

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 두유의 젖산발효

유주현* · 진효상^o · 백영진¹

연세대학교 공과대학 식품공학과

¹한국야쿠르트유업주식회사 연구소

Lactic Fermentation of Soymilk by Mixed Culture of *Lactobacillus bulgaricus* and *Saccharomyces uvarum*

Yu, Ju-Hyun*, Hyo-Sang Jin^o and Young-Jin Back¹

Department of Food Engineering, College of Engineering,

Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

¹Hankuk Yakult Institute, Wanggok-dong, Euiwang-si, Kyunggi-do 437-020, Korea

Abstract — When *L. bulgaricus* KFCC 35462 and *S. uvarum* KFCC 32021 were mixed cultured in soymilk, growth of *L. bulgaricus* was stimulated with growth of *S. uvarum* little affected. Cultured in soymilk singly, *L. bulgaricus* produced only 0.07% of acids. *S. uvarum*, cultured singly, produced 0.40% of ethanol and 0.18% of acids. Mixed culture of both produced 0.27% of acids and 0.42% of ethanol. Thus, *S. uvarum* was not much affected in growth and ethanol fermentation by *L. bulgaricus*, while *L. bulgaricus* was stimulated by *Sacch. uvarum* in growth but not in acid fermentation.

두유에 젖산균과 효모를 혼합배양시키면 젖산균 단독배양에서 보다 산생성이 증가되고 비소화성 과당류가 제거되는 등의 장점이 보장될 수 있다. 그 이유는 주로 효모가 혼합배양 중 젖산균이 이용하지 못하는 두유의 과당류를 단당류로 분해시켜주기 때문인 것으로 보이지만 한편 *Lactobacillus acidophilus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에서 볼 수 있는 것처럼 젖산균의 효모에 대한 억제작용 등 배양균주 상호간의 특이적인 관계에도 기인하는 것으로 보인다. 따라서 젖산균과 효모의 혼합배양에 의한 두유의 발효는 어떠한 균들을 접종시키느냐에 따라 발효적성이 결정되는 것으로 짐작된다(1-7).

그러나 이러한 결론을 내리기 위해서는 보다 많은 균주들을 혼합배양시키고 이들의 발효특성 및 발효에 미치는 상호작용 등을 검토해 볼 필요가 있으며 우선

혼합배양에서 효모의 생육과 알코올 발효에 대한 젖산균의 억제작용이 일반적인 현상인지 아닌지도 알아야 하겠다. 예를들면 *Kluyveromyces fragilis*에 *L. acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*(*L. bulgaricus*) 및 *L. casei* 등의 젖산균을 혼합배양시키면 산생성 면에서 *L. acidophilus*의 경우가 가장 우수하다(1-3). 또한 *L. acidophilus*는 *S. uvarum*과의 혼합배양에서도 산생성에 있어서 높은 상승효과를 보여주고 있다. 효모와의 혼합배양에서 *L. acidophilus*가 다른 젖산균에 비하여 높은 산도를 나타내는 이유가 앞에서 언급한 효모에 대한 억제작용 때문인지를 알아보려면 *L. bulgaricus* 등의 다른 젖산균에 대하여도 이러한 억제작용이 나타나는지를 검토해 볼 필요가 있다.

따라서 본 연구에서는 두유에 *L. bulgaricus*와 *S. uvarum*을 혼합배양시키고 혼합발효액에서 젖산 및 알코올 발효가 어떠한 양상으로 나타나며, 각각의 생육과 발효에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하였다.

Key words: Mixed culture, *L. bulgaricus*, *S. uvarum*

*Corresponding author

^o현소속: 전주대학교 미생물학과

실험재료 및 방법

사용균주와 배지

젖산균과 효모는 연세대학교 식품공학과에 보관 중인 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*L. bulgaricus*) KFCC 35462와 *Saccharomyces uvarum* KFCC 32021을 사용하였다. 젖산균은 MRS(Difco.) stab culture media를 효모는 YM(Yeast extract 3g, Malt extract 3g Peptone 5g, Dextrose 10g, Agar 20g, Water 1l) slant culture media를 사용하였다.

접종균액의 조제는 Yu 등(1)의 방법을 사용하였다. 그리고 배지에 사용한 두유 및 두유장 등의 방법(1)에 따라 조제하였다.

균수, 당류 및 산도의 측정

효모의 총균수 측정은 시료를 균질 혼합시킨 다음 소량을 취하여 Haematometer에 가한 후 2분간 정지하고 280배에서 계측하였다. 균의 계측은 임의의 4구획을 10회 측정하여 평균값에 10을 곱한 수를 1 ml 중의 균수로 나타내었다.

젖산균의 생균수 측정은 Plate counting method를 사용하였다. 즉 시료를 멸균 생리 식염수로 10배씩 희석한 것을 50 μ l씩 취하여 MRS plate에 가하고 bent glass로 도말한 후 24시간 배양한 다음 colony를 계측하였다.

산도는 적정산도로 측정하였다. 적정산도는 37°C에서 일정시간 발효시킨 발효두유 10 ml에 동량의 증류수를 가하여 균질 혼합하고 50 ml 비이커에 가한 후 교반 상태에서 0.5%(W/V) phenolphthalein을 3방울 가하고 0.1 N NaOH로 중화 적정하였다. 이때 소비된 0.1 N NaOH의 ml수를 다음식을 이용하여 젖산 %로 환산하였다.

$$\text{젖산}(\%, \text{W/V}) = \frac{\text{적정치}(\text{ml}) \times 0.009}{10} \times 100$$

당류의 분석은 Yu 등(7)의 방법 및 조건대로 시행하였다.

Ethanol의 정량

Ethanol의 정량은 발효두유 10 ml에 증류수 5 ml를 가하여 진탕 혼합시킨 후 0.5 ml를 취하여 Eppendorf tube에 가하고 1% 젖산액 0.5 ml를 가하여 혼합한

다음 10,000 \times g에서 20분간 원심분리하고 상등액을 얻었다. 이 상등액을 gas chromatography(Varian 3700)를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

혼합배양이 산도에 미치는 영향

일반적으로 두유에 젖산균과 효모를 혼합배양시키면 산도가 증가된다. 일반적으로 혼합배양액의 산도는 젖산균과 효모를 각각 단독배양한 배양액 중의 산도의 합보다 더 높아 일종의 상승효과가 나타난다(1-7).

두유에 *L. bulgaricus*와 *S. uvarum*을 혼합배양하고 산생성에 미치는 혼합배양의 영향을 살핀 결과 Fig. 1과 같았다. 24시간 배양한 혼합배양액의 산도는 0.28%이었으며 이 값은 각각의 단독배양액의 산도의 합과 거의 같아 젖산균과 효모의 혼합배양에서 오는 상승효과가 나타나지 않았다. 또한 이 값은 *L. acidophilus*와 *S. uvarum*의 혼합배양액의 산도인 0.63%에 비해 크게 작았다. 따라서 *L. bulgaricus*와 *S. uvarum*의 혼합배양에서는 다른 젖산균과 효모의 혼합배양에서와는 다른 배합특성을 볼 수 있었다.

당보충의 영향

*L. bulgaricus*는 *L. acidophilus*의 경우에 비해 낮은

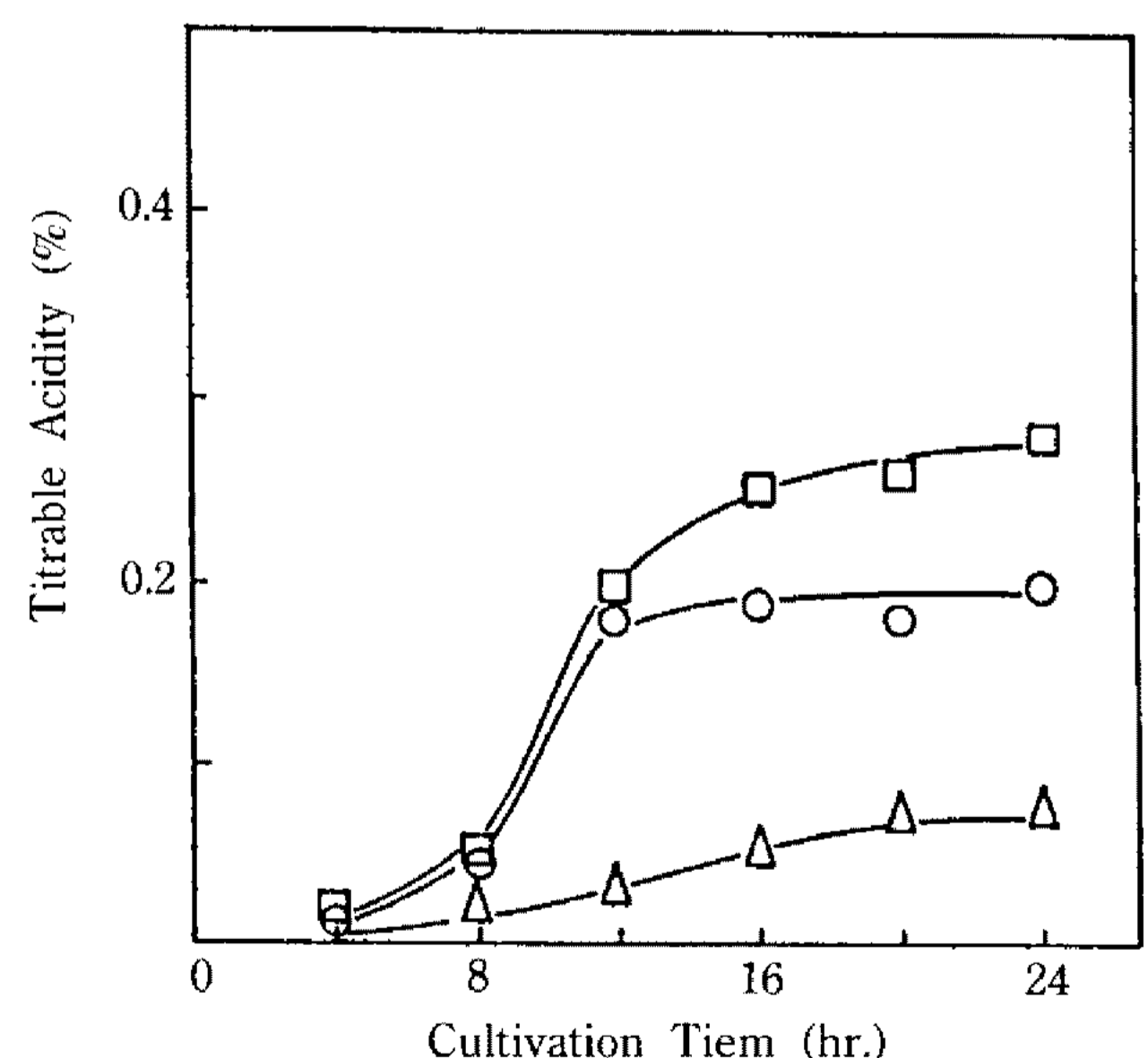


Fig. 1. Changes of Acidity of Soymilk by Single and Mixed Culture of *L. bulgaricus* and *Sacch. uvarum*. Δ : Single culture of *L. bulgaricus*, \circ : Single culture of *S. uvarum*, \square : Mixed culture of *L. bulgaricus* and *Sacch. uvarum*

Table 1. Effect of Sugars on Lactic Fermentation of Soymilk by Single and Mixed Cultures of *L. bulgaricus* and *Sacch. uvarum*.

Culture	Titrable Acidity (%)						
	Blank	Glucose	Fructose	Galactose	Sucrose	Melibiose	Raffinose
<i>L. bulgaricus</i>	0.14	0.74	0.17	0.66	0.14	0.14	0.14
<i>S. uvarum</i>	0.18	0.20	0.19	0.19	0.20	0.20	0.20
<i>L. bulgaricus</i> and <i>S. uvarum</i>	0.32	0.74	0.36	0.52	0.54	0.34	0.39

산도를 나타내었으므로 두유의 각종 당성분의 보충에 의한 산생성의 촉진 정도를 검토해본 결과 Table 1과 같았다.

*L. bulgaricus*는 단독배양에서 glucose와 galactose의 보충에 의해 산생성이 촉진되었으나 fructose, sucrose, melibiose 및 raffinose에 의하여는 촉진되지 않았다. 혼합배양에서는 glucose, galactose 이외에 sucrose에 의하여도 촉진되었으나 fructose, melibiose 및 raffinose에 의하여는 촉진되지 않았다.

이 결과를 *L. acidophilus*의 경우와 비교해 볼 때 *L. bulgaricus*는 특이하게 fructose의 보충에 의해 산생성이 촉진되지 않았다. 이러한 특성은 *L. bulgaricus* KFCC 35462같은 특수한 균주에 국한되는 성질일 수도 있으나 이것이 단독 및 혼합배양에 있어서 *L. bulgaricus*가 다른 젖산균에 비해 산생성이 낮게 되는 이유 중 하나로 생각된다.

혼합배양이 *L. bulgaricus* 생육에 미치는 영향

젖산균의 산생성은 생육의존형이므로(8) 낮은 산도가 낮은 생육 때문인지 알아보기 위해 두유장에 *L. bulgaricus*를 단독 및 *S. uvarum*과 혼합배양시키고 각각의 배양액 중 *L. bulgaricus*의 생균수를 경시적으로 계측한 결과 Fig. 2와 같았다.

*L. bulgaricus*의 생균수는 *S. uvarum*과 혼합 배양하였을 때가 단독 배양하였을 때에 비해 약 40배 더 많이 증식되었다. *L. acidophilus*와 *S. uvarum*을 혼합배양할 경우 *S. uvarum*에 의하여 대두유 중에 있는 sucrose, raffinose 및 stachyose 등의 과당류를 분해하여 생성된 단당을 *L. acidophilus*가 탄소원으로 사용하기 때문에 젖산균을 단독배양하는 것보다 혼합배양하는 것이 젖산균의 생육속도가 빠르고 젖산의 축적량이 많았다(9, 10). 따라서 대두유 중에 있는 과당류를 *S. uvarum*에 의하여 *L. bulgaricus*가 자화할

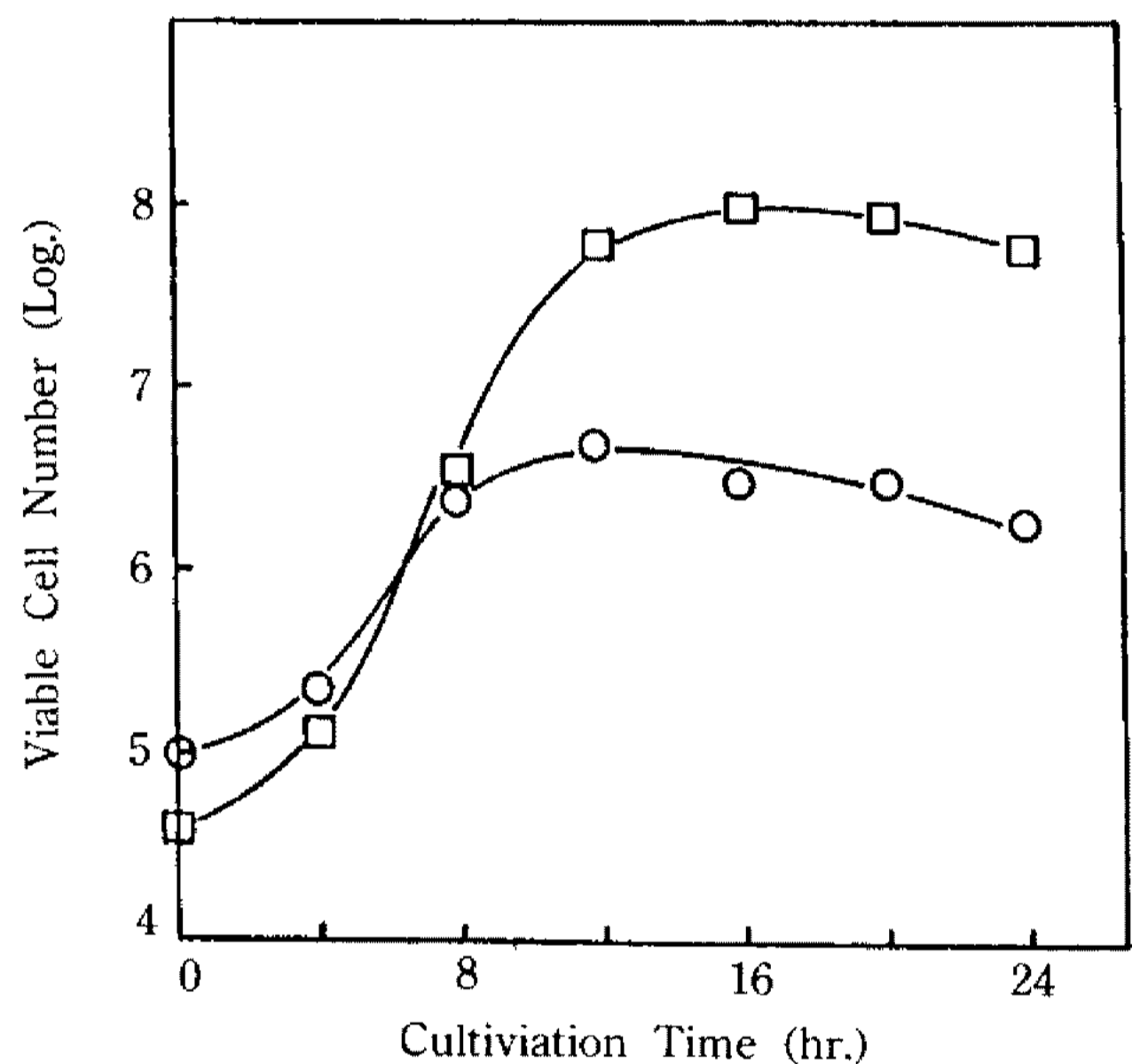


Fig. 2. Effect of Mixed Culture on Cell Number of *L. bulgaricus* in fermented Soywhey.

○: Single culture of *L. bulgaricus*, □: Mixed culture of *L. bulgaricus* and *S. uvarum*

수 있는 단당류로 분해하기 때문에 혼합배양하였을 경우의 *L. bulgaricus*에 의한 생육량은 단독배양하였을 경우보다 많아졌다고 생각할 수 있다. 따라서 낮은 산도는 낮은 생육에 기인하지 않았다. 높은 생육에도 불구하고 낮은 산도를 보이는 것은 특이하며 이것은 우선 *L. bulgaricus* KFCC 35462이 fructose를 산생성에는 이용하지 못하지만 생육에는 이용하기 때문이라고 생각되지만 그밖에 다른 요인도 있을 것으로 생각된다.

혼합배양이 *S. uvarum*의 알코올 발효에 미치는 영향

두유에 *S. uvarum*을 배양하면 ethanol을 생성한다. 발효두유에 경미한 양의 ethanol은 향미에 도움이 될 수 있지만 과량의 경우에는 알콜취가 향미에 나쁜

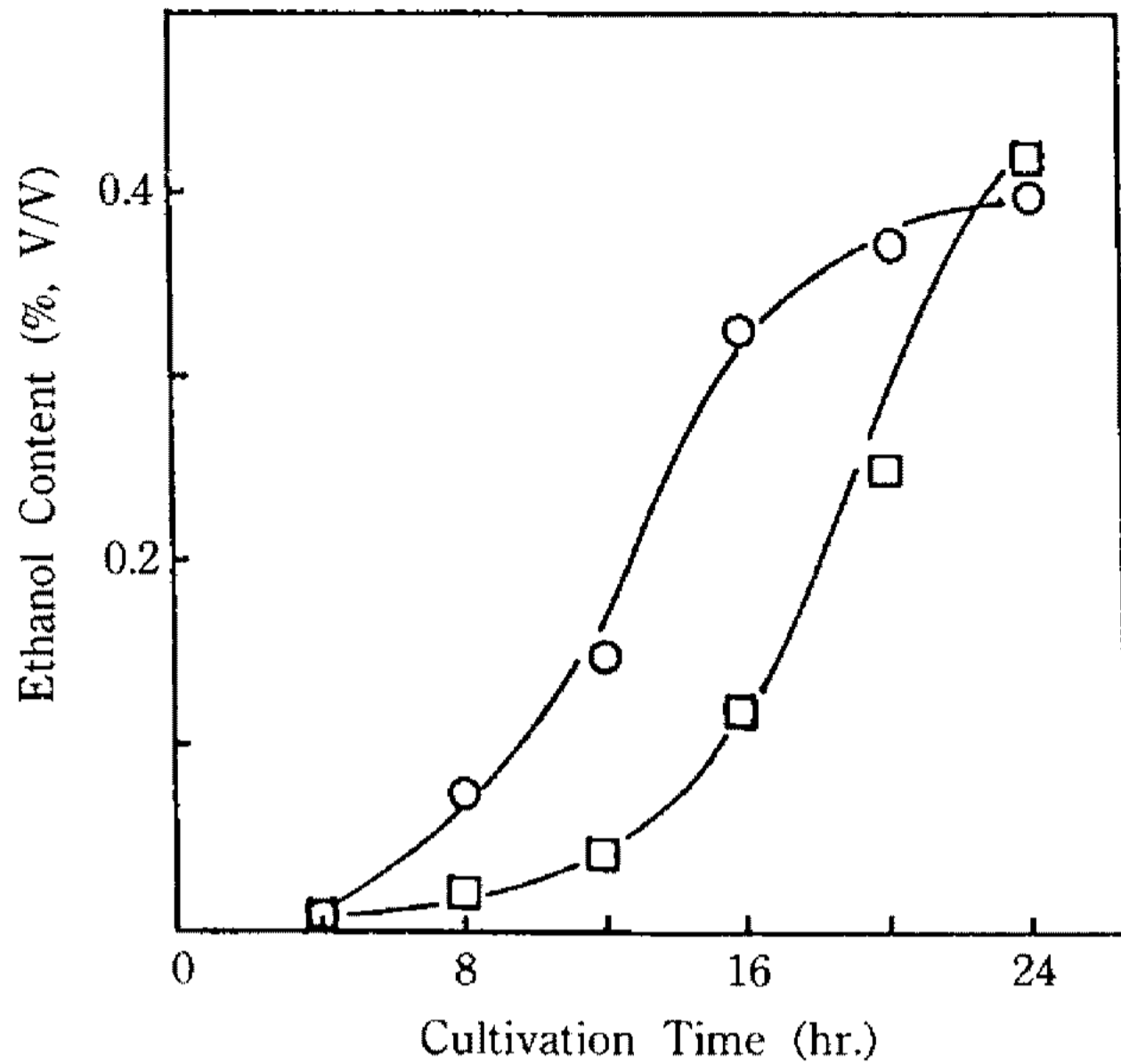


Fig. 3. Effect of Mixed Culture on Ethanol Content of fermented Soymilk.

○: Single culture of *S. uvarum*, □: Mixed culture of *S. uvarum* and *L. bulgaricus*

영향을 미치므로 가능한한 ethanol 발효는 억제되는 것이 좋다.

*L. acidophilus*와 *S. uvarum*의 혼합배양에서는 젖산균이 효모의 알코올 발효를 억제하였으며 이 억제 작용은 혼합배양에서의 산도증가와 큰 연관이 있었으므로(9) 본 실험의 *L. bulgaricus*와 *S. uvarum*의 혼합배양에서도 그와 같은 억제작용을 나타나는지를 살펴보았을 때 Fig. 3과 같았다.

두유에 *S. uvarum*을 단독 또는 *L. bulgaricus*와 혼합접종하고 37°C에서 24시간 동안 각각 배양하며 배양액의 ethanol 함량을 비교하였을 때 혼합배양액의 경우는 단독배양에서 보다 초기 ethanol 생성이 지연되었으나 24시간 배양액의 농도는 각각 0.42 및 0.40%로 거의 비슷하게 나타났다. 따라서 *L. bulgaricus*는 *L. acidophilus*와는 달리 혼합배양 중 *S. uvarum*의 ethanol 생성을 억제하지 않는 것으로 나타났다.

이러한 결과는 *L. bulgaricus*가 *L. acidophilus*(9)에 비해 혼합배양에서 낮은 산도를 나타내는 또 하나의 이유로 생각된다. 왜냐면 두유에 함유된 당의 일부가 젖산 대신 ethanol로 전환되기 때문이다.

혼합배양이 *S. uvarum*의 생육에 미치는 영향

*S. uvarum*은 *L. acidophilus*와의 혼합배양에서 알코올 발효 뿐만 아니라 생육도 저해되었으므로(9) *L.*

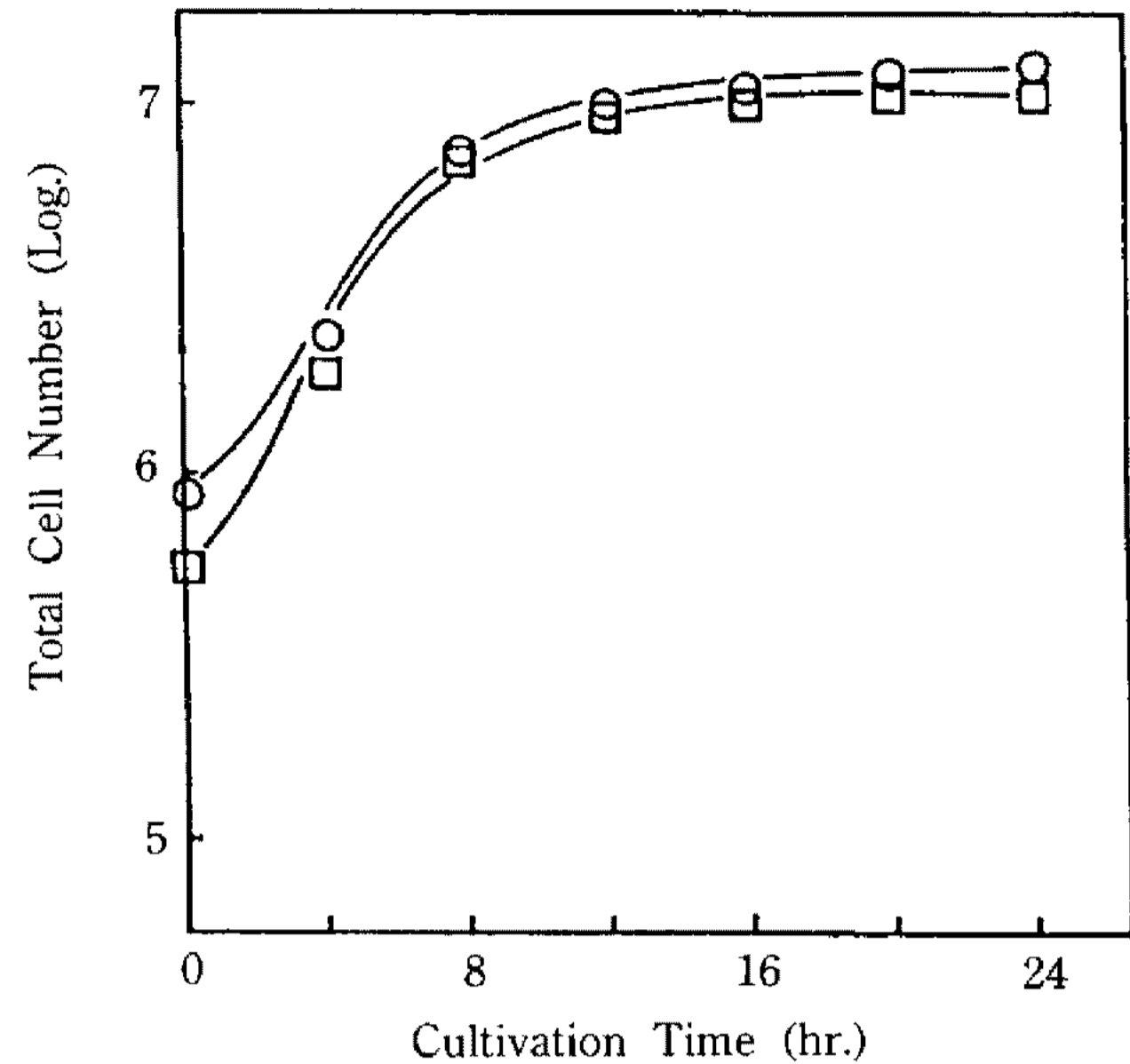


Fig. 4. Effect of Mixed Culture on Cell Number of *S. uvarum* in fermented Soywhey.

○: Single culture of *S. uvarum*, □: Mixed culture of *S. uvarum* and *L. bulgaricus*

*bulgaricus*와의 혼합배양에서 생육은 어떻게 되는지 알아본 결과 Fig. 4와 같았다.

*S. uvarum*의 균체수는 단독배양 및 혼합배양에서 거의 같은 정도의 증식속도를 나타내어 *S. uvarum*의 생육이 *L. bulgaricus*와의 혼합배양에 의해 저해되지 않는 것으로 나타났다.

발효 중 당류의 변화

두유에 젖산균과 효모를 혼합배양하면 젖산균이 이용하지 못하는 과당류를 효모가 단당류로 분해시켜 주어 더 많은 당이 젖산발효에 이용되므로 혼합발효액의 산도가 증가하는 것으로 알려져 있다. 그러나 산도의 증가는 단순한 효모의 과당류 분해작용의 결과라기 보다 분해속도와 이용속도의 차이에 의한 결과이다. 실제 *Kluyveromyces fragilis*나 *S. uvarum*을 두유에 단독배양시키면 단당류가 발효중기에 축적되다가 전량 소비된다(5, 7). 이것은 발효 초기에 효모의 과당류 분해작용 속도가 이용속도에 비해 더 크기 때문에 나타나는 현상이다. 단당류의 축적현상은 이들 효모가 *L. acidophilus*와 혼합배양될 때 더 크게 나타나는데 이것은 이들 효모의 생육과 알코올 발효가 *L. acidophilus*에 의해 억제되므로서 효모의 당류 이용속도가 분해속도에 비해 더 작아졌기 때문이라고 생각된다.

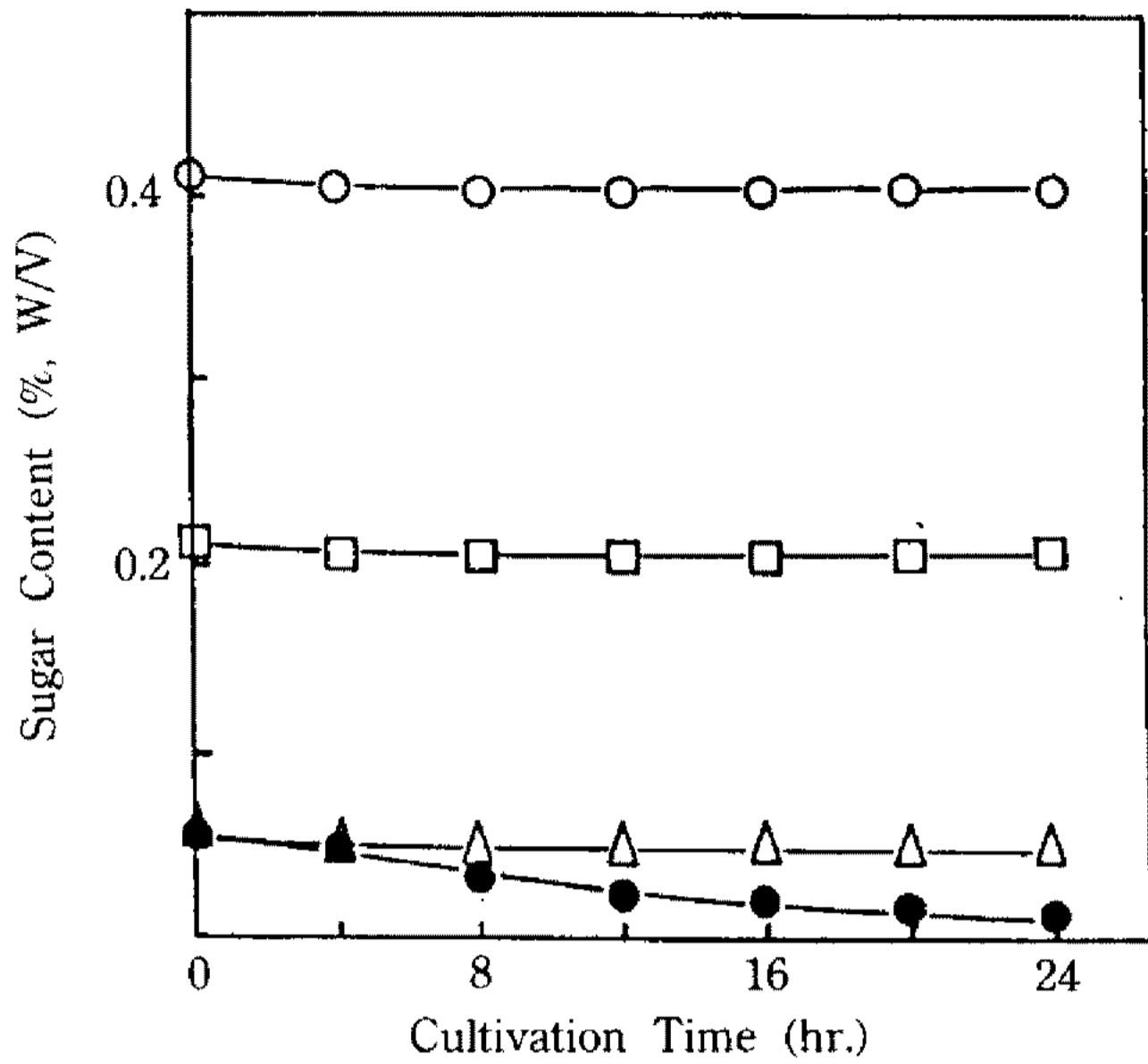


Fig. 5. Changes of Sugar Content in Soymilk by *L. bulgaricus*.
○: Sucrose, ◻: Stachyose, △: Raffinose and ●: Monosaccharides

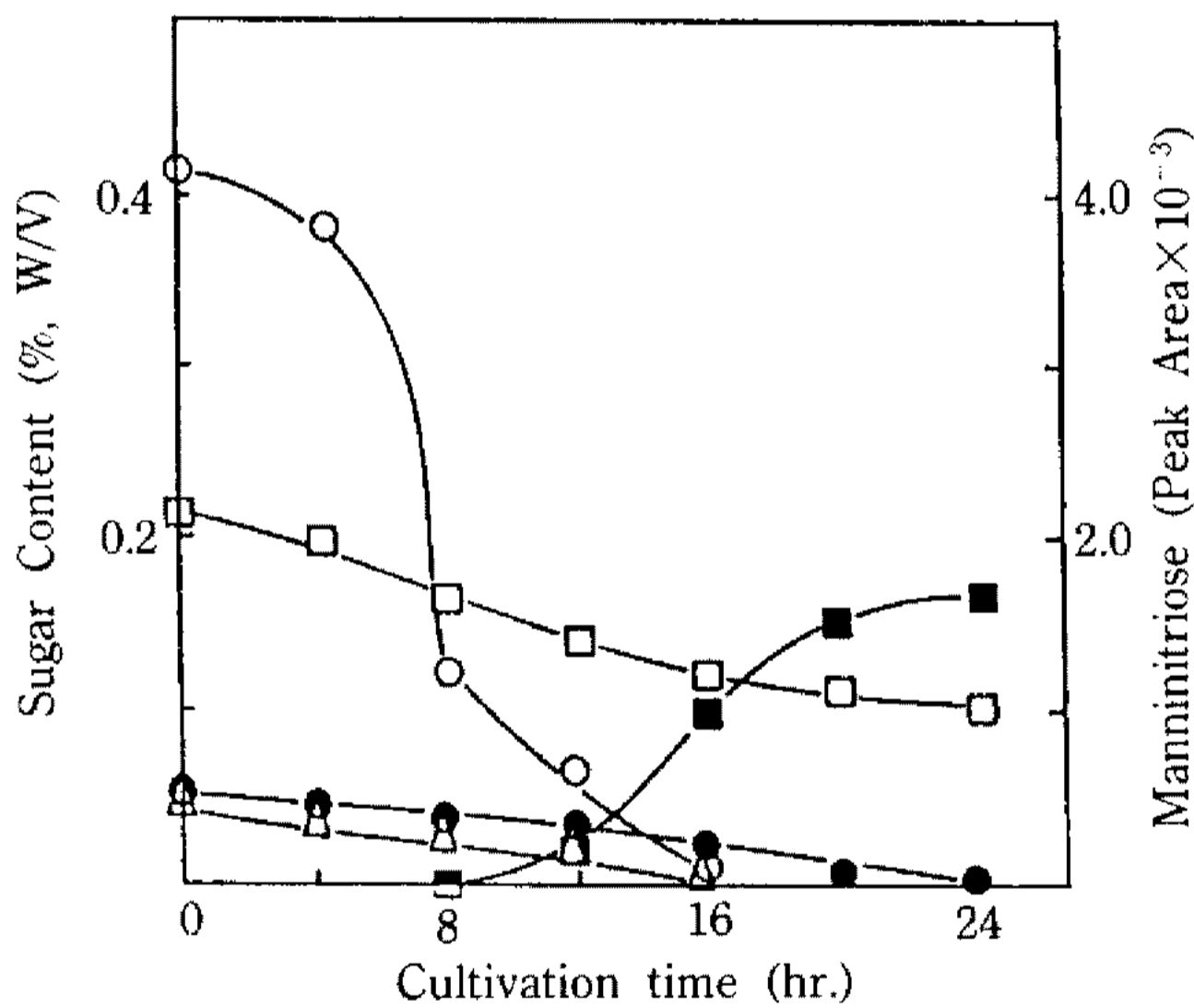


Fig. 6. Changes of Sugar Contents in Soymilk by Mixed Culture of *L. bulgaricus* and *Sacch. uvarum*.
○: Sucrose, ◻: Stachyose, △: Raffinose, ●: Monosaccharides and ■: Manninotriose

*L. bulgaricus*를 두유에 단독배양하고 발효 중 당류 이용상태를 살펴본 결과 Fig. 5와 같이 *L. bulgaricus*는 두유의 sucrose, raffinose 및 stachyose를 이용하지 못하였고 오직 단당류만 이용하였으나 단당류는 24시간 발효액에서도 미량 검출되었다.

*L. bulgaricus*와 *S. uvarum*의 혼합배양에서는 Fig. 6에서와 같이 sucrose와 raffinose가 16시간만에 전량 소비되었고 단당류는 축적증가되지 않으며 24시간만

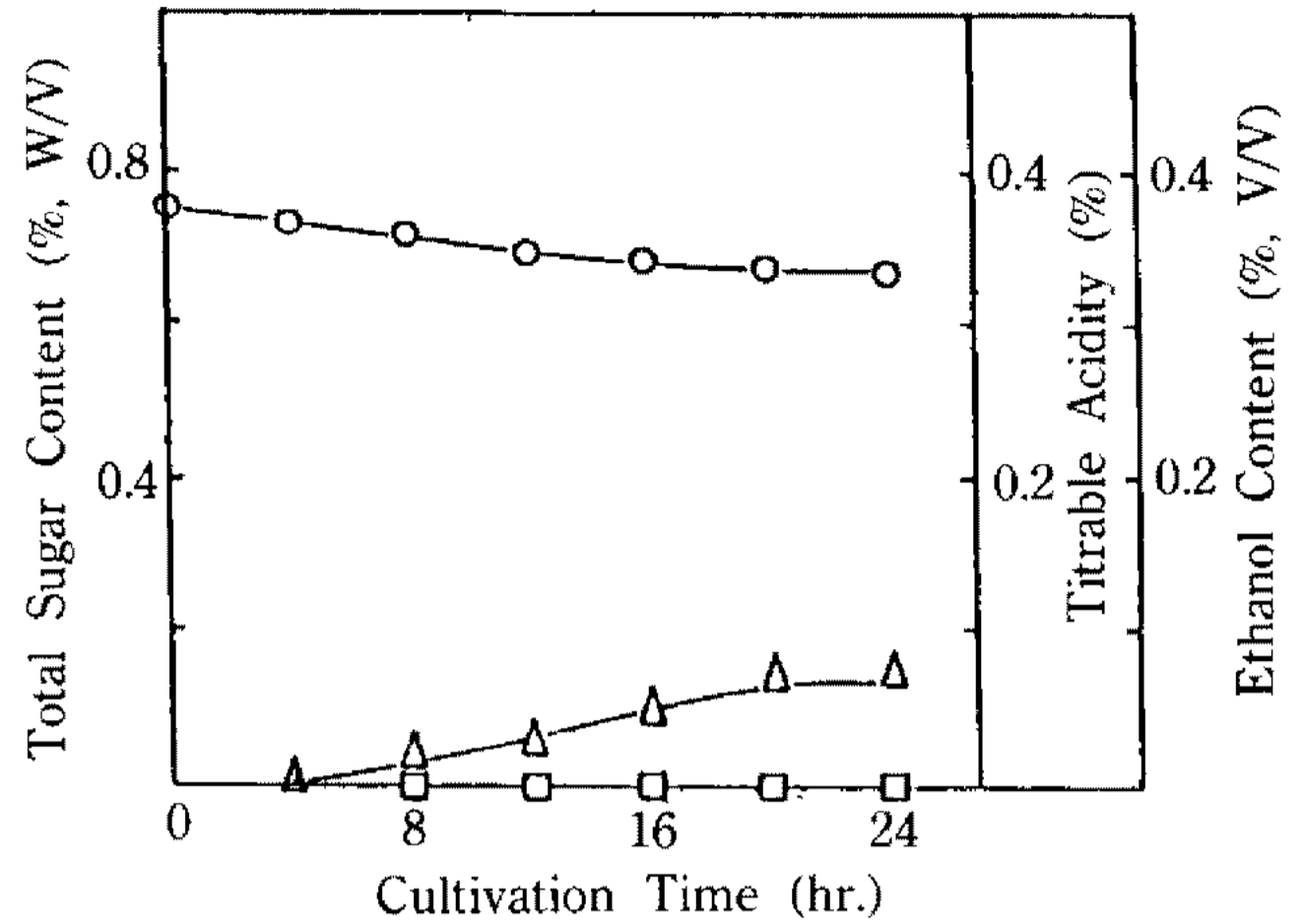


Fig. 7. Changes of Sugar, Acidity, and Ethanol Contents in Soymilk fermented by *L. bulgaricus*.
○: Sugar, ◻: Ethanol and △: Acidity

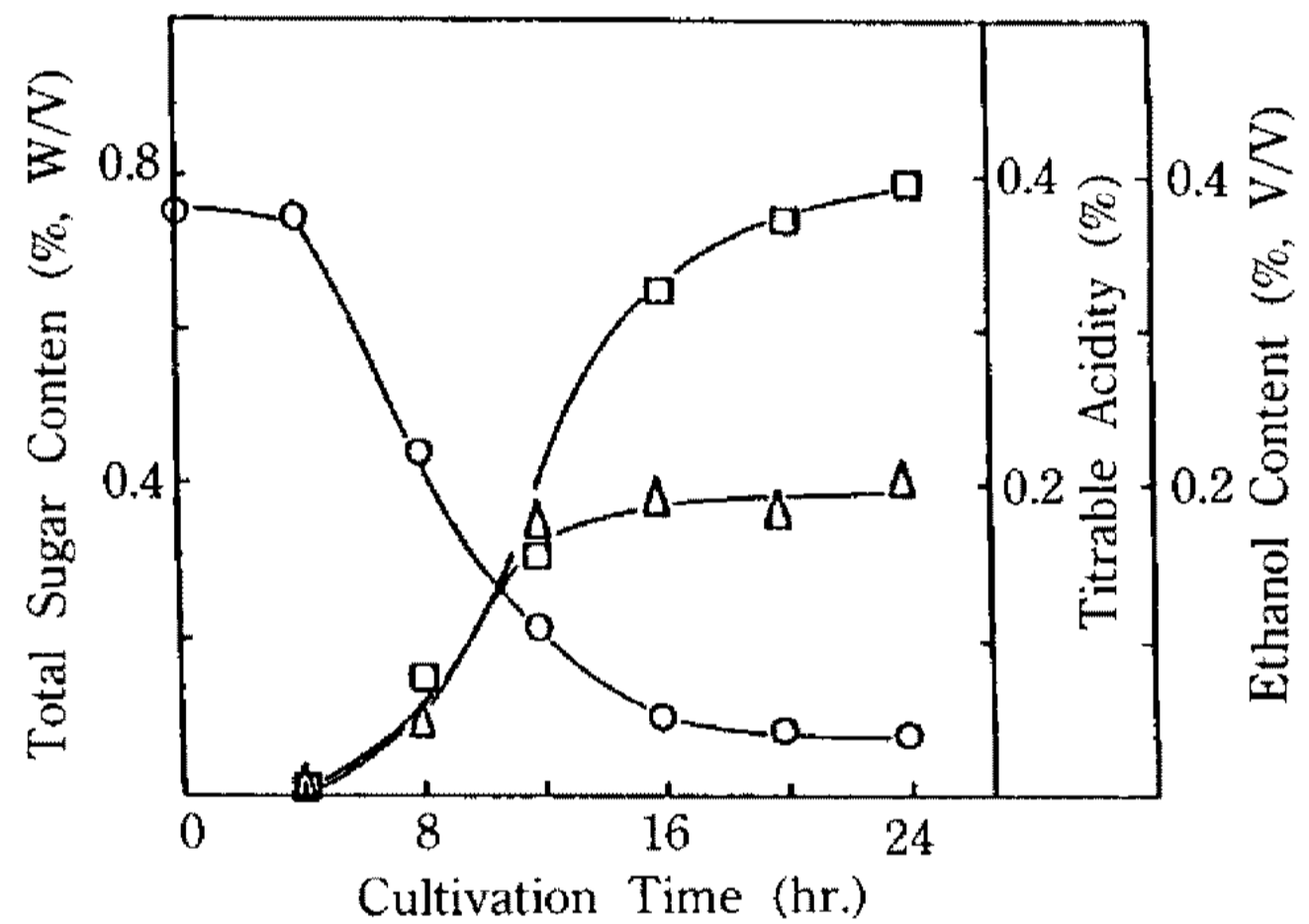


Fig. 8. Changes of Sugar, Acidity, and Ethanol Contents in Soymilk by *S. uvarum*.
○: Sugar, △: Acidity and ◻: Ethanol

에 전량 소비되었다. Stachyose는 일부 소비되며 manninotriose가 축적되었다.

이러한 결과는 *L. acidophilus*(9)와는 달리 *L. bulgaricus*는 혼합배양 중 *S. uvarum*의 생육과 발효를 억제하지 않고 오히려 약간 촉진시키므로서 과당류의 분해속도보다 분해된 단당류의 이용속도를 증가시켜 단당류의 축적이 나타나지 않은 것으로 생각된다. 또한 효모에 의한 당류의 소비증가는 *L. bulgaricus*의 젖산발효에 이용될 당량을 감소시켜 결과적으로 혼합배양액의 산도가 증가될 수 없었던 것으로 생각된다.

*L. bulgaricus*를 대두유에 단독배양하여 경시적으로 검토한 결과는 Fig. 7과 같았다. 당의 소모속도와 산의 생성속도는 느리었고, 배양 후 24시간이 되었을 때

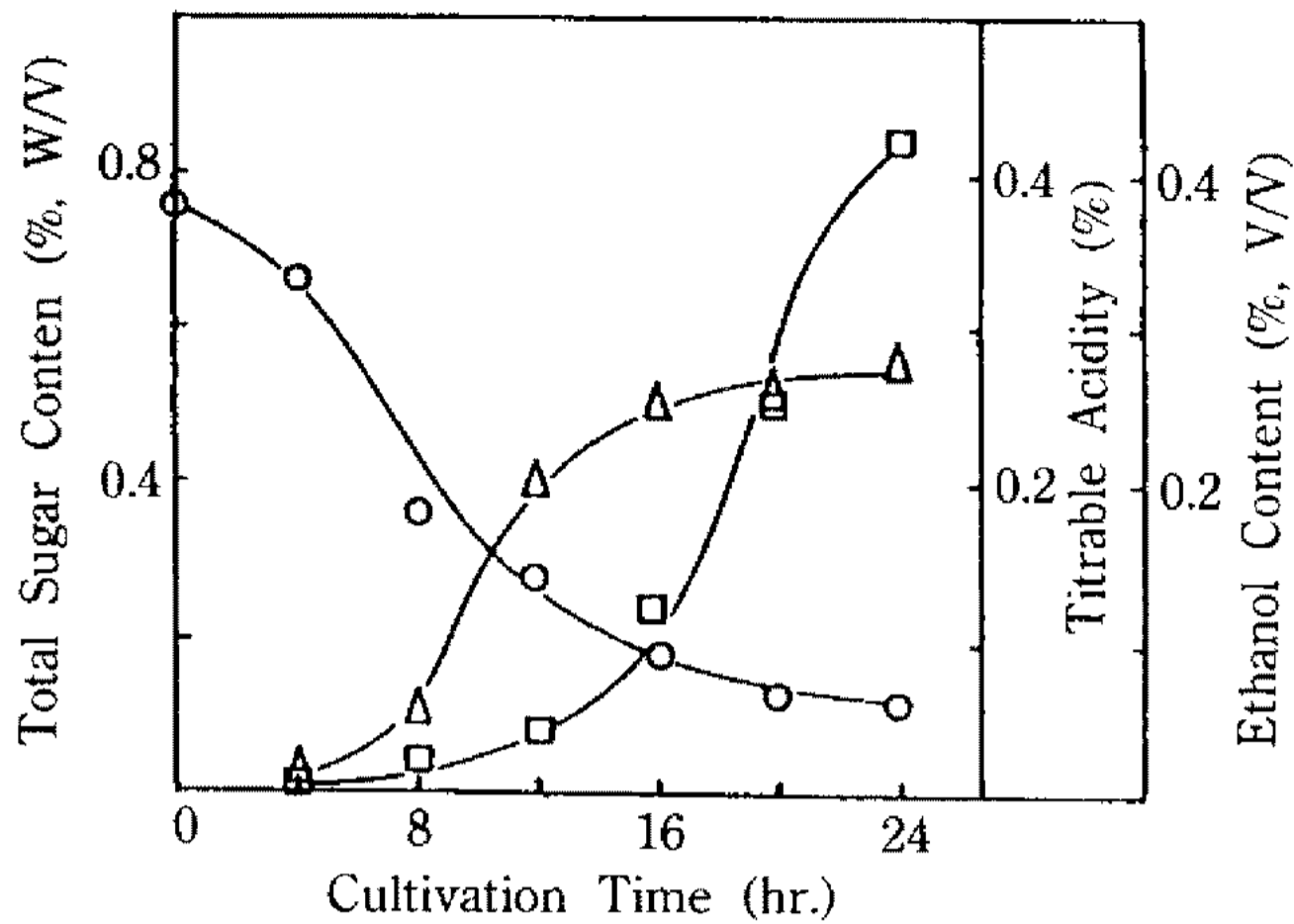


Fig. 9. Changes of Sugar, Acidity, and Ethanol Contents in Soymilk fermented by Mixed Culture of *L. bulgaricus* and *S. uvarum*.

○: Sugar, △: Acidity and □: Ethanol

잔당량은 0.67%로 감소되면서 적정산도는 0.07%로 나타내었다. 그리고 ethanol은 그림에 표시할 수 없을 정도로 극미량이 검출되었다.

*S. uvarum*의 단독배양에서는 Fig. 8에서와 같이 90%의 당이 소비되었고 소비된 당은 주로 0.40%의 ethanol로 전환되었고 일부는 0.18%의 산으로 전환되었다.

이들의 혼합배양에서는 Fig. 9에서와 같이 당이 0.75%에서 0.12%로 감소되며 0.27%의 적정산도와 0.42%의 ethanol을 나타내었다.

이상의 결과로 *L. bulgaricus*와 *S. uvarum*를 두유에 혼합배양하였을 때 산생성이 촉진되지 않았던 가장 큰 이유는 *L. bulgaricus*가 *S. uvarum*를 억제하지 않으므로 젖산발효에 이용될 두유의 당이 *S. uvarum*의 생육과 알코올발효로 전환되었기 때문임을 알 수 있었다. 또한 젖산균에 의한 효모의 억제작용은 일반적인 현상이 아니며 특정균주를 배합할 때만 나타나는 특이한 관계이며 이러한 특이한 균주 배합특성이 두유음료의 발효적성에 매우 중요한 것으로 생각된다.

요 약

L. bulgaricus KFCC 35462와 *S. uvarum* KFCC

32021을 두유에 혼합배양하였을 때 *L. bulgaricus*의 생육은 크게 촉진되었으나 젖산발효는 거의 촉진되지 않았고, *S. uvarum*의 생육과 알코올 발효는 억제되지 않았다. 젖산균과 효모의 혼합배양에 의한 두유음료의 산도증가 등의 발효적성의 향상에는 젖산균에 의한 효모의 억제작용 등의 배합균주 상호간의 특이적 작용이 중요하였다.

감사의 말

이 연구를 위하여 지원하여 주신 한국야쿠르트유업주식회사 이은선 사장님에게 감사드립니다.

참고문헌

1. Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and I.S. Kong: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 162 (1987)
2. Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and I.S. Kong: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **19**, 263 (1987)
3. Yu, J.H., I.D. Lew, C.K. Park and H.C. Lim: *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **20**, 518 (1988)
4. Yu, J.H., D.H. Oh, I.S. Kong, Y.S. Park, and H.C. Lim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 131 (1988)
5. Lew, I.D. and J.H. Yu: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**, 253 (1987)
6. Lew, I.D., H.S. Jin, and I.D. Lew: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **16**, 287 (1988)
7. Lew, I.D., H.S. Jin, and I.D. Lew: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 533 (1989)
8. Patel, A.A., W.M. Waghmare and S.K. Gupta: *Proc. Biochem.*, **10**, 9 (1980)
9. 진효상: Lactic acid bacteria와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 젖산발효, 연세대학교 대학원 (1988)
10. Kong, I.S., J.S. Lee, Y.J. Chung, I.D. Lew, D.W. Oh and J.H. Yu: *Kor. J. Food Sci. Technol.*, **19**, 355 (1987)

(Received June 12, 1991)