

豆乳에서의 乳酸菌生育과 酸生成에 關한 研究

金 午 燮·金 昌 漢*

정·식품주식회사, *建國大學校 畜産加工學科

(1979년 11월 10일 수리)

Studies on the Growth and Acid Production of Lactic Acid Bacteria in Soy Milk

O Sup Kim and Chang Han Kim*

Chung Foods Co. Ltd., *Department of Livestock Technology,

Kon Kuk University, Seoul, Korea

(Received November 10, 1979)

Abstract

Lactobacillus acidophilus exhibited more growth and produced greater amounts of acid in the soy milk than *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, and *Lactobacillus helveticus* examined.

The supplementation of the soy milk with glucose accelerated the growth of *L. acidophilus*, and enhanced acid production by *L. acidophilus* whereas sucrose addition was without effect.

The supplementation of the soy milk containing five percent glucose with a methionine accelerated the growth of *L. acidophilus*, and enhanced acid production by *L. acidophilus*.

L. acidophilus showed greater population in the soy milk containing five percent glucose which was treated with 0.0008% protease ($9.40 \times 10^8/ml$) than the soy milk containing five percent glucose ($2.02 \times 10^9/ml$) moreover *L. acidophilus* produced greater amounts of acid in the soy milk containing five percent glucose which was treated with 0.0008% protease (1.47%) than in the soy milk containing five percent glucose (0.56%).

緒 論

大豆는 오래 전부터 저렴한 가격의 훌륭한 蛋白質 食品으로서 중요한 위치를 담당해 왔으며, 근래에 와서는 콩 또는 콩의 축출물, 즉 豆乳의 食品的 利用에 관한 研究가 상당히 활발하게 진행되어 왔다. Wilken 등¹⁾, Mustakas 등²⁾ 그리고 Steinkraus³⁾에 의하여 여러가지 脫臭方法이 연구되었다. 또한 豆乳의 香味를 조절하고 맛과 조직을 개선하기 위하여 牛乳의 乳酸菌 醱酵방법을 응용하여 豆乳의 醱酵製品을 개발하게 되었다. 豆乳는 乳酸菌의 배지가 되는 하나 *Str. lactis*, *Str. citrovorus*,

Str. paracitrovorus 등에 의한 酸生成은 牛乳에 비해 거의 절반에 지나지 않는다⁴⁻⁵⁾. Matsuoka 등⁶⁾과 Yamanaka 등⁷⁾은 *Str. thermophilus*가 豆乳에서의 산생성도가 높아 豆乳 醱酵에 적합하다고 보고한바 있으며 *Str. thermophilus*는 *Str. diacetylactis*보다 豆乳에서의 酸生成이 우수하므로 豆乳치즈의 제조에 있어서 전처리 유산균으로 사용되고 있다. 또한 *L. bulgaricus*, *Str. faecalis*, *L. acidophilus* 등도 豆乳의 발효에 유용하다고 한다.

Angeles 등⁸⁾은 glucose 나 lactose를 豆乳에 첨가하면 *Str. lactis*, *Str. cremoris*, *Str. diacetylactis*, *L. casei* 및 *L. helveticus* 등에 의한 산생성이 증

가하며 sucrose 의 첨가는 효과가 없었다고 보고한 바가 있다. 또한 부분적으로 분해한 단백질을 첨가해도 *Str. thermophilus*, *L. pentosus*, *Leuconostoc* species 등의 산생성에 증가를 보였다고 한다.

Obara⁹⁾는 豆乳蛋白質을 특정한 蛋白分解酵素로 처리한 豆乳에 *Str. cremoris*와 *Str. lactis*를 혼합사용하여 치즈와 같은 발효제품을 생산할 수 있음을 보고하였고, Yamanaka 등⁷⁾은 脫脂粉乳, 大豆蛋白質 및 아미노산 등의 혼합액에 *L. bugaricus*와 *Str. thermophilus*를 배양하여 醱酵飲料와 요구르트를 제조 개발한 바도 있다.

그러나 국내에서는 아직 豆乳의 유산균 발효이용과 豆乳의 다양한 식품적 이용에 관한 연구가 거의 없는 실정이다. 따라서 저자 등은 豆乳의 발효식품 개발의 일환으로서 豆乳에서의 유산균 생육 상태와 산생성에 관하여 검토하고, 활성이 우수한 유산균을 선별하여 첨가물의 첨가와 효소 처리에 의한 생육 조건의 적합성을 검토하였기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

(1) 使用菌株

Lactobacillus acidophilus, *Lactobacillus bulgaricus*는 韓國種菌協會에서, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus*는 畜産試驗場에서 분양받았다.

(2) 培地の 調製

乳酸菌株의 選別 및 保存用 배지로는 peptone 1.0%, beef extract 1.0%, yeast extract 0.5%, glucose 2.0%, diammonium citrate 0.3%, Sodium acetate 0.5%, tween-80 0.1%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.02%, agar 3.0%, pH 6.2~6.6의 M. R. S. 한천배지와 여기에서 한천을 제외한 M. R. S. broth를 사용하였고 乳酸菌數 測定用 배지로는 tomato juice 2.5%, peptone 1.0%, peptone 化 milk 1.0%, agar 1.5%, pH 6.2의 tomato juice agar (T. J. A.)를 사용하였다.

(3) 乳酸菌株의 選別 및 保存

분양받은 유산균을 각 종균별로 M. R. S. broth 10ml씩에 한 백금이를 이식접종하여 37°C에서 16시간 배양하고 이배양액 한 백금이를 M. R. S. 한

천배지 15ml를 주입시켜 고정시킨 平板에 이식시켜 37°C에서 24시간 배양하였다. 이 平板에 나타난 각 colony를 다시 각각의 M. R. S. broth 10ml씩에 이식 접종하여 37°C에서 16시간 배양한 후 적정산도를 측정하고 산도가 가장 높은 각각의 유산균주를 선정하여 M. R. S. 한천배지에 접종 배양하여 냉장고(4°C)에서 보존하였다.

(4) 豆乳의 調製

豆乳調製의 原料豆로는 수분이 적고 단백질 함량이 높은 滿州産 大豆(일반성분: 水分 8.89%, 粗蛋白質 39.27%, 粗脂肪 17.24%, 可溶無窒素物 28.78%, 粗纖維 —, 灰分 5.83%)를 사용하였으며, Fig. 1에서 보는 바와 같이 먼저 건조, 탈피하여 15°C의 물에 약 8~10시간 침지한 다음 95°C~100°C의 온수로 열처리하였다. 溫水熱處理에 의하여 불어난 大豆를 일정량(콩:물=1:1.8)의 물과 혼합 마쇄하여 이것을 다시 95°C로 10~20분간 가열하고 0.03% NaOH로서 중화처리한 것을 원심분리기(3,600rpm)로 비저를 제거하고 남은 상등액을 豆乳로 사용하였다.

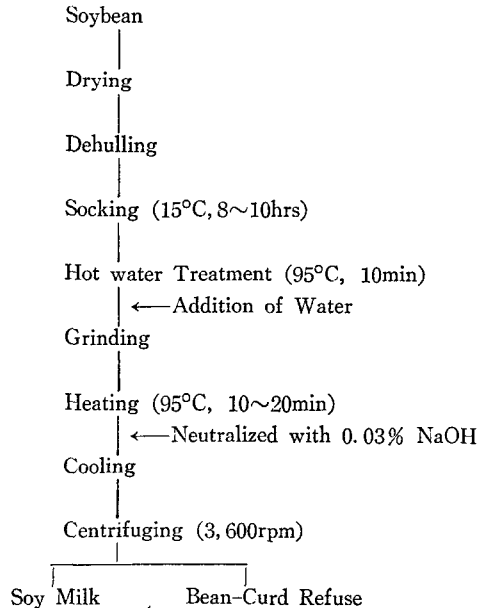


Fig. 1. Preparation of Soy Milk.

(5) 乳酸菌數의 測定

보존균주 한 백금이를 뜯어 M. R. S. broth 10ml에 접종한 후 37°C에서 16시간 배양하고 豆乳培地에 그 유산균 배양액을 2% 접종하여 37°C에서

16~24시간 배양한다. 이 배양액을 멸균 생리식염수로 10배 희석법으로 희석하여 이들 희석액 1ml를 멸균 petri-dish에 주입한 다음 그 위에 45~47°C의 加溫溶解된 T.J.A 배지를 가하여 균등히 확산시켜 고정시킨 후 거꾸로 뒤집어 37°C에서 16~24시간 배양한 다음 colony 수가 30~300개가 나타나는 平板을 선택하여 乳酸菌數를 산출하였다.

(6) 酸度 및 pH 測定

豆乳培地에서 배양한 유산균 배양액 9ml를 취하여 동량의 증류수를 첨가한 후 phenolphthalein 지시약을 2~3방울 떨어뜨린 후 0.1N NaOH 로서 적정하여 酸度を 산출하였다.

그리고 pH의 측정은 pH meter(Model HM 7B)를 사용하여 常法에 의거하여 실시하였다.

(7) 豆乳의 蛋白質分解酵素 처리

豆乳를 121°C에서 15분간 멸균한 다음 급히 식힌 후 여기에 protease를 0.0008% 첨가하고 유산균을 배양시킨 M.R.S broth를 2% 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다.

(8) 試 藥

본 실험에서 사용한 protease(30,000~35,000 units/g)는 태평양화학제품이고, mineral mixture인 A(potassium phosphate dibasic 0.2%, sodium acetate 0.5%, magnesium sulfate 0.02% 함유)는 시중에서 구입하였고 그 외 培地用 시약 등은 1급 이상의 순도높은 것으로 사용하였다.

結果 및 考察

(1) 豆乳에서의 유산균 生育

豆乳에 *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus*의 배양액을 각각 2%씩 접종하여 37°C에서 배양한 후 유산균 수를 측정할 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 국내에서 주로 사용하고 있는 4가지의 균주중 豆乳에서의 생육도가 우수한 유산균은 *L. acidophilus*였다.

(2) 糖의 첨가가 *L. acidophilus*의 生育과 酸生成에 미치는 영향

豆乳에 당류인 glucose, lactose, sucrose를 각 5%씩 첨가한 배지에 *L. acidophilus*의 M.R.S. 배양액 2%를 접종하여 37°C에서 배양한 결과

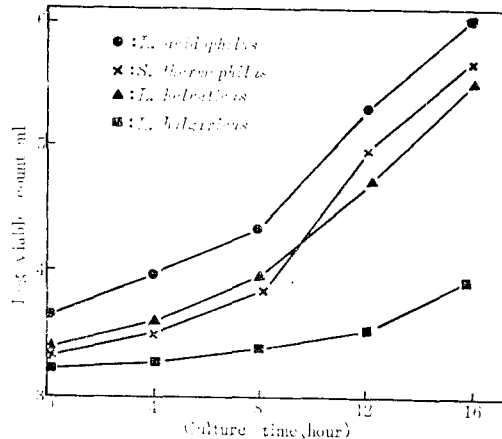


Fig. 2. Growth of *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *L. helveticus* in Soy Milk.

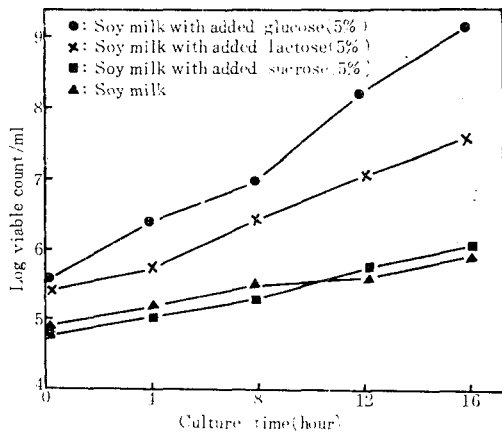


Fig. 3. Effect of Glucose, Lactose and Sucrose on Growth of *L. acidophilus* in Soy Milk.

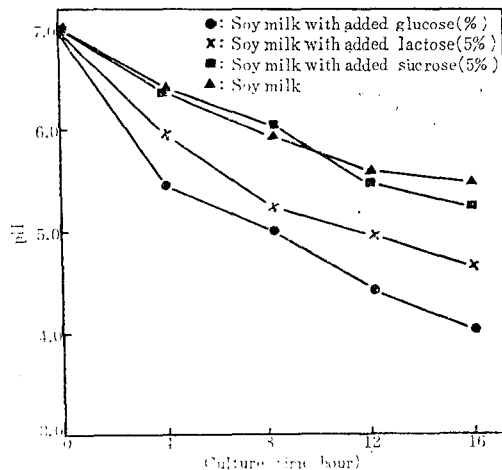


Fig. 4. Effect of Glucose, Lactose and Sucrose on pH of *L. acidophilus* in Soy Milk.

Fig. 3, Fig. 4 와 같이 나타났다. 즉, glucose 를 첨가한 것이 lactose 나 sucrose 를 첨가한 것보다 생육과 산생성량에 있어서 좋은 효과를 가져왔다. 이것은 Angeles 등⁸⁾의 보고결과와 비슷한 경향을 보였다.

(3) Methionine, Yeast Extract 및 A의 첨가가 *L. acidophilus*의 생육과 酸生成에 미치는 영향

5%의 glucose 를 첨가한 豆乳 100ml 씩에 각각 methionine, yeast extract 및 A를 첨가하여 멸균한 후 *L. acidophilus* 배양액을 2%씩 접종하여 37°C 에서 20시간 배양한 후 각각의 배양액에 있어서 그 생육도와 산생성량을 측정 한 결과 Table 1 에서 나타내는 바와 같다.

Table 1. Effects of Methionine, Yeast Extract and A on Growth and Acid Production of *L. acidophilus* in Soy Milk.

Media	Viable Count/ml	pH	T. A. (%)
Base*	1.03×10 ⁹	4.0	0.75
Base+Methionine 0.036%	2.10×10 ⁹	3.9	0.95
Base+Yeast Extract 0.1%	1.32×10 ⁹	3.9	0.85
Base+A** 0.1%	1.78×10 ⁹	3.9	0.90

* : Soy milk 100ml+glucose 5g.

** : Mineral mixture containing K₂HPO₄ 0.2%, CH₃COONa 0.5% and MgSO₄ 0.02%.

Table 1 에서 보는 바와 같이 기본배지 (soymilk 100ml+glucose 5%)에 yeast extract 나 A를 첨가한 것보다 methionine 을 첨가한 것이 유산균수와 산생성에 있어서 좋은 효과를 가져왔다. 이것은 牛乳보다 豆乳에 있어서 부족한 필수아미노산인 methionine 을 첨가해주므로서 유산균의 생육이 활발해 졌기 때문이라 생각된다.

(4) Protease 처리가 *L. acidophilus*의 생육과 酸生成에 미치는 영향

豆乳에 *L. acidophilus* 배양액 2%를 접종한 것과 豆乳에 0.0008%의 protease 을 첨가한 후 *L. acidophilus* 배양액 2%를 접종한 것을 37°C 에서 배양하면서 經時的으로 유산균의 생육도와 산생성을 검토한 결과는 Table 2 에서 보는 바와 같다. 즉 protease 비첨가보다 첨가시 유산균의 생육도와 산생성이 월등히 좋았다. 이것은 protease 의 첨가에 의하여 豆乳蛋白質의 일부가 분해되고 이 分解物質에 의해 유산균의 생육이 촉진되었기 때문이라고 사료된다.

한편, 5%의 glucose 를 첨가한 豆乳에 *L. acidophilus* 배양액 2%를 접종한 것과 5%의 glucose 를 첨가한 豆乳에 0.0008%의 protease 를 첨가하고 거기에 *L. acidophilus* 배양액 2%를 접종한 것을 37°C 에서 배양하면서 經時的으로 乳酸菌의 생육도와 酸生成을 비교 검토한 결과는 Fig. 5, 6 에서 보는 바와 같다. 즉, 5%의 glucose 를 첨가한 豆

Table 2. Effect of Protease Treatment on Growth and Acid Production of *L. acidophilus* in Soy Milk.

Culture Time (hours)	Protease Untreatment			Protease Treatment		
	Viable count/ml	pH	T. A. (%)	Viable count/ml	pH	T. A. (%)
0	1.00×10 ⁴	6.7	0.06	3.47×10 ⁴	6.5	0.10
4	1.04×10 ⁴	6.6	0.08	1.00×10 ⁷	5.8	0.30
8	1.11×10 ⁴	6.6	0.10	1.28×10 ⁷	5.3	0.42
12	1.31×10 ⁴	6.5	0.14	6.20×10 ⁷	4.8	0.54
16	1.12×10 ⁶	6.4	0.17	2.45×10 ⁸	4.2	0.64
20	1.18×10 ⁷	6.4	0.19	5.60×10 ⁸	4.0	0.71
24	6.72×10 ⁶	6.3	0.21	1.32×10 ⁹	3.8	0.82

乳에 있어서도 protease 의 添加時가 非添加時보다 유산균의 생육과 산생성에 있어서 더 좋은 효과를 나타내었다.

Fig. 5 와 6 에서 보는 바와 같이 protease 첨가시 는 배양시간 12시간 후부터 유산균의 생육과 산생

성이 급격히 상승하였다. 또한 배양시간이 길어질 수록 protease 첨가시와 비첨가시의 산생성량의 차이는 현저하게 나타난다. 즉, 24시간 배양했을 때 이와 같은 경향은 유산균의 생육을 촉진시킨다고 생각되는 protease 에 의한 豆乳蛋白質의 分解物이

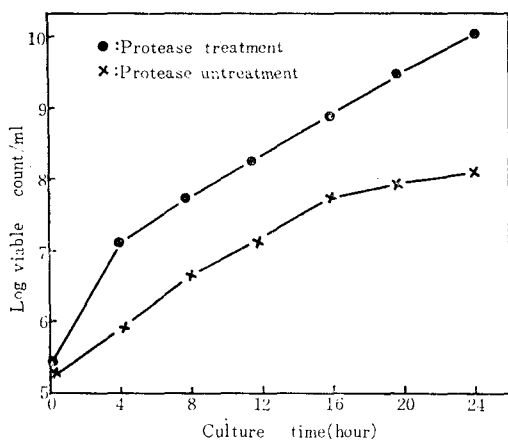


Fig. 5. Effect of Protease Treatment on Growth of *L. acidophilus* in Soy Milk Containing 5% Glucose.

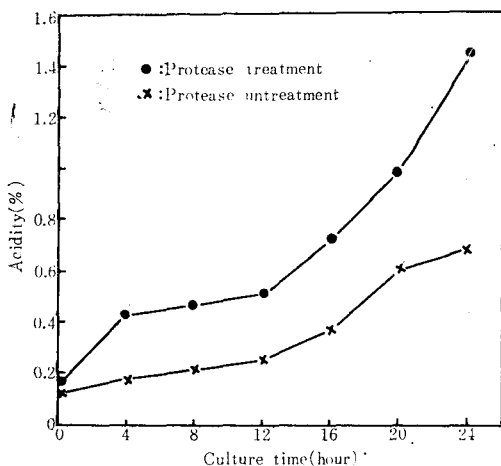


Fig. 6. Effect of Protease Treatment on Acid Production of *L. acidophilus* in Soy Milk Containing 5% Glucose.

배양시간의 경과와 더불어 계속 생성되었기 때문이라고 사료된다. protease 처리시의 유산균수는 $9.40 \times 10^9/ml$, 산도는 1.47%이었고, 비처리시의 유산균수는 $2.02 \times 10^8/ml$, 산도는 0.56%로서 처리시의 酸生成은 비처리시보다 2 배 이상이었다.

要 約

豆乳에서의 乳酸菌 生育과 酸生成량을 높일 수

있는 조건을 검토한 것을 요약하면 다음과 같다.

1. 乳酸菌 *Str. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, 그리고 *L. helveticus* 중에서 *L. acidophilus* 가 豆乳에서의 生育이 가장 우수하였다.

2. 豆乳에 glucose, lactose 또는 sucrose 를 각각 添加했을 때 glucose 의 添加가 가장 *L. acidophilus* 의 生育과 酸生成에 效果가 있었다.

3. 牛乳보다 豆乳의 부족 必須아미노산인 methionine 을 豆乳에 添加했을 때 *L. acidophilus* 의 生育과 酸生成량을 상승시켰다.

4. 豆乳의 protease 處理는 *L. acidophilus* 의 生育과 酸生成을 크게 향상시켰고 酸도는 非處理區보다 2 배 이상 增加되었다.

參 考 文 獻

- 1) Wilkens, W.F., Mattick, L.R. and Hand, D.B: Food Technol., 21, 86 (1967).
- 2) Mustakas, G.C., Albrecht, W.J., McGhee, J.E., Black, L.T., Bookwalter, G.N. and Griffin, E.L.: J. Am. Chem. Soc, 46, 623 (1969).
- 3) Steinkraus, K.H.: Method for deffating Soybean meal U.S. Patent 3, 721, 569(1973).
- 4) Gehrke, C. and Weiser, H.H.: Food Res., 12, 360 (1947).
- 5) Gehrke, C. and Weiser, H.H.: J. Dairy Sci., 31, 213 (1948).
- 6) Matsuoka, H., Sasago, K. and Sekiguchi, M.: J. Food Sci. Technol. (Tokyo), 15, 103 (1968).
- 7) Yamanaka, Y., Okamura, O. and Hasegawa, Y.: Method of preparing a sour milk beverage. U.S. Patent 3, 535, 117 (1970).
- 8) Angeles, A.G. and Marth, E.H.: J. Milk Food Technol., 34, 30 (1971).
- 9) Obara, T.: U.S. Dep. Agri, Frinal Tech, Report PL 480 Project URA, 11-(40), 26 (1968).