

대두 전처리 공정 및 식물 유래 유산균 혼합 배양에 의한 기능성 유산균 음료 생산기술 개발

조은경 · †조형용 · 김병철 · 신해현* · 조석철** · 국무창*** · 변유량****

(주) 다손, *백석문화대학 외식산업학부, **경희대학교 피부생명과학센터,
안양대학교 해양생명공학과, *(주)바이오벤

Development of Pretreatment and Mixed Culture Processes for Plant Originated Lactic Acid to Produce a Functional Lactic acid Beverage

Eun-Kyung Cho, †Hyung-Yong Cho, Byeong-Cheol Kim, Hae-Hun Shin*,
Seok-Cheol Cho**, Moo-Chang Kook*** and Yu-Ryang Pyun****

Dason Co., Bucheon 421-741, Korea

*Division of Food Service Industry, BaekSeok Culture University, Cheonan 330-705, Korea

**Skin Biotechnology Center, KyungHee University, Suwon 443-766, Korea

***Department of Marin Biotechnology, Anyang University, Incheon 417-833, Korea

****Bio Van Co., Chuncheon 200-160, Korea

Abstract

This study was conducted to establish process conditions for plant-originated lactic acid production using a mixed culture of plant originated lactic acid bacteria, *Lactobacillus sakei* B2-16, and *Lactobacillus plantarum* P23, which were isolated from kimchi, and *Bacillus subtilis*, which was TP6 isolated from Denjang. Soybean medium was pretreated for 10 minutes at 110°C and hydrolyzed with 0.2%(w/v) cellulase at 55~60°C for at least 2 hrs. The quality of the final fermentation product was influenced by the inoculation ratio of the *Lactobacillus sakei* B2-16, *Lactobacillus plantarum* P23, and *Bacillus subtilis* TP6. The optimum microorganism inoculation ratio was 1:0.7:0.3, *Lactobacillus sakei* B2-16: *Lactobacillus plantarum* P23: *Bacillus subtilis* TP6, respectively. The sensory characteristics of the product were a refreshing sourness and a soft flavor.

Key words: Plant Originated Lactic Acid Bacteria(POLAB), total soybean, probiotic, functional beverage, mixed culture

서 론

유산균(lactic acid bacteria, LAB)은 치즈, 발효유, 유산균 음료 등의 발효 유제품을 비롯하여 각종 발효 식품의 제조에 전 세계적으로 광범위하게 응용되고 있는 산업적으로 중요한 미생물이다. 특히 국내 대부분의 발효유는 우유를 원료로 하여 제조된 살아있는 유산균을 섭취하기 용이하도록 제조된 대표적인 식품이라 할 수 있다. 발효유를 통하여 섭취된 유산균은 장내 유용균의 증식을 촉진하는 반면, 유해균의 증

식은 억제하여 유익균이 우위를 차지하도록 장내 균총의 균형을 개선하며, 그 결과 장관 감염과 식중독의 방지, 장내 부패 억제, 장의 운동을 촉진하여 변비 방지, 면역력 증가, 발암 억제, 비타민 B군의 생산 등 여러 가지 생리적 기능을 가지는 것으로 밝혀지고 있다(Ji GE 1994; Doron 등 2005; Müller 등 2009). 따라서 유럽 등 서구에서는 요구르트, 유산균 음료와 분말, 과립, 정제 형태의 유산균 생균 제품이 기능성 식품으로서 가장 큰 시장을 형성하고 있다. 뿐만 아니라 최근 들어 유산균은 상술한 장내 미생물 균총의 개선에 의한 건강 증진

† Corresponding author: Hyung-Yong Cho, Dason Co., Bucheon 421-741, Korea. Tel: +82-32-329-4040, Fax: +82-32-321-9025, E-mail: hycho5710@hanmail.net

효과 이외에 생리활성 물질 생산균으로 새롭게 조명되고 있으며, riboflavin, folate, cobalamin 등의 비타민 B군, alanine, tagatose, mannitol, sorbitol 등의 저칼로리당, 세포의 다당류, 올리고당 등의 기능성 소재 생산과 관련되어 활발한 연구가 진행되고 있다(Cho JJ 2000; Ryu 등 1998).

최근에는 이렇게 우유, 치즈 등에서 분리된 유산균과는 별도로 식물성 유산균의 장점이 부각되고 있다. 식물성 유산균은 Plant Originated Lactic Acid Bacteria(POLAB)로 지칭되어 일반 유산균과 차별적으로 취급되고 있으며, 동양에서 예로부터 섭취하던 식물 원료의 발효 식품에서 분리된 유산균을 말한다(Kumagai T 2009). 즉, 한국의 김치는 식물성 유산균의 대표적인 보고라 할 수 있다. 이러한 식물성 유산균은 일반 유산균보다 척박한 환경, 즉 적은 영양소와 천연 항균물질이 포함되어 있는 상황에서 생육하기 때문에 영양소를 분해, 섭취하는 능력이 뛰어나며, 각종 생리활성물질의 생산력도 우수한 것으로 알려져 있다(Igarash T 2007; Huang 등 2008).

대두는 그 기능과 구성성분에서 약간의 차이는 있으나, 대두의 종류에 상관없이 40% 가량을 차지하는 단백질에는 필수 아미노산이 균형 있게 배합되어 있으며, 다른 식물성 단백질에는 부족하기 쉬운 리신이 많은 특징을 지니고 있다. 지방 함유량은 18% 정도이며, 대부분이 불포화지방산으로 50% 이상이 최상급의 리놀렌산이다. 또 리놀렌산의 작용을 돕는 비타민 E도 충분하여 동물성 지방의 과잉 섭취로 인한 콜레스테롤을 제거하는 역할도 한다. 그 외에 대두는 비타민 B가 풍부하여 피로 회복을 도우며, 칼슘, 철분 등의 영양성분도 풍부하다. 이밖에도 항암작용, 동맥경화 및 노화 방지 등 대두의 식품학적 가치는 이루 헤아릴 수 없을 정도로 많다고 할 수 있다(Kim 등 2003). 대두 isoflavone의 지질대사 개선, 암 예방, 갱년기 장애 완화 등의 생리활성이 크게 주목받고 있으며, 중년기 이후의 여성 건강, 성인병 예방에 크게 기여할 것으로 기대된다(Huang & Kuo 2006; Choi & Jung 2008; Lim 등 2008; Yun 등 2008). 대두에는 단백질, 펩타이드 및 isoflavone 등 건강기능성 성분이 풍부하게 함유되어 있다는 사실이 우리나라 국민들에게 새롭게 인식되면서 전통식품에서 건강기능성 식품으로 두유 제품이 새로운 시장을 개척하고 있다(Shin 등 2004; Lee & Kim 2007; Ryu 등 2007).

기존의 국내 대두 발효 음료는 주로 대두 수용성 성분만을 추출하여 분무 건조한 대두 분말이나 두유를 사용하였다(Yasuhisa 등 2005). 이 방법들은 대두 껍질 및 비지에 함유되어 있는 풍부한 식이 섬유가 제거되어 최종 제품의 생리적인 효과가 감소하게 되며 대두의 유용성분의 일부가 제거된다는 단점이 있다. 또한 국내에서 개발된 대두 분말 및 대두유를 이용한 발효 제품에서 사용한 발효균주를 살펴보면 *Bifidobacterium breve*(Yasuhisa 등 2005), *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus*

casei, *Lactobacillus acidophilus*로 구성되는 혼합 균주 또는 그 중 한 가지(Lee & Cho 2007) 등을 선택하는 것으로 식물 유래 유산균이 아닌 유제품 발효에 사용하는 동물유래 유산균을 주로 사용하였다. *Bacillus firmus*를 이용하거나(Lee & Cho 2007), *Bacillus subtilis*를 사용하여 대두를 발효시킨 예(Cho JJ 2004)는 있으나, 각각 2단 발효법을 이용하거나, 음료가 아닌 고체 발효 형식을 이용하는 것으로 음료 형태의 제형화에는 문제가 있다고 할 수 있다.

프로바이오틱스로 *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum*가 함유된 발효 음료는 불규칙적인 식생활, 다양한 스트레스, 무리한 다이어트에서 오는 변비 현상을 해결할 수 있으며, 항산화 효과, 혈압 강하, 변비 개선, 장내균총 개선 효과 등을 나타내는 제품의 개발이 가능하다.

본 연구에서는 한국 전통식품 유래 균들인 식물성 유산균을 대두에 혼합 배양한 대두 발효조성물에서 생산되는 생리활성물질의 기능과 유산균 음료로서 프로바이오틱스의 기능 및 대두의 건강기능성 등의 상승적인 효능을 가진 유산균 음료를 개발하는 것을 목적으로, 대두의 전처리 기술 및 발효 유산균 선정 등에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

본 연구에서는 국내의 김치 및 된장으로부터 분리한 *Lactobacillus lactis* A164, *Lactobacillus lactis* BH5, *Lactobacillus sakei* B2-16, *Lactobacillus plantarum* P-23, *Lactobacillus lactis* L13, 발효 음료 분리균인 *Enterococcus faecium*, 그리고 된장에서 분리한 *Bacillus subtilis* TP-6를 사용하였다.

2. 일반 배지

유산균은 *Lactobacilli* MRS broth(Difco, USA), *Bacillus*균은 modified nutrient 배지(5 g tryptone, 5 g beef extract, 20 g xylose per liter, pH 7.0)를 이용하였다.

3. 배지의 조제

실험에 사용한 대두 배지는 수세한 국산 대두(농협)에 대두 중량 대비 4배의 물을 가하여 100℃의 끓는 물에서 7분간 가열한 다음 상등액을 제거하고, 스크류식 습식미분쇄기(Super Masscolloider, ZA10-15J, Koen, Korea)와 일반 믹서기를 사용하여 미분쇄하였다. 분쇄 후 수분 조절이 끝난 대두 분쇄물은 1차로 가열하여 대두의 조직을 연화시켜 효소 처리 또는 발효 시 기질로 사용하였다.

효소 처리 배지는 가열이 끝난 대두 배지에 식품용 cellulase (Bioland, Korea)를 대두 고형분의 0.2%(w/v)를 첨가하여 반응

온도는 60°C에서 2시간 이상 처리 후 원하는 부원료를 첨가하여 80°C에서 15분간 살균하여 만들었다.

4. 입자 크기

습식미분쇄기와 일반 믹서기를 이용하여 분쇄한 대두의 입자 크기는 입도분석기(Laser diffraction particle size analyser, LS 13 320, Beckman coulter, USA)를 사용하여 입자의 크기별 분포를 분석하였다.

5. 배양 조건

대두 배지의 발효는 플라스크 및 발효조를 사용하였다. 플라스크 배양은 250 ml 삼각 플라스크에 100 ml 배지를 넣고, 균주의 전 배양액 1%(v/v)를 접종한 후, 30°C incubator에서 48~60시간 동안 배양하였다. 발효조 배양액은 5 l jar fermentor (MK-250, Korea fermentor, Korea)에 전배양액 1%를 접종한 후, 배양 온도 30°C, 교반 속도 80 rpm에서 약 48시간 동안 회분 배양하였다. 이때 배양 배지의 초기 pH는 6.5로 조절하였다.

6. 생균수 측정

생균수의 측정은 유산균의 경우에는 MRS agar(Difco, USA), *Bacillus* 균은 TP6 agar(Soypeptone, Bacto beef extract, Xylose, agar)를 배지로 사용하여 37°C에서 배양한 후 생성된 집락을 3회 반복하여 측정한 후 평균값으로 나타내었다.

7. 관능검사

관능검사는 훈련된 패널 15명을 대상으로 3회 반복하여 행한 후 차이 식별 능력이 우수한 10명을 선정하였다. 검사 시료로 균주별 혼합비를 달리하여 동일한 온도 및 시간을 기준으로 배양한 음료균을 사용하여 평가하였으며, 평가항목은 색(color), 풍미(flavor), 단맛(sweetness), 신맛(sourness), 고소함(sesameness), 부드러움(softness), 전반적인 기호도(overall quality)에 대한 특성으로 5에 가까울수록 큰 기호도를 나타내는 5점 척도법으로 평가하였다.

8. 통계분석

본 연구에서 얻어진 자료 분석은 SPSS(12.01 for windows) program을 이용하여 통계분석을 시행하였다. 모든 연속형 변수의 평균과 표준편차(Mean±S.D.)를 구하였으며, Duncan's multiple range test를 이용 일원배치 분산분석을 통해 $p<0.05$ 의 수준에서 시료간의 유의차 검정을 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 대두의 전처리 기술 예비 실험

증숙된 두유의 발효가 가능한 균주를 선별하기 위하여 항균 펩타이드의 생산이 가능한 2종의 균주(*Lactococcus lactis* A164, BH5), GABA(γ -Aminobutyric acid) 생산균인 *Lactobacillus sakei* B2-16, 또한 내산성이 강한 유산균인 *Lactobacillus plantarum* P23을 이용하여 대두를 냉수에 24시간 정도 불린 후 조분쇄한 후 불린 물을 포함하여 대두 무게의 10배 되도록 물을 첨가하고 30분 이상 가열하였다. 여과포를 이용하여 비지를 제거한 후 *Lactobacilli* MRS broth에서 배양된 각 유산균을 접종한 후 30°C에서 24시간 정치 배양하면 모든 유산균이 두유에서 생육하는 특징을 나타내었으나, 대두 특유의 비린내와 어느 정도의 불쾌취를 나타내었다. 따라서 발효 후 생성되는 대두 발효취와 불쾌취 제거를 위한 전처리 공정이 요구되었다. 이러한 불쾌취는 침지 과정 중에 대두에 존재하는 lipooxygenase가 불포화 지방산에 작용하여 생성되는 furan, aldehyde, alcohol 등과 두유 중의 alcohol계인 hexanol, aldehyde계인 hexanal, propanal, pentanal 등이 있다고 알려져 있다(Oh 등 1988). 일반적으로 가열처리와 효소 처리 등에 의하여 이러한 불쾌취를 제거할 수 있으므로 대두 배지를 제조할 경우 충분한 열처리와 효소 처리를 병행해야 할 것으로 판단되었다.

산업적인 열처리를 위하여 기존의 대두 증숙 과정에 소요되는 에너지를 줄이고, scale-up시 적합한 process를 개발하기 위하여 대두 침지 없이 수세한 대두를 100°C 끓는 물에 7분간 침지한 결과, 에너지 감소와 콩 비린내 제거, 침지에 의한 영양성분 손실을 최소화한 것으로 나타났다.

2. 분쇄 방법

일반적으로 대두 입자 크기가 작을수록 다른 원료와 혼합하여 제품을 만들 때 고르게 분산되어 발효가 효율적으로 진행되고, 색, 맛, 향 등의 특성 및 발효조성물의 물성과 기능성 물질의 용출 효율을 증진시킬 수 있다. 따라서 대두를 일반 믹서분쇄와 습식미분쇄로 처리한 입자 크기를 분석한 결과(Fig. 1), 대두의 일반분쇄의 평균 입자 크기는 206 μm 로 미세분쇄의 20~26 μm 보다 약 8~10배 정도 컸다. 또한 습식분쇄에 사용한 압력이 증가되면 입자 크기가 약간 감소하였다.

침지가 끝난 대두는 수분 함량을 조절하면서 습식분쇄를 진행하게 되는 데, 최종 고형분 함량은 완제품의 특성을 고려하여 산업체에서 drink type의 제품은 7~8%, spoonful type의 제품은 9~12% 수준으로 결정하고 있다.

3. 효소 처리

대두 발효 시 대두의 표피 성분에서 유래하는 불쾌취를 제거하기 위하여 cellulase를 이용하여 기질로 사용되는 대두의 성분을 일차적으로 분해하였다.

Cellulase로 2시간 처리한 후 제조한 대두 배지에 *L. lactis*

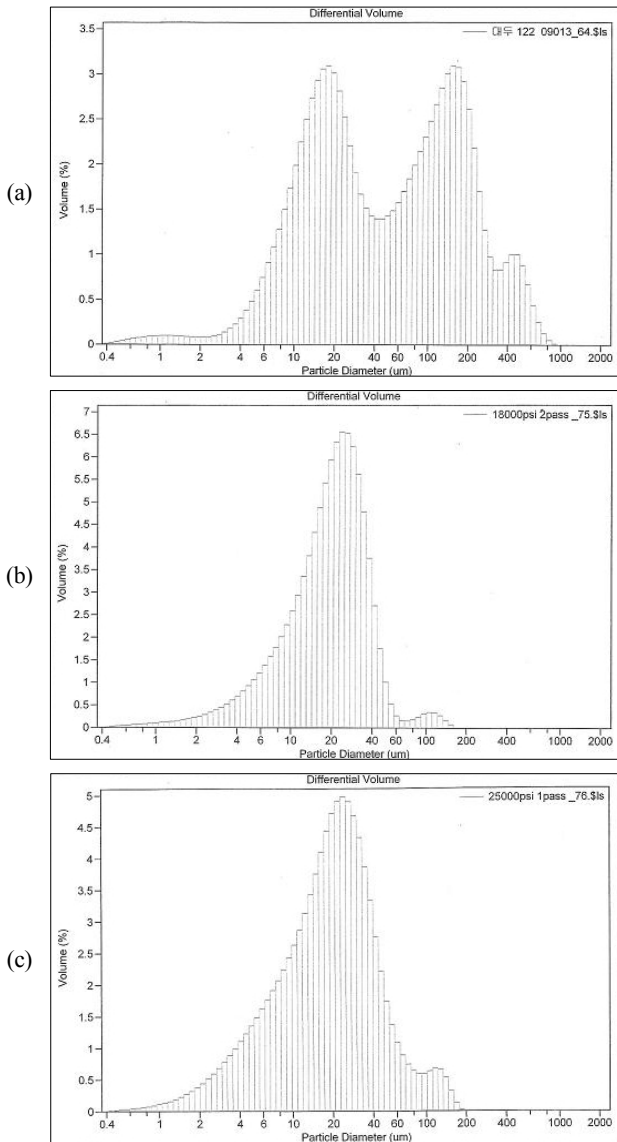


Fig. 1. Analysis of particle size distribution by size reduction method. (a) Normal mixer, (b) super masscollider (18,000 psi, 2 pass), (c) super masscollider(25,000 psi, 1 pass).

Table 1. Effect of cellulase treatment on pH and off-flavor of soybean medium fermentation

Microorganism ¹⁾	pH	Off-flavour	Sensory score
A164	4.76	ND ²⁾	3.8
BH5	4.50	ND	3.5
B2-16	4.92	ND	4.6
P23	4.72	ND	4.4

¹⁾ A164: *Lactococcus lactis* A164, B2-16: *Lactobacillus sakei* B2-16, BH5: *Lactococcus lactis* BH5, P23: *Lactobacillus plantarum* P23.

²⁾ ND: Not detected.

A164, *L. lactis* BH5, *L. sakei* B2-16, *L. plantarum* P23을 접종하고 30°C에서 24시간 배양한 후 pH 및 불쾌취 발생 여부를 비교하였다. 그 결과, cellulase 처리에 의하여 불쾌취가 발생되지 않아 향미 개선 효과를 확인할 수 있었으며, pH 역시 유산균 음료에 적합한 pH 4.5 부근으로 감소하여 cellulase에 의한 전처리 후 대두 발효 음료를 제조할 수 있음을 확인하였다(Table 1). 4가지 균주 중에서 향미가 우수한 *L. sakei* B2-16, *L. plantarum* P23을 1차적으로 발효를 위한 균주를 1차 선택하였다.

4. 발효 유산균의 선정

최종적으로 대두 발효에 사용할 균주를 결정하기 위하여 위에서 선정한 *L. sakei* B2-16과 *L. plantarum* P23과 함께 발효 음료 분리균인 *Ent. faecium* 및 김치에서 분리된 유산균 *L. lactis* L13을 이용하여 24시간 발효시킨 후 발효 특성을 비교하였다(Table 2).

배지의 제조 공정에서 스크류식 분쇄기를 사용하여 비지를 제거할 경우 동일한 시간에 발효가 더 진행하게 될 것으로 예상되어 *L. sakei* B2-16과 *L. plantarum* P23은 비지 제거 효과도 함께 검토하였다. 산업체에서는 유산균 발효 음료의 pH를 일반적으로 pH 4.5 부근이 생균수와 산미 관점에서 가장 적합한 조건으로 결정하고 있다. 발효 음료에서 분리한 *Ent. faecium*는 배양온도 37°C에서 pH 4.5 이하 범위로 발효되었고, 발효 후 사과향이 나는 장점을 확인하였다. *L. sakei* B2-16 균주의 경우에도 발효 후 약간의 단맛 및 부드러운 물성을 나타내어 대두 발효에 적합한 특성을 나타내었으나, *L. lactis* L13 균주의 경우 산미가 너무 강하여 발효에 부적합한 물성을 나타내었다. 그러나 대두 발효에 사용할 균주는 단일 균주보다는 혼합 균주를 이용하는 것이 효과적이므로 배양 실험

Table 2. Effect of pretreatment conditions on pH and sensory evaluation of various microorganisms

Microorganism ¹⁾	Conditions	pH	Sensory characteristics
P23	30°C	4.32	-
	30°C, soy curd removal	4.02	
B2-16	30°C	5.16	Sweet, soft
	30°C, soy curd removal	4.46	
L13	30°C	4.22	Sour
KK	30°C	4.80	Apple aroma
	37°C	4.43	
	50°C	4.68	

¹⁾ L13: *Lactococcus lactis* L13, P-23: *Lactobacillus plantarum* P23, B2-16: *Lactobacillus sakei* B2-16, KK: *Enterococcus faecium*.

이 추가적으로 필요할 것으로 판단되었다.

5. 탄소원 선정

효소 및 열에 의한 대두의 전처리만으로는 충분한 유산균 발효가 진행되기 어려워 추가적으로 첨가해 줄 배지의 탄소원을 탐색하였다. 기존 균주인 *L. sakei* B2-16 및 *L. plantarum* P23, 발효 음료 분리균인 *Ent. faecium*, 김치에서 분리한 *L. lactis* L13 등 4종의 유산균을 사용하였으며, 비교할 탄소원으로는 가격이나 범용적인 측면에서 활용도가 높은 sucrose, glucose, lactose, 꿀을 2%(w/v) 첨가한 후 30°C에서 24시간 배양하여 pH를 Table 3에 나타내었다.

4종의 유산균 모두 실험에 사용된 탄소원을 이용하였으나, glucose와 lactose를 사용한 경우에는 기호도가 좋지 않았으며, 모든 실험군에서 pH가 너무 감소하여 산미가 강했다.

6. 단일 배양 생육 특성

대두 발효시 사용되는 균주가 관능적으로 우수하다고 해도 다른 균과 생육 속도에서 차이를 보이거나 최종 균수가 좋지 않은 경우 산업화에 문제가 될 수 있다. 따라서 대두를 원료로 발효가 가능하다고 판단되는 *L. plantarum* P23과 *L. sakei* B2-16를 주발효균으로 하고, 된장에서 분리한 Nattokinase 보다 뛰어난 혈전용해효소를 생산하면서 안전성이 입증된 *B. subtilis* TP-6를 물성 강화균으로 하여 혼합 배양을 하고자 하였다. 이에 대두 배지에 각각 1%(v/v) 수준으로 접종하여 배양하면서 생육 특성을 확인하였다(Fig. 2). 발효 10시간 후에 균수는 최대값에 도달하였으며, *L. plantarum* P-23의 경우 1.87×10^9 cfu/ml의 생균수로, *L. sakei* B2-16과 *B. subtilis* TP-6에 비해 10배와 100배의 높은 값을 보였다. 발효 시간이 경과함에 따라 발효액의 pH는 서서히 감소하는 경향을 보였으며, 특히 *L. plantarum* P-23의 경우에는 10시간 배양 후에 pH 4.1로 감소하여 발효 두유에 적합하였으며, 24시간 발효 후 pH 3.77까지 낮아져 강한 신맛을 보였다. 산도의 경우 배양 10시간 후 가장 높았으며, 이후에는 산도가 감소하는 경향을 보였다.

Table 3. Effect of carbohydrates on pH of soybean medium fermentation

Microorganism ¹⁾	Sucrose	Glucose	Lactose	Honey
P23	3.76	3.80	3.93	3.78
B2-16	4.17	4.04	4.17	4.06
L13	3.99	4.02	4.37	4.15
KK	3.84	4.81	3.96	4.00

¹⁾ L13: *Lactococcus lactis* L13, P-23: *Lactobacillus plantarum* P23, B2-16: *Lactobacillus sakei* B2-16, KK: *Enterococcus faecium*.

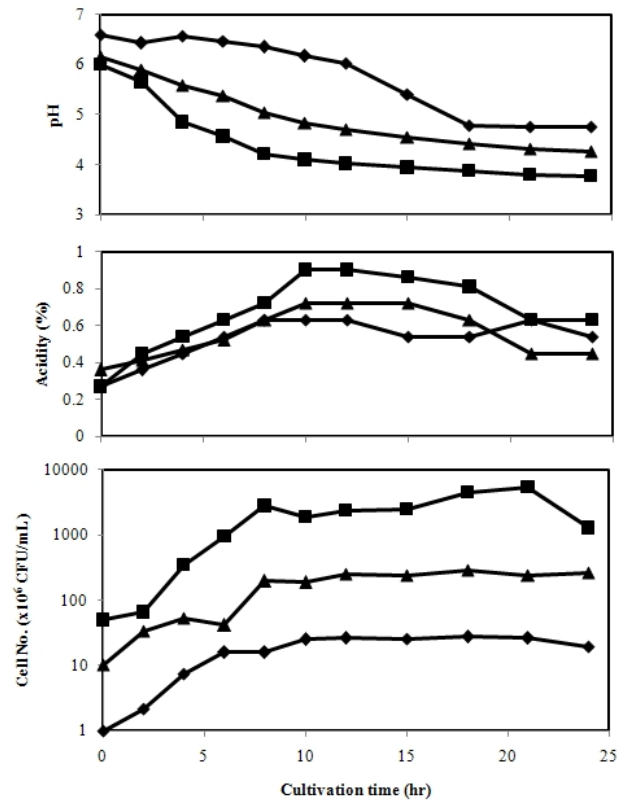


Fig. 2. Comparisons of pH, acidity and cell number by microorganism in soybean medium. ■: *Lactobacillus plantarum* P23, ▲: *Lactobacillus sakei* B2-16, ◆: *Bacillus subtilis* TP6.

7. 유산균 혼합 배양

두유 배지에서 혼합 배양 시 유산균 발효에 의한 pH 저하로 생육 저해 유무를 확인하기 위하여, *L. plantarum* P23과 *L. sakei* B2-16를 *B. subtilis* TP-6와 혼합 배양하면서 pH, 산도, 젖산균과 *Bacillus* 균의 생균수를 측정하여 Table 4에 나타내었다.

혼합 배양 10시간 후의 *Bacillus* 균수는 1.03×10^9 과 1.60×10^9 cfu/ml로 단독 배양시의 1.60×10^7 cfu/ml 보다 높은 값을 보여, 발효에 의해 생기는 pH 저하 현상으로 인한 TP6의 생육 저해는 보이지 않았다. 또한 pH도 단독 배양시 6.17에서 B2-16과 P23 혼합 배양에서 4.49와 4.32로 낮은 값을 보였다.

Table 4. Comparison of pH, acidity and cell number by mixed culture of *Lactobacillus* and *Bacillus* at 10 hr cultivation

Microorganism ¹⁾	pH	Acidity (%)	Viable cell number (cfu/ml)		
			Total	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus</i>
B2-16+TP6	4.49	0.45	2.45×10^9	1.42×10^9	1.03×10^9
P23+TP6	4.32	0.54	2.86×10^9	1.26×10^9	1.60×10^9

¹⁾ P23: *Lactobacillus plantarum* P23, B2-16: *Lactobacillus sakei* B2-16, TP6: *Bacillus subtilis* TP6.

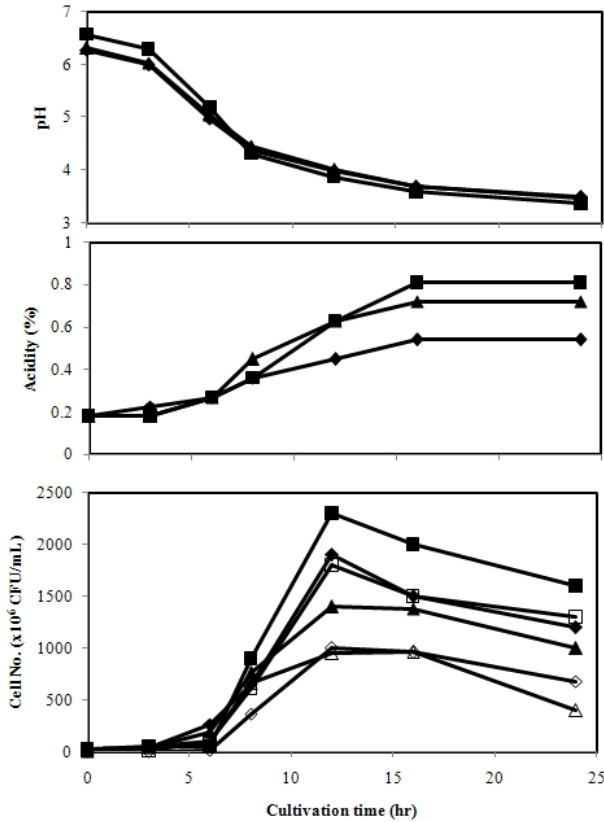


Fig. 3. Effect of mixed culture on pH, acidity and cell growth. ■: *Lactobacillus plantarum* P23+*Bacillus subtilis* TP6, ▲: *Lactobacillus sakei* B2-16+*Bacillus subtilis* TP6, ◆: *Lactobacillus plantarum* P23+*Lactobacillus sakei* B2-16 +*Bacillus subtilis* TP6, open symbol: cell number of *Bacillus subtilis* TP6 at mixed culture.

2종 혼합 배양에 의한 pH 및 산도의 변화 패턴을 Fig. 3에 나타난 결과, 각 균의 단독 배양 시와 동일한 패턴을 보였다.

최종 발효 제품의 풍미는 접종 균의 비율에 따라 많이 좌우되었는데, *L. sakei* B2-16은 부드러운 물성과 단맛을 내고, *L. plantarum* P23의 경우는 상쾌한 신맛, *B. subtilis* TP6의 경우는 부드러운 물성을 부여하는 특징이 있어 2종의 유산균과 1종의 *Bacillus* 균의 접종비를 달리하여 두유 배지에서 37°C 10시간 배양한 후 생균수를 분석한 결과, 전반적으로 *B. subtilis* TP6의 생균수가 유산균에 비하여 낮았다(Table 5). 특히, *L. sakei* B2-16, *L. plantarum* P-23, *B. subtilis* TP6의 접종비를 1 : 0.5 : 0.7으로 하여 접종하였을 때, 균의 생육은 다른 접종비에 비하여 현저히 낮았으며, 관능평가를 수행하여 그 맛과 향을 평가한 경우에도 다른 접종비에 비하여 낮은 결과를 얻었다(Fig. 4). 그러나 *L. sakei* B2-16, *L. plantarum* P23, *B. subtilis* TP6를 1 : 0.7 : 0.3으로 발효한 경우에는 발효 두유의 맛과 향에는 큰 차이를 보이지 않는 관능평가 결과를 얻을 수 있었

Table 5. Effect of mixed ratio of microorganisms on pH, acidity and cell number

Mixed ratio ¹⁾	pH	Acidity (%)	Viable cell number (cfu/ml)		
			Total	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus</i>
1:0.5:0.7	5.13	0.40	1.97×10 ⁸	1.33×10 ⁸	6.05×10 ⁷
1:0.7:0.3	4.40	0.63	1.22×10 ⁹	1.12×10 ⁹	4.00×10 ⁸
1:1:1	4.48	0.54	8.0×10 ⁸	1.83×10 ⁹	5.18×10 ⁸
1:1:0.5	3.47	0.72	2.9×10 ⁹	1.9×10 ⁹	1.0×10 ⁹

¹⁾ *Lactobacillus sakei* B2-16: *Lactobacillus plantarum* P23: *Bacillus subtilis* TP6 (%).

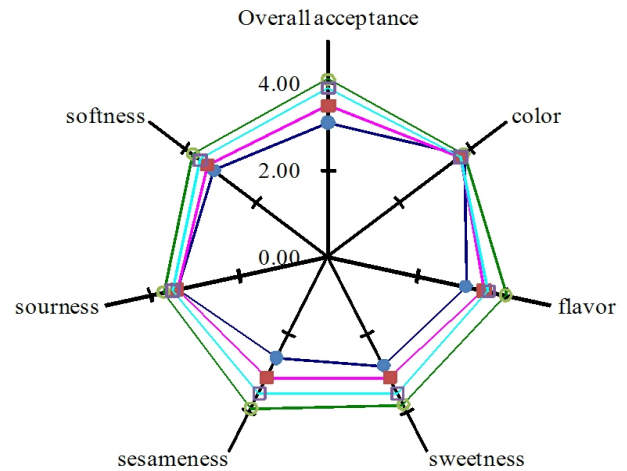


Fig. 4. Sensory evaluation graph by mixed ratio of microorganisms. mixing ratio - ● 1:0.5:0.7, ■ 1:0.7:0.3, ○ 1:1:0.5, □ 1:1:1, mixing ratio=*Lactobacillus plantarum* P23: *Lactobacillus sakei* B2-16: *Bacillus subtilis* TP6.

으며, 발효 최종 균수 등의 차이도 보이지 않았다. 또한 발효 8시간 내외에서 pH는 4.6 내외로 발효의 종결 시점과 매우 유사하였다.

이러한 결과는 선택된 2종의 유산균 및 1종의 *Bacillus* 균을 이용하여 산업적으로 다양한 제품의 발효 두유를 생산할 수 있는 가이드를 제시할 수 있다고 판단되어진다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청에서 시행한 기술혁신개발사업의 지원에 의해 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

Cho JH. 2000. Effects of fructooligosaccharides and sponge cakes

- containing fructooligosaccharides on the rat's intestine and serum lipids. MS thesis. Chungnam Uni. Korea
- Cho JI. 2004. Health food using fermented soybean. Korea Patent 10-0448841-0000
- Choi MJ, Jung YJ. 2008. The effects of isoflavones intake level on bone markers and bone related hormones in growing female rats. *Kor J Nutr* 41:199-205
- Doron S, Snyderman DR, Gorbach SL. 2005. *Lactobacillus* GG: Bacteriology and clinical applications. *Gastroenterology Clinics of North America* 34:483-498
- Huang CJ, Wang ML, Kuo CY. 2008. Studies on the cholesterol removal ability of plant origin lactic acid bacteria. *J Taiwan Livestock Res* 41:267-274
- Huang, CJ, Kuo CY. 2006. Studies on the screening, characteristics and application of dairy products with plant origin lactic acid bacteria. *J Taiwan Livestock Res* 39:239-250
- Igarashi T. 2007. Development of beverage and food using plant origin lactic acid bacterium. *Bioindustry* 24:32-39
- Ji GE. 1994. Composition and distribution of intestinal microbial flora in Korean. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 22:453-458
- Kim DH, Lee GY, Kim NM, Lee JS. 2003. Physiological functionality of various extracts from danmemil and legumes. *Kor J Food Nutr* 16:347-352
- Kumagai T. 2009. Application of plant origin lactic acid bacteria to food. *Food Style* 21 13:46-47
- Lee HS, Kim KO. 2007. The Development of yogurt, bread, and cookies with added bean sprout powder and isoflavone extracts. *Kor J Food Cookery Sci* 23:537-550
- Lee SB, Cho JK. 2007. Functional soybean paste fermented by *Bacillus* sp. and *Lactobacillus casei* and a method of preparing thereof. Korea Patent 1007362550000
- Lim AK, Jung HK, Hong JH, Oh JS, Kwak JH, Kim YH, Kim DI. 2008. Effects of the soybean powder with rich aglycone isoflavone on lipid metabolism and antioxidative activities in hyperlipidemic rats. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 37:302-308
- Müller DM, Carrasco MS, Tonarelli GG, Simonetta AC. 2009. Characterization and purification of a new bacteriocin with a broad inhibitory spectrum produced by *Lactobacillus plantarum* lp 31 strain isolated from dry-fermented sausage. *J Appl Microbiol* 106:2031-2040
- Oh JS, Lee GH, Lee WY, Lee KS, Oh MJ. 1988. Effects of alkali treatment of soybean on the quality of soybean milk. *J Kor Soc Food Nutr* 17:85-94
- Ryu BH, Cho SH, Ha SW, Park KM, Kang KH. 1998. Changes of the intestinal microflora and fecal properties by intake of yoghurt added capsulated or uncapsulated bifidobacteria. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 26:221-225
- Ryu BM, Sugiyama K, Kim JS, Park MH, Moon GS. 2007. Studies on physiological and functional properties of Su-sijang, fermented soybean paste. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 36:137-142
- Shin HC, Seong HS, Sohn HS. 2004. The industrial development and health benefits of the soymilk. *Korea Soybean Digest* 21:15-27
- Yasuhisa S, Takashi M, Fumiyasu I. 2005. *Bifidobacterium breve* and fermented soymilk prepared with the same. Korea Patent 1004716310000
- Yun ME, Lee DH, Kim MH. 2008. Effects of soy isoflavones supplementation and exercise on urinary calcium, magnesium, copper and zinc excretion in postmenopausal women. *Kor J Nutr* 41:612-620

접 수 : 2011년 2월 22일
 최종수정 : 2011년 3월 15일
 채 택 : 2011년 3월 16일