

식초와 김치 유래 젖산균으로 제조한 서리태 발효우유 제조 및 물리화학적 품질 특성 연구

정성엽[†] · 강선아^{1,†} · 이나라² · 류명선 · 오현호¹ · 김다솔¹ · 박선민^{1,*}
발효미생물산업진흥원, ¹호서대학교 식품영양학과 · 기초과학연구소 · 비만당뇨연구소,
²호서대학교 나노바이오트로닉스과

Production and physicochemical properties of black bean yogurt made with lactic acid bacteria isolated from vinegar and kimchi

Seong-Yeop Jeong[†], Suna Kang^{1,†}, Na Ra Lee², Myeong Seon Ryu, Xuangao Wu¹, Da Sol Kim¹, and Sunmin Park^{1,*}

Microbial Institute for Fermentation Industry

¹Department of Food & Nutrition, Institute of Basic Science, Obesity/Diabetes Center, Hoseo University

²Department of Nanobiomechanics, Hoseo University

Abstract This study evaluated the physicochemical properties of a novel black bean milk yogurt made by lactic acid producing bacteria isolated from vinegar (*Bacillus acidiproducens*, BA) and kimchi (*Lactobacillus plantarum*, LP). Commercially available *Lactobacilli* mixture for yogurt (YF) were regarded as control bacteria. To investigate optimal conditions to make black bean yogurt, different types of bacteria (BA and LP) and dilution ratios of black bean milk and water (1:1, 1:1.5, and 1:2) were used. Titratable acidity and pH were affected by these dilution ratios, but not by the different types of *Lactobacilli* used. Titratable acidity and pH were lowest in the 1:1 diluted sample. The visible cell count, sugar content, and viscosity were significantly higher in the sample containing the black bean milk: water ratio of 1:1 than the rest of the samples. In the sensory test, black bean yogurt made with BA showed a higher overall acceptability score, similar to yogurt made with YF. In conclusion, black bean yogurt made by fermentation with BA and with 1:1 black bean milk:water dilution ratio was better than ones made with LP and at other dilution ratios.

Keywords: black bean, *Bacillus acidiproducens*, *Lactobacillus plantarum*, yogurt, dilution ratio

서 론

발효우유는 본래 우유에서 발생하는 세균이 상온에서 발효되어 생성되는 고체 혹은 액체상태의 음식이다. 역사적으로 오래된 서적인 성경에 발효우유에 대한 내용이 기록될 정도로 그 역사가 매우 길다(1). 장수음식으로 알려진 발효우유(2)는 면역증진(3,4), 암 유발 억제(5,6), 혈중 콜레스테롤 감소(7,8) 등의 효과를 가지고 있다. 또한 최근 발효우유 안에 존재하는 미생물이 사람의 위(9)와 장내 미생물의 생육에 영향을 미쳐 유익세균의 성장에 도움을 주어 비만 치료에 효과가 있다는 사실이 연구를 통해 밝혀지고 있다(10). 고령화에 따른 발효우유 소비 및 그 시장이 증가한다는 연구(11)가 존재할 정도로 고령화와 발효우유는 관계가 깊으며, 발효우유가 가지는 다양한 기능성으로 인해(12), 발효우유에 대한 관심의 증대로 관련 시장은 지속적으로 증가하고 있

다. 본래 발효우유는 유제품(포유류의 젖)을 주재료로 하여 만드는 동물성 제품이지만(13) 최근 채식주의자의 수도 증가하면서 동물성 제품보다 식물성 제품을 선호하는 경향이 높아지고, 식물성 젖산균이 동양인에게 더 적합하다는 연구(14)와 식물유래 젖산균이 가지는 이점이 알려지면서 식물성 식품 유래 젖산균으로 제조한 발효우유에 대한 관심이 높아지고 있다.

대표적인 식물성 젖산균으로는 김치 젖산균인 *Lactobacillus plantarum*이 있다. 식물성 젖산균의 장점은 동물성 젖산균에 비해 내산성이 강해서 섭취한 후 위산으로 파괴되지 않고 장까지 생존하여 도달하여 장에서 다양한 생리적 기능을 나타내는 것이다(15). 발효시키는 젖산균의 종류에 따라 발효우유의 풍미나 맛도 달라지는데(16) *L. plantarum*의 경우 제조한 제품이 신맛이 강하고 향에 대한 선호도가 낮아 이를 해소할 수 있는 젖산균에 대한 요구가 높다. 본 연구팀은 식초에서 내산성이 있는 젖산을 생성 박테리아를 분리 및 동정하였고, 이 중에서 향이 좋은 *Bacillus acidiproducens* 을 선별하였다. 과거 연구에 따르면 *B. acidiproducens*은 한국 토양에도 존재하며, 37°C, 약산성에서 자라고 젖산을 생성하는 것으로 알려져 있다(17,18). 이 균에 대한 연구는 많이 수행되지 않았지만 식초에서 생육하므로 내산성이 강해 위산에서도 생존하여 장까지 도달해 장에 이로운 영향을 미칠 것으로 기대된다.

우유 대신 사용할 수 있는 식물성 식품으로 적합한 것은 단백질이 많이 함유된 콩이다. 콩은 우유와 유사하게 단백질이 많이

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: Sunmin Park, Ph.D., Dept. of Food and Nutrition, Hoseo University, Asan, Chungnam 31499, Korea
Tel: +82-41-540-5633
Fax: +82-41-548-0670
E-mail: smpark@hoseo.edu

Received September 8, 2017; revised October 8, 2017;
accepted October 13, 2017

함유되어 있고, 더 나아가 식이섬유소가 많이 함유되어 있으며 쌀을 많이 섭취하는 아시아인에게는 제한 아미노산을 보충할 수 있는 식품이다. 그 중 검은 콩 중에 하나인 서리태는 항산화 능력이 뛰어나고(19,20) 신장 기능 보호(21), 암세포 증식 억제 효과(22,23) 등 다양한 효과를 지닌 식품이다. 본 연구팀의 예비연구에서 서리태는 안토시아닌도 함유되어 있고 향에서 선호도가 좋았으므로 메주콩에 비해 발효우유를 제조하는데 적합하다고 판단하였다.

본 연구에서는 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* YD09 균과 식초에서 분리한 *Bacillus acidiproducens* VG1 균을 이용하여 호상 발효우유 제조에 최적의 조건을 확립하고 식물성 호상 발효우유를 제조하고 그 물리 화학적 특성을 알아보려고 하였다.

실험 재료 및 방법

신규 균주의 탐색 및 분리

수집한 식초 시료 1.0 mL을 채취하여 9.0 mL의 살균 생리식염수(0.85% NaCl)에 첨가하여 1분간 블렌더(blender)로 균질화 한 후 10 배 단위로 단계별로 희석한 후 *Lactobacillus* MRS broth (Difco, BD, USA)로 만든 평판배지에 0.1 mL씩 도말 한 후 30°C에서 2일간 배양하였다. 배지 상에 형성된 다양한 미생물 콜로니의 형태, 색에 따라 분리하고 선택한 균을 BCP (bromocresol purple, 0.004%) 첨가한 MRS 평판배지에 도말하여 30°C에서 24 시간 배양하여 집락 주위에 노란색의 환을 형성하는 균주를 선별하였다. 분리한 젖산균은 MRS 액체배지에 배양하여 균체만을 회수하여 20% (v/v) 글리세롤(glycerol)과 1:1의 비율로 혼합하여 보관용 스톡(stock)을 제조하여 -80°C에서 보관하였으며, 실험에 사용하기 직전에 MRS 액체배지에 2회 계대 배양하여 활성을 높인 후 실험에 사용하였다.

커드(curd)형성 균주의 선별

분리 균주 중 커드(curd)를 형성하는 젖산균을 선별하기 위하여 10.0% 탈지우유액 배지(skim milk broth, Difco, USA)에 전배양한 분리 균주(2.0×10^8 CFU/mL)를 0.02% 접종하여 37°C에서 4일간 정치배양한 후 커드 형성능력이 있는 균주를 1차 선별하였다. 최종적으로 1차 선별한 균주를 대상으로 10.0% 탈지분유에 1차 선별 젖산균(2.0×10^8 CFU/mL)을 0.02% 접종하여 37°C에서 4일간 정치배양하면서 커드 형성능력과 산 생성 능력이 탁월하고, 향이 좋은 균주를 최종적으로 선별하였다.

선별 균주의 동정

선별한 균주의 동정은 16S rRNA 순서 분석을 통하여 분리 균주를 동정하였다. 분리 균주의 Genomic DNA는 ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (Zymo Research, USA)를 사용하여 분리하였다. 분리한 DNA를 주형으로 하여 PCR 수행하였다. PCR 반응을 위한 프라이머(primers)로는 universal primer인 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3')를 사용하였고, PCR 조건은 initial denaturation 5분, 그리고 94°C에서 45초간 변성(denaturation), 55°C에서 60초간 annealing 및 72°C에서 60초간 extension의 cycle을 35회 하였다. 16S rRNA 염기서열 확인은 (주)마크로젠(Seoul, Korea)에 의뢰하여 확인하였다.

균주 스톡(stock) 및 발효우유 스타터(stater) 제조

실험균으로 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* YD09을

Table 1. Yogurt made from black bean milk fermented with different lactic acid bacteria and water contents

	Group name	Liquid from black bean (mL)	Water (mL)	Sugar (g)
ABT-4	Y1	75	75	10.5
	Y2	60	90	10.5
	Y3	50	100	10.5
<i>L. plantarum</i> YD09	L1	75	75	10.5
	L2	60	90	10.5
	L3	50	100	10.5
<i>B. acidiproducens</i> VG1	B1	75	75	10.5
	B2	60	90	10.5
	B3	50	100	10.5

Y, L and B indicated that liquid from boiled black beans were inoculated with Probio-Tec® blended culture (ABT-4), *L. plantarum* YD09, *B. acidiproducens* VG1, respectively, and 1, 2, and 3 indicated the dilution ratios of the liquid from black bean and water=1:1, 1:2, and 1:3, respectively.

발효미생물산업진흥원(Microbial Institute for Fermentation Industry, Sunchang, Korea)에서 분양받은 것과 식초에서 분리한 *Bacillus acidiproducens* VG1 균을 사용하였다. 대조균은 일반적으로 발효 우유의 종균으로 많이 사용되고 있는 ABT-4 (*Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, and *Bifidobacterium*; Probio-Tec® blended culture, Hansen, Denmark) 구입하여 사용하였다. 균주의 스톡을 만들기 위하여 *L. plantarum* YD09, *B. acidiproducens* VG1 및 대조균인 TF (ABT-4) 젖산균은 각각 5.0 mL의 MRS 액체배지에 37°C에서 18시간 전배양한 후 전배양한 배양액을 100 mL의 MRS 액체배지에 0.02%씩 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 뒤, 각각의 균주 배양액 500 µL, 20.0% glycerol 500 µL를 혼합하여 보관용 스톡(stock)을 제조하였다. 각 균주의 스톡에는 2.0×10^8 CFU/mL의 젖산균을 함유하도록 하였다.

요구르트를 제조하기 전날 상기 보관용 스톡의 일부를 5.0 mL의 MRS 배지에 접종하고, 하룻밤 동안 배양(12시간, 150 rpm)하여 액상 스타터(starter)로 사용하였다. 이때 액상 스타터는 총 균수가 1.0×10^6 CFU/ mL이 되도록 제조하였다.

선별 균주를 이용한 서리태 발효우유 제조

선별 균주를 이용하여 서리태 요구르트를 제조하였다. 균주 및 콩과 물의 비율별 발효우유의 배합비는 Table 1에 나타내었다. 사용한 균주에 따라 크게 Y군(YF, Probio-Tec® blended culture, Hansen, Denmark), L군(*L. plantarum* YD09, Microbial Institute for Fermentation Industry, Sunchang, Korea), B군(*B. acidiproducens* VG1)으로 구분하였다. 서리태로 제조한 발효우유의 제조 공정은 Fig. 1에 나타내었다. 서리태 콩을 실온에서 5시간 이상 물에 불린 뒤 물기를 제거하고 블렌더(LB-32HP RPM professional blender, L'equip, Seoul, Korea)에 넣고 서리태와 물을 1:1로 넣고 2분간 최대 속도로 갈아낸 후, 거르러 짜서 콩물만 얻어 내었다. 이렇게 얻은 콩물과 물의 비율을 1:1, 1:1.5, 또는 1:2의 비율로 섞어준 후, 7.0% (w/v) 설탕을 첨가하고 고압살균기(AC-12 autoclave, Jeio tech, Deajeon, Korea)에서 121°C에서 15 min 동안 살균하였다. 클린벤치(CLB-201-04 vertical laminar flow cabinet, CHC lab, Deajeon, Korea)에서 37-40°C까지 식힌 후, 제조한 균주 스타터를 각각 2.0% (v/v) 접종하여 발효 전 각각의 두유에는 3.0×10^4 CFU/mL의 젖산균을 함유하고 있었다. 이 두유를 24시간

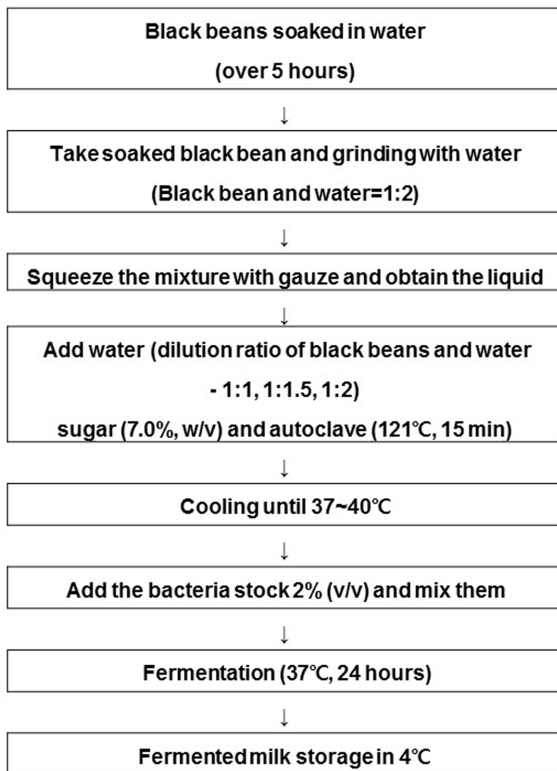


Fig. 1. Manufacturing process of yogurt made from black bean milk fermented with different lactic acid bacteria and water contents.

동안 37°C 배양기(incubator, IB-600M incubator, Jeio tech, Deajeon, Korea)에서 발효시켜 제조하였다. 제조가 완료된 발효우유는 4°C에서 냉장보관 하였다.

pH 및 적정산도 측정

발효기간별 발효우유의 pH는 각각 0, 6, 12, 24시간에 pH 측정기(meter, Orion 3-star Benchtop pH meter, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA)를 사용하여 측정하였고 평균값으로 나타내었다. 발효우유의 산도는 시료를 10 mL씩 취하고 증류수 10 mL를 가하여 1:1희석하고, 0.1 N 수산화소듐(NaOH)로 pH 8.4가 될 때까지 적정하여 적정산도를 측정하였다.

생균수 측정

발효기간별 생균수 측정은 균을 집중한 직후(0시간)와 6시간, 12시간, 24시간의 발효우유를 1mL 씩 취하여 멸균 생리식염수에 십진희석법으로 희석하고 MRS agar (Difco, YL Science, USA)에 도말한 뒤, 표준평판법으로 37°C에서 24시간 동안 혐기조건으로 배양한 뒤 나타난 colony 수를 log CFU (colony forming unit)/mL로 발효우유 제작부터 완료 시기까지의 생균수를 나타내었다.

당도와 점성 측정

당도와 점성은 발효 완료시점인 24시간 후 4°C에서 보관 후 실온에서 당도는 당도계를 이용하여 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다. 점성은 발효 완료 후 24시간 4°C에서 보관 후 실온에서 점성계(LVDV-II+ Pro Brookfield Engineering Lab. Inc. USA) 4번 스피들(spindle)을 이용하여 30 rpm에서 1분 동안 안정화시간을 거친 뒤 30초에 간격으로 2분 동안 발효우유의 온도를

측정하면서 3회 반복 측정하였다.

색도 측정

색도는 색차계(CM-3500D, Minolta, Japan)를 사용하여 L값(lightness), a값(redness), b값(yellowness)을 측정하였다. 모든 시료는 3회 반복 측정하여 평균값으로 나타내었다.

관능검사

제조한 발효우유를 4°C에서 24시간 냉장보관한 후 호서대학교 학생에게 공고를 통해 자원을 받은 19명을 대상으로 동의서를 작성하고 관능평가에 대한 용어, 평가기준과 평가 방법 등을 숙지시키고 관능 검사원에게 시료를 무작위로 받아 평가를 수행하였다. 시료는 검사 전 30분에 미리 실온에 꺼내어 작은 종이컵에 일정하게 담아 물과 함께 제공하였으며, 검사 전후에 물로 입을 행구고 발효우유의 색과 향, 단맛, 신맛, 전체적 기호도 항목으로 평가하였고, 나쁘다 1점, 좋다 5점의 5점 척도법으로 평가를 실시하였다.

통계처리

실험 결과는 SPSS 프로그램(Statistical package for social science, version. 24.0)을 이용하여 평균±표준오차로 나타내었고, 사용 균주와 콩과 물의 혼합 비율에 따른 발효우유의 통계적 유의성은 two-way ANOVA로 측정하였다. ANOVA로 측정한 그룹 내에서 통계적으로 유의성은 Tukey test로 검정하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

균주의 탐색 및 커드형성 균주의 선별

수집한 식초 시료로부터 총 3종의 균주를 분리하였으며, 분리 균주를 대상으로 커드 형성 유무를 확인한 결과 총 3종 균주가 모두 커드를 형성하였고, 비교적 단단한 커드를 형성하는 VG1 균주를 최종적으로 선정하였다.

선정균주의 동정

최종 선정 균주의 16S rDNA 서열분석결과를 바탕으로 GeneBank에 등록되어 있는 여러 젓산균들과의 BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 분석 프로그램을 이용하여 상동성을 비교하였다. 그 결과 식초에서 분리한 젓산을 생성하는 분리균주는 *B. acidiproducens*과 99.9% 유사한 것으로 동정되었으며 *B. acidiproducens* VG1로 명명하였다.

pH와 적정산도

제조한 발효우유의 pH와 적정 산도의 결과는 Table 2에 나타내었다. 발효우유의 초기 pH값은 B3이 유의적으로 높은 값을 나타내었으나, 전반적으로 6.6±0.1의 유사한 값을 나타내었다($p < 0.05$). 6시간 발효되었을 때, B군, Y군, L군순으로 유의적으로 낮은 pH 값을 나타내었고, 12시간 발효되었을 때에는 B, Y, L군 순서로 낮은 값을 나타내었다($p < 0.05$). 최종 발효 완료 시점인 24시간에는 4.35±0.05로 모든 발효우유에서 유사한 값을 나타내었다. 콩물과 물의 비율에 의한 차이는 없었으나, 발효가 진행되는 기간에 집중한 균에 의한 유의적인 차이가 존재했다($p < 0.05$). 시판되는 농후 발효우유의 pH는 3.85-4.56(24)을 나타내었고, 본 실험에서 제조한 발효우유의 pH값이 안에 포함되는 것으로 보아 발효우유가 제대로 만들어진 것으로 사료된다.

적정산도에서 사용한 균에 의한 차이는 없었고, 콩물과 물의

Table 2. pH and titratable acidity of yogurt made from black bean milk fermented with different lactic acid bacteria and water contents

		Fermentation periods (hr)			
		0	6	12	24
pH	Y1	6.53±0.11 ^{b*}	6.48±0.05 ^{c*}	4.68±0.07 ^{b*}	4.38±0.07
	Y2	6.59±0.03 ^{ab}	6.51±0.03 ^{bc}	4.65±0.03 ^b	4.35±0.01
	Y3	6.62±0.02 ^{ab}	6.49±0.02 ^c	4.62±0.02 ^b	4.35±0.03
	L1	6.58±0.02 ^{ab}	6.57±0.02 ^b	5.33±0.16 ^a	4.40±0.04
	L2	6.60±0.03 ^{ab}	6.60±0.02 ^a	5.14±0.13 ^a	4.34±0.02
	L3	6.63±0.02 ^{ab}	6.62±0.01 ^a	5.19±0.19 ^a	4.30±0.02
	B1	6.64±0.06 ^{ab}	6.35±0.01 ^d	4.53±0.04 ^b	4.37±0.05
	B2	6.66±0.06 ^{ab}	6.35±0.02 ^d	4.53±0.03 ^b	4.37±0.04
	B3	6.69±0.04 ^a	6.36±0.03 ^d	4.52±0.05 ^b	4.37±0.1
Titratable acidity	Y1	0.15±0.01 ^a	0.38±0.03 ^a	0.92±0.03 ^a	1.14±0.02 ^a
	Y2	0.16±0.01 ^a	0.33±0.01 ^{ab}	0.76±0.1 ^{ab}	1.00±0.03 ^{bc}
	Y3	0.15±0.00 ^a	0.29±0.1 ^{ab}	0.66±0.01 ^b	0.97±0.03 ^{bc}
	L1	0.17±0.01 ^a	0.35±0.03 ^{ab}	0.74±0.05 ^{ab}	1.11±0.03 ^{ab}
	L2	0.17±0.01 ^a	0.30±0.01 ^{ab}	0.64±0.03 ^b	0.97±0.02 ^{bc}
	L3	0.17±0.01 ^a	0.28±0.01 ^b	0.62±0.03 ^b	1.02±0.04 ^{bc}
	B1	0.17±0.01 ^a	0.33±0.02 ^{ab}	0.79±0.03 ^{ab}	1.04±0.03 ^b
	B2	0.16±0.01 ^a	0.27±0.01 ^b	0.75±0.03 ^{ab}	0.98±0.02 ^{bc}
	B3	0.14±0.01 ^a	0.26±0.02 ^b	0.71±0.03 ^{ab}	0.93±0.04 ^c

Y, L and B indicated that liquid from boiled black beans were inoculated with Probio-Tec[®] blended culture (ABT-4), *L. plantarum*, *B. acidiproducens*, respectively and 1, 2, and 3 indicated the dilution ratios of the liquid from black bean and water=1:1, 1:2, and 1:3, respectively. Values are mean±SE (n=3).

*Significant difference by the different bacteria at p<0.05.

†Significant difference by the dilution of soybean at p<0.05.

^{a-c}Different alphabets in the same row indicate significant differences among the groups by Tukey's test at p<0.05

Table 3. Changes in numbers of viable cells in yogurt made from black bean milk fermented with different lactic acid bacteria and water contents

		Fermentation periods (hr)			
		0 (×10 ⁴)	6 (×10 ⁶)	12 (×10 ⁸)	24 (×10 ⁸)
Y1	2.70±0.13 ^a	4.48±0.57 ^a	3.88±0.40 ^a	5.61±0.46 ^a	
Y2	3.07±0.18 ^a	4.47±0.34 ^a	3.22±0.42 ^a	4.19±0.26 ^b	
Y3	2.98±0.20 ^a	3.48±0.29 ^a	3.08±0.21 ^a	4.40±0.17 ^b	
L1	3.28±0.39 ^a	4.41±0.35 ^a	3.42±0.25 ^a	5.27±0.33 ^a	
L2	2.90±0.16 ^a	4.31±0.35 ^a	2.97±0.16 ^a	4.00±0.39 ^{bc}	
L3	3.30±0.14 ^a	3.94±0.39 ^a	3.04±0.23 ^a	3.79±0.29 ^{bc}	
B1	3.00±0.17 ^a	4.50±0.20 ^a	3.44±0.16 ^a	4.33±0.41 ^b	
B2	3.20±0.40 ^a	4.03±0.40 ^a	2.93±0.25 ^a	3.90±0.56 ^{bc}	
B3	2.90±0.11 ^a	3.24±0.09 ^b	3.02±0.43 ^a	3.55±0.15 ^c	

Y, L and B indicated that the liquid from grinded black beans were inoculated with Probio-Tec[®] blended culture (ABT-4), *L. plantarum*, *B. acidiproducens*, respectively and 1, 2, and 3 indicated the dilution ratios of the liquid from black bean and water=1:1, 1:2, and 1:3, respectively. Values are mean±SE (n=6).

†Significant difference by the dilution of soybean at p<0.05.

^{a-c}Different alphabets indicate significant differences among the groups by Tukey's test at p<0.05.

비율에 의한 차이가 존재하였다. 콩물과 물의 비율이 1:1인 것이 다른 군에 비하여 유의적으로 높은 산도를 나타내었고(p<0.05), 1:2에서 낮은 산도를 나타내는 경향을 보였다. 발효우유 초기에는 균별로 유사한 산도 값을 나타내었고, 6시간 이후로 시중에 판매되는 균을 사용한 Y군의 1:1 비율에서 높은 값을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었다. 식품공전에 제시되어 있는 발효우유의 적정산도(0.5 이상) 값에 적정한 결과를 보였으므로 발효우유가 잘 제조된 것으로 보인다. Bao 등(25)은 *L. plantarum*으로

콩 발효우유의 물리적 특성 연구하였는데, pH 2의 환경에서 12종의 *L. plantarum* strains 중 2시간에 9개, 3시간에는 7개의 colony가 생존했다고 보고한 바 있다. 동물성 젖산균인 *L. bulgaricus*가 pH 3에서 2시간도 생존할 수 없다는 보고(26)와 비교해 보면 식물성 젖산균이 내산성이 강하다는 것을 알 수 있다. *B. acidiproducens*로 발효시킨 발효우유에 대한 연구는 부족한 실정이지만, 시판되는 식초의 pH는 2.39-3.73 값으로(27) 위산과 유사한 pH를 나타내므로 위에서도 높은 생존률을 나타낼 것으로 사료된다.

생균수

발효되는 시간에 따른 생균수의 양을 측정하는 것은 Table 3과 같다. 0시간에 각 군에는 젖산균의 종류와 물의 배합비와 상관없이 약 3.0×10^4 CFU/mL로 같은 함량의 젖산균을 함유하고 있었다. 젖산균의 종류에 관계없이 6시간부터 콩물과 물의 배합비에 의한 차이를 나타내어 물의 비율이 높은 군에서 젖산균의 함량이 적은 경향을 보였다. 6시간 동안 발효시킨 후에는 젖산균의 종류에 관계없이 콩물과 물의 배합비가 1:1, 1:1.5와 1:2에서는 각각 약 4.4×10^6 , 4.2×10^6 , 3.5×10^6 CFU/mL의 젖산균을 함유하고 있었다. 12시간 발효부터 젖산균의 종류에 따른 차이를 나타내기 시작하였지만 24시간 발효에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. 24시간 발효 후 생균수는 Y군의 1:1 비율에서 가장 높은 값을 나타내었으며($p < 0.05$), 1:1.5, 1:2순으로 1:2에서 가장 낮은 생균수 값이 나타났다. 시중에 판매되는 균주를 이용한 Y군의 생균수에서 높은 값을 나타내는 경향을 보였고, 김치에서 분리한 *L. plantarium* YD09, 식초에서 분리한 *B. acidiproducens* VG1순으로 낮은 생균수를 나타내었다. Shin 등(28)의 연구에 따르면 시판되는 발효우유의 생균수는 $5.0\text{-}9.0 \times 10^8$ CFU/mL 이상의 값을 나타내었고, 식품공전에서 농후 발효우유의 적합한 젖산균 수인 1.0×10^8 CFU/mL 이상이라고 정의하고 있다. 본 연구에서 서리태 콩물과 물의 1:1 비율로 제조한 대조군인 Y와 김치 균인 L에서 시판 발효우유와 유사한 생균수 값을 나타내었다. 가장 낮은 생균수를 나타내었던 아세트산 세균인 B에서는 $5.0\text{-}9.0 \times 10^8$ CFU/mL에는 조금 못 미치는 4.0×10^8 CFU/mL 값을 나타내었지만 발효우유로 제품화를 하는 것에는 문제는 없을 것으로 사료되었다. Hong 등(29)의 *S. thermophilus*와 *L. casei*에 미강을 첨가한 발효우유 연구에 따르면, *S. thermophilus*는 미강 첨가량과 관계없이 생균수에서 유사한 값을 나타내었으나, *L. casei*는 미강 첨가량이 증가할수록 빨리 대수기에 도달했다고 보고하였다. 본 연구에서는 군에 의한 유의적인 차이는 없었으나, 1:1의 비율에서 Y와 L군이 높은 값을 나타낸 것으로 보아, 서리태 대사산물이 YF균과 LP균의 증식에 영향을 미친 것으로 사료된다.

당도와 점성

발효 완료 후 발효우유의 당도와 점성 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 당도 값은 콩과 물의 비율이 1:1인 것이 $12.3 \pm 2.0^\circ\text{Bx}$ 로 군별로 유사한 값을 나타내었고, 콩물과 물의 비율에 의한 유의적인 차이가 있었다(Fig. 2A, $p < 0.05$). 사용한 균주별로 동일한 비율에서 유사한 값을 나타내었고, 콩과 물의 비율이 1:1로 제조한 발효우유가 높은 값을 나타내는 경향을 보였다. Kim 등(30)은 버찌분말을 첨가한 요구르트에 대하여 연구하였는데, 동량의 발효우유를 제조하기 위해 버찌가 첨가되지 않은 발효우유는 버찌가 첨가된 발효우유보다 우유의 함량이 높았다. 버찌 분말이 들어가지 않은 것에 비하여 분말이 첨가된 발효우유의 당도 값이 더 높게 나타났고, 버찌에 함유된 환원당으로 인한 결과라고 보고한 바 있다. 발효우유를 제조할 때, 동량의 당을 첨가하였으므로 물의 비율에 의해 1:1 비율의 발효우유에서 높은 당도 값을 나타낸 것으로 사료된다.

점성에서도 당도의 결과와 유사하였는데, 콩물과 물의 비율을 1:1로 제조한 발효우유의 점성값 다른 비율로 제조한 발효우유보다 높은 값을 나타내었다(Fig. 2B, $p < 0.05$). 발효우유의 점성은 상대습도, 물, pH, 효소, 온도, 고형물 등에 영향을 받고(31), 커드의 형성과 밀접한 관련이 있는데, 단백질이 커드를 형성할 때 물, pH, 효소, 온도 등에 영향을 받는다. 또한 산 생성량에 영향을 받는데(32), 산도가 가장 높았던 1:1에서 점성값이 가장 높게 나타났

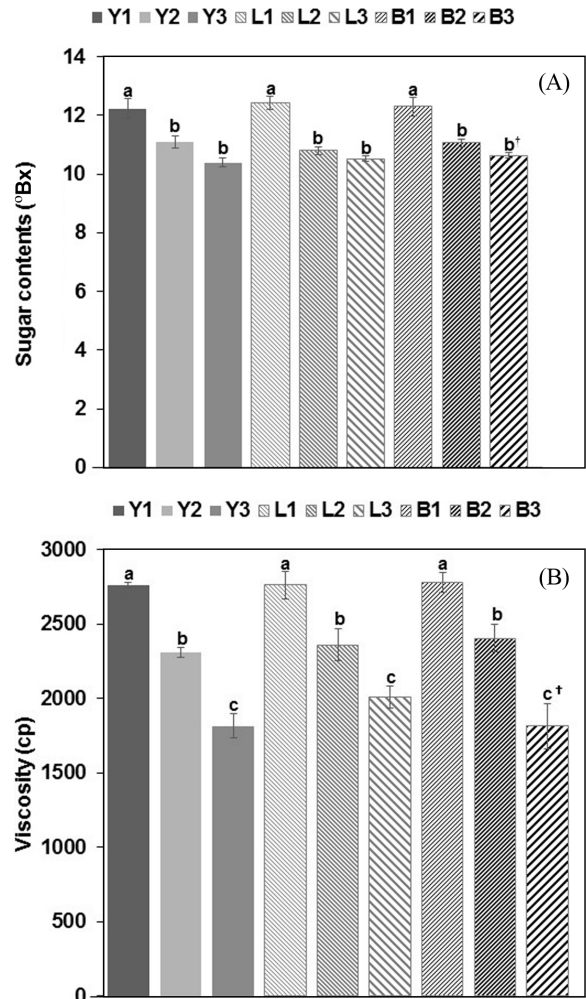


Fig. 2. Sugar contents and viscosity of yogurt made from black bean milk fermented with different lactic acid bacteria and water contents. A. Sugar contents. B. Viscosity. Y, L and B indicated that the liquids from grinded black beans were inoculated with Probio-Tec® blended culture (ABT-4), *L. plantarium* YD09, *B. acidiproducens* VG1, respectively and 1, 2, and 3 indicated the dilution ratios of the liquid from black bean and water=1:1, 1:2, and 1:3, respectively. Values are mean±SE (sugar contents: $n=3$, viscosity: $n=6$). Significant difference by the dilution of soybean at $p < 0.05$. ^{a-c}Different alphabets indicate significant differences among the groups by Tukey's test at $p < 0.05$

다. pH와 온도는 같은 조건을 주었고, 점성 결과 사용한 균주에 의한 유의적인 차이는 보이지 않았다. 다만 콩물과 물의 비율을 1:1로 제조한 발효우유의 경우 2770 ± 20 cp 값을 나타내었으나 물의 비율이 증가할수록 그 값은 낮아지는 경향을 보였다. 물이 커드가 형성되는 것을 방해하여 위와 같은 결과가 나온 것으로 보인다.

색도

색도의 결과는 다음과 같다(Table 4). 명도 결과는 사용한 균과 물의 비율에서 대체적으로 유사한 경향을 보였으나, 적색도와 황색도에서는 균과 물의 비율에 영향을 받았다. 적색도의 경우 Y 균을 사용하고 물이 비율 1:1이었던 Y1이 유의적으로 높은 값을 나타내었고, 황색도에서는 균의 종류와 물의 비율에 모두 영향을

Table 4. Chromaticity of yogurt made from black bean milk fermented with different lactic acid bacteria and water contents

	Chromaticity		
	L*	a*	b*
Y1	72.3±0.1 ^b	2.5±0.1 ^{a*}	13.2±0.1 ^{a*}
Y2	72.5±0.1 ^b	1.9±0.2 ^b	12.5±0.1 ^b
Y3	72.5±0.1 ^b	1.3±0.1 ^c	11.8±0.1 ^c
L1	72.5±0.1 ^b	1.7±0.1 ^{bc}	12.4±0.1 ^b
L2	72.5±0.1 ^b	1.4±0.1 ^{bc}	12.5±0.1 ^b
L3	72.6±0.1 ^b	1.6±0.1 ^{bc}	12.4±0.1 ^b
B1	73.4±0.1 ^a	1.6±0.2 ^{bc}	12.5±0.1 ^b
B2	73.1±0.2 ^a	1.5±0.1 ^{bc}	12.1±0.2 ^{bc}
B3	71.9±0.2 ^b	1.5±0.1 ^{bc}	11.3±0.1 ^d

Y, L and B indicated that the liquid from grinded black beans were inoculated with Probio-Tec[®] blended culture (ABT-4), *L. plantarum*, *B. acidiproducens*, respectively, and 1, 2, and 3 indicated the dilution ratios of the liquid from black bean and water=1:1, 1:2, and 1:3, respectively. L*: 0 yields black and 100 diffuses white; a*: negative and positive values indicate green and magenta, respectively; b*: negative and positive values indicate blue and yellow, respectively. Values are mean±SE (n=9).

*Significant difference by the different bacteria at p<0.05.

†Significant difference by the dilution of soybean at p<0.05.

^{a-c}Different alphabets indicate significant differences among the groups by Tukey's test at p<0.05.

받았는데, Y균을 사용한 것과 물의 비율이 1:1인 것이 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 물의 비율이 증가함에 따라 발효우유가 희석되어 적색도와 황색도 값이 낮아진 것으로 사료된다. 서리태는 작두콩과 대두보다 폴리페놀 함량이 높고, 안토시아닌이 함유되어 있으며, 이소플라본의 글리코사이드, 비글리코사이드의 함량이 높으며(33), 자유당에서는 설탕 함량이 높고 과당을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(34). 콩물과 물의 비율이 1:1이고, YF균으로 제조한 Y1이 다른 균에 비해 생균수와 적정산도, 점성에서 높은 값을 나타내었으므로, 1:1이라는 적당한 비율에서 YF의 활성이 높아져 서리태가 함유한 프리바이오틱스를 사용하여 적색도와 황색도 값에 영향을 미친 것으로 사료된다.

관능검사

관능검사 결과는 다음과 같다(Fig. 3). 향과 단맛에서 대조군으로 사용한 Y가 높은 점수를 얻었고, B, L 순으로 높은 선호도를 나타내었다. 색과 신맛은 B가 좋은 점수를 얻었으며 Y와 L은 유사한 선호도를 나타내었으나 큰 차이를 보이지 않았다. 전체적인 기호도에서는 Y와 B가 높은 점수를 받았고 L에서 낮은 값을 받았다. L은 김치에서 얻은 균을 이용하여 제조한 발효우유로, *L. plantarum* 은 강한 신맛을 가지고 있어(35) 신맛이 전체적인 기호도를 낮추는데 영향을 끼친 것으로 사료된다. 식초에서 얻은 균을 사용하여 제조한 B군은 시판되는 Y균과 유사한 점수를 얻은 것으로 보아 아세트산 세균을 이용하여 발효우유를 제조할 경우 신맛이 강한 L군 보다 선호도가 높고 맛이 좋은 발효우유를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 식물성 원료인 콩에 물의 비율을 달리하여 발효우유 베이스(base)를 제조하고, 식물성 젖산균인 김치 젖산균 *L. plantarum*과 식초 젖산균인 *B. acidiproducens*를 접종하여 제조

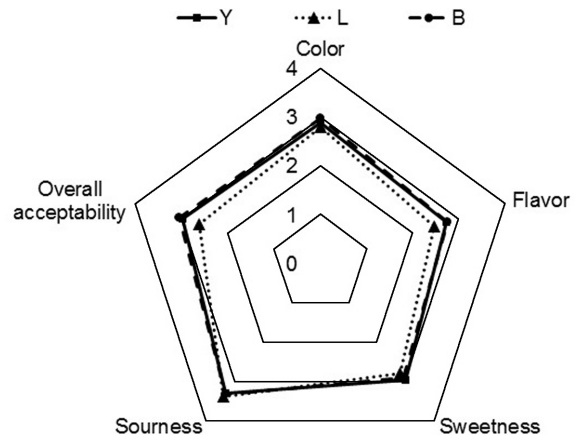


Fig. 3. Sensory evaluation scores of yogurt made from black bean milk fermented with different lactic acid bacteria and water contents. YF, LP and BA indicated that liquids from grinded black beans were inoculated with Probio-Tec[®] blended culture (ABT-4; YF), *L. plantarum* YD09 (LP), *B. acidiproducens* VG1 (BA), respectively, and dilution ratio of black bean and water=1:1: (n=19).

한 발효우유의 물리 화학적 특성을 알아보려고 하였다. 콩과 물의 비율은 1:1인 것이 다른 비율보다 실험결과에서 이상적인 값을 보였다. *L. plantarum* 발효우유와 *B. acidiproducens* 발효우유는 pH와 산도, 생균수에서 대조군으로 사용한 YF 발효우유보다 낮은 값을 나타내었으나 발효우유 제조 규격에 적합한 수준이었다. *L. plantarum* 발효우유는 발효완료시점의 생균수에서 *B. acidiproducens* 발효우유보다 유의적으로 높은 값을 나타내었으나 (p<0.05) 완성된 발효우유의 향과 전체적 기호도에서 낮은 평가를 받았는데, 이는 발효우유의 신맛과 향으로 인한 결과로 사료된다. *B. acidiproducens* VG1 발효우유는 *L. plantarum* YD09 발효우유와 pH, 산도, 색도, 당도 및 점성에서 유사한 결과 값을 보였고, 생균수에서는 *L. plantarum* 발효우유보다 낮은 값을 나타내었지만, 관능검사에서 높은 선호도를 보였다. 결론적으로 김치 젖산균인 *L. plantarum* YD09과 식초에서 분리한 *B. acidiproducens* VG1은 시판되는 YF 균주보다 발효 초기 pH값이 높은 경향을 보였으나 발효가 완료된 시점에서 발효우유로써 규격에 합치는 결과 값을 나타낸 것으로 보아 발효우유 제조에 적합한 것으로 사료되며, 콩과 물의 비율을 1:1로 정하여 제조하는 것이 생균수가 높고, 커드 형성이 잘 되는 발효우유를 제조할 수 있을 것으로 보인다. 그리고 *L. plantarum* 보다 *B. acidiproducens* VG1을 사용하여 발효우유를 제조할 경우 신맛이 덜하고 시판되는 ABT-4 (YF)만큼 기호도가 높은 발효우유를 제조할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단-전통문화융합연구사업과 2017년도 산업통상자원부의 ‘창의산업융합 특성화 인재양성사업(과제번호 N0000717)’의 지원을 받아 연구되었음.

References

1. Prajapati JB, Nair BM. The history of fermented foods. Hand-

- book of Fermented Functional Foods. 2th ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. pp. 1-24 (2008)
2. Farnworth ER ed. Handbook of fermented functional foods 2nd edition. CRC press, Boca Raton, FL, USA. p. 27 (2008)
 3. Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 10: 55-63 (1994)
 4. Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 2706-2708 (2000)
 5. Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 451-455 (2001)
 6. Van't Veer P, Dekker JM, Lamers JW, Kok FJ, Schouten EG, Brants HA, Hermus RJ. Consumption of fermented milk products and breast cancer: a case-control study in The Netherlands. *Cancer Res.* 49: 4020-4023 (1989)
 7. Nakajima H, Suzuki Y, Hirota T. Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J. Food Sci.* 57: 1327-1329 (1992)
 8. Agerbaek M, Gerdes LU, Richelsen B. Hypo-cholesterolaemic effect of a new fermented milk product in healthy. *Eur. J. Clin. Nutr.* 49: 346-352 (1995)
 9. Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 245-256 (2004)
 10. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-1023 (2006)
 11. Lim KS, Heong JW, Oh SJ, Moon YI, Hoh JH. Current market trends and perspectives of probiotics. *Curr. Top. Lactic Acid Bac. Probio.* 3: 46-53 (2015)
 12. Bhadoria PBS, Mahapatra SC. Prospects, technological aspects and limitations of probiotics-A Worldwide Review. *Eur. J. Food Res. Rev.* 1: 23-42 (2011)
 13. Gil BL, Song HN. The health beneficial effect of fermented milk. *Kor. Soc. Food Nutr.* 16: 93-103 (2003)
 14. Jang DL, Kim JB. 'Pulmuone vegetable lactic acid bacteria' advertisement of Pulmuone Healthy Life. Campaigns: Creating new categories in growing markets. *Kor. J. Advertising.* 21: 253-265 (2010)
 15. Molin G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v. *Am. J. Clin. Nutr.* 73: 380-385 (2001)
 16. Kim HW. Development of fermented dairy products. *Food Sci. Biotechnol.* 10: 4-9 (1977)
 17. Jung MY, Kim JS, Chan YH. *Bacillus acidiproducens* sp. nov., vinyard soil isolated that produce lactic acid. *International J. System. Evolut. Microbiol.* 59: 2226-2231 (2009)
 18. Prasirtsak B, Tanasupawat S, Boonsombat R, Kodama K Thongchul N. Characterization of lactic acid producing bacteria from Thai sources. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3: 33-38 (2013)
 19. Hwang CE, Seo WT, Cho KM. Enhanced antioxidant effect of black soybean by *Cheonggukjang* with potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191. *Kor. J. Microbiol.* 49: 391-397 (2013)
 20. Cho EJ, Park HY, Lee SH, Kim HY. Protective effects of *Seoritae Chungkukjang* added with green tea powder against 3-morpholinosydnonimine-induced oxidative stress. *Kor. J. Agric. Sci.* 42: 407-414 (2015)
 21. Koh ES, Lim JH, Kim MY, Chung S, Shin SJ, Choi BS, Chang YS. Anthocyanin-rich *Seoritae* extract ameliorates renal lipotoxicity via activation of AMP-activated protein kinase in diabetic mice. *J. Translational Medi.* 13: 1-12 (2015)
 22. Lim SY. Comparison of effect of various types of soybeans on mutagenicity and growth of human cancer cell lines. *J. Life Sci.* 20: 1532-1537 (2010)
 23. Jeon YH, Won JH, Kwon JE, Kim MR. Antioxidant activity and cytotoxic effect of an ethanol extract from *Seoritae*. *Kor. J. Food Cookery Sci.* 27: 1-9 (2011)
 24. Ko SJ, Jeong SS, Choi CH, Kim KH. pH and buffering capacity in some commercial fermented milks. *J. Kor. Soc. Dental Hygiene.* 13: 701-711 (2013)
 25. Bao Y, Zhang Y, Li H, Liu Y, Wang S, Dong X, Zhang H. In vitro screen of *Lactobacillus plantarum* as probiotic bacteria and their fermented characteristics in soymilk. *Ann. Microbiol.* 62: 1311-1320 (2012)
 26. Conway PL, Gorbach SL, Goldin BR. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70: 1-12 (1987)
 27. Moon SY, Chung HC, Yoon HN. Comparative analysis of commercial vinegars in physicochemical properties, minor components and organoleptic tastes. *Korean J. Food. Sci. Technol.* 29: 663-670 (1997)
 28. Shin HS, Kim SM, Choi NK, Yang KH, Kang MS. The effect of fermented milk on viable cell count and biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *J. Kor. Acad. Pediatr. Dent.* 36: 358-366 (2009)
 29. Hong SM, Gu MS, Chung EC, Kang PG, Kim CH. Quality characteristics of yogurt prepared with rice bran *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus casei*. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 33: 17-25 (2015)
 30. Kim KH, Hwang HR, Jo JE, Lee SY, Kim NY, Yook HS. Quality characteristics of yogurt prepared with flowering cherry(*Prunus serrulata* L. Var. *spontanea* Max. wils) fruit powder during storage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1229-1236 (2009)
 31. Hancock BC, Zografi G. The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids. *Pharma. Res.* 11: 471-477 (1994)
 32. Sung YM, Cho JR, Oh NS, Kim CK, In MJ. Preparation and quality characteristics of curd yogurt added with chlorella. *Korean J. Soc. Appl. Biol. Chem.* 48: 60-64 (2005)
 33. Kim JP, Yang YS, Kim JH, Lee HH, Kim ES, Moon YW, Kim JY, Chung JK. Chemical properties and DPPH radical scavenging ability of sword bean (*Canavalia gladiata*) extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* 44: 441-446 (2012)
 34. Moon HK, Lee SW, Moon JB, Kim DH, Yoon WH, Kim GY. Quality characteristics of various beans in distribution. *J. East Asian Soc. Diet. Life.* 21: 215-221 (2011)
 35. Han KH, Park JK, Lee CH. Manufacture and product evaluation of fermented sausages inoculated with freeze-dried *Kimchi* Powder and starter culture (*Lactobacillus plantarum*). *Kor. J. Food Sci. Anim. Resour.* 26: 486-490 (2006)