

단백분해효소와 배양방법의 종류에 따른 비피더스균의 생육특성 및 soy yogurt의 품질특성

이정은 · 이숙영*
중앙대학교 식품영양학과

Growth Characteristics of *Bifidobacteria* and Quality Characteristics of Soy Yogurt Prepared with Different Proteolytic Enzymes and Starter Culture

Jung-Eun Lee and Sook-Young Lee*
Department of Food & Nutrition, Chung Ang University

The quality characteristics of soy yogurt prepared with different proteolytic enzymes and starter culture were evaluated. In order to facilitate the growth of lactic acid bacteria and subsequent production of lactic acid, soy protein isolate(SPI) was hydrolyzed using three kinds of proteases; one extracted from *Aspergillus oryzae*, bromelain and α -chymotrypsin. The cultural systems employed thereafter for lactic fermentations were: 1) *Bifidobacterium bifidum*, 2) *B. bifidum* and *Lactobacillus acidophilus*, 3) *B. bifidum* and *Lactobacillus bulgaricus*. In soy yogurt, pH was more decreased by mixed culture method than single culture method with the accumulation of lactic acid. Viable cells of lactic acid bacteria in soy yogurts were measured 10^8 CFU/g by the single culture method while 10^9 CFU/g by the mixed culture method except α -chymotrypsin treatment. The amount of free amino acids in soy yogurts were substantially increased by enzyme treatment. Viscosity was decreased by enzyme treatment, resulting in higher viscosity by α -chymotrypsin treatment. Water holding capacity was found to be higher in the single culture method in case of enzyme treatment. Among the various volatile flavor components isolated and identified after enzyme hydrolysis, acetaldehyde, ethanol, diacetyle, butyl alcohol contents tended to increase by lactic fermentation.

Key words: soy yogurt, quality characteristics, proteases, soy protein isolate, culture method

서 론

대두단백은 필수아미노산을 풍부하게 제공하는 양질의 식물성 단백으로써 동물성 단백과 비교하여 가격이 저렴하므로 동물성 단백의 대체식품으로 사용되고 있다. 대두단백은 식품영양 측면에서 뿐만 아니라 생리활성도 우수하여 혈청 콜레스테롤의 함량을 낮추는 역할을 하며 항암효과, 골다공증의 예방을 비롯하여 신장기능 이상증상을 개선하는 등의 작용을 한다^(1,2). 특히 분리대두단백은 단백질을 90% 이상 함유하고 있으며 제품의 조직감 개선 및 냉동식품의 결착력 등을 증가시키기 위해 사용되고 있을 뿐만 아니라 분리대두단백을 첨가한 요구르트, 영양음료, 치즈, 아이스크림 등의 가

공품에도 이용될 수 있다⁽³⁻⁸⁾.

대두단백을 이용한 soy yogurt에 관한 연구를 종합하여 보면 soy yogurt 제조시 두유나 대두단백을 효소처리하므로써 콩비린내를 감소시켰고 젖산균의 생육을 촉진시켰다. Lee와 Oh의 연구⁽⁴⁾에서는 분리대두단백을 trypsin과 α -chymotrypsin으로 처리하여 대두요구르트를 제조한 결과 효소처리에 의해 산생성이 촉진되었으며, Murata 등⁽⁹⁾은 *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa* 등의 미생물에서 추출한 단백분해효소로 대두단백을 효소처리한 결과 대두 특유의 맛과 향기가 없었고 bromelain, papain 등으로 효소처리한 경우보다 쓴맛을 생성하지 않았다고 보고하였다. 또한 Kwon의 연구⁽⁵⁾에서는 대두단백을 효소처리하여 soy yogurt를 제조한 다음 이를 동결하여 frozen soy yogurt를 제조하였다. 이 연구에 의하면 *bifidobacteria*의 종류를 달리하여 frozen soy yogurt를 제조한 결과 *B. bifidum*으로 제조한 경우 관능적 특성이 가장 우수한 것으로 보고하였다.

우리나라 뿐만 아니라 일본과 유럽을 포함한 서구 여러 나라에서는 젖산균 발효유를 제조하기 위하여 과거에는 *lacto-*

*Corresponding author : Sook Young Lee, Department of Food & Nutrition, Chung Ang University, Naeri san 40-1, Daeduk-myun, Ansung-si, Kyungki-do 456-756, Korea

Tel: 82-31-670-3274
Fax: 82-31-676-8741
E-mail: syklee48@hanmail.net

*bacilli*와 *streptococci*가 주로 이용되어 왔으나 *bifidobacteria*의 유용성이 밝혀짐에 따라 최근에는 *bifidobacteria*가 가장 많이 사용되고 있다. *Bifidobacteria*는 주요 발효 산물로 acetic acid와 lactic acid를 1.5 : 1로 생산하여 정장효과가 *lactobacilli*보다 크며 유해 세균의 장내 증식을 억제하고, 암모니아, 페놀성 물질, 세균성 독소 등의 장내 생산을 감소시킨다⁽⁶⁾. 특히 *Bifidobacteria*로 발효시킨 발효유는 산미가 부드러우며 냉장저장기간 동안 산도의 상승이 적고 생리적으로 가치가 있는 L(+)-lactic acid를 함유하는 등의 장점⁽⁷⁾이 있으나 혐기적 조건을 주어야 하는데 *bifidobacteria*를 산소의 존재하에서 배양할 경우 생성되는 H₂O₂가 *bifidobacteria*의 생장을 저해하므로 H₂O₂를 분해할 수 있는 *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* 및 *S. thermophilus* 등의 젖산균과 혼합배양이 필요하다⁽⁸⁾.

그러므로 본 연구에서는 분리대두단백을 3종류의 단백분해효소로 처리하여 젖산균들의 생육을 촉진시키고 질감, 품미 등의 품질이 향상된 frozen soy yogurt를 제조하기 위한 중간단계로서의 soy yogurt 발효과정에 있어서, *B. bifidum*으로 단독배양하거나 *B. bifidum*과 *L. acidophilus* 또는 *B. bifidum*과 *L. bulgaricus*로 혼합배양하여 단백분해효소와 배양방법의 종류가 비피더스균의 생육특성 및 soy yogurt의 유리아미노산 함량, 점도, 보수력, 휘발성 향기성분 등에 미치는 영향을 알아보기자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 분리대두단백(SPI)은 A.D.M.(Decatun, IL, USA)사의 Proten 972를 사용하였고, 안정제는 sodium alginate와 carrageenan의 혼합물인 monoice를 (주)광일에서 제공받아 사용하였다.

효소처리에 사용된 *Aspergillus oryzae*로부터 추출된 단백분해효소(P-4032, activity: 3.8 units/mg protein), bromelain(B-4882, activity: 6.1 units/mg protein), α -chymotrypsin(C-4129, activity: 54 units/mg protein)은 Sigma사의 제품을 사용하였다. 사용균주는 *Bifidobacterium bifidum*(KCTC 3176), *Lactobacillus acidophilus*(ATCC 2182), *Lactobacillus bulgaricus*(KCTC 3188)로서 한국생명공학연구소에서 분양받았으며 사용된 올리고당은 isomaltoligosaccharide로 (주)삼양제넥스 연구소에서 제공받았다.

균주의 배양 및 처리조건

*L. acidophilus*와 *L. bulgaricus*는 MRS(Difco, Detroit, MI, USA) broth로 배양하였고 *Bifidobacterium bifidum*은 0.05%의 L-cysteinⁱ 첨가된 MRS broth로 배양하여 사용하였다. *B. bifidum*, *L. acidophilus* 및 *L. bulgaricus*는 37°C로 고정된 배양기에서 24시간 배양하여 soy yogurt 제조에 이용하였다. 요구르트 접종시에는 4°C에서 1,770×g로 20분간 원심분리시킨 다음 상등액을 제거하고 균체만 회수하여 접종하였다.

분리대두단백의 효소처리 및 시료의 제조

Kim(Lee) 등⁽¹⁰⁾의 방법을 약간 변형하여 SPI를 효소처리하였다. 즉 10% SPI 용액(w/v)을 만들고 6N NaOH를 이용하

여 각각 pH 7.5(*A. oryzae*로부터 추출된 단백분해효소), 7.0(bromelain) 및 7.8(α -chymotrypsin)로 조정한 다음 항온수조에서 시료의 온도가 37°C가 되게 하여 조단백질함량의 0.5% (w/w)의 효소를 각각 첨가한 후 20분간 교반하면서 반응시켰다. 효소반응이 끝난 SPI 용액은 즉시 87°C에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시켜 반응을 정지시킨 다음 6 N HCl을 이용하여 pH 7.0으로 조정하였다.

시료는 Lee와 Oh의 방법⁽⁴⁾을 약간 변형하여 제조하였다. 효소처리 및 비효소처리된 분리대두단백 용액(분리대두단백 45 g+증류수 450 mL)에 soybean oil 20 g, 안정제 2.5 g을 첨가하여 soy yogurt mix를 제조한 다음 121°C에서 15분간 멸균하였다. 또한 Mailard 반응을 방지하기 위해서 isomaltoligosaccharide 40 g에 증류수 40 mL를 첨가하여 수용액으로 만든 다음 121°C에서 15분간 멸균하여 soy yogurt mix와 잘 섞어 주었다. 그 후 37°C로 냉각되면 *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* 배양액을 *B. bifidum* 단독배양에서는 2%(v/v) 접종하였고 *B. bifidum*과 *L. acidophilus* 또는 *L. bulgaricus*와의 혼합배양에서는 각각 1%(v/v)씩 접종하여 37°C에서 14시간 동안 배양하여 soy yogurt를 제조하였다.

분리대두단백의 가수분해도 측정

An⁽¹¹⁾의 방법에 따라 효소처리 또는 무처리한 분리대두단백 1 g을 각각 증류수 100 mL 첨가하여 자석교반기로 교반시켜 분산시켰다. 이 용액 1 mL를 취하여 micro-Kjeldhal법으로 질소량을 측정하였으며, 또한 위의 분산액 중 각각 10 mL를 취하여 20% TCA 10 mL과 혼합한 후 3,980×g에서 20분간 원심분리한 다음 상등액 4 mL를 취하여 micro-Kjeldhal 법으로 질소량을 측정하였다. 가수분해도는 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Degree of hydrolysis (\%)} = \frac{10\% \text{ TCA soluble N}}{\text{total N}} \times 100$$

pH 및 산도 측정

pH는 pH meter(Model 520A, Orion Co., USA)를 사용하여 측정하였으며 산도는 시료 10 g을 취하여 동량의 증류수로 희석한 다음 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 소비된 NaOH의 소비량을 구한 후 lactic acid(% w/w)로 환산하여 표시하였다.

생균수

시료를 각각 1 g씩 무균적으로 취하여 멸균 peptone 수에 의한 10배 희석법으로 희석하고 MRS(Difco, Detroit, MI, USA) 배지에 plating한 후 *B. bifidum*은 anaerobic jar(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하여 37°C로 고정된 배양기에서 48~72시간 동안 혐기적으로 배양하였고 *L. acidophilus* 및 *L. bulgaricus*는 호기적으로 배양하여 colony 수가 25~250개가 나타나는 평판을 선택하여 신출하였다.

유기산 측정

Marsili 등⁽¹²⁾의 방법을 변형하여 5 g의 시료에 5 mL의 탈이온수와 20 mL의 acetonitrile을 가하여 50 mL의 centrifuge tube에서 2분간 혼들어 준 후 5,420×g에서 5분간 원심분리한 다

Table 1. Operating condition of amino acid analyzer for free amino acids

Instrument:	Biochrom 20 Amino acid analyzer (Pharmacia Biotech)
Column:	High performance column (200×4.6 mm + Resin pot)
Buffer solution:	citrate
Buffer flow rate:	35 mL/hr
Ninhydrin flow rate:	25 mL/hr
Column temp.:	53~90°C
Wave length:	570 nm, 440 nm
Injection volume:	40 μL

음 상등액을 0.2 μm membrane filter로 여과하여 HPLC (Model 305, Gilson Co., France)로 분석하였다. 컬럼은 Aminex HPX-87H를 사용하였으며 검출기는 UV detector를 사용하였고 시료를 20 μL 주입하여 65°C에서 0.008N H₂SO₄ mobile phase로 하여 유속 0.6 mL/min의 속도로 분석하였다.

유리아미노산 측정

Kim 등⁽¹³⁾의 방법을 변형하여 5 g의 시료에 5 mL의 틸이 온수를 가한 다음 0.5 g의 sulfosalicylic acid를 첨가하고 4°C에서 1시간 방치한 후 1,350×g에서 30분간 원심분리하였다. 상등액을 citrate buffer(pH 2.5)와 1:1로 혼합한 다음 0.2 μm membrane filter로 여과하여 아미노산 자동분석기로 유리아미노산을 분석하였으며 분석조건은 Table 1과 같다.

점도 및 보수력 측정

점도는 Ioanna 등⁽¹⁴⁾의 방법에 의해 Brookfield viscometer (Model LVF, Brookfield Eng., USA)를 사용하였으며, 4°C에서 spindle No. 4를 사용하여 60 rpm에서 spindle이 돌기 시작한 후 1분이 되는 순간의 점도를 centipoise(cp)단위로 읽었다. 보수력은 Estelle 등⁽¹⁵⁾의 방법에 따라 시료 10 g을 원심분리관에 담아 원심분리기(Model SR 20.22, Jouan Co., France) 10°C에서 20,160×g로 30분간 원심분리시킨 다음 상등액을 제거하였으며, 또한 10분간 방치한 후에 생성된 상등액을 스포이드로 제거한 다음 침전물의 중량을 재어서 다음 식에 의하여 보수력을 계산하였다.

$$\text{Water holding capacity (\%)} = \frac{\text{wt. of sample after remove supernatant}}{\text{wt. of sample}} \times 100$$

휘발성 향기성분 측정

시료의 휘발성 향기성분 측정은 Lee 등⁽¹⁶⁾의 방법을 변형하여 30 g의 시료를 100 mL의 병에 넣고 35 g의 Na₂SO₄를 첨가하여 rubber septum으로 밀봉한 후 60°C의 항온수조에서 20분간 교반하였다. 발생한 headspace gas를 5 mL gas-tight syringe(Hamilton Co. USA)로 1 mL를 취하여 gas chromatograph(Model 3400, Varian Co., USA)로 분석하였다. 컬럼은 DB-FFAP(30 m×0.25 mm×0.25 μm)를 사용하였으며 검출기는 flame ionization detector를 사용하였고 주입구의 온도는 200°C, 검출기의 온도는 220°C로 하였다. Carrier gas는 헬륨을 사용하였다.

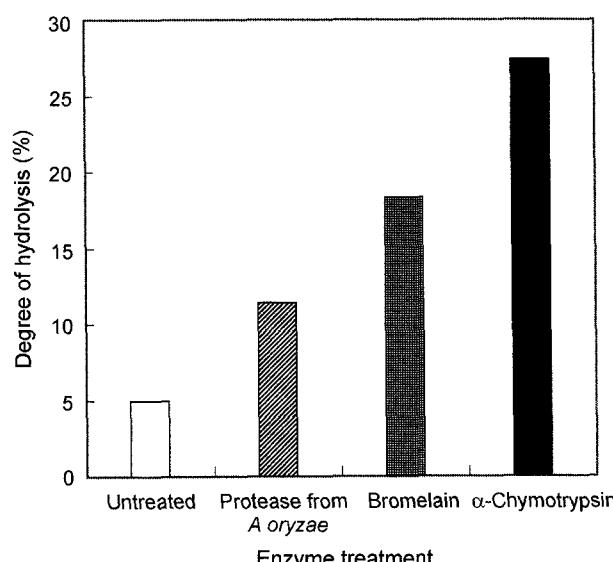


Fig. 1. Degree of hydrolysis of soy protein isolates after proteolytic enzyme treatments.

통계처리

pH, 적정산도, 점도 및 보수력 측정결과 얻어진 자료에 대한 통계처리는 SAS package를 사용하였으며 분산분석한 결과 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 시료간의 유의차를 검증하였다.

결과 및 고찰

분리대두단백의 가수분해도

비효소처리군, *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소, bromelain 처리군 및 α-chymotrypsin 처리군의 가수분해도(Fig. 1)는 각각 5.0, 11.4, 18.3, 27.4%였다. α-Chymotrypsin 처리군의 가수분해도는 27.4%로써 가장 높았는데, 본 실험에서 사용한 비효소처리 분리대두단백에 비하여 5.5배 정도 증가하였다.

pH 및 적정산도에 미치는 영향

효소처리와 배양방법을 달리하여 제조한 soy yogurt의 pH는 Fig. 2와 같다. 효소처리를 달리한 soy yogurt의 pH는 단독배양시에 비효소처리군이 6.44로 가장 높았으나, 혼합배양시에는 α-chymotrypsin 처리군이 가장 높았다($p<0.001$). 또한 배양방법을 달리한 시료의 pH는 혼합배양시에 단독배양보다 낮았다($p<0.001$). *B. bifidum*을 *L. acidophilus* 또는 *L. bulgaricus*와 혼합배양한 경우 *B. bifidum*의 생장을 저해하는 H₂O₂를 분해할 수 있는 catalase 생성능력이 있어 H₂O₂에 의한 생장저해작용을 감소시킬 수 있으므로⁽⁸⁾ 혼합배양시에 *B. bifidum*의 생장이 촉진되어 산생성이 증가되므로써 pH가 저하되었던 것으로 생각된다.

적정산도(Fig. 3)는 효소처리군 중에서 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군과 bromelain 처리군은 비효소처리군보다 더 높았으나 α-chymotrypsin 처리군은 비효소처리군과 거의 차이가 없었다. 이러한 결과는 단백질 가수분해에

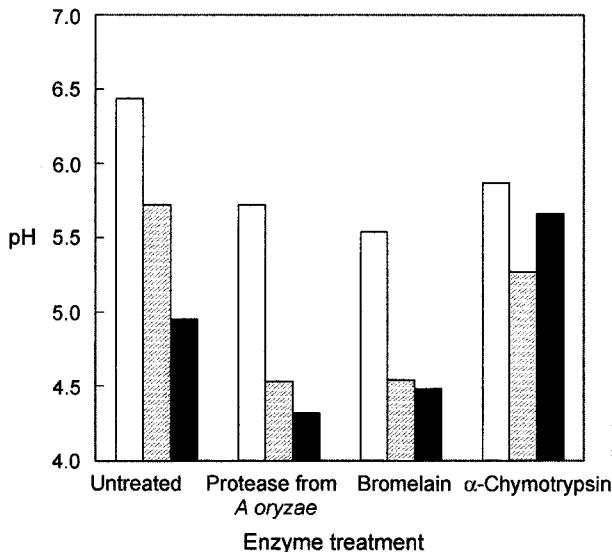


Fig. 2. Effects of types of starter culture and enzyme treatment on the pH of soy yogurts.

□ : *B. bifidum*, ▨ : *B. bifidum*+*L. acidophilus*, ■ : *B. bifidum*+*L. bulgaricus*.

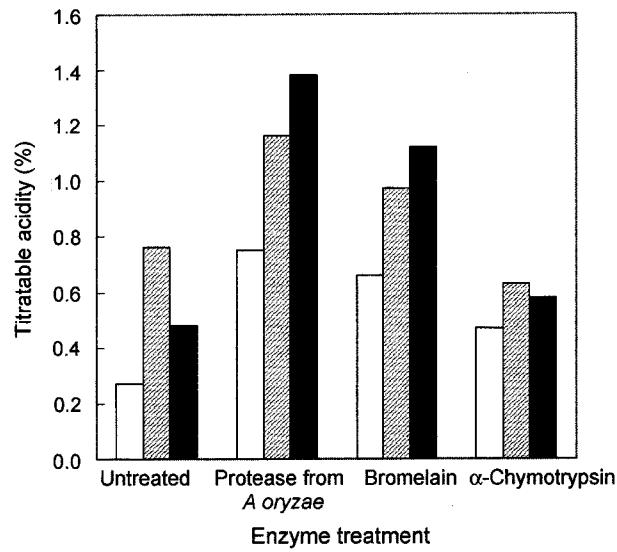


Fig. 3. Effects of types of starter culture and enzyme treatment on the titratable acidity of soy yogurts.

□ : *B. bifidum*, ▨ : *B. bifidum*+*L. acidophilus*, ■ : *B. bifidum*+*L. bulgaricus*.

의해 생성된 peptide가 젖산균에 의한 산생성을 촉진시켰을 것으로 생각되나 단백질 가수분해도가 가장 높았던 α -chymotrypsin 처리군의 경우는 분리대두단백을 α -chymotrypsin으로 처리하여 생성된 소수성 아미노산을 말단기로 갖고 있는 peptide를 본 실험에 사용된 젖산균들이 잘 이용하지 못했던 것으로 생각된다. 배양방법을 달리한 시료의 적정산도는 혼합배양시에 단독배양보다 높았다($p<0.001$). *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군과 bromelain 처리군에서는 혼합배양시에 산도가 0.97~1.38%로 acid yogurt의 적정산도 1.0~1.3%에 속하였으며 α -chymotrypsin 처리군은 mild yogurt의 적정산도 0.6~0.9%에 근접하였다.

생균수에 미치는 영향

Soy yogurt의 *B. bifidum*, *L. acidophilus* 또는 *L. bulgaricus*의 생균수(Table 2)는 *B. bifidum*의 경우 혼합배양시 단독배양보다 더 많았던 반면, α -chymotrypsin 처리군의 경우는 배양방법에 따라서 *B. bifidum*의 생균수 변화가 거의 없었다. 이와 같이 *B. bifidum*의 생균수가 *L. acidophilus* 또는 *L. bulgaricus* 혼합배양에 의하여 증가하였던 것은 Kough의 연구⁽¹⁷⁾와 일치하였는데, 이는 기질내에 들어 있는 산소를 호기

성균인 *L. acidophilus*와 *L. bulgaricus*가 이용하여 협기적 조건으로 만들어 주므로써 협기성균인 *B. bifidum*의 생장을 촉진시킨 것으로 생각된다. 또한 단독배양시에 비효소처리군의 경우 *B. bifidum*의 생균수가 10^7 CFU/g이었으나 효소처리군에서는 10^8 CFU/g으로 증가하였는데, 이는 분리대두단백을 효소처리하므로써 *B. bifidum*이 이용 가능한 질소가 생성되어 *B. bifidum*의 생장을 촉진하였기 때문이라고 추측된다. 그러나 혼합배양시에는 효소처리가 생균수에 크게 영향을 미치지 않았다. 혼합배양의 경우는 비효소처리군, *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군 및 bromelain 처리군에서 10^9 CFU/g을 유지하였으나 α -chymotrypsin 처리군은 10^8 CFU/g을 나타내었다.

요구르트의 성분 규격에 의하면 생균수는 10^8 CFU/mL 이상이 되어야 하는데, 본 연구에서는 생균수가 비효소처리군의 *B. bifidum* 단독배양의 경우를 제외한 모든 시료군에서 10^8 CFU/g 이상이었으므로 요구르트의 성분 규격에 적합하였다.

유기산 함량에 미치는 영향

Soy yogurt의 유기산 조성 및 함량(Table 3)은 배양방법에

Table 2. Viable cell counts of *B. bifidum*, *L. acidophilus* and *L. bulgaricus* of proteolytic enzyme-treated soy yogurts fermented with various starter culture
(unit: 10^8 CFU/g)

Enzyme treatment ¹⁾	Starter culture	Bb		BbLa		BbLb	
		<i>B. bifidum</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. bulgaricus</i>
Untreated		0.38	13.1	13.6	19.9	27.6	
Protease from <i>A. oryzae</i>		2.48	22.4	21.8	69.3	32.8	
Bromelain		2.77	31.8	40.2	34.8	49.6	
α -Chymotrypsin		2.14	2.49	2.60	7.49	7.11	

¹⁾Bb: Inoculated with *B. bifidum*, BbLa: Inoculated with *B. bifidum* and *L. acidophilus*, BbLb: Inoculated with *B. bifidum* and *L. bulgaricus*

따라 뚜렷한 차이를 나타내어, 단독배양의 경우 acetic acid 와 succinic acid의 함량이 가장 많았으며 lactic acid, citric acid 순으로 많았다. 반면 혼합배양에서는 lactic acid의 함량이 가장 많았고 acetic acid, pyruvic acid 순으로 많았으며 단독배양시에 생성된 citric acid와 succinic acid는 검출되지 않았다. Acetic acid의 함량은 단독배양시에 전체 유기산 중 33.5~51.6%를 차지하였으나 혼합배양에서는 7.6~19.2%를 차지하였다. 이상 젖산발효균인 *B. bifidum*은 glucose 대사의 최종산물로 생산하는 산을 acetic acid와 lactic acid를 1.5 : 1의 비율로 생산하며 소량의 formic acid, succinic acid, ethanol 등을 생성한다고 보고하였는데^(6,18), 본 연구에서는 acetic acid 와 lactic acid의 비율이 단독배양에서 1.8~2.8 : 1이었다. Lactic acid의 함량은 효소처리를 달리한 시료의 경우 적정산도가 가장 높았던 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군이 가장 많았으며, 혼합배양시에 크게 증가하여 전체 유기산 중 80.8~92.4%를 차지하였는데, 혼합배양에서의 산도증가는 주로 lactic acid에 기인하는 것으로 생각된다. 향미성분의 생성에 필요한 전구체인 citric acid는 단독배양에서만 검출되었으며, 비효소처리군에서 6.5 ppm으로 가장 많았으며 bromelain 처리군과 α -chymotrypsin 처리군에서 각각 5.4, 4.2 ppm을 나타내었던 반면 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군에서는 citric acid가 검출되지 않았다. 단독배양에서만 검출된 succinic acid는 α -chymotrypsin 처리군에서 52.9 ppm으로 가장 많았고 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군, bromelain 처리군 및 비효소처리군에서는 각각 38.6, 28.8, 20.9 ppm이였다.

유리아미노산의 함량에 미치는 영향

Soy yogurt의 유리아미노산의 함량(Table 4)은 효소처리와 배양방법에 따라 큰 차이를 나타내었다. 효소처리군의 유리아미노산 함량은 비효소처리군에 비하여 현저히 많았다. Shin의 연구⁽¹⁹⁾에 의하면 대두유를 neutrase와 bromelain으로 각각 효소처리하여 *L. acidophilus*로 발효시켜 젖산발효 대두유를 제조한 결과, 효소처리에 의해 유리아미노산의 함량이 증가

Table 3. Organic acid contents of proteolytic enzyme-treated soy yogurts fermented with various starter culture (unit: ppm)

Product ¹⁾	Organic acid				
	Acetic	Lactic	Citric	Pyruvic	Succinic
U-Bb	19.4	7.9	6.5	Tr ³⁾	20.9
U-BbLa	12.2	104.0	ND ²⁾	0.1	ND
U-BbLb	12.1	108.0	ND	0.1	ND
P-Bb	67.3	24.4	ND	ND	38.6
P-BbLa	18.7	142.0	ND	Tr	ND
P-BbLb	13.9	169.0	ND	ND	ND
B-Bb	63.0	26.8	5.4	ND	28.8
B-BbLa	23.4	133.0	ND	0.1	ND
B-BbLb	13.6	154.0	ND	0.1	ND
C-Bb	40.1	22.3	4.2	ND	52.9
C-BbLa	16.8	73.7	ND	0.1	ND
C-BbLb	17.0	71.6	ND	0.1	ND

¹⁾U: untreated, P: protease from *A. oryzae*, B: bromelain, C: α -chymotrypsin, Bb: *B. bifidum*, BbLa: *B. bifidum*+*L. acidophilus*, BbLb: *B. bifidum*+*L. bulgaricus*

²⁾ND: Non-detectable, ³⁾Tr: Trace (<0.1 ppm).

되었다고 보고하여 본 연구와 일치하였다. 효소처리군 중에서는 효소의 기질특이성이 없는 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군이 다른 효소처리군에 비하여 isoleucine, leucine, lysine 및 arginine 등의 염기성 아미노산의 함량이 많았으며 특히 lysine 함량이 매우 많았다. 즉 유리아미노산의 함량이 높았던 *A. oryzae*에서 추출한 단백분해효소처리군은 가수분해도가 높았던 α -chymotrypsin 처리군에 비해 lactic acid 함량이 높았고 pH는 더 낮으며, 산도는 높았고 생균수는 많았는데 이것은 유리아미노산의 함량이 높았기 때문이라고 생각된다. 배양방법에 따라서는 생성된 총 유리아미노산 함량이 효소처리군의 경우 특히 bromelain 처리군과 α -chymotrypsin 처리군에서는 단독배양에서 가장 많았으나 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군에서는 배양방법에 따라 큰 차이가 없었다. Kough의 연구⁽¹⁷⁾에 의하면 9% 환원

Table 4. Free amino acid contents of proteolytic enzyme-treated soy yogurts fermented with various starter culture

(unit: nmol/100 g sample)

Product ¹⁾	Free amino acid														
	Glu	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Amm ⁴⁾	Arg	Pro	Total
U-Bb	ND ²⁾	Tr ³⁾	Tr	Tr	Tr	0.3	0.1	0.1	0.2	Tr	ND	0.1	ND	ND	0.8
U-BbLa	Tr	0.1	0.1	0.2	0.1	0.5	0.2	0.1	0.3	0.2	ND	0.5	ND	0.7	2.7
U-BbLb	Tr	0.1	0.1	0.2	0.1	0.5	0.2	0.1	0.3	0.2	21.2	0.4	ND	0.6	24.0
P-Bb	ND	0.6	0.8	0.6	0.7	23.6	221.2	5.2	13.4	1.8	1521.0	1.6	176.4	0.5	1967.4
P-BbLa	ND	0.8	0.8	1.6	0.6	26.5	156.1	5.4	12.5	1.7	1361.2	1.6	156.0	0.5	1725.3
P-BbLb	ND	0.6	1.0	1.8	0.7	34.8	155.0	5.9	24.4	1.8	1559.6	1.7	163.2	0.7	1951.2
B-Bb	Tr	0.6	0.2	0.4	0.5	1.4	141.1	4.4	4.6	0.9	ND	1.1	83.9	0.3	239.7
B-BbLa	Tr	0.5	0.3	0.3	0.4	2.1	58.3	4.2	4.8	0.9	ND	1.3	74.3	0.7	148.1
B-BbLb	Tr	0.9	0.2	0.3	0.3	0.5	61.9	4.3	4.5	0.8	ND	1.0	73.8	0.5	149.0
C-Bb	ND	0.1	0.1	0.4	0.3	ND	96.3	3.0	1.7	0.7	ND	0.4	44.8	0.1	147.2
C-BbLa	Tr	0.5	0.1	0.7	0.2	0.3	77.2	3.3	3.4	0.7	ND	0.8	ND	0.2	87.4
C-BbLb	ND	0.3	0.1	ND	0.3	1.3	69.7	2.9	2.4	0.6	ND	0.6	ND	0.2	78.4

¹⁾U: untreated, P: protease from *A. oryzae*, B: bromelain, C: α -chymotrypsin, Bb: *B. bifidum*, BbLa: *B. bifidum*+*L. acidophilus*, BbLb: *B. bifidum*+*L. bulgaricus*, ²⁾ND: Non-detectable, ³⁾Tr: Trace (<0.1 nmol), ⁴⁾Amm: ammonia

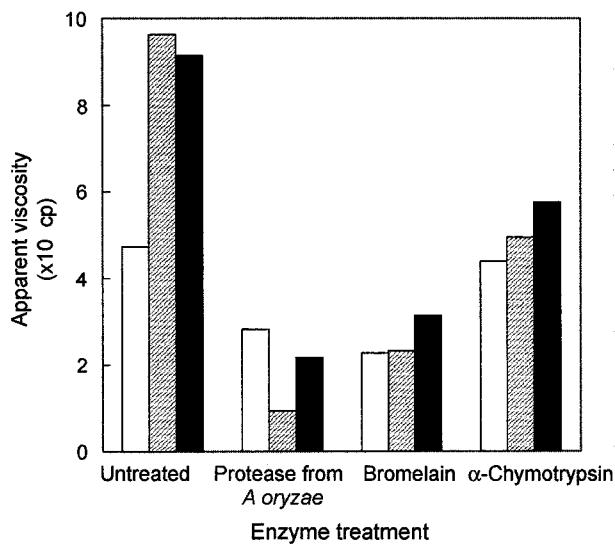


Fig. 4. Effects of types of starter culture and enzyme treatment on the apparent viscosity of soy yogurts.

□ : *B. bifidum*, ▨ : *B. bifidum+L. acidophilus*, ■ : *B. bifidum+L. bulgaricus*.

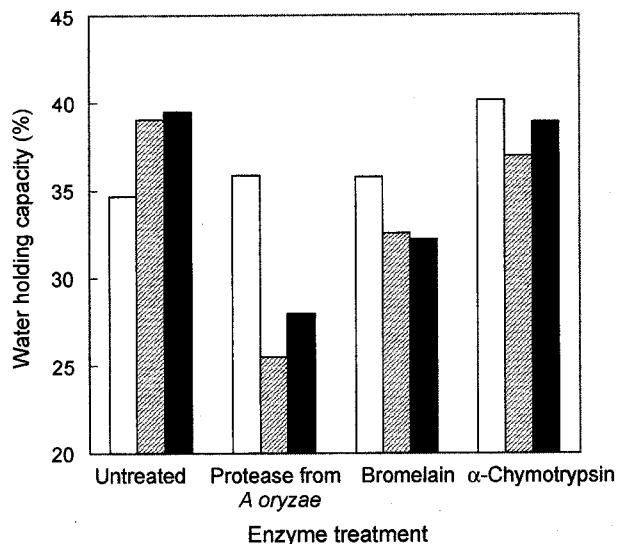


Fig. 5. Effects of types of starter culture and enzyme treatment on the water holding capacity of soy yogurts.

□ : *B. bifidum*, ▨ : *B. bifidum+L. acidophilus*, ■ : *B. bifidum+L. bulgaricus*.

탈지유에 *B. bifidum*, *L. acidophilus*, *L. casei* 및 *S. thermophilus*를 접종하여 발효유를 제조한 다음 유리아미노산 함량을 측정한 결과 *B. bifidum*으로 제조한 발효유에서 가장 많았는데, 이는 *B. bifidum*의 단백질 분해 및 아미노산 합성에 기인한 것으로 추측된다고 보고하였다. 전반적으로 단독배양에서는 methionine, leucine 및 arginine의 함량이 많았고 *B. bifidum*과 *L. acidophilus*의 혼합배양에서는 ammonia와 proline의 함량이 약간 많았다. 특히 단독배양시 비효소처리군의 경우 총 유리아미노산의 함량이 매우 낮았는데, 이것은 발효가 잘 이루어지지 않았기 때문이다.

점도 및 보수력에 미치는 영향

효소처리와 배양방법을 달리하여 제조한 soy yogurt의 점도(Fig. 4)는 효소처리군이 비효소처리군에 비하여 더 낮았다($p<0.001$). Lee 등⁽²⁰⁾에 의하면 효소에 의하여 분리대두단백의 가수분해가 진행됨에 따라 고유점도가 감소되는데, 고유점도는 분산질의 분자량 및 기하학적 분자구조와 깊은 관계가 있으며 분자량이 작을수록 또한 구조가 구형에 가까울수록 고유점도는 낮아진다고 보고하였다. 배양방법을 달리한 시료의 점도는 비효소처리군, bromelain 및 α-chymotrypsin 처리군에서 혼합배양시에 단독배양보다 더 높았다($p<0.05$). 발효유의 제조 중 일부는 발효유 제조시 다당류를 생성하여 점도에 영향을 주는데, 특히 *Str. thermophilus*와 *L. bulgaricus*는 arabinose, mannose, glucose 및 galactose 등으로 구성된 다당류를 생성한다⁽²¹⁾. 본 연구에서 *L. bulgaricus*가 *B. bifidum* 및 *L. acidophilus*에 의해 다당류를 생성하여 soy yogurt의 점도증가에 영향을 주었을 것으로 생각된다.

Soy yogurt의 보수력(Fig. 5)은 단독배양시에는 효소처리에 의해 보수력이 낮아지지 않았다. 그러나 혼합배양시에는 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소 및 bromelain 효소처리에 의해 보수력이 크게 감소하였으나, α-chymotrypsin 처리군은

크게 낮아지지 않았다. 즉 효소처리를 달리한 시료의 보수력은 단독배양의 경우 α-chymotrypsin 처리군에서 가장 높았으나($p<0.05$) 혼합배양의 경우는 비효소처리군에서 가장 높았다($p<0.001$). Kwon의 연구⁽⁵⁾에서 효소처리한 분리대두단백에 *bifidobacteria*와 oligosaccharide의 종류를 달리하여 제조한 soy yogurt의 점도는 대체적으로 보수력과 유사한 경향을 나타내었는데, 이것은 보수력이 증가할수록 결합수와 자유수의 비율에 있어서 결합수의 양이 상대적으로 증가되어 점도의 증가에 영향을 준다고 보고하였다. 본 연구에서도 효소처리군 중에서 점도가 가장 높았던 α-chymotrypsin 처리군의 보수력이 가장 높았고, 전반적으로 점도가 낮았던 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군의 보수력이 낮은 경향을 나타내었다.

휘발성 향기성분의 함량에 미치는 영향

Soy yogurt의 휘발성 향기성분 함량은 Table 5와 같다. Acetaldehyde의 함량은 전반적으로 발효에 의해 증가되었으나 효소처리에 의해서는 약간 감소되었다. 요구르트의 전체적 향미에 다소 기여하는 것으로 알려진 acetone 함량은 휘발성 향기성분 중 가장 많은 양이 검출되었으며 발효에 의해 bromelain 처리군에서는 오히려 0.83 μg에서 0.60~0.62 μg으로 감소하였으나 다른 시료군에서는 발효 후 약간 증가하였다. Methanol의 함량은 대부분의 시료에서 0.01~0.05 μg이었으며 특히 비효소처리군에서는 검출되지 않았다. Ethanol은 젖산균에 의해 생성되며 요구르트의 향미에 큰 영향을 미치지는 않는 성분으로 발효전보다 발효 후 증가하는 경향을 나타내었으며 효소처리에 의해서는 그 함량의 차이가 없었다. Diacetyl 함량은 Table 5에서 보는 바와 같이 전반적으로 발효에 의해 증가되었다. 배양방법에 따라서는 비효소처리군, *A. oryzae* 처리군 및 α-chymotrypsin 처리군에서 *B. bifidum*과 *L. acidophilus* 혼합배양시에 diacetyl 함량이 가장 많았으나, bromelain 처리군에서는 단독배양시에 0.41 μg으로 가

Table 5. Volatile flavor components of proteolytic enzyme-treated soy yogurts fermented with various starter culture

(unit: $\mu\text{g}/100 \text{ g sample}$)

Product ¹⁾	Acetaldehyde	Acetone	Methanol	Ethanol	Diacetyl	Butyl alcohol
U-Non ²⁾	0.15	0.64	ND ³⁾	0.01	0.40	ND
U-Bb	0.23	0.50	ND	0.09	0.59	ND
U-BbLa	0.10	0.91	ND	0.15	0.90	0.03
U-BbLb	0.29	0.64	ND	0.12	0.52	0.02
P-Non	0.07	0.57	0.01	0.04	0.38	ND
P-Bb	0.31	0.69	0.02	0.16	0.67	ND
P-BbLa	0.14	0.99	0.05	0.22	0.71	0.02
P-BbLb	0.19	0.60	0.02	0.15	0.35	0.02
B-Non	0.07	0.83	0.01	0.01	0.57	ND
B-Bb	0.12	0.61	0.01	0.14	0.41	0.01
B-BbLa	0.03	0.60	0.01	0.13	0.39	0.03
B-BbLb	0.15	0.62	0.01	0.12	0.39	0.01
C-Non	0.08	0.50	0.01	Tr ⁴⁾	0.22	ND
C-Bb	0.12	0.60	0.01	0.10	0.61	0.02
C-BbLa	0.13	0.86	0.02	0.03	0.73	0.02
C-BbLb	0.12	0.63	0.02	0.09	0.57	0.03

¹⁾Bb: *B. bifidum*, BbLa: *B. bifidum+L. acidophilus*, BbLb: *B. bifidum+L. bulgaricus*, ²⁾Non: Without starter cultures, ³⁾ND: Non-detectable, ⁴⁾Tr: Trace (<0.01 ppm).

장 많았다. Butyl alcohol은 분리대두단백에서는 전혀 검출되지 않았으나 발효에 의해 생성되었고 모든 시료군에서 그 함량이 0.01~0.03 $\mu\text{g}/\text{g}$ 이였다.

요 약

본 연구는 분리대두단백을 세 종류의 단백분해효소로 처리하여 가수분해시킨 후 *B. bifidum*으로 단독배양하거나 *B. bifidum*과 *L. acidophilus* 또는 *B. bifidum*과 *L. bulgaricus*로 혼합배양하여 soy yogurt를 제조한 다음 비피더스균의 생육특성 및 시료의 품질특성을 측정하였다. Soy yogurt에서 혼합배양의 경우 단독배양보다 pH는 더 낮았으나 산도는 더 높았으며 생균수는 더 많았다. 유기산의 함량은 혼합배양의 경우 lactic acid의 함량이 매우 많았으나 단독배양시에는 acetic acid와 succinic acid의 함량이 많았다. 또한 유리아미노산의 함량은 효소처리군의 경우 단독배양시에 혼합배양보다 많았으며 *A. oryzae*로부터 추출한 단백분해효소처리군에서 그 함량이 월등히 많았으나 α -chymotrypsin 처리군에서는 그 함량이 가장 적었다. 이는 효소처리군 중에서 α -chymotrypsin 처리군의 가수분해도는 가장 높았으나 그 가수분해물의 비피더스균 생육촉진 효과가 가장 적어서 유기산 및 유리아미노산의 함량이 가장 낮았고 pH가 가장 높았으며 산도는 가장 낮았고 생균수는 가장 적었다. 효소처리한 soy yogurt의 점도와 보수력은 비효소처리군보다 더 낮았으며, 특히 α -chymotrypsin 처리군의 점도와 보수력은 다른 효소처리군에 비해 더 높았다. 휘발성 향기성분 중 acetaldehyde, ethanol, diacetyl 및 butyl alcohol의 함량은 발효에 의해 증가되었다.

품질이 향상된 frozen soy yogurt를 개발하기 위한 중간단계로써 단백분해효소와 배양방법을 달리하여 soy yogurt를 제조하였으며, 본 연구결과를 전반적으로 종합하여 볼 때 분리대두단백을 단백분해효소로 처리하고 비피더스균에 젖산균들

을 혼합배양하므로써 lactic acid 생성 및 비피더스균의 생육을 촉진시켰다.

감사의 글

본 연구는 1998년 한국과학재단 핵심전문연구과제(과제번호 981-0608-032-2)의 일부이며 연구비를 지원하여 주신 한국과학재단에 깊이 감사드립니다.

문 현

1. Kim, J.S. Current research trends on bioactive function of soybean. Korea Soybean Digest 13:17-24 (1996)
2. Sung, M.K. The anticarcinogenic properties of soybeans. Korea Soybean Digest 13:19-31 (1996)
3. Kim O.H. Application method of isolated soy protein in meat processing. Korea Soybean Digest 9:31-49 (1992)
4. Lee, S.Y. and Oh, G.N. Effects of sweeteners and enzyme treatment on the quality characteristics of soy yogurts prepared with soy protein isolates. Kor. J. Soc. Food Sci. 15:73-80 (1999)
5. Kwon, Y.S. Effects of *Bifidobacteria* and oligosaccharides on the quality attributes of frozen soy yogurts containing enzyme treated soy protein isolates. M. S. Thesis, Chung Ang Univ. Seoul, Korea (1998)
6. Hughes, D.B. and Hoover, D.G.: *Bifidobacteria*, their potential for use in American dairy products. Food Technol. 54:74-83 (1991)
7. Kang, K.H. Lactic acid bacteria food science. p. 257 Sungkyunkwan Univ. Press, Seoul, Korea (1990)
8. Hong, S.M., Shin, J.H., Kim, E.R., Lee, J.I. and Yu J.H. Effect on the texture and flavor of frozen yogurt by mixed strain culture. Korean J. Dairy Sci. 7:203-213 (1995)
9. Murata, K., Kusakabe, I., Kobayashi, H., Akaike, M., Park, Y.W. and Murakami, K. Studies on the coagulation of soymilk-protein by commercial proteinases. Agric. Biol. Chem. 51:385-389 (1987)
10. Kim(Lee), S.Y., Park, S.W. and Rhee, K.C. Textural properties of cheese analogs containing proteolytic enzyme modified soy protein isolate. J. Am. Oil Chem. Soc. 69:755-759 (1992)

11. An, T.H. Effects of enzyme modification and soy protein isolate on the quality of cheese analogs containing lipoxygenase-defected soy milk. Ph. D. Thesis, Chung Ang Univ. Seoul, Korea (1998)
12. Marsilli, R.T., Ostapenko, H., Simmons, R.E. and Green, D.E. High performance liquid chromatographic determination of organic acids in dairy products. *J. Food Sci.* 46:52-57 (1981)
13. Kim, C.H., Shin, Y.K., Baick, S.C. and Kim, S.K. Changes of oligosaccharide and free amino acid in soy yogurt fermented with different mixed culture. *Korean J. Food Sci. Technol.* 31:739-745 (1999)
14. Ioanna, S., Martinou, V. and Gregory, K.Z. Effect of some stabilizer on textural and sensory characteristics of yogurt ice cream from sheep milk. *J. Food Sci.* 55:703-707 (1990)
15. Estelle, M.P., Clunies, Y.K. and Mullen, M. Physical properties of yogurt: A comparison of vat versus continuous heating systems of milk. *J. Dairy Sci.* 69:2593-2603 (1986)
16. Lee, J.S., Kim, Y.B. and Ko, Y.T. Flavor and volatile compounds of soy yogurt. *Korean J. Food Sci. Technol.* 17:51-53 (1985)
17. Kough, J.S. Studies on the milk fermentation and the substrate conversion by *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11863. Ph. D. thesis, Chung Ang Univ. Seoul, Korea (1987)
18. Shan, N.P. *Bifidobacteria*: Characteristics and potentiation for application in fermented milk products. *Milchwissenschaft* 52:16-20 (1997)
19. Shin, J.H. Effect of ISP(Isolated Soy Protein) treated with enzyme on fermented soy milk. Ph. D. Thesis, Kyung Hee Univ. Seoul, Korea (1986)
20. Lee C.H., Kim C.S. and Lee S.P. Studied on the enzymatic partial hydrolysis of soybean protein isolates. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16:228-234 (1984)
21. Rasic, J.L. and Kurmann, J.A. *Yoghurt: Science Grounds, Technology, Manufacture and Preparations*. p. 63 Technical dairy publishing house, Copenhagen, Denmark (1978)

(2001년 7월 18일 접수)