

Lactobacillus acidophilus 와 *Saccharomyces uvarum* 의 혼합배양에 의한 두유의 발효 중 당이용에 미치는 작용

유주현* · 진효상¹ · 류인덕²

연세대학교 공과대학 식품공학과

Interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum* on Utilization of Galacto-oligosaccharides in Soymilk

Yu, Ju-Hyun*, Hyo-Sang Jin¹ and In-Deok Lew²

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

The enhanced growth and lactic fermentation of *L. acidophilus*, when mixed with *S. uvarum*, was investigated. Spent medium of *S. uvarum*, at 10%, stimulated the growth and lactic fermentation of *L. acidophilus*, and also increased the content of monosaccharide while decreased the contents of sucrose, raffinose, and stachyose in soymilk. While single culture of *L. acidophilus* consumed only the monosaccharides in soymilk, the mixed culture of *L. acidophilus* and *S. uvarum* consumed almost all the oligosaccharides as well as the monosaccharides in soymilk. Thus it was assumed that *S. uvarum* converted the oligosaccharides into monosaccharides so that *L. acidophilus* can produce more lactic acid and cell mass by using the increased monosaccharides.

젖산균의 단독배양에 의한 두유의 발효에 관한 그간의 결과(1-5)는 대부분의 젖산균이 두유의 과당류를 이용하지 못함으로 인하여 젖산 발효가 되지 않아 발효액 중의 산도가 낮고(6-9), 두유 고유의 불쾌취(10)와 비소화성 과당류에 의한 flatulence(11)가 그대로 남아 만족스럽지 못한 것으로 나타났다.

그러나 두유에 젖산균과 효모의 혼합배양을 시도한 Yu 등(12-17)의 결과는 이러한 문제가 쉽게 해결되는 것을 보여주고 있다. 즉 두유에 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus bulgaricus* 등의 젖산균과 *Kluyveromyces fragilis*를 혼합 발효시켰을 때 raffinose, stachyose와 같은 두유의 비소화성 과당류가 제거되었을 뿐 아니라 젖산균 단독배양에서 보다 훨씬 높은 산도를 나타내었다. 이와 비슷한 결과는 *Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces cerevisiae*(*Lactobacillus*는 *L.*로 *Saccharomyces*는 *S.*로 생략함)의 혼합배양에서도 확인되었다. 이러한 혼합배양은 그동안 단독배양의 단점을 보완하고자 했던 많은 시도들(18-22)에 비하

여 새롭고 효과적인 발효법인 것으로 생각된다.

이러한 효모와 젖산균의 공생의 예는 많은 식품에서 찾아볼 수 있다(23-29). 그러나 이들의 관계를 이해하는데 필요한 기초적인 연구는 거의 없는 실정이다.

Yu 등(16)은 *L. acidophilus*와 *Kluyveromyces fragilis*(*Kluyveromyces*는 *K.*로 생략함)의 혼합배양해서 더 높은 산도를 보이는 것은 효모가 젖산균이 이용하지 못하는 두유 중의 당성분을 분해시켜줌으로써 산생성에 필요한 가용성당을 증가시켜 주기 때문이며 또한(17) 두유의 단백질 분해에 의한 아미노산 생성 및 비타민 대사의 영향 때문이라고 보고하였다.

본 연구의 *L. acidophilus*와 *S. uvarum*의 혼합배양은 Yu 등의 결과에서 같이 산생성의 촉진을 나타내었다.

따라서 본 연구에서는 혼합배양 중 이들이 두유의 각종 단당류 및 과당류의 이용에 있어서 상호간에 어떠한 영향을 미치는지를 살펴보고자 하였다.

Key words: Mixed culture, soymilk, lactic acid

*Corresponding author

(1) 현재 기전여자전문대학 재직 (2) 현재 충주공업전문대학 재직

재료 및 방법

사용균주

젖산균과 효모는 연세대학교 식품공학과에 보관 중인 *L. acidophilus* KFCC 12731와 *S. uvarum* KFCC 32021를 사용하였다.

젖산균은 MRS(Difco.) 고층 배양배지에, 효모는 YM(Yeast extract 3g, Malt extract 3g, Peptone 5g, Dextrose 10g, Agar 20g, Water 1l)사면 배양배지에 각각 37, 30°C로 계대배양하며 사용하였다. 실험에 사용할 접종균액은 보관균주를 MRS broth와 YM broth에 접종하여 24시간 각각의 온도에서 배양한 것을 다시 같은 배지에 각각 1%(v/v)씩 접종하고 16-20시간 배양한 것을 사용하였다.

두유에 대한 접종량은 1%(v/v)로 하고 혼합배양의 경우는 젖산균과 효모의 비율을 4:6으로 하되 합이 1%가 되게 하였다.

두유와 두유장 및 효모 배양여액의 조제

두유와 두유장은 Yu 등의 방법(12)에 준하여 조제하였다. 그리고 두유장의 배양여액은 원심분리하여 균을 제거하고 다시 millipore membrane(0.45 μ m)로 여과한 것을 사용하였다. 두유의 배양여액은 Yu 등(16)의 방법을 일부 변경하여 실시하였다.

즉 효모배양액에 젖산을 가하여 pH를 4.2로 조절한 후 응고침전된 단백질 원심분리하여 제거한 후 상등액을 얻었다. 이 상등액에 1N NaOH를 가하여 pH를 6.6으로 환원한 후 재균한 것을 사용하였다.

당류의 분석 및 균체량과 산도의 측정

Yu 등(16)의 방법을 일부 변형하여 시행하였다. 시료 10ml에 증류수 5ml를 가하여 진탕혼합한 다음 이 혼합액 0.5ml를 취하여 1.5ml용 eppendorf tube에 넣고 acetonitrile 0.5ml를 가하여 혼합시키고 10,000 \times g에서 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액은 clarification kit(Water Co.)에 통과시킨 다음 여액을 얻고 이 여액은 SEP PAK C18 cartridge를 통과시켜 지질, 단백질, 색소물질을 제거시킨 다음 HPLC(Waters Co.)로 당의 변화를 조사하였다. 균체량의 측정과 산도의 측정방법은 Yu 등(13)이 사용한 방법을 사용하였다.

결과 및 고찰

*L. acidophilus*와 *S. uvarum*의 혼합배양의 영향

Yu 등(12, 13)은 두유에 *L. bulgaricus* 및 *L.*

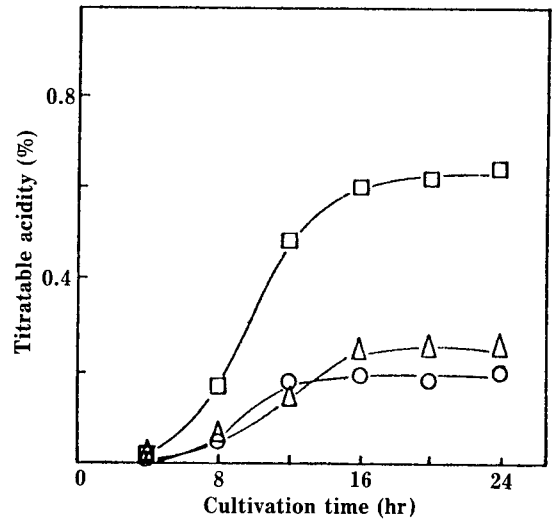


Fig. 1. Effect of single and mixed cultures by *L. acidophilus* and *S. uvarum* on lactic fermentation of soymilk.

△: Single culture by *L. acidophilus*

○: Single culture by *S. uvarum*

□: Mixed culture by *L. acidophilus* and *S. uvarum*

*acidophilus*를 *K. fragilis*와 혼합배양하였을 때 젖산균 단독배양액의 산도보다 혼합배양액의 산도가 더 높음을 보였다. 본 실험의 균주인 *L. acidophilus*와 *S. uvarum*의 혼합배양에서도 Fig.1에서와 같이 젖산균 단독배양에서도 보다 효모와의 혼합배양에서 산도가 더 높음을 볼 수 있었다.

*L. acidophilus*의 생육과 발효에 미치는 *S. uvarum* 발효여액의 영향

*L. acidophilus*를 단독배양하는 것보다 혼합배양하므로써 젖산발효가 더 잘되는 결과를 얻었으므로 효모 발효액 중의 촉진물질의 존재를 확인하여보았다.

Yu 등(16)은 *K. fragilis*의 발효여액을 100°C에서 10분간 가열처리한 것과 열처리하지 않은 것을 각각 두유에 넣고 젖산균을 배양하여 산생성의 촉진상태를 비교하였을 때 가열처리하지 않은 것이 촉진력이 있는 반면 열처리한 쪽은 촉진력을 상실하였다고 하였다.

*S. uvarum*을 두유장에서 37°C에서 24시간 배양하고 얻은 발효여액을 100°C에서 10분간 가열처리한 것과 가열처리하지 않은 것을 각각 두유 및 두유장에 10% 농도로 넣고 *L. acidophilus*의 산생성 및 생육에 미치는 영향을 검토하였을 때 Table 1과 같았다.

효모의 발효여액을 가한 두유장 및 두유의 산도는

Table 1. Effect of culture filtrate of *S. uvarum* on lactic fermentation and growth by *L. acidophilus*.

Media	Culture filtrate (10%)	Titrateable acidity (%)	Absorbance (at 660 nm)
Soywhey	blank	0.10	1.1
	raw	0.39	1.5
	heat-treated	0.11	1.1
Soymilk	blank	0.22	-
	raw	0.45	-
	heat-treated	0.24	-

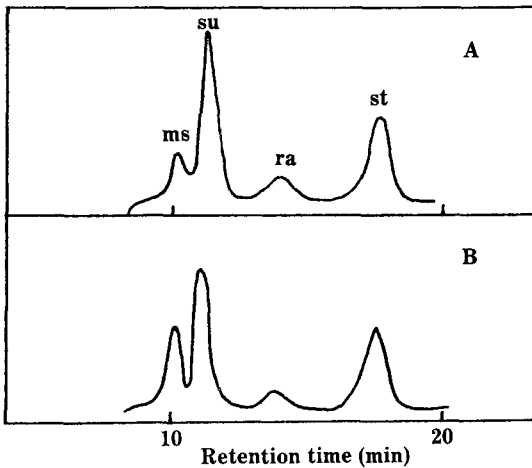


Fig. 2. HPLC chromatograms of sugars in soymilk treated by culture filtrate of *S. uvarum*. ms: monosaccharides, su: sucrose, ra: raffinose, st: stachyose. Soymilk with 10% culture filtrate was incubated at 37°C for 0 (A) and 8 hours (B).

각각 0.39%와 0.45%로서 가하지 않은 경우 0.10%와 0.22%에 비하여 각각 3.9배와 2.0배 증가하였다. 그러나 가열처리한 발효여액을 가한 경우는 가하지 않은 경우와 거의 같았다.

생육에 있어서도 가열처리하지 않은 발효여액을 가한 두유장에서의 젖산균의 흡광도는 1.5인데 반하여 가열처리한 발효여액을 가한 경우와 발효여액을 가하지 않은 경우는 1.1로 서로 같았다.

두유 발효여액에서도 열처리하지 않은 것은 산생성의 촉진작용을 보이는데 반하여 열처리한 것은 그렇지 않았고, 발효여액의 촉진작용은 효모의 배양시간이 길어짐에 따라 증가하였다 (Table 2).

이상의 결과는 젖산균과 *K. fragilis*를 혼합배양한 Yu 등(16)의 결과와 같았으며 효모가 발효액에 생성

Table 2. Effect of cultivation time of *S. uvarum* on stimulatory activity of the culture filtrate in lactic acid fermentation of soymilk by *L. acidophilus*.

Cultivation time of yeast culture (hr.)	Titrateable acidity (%)	
	Raw	Heat-treated
0	0.20	0.20
12	0.25	0.20
24	0.27	0.22
48	0.34	0.21

하는 산생성 촉진물질은 열불안정성이고 또한 발효시간 의존성이므로 보아 발효액에는 두유에 존재하는 젖산균 비발효성 당을 분해하여 주는 효소가 존재하는 것으로 생각할 수 있다.

배양여액에 sucrose, raffinose, stachyose 등의 당을 분해하는 효소작용이 있는지를 검토하기 위하여 효모의 두유발효여액을 10%가 되게 하고 8시간 반응시킨 다음 두유의 당의 변화를 HPLC에 의해 확인하였을 때 Fig.2와 같은 결과를 얻었다.

배양시간이 5시간 경과한 후는 sucrose가 감소하면서 glucose와 fructose의 단당류가 증가하였고 raffinose와 stachyose도 경미한 감소를 보였다. 이 결과는 효모의 배양여액에는 sucrose를 포함한 비발효성 당을 단당류로 분해시켜 주는 효소작용이 있음을 뒷받침하여 주고 있다.

***L. acidophilus*와 *S. uvarum*의 단독 및 혼합배양액의 잔당성분**

효모의 발효여액에 의한 당류의 변화물 효모와의 직접배양에 의한 당류변화와 비교하여 보기 위해, 두유에 *L. acidophilus*와 *S. uvarum*을 단독 또는 혼합접종하여 24시간 발효시킨 후 당성분의 잔류량을 확인하여 본 결과 Fig.3과 같았다.

*S. uvarum*의 단독배양액은 단당류, sucrose, raffinose가 거의 소비되었음에 반하여 stachyose는 일부가 남아있고 새로운 성분인 manninotriose가 생성되었음을 보여주었다. 또한 혼합배양에서는 효모의 단독배양에 비하여 단당류, sucrose 및 raffinose가 더욱 많이 소비되고 있으나 stachyose의 일부가 남아 있었다. *L. acidophilus* 단독배양액에서는 단당류만이 소비되었음을 보여주었다.

효모가 젖산균과는 달리 sucrose를 포함한 비발효성 당류를 이용할 수 있음을 보여주었다. 이상의 결과로서 효모가 이들의 다당류를 분해할 수 있는 효소를 생합성하는 것으로 생각할 수 있다.

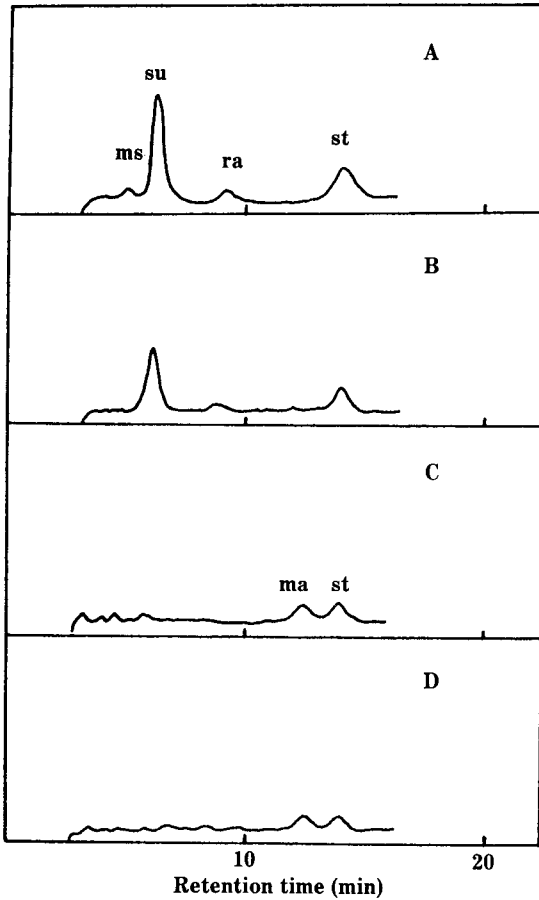


Fig. 3. HPLC chromatograms of sugars in soy milks fermented by single and mixed cultures of *L. acidophilus* and *S. uvarum*.

ms: monosaccharides, su: sucrose, ra: raffinose, st: stachyose. ma: manninotriose

Soy milk were fermented by none (A), *L. acidophilus* (B), *S. uvarum* (C) and the mixed culture of *L. acidophilus* and *S. uvarum* (D).

S. uvarum 과의 혼합배양에 의한 *L. acidophilus* 의 생육촉진

혼합발효에서의 산생성 촉진은 젖산균의 생육 자체의 증가에도 기인하는 것으로 보인다. 그 이유는 젖산균의 산생성은 생육 의존형이므로 (4) 젖산균의 생육촉진이 결국 산생성의 촉진으로 연결될 것이라고 생각되기 때문이다. 혼합발효액의 젖산균 생균수와 단독발효액의 생균수를 경시적으로 비교하여 보았을 때 Fig.4 와 같았다.

24 시간까지의 배양에서 혼합발효액의 최대 생균수는 단독배양액의 최대 생균수에 비해 더 많았고 정상기 이후의 균의 사멸도 지연되었다.

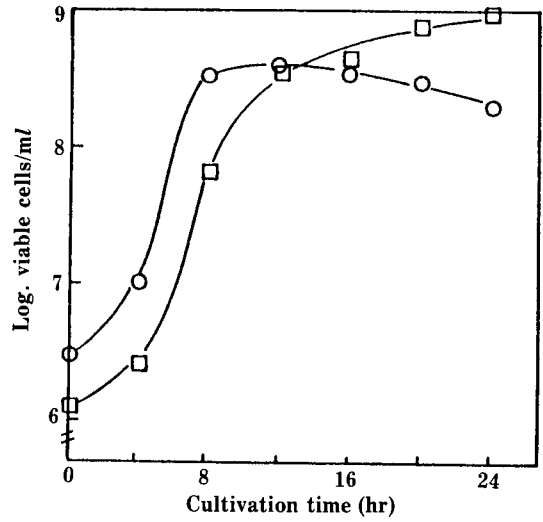


Fig. 4. Growth curves of single and mixed culture in soy whey by *L. acidophilus* and *S. uvarum*.

○: Single culture of *L. acidophilus*

□: Mixed culture of *L. acidophilus* and *S. uvarum*

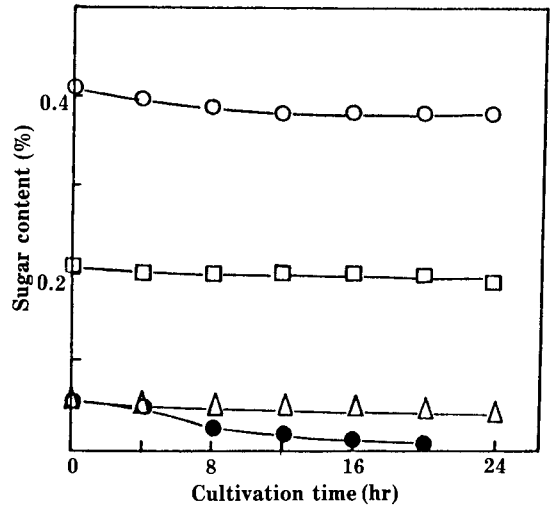


Fig. 5. Changes of sugar contents in soy milk fermented by *L. acidophilus*.

○: sucrose □: stachyose △: raffinose ●: monosaccharides

L. acidophilus 및 **S. uvarum** 의 단독 및 혼합배양액의 당류의 경시적 변화

두유 중의 당류가 *L. acidophilus* 단독배양에 의해 경시적으로 어떻게 변하는지를 추적하였을 때 Fig.5 와, 같은 결과를 얻었다. 두유에는 sucrose, raffinose, stachyose 및 단당류가 각각 0.41, 0.07, 0.22 및 0.07% 씩 존재하였으며 이중 단당류는 20 시간 만에

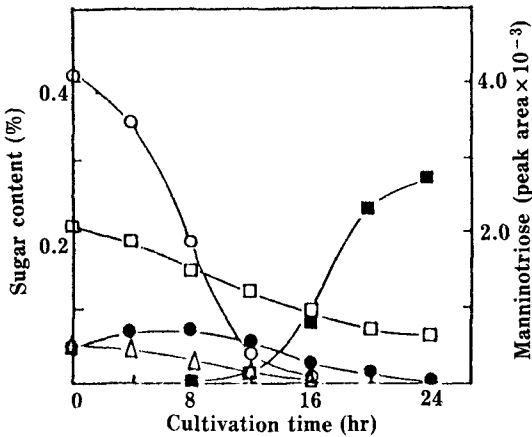


Fig. 6. Changes of sugar contents in soymilk fermented by *S. uvarum*.

○: sucrose, □: stachyose, △: raffinose, ●: monosaccharides and ■: mannitriose

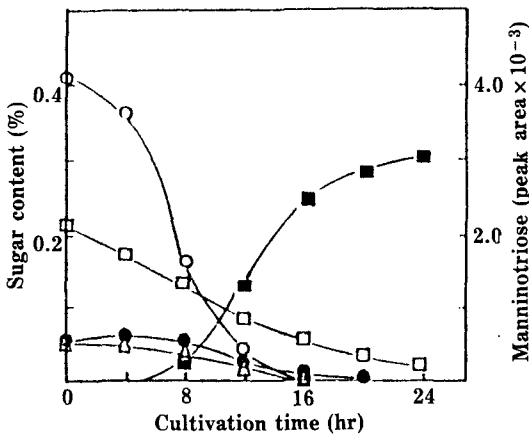


Fig. 7. Changes of sugar contents in soymilk fermented by mixed culture of *L. acidophilus* and *S. uvarum*.

○: sucrose, □: stachyose, △: raffinose, ●: monosaccharides and ■: mannitriose.

완전 소비되었으나 sucrose, raffinose 및 stachyose 는 24 시간까지의 배양에서 거의 감소되지 않았다. 따라서 *L. acidophilus* 는 두유에 존재하는 glucose, fructose 등의 단당류는 발효할 수 있으나 sucrose, raffinose 및 stachyose 등의 과당류는 발효할 수 없었다. 이로 인하여 단독배양에서는 산생성량이 적은 것으로 보인다.

반면 *S. uvarum* 의 단독배양에서는 Fig.6에서와 같이 sucrose 는 raffinose 와 함께 16 시간 만에 완전 소비되고 stachyose 는 24 시간만에 반감되며 단당류는 약간 증가하다가 서서히 거의 전량이 소비되었

다. 단당류가 잠시 증가하는 것은 sucrose, raffinose 및 stachyose 등의 분해에 의한 단당류의 생성속도가 효모에 의한 단당류의 소비속도에 비해 크기 때문인 것으로 생각된다. 이러한 현상은 Yu 등(16)의 *K. fragilis* 배양시에서도 나타났으나 이들에 비하여 증가 정도는 약하였다. 또한 *S. uvarum* 에 의한 단독발효에서는 *K. fragilis* 의 단독발효에서보다 stachyose 이용률이 낮은 것으로 나타났다.

혼합배양의 경우는(Fig.7) 효모의 단독배양과 유사한 변화를 나타내었다. 단지 당의 소비가 더 빨랐으며 mannitriose 의 생성량이 더 큰 것으로 보아 stachyose 의 분해가 더 큰 것으로 나타났다.

이상의 결과로 *L. acidophilus* 는 단독배양에서는 단당류만을 이용하므로 낮은 산도를 보이나 혼합배양에서는 *S. uvarum* 이 sucrose 를 포함한 비발효성 당을 단당류로 분해시켜주고 분해되어 생성된 당을 젖산균이 이용함으로써 산생성 및 생육이 증가되는 것으로 보인다. *S. uvarum* 은 당의 이용에 있어 *L. acidophilus* 와 경쟁의 관계에 있는지는 아직 알 수 없으나 당을 산생성 이외의 방향으로 소비하였다.

요 약

S. uvarum KFCC 32021 의 발효여액은 10% 농도에서 *L. acidophilus* KFCC 12731 의 산생성 및 생육을 촉진하였으나 촉진작용은 100℃에서 10분간의 열처리에 의해 실패되었다. 또한 이 여액은 두유의 sucrose, raffinose 및 stachyose 등의 과당류를 분해하여 단당류의 함량을 증가시켰다.

L. acidophilus KFCC 12731 의 24 시간 단독배양에서 두유의 단당류는 전량 소비되었으나 과당류는 거의 전량 잔존하였다. *S. uvarum* KFCC 32021 의 단독배양에서는 단당류, sucrose 및 raffinose 는 완전 소비되었고, stachyose 는 일부 잔존되고 mannitriose 가 축적되었다. 혼합발효에서의 당소비유형은 *S. uvarum* 의 단독배양에서와 유사하였다. 이상의 결과로 혼합배양에서 *S. uvarum* KFCC 32021 은 두유의 과당류를 *L. acidophilus* KFCC 12731 이 이용할 수 있는 단당류로 분해시켜 줌으로써 발효액의 산생성을 촉진시키는 것으로 보인다.

사 사

이 연구는 한국음식문화연구원 연구비지원에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 감사드립니다.

참고문헌

1. Patel, A.A., W.M. Waghmare and S.K. Gupta: *Proc. Biochem.*, **10**, 9 (1980).
2. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Milk Food Technol.*, **39**(5), 342 (1976).
3. Wang, H.L., L. Kraidie and C.W. Hesselstine: *J. Milk Food Technol.*, **37**(2), 71 (1974).
4. Hang, Y.D. and H. Jackson: *Food Technol.*, **21**, 97 (1967).
5. Breed, R.S., E.G.D. Murray and N.R. Smith: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baillire, Tindall and Cox. London 7th ed., (1974).
6. Angeles, A.E. and E.H. Marth: *J. Milk Food Technol.*, **34**, 30 (1971).
7. Hammer, B.W. and F.J. Babel: *Dairy Bacteriol.*, John Wiley and Sons, Inc., New York, 4th ed. (1957).
8. Kawamura, S. and M. Toda: *Tech. Bull. Fac. Agr.*, Kagawa Univ., Japan, **18**, 138 (1967).
9. Aspinall, G.O., R. Bigbie and J.E. Mckay: *Cereal Sci. Today*, **12**, 333 (1967).
10. Racki, J.J., J.J. Sessa and D.H. Honig: *ARS*, 71-35, USDA, p.100 (1967).
11. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Food Sci.*, **40**, 114 (1975).
12. Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and I.S. Kong: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**(3), 162 (1987).
13. Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and I.S. Kong: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **19**(3), 263 (1987).
14. Yu, J.H., D.H. Oh, I.S. Kong, Y.S. Park and H.C. Lim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**(2), 131 (1988).
15. Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and H.C. Lim: *Kor. J. Food Sci. Technol.* **20**(4) 518 (1988).
16. Lew, I.D. and J.H. Yu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**(4), 253 (1987).
17. Lew, I.D., C.K. Park and J.H. Yu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **16**(4), 287 (1988).
18. Pinthong, R., R. Macrae and J. Rothwell: *J. Food Technol.*, **15**, 647 (1980).
19. Mital, B.K. and K.H. Steinkraus: *J. Food Sci.*, **39**, 1018 (1974).
20. Kanda, H., H.L. Wang, C.W. Hesselstine and K. Warner: *Process Biochem.*, **11**(4), 23 (1976).
21. Kothari, S.L.: *Indian J. Microbiol.*, **13**, 109 (1973).
22. Kothari, S.L.: *Indian J. Microbiol.*, **15**, 18 (1975).
23. Suriyarachchi, V.R. and G.H. Fleet: *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**(3), 574 (1981).
24. Anon: *Milk Ind.*, **62**(5), 26 (1968).
25. Devoyod, J.J., M. Desmazeaud, D. Melcion, C. Degas and C. Auiault: *Lait* **51**, 399 (1971).
26. Noda, F., K. Hayashi and T. Mizunuma: *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**(3), 452 (1980).
27. Fleet, G.H., S. Lafon-Lafourcade and P. Ribereau-Gayon: *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**(5), 1034 (1984).
28. Nakamura, L.K. and P.A. Hartman: *J. Bacteriol.*, **81**, 519 (1961).
29. Gashe, Berhanu A.: *J. Food Sci.*, **50**(3), 800 (1985).

(Received July 25, 1989)