

칼슘강화 두유의 제조 및 단백질과 칼슘의 체외 소화특성

변진원 · 황인경*

수원여자전문대학 식품영양과, *서울대학교 식품영양학과

Preparation of Calcium-fortified Soymilk and *in Vitro* Digestion Properties of Its Protein and Calcium

Jin-won Pyun and In-kyeong Hwang*

Department of Food and Nutrition, Suwon Women's College

*Department of Food and Nutrition, Seoul National University

Abstract

The present study was attempted to prepare calcium-fortified soymilk using proteases to improve calcium intolerance of soymilk protein and to evaluate its nutritional properties. The protease from *Bacillus polymyxa* was chosen as an enzyme source because it produced the least bitter taste and calcium-aggregation of soymilk among various enzymes. The optimum treatment time was 10 minutes at 50°C for the best result. *In vitro* protein digestibility of calcium-fortified soymilks was comparable with that of control soymilk. Calcium in the digested soymilks was mostly in the ionic form and the amount of ionic calcium increased in accordance with the amount of fortified calcium in soymilk. This suggests that fortified calcium in the soymilk is bioavailable.

Key words: protease treatment, calcium intolerance, calcium fortified soymilk, *in vitro* digestibility, ionic calcium, bioavailable

서 론

우리나라에서 이용되고 있는 전통적인 대두가공품 중 음료의 형태로 이용되고 있는 두유는 필수지방산이 많이 함유되어 있고 필수아미노산의 조성도 메티오닌 외에는 우유의 것과 유사하여, 곡류 위주의 식사 습관을 지닌 우리나라 사람들에게 결핍되기 쉬운 리진의 좋은 공급원이다. 또한 두유에는 유당이 함유되어 있지 않아 우유와 같은 소화장애가 없을 뿐만 아니라, 우유에 알레르기가 있는 유아에게 알레르기가 없어도 단백 우유대체식품으로서의 가치를 인정받고 있다. 성인의 경우에 있어서도 기호성, 경제성, 또는 동물성 식품의 과다섭취 등으로 인하여 우유를 기피하는 경우, 두유에는 콜레스테롤도 없을 뿐 아니라 체내의 콜레스테롤 함량을 낮추는 생리활성물질이 함유되어 있으며 성인병 예방에 좋은 불포화지방산 등을 함유하고 있어 식물성 영양음료로서의 인식이 더욱 확대, 강

화되고 있다⁽¹⁾.

1967년 공장생산되어 상품화된 이래 수요가 날로 증가되고 있는 우유대체 영양음료인 두유는 trypsin inhibitor, hemagglutinin, phytic acid와 같은 영양저해 성분과 장내 가스발생 인자, 콩비린내 등 여러가지 문제점을 가지고 있으나 많은 연구를 통해 보완 시정되고 있다⁽²⁾. 반면 성장기 아동 및 노인들에게 매우 중요한 칼슘의 부족은 고단백 우유대체 식품으로서의 가치를 인정받고 있는 두유가 가진 큰 문제점 중의 하나인데도 칼슘첨가에 대해 이루어진 연구는 미비한 형편이다.

칼슘은 뼈와 치아의 구성성분일 뿐 아니라 효소의 활성화, 신경흥분의 조절, 근육수축 그리고 혈액응고 등 체내의 중요한 대사에 관여하는 중요한 무기질이다. 더구나 생활수준의 향상으로 현대인은 동물성 단백질의 섭취가 늘어가고 있는데 단백질의 섭취 증가는 칼슘의 배설을 촉진시키므로⁽³⁾ 칼슘섭취에 대한 필요성은 증대되며, 두유에 존재하는 phytic acid에 의한 칼슘의 흡수 저해도 충분한 양의 칼슘이 존재할 때는 문제되지 않으므로⁽²⁾ 두유에 칼슘을 첨가하는 연

Corresponding author: Jin-won Pyun, Department of Food and Nutrition, Suwon Women's College, San 1-6, Omokchun-dong, Kwonsun-gu, Suwon, Kyunggi-do 441-748, Korea

구는 필요하다고 생각된다.

한편 대두단백질은 칼슘과 결합하여 침전하는 성질이 있어 두유에 칼슘을 첨가하는 것은 음료의 성질상 부적합하므로 그리 쉬운 문제는 아니다. 몇 가지 칼슘을 첨가한 연구^(13,14)가 보고되었지만 처리가 너무 복잡하고 또 불용성 칼슘염의 사용으로 칼슘염이 침전하는 현상을 초래하므로 실용성은 떨어진다. 그러나 단백질의 기능적 특성을 향상시키기 위하여 단백분해효소(protease)를 처리하게 되면 단백질 분자량의 감소 및 기타 단백질구조의 변화로 칼슘내인성(calcium intolerance)이 증가되므로 이를 이용하면 칼슘첨가시 나타나는 두유의 문제점이 해결될 수 있으리라 생각된다.

본 연구에서는 여러가지 단백질 분해효소 중에서 쓴맛의 생성을 최소로 하는 효소를 선택하여 두유에 처리한 뒤 칼슘염을 첨가한 칼슘강화두유를 제조하였으며 칼슘첨가로 인해 영향을 줄 수 있는 단백질과 칼슘의 체외 소화특성을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료

두유제조용 대두는 농촌진흥청에서 분양 받은 장엽(91년산)을 사용하였으며, 단백질 가수분해 효소로는 Sigma사에서 구입한 bromelain (B 2252)과 trypsin (T 8128), *Aspergillus oryzae*에서 추출한 단백분해효소(P 4032)와 *Bacillus polymyxa*에서 추출한 단백분해효소(P 5647)를 사용하였다.

단백분해효소의 처리

효소의 선택: 두유에 처리할 단백가수분해 효소는 다음과 같이 선택하였다. 즉 동물성 효소로 trypsin, 식물성 효소로는 bromelain, 미생물 효소로는 단백질 가수분해시 쓴맛이 나지 않는다고 보고된⁽¹⁵⁾ *Aspergillus oryzae*와 *Bacillus polymyxa*에서 추출한 단백분해효소 등 4가지를 선택하였다. 선택한 효소를 각각의 최적 pH인 pH 8, pH 7, pH 7.5, pH 7.5로 조절된 두유에 첨가(단백질 : 효소의 비율은 *Bacillus polymyxa*의 효소는 100 : 1로, 나머지 효소는 400 : 1)하고 10분간 50°C 온탕수조에서 흔들어 주면서 반응시켰으며 반응이 끝난 용액은 직화에서 1분간 끓여 효소를 불활성화하였다.

효소반응이 정지된 두유에 대해 5명의 평가원이 쓴맛 여부를 관능평가하였고, 여기에 30 mM의 CaCl₂를 첨가한 뒤 원심분리하여 얻은 상침액에 대해 280 nm에서의 흡광도를 측정하여 응고정도를 비교하였으며, 이 중에서 응고성과 쓴맛 정도가 가장 낮은 효소를 선

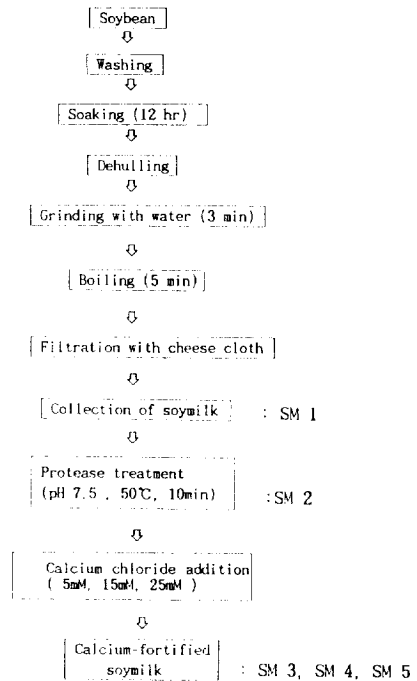


Fig. 1. Preparation of calcium-fortified soymilk

택하였다.

최적 효소처리 시간의 결정: 두유에 선택된 효소를 첨가하여 가수분해하면서 시간별로 흡광도를 측정⁽¹⁶⁾한 뒤 Alder-Nissen의 방법⁽¹⁷⁾으로 가수분해율(degree of hydrolysis : DH)을 계산하였다. 또 가수분해된 두유의 쓴맛 정도와 칼슘염에 대한 응고정도를 평가하여 최적 시간을 결정하였다.

칼슘강화 두유의 제조

Fig. 1과 같은 방법으로 제조하였다.

대두의 침지, 마쇄, 가열, 여과를 거쳐 두유를 제조한 뒤 앞의 실험결과 선택된 *Bacillus polymyxa*의 단백분해효소를 두유단백질의 1/100 (w/w)로 첨가하고 pH 7.5, 50°C에서 10분간 처리한 뒤 칼슘염을 첨가하여 칼슘강화 두유를 제조하였다.

두유의 분석에 사용된 시료는 5가지인데 효소처리전의 표준두유를 SM 1, 효소처리만 한 두유를 SM 2, 효소처리한 것에 5 mM, 15 mM, 25 mM의 염화칼슘을 첨가한 것을 SM 3, SM 4, SM 5로 표시하였다.

칼슘강화 두유 단백질의 체외 소화율

활성화시킨 투석막(Sigma D-9527, cut-off Mw 12,000)에 두유 5 ml와 0.1 M HCl (pH 2) 19 ml, pep-

sin-HCl 1 ml를 넣은 뒤 HCl 용액 200 ml가 담긴 플라스크에 투석막을 넣고 37°C 항온수조에서 2시간 진탕 처리하였다. 투석막을 0.1 M NaHCO₃ 용액 200 ml가 담긴 플라스크에 옮기고 막안에 1 N NaHCO₃, 2.5 ml를 첨가하여 밀봉한 뒤 15분간 수조에서 흔들어 주고 2.5 ml의 pancreatin-bile 용액을 첨가하여 다시 2시간 동안 항온수조에서 진탕처리한 후 투석 여액을 모아 단백질을 분석하였다^(18,19).

소화효소를 처리하기 전에 두유에 존재하는 가용성 단백질의 함량을 알아 보기 위해 펩신, 판크레아틴 등의 효소나 산을 처리하지 않은 채 위와 같은 방법으로 투석하여 두유의 가용성 단백질의 함량을 분석하였다. 단백질은 Lowry 방법⁽²⁰⁾으로 분석하였고 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하여 표준곡선을 구하고 이로부터 가용성 단백질의 양을 구한 뒤 두유의 총 단백질에 대한 가용성 단백질의 비로서 소화율을 계산하였다.

칼슘강화 두유의 소화에 따른 칼슘 형태 변화

두유에 존재하는 총 칼슘은 일정량의 두유를 550°C 회화로에서 회화시킨 후 질산 3 ml에 녹인 뒤 가열, 건조시키고 다시 진한 HCl 10 ml로 희석하여 원자흡수분광계(GBC 904AA)로 측정하였다⁽²¹⁾.

가용성 칼슘은 소화전, 펩신처리 후, 판크레아틴 처리후의 두유 투석액을 0.5% lanthanum chloride로 2배 희석하고 원자흡수분광계로 측정하였다^(22,23).

이온 형태의 칼슘은 투석액 5 ml에 4 M KCl 0.1 ml를 첨가하여 이온강도를 맞춘 뒤 calcium ion-selective electrode (Phoenix electrode company)를 사용하여 측정하였다^(22,23).

결과 및 고찰

효소의 선택

기능적 특성의 향상을 위하여 단백질에 행하는 변

Table 1. Comparison of bitter taste and turbidity of soymilk treated with different proteases

Enzyme Treatment	Bitter taste ¹⁾	Absorbance ²⁾
Control	---	0.239
Protease from <i>B. polymyxa</i>	-	0.567
Protease from <i>A. oryzae</i>	++	0.339
Bromelain	+++	0.358
Trypsin	-	0.540

¹⁾ - : none, ++: moderate, +++: much

²⁾ Turbidity at 280 nm of diluted (×100) supernatant of soymilk added 30 mM CaCl₂

형의 한 방법으로 단백분해효소를 처리하면 부수적으로 쓴맛 펩타이드의 생성이 문제될 수 있다^(24,25). 쓴맛 펩타이드는 주로 소수성 oligopeptide로부터 유래되며 소수성 아미노산의 측쇄가 관여하는데⁽²⁶⁾, 대두 단백질은 Q값이 큰 소수도가 높은 단백질로⁽²⁷⁾ 쓴맛 펩타이드가 생성되기 쉬운 단백질에 속한다. 쓴맛 펩타이드의 생성정도는 효소의 종류나 가수분해 정도에 따라 달라지는데 이런 쓴맛의 생성은 효소처리의 실용화를 어렵게 하므로 쓴맛의 생성을 초래하지 않는 효소 조건을 선택하는 것이 바람직하다.

4가지 효소를 처리한 후 쓴맛의 생성여부와 CaCl₂ (30 mM)를 첨가한 뒤의 응고정도를 분석한 결과는 Table 1과 같다. 효소를 처리한 두유 중에서 쓴맛이 나타나지 않는 것은 trypsin과 *Bacillus polymyxa*에서 추출한 단백분해효소를 처리한 두유이고, 탁도검사에 의해 칼슘첨가 후 응고성이 적은 것은 *Bacillus polymyxa*의 단백분해효소를 처리한 두유로 나타났으므로 *Bacillus polymyxa*의 효소를 두유 단백질의 가수분해용 효소로 결정하였다.

최적 효소처리 시간

두유에 *Bacillus polymyxa*에서 추출한 단백분해효소를 처리한 뒤 시간별로 채취하면서 측정된 가수분해 정도는 Fig. 2와 같다. 반응초기 10분간은 가수분해 정도가 빠르게 증가하였고 그 이후로는 반응시간에 비례하여 서서히 증가하는 경향을 나타내었다. 처리시간에 따라 가수분해 정도(DH)와 쓴맛, 응고 정도를 측정된 결과는 Table 2와 같이 가수분해정도가 증가할수록 칼슘에 의한 응고정도는 감소했으나 10분 이후부터 쓴맛이 감지되었으므로 단백분해효소의 처리시간

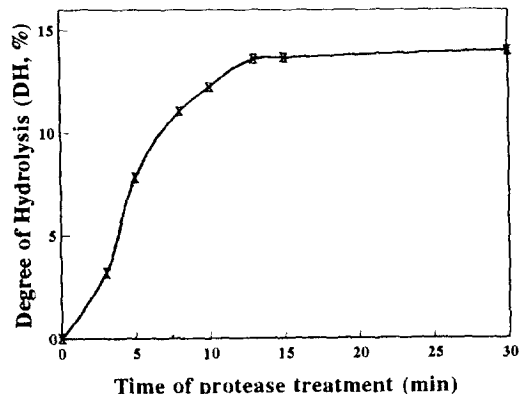


Fig. 2. Degree of hydrolysis (DH) curve of soymilk protein treated with protease from *Bacillus polymyxa*

Table 2. Changes in bitter taste, turbidity, and degree of hydrolysis(DH) of soymilk treated with protease from *B. polymyxa* at 50°C for 15 min

Treatment time (min)	Bitter taste ¹⁾	Turbidity ²⁾	DH (%)
0	-	0.239	0
3	-	0.439	3.21
5	-	0.482	7.84
8	-	0.524	11.05
10	-	0.567	12.24
13	+	0.589	13.51
15	++	0.618	13.67

¹⁾ -: none, +: slight, ++: moderate

²⁾ Absorbance at 280 nm of diluted (×100) supernatant of soymilk added 30 mM CaCl₂

은 10분으로 결정하였다.

칼슘강화 두유 단백질의 체외 소화율

표준두유와 단백질해 효소처리 및 칼슘이 강화된 두유를 펩신과 판크레아틴으로 처리하여 측정된 단백질의 체외 소화율(*in vitro* protein digestibility)은 Fig. 3과 같다. 가수분해하기 전의 가용성 단백질의 비율을 보면 SM 1, SM 2, SM 3, SM 4, SM 5의 것이 각각 2.33%, 7.06%, 7.07%, 7.04%, 9.09%로 단백질해 효소 처리를 한 SM 2, SM 3, SM 4, SM 5의 것이 크게 나타났다. 반면 펩신과 판크레아틴으로 충분히 가수분해한 결과는 60% 내외로 5가지 두유의 소화율이 큰 차이를 나타내지 않았으므로 두유에 첨가된 칼슘의 농도가 체내 소화시 단백질의 가용성에 영향을 주지 않을 것이라고 생각된다.

칼슘강화 두유의 소화시 칼슘의 이용성

두유에 첨가된 칼슘의 이용도를 알아보기 위해 소화액에 존재하는 칼슘의 형태와 함량을 분석하였다.

무기질이 장내에서 흡수되기 위해서는 먼저 가용성이 되어야만 하므로 칼슘첨가물이나 칼슘강화제의 체내 이용도를 알아보기 위해 사용되는 *in vitro* 분석 방법은 여러 pH에서 소화효소를 처리한 뒤 가용성 칼슘의 양을 측정하는 방법을 이용하는 것이다⁽²⁰⁾. 투석을 하지 않은 가용성 칼슘의 측정법은 단백질 가수분해 중에 soap을 형성하게 되어 가수분해 전보다 가용성과 이온 형태의 칼슘의 양이 감소하여 정확한 측정이 어려우므로⁽²³⁾ 본 실험에서는 투석한 뒤 가용성 칼슘의 함량을 분석하였다. 또 최근 보고에 의하면 펩신 또는 펩신-판크레아틴 가수분해물의 칼슘용해도는 그 식품의 *in vivo* 칼슘 체내 이용도와 잘 일치하지 않는데 이는 흡수는 되지 않으면서 매우 안정한 가용성 칼슘복

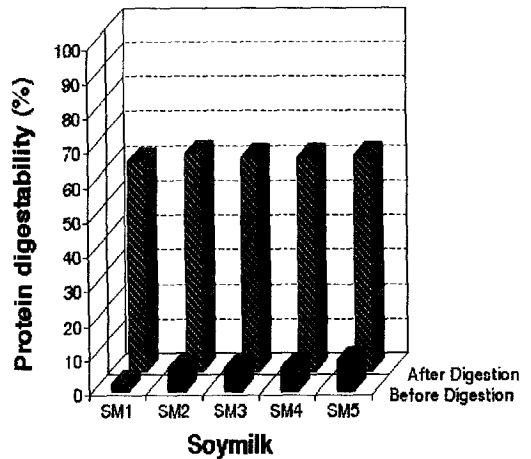


Fig. 3. Comparison of *in vitro* protein digestibility of protease-treated and calcium-fortified soymilks before and after pepsin and pancreatin digestion SM 1: control, SM 2: protease-treated, SM 3: protease-treated and 5 mM calcium-fortified, SM 4: protease-treated and 15 mM calcium-fortified, SM 5: protease-treated and 25 mM calcium-fortified

합체를 형성하기 때문으로 알려졌다⁽²⁰⁾. 따라서 칼슘의 체내 이용도 지수로 펩신 또는 펩신-판크레아틴 가수분해물의 총 가용성 칼슘보다는 가용성이면서 이온 형태의 칼슘을 사용하는 것이 더 좋다고 제안되었으므로 이온 형태의 칼슘 함량도 같이 분석하였는데 그 결과는 Table 3과 같다.

가수분해하기 전의 SM 1과 SM 2의 가용성 칼슘과 이온 형태의 칼슘 함량을 비교하면, SM 1에 비해 SM 2는 가용성 칼슘의 함량은 약간 높으면서 이온 형태의 것은 적었는데 이는 두유에 단백질분해효소를 처리한 결과 작은 펩타이드가 형성되면서 카르복실기가 노출되고 이런 작은 펩타이드와 결합된 칼슘의 양이 많아지면서 가용성 칼슘의 함량은 SM 1과 유사하나 이온 형태의 것은 감소된 것으로 생각된다. 그러나 두유 단백질에 단백질분해효소를 처리하여 칼슘의 결합 부위가 늘어나도 첨가된 칼슘의 양이 점차 증가되면 결합 부위가 포화되면서 SM 3, SM 4, SM 5에서 보듯 이온 형태의 칼슘 함량이 점차 증가하고 있다.

한편 펩신처리시에는 가용성과 이온 형태의 칼슘 함량이 거의 유사하게 나타났는데 이는 Kim과 Zemel의 보고⁽²¹⁾와도 일치한다. 또 본 실험 결과에서 보면 펩신처리시 다른 경우보다 가용성 칼슘의 양이 증가하였고 대부분이 이온의 형태로 나타났으며 또 두유에 첨가된 칼슘의 양이 증가할수록 유리되는 이온 형태의 칼슘이 증가하였다. 이는 산성조건에 의한

Table 3. Concentration of total, soluble, and ionic calcium of protease-treated and calcium-fortified soymilks before and after pepsin and pancreatin digestion (unit : mM)

Soymilk ¹⁾	Before ²⁾			Pepsin ³⁾		Pancreatin-bile ⁴⁾	
	Total calcium	Soluble calcium	Ionic calcium	Soluble calcium	Ionic calcium	Soluble calcium	Ionic calcium
SM 1	5	0.85	0.83	3.54	3.45	0.34	n.d.
SM 2	5	0.94	0.60	3.57	3.46	0.31	n.d.
SM 3	10	1.56	1.38	5.31	5.25	0.37	n.d.
SM 4	20	5.0	34.45	14.51	14.45	0.38	n.d.
SM 5	30	12.01	11.17	18.58	18.45	0.51	n.d.

¹⁾Abbreviations indicate the same meaning as shown at Fig. 3

n.d.: Not detected

²⁾Before digestion

³⁾After pepsin digestion

⁴⁾Dialysis of pepsin digestion followed by pancreatin-bile digestion

것이라 생각되며, 정상적인 위산의 산도에서는 모든 칼슘이 가용성 상태가 되므로⁽⁶⁰⁾ 많은 양의 칼슘이 첨가된 SM 4나 SM 5의 경우도 펩신처리시 산성조건에 의해 가용성 칼슘 및 이온 형태의 칼슘 함량이 증가하였다고 생각되며 이로써 두유에 첨가된 칼슘에 의해 칼슘의 체내 이용율이 높아질 수 있으리라 사료된다.

펩신을 처리하였을 때 이미 대부분의 칼슘이 녹아 나왔으므로 판크레아틴 처리시의 가용성 칼슘은 매우 낮게 나타났으며 이중 이온 형태의 것은 거의 감지되지 않았다. 이는 중성 pH에서 칼슘의 용해도가 낮아 칼슘복합체(calcium-zinc-phytic acid, etc.)가 형성되었거나 또는 중성 pH에서 칼슘이 가수분해된 펩타이드와 결합되었기 때문이라 생각된다.

요 약

본 실험은 두유에 칼슘을 강화하기 위해 두유 단백질의 칼슘내인성을 높이기 위한 방법으로 두유 단백질을 부분가수분해시킬 최적 단백질분해효소 및 그의 최적 처리조건을 결정하였고, 효소처리한 뒤 칼슘염을 첨가하여 제조된 칼슘강화 두유의 체외소화시 단백질과 칼슘의 소화특성을 조사하였다.

두유에 처리된 4가지 단백질분해효소 중에서 *Bacillus polymyxa*의 단백질분해효소가 pH 7.5, 50°C, 10 min의 처리조건하에서 처리 후 두유에 쓴맛을 남기지 않고, 칼슘염을 첨가하였을 때 응고현상을 가장 적게 나타내는 것으로 밝혀졌다.

또 가수분해 정도가 증가할수록 칼슘에 의한 응고 정도는 감소했으나 10분 이후부터는 쓴맛이 감지되었으므로 효소처리시간은 10분으로 결정하였다.

두유에 효소처리를 한 뒤 염화칼슘을 5, 15, 25 mM 첨가하여 칼슘강화 두유를 제조하여 단백질의 체외

소화율을 분석한 결과, 두유에 첨가된 칼슘의 농도와 무관하게 모든 칼슘강화 두유가 표준두유와 유사한 소화율을 나타냈다.

소화전에는 표준두유에 비해 효소처리만 한 두유의 가용성 칼슘이 약간 높으면서 이온형태의 것은 적게 나타났으며 효소처리 후 염화칼슘을 5, 15, 25 mM 첨가하여 만든 칼슘강화 두유는 이온형태의 칼슘함량이 점차 증가하였다. 펩신을 처리하였을 때는 가용성칼슘이 거의 이온형태의 것으로 나타났으며 두유에 칼슘이 많이 강화될수록 유리되는 이온형태의 칼슘함량도 증가하였다.

이상의 결과를 미루어 볼 때, 우유와 비슷한 수준으로 칼슘이 첨가된 두유도 단백질의 체외 소화율은 감소되지 않았으며, 소화시 체내에 흡수될 수 있는 이온형태의 칼슘의 양은 첨가량과 비례하였으므로 이와 같은 방법으로 칼슘강화 두유를 제조할 때 칼슘의 체내 이용도는 증가할 수 있을 것으로 생각된다.

문 헌

1. Hashimoto, S.: The soymilk industry. *The Food Industry*, **26**, 62 (Japanese) (1983)
2. Saio, K.: About soymilk. *Shoku No Kagaku*, **70**, 58 (Japanese) (1983)
3. Anonymous: Effect of legume seeds on serum cholesterol. *Nutr. Rev.*, **38**, 159 (1980)
4. Murphy, P.A.: Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.*, **1**, 60 (1982)
5. Nelson, A.I., Steinberg, M.P. and Wei, L.S.: Illinois process for preparation of soymilk. *J. Food Sci.*, **41**, 57 (1976)
6. 김우정, 오훈일, 오명원, 변시명: 대두발아가 대두유의 품질 및 아미노산 조성에 미치는 영향. *한국식품과학회지*, **15**, 12 (1983)
7. 김은수, 조재선: 두유의 현탁안정성에 관한 연구. *한국식품과학회지*, **22**, 312 (1990)

8. 하상도, 김성수, 박철수, 김병목 : 대두의 데치기와 발아가 두유의 품질에 미치는 영향. 한국식품과학회지, **23**, 485 (1991)
9. Johnson, L.A., Deyoe, C.W. and Hoover, W.J.: Yield and quality of soymilk processed by steam-infusion cooking. *J. Food Sci.*, **46**, 238 (1981)
10. Johnson, N.E., Alcantara, E.N. and Linkswiler, H.M.: Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium and calcium retention of young adult males. *J. Nutr.*, **100**, 1425 (1970)
11. Margen, S., Chu, J.Y., Kaufman, N.A. and Colloway, D. H.: Studies in calcium metabolism. 1. The calciuretic effect of dietary protein. *Am. J. Clin. Nutr.*, **27**, 584 (1974)
12. Hegsted, D.M.: Calcium and phosphorus. In *Modern Nutrition in Health and Disease* (5th ed.), Lea and Febiger, Philadelphia, p.268 (1973)
13. Weingartner, K.E., Nelson, A.I. and Erdman JR, J.W.: Effects of calcium addition on stability and sensory properties of soy beverage. *J. Food Sci.*, **48**, 256 (1983)
14. Hirotsuka, M., Taniguchi, H., Narita, H. and Kito, M.: Calcium fortification of soymilk with calcium-lecithin liposome system. *J. Food Sci.*, **49**, 1111 (1984)
15. Murata, K., Kusakabe, L., Kobayashi, H., Akaike, M., Park, Y. W. and Murakami, K.: Studies on the coagulation of soymilk-protein by commercial proteinases. *J. Agric Biol. Chem.*, **51**, 385 (1987)
16. Kwan, K.K.H., Nakai, S. and Skura, B.J.: Comparison of four methods for determining protease activity in milk. *J. Food Sci.*, **48**, 1418 (1983)
17. Alder-Nissen, J. and Olsen, H.S.: The Influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy proteins. In *Functionality and Protein Structure*, Am. Chem. Soc., Washington D. C., pp.125-146 (1979)
18. Miller, D.D., Schricker, B.R., Rasmussen, R.R. and Campen, V.D.: An *in vitro* method for estimation of iron availability for meals. *Am. J. Clin. Nutr.*, **34**, 2248 (1981)
19. Knuckles, B.E., Kuzmicky, D.D. and Betschart, A.A.: Effect of partially hydrolyzed phytate on *in vitro* protein digestibility. *J. Food Sci.*, **50**, 1080 (1985)
20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951)
21. Kim, H. and Zemel, M. B.: *In vitro* estimation of the potential bioavailability of calcium from sea mustard (*Undaria pinnatifida*), milk, and spinach under simulated normal and reduced gastric acid condition. *J. Food Sci.*, **51**, 957 (1986)
22. Mohamed, M.O., May, A.T. and Morris, H.A.: Effects of pH, CaCl₂ and soy protein on [Ca²⁺]in reconstituted nonfat dry milk and on rennet-induced coagulum properties. *J. Food Sci.*, **53**, 798 (1988)
23. Reykdal, O. and Lee, K.: Soluble, dialyzable and ionic calcium in raw and processed skim milk, whole milk and spinach. *J. Food Sci.*, **56**, 864 (1991)
24. Fujimaki, M., Yamashita, M., Okazawa, Y. and Arai, S.: Applying proteolytic enzymes on soybean. 3. Diffusible bitter peptides and free amino acids in peptic hydrolysate of soybean protein. *J. Food Sci.*, **35**, 215 (1970)
25. Matoba, T., Nagayasu, C., Hayashi, R. and Hata, T.: Bitter peptides in tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **33**, 1662 (1969)
26. Matoba, T. and Hata, T.: Relationship between bitterness of peptides and their chemical structures. *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1423 (1972)
27. Ney, K.H.: Voraussage der bitterkeit von peptiden aus deren aminosauressatzumsetzung. *Z. Lebensm. Untersuch. Fdrsch.*, **147**, 64 (1971)
28. Greger, J.L.: Effect of dietary protein and minerals on calcium and zinc utilization. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutrition*, **28**, 249 (1989)
29. Zemel, M.B.: *In vitro* evaluation of the ortho-, tripoly- and hexametaphosphate on zinc, iron and calcium bioavailability. *J. Food Sci.*, **49**, 1562 (1984)
30. Champagne E.T. and Phillippy, B.Q.: Effects of pH on calcium, zinc and phytate solubilities and complexes following *in vitro* digestions of soy protein isolate. *J. Food Sci.*, **54**, 587 (1989)

(1994년 12월 20일 접수)