

밤 용액의 젖산발효

진 효 상

전주대학교 자연과학부

Lactic Acid Fermentation of Chestnut Broth. Jin, Hyo-Sang. *Division of Natural Science, Jeonju University, Jeonju #560-759, Korea* – For lactic acid fermentation of chestnut broth, 10 strains of bacteria were isolated from human feces and commercial yogurt, 6 of which were identified to be *Bifidobacterium*, and the rest *Lactobacillus*. Acidities of the chestnut broths fermented by these strains were lower than yogurt, but more than two times higher than yogurt made from seeds or vegetables including soy milk. To stimulate acidity of the fermented broths, addition of yeast extract and tryptone peptone were the most effective at the concentration of 0.2 and 0.4%, respectively, while glucose addition above 0.5% up to 8% did not increase the acid production except a few strains of *Lactobacillus*. Among the tested fruits and vegetables, carrot juice supplementation was the most effective in acid production by most of the tested strains. Saccharification of chestnut broth by hydrolyzing process greatly increased the acid production at 25% of cooked chestnut. However, compared to the results from the 8% of unhydrolyzed chestnut, the net increase in acid production by hydrolysis was not much stimulative.

Key words: Lactic acid fermentation, chestnut broth, lactic acid bacteria, bifidobacteria

우리나라는 연간 약 100,000톤의 밤을 생산하여 세계 제 2위의 밤 생산국이지만 밤을 이용한 다양한 가공식품이 개발되지 못한 이유로 모두 이용되지 못하고 있으며 일부는 수확되지도 않고 방치되고 있는 형편이다[3]. 밤이 지나는 독특한 향미와 감미 외에도 섬유질 함량이 비교적 높아 식이요법에서 변비완화식으로 권유되어 온 점을 고려할 때, 밤을 직접 발효하여 고섬유성 식물성 젖산균 발효제품으로 제조가 가능하다고 생각되어 본 연구에서는 밤을 이용하여 발효음료로 개발하기 위한 가능성을 검토하였다.

젖산균은 장내세균의 이로운 작용을 강화하거나 보충하여 인체의 건강을 돕는다는 많은 보고[7]에 따라 요구르트 등의 음료 형태로 널리 소비되고 있을 뿐만 아니라 변비, 설사 등의 각종 특정 질환의 예방 또는 치료를 목적으로한 tablet 형태의 의약품으로도 이용되고 있다[2,14]. 요구르트는 전통적으로 우유를 젖산균으로 발효시켜 만들어 왔으나, 유제품은 allergy, lactose intolerance 등의 문제를 지닌 사람이나 저지방 다이어트를 행하는 사람에게는 기피되어 왔다. 이러한 문제를 보완하기 위하여 그간 당근[16], 야채[11], 토마토, 두유[20,21], 감자[19], 쌀[9,17], 쌀과 사과박[10], 쌀과 두유 단백질[13]등을 이용하여 식물성 요구르트를 제조하기 위한 시도가 있었다. 고섬유성 요구르트는 비만이나, 과민성 장 질환[8]을 가진 사람들에게 선호되고, acidophilus milk와 함께 현재 노인성 변비에 처방되고 있

는 약제 중에 가장 부작용이 적은 제품으로 인식되고 있다 [6].

식물성 재료로 젖산균 발효제품을 만드는데는 젖산균의 생육에 의해 적정한 산도를 형성시키는 것이 중요하다. 그 이유는 젖산균은 주로 단당류나 이당류를 이용하여 에너지를 얻고 젖산을 분비하는데, 채소의 경우[16]에는 전체적인 당함량이 적어 발효에 의해 충분한 산이 생성될 수 없고, 곡류의 경우[17]에는 전분과 같은 다당류가 주성분이어서 가수분해시키지 않으면 발효에 이용되지 못하여 산생성이 낮기 때문이다. 따라서 밤과 같은 전분질 식품을 이용하여 발효음료를 개발하기 위해서는 밤용액에서 산생성이 우수한 발효균주를 분리해야 하고 이들의 발효와 생육에 우수한 발효조건을 강구하는 일이 중요하다고 여겨진다.

본 연구에서는 밤을 이용하여 발효음료를 개발할 목적으로 밤 용액에서 젖산발효에 적성을 보이는 미생물을 분리하고 이들을 이용하여 밤용액을 발효시키고 젖산발효에 적합한 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

젖산균의 분리 및 동정

20-25 세의 정상적인 배변습관을 가지는 대학생(남학생 10 인과 여학생 5인)을 선정하고, 표본은 대상자들이 원하는 시간에 실험실에서 가까운 지정된 장소에서 제공하게 하였다. 분변 표본은 즉시 냉동저장용 배지(Brain Heart Infusion 37 g, glycerol 100 ml, cysteine 0.5 g, resazurin 0.1% solution. 1 ml, pH 7 [1]) 에 혐기적으로 희석하고

*Corresponding author
Tel. 063-220-2326, Fax. 063-220-2326
E-mail: jin@jeonju.ac.kr

CO₂가스로 치환된 작은 병에 소액분주하여 -60°C 냉동고에 보관하였다.

냉동 보관된 시료는 실온에서 서서히 용해시키고 희석용 배지에서 혐기적으로 희석한 다음 이중 10¹-10⁶ 배 희석한 것을 TJA와 MRS 평판배지에 도말하고, CO₂ 가스 하에서 혐기적으로 3일 배양하였다. 나타난 집락들 중 catalase 음성, 그람 양성균을 1차 분리하고 혐기성 배양시험을 수행하여 통성호기성균과 혐기성균으로 나누었다. 이들은 추가로 Rapid API32A와 API50CHL 등의 상업용 키트를 이용하여 생화학 시험을 수행하고, fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) 활성을 측정하고, 발효산물을 HPLC로 확인하여 acetate/lactate의 비율을 계산하여 최종 Chevalier 등의 분류법[4]에 따라 동정하였다.

시판 요구르트로부터 균분리는 구매한 몇 종의 요구르트를 희석하고 위와 같은 배지와 조건으로 분리 동정하였다.

밤 용액의 제조, 발효 및 당화

밤 용액은 밀폐용기에 냉동시킨 삶은 밤과육을 60°C의 물에 넣고 해동시킨 다음 Homogenizer로 일정시간 균질화시키고 LK tube에 넣어 멸균시켜 제조하였다. 발효는 멸균한 밤 용액 또는 당화액에 MRS broth에서 12-15시간 자란 균주를 4% 접종하고 37°C에서 24-48시간 배양하였다.

밤용액의 당화를 위해서 증숙 밤과육 100 g을 물 200 ml에 넣고 균질화시켰다. 균질용액 100 ml에 물 50 ml와 액화효소액(α형 당화효소) 100 μl를 넣고 90°C에서 1시간 액화시킨 후 물 40 ml와 고지추출액(β형 당화효소) 10 ml를 첨가하여 55°C에서 2시간 당화시켰다. 당화액은 냉장고에 저장하여 필요한 때 발효에 사용하였다. 고지추출액은 12.5 %의 고지액을 55°C에서 1시간 정지한 다음 여과하여 얻었다.

옛기름에 의한 당화는 50 g의 옛기름을 200 ml의 물에 침지시키고 55°C에서 1시간 정지후 여과하여 옛기름 추출액을 얻은 후 고지추출액과 같은 조건으로 사용하였다.

산도 및 균체량 측정

산도는 발효액 5 ml에 증류수 5 ml를 가하여 10 ml로 하고 페놀프타레인 3 적을 가한 후 0.1 N NaOH로 중화적정하여 소비된 NaOH 용액의 ml 수를 총산도로 표시하였다.

발효액의 균체량은 탁도로 측정하였고 탁도에 미치는 영향을 고려하여 밤용액의 침전물을 사전에 원심분리에 의해 제거한 다음 배양에 사용하였다.

결과 및 고찰

균주의 분리 및 동정

성인의 분변과 시판 요구르트로부터 MRS와 TJA 배지에서 catalase 음성이고 Gram 양성인 균들을 분리하고 이들을 밤 용액에서 발효 시험하여 상대적으로 우수한 발효적

성을 보이는 균주를 10주 분리하고 각각 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, NBL1, PAP2, F1R4, MGG1, MGG2, PAP1으로 잠정 명명하였다. 이들을 동정하기 위하여 Rapid32A 키트에 의한 생화학적 특성, F6PPK의 활성, 발효산물 중 acetate와 lactate의 비율을 조사한 결과는 Table 1과 같았다. Chevalier의 분류법[4]에 따라 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, NBL1, PAP2의 6주는 α-galactosidase (α-GAL)가 양성이며, F6PPK 활성이 있으며, acetate와 lactate의 비율이 1.0 이상이어서 *Bifidobacterium*으로, F1R4, MGG1, MGG2, PAP1의 4주는 α-GAL은 음성이며 F6PPK 음성이고, Acetate와 lactate의 비율이 0.04 이하였으므로 *Lactobacillus*로 동정하였다.

발효조건외 검토

밤 용액 중 증숙밤 함량의 영향

증숙밤을 증류수에 현탁시키고 균질화시키면 용출된 가용성 성분이 미생물의 생육과 발효에 이용된다. 밤용액의 발효에서 적절한 산도가 형성되는 때는 어느 정도의 증숙밤 농도가 필요한지를 검토하기 위해 증숙밤의 함량을 변화시키고 4% 접종으로 37°C에서 48시간 발효 후 산생성을 측정하였다(Table 2).

시험균들은 2%에서 32%의 범위에서 농도를 증가시킬수록 산 생성은 증가되었다. 밤용액의 산생성의 정도는 10% 용액에서 적정산도는 5-10의 범위였고, 이것은 발효유의 산도 범위인 11-16[12]보다는 적었지만, 두유의 2-6[21]보다 높았고, 야채나 과일 발효의 0.2-1.0[9]보다는 훨씬 더 높았다. 이는 밤의 균질화에 의해 용출되는 가용성 성분이 두유, 채소 혹은 과일에 비해 더 많기 때문으로 생각된다. 농도 증가에 의한 산생성 촉진의 크기는 F1R4와 PAP1가 가장 컸고 4%에서 8%로 증가시킬 때 상승폭이 가장 컸다. 따라서 밤농도는 8% 농도를 사용함이 가장 경제적인 것으로 사료되었다.

당 첨가의 효과

8%의 밤용액에 당을 0.5%에서 8%의 범위에서 첨가시키고 37°C에서 48시간 배양 후 산도를 비교했을 때 당의 첨가는 첨가량에 비례하여 산생성을 촉진하지 않았다(Table 3). 그러나 당 첨가에 의해 추가 생성되는 산의 양은 균주의 종류에 따라 달랐다. F1R4, MGG1, MGG2, PAP1 등의 *Lactobacillus* 속의 균들은 첨가되는 당의 농도에 따라 산생성이 증가되었으나 나머지 *Bifidobacteria*들은 증가하지 않거나 감소하여 다른 경향을 나타내었다. 이는 당 첨가에 의해 생성된 산에 의해 균의 생육이 억제되거나 당 이외의 생육에 필요한 성분의 부족으로 균의 생육이 낮기 때문으로 생각된다.

당 종류의 영향

젖산균은 발효 유제품에서 흔히 발견되고 모두 β-galac-

Table 1. Biochemical characteristics of the isolated strains

Test*	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
URE	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+		+	+	-	-	-	+	-	+
αGAL	+	+	+	+	-	-	-	w	-	+
βGAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
βGP	w	w	w	w	-	-	-	+	-	w
αGLU	-	-	-	-	+	w	+	-	w	-
βGLU	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+
αARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
βGUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
βNAG	+	+	+	+	w	w	+	+	w	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
αFUC	-	-	-	-	w	+	w	-	+	-
NIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAL	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
ArgA	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w
ProA	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
LGA	w	w	w	w	-	w	-	w	-	w
PheA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LeuA	w	w	+	+	+	+	+	+	+	w
PyrA	+	+	+	+	-	w	-	+	w	+
TyrA	w	+	+	w	-	w	-	w	w	w
AlaA	w	w	w	w	w	+	w	w	+	w
GlyA	w	w	w	w	-	w	-	-	-	w
HisA	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
GGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SerA	+	+	+	+	+	w	w	+	+	+
F6PPK	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
Ac/Lc	<1.0	<1.0	<1.0	<1.0	>0.04	>0.04	>0.04	<1.0	>0.04	<1.0

Test*: Test from URE to SerA was carried out with Rapid 32A Kit.

F6PPK: fructose-6-phosphate phosphoketolase.

Ac/Lc: ratio of acetic acid to lactic acid.

+: positive, W: weakly positive, -: negative

Table 2. Effect of chestnut concentration on acidity of the fermented broth

Concentration*	Titrable acidity (ml, 0.1 N NaOH)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
2	1.19	1.10	1.15	1.23	1.58	0.80	1.12	0.79	1.53	0.55
4	1.84	1.94	1.62	2.12	1.85	0.78	0.88	1.01	2.16	0.96
8	2.75	2.12	2.63	2.28	4.56	0.99	1.27	1.48	4.97	1.28
16	3.23	3.02	3.20	2.76	8.09	1.35	1.77	2.29	7.79	1.85
32	3.84	3.72	4.15	3.78	9.08	2.47	2.42	3.23	8.88	3.22

Concentration*: Grams of boiled chestnut flesh dissolved in 100 ml of water.

tosidase 활성을 가지고 때문에 우유에 존재하는 당인 lactose를 선호할 것으로 생각된다. 따라서 산 발효에 있어서 당의 특이성을 알아보기 위해 밤용액에 0.5% 농도로 포도당 및 3 종의 이당류를 보강하고 산생성에 미치는 영향

을 보았을 때(Table 4) 기대와는 달리 이당류 첨가에 의해 촉진되는 산의 양은 거의 모든 균에서 포도당의 촉진 수준을 넘지 않았다. 또한 같은 이당류를 비교하더라도 MGG2, NBL1, PAP2를 제외한 대다수 분리 균들은 산 발효에 있

Table 3. Effect of sugar concentration on acidity of the fermented broth

Concentration (%)	Titrable acidity (ml, 0.1 N NaOH)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0.5	2.37	1.98	2.29	1.07	2.45	3.32	3.12	0.82	2.49	0.92
1.0	2.18	2.01	2.14	0.81	2.57	3.66	3.15	0.92	2.75	1.05
2.0	2.16	2.17	2.06	0.81	3.01	3.71	3.20	1.03	3.06	0.91
4.0	2.20	2.24	2.33	1.01	3.48	3.76	3.60	0.91	3.57	0.83
8.0	2.26	2.07	2.35	1.10	3.62	3.48	3.31	0.79	3.69	0.85

Concentration of cooked chestnut: 8 g/100 ml H₂O

Table 4. Effect of sugars on the acidity of the fermented broth

Suars	Titrable acidity (ml, 0.1 N NaOH)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
Glucose	2.47	2.01	1.94	1.86	6.05	3.25	3.36	1.67	5.74	1.82
Lactose	2.47	1.97	1.96	1.90	3.91	0.97	3.95	1.78	3.89	1.88
Maltose	3.06	2.13	1.99	1.99	5.84	1.28	1.97	1.57	5.62	1.66
Sucrose	2.85	2.27	2.23	2.05	5.91	1.05	1.27	1.77	5.90	1.63

Sugar concentration: 0.5% each, concentration of cooked chestnut: 8 g/100 ml H₂O, nutrient supplementation: Yeast extract 0.2%, Phyton peptone 0.4%

어서 lactose보다 maltose와 sucrose를 더 잘 이용하는 것으로 나타났다. 따라서 밤 용액의 발효에서 산도를 증가시킬 목적으로 당을 보충하는 경우는 포도당이 가장 적합한 것으로 생각된다.

중균 배양액 접종 량의 영향

초기 중균 배양액의 접종 량이 증가할수록 산 생성이 증가하였으나 0.5-8%의 범위에서 산 생성 증가율은 접종량의 증가율에 비례하여 증가되지 않았다(Table 5). 따라서 우유의 발효시에는 통상 2%의 범위에서 접종하기 때문에[19] 본 발효에서는 생산 조건에 따라 0.5-2%의 범위에서 알맞은 접종 량을 선택할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 *Bifidobacteria*가 포함된 발효제품의 경우에는 발효기간의 단축, 균주 간의 발효특성 차이의 극대화, 오염 균에 의한 영향 감소 등을 고려하여 5-20%의 범위에서 접종하는 점[15]을 고려하여 본 실험에서는 4%로 진행하기로 하였다.

영양물 보강의 효과

밤의 조성을 고려할 때 밤 용액은 당질을 풍부하게 포함하고 있다고 생각되지만 다른 영양소는 충분치 않거나 당에 적절한 비례에 있지 않다고 생각되어 밤용액에 질소원과 생육 촉진 영양성분 등을 보강하고 산생성에 미치는 영향을 조사하였을 때 Table 6과 같은 결과를 얻었다.

Cysteine은 질소 원으로서 뿐 아니라 환원성으로 인하여 흔히 혐기성 조건을 요구하는 균들의 생육을 촉진하기 위하여 첨가된다[18]. Cysteine을 0.05%의 농도로 배지에 첨가한 결과 *Lactobacillus* 속의 균들은 오히려 산생성이 감소되는 경향을 보이는 데 반하여 *Bifidobacteria* 속의 균들은 증가되었다.

제조 원료가 다른 3종의 peptone을 질소원으로 보강한 효과는 크게 달랐다. 일반적으로 *Lactobacillus*는 *Bifidobacteria*에 비해 peptone 첨가에 의하여 산생성이 더 크게 촉진되었다. 가장 큰 촉진은 phytone peptone을 F1R4와 PAP1에 첨가할 때였고 모두 약 130%의 증가율을 보였다.

Table 5. Effect of inoculant size on the acidity of the fermented broth

Inoculant size(%)	Titrable acidity (ml, 0.1 N NaOH)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0.5	2.68	2.02	2.22	2.15	5.14	3.33	3.47	1.47	5.65	1.84
1.0	2.47	2.11	2.00	2.02	5.85	3.64	3.48	1.73	5.52	1.69
2.0	2.74	2.03	2.13	2.22	5.82	3.65	3.60	1.76	5.56	1.90
4.0	2.86	2.33	2.34	2.34	6.25	3.60	3.75	1.76	6.20	1.80
8.0	3.06	2.28	2.72	2.43	6.34	4.05	4.11	1.93	6.86	1.98

Chestnut concentration: 8 g/100 ml H₂O, Nutrient supplementation: yeast extract 0.2%, phytone peptone 0.4%, glucose 0.5%

Table 6. Effect of nutrient supplementation on the acidity of the fermented broth

Supplements	Titrable acidity (ml, 0.1 N NaOH)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
Blank	2.83	1.81	2.09	1.85	2.38	3.00	2.93	0.86	2.54	0.92
Cys	2.59	2.24	2.16	2.23	1.90	2.70	2.97	0.92	2.17	0.78
GP	2.80	2.26	2.25	2.19	3.72	3.70	3.82	1.06	3.64	1.23
PP	2.91	2.24	2.30	2.31	5.53	3.63	3.64	1.68	5.92	1.70
TP	2.83	2.28	2.23	2.17	5.67	3.71	3.77	1.66	3.92	1.82
YE	2.68	2.29	2.34	2.08	3.34	3.68	3.75	1.10	3.33	1.40

Chestnut concentration: 8 g/100 ml H₂O, Cys: cysteine 0.05%, GP: gelysate peptone 0.4%, PP: phytone peptone, 0.4%, TP: trypticase peptone 0.4%, YE: yeast extract 0.2%

Table 7. Effect of vegetable and fruit juice on the acidity of the fermented broth

Vegetables and fruits	Titrable acidity (ml, 0.1 N NaOH)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
None	2.04	1.90	1.82	1.65	2.45	3.17	2.99	0.89	2.41	0.88
Apple	2.46	1.80	2.03	1.87	3.29	4.12	2.84	0.82	3.30	0.75
Orange	2.22	1.82	1.69	1.62	4.12	4.94	3.66	0.78	4.01	0.88
Tomato	2.37	2.06	2.10	2.01	4.13	4.51	3.62	0.83	4.17	0.83
Pear	2.67	1.88	2.05	1.85	3.53	4.61	3.18	1.22	3.49	1.09
Cucumber	2.64	1.96	1.99	1.95	4.94	4.05	3.42	1.17	5.07	1.14
Carrot	2.65	1.78	1.88	1.77	5.76	4.92	3.85	1.42	5.78	1.34
Dropwort	2.81	2.30	2.20	2.18	5.38	3.80	3.69	1.90	5.42	1.14

Supplement concentration: 10%(V/V), Chestnut concentration: 8 g/100 ml H₂O, Other supplement: glucose 0.5%

따라서 phytone peptone이 발효액의 영양적 불균형을 가장 잘 보완해주는 것으로 생각된다.

Yeast extract 첨가는 M1R1을 제외한 대부분의 균주에서 산 생성을 촉진하였고 그 효과는 F1R4와 PAP1에서 가장 컸다.

천연과즙 및 야채즙 보강의 효과

사과, 귤, 토마토, 배, 오이, 당근, 미나리 등의 천연 채소와 과일의 즙을 10% 농도에서 가하고 산 생성에 미치는 영향을 본 결과(Table 7), 천연물 추출액은 M2R1을 제외한 대부분의 균주에서 산 생성을 촉진하였다. 그 중 F1R1, MGG1, PAP1가 가장 크게 촉진되었으며, F1R4는 당근과 미나리 즙에 의해, MGG1은 귤과 당근에 의해, PAP1은 오이, 당근, 미나리 즙에 의해 산 생성이 가장 크게 촉진되었다. 당근은 시험균 모두에서 촉진작용을 나타내었으며 이러한 결과는 *Bifidobacteria*에 의한 발효에서 당근이 다른 채소나 과일에 비해 산도와 생육면에서 우수하였다는 박 등[16]의 결과와 같다. 이에 따라 본 발효액의 배지는 맛 등을 고려하여 당근 즙 등의 천연물 보강이 가능하다고 사료된다.

발효시간 별 균체 생육의 영향

발효액의 배양 시간별 균체량의 변화를 알아보기 위해 밤 현탁액을 원심 분리하여 침전물을 제거하고 난 투명한 발효액으로 발효를 시행하고 시간별로 흡광도의 변화를 살

폈다. 생육양상을 보면 일반적으로 24시간이면 거의 생육이 정지기에 이르지만 48시간까지는 계속 증가하였고, 그 이상의 시간에는 생육이 증가하지 않았다(Table 8). 따라서 발효시간은 제품의 요구되는 형편에 따라 24시간 또는 48시간까지 진행할 수 있는 것으로 생각된다. 이러한 발효시간은 48시간까지 생육이 지속되는 당화 쌀용액에서의 발효경향[17]과 유사하였으나 12-24시간에 발효가 종료되는 채소류의 경우[11]에 비하여는 길었다. 균주별로 보면 F1R4, MGG1, PAP1 등은 초기 접종액의 탁도가 컸고, 최종 탁도도 가장 커서 발효액에서 우수한 생육 적성을 나타내었다.

가수분해에 의한 발효액의 발효촉진

밤은 전분이 많아 곡물과 같은 성질을 가진다. 곡물을 젖산발효에 이용하는 경우에는 amyolytic enzyme을 생산하는 균주를 사용하는 경우[9]를 제외하고는 곡물을 전분분해 효소로 가수분해시키는 것이 보통이다[17]. 따라서 밤의 당화가 발효에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 곡물을 당화하는 일은 전통적으로 양조공업과 식혜제조와 같은 식품 공업에서 이루어져 왔기 때문에, 이들 방법으로 발효액을 당화시키고 그 영향을 비교해 보았다(Table 9).

양조공업에서 사용하는 효소로 당화된 발효액은 산도가 4.39-14.67의 범위로 크게 증가되었으며 촉진정도는 엷기름 추출액에 의한 처리군의 3.31-9.96 범위 보다 더 컸다. 이

Table 8. Changes in turbidity of the fermented broth during the cultivation time

Cultivation (hour)	Absorbance (550 nm)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0	0.19	0.17	0.15	0.16	0.41	0.41	0.35	0.15	0.41	0.14
8	1.12	1.24	0.87	1.21	1.16	1.13	1.11	0.73	1.14	0.72
24	1.30	1.45	1.40	1.41	1.78	1.73	1.61	0.83	1.84	0.83
48	1.48	1.59	1.54	1.55	1.99	1.93	1.80	0.99	1.98	0.99
72	1.48	1.59	1.55	1.55	2.01	1.94	1.79	1.00	1.98	1.02

Supplements: phytone peptone 0.4%, yeast extract 0.2%, glucose 0.5%, chestnut concentration: 8 g/100 ml H₂O

Table 9. Effect of saccharification on the acidity of the fermented broth

Treat	Titrable acidity (ml, 0.1 N NaOH)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
Control	3.00	2.82	3.19	2.89	8.18	1.55	1.74	2.29	7.42	2.27
0.5%Dex	3.39	2.80	3.08	2.89	6.87	4.63	4.83	2.47	6.84	2.71
M	4.17	4.05	4.08	4.22	9.52	4.79	6.31	3.31	9.96	3.35
0.50M	3.06	2.88	3.42	3.12	7.77	2.59	3.30	1.97	7.42	1.84
0.25M	3.23	2.21	2.17	2.17	3.15	1.42	1.50	0.92	3.15	0.85
K	6.74	6.49	6.49	6.53	13.97	14.67	13.19	5.35	14.08	4.39
0.50K	4.76	4.40	4.46	4.83	11.00	11.50	11.65	2.48	9.81	2.30
0.25K	3.16	2.46	2.24	2.44	5.63	6.23	6.61	1.45	5.62	1.45

Control: chestnut concentration of 25 g/100 ml H₂O, 0.5% Dex: 0.5% dextrose, M: chestnut broth treated with malt extract, 0.50M: half strength of M, 0.25M: quarter strength of M, K: chestnut broth treated with liquafying and saccharifying enzymes, 0.5K: half strength of K, 0.25K: quarter strength of K

러한 증가는 0.5% 포도당이 보강된 군에 비해 훨씬 더 커서, 효소처리에 의한 축진은 단지 당 생성의 증가에만 그치지 않고 당이 분해되면서 조직에 변화가 일어나 다른 성분도 함께 용해되어 용액 중 유기성분의 함량이 증가되기 때문으로 보인다. 그러나 8% 밤용액과 같은 크기의 농도로 환산하면 대조구의 1/3회석액과 비슷한데, 1/3회석액의 산도 범위를 가수분해 처리하지 않고 발효한 자료의 범위와 비교해 볼 때 당화 처리에 의해 산도가 약간 증가하기는 하지만 큰 차이는 없었다. 따라서 당화공정은 발효액에서 요구되는 특성 및 발효액에 미치는 영향 등을 면밀히 고려하여 선택해야 한다고 사료된다.

요 약

분변과 요구르트에서 10주의 젖산균을 분리하여 이중 6주는 *Bifidobacteria*로, 4주는 *Lactobacilli*로 동정하였다. 이들을 이용하여 8% 증숙밤용액을 발효시켰을 때 발효액의 산도는 요구르트보다는 낮았으나 두유를 비롯한 식물성 요구르트보다는 2배 이상 높았다. 산도를 증가시키기 위해 Yeast extract와 tryptone peptone를 첨가할 때 0.2%와 0.4%의 농도에서 가장 높았다. 포도당을 0.5-8.0% 범위의 첨가하였을 때 *lactobacilli*에 의한 발효액에서는 산생성이 촉진되었으나 *bifidobacteria*에서는 그렇지 않았다. 시험된 과일과 채소즙 중

에서는 당근즙의 첨가가 가장 큰 촉진 효과를 나타내었다. 25% 밤용액에서 고지추출액에 의한 가수분해는 젖산생성을 크게 촉진하였으나 가수분해하지 않은 8% 밤용액에서의 젖산생성량과 비교하였을 때 산생성 순증가량은 그다지 크지 않았다.

감사의 말

본 연구는 농림부 연구비(98년 농림특정연구과제)에 의해 수행된 과제의 일부이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Balmer, S. E. and B. A. Wharton. 1989 Diet and fecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. *Arch. Disease Child.* **64**: 1685-1690.
- Black, F. T., P. L. Anderson, F. Arskov, K. Gaarslev, and S. Laulund. 1989. Prophylactic efficacy of *lactobacilli* on travellers diarrhoea. *Travel Med.* **5**: 333-335.
- Bulletin G1147-0759 from Korean Forestry Administration. 1998. Study on the development of chestnut peeling machineries. Researched by Korea Food Research institute.
- Chevalier, P., D. Roy, and P. Ward. 1990. Detection of *Bifidobacterium* species by enzymatic methods. *J. Appl. Bacteriol.* **68**: 619-624.
- Considine, D. M. and G. D. Considine. 1982. Yogurt. In

- Foods and Food Production Encyclopedia. Van Nostrand Reinhold Company. New York, Melbourne. pp1238–1239.
6. Floch, M. H. and K. Moussa. 1998. Probiotics and dietary fiber: the clinical coming of age of intestinal microecology [editorial] [see comments]. *J. Clin. Gastroenterol.* **27**: 99–100.
 7. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365–378.
 8. Hasler, W. L. 1995. Irritable bowel syndrome. *Cur. Opinion Gastroenterol.* **11**:16–21.
 9. Park, J. H., H. K. Song, J. B. Ahn, G. E. Ji, and C. K. Mok. 1997. Rice fermentation by Korean amylolytic *Bifidobacterium* spp. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 581–587.
 10. Lee, J. Y., J. H. Park, H. G. Chang, and C. K. Mok. 1999. *Bifidobacterium* fermentation of rice and apple pomace mixture. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 333–338.
 11. Kim, K. H., I. H. Yeo, Y. J. Koo, and J. Y. Yu. 1989. Method of manufacturing vegetable ferment liquor. Korea Patent No. 1653.
 12. Kim, M. S., E. S. Ahn, and D. H. Shin. 1993. Physico-chemical properties of commercial yogurt in Korea. *Kor. J. Food Technol.* **25**: 340–344.
 13. Mok, C. K., J. S. Han, Y. J. Kim, N. S. Kim, D. Y. Kwon, and Y. J. Nam. 1991. Risogurt, a mixture of lactic acid fermented rice and soybean protein: Development and properties. *Kor. J. Food Technol.* **23**: 745–749.
 14. Oksanen, P. J., S. Salminen, M. Saxelin, and P. Hemeleinen. 1990. Prevention of travellers diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann. Med.* **22**: 58–63.
 15. Rasic, R. Lj. and J. A. Kurmann. 1983. Dairy preparation, manufacture and technology. In *Bifidobacteria* and their role. Birkhauser Verlag. Basel. p120.
 16. Park, S. Y., Y. T. Ko, J. Y. Lee, C. K. Mok, J. H. Park, and G. E. Ji. 1997. Fermentation of carrot juice by *Bifidobacterium*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **29**: 571–575.
 17. Tominaga, M. and K. Sato. 1996. Lactic acid fermentation of saccharified solution from rice flour. *J. Food Technol.* **61**: 627–631.
 18. Willis, A. T. 1991. Anaerobic culture methods. In *Anaerobic Microbiology*. Levett PN(eds), IRL Press at Oxford university press, Oxford, New York, Tokyo. p2.
 19. Shin, Y. S., H. J. Sung, D. H. Kim, and K. S. Lee. 1994. Preparation of yogurt added with potato and its characteristics. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**: 266–271.
 20. Ko, Y. T. 1989. Acid production by lactic acid bacteria in soy milk treated by microbial protease or papain and preparation of soy yogurt. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **21**: 379–386.
 21. Yu, J. H., I. D. Lew, and H. S. Jin. 1989 Interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum* on Utilisation of Galacto-oligosaccharides in Soymilk, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 533–538.

(Received Jun. 25, 2001/Accepted Aug. 17, 2001)