

최 종
연구보고서

콩 단백을 이용한 새로운 고상 젖산 발효식품
제조기술 개발

Development of Novel Fermented Soybean
Product Fermented by Lactic Bacteria

콩단백 발효식품(NFS) 제조를 위한 미생물학적 및
발효공정 최적화 연구

Starter Culture for the NFS Production and Optimization
of Fermentation Process

콩단백 발효식품(NFS) 제조를 위한 가공 조건 및
제조공정 확립

The Establishment of Processing Conditions and Manufacturing
Process for the NFS Production

고 려 대 학 교

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “콩 단백을 이용한 새로운 고상 젓산 발효식품 제조기술 개발” 과제 (세부과제 “콩 단백질 발효식품(NFS) 제조를 위한 미생물학적 및 발효공정 최적화 연구”, “콩 단백질 발효식품(NFS) 제조를 위한 가공 조건 및 제조공정 확립”)의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 11 월 14 일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 황 한 준

연 구 원 : 윤 미 영

연 구 원 : 이 은 정

연 구 원 : 윤 운 진

협동연구기관명 : (주) 샘 표

협동연구책임자 : 이 대 희

연 구 원 : 이 병 조

연 구 원 : 홍 성 주

연 구 원 : 김 재 영

연 구 원 : 이 경 한

요 약 문

I. 제 목

콩 단백을 이용한 새로운 고상 젓산 발효식품 제조기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

콩은 일반 곡물과 달리 단백질이 30~45%, 지방이 16~22%로 매우 높아 영양적 조성이 육류에 가까우며, 아미노산 조성은 우유와 유사하다. 특히 대두 단백질은 우수한 수화력을 바탕으로 육가공(햄·소시지), 어육가공(어묵·맛살), 만두 가공시 증량제로 사용되고 있으며, 또한 건강보조식품, 이유식, 다이어트식, 병원환자식 등에 단백질 강화제로서 널리 사용되고 있다. 이처럼 대두 단백질은 동물성 단백질보다 확실히 경제적으로 우위에 있으며 첨가물 분야를 비롯한 제반 식품산업의 기술 발달로 동물성 단백질이 갖는 여러 기능적 특성(functional property)을 대체하고 있다. 또한 최근에는 대두가 암을 비롯한 성인병을 예방할 수 있는 생리활성 성분(phytochemical)을 함유하고 있다고 보고되어 건강기능성 식품으로 각광을 받고 있다.

콩에는 항암, 항노화, 변비완화, 항신부전, 항알레르기, 항비만, HIV 증식억제, 담석증 예방, 이노작용, 치매예방, 항콜레스테롤혈증, 고지혈증예방, 동맥경화 억제, 항심혈관 질환 등의 생리활성성분이 함유되어 있어 대체로 성인병 예방과 밀접한 관련이 있고, 그 외에도 정장 효과, 항산화작용, 골다공증 예방, 혈압강화작용, 항혈전작용, 면역 증강 효과, 간 기능 증진 등에 관여하는 성분을 함유하고 있다.

대두 단백질의 양적 사용 증가는 식품학적 기능 특성, 높은 영양가, 다량 생산과 응용의 다양성, 그리고 저렴한 가격에서 기인된다. 따라서 국내·외에서 대두 단백질을 이용한 새로운 개념의 식품이 개발되고 있으며 동양의 전통 콩 발효식품의 소비와 생산도 증가하고 있다. 그러나 대두 단백질이 갖는 완벽한 기능적 특성과 영양 및 생리활성 등을 살린 제품 개발은 아직 미흡하다.

대두 단백질은 용해도, 점도, 점착력, 아미노산 조성 등 여러 가지 성질이 우유단백질과 유사하므로 이를 이용하여 치즈와 유사한 고형식품을 제조하고자 하는 연구가 지금까지 많

이 수행되어 왔다. 우리나라의 경우 치즈의 소비량은 증가하고 있으나 공급이 그 수요에 미치지 못해 값이 비싸고 저장 기간이 짧은 점을 감안할 때 대용식품의 하나로서 대두단백을 curd화하여 식품의 기능성과 영양학적 가치를 향상시킨 새로운 식품의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

대두단백질이 가지고 있는 기능성으로 인하여 각국에서 대두의 소비를 권장하고 있음을 감안할 때 국내 소비는 매우 미미한 실정이다. 또한, 콩기름이나 두부를 제조하고 남은 부산물의 막대한 양에 비해 이용되는 양은 현저히 적음을 감안할 때 식품원료의 낭비를 막고 고기능성 및 고단백식품 개발의 필요성이 크게 대두되고 있다.

최근의 식품공업은 식품의 1, 2 차적 기능인 영양적, 관능적 기능 이외에 3 차적인 생체 조절기능성을 강조하는 추세이므로 보다 합리적이며 과학적인 방법으로 콩의 다양하고 우수한 생리활성 성분을 섭취하는 방법을 제시하는 것이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 고기재료에 적용했던 유럽의 발효소시지 제조 원리를 유사 재료인 대두단백에 도입하고 보다 합리적이고 효율적으로 수행하기 위해 “발효소시지 제조기술”의 개념을 도입하여, 한정된 system내의 온·습도가 control되는 조건에서 미생물들의 동역학적 변화를 파악하여 적합한 스타터에 의해 조절하고, 생성된 젖산으로 하강하는 pH에 더불어 탈수과정을 병행하여 저장성과 풍미가 우수한 새로운 형태의 대두발효식품 제조공정을 확립하고자 한다.

본 연구의 목적은 두부, sufu나 temphe의 제품 특성을 살리면서 젖산 발효식품으로서 특유의 향미 그리고 높은 저장성을 지닌 제품을 개발하고자 하는 것이며 대두 단백질의 효율적 이용을 가능하도록 하는 제품을 개발하고 지속적인 개선 보완을 통해 서구의 대두식품 선호 추세에 발맞추어 산업적인 경쟁력을 확보하고자 하는 것이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구개발의 최종목표는 우수한 생리활성 기능을 갖는 것으로 알려진 콩 단백질을 이용하여 섭취가 용이하고 풍미가 증진된 새로운 형태의 발효식품 (이하 NFS)을 제조하는 것으로 목적이 있으며 다양한 균종과 여러 가지 원료를 이용하여 다양한 조성의 제품을 제조·개발하고 이에 대한 생화학적 및 물리화학적 분석과정을 통해 그 유용성을 증명할 뿐만 아니라 이를 상품화하는데 필요한 제품의 가공 기술을 검토하고 상업적 생산가능성의 기반을 제시하기 위해 다음과 같은 연구내용 및 범위를 설정하였다.

1) NFS의 제조에 적합한 젖산균 스타터의 선정 및 특성규명

- ① 국내 대두단백 및 발효제품에서 젖산균 등 분리

- ② 순차적 탐색 방법에 의한 스타터 후보균의 동정 및 균총 검토
- ③ 분리주의 생물학적 특성 및 안전성 규명: biogenic amine 생산성, 향미생물 활성, 단백질 및 지방 분해 활성 등의 효소 활성, 생육 특성 등 검토

2) NFS의 제조에 적합한 곰팡이 스타터의 선정 및 특성규명

- ① 국내·외 콩 발효제품으로부터 곰팡이 스타터 후보균의 분리 및 동정
- ② 생화학적 및 물리적 특성 검토
- ③ Mycotoxin 생산성 확인

3) 스타터 후보균의 NFS 제조에의 적용

- ① 상업적 스타터와 분리주(이하 스타터 후보균)에 의하여 제조된 제품의 미생물학적 거동 및 생리·화학적 특성 비교 검토
- ② 스타터 후보균의 *in vitro*, *in situ* (pilot scale), industry scale에서 가공 특성,
- ③ 안전성, 기능성 및 관능성에 근거한 최우수 균주의 선별

4) 대두단백 발효식품(NFS) 제조 방법 확립

- ① 원료 대두단백의 가공 조건 설정
- ② 원료배합 조건 확립
- ③ casing 선정 조건 확립
- ④ 발효 및 숙성 조건 확립
- ⑤ 저장 안정성 확보

5) 생리활성이 우수한 새로운 형태의 고단백 대두발효식품 제조

- ① 발효 및 숙성 조건 최적화
- ② starter로서 균주의 기술적 유용성 및 발효과정 중의 생리활성 물질의 변화 분석
- ③ 대두 단백질의 가공적성, casing 조건 및 배합을 최적화
- ④ 최우수 스타터 균주 선정·적용에 의해 제조된 기능성 NFS의 품질특성, 품질 평가, 저장성 및 산업적 규모의 제조공정 확립

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

콩 단백을 이용한 신 개념의 기능성 발효식품, 즉 콩 단백질 발효식품(NFS) 제조를 위한 미생물학적 및 발효공정 최적화 연구(제 1 과제)와 NFS 제조를 위한 가공조건 및 제조공정 확립(협동과제)으로 나누어 연구를 수행하였으며, 이상의 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 국내·외의 콩 발효식품들로부터 젖산균들을 분리하였다. 또한 NFS 제조에 필요한 우수한 젖산 생성능, 생육 속도, 발효능, 유용한 효소 활성, 안전성 등을 검토하여 최적의 조건을 갖춘 균주 20주를 후보균으로 선정하였다.

2) NFS 외부에 곰팡이 후보균을 접종하여 제품의 탈수 현상을 방지하고 protease의 활성을 이용하여 기능성 콩 peptide의 함량을 높이며, 외부 잡균으로부터의 오염을 방지하려는 연구를 수행하였다. 이를 위해 우선 곰팡이 후보균 들을 미생물학적 특성을 검토하여 유용성을 검토하였다.

3) 콩 발효식품에서 분리한 곰팡이 분리균의 경우 밀생정도, 균사의 모양이나 색이 NFS 제조에 적합하지 않다고 판단되어 제외되었다. 8종의 분양주에 대해 효소활성 및 생육 특성 등을 검토하여 사용가능성을 제시하였으며, 이들의 mycotoxin 생성 유무를 확인하기 위해 *Artemina salina*, cell cytotoxicity (MTT assay)의 생물학적 검증방법과 Ames test에 의한 변이원성 시험을 실시하고, 최종적으로 안전하다고 판단되는 곰팡이 후보균 5종을 선별하였다.

4) 최종 선별된 젖산균과 곰팡이 후보균을 이용하여 NFS를 제조하고 NFS 내에서의 미생물들의 역학적인 변화 및 기능적, 식품학적 특성을 검토하여 젖산균 분리주로는 *Lactococcus lactis* DC24, *Enterococcus faecium* S2C16을 선별하였다. 또한 여기에 유럽 시장에서 수집된 상업적 starter들의 적합성을 검토하여 이 중 Bacterferm™ F-2 (CHR. HANSEN)이 가장 적합한 것으로 판단하고 혼합 또는 단일 후보균을 이용한 제품의 다양성을 검토하였다.

5) Casing 내부에는 젖산균을 외부에는 곰팡이 후보균을 이용하여 제조된 NFS system

내에서 일어나는 물리·화학적·미생물학적 변화를 측정하여 최적 곰팡이 후보균으로 *Penicillium camemberti* DSM 1233과 *Actinomucor elegans* DSM 63362를 최종 선별하였다.

6) 여러 가지 종류의 콩 단백질, 첨가물, 가미·가향제가 NFS제조에 미치는 영향을 검토하였다.

7) ISP (Isolated soy protein), CSP (Concentrated soy protein), Soybean flour, 탈지대두박, 콩, TVS-1 (Textured vegetable soybean protein), TVS-2의 총 7 가지를 원료로 하여 시료의 적합성을 검토하였으며, 결합제의 종류 및 첨가량, 가수량, 원료의 선별, 원료의 배합비, 발효와 숙성과정 중 온도, 저장기간 등을 선별하여 제조 방법을 최적화하였다.

8) NFS 제조를 위해 원료 및 배합비를 검토한 결과 ISP와 TVS를 주원료로 결정하고, 발효와 숙성과정 중 온도와 저장기간을 최적화하여 제조조건을 확립하였다.

9) 인위적 첨가물들을 최소화한 조건을 정립하여 isolate soybean protein (ISP)와 gluten, 소금, 설탕을 이용한 NFS의 원료 배합비를 확립하였다.

10) 산업적 생산을 위한 발효 및 숙성 조건을 검토한 결과 발효온도는 25℃, 순도 95%, 숙성온도 15℃, 습도 85%가 가장 적합한 것으로 확인되었다.

11) 확립 조건을 이용하여 NFS를 제조하고 texture profile과 flavor profile을 이용하여 제품의 특성을 이해하였으며 스타터 후보균의 미생물학적 거동을 파악하고 NFS내의 물리적 변화를 측정하였다.

12) 제품의 기능성과 기호성을 입증하기 위해 콩의 생리활성 물질인 isoflavone, phytic acid, 당류, 유리 아미노산의 분석을 수행하였다. 제조된 NFS는 발효가 진행되면서 isoflavone의 활성형인 aglycon의 함량은 증가하고 phytic acid, 그리고 raffinose나 stachyose 등의 반 영양물질들은 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 유리 아미노산의 분석 결과도 기능성 식품으로서의 가치를 입증하였다.

13) 관능검사와 TPA 분석 결과, 제조된 NFS의 탄성과 texture에 의한 식감 등은 좋은 편으로 나타났으며 콩의 이취는 감소하였다. 젓산균 특유의 신맛과 미약한 콩비린내 등이 문제점으로 지적되었으나 가향 가미과정을 통해 개선이 가능함을 제시하였다.

2. 활용에 대한 건의

- 가) 대두발효식품을 건강기능성 식품으로 활용촉진 방안 필요
- 나) 젖산균 스타터를 콩 발효제품의 다양화에 활용
- 다) 다양한 형태의 제품 개발에 활동: 예) 치즈, 소시지, 양갱 등
- 라) 연구 결과의 산업체 기술 이전을 통한 실용화 촉진
- 마) 우리나라 콩 발효식품의 미생물학적 군상에 대한 결과를 토대로 기존 콩 발효식품의 안전성과 기능성이 강화된 발효식품 제조 개발에 응용

SUMMARY

The soybean is low cost but high-quality protein rich food. In recent years, the health benefits of soybean-based products have been widely recognized all over the world. The studies and clinical trials have revealed that isoflavones and soy peptides in soybean were effective for the prevention of various chronic diseases and hormone-associated health disorders. Its consumption as a food product is not very popular in western countries. One of the reason is its off-flavor which are produced during processing. Lactic acid fermentation would be a promising way, because some lactic acid bacteria are effective to reduce the off-flavor. The soybean benefits are more easily achieved with fermentation; transformation of isoflavones to aglycon forms, reduction of non-digestive oligosaccharides, and remove of antinutrition factors such as phytic acid and trypsin inhibitors. Consequently, it is a better choice to intake fermented soybean foodstuffs than non-fermented foods. Fermentation is a good tool for developing bio-functional soy-foods.

The purpose of this research was to develop a novel fermented soy food product (NFS) using starter organisms. To establish optimal production method, we also performed the studies about processing conditions, manufacturing processing, and combination ratio of the ingredients.

This project consists of one subject and a joint subject. the former is to conduct the isolation and the screening of starter candidates suitable for the production of novel fermented soybean food product (NFS). The latter is to establish the manufacturing process, fermentation, and ripening conditions.

In order to take adequate bacterial starter for the production of NFS, we isolated lactic acid bacterial (LAB) and fungal strains from the soy fermented foods such as Cheongkukjang, Deonjang, Sufu, and Miso. LAB were primarily screened for the suitability of microbiological characteristics, enzyme activities, pH profile, and growth rate in real food system. In addition, their safety and fermentation properties *in situ* were also determined.

The functionality and the safety of mold starter candidates were also assayed. The toxigenicity of the mold strains was tested by biological methods such as Ames test,

brine shrimp assay, and MTT assay.

NFS that produced using twenty lactic bacterial starter candidates were scored as good for the taste and flavor. Consequently, three of the isolates, *Lactococcus lactis* DC24, *Enterococcus faecium* S2C16 and *Lactobacillus curvatus* R8 were finally selected for the application to produce NFS. In addition, commercial starter FloraCarn F-2 was also selected.

The mold starters were excepted because it is convinced that the tested commercial mold starters were not suitable for the various growth behaviors on surface and flavors of NFS.

The taste and flavor of the NFS were proper when ISP 100 g, soymilk 390 ml, starter culture in soymilk 50 ml, sugar 3.2 g, and gluten 97 g were mixed. Therefore, this composition of the ingredients was further used to produce NFS.

The manufacturing process of the NFS was established at the industrial scale. The optimal temperatures for the fermentation and the ripening were 25°C and 15°C, respectively. In addition, the optimal time of fermentation was two days and the optimal ripening period was used for six days.

The contents of biological material, isoflavone and phytic acid in NFS were determined. Overall, after fermentation using starter organism, active form of isoflavones were increased but phytic acid remarkably decreased.

Consequently, we manufactured the NFS having the highly biological and functional activities and established the optimal manufacturing process for industrial application.

CONTENTS

Summary (Korean)	4
Summary (English)	4
Contents (English)	9
Contents (Korean)	13
Part 1. The Outline for Research & Development	16
Chapter 1. The purpose and need for research & development	16
Chapter 2. The contents and limit for research & development	19
Part 2. The Present States of Technology and Development at Home and Abroad	20
Part 3. The Results of Research & Development	22
Chapter 1. The screening of lactic acid bacterial strains isolated from soybean fermented soy products which are produced at home and abroad	22
1. Introduction	22
2. Materials and Methods	23
A. The isolation of starter candidates from fermented soy foods	23
B. The screening of starter candidates and determination of its chemical and biological characteristics	24
3. Results and Discussion	29
A. Lactic bacterial counts and total counts in fermented soy foods collected	29
B. Morphological and Biochemical characteristics of lactic acid bacteria isolated	30
C. Antimicrobial activity test	30
D. Hydrolysis activity of macro-molecules and utilization of soy protein	30
E. Screening of biogenic amine production, hemolysis, urease, and hyaluronidase activities (for assessment of safety)	33

Chapter 2. The Screening of fungal starter candidates isolated from fermented soy foods	34
1. Introduction	34
2. Materials and Methods	35
A. The screening of fungal starter candidates for the morphological and biochemical properties	35
3. Results and Discussion	40
A. The screening of fungal starter candidates for the morphological and biochemical properties	40
 Chapter 3 The manufacturing process of NFS, the investigation of main ingredients and the application to production	52
1. Introduction	52
2. Materials and Methods	53
A. The primary model for the establishment of NFS precess method	53
B. Screening of ingredients	54
C. Selection of casing	56
D. The proportion of water added and heat treatment condition	56
E. Starter selection	57
F. Production of NFS using optimal condition	58
3. Results and Discussion	61
A. The establishment of NFS process	61
B. The selection of ingredients	62
C. Investigation of the product variety as type of casing	67
D. The proportion of water added and heat treatment condition	68
E. Final starter selection	68
F. The establishment of final NFS process	73
 Chapter 4 Optimization of process condition and fermentation and ripening conditions for the NFS production	75
1. Materials and Methods	75
A. The conditions for the fermentation and ripening (time, humidity, and aeration etc.)	75
B. Assessment of NFS quality	76

3. Results and Discussion	77
A. The changes of pH and microbial count during fermentation and ripening of NFS	77
B. The changes of the shape under the different conditions	81
C. The characteristics of NFS under the different conditions (of temperature, humidity and aeration)	83
D. Texture and flavor profile analysis of NFS	85
 Chapter 5 The quality property of functional NFS	88
1. Introduction	88
2. Materials and Methods	89
A. The changes of main functional components	89
B. The special quality of the product	91
3. Results and Discussion	92
A. The changes of main functional components and anti-nutrition factor	92
B. The special quality of production	99
 Part 4. Achievements of Purpose and Contribution for Relative Field	103
Chapter 1. Purpose of Research & Development and Achievement	103
Chapter 2. Contribution for Relative Field	106
 Part 5. Results of Research & Development and Application Plan	107
 Part 6. Collection of Technology information	108
 Part 7. References	110
 APPENDEX	114
Publications	114

목 차

제 출 문	4
요 약 문	4
SUMMARY	8
CONTENTS	10
목 차	13
제 1 장 연구개발과제의 개요	16
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	16
제 2 절 연구개발 내용 및 범위	19
제 2 장 국내·외 기술개발현황	20
제 3 장 연구 개발 및 결과	22
제 1 절 국내·외 발효식품들로부터 젖산균 스타터 후보균의 선별 및 특성 확인	22
1. 서론	22
2. 재료 및 방법	23
가. Starter 후보균의 분리	23
나. Starter 후보균의 선별 및 생리·화학적 특징	24
3. 실험 결과	29
가. 국내·외 콩단백 발효식품의 젖산균수와 미생물 총균수	29
나. 분리균주의 형태학적 및 생리·화학적 특성	30
다. 항균활성 실험	30
라. 고분자 물질 분해능 및 콩단백 이용성	30
마. 안전성 검증	33
제 2 절	34
1. 서론	34
2. 재료 및 방법	35
가. Fungal starter 후보균의 형태·생화학적 특성 및 선별	35

3. 실험 결과	40
가. Fungal starter 후보균의 형태 · 생화학적 특성 및 선별	40
제 3 절 NFS 제조 방법, 주원료, 첨가제의 특성 및 이용성 검토	52
1. 서론	52
2. 재료 및 방법	53
가. NFS 제조 방법 구축을 위한 초기 모델	53
나. NFS 원료 선별	54
다. 적합한 casing 선별	56
라. 가수량과 열처리 조건	56
마. Starter 후보균의 선별	57
바. 선별된 시료에 의한 최적 배합의 NFS 제조	58
3. 실험 결과	61
가. NFS 제조 방법 확립	61
나. NFS의 원료 선별	62
다. Casing의 종류에 따른 NFS의 제품 다양화 검토	67
라. 가수량과 열처리 조건	68
마. 최종 starter 선별	68
라. 최종 NFS의 제조 방법 확립	73
제 4 절 NFS 제조 최적화를 위한 가공 공정 및 숙성 · 발효 조건의 최적화	75
1. 재료 및 방법	75
가. 발효 및 숙성(발효, 숙성시간, 온도, 습도, 공기유동) 확립	75
나. 제조된 NFS의 품질 평가	76
2. 실험 결과	77
가. 초기 제조된 NFS의 발효 · 숙성과정 중 pH와 미생물학적 변화	77
나. NFS의 제조공정 중 형태 변화	81
다. 온도, 습도 및 공기유동에 따른 NFS의 특징	83
라. 초기 NFS의 관능검사 및 조직감	85
제 5 절 기능성 NFS의 제품 특성	88
1. 서론	88
2. 재료 및 방법	89
가. 주요 성분 변화	89

나. 제품 특성	91
3. 실험 결과	92
가. 생리활성 물질 및 항 영양인자의 함량 변화	92
나. 제품 특성	99
제 4 장 목표달성도 및 관련 분야 기여도	103
제 1 절 연구개발 목표 및 달성도	103
제 2 절 관련 분야 기여도	106
제 5 장 연구개발 결과 활용계획	107
제 6 장 연구개발 과정에서 수입한 해외 과학 기술 정보	108
제 7 장 참고문헌	110
부록	116
학회 발표 및 논문 발표	116

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 콩의 기능적 중요성

- 콩은 일반 곡물과 달리 단백질이 30~45%, 지방이 16~22%로 매우 높은 편이며, 탄수화물로서는 전분은 거의 없고 대신 섬유질이 약 20%, 가용성 당이 약 10% 정도를 차지한다. 따라서 콩은 그 영양적 조성이 육류에 가까우며, 아미노산은 우유와 그 조성이 유사하다.

- 콩에는 항암, 항노화, 변비완화, 항신부전, 항알레르기, 항비만, HIV 증식억제, 담석증 예방, 이뇨작용, 치매예방, 항콜레스테롤혈증, 고지혈증예방, 동맥경화 억제, 항심혈관 질환 등의 생리활성성분이 함유되어 있어 대체로 성인병 예방과 밀접한 관련이 있고, 그 외에도 정장 효과, 항산화작용, 골다공증 예방, 혈압강화작용, 항혈전작용, 면역 증강 효과, 간 기능 증진 등에 관여하는 성분을 함유하고 있다.

- 대두식품의 섭취는 심장질환 발생률을 감소시키는 것으로 제안된 바 있다. 또 최근에는 대두 isoflavone이 폴리페놀구조를 소유함으로써 LDL 콜레스테롤의 산화를 억제하고 이에 따라 관상동맥성 질환의 예방효과가 있는 것으로 보고 있다.

- Isoflavones은 phytoestrogen으로 본래 estrogen과 같은 생리활성을 갖거나 장내 균총에 의해 활성화되는 phytochemical이다. Genistein과 daidzein, 이들의 배당체, 기타 여러 유도체 등으로 구성되어 있으며, 대부분은 배당체 형태로 존재하지만 aglycone이 배당체로부터 유리되었을 때 생체 이용성이 더 높아지며, 발효식품의 형태가 이소플라본을 더 효과적으로 이용할 수 있는 것으로 알려져 있다.

- Phytic acid는 콩과 대부분의 콩제품에 건조 중량의 1.0-3.0%가 함유되어 있으며, 비영양물질로서 알려져 왔으나 최근 다양한 생리활성 기능이 알려지면서 새롭게 주목받고 있다. 장내에서 철이온과 결합하여 결장암 생성을 저해하며 유방암초기 단계도 효과적으로 저해하는 것으로 보고되고 있다.

- 최근의 연구에서 lactic acid bacteria와 함께 phytic acid가 소화기관에서 발암형성 저해,

생식 독소물 생성을 저지하는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

2. 대두단백질의 기능성

- 1950년대부터 콩 단백질 이용 기술에 관한 연구는 많이 되어 왔으나 아직도 콩 단백질의 식용화는 콩 단백질 생산량에 비해 못 미친다. 콩 단백질은 유아식, 스포츠드링크, 우유나 육류 대체품, 곡류강화식품 등 이화학적 기능특성을 주는 식품에 사용되고 있으나, 최근 콩 단백질 식이가 심장병, 비만, 비만, 암, 당뇨 등에 관련이 있어 생리활성 물질로 관심을 갖고 있다.

- 콩 단백질은 우수한 수화력을 바탕으로 육가공(햄·소시지), 어육가공(어묵·맛살), 만두 가공시 증량제로 사용되고 있으며, 또한 건강보조식품, 이유식, 다이어트식, 병원환자식 등에 단백질 강화제로서 널리 사용된다.

- 콩 단백질은 동물성 단백질만큼의 경제적인 가치를 지니며 첨가물 분야를 비롯한 제반 식품산업의 기술 발달로 동물성 단백질이 갖는 여러 기능적 특성(functional property)을 대체하고 있다.

- 콩 단백질은 효소의 작용에 의하여 부분적으로 가수 분해되어 생리활성을 갖는 soy peptides가 될 수 있는데 생리활성기능 이외에 생체 내에서 아미노산 흡수가 잘되고 콩 단백질의 C 나 N-말단으로부터 소수성 아미노산을 분해하여 쓴맛을 감소시켜 준다. 또한 겔 형성능력이 강하고 또한 유화나 거품 형성능력도 좋게 된다.

- Peptides는 다양한 조합의 아미노산이 peptide결합에 의해 중합물을 형성하고 있는 것으로 일반적으로 분자량 10,000 이하의 것을 말한다. 식품 중에 존재하는 펩타이드는 아미노산을 공급하는 영양기능, 맛이나 용해성, 유화성 등에 관여하는 감각기능, 여러 생리활성을 나타내는 생체 조절기능 등에 모두 관여한다. 특히 생리활성을 나타내는 생체 조절기능으로는 항암, 혈압강하, 혈청 콜레스테롤 강하, 면역증강, 칼슘흡수 촉진 등의 광범위한 생리활성을 가지고 있다.

- 콩단백질은 생체 내에서 아미노산 흡수가 잘되도록 도와줄 뿐만 아니라 소화기내에서 담즙산의 재흡수를 저해함으로써 혈중 콜레스테롤의 저하 및 LDL과 지방의 감소효과가 있어 동맥경화의 예방 및 치료가 기대된다. 또한 ACE저해 활성에 의한 혈압강화 peptide, 혈

소판 응집저해 활성을 갖는 항 혈전 펩타이드, 항종양 펩타이드 등이 알려져 있다.

- 최근 생리활성기능을 갖고 있는 콩 펩타이드를 식품에 첨가한 새로운 기능성 식품이 상품화되어 시장에 출시되었으며, 콩 펩타이드가 갖는 생리활성 기능을 포함한 여러 가지 기능을 이용하여 건강지향식품, 기능성식품, 제약, 화장품에 응용되고 있다.

3. 대두 단백질을 이용한 새로운 식품 개발의 필요성 및 이점

- 대두 단백질의 양적 사용 증가는 식품학적 기능 특성, 높은 영양가, 다량 생산과 응용의 다양성, 그리고 저렴한 가격에서 기인된다. 대두 단백질을 이용한 새로운 개념의 식품이 개발되고 있으며 동양에서의 전통적인 식품의 생산도 증가하고 있다. 그러나 보다 적극적이고 대두 단백질이 갖는 완벽한 기능적 특성과 영양성, 및 생리활성 등을 살린 제품은 아직도 충분히 실현되지 않고 있다.

- 대두 단백질은 용해도, 점도, 점착력, 아미노산 조성 등 여러 가지 성질이 우유단백질과 유사하므로 이를 이용하여 치즈와 유사한 고형식품을 제조하고자 하는 연구가 많이 수행되어 왔다. 우리나라는 치즈의 소비량은 증가하고 있으나 공급이 그 수요에 미치지 못해 값이 비싸고 저장 기간이 짧은 점을 감안할 때 대용식품의 하나로서 대두단백을 curd화하여 식품의 기능성과 영양학적 가치를 향상시킨 새로운 식품의 개발이 필요할 것으로 사료된다.

4. 경제·산업적 측면에서 제품개발의 필요성

- 2000년 유럽 전역을 휩쓴 구제역과 광우병 파동 이후 콩은 전세계적으로 주요한 단백질 공급원으로 부각되고 있다. 미국 등에서 콩이 21세기 식품으로 새롭게 주목을 받고 있는 것도 바로 이 때문이다.

- 세계 대두 생산량은 2001/02년에 사상 최대인 1억 8,475만 톤에 이를 것으로 전망하고 있다. 또한 대두 소비량은 전년보다 6.5% 늘어난 1억 8,476만 톤이 될 것으로 전망되어 생산과 소비량이 거의 균형을 이룰 것으로 전망된다.

- 국내 대두 생산량은 1980년대 말 25만 톤에 달했으나, 이후 계속 감소하여 2001년 기준으로 약 11만 7,700여 톤, 수출은 446 톤이고, 수입량은 136만 5,300여 톤으로 국내 수요는 지

속적으로 증가하고 있다. 따라서 현재 국내에서 사용되고 있는 대두의 수입콩의 비율은 약 92%에 달하며, 그 외에 탈지대두박의 수입량도 연간 75만 톤이다.

- 콩기름 가공시 부산물로 발생하는 탈지대두박은 장류식품, 배합사료의 원료, 비식용 공업용 원료로서 널리 이용되고 있으나 지방만 제거되었을 뿐 단백질이 약 50%, 탄수화물이 25~30%이며 생리활성 물질도 거의 포함되어 있고, 국내에서 발생하는 탈지대두박이 연간 600만 톤 이상이 되는 것을 감안 할 때 식품학적으로도 중요한 소재라 할 수 있다.

제 2 절 연구개발의 목표

대두단백을 이용한 발효식품 개발에 적용될 새로운 개념

- 새로운 대두단백 발효식품(novel fermented soy food product: 이하 NFS) 제조를 위해 고기재료에 적용했던 유럽형 발효소시지 제조 원리를 유사 재료인 대두단백에 도입하였다. 발효과정을 통해 절단견고성, 향미성분의 생성, 높은 생리활성 및 높은 저장성 등을 갖는 독특한 형태의 새로운 대두 발효식품을 제조하고자 하였다.

- 본 연구에서는 고단백 두유를 제조하여 gluten 및 젖산균 starter등을 인조 casing에 충전하여 적절한 온도와 습도 그리고 공기의 유동 등에 의하여 건조, 발효, 숙성시킨다. 그러나 순수한 고기 대신 콩을 원료로 한다는 점과 원료 처리에 가열공정(두유 제조공정)이 있다는 점 등이 그것과 다른 점이다.

- 제품에 대한 기본 concept은 대두유, 대두단백 및 기타 첨가 혼합물을 casing에 충전하여 젖산 발효시킨 제품으로서 콩 치즈 유사조직의 형태를 유지하며 slice-ability를 갖고, 신축성, 점성 및 탄력성이 적당하여 주로 가벼운 열처리(물에 데우거나 frying)를 통해 부식이나 가벼운 주식으로 이용할 수 있도록 설정되었다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국내의 기술 개발 현황

- 국내에서는 박 등이 식물성 치즈(sufu)를 제조하기 위해 우수한 균주 선발 및 발효적성에 대한 연구를 수행하여, 두유 및 탈지분유의 혼합액에 rennet 및 유산균의 첨가효과를 검토하였으며, 김 등은 두유에 우유를 첨가한 후 *Actinomucor elegans*를 이용하여 발효시킨 후 그 성분 특성을 조사한 바 있다.
- 치즈와 같은 부드러운 조직감을 위해 류 등은 대두유에 젖산균과 응고제를 이용하여 치즈를 생성한 후 최적의 응고조건을 찾고자 하였으며, 이 등은 대두단백질 중 7S와 11S globulin 대두단백 분획의 gelling 특성을 연구하기도 하였다.

2. 외국의 기술 개발 현황

- 대두단백을 이용한 발효식품은 아시아지역을 중심으로 유사한 형태의 제품이 다양하게 분포되어 있으며 중국이나 대만의 tobuyo 및 sufu, 인도네시아의 temphe 및 taokoan, 필리핀의 tahuri, 태국의 tau hu yee, 일본의 tofuyo 등이 있으며, 각 국별로 전통적인 제조 방법에 현대과학의 접목이 활발히 시도되고 있다.
- sufu는 콩 치즈로 제조방법이 간편할 뿐만 아니라 영양가 및 풍미가 우리나라 기호에 비교적 맞는 중국의 대두 발효식품이다. 이는 두부에 곰팡이를 번식시켜서 분비되는 효소인 trypsin과 pepsin에 의해 대두단백질의 주성분인 globulin과 albumin이 점차적으로 가수분해를 일으켜 peptide 및 아미노산으로 분해되어 숙성이 진행됨에 따라 치즈와 유사한 부드러운 조직과 풍미 및 우수한 소화율을 갖게 된다.
- 템페(temphe)는 인도네시아의 가정에서 제조되어온 오랜 전통의 발효 식품으로 물에 담가 탈피한 대두를 30분 동안 삶은 후 탈수하여 냉각시킨 다음 starter (*Rhizopus oligosporus* or *Actinomucor elegans*)와 함께 섞어 성형하여 항온(30~38℃)에서 1~2일 동안 발효시켜 제품화한 것으로, 조미나 향신료로 사용되는 여타의 대두 발효식품과는 달리 주로 주식이나 육 대용품으로 이용된다. 발효과정이 비교적 짧고 단순하며 육류와 같은 조

직과 버섯이 갖는 향미를 갖고 있는 것이 특징이다.

- 또한 일본의 tofuyo는 두부를 건조시킨 후 *Monascus* sp.나 *Aspergillus* sp.의 국균을 찢쌀에 생육시켜 만든 koji와 증류주 등을 섞은 침지액에 넣어 숙성시킨 것으로 감미가 있고 매끈매끈한 크림 형태의 두부 발효식품이다.

- 또한 여러 가지 연구에서 *Bifidobacterium* sp. 등의 젖산균과 *Bacillus* sp. 효모 등을 이용하여 발효두유를 제조함으로써 기능성 물질을 증대시켜 생리활성을 높이려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 항 영양인자인 phytic acid, 비소화성당류인 raffinose계 당류를 감소시킨 두유의 개발에도 많은 연구가 진행되고 있다.

3. 현 국내·외 기술의 문제점

- 국내에는 장류식품 이외의 발효 대두식품은 발견되지 않고 있으며, well-being 식품으로서 콩 단백질 식품이 있으나 그의 형태나 기호적인 면에서 미흡한 수준인 것으로 평가된다. 또한, 외국의 경우 대두 발효식품들은 대체로 두부형태로 고형화한 것에 곰팡이를 이용하여 발효·숙성시킨 것으로 우리나라 기호에 적합하지 않는 것으로 판단된다.

- 최근 국내외에서 젖산균을 이용한 콩 치즈 개발 등이 진행되고 있지만 산업적으로 획기적인 상품이 시장에서 발견되지 않고 있다. 이는 젖산균에 의한 pH 저하로 유발되는 수분리 현상 때문으로 판단된다. 또한 발효시키지 않는 경우는 쉽게 부패되는 콩 단백질의 특성 때문에 저장성에 있어서 많은 문제점을 안고 있다.

- 콩이 가지고 있는 이취와 무미, 그리고 씹쓸한 맛 등을 개선하기 위한 연구가 진행되고 있으나 beany favor의 원인물질로 알려진 acetaldehyde, ketone류 등의 분석에만 초점을 맞추고 있거나 가열, 침지 등의 일차적 공정 과정 중에서의 성분변화 분석에 대한 연구가 주로 수행되고 있어 실용적인 결과를 내지 못하고 있다.

- 따라서 본 연구에서 대두유와 대두단백 등을 이용하여 제한된 system 내에서 온도와 습도가 제어되는 조건에서 젖산균 starter를 이용하여 저하된 pH, gluten등을 이용하여 새로운 형태의 대두 발효식품을 개발하고자 하였다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 국내·외 발효식품들로부터 젖산균 스타터 후보균의 선별 및 특성 확인

1. 서론

발효식품에서 스타터의 역사는 매우 오래되어 그 기능성 특성이나 유용성은 많은 연구가 되어 있으며 상업적으로 생산되어지기도 한다. 유럽의 경우 스타터의 시장이 활성화되어 있으며 치즈, 발효소세지, 요구르트 등을 가공하는데 이용되고 있다. 상업적으로 사용되는 젖산균으로서 대표적인 것은 *Lactobacillus plantarum*, *Lb. sake*, *Lb. curvatus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Str. salivarius* subsp. *thermophilus*, *Pediococcus pentosaceus*, *Ped. acidilactici* 등이 알려져 있다.

젖산균이 발효과정 중 생성하는 다양한 유기산들은 방향과 풍미, 저장성 등을 증진시키며 pH-값의 저하를 유발한다. 또한 콩은 젖산균의 생육을 위한 배지로서도 제공되어 왔으므로 콩 내에서 젖산균의 생육활성을 이용한 식품의 개발은 매우 용이할 것으로 생각된다.

콩을 발효하여 생리활성 물질을 증대시키는 연구는 오랫동안 진행되어 왔으며 젖산균이나 효모, 곰팡이를 이용하여 발효된 콩 제품에서 이미와 이취성분이 발효되지 않은 제품에 비해 감소하며 대표적인 기능성물질인 isoflavone은 비활성형인 glycosides에서 활성형인 aglycon으로 전환된다는 보고가 있다. 또한 발효에 의해 콩 단백질이 peptide로 변환되어 콩의 기능성이 더욱 증가하며 여기에 젖산균이나 효모 자체의 probiotic 기능까지 부가되어 건강기능성 식품으로서의 가치를 부각시킬 수 있는 것으로 알려지고 있다.

젖산균이 유기산을 생산하는 특성을 이용하여 낮은 pH에 의해 단백질의 보수력을 최소화하여 탈수를 용이하도록 하고, 이 때 건조공정을 동시에 진행함으로써 대두입자가 단백질 matrix에로 결합되어 절단견고성이 부여될 것으로 예상된다. 젖산균, 향산화성 풍미 생성균 및 곰팡이 등 스타터 미생물은 산 생성, pH 저하에 의한 보존성 향상, 다양한 대사산물에 의해 NFS에 독특한 향미를 부여할 뿐 만 아니라 식품위해를 방지하는 제품의 품질을 좌우하는 가장 중요한 인자로 생각된다.

대두 및 대두단백은 생산지, 기질적 및 품종적 특성에 따라 총균수, microflora의 균상, 분포상태, 성장조건, 성장양태 및 생존능력 등 미생물학적 특성이 다양할 것이며, 발효유

제품이나 육류 제품을 위해 개발된 starter는 적합하다고 볼 수 없다. 따라서 대두에 합당한 starter (NFS 내에서의 대사능력 및 오염균과의 우수한 경쟁력 등을 갖춘)를 응용하는 것이 바람직할 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 첨단기술개발사업의 취지에 부응하여 기본적으로 유럽시장으로부터 발효 유·육제품 제조가 목적인 상업적 스타터를 구입하고, 아울러 국내 대두제품으로부터 분리한 젖산균 등으로부터 대사활성, 위생안전성, 관능 특성, 가공·기술적 특성 등을 근거로 하여 최적의 스타터를 선정하여 발효조건을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. starter 후보균의 분리

NFS 제조에 적합한 젖산균 starter 후보균을 선별하기 위해 국내·외의 콩 단백질 발효 식품을 수집하였다. 시료 선택에 있어서 고려 사항은 식품 중의 미생물 생육과 식품의 숙성도, 전통식 방법에 의한 제조 유무로 청국장 6 종류, 된장 5 종류, 장류 8 종류를 선별하여 총 19 가지 시료를 사용하였다. 국외의 경우 중국 상해시의 소규모 마트와 재래시장 등에서 구매한 sufu 총 10종의 제품과 국내에 수입 판매되고 있는 춘장 2종, 그리고 국내에서 수입 판매 중인 natto 2종을 사용하였다. 본 실험에 사용된 국내시료의 제조원과 제품명은 Tab. 1-1과 같다.

총균수 측정을 위한 배지로는 PCA를 젖산균 분리를 위한 배지로는 BCP(0.002% bromocresol purple)와 MRS (0.6% CaCO₃) 배지를 사용하였다. 시료 10 g에 멸균 희석수 90 ml 첨가하여 희석한 다음 배지에 도말하여 30℃, 혐기적 조건에서 24시간 배양한 후 생성된 집락을 관찰하였다. BCP 평판배지에서 노랗게 배지를 변화시키고 MRS 평판배지에서 집락 주변을 투명하게 변화시키는 집락들을 2회 이상 분리하여 산생성 여부를 확인하였다. 순수한 집락을 다시 MRS broth에 18 시간 배양한 후 배양액을 15% glycerol의 농도로 -70℃에서 저장하면서 실험에 사용하였다. 혼합균주로 사용 가능한 starter 확보와 분리 starter 후보균과 상업적 starter와의 활성 비교를 위해 Christian HANSEN사와 Gewürzmüller사로부터 상업적 starter를 구매하였으며 그 내용은 다음 Tab. 1-2와 같다. 상업적 starter들의 경우 혼합 형태이므로 분리를 위해 MRS 배지에 활성화시킨 후 그람 염색, urease 및 catalase test, 선택 배지(SK 배지)에 의해 단일 속으로 분리하여 -70℃에 보관하였다

Table 1-1. 예비 starter 후보균 분리에 사용된 국내 콩 발효 제품

제품류	제조원	제품명
청국장	(주)다믄촌	다믄(국내산콩)청국장
	상촌식품	웃말 청국장
	한국맥꾸름하우스	청수골 맥 청국장
	만석군 이기남 할머니 고추장	이기남 할머니 청국장
	풀무원	오월의 장맛
	가내 제조	가내 제조
된장	해산들	재래식 된장
		순창된장
	청정원	순창콩된장
		햇살 담은 조선된장
	샘표	숨쉬는 콩된장
간장	상촌식품	웃말 한식간장 국간장
	한국맥꾸름하우스	청수골 조선맥 간장
		샘표 양조간장 자연숙성
	(주)샘표	양조간장
		맑은 조선간장
	(주)풀무원	오월의 장맛 한식국간장
	몽고장유	몽고진간장
	청정원	햇살담은 조림간장

나. Starter 후보균의 선별 및 생리·화학적 특성

1) 분리주의 형태학적·생리적 특성

미생물 염색법을 수행하여 예비 starter 균주의 morphology를 현미경(Axioskop, ZEISS, Germany)을 이용하여 관찰하였다. Starter 후보균의 생리적 특성을 검토하고 동정하기 위해 catalase test, arginine hydrolysis와 esculin hydrolysis, 당 분해력, gas 생성력, pH, 생육속도, 다양한 온도에서의 생육 특성을 수행하였다.

가) Catalase test는 분리주를 broth에 24 시간 동안 배양한 후 배양액을 취해 slide glass에 1 ml정도를 적하한 후 여기에 3% H₂O₂를 반응시켜 거품 형성 여부를 관찰하였으며 거품이 형성되면 양성, 형성되지 않으면 음성으로 간주하였다. Arginine hydrolysis는 Nessler reagent로 NH₃ 생성여부를 확인하였다. Esculin의 가수분해여부는 modified MRS broth에 접종 배양하여 5일 이내에 배지가 흑색으로 변하는 유무를 보고 확인하였다.

나) 당분해능은 기본 peptone 배지에 최종 농도가 1%가 되도록 당(glucose, lactose, maltose, raffinose, sucrose)을 첨가하고 지시약으로 0.004% bromocresol purple을 사용하여 30 °C에서 24 시간 배양 후 배지의 색이 변하는 것으로 나타내었다. 보라색의 배지가 노랗게 변하면 양성, 변하지 않으면 음성으로 나타내었다.

다) Gas 생성력은 MRS broth에 durham tube를 넣고 분리주를 배양하여 24 h 후 gas 생성 여부를 관찰하였다.

라) 생육속도는 각각의 분리주를 30°C에 배양하여 18 시간 후에 생성되는 균체량을 spectrophotometer (UV-1601, SHIMADZU)를 이용하여 측정하였다. 준비된 MRS broth에 분리주를 접종한 후 각각 15°C, 20°C, 27°C, 30°C, 37°C, 45°C, 50°C에서 48 시간 배양하여 생육 특성을 관찰하였다.

Table 1-2. Commercial starters purchased from CHR. HANSEN and Gewürzmüller

Company	Product name	Microorganism
CHR. HANSEN	FloraCarn SPX /Bacterferm™ T-SPX	<i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34 <i>Pediococcus pentosaceus</i> PC-1
	Bacterferm™ T-RM-10	<i>Staphylococcus carnocus</i> M3 <i>Staphylococcus xylosus</i> K4
	Bacterferm™ T-SL	<i>Lactobacillus curvatus</i> Lb3 <i>Staphylococcus carnocus</i> M3
	FloraCarn FF-2 /Bacterferm™ F-2	<i>Lactobacillus pentosus</i> LP-1 <i>Staphylococcus carnocus</i> M3
	Bacterferm™ F-LC	<i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34 <i>Lactobacillus farciminis</i> GN
	Bacterferm™ B-2	<i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34 <i>Pediococcus acidilactici</i> PA-2
	Bacterferm™ S-B-61	<i>Lactobacillus curvatus</i> M1 401 <i>Lactobacillus sake</i> BJ-33
	Bacterferm™ S-SX	<i>Staphylococcus carnocus</i> M3 <i>Staphylococcus xylosus</i> DD-34
	LS-1	
	LS-25	
	LS-25 plus	<i>Staphylococcus</i> ,
	LK-30	<i>Lactobacillus</i> ,
	LK-30 plus	<i>Micrococcus</i>
LKB-5		

2) 분리주의 항균활성 실험

가) 시료 전처리

1차 분리주의 항균활성을 측정하기 위해 분리주를 MRS broth에 30℃에서 18시간 배양 후 4℃로 냉장시켰다. 산에 의한 pH와 H₂O₂가 항균활성 결과에 미치는 영향을 배제하기 위해 0.1 M의 NaOH를 이용하여 pH를 7.0으로 조정하였으며 catalase를 50 U/ml을 첨가하여 1 시간 동안 30℃에서 반응시켰다. 반응시킨 후 5000 x g, 4℃에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 동결건조기를 이용하여 동결 건조시킨 후 50 mM sodium phosphate buffer를 이용하여 10배 농축시켜 조시험액으로 하였다. 조 시험액은 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다. 대조구로는 MRS broth를 동량 취하여 같은 방법으로 전처리하여 사용하였다.

나) ADT 수행

분리주들의 항균활성을 확인하기 위해 agar diffusion test (ADT)를 수행하였다. 시험균주는 그람양성균으로 *Bacillus subtilis* KCTC 1022, *Listeria monocytogenes* ATCC 19113을 그람음성균으로 *E. coli* O157:H7 ATCC 43894를 이용하였다. 우선 paper disc (Whatman, Φ 8 mm)에 시료를 50 μ l를 적하하여 무균 상태에서 건조시킨 후 시험균주가 도말된 배지 위에 올려놓고 30℃에서 24 시간 이내에 paper disc 주변에 저해환이 형성되는 것으로 항균활성 여부를 판단하였다.

3) 예비 starter 분리주의 이용적합성

단백질, 지방, 전분, 구연산 등에 대한 분해 능력, 콩단백(분리대두단백) 이용성 등에 대한 실험을 수행하였다.

가) 단백질 이용성

단백질 분해능을 우선 protease activity 측정용 배지를 이용하여 screening 하였다. 우선 pancreatic digest of casein, yeast extract, glucose, agar로 구성된 배지에 bovine serum albumin, casein을 최종 농도가 1%가 되도록 첨가한 후 해당 균을 접종하여 배지에 clear zone 형성 여부를 보고 판단하였다. Screening을 통해 활성이 확인된 균주들의 enzyme assay는 Jensen 방법에 의해 측정하였으며 기질 (0.6% Hammersten casein, 50 mM Sodium phosphate buffer(pH 7.0)) 5 ml를 항온 수조에서 예열한 후 적정 농도로 희석한 조효소액 0.5 ml를 넣고 37 °C에서 20 min간 반응시킨 후 TCA (1.8%

Trichloroacetic acid, 1.8% sodium acetate, 1.98% acetic acid) 5 ml를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 대조구는 예열된 기질액에 TCA를 첨가하여 20 분간 반응시킨 후 조효소액을 첨가하여 반응시켰다. 이 반응액을 8000 x g, 30 min간 원심분리한 후 상층액을 취하여 spectrophotometer (SHIMADZU, UV-2501PC)를 이용하여 275 nm에서 측정하였다. Standard curve는 L-tyrosine (Sigma)을 이용하였다.

나) 지방. starch 분해능

지방의 분해능은 tributyrin을 분해할 수 있는 능력을 확인하도록 제조된 lipid media를 이용하였으며 starch 분해능은 starch를 기질로 한 기본배지를 이용하였다. 배양액 1 ml을 취하여 해당 배지에 도말하여 24 시간 배양 후 배지의 분해여부로 판단하였다. 배지 조성은 Tab. 1-3, 1-4와 같다.

Table 1-3. Composition of starch agar

DW	1 ℓ
Peptone	5
Beef extract	3 g
Starch	2 g
Agar	15 g
pH	7.0 ± 0.2

Table 1-4. Composition of tributyrin agar

DW	1 ℓ
Peptone	5 g
Beef extract	3 g
Tributyrin	10 g
Agar	15 g
pH	7.0 ± 0.2

다) 구연산 분해능과 콩단백의 이용성, DNase 생성능

구연산 분해능은 Simmons citrate agar를 이용하여 측정하였으며 콩 단백질의 이용성은 ISP를 액체 배지로 하여 분리주의 생육 유무로 판단하였다. DNase 생성능은 methyl green을 첨가한 DNase test agar를 이용하여 측정하였다.

4) 예비 starter 분리주의 안정성 검증을 위한 효소활성

분리주의 식품학적 안정성을 검증하기 위해 hemolysis, urease, coagulase, hyaluronidase, biogenic amine 생성능력을 측정하였다.

가) Hemolytic activity를 측정하기 위해 5% sheep erythrocytes가 첨가된 blood agar

plate를 사용하였다.

나) Urease는 phenol red가 첨가된 christensen's media을 사용하였다.

다) Coagulase는 skim milk broth에 24시간 배양 후 배지의 응집여부로 확인하였다.

라) Hyaluronidase 생성능은 기본 배지를 50°C로 식힌 후 hyaluronic acid(400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bovine albumin을 최종 농도 1%가 되도록 첨가하여 1 차 분리주를 24시간 배양 후 2 N acetic acid를 배지에 적하하여 형성되는 clear area로 확인하였다.

마) Biogenic amine (BA) 생성능은 본 실험실에서 Niven's medium을 변형시킨 improved decarboxylating agar와 S. Bover-Cid agar를 이용하여 확인하였다. Improved decarboxylating agar는 Niven's media에 아미노산을 첨가하고 무기원 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)과 glucose, Tween 80을 첨가하고 지시약으로 cresol red를 이용하였으며, S. Bover-Cid agar는 Improved decarboxylating agar에 ammonium citrate, thiamine, K_2PO_4 , CaCO_3 , pyridoxal-5-P을 첨가하였으며 지시약으로는 0.002%의 bromocresol purple을 사용하였다.

또한 BA생성 균주로 확인된 경우 BA의 정량분석은 HPLC를 이용하여 분석하였다. 우선 세포의 decarboxylase를 유도하기 위해 0.1%와 1%의 pre-amin acid 배지에 2번 계대배양 후 1% pre-amino acid가 첨가된 배지에 1일 배양 후 전처리를 하였다. 배양액 1 ml에 0.4 M perchloric acid 9 ml을 첨가하여 진탕 후 원심분리하고 0.45 μm 로 여과 멸균한 시료 1 ml에 다시 2 N sodium hydroxide와 sodium bicarbonate, dansyl chloride를 넣고 40°C에서 45분간 반응시킨다. 반응 후 25% ammonium hydroxide로 정용하여 여과 후 분석에 이용하였다. 분석기기는 Waters 996 photodiode array detector와 Millennium 2010 software가 장착된 Waters 2690 separation module을 column은 Nova-Pal C18, 4 μm , 150 by 3.9 mm (Waters)를 이용하였으며 이동상은 0.1 M ammonium acetate (Sol A)와 acetonitrile (Sol B)을 농도구배를 주어 분석하였다. 용매 흐름속도는 1 ml/min이었으며 254 nm에서 검출하였다.

5) 선별된 예비 starter의 동정

산생성능에 의한 curd 생성능과 단백질 이용능, 각 고분자 물질에 대한 분해능, 당 이용능 등을 고려하여 최종적으로 선별된 20 개의 분리주들을 분류하기 위해 API kit를 이용하였다. 이용된 API kit는 API 50 CH, API STAPH, API STREP(BioMerieux, France) 3 종류를 이용하였으며, 각각의 kit는 생리화학적 실험을 수행한 후 사용하였

다. 다시 최종 동정은 PCR을 이용하여 16S rDNA를 증폭하여 sequence를 분석한 후 Gene blast에 비교하여 동정하였다.

3. 실험 결과

가. 국내·외 콩 단백질 발효식품의 젖산균수와 미생물 총균수

1) 국내 시료의 미생물학적 분포

국내의 청국장 6개 시료에서 1 차 screening을 거쳐 Gram 양성, catalase 음성의 젖산균으로 보이는 균을 분리하여 생리·생화학적 실험을 통해 Bergey's manual을 기준으로 동정하였으며, 추가로 API kit을 이용하여 확인하였다. 그 결과 총 1500여 주의 균을 분리하였고 국내 청국장 6개 시료 중 맥꾸름, 이기남, 상춘, 풀무원, 다른 청국장에서 대부분을 차지하는 *Enterococcus faecium*이 분리되었으며, 다른, 이기남, 맥꾸름, 가내제조 청국장에서 *Lactococcus lactics* ssp. *lactics*가 분리되었다.

국내의 청국장류는 총균수가 평균 10^9 CFU/g, 간장은 10^6 CFU/g, 된장은 10^8 CFU/g으로 측정되었다. 국내 된장류에서는 젖산균으로 보이는 균주가 분리되지 않았으며, 간장류의 경우 *Pediococcus* 속으로 보이는 젖산균들이 확인되었으나 간장류의 총균수가 10^6 CFU/g인 것에 비해 매우 적어 10^1 CFU/g 정도로 분포되어 있었으며, 호염성균으로 NFS 제조에는 적합하지 않은 균으로 판단되어 본 연구에서 제외되었다. 청국장의 경우 젖산균은 10^2 CFU/g~ 10^3 CFU/g 정도 분포하는 것으로 확인되었으며, 특히 가내 제조한 청국장 시료의 경우 BCP, MRS(with 1% CaCO_3)의 분리배지에서 colony의 형태로 보아 4~5가지 정도의 산생성 colony가 관찰되었다. 이상과 같이 국내의 청국장에서 분리된 총 150주를 1 차 분리주로 하였다.

2) 국외 시료의 미생물학적 분포

10 종의 중국산 sufu의 미생물 분리결과 제품에 따라 총균수에서 큰 차이를 보였으며 대부분은 곰팡이로 확인되었다. 일본의 낫토와 중국의 춘장에서는 미생물이 검출되지 않았다.

나. 분리주의 형태학적 및 생리화학적 특성

1) 최종 분리주의 생육 특성 및 pH 및 당 이용능, gas 생성능

콩 단백질을 이용한 curd 생성능은 산의 생성능력과 관련되어 있으며, 분리주들의 curd 생성은 평균 pH 3.7 이하에서 이루어지는 것으로 나타났다. 또한 catalase test에서는 분리주 150주 모두 음성이었으며, 그람염색 시험에서는 그람 양성, micro-morphology는 쌍구균 또는 단구균으로 나타났다. Arginine 분해능은 모두 약한 양성으로 나타났으며, esculine 분해능은 모두 강한 것으로 나타났다. 1차 분리주 150주 중 curd 형성능이 상대적으로 강한 특성을 보이는 20주의 당 분해능 및 gas 생성을 검토하였으며 그 결과는 Table 1-5와 같다.

2) 생육 속도 및 배양 최적온도

분리주 모두 15°C~45°C의 온도범위에서 생육 가능한 것으로 확인되었으며, *Enterococcus faecium* DC 21, *Lactococcus. lactis* ssp. *lactis* L2C5, L2C18, *Aerococcus viridans* L2C8를 제외한 나머지 균주들은 50°C에서도 생육 가능한 것으로 나타나 넓은 온도 생육 범위를 가지고 있는 것으로 확인되었다. 대부분 균주들은 온도 차이에 따라 cell mass의 차이나 pH 변화는 거의 나타나지 않았다.

다. 항균활성 실험

최종 선별된 starter 후보균 20주의 항균활성시험 수행 결과 *E. faecium* S2C10과 *E. faecium* S2C11이 *Listeria monocytogenes* ATCC와 *Bacillus subtilis*에 대해 활성을 나타내어 bacteriocin 생성 가능성을 검토하였으며, 이 결과 lipase에 의해 실활되는 lipid-like 물질로 추측되었다.

라. 고분자 물질 분해능 및 콩단백 이용성

1) 단백질분해능

1차 선별된 균주 150주의 protease 활성을 위한 1차 screening 결과 청국장 시료의 9주와 상업적 starter의 6주가 활성을 나타내었으며, Fig. 1-1과 같다. 배지에서 활성을 보인 균주들은 다시 효소 정량을 수행하였으며 결과는 Fig. 1-2와 같다.

2) 지방과 starch 분해능, citrate hydrolysis, urease hydrolysis

분리주들의 지방과 starch 분해능, citrate hydrolysis, DNase activity는 다음 Table 8과 같다. DNase 활성은 모두 음성으로 나타났으며, 지방과 구연산은 거의 음성, 전분 분해능은 대부분 약한 활성을 나타냈다. 분리주 모두 대두유에서 충분히 생육 가능한 것으로 확인되었다.

Table 1-5. The biochemical characteristics of isolates after 24 h incubation.

Isolate	pH after incubation	Acid formation from					Gas from glucose
		Glucose	Lactose	Maltose	Raffinose	Sucrose	
DC 21	3.73	+	+	+	+	+	-
DC 24	4.27	-	-	-	-	-	+
DC 28	3.30	+	+	+	+	+	-
DC 30	3.33	+	+	+	+	+	-
LCY 10	3.57	+	+	+	+	+	-
LCY 12	3.60	+	+	+	-	-	-
LCW 1	3.58	+	+	+	+	+	-
LCW 8	3.51	+	+	+	+	+	-
LCW 11	3.45	+	+	+	+	+	-
LCW 27	3.30	+	+	+	+	+	-
PC 5	3.82	+	+	+	+	+	-
PC 11	3.56	+	+	+	+	+	-
PC 30	3.64	+	+	+	+	+	-
S2C 7	3.34	+	+	+	+	+	+
S2C 16	3.57	+	+	+	+	+	-
L2C 5	3.60	+	+	+	+	+	-
L2C 8	3.43	+	+	+	+	+	-
L2C 18	3.51	+	+	+	+	+	-
M1C 25	3.44	+	+	+	+	+	-
M1C 26	3.30	+	+	+	+	+	-

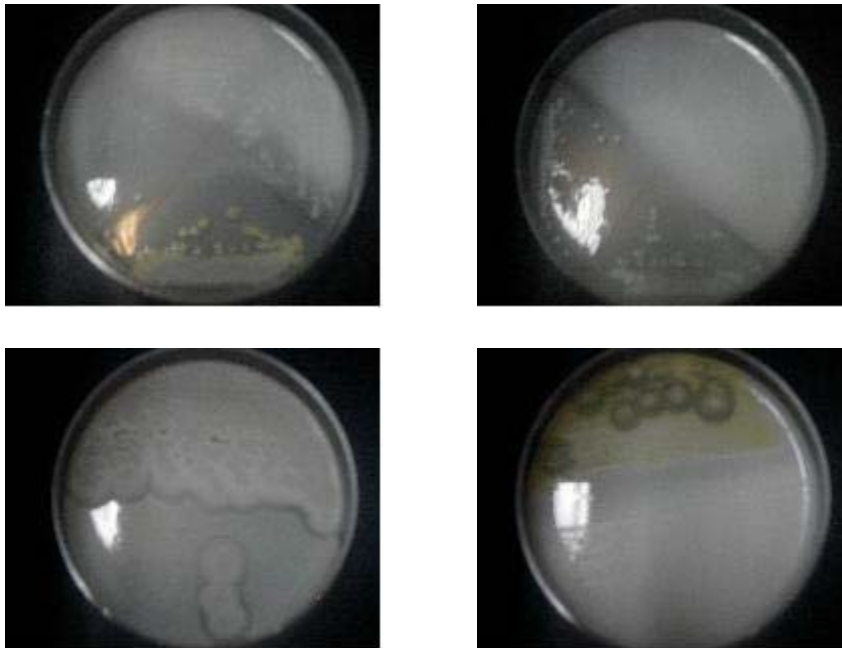


Fig. 1-1. Protease activities on screening media

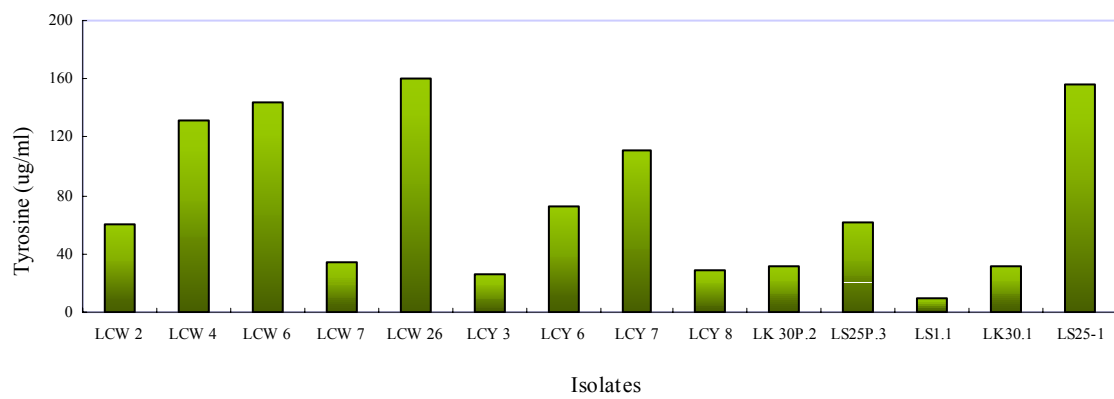


Fig. 1-2. Protease activities determined by the Jensen's enzyme assay

Table 1-6. Hydrolysis activity of macro-molecule materials.

Isolate	Lipid hydrolysis	Starch hydrolysis	Citrate hydrolysis	DNase activity
DC 21	-	(+)	-	-
DC 24	-	+	-	-
DC 28	-	(+)	-	-
DC 30	(+)	+	-	-
LCY 10	-	+	-	-
LCY 12	-	+	-	-
LCW 1	-	(+)	-	-
LCW 8	-	(+)	-	-
LCW 11	-	(+)	-	-
LCW 27	-	(+)	-	-
PC 5	-	(+)	(+)	-
PC 11	-	(+)	(+)	-
PC 30	-	(+)	-	-
S2C 7	-	(+)	-	-
S2C 16	(+)	(+)	-	-
L2C 5	-	(+)	-	-
L2C 8	-	(+)	-	-
L2C 18	-	-	-	-
M1C 25	-	-	-	-
M1C 26	-	(+)	-	-

마. 안전성 검증

Biogenic amine 생성능은 false-positive가 나타날 수 있으므로 modified medium (참고 문헌)과 S. Bover-Cid media 2가지를 사용하여 비교하였다. 젖산균의 biogenic amine 생산성은 S. Bover-Cid media를 사용한 결과 improved modified media에 비해 false-positive가 나타나지 않으며, pH에 의한 배지의 색변화를 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 실험 결과 분리주 22개 모두가 배지 상에서 biogenic amine을 생성하지 않는 것으로 확인되었다. 또한 미약한 활성을 보인 젖산균 (최종 선별 균주에 속하지 않은)의 경우 HPLC 분석을 통해 정량하여 제외하였다. 기타 효소활성의 경우 측정 결과 분리주 모두 음성으로 나타나 starter 후보균으로 활용하였다.

제 2 절 NFS 제조를 위한 곰팡이 스타터 후보균의 선별

1. 서론

제품의 다양성 측면에서 casing 내부의 대두 mix에는 젖산균을 적용하고, casing 외부에는 sufu나 tempeh 제조에 적용되는 곰팡이 starter들을 적용하여 새로운 제품화를 시도하고자 한다. 특히 NFS mix를 충전한 후 표면에形形色색의 다양한 곰팡이들이 번식할 수 있어 이들이 mycotoxin을 생성한다면 NFS 내로 침투될 수 있으므로 안전성에 큰 문제가 되기 때문에 시험된 곰팡이 스타터를 적용하여 위생 안전성을 확보할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 콩 단백질을 분해하여 기능성 peptide를 용출시키며 특유의 향미를 만들어내 가치를 높일 수 있을 것으로 생각된다. 또한 항 영양인자인 phytic acid와 trypsin inhibitor의 활성화도 억제할 수 있을 것이다.

중국의 콩 발효제품인 sufu나 인도네시아의 tempeh의 경우 *Actinomucor*, *Mucor*, *Rhizopus*속의 곰팡이를 이용하여 발효시킨다. 여러 가지 연구를 통해 곰팡이 발효에 의해 제품의 수용성 고형분, 수용성 질소, pH, 섬유질이 증가되며 환원당은 감소하고 nisin, riboflavin, thiamine, vitamin B12 함량은 크게 증가한다고 알려져 있다. 또한 곰팡이의 작용에 의해 조직이 연화되어 다당류의 용해가 일어나는 것으로 보고되었다. 국내의 경우 콩을 이용한 치즈제조를 위해 *Penicillium candidum*, *Actinomucor elegans*를 이용하여 제품제조를 검토하였으며 이 결과 사용균주의 단백질 분해 능력에 의해 총 질소 함량, amino태 질소함량, 환원당 함량이 증가하다가 숙성이 되면서 완만해진다는 보고를 하였다. 또한 다른 연구에서 protease활성이 높은 *Actinomucor elegans*을 선별하고 이를 이용하여 식물성 치즈인 pehtze를 제조하고 단백질 가수분해를 측정하였다.

본 연구에서도 곰팡이 starter는 NFS 표면에 번식해서 외관을 개선시킬 뿐만 아니라, 곰팡이 특유의 맛과 향을 부여하며, 지방산패 방지, 건조속도의 조절 등에 기여할 것으로 생각된다.

기존의 연구는 대부분 *Actinomucor elegans*균종을 이용한 치즈유사제품에 초점을 맞추고 있으나 본 실험의 목적은 조직의 형태 및 향미가 기존의 대두단백질 발효식품과는 차별화 되는 대두 발효제품을 만들고자 하는 것이므로 여러 가지 발효식품에 대표적으로 이용되는 곰팡이 starter들의 적용 가능성을 검토하고자 하였으며 특히 *Penicillium nalgiovense*, *Pen. chrysogenum*, *Pen. caseicolum*, *Actinomucor elegans*, *Rhizopus oligosporus* 등 적합성이 중점적으로 검토되었다. 또한 메주발효에 이용되는 *Aspergillus*

oryzae 등은 제품의 품질 특성을 변화시킬 수 있으므로 우리나라의 기호특성상 이용가능성은 적을 것으로 판단되었으나 NFS제조에 대한 적합성 검토를 시도하였다.

2. 재료 및 방법

가. Fungal starter 후보균의 형태·생화학적 특성 및 선별

1) Fungal starter 후보균의 분리

NFS 제조를 위한 곰팡이 starter 후보균의 선별을 위하여 총 4 가지 범위를 선정하여 시도하였으며 다음과 같다.

- NFS의 원재료에서 자연 상태로 발효시킨 경우 생육되는 곰팡이균 분리.
- 국내외의 균주보존기관에서 예비 후보 곰팡이균을 분양받아 이용 가능성 검토.
- 수집된 중국의 전통 콩 발효 식품인 Sufu 10종으로부터 곰팡이균 분리.
- CHR. HANSEN사에서 제조·판매되는 상업적 fungal starter의 이용성 검토.

식품에서 곰팡이를 분리하기 위해 시료 10 g에 희석수 (0.05% Tween 80) 90 ml을 가하여 균질화한 후 단계적으로 희석하여 배지에 도말하고 25℃의 호기적 조건에서 총 14일 또는 21일 동안 배양하였다. 배양 후 형태적으로 차이를 보이는 곰팡이들은 각각 PDA (potato dextrose agar)에 순수분리하고 분리된 곰팡이들은 형태학적 특성 및 균사의 색등을 고려하여 선별·보존하였다. 실험 균주들은 PDA에 접종하고 25℃에서 14일간 배양 후 10%의 tween 80을 이용하여 포자를 수확하고 10^6 spores/ml으로 희석하여 4℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 분양받은 균주는 희석수(0.5% tween 80)를 사용하여 도말하였으며 활성화된 상태의 균주는 삼점 배양을 통하여 생육특성을 확인하고 위와 같은 방법으로 포자를 수확하였다.

2) Starter 후보균의 선별 및 생리·화학적 특성

Starter 후보균의 생리적 특성을 검토하기 위해 현미경(Axioskop, ZEISS, Germany)을 이용하여 곰팡이의 생태학적 특성을 파악하였으며, 배양 중 온도, 성장 속도 등의 생육 특성을 검토하였다. Starter 후보균의 생리학적 특성은 단백질, 지방, 당(xylose, maltose, lactose, sorbitol), cellulose, 전분의 이용 능력을 검토하였으며 stater의 유용성을 검증하기 위해 항균활성 및 포자형성 능력, 경쟁력 등을 검토하였다.

가) 콩발효식품 및 NFS에서 분리된 균주의 특성 확인은 Samson 등의 'Introduction to food-borne fungi'을 참조하여 수행하였다. Czapek-dox medium에 배양하여 lactophenol cotton blue (lactic acid 20 ml, aniline blue 0.05 g, glycerol 40 ml, phenol crystals 20 g, DW 20 ml)로 염색한 후 현미경 검경하였다. Starter 후보균을 배양하면서 균총의 색, 균사의 발달 유무, 색소 생산 및 생육 속도, 표면 구조, 유성, 무성번식 기관의 형태, 격벽 등 형태학적 특성을 확인하였다.

나) 생육속도는 각각의 분리주를 25°C에 배양하여 1~3일 간격으로 곰팡이의 크기를 측정하여 생육속도를 비교하였으며 온도에 따른 생육 특성은 10^4 spores/ml로 희석하고 접종하여 각각 4°C, 12°C, 25°C, 30°C에서 총 12일간 배양하면서 관찰하였다.

다) 분리 또는 분양받은 균주의 형태학적 특성은 MEA (malt extract agar), PDA, CY (capek yeast extract), DRBC (dichloran-rose-bengal-chloramphenicol)에 접종 배양하면서 균총의 색, 색소 생산 및 생육 속도, 균사의 밀생 정도를 측정하여 starter 후보균으로서의 적합성을 판단하였다.

3) Starter 후보균의 유용성 검증

가) 효소활성

(1) 단백질 이용능력을 측정하기 위해 skim milk를 15% 첨가한 Casein hydrolysis medium을 이용하였으며 지방 분해능은 lipase activity를 측정하기 위한 배지로 0.1% tributyrin, fatty acid esterase activity를 측정하기 위해서는 tween 80을 10% 첨가한 fatty acid esterase 배지를 각각 이용하였다. 10^7 spores/ml을 백금선을 이용하여 평판배지 위에 점 또는 선으로 배양 시킨 후 14일 후 관찰하였으며 모든 실험은 3회 반복 실험하였다.

(2) Cellulose 및 전분의 분해능력 확인은 각각 10%의 CMC (carboxymethyl cellulose)가 첨가된 cellulose agar plate와 starch agar plate를 이용하여 측정하였다. Cellulose 분해능은 배양 후 0.1% congo red 시약 5 ml을 배지에 조심스럽게 분주하여 30 분간 반응시키고 다시 제거한 후 곰팡이 주변에 생성된 clear zone을 확인하여 생성되면 양성 생성되지 않으면 음성으로 측정하였다. Starch 분해능은 iodine solution을 이용하여 주변에 나타난 clear zone을 확인하였다.

(3) Extracellular activity를 측정하기 위해 DNA가 첨가된 Nucleic acid hydrolysis medium을 이용하였다. 배양 후 0.1 N HCl 시약을 주변부에 떨어뜨려 생성되는 clear

zone을 확인하였다.

(4) Carbohydrate 분해능을 측정하기 위해 lactose, maltose, xylose 또는 sorbitol을 약 0.5%, bromcresol purple 0.002%를 첨가한 당분해능 측정용 배지를 이용하였다. 배양 후 배지의 색을 황색으로 변화시킨 경우 carbohydrate 분해능이 있는 것으로 판정하였다.

나) 포자 형성능력 및 경쟁력

현미경(Axioskop, ZEISS, Germany)을 이용한 경시적 관찰에 의해 포자 형성 능력을 측정하였으며 경쟁력 측정은 후보균을 각각 PDA에 2 균주씩 점배양 하여 25℃에서 배양 하면서 상대적인 생육속도 및 동일배지에서의 생육속도와 점유율에 따른 경쟁력을 측정하였다.

다) 항균활성 실험

항균활성은 Modified agar plug 방법과 ADT (agar diffusion test)를 병행하여 측정하였다.

(1) 시료 준비

YES (yeast extract sucrose) plate에 균주의 생육 속도에 따라 각각 14일, 21일 동안 25℃에서 배양하였다. 배양된 균은 100 ml의 MeOH를 첨가하고 blender를 이용하여 마쇄한 후 여과하여 감압농축기(EYELA SB-651, JPN)를 이용하여 농축하였다.

(2) ADT 수행

분리주들의 항균활성을 확인하기 위해 agar diffusion test (ADT)를 수행하였다. 배지는 BHI(brain heart diffusion)과 NB(nutrient broth)를 사용하였으며 시험균주는 그람양성균으로 *Listeria monocytogenes* ATCC 19113, *Staphylococcus aureus* KCTC 1916 을 그람음성균으로는 *Escheria coli* O157:H7 ATCC 43895, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 를 이용하였다. 우선 paper disc(Whatman, Φ 8 mm)에 시험액을 50 μ l씩 적하하여 무균 상태에서 건조시킨 후 시험균주가 도말된 배지 위에 올려놓고 25℃에서 18시간 이내에 paper disc 주변에 저해환이 형성되는 것으로 항균활성 여부를 판단하였다.

(3) Modified agar plug method

곰팡이 후보균을 PDA에 도말하여 배양 후 직경 8 mm의 cork borer를 이용하여 agar plug를 준비하였다. 미리 시험미생물을 도말시킨 plate에 곰팡이가 생육된 agar plug를 끼워 넣고 30℃에서 24시간 배양하여 생성되는 저해환을 측정하였다.

4) Starter 후보균의 생물학적 안전성 실험

곰팡이 균주의 생물학적 안전성을 위한 실험으로 MTT assay 및 *Artemia salina* test 의 생물학적 검증방법을 실시하였으며 starter 후보균의 돌연변이원성을 검증하기 위해 Ames test를 수행하였다.

가) 시료 준비

YES broth 200 ml에 spore suspension (10^6 spores/ml)을 0.1 ml 넣고 14일 동안 배양하여 충분히 균사가 형성되도록 하였다. 배양 후 Whatman No. 41로 여과하여 배양여액은 chloroform으로 5회 연속 추출하였다. 균사체(mycelium)은 동량의 methanol을 넣고 blender를 이용하여 5분간 마쇄한 후 Whatman No. 41로 여과하고 여액을 농축하였다. 농축된 배양여액과 mycelium은 각각 5% DMSO (Dimethyl sulfoxide)와 PBS buffer(pH 7.4)에 100 mg/ml에 녹여 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

나) *Artemia salina* (Brine shrimp) bioassay

(1) Brine shrimp 준비

Solis 등(1993)의 방법을 변형하여 측정하였다. 우선 brine shrimp egg (Parker international Inc., USA) 100 mg을 탈수시킨 후 100 ml의 artificial seawater(NaCl 30 g, Dinatrium Glycerophosphate 3 g, CaCl₂ 0.3 g, MgSO₄ 0.5 g, MgCl₂ 1.5 g, KCl 0.8 g, MgBr₂ 0.1 g, Glycine 6 g, Distilled water 1L)에 형광을 조사하였으며 27°C, 140 rpm으로 진탕시켜 24시간 동안 배양하였다.

(2) Bioassay

최종 실험 부피인 1 ml로 조정하기 위해 부화액을 200 shrimps/ml이 되도록 모은 후 부화액을 각 48 well에 100 ul씩 옮겨 well당 shrimp이 약 20~30 shrimp가 되도록 하였다. Well에 shrimp를 옮기기 전에 준비된 시료 100 ul를 disc pulp (8 mm)에 주입시킨 후 멸균상태로 건조시키고 각각의 well에 넣어주었다.

Negative control로는 PBS를 positive control로서는 ochratoxin A를 0.1, 1, 10, 100 ug/well로 이용하였다. 각 plate를 parafilm으로 밀봉하고 27°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후 brine shrimp larvae를 binocular microscope로 확인하여 약 10초간 관찰하는 동안 움직임을 보이는 않는 larvae의 사멸수를 측정하여 사멸률을 산출하였으며 3회 반복하여 10% 이내의 사멸률을 나타낸 경우 비독성으로 판정하였다. 사멸률의 계산을 위한 Abbott의 식은 다음과 같다.

사멸률 (P) = 시료의 사멸률(Pi) - control의 사멸률(C) / 1 - control의 사멸률(C) X 100

다) Cell cytotoxicity

(1) Cell line

MTT(3- [4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay를 위해 liver hepatoblastoma인 HepG2 ATCC HB-8065와 kidney cell인 vero KCLB 10081을 사용하였다. Cell 배지로는 10% FBS + 1% antibiotic + 1.5 g sodium bicarbonate를 첨가한 MEM (Minimal Eagle's medium, GibcoBRL 12100-046, USA)과 RPMI 1640 (GibcoBRL 31800-022, USA)를 이용하였으며 5% CO₂, 습도 100%, 37°C 조건에서 배양하면서 1주일에 2~3회 정도 계대하였다. 계대하면서 cell이 충분히 바닥에 부착되어 자라며 10⁶~10⁷ cells/ml이 되도록 배양하였으며 trypsin-EDTA로 처리한 후 cell을 수확하여 실험에 사용하였다. 시료는 5% DMSO를 이용하여 완전히 현탁시켜 준비하였다.

(2) MTT assay

96 well cell culture dish에 vero cell의 경우 1 X 10⁴ cells/well, HepG2의 경우 1 X 10⁵ cells/well이 되도록 seeding하고 24 시간동안 배양하였다. 24 시간 후 준비된 crude mycotoxin 추출물을 각각의 well에 최종 부피의 10%로 주입하고 48 시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 후 2.5 mg/ml의 농도로 준비된 MTT 시약을 10 ul/well 처리하여 MTT가 생존 세포의 효소작용에 의해 formazan으로 환원되도록 하였다. 3시간 후 상등액을 제거하고 DMSO를 150 ul/well 처리하여 10분 동안 실온에 방치한 후 microplate reader (BIORAD, 550)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라) Ames test

Direct plate incorporation 방법으로 수행하였다. 시험균주로는 *Salmonella typhimurium* TA100, *S. typhimurium* TA1535 균주를 이용하였으며 양성 돌연변이 물질로는 sodium azide(Sigma)를 2 ug/plate, 음성 대조군으로는 멸균 증류수를 이용하였다. 시험결과는 3회 반복 실험하여 얻은 revertants가 음성대조군의 2배 이상인 경우를 양성으로 하였다.

3. 실험 결과

가. Fungal starter 후보균의 형태·생화학적 특성 및 선별

1) Starter 후보균의 균학적 및 생육 특성

가) 중국에서 구입한 12 종의 sufu에서 생육특성 및 배지에서의 성장 특성에 따라 분류하고 각기 다른 특성을 보이는 19종을 분리하였다. 각 균종의 색, 기균사의 발달 유무, 색소 생산 및 생육 속도, 표면 구조, 번식 기관의 형태, 격벽 등 형태학적 특성에 따라 분리하였으며 그 결과는 다음 Tab 2-1과 같다. 분리된 곰팡이 19주의 생육 특성을 확인한 결과 성장은 빠르나 균종의 색이 고르지 못하거나 녹색 또는 황색으로 starter의 색으로 적합하지 않으며 대부분 *Aspergillus* 속으로 동정되어 NFS 제조에 부적합한 것으로 판단되었다.

Table 2-1. Characteristics of fungal strains isolated from Sufu

Isolated strain	Relative growing rate ¹⁾	Shape and color of mycelia
W3WP	fast	dark yellowish grass
XM7CY	fast	downy, white
W3YO	slow	downy, yellowish white
C6M	slow	grass, yellowish white
XG2'	fast	floccose, yellowish white
XG2WP	middle	floccose, yellowish-green white
W3WO	middle	yellowish white
H3CM	fast	yellowish grass
ZS7WH	fast	grass, fluorescent-yellow drop on gin area
GB7'	fast	yellowish grass
H3WH	fast	floccose, yellowish green
H3IY	fast	fine down, deep green
GB3YM	middle	fine deep green
GH3WCH	middle	cotton dark green
GM3CYM	middle	yellowish white
W3RO	fast	orange
XM2YM	fast	yellowish orange

¹⁾fast: covered completely when incubated on PDA during the 3rd-7th days, midium: covered completely during the 8th-12th days, slow: covered completely during the 13th-17th days

나) NFS 발효시 환경적 원인에 의해 생성되는 곰팡이를 분리하였으며, 그 결과 *Aspergillus oryzae*와 *Aspergillus niger*로 동정하였다. 이 두 종의 곰팡이는 강한 protease 활성을 가지나 제품에 적합한 향미를 주지 못하며 포자의 색도 적합하지 않아 후보균에서 제외되었다.

라) 분양받은 곰팡이를 각각 PDA, MEA, Czapek, DRBC에 배양하여 생육특성을 검토 하였으며(data not shown) 그 결과 모든 배지에서 white, yellow white, greyish white, creamy white등의 색을 가지며 집락의 형태가 벨벳형 또는 솜털형으로 고르며 비교적 빠른 성장을 보이는 6개의 균주를 1차 선별하였다.

마) Cheese와 meat starter로 사용되고 있는 상업적 starter를 CHR HANSEN으로부터 구입하여 적합성을 검토하였으며, 그 결과는 다음 Tab. 2-2와 같다.

Table 2-2. Compositive and characteristics of commercial starters purchased from CHR.HANSEN

Product name	Color	Composite microorganism	Characteristics
GEO CA	cream white	<i>Geotrichum candidum</i>	aminopeptidase
GEO CB	cream white	<i>Geotrichum candidum</i>	aminopeptidase
GEO CD1	very white	<i>Geotrichum candidum</i>	aminopeptidase
GEO CE	cream white	<i>Geotrichum candidum</i>	aminopeptidase
M-EK-72 Bacterferm	white/light greyish	<i>Penicillum nalgiovense</i>	lipolytic, proteolytic
M-EK-4 Bacterferm	white/cream	<i>Penicillum nalgiovense</i>	lipolytic, proteolytic
M-EK-6 Bacterferm	white/light greyish	<i>Penicillum nalgiovense</i>	lipolytic, proteolytic
PCA 1	very white	<i>Penicillum candidum</i>	good aging
PCA 3	white	<i>Penicillum candidum</i>	anti-mucor
PCA FD	white	<i>Penicillum candidum</i>	anti-mucor

2) Starter 후보균의 생리·화학적 특성 및 선별

가) 생육 특성

(1) 생육속도

생육 속도는 *Actinomucor elegans*, *Rhizopus oligosporus*, *Penicillium camemberti*, *P. caseicolum*, *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* 순으로 나타났다. *A. elegans*의 경우 배양 후 1일이 지나면 균사의 집락이 0.2-0.3 mm 정도 형성되며 5일에는 완전히 plate에 증식되는 경향을 보였다. 또한 *R. oligosporus* 경우 7일에는 완전히 성장하며, *Penicillium* 속의 경우 14일 정도 배양기간이 걸리는 것으로 측정되었다. 또한 온도에 따라 생육 속도에 차이를 보였으며 시험된 모든 starter 후보 곰팡이의 생육이 가장 빠른 온도는 25℃로 나타났다. 그러므로 실험균주 모두가 NFS 제조의 발효 온도인 25℃에 적합한 것으로 확인되었다.

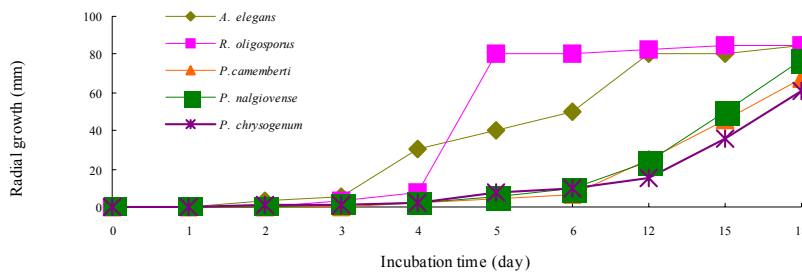


Fig. 2-1. Growth rates of fungal starters tested

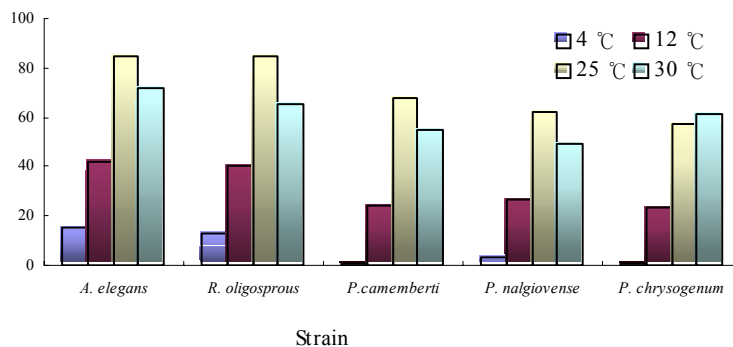


Fig. 2-2. Radial growth under the different conditions of temperature

(2) 균총의 색, 색소 생산, 균사의 밀생 정도

분양주 18주 및 분리주 22주를 각각 DRBC, MEA, PDA, Czapek media에 3점 배양하여 균총의 색, 색소생산, 균사의 밀생 정도를 확인하였다(data not shown). 그 중 *Penicillium camemberti*와 *P. caseicolum*, *P. nalgiovense* 등이 아래 Fig. 2-3과 같이 white, yellowish white, grayish white를 가지며 밀생하는 것으로 나타나 후보균으로서의 가능성을 확인하였다.

(1)



(2)



Fig. 2-3. Examples of cultured morphology on BRBC, MEA, PDA and Czapek

(1) *Penicillium camemberti* KCTC 6429

(2) *Penicillium caseicolum* KCTC 6041

from the left to the right: BRBC, MEA, PDA, CY plate

3) Starter 후보균의 유용성 검증

가) 효소활성

(1) 당분해능

당에 대한 곰팡이 후보균의 분해 활성을 측정한 결과 *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605의 경우 maltose 및 lactose에 대해 강한 분해활성을 갖는 것으로 확인되었다.

Table 2-3. Carbohydrate hydrolysis activity of fungal starter candidates

Isolate No.	Hydrolysis activities of carbohydrate			
	Xylose	Maltose	Lactose	Sorbitol
60415	+	-	-	-
6429	-	-	-	-
1233	-	-	NG	NG
1995	-	-	NG	-
34767	-	-	-	-
62858	(+)	(+)	(+)	(+)
844	-	-	NG	-
6041	NG	NG	NG	-
897	-	+	-	-
60393	-	++	-	-
11269	+	-	-	-
11275	-	NG	NG	NG
11605	-	++++	+++++	+
1145	-	-	NG	-
1174	-	-	NG	-

All tests were duplicated

NG: not grown

-, negative reaction; +, weak positive reaction; ++, positive reaction; +++, strong positive reaction



Fig. 2-4. Carbohydrate hydrolysis activity of fungal starter candidates

left: strong positive, right: negative

거대분자 분해능 실험결과는 다음과 같다. Fatty acid esterase 활성은 대부분 양성 반응을 보였으며 *Penicillium camemberti* DSM 1995의 경우 casein과 starch 이용능, DNase 활성이 우수하며 *Rhizopus oligosporus* KCCM 11275, *R. oligosporus* KCCM 11605는 starch 분해능이 매우 강한 것으로 나타났다.

Table 2-4. Enzyme activities of fungal starter candidates

Strain	Lipid		cellulose	casein	starch	DNA
	Tributylin	Esterase				
60415	(+)	-	-	-	+	-
6429	+	++	-	+	+++	+++
1233	NG	-	-	-	+	NG
1995	+	+++	-	+++	+++	+++
34767	++	+++++	-	-	+++	+
62858	+	++	-	-	++	-
844	-	-	-	(+)	-	-
6041	-	++	-	+	-	-
897	+	++	-	++	+	++
60393	(+)	+++++	-	-	-	-
11269	+	+++++	-	+	-	-
11275	+	+++++	-	-	+++++	-
11605	++	+++++	-	+	+++++	-
1145	++	NG	-	-	+	-
1174	++	+++++	-	-	+	-

All tests were duplicated

NG: not growth

- : negative reaction, + : weak positive reaction, ++: positive reaction, +++: strong positive reaction

(1)



(2)



(3)



(4)



Fig. 2-5. Enzyme activities of fungal starter candidates

(1) casein hydrolysis (2) DNase activity

(3) esterase activity (4) starch hydrolysis

(1), (2) left: negative, right: positive

(3), (4) left: positive, right: negative

나) 경쟁력

Starter 후보 곰팡이를 2균주씩 2점 배양하여 경쟁력을 측정한 결과 상대균주에 대한 저해능력을 보이는 균주는 없는 것으로 확인되었으며, 경쟁력은 생육속도에 비례하는 것으로 확인되었다. 즉 생육 속도가 빠른 *Actinomucor elegans*, *Rhizopus microsporus*의 경우 *Penicillium camemberti*, *P. caseicolum*, *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* 등에 비해 빠른 배지 점유율을 보였다.

다) 항균활성 실험

Modified agar plug method를 이용하여 항균활성을 측정한 결과 *Penicillium chrysogenum* KCTC 34767의 경우 *E. coli* O157:H7 ATCC 43895에 대해 17 mm의 항균활성을 나타내었으며 *P. roqueforti* KCCM 11269의 경우 agar plug 주변에 미약한 활성을 나타내었다. ADT (agar diffusion method)는 modified agar plug method 결과 항균활성을 나타낸 *P. chrysogenum* KCCM 34767과 *P. roqueforti* KCCM 11269를 제외하고 수행되었으며, 시험 대상 균주 모두 항균활성을 나타내지 않는 것으로 재확인되었다.



Fig. 2-6. Antimicrobial activity with modified agar plug method

left plate, from up to down *Penicillium chrysogenum* KCCM 34767, *P. roqueforti* KCCM 11269; right plate, turn to the left *P. camemberti* KCTC 6041, *P. caseicolum* KCTC 6429, *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605

Table 2-5. Antimicrobial activities of fungal starter candidates with modified agar plug method

Strain No.	Test organisms			
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 1916	<i>Escheria coli</i> O157:H7 ATCC 43895	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145
6041	-	-	-	-
6429	-	-	-	-
11605	-	-	-	-
1233	-	-	-	-
1995	-	-	-	-
11275	-	-	-	-
11605	-	-	(+)	-
34767	-	-	+++	-
11269	-	-	-	-

-, no activity; +, very weak (9-11 mm); ++, weak (11-14); +++, strong (14-17 mm); +++++, very strong (17-20 mm)

4) Starter 후보균의 생물학적 안전성 검토

효소활성 및 생육 특성 등의 검토 결과로부터 1차 선별된 *Penicillium caseicolum* KCTC 6041, *P. camemberti* KCTC 6429, *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605, *R. oligosporus* KCCM 11275, *P. camemberti* DSM 1233, *P. camemberti* DSM 1995, *P. nalgioiense* DSM 897, *Actinomucor elegans* DSM 63362 총 8균주의 mycotoxin 생산성을 확인하기 위해 MTT assay 및 *Artemia salina* test의 생물학적 검증방법을 실시하였으며, 그 결과는 다음과 같다

가) *Artemia salina* (brine shrimp) bioassay

각각 배양여액과 mycelium에서 추출된 배양 추출물(culture extract) 1 mg을 PBS(pH 7.4)에 현탁하여 100 ul (1 mg/ml)를 시험에 사용하였으며, positive control인 ochratoxin A (OTA)의 농도를 0.1, 1, 10, 100 ug/well로 하여 시험한 결과, OTA의 경우 1 ug/well에서 사멸률이 16% 이상으로 나타나 독성이 확인되었다. 곰팡이 starter 후보균의 배양추출물 시료의 농도를 각각 10, 20, 100, 1000 ug/well로 하여 시험한 결과 일반적으로 배양물보다 mycelium 추출물이 *Artemia salina*에 영향을 나타내는 것으로 확인되었다. 특히, *P. nalgioiense* DSM 897은 배양물과 mycelium 추출물 모두 1000 ug/well의 농도에서 사멸률이 10% 이상으로 나타났으며, mycelium 추출물의 경우 사멸률이 30% 이상으로 mycotoxin 생성 가능성이 있는 것으로 판단되었다. 각각 시료의 농도에 따른 *Artemia salina*의 사멸률은 Fig. 2-7과 같다.

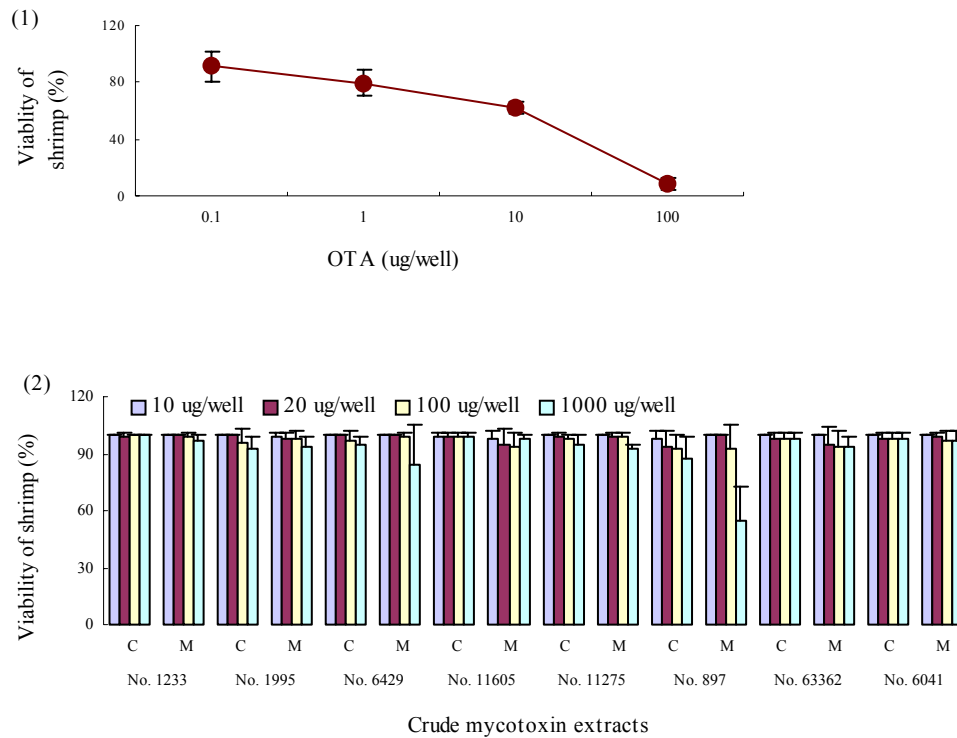


Fig. 2-7. Viability of *Artemia salina* exposed to ochratoxin A and crude mycotoxin extracts

(1) Ochratoxin A, (2) Culture extract

C: culture broth, M: mycelium

나) Cell cytotoxicity

Vero cell과 HepG2 cell에 대한 세포독성을 측정한 결과는 각각 Fig. 2-8, 2-9와 같다. 준비된 시료의 농도를 10%로 하여 48시간 처리 후 각 cell에 대한 cytotoxicity를 측정한 결과, positive control로 사용된 citrinin은 dose-related toxicity response를 나타내며 10 ug/ml의 농도에서 viability가 50% 이하로 독성을 나타내었다. Starter 후보균의 경우 *P. camemberti* DSM 1995, *Penicillium caseicolum* KCTC 6041, *P. camemberti* KCTC 6429의 경우 vero cell에 대한 cell viability가 80%, HepG2 cell에 대한 cell viability는 92% 수준으로 독성이 의심되었으며 *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605는 독성이 없는 것으로 확인되었다.

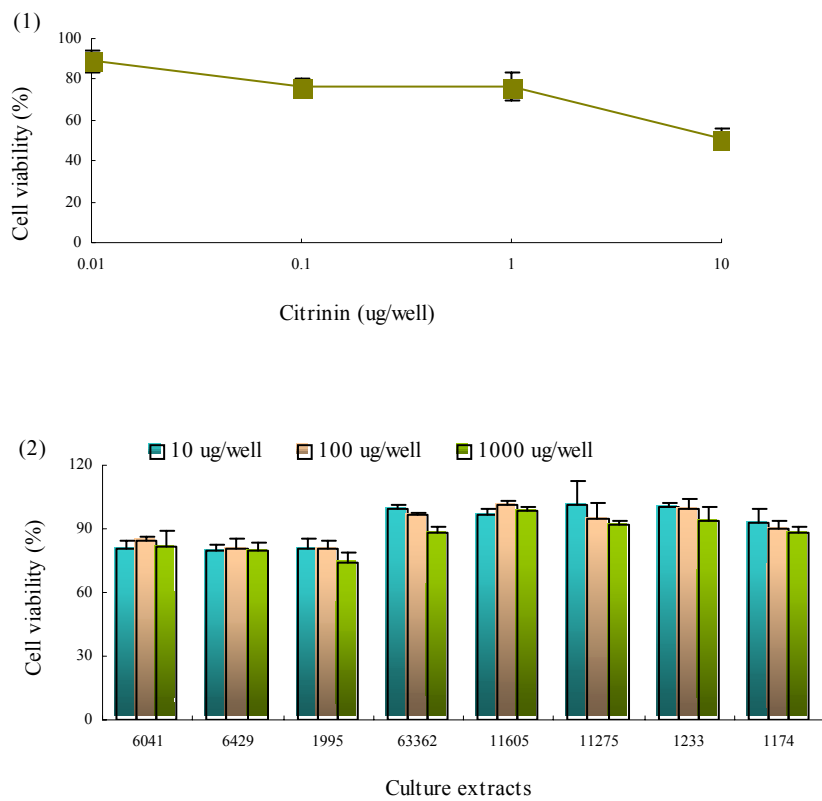


Fig. 2-8. Cell cytotoxicity of citrinin and crude mycotoxin extracts on vero cell (1) citrinin (2) culture extracts

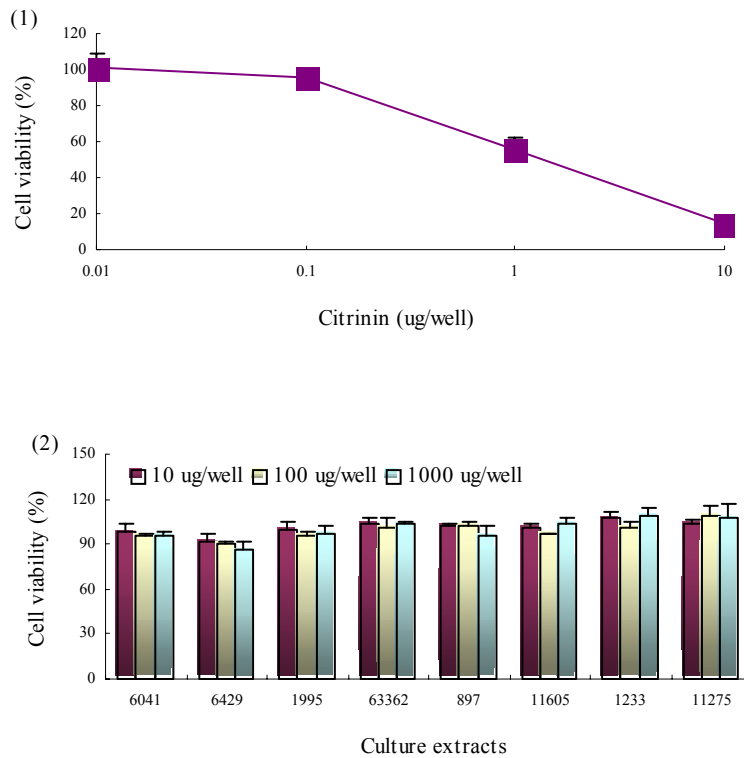


Fig. 2-9. Cell cytotoxicity of citrinin and crude mycotoxin extracts on HepG2 cell (1) citrinin (2) culture extracts

다) Ames test

Salmonella TA100, TA1538에 대한 돌연변이원성 결과는 Fig. 2-10과 같다. Starter 후 보균의 경우 positive control로 사용한 sodium azide에 비해 TA100과 TA1538균주 모두 현저히 낮은 revertants의 수를 나타냈다. 또한, TA100의 경우 negative control과 큰 차이를 보이지 않았으며 TA1538의 경우 2배가 넘지 않는 것으로 확인되어 돌연변이원성이 없는 것으로 판정하였다.

이상과 같이 안전성 시험들을 수행한 결과 총 8균주 중 *Penicillium nalgiovense* DSM 897, *P. camemberti* DSM 1995, *P. caseicolum* KCTC 6041, *P. camemberti* KCTC 6429의 경우 독성이 있는 것으로 판단되어 제외하였다.

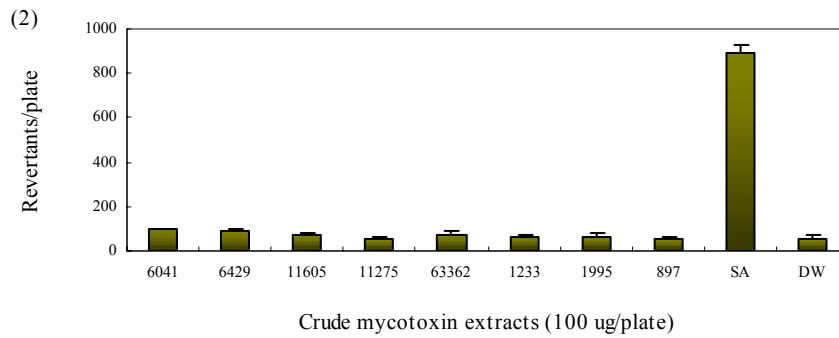
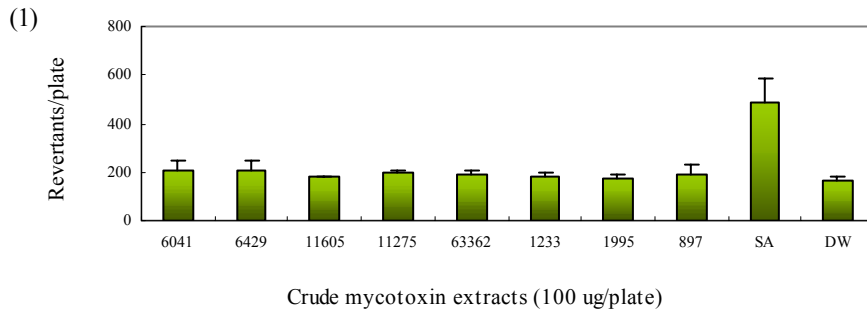


Fig. 2-10. Mutagenicity of crude mycotoxin extracts from fungal starter candidates in TA100 (1) and TA1535 (2).

Revertants are given as mean \pm SD of n = 3 plates.

제 3 절 NFS 제조 방법, 주원료, 첨가제의 특성 및 이용성 검토

1. 서론

식물성 단백질 중 대두 단백질은 동물성 단백질에 뒤떨어지지 않을 정도로 영양가가 높을 뿐만 아니라 저렴하여 우리나라를 비롯하여 여러 나라에서 동물성 단백질 대신할 수 있는 중요한 단백질원으로 이용되고 있다.

대두를 이용한 가공식품은 쌀 문화권 중심의 동남아시아에 널리 분포되어 있다. 최근 우리나라 뿐만 아니라 대만, 일본, 인도네시아 등 대두 가공식품을 많이 먹고 있는 나라의 성인병 발병률이 낮은 것으로 보고되고 있어 동양식 식생활에 대한 서구의 구체적인 관심이 증대되고 있다.

대두 가공 식품은 동아시아에 널리 분포되어 있으며 특히, 두부 발효식품으로 중국이나 대만의 두부유, 인도네시아의 taokoan, 필리핀의 tahuri, 태국의 tau hu yee, 일본의 tofuyo 등이 있고, 이 중 많은 연구가 진행된 중국이나 대만의 두부유는 *Actinomucor elegans*, *Mucor hiemalis*, *Mucor silvaticus*, *Mucor prairimi* 및 *Rhizopus chimenisis* 등의 유용 곰팡이를 두부 표면에 생육시켜 술덧과 소금용액을 섞은 침지액에서 숙성시킨 것으로 숙성이 진행됨에 따라 조직이 부드럽게 되어 치즈와 같은 감촉과 풍미를 가지며 soybean cheese라고 부르기도 한다. 또한 일본의 tofuyo는 두부를 건조시킨 후 *Monascus* sp.나 *Aspergillus* sp.의 국균을 찢쌀에 생육시킨 koji와 증류주 등을 섞은 침지액에 넣어 숙성시킨 것으로 감미가 있고 매끈매끈한 크림 형태의 두부 발효식품이다.

한편, 우리나라의 대두 가공식품은 비발효식품(non-fermented foods)과 발효식품(fermented foods)으로 분류된다. 비 발효식품으로는 콩을 볶아서 거피(去皮)하여 가루로 만든 콩가루, 대두를 수침, 마쇄하여 가열처리 후 제조하여 우유 대체용으로 식용되며 여러 종류의 생리 활성 물질을 가지고 있을 뿐만 아니라 콜레스테롤도 없어 우리나라를 비롯한 세계 여러 나라에서 천연의 건강식품으로 가치를 인정받고 있다. 또한, 가열처리한 두유액에 응고제를 가하여 만든 두부는 소화 흡수율이 96%로 생대두가 갖는 82%에 비해 소화 흡수율이 높은 편이며 단백질이 우유나 달걀 단백질의 85~95%정도로 육류나 치즈의 대용식품으로 이용되며 콜레스테롤과 유당이 없고 포화지방산의 함량이 낮아 다른 식품과 함께 조리하여 섭취하고 있다. 두유막(Soy milk Film, Soy Protein-Lipid Film)은 대두액을 일정한 온도로 가열시 형성되는 피막을 채취하여 이를 그대로 이용하거나 가소한 것으로 독특한 대두 가공식품의 하나이다. 현재 두유막은 일부가정이나 소규모 공장에서 전통적인 방법으로 제조되어 그 자체나 혹은 채소를 싸서 모양을 내어 전채(hors d'oeuvre)로 이용되며 soup이나 전골에 넣거나 topping용으로 사용되고 있다.

발효식품은 오래전부터 자연환경에 알맞게 만들어 왔으며 식생활에 중요한 몫을 차지하고 있다. 발효식품은 미생물의 효소활성으로 인해 원료보다 더 바람직한 식품으로 전환된 것이며 영양가와 저장성이 더 좋게 된다.

지금까지 연구된 대두단백질은 주로 된장, 고추장, 간장 이외에 증량제나 강화식품으로 활용되어 왔으며, 혹은 단순히 치즈 제조과정의 생산 방법을 모방하거나 유사한 외국의 발효식품을 흉내만 내는 정도에 지나지 않아 관능성이 현대인의 감각에 부응하며 과학적·위생적 및 저장성이 우수한 대두발효식품개발이 매우 필요한 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 풍부한 양의 대두단백을 이용하여 응고제 대신 젖산균을 이용한 젖산 발효를 통해 NFS를 제조하고 발효 및 숙성 탈수과정을 진행하는 제조조건을 실험하여 다양한 종류의 대두단백과 제조기술의 NFS 제조 적합성을 검토하여 원료를 선별하고 그 적절한 배합비를 검토하였으며 한정된 system내의 온·습도가 control 조건에서 미생물들의 동역학적 변화를 파악하여 생성된 젖산으로 하강하는 pH에 더불어 단계적인 탈수과정을 병행시키므로 저장성과 풍미가 우수한 NFS제조공정을 확립 하였다.

2. 재료 및 방법

가. NFS 제조방법 구축을 위한 초기 모델

1) 두부형: 대두유에 0.3%의 trans-glutaminase, 0.3%의 젖산균, 1%의 D-(+)-glucono-1,5-lactone를 첨가하여 3일간 발효하여 상층액을 제거하고 응고된 침전물을 충전하여 제조하였다.

2) 치즈형: 대두유와 대두단백을 5:1의 비율로 혼합한 후 0.3%의 trans- glutaminase, 0.3%의 젖산균을 첨가하였다. 3일간 발효기간 중 3 kg의 압력을 24 시간 가하여 방치한 후 수분을 제거하고 충전하였다.

3) 최소수분형: 대두유와 대두단백을 1:1의 비율로 혼합한 후 0.3%의 trans- glutaminase , 0.3%의 젖산균을 첨가하였다.

4) 수분형: 대두유와 대두단백을 4:1의 비율로 혼합한 후 0.3%의 trans- glutaminase , 0.3%의 젖산균을 첨가하였다.

나. NFS 원료 선별

1) 주 원료의 선별 및 배합비

가) 사용원료

NFS 제조에 적합한 원료를 선별하기 위해 사용된 시료는 ISP (Isolated soy protein), CSP (Concentrated soy product), soybean flour, 탈지대두박, 콩, textured vegetable, 대두단백, large particle (TVS-1), textured vegetable soybean protein small particle (TVS-2) 총 7 가지를 이용하였다. ISP와 CSP는 ADM (USA)로부터 구입하여 사용하였으며, soybean flour는 Sigma (USA)로부터 탈지대두박과 콩은 경동시장(서울)에서 구입하여 사용하였고, starter 배양을 위한 soymilk는 조치원(충남)시장에서 구입하여 사용하였다.

나) 선정된 대두단백의 배합비 분석

원료 선별결과 좋은 조직감을 보인 ISP (isolated soybean protein), CSP (concentrated soybean protein), TVS-1 (textured vegetable soybean protein, large particle), TVS-2 (small particle) 4종을 일차 선별하고 Tab. 3-1과 같이 soymilk의 함량을 달리하여 조직감을 분석하였다. 또한 각각 ISP와 CSP에 대한 TVS-1, TVS-2의 영향을 비교하기 위해 Tab. 3-2의 배합비로 분석을 수행하였다.

Table 3-1. Proportions of soybean proteins: soymilk

(1)		(2)	
ISP (g)	Soymilk (ml)	CSP (g)	Soymilk (ml)
50	50	50	50
	100		100
	150		150
	200		200
	250		250

(3)		(4)	
TVS-1 (g)	Soymilk (ml)	TVS-2 (g)	Soymilk (ml)
50	50	50	50
	100		100
	150		150
	200		200
	250		250

(1) ISP, (2) CSP, (3) TVS-1, (4) TVS-2

Table 3-2. Proportions of soybean proteins

(1)				(2)			
ISP (g)	TVS-1 (g)	TVS-2 (g)	Soy milk (ml)	CSP (g)	TVS-1 (g)	TVS-2 (g)	Soy milk (ml)
100	-	-	300	100	-	-	300
	-	-			-	-	
80	20	-	240	80	20	-	240
	-	20			-	20	
60	40	-	180	60	40	-	180
	-	40			-	40	
40	60	-	120	40	60	-	120
	-	60			-	60	
20	80	-	80	20	80	-	80
	-	80			-	80	
0	100	-	100	0	100	-	100
	-	100			-	100	

(1) Proportions of soybean protein ISP:TVS-1, TVS-2:soymilk

(2) Proportions of soybean protein CSP:TVS-1, TVS-2:soymilk

2) 기타 원료 및 첨가물의 배합조건

가) 결착제 선별

천연물로는 활성 gluten, 구아검, 난백분, 알과 옥수수 전분, whey를 사용하였으며 합성 첨가물로는 산성피로인산나트륨, 피로인산나트륨, 메타인산나트륨, 효소로는 activa super curd (Ajinomoto), 2종의 trans-glutamase (TG-PS, QR type: Ajinomoto)로 총 11종의 결착제를 농도를 달리하여 첨가하여 콩 단백질 조직에 미치는 영향을 관찰하여 최종 선정하였다.

나) 향미 개선을 위한 향료 선별

Nutmeg, MSG, tyroler-aroma glutamat (TAG)를 사용하였다. 콩단백을 기준으로 nutmeg 은 0.1~0.5%, MSG는 0.01~0.5%로 배합하여 관능검사를 통하여 비교하였다. TAG는 0.005~0.2%로 첨가하여 분석하였다. 각각의 함량은 다중시료 비교검사를 통하여 적절한 농도를 선정하였고, 3가지 첨가물간의 비교는 아무것도 첨가하지 않은 것 (control)과 함께 선호도 검사(ranking test)를 실시하여 선정하였다.

다) 가미를 위한 염의 선별

(1) 인산염류의 영향

메타인산염, 피로인산나트륨, 산성피로인산나트륨 3가지의 염류를 사용하여 바람직한 조직감을 비교하여 적합한 염류를 선택하기 위해 대조구로 trans-glutaminase를 사용하여 조직감을 비교하였다.

(2) 풍미 개선에 대한 소금의 영향

소금을 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 3%로 농도별로 달리 첨가하여 제조한 NFS를 다중시료비교검사(multiple comparison test)를 통하여 가장 적절한 첨가량을 선정하였다.

라) 기타원료의 종류 및 함량

(1) 조직 개선

선별된 4종의 대두단백에 대해 결합제로는 활성 gluten, 염으로는 alginic acid calcium salt를 사용하였으며, 활성 gluten은 콩단백을 기준으로 1~20%로 alginic acid calcium salt는 콩단백을 기준으로 0.01~1%로 혼합하여 제조하였고 NFS의 조직감 향상에 대한 영향을 분석하여 비교하였다.

Table 3-3. Proportions of coagulants: ISP, CSP, TVS-1 and TVS-2:gluten and alginic acid

ISP	CSP	TVS-1	TVS-2	단위 (%)	
				gluten	alginate
100	100	100	100	10	0.01
				13	0.05
				15	0.10
				18	0.50
				20	1.00

다. 적합한 casing 선별

인조 casing으로는 fibrous (Viskase, Φ 105 mm), cellulose (Devro Φ 70 mm), collagen (Devro, Φ 20 mm)을 사용하였다. 발효·숙성기간 동안 탈수가 잘 일어나고, 이수현상이 적절하며 점착이 잘 이루어지는 casing을 선별·사용하였다.

라. 가수량과 열처리 조건

시료에 적합한 가수량과 열처리 조건을 선택하기 위해 다음의 조건들을 수행하였다. 각각 가수량은 3, 5, 7, 9 배로 달리하여 수행하였으며 초기 오염균을 제거하기 위한 열처리 조건은 각각 65°C, 75°C, 95°C, 121°C, 가열시간은 각각 15, 20, 25, 30 min으로 하여 총 16가지의 조건으로 실험하였다.

Table 3-4. The volume of soymilk added and condition of heat treatment.

가수량(배)	열처리 조건(℃)	가열시간(min)
3	65	15
5	75	20
7	95	25
9	121	30

마. Starter 후보균의 선별

1) 젖산균 starter의 선별

*In vitro*에서 선별된 starter 후보균의 NFS내에서의 적합성을 재검토하기 위하여 콩 발효식품 분리주인 *Enterococcus faecium* S2C16, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DC24, 소시지 분리주인 *Lactobacillus curvatus* R8과 commercial starter인 *Microoccus* LS25 p.1, *Staphylococcus* LS1.1, *Lactobacillus* LK 30 p.4, F-2 총 7종의 starter 사용하였다.

2) 곰팡이 starter의 선별

가) 곰팡이 starter의 준비

곰팡이의 선별에 사용된 1차 선별 곰팡이인 *Penicillium caseicolum* KCTC 6041, *P. camemberti* KCTC 6429, *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605, *R. oligosporus* KCCM 11275, *P. camemberti* DSM 1233, *P. camemberti* DSM 1995, *P. nalgoivense* DSM 897, *Actinomucor elegans* DSM 63362 총 8균주 중 효소활성 및 생육 특성, 안전성의 확인된 *Rhizopus oligosporus* KCCM11605, *Penicillium camemberti* KCCM6429, *Penicillium caseicolum* KCTC6041 총 3종의 곰팡이를 NFS 제조에 이용하였다.

우선 충분한 초기 접종량(10^7 cells/g)을 확보하기 위해 본 실험실에서 고안된 방법을 이용하였다. 기질로는 호밀을 30% 첨가하여 제작한 빵을 이용하였으며 신선한 상태로 준비된 빵을 각각 1 cm²로 잘라 표면적이 최대가 되도록 조각들을 배치하여 배양용기에 넣어 먼전한 후 25℃에서 10일간 배양하였다. 배양 후 Bufferfield-phosphate buffer에 0.0001% triton X-100 용액을 제조하여 배양액에 충분히 잠기도록 넣은 후 2시간 동안 진탕시켰다. 진탕 후 배양여액을 멸균된 cheese clothe를 이용하여 여과하여 3000

rpm에서 20분간 원심분리한 후 멸균희석수로 3회 세척하여 준비한 후 10^9 cell/ml 이 되도록 희석하여 준비하였다.

나) 곰팡이 starter의 NFS에서 밀생 및 상호경쟁력

NFS를 제조한 직후로부터 각 예비 후보균의 colony 형성과 그 형태 및 밀생정도를 1일 간격으로 관찰하여 NFS의 casing 주변에 형성된 균사의 균일 도포 여부와 성장정도를 측정하였다. 또한 25°C, 상대습도 85~92% 저온실에서 곰팡이 스타터가 접종된 NFS를 방치한 후 잡균에 대한 경쟁력을 확인하였다.

다) NFS에서의 곰팡이 starter 적용 (*in vitro*)

NFS 원료를 petri dish에 고르게 넣은 후 배지 표면에 casing을 부착시켜 그 위에 곰팡이 스타터를 접종한 후 25°C, 98%의 항온항습기에서 3일간 발효시켰다. Colony가 생성되면 15~22°C, 82~95%의 온도와 습도로 항온항습기에서 7일간 숙성하였다. NFS 원료조직에서 나타내는 균사의 색 및 성장속도를 측정하였다.

바. 선별된 시료에 의한 최적 배합의 NFS 제조

1) NFS의 원료 배합비

NFS를 제조하기 위해 최종적으로 적합한 시료의 종류와 가수량, 열처리 조건을 선택하여 청국장에서 분리하여 선별한 예비 starter를 첨가하여 NFS를 제조하였다. NFS 제조 방법은 다음 Tab. 3-5와 같다. 원료의 배합비와 가수량의 차이 결과를 평가하기 위해 각각 ISP와 soybean flour, CSP와 soybean flour의 배합 차이와 soybean flour를 단독으로 사용하는 경우 가수량에 차이에 따른 조건을 위해 Tab. 3-7과 같이 실험하였다. 결착제의 종류 및 첨가량에 따른 NFS의 변화는 texture는 비슷한 결과를 나타냈으나, flavor의 차이가 크게 나타났기에 Tab. 3-6의 flavor profile에 따라 비교하여 선별하였다.

Table 3-5. Compounding of final NFS process

	ISP	Gluten	soy milk	starter
control	100	97	440	0
F-2 control	100	97	430	10

Table 3-6. Flavor profile for sensory evaluation of NFS

1st factor(no)	Flavor	2nd factor	
1	Animal, foul	0	-
		1	rancid
		2	sweaty
		3	putrid, foul
		4	sickening
		5	fecal
		6	sour milk
		7	animal
		8	urine
		9	sour, vinegar
		10	cheesy
3	Non-citrus fruit	0	-
		1	non-citrus fruit
		2	apple
		3	strawberry
		4	peach
		5	grape juice
		6	pineapple
		7	cherry
		8	fermented fruit
		9	banana
		10	sweet
5	Nutty	0	-
		1	popcorn
		2	nutty
		3	peanut butter
		4	grainy
		5	meaty
		6	fresh smoke
		7	yeasty
		8	brunt, smoky
		9	mouse
		10	-
6	Brown	0	-
		1	caramel
		2	maple
		3	molasses
		4	buttery
		5	honey
		6	chocolate
		7	malty
		8	coffee
		9	vanilla
		10	bakery
10	Citrus	0	-
		1	lemon
		2	grapefruit
		3	citrus
		4	orange
14	Coconut, almond	0	-
		1	coconut
		2	almond
		3	vanilla

Table 3-7. Conditions as proportion of soybean flour: ISP and soybean flour: CSP, soybean flour

Soybean flour(g)	ISP(g)	Soybean flour(g)	CSP(g)	DW (ml)	Soybean flour(g)	DW (ml)
40	0	40	0	160	40	120
30	10	30	10			160
20	20	20	20			200
10	40	10	40			240
50	0	50	0			280
40	10	40	10			320
25	25	25	25			360
10	40	10	40			400

Table 3-8. Conditions as proportion of ISP: gluten, total volume: soymilk

ISP(g)	Gluten(g)	Total volume(g)	soy milk(ml)
100	50	100	100
100	100	100	150
100	150	100	200
100	200	100	250

2) ISP, gluten, 대두유, 상업적 starter의 배합비

1~2차년도 실험결과 가장 적합하다고 판단되어지는 주원료로 ISP와 결합제 gluten이 사용 되었다. 이 원료들의 적합한 조합비를 선택하기 위해 다음의 조건들을 수행하였다. 각각 첨가량은 ISP를 기준으로 하였으며 결합을 위하여 Tab. 3-9에서와 같이 ISP 100에 gluten을 97, 92, 87, 82, 77을 첨가하여 NFS를 제조하였다.

Table 3-9. Representation profile of NFS component ratio

	ISP	Gluten	soy milk	starter
control	100	97	440	0
F-2 control	100	97	430	10
F2 A	100	92	430	10
F2 B	100	87	430	10
F2 C	100	82	430	10
F2 D	100	77	430	10
R8 control	100	97	390	50
R8 A	100	92	390	50
R8 B	100	87	390	50
R8 C	100	82	390	50
R8 D	100	77	390	50

4. 실험 결과

가. NFS의 제조방법 확립

1) 기본 NFS 제조방법 및 특성

NFS 제조는 치즈형, 두부형, 최소수분형, 수분형 제조방법을 실행하였으며 치즈형, 두부형의 경우 이수현상이 심하고 적절한 조직형성이 어려웠으며 과도한 젖산발효가 촉진되어 off-flavor가 형성되었다. 반면 수분형 제조 방법으로 NFS 가공하였을 경우 이수현상이 적고 젖산균의 생육이 충분히 활성화 되었다. 따라서 Fig. 3-1(4)와 같은 수분형 제조 방법을 최종 선택하였다.

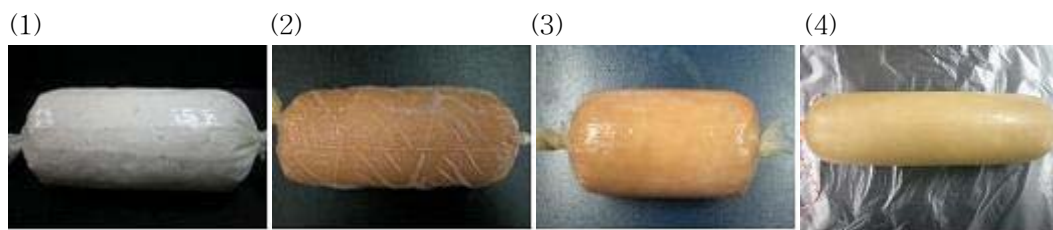


Fig. 3-1. NFS processed by variable method

(1) tofu type (2) chesse type (3) less water type (4) water type

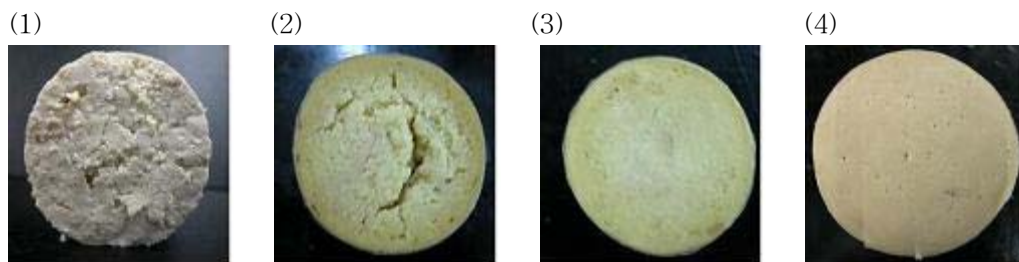


Fig. 3-2. The sections of NFS processed by variable method

(1) tofu type (2) chesse type (3) less water type (4) water type

나. NFS의 원료 선별

1) 주원료 선별 및 배합비 특징

(가) NFS의 주원료 선별

시험 starter를 배양·발효시켜 숙성 과정을 진행한 결과 향미나 조직감 면에서 ISP가 가장 우수하여 NFS제조에 가장 적합한 것으로 나타났다. CSP의 경우는 모두 texture면에서 우수하였으나 starter의 배양이 원활하지 않았으며 탈지대두박과 콩은 대두유 제조시 원료의 특성상 가수량이 많아 향미부분에서는 우수했으나 texture면에서 적합하지 않은 것으로 판단되었다. ISP와 CSP는 대두유와 1:4의 배합비율이 적절하였다.

TVS는 1:1이 비교적 적절하였으나 미생물 생육 및 충전시 공기 접촉으로 인한 마름현상을 줄이기 위하여 1:1.5가 가장 적합하였다. 또한 ISP와 TVS-1이 NFS제조에 적합하고 각 콩단백의 배합은 그다지 적절하지 않은 것으로 판단되었다. 제품 중 증량 효과를 위해 ISP와 soy flour를 혼합하여 제조한 결과 soy flour의 양이 많을수록 제품이 덩어리지는 경향을 보였으며 가수량도 증가하여 soy flour가 수분을 많이 흡수하는 것으로 판단되었다. 따라서 초기 실험 결과 ISP 단독으로 제품을 제조하는 것이 풍미나 조직, 미생물의 발효조건 면에서 가장 적합한 것으로 확인되었다.

2) 대두유 제조 및 첨가량

가) 대두유의 제조

콩과 탈지대두박을 원료로 하여 대두유를 만들 때 수침시간은 18시간, 수침기간 중 보관 온도는 25℃, 가수량은 수침의 경우 5배, 마쇄할 때 추가로 5배로 총 10배가 적당하며 가열조건은 95℃에서 30분간 가열할 때 충분히 가용성 물질을 얻을 수 있는 것으로 확인되었다.

나) 대두유의 열처리 및 첨가량

NFS에 첨가량은 4배가 가장 적합하며 이는 수분활성도나 숙성과정 중의 탈수공정 등을 기준으로 한 것이다. starter를 배양하기 전 열처리 조건은 단백질의 변성을 최소화하고 원료 중의 오염균을 제거하기 위한 온도로 80℃에서 30분간 가열처리하는 것이 가장 적합하였으며 95℃이상의 온도에서 10 min 정도 가열처리 할 경우 콩단백이 일부 변성되어 texture에 영향을 미치는 것을 확인 할 수 있었다.

3) 결착제 선별

다양한 종류의 결착제를 사용한 결과 Tab. 3-10과 같은 제품 특성을 나타내었다. starter에 의한 curd형성이 대조구에 비해 더 단단한 curd형성을 도와주는 것으로 판단되었으나 대부분의 경우 약간의 불쾌취를 유발하는 경우를 보였다. 결착제의 종류에 따른 시료의 형태 변화는 다음 Fig. 3-3과 같다. 결착제의 종류에 따라 콩 단백질이 응집된 형태를 보이거나 순두부 형태, 침전된 형태 3 가지로 관찰되었으며 transglutaminase와 corn starch의 배합을 달리한 결과 나타난 NFS의 풍미적 특성은 다음 Fig. 3-4와 같다. 활성 gluten은 콩단백을 기준으로 20% 첨가시 그 조직이 육에 가까워지는 것으로 확인되었다. 또한 알긴산 0.5%을 글루텐과 함께 첨가할 경우 조직감이 상승하는 것으로 확인되었다. 활성 gluten이 조직감이 가장 육에 흡사하고 전체적인 선호도도 가장 높은 것으로 판정하였다.

Table 3-10. Characteristic of curd formation by different coagulants

coagulant	Characteristic
Transglutaminase (3종)	전체적인 결착이 이루어짐, 부스러지는 형태 형성
Hydrocolloid (3종)	커드형성, 침전물과 수분층 및 거품층 확연히 분류
인산염 (3종)	전체적인 결착이 이루어짐, 부스러지는 형태 형성
난백분	커드형성, 침전물과 수분 및 거품 혼합층으로 분류
유청단백	커드형성, 침전물과 수분 및 거품 혼합층으로 분류
gluten	커드형성, 결착이 이루어짐 가장 안정적 상태
전분	커드형성, 침전물과 수분 및 거품 혼합층으로 분류

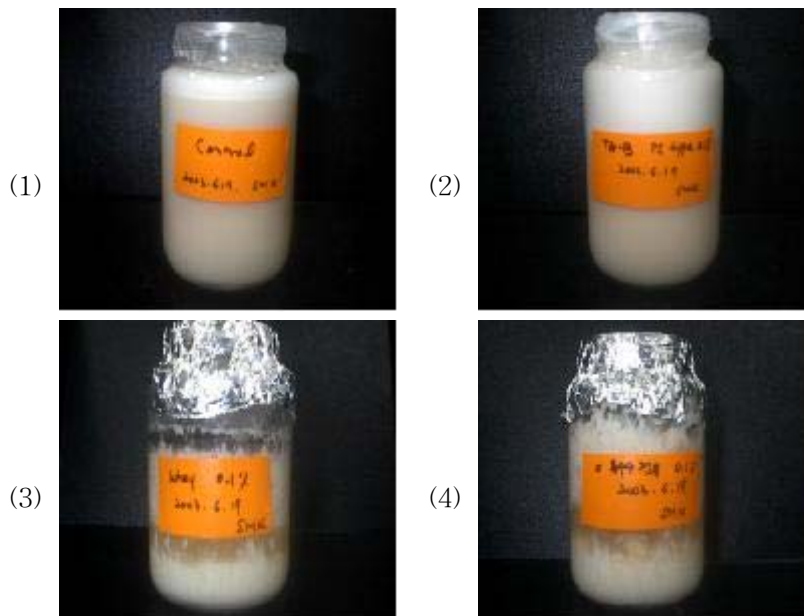


Fig. 3-3. Changes of pre-NFS after added the coagulants

(1) Control (2) Transglutaminase (3) Whey (4) Corn starch

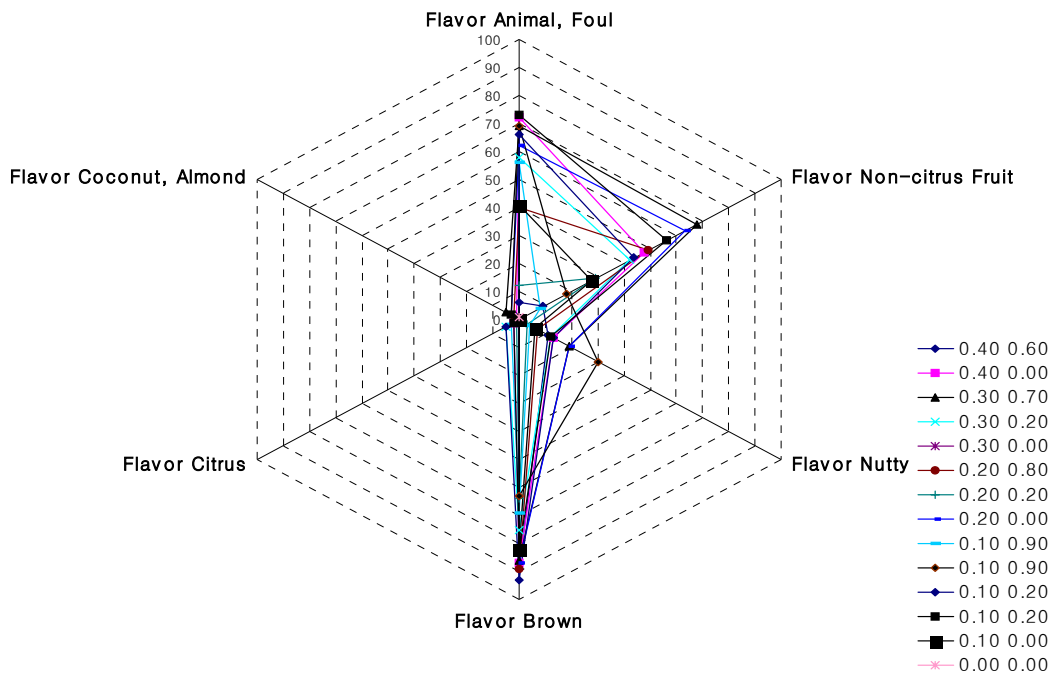


Fig. 3-4. Web graph NFS for flavor evaluation produced using different proportions of coagulant transglutaminase와 corn starch의 배합비를 %로 나타냄.

4) 첨가물의 종류 및 배합조건 확립

가) 염의 종류 및 첨가량

(1) 조직감 향상에 대한 인산염류의 영향

Tab. 3-11 에 나타난 바와 같이 인산염류 사용시 결착제로서 trans-glutaminase보다 활성이 떨어지며 관능검사에서도 낮은 수치를 나타내어 적절치 않다고 판단되었다.

Table 3-11. Sensory evaluation about phosphate for selection of desirable texture

Panel	Trans-glutaminase	Phosphate			Total
		meta-sodium phosphate	Na-pyro phosphate	Na-pyro phosphate (acid type)	
P ₁	0.30	-1.03	1.03	-0.30	0
P ₂	1.03	0.30	-1.03	-0.30	0
P ₃	0.30	1.03	-0.30	-1.03	0
P ₄	1.03	-0.30	0.30	-1.03	0
P ₅	-0.30	-1.03	1.03	0.30	0
P ₆	1.03	-0.30	-1.03	0.30	0
P ₇	-1.03	1.03	-0.30	0.30	0
P ₈	1.03	-0.30	-1.03	0.30	0
P ₉	1.03	-1.03	-0.30	0.30	0
P ₁₀	-0.30	-1.03	0.30	1.03	0
Total	4.12	-2.66	-1.33	-0.13	0

(2) 풍미 개선에 대한 소금의 영향

Tab. 3-12에 나타난 바와 같이 풍미 증진을 위해서는 1.5%의 소금 사용이 가장 적절하다고 판단되었다.

Table 3-12. Sensory evaluation as proportion of salt for desirable taste

Panel	Salt (NaCl)						Total
	0.10%	0.50%	1.00%	1.50%	2.00%	3.00%	
P ₁	5	5	3	4	4	3	21
P ₂	5	5	6	7	2	6	25
P ₃	5	9	2	9	6	4	33
P ₄	5	7	9	9	6	5	32
P ₅	5	1	2	5	8	5	24
P ₆	5	3	5	1	5	5	19
P ₇	5	7	7	4	4	7	27
P ₈	5	2	8	5	6	3	21
P ₉	5	7	8	8	5	4	29
P ₁₀	5	5	2	4	3	2	19
Total	50	51	52	56	49	44	250

나) 첨가물의 종류 및 함량

(1) 기타 첨가물에 따른 NFS의 특성

Nutmeg 0.02%(Tab. 3-13), MSG 0.05%(Tab. 3-14), TAG 0.2%(Tab. 3-15) 첨가시 선호도가 가장 높은 것으로 나타났다. 첨가물에 향미 향사에 미치는 영향을 검토한 결과 TAG가 대조구나 다른 2가지 첨가물에 비해 선호도가 높은 것으로 판단되었다.

Table 3-13. Sensory evaluation as proportion of nutmeg for selection of desirable flavor

Panel	Nutmeg					Total
	0.01%	0.02%	0.03%	0.04%	0.05%	
P ₁	6	5	5	4	1	21
P ₂	8	5	7	6	1	27
P ₃	4	9	8	3	7	31
P ₄	6	8	5	4	1	24
P ₅	1	4	5	3	2	15
P ₆	7	8	5	6	3	29
P ₇	2	5	5	4	3	19
P ₈	4	2	1	7	8	22
P ₉	4	6	1	5	8	24
P ₁₀	6	8	7	7	3	31
Total	48	60	49	49	37	243

Table 3-14. Sensory evaluation as proportion of MSG for selection of desirable flavor

Panel	MSG						Total
	1.5%	0.01%	0.05%	0.10%	0.30%	0.50%	
P ₁	5	4	4	5	3	3	20
P ₂	5	2	7	5	6	6	24
P ₃	5	6	9	9	2	4	26
P ₄	5	6	9	7	9	5	32
P ₅	5	8	5	1	2	5	21
P ₆	5	5	1	3	5	5	23
P ₇	5	4	4	7	7	7	30
P ₈	5	6	5	2	8	3	24
P ₉	5	5	8	7	8	4	29
P ₁₀	5	3	4	5	2	2	17
Total	50	49	56	51	52	44	246

Table 3-15. Sensory evaluation as proportion of TAG for selection of desirable flavor

Panel	TAG					Total
	0.005%	0.010%	0.050%	0.100%	0.200%	
P ₁	4	7	3	9	9	32
P ₂	6	2	6	5	7	26
P ₃	9	7	8	5	9	38
P ₄	4	5	5	4	4	22
P ₅	2	2	5	3	3	15
P ₆	7	3	2	5	8	25
P ₇	5	5	5	4	3	22
P ₈	8	8	5	8	5	34
P ₉	5	5	4	9	6	29
P ₁₀	2	4	7	3	8	24
Total	52	48	50	55	62	267

Table 3-16. Sensory evaluation as comparison of nutmeg, MSG and TAG for selection of desirable flavor

Panel	Control	Nutmeg	MSG	TAG	Total
P ₁	1.03	-1.03	0.30	-0.30	0
P ₂	-0.30	0.30	-1.03	1.03	0
P ₃	-1.03	-0.30	0.30	1.03	0
P ₄	-1.03	-0.30	0.30	1.03	0
P ₅	1.03	-1.03	-0.30	0.30	0
P ₆	-1.03	1.03	0.30	-0.30	0
P ₇	1.03	-0.30	-1.03	0.30	0
P ₈	-0.30	-1.03	0.30	1.03	0
P ₉	0.30	-1.03	-0.30	1.03	0
P ₁₀	-0.30	1.03	-1.03	0.30	0
Total	-0.6	-2.66	-2.19	5.45	0

(2) 조직 특성 개선을 위한 첨가물

Tab. 3-17에서와 같이 NFS 내부의 수분의 이수현상을 막기 위해 gluten과 전분을 첨가 하였으나 전분의 경우 수분의 이수현상을 막아주기는 하나 많은 수분이 NFS의 내부에 존재하게 되어 숙성이 진행되면서 NFS내부에 수분이 지나치게 많아지는 결과가 발생하였으며 gluten의 경우 조직감을 향상시켜주는 것으로 나타났으나 97 g 이상의 사용은 오히려 조직을 경화시키므로 97 g이하를 사용하도록 최종 선택하였다. Aw의 경우 큰차이를 나타내지는 않았으나 gluten이 첨가된 경우 starter가 첨가된 것에 비해 24h후 NFS내의 수분함량이 매우 감소한 것으로 확인되었다. Gluten이 NFS의 조직감 및 curd 형성에 큰 영향을 나타내었다.

Table 3-17. Representation profiles of NFS component ratio

	ISP	Gluten	starch	soymilk	starter	fructose
F2 control	100	97	0	430	10	3.2
F2 A-1	100	94	0	430	10	3.2
F2 A-2	100	91	0	430	10	3.2
F2 A-3	100	88	0	430	10	3.2
F2 B-1	100	79	15(7.5%)	430	10	3.2
F2 B-2	100	76	15(7.5%)	430	10	3.2
F2 B-3	100	73	15(7.5%)	430	10	3.2

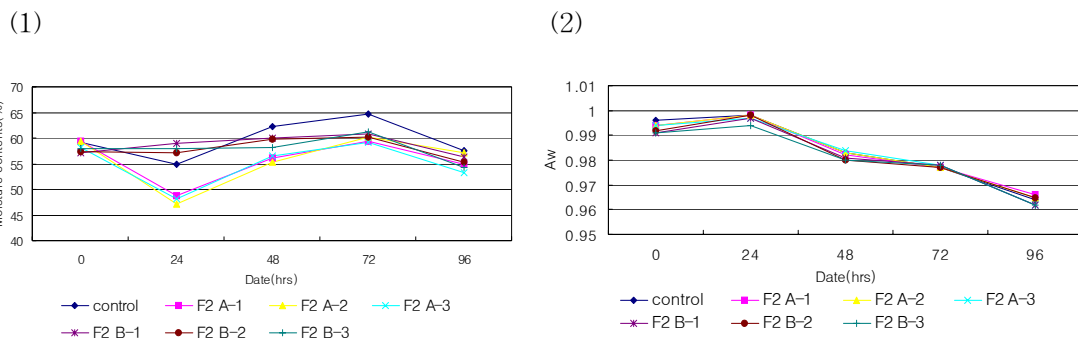


Fig. 3-5. Representation profiles of moisture contents and Aw in the NFS

(1) moisture contents in NFS (2) Aw in NFS

다. Casing의 종류에 따른 NFS의 제품 다양화 검토

Fibrous casing (Viskase, Willowbrook, USA)은 수분이 이탈이 용이하고 곰팡이 스타터 생육에 적절한 것으로 나타났다. Cellulose casing (Devro)은 수분의 이탈이 어려웠고 casing 표면의 마름현상이 심한 것으로 나타났다. Collagen casing (Devro, Moodiesburn, UK)은 수분이탈 및 곰팡이 생육에 적절하였다. 최종적으로 직경과 수분이탈 및 곰팡이 스타터 생육에 적절한 fibrous casing을 선정하였다.

라. 가수량과 열처리 조건

Tab. 3-18과 같이 총 16가지의 조건으로 실험한 결과 가수량은 3배 첨가시 적은 수분으로 인한 starter의 생육이 늦고 NFS의 제조가 용이치 않았다. 반면 5배 이상의 가수량은 NFS내의 과도한 수분으로 인하여 조직감이 좋지 않았고 starter의 과도한 생육으로 인하여 불쾌취를 유발하여 적적치 못하다고 판단하였다. 가수량을 4배로 하였을 경우 적절한 조직감과 starter의 생육이 안정되었다고 판단하여 최종적으로 가수량은 4배로 하였다. 또한 과도한 열처리는 콩단백의 변성을 야기시킴으로 121℃, 15분으로 최종 선정하였다.

Table 3-18. The volume of soymilk added and condition of heat treatment.

가수량(배)	열처리 조건(℃)	가열시간(min)
3	65	15
5	75	20
7	95	25
9	121	30

마. 최종 starter 선별

1) 젖산균 starter 선별

Enterococcus faecium S2C16, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DC24, 소시지 분리주인 *Lactobacillus curvatus* R8과 commercial starter인 *Microccus* LS25 p.1, *Staphylococcus* LS1.1, *Lactobacillus* LK 30 p.4, F-2 총 7종의 starter를 사용하였다. 이중에 가장 좋은 활성을 보인 F-2와 R8 starter를 사용하였다. 두 종의 starter 모두 6, 12, 24시간 soy milk에서 활성화 시킨 후 NFS제조에 사용하였다. 분리 균주에 비해 F-2는 모든 활성화 시간대에서 요구르트 향과 6시간 활성화에서는 10^7 , 12시간 활성화에서는 10^8 , 24시간 활성화에서는 10^9 의 균수를 나타내었다. 반면 R8은 활성화 시간대에서는 F-2보다 낮은 균수를 나타내었으나 향미가 F-2보다 떨어지는 것으로 판단되었다. 따라서 분리균주와 commercial starter인 F-2, R8 중 향미와 물성이 좋은 F-2를 최종 선별하게 되었다.

(1)



(2)



(3)



Fig. 3-6. The changes of NFS surface during fermentation and aging

(1) control (2) F-2 (3) R8

2) 선별된 곰팡이 후보균의 NFS에의 적용 및 최종 선별

(가) NFS real food system에서 starter의 특성

Rhizopus oligosporus KCCM 11605는 white colony를 나타냈고 포자가 밀생하였으며 균사가 위로 뻗어 자라는 특징이 있었다. *Penicillium camemberti* KCCM 6429는 벨벳형으로 균사가 성장하는 특징이 있었으며 숙성 중 부분적으로 푸른빛을 나타내었다. *P. caseicolum* KCTC 6041은 colony의 밀생정도가 낮은 것으로 확인되었다.

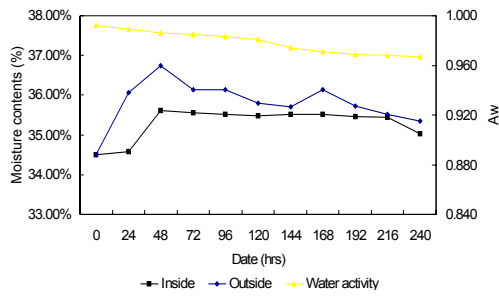
다) NFS에서의 곰팡이 starter 생육속도

Rhizopus oligosporus KCCM 11605의 경우 48~72 시간내에 NFS casing에 colony가 나타났고 균사 형성 후 완전 도포까지 5일이 소요되어 가장 빠른 성장을 보였다. 반면, *Penicillium camemberti* KCCM 6429와 *P. caseicolum* KCTC 6041은 colony 형성까지 4~5일이 소요되었고 균사 형성 후 완전 도포될 때까지 6~7일이 소요되었다. *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605는 비교적 빠른 생육속도로 인해 다른 잡균에 대한 높은 경쟁력을 보였다. *P. camemberti* KCCM 6429는 숙성 초기에 부분적 잡균오염이 있었으나 colony의 밀생으로 인해 숙성 중 접종균주에 의해 완전 도포되었다. *P. caseicolum* KCTC 6041은 부분적인 colony의 생육이 일어나며 느린 성장속도로 인한 오염이 쉽게 이루어져 경쟁력이 약한 것으로 판단하였다. 그리고 전체적으로 곰팡이 starter들 모두 casing 외부에 고른 도포가 되지 못하고 성장이 많이 더더 곰팡이 starter의 첨가는 바람직하지 않은 것으로 판단하였다.

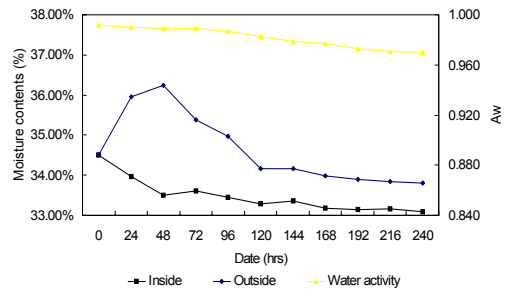
라) 곰팡이 starter를 적용한 NFS의 특징

제조된 NFS에 총 3종의 곰팡이 후보균을 접종하여 발효·숙성시키면서 수분활성도 및 수분함량 변화를 측정한 결과는 다음 Fig. 3-9와 같다. *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605의 경우 내부수분함량과 외부수분함량이 큰 차이를 보이지 않았다. 접종 24시간 후 NFS 내·외부 수분함량 차이는 2% 정도이며 이후 발효·숙성기간에도 $1\pm 0.5\%$ 정도의 낮은 차이를 보여 다른 곰팡이 starter보다 이수 현상을 줄이는데 큰 도움을 줄 것으로 판단하였다. 곰팡이 후보균은 충분한 균사를 형성하지 못하는 발효기간 동안에도 곰팡이 수가 지속적으로 증가하여 내부 젖산균 후보균에 의한 생육저해는 받지 않는 것으로 판단되었다. 곰팡이 후보균의 colony 및 균사가 도포되기 시작하는 숙성기간부터 *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605와 *Penicillium camemberti* KCCM 6429는 내부 젖산균 후보균과 비슷한 성장 속도를 나타냈다. 반면 *P. caseicolum* KCTC 6041을 접종한 NFS의 경우 숙성과정 중 불안한 생육곡선을 나타내며 pH가 올라가는 것으로 확인되었다. 그러나 전체적으로 곰팡이 starter들 모두 casing 외부에 고른 도포가 되지 못하고 성장이 많이 더더 곰팡이 starter의 첨가는 바람직하지 않은 것으로 판단하였다.

(1)



(2)



(3)

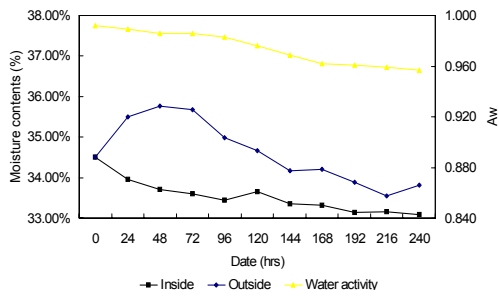
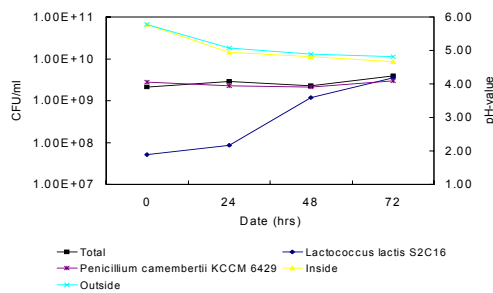


Fig. 3-9. The moisture contents in and outside the NFS with molds

(1) *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605 (2) *Penicillium camemberti* KCCM 6429

(3) *P. caseicola* KCTC 6041

(1)



(2)

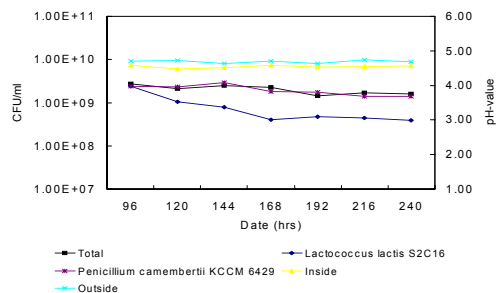


Fig. 3-10. Growth curve and pH-value of *Penicillium camemberti* KCCM 6429

(1) fermentation period (2) ripening period

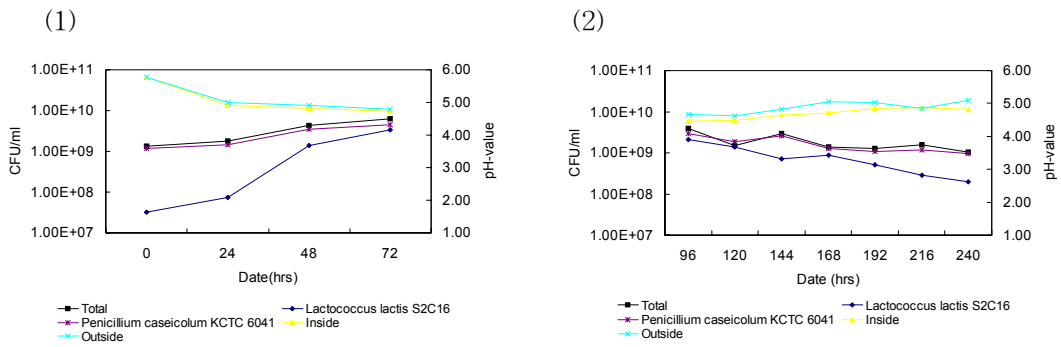


Fig. 3-11. Growth curve and pH-value of *Penicillium caseicolum* KCTC 6041

(1) fermentation period (2) ripening period

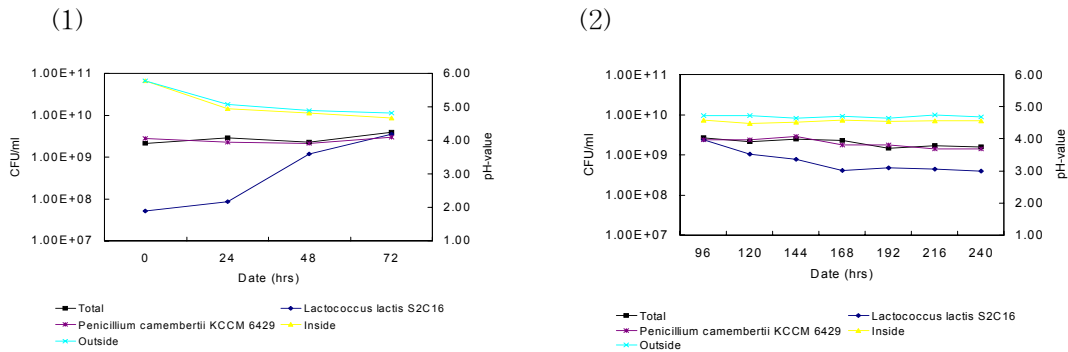


Fig. 3-12. Growth curve and pH-value of *Rhizopus oligosporus* KCCM 11605

(1) fermentation period (2) ripening period

바. 최종 NFS의 제조 방법 확립

1) NFS의 제조방법 확립

1~2차년도 에서의 NFS의 제조 방법은 Fig. 3-13의 수분 최소화 제조 방법을 기초로 하여 NFS를 제조하였으나, 최종 제품 제조방법은 수분형으로 대두유에 starter를 접종 하여 starter를 활성화(6, 12, 24 hr) 시킨 후에 NFS 제조에 사용하였다. 주원료로는 ISP와 조직감 형성에 도움이 되는 gluten으로 최종 선별하여 사용하였다. Starter의 생육을 위하여 당을 첨가하여 starter가 보다 빠르게 생육할 수 있도록 하였다. 최종 방법은 아래 Fig. 3-14와 같다.

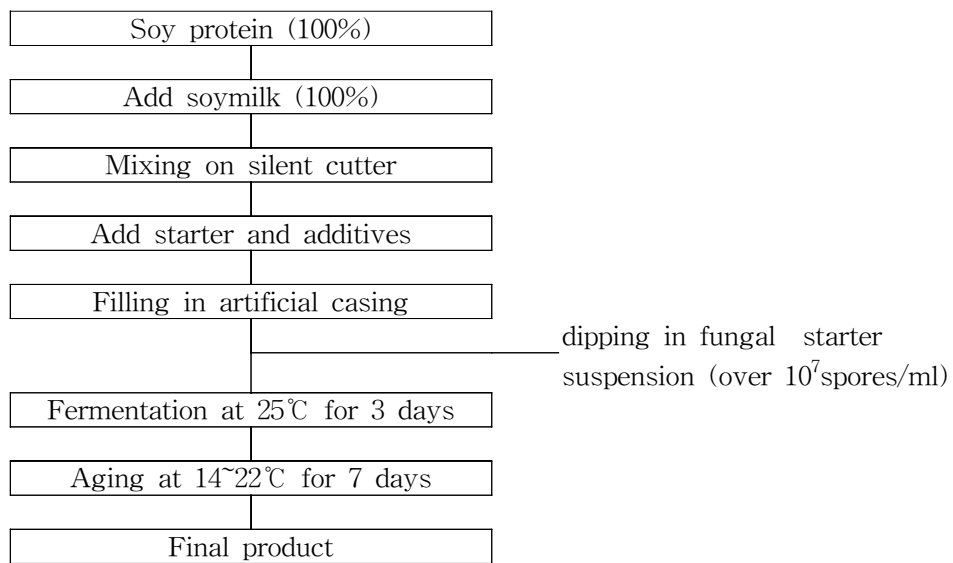


Fig. 3-13. Flow sheet of processing method of NFS (less water type)

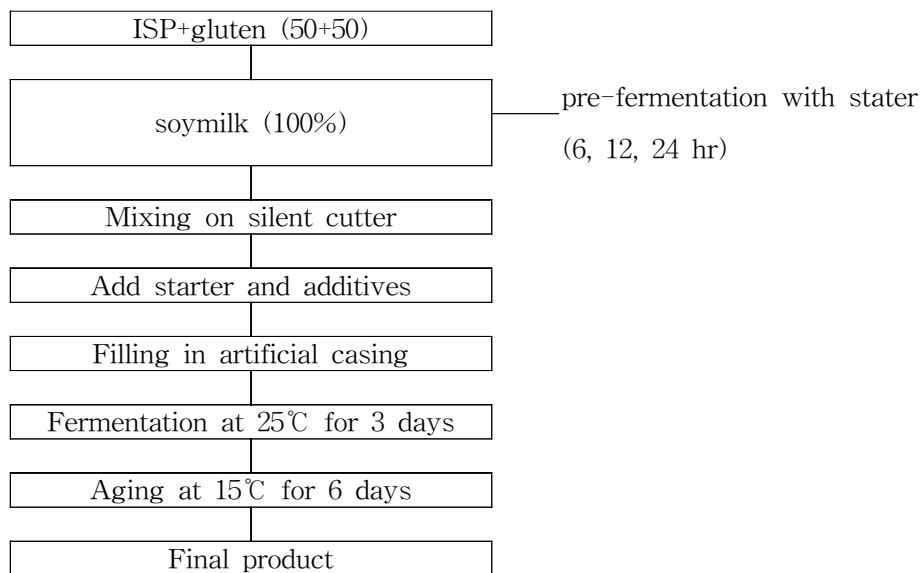


Fig. 3-14. Flow sheet of NFS processing method (water type)

제 4 절 NFS 제조 최적화를 위한 가공 공정 및 숙성, 발효 조건 최적화

1. 재료 및 방법

가. 발효 및 숙성 조건 확립

1) 발효·숙성(발효, 숙성시간, 온도, 습도, 공기유동) 확립

가) 발효와 숙성시간 확립

NFS matrix에서 내부 젖산균의 생육곡선이 정지기에 들어가는 시점까지를 발효로 판단하였다. NFS 10 g을 채취한 후 90 ml의 3차 증류수에 peptone 0.1%, NaCl 0.75%를 첨가하여 희석한 후 MRS 배지에서 균수를 측정하였다. 숙성시간은 NFS 조직에서 curd 형성 후 충분한 이수를 통한 조직을 갖는 시기를 숙성 종료시기로 판단하였다.

나) 온도, 습도 및 공기유동 조건 확립

발효 중 온도, 습도, 공기유동은 NFS에서 이수현상을 최소화하고 내·외부 스타터들의 생육에 저해를 주지 않는 조건을 적점으로 판단하였다. 숙성중 온도, 습도, 공기유동은 탈수현상에 의해 casing의 형태변화가 일어나지 않으며 외부 곰팡이 스타터의 생육을 지속하는 조건을 적점으로 판단하였다.

2) 발효와 숙성과정 중 적합한 시간과 온도의 선별

NFS의 발효와 숙성기간에 따른 적절온도와 최적 발효 숙성 기간을 결정하기 위하여 Tab. 4-1의 방법을 기초로 하여 Tab. 4-2와 같이 실험하였다. Casing에 filler를 이용하여 충전시킨 NFS를 향온·향습기에서 숙성시켰다. 발효 및 숙성 과정은 온도, 습도 변화에 따른 미생물학적 변화와 물리화학적 변화를 검토하였다. 최종적으로 산업적 규모의 발효실과 숙성실을 이용하여 최적의 가공조건을 확립하였다. 3절에서 선별된 배합비로 제조된 NFS를 온도, 습도 변화에 따른 미생물학적 변화와 물리화학적 변화를 검토하였다.

Table. 4-1. Condition of the fermentation and ripening

condition	발효 및 숙성 온도(℃)	발효 및 숙성 저장기간(일)
1	20	5
2	25	6
3	30	7
4	37	-

Table. 4-2. Condition of the fermentation and ripening

condition	발효 온도(℃)	숙성 온도(℃)	발효 저장기간(일)	숙성 저장기간(일)
1	25	15	2	4
2	25	15	2	6
3	25	15	3	4
4	25	15	3	6

나. NFS 품질 평가

1) 제품의 품질 평가

NFS 제조하고 그 적합성을 검토하기 위해 수행된 관능검사는 다음 Tab. 4-3을 기준으로 하여 훈련받은 패널 10명이 실시하였다. 시판되는 콩 소시지 5종의 관능검사 결과 기호도가 우수한 V상의 콩 소시지를 기준시료로 선정하였다.

Table 4-3. Szczesniak의 조직감 특성 분류법에 따른 Texture profile.

기계적 특성 요소		
	일차적	이차적
1	Hardness	일반적 표현 무르다 ↔ 굳다 ↔ 단단하다
2	Cohesiveness	Fracturability 부스러진다 ↔ 깨어진다
		Chcewiness 연하다 ↔ 쫄깃쫄깃하다
		Gumminess 푸석푸석하다
3	Viscosity	묽다 ↔ 진하다 ↔ 되다
4	Springiness	탄력이 없다 ↔ 말랑말랑하다
5	Adhesiveness	미끈미끈하다 ↔ 끈적끈적하다

2) 향미 성분, 관능성 검사

관능검사는 다중시료비교검사와 순위검사를 이용하여 제품의 호감도를 파악하였다. 이후 관능검사 결과를 F-분포표에 따라 유의성을 파악하였으며 순위검사에서 점수 환산 기준으로 순위데이터 점수 환산표를 이용하였다.

2. 실험 결과

가. 초기 제조된 NFS의 발효·숙성과정 중 pH와 미생물학적 변화

NFS의 발효과정 중 pH 변화는 다음 Fig. 4-1과 같다. 초기 원료의 pH가 7.0이며 starter를 첨가한 지 하루만에 pH가 5.0으로 감소하는 경향을 보였다. 발효 이틀째부터는 pH 4.5까지 감소하며 이 때부터 curd가 형성되었다. 발효과정 중 미생물학적 변화는 Fig. 4-2와 같다. *Micrococcus* LS25 p.1, *Staphylococcus* LS1.1, *Lactobacillus* LK 30 p.4의 경우 발효 하루 만에 크게 성장하여 이틀 후부터 뚜렷하게 감소하는 경향을 보였으나, *Enterococcus faecium* S2C 16, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* DC24는 천천히 증가하여 발효 4일째 가장 많이 생육한 것으로 나타났다. 숙성 기간 중 pH와 미생물학적 변화는 각각 Fig. 4-3, 4-4와 같다. 숙성 기간 중 pH는 조금 증가하는 경향을 보였으며 미생물은 감소하는 경향을 보였다. 발효가 시작하는 시점에서 첫 번째 조건인 5일까지 pH와 미생물 변화가 모두 같은 양상을 보였으며 5일 이후의 발효기간의 차이와 그 이후 숙성 기간의 차이에 따른 pH와 미생물학적 변화는 각기 다른 양상을 나타내었으나, 대체적으로 숙성 기간 중 pH는 조금 증가하는 경향을 보였으며 미생물은 감소하는 경향을 보였다.

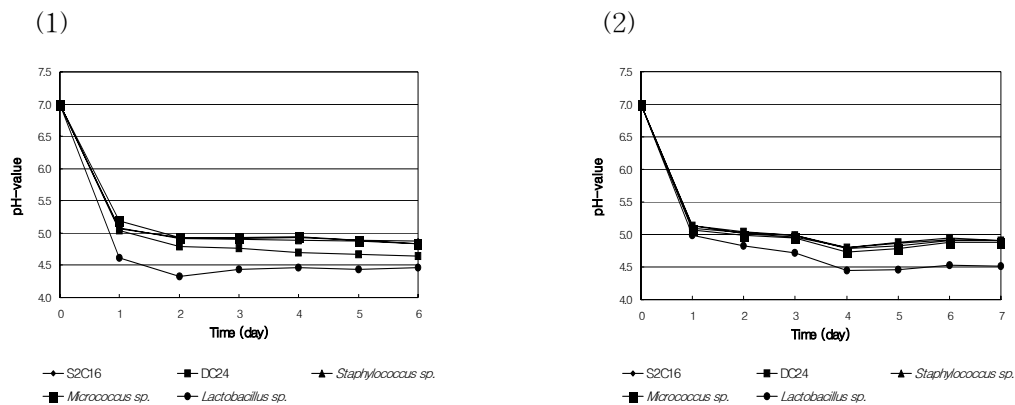


Fig. 4-1. Change of pH in NFS applied with lactic acid bacteria during the fermentation (1) from 1 to 6 day (2) from 7 to 9 day

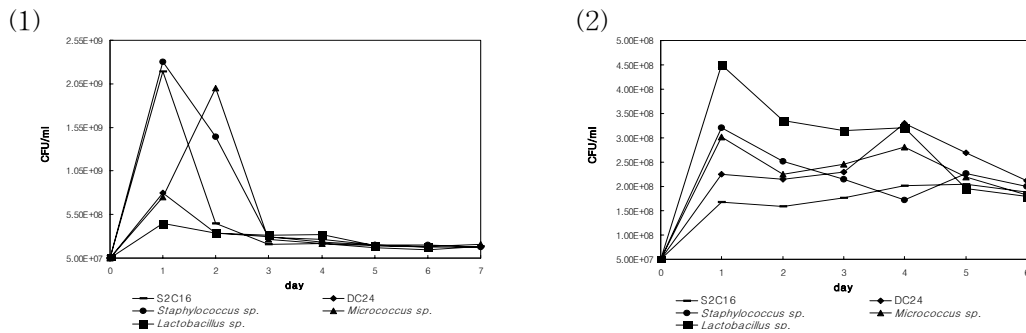


Fig. 4-2. Change of the number of microorganisms in the NFS during the fermentation (1) from 1 to 6 day (2) from 7 to 9 day

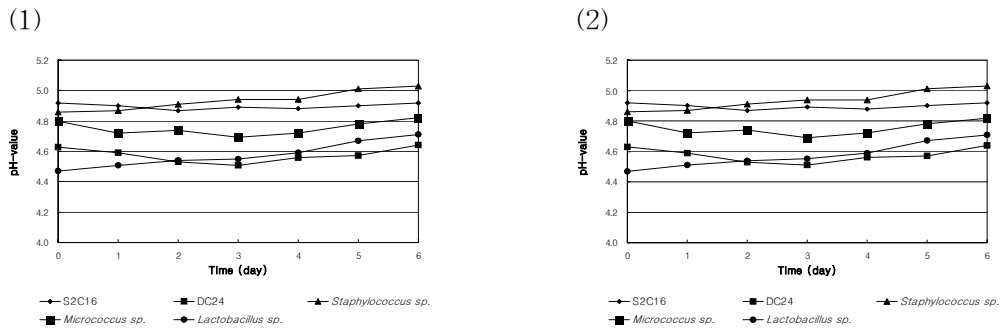


Fig. 4-3. Representation profile of pH change in NFS applied with various bacteria during the ripening (1) from 1 to 6 day (2) from 7 to 9 day

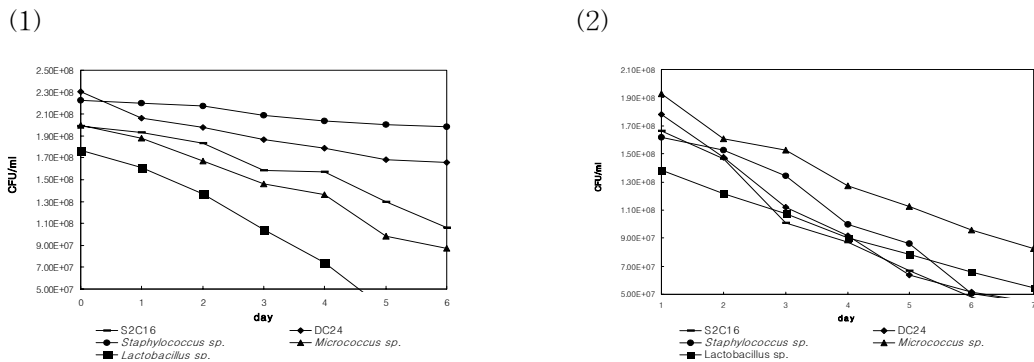


Fig. 4-4. Change of the viable cell counts of microorganism in the NFS during the ripening (1) from 1 to 6 day (2) from 7 to 9 day

분리주와 다른 종류의 상업적 starter F-2, 콩 발효식품 분리주인 R8을 병행하여 사용하였으며, F-2, R8 두 starter 모두 6, 12, 24시간 대두유에서 활성화 후에 사용하였다. F-2는 모든 활성화 후 시간대에서 요구르트 향과 6시간 활성화에서는 10^7 , 12시간 활성화에서는 10^8 , 24시간 활성화에는 10^9 의 균수를 나타내었다. 반면 R8은 각각의 활성화 시간대에서 F-2보다 낮은 균수를 나타내었으며 향미 또한 F-2보다 떨어지고 전체적으로 물성이 좋지 않은 것으로 판단되었다.

F-2의 경우 다른 분리 미생물이나 R8보다 더 나은 향미를 보여주었으며 F-2 starter는 발효 3일까지 꾸준한 증가를 보였으며, 균수의 증가로 인하여 pH도 초기 6에서 72시간 경과 후 pH 4까지 감소하였다. NFS의 내부에서 당첨가로 인하여 starter의 생육이 좀 더 빠른 것으로 판단하였으며, 72시간 발효 후 숙성기간에는 pH가 약간 증가하는 경향을 보였다. 균수는 젖산균의 경우 10^8 , 다른 균의 경우 10^9 까지 증가하였다. 전체적인 균수나 pH의 감소로 인하여 다른 잡균의 오염을 막고 starter의 원활한 생육을 위하여 당(fructose)을 0.5% 첨가하는 것이 좋다고 판단하였다.

발효 초기부터 72시간 발효까지 각 NFS들 모두 50% 이상의 수분함량에서 수분함량이 발효 72시간이 지나면서 35%까지 떨어지는 것으로 나타났다. 이는 내부의 수분이 casing을 통하여 외부로 이수되고 NFS 내부에서 starter의 생육으로 인해 단백질변성을 유도하여 수분함량이 낮아졌다고 판단된다. 숙성기간 중에는 수분의 함량이 다시 증가하여 45%정도를 유지 하였다.

수분활성도가 떨어지면서 starter의 생육 안정과 다른 잡균들의 생육이 억제되어 수분함량이 안정되었다고 판단된다. 수분활성도는 발효·숙성과정에서의 수분조절로 0.95까지 낮추어 다른 잡균의 생육을 막고, NFS 내부의 수분 이수현상을 저해하였다.

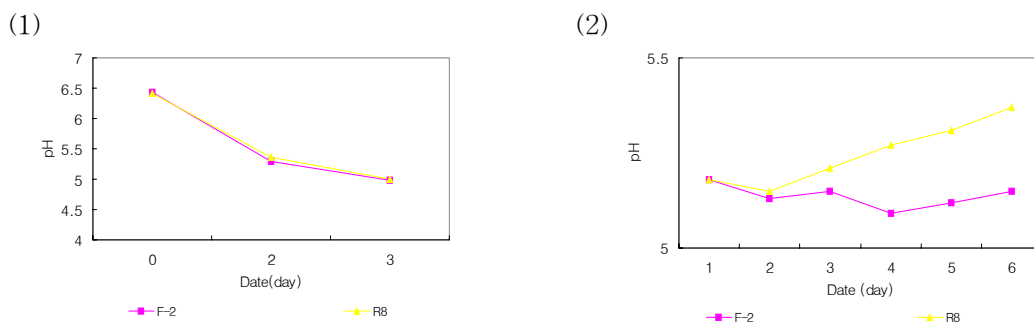


Fig. 4-5. Change of pH in NFS applied with lactic acid bacteria during the fermentation and ripening (1) condition from 1 to 3(fermentation) (2) condition from 1 to 6(ripening)

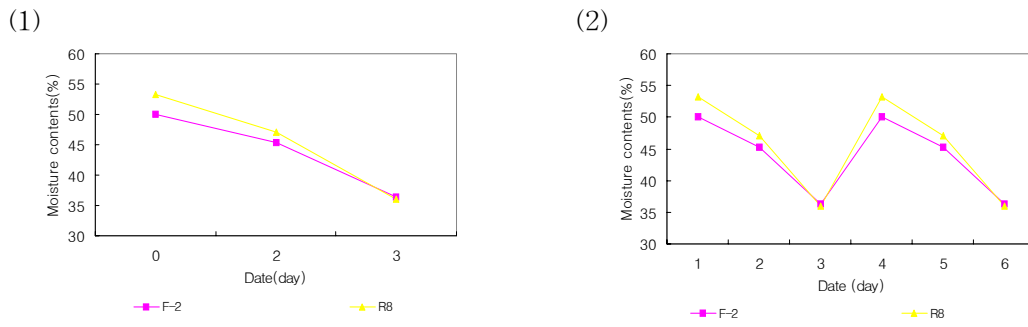


Fig. 4-6. Change of the moisture contents in the NFS during fermentation and ripening

(1) condition from 1 to 3 (fermentation) (2) condition from 1 to 6 (ripening)

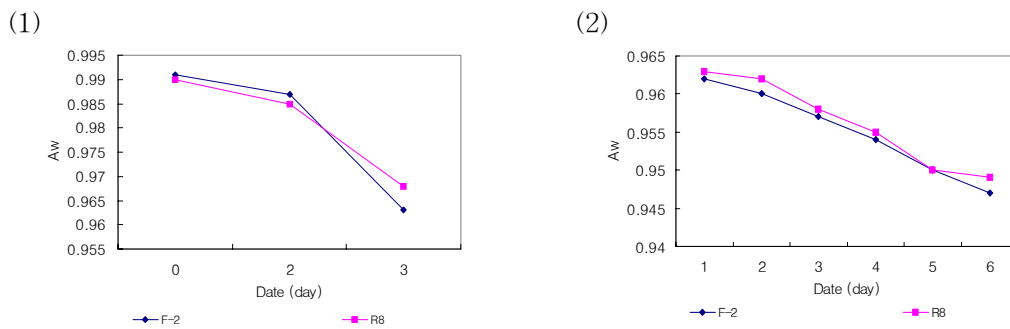


Fig. 4-7. Change of the Aw in the NFS during fermentation and ripening

(1) condition from 1 to 3 (fermentation) (2) condition from 1 to 6 (ripening)

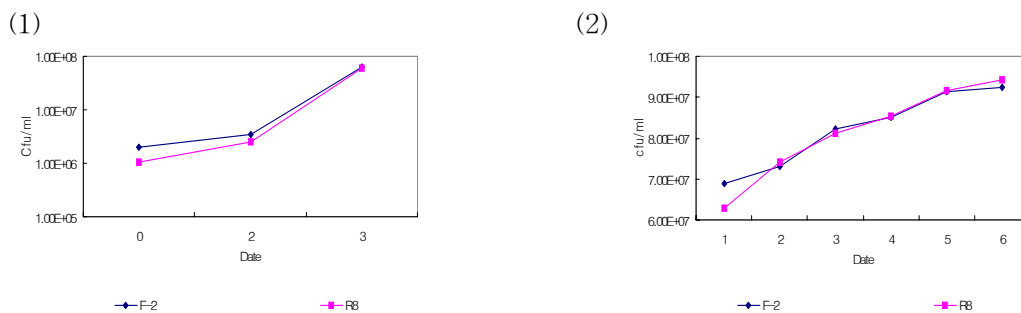


Fig. 4-8. Change of the number of microorganism in the NFS during fermentation and ripening (in MRS) (1) condition from 1 to 3 (fermentation) (2) condition from 1 to 6 (ripening)

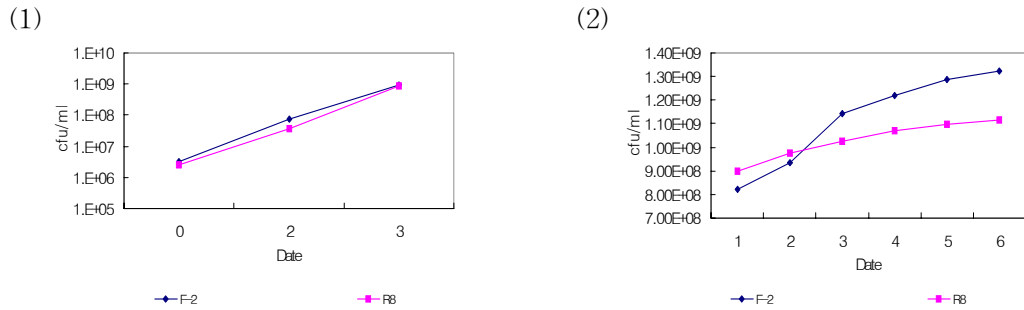


Fig. 4-9. Change of the number of microorganism in the NFS during fermentation and ripening (in PCA)

(1) condition from 1 to 3(fermentation) (2) condition from 1 to 6(ripening)

나. NFS의 제조공정 중 형태 변화

1) 제조된 NFS의 배양·숙성 중 형태 변화

초기 제조된 NFS를 선별된 조건에서 배양·숙성 중 형태는 다음 Fig. 4-10와과 같다. Casing에 충전하여 발효·숙성시킨 결과 젖산균 starter에 의해 조직의 형태가 견고해지고 발효가 진행될수록 탈수가 일어나는 것이 관찰되었다.



Fig. 4-10. Representation profile of the ripening room

2) 산업적 scale의 제조공정 확립

최종의 NFS를 다량 제조하여 배양·숙성 중 형태는 다음 Fig. 4-11과 같으며, casing에 충전하여 발효·숙성시킨 결과 젖산균 starter와 gluten에 의해 조직의 형태가

견고해지고 발효가 72시간 후 탈수가 일어나면서 dry ring이 생성되는 것이 관찰되었다. 숙성 중에 dry ring이 생성되는 것은 습도의 조절로 완화 가능하다고 판단된다. NFS제조 후 3일에 젖산균의 생육이 최고점에 이르러 이 시기를 발효기간으로 선정하였고, 이후 젖산균의 생육이 떨어지는 3일째부터 7일까지를 숙성기간으로 선정하였다. 젖산균의 NFS 내부에서의 활성을 좋게 하기 위하여 대두유에서 각각 6, 12, 24시간 발효를 시킨 후 총 발효 시간을 3일로 하여 발효시간으로 결정하였다.

NFS내에서 가장 성장능력이 좋은 F-2는 발효 3일까지 꾸준한 증가를 보였으며, 균수의 증가로 인하여 pH도 초기 6에서 72시간 경과 후 pH 4까지 감소하였다. 당침가로 인하여 stater의 생육이 좀 더 빠른 것으로 판단되었으며 72시간 발효 후 숙성기간에는 pH가 약간 증가하는 경향을 보였다. 균수는 젖산균의 경우 10^8 , 다른 균의 경우 10^9 까지 증가하였다. 전체적인 균수나 pH의 감소로 인하여 다른 잡균의 오염을 막고 stater의 원활한 생육을 72시간으로 판단하였다.



Fig. 4-11. The ripening process of NFS was produced by industrial scale

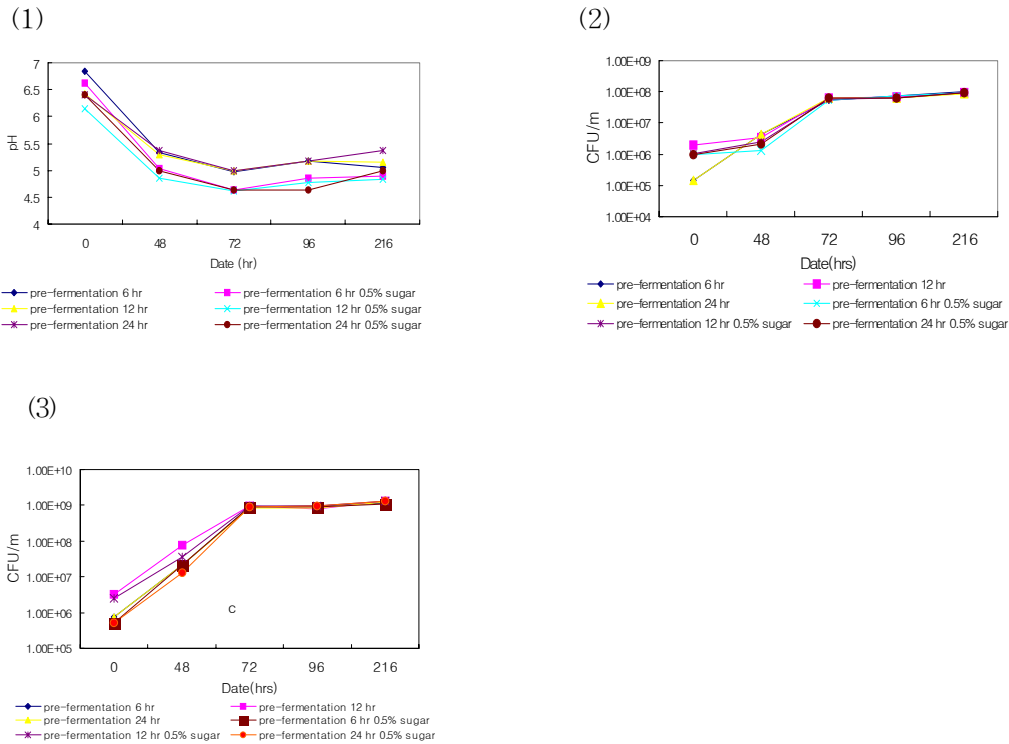


Fig. 4-12. Changes of total counts and pH in the NFS during fermentation and ripening (1) pH changes in NFS (2) Changes of viable cells of lactic acid bacteria (3) Changes of total counts

다. 온도, 습도 및 공기유동에 따른 NFS의 특성

1) 온도 및 습도

발효조건으로서 젖산균과 곰팡이 스타터 모두에게 영향을 주지 않는 적정온도인 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 높은 습도 유지를 통한 초기 NFS 조직의 급격한 이수현상을 줄일 수 있는 95~98%가 선정되었다. 일차 적으로 숙성 중에는 24~36시간마다 $1 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 씩 변화를 주어 22~14 $^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 습도는 92~78%로 24~36시간마다 $2 \pm 0.1\%$ 씩 변화를 주는 것이 적합한 것으로 판단하였으나 최종적으로 숙성 중에는 온도변화는 주지 않고 습도를 24시간마다 5% 변화를 주어 95~85%를 유지 하였고, 발효중에도 온도는 15 $^\circ\text{C}$ 를 유지하였으며 습도는 24시간마다 5%의 변화를 주어 85%~80%를 유지하는 것이 가장 적합한 것으로 판단하였다.

2) 공기 유동

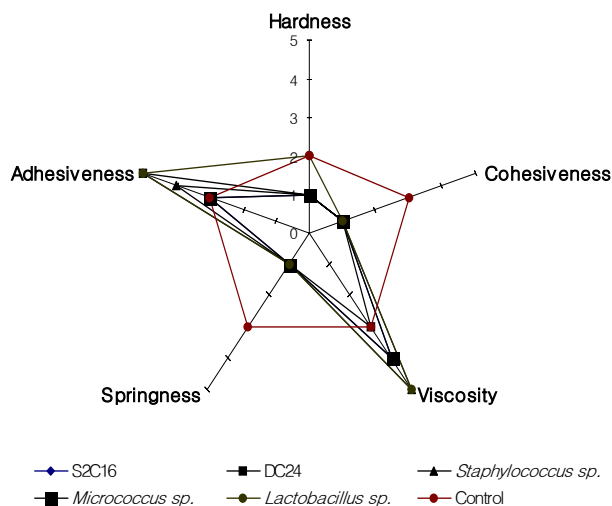
공기의 유동이 빠를 경우 곰팡이 스타터가 NFS에서 국부적 성장을 보이는 경향이 있었고, 반면 공기의 유동이 없을 경우 곰팡이가 부분적으로 생육되는 것으로 관찰되었다. 따라서 fan의 풍속을 약하게 하여 습도 유지 및 적절한 공기 유동을 유지하는 것이 바람직한 것으로 확인되었다.

라. 초기 NFS의 관능검사 및 조직감

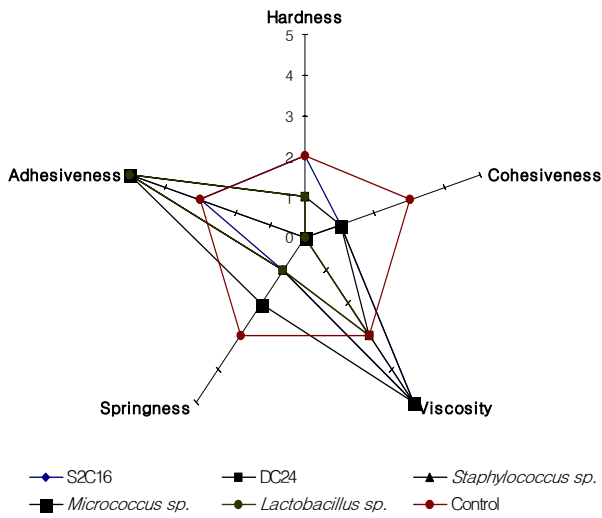
1) 제품의 품질 평가

제조된 NFS의 관능검사결과 발효 기간에 따른 관능 차이는 거의 나타내지 않았다. 발효기간과 숙성기간 및 starter의 종류에 따라 대표적인 NFS에 대한 관능 검사치는 다음 Fig. 4-12와 같다. 대부분 adhesiveness와 viscosity에 대한 평가치만 높게 나타내었으며 hardness와 cohesiveness는 거의 나타나지 않거나 낮은 수치를 나타내었다. Starter에 의해 발효가 일어나 curd가 형성된 다음은 대부분 같은 조직 특성을 보이는 것으로 나타났으며 starter의 종류에 따른 제조시 texture에는 영향을 주지 않으나 발효나 숙성기간이 진행됨에 따라 향미 특성에 영향을 미치는 것으로 나타났다.

(1)



(2)



(3)

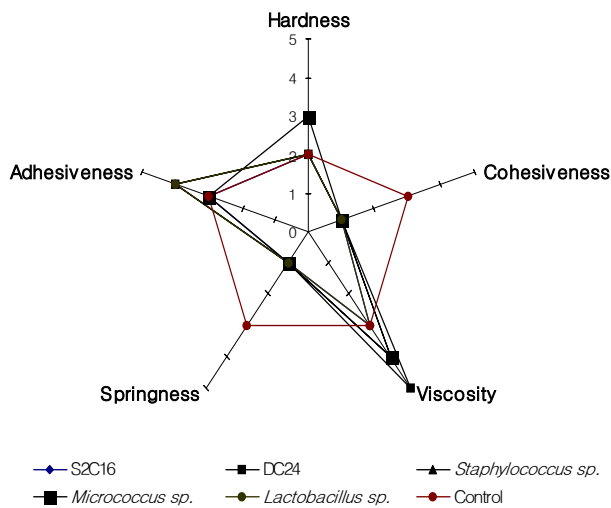


Fig. 4-13. Web graph of NFS for texture evaluation fermentation different period

(1) fermentation period 5 days and ripening period 5 days (2) fermentation period 6 days and ripening period 6 days (3) fermentation period 7 days and ripening period 7 days

마. 최종 제조된 NFS의 제품 특성

최종 NFS는 발효 3일, 숙성 6일을 통하여 제조되었으며 발효 3일 이후 dry ring이 생성되었다. 각 NFS의 제품군의 외관은 유사한 형태를 보였고 NFS들의 casing외관은 거의 손상이 없었으며, 약간의 dry ring의 생성은 수분의 조절로 인하여 개선이 가능하다고

판단되었다. 조직은 시중에 판매되어지는 제품에 비해 크게 떨어지지 않는다고 판단되었
다.

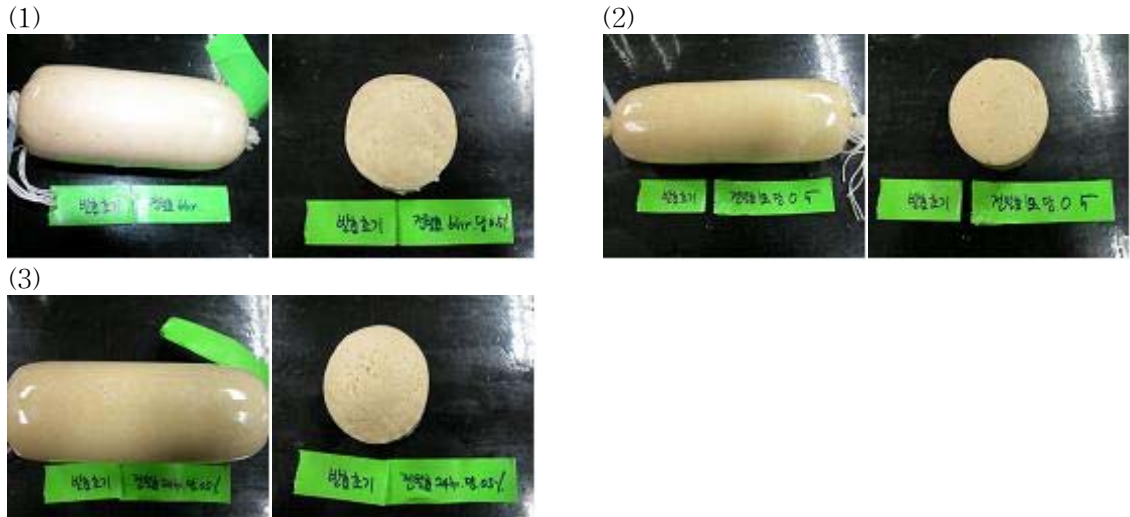


Fig. 4-14. Representation profile of NFS surface and inside at 0 time

(1) pre-fermentation 6h 0.5% sugar (2) pre-fermentation 12h 0.5% sugar (3) pre-fermentation 24h 0.5% sugar

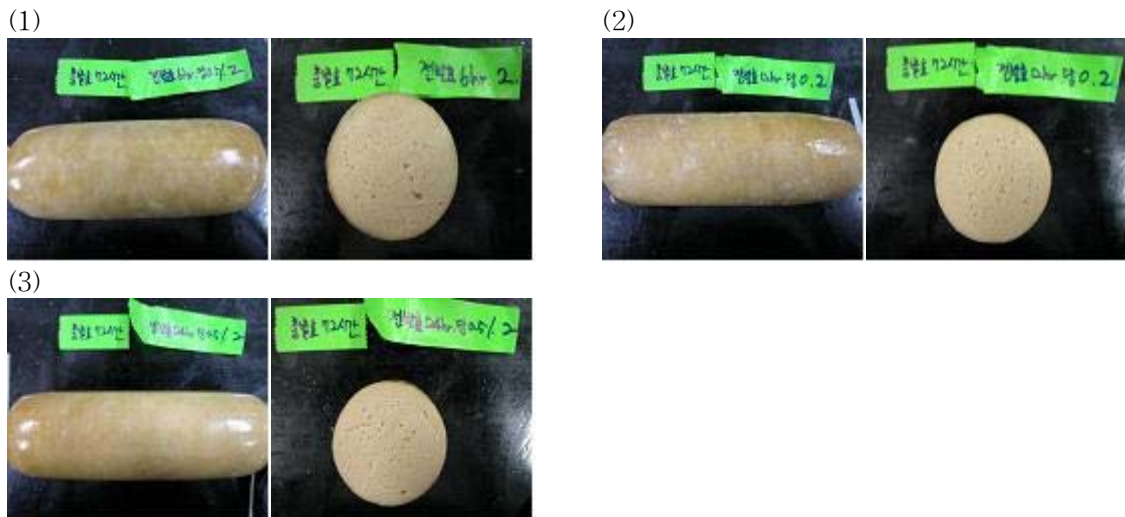


Fig. 4-15. Representation profile of NFS surface and inside after fermentation

(1) pre-fermentation 6h 0.5% sugar (2) pre-fermentation 12h 0.5% sugar (3) pre-fermentation 24h 0.5% sugar

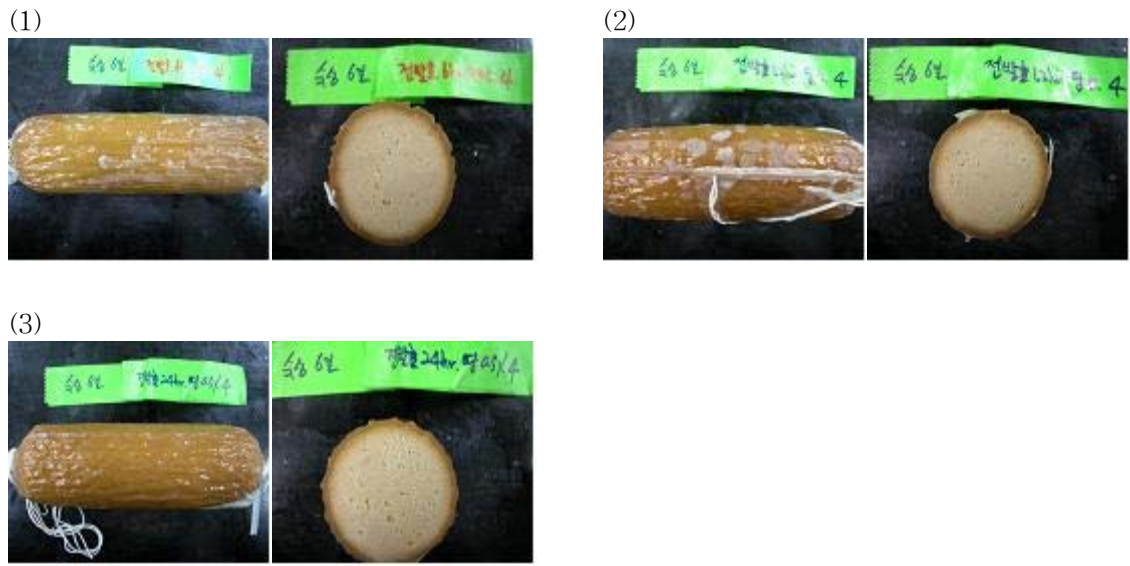


Fig. 4-16. Representation profile of NFS surface and inside after ripening

(1) pre-fermentation 6h 0.5% sugar (2) pre-fermentation 12h 0.5% sugar (3) pre-fermentation 24h 0.5% sugar

제 5 절 기능성 NFS의 제품특성

1. 서론

콩에는 여러 가지 생리활성물질이 다양하게 들어 있으며 saponin, phytic acid, lectin, protease inhibitor, oligosaccharide, isoflavone 등이 여러 가지 생리활성을 나타내는 물질로 알려져 있다.

그 중 대표적인 성분으로 최근 항암, 또는 기능성 물질로서 가장 크게 각광을 받고 있는 isoflavone은 콩에 100~300 mg%나 함유되어 있다.

식물 phenolic 화합물 중 하나인 flavonoid는 식물계에 가장 널리 분포하고 있는 물질중이며, isoflavone은 flavonoid의 배당체 중의 하나이다. 현재 밝혀져 있는 isoflavone의 종류는 12종이나 되며, 이중 대표적인 것으로는 daidzein, genistein, glycitein 등이 있다.

Isoflavone은 콩 제품의 씹쓸하고 비린내처럼 좋지 않은 맛을 내는 성분인데, 항산화, 항암, 골다공증, 심혈관 질환 예방을 한다고 알려져 많은 연구가 이루어져 왔다. 이 중 가장 많은 함량을 차지하는 genistein은 전립선 암 억제 등 발암을 억제하고 estrogen receptor와 약하게 결합하여 estrogen 활성을 필요로 하는 유방암 세포의 발생을 억제하며 daidzein은 뼈의 재흡수를 억제하고 genistein이 약한 estrogen의 활성을 발휘하여 노인과 여성의 골다공증 방지에도 효과적인 것으로 보고되어 있다.

Phytate는 콩에 많은 양이 존재하고 있으며, 콩 식품 중에는 1~1.5% 들어있다. phytic acid는 칼슘, 마그네슘, 철, 아연, 망간과 같은 무기질의 체내 흡수를 방해하는 것으로 알려져 항영양인자로 생각되었으나 최근에는 소장에서 발암원으로 작용하는 유리기(free radical)를 생성하는 철과 함께 불용성 복합체를 형성함으로써 항산화제 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.

또한 raffinose와 stachyose와 같은 올리고당의 섭취는 설사를 유발하는 것으로 알려져 항영양인자로 분류되었으나 최근의 연구에서 올리고당이 발효되면서 만들어지는 산성 물질이 대장암을 유발하는 물질을 적절하게 제거해 장세포가 발암물질에 노출되는 것을 억제하여 장세포가 암세포로 전이하는 것을 효과적으로 막아주는 것으로 보고되었다. 또한 발효되면서 산을 생성하면 칼슘을 이온화 하여 결과적으로 장내의 칼슘 흡수율이 높아진다는 결과도 보고 되어 대두 올리고당에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다.

미생물 발효에 의해 제조된 장류나 발효식품들이 발효되지 않은 콩제품에 비해 생리활성이 증가하는 것에 대한 연구결과는 매우 많이 보고되어 있으며 trypsin inhibitor, phytic acid, oligosaccharide 등의 항영양 인자의 감소와 발효에 의해 생성되는 유기 화합물, 유리 peptide, 아미노산의 증가도 함께 연구되고 있다.

따라서 본 연구에서 젖산균 발효에 의해 기능성 또는 항영양인자의 성분 변화를 검토하고자 한다. 또한 최종 조건으로 제조된 NFS의 관능적 특성을 검토하여 상품가치를 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 실험 방법

분석에 사용된 NFS는 0.5%의 당을 첨가한 것과 첨가하지 않은 군으로 나누어 전발효와 숙성 시간에 따라 준비하였으며 전발효의 경우 대두유에서 균 발효시간을 달리하고 NFS를 제조한 후 발효시간까지 총 48시간을 발효하였다. 사용된 starter는 F2를 ISP 100 g, gluten 97 g, 대두유 390 ml, starter 접종량은 10^{10} CFU/ml으로 배양된 starter를 50 ml, 당 3.2 g을 첨가하여 제조하여 분석하였다.

가. 주요 성분 변화

1) Isoflavone

시료 1 g을 취하여 0.1% glacial acetic acid 가 첨가된 70% EtOH를 4 ml 첨가한 후 균질화 하였다. 준비된 시료를 50°C water bath에서 2시간 반응시킨 후 다시 6시간 동안 상온에서 진탕하여 crude flavonoid를 추출하였다. 3,000 rpm에서 10 min간 원심 분리하고 상층액을 0.22 μ m의 syringe filter로 여과 멸균하여 HPLC 분석에 사용하였다. isoflavone 분석은 RP-HPLC를 수행하였으며 실험에 사용된 column은 Nova-pak (Waters, 3.9 \times 150 mm)를 이동상은 1% acetic acid를 함유한 DW (Sol. A)와 1% acetic acid를 함유한 acetonitrile (Sol. B)을 350:650 비로 혼합하여 30 분간 분석하였으며 용출속도는 1 ml/min, detector는 UV 254 nm로 분석하였다.

2) Phytic acid

Wheeler와 Ferrel의 방법을 변형하여 측정하였다. 시료 3 g을 칭량하여 3% TCA 용액 30 ml에 녹여서 1 시간 동안 진탕하였다. 염화제2철, 3% TCA-3% 황산나트륨 혼합액, 증류수, 1.5 N 수산화나트륨, 열수, 3.2 N 질산용액을 순서대로 반응시킨 후 1.5 M KSCN을 가하여 30분간 반응시킨 후 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 염화제2철 용액을 이용하여 작성된 표준곡선을 이용하여 철이온 양을 구한 후 phytate 함량은 Fe:P의 몰비율, phytic acid의 P 함유율 (28.20%)를 이용하여 계산하였다.

3) 유리 아미노산 분석

HPLC (Varian)를 이용하여 AccQ-Tag 방법에 의해 분석하였다. NFS 1g에 80% EtOH 10 ml를 가하여 180 rpm으로 2시간 교반한 다음 상층액을 membrane filter (0.2 μ m)로 여과하여 20 μ l를 HPLC에 주입하였다. 유리 아미노산 분석을 위한 column은 Nova-Pak C18 (3.9X150 mm, waters. MA. USA)을 사용하였으며 시료 주입량은 20 μ l 컬럼 온도는 37°C 유지하였다. 검출기는 UV detector를 이용하였고 용매 A는 0.14M sodium acetate, 용매 B는 80% acetonitrile를 사용하여 gradient system으로 분리하였다. Amino acid standard kit를 Sigma로부터 구입하여 표준물질로 사용하여 정량하였다.

4) 당 분석

HPLC (Waters system, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 즉, NFS 1 g에 증류수 10 g을 가하여 180 rpm으로 12시간 교반한 다음 상층액을 filter (0.2 μ m)로 여과 멸균하여 사용하였다. Column은 carbohydrate analysis, CHO-820을 분석 조건은 column 온도는 90°C로 유지하고 검출기는 RI detector (Waters, USA)를 이용하였으며 이동상으로는 3차 증류수를 사용하였다. 표준물질인 raffinose, stachyose, sucrose, fructose, glucose는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다.

나. 제품 특성

1) 수분활성도(a_w) 및 수분함량

발효 및 숙성 과정 중 NFS를 취하여 상하, 좌우에서 중심이 되는 부분을 선택하여 절단 한 후 단면을 취하였다. 취한 단면의 가장자리 부분과 중심부에서 적당량의 시료를 취하여 수분활성도 측정기를 이용하여 수분활성도를 측정하였으며 수분 함량은 AOAC의 상압가열건조법을 이용하여 측정하였다.

2) pH 변화

제조된 NFS를 발효·숙성 중의 pH 변화를 측정하였다. pH는 시료의 가장 중심부에 pH 측정기를 주입하여 측정하였다.

3) NFS system 내에서의 미생물학적 변화

시료 1 g을 멸균 희석수 (0.85% NaCl, 1% peptone, 0.02% tween 80)를 이용하여 단계적으로 희석한 후 PCA(plate count agar), PDA(potato dextrose agar), MRS(6% CaCO₃ 첨가)에 도말하여 젖산균의 경우 48시간 곰팡이의 경우 5일간 배양 후 측정하였다. 총균수, 젖산균 starter, 곰팡이 starter의 변화를 측정하였다.

4) 조직감 분석

조직감은 Texture analyser와 Lotus 1-2-3 system의 TPA (texture profile analysis) program을 이용하여 분석하였다. Force와 time에 따른 관능 특성으로 수행하였으며 compression probe (직경 30 mm)를 사용하였다.

6) 관능검사

앞서 수행한 방법과 동일한 방법으로 수행하였다.

3. 실험결과

가. 생리활성 물질 및 항 영양인자의 함량 변화

1) Isoflavone

Isoflavone 분석 결과는 다음 Fig 5-1과 같다. 전발효 6, 12, 24시간 후를 초기값으로 하고 발효 48시간, 숙성 1일, 숙성 6일 후 NFS를 취하여 분석한 결과 당을 첨가한 것과 첨가되지 않은 경우의 NFS 함량은 크게 차이를 나타내지 않았다. 그러나 전발효의 시간에 따른 isoflavone의 함량 차이는 크게 나타나 전발효를 6시간 진행시킨 경우 12시간이나 24시간 발효시킨 시료에 비해 발효 48시간 이후부터는 aglycon의 함량이 4-5배 더 높은 것으로 나타났으며 전발효를 끝낸 직후인 초기의 함량은 12시간이나 24시간 전발효의 경우가 다소 더 높은 것으로 나타났다. 이는 균주의 충분한 초기 배양을 위해 수행한 전발효 과정에서 이미 aglycon으로의 전환이 일어나고 있음을 의미하며 12시간이후부터 활성이 극대화되고 있음을 알 수 있었다. 또한 모든 전발효 시간조건을 분석한 결과 발효 2일째 크게 증가하며 특히 daidzein의 경우 10배 이상의 증가를 나타내고 있으나 숙성 1일째부터 감소하기 시작하여 6일째 함량이 매우 적은 것으로 나타나 장시간의 숙성으로 활성 isoflavone이 오히려 감소됨을 알 수 있었다.

2) Phytic acid

칼슘의 흡수를 저해하는 항영양인자인 phytic acid의 발효 숙성 과정 중 함량 변화는 다음 Fig 5-2와 같다. phytic acid의 함량은 초기에는 250~500 mg/g 이었으나 발효가 시작되어 48시간이후 약 90%이상이 감소하여 숙성 6일까지 감소된 경향을 보였다. 이는 젖산균이 생성하는 phytase 등의 효소 작용 또는 산에 의한 것으로 생각되어지며 발효에 의해 제조된 NFS는 노인이나 유아의 영양식으로서 개발 가능성을 확인하였다.

3) 유리 아미노산 분석

유리 아미노산 분석 결과는 다음 Fig 5- 과 같다. 전발효 시간에 따른 아미노산의 종류 및 조성 변화는 큰 차이를 보이지 않았으며 감칠맛을 내는 아미노산 중 하나인 glutamin의 함량이 높은 것으로 나타났다. 또한 발효와 숙성이 진행되는 과정 중 아미노산의 함량 차이에는 변화가 거의 나타나지 않아 NFS내에서 유리 아미노산의 생성 또는 분해는 일

어나진 않는 것으로 확인되었다.

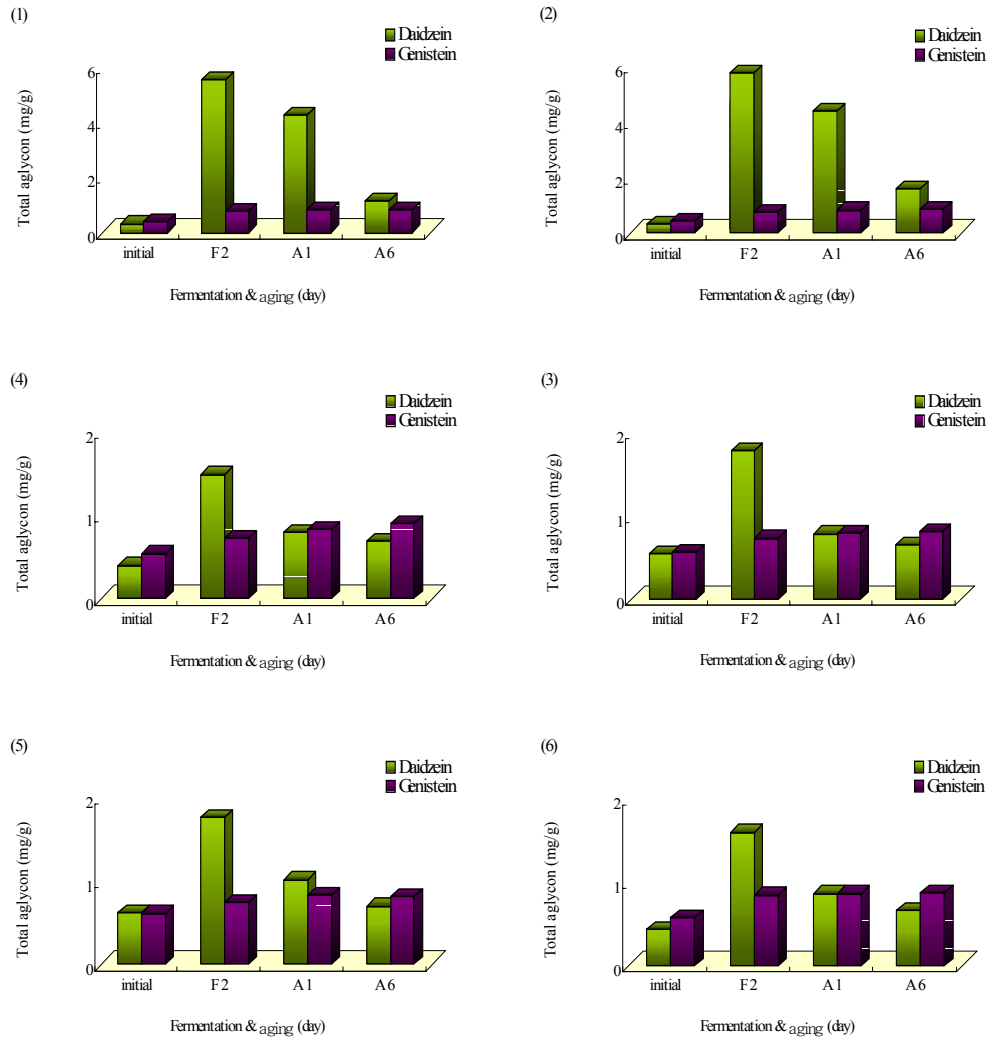


Fig. 5-1. Changes of active form isoflavone contents in during fermentation and ripening.

- (1) pre-fermentation 6 h (2) pre-fermentation 6 h, sugar added
 (3) pre-fermentation 12 h (4) pre-fermentation 12 h, sugar added
 (5) pre-fermentation 24 h (6) pre-fermentation 12 h, sugar added

This results were determined by obtained from initial (after pre-fermentation of 6, 12, 24 h), fermentation 2 days, fermentation 2 days and ripening 1 day, and fermentation 2 days and ripening 6 days.

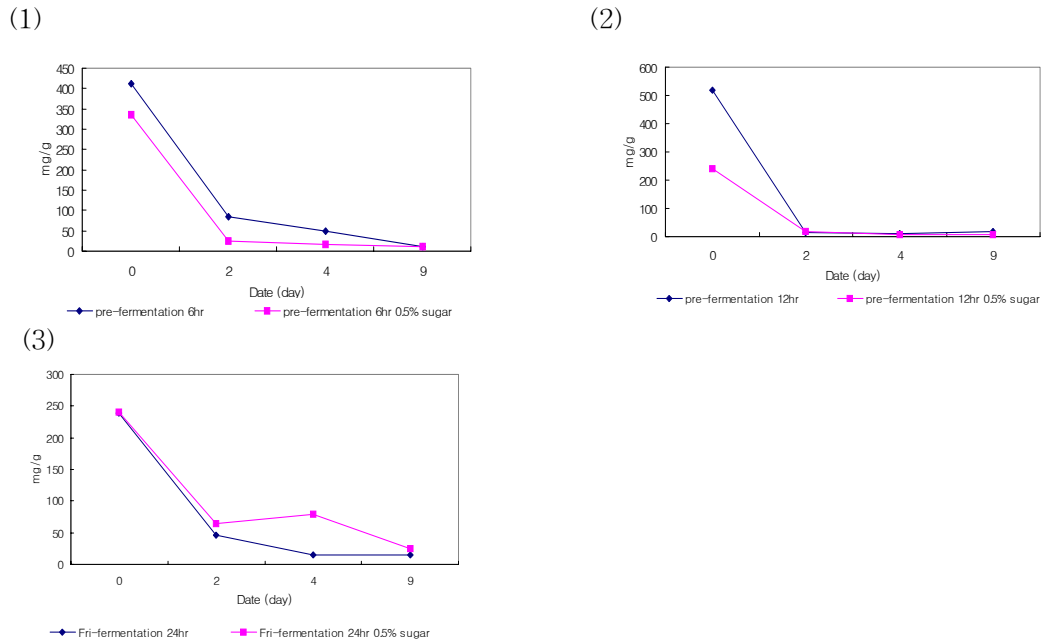
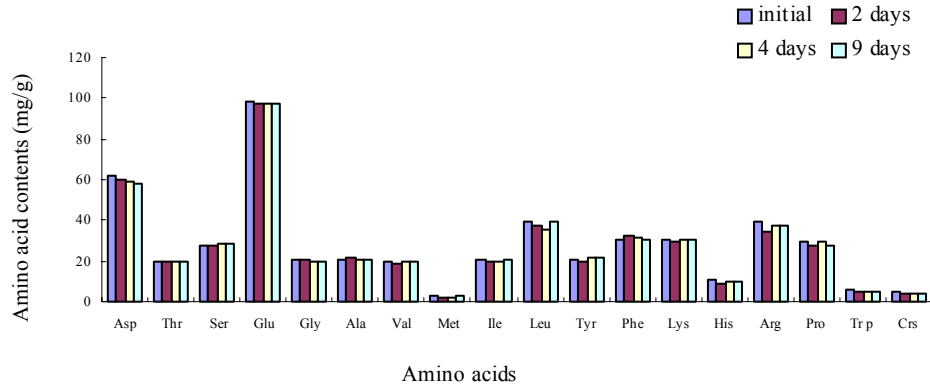


Fig. 5-2. The changes of phytic acid content in NFS during fermentation and ripening (1), pre-fermentation 6h (2) pre-fermentation 12h (3) pre-fermentation 24h

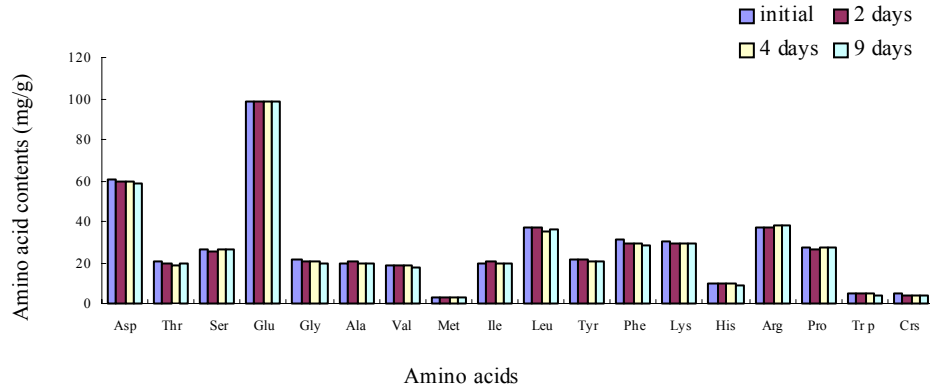
4) 당 분석

NFS의 당 함량을 분석한 결과 발효 초기에는 fructose, stachyose 함량이 매우 높은 것으로 나타났으나 발효가 진행되면서 Fig. 5-4와 같이 감소하였다. 특히 0.5%의 fructose가 첨가된 NFS의 경우 초기의 함량이 큰 차이를 보이지 않았으나 발효와 숙성 과정을 거치면서 상대적으로 많이 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 전발효의 시간이 길수록 당의 이용도는 높아지는 것으로 나타났다. 즉, 24시간 전발효의 경우 당을 첨가한 것과 그렇지 않은 경우의 raffinose와 stachyose의 함량이 조금씩 감소하는 형태를 보여 6시간이나 12시간 전 발효한 경우에 비해 감소율은 낮으나 전체적인 함량이 더 낮은 것으로 나타났다.

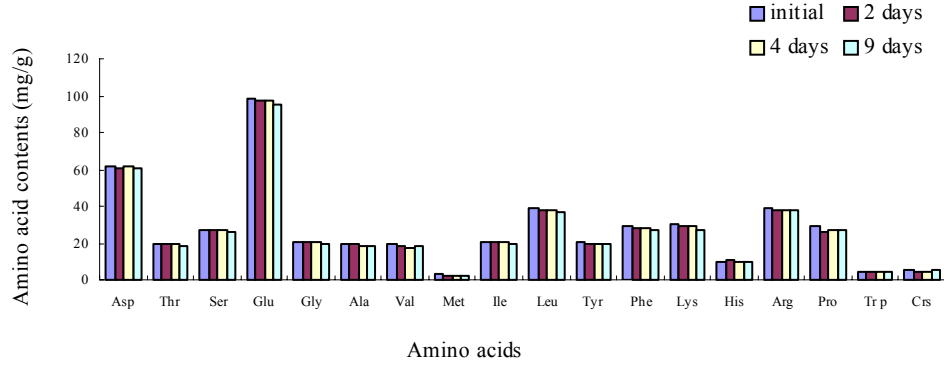
(1)



(2)



(3)



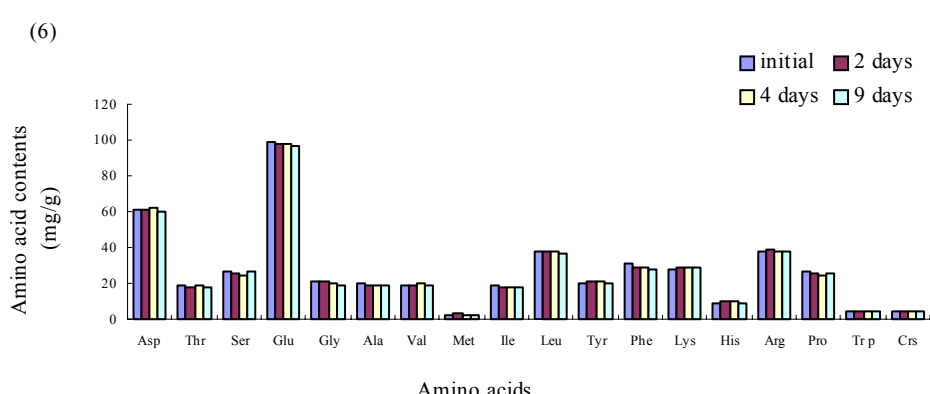
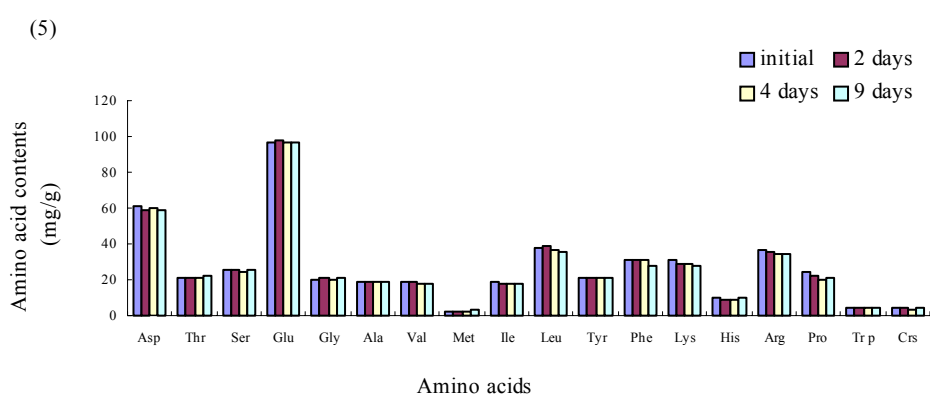
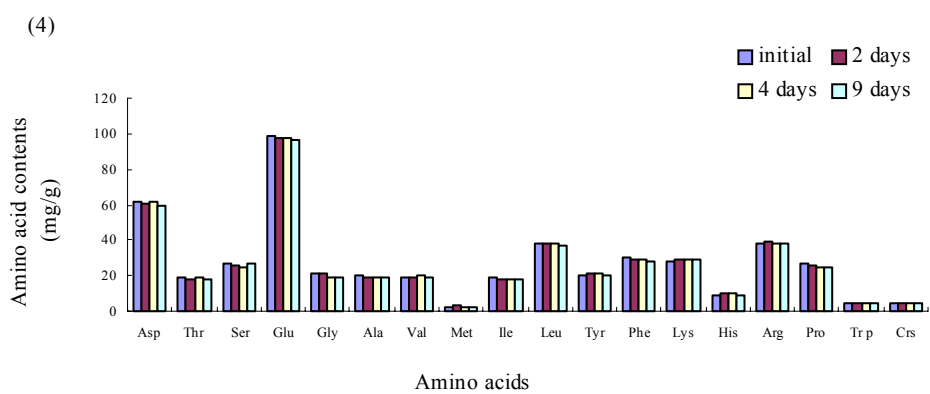


Fig. 5-3. Amino acid analysis in NFS during fermentation and ripening

- (1) pre-fermentation 6 h (2) Pre-fermentation 6 h, 0.5% sugar
 (3) pre-fermentation 12 h (4) pre-fermentation 12 h, 0.5% sugar
 (5) pre-fermentation 24 h (6) pre-fermentation 24 h, 0.5% sugar

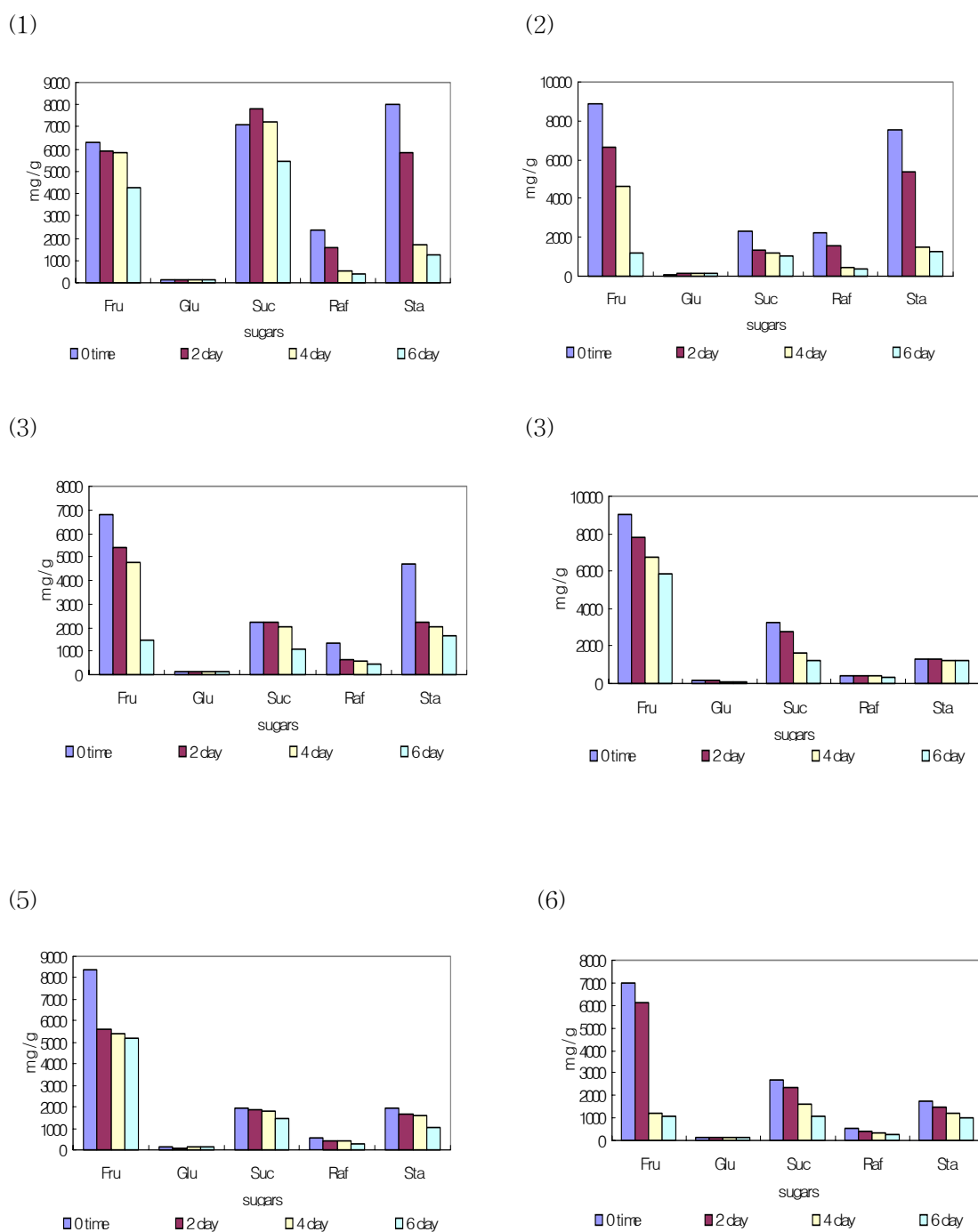


Fig. 5-4. The oligosaccharides and monosaccharides in NFS during fermentation and ripening

- (a) pre-fermentation 6 h (b) Pre-fermentation 6 h, 0.5% sugar
- (c) pre-fermentation 12 h (d) pre-fermentation 6 h, 0.5% sugar
- (e) pre-fermentation 24 h (f) pre-fermentation 24 h, 0.5% sugar

나. 제품 특성

1) pH 변화

NFS내에서 일어나는 pH 변화는 다음과 같다. 모든 조건에서 초기 6-7의 pH에서 발효 2일째 크게 낮아져 pH 4.5-5.5를 나타냈으며 발효 3일째 조금 더 낮아지는 경향을 보이다 숙성을 거치면서 pH가 조금 상승하는 경향을 나타내었다. 특히 가장 낮은 pH를 보였던 전발효 24시간, 당첨가의 조건으로 제조된 NFS의 경우 pH의 증가폭이 커 숙성 6일째에 는 모든 조건의 NFS가 4.7-5.3 정도에 이르는 것으로 확인되었다.

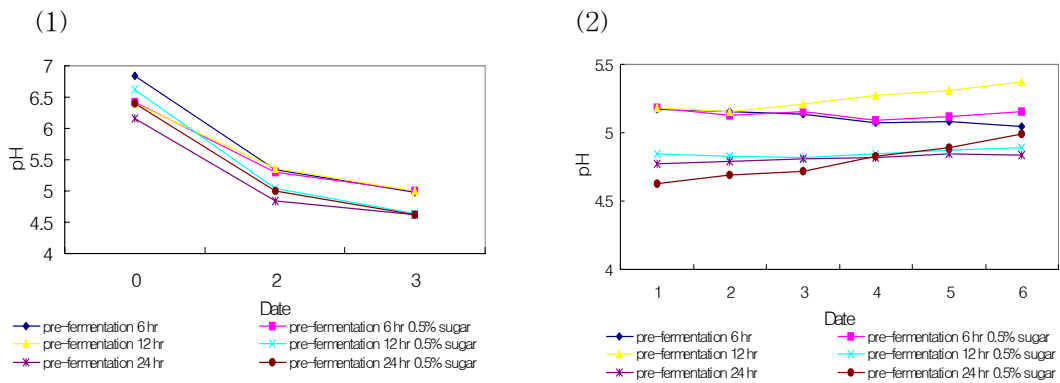


Fig. 5-5. Changes of pH in NFS during fermentation and ripening

(1) condition from 1 to 3(fermentation) (2) condition from 1 to 6(ripening)

2) NFS system 내에서의 미생물학적 변화

F-2의 경우 발효과정 (25°C, 습도 95%)에서 가장 생육속도가 급속히 증가 하였으며, R8의 경우도 발효과정에서 가장 높은 생육속도를 보였다. F-2, R8 모두 숙성과정(15°C, 습도 85%)에서는 $10^8 \sim 10^9$ 의 균수를 유지 하였다. F-2, R8 두 starter 모두 발효과정에서 비교적 빠른 생육속도로 인하여 다른 잡균에 대한 높은 경쟁력을 보였다. 그러나 F-2의 경우가 빠른 생육속도를 나타내었기에 NFS 제조에 더 적합한 starter인 것으로 판단되었다.

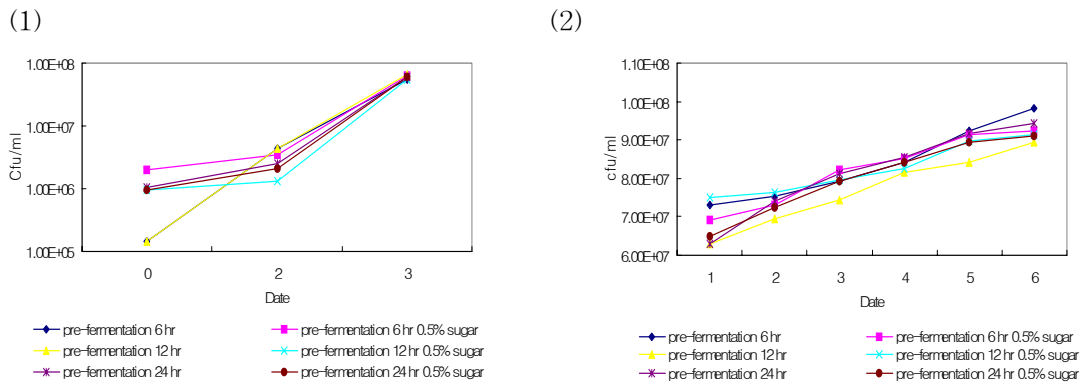


Fig. 5-6. Changes of the lactic bacteria counts in the NFS during fermentation and ripening (1) condition from 1 to 3(fermentation) (2) condition from 1 to 6(ripening)

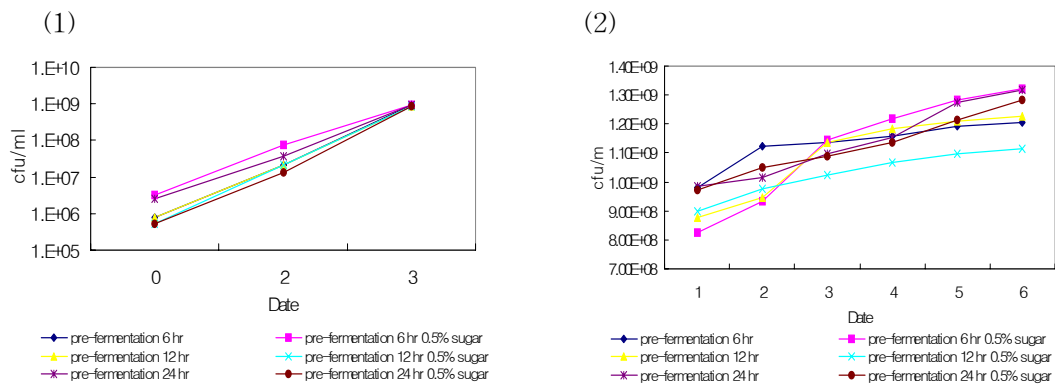


Fig. 5-7. Total counts of microorganism the NFS during fermentation and ripening (1) condition from 1 to 3(fermentation) (2) condition from 1 to 6(ripening)

3) 수분함량과 수분활성도 변화

초기 NFS의 수분함량은 약 50-55%를 유지하나 발효과정이 진행되면서 3일째에는 30-35%까지 감소하는 것으로 나타났다. 숙성과정 중 수분함량은 크게 변화는 나타나지 않아 조건에 따라 약 3-5%의 변화양상을 보였다. 수분함량은 발효과정 중에는 조건에 따라 큰 차이를 보이지 않으나 숙성과정 중에는 조금씩 차이를 보이며 가장 탈수가 잘 이루어진 조건은 전발효 12시간, 당 첨가 조건으로 확인되었다. 수분활성도의 경우 발효과정 중에는 수분함량의 변화와 유사하게 나타났으나 숙성과정 중에서 조건별로 큰 차이를 보이지 않았다. 초기 수분활성도는 0.99로 매우 높게 나타났으며 발효 숙성 과정 중에 0.94까지 감소하였다.

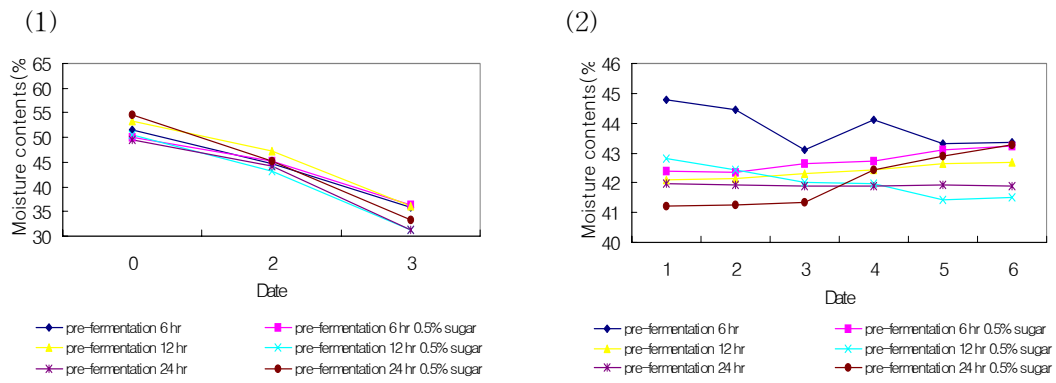


Fig. 5-8. Changes of the moisture contents in the NFS during fermentation and ripening

(1) condition from 1 to 3(fermentation) (2) condition from 1 to 6(ripening)

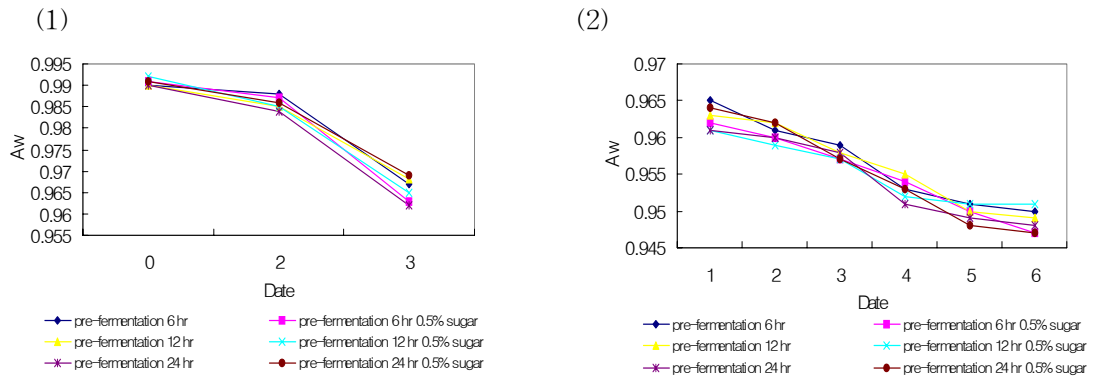


Fig. 5-9. Changes of the Aw in the NFS during fermentation and ripening

(1) condition from 1 to 3(fermentation) (2) condition from 1 to 6(ripening)

3) NFS의 조직감

Tab. 5-1에 나타난 바와 같이 전반적으로 전발효 6시간, 당 첨가 조건의 NFS가 Hardness, Gumminess, Chewiness가 가장 높은 수치를 나타내었다. 따라서 이 조건이 가장 적합한 조직의 NFS의 제조방법으로 판단되었다.

Table. 5-1. Representation profile of TA analysis

	전발효 6시간	전발효 6시간, 당0.5%첨가	전발효 12시간	전발효 12시간, 당0.5%첨가	전발효 24시간	전발효 24시간, 당0.5%첨가
Product Height	10.680± 0.98	11.320± 1.44	10.470± 2.17	9.880± 1.33	10.670± 1.49	11.245± 2.43
Initial Stress	3.650± 0.51	2.722± 0.94	3.087± 1.44	4.000± 1.22	3.181± 0.96	3.650± 1.41
Compression	5.660± 0.71	5.741± 0.88	5.235± 1.49	4.940± 0.95	5.335± 1.42	5.622± 1.91
Springiness	0.875± 0.14	0.836± 0.22	0.831± 0.45	0.855± 0.99	0.842± 0.74	0.829± 0.52
Cohesiveness	0.694± 0.11	0.680± 0.32	0.663± 0.17	0.665± 0.21	0.634± 0.13	0.738± 0.22
Chewiness	1174.662± 21.41	1273.565± 28.11	1001.999± 18.59	1150.590± 17.43	968.329± 17.43	839.667± 16.44
Gumminess	1341.799± 25.78	1522.618± 19.44	1205.602± 22.73	1345.056± 22.81	1150.426± 19.43	1065.812± 21.94
Adhesiveness	-15.308± 2.47	-17.486± 3.96	-16.419± 1.99	-15.312± 1.45	-1.547± 1.44	-16.447± 1.96
Fracturgtility	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Hardness	1934.6± 26.14	2240.8± 19.78	1818.78± 1.43	2022.9± 14.56	1813.6± 18.79	1719.22± 13.29

4) 최종 제조된 NFS의 관능검사

최종 제조된 NFS를 12명의 패널들을 통하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사는 조직감, 맛, 냄새, 외형에 대한 기호도를 대상으로 검토하였다. 관능검사 방법은 7점 순위 검정 test를 사용하였으며, 각 제품의 선호도를 평가하여 선호도가 낮으면 1점, 높으면 7점을 주게 하여 각 점수를 평균 내어 선호도를 판단하였다. Sample은 무작위성을 주어 NFS 1(6시간 활성화), NFS 2(12시간 활성화), NFS 3(24시간 활성화)으로 하였다. Tab. 5-2, 5-3, 5-4에 나타난 바와 같이 NFS의 조직감(단단함, 탄성, 점착성)이 다른 sample보다 높은 점수를 받았으며, 맛에서도 콩비린내는 적고 단백한 맛은 높은 것을 나타냈다. 즉 6시간 전발효과정을 거친 경우 가장 관능성이 좋은 것으로 나타나 제조 최적조건으로 판단되었다.

Table 5-2. Sensory evaluation of flavor and texture (pre-fermentation 6 h)

	flavor			hardness	texture	
	sourness	콩비린내	단백한맛		springiness	adhesiveness
P 1	6	4	2	6	5	2
P 2	4	3	3	6	6	5
P 3	6	2	2	6	6	2
P 4	6	5	2	6	7	6
P 5	3	5	4	7	5	7
P 6	4	5	3	5	5	4
P 7	5	6	3	5	5	5
P 8	7	6	5	5	4	5
P 9	5	3	4	5	2	4
P 10	5	2	3	4	4	5
P 11	2	5	5	6	5	6
P 12	5	2	5	4	5	5
평균	4.83	4.00	3.42	5.42	4.92	4.67

Table 5-3. Sensory evaluation of flavor and texture (pre-fermentation 12 h)

	flavor			hardness	texture	
	sourness	콩비린내	단백한맛		springiness	adhesiveness
P 1	5	4	3	5	5	2
P 2	5	5	1	3	3	4
P 3	3	2	2	6	6	2
P 4	6	5	3	6	7	6
P 5	5	2	2	5	5	4
P 6	6	5	3	3	3	4
P 7	6	6	3	4	6	6
P 8	5	6	4	4	5	5
P 9	6	5	5	6	5	2
P 10	7	4	2	4	3	2
P 11	5	4	2	2	3	3
P 12	4	2	5	2	3	3
평균	5.25	4.17	2.92	4.17	4.50	3.58

Table 5-4. Sensory evaluation of flavor and texture (pre-fermentation 24 h)

	flavor			hardness	texture	
	sourness	콩비린내	단백한맛		springiness	adhesiveness
P 1	6	5	3	6	6	2
P 2	5	6	2	4	5	6
P 3	2	3	3	5	4	1
P 4	5	4	4	6	4	5
P 5	1	1	2	2	7	6
P 6	6	6	3	3	3	4
P 7	6	6	3	4	6	6
P 8	4	5	4	5	3	5
P 9	3	6	5	2	2	2
P 10	6	3	4	2	2	3
P 11	4	3	3	3	2	3
P 12	6	5	3	6	2	2
계	4.50	4.42	3.25	4.00	3.83	3.75

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 연구개발 목표 달성도

1. 1차년도 연구개발 목표 달성도

연구 개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
스타터 후보균의 미생물학적 거동 및 생리화학적 특성 (<i>in vitro</i> , <i>in situ</i>) (주관연구기관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 스타터 후보균의 생리적 특성, 대사활성, 효소활성, 항균활성(bacteriocin) 검토 (<i>in vitro</i>) <ul style="list-style-type: none"> - 원료 대두단백의 미생물학적, 물리·화학적 특성 - 발효 및 숙성기간 중 스타터 미생물의 거동 및 균상 변화 (<i>in situ</i>) ○ NFS 제조방법의 최적화 및 표준화 <ul style="list-style-type: none"> - NFS 매트릭스에서의 스타터 후보균의 물리·화학적 및 생화학적(효소학적) 특성 검토 ○ 콩단백 원료의 생리활성, 가공 기술적 특성 및 가공적성 검토 	100
Starter 후보균 적용에 의한 NFS 제조 (협동연구기관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 콩단백 원료의 가공 기술적 특성 및 적성검토 <ul style="list-style-type: none"> - NFS 제조 및 관능검사 - NFS 매트릭스에서의 향미성 	100

2. 2차년도 연구개발 목표 달성도

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
스타터 선정, 각종 변화 및 원료 배합, 발효·숙성 조건 최적화 (Pilot Scale) (주관협동기관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 젖산균 스타터 선정 <ul style="list-style-type: none"> - 곰팡이 균주(<i>Actinomucor elegans</i>, <i>Rhizopus oligosporus</i>)의 스타터로서의 활용 가능성 검토 - 곰팡이 균주의 다양한 생리화학적 특성, mycotoxin 생산성 및 변이원성 검토 (<i>in vitro</i>) ○ NFS 시스템에서 다양한 특성 확인 (<i>in situ</i>) <ul style="list-style-type: none"> - 탈지대두분, 탈지대두단백, 농축콩단백, 분리콩단백으로부터 적합한 가공한 조건 설정 - 필요 원료 및 첨가물 사용 검토 	100
NFS mix의 최적화 및 시제품 제작 (협동연구기관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발효 및 숙성 조건의 최적화 <ul style="list-style-type: none"> -첨가물의 필요성 및 첨가 조건 검토 -원료 배합, casing 조건의 최적화 	100

3. 3차년도 연구개발 목표 달성도

연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
최적화하여 제조된 콩 단백질발효식품(NFS)의 품질특성, 저장성 개선 및 건조공정 등 최종 제조공정 확립 (Industry Scale) (주관협동기관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산업적 규모로 제조된 NFS의 품질 특성 (관능성, 생리활성 및 영양성, 가공기술성 등) 검토 <ul style="list-style-type: none"> - 저장기간 및 미생물학적 안정성 극대화 방안 수립(각 hurdle 개선 방안 수립) - 제조된 NFS의 미생물학적, 물리화학적, 생화학적 및 생리활성(isoflavones, phytic acid 등) 검사 ○ 생리활성이 우수한 새로운 형태의 고단백 발효식품 제조 <ul style="list-style-type: none"> - 건조탈수공정 최적화 - 산업적 규모의 최종 발효 및 숙성 공정 확립 	100
NFS의 산업적 제조 (협동연구기관)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 산업적 규모의 최종 제조조건의 확립 <ul style="list-style-type: none"> - scale-up의 물성 및 관능 특성 분석 - 건조 및 탈수 공정 확립 	100

4. 평가 착안점

구 분	착 안 사 항	척도 (점수)
1차 년도 (2003)	<ul style="list-style-type: none"> • 원료 대두 및 대두단백의 생리활성, 미생물학적·물리화학적 특성 검토 • 스타터 후보균의 생리적 특성 및 생화학적 특성 • 대두단백을 이용한 새로운 발효 식품(NFS)의 제조방법 최적화 및 표준화 • NFS matrix에서의 스타터 후보균의 물리화학적 및 생화학적 특성 • 발효 및 숙성기간 중 스타터 후보균의 미생물학적 거동 및 균상 변화 	20 20 20 20 20
2차 년도 (2004)	<ul style="list-style-type: none"> • 곰팡이 균주의 생리적 및 생화학적 특성 • 곰팡이 균주의 mycotoxin 생산성 및 변이원성 검토 • 콩단백, 기타 원료 및 첨가물 배합조건 검토 • 발효 및 숙성 조건 확립 • 스타터 균주의 기술적 유용성 및 발효과정 중의 생리활성 물질 변화 분석 	20 20 20 20 20
3차 년도 (2005)	<ul style="list-style-type: none"> • NFS의 품질(영양성, 관능성, 가공기술성) 특성 • NFS의 미생물학적 안정성 확보 • 산업적 규모로 제조된 NFS의 미생물학적, 물리화학적, 생화학적 및 생리활성 검사 • 제조, 발효·숙성 공정 및 건조탈수 공정 최종 확립 	25 25 25 25
최종 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 젖산균 및 곰팡이 스타터 선정 기준의 적합성 • 발효시스템의 효율적 확립 • 콩단백의 효율적 이용, 제품의 참신성 (경제성, 품질평가 등) • NFS의 산업화 가능성 • 최종 선정된 젖산균 및 곰팡이 스타터를 적용하여 산업적 규모에서 제조된 제품의 품질 평가 및 제조공정 확립의 타당성 	20 20 20 20 20

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 기술적 측면

국내 대두 식품제조에 적합한 스타터를 개발하여 제조공정 확립 (대단위 산업화 가능)

- 새로운 형태의 대두 발효식품의 출현으로 대두가공 식품에 획기적 변화
- (Hurdle-Technology의 응용 식품으로서) 국내 식품발효기술 및 biopreservation 기술수준 또는 응용력 제고

2. 사회·문화적 측면

- 고 생리활성을 지닌 건강식품 출현으로 고급문화 향유
- 국내 대두 및 대두단백의 장기적 수급 대책 효과
- 쌀과 더불어 새로운 형태의 주식문화 형태에 대한 관심 증폭
- NFS는 발효식품분야에 유익한 영향을 미침
 - ① 냉장하지 않고도 고품질 유지 가능
 - ② 영양가의 증가 - 생리활성물질 증대
 - ③ ready to eat
- 대두 단백질의 이용성 증대 (경제성, 고기능성)
- 가공으로 인한 대두 및 대두단백의 수급조절 효과, 농가 보호 및 두가 안정 (국내 대두생산 자급률 향상)
- 소비자에 대한 새로운 고급 대두제품 제공
- 시장개방에 대한 경쟁력 확보
- 건강식품인 대두의 수요 증가로 NFS의 구미시장으로의 수출 가능성

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 연구개발 결과의 활용계획

- 대두 단백을 이용한 새로운 발효식품(NFS) 제조법 - 특허출원 준비중
- NFS의 발효 과정 중 미생물학적 연구, 향미성분 및 생리활성 물질의 변화 등에 대한 결과 SCI급 학술지 발표 - 2 편 준비 중에 있음.
- 산업체 활용으로 제품화 및 새로운 대두 식품개발에 응용 - 참여 기업이 시도할 예정임

제 2 절 추가 연구의 필요성 및 타 연구에의 응용

본 연구를 수행하여 콩단백을 이용하여 새로운 형태를 갖는 식품의 개발과 기능적 측면을 고려한 식품학적 특성을 검토함으로써 산업적인 제품 개발 가능성을 충분히 제시하였다고 사료된다. 그러나 콩 자체의 특유의 불쾌취와 맛의 개선, 생리활성물질의 변화 및 발효미생물들이 가지고 있는 여러 가지 기능성 측면을 충분히 검토하는 연구는 더 수행되어야 할 것으로 생각되며 부가가치를 높이기 위해 다른 형태의 제품 개발도 이루어져야 할 것이다. 또한 외국의 경우 starter의 개발이 중요한 관심사로 경제적 소득이 큰 것을 감안할 때 본 과제에서 연구된 starter culture의 기능적 특성을 고려하여 활용도가 높은 starter의 개발에 대한 충분히 연구가 더 진행되어야 할 것으로 사료된다.

제 3 절 기업화 추진 방안

본 연구는 산업화를 하는데 초점을 맞추어 수행하였으며 (주) 샘표와 협동과제를 수행함에 있어 국내 콩 발효식품이 양념으로서의 기능을 벗어나 그 자체를 주식으로 하는 새로운 식품개발을 겨냥하고 있으며 이에 따라 제조된 NFS의 산업적 가치에 대해 자체적으로 긍정적 평가를 하고 있다.

또한 NFS를 응용하여 또 다른 형태의 제품개발에 대한 연구를 수행하는 데에 기초적 자료를 제시할 수 있을 뿐 아니라 제조 방법에 대한 노하우를 바탕으로 또 다른 콩 단백질 제품을 개발하여 건강을 생각하는 소비자의 욕구를 충족시킬 수 있을 것으로 사료된다. 이 뿐만 아니라 포장재의 변화를 통해 섭취방법을 쉽게 하여 대용식품으로서의 가치를 갖는 식품개발이 가능할 것으로 생각된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 외국의 콩 발효제품에 대한 학문적 연구와 기술적 자료 수집

중국이나 대만의 sufu, 인도네시아의 temphe, 필리핀의 tahuri, 태국의 tau hu yee, 일본의 tofuyo 등에 대해 각국에서 콩 발효식품의 유용성과 생리활성을 규명하며 안전성을 확보한 제품 개발 및 그에 대한 연구가 활발하게 진행되어 있다. 특히 sufu의 경우 많은 연구가 진행되어 있는데 치즈와 유사한 부드러운 조직감과 풍미 및 우수한 소화율을 갖는 식품으로 그 가치를 입증하고 있다. 기술적으로 이러한 제품을 제조하기 위해서는 기능성 starter에 대한 연구가 진행되고 있으며 이에 대한 심도 높은 연구 자료를 구축하였다.

2. Biogenic amine 생성능력의 *in vitro* 상의 측정 방법

Biogenic amine (BA)는 다양한 발효식품에서 발견되는 유기화합물로 식품에서 몇 가지 독성을 나타내는 것으로 알려져 있으며 특히 histamine과 tyramine의 독성은 많이 연구되어져 왔다. 발효 미생물의 BA생성 유무는 배지에 amine 전구물질을 첨가하여 배지의 색변화를 관찰하여 선별하거나 HPLC 분석을 하는 방법이 있으며 본 연구에서는 pH indicator로서 bromocresol purple, 유도물질로서 pyridoxal-5-phosphate를 첨가한 선별배지를 사용하였다. 정량분석을 위해서는 HPLC을 이용할 수 있으며 본 연구에서는 수집된 연구들을 통해 분석 방법을 체계화하여 효율적인 방법을 확립하였으므로 앞으로 균주의 BA의 생산성을 확인하여 안전성을 검토하는데 보다 손쉽고 정확한 검출 방법을 제시할 수 있었다.

FEMS Microbiology Letters, 199 (2001) 9-13

Meat Science, 59 (2001) 267-176

International Journal of Food Microbiology 53 (1999) 33-41

3. Mycotoxin 생성능 검증방법

곰팡이의 mycotoxin의 생성 여부 및 안전성은 균종별로 다양한 종류의 mycotoxin 생성뿐만 아니라 한 균종 내에서도 다종의 mycotoxin이 검출되는 문제로 인해 한두 가지 분석 방법으로는 검출이 불가능하다. 본 연구에서는 여러 곰팡이 후보균의 안전성을 검토하기 위한 방법으로 생물학적인 검증방법을 택하였으며 mutagenicity, cell cytotoxicity, brine shrimp을 이용한 독성 실험을 통해 안전성을 검증하였다.

Food and Chemical Toxicology, 38 (2000) 1097-1102

Food and Chemical Toxicology, 40 (2002) 1085-1090

Arch Toxicol, 72 (1998) 342-346

4. Isoflavone와 phytic acid의 효율적 측정 방법 구축

기존의 Wang 등에 의한 방법은 추출방법이 복잡하고 HPLC 분석 시간이 60 min으로 시료 당 약 1시간 정도의 시간이 소모되는 단점이 있었으나 본 연구에서는 0.1% acetic acid가 함유된 DW와 acetonitrile를 이용하여 분석함으로서 추출방법을 간소화하고 분석시간도 30 min으로 단축할 수 있었다. 또한, phytic acid의 경우 화학적 방법과 물리적 방법들을 검토하여 가장 정확한 방법을 구축하였다.

Food Research International, 38 (2005) 551-559

JARQ, 38 (2004) 259-265

Food Research International, 33 (2000) 393-397

5. NFS 제조 방법 구축

NFS는 새로운 형태의 제품이므로 기존에 제시된 발효식품들로는 비교하기가 어렵다. 그러나 소비자들에게 친숙한 이미지를 주어 산업화하기 위해 유럽의 발효소시지의 개념을 접목하였고 이를 위해 fermented sausage, 특히 salami에 대한 기술적 방법들을 습득하였다. 또한 soybean protein의 특성에 대한 자료를 확보하였다.

J. Agric. Food. Chem., 46 (1998), 3039-3046

J. Agric. Food. Chem., 47 (1999), 4375-4378

Chem. Mikrobiol. Technol. LM. 9 131-143

Fleischwirtschaft, 73(1), 89-92

제 7 장 참고문헌

- 김우정. 1987. 콩단백질의 영양과 이용. ASA 학술총서(15). 미국대두협회
- 김창식, 신호선. 1971. 콩을 이용한 치즈제조에 관한 연구, 한국식품과학회지, 3(1), 57-63
- 김학정, 김범용, 김명환. 1995. 제조조건에 따른 두부의 물성 연구. 한국 식품 과학회지, 27(3), 324
- 박관화, 김재욱. 1980. 식물성 치즈(Sufu)의 제조. 한국농화학회지, 23(2), 115-122
- 변시명, 권중훈, 김철진, 이양희. 1978. 대두 단백질 함유의 제조에 관한 연구. 한국식품과학회지, 10(2):143
- 유주현, 신원철, 변유량, 양용. 1978. 대두유를 이용한 치즈 유사제품의 제조에 관한 연구. 10(2), 231-236
- Bacus, J.N. & W.L. Brown, 1981, Use of microbial cultures; Meat Products. *Food Technol.* (1) 74-78, 83
- Campbell, M.F., Kraut, C.W., Yackel, W.C. and Yang, H.S. 1985. Soy protein concentrate. In *New Protein Foods*. Vol. 5. Seed Storage Proteins, Altschul, A.M. and Wilcke, H.L. (eds.), pp. 02-338. Academic Press. Inc., New York
- Chassy, B. 1986 Lactobacilli in food fermentation. LB: 197-207
- Chung, H.Y. 1999. Volatile components in fermented soybean (*Glycine max*) curds. *J. Agric. Food Chem.*, 47(7), 2690-2696
- Fransen, N.G., O'connell, M.B., Arendt, E.K., 1997. A modified agar medium for the screening of proteolytic activity of starter cultures for meat fermentation purposes. *Int. J. Food Micro.* 36. 235-239

Golbitz, P. 1995. Traditional soyfoods: processing and products. *J. Nutr.* 125(3S), 570S-572S

Hammes, W.P. 1986 Starterkulturen in der Fleischwirtschaft. *Chem. Mikrobiol. Technol.*

LM. 9 131-143

Han, B-Z., Beumer, R. R., Rombouts, F. M., Nout, M.J.R., 2001. Microbiological safety and quality of commercial sufu—a Chinese fermented soybean food. *Food Control.* 12. 541-547

Han, B-Z., Beumer, R. R., Rombouts, F. M., Nout, M.J.R., 2001. A chinese fermented soybean food. *Int. J. Food Micro.* 65. 1-10

Horan, F.E. 1974. Soy protein products and their production. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 51, 67A-73A

Hou, J.W., Yu, R.C., Chou, C.C., 2000. Changes in some components of soymilk during fermentation with bifidobacteria. *Food Research International.* 33. 393-397

Hwang, H. J. R. Vogel & W.P. Hammes 1993. Entwicklung von Schimmelkulturen für die Rohwurstherstellung: Charakterisierung der Stämme und toxikologische Bewertung. *Fleischwirtschaft*, 73(1), 89-92

Hwang, H. J. R. Vogel & W.P. Hammes 1993. Entwicklung von Schimmelkulturen für die Rohwurstherstellung: Technologische Eignung der Stämme und sensorische Bewertung der Produkte. *Fleischwirtschaft*, 73(3), 327-332

Jackson, C.-J.C., Dini, J.P., Lavandier, C., Rupasinghe, H.P.V., Faulkner, H., Poysa, V., Buzzell, D., DeGrandis, S., 2002. Effects of processing on the content and composition of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Process Biochemistry.* 37. 1117-1123.

Katsaras, K. & L. Leistner 1987. Solid-state Fermentation von Rohwurst. *JB d. BAFV* 7497-7500

- Kinsella, J.E. 1979. Functional properties of soy proteins. *J. Am. Oil Chem Soc.*, 56, 242-258
- Kitamura, K. 1997. Biochemical characterization of soybean protein consisting of different subunits of glycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 45(3), 656-660
- Kohyama, K., Sano, Y. and Doi, E. 1995. Rheological characteristics and gelation mechanism of tofu (soybean curd). *J. Agric. Biol. Chem.*, 43, 1808-1812
- Leistner, L. 1986 Allgemeines fuer Rohwurst und Rohschinken. *MTB d. BAFF*, 1-29
- Leistner, L. 1986 Huerden-Technologie fuer die Herstellung stabiler Fleischerz.. *Flw.* 66(1), 10-15
- Lockmiller, N. R. 1972. Textured protein products. *Food Technol.*, 26, 56
- Longenbach, J.I., Heinrichs, A.J., 1998. A review of the importance and physiological role of curd formation in the abomasum of young calves. *Animal Feed Sciences and Technology.* 72. 85-97
- Luecke, F.-K. 1986 Mikrobiologische Vorgaenge bei der Herstellung von Rohwurst und Rohschinken. *Flw.* 66(3) 302-309
- Noh, E.J., Park, S.Y., Park, J.I., Hong, S.T., Yun, S.E., 2005. Coagulation of soymilk and quality of 새끼 as affected by freeze treatment of soybeans. *Food chemistry.* 715-721
- Pyo, B.-S., Oh, Y.-J., Park, Y.-W., 1994. Studies on the characteristics of the soybean protein coagulating enzyme from microorganism and the soy cheese-like food (curd). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(6). 973-979
- Prestamo, G., Lesmes, M., Otero, L. and Arroyo, G. 2000. Soybean vegetable protein (tofu) preserved with high pressure. *J. Agric. Food Chem.*, 48(7), 2943-2947
- Roedel, W & A. Stiebing 1987. Kontinuierliche Messung des Reifungsverlaufs von Rohwurst. *Flw.* 67(10) 1202-1211

Saio, K. 1979. Tofu-relationships between texture and fine structure. *Cer. Food World*, 24, 342

Sara, B.-C., Holzapfel, W.H., 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Micro.* 53. 33-41

Schaefer, M.J. and Love, J. 1992. Relationships between soybean components and tofu texture. *J. Food Quality*, 15, 53~66.

Schmidhofer, T. 1986 Derzeitiger Trend bei der Herstellung fermentierter Fleischwaren. *Chem. Mikrobiol. Technol. LM.* 9, 144-146

Sparringa, R. A., and Owens, J. D. 1999. Protein utilization during soybean temphe fermentation. *J. Agric. Food. Chem.* 47. 4375-4378

Thanh, N.V., Nout, M.J.R. 2002. *Rhizopus oligosporus* biomass sporangiospore yield and viability as influenced by harvesting age and processing conditions. *Food Microbiology.* 19. 91-96

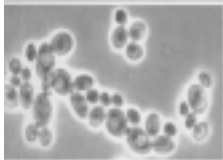
Weber, H. 1986 Rohwurstherstellung mit Starterkulturen im Handwerksbetrieb-Entwicklungs-stand und Tendenzen. *Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.* 9, 147-151

부 록

학회 발표 및 논문 발표

2003년도 한국식품영양과학회
정기총회 및 제 54차 학술발표회

.....
건강기능식품의 유효성 평가



일시 / 2003년 11월 29일 (토) 09:00

장소 / 충북대학교 개신문화관

주최 / 한국식품영양과학회

후원 / 한국과학기술단체총연합회
충북대 RRC

후원사 / 서울우유협동조합

협찬사/ 동서약품 식품사업부, 이오무역,
(주)이플라이프, WBG Korea,
Bio & 21, (주)빅숲, 체리부로,
풀무원건강생활(주), (주)해찬들

P3-37

Physiological and Structural Changes of a Soybean Product Fermented by Lactic Acid Bacteria

Min-Kyu Sohn*, Un Jin Yun, Mi Young Yoon, Jae-Hyung Mah and Han-Joon Hwang
Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

This study was performed to develop a soybean product (NFS) fermented by curd-forming lactic acid bacteria. For curd formation, two isolates selected because of excellent curd-forming properties and carbohydrates hydrolyzing abilities. In addition, three commercial lactic acid bacteria were compared with the isolates. To enforce the texture properties in the soybean product, the product was treated with a reagent for coagulation. And then, physiological and textural change, and micro-structure in NFS were observed. As the result, NFS inoculated with the selected isolates and commercial strains showed that pH-value decreased from 5.2 to 4.8 and viable cell counts were reduced 10^9 to 10^8 . The isolates produced more acids and less sour flavor than commercial ones. It was observed using SEM and then the strains inoculated impartially, although the micro-structure in NFS had many pore. Consequently, the isolates may be potential for starter culture to produce NFS. The candidates of the strains will be furtherly applied to NFS production *in situ*.

2004년 한국식품과학회 제71 학술대회

International Symposium on FUSION TECHNOLOGY

기간 : 2004년 6월 23일(수)~25일(금)
장소 : 강원도 용평리조트

Fusion Technology in Food Science



한국식품과학회

후원 : 강원도청, 한국학술진흥재단
한국과학기술단체총연합회

P6-072

Antimicrobial Activity of *Enterococcus faecium* S2C11 from Fermented Soy Product against *L. monocytogenes*

Mi-Young Yoon*, Min-Kyu Son, and Han-Joon Hwang

Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University

Total 189 strains were isolated from 20 samples of traditional fermented soybean food. Antimicrobial activity was examined by the modified direct method and an agar diffusion method. Among of isolates, S2C11 and S2C16 strains were showed the strongest antimicrobial activity against *L. monocytogenes*. They were identified as *Enterococcus faecium* with 16S rDNA sequence and determined hemolysis and amine decarboxylase activity for safety. Antimicrobial spectrum was determined against 17 strains of pathogens and 6 strains of lactic acid bacteria. With regards to the agar diffusion method, the clear zone on *L. monocytogenes* was 15 mm, indicating the strain is more sensitive than other strain tested, and corresponding to 0.6 mL eq./disc of MIC. Mode of action about enzyme treatment and heat treatment, effects of pH and solvent were determined. Antimicrobial activity of S2C11 was stable to solvent, acidic and basic pH (except pH 12), and to heat treatment conditions of at 45, 60, 75, 90, and 121°C for 15 and 30 min, respectively (except at 121°C for 30 min). Antimicrobial material of S2C11 was presumed as lipid-like material because retained its antilisterial activity after protease, proteinase K, trypsin, cellulase treatment, but was inactivated by lipase.

P3-078

**As Variable Additives, Processing of Soybean Product
Fermented by Lactic Acid Bacteria**

Min-Kyu Sohn*, Mi Young Yoon, and Han-Joon Hwang

Graduate School of Life Science and Biotechnology, Korea University

For developing a soybean product (NFS) fermented by curd-forming lactic acid bacteria, this study was performed to enforce the texture properties as variable additives. Four parts of additives selected, three kinds of sodium phosphate, hydrocolloid, trans-glutaminase and a whey protein concentrate and were compared with each other. And then, to confirm textural changes in NFS used a texture analyzer (TA) and sensory evaluation. As the result, K-carrageenan and a mixture of xanthan and locust bean gum, two hydrocolloids, and three trans-glutaminases showed that the texture enhanced in about springiness, hardness, gumminess, chewiness, fracturability, adhesiveness and cohesiveness. Although sour flavor as similar with lemon except for sweetness increased when added two hydrocolloids. In other hands, NFS added three sodium phosphates showed that springiness had poor textural changes. And so did a whey protein and a guar gum. Consequently, trans-glutaminases may mostly activate to bind proteins and cooperate with curd-forming lactic acid bacteria. The candidates of the coagulating agents will be further applied to NFS production *in situ*.

2004 Annual Meeting
and International Symposium

"The Current Prospects of Functional and Medicinal Food"

November 17~19, 2004

Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju Island, Korea



Sponsored by

Korea Research Foundation
Korea Science and Engineering Foundation
The Korean Federation of Science and Technology Societies
WONGSHIM Co., Ltd.
WORLD WAY Co., Ltd.
Korea Nohjap Association
Korea Saengsik Association
ASA USA
Jeju City

KFN

The Korean Society of
Food Science and Nutrition
Jeju-do, Cheju Natl Univ
Korea Food & Drug Administration

P6-36

The Use of Toxicological Bioassay and Ames Test to Assess Suitability as a Fungal Starter

Mi-Young Yoon^{1*}, Min-Kyu Sohn¹ and Han-Joon Hwang^{1,2}.

¹Graduated of Life Sciences and Biotechnology, and ²Department of Food and Biotechnology, Korea University

Brine shrimp assay, cell culture test, and Ames test were used to assess safety of selected mold starter candidates. Previously, we have selected mold starter candidates and evaluated their properties according to enzyme activities, morphological characteristics, and growth conditions. Finally, eight strains of candidate were selected and cultured in YES medium. The extracts of mycelium showed stronger effect than culture supernatant on *Artemia salina* test. Mortalities of shrimps showed below 10% in all of samples tested, except for mycelium extract (1 mg/well) of *Penicillium nalgiovense* DSM 897 that was shown to over 30% of mortality. With the cell cytotoxicity to vero cell, *P. camemberti* DSM 1995, *P. camemberti* KCTC 6429, *P. caseicolum* KCTC 6041 showed 26, 21, 19% cell debris, respectively. And to HepG2 cell, viability of *P. camemberti* KCTC 6429 was 79%. In Ames test, five strains were negative because revertants were extremely low compare to positive control and showed no direct mutagenicity. However, *P. camemberti* DSM 1995, *P. caseicolum* KCTC 6041, and *P. camemberti* KCTC 6429 were shown weak positive in the bacterial reversion assay with *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535. Consequently, these results might be suggested *P. camemberti* KCTC 6429. *P. camemberti* DSM 1995, and *P. caseicolum* KCTC 6041 have potential for mycotoxin production.

P3-50

Development of Novel Fermented Soy Product

Min-Kyu Sohn^{1*}, Mi-Young Yoon¹ and Han-Joon Hwang^{1,2}.

¹Graduate School of Life Sciences and Biotechnology and

²Department of Food and Biotechnology, Korea University

This study was performed to develop a novel fermented soy product (NFS) by lactic acid bacteria. For selecting strain of excellent curd-forming and good sensory properties, 20 strains were primarily selected for candidates and compared with three commercial lactic acid bacteria. To enforce the texture properties in the NFS, the product was treated with trans-glutaminase (TG), gluten, hydrocolloid, and starch by adding each ratios. The physiological and textural change of NFS samples were evaluated by texture analyzer and sensory profile. In addition, sugar, salt, and glutinous starch syrup were treated to NFS for developing sensory properties of taste. And nutmeg, mono-sodium glutamic acid (MSG), and glutamate were treated to NFS for developing sensory properties of flavor. As the result, isolate No. S2C16 was selected because of excellent curd-forming, good sensory properties. As the reagents of enhancing the texture, TG and gluten were selected and added 0.3% and 20.0%, respectively. And fructose and glutamate were selected and added each 0.4% and 0.1% to NFS as the additives for improvement of sensory properties. Consequently, the NFS may be potential for novel fermented food, although NFS still had beany flavor and weak texture.

복지사회의
"건강과 식품안전"

제72차 학술발표회, 국제심포지엄 및 정기총회

Health & Food Safety in a Welfare Society

KOSFOST Annual Meeting, June 15-17, 2005

COEX Convention Center, Seoul

- 기간 : 2005년 6월 15일(수) ~ 17일(금)
- 장소 : 서울 COEX 컨벤션 센터
- 주최 : 사단법인 한국식품과학회 www.kosfost.or.kr
- 후원 : 농림부, 식품의약품안전청, 서울특별시,
대상식품(주), 동서식품(주), CJ(주)식품안전연구센터
국제심포지엄 : (주)한국아쿠르드, 매일유업(주), (주)두산R&D센터

식품
안전
한국식품과학회

Production α -galactosidase from *Leuconostoc mesenteroides* and its Application in the Removal of Non-digestible Oligosaccharides in Soybean Milk

Mi-Young Yoon* Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Min-Kyu Sohn, Eun-Jung Lee and Han-Joon Hwang Graduate School of Life Sciences and Biotechnology, Department of Food and Biotechnology, Korea University

The α -galactosidase activities of lactic bacterial isolates were evaluated to select suitable strains for producing functional food from soybean. About 90% of isolates were able to grow in soymilk, lowered the pH, and produced lactic acid. These strains could be classified into three groups based on their hydrolyzing capacity of non-digestible oligosaccharides (NDO). Out of 171 isolates, 34 strains could ferment both raffinose and stachyose. Isolates No. R8 and JK55 were selected having high fermentation ability and were identified as *Leuconostoc mesenteroides* using PCR amplification. The maximum activity of cell-free extract of isolate No. JK55 was determined to 98.6 ± 3.8 AU (μ M/min) between 18 h and 21 h, which corresponded to the late exponential phase of growth and then rapidly decreased to 61.8 ± 4.1 AU after 24 h incubation. On the other hand, the highest activity of isolate No. R8 was 92.9 ± 11.3 AU at 9 h, and slowly decreased to 57.8 ± 6.0 AU after 9 h. Effects of sugars on α -galactosidase activity, raffinose or stachyose acted as efficient inducers. But this enzyme was inhibited by glucose. When same ratio of glucose was added to 0.5% and 1.0% of raffinose, α -galactosidase activities lowered to 41.5 ± 5 and 20 ± 0.7 AU, respectively. In model food system, two strains hydrolyzed effectively oligosaccharides. Especially, isolate No. JK55 strain metabolized preferentially stachyose showing the reduction of 91.52% after 18 h, while the consumption of raffinose was less, 86%. After 24 h incubation, these sugars were completely hydrolyzed in a soymilk. Finally, it is concluded that *L. mesenteroides* JK55 was the most suitable strain to produce the yogurt-like fermented soybean milk without NDO cause flatulence.

2005 International Symposium and Annual Meeting of
the Korean Society of Food Science and Nutrition

"Nutraceuticals and Food Safety for Well-Being Life"

October 19-21, 2005
YongPyong Resort, Gangwon-do, Korea



Sponsored by

Gangwon-do
Korea Science and Engineering Foundation
Korea Research Foundation
The Korean Federation of Science and Technology Societies
Amway, Amway Korea Ltd.
CJ Corp.
Jeollanamdo Innovation Agency for Strategic Industry
Korea Nokjup Association
W M. SON Co., Ltd.
RIS Gwangju-Jeonnam Kimchi Industry Promotion Unit
Chuncheon Bioindustry Foundation
Kangwon BIO-NURI

Hosted by

KFN The Korean Society of Food Science and Nutrition
KFDA Korea Food & Drug Administration

P6-19

Fermentation products of *Leuconostoc mesenteroides* JK55 and *Lactobacillus curvatus* R8 in soymilk

Mi-Young Yoon^{1*} and Han-Joon Hwang^{1,2}.

¹Graduate School of Life Sciences and Biotechnology,

²Department of Food and Biotechnology, Korea University

Leu. mesenteroides JK55 (JK55) and *L. curvatus* R8 (R8) were used for the production of soymilk. The changes in the content of some components including sugars, organic acids, and bioactive isoflavone in soymilk during fermentation were examined. Two strains effectively metabolized the stachyose and raffinose, after incubation for 18 h at 37°C. During the fermentation, contents of raffinose, stachyose, and sucrose and pH decreased. The lactic acid content was 2.0-2.7 folds higher than that in soymilk did not fermented, after 24 h fermentation. In addition, acetic acid content was slightly increased. The bioactive isoflavone content was increased from its initial value of 15.22 mg/100 mL to 39.14 mg/100 mL and 36.05 mg/100 mL in soymilk inoculated with JK55 and R8, respectively. Therefore, a soymilk added nutritive and probiotic value can be prepared by fermentation with JK55 and R8.

P6-20

Kinetic properties of α -D-galactosidase from *Leuconostoc mesenteroides* JK55

Mi-Young Yoon^{1*} and Han-Joon Hwang^{1,2}

¹Graduate School of Life Sciences and Biotechnology,
²Department of Food and Biotechnology, Korea University

The kinetic properties of α -D-galactosidase from *Leu. mesenteroides* JK55 and *L. curvatus* R8 have been investigated to determine the optimum conditions for the hydrolysis of raffinose sugars in soymilk. JK55 showed the stronger activity than R8 to removal of non-digestible oligosaccharides in fermentation of soymilk. Maximum and specific activities of the enzyme produced from JK55 were 33.7 IU and 15.1 AU (IU/mg protein), respectively, at 37°C, pH 7.0. The V_{max} and K_m as concentrate of *p*-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (*p*NPG) were 7.77 IU/mL and 1.08 mM, respectively. The relevance between cell growth and enzyme activity was also examined with mMRS added 5% raffinose. The enzyme activity on *p*NPG was highest in late exponential growth. The enzyme partially inhibited by glucose and retained 72% of its initial activity following 3 months storage at 4°C. The pH stability of α -galactosidase from JK55 was relatively maintained in neutral between pH 6.5 and 10.0. In addition, optimum pH was 7.2. The enzyme activity was shown to have an optimal operating temperature of 37°C. The enzyme showed stability on temperature of range from 0 to 40°C. The half-life at 37°C, was shown to be 1 h. We confirmed that the α -D-galactosidase has the molecular size of about 80 kD using nondenaturing-PAGE together with zymogram.