혼합발효를 통한 γ -aminobutyric acid와 펩타이드가 강화된 호상 요구르트 제조

임종순¹ · 이삼빈^{1,2*}

¹계명대학교 식품가공학과, ²계명대학교 TMR센터

Production of Set-type Yogurt Fortified with Peptides and γ -aminobutyric acid by Mixed Fermentation Using *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*

Jong-Soon Lim¹ and Sam-Pin Lee^{1,2*}

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University

²The Center for Traditional Microorganism Resource, Keimyung University

Abstract Mixed fermentation of cow milk was performed by sequential co-cultures with *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*. After a first fermentation step with *B. subtilis* for 6 h, the number of viable cells increased to 2.5×10^8 CFU/mL. The second fermentation step with *L. lactis* resulted in increased viable cells 1.09×10^{10} CFU/mL for 3 days and increased acidity. However, the number of viable *B. subtilis* cells was decreased greatly to 5×10^1 CFU/mL following fermentation with *L. lactis*. Milk proteins were markedly hydrolyzed by the first fermentation after 2 h, and the second fermentation induced curd formation in milk. However, after 4 h, the first fermentation resulted in higher whey separation and 80 mg% tyrosine content. Gamma-aminobutyric acid (GABA) production was dependent upon the degree of protein hydrolysis by first fermentation. Second fermentation resulted in 0.14% GABA. The milk fermented by *B. subtilis* indicated the rough surface of yogurt depended upon the degree of protein hydrolysis. In conclusion, set-type yogurt was efficiently produced by co-culturing of milk, and fortifying with peptides, GABA, and probiotics.

Keywords: set-type yogurt, peptide, γ -aminobutyric acid, *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*

서 론

발효유는 우유, 산양유, 마유 등을 젖산균 스타터를 이용하여 발효시킨 제품을 말하며, 양질의 영양성분과 풍미, 조직감, 다양한 생리활성 성분을 갖는 발효식품이다(1,2). 특히, 발효유에 존재하는 젖산균은 인체에 유익한 probiotic균으로서 유해균의 증식을 억제하는 효과를 통해서 정장작용, 노화방지와 면역증강 등의 다양한 기능성을 제공하는 것으로 알려져 있다(3,4).

우유 발효식품인 요구르트는 우유 단백질로 구성된 gel network로 구성되며, 요구르트의 조직감은 요구르트 제조에서 가장 중요한 품질요소이다. 특히 요구르트 gel 형성을 위해서는 우유의 주된 단백질인 카제인과 유청단백질의 효과적인 변성을 통한 단백질 분자간 결합에 의해서 수분이 최대한 포집되는 것이 필요하다(5). 일반적으로 요구르트는 젖산균 스타터의 혐기적 조건에서 유당 대사를 통한 젖산의 생성에 의해서 단백질 커드가 형성되어 액상과 호상의 형태로 제조된다. 또한 발효유의 고형분 증진, 물성 및 기능성 강화에 도움이 되는 부재료 성분을 첨가하여 다양한 요구르트 제조에 관한 연구들이 진행되어왔다(6,7). 일반적

으로 상업적인 요구르트 생산에서 단일 젖산균 스타터 보다는 혼합 젖산균 스타터를 이용하여 효과적으로 산 생성과 젖산균의 생육을 촉진시킴으로서 단기간에 요구르트 제품을 생산하는 것이 알려져 있다(8).

특히, 우유 단백질로부터 유래된 펩타이드는 다양한 생리활성을 갖는 것으로 보고되었으며(9), 우유 단백질은 가공과정 또는 장내소화 과정에서 생리활성을 갖는 펩타이드로 전환되는 것이 보고되고 있다(10). 특히 우유 발효식품에서 주로 관여하는 젖산균으로부터 유래된 단백질 가수분해 효소에 의해서 다양한 생리활성 펩타이드 생성에 관한 연구들이 보고되었으며(11), 젖산균에 의한 카제인과 유청 단백질의 분해는 면역증진, 항균, 항산화 및 항고혈압 생리활성 펩타이드를 생산하는 중요한 수단이 되고 있다(9). 한편 젖산균 유래의 단백질 분해효소는 고초균 등과 비교할 때 효소활성이 약하여, 효과적인 펩타이드 생산을 위해서는 젖산균 이외의 고초균 및 곰팡이 등의 발효 미생물의 작용이 요구된다.

발효 미생물 중 콩 발효식품에 주로 관여하는 고초균은 발효과정 중에 단백질 가수분해 효소의 생산에 크게 기여하며, 동시에 기능성 펩타이드, 고분자 점질물 등의 다양한 생리활성물질을 생산하는 것이 보고되었다(12). 콩 우유를 이용한 젖산균과 고초균 혼합발효에 의한 요구르트 제조에 관한 보고가 있지만(13), 우유만을 이용한 고초균 발효에 관한 연구는 전무한 실정이다. 일반적으로 고초균은 단백질을 분해시켜 고유한 풍미를 생산하는 관계로 불쾌취의 원인이 되고 있으나, 발효 원료, 발효시간 등에 따라서 풍미가 개선되는 보고가 있다(14). 특히 고초균은 단백질

*Corresponding author: Sam-Pin Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Tel: 82-53-580-5554
Fax: 82-53-580-6447
E-mail: splee@kmu.ac.kr
Received October 21, 2013; revised December 20, 2013;
accepted December 31, 2013

가수분해 효소를 비롯한 다양한 가수분해 효소를 생산하는 우수한 발효 미생물로서 우유 단백질의 가수분해에 활용함으로써 효과적으로 우유 단백질유래 펩타이드 생산이 가능하다고 사료된다. 최근까지 우유의 젖산균 발효에 의한 요구르트 생산 과정에서 우유 단백질 가수분해물의 생산을 촉진하기 위해서 고초균의 활용에 관한 연구보고는 전무한 실정이다.

Gamma-aminobutyric acid (GABA)는 포유동물의 뇌나 척수에 존재하여 신경 전달 물질로서 작용하는 비단백질 아미노산의 일종으로 자연계에 널리 분포하고 있다. 사람에게 있어서 혈압 강하 작용과 알코올 대사를 증진시키며(15) 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소 공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 촉진시키는 등 다양한 생리활성을 가지고 있다(16). 미생물에 의한 GABA 생산은 젖산균을 이용한 생산 최적화에 대한 많은 연구들이 수행되어 왔으며(17), 최근 젖갈과 발효유로부터 분리된 젖산균을 이용한 GABA 생산의 최적화에 관한 다양한 연구가 보고되고 있다(18,19).

콩과 우유를 이용한 발효식품에 관여하는 대표적인 발효 미생물로서 고초균과 젖산균은 오래전부터 식용으로 안전하다는 generally recognized as safe (GRAS)로서 알려져 왔으며, 각각의 식물성 및 동물성 원료의 생물전환을 통해서 청국장 및 요구르트 발효제품의 품질향상과 보존성을 부여하며, 양질의 영양성분, 풍미생성 및 생리활성물질을 강화하는데 이용되고 있다(20). 지금까지 발효유 생산을 위한 발효법은 고유한 젖산균 또는 젖산균과 효모를 스타터로 이용하는 것으로, 고초균을 이용하거나 또는 복합균주를 이용한 요구르트 제조에 대한 연구보고는 없는 실정이다.

본 연구에서는 우유에 고초균을 이용한 단기간 발효를 통해 우유 단백질의 가수분해를 촉진시키며, 동시에 2차 젖산균 발효에 의한 요구르트 커드 생성능과 생리활성물질인 GABA 생성에 대한 평가를 통해서 고초균과 젖산균의 혼합발효를 통한 펩타이드, GABA, probiotic을 함유한 기능성 발효 유제품을 제조하는 기초 자료로 제공하고자 한다.

재료 및 방법

재료

발효유 제조의 원료 우유는 매일유업(Maeil Dairies Co., Seoul, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. GABA standard는 Sigma사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, TLC plate는 MERCK사(Merck KGaA, Darmstadt, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. SDS-PAGE marker 단백질은 Thermo사(Waltham, MA, USA)로부터 구입하였으며, Folin reagent는 Junsei Chemical사(Tokyo, Japan)로부터 구입하여 사용하였다. Gel 염색용 Instant blue 용액(Coomassie dye)은 Expedeon (Cambridge, UK)로부터 구입하였다.

균주 및 스타터 배양액 제조

사용 균주로는 재래식 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* HA (KCCM 10775P)를 이용하여 1차 고초균 발효를 수행하였고, 물김치에서 분리한 GABA 생산 균주인 *Lactococcus lactis* YC (KCCM 11297P)를 이용하여 2차 젖산발효를 수행하였다.

1차 발효를 위한 스타터로 사용된 *B. subtilis* HA (KCCM 10775P)균은 탈지대두분말을 이용하여 제조한 5% soy milk 배지를 121°C에서 15분간 멸균한 액체배지 50 mL에 MRS agar plate에서 배양(42°C, 24 h)한 *B. subtilis* HA를 1회 접종한 뒤 진탕배

양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Deajeon, Korea)에서 42°C에서 24시간 동안 배양하여 사용하였다. 2차 젖산발효를 위해 스타터로 사용된 젖산균은 MRS agar plate에서 30°C, 24시간 배양한 *L. lactis* YC를 MRS broth 10 mL에 접종한 뒤 30°C 진탕배양기에서 24시간 동안 배양하고 원심분리기(SUPRA21K, Hanil, Incheon, Korea)를 이용하여 8,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 균체를 분리하였다. 이를 살균 우유 10 mL에 현탁하여 24시간 배양한 후 젖산균 스타터로 사용하였다.

커드 요구르트의 제조

우유에 *B. subtilis* HA를 1%(v/v) 접종하여 42°C 진탕 배양기에서 6시간 동안 1차 발효한 후, 1시간마다 발효된 우유 시료 50 mL을 채취하여 우유에서 24시간 배양하여 활성화된 *L. lactis* YC 스타터 균체를 발효 원료의 10%(v/v) 수준으로 접종하여 30°C 항온 배양기에서 3일 동안 2차 젖산발효하였다.

pH 및 적정 산도

pH는 pH meter (420A+, Thermo Orion, Waltham, MA, USA)를 이용한 발효유 1 mL에 증류수 9 mL을 혼합한 후 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 mL에 증류수 9 mL을 첨가하여 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정한 소비량을 lactic acid 함량(% , v/v)으로 환산하였다.

생균수 측정

생균수는 발효유 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배로 단계별 희석하여 MRS broth agar 배지에 20 μ L 도말한 후, *B. subtilis* HA는 42°C 항온배양기에서 24시간 배양 후 colony forming unit (CFU)/mL으로 나타내었다. 2차 발효 후 *B. subtilis* HA의 생균수는 42°C 항온배양기에서 배양하여 측정하였으며, *L. lactis* YC는 30°C 항온배양기에서 24시간 배양함으로써 고온에서 생육하는 *Bacillus* sp.의 생육을 억제하여 젖산균의 생균수를 측정하였다.

발효유 커드 생성과 유형분리

발효유 커드의 생성 정도는 배양이 끝난 직후 육안으로 관찰하여 커드의 흐름정도를 4단계로 나타내었으며(-, +, ++, +++), 유형의 분리 정도는 발효액(55 mL)을 30 mesh 체에 걸러 2시간 동안 흘러내린 액체(whey)의 부피 및 체에 남아있는 커드의 양을 측정하였다(21).

Tyrosine 함량 측정

발효물의 peptide 생성 정도를 측정하기 위하여 Folin phenol 시약을 이용하여 발효유 중에 존재하는 tyrosine 함량을 측정하였다(22). Tyrosine 함량의 비교를 위한 standard로 50, 100, 150, 200, 250 μ g/mL의 tyrosine 용액을 사용하였다. 발효유는 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 얻어진 상등액을 증류수로 희석한 후 0.7 mL를 취하여 0.44 M TCA 용액 0.7 mL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 15,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 2.5 mL과 Folin phenol 시약 (원액을 3배로 희석한 액) 0.5 mL을 차례로 넣고 혼합한 후 37°C 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 spectrophotometer (UVIKON 922, Kontron Instruments, Milan, Italy)로 660 nm에서 측정하였다.

SDS-PAGE 분석

발효유의 단백질 가수분해 패턴을 알아보기 위하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 전기영동을 수행하였다. 발효유를 SDS-sample buffer (10 mM 2-mercaptoethanol, 30 mM Tris HCl, pH 8.0)에 혼합하여 6시간 동안 용해시킨 후 원심분리(15,000 rpm)하여 상등액과 sample buffer를 혼합하여 100°C에서 5분간 열처리한 후 전기영동(Hoefer Scientific Instruments, CA, USA)을 실시하였다(23). SDS-PAGE gel 염색은 Instant blue 용액(Expedeon, Harston, Cambridgeshire, UK)을 사용하였으며 표준 단백질은 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 100, 130, 170 kDa으로 조합되어 있는 protein marker를 사용하였다.

GABA 함량 측정

TLC 전개는 사각 유리 chamber (30×25×10 cm)에서 수행하고, silica gel TLC plate는 10×20 cm의 크기로 잘라서 사용하였다. GABA 생성능 비교를 위한 standard로 0.1, 0.25 µg/mL GABA 용액을 사용하였다. 전개용매는 n-butyl alcohol:acetic acid: distilled water를 3:1:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 25°C에서 4시간 이상 포화시켰다. 발효유 시료는 Centricone (10 kDa cut-off)를 이용하여 3,000 rpm에서 원심분리하여 분자량 10 kDa 이상을 제거한 후 여액을 취하여 TLC plate의 끝에서 20 mm 되는 위치에 2 µL를 점적하였고, sample 간격은 15 mm를 유지하였다. 점적 후 TLC plate의 sample를 건조시킨 후 전개하고, 전개가 끝난 TLC plate는 건조시킨다. 건조된 TLC plate에 발색시약 0.2% ninhydrin을 뿌리고, 100°C dry oven에서 5-10분 동안 발색시킨 후 GABA spot을 확인하였다. 또한 GABA 함량의 정량적 분석을 위해서 image analyzer (CARESTREAM Gel Logic Imaging System, Carestream Health, Inc., Rochester, New York, NY, USA)를 이용하여 TLC에서의 GABA standard와 상대적인 정량평가를 하여 발효물의 GABA 함량을 나타내었다.

Scanning electron microscopy (SEM) 분석

발효유를 동결건조기(Ilsin, Busan, Korea)를 이용하여 동결건조한 뒤 발효유 분말의 표면을 금으로 도금시켜 전도성을 갖게 하여 scanning electron microscopy (S-4300, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 가속전압 15 kV photo times 85초 동안 50배에서 200배로 하여 관찰하였다.

통계처리

실험 결과는 Statistical Package for the Social Science (SPSS, Version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균과 표준오차(mean±SE)를 구하였으며, 각 집단 간 평균치 차이를 검증하기 위하여 one way-ANOVA 및 Duncan's test를 적용하였다. 결과에 대한 검증은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

고초균 발효유의 pH, 생균수, 산도의 변화

우유에 *B. subtilis* HA를 접종하여 42°C에서 6시간 동안 발효시키면서 시간 별로 1차 고초균 발효 후 *L. lactis* YC를 2차 접종하여 3일 동안 젖산발효시킨 발효유의 물성 변화를 관찰하였다. 발효유의 pH 및 생균수 변화를 측정한 결과는 Table 1에서 나타나는 것처럼 1차 고초균 발효의 초기와 6시간 하였을 때 pH는 각각 6.89, 6.87로 고초균 발효가 수행되면서 발효물의 pH값은 거의 변화가 없으면서 중성을 나타내었다. 각각의 1차 고초균

Table 1. Comparison of pH in milk fermented by *B. subtilis* HA and *L. lactis* YC

*Alkaline fermentation (h)	Lactic acid fermentation (days)			
	0	1	2	3
0	6.89±0.16 ^a	5.96±0.1 ^b	5.24±0.05 ^c	5.02±0.06 ^d
1	6.91±0.12 ^a	4.48±0.02 ^{fg}	4.21±0.08 ^j	4.23±0.02 ^j
2	6.95±0.01 ^a	4.44±0.03 ^{gh}	4.24±0.03 ^j	4.24±0.01 ^j
3	6.93±0.08 ^a	4.56±0.07 ^{ef}	4.38±0.05 ^{hi}	4.34±0.04 ⁱ
4	6.90±0.02 ^a	4.60±0.05 ^e	4.47±0.06 ^{gh}	4.43±0.03 ^{ghi}
5	6.90±0.06 ^a	4.60±0.03 ^e	4.43±0.02 ^{gh}	4.41±0.01 ^{ghi}
6	6.87±0.02 ^a	4.63±0.03 ^e	4.48±0.04 ^{fg}	4.42±0.01 ^{ghi}

*Alkaline fermentation: 1st fermentation using *B. subtilis* HA. Each value is the mean±SE (n≥4); means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

발효물을 이용하여 2차 젖산균 발효를 3일 동안 수행하였을 때 pH는 4.23-5.02으로 1차 고초균 발효보다 크게 감소하는 결과를 나타냈다. 특히, 1차 고초균 발효를 수행하지 않은 경우에 비해서 고초균 발효를 수행한 경우에 2차 젖산발효에서 전반적으로 낮은 pH값을 나타내었다. 반면에 1차 고초균 발효없이 2차 젖산균 발효 시에 발효 3일 동안 완만하게 pH가 감소하면서 최종 3일 발효 후에 pH 5.02를 나타내었다(Table 1).

우유 발효물의 생균수 측정 결과, 1차 고초균 발효를 6시간 동안 단기간 수행하면서 발효 시간 증가함에 따라 초기 고초균 생균수 6.0×10^6 CFU/mL에서 발효 4시간 후에 8.7×10^7 CFU/mL로 증가하였으며, 발효 6시간 후에는 1.6×10^9 CFU/mL로 크게 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1). 이는 우유 배지에서 고초균이 생육되면서 일부 산 생성과 생균수 증가를 초래하는 것으로 사료된다. 일반적으로 고초균은 우유에 존재하는 유당을 탄소원으로 이용하지 못하는 것으로 알려졌으며, 이에 따라 우유를 이용한 고초균 발효는 거의 보고된 연구결과가 없는 실정이다. 그러나 우유의 고초균 발효를 위해서 첨가하는 스타터의 배양액이 soy milk 액체배지에서 제조됨으로서 제한적이지만 고초균의 생육을 위한 영양성분에 제공되어 우유의 고초균 발효가 수행된 것으로 판단된다.

2차 젖산균 발효

1차 고초균 발효없이 2차 젖산균 발효를 1일 동안 수행한 후에 제조된 발효유의 젖산균 생균수는 8×10^8 CFU/mL로 가장 낮은 값을 나타내었으며, 젖산발효 3일 후에도 젖산균 생균수가 증가하는 경향을 보였다. 1차 고초균 발효가 3시간 정도 수행된 우유에 2차 젖산균 발효를 2일 동안 수행하면 젖산균 생균수는 4.68×10^9 CFU/mL으로 가장 높은 값을 보였으며, 3일 발효 후에 일부 감소하면서 2.83×10^8 CFU/mL의 생균수를 나타내었다(Fig. 1). 1차 고초균 발효를 1시간 이상 수행한 우유는 2차 젖산균 발효에서 높은 젖산균 생균수를 보이면서, 1일 젖산균 발효 후에 생균수는 1.6×10^9 - 4.15×10^9 CFU/mL을 높은 값을 나타내었다.

1차 고초균 발효를 3시간 이상 수행한 경우에 2차 젖산발효물의 생균수는 발효시간이 증가하면서 약간 감소하는 경향을 보였으며, 1일 발효 후에 3.03×10^9 CFU/mL으로 가장 높았으며 3일 발효한 경우에 5.83×10^8 CFU/mL으로 약간 감소하였다. 또한, 우유 젖산발효 전에 1차 고초균 발효를 4시간 동안 수행하는 경우에 2차 젖산발효에서 발효 1일, 2일 후에 각각 4.15×10^9 , 2.05×10^9 CFU/mL의 생균수를 보였으며, 1차 고초균 발효를 6시간 수행한 경우에 2차 젖산발효를 1일 동안 수행한 경우에 발효물의 젖산

Fig. 1. Comparison of viable cell counts in milk fermented by *B. subtilis* HA and *L. lactis* YC. *Alkaline fermentation: 1st fermentation using *B. subtilis* HA

균 생균수는 1.63×10^8 CFU/mL로 가장 낮은 생균수를 보였으며, 젖산발효기간이 증가함에 따라서 생균수가 증가하여 발효 3일에는 1.09×10^{10} CFU/mL 생균수를 나타내었다. 이는 1차 고초균 발효시에 고초균 생육이 증가하면서 생성된 대사산물의 일부가 2차 젖산균 발효에 생육을 초기에 억제시키지만, 시간이 지나면서 지속적으로 생균수가 증가하는 것으로 사료된다. 특히, 2차 젖산균 발효를 3일 동안 수행하면서 발효물에 존재하는 고초균의 생균수는 급격하게 감소하는 경향을 보였으며, 고초균 발효 3시간 및 6시간을 수행한 발효물의 초기 고초균 생균수는 2.38×10^8 , 1.63×10^9 CFU/mL에서 각각 5×10^4 , 1.0×10^5 로 감소하였다. 이는 2차 젖산균에 의한 생육촉진으로 산 생성 등으로 고초균이 생육이 억제되면서 사멸되는 것으로 판단된다. 결론적으로 우유 원료는 1차 고초균 발효를 단기간에 수행함으로써 2차 젖산균의 생육이 촉진되며, 이는 젖산균 생육에 필요한 영양성분의 강화에 기인한 것으로 판단된다. Hosoi 등(24)은 고초균 발효물의 존재 하에 *L.*의 생육 촉진 및 생균수를 증진시켰으며, 이는 고초균이 분비하는 단백질 분해효소의 작용에 기인하는 것으로 보고하였다.

B. subtilis 균주가 분비하는 bacteriocin은 Gram 양성 세균 *B. cereus*와 *Listeria monocytogenes*의 생육을 억제하는 효과를 보였으며(25), *B. megaterium*종에 의하여 *Leuconostoc mesenteroides*의 생육 억제 효과를 보고하였다(26). 따라서 우유를 이용한 혼합발효시에 1차적으로 고초균 발효시간에 따라 고초균 생육이 증가되면 2차 젖산발효시에 젖산균의 생육에 영향을 미칠 수 있음이 사료된다.

1차 고초균에 의해서 발효된 우유에 2차 젖산균 발효를 3일 동안 수행하는 경우에 젖산균 생균수는 7.45×10^8 – 8.1×10^9 CFU/mL로 확인되었다. 우리나라 식품공전(27)에서 농후 요구르트의 젖산균수는 1×10^8 CFU/mL로 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보였다. 이와 같이 2차 젖산발효 시간에 따른 pH의 감소는 Lee와 Bea(28)의 연구 결과에서 발효시간의 경과에 따른 pH의 감소와 젖산균수의 증가로 본 연구와 같은 경향을 보였으며, 이러한 pH 감소의 원인은 젖산균의 발효를 통해 생성되는 유기산의 영향으로 생각된다.

발효된 발효유의 산도는 1차 고초균 발효에 의해서 약간 증가하였으며, 특히 2차 젖산균에 의한 발효 시간이 길어질수록 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2). 1차 고초균 발효없이 2차 젖산발효

Fig. 2. Comparison of total acidity in milks fermented by *B. subtilis* HA and *L. lactis* YC. HA. Each value is the mean $\pm$ SE ($n \geq 4$); means with the different letters in each column are significantly different ($p < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

를 3일 동안 수행한 경우에 산도는 0.27% 정도로 낮은 값을 나타내었으며, 반면에 1차 고초균 발효를 1시간 수행한 후 2차 젖산균 발효를 통해서 산도가 0.86% 정도로 크게 증가하였다. 특히, 1차 고초균 발효를 6시간 동안 수행한 후 2차 젖산균 발효를 한 경우 2일째 이후에 발효유의 산도가 급격하게 증가하였다. 2차 젖산발효 중 산도의 증가는 1차 고초균 발효의 시간이 증가함에 따라 증가되는데 이는 1차 고초균의 발효유의 생육인자 존재에 따른 젖산균의 생균수의 증가에 기인한 것으로 판단된다. Rasic과 Kurmann(29)은 0.85–1.20%가 요구르트의 적정산도라고 보고하고 있으며 국내에서 시판되고 있는 농후 발효유의 적정산도는 0.82–1.24%라는 보고(30)와 비교하였을 때 1차 고초균 발효 4시간 동안 수행한 후 2차 젖산균 발효를 2일 동안 수행한 발효유가 적당한 산도를 나타내는 것으로 사료된다.

발효유의 커드 형성능

요구르트의 발효과정 중 젖산균에 의한 lactic acid 생성은 요구르트의 풍미에 관여하며, 우유의 산성화에 따라 casein micelle의 불안정화를 통해서 유단백질을 응고시키는 역할을 한다(31). 특히 yogurt 제조에 있어서 유청분리는 제품의 품질을 저하시키며, 이런 현상은 단백질 gel network를 구성하는 단백질 입자들의 과도한 응집을 통해서 유청분리가 유발하는 것으로 보고되었다(5).

1차 고초균에 의해 발효된 우유의 2차 젖산균에 의한 발효 시간에 따른 발효유의 커드 형성능의 결과는 Fig. 3에서 나타내고 있다. 1차 고초균 발효없이 우유의 젖산균 발효에 의한 커드형성은 발효 초기에는 매우 미비하였으나 발효 3일에는 완전한 커드를 형성하였다. 반면에 1차 고초균 발효를 1, 2시간 수행한 후 2차 젖산균 발효를 통해서 발효유의 커드 형성능이 양호하였으며, 특히, 1차 고초균 발효를 1시간 동안 수행한 후 2차 젖산발효를 1일 수행하는 경우에 pH 4.48, 산도 0.7%로 커드 형성이 우수하였으며, 3일 수행하는 경우에 발효유의 pH 4.23, 산도는 0.86% 정도를 나타내면서 발효유의 커드 형성능이 가장 우수하였다(Fig. 3). 또한 1차 고초균 발효를 2시간 동안 수행한 경우에 2차 젖산발효를 1일 수행한 경우에 각각 pH 4.44, 산도 0.75%를 나타냈으며, 발효유의 커드 형성능이 양호하였다. 반면에 1차 고초균 발효를 3시간 이상 수행한 우유를 2차 젖산균 발효를 3일 동안 수행하여도 발효유의 커드 형성은 미비하였다. Fig. 3에서 나타내는 것처럼 1차 고초균 발효를 2시간 동안 수행한 후 2차 젖산균

Fig. 3. Curd formation in milks fermented by *B. subtilis* HA and *L. lactis* YC. *Alkaline fermentation: 1st fermentation using *B. subtilis* HA. Each value is the mean±SE (n≥4); means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

발효를 수행하는 경우에 발효시간이 증가되면서 커드형성이 진행되면서 유청분리가 감소되는 경향을 보였다. 그러나 1차 고초균 발효를 3시간 수행한 후 2차 젖산균 발효를 3일 동안 수행하여도 유청분리가 심하게 나타났다. 이는 우유 단백질의 가수분해 정도가 젖산균에 의한 커드형성에 영향을 크게 미치는 것을 알 수 있었으며, 단백질 가수분해 효소 Neutrase로 처리된 우유로부터 형성된 set yoghurt는 조직감, 풍미가 개선되며, 응고시간이 감소되는 효과가 있다고 보고(32)된 것과 유사한 결과를 나타내었다. 또한, 콩 발효 미생물인 고초균이 설당을 포함한 합성배지에서 배양되었을 때 우유 응고 활성을 나타내는 효소 생산에 대한 보고가 있었다(33). 이는 고초균 발효에 의해서 생성된 단백질 가수분해 효소는 요구르트 제조시에 우유의 부분적인 가수분해에 기여하면서 응유효소로서 역할이 기대된다.

결론적으로 1차 고초균 발효를 2시간 동안 수행한 경우에 2차 젖산균에 의한 발효유의 커드 형성능이 개선되는 것으로 확인되었으며, 3시간 이후부터 발효유의 커드 형성능이 미비하였다. 이는 1차 고초균 발효를 통해서 생산된 알칼리성 단백질분해효소에 의한 주된 우유 단백질인 카제인이 부분적으로 가수분해되어 나타나는 현상으로 사료된다. 이는 우유 단백질의 가수분해 정도에 따라서 젖산균에 의한 산 생성에 의해 응고되어 젤을 형성하는 능력에 차이가 있음을 나타내었다. 식품단백질의 효소적 변성은 젤 형성능 등의 기능성에 영향을 미치며, 단백질의 기능성 개선을 위해서 효소적 가수분해 정도가 매우 중요한 인자임을 보고하였다(34). 탈지대부분의 가수분해에 따른 젤 형성 연구에서 단백질분해효소 alcalase를 60분 정도 처리하였을 때 효소 처리 전 보다 젤 형성능이 개선되었지만, 효소 처리 시간이 증가되면서 젤이 형성되지 않았으며, 단백질 분해 효소의 종류에 따라 차이가 있다고 보고하였다(35).

이는 단백질의 부분적인 가수분해에 의해서 변성 단백질로 전환되면서 단백질의 중요한 기능성인 젤 형성능이 개선된다는 것을 보여주고 있으며, 반면에 과도한 단백질 변성은 젤 형성능을 저하하는 것으로 사료된다. 이는 단백질의 가수분해에 의한 변성 정도에 따라서 단백질 gel 형성능이 차이가 있음을 나타내며, 단백질의 gel 형성을 증진시키기 위해서는 단백질의 가수분해의 최적조건이 필요함을 나타내었다.

Fig. 4. Comparison of tyrosine content in milks fermented by *B. subtilis* HA and *L. lactis* YC. Each value is the mean±SE (n≥4); means with the different letters in each column are significantly different (p<0.05) by Duncan's multiple range test.

발효유의 펩타이드 함량 변화

발효유의 펩타이드 함량을 간접적으로 측정하기 위해서 펩타이드에 함유된 tyrosine 잔기의 함량을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. 고초균 발효가 수행되지 않은 우유의 초기 tyrosine 함량은 3.86 mg% 정도로 매우 낮았으며, 2차 젖산균 발효를 3일 동안 수행한 후에도 발효유의 tyrosine 함량에는 차이가 없었다. 한편 고초균 발효를 6시간 동안 수행한 결과 발효시간에 따라 tyrosine 함량이 증가되었으며, 특히 발효시간 4시간부터 tyrosine 함량이 급격하게 증가하는 경향을 보였다. 이는 고초균 발효에 의해서 생성된 단백질 분해효소에 의한 우유 단백질의 부분적인 가수분해에 의해서 수반되는 것으로 사료된다. 1차 고초균 발효를 2시간 동안 수행한 후 2차 젖산균 발효물의 tyrosine 함량은 8.78 mg% 정도로 증가하였으며, 4시간 이상 수행한 발효유는 tyrosine 함량이 100 mg% 이상으로 더욱 증가하는 경향을 보였다. 1차 고초균 발효 4시간 동안 수행한 경우에 2차 젖산균 발효물은 tyrosine 함량이 80 mg% 이상으로 크게 증가하였으며, 발효 시간이 증가함에 따라 tyrosine 함량도 증가하는 경향을 보였다. 한편, 2차 젖산발효 시간에 따른 tyrosine 함량을 비교해 보았을 때, 시간에 따른 큰 차이가 보이지 않는 것으로 보인다. 이는 1차 고초균 발효에 의해서 이루어진 단백질 가수분해에 비해 2차 젖산발효에서 젖산균은 단백질 가수분해에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 판단된다. 일부 발효유 제품에서 젖산균에 의한 단백질 가수분해 효소작용에 의해서 카제인과 유청 단백질들의 가수분해에 대한 보고가 있으나(36), 2차 젖산발효에 의해 생성된 tyrosine 값의 차이가 없는 것을 근거로 *L. lactis*에 의한 우유의 젖산발효는 유단백질의 가수분해능이 미비한 것으로 판단되었다. 2차 젖산균에 의한 발효유의 tyrosine 함량과 쓴맛의 연관성은 모든 발효 시료에서 유사하였으며, 1차 고초균 발효를 4시간 수행한 후 2차 젖산발효 통해서 생산된 발효유 tyrosine 함량이 90 mg% 이상에서 쓴맛이 나타났다. 따라서 발효유의 1차 발효 시간이 길어질수록 우유 단백질의 가수분해가 이루어지면서 펩타이드가 생성되며 동시에 쓴맛이 증가됨으로서 호상 요구르트의 제조에는 부적합하다고 생각되었다. 그러나 1차 고초균에 의한 tyrosine 함량의 증가는 우유 단백질의 가수분해에 의한 펩타이드 생성을 의미하며, 이를 통해서 최종 발효유에 효과적으로 펩타이드를 강화시킬 수 있다고 사료된다. 또한 발효유의 tyrosine 함량이 일정 수준에 도달하면 쓴맛을 부여함으로 최종 발효유의 tyrosine 함량을 평가함

Fig. 5. SDS-PAGE pattern of milks fermented by *B. subtilis* HA.
*Alkaline fermentation: 1st fermentation using *B. subtilis* HA

으로서 쓴맛의 지표로 삼을 수 있다고 생각한다.

고초균 발효유의 단백질 가수분해

B. subtilis HA를 이용하여 6시간 동안 1차 고초균 발효한 발효유를 시간별로 시료를 취하여 SDS-PAGE를 통한 우유 단백질의 가수분해 정도를 확인하였다(Fig. 5). 고초균에 의한 우유 단백질의 가수분해 정도를 확인한 결과 1시간 발효 후 우유의 주된 단백질인 카제인(분자량 25-35 kDa) 단백질들의 대부분이 가수분해되어 대부분이 10 kDa 이하의 펩타이드로 저분자화되는 것으로 판단된다. 단백질 가수분해 정도를 image analyzer로 분석한 결과 우유 단백질이 고초균에 의한 발효시간이 증가함에 따라 카제인 단백질은 가수분해가 진행되었으며, 36 kDa으로 카제인은 발효의 진행에 따라 95% 이상 가수 분해되었으며, 18 kDa (β -lactoglobulin)은 발효시간이 3시간까지 50%, 6시간까지 90% 이상 가수분해되었다(data not shown) 우유 단백질은 α -chymotrypsin, trypsin 효소에 의해서 가수분해하는 경우에 카제인 단백질이 효과적으로 분해되면서 14 kDa 이하의 저분자 펩타이드로 전환되는 것을 보고하였다(37). 우유 유래의 펩타이드는 효소적 가수분해 또는 발효 미생물로부터 분비되는 단백질 가수분해 효소에 의해서 생성되며, 이들 방법을 복합적으로 사용함으로써 효과적으로 기능성 펩타이드 생성이 가능하다고 판단된다. 결론적으로 우유는 고초균 발효시간 3시간 안에 우유 주된 단백질인 카제인 대부분이 가수분해되면서 펩타이드를 생성하며 동시에 tyrosine 함량이 급격하게 증가하는 경향과 일치하는 결과를 보였다.

우유 발효식품인 치즈의 장기간 숙성 중에 카제인 단백질의 가수분해 정도를 SDS-PAGE로 확인한 연구결과와 비교할 때 치즈의 카제인 단백질이 장기간 숙성과정에서 서서히 분해되는 점에 비해서 고초균 발효시에 카제인 단백질이 매우 단기간에 급격하게 가수분해되는 경향을 보였다(38). 이는 고초균에 의한 생성된 단백질 가수분해 효소는 대표적인 alkaline 단백질 분해 효소이며, 우유의 중성조건에서 효소의 활성이 유지되면서 우유 단백질을 효과적으로 가수분해하는 것으로 판단된다. 따라서 우유의 발효시에 고초균을 효과적으로 이용한다면 기능성 펩타이드가 증진된 기능성 발효식품의 제조가 가능할 것으로 사료된다.

발효유의 GABA 함량

1차 고초균 발효 후 2차 GABA 생산 젖산균을 이용한 젖산발

Fig. 6. TLC analysis of GABA content in milks fermented by *Lac. lactis* YC after pre-fermentation by *B. subtilis* HA. *Alkaline fermentation: 1st fermentation using *B. subtilis* HA

효를 3일 동안 수행한 경우 발효유의 GABA 생성 정도를 TLC를 이용하여 확인해 본 결과는 Fig. 6과 같다. 1차 고초균 발효 없이 우유에 젖산균 발효를 수행한 경우에 GABA 함량은 매우 미비하였다. 반면에 1차 고초균 발효시간이 증가할수록 2차 젖산 발효에서 GABA 생성을 나타내는 GABA spot의 농도가 증가하는 경향을 보였다. 1차 고초균 발효를 3시간 수행한 경우에 젖산균 발효물은 0.7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0.07%) 농도의 GABA를 함유하였으며, 1차 고초균 발효가 6시간 수행한 경우는 2차 젖산발효물의 GABA함량은 1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (0.14%)로 증가하였다. 또한 우유 발효물 커드에 함유된 가수분해물의 평가를 위해서 분자량 10 kDa 이상을 제거시킨 여액을 TLC 분석을 통해서 생성된 아미노산 양상을 Fig. 6에서 확인할 수 있었다. 1차 고초균 발효시간이 증가함에 따라서 GABA보다 분자량이 큰 아미노산 함량이 증가하는 경향을 보였으며, SDS-PAGE로 분석된 저분자 단백질과 펩타이드 생성과 연관이 있음을 확인할 수 있었다. 이는 고초균 발효시간에 따른 우유 발효물의 tyrosine 함량의 증가와 유사한 경향을 보였다. 특히, 1차 고초균 발효가 수행되면서 SDS-PAGE에서 확인할 수 없었던 GABA보다 분자량이 작은 물질이 5시간 발효 후부터 생성되었으며, 특히 2차 젖산균에 의한 젖산발효가 3일 동안 수행되면서 생성량이 크게 증가되는 것으로 나타났다.

따라서 *B. subtilis* HA를 이용하여 우유 원료를 1차 고초균 발효 후, GABA 생산 젖산균을 이용하여 2차 젖산발효를 통해서 GABA 생성이 가능하였으며, 이는 1차 고초균 발효시간에 의존적으로 증가하였다. 이는 콩 원료를 이용하여 고초균과 젖산균의 혼합발효물로부터 생성된 GABA 함량이 0.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었다는 연구 결과보다는 높은 GABA를 생성하는 것으로 나타났다(39). 우유에 고초균과 젖산균을 혼합 발효시킴으로서 발효유에 펩타이드 및 기능성 성분인 GABA를 강화시킬 수 있으며, 젖산균에 의한 GABA 대량생산을 최적화시키는 연구가 요구된다.

발효유의 표면 조직 관찰

고초균 및 젖산발효를 통해 형성된 발효유 커드 조직을 주사전자 현미경을 이용하여 관찰한 결과는 Fig. 7과 같다. 고초균에 의한 1차 발효 중에 우유단백질들이 가수분해 된 후 2차 젖산발효에 의해서 형성된 요구르트 커드의 표면의 모습은 우유 단백질의 가수분해 정도에 따라서 차이를 보였다. 고초균 발효가 생략되어 단백질 가수분해가 없는 조건에서 젖산균 발효에 의해서

Fig. 7. SEM images ($\times 50$) of milk curds fermented by *L. lactis* YC after pre-fermentation by *B. subtilis* HA. ¹⁾Alkaline fermentation time (h)

형성된 요구르트는 고른 입자를 갖는 균일한 표면을 보이지만, 단백질 가수분해가 진행되면서 커드 표면적이 불균일하며 거친 표면 조직을 나타냈다. 이는 요구르트 커드를 동결건조하여 수분을 제거시키는 과정에서 유청분리가 심한 요구르트는 단백질들의 결합이 균일하지 못하여 불규칙하고 거친 표면을 나타내는 것으로 판단된다. 반면에 유청분리가 없이 형성된 요구르트의 커드는 균일한 단백질 젤 형태를 이루면서 표면이 균일한 조직을 나타내는 것으로 사료된다. 또한 1차 고초균 발효를 3시간 동안 수행한 후 2차 젖산발효에 의해서 형성된 요구르트 커드 표면에 큰 변화를 초래하는 것을 보였다. 이는 1차 고초균 발효에 의해서 우유 단백질의 가수분해 정도에 따라 젖산균 발효에 의한 커드 형성능의 차이와 연관이 있음을 나타내며, 단백질의 가수분해가 지나치게 이루어지면 젖산균에 의한 요구르트 제조시에 유청분리가 심하며 불안정한 gel 형성으로 동결건조시에 표면 조직이 거칠어지는 것으로 판단된다.

따라서 고초균에 의해서 우유 단백질의 효과적인 가수분해를 통한 펩타이드 증진 및 커드 형성능을 증진시키기 위해서 고초균발효를 2시간 정도의 단기간 동안 수행하는 것이 필요하며, 이를 통해서 유청분리가 적은 보다 안정한 호상형 요구르트 커드를 제조할 수 있다고 사료된다.

요 약

시판 우유를 이용하여 고초균과 젖산균의 혼합발효에 의한 호상 요구르트 제조에 미치는 영향을 관찰하였다. 우유 원료를 6시간 동안 고초균 발효를 통해서 고초균 생균수가 초기 6.0×10^6 CFU/mL에서 2.5×10^8 CFU/mL로 증가되었다. 2차 젖산균 발효시에 생균수 증가 및 산 생성능이 촉진되었으며, 발효 1일 후에 젖산균 생균수 3.03×10^9 CFU/mL을 나타내었으며, 고초균은 4.67×10^5 CFU/mL로 감소하였다. 단백질 카제인은 1시간 동안 1차 고초균 발효에 의해서 급격하게 가수분해되어 저분자 펩타이드로 전환되었으며, 2차 젖산균 발효시에 유청분리가 최소화되면서 커드형성이 우수하였다. 초기 3시간까지 고초균 발효시에 젖산균에 의해 커드형성능이 양호하였으며, 그 이상의 고초균 발효는 우유의 커드형성을 지연시켰다. 특히 4시간 발효물은 심한 유청분리 현상과 함께 tyrosine 함량이 급격히 증가되어 80 mg% 수준을 나타내었다. 1차 고초균 발효를 수행한 경우에 2차 젖산균 발효에 의한 GABA 생산이 증진되었다. 호상 요구르트 커드의 표면구조는 1차 고초균 발효가 진행될수록 거친 표면적을 나타내었으며, 결론적으로 1차 고초균 발효 3시간, 2차 젖산발효 3일 동안 수행한 경우에 산도 0.92%, pH 4.34, tyrosine 함량 47.39 mg%,

GABA 함량이 0.07%로 생성되었다. 우유에 고초균 발효를 단기간 수행함으로써 우유 단백질의 부분 가수분해에 의해서 2차 젖산균 발효시에 균의 생육을 촉진하여 산생성능이 우수하여 호상 요구르트 제조가 용이하였으며, 펩타이드, GABA, probiotics 등이 강화된 호상 요구르트를 제조할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 계명대학교 대학원 학생학술 연구 장학금에 의해 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

References

- Gilliland SE. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 87: 175-188 (1990)
- Snchez-Segarra PJ, Garca-Martnez M, Gordillo-Otero MJ, Daz-Valverde A, Amaro-Lopez MA, Moreno-Rojas R. Influence of the addition of fruit on the mineral content of yoghurts. Nutritional assessment. Food Chem. 71: 85-89 (2000)
- Lee JL, Huh CS, Baek YJ. Utilization of fermented milk and its health promotion. Korean Dairy Technol. 17: 58-71 (1999)
- Lourens-Hattingh A, Viljoen BC. Yogurt as probiotic carrier food. Int. Dairy J. 11: 1-17 (2001)
- Vliet TV, Lakemond CMM, Visschers RW. Rheology and structure of milk protein gels. Curr. Opin. Colloid In. 9: 298-304 (2004)
- Cho YH, Shin HJ, Chang CH, Nam MS. Studies on the development of the yogurt decreasing blood glucose. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 26: 257-262 (2006)
- Kim GM, Shin SH, Kang MJ, Yang SM, Sung NJ. Preparation and characteristics of yogurt added with garlic powder. J. Agr. Life Sci. 44: 49-56 (2010)
- Lim MR, Lee DK, Ahn JJ, Kwak HS. Change of volatile flavor compounds on yogurt manufactured with various commercial starter cultures during refrigerated storage. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 16: 173-179 (1996)
- Urista CM, Fernandez R, Rodriguez FR, Cuenca AA, Jurado AT. Review; production and functionality of active peptides from milk. Food Sci. Technol. Int. 17: 293-317 (2011)
- Korhonen H, Leppla AP, Rantamki P, Tupasela T. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. Trends Food Sci. Tech. 9: 307-319 (1998)
- Clare DA, Swaisgood HE. Bioactive milk peptides: A prospectus. J. Dairy Sci. 83: 1187-1195 (2000)
- Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon CS, Sohn HY. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* jb-1 from Chungkook-jang and fermentational characteristics of Jb-1. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 32: 291-296 (2004)
- Yang M, Kwak JS, Jang S, Jia Y, Park IS. Fermentation characteristics of soybean yogurt by mixed culture of *Bacillus* sp. and lactic acid bacteria. Korean J. Food Nutr. 26: 273-279 (2013)
- Son SJ, Lee SP. Physicochemical and functional properties of roasted soybean flour, barley, and carrot juice mixture fermented by solid-state fermentation using *Bacillus subtilis* HA. Food Sci. Biotechnol. 20: 1509-1515 (2011)
- Tsushida T, Okamoto J, Omori M, Murai T, Higuchi M, Yano T. Effect of anaerobically treated tea (Gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. J. Agr. Chem. Soc. Jpn. 61: 1449-1451 (1987)
- Narayan VS, Nair PM. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. Phytochemistry 29: 367-375 (1990)
- Cagno RD, Mazzacane F, Rizzello CG, Angelis MD, Giuliani G, Meloni M, Servi BD, Gobetti M. Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. Appl. Microbiol. Biot. 86: 731-741 (2010)
- Um JI. Production of γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus* sp. isolated at traditional jeotgal. MS thesis, Kyungpook National University, Daegu, Korea (2005)
- Woo KT. GABA productivity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SP5 strain in goat milk yogurt. MS thesis, Hankyong National University, Ansong, Korea (2012)
- Kim SY. Quality characteristics of soy yogurt fermented with mixed lactic strain culture. MS thesis, Yonsei University, Seoul, Korea (2001)
- Puvanenthiran A, Williams RPW, Augustin MA. Structure and viscoelastic properties of set yoghurt with altered casein to whey protein ratios. Int. Dairy J. 383-391 (2002)
- Oh SM, Kim CS, Lee SP. Characterization of the functional properties of soy milk cake fermented by *Bacillus* sp. Food Sci. Biotechnol. 15: 704-709 (2006)
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685 (1970)
- Hosoi T, Ametani A, Kiuchi K, Kaminogawa S. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (natto), catalase, or subtilisin. Can. J. Microbiol. 46: 892-897 (2000)
- Kwon GH, Kim JH, Lee HA. A bacteriocin of 5-kDa in size secreted by *Bacillus subtilis* 168. Korean J. Microbiol. Biotechnol. 38: 163-167 (2010)
- Malanicheva IA, Kozlov DG, Sumarukova IG, Efremenkova OV, Zenkova VA, Katrukha GS, Resnikova MI, Tarasova OD, Sineokii SP, El'-Registan GI. Antimicrobial activity of *Bacillus megaterium* strains. Microbiology 81: 196-204 (2012)
- KFDA. Korea Food & Drug Administration. Available from: <http://fse.foodnara.go.kr/origin>. Accessed May 21, 2009.
- Lee JY, Bea HC. Preparation of fermented milk added with powder of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* and its sensory characteristics. J. East Asian Soc. Dietary Life 19: 967-974 (2009)
- Raich JL, Kurmann JA. Yoghurt: scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Technical dairy publishing house, Denmark. p. 55 (1978)
- Lee SH, Koo YJ, Shin DH. Physicochemical and bacteriological properties of yogurt made by single or mixed cultures of *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Korean J. Food Sci. Technol. 20:140-147 (1988)
- Jung SW. Fermentation characteristics of yoghurt using lactic acid bacteria with high exopolysaccharide production ability isolated from sourdough. PhD thesis, Dongguk University, Seoul, Korea (2007)
- Hemantha Kumar HR, Monteiro PV, Bhat GS, Ramachandra Rao HG. Effects of enzymatic modification of milk proteins on flavor and textural qualities of set yoghurt. J. Sci. Food Agr. 81: 42-45 (2001)
- Shieh CJ, Thi LAP, Shih IL. Milk-clotting enzymes produced by culture of *Bacillus subtilis* natto. Biochem. Eng. J. 43: 85-91 (2009)
- Panyam D, Kilara A. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modification. Trends Food Sci. Tech. 7: 120-125 (1996)
- Hrčková M, Rusková M, Zemanovič J. Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different protease and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. Czech J. Food Sci. 20: 7-14 (2002)
- Tzvetkova I, Dalgalarondo M, Danova S, Iliev I, Ivanova I, Chobert JM, Haertle T. Hydrolysis of major dairy proteins by lactic acid bacteria from bulgarian yogurts. J. Food Biochem. 31: 680-702 (2007)
- Woo SH, Jho JW, Kim GY. Antioxidant activity of low molecular peptides derived from milk protein. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 29: 633-639 (2009)
- Song EH, Won BR, Yoon YH. Production of probiotic cream cheese by utilizing *Lactobacillus helveticus* CU 631. J. Anim. Sci. Technol. 43: 919-930 (2001)
- Shin MK. Development of functional fermented soy products by mixed culture of *Bacillus* sp. and lactic acid bacteria. MS thesis, Andong National University, Andong, Korea (2010)