Protease를 생산하는 *Lactobacillus paracasei*의 분리와 이를 이용한 두유 발효 최적화

이설희 · 장동훈¹ · 최혁준² · 박영서*

가천대학교 식품생물공학과, ¹학교법인 연세대학교 연세우유, ²(주)BK bio

Optimization of Soymilk Fermentation by the Protease-producing *Lactobacillus paracasei*

Sulhee Lee, Dong-Hun Jang¹, Hyuk Jun Choi², and Young-Seo Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University

¹Yonsei University Milk

²BK bio, Co., Ltd.

Abstract Our aim was to ferment soymilk using lactic acid bacteria that showed protease activity and to optimize the condition for fermentation. In total, 108 strains of protease-producing lactic acid bacteria were isolated from various fermented foods such as kimchi and *jeotgal*, and among them, 29 strains displaying the highest protease activity were selected for further study. From these 29 strains, strain MK1, whose protease activity was 126 mU/mL·min, was selected as the optimal fermentation strain owing to its high ability to digest soymilk protein. It was henceforth labeled as *Lactobacillus paracasei* MK1. The optimum conditions for the fermentation of soymilk by using *L. paracasei* MK1 were determined to be as follows: 30 h of fermentation time at a temperature of 30°C, and at a pH of 6.0 in the initial growth medium.

Keywords: protease, soymilk, fermentation, *Lactobacillus paracasei*

서 론

두유는 대두를 수용성으로 추출한 대두 가공식품 중 하나이며, 우유와 비교하여 외관 및 성분이 유사하고, 불포화지방산, 수용성 단백질 및 필수 아미노산의 함량이 높다(1,2). 전통적으로 두유는 대두를 물에 불린 후(수침) 마쇄, 여과 및 가열공정을 통하여 비지를 제거한 후 얻을 수 있다. 두유는 유당불내증(lactose intolerance)과 우유 알레르기가 있는 사람에게 우유를 대체할 수 있는 식품이며 두부나 유부 등의 중간원료로 사용되기도 한다(1,3). 최근 국내 두유 생산량 또한 증가하고 있는데, 1995-2005년의 연평균 두유 생산량은 159,036 kL로, 연평균 성장률이 1.97%이고, 2000-2005년의 연평균 두유 생산량은 177,236 kL로, 연평균 성장률이 5.05%를 확인할 수 있었다. 1995-2005년까지의 연평균 성장률과 최근 6년간의 연평균 성장률보다 증가하였고, Shin 등(4)은 이러한 두유 시장의 급속한 증가는 해외시장에서도 확인할 수 있다고 하였고, 기능성 두유 또한 맛이 뛰어난 검은 콩을 사용하거나 칼슘이나 이소플라본 등을 첨가한 두유가 시판되고 있으며 기능성을 강화한 제품이 두유 시장에서도 큰 폭으로 성장

하고 있다고 보고하였다. 대두는 많은 연구를 통해서 이소플라본, 올리고당, 사포닌 및 대두 peptide 등의 생리활성 기능이 보고되어 있는데, Anderson과 Wolf(5)는 현재까지 단백질, 이소플라본, 올리고당(oligosaccharide), 사포닌, 피틴산(phytic acid), 트립신 저해제(trypsin inhibitor) 등이 콩의 생리활성물질로 밝혀졌고, 여러 질병과 예방에 도움이 된다는 연구가 활발하게 이루어지고 있다고 하였다. 또한 사포닌은 혈중 cholesterol 감소, 유해성분을 장 내에서 흡착하여 독성을 지닌 음식물이 장내에 머무르는 시간을 짧게 하여 항암효과를 기대할 수 있으며, 더불어 면역증진 효과 등이 있는 것으로 연구되었다(6,7). Peptide는 단백질의 분해과정 중 생성되는 물질로 분자량은 10,000 Da 이하로, 적은 수의 아미노산이 결합되어 있는 저분자 peptide는 아미노산보다 단위 시간당 흡수량이 더 많다(8,9). Peptide의 생리활성은 이미 많은 연구가 이루어져 있는데, angiotensin I-converting enzyme (ACE) 저해 활성, opioid agonist 저해 활성, 항균 활성, 미네랄 결합 활성 등이 보고되어 있다(10,11). 대두 단백질을 그대로 섭취하는 것보다는 가수분해한 peptide 형태로 섭취할 때 체내 지질 개선에 더 효과적인 것으로 알려져 있고, 대두 단백질에 비하여 알레르기성이 낮으며, 흡수가 빠르다는 장점이 있다(12). Aoyama 등(13)의 연구에서는 분리대두단백질보다 그의 가수분해물이 체중과 체지방량을 감소하는 효과가 더 크며, 혈중 cholesterol을 더욱 감소시켰다고 보고하였다. 비만과 더불어 고혈압을 예방해주는 연구결과가 발표되었는데, Shin 등(14)과 Gibbs 등(15)은 고혈압을 유발시키는 ACE의 활성은 미생물 또는 효소 등의 분리대두단백의 가수분해로 생성되는 peptide 말단에 His-His-Leu이 존재하게 되면 ACE의 활성이 억제되어 고혈압을 예방할 수 있다고 하였으

*Corresponding author: Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Seongnam, Gyeonggi 461-701, Korea
Tel: 82-31-750-5378
Fax: 82-31-750-5273
E-mail: ypark@gachon.ac.kr
Received April 4, 2013; revised June 29, 2013;
accepted June 29, 2013

며, 항혈전 및 항산화에 대하여 보고하였다. 이 외에도 암이나 당뇨병 등의 질병에 peptide가 많은 효과가 있는 것으로 입증되고 있다(16).

Ammor와 Mayo(17)는 우리나라 전통 발효식품인 김치와 젓갈 등에 주로 존재하는 *Lactobacillus plantarum*과 같은 유산균은 유산을 생성하여 유해한 미생물 생장을 억제하고, 발효식품의 풍미를 증진시키며, 김치에서 분리한 유산균인 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus sakei*를 이용하여 두유 요구르트에 이용한 Kim(18) 또한 식이섬유를 생성하고, 뛰어난 정장작용으로 probiotics의 가치가 높을 것이라고 보고하였다. 이처럼 유산균을 이용한 두유의 발효는 지속적으로 연구되고 있으나, 기능성 peptide를 생산할 수 있는 protease 효소활성을 나타내는 유산균을 이용하여 두유 단백질로부터 peptide를 제조한 연구는 미진한 실정이다. 본 연구에서는 protease를 생성하는 유산균주를 탐색 분리하고, 선정된 유산균이 생산하는 protease에 의해 두유 단백질을 분해하는 발효 조건을 최적화하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 두유는 (학)연세대학교우유(Seoul, Korea)에서 제공하였고, 유산균의 분리원으로는 젓갈 및 김치 등 다양한 발효식품을 사용하였다.

Protease 생산 균주 탐색

발효식품시료 1g을 멸균생리식염수(0.88%, w/v, NaCl)에 현탁

한 후 십진 희석하여 skim milk가 첨가된 BCP plate count agar 배지(peptone 5.0 g, yeast extract 2.5 g, dextrose 1.0 g, tween 80 1.0 g, L-cysteine 0.1 g, bromocresol purple 0.05 g, agar 15.0 g)에 100 µL씩 도말하였다. 이 때, skim milk는 20% 농도의 용액으로 제조하여 105°C에서 20분간 멸균하고, 121°C에서 15분간 멸균한 BCP plate count agar에 최종 농도 2%(v/v)가 되도록 첨가하여 제조하였다. 도말한 agar 배지를 37°C에서 48시간 배양한 후 모양, 색, 크기 등을 이용하여 유산균으로 판단되고 clear-zone을 형성하는 균주를 1차 선별하였다.

Protease 활성 측정

Protease 활성 측정은 Vazquez Peyronel과 Cantera(19)의 방법을 수정하여 측정하였다. 분리된 유산균주를 MRS 액체 배지에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하여 그 상등액을 조효소로 사용하였다. 0.1 M 인산완충용액(pH 7.0)에 용해한 2%(w/v) azo-casein을 기질로 사용하였고, 기질용액 500 µL에 조효소액 50 µL를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켰다. 여기에 12%(w/v) trichloroacetic acid 1 mL을 가하여 잔존활성을 실험시키고, 4°C에서 30분간 침전시킨 후 16,100×g에서 10분간 원심분리한 다음 상등액 500 µL에 동량의 0.5 M NaOH 용액을 가하여 440 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소 활성 1 unit은 주어진 조건에서 분당 440 nm에서의 흡광도를 0.001 증가시키는 양으로 정하였다.

두유 발효액의 pH, 적정산도 측정

두유를 121°C에서 15분간 멸균한 후 분리 유산균을 접종하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 증류수 10 mL에 배양액을 9 mL 취

Table 1. Biochemical characteristics of *Lactobacillus paracasei* MK1

Nutrients	<i>L. paracasei</i> MK1	Nutrients	<i>L. paracasei</i> MK1
Glycerol	-	Salicin	-
Erythritol	-	D-Cellobiose	-
D-Arabinose	-	D-Maltose	-
L-Arabinose	- ¹⁾	D-Lactose (bovine origin)	-
D-Ribose	+ ¹⁾	D-Melibiose	-
D-Xylose	-	D-Saccharose (sucrose)	+
L-Xylose	-	D-Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inulin	+
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	D-Melezitose	+
D-Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon (starch)	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	-
L-Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
D-Mannitol	+	D-Fucose	-
D-Sorbitol	-	L-Fucose	-
Methyl-α-D-mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Methyl-α-D-glucopyranoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Potassium gluconate	-
Amygdalin	+	Potassium 2-ketogluconate	-
Arbutin	+	Potassium 5-ketogluconate	-
Esculin ferric citrate	+		

¹⁾+: Produced acid from carbohydrates, -: Not produced acid from carbohydrates

하여 희석한 후, 0.1% phenolphthalein 용액 500 μ L를 첨가하고, 30초 동안 미홍색이 없어지지 않을 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 그 소비량을 % 적정 산도로 나타내었다. 산도는 유산(0.1 N NaOH 1 mL=유산 0.009 g)으로 표시하여 계산하였고, 동시에 pH를 함께 측정하였다.

SDS-PAGE를 이용한 단백질 분해능 확인

각 유산균주를 상기 방법으로 멸균한 두유에 37°C에서 48시간 배양한 후 균배양액을 16,100 $\times$ g에서 5분간 원심분리한 다음 그 상등액을 취하여 Laemmli(20)의 방법에 따라 SDS-PAGE를 실시하였다.

16S rRNA 유전자 염기서열 분석

분리 균주의 16S rRNA 유전자의 염기서열을 이용한 동정을 위하여 AccuPrepR Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 분리하였고, 27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3'), 1492R (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3') primer(21)를 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. PCR은 Accu-PrepR PreMix (Bioneer)를 사용하여 My Cyclor (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA)로 반응시켰으며, PCR 조건은 94°C에서 2분, 1 cycle; 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분, 35 cycle; 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer를 이용하여 수행하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열의 homology 분석은 BLASTn online program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하여 표준균주들의 염기서열을 Gen-

Bank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)로부터 추출하여 분리 균주의 염기서열과 비교하였다. 16S rRNA 유전자 염기서열은 Bioedit program (Tom Hall Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA)을 이용하였고, 염기서열의 상동성은 Clustal X (<http://www.clustal.org/clustal2>)와 Mega 5 program (Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)에 의해 phylogenetic tree를 작성하였다.

생화학적 및 생리학적 특성 분석

균주의 생리학적 특성은 Gram 염색, 3% KOH 실험, 운동성, catalase 실험, 포자염색, 당 분해로 인한 가스 생성 유무를 확인하였고, API CHL 50 kit (BioMerieux Ltd., France)를 사용하여 탄수화물 이용성에 대한 생화학적 특성을 분석하였다.

주사전자현미경

균주의 형태학적 특성은 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하였고, 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM, Seoul, Korea)에서 수행하였다. 유산균주의 균체를 회수하여 고정액(2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.05 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2)으로 2시간 고정하여 0.05 M sodium cacodylate buffer로 10분간 3번 세척하였다. 후고정액(1% osmium tetroxide in sodium cacodylate buffer, pH 7.2)으로 2시간 후고정을 실시하고, 다시 증류수로 세척한 뒤, 0.5% uranyl acetate로 en bloc staining을 30분간 수행하였다. Ethanol의 농도를 30, 50, 70, 80, 90%로 하여 각각 10분간 탈수시킨 후, 100% ethanol로 10분씩 3번 최종 탈수를 진행하였으며, 100% hexamethyldisilazane으로 15분간 2번 건조하여 주사현미경(JSM-

Fig. 1. Phylogenetic tree of *Lactobacillus paracasei* MK1.

Fig. 2. Scanning electron microscope image of *Lactobacillus paracasei* MK1 ($\times 30,000$).

5410LV, JEOL, Tokyo, Japan)으로 세포를 관찰하였다.

두유 발효를 위한 배지 및 배양조건의 최적화

두유를 121에서 15분간 멸균하여 이를 기본배지로 사용하였고, 균체 배양액을 두유에 2%(v/v) 접종하였으며, 여러 배양조건으로 최적 생육조건과 단백질 분해능을 확인하였다. 배양조건 중 배양 온도는 25, 30, 37, 및 40°C의 조건으로, 두유 희석에 따른 효과는 두유를 증류수에 희석하여 두유의 농도가 25, 50, 75, 100%(v/v) 되도록 희석한 조건에서, 초기 pH의 설정은 pH 6.0, 7.0, 및 8.0에서 측정하였으며, 탄소원 첨가에 따른 활성은 glucose, lactose, sucrose를 각각 2%(v/v) 첨가한 조건에서 최적 생육조건을 결정하였다. 각 조건의 최적화 연구에서는 생균수, pH, 적정산도 및 SDS-PAGE를 실시하였다.

결과 및 고찰

Protease 생산 균주의 탐색

발효식품으로부터 protease를 생산하는 유산균을 분리하기 위하여 김치와 각종 젓갈류에서 총 108주의 유산균을 분리하였다. 이 균주들을 2%(w/v) skim milk가 첨가된 고체 배지에서 생육시킨 결과 29주의 유산균이 colony 주변에 일정 수준 이상의 clear zone을 나타내었으며, clear zone을 생성한 29주의 균주들을 두유에 접종하여 발효시킨 후 발효액의 protease 활성을 측정한 결과 묵은지에서 분리한 MK1 균주의 protease 활성이 126 mU/mL·min로 가장 높은 활성을 나타내었다. MK1 균주 발효액의 pH는 4.10으로 29 균주의 발효액 중에서 가장 낮은 pH를 보였고, 적정산도는 0.28%로 다른 균주들보다 높은 산도를 나타내었으며, SDS-PAGE를 이용하여 peptide 생성 정도를 확인한 결과 MK1의 균주발효액이 다른 균주의 발효액에 비해 저분자 peptide 생성이 우수한 것으로 나타났다(data not shown). 이상의 결과로부터 두유 단백질을 가수분해하여 peptide를 생성시키기 위한 균주로서 MK1을 선정하였다.

Bifidobacteria를 이용하여 두유를 발효하는 동안 일어나는 성분변화를 연구한 Hou 등(22)은 *Bifidobacterium longum* B6로 발효한 두유의 적정산도는 0.17%에서 0.36%로 증가하여 본 연구결과와 유사한 결과를 보였다. 두유에 유산균을 접종하여 대두 요구르트를 제조한 Lee(23)의 연구에서는 *Lactobacillus* sp. F144-214는 발효 24시간 후 pH가 6.03, 산도는 0.30%로 확인되었으며,

Fig. 3. Effect of culture temperature on titratable acidity, pH, and viable cell number according to fermentation time.

Leuconostoc sp. F143-652가 pH 4.95, 산도는 0.44%로 보고한 바 있다.

최종선발균주의 계통학적 분류 및 생화학적, 형태학적 특성

본 연구에서 최종 선정한 protease 생산 균주인 MK1의 형태학적 및 생리학적 특성을 분석한 결과, MK1은 포자를 형성하지 않는 Gram 양성세균으로, 운동성은 없으며 catalase 활성과 gas 생성능은 없는 것으로 확인되었다. MK1의 탄수화물 이용성을 API CHL50 kit로 분석한 결과 Table 1에 나타난 바와 같이, 다양한 당류를 이용하는 것을 확인할 수 있었으며, API의 database 상의 균주와 비교하였을 때 *Lactobacillus paracasei*의 생화학적 자료와 98.5% 일치하는 것으로 나타났다. 또한 MK1 균주의 16S rRNA 유전자를 증폭하여 분리하여 그 염기서열을 결정한 다음 phylogenetic tree를 작성하여 계통적으로 분석한 결과 *Latobacillus paracasei* JCM813과 가장 높은 유사성을 나타내었다(Fig. 1). 이상의 형태학적, 생리학적 및 분자유전학적 분석을 통해 본 균주를 *Lactobacillus paracasei* MK1으로 동정 명명하였다. 한편 *L. paracasei* MK1의 세포를 주사전자현미경을 이용하여 관찰한 결

Fig. 4. SDS-PAGE of soymilk fermented with *Lactobacillus paracasei* MK1. A. Lane M. Marker; 1. 25°C, 0 h; 2. 25°C, 16 h; 3. 25°C, 24 h; 4. 30°C, 0 time; 5. 30°C, 16 h; 6. 30°C, 24 h B. Lane M. Marker; 1. 37°C, 0 h; 2. 37°C, 16 h; 3. 37°C, 24 h; 4. 40°C, 0 h; 5. 40°C, 16 h; 6. 40°C, 24 h

과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 간균으로서 균체의 크기는 약 $0.5\ \mu\text{m} \times (1-1.5)\ \mu\text{m}$ 로 측정되었다.

최적 발효 온도

최종선택발균주인 *L. paracasei* MK1의 두유에서의 최적생장조건을 설정하기 위하여 발효 온도, 배지로 사용되는 두유의 희석배수, 초기 pH 및 탄소원의 종류에 따른 생균수를 조사하였다. 발효 온도에 따른 생균수와 발효능을 조사한 결과 Fig. 3에 나타낸 바와 같이 24시간 발효 시 25°C를 제외한 30, 37, 40°C에서 산도가 0.98%였고, pH의 경우에도 25°C에서는 pH 5.64였지만 30, 37, 40°C에서는 모두 pH 4.56으로 동일한 값을 나타내었다. 생균수는 24시간 발효 시, 25°C와 30°C에서는 8.98 log CFU/mL, 37°C에서는 8.74 log CFU/mL, 40°C에서는 8.37 log CFU/mL로 온도에 따른 차이를 나타내지는 않았다. 발효 온도에 따른 단백질 분해 정도를 확인하기 위하여 두유 발효액에 대한 SDS-PAGE를 수행하여 Fig. 4에 나타내었다. 24시간 발효하였을 경우 25, 37, 40°C에서는 20 kDa 근처에서 주 밴드가 나타난 것에 비해 30°C에서 발효한 두유는 15 kDa 이하에서 주 밴드가 나타난 것을 확인할 수 있어 30°C에서 발효하였을 때 두유 중에 존재하는 단백질이 가장 많이 분해됨을 알 수 있었다.

한편 발효과정 중에 *L. paracasei* MK1가 유산을 생성함으로써 배양 12시간 이후부터 커드(curd)가 형성되었으며 발효시간이 경과함에 따라 커드의 정도가 증가하는 것이 관찰되었다(data not shown). 이상의 결과로부터 두유 단백질을 가장 효과적으로 분해할 수 있는 최적 발효온도는 30°C로 확인하였다.

최적 두유 희석배수

두유 원액의 희석배수에 따른 *L. paracasei* MK1의 발효능을

Fig. 5. Effect of dilution ratio on titratable acidity, pH, and viable cell number in fermentation time.

조사하기 위하여 두유를 증류수로 희석하여 최종 두유 농도를 25, 50, 75, 및 100%(v/v)로 조정하여 다음 *L. paracasei* MK1으로 발효를 진행하였을 때의 적정 산도, pH, 및 생균수를 측정하여 이를 Fig. 5에 나타내었다. 100% 두유에서 적정 산도는 발효 18 시간에서 0.90%의 높은 산도를 나타냈으며, 나머지 75% 이하의 시료들은 24시간 이후에도 적정산도가 계속적으로 증가하는 것으로 관찰되었다. 적정 산도와는 달리 실험구간의 차이가 크지 않았던 pH와 생균수는 각각 24시간 발효 후 최종 pH는 약 4.6, 생균수는 8.86(100% 두유)-9.12(75% 두유) log CFU/mL로 측정되어 두유의 희석에 크게 영향을 미치지 않는 것을 확인할 수 있었다. 25%를 제외하고 50, 75 및 100%의 두유에서 큰 차이가 없었으므로 50%로 희석한 두유를 발효에 사용하였다.

최적 초기 pH

두유의 초기 pH가 *L. paracasei* MK1의 두유 발효에 끼치는 영향을 관찰하기 위하여 50% 두유의 pH를 pH 6.0, 7.0, 8.0으로 조정하여 발효하였다. Fig. 6과 같이 pH 6.0으로 조정된 시료는 접종 후 6시간부터 적정산도가 증가하였으며, 30시간에서 0.57%로

Fig. 6. Effect of initial pH on titratable acidity, pH, and viable cell number in fermentation time.

다른 pH에 비해 가장 높은 산도를 보였다. 산도와는 달리 pH의 경우 초기 pH를 6.0으로 조정한 두유는 30시간 발효 시 pH 4.30으로 측정되었고, 나머지 pH 7.0과 8.0으로 조정한 두유의 pH는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 생균수의 경우 pH 6.0으로 조정한 두유는 24시간 발효 시 9.41 log CFU/mL로 최고 생균수를 나타냈고, 30시간에 진입하자 8.99 log CFU/mL로 생균수가 감소하였다. pH 7.0, 8.0으로 조정한 두유의 경우 30시간 발효시 각각 9.21, 9.23 log CFU/mL로 측정되었다. 물리적 성상을 관찰한 결과, pH 7.0 및 pH 8.0은 18시간 이후부터 커드가 형성되는 반면, 초기 pH 6.0으로 조정한 두유는 12시간부터 커드가 미약하게 형성되었다(data not shown). 커드의 생성은 유산균에 의한 유산의 생성 때문인 것으로 판단되며, protease 효소활성이 증가함에 따라 커드가 형성됨을 확인할 수 있었다. 대두 요구르트를 생성하는 유산균의 동정과 특성을 연구한 Yoon(24)은 유산균으로 발효하는 대두 요구르트의 pH 감소가 일정 수준에 도달하게 되면 정제기가 되어 더 이상 pH나 산도가 증가하지 않았다고 보고하였는데, 이는 본 연구결과와 유사함을 확인할 수 있었다.

Fig. 7. Effect of carbon sources on titratable acidity, pH, and viable cell number in fermentation time.

최적 탄소원

Glucose, lactose, sucrose를 두유에 각각 2%(w/v)씩 첨가하여 균주를 접종한 뒤 적정산도와 pH, 및 균주의 생육도를 관찰하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 glucose를 첨가한 두유는 접종 후 12시간부터 0.19%에서 발효 24시간에는 0.76%로 산도가 급격히 증가하였다. Sucrose를 첨가한 두유는 발효 30시간째에 0.63%, lactose를 첨가한 두유는 0.42%로 glucose를 첨가한 두유보다 낮은 산도가 측정되었다. pH 결과도 마찬가지로 glucose를 첨가한 두유가 나머지 두 실험구보다 pH가 낮아 30시간의 pH는 glucose는 pH 4.04, lactose는 pH 4.55, sucrose는 pH 4.16으로 glucose의 pH가 가장 낮음을 확인할 수 있었다. 생균수 결과의 경우 발효 30시간에 오히려 sucrose가 9.40 log CFU/mL로 가장 높은 값을 보였고, lactose, glucose는 각각 9.27, 9.17 log CFU/mL로 나타났다. 이는 glucose를 탄소원으로 이용하는 것이 lactose나 sucrose보다 유산균의 탄소원 이용성이 좋은 것으로 판단된다.

이상의 결과로부터 *Lactobacillus paracasei* MK1을 이용하여 두유를 발효하였을 경우 최적 발효조건은 2%(w/v)의 glucose를 첨

가하고, pH 6.0으로 조정한 50% 두유를 이용하여 30°C에서 30 시간 발효하는 것으로 확립하였다.

요 약

본 연구에서는 김치나 젓갈 등 각종 발효식품으로부터 단백질 가수분해 활성이 있는 총 108주의 분리된 유산균 중 일정 수준 이상의 protease 활성을 지니는 29주를 선정하였다. 그 중 두유 단백질 분해능이 가장 높은 균주 MK1을 본 연구의 발효균주로 최종 선정하였고, 생리학적 특성 및 16S rRNA 유전자 염기서열 등과 같은 분자유전학적 분석을 통해 *Lactobacillus paracasei* MK1로 동정 및 명명하였다. *L. paracasei* MK1을 이용하여 두유의 최적 발효산물을 제조하기 위하여 pH, 적정 산도, 생균수 및 단백질 분해 양상에 따른 최적화 연구를 실시하였다. *L. paracasei* MK1의 종배양액을 멸균한 두유에 2%(v/v) 접종하여 발효시켰을 경우, 발효의 최적온도는 30°C이었으며, 이 때의 적정산도와 pH는 발효 초기 0.15%와 pH 7.31에서 24시간 발효 후 0.98%과 pH 4.56으로 변화하였다. 생균수는 초기 6.94 log CFU/mL에서 발효 후 9.03 log CFU/mL로 증가하였다. 두유의 최적 희석배수는 50%로서 적정산도는 배양 24시간 후 0.08%에서 0.45%로 증가하였다. 최적 초기 pH는 6.0이었으며 탄소원으로 2%(w/v) glucose를 50%로 희석한 두유에 첨가하고, 30°C에서 두유 발효를 실시하였을 때 가장 적합한 발효 경향을 나타내었다.

References

1. Jang SY, Sin KA, Park NY, Kim DH, Kim MJ, Kim JH, Jeong YJ. Changes of quality characteristics of low-molecular soymilk according to hydrolysis time. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 1287-1293 (2008)
2. Lee EK, Hwang IK. Study on the physicochemical, nutritional and sensory characteristics of the calcium-fortified soy-milk (tofu-milk). Korea Soybean Digest 11: 23-31 (1994)
3. Shon DH. Nutritional and bioactive components of soymilk and cow's milk (a review). Korea Soybean Digest 14: 66-76 (1997)
4. Shin HC, Seong HS, Sohn HS. The industrial development and health benefits of the soymilk. Korea Soybean Digest 21: 15-27 (2004)
5. Anderson RL, Wolf WJ. Compositional changes in trypsin inhibitors, phytic acid, saponins and isoflavones related to soybean processing. J. Nutr. 125: 581S-588S (1995)
6. Kim WJ. Soybean, Health and Utilization. Hyoil Books Publishing, Seoul, Korea. pp. 35-37 (2006)
7. Park KH. Variation of isoflavone and saponin contents in Korean soybean cultivars. MS thesis, Chungbuk University, Cheongju, Korea (2011)
8. Choi SY. Roles of soy peptide on the Korea traditional fermented foods. Food Ind. Nutr. 11: 19-26 (2006)
9. Lee BY. Physiological activities and application of soy peptide. Food Ind. Nutr. 11: 1-12 (2006)
10. Gill I, Lopez Fandino R, Jorba X, Vulfson EN. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. Enzyme Microb. Technol. 18: 162-183 (1996)
11. Meisel H. Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. Livest. Prod. Sci. 50: 125-138 (1997)
12. Park JH, Park MN, Lee IS, Kim YK, Kim WS, Lee YS. Effects of soy protein, its hydrolysate and peptide fraction on lipid metabolism and appetite-related hormones in rats. Korea J. Nutr. 43: 342-350 (2010)
13. Aoyama T, Fukui K, Takamatsu K, Hashimoto Y, Yamamoto T. Soy protein isolate and its hydrolysate reduce body fat of dietary obese rats and genetically obese mice (Yellow KK). Basic Nutr. Investig. 16: 349-354 (2000)
14. Shin ZI, Yu R, Park SA, Chun DK, Ahn CW, Nam HS, Kim KS, Lee HJ. His-His-Leu, an angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide derived from Korean soybean paste, exerts antihypertensive activity *in vivo*. J. Agr. Food Chem. 49: 3004-3009 (2001)
15. Gibbs BF, Zougman A, Masse R, Mulligan C. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food Res. Int. 37: 123-131 (2004)
16. Kim JI. Health benefits of soybean-prevention of chronic degenerative disease. Korea Soybean Digest 28: 37-42 (2011)
17. Ammor MS, Mayo B. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Sci. 76: 138-146 (2007)
18. Kim RU. Identification and characterization of soy yogurt-forming lactic acid bacteria. MS thesis, Pusan University, Busan, Korea (2010)
19. Vazquez Peyronel D, Cantera AM. A simple and rapid technique for postelectrophoretic detection of proteases using azocasein. Electrophoresis 16: 1894-1897 (1995)
20. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
21. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. pp. 115-175. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt E, Goodfellow M. Wiley, New York, USA (1991)
22. Hou JW, Yu RC, Chou CC. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. Food Res. Int. 33: 393-397 (2000)
23. Lee WK. Development of lactic acid bacteria for functional soy yogurt. MS thesis, Mokpo National University, Muan, Korea (2009)
24. Yoon MY. Evaluation of lactic acid bacteria as starter cultures for fermented soymilk. PhD thesis, Korea University, Seoul, Korea (2008)