고초균과 유산균의 혼합배양에 의한 두유 요구르트의 발효 특성

양밍 · 광정순 · 장세리 · 짜아위엔 · [†]박인식

동아대학교 식품영양학과

Fermentation Characteristics of Soybean Yogurt by Mixed Culture of *Bacillus* sp. and Lactic Acid Bacteria

Ming Yang, Jung Soon Kwak, Seri Jang, Yuan Jia and [†]Inshik Park

Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Abstract

The microorganisms producing high protease activity and acid producing ability were isolated from *Chunggukjang* and kimchi, which were identified as *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* by morphological, biochemical and nutrient requirement. The attempt was made to produce soybean milk yoghurt by using the isolated microorganisms. The mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* exhibited the lowest pH value of 4.23 and highest titratable acidity of 0.88% compared to those of single cultures at 37°C for 32 hrs, and their total viable count was 4.09×10^8 cfu/ml. The α -amylase activity was the highest in culture of *Bacillus subtilis* after incubation for 24 hrs, while protease activity was most produced in mixed culture of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. The amounts of reducing sugars were steadily decreased as soy milk fermentation progressed.

Key words: soybean milk yogurt, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, mixed culture

서 론

최근 생활수준의 향상에 따른 식생활 패턴의 서구화와 질병 양상의 변화로 인해 심혈관계 질환과 호르몬 관련 질환이 증가(Kim JS 1989)함에 따라 식생활과 성인병 예방에 대한 관심이 급격히 증가하고 있는 추세이다. 이에 많은 건강기능 식품이 개발되어 시판되고, 더불어 식물성 유래 식품에 대한 관심이 증대되었으며, 음료시장 추세도 건강음료로 바뀌어 식품 회사들은 다양한 음료를 개발하여 시판하고 있다(Kim RU 2010). 2006년 미국 Health 잡지가 뽑은 세계적인 건강식품 5가지 중 3가지가 발효식품이며, 김치와 장류 그리고 요구르트가 선정되어 국제적으로도 발효식품은 건강 식품으로 인식되고 있다(Park KY 2012).

대두는 동양에서 간장, 된장, 고추장, 청국장 등의 발효식

품의 형태로 널리 이용되어 왔으며, 대두에는 isoflavone, lecithin, 섬유소 등과 같은 물질이 풍부하고, 식물성 고단백 식품으로 영양학적으로 아주 우수한 소재이다. 또한 대두는 곡식이지만 육류에 가까운 성분을 가지고 있기 때문에 밭에서 나는 육류라고 부르고 있다. Saponin, phytic acid, isoflavones, hemagglutinins 등의 다양한 생리활성물질을 포함하고 있어 암을 비롯한 성인병 예방 및 치료에 대한 가능성이 보고되고 있다(Yoo & Yeo 2008).

요구르트는 우유를 젖산균으로 발효시켜 산미와 향미를 강화시킨 것으로 우유성분 외에 젖산균으로 유효성분(lactate, peptone, peptide, 미량활성물질)의 생성, 젖산균이 함유되어 있어서 영양학적으로 우유보다 우수하다(Jung & Ju 1997). 특히 요구르트의 건강 증진 효과로는 유당 소화 불량 개선, 장내 균총 정상화 및 정장 작용, 설사와 변비의 개선, 장내

[†] Corresponding author: Inshik Park, Dept. of Food Science and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, Korea. Tel: +82-51-200-7322, Fax: +82-51-200-7535, E-mail: ispark@dau.ac.kr

유해 세균의 생육 억제 작용, 혈중 콜레스테롤 저하 작용, 면역 증진 작용, 항암 작용 등을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Robinson 등 1984; Savaiano 등 1984; So MH 1985; Hood & Zottola 1988).

이렇게 풍부한 영양학적인 가치를 지닌 콩도 특성상 몇 가지 해결해야 할 과제들도 있는데, 특히 콩 비린내를 내는 lipoxigenase는 기호성을 저하시키고, 인체의 대사중에 위와 장에서 가스를 생성하는 flatulence와 trypsin inhibitor, phytic acid 등의 영양장애 요인이 있어(Jung HJ 2008), 이용을 하는데 제한을 받고 있기 때문에, 가공법의 개선과 함께 소화율을 높이고, 콩 비린내와 가스 생성물질을 제거하기 위한 방법의 일환으로 발효에 관한 연구가 진행되어 오고 있다(Lim 등 1984). 최근에는 두유에 *Lactobacillus*나 *Bifidobacteria* 등과 같은 유산균을 접종하여 발효 두유를 개발하려는 시도가 이루어지고 있다(Jang & Yoo 1997), 그러나 식물 유래 유산균과 고초균을 이용한 두유 발효에 관한 연구는 부족한 편이다.

따라서 본 연구에서는 영양학적으로 손색이 없는 단백질 자원의 대두를 주원료로 청국장 발효 균주인 고초균과 김치에서 유래한 유산균을 이용하여 혼합 발효를 통한 대두발효 식품인 두유 요구르트를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 균주 분리

청국장에서 단백질 분해능이 있는 균을 분리하기 위해서 시료 30 g에 멸균 생리식염수 270 mL를 멸균된 stomacher bag에 담아 stomacher를 이용하여 4분간(260 rpm) 균질화하여 80°C water bath에 15분간을 살균한 다음 그 상층액을 10^{-5} ~ 10^{-7} 으로 희석한 후 미리 준비한 nutrient agar(skim milk 2%) 배지에 도말한 후, 항온기 37°C에서 48시간 배양하여 배지에 나타난 colony의 크기와 모양 및 투명환의 크기에 따라 균주 12개를 nutrient agar 배지에 streaking하여 순수 분리하였다.

김치에서 산 생성력이 강한 균을 분리하기 위해서 시료 30 g에 멸균 생리식염수 270 mL를 멸균된 stomacher bag에 담아 stomacher를 이용하여 4분간(260 rpm) 균질화하여 그 상층액을 10^{-4} ~ 10^{-6} 으로 희석한 후, 미리 준비한 1%(w/v) CaCO_3 를 함유하는 MRS agar 배지에 도말한 후, 항온기 37°C에서 48시간 배양하여 배지에 나타난 colony의 크기와 모양 및 투명환의 크기에 따라 균주 15개를 MRS agar 배지에 streaking하여 순수 분리하였다.

2. 균의 선별

청국장에서 순수 분리한 균주를 YMB-1~YMB-12까지 명명하였으며, Horikoshi K(1971)의 protease 생산 배지(glucose 1%,

peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, soybean meal 1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%)를 사용하여 37°C에서 배양하였다. 배양액을 원심분리(15,000 rpm, 15 min) 후 상등액을 조효소로 하여 1% casein 용액을 기질로 하여 활성을 측정하여 단백질 분해효소 활성이 가장 높은 균을 선별하였다. 선별한 균주는 nutrient broth 배지에서 배양한 후 30% glycerol 액에서 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

김치에서 순수 분리한 균주를 YML-1~YML-15까지 명명하였으며, MRS 액체 배지에 37°C에서 24시간 동안 계대배양을 하고, 산도가 가장 높은 균주 만을 선별하였다. 선별한 균주는 MRS broth 배지에서 배양한 후 30% glycerol 액에서 -70°C에서 보관하면서 사용하였다.

3. 분리 균주의 동정

김치와 청국장에서 분리한 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 따라서 형태적, 배양적 및 생리적 특성을 조사하여 확인하였다(Gerhardt 1981; Harold J 1994).

4. 두유 요구르트 제조

발효 대두유의 제조는 선별한 건조대두 60 g을 물에 12시간 이상 침지시킨 후, 물을 제거한 다음 대두와 물의 중량 비율 1:10으로 하여 두유로 제조하였다. 제조한 두유에 1%(w/v) 포도당을 첨가하여 121°C에서 15분간 autoclave하고 냉각하여 실험에 사용하였다. 선별 동정된 고초균을 nutrient broth로 사용하여 37°C에서 2회 계대 배양한 것을 스타터로 사용하였다. 선별 동정된 유산균을 MRS broth로 사용하여 고초균과 같은 방법으로 실시하였다. 멸균된 두유에서 약 10^8 cfu/mL로 배양된 스타터를 2%(v/v)가 되게 접종하고, 37°C에서 32시간 배양하였다. 혼합배양 시에는 선별된 고초균과 유산균을 1:1로 혼합하여 단독배양과 같은 조건에서 발효하였다.

5. 두유 요구르트 이화학적 분석

1) pH 및 산도

pH는 발효두유 3 mL에 멸균 증류수 27 mL를 가한 후 잘 용해하여 pH meter로 측정하였다. 발효두유의 산도는 시료 여과액 20 mL를 0.1 N NaOH를 가하여 최종 pH가 8.4가 될 때까지 적정하였다. 적정에 사용된 0.1 N NaOH의 소비 mL를 다음의 계산식으로 젖산으로 환산하였다.

Acidity (%) =

$$\frac{\text{mL of 0.1 N NaOH} \times \text{factor} \times \text{dilution rate} \times 0.009}{\text{Weight of sample (mL)}} \times 100$$

2) 총 생균수

고초균 생균수는 채취한 요구르트 시료를 멸균수에 십진 희석하여 nutrient agar에 도달한 후 37°C에서 48 hrs 배양한 후 균수를 계측하였다. 유산균 생균수는 채취한 요구르트 시료를 멸균수에 십진희석하여 MRS agar에 도달한 후 37°C에서 48 hrs 배양한 후 균수를 계측하였다. 균수는 30~300개가 나타나는 평판을 선택하여 산출하였다.

3) 가수분해 효소 활성도 측정

효소 활성은 α -amylase와 protease로 나누어 역가를 측정하였으며, 발효액 1 ml에 0.02 M phosphate buffer(pH 7.0) 9 ml를 첨가한 뒤 실온에서 진탕 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 상등액으로부터 효소액을 조제한 다음 효소 활성을 측정하였다.

α -Amylase 활성 측정은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(Noh 등 2008)에 따라서 실시하였다. 1% 가용성 전분용액 0.5 ml에 완충용액(0.02 M phosphate buffer pH 7.0) 0.2 ml와 1% NaCl 0.1 ml를 첨가한 용액을 기질로 사용하였고, 반응 온도에서 5분간 예열시킨 후 조효소액 0.1 ml를 가하여 시작부터 60°C에서 10분간 반응시킨다. 그 후 2 M NaOH 0.1 ml로 반응 정지시키고 반응액 0.25 ml를 DNS 용액 0.75 ml와 진탕한 후 끓는 수조에서 5분간 방치하고, 즉시 얼음수조에서 냉각시킨 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소 활성을 구하기 위해서 maltose로 표준곡선을 작성해서 사용하였다. 효소 활성은 1분간 0.1 μ mol의 maltose를 생성하는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Protease의 활성도는 Anson의 방법(Kim 등 1998)을 변형하여 측정하였다. 기질로 1%의 casein 용액 0.35 ml와 효소액 0.35 ml를 Eppendorf tube에 넣고, 항온수조에서 반응(37°C, 10 min)시킨 다음 0.44 M TCA 용액 0.7 ml를 넣어 반응을 정지시킨 후 37°C에서 30분간 정치시켰다. 이 반응액을 원심분리(15,000 rpm, 15 min)한 후 여액 0.25 ml에 0.55 M Na_2CO_3 0.625 ml와 3배 희석된 Folin reagent 0.125 ml를 넣고 37°C에서 30분간 반응시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응조건 하에서 1분간에 tyrosine 1 μ g을 유리시키는 효소량을 1 unit으로 하였다.

4) 환원당 함량 측정

발효두유를 증류수로 10배 희석하고 여지로 여과한 후, 그 여액 0.25 ml에 DNS 시약 0.75 ml를 가하고, 끓는 수조에서 5분간 반응하였다. 그리고 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 측정된 값은 glucose 표준곡선으로 환원당 함량을 산출하였다(Noh 등 2008).

6. 통계분석

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 통계프로그램을 이용하여 처리하였다. 각 측정치의 평균과 표준편차를 구하고, 그룹간 비교를 위하여 one-way analysis of variance(ANOVA)와 Duncan's multiple-range test를 실시하였으며, 통계적 유의수준은 $p < 0.05$ 로 설정하였다.

결과 및 고찰

1. 균주의 선별

1% CaCO_3 를 함유한 MRS agar 배지에 김치액 0.1 ml를 가하고, 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 투명환이 크게 나타난 균주 15종을 선별하여 YML-1~YML-15로 명명하였다. 이들 분리한 15개 균주를 대상으로 2차에 걸친 산도 측정을 통하여 산 생산능력이 가장 강한 균주를 선정하였다. 최종적으로 YML-4를 선별하여 본 연구에 사용하였다.

2% skim milk를 첨가한 nutrient agar 배지에 청국장 희석시료 0.1 ml를 가하여 37°C에서 24시간 배양 후에 배지에 투명환이 크기에 따라 12종을 분리하고, YMB-1~YMB-12까지 명명하였다. 이들 분리한 12개 균주를 대상으로 2차에 걸친 효소 생산능력 측정을 통하여 protease 생산능력이 가장 강한 균주를 선정하였다. 최종적으로 YMB-12를 선별하여 본 연구에 사용하였다.

2. 균주의 동정

선별된 균주(YMB-12)의 형태는 운동성이 있는 Gram 양성균의 간균으로서 내생포자를 형성하였고, catalase 활성이 있어 *Bacillus* sp.의 세균으로 추정되었다. 그 외에 탄수화물의 이용성과 생화학적 실험의 결과는 Table 1과 같다.

탄소원으로는 arabinose, cellobiose, fructose, glucose, maltose, mannitol, sucrose를 이용하였지만, esculin, lactose, melibiose, rhamnose, raffinose, xylose는 이용하지 못하였으며, casein, starch, gelatin 가수분해능이 있었고, 50°C까지 생육이 이루어지었다. 이와 같은 결과로 보아 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 상의 *Bacillus subtilis*의 특성과 일치되어 분리된 균주(YMB-12)를 *Bacillus subtilis*로 동정되었으며, *Bacillus subtilis* YMB-12로 명명하였다. 선별된 균주(YML-4)는 Table 1에 나타난 바와 같이 비운동성, Gram 양성균의 간균으로서 포자를 형성하지 않고, catalase 음성, indole를 생성하지 않는 등 대표적인 특성이 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 분류기준과 일치하였으며, 그 결과는 분리된 균주(YML-4)를 *Lactobacillus plantarum*으로 동정하였고, *Lactobacillus plantarum* YML-4로 명명하였다.

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the strains, YML-4 and YMB-12

Characteristics	Strain No.	
	YML-4	YMB-12
Gram stain	+	+
Cell form	Rod	Rod
Motility	-	+
Endospores	-	+
Catalase	-	+
Citrate-test	-	+
Nitrate reduction	-	+
VP-test	-	+
MR-test	+	-
Indole-test	-	-
Casein hydrolysis	-	+
Starch hydrolysis	-	+
Gelatin hydrolysis	-	+
NH ₃ from arginine	-	-
Dextran formation	-	-
Litmus milk test		
Acidification	+	-
Reduction	+	+
Coagulation	+	-
Peptonization	-	+
Gas from glucose	-	-
Acid from		
Arabinose	+	+
Cellobiose	+	±
Esculin	+	-
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Lactose	+	-
Maltose	+	±
Mannitol	+	±
Melibiose	+	-
Rhamnose	-	-
Raffinose	+	-
Sucrose	+	+
Xylose	+	-
Growth in 7% NaCl	+	+
Growth in 10% NaCl	±	-
Growth at 15°C	±	-
Growth at 25°C	+	+
Growth at 45°C	+	+
Growth at 50°C	-	+

Symbols : +, positive; -, negative; ±, weak.

3. 두유 요구르트 이화학적 분석

1) 두유 요구르트의 pH와 산도, 총 생균수

발효 진행 중 나타난 pH 및 적정산도는 Fig. 1, 2에 나타난 바와 같다. 대조구(NFS)를 제외한 각 시료의 pH는 발효시간이 증가하면서 점차 낮아지는 경향을 보였지만, *Bacillus subtilis* YMB-12 단독 배양일 경우가 다른 처리구에 비해 완만하게 감소로 변화를 나타내었고, *Lactobacillus plantarum* YML-4를 이용한 두유 발효와 혼합 배양의 경우가 급격히 감소한 경향을 나타내었다. 이는 *Lactobacillus plantarum*의 특성상 산을 많이 생성하므로 *Bacillus subtilis*에 비해 pH가 더 빨리 낮아지는 것으로 생각된다.

배양 32시간째 각 처리구별 pH는 *Lactobacillus plantarum* YML-4의 경우 4.28, *Bacillus subtilis* YMB-12의 경우 5.98인데 비해, 혼합 배양의 경우는 4.23으로 가장 낮았다. Cho 등(2011)은 혼합 배양의 경우는 4.32라고 보고한 것과 비슷하였다.

요구르트 제조 중 가장 중요한 화학적 변화는 lactic acid의 생성이다. 요구르트는 적절한 산도를 가져야 풍미가 향상되는 것으로 알려져 있다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 *Lactobacillus plantarum* YML-4를 이용한 두유 발효와 혼합 배양의 경우가 lactic acid의 생성은 배양 8시간 이후에 급격히 증가하였으며, *Bacillus subtilis* YMB-12 단독 배양의 경우가 완만하게 증가한 경향을 나타내었다. 이는 pH 분석에서 나타난 결과와 일치하였다. Cho 등(2011) 및 Jeong EJ(2010)은 *Lactobacillus plantarum*과 *Bacillus subtilis*를 스타터로 단독 및 혼합 배양하여 두유 요구르트 발효 중 단독으로 배양하였을 때보다 혼합 배양하였을 때 산생성, 생균수의 성장 등이 증진되었다고 보고하여 본 연구결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

배양 32시간째 각 처리구별 산도는 *Lactobacillus plantarum* YML-4의 경우 0.74%, *Bacillus subtilis* YMB-12의 경우 0.42%인데 비해 혼합 배양의 경우는 0.88%로 가장 높았다. Cho 등(2011)은 혼합 배양의 경우는 0.54%라고 보고한 것보다는 높았다.

두유에는 우유와 달리 유당이 함량이 적고 유산균이 이용하기 어려운 올리고당 있기 때문에 산도가 낮았으며, 일반적으로 유산균으로 발효한 발효유의 경우 산도는 1.0~1.1%일 때 가장 양호한 품질을 가진다고 보고되었다(Shin 등 1983)

발효 중 두유 요구르트 내 총 균수의 변화는 Fig. 3과 같다. 단독배양의 경우 24시간까지 *Lactobacillus plantarum* YML-4의 성장이 *Bacillus subtilis* YMB-12에 비해 빨랐으며, 24시간 이후 *Lactobacillus plantarum* YML-4의 성장이 점차 감소하였다. 혼합 배양의 경우 단독배양에 비해 증식이 더 우수하였고, 배양 32시간째 각 처리구별 총 균수는 *Lactobacillus plantarum*

Fig. 1. Change of pH during the fermentation of soybean milk at 37°C. Symbols: LP, *Lactobacillus plantarum* fermented soybean milk; BS, *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; LPBS, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; NFS, Non-fermented soybean milk.

Fig. 2. Change of titratable acidity during the fermentation of soybean milk at 37°C. Symbols: LP, *Lactobacillus plantarum* fermented soybean milk; BS, *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; LPBS, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; NFS, Non-fermented soybean milk.

Fig. 3. Change of viable cell counts during the fermentation of soybean milk at 37°C. Symbols: LP, *Lactobacillus plantarum* fermented soybean milk; BS, *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; LPBS, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* fermented soybean milk.

YML-4의 경우 1.02×10^8 cfu/ml, *Bacillus subtilis* YMB-12의 경우 2.12×10^8 cfu/ml인데 비해 혼합 배양의 경우는 4.09×10^8 cfu/ml로 가장 높았다. Cho 등(2011)은 두유에 *Lactobacillus plantarum*과 *Bacillus subtilis*로 발효시켰을 때 발효 10시간에 총 균수는 2.86×10^9 cfu/ml였다. 이는 균종 간의 차이, 그리고 제조 공정 등에 대한 차이에 기인한 것으로 생각된다.

2) 발효시간 별 두유 요구르트의 가수분해효소 및 환원당 함량 변화

두유 요구르트의 α -amylase 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. *Lactobacillus plantarum* 단독 배양일 경우는 α -amylase 활성이 없는 것으로 나타났다. *Bacillus subtilis* YMB-12 단독 배양과 혼합 배양일 경우는 8시간 이후 α -amylase 활성이 증

Fig. 4. Change of α -amylase activity during the fermentation of soybean milk at 37°C. These values are means $\pm$ S.D. of triplicate determinations. Symbols: LP, *Lactobacillus plantarum* fermented soybean milk; BS, *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; LPBS, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* fermented soybean milk.

Fig. 5. Change of protease activity during the fermentation of soybean milk at 37°C. These values are means $\pm$ S.D. of triplicate determinations. Symbols: LP, *Lactobacillus plantarum* fermented soybean milk; BS, *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; LPBS, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* fermented soybean milk.

Fig. 6. Change of reducing sugar contents during the fermentation of soybean milk at 37°C. These values are means±S.D. of triplicate determinations. Symbols: LP, *Lactobacillus plantarum* fermented soybean milk; BS, *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; LPBS, *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* fermented soybean milk; NFS, Non-fermented soybean milk.

가되면서 24시간 동안 발효시 22.01 unit/ml, 8.13 unit/ml로 가장 높았다. 그리고 protease의 활성을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. *Lactobacillus plantarum* 단독 배양일 경우는 protease의 활성이 없었는데, 이는 α -amylase 활성을 측정한 결과와 유사한 것으로 나타났다. *Bacillus subtilis* YMB-12 단독 배양과 혼합 배양일 경우는 8시간 이후 protease 활성이 증가하기 시작하여 발효 32시간째 103.08 unit/ml, 85.84 unit/ml로 활성이 높게 나타났으며, 이 결과는 Oh SM(2006)는 고초균을 이용한 발효 비지의 특성에서 가수분해 효소 활성도 측정한 결과와 일치하는 경향을 보였다. 이는 *Bacillus subtilis*에 의한 두유의 발효는 α -amylase, protease의 생성을 초래하며, 발효시간이 증가하면서 효소 활성이 증가하는 것을 알 수 있다. 그리고 발효 시간에 따른 각 시료의 환원당 함량을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 대조군(NFS)를 제외 각 시료의 환원당 함량은 발효시간을 증가하면서 점차 낮아지는 경향을 보였다. 특히 *Lactobacillus plantarum* YML-4를 이용한 두유 발효와 혼합 배양의 경우가 발효 초기 함량은 3,492.86 mg%, 3,433.04 mg%이었는데, 발효 32시간 후에는 1,942.90 mg% 및 1,865.40 mg%로 각각 약 56%, 54%의 당을 이용하였음을 알 수 있다. 그리고 초기 24시간에는 급격한 감소현상을 보였으며, 그 후에는 다소 완만한 경향을 보이고 있다. 환원당의 감소는 발효 중 미생물 증식 및 유기산발효에 기인한 것으로 생각된다. Kim 등(1999)은 혼합균주를 이용한 대두유의 발효에 따른 당 변화에 측정한 결과를 보고하여 본 연구결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

요 약

본 연구에서는 단백질이 풍부한 원료 콩에 청국장에서 분리

한 *Bacillus subtilis*와 김치에서 분리한 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 혼합발효를 통해 대두 발효 제품의 개발을 목표로 한 연구결과는 다음과 같은 분석 결과를 얻었다.

우유 균주 선별을 위한 연구로 고초균의 경우 단백질 분해 능력이 높은 균주를 청국장에서 분리하였고, 유산균의 경우 산도 생성이 높은 균주를 김치에서 분리하였다. 그리고 청국장에서 분리한 균주는 *Bacillus subtilis*로, 김치에서 분리한 균주는 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다. 두유 발효에서 pH는 *Lactobacillus plantarum*를 이용한 두유 발효와 혼합 배양의 경우가 급격한 낮은 경향을 나타내었고, *Bacillus subtilis* 단독 배양일 경우가 다른 처리구에 비해 완만한 변화를 보였다. *Lactobacillus plantarum*을 이용한 두유 발효와 혼합 배양의 경우가 lactic acid의 생성은 배양 8시간 이후에 급격히 증가하였으며, *Bacillus subtilis* 단독 배양의 경우가 완만하게 증가한 경향을 나타내었으며, 이는 pH 분석에서 나타난 결과와 일치하였다.

두유 요구르트 생육도 측정 결과는 혼합 배양의 경우 단독 배양에 비해 증식이 더 우수하였으며, 배양 32시간째 각 처리구별 총 균수는 *Lactobacillus plantarum*의 경우 1.02×10^8 cfu/ml, *Bacillus subtilis*의 경우 2.12×10^8 cfu/ml인데 비해 혼합 배양의 경우는 4.09×10^8 cfu/ml로 가장 높았다.

α -Amylase의 활성은 *Bacillus subtilis* 단독 배양과 혼합 배양일 경우는 8시간 이후 효소 활성이 증가되면서 24시간 동안 발효시 22.01 unit/ml, 8.13 unit/ml로 가장 높았다. Protease의 경우는 *Bacillus subtilis* 단독 배양과 혼합 배양일 경우는 8시간 이후 활성이 증가하기 시작하여 발효 32시간째 103.08 unit/ml, 85.84 unit/ml로 활성이 높게 나타났다, *Lactobacillus plantarum* 단독 배양일 경우는 가수분해효소 활성이 없는 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 동아대학교 교내연구비 지원에 의하여 연구되었음.

Reference

- Cho EK, Cho HY, Kim BC, Shin HH, Cho SC, Kook MC, Pyun YR. 2011. Development of pretreatment and mixed culture processes for plant originated lactic acid to produce a functional lactic acid beverage. *Korean J Food & Nutr* 24:117-123
- Gerhardt. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. American Society for Microbiology
- Harold J. 1994. Benson Microbiological Applications 6th edn.

- Wm. C. Brown Publishers. pp 143-168
- Hood, SK, Zottola, EA. 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J Food Sci* 55:506-511
- Horikoshi K. 1971. Production of alkaline enzyme by alkalophilic microorganism. *Agric Biol Chem* 35:1783-1791
- Jang JK, Yoo SH. 1997. Preparation of soy yogurt using isolated soybean protein and whey powder. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26:1128-1134
- Jeong EJ. 2010. Chemopreventive effects of soymilk fermented by *Bacillus subtilis* KCCM 42923. Master's Thesis, Pusan National Uni. Busan. Korea
- Jung GT, Ju IO. 1997. Studies on the preparation of yogurt from milk added purple sweet potato powder. *Kor J Food Nutr* 10:458-461
- Jung HJ. 2008. Development and physiological effects of soy yogurt fermented *Lactobacillus* isolated from plants. Master's Dissertation, Yonsei Uni. Seoul. Korea
- Kim CH, Shin YK, Baick SC, Kim SK. 1999. Changes of oligosaccharide and free amino acid in soy yogurt fermented with different mixed culture. *Korean J Food Sci Technol* 31:739-745
- Kim HJ, Lee JJ, Cheigh MJ, Choi SY. 1998. Amylase protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of Kimchi ingredient. *Korean J Food Sci Technol* 30:1333-1338
- Kim JS. 1989. Perspective and transition of death causes among Korean. *Korean J Epidemiol* 11:155-174
- Kim RU. 2010. Identification and characterization of soy yogurt-forming lactic acid bacteria. Master's Thesis, Pusan National Uni. Busan. Korea
- Lim SJ, Kho YT, Yoo JC. 1984. Manufacture of yogurt from soy protein concentrate. *Food Sci Biotechnol* 16:143-148
- Macfaddid JF. 1980. Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria. 2nd edn. Willams and Wilkins. Baltimore
- Noh BS, Kim SJ, Kim YS, Lee KG, Lee JH. 2008. Food Analysis. Soohaksa, Seoul
- Oh SM. 2006. Optimization of production of bioactive compounds of the fermented soybean curd residue by *Bacillus* sp. Master's Thesis, Keimyung Uni. Korea
- Park KY. 2012. Increased health functionality of fermented foods. *Food Ind Nutri* 17:1-8
- Robinson IM, Whipp SC, Bucklin JA, Allison MT. 1984. Characterization of predominant bacteria from the colons of normal and dysenteric pigs. *Appl Environ Microbiol* 33: 79-85
- Savaiano DA, Abou A, Anouar AL, Smith DZ, Levitt MD. 1984. *Lactose malabsorption* from yogurt, pasteurized yogurt, sweet acidophilus milla, and cultured milk in lactose-deficient individuals. *Am J Clin Nutr* 40:1219-1225
- Shin YS, Lee KS, Kim DH. 1983. Studies on the preparation of yogurt from milk and sweet potato or pumpkin. *Korean J Food Sci Technol* 25:666-671
- So MH. 1985. Identification and tolerance test to digestive fluids of *Lactobacillus* isolated from Korean liquid yogurt. *Kor J Food Sci Technol* 17:192-196
- Yoo JH, Yeo IH. 2008. Soybean Food Processing. Hyoilbooks

접 수 : 2013년 5월 2일
 최종수정 : 2013년 5월 29일
 채 택 : 2013년 6월 4일