. longum*에 의하여만 완전히 이용되었고(Fig. 1) 다른 균들에서는 거의 이용되지 않았다(data not shown). 위의 조사된 산도의 증가에서 *Bifidobacterium*이 가장 강했던 이유는 raffinose와 stachyose 등의 기질이 *Bifidobacterium*에 의하여 제일 많이 이용된 것과 상관성이 있을 것으로 사료된다. 공 등⁽⁶⁾은 *L. acidophilus*와 *S. uvarum*의 혼합배양에 의하여 raffinose와 stachyose를 제거하려고 하였지만 본 실험에서는 오직 *Bifidobacterium*만을 배양함으로써 raffinose와 stachyose를 제거하

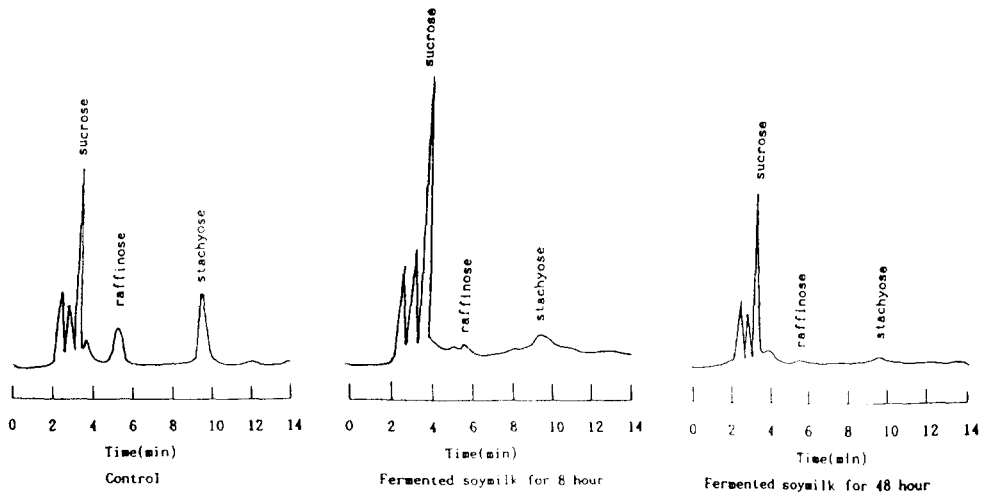


Fig. 1. HPLC chromatograms of free sugars in soymilk fermented by *Bifidobacterium longum*

Table 3. Change in activities of various glycosidases in cultured soymilk by various intestinal bacteria (m unut/ml culture)

Enzyme Hour	α -galacto- sidase			β -galacto- sidase			α -gluco- sidase		
	8hr	16hr	48hr	8hr	16hr	48hr	8hr	16hr	48hr
Microorganism									
<i>B. longum</i>	35	7	5	21	8.6	6.3	43	22	12
<i>E. coli</i>	-	-	-	8.8	8.2	6.8	-	-	-
<i>L. acidophilus</i>	-	-	-	12.3	7.3	4.1	-	-	-
<i>Cl. perfringens</i>	5	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Eu. limosum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Bac. fragilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: Activity was not detected at all or very weak

*: Production of β -glucosidase and β -xylosidase was not detected at all or very weak by all strains

는 것을 보여주는 결과였다. 그러나 서론에서 언급된 것과 마찬가지로 raffinose와 stachyose는 대장에 다달아 Bifidus factor로 작용한다는 최근의 보고⁽⁹⁾에 의하면 두 유류로부터 이들 올리고당을 제거하는 것이 바람직한 것 인지는 의문의 여지가 있고 앞으로 더욱 연구가 필요한 사항이라 할 것이다. 두유중의 raffinose와 stachyose의 분해를 담당하는 효소는 α -galactosidase인데⁽¹⁶⁾ α -galactosidase 활성 역시 *Bifidobacterium*에서 가장 높았고 *Cl. perfringens*에서는 배양초기에 약간 검출되는 상황이었 으며 다른 균주들은 배양중 전혀 검출되지 않았다(Table 3). 두유중에 생산되는 α -galactosidase 및 기타 glycosidase 활성들은 전반적으로 전에 보고된 BHI배지 배양액에서의 수준⁽¹¹⁾에 비하여 낮았다. 이는 배지의 종류 또는 *in vivo* 상태에서 장내의 환경에 따라 효소의 생산이 변동이 많을 것이라는 것을 시사한다. α -galactosidase이 외에 β -glucosidase, β -xylosidase, α -glucosidase, β -gala-

ctosidase의 활성을 측정된 결과는 Table 3에 나타내었다. β -glucosidase는 cellobiose를 분해할 뿐만 아니라 배당체 분해를 일으켜 발암 물질을 생성하는 효소로 알려져 있다⁽¹⁵⁾. 이러한 이유로 현재 *Salmonella*를 이용한 Ames 돌연변이 실험에 있어서도 어떤 물질이 대장에서 돌연변이원으로 작용하는지 검사할 때 β -glucosidase를 첨가하여 조사하고 있다⁽¹⁷⁾. *B. longum*의 경우 BHI에서 배양하였을 때 β -glucosidase가 활발히 생산되었으나 (data not shown) 본 실험의 두유배양액 중에서는 β -glucosidase 생산이 극히 미약하였다. β -xylosidase는 hemi-cellulose의 분해물인 xylooligomer를 분해하는 효소이고 β -galactosidase는 lactose, mucin, arabinogalacton과 배당체 중의 β -galactoside 결합을 분해하며 α -glucosidase는 maltose, dextrin, starch, sucrose 등의 분해에 주로 관여하는 효소이다⁽¹⁸⁾. 본 연구에서 조사된 glycosidase들은 또한 두유중에 존재하는 다당류와 섬유질 물질의 분해에 관련이 될 수 있을 것이라고 사료된다. 이상의 결과를 종합해보면 두유에서 *B. longum*은 ml당 1.5×10^8 CFU까지 배양이 되며 α -galactosidase를 생산하여 두유중의 raffinose와 stachyose 등을 분해 이용하고 산의 생산성을 증가시킨다는 것이 조사되었다. 두유를 이용한 Bifido 음료로서의 개발성명 두유의 인체내에서의 건강에 미치는 대사 및 균총에 미치는 영향 등은 앞으로 더욱더 연구가 필요한 분야라고 할 것이다.

요 약

*Bifidobacterium*과 기타 장내 세균을 두유에 배양하여 배양특성을 살펴보았다. 균주들은 다음과 같이 *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium limosum*, *Clostridium perfringens*,

*E. coli*를 사용하였다. 이들중 *B. longum*만이 높은 활성의 α -galactosidase를 생산해 두유의 주요 당인 raffinose와 stachyose를 이용하였고 가장 높은 산 생성을 보여주었다. 16시간 배양후에 *B. longum*은 1.5×10^8 CFU에 이르렀다. 또한 *B. longum*은 α -galactosidase이 외에 α -glucosidase와 β -galactosidase의 활성도 다른 균주에 비하여 가장 높았다.

문헌

- Patel, A.A., Waghmare, W.M. and Gupta, S.K.: Lactic acid fermentation of soymilk-A review. *Process Biochem.*, 15(7), 9(1988)
- Lee, S.Y., Morr, C.V. and Seo, A.: Comparison of milk based and soymilk-based yogurt. *J. Food Sci.*, 39, 1018 (1974)
- Mital, B.K. and Steinkraus, K.H.: Growth of lactic acid bacteria in soymilks. *J. Food Sci.*, 39, 1018(1974)
- Mun, S.A. and Ko, Y.T.: Keeping quality of yogurt beverage prepared from soy protein isolate. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 18, 124(1986)
- 공인수, 공재열, 유주현: *Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 대두유의 당변화. *한국식품과학회지*, 24, 519(1992)
- Mital, B.K. and Steinkraus, K.H.: Flaver acceptability of unfermented and lactic fermented soymilks. *J. Milk Food Technol.* 39, 342(1976)
- Steggerdo, F.R., Richards, E.A. and Rackis, J.J.: Effect of various soybean products on flatulence in the adult man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 1235(1968)
- Calloway, D.H., Hickey, C.A. and Murphy, E.L.: Reduction of intestinal gas-forming properties of legumes by traditional and experimental food processing methods. *J. Food. Sci.* 36, 251(1971)
- Hayakawa, K., Mizutani, J., Wada, K., Masai, T., Yoshihara, I. and Mitsuoka, T.: Effects of soybean oligosaccharides on human fecal flora. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 3, 293(1990)
- Hayakawa, K.M., Masai, T., Yoshida, Y., Shibuta, T. and Miyazaki, H.: Enhancing growth of *Bifidobacteria* using soybean extract. US Patent 4,902,673(1990)
- 박헌국, 강동현, 윤석환, 이계호, 이세경, 지근역: 한국인 분변으로 부터 분리한 *Bifidobacterium* sp. Int-57의 효소 pattern. *한국산업미생물학회지*, 20, 647(1992)
- Ji, G.E., Han, H.K., Yun, S.W. and Rhim, S.L.: Isolation of Amyolytic *Bifidobacterium* sp. Int-57 and characterization of amylase. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2, 85(1992)
- 유주현, 류인덕, 박정길, 공인수: *Lactobacillus acidophilus*와 *Kluyveromyces fragilis*의 혼합 배양에 의한 대두유의 젖산 발효. *한국산업미생물학회지*, 15, 162(1987)
- Smith, L.D.S.: Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Reviews of Infectious Diseases.* 1(2), 254(1979)
- Goldin, B., Lichtenstein, A.H. and Gorbach, B.L.: The roles of the intestinal flora in Modern Nutrition in Health and Disease ed. by Maurice E. Shills and Vernon R. Young, 500(1988)
- Sakai, K., Tachiki, T., Kumagai, H., Tochikura, T.: Hydrolysis of alpha-D-galactosyl oligosaccharides in soymilk by alpha-D-galactosidase of *Bifidobacterium breve* 203. *Agric. Biolo. Chem.* 51, 315-322(1987)
- Maron, D.M. and Ames, B.N.: Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation research* 113, 173(1983)
- Macfarlane, G.T., Gibson, G.R. and Cummings, J.H.: Extracellular and cell associated glycosidase activities in different regions of the human large intestine. *Letters in Applied Microbiology* 12, 3(1991)

(1993년 9월 6일 접수)