

최 중
연구보고서

국산대두를 이용하여 이취 및 생리활성이 개선된 두유발효유의 개발

Development of fermented soymilk with improved flavour
characteristics and biological activities using domestic
soybean

매일유업(주) 중앙연구소

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국산대두를 이용하여 이취 및 생리활성이 개선된 두유발효유의 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 6월 일

주관연구기관명 : 매일유업(주)

총괄연구책임자 : 윤 승 섭

연 구 원 : 김 완 식

연 구 원 : 양 진 오

연 구 원 : 김 영 수

연 구 원 : 예 현 수

연 구 원 : 정 병 문

연 구 원 : 박 정 민

연 구 원 : 윤 청 후

협동연구기관명 : 이 화 여 대

협동연구책임자 : 김 영 석

협동연구기관명 : 서울산업대

협동연구책임자 : 이 재 환

위탁연구기관명 : 중 앙 대

위탁연구책임자 : 최 형 균

요 약 문

I. 제 목

국산대두를 이용하여 이취 및 생리활성이 개선된 두유발효유의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 두유발효유를 제조함에 있어서 두유배지에서 성장력 및 산생성 능이 우수하고 α -galactosidase, β -glucosidase와 phytase 효소역가가 높은 균주를 선발하여 두유발효유 제조에 이용함으로써 두유 섭취 시 속이 더부룩한 증상을 개선하고, 배당체 이소플라본을 aglycone으로 전환시켜 소화흡수율을 최대로 높이며, 두유의 고질적인 beany flavor를 저감화시켜 관능적으로 풍미를 개선시킨 두유발효유에 적용시키기 위함이다.

옛부터 대두는 우리민족과 오랜 역사를 같이한 작물임과 동시에 여전히 많이 섭취하고 있는 영양식품으로 이용되어져 오고 있다. 현재까지 대두에 함유되어 있는 식물성 에스트로겐이라 불리는 이소플라본은 폐경기증후군, 골다공증, 암, 심장질환에서의 긍정적인 역할이 부각되고 있지만 위에서 언급한 바와 같이 인간에 대한 생리학적 활성에 대해서 보다 심도 깊은 연구가 필요할 것이라 사료된다. 따라서, 이취 및 생리활성을 개선시킨 두유발효유를 개발하여 출시함으로써 국내에 아직 자리잡지 못한 두유발효유 시장을 개척하는데 도움이 되고자 한다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 두유발효유 제조 시 적합한 유산균 탐색 및 동정

가. 유산균주 탐색 및 동정

- 1) 189종 유산균 순수분리 및 활성화
- 2) 성장력 및 산생성능이 우수한 유산균과 보존 중 후산발효 능력이 약한 유산균 탐색
- 3) 이취성분 농도를 배양과정 중 저감화시키는 유산균 탐색
- 4) α -galactosidase, β -glucosidase와 phytase 생성능이 우수한 유산균 탐색
- 5) 최종 선발된 유산균 동정

나. 두유발효유 제품화를 위한 생산공정 개발

- 1) 이취저감화 생산공정 검토
- 2) 지방산화 억제 생산공정 검토
- 3) 시제품 생산 및 GMO 검증

2. 휘발성 향미성분 및 비휘발성 유기산 분석

매일유업(주)으로부터 시료를 전달받아 고체상미세추출법(Solid Phase Microextraction, SPME)을 사용하여 추출하고 Gas Chromatograph/Mass Spectrometry(GC/MS)로 분석하였다.

3. 지방산, lipoxygenase 활성 및 이소플라본 분석

매일유업(주)으로부터 동결건조된 시료를 전달받아 GC와 HPLC 분석을 실시하였다.

4. 항산화 및 항염증 활성 분석

매일유업(주)으로부터 동결건조된 시료를 전달받아 대두발효유 metabolome의 친수성(hydrophilic) 및 비친수성(hydrophobic) 대사체를 추출하여 NMR 분석 대사체의 다변량 통계분석을 실시하였다(PSA, PLSR). 또한, 동결건조된 시료를 추출하여 free-radical scavenging activity, total phenolic, total flavonoid, MTT assay 및 COX-2 Luciferase assay (I)을 실시하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

189종(Lactobacilli 92종, Bifidobacteria 69종, Streptococci 5종)의 유산균주를 이용하여 두유배지에서 성장력 및 산생성능을 측정하고, α -galactosidase, β -glucosidase와 phytase 역가를 측정하여 Lactobacilli(7종)는 난소화성 대두올리고당을 분해하여 소화흡수율을 개선시키는 α -galactosidase 역가가 우수한 균주로서 선발하였으며, Bifidobacteria(8종)와 Streptococci(5종)는 배당체 이소플라본을 비배당체 이소플라본으로 전환시키는 β -glucosidase 역가가 우수한 균주로서 선발하였다. 1차적으로 선발된 20종의 유산균주로 37℃에서 24시간 배양하여 제조한 두유배양액의 휘발성 향미성분, 지방산 및 이소플라본, 항산화 활성 분석을 실시하여 6종(Lactobacilli 2종, Bifidobacteria 2종, Streptococci 2종)의 유산균주를 2차 선발하였

다. 2차 선발된 6종의 유산균주를 L-B-S형태로 혼합하여 배양액을 제조하였고, 관능검사를 실시하여 강한 후산발효로 인해 전체적인 풍미가 낮은 Lactobacilli(2종)를 제외시켰다. Bifidobacteria 2종, Streptococci 2종을 B-S형태로 혼합하여 배양시간별, 항산화제(Vit A, C, E) 첨가, 질소충진(용존산소 제거) 등의 공정을 검토한 결과 휘발성 향미성분이 감소하는 경향을 보였다. 배양시간이 증가하면서 배당체 이소플라본이 aglycone으로 전환되는 경향을 보였지만, 항산화제 첨가 및 질소충진이 두유배양액의 배당체 이소플라본을 aglycone으로 전환시키는데 미치는 영향은 미비했다. Free radical scavenging activity, total phenolic, total flavonoid 분석 결과 항산화제 첨가 시 높게 나타났으나, 질소충진은 영향을 주지 않았다. 세포 독성을 본 MTT assay 실험에서는 항산화제 첨가가 세포독성에 유의적인 차이를 나타내지 않아 대두발효유 추출물이 세포독성을 가지고 있지 않음을 알 수 있었다. 항염증 활성 효과를 기대하여 COX-2 실험을 하였으나, 항염증 효과가 없는 것으로 밝혀졌다. 상기 결과를 토대로 최종적으로 B62-S12 균주를 선발하여 동정을 실시하였다.

최종적으로 선발된 B62-S12 균주를 이용하여 배양액을 제조하고, 백설탕과 향료를 첨가하여 매일유업(주) 광주공장에서 시제품을 생산하였다. 시제품을 국내제품(J사) 1종, 일본제품(S사) 1종과 비교하여 시제품의 휘발성 향미성분 분석 결과 총 41개의 휘발성 향미성분이 분석되었으며, 대체적으로 과일향의 향기성분을 나타내는 휘발성 향미성분이 검출되었다. 이는 향료와 백설탕이 가미된 당액 때문으로 사료된다. 특히, 사과향, 파인애플향 및 달콤한 성분들인 3-methylbutyl acetate, 2-methylbutyl acetate, butyl acetate, *l*-limonene, linalool 등이 다량으로 정량되었고, 반면 2-ethylfuran이나 hexanal과 같은 지방산화로 인한 이취성분들은 동정되지 않았다. 시제품의 이소플라본 분석 결과 1.42 mmol/g로서 S사의 0.4 mmol/g, J사의 0.35 mmol/g 보다 2배 이상 정량되어 B62-S12 균주의 생리활성 개선 효과가 높은 것으로 판단된다.

이상의 연구결과를 토대로 이취 저감화 및 생리활성을 개선시킨 두유발효유 개발에 적합한 유산균주에 대하여 지적재산권을 가지고, 국산대두를 이용하여 기능성 두유발효유를 제품화함으로써 자사의 이익 창출 및 국민 건강 증진에 기여할 것으로 판단되며, 국산대두 소비 촉진 및 농가 소득 증대에 이바지할 것으로 판단된다.

SUMMARY

I . Title

Development of fermented soymilk with improved flavour characteristics and biological activities using domestic soybean

II . Purpose and significance

Soybean, a crop used in cook of the traditional korean food, has been a fixture of the Korean diet for centuries. Soy isoflavones are phytoestrogens which are plant-derived nonsteroidal compounds that possess estrogen-like biological and antioxidant activity. They have been reported as having an beneficial effect on climacteric syndrome, osteoporosis and cancer.

This study aimed at improving the digestibility and reducing the off-flavour of fermented soymilk. The lactic acid bacteria for fermented soymilk were selected by comparing growth , acidity, conversion of isoflavones glycoside to aglycone and reduction of beany flavour during fermentation.

Progresses obtained in this study are expected to contribute to revitalize the market of fermented soymilk by developing the techniques to produce the fermented soymilk 'easy to drink' which is more available for consumers in both digestion and taste.

III. Contents and scope

1. Screening and identification of the lactic acid bacteria suitable for fermented soymilk
 - A. Screening and identification of lactic acid bacteria
 - 1) Activation and isolation of 189 strains of lactic acid bacteria

- 2) Screening of superior lactic acid bacteria in growth and acidity
- 3) Screening of superior lactic acid bacteria in reduction of beany flavour
- 4) Screening of superior lactic acid bacteria in enzyme activity such as α -galactosidase, β -glucosidase and phytase
- 5) Identification of selected lactic acid bacteria

B. Development of manufacturing process

- 1) Examination of manufacturing process to reduce beany flavour
 - 2) Examination of manufacturing process to inhibit the lipid oxidation
 - 3) Pilot production and verification of genetically modified organisms(GMO)
2. Analysis of volatile flavour compounds and non-volatile organic acids
 3. Analysis of fatty acids, isoflavones and lipoxygenase activity
 4. Analysis of antioxidant and anti-inflammatory activity

IV. Results and suggestion of application

189 strains of lactic acid bacteria (92 of lactobacilli, 69 of bifidobacteria, 5 of streptococci) were screened by measuring growth, acidity and enzyme activity of α -galactosidase, β -glucosidase and phytase. 7 of lactobacilli were chosen by measuring α -galactosidase activity which indicates the capability of breaking the indigestible soybean oligosaccharide into the digestible form. 8 of bifidobacteria and 5 of streptococci were selected by testing β -glucosidase activity which indicates the capability of converting isoflavone glycoside to alycone.

6 strains(2 of lactobacilli, 2 of bifidobacteria, 2 of streptococci) of 20 lactic acid bacteria were selected based on the amount of volatile flavor compounds, conversion activity of isoflavone glycoside to aglycone and antioxidant activity through fermentation at 37°C for 24 h. They were mixed and inoculated in

lactobacilli–bifidobacteria–streptococci form and 2 of lactobacilli were omitted due to their strong post–acidification. Finally, the B–S form constituted with 2 of bifidobacteria and 2 of streptococci were cultivated under various culture conditions to optimize process of the fermented soymilk production. Controlling the factors like incubation time, additives (Vit A, C, E as an antioxidant), dissolved oxygen level(nitrogen treatment) resulted in the decrease of volatile off–odor compounds. The conversion rate of isoflavone to aglycone was increased in proportion during fermentation, while both additives and dissolved oxygen level didn't affect on conversion. Free radical scavenging activity, total amount of phenolic compounds and flavonoids became higher when antioxidants were added but nitrogen filling treatment showed no effect on the levels mentioned above.

MTT assay was performed to see the effect of cytotoxicity by the addition of additives but there were no statistical differences in the aspects of toxicity. It means that fermented soymilk shows no toxicity. COX–2 test showed that fermented soymilk have no anti–inflammatory activity.

Using mixed culture of B62–S12 form by final selection, fermented soymilk was produced in the factory of Maeil Dairies Co., Ltd located in Kwang–Ju. The volatile flavours of Products were analyzed by GC/MS and 41 kinds of components were detected. Most of volatile flavour compounds were identified as fruity flavours from artificial flavours and sugar. 3–methybutyl acetate, 2–methybutyl acetate, butyl acetate, limonene and linalool were detected in large quantities, while beany flavour compounds like 2–ethylfuran and hexanal originated from lipid oxidation were not detected. Isoflavone analysis of products showed that aglycone contents of ours(1.42 mmol/g) were quantified over twice than 2 of commercial products(0.4 mmol/g, 0.35 mmol/g, respectively)

In this study, we confirmed that B62–S12 strains are prospective on improving physiological activities by converting isoflavones glucosides to aglycone and taste of fermented soymilk by reducing beany flavours.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	14
Chapter 2. International, domestic trends of the technical development -----	17
Part 1. International, domestic market of soymilk -----	17
Part 2. International, domestic trends of the target technical development --	19
Chapter 3. Results and discussion -----	20
Part 1. Screening of lactic acid bacteria suit for fermented soymilk -----	20
1. Production of soymilk	
2. Isolation and activation of strains	
3. Measurement of the acidity	
4. Measurement of the enzyme activity	
5. Selection of 20 strains of lactic acid bacteria	
Part 2. Analysis of physiological activities and off-flavours from fermented soymilk at different origins -----	46
1. Analysis of volatile flavour contents from fermented soymilk at different origins	
2. Analysis of non-volatile organic acids from fermented soymilk at different origins	
3. Changes of metabolomic profiling from fermented soymilk at different origins	
4. Analysis of isoflavones from fermented soymilk at different origins	
Part 3. Analysis of physiological activities and off-flavors from fermented soymilk with 20 strains of selected lactic acid bacteria -----	58
1. Analysis of volatile flavor contents from fermented soymilk with 20 strains	

of selected lactic acid bacteria

2. Analysis of fatty acids and lipoxygenase activity from fermented soymilk with 20 strains of selected lactic acid bacteria
3. Analysis of isoflavones from fermented soymilk with 20 strains of selected lactic acid bacteria
4. Antioxidant activity from fermented soymilk with 20 strains of selected lactic acid bacteria
5. Secondary selection of 6 strains of lactic acid bacteria
6. Tertiary selection of 4 strains of lactic acid bacteria

Part 4. Analysis of physiological activities and off-flavors from fermented soymilk with Bif–St complex culture ----- 76

1. Analysis of volatile flavour contents from fermented soymilk with Bif–St complex culture
2. Analysis of isoflavones from fermented soymilk with Bif–St complex culture
3. Analysis of free–radical scavenging activity from fermented soymilk with Bif–St complex culture
4. Final selection of Bif–St complex culture

Part 5. Examination of manufacture process to commercialize from fermented soymilk with B62–S12 ----- 86

1. Examination of the relation between lipid oxides and offensive flavor contents from fermented soymilk with B62–S12
 - 1–1. Test for reduction of offensive flavor contents
 - 1–2. Analysis of volatile flavor contents from fermented soymilk with Vitamin A, C, E
 - 1–3. Analysis of volatile flavor contents from fermented soymilk with N2
2. Analysis of isoflavones from fermented soymilk with B62–S12
 - 2–1. Analysis of isoflavones from fermented soymilk with Vitamin A, C, E
 - 2–2. Analysis of isoflavones from fermented soymilk with N2

3. Analysis of metabolom, antioxidant and anti-inflammatory activity from fermented soymilk with B62-S12	
3-1. Analysis of metabolom, antioxidant and anti-inflammatory activity from fermented soymilk with Vitamin A, C, E	
3-2. Analysis of metabolom, antioxidant and anti-inflammatory activity from fermented soymilk with N2	
Part 6. Production of fermented soymilks in factory -----	109
1. Production	
2. Composition of ingredients	
3. Standard of the product	
4. Process	
5. Records of production of fermented soymilk	
6. Results of production of fermented soymilk	
7. Analysis of physiological activities and offensive flavors from fermented soymilk	
8. GMO verification from fermented soymilk	
Part 7. Identification of the selected lactic acid bacteria -----	120
Chapter 4. Achievement and contribution -----	127
Part 1. The annual achievement of research and development -----	127
Part 2. Contribution of research and development -----	130
Chapter 5. Application -----	131
Chapter 6. International techniques -----	132
Chapter 7. References -----	135

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요-----	14
제 2 장	국내외 기술개발 현황-----	17
제 1 절	국내외 두유시장의 현황-----	17
제 2 절	연구개발대상 기술의 국내외 현황-----	19
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과-----	20
제 1 절	두유발효유 제조 시 적합한 유산균주 탐색-----	20
1.	두유원액 제조	
2.	균주 순수분리 및 활성화	
3.	산생성능 측정	
4.	효소활력 측정	
5.	20종의 유산균주 1차 선발	
제 2 절	대두 원산지별 이취성분 및 생리활성 비교/분석-----	46
1.	대두 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 휘발성 향미성분 분석	
2.	대두 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 비휘발성 유기산 분석	
3.	대두 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 metabolomic profiling의 변화	
4.	대두 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 이소플라본 분석	
제 3 절	1차 선발된 20종 유산균주의 이취성분 및 생리활성 분석-----	58
1.	1차 선발된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 휘발성 향미성분 분석	
2.	1차 선발된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 지방산 분석 및 Lipoxygenase 활성도	
3.	1차 선발된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 이소플라본 분석	
4.	1차 선발된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 항산화 활성	
5.	6종의 유산균주 2차 선발	
6.	4종의 유산균주 3차 선발	
제 4 절	Bif-St 복합유산균주의 이취성분 및 생리활성 분석-----	76
1.	Bif-St 복합유산균주의 휘발성 향미성분 분석	

2. Bif-St 복합유산균주의 이소플라본 분석
3. Bif-St 복합유산균주의 free-radical scavenging activity 분석
4. 최종 복합유산균주 1종 선발

제 5 절 B62-S12 복합유산균주를 이용하여 제품화를 위한 생산공정 검토----- 86

1. B62-S12균주를 이용하여 제조한 두유배양액의 지방산화물과 이취성분과의 관계 규명
 - 1-1. 이취성분 저감화 검토
 - 1-2. Vitamin A, C, E를 첨가한 두유배양액의 휘발성 향미성분 분석
 - 1-3 N₂를 이용하여 용존산소를 제거한 두유배양액의 휘발성 향미성분 분석
2. B62-S12균주를 이용하여 제조한 두유배양액의 이소플라본 분석
 - 2-1. Vitamin A, C, E를 첨가한 두유배양액의 이소플라본 분석
 - 2-2. N₂를 이용하여 용존산소를 제거한 두유배양액의 이소플라본 분석
3. B62-S12균주를 이용하여 제조한 두유배양액의 metabolome, 항산화, 항염증 활성 분석
 - 3-1. Vitamin A, C, E를 첨가한 두유배양액의 metabolome, 항산화, 항염증 활성 분석
 - 3-2. N₂를 이용하여 용존산소를 제거한 두유배양액의 metabolome, 항산화 활성 분석

제 6 절 시제품 생산----- 109

1. 생산내용
2. 성분 배합비율
3. 제품규격
4. 제조공정도
5. 시제품 생산 일지
6. 시제품 생산 결과
7. 시제품 이취성분 및 생리활성 분석
8. 시제품 GMO 검증

제 7 절 유산균 동정----- 120

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도----- 127

제 1 절 연차별 연구개발 목표달성도----- 127

제 2 절 관련분야에의 기여도----- 130

제 5 장	연구개발 결과의 활용 계획-----	131
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보-----	132
제 7 장	참고문헌-----	135

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

가. 경제산업적 측면

- 1) 국내산 대두를 이용하여 농민의 소득 증대 기대
- 2) 국내산 대두를 이용한 발효식품 개발을 통한 건강기능성 식품 생산
- 3) 기존 두유발효유에 대한 이취를 개선시키고 생리활성물질에 대한 과학적 근거 제시를 통해 국내 수요 확대와 수출 증가를 통한 식품산업 발전

나. 대두의 일반 특징 및 활용 현황

콩(大豆, soybean)은 중국을 비롯한 동아시아가 원산지인 곡물로서 약 5천년 전부터 재배되어 오고 있고, 주 생산국으로는 미국, 중국, 브라질 등이며 세계적으로 연간 1억 8천 톤이 생산되고 있으며, 지난 20년간 콩의 생산량은 2배로 증가하고 있다. 예로부터 동아시아에서 콩은 두부, 유부, 된장, 낱두 등 전통적 식품으로 또는 착유의 원료로 사용되었지만, 최근에는 그 영양성분 및 생리활성 성분이 밝혀지면서 세계적으로 두유, 시리얼, 빵, 칩, 냉동즉석식품, 마가린, 버거, 초콜렛바 등 다양한 식품 원료로 이용되고 있다. 콩은 단백질 40%, 탄수화물은 30% 지질 20% 함유되어 있으며 단백질의 90%가 수용성 globulin의 일종인 glycinin이 대부분이다. 탄수화물 중 20%가 섬유소이고 가용성 당이 10%를 차지하며 지방 중 88%가 불포화지방산이며, 그 중 50%는 linoleic acid, 25%는 oleic acid이다. 또한, 많은 종류의 비타민과 무기질이 함유되어 있는데 특히 비타민B군을 많이 함유하고 있다. 콩은 영양성분 외에도 saponin, phytic acid, lectin, protease inhibitor, oligosaccharide, isoflavone 등의 생리활성 물질이 함유되어 있고, 특히 isoflavone은 항암, 골다공증, 심혈관 질환 예방 기능이 있음이 밝혀지고 있으며 콩에 100-300mg 정도 함유되어 있다. 콩을 이용한 식품 중 두유는 콩의 수용성물질, 즉 고형분과 단백질을 주로 추출하여 이용한 가공제품으로 유제품의 대안으로 각광을 받고 있으며 기존의 유제품에 비해 칼로리가 낮은 건강식으로 인식되고 있다.

다. 국산 대두 이용 이취 및 기능성 개선 발효유의 생산 필요성

국내산 대두와 수입산 대두의 주요성분인 단백질, 지방 및 탄수화물을 비교하여 보면 국내산 대두의 우수성이 인정되고 있으며 최근 대두를 이용한 가공식품이 건강 지향적 식품으로 인식되면서 수요가 증가추세에 있다.(농진청 자료)

구분	단백질(%)	지방(%)	탄수화물(%)	비고
한국	36.2	17.8	25.7	농진청
미국	33.0	21.7	24.6	일본 농림수산성
중국	32.8	19.5	26.2	“
일본	35.3	19.0	23.7	“

1) 유전자변형(GMO)콩이 개발되어 1996년부터 재배되기 시작하여 매년 면적이 확대되어 2002년도에는 미국을 주축으로 약 24백만ha(전체 GMO 작물 재배면적의 69%)에서 GMO콩이 생산되고 있다. 따라서 EU를 비롯한 대두 주요 수입국에서는 GMO제품의 표시제가 이행되고 또한 소비자는 GMO식품의 안정성 문제로 Non-GMO 대두를 선호하고 있어 향후 국내산 대두의 수요는 증대될 것으로 전망된다.

2) 콩 및 두유를 포함한 대두 이용 제품의 경우 풋냄새 혹은 beany flavor 등의 이취(off-flavor)에 의한 소비자 선호성 감소가 시장 확대의 큰 저해원인이 되고 있다. 이취의 생성 원인은 주로 lipoxygenase의 불포화지방산 산화에 의해 유발되고, Lipoxygenase의 활성을 억제하기 위해 이 효소가 결여된 콩 품종의 개발, 여러 종류의 열처리 공정 도입에 의한 효소 불활성 방법이 연구되어 왔다.

3) 이취를 감소하고 대두의 소화율을 높이면서 생리활성효과가 높은 제품을 개발하기 위한 방법으로서 두유 발효 제품 제조가 제시되고 있다. 또한, 두유가 유산균의 좋은 배지로 밝혀짐에 따라 두유의 유산균 발효제품이 개발되고 있다. 발효공정에 의한 향미의 증진 뿐 아니라 Bifidobacteria와 같은 장내 미생물의 발효 작용에 의해 이소플라본을 aglycone의 형태로 전환시켜 장내 흡수율을 증가 시키는 등의 기존 두유와는 다른 생리활성물질의 생성 및 변화가 보고되고 있다.

4) 일반 우유로 만든 발효유와 달리 두유를 이용한 발효유는 콩의 다양한 성분을 자연스럽게 섭취할 수 있는 장점이 있으며, 그 중 하나가 골다공증과 같은 골(骨)과 관련하여 연구되어 있는 이소플라본을 유산균과 함께 섭취할 수 있어 두유를 이용한 발효유는 콩의 영양 가치에 유산균에 의한 건강 증진 효과를 함께 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

5) 발효식품에 대한 기호도가 높은 우리나라는 아직 발효유시장이 유럽수준으로 증가할 여지가 충분히 남아있어 지난 십년간의 6~7%의 성장률을 지속할 것으로 전망된다. 식품 발효에 대한 노하우를 가지고 다양한 발효식품을 섭취하고 있는 우리나라로서는 두유를 이용한 독특한 제품개발을 추진함으로써 국내 시장 창출 및 수출 시장의 확대 가능성이 높다.

6) 양질의 단백질과 필수지방을 다량 함유한 건강식품이지만 이취때문에 일부 소비자들이나 서구인들에게는 거부되어온 두유를 원료로 이용하여 관능적으로 문제가 되는 이취를 줄이고 지방산화를 감소시키며 유산균 발효에 의해 이소플라본을 체내 이용률이 높은 aglycone 형태로 전환시켜 생리활성물질을 효율적으로 제공 할 수 있다면 두유발효유를 통한 세계시장 진출에 충분한 경쟁력을 확보해 나갈 수 있을 것으로 판단된다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 두유시장의 현황

1. 세계 두유시장의 현황

가. 세계적인 마케팅조사 전문기관 AC 닐슨이 전 세계의 총 소비재 제품 중 93%이상, 그리고 세계 인구의 77%이상을 차지하는 아시아태평양, 신흥국가, 유럽, 라틴아메리카 및 북아메리카 지역에 걸친 59개 시장의 소매점에서 판매된 89개 품목에 기초해 발표한 보고서 '2004년 전세계 인기품목-식품 및 음료업 성장에 관한 연구(What's Hot Around the Globe-Insights on Growth in Food and Beverages 2004)'에 따르면, 지난해 두 자리 수 성장률을 기록한 7가지 품목 중 5가지는 건강 또는 체중감량 혜택을 제공하는 품목인 것으로 나타났다.

나. 최고의 성장률을 기록한 품목은 두유 음료(39%)와 마시는 요구르트(19%)였으며, 이 두 품목은 2002년도에 실시한 조사에서도 가장 빠르게 성장하는 품목에 포함된다. 특히 선진국 시장에서 고단백 저탄수화물 다이어트에 대한 소비자의 관심이 늘어났기 때문으로 분석된다. (식품음료신문 2005.2.2)

2. 국내 두유시장의 현황

가. 통계청 자료에 따르면, 국내 두유시장은 최근 4년간의 연평균 성장률이 1995년부터 2003년까지의 연평균 성장률보다 증가하고 있다. 2003년도 국내 두유 생산량은 219,200kl로 1995년의 140,177kl에 비해 56.37% 증가하였고, 2002년도의 193,082kl에 비해 13.53% 증가하였다. 음료시장의 전반적인 경기침체에도 불구하고 이처럼 두유 시장이 꾸준한 성장세를 보일 수 있었던 것은 두유 시장 성장에 저해요인으로 작용되었던 관능적인 면을 극복하기 위한 다양한 가공두유의 개발과 건강에 대한 소비자들의 관심증대에 기인한다.

나. 두유시장은 2002년도에는 2001년 1,605억원보다 25% 성장한 2,000억원대의 시장을 형성하였으나 2004년도에는 소비자들의 관심을 크게 이끌지 못하면서 두유시장

의 한계성을 보인다. 하지만 앞으로 소비자들의 건강 선호경향이 지속될 것으로 보
이면서, 두유발효유 제품개발 등 업체들의 노력여하에 따라 두유시장의 지속적인 성
장이 기대된다.

제 2 절 연구개발대상 기술의 국내외 현황

1. 세계적 수준

가. Lactobacilli와 Streptococci에 의한 두유의 beany flavor에 관여하는 휘발성 성분수준이 감소한다는 보고가 있다.

나. GC 분석을 이용한 발효 soya bean curd의 휘발성 성분 분석의 보고가 있다.

다. 대두의 beany flavor의 원인이 되는 lipoxygenase를 불활성화시키는 최적 온도와 압력 조건확립에 대한 연구가 보고 되었다.

라. 두유 제조과정 중에 따른 이취성분(이취성분)과 hydroperoxide 함량에서의 온도효과에 대한 연구보고에서 고품질의 두유생산을 위한 최적 조건으로 3℃와 같은 낮은 온도에서의 두유 제조방법이 제시되었다.

마. 식품 분야를 포함한 학문 전 분야에 걸쳐서 두유의 향미성분 분석 및 lipoxygenase에 대한 연구는 많이 보고 되어 있으나, 두유를 이용한 발효유 제조에 따른 향미성분 및 이취성분제거에 대한 연구 성과는 미비한 실정이다.

2. 국내 수준

가. 국내 논문에 의하면 분리대두단백과 유청분말을 사용한 대두 요구르트의 제조에 관한 연구, 두유에서 젖산균의 생육과 두유요구르트의 향미 등에 관한 논문에서는 관능 검사를 이용한 대두요구르트의 향미 특성 분석이 이루어졌다.

나. Lipoxygenase 결핍 콩과 그 가공품의 휘발성 성분 분석, 콩 비린내의 생성기작 제거방안과 향분석 방법등의 논문에서는 대두 자체의 이취성분에 대한 분석과 함께 lipoxygenase 결핍 콩으로 제조한 두유의 이취성분을 분석하였으나 대두 발효유 자체의 이취성분 제거에 관한 논문은 보고된 바 없다.

다. 국내에서는 두유의 이취성분에 관련하여 lipoxygenase에 대한 연구는 많이 이루어져 있으나 식품 분야를 포함한 학문 전 분야에 걸쳐서 아직 본격적으로 두유발효유의 이취성분에 대한 연구성과는 보고되지 않았다.

라. 두유의 발효 과정 중 제조 공정에 따른 지방산 분석 profile 및 lipoxygenase에 대한 연구는 보고 되어 있지 않다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 두유발효유 제조 시 적합한 유산균주 탐색

1. 두유원액 제조

2005년 강원산 백태 품종 대두를 불순물 제거 후 1kg을 세척하여 건조중량의 3배(v/w) 증류수(3L)를 가하여 95℃에서 30분간 침지시킨 후 껍질과 씨눈을 제거하고, 건조중량의 4배(v/w) 증류수(4L)를 다시 가하여 건조대두와 증류수의 비율이 1:7이 되도록 조정하여 다음 95℃ 수조에서 가운한 후 두유제조기(현대종합기계)를 이용하여 3,500rpm, 120mesh로 2회 반복하여 분쇄하였다. 추출된 두유원액은 총고형분 10%로 조정하여 균질화(150bar)과정을 거쳐서 121℃에서 15분간 고압 멸균하여 4℃에서 냉장 보관하였다. 두유원액 제조 시 수율은 대두건조중량의 5.5배였다.

2. 균주 순수분리 및 활성화

매일유업 보유균주(94종)는 해동하여 Lactobacilli는 MRS agar plate, Streptococci는 M17 agar plate, Bifidobacteria는 BL agar plate에 도말한 후 혐기배양기에서 37℃, 48시간동안 배양하였다. 상업용 분말균주(95종)는 멸균희석수(0.85%)에 녹여 Lactobacilli는 MRS agar plate, Streptococci는 M17 agar plate, Bifidobacteria는 BL agar plate에 도말한 후 혐기배양기에서 37℃, 48시간동안 배양하였다. 분리된 colony를 취하여 modified MRS broth(Difco)에 1% 접종하여 혐기배양기에서 37℃, 24시간동안 증균한 후 증균된 Lactobacilli는 MRS agar plate, Streptococci는 M17 agar plate, Bifidobacteria는 BL agar plate에 각각 도말하여 혐기배양(37℃, 48시간)하였다. 다시 분리된 colony를 취하여 modified MRS broth에 증균(혐기배양, 37℃, 24시간)한 후 증균된 유산균을 modified MRS broth에 1% 접종 후 혐기배양기에서 37℃, 24시간동안 활성화 시켰다.

3. 산생성능 측정

가. 재료 및 방법

매일유업(주) 광주공장에서 생산되는 미국산 두유원액과 국산대두를 이용하여 두유제조기로 추출한 두유원액에 유산균주 189종의 산생성능을 측정하였다. 121℃에서 15분간 고압 멸균된 두유원액을 무균적으로 Falcon tube에 30ml씩 분주하여 활성화된 유산균 배양액(189종)을 각각 1% 접종한 후 37℃에서 24시간 배양하여 커드생성유무, pH, 산도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

매일유업(주) 광주공장에서 생산되는 미국산 두유원액으로 189종 유산균주의 산 생성능을 측정한 결과 189종 중 52종(Lactobacilli 25종, Bifidobacteria 27종)이 커드가 형성되지 않았고, 국내산 대두를 이용하여 실험실에서 두유제조기로 제조한 두유원액에서 산생성능을 측정한 결과 189종 중 2종(Bifidobacteria 2종)이 커드가 형성되지 않았다. 실험실에서 두유제조기로 제조한 두유원액과 달리 매일유업(주) 광주공장에서 제조된 미국산 두유원액에서 52종의 유산균이 커드가 형성되지 않은 원인은 원산지차이가 아니라 현장에서 두유원액 제조 시 침지시킨 물을 이용하지 않음으로써 그 물과 함께 수용성 당성분이 소실되었을 것으로 판단된다.

Table 1. Acid formation activity in U.S. made soymilk.

Lactobacilli

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
L-1	<i>L. acidophilus</i> La NA001	Chr. Hansen	상업종균	0.19	6.11	X
L-2	<i>L. acidophilus</i> CSLA	CSI	상업종균	0.47	4.84	O
L-3	<i>L. acidophilus</i> La5	Chr. Hansen	상업종균	0.44	4.89	O
L-4	<i>L. acidophilus</i> 50	Lallemand(Rosell)	상업종균(캐나다)	0.58	4.66	O
L-5	<i>L. acidophilus</i> L10	DSM	상업종균	0.47	4.93	O
L-6	<i>L. acidophilus</i>	Danisco(wisby)	상업종균	0.47	4.81	O
L-7	<i>L. acidophilus</i> probio-40	프로바이오틱(주)	상업종균	0.80	4.29	O
L-8	<i>L. acidophilus</i> ATCC4356	KCTC	MK-LP-003	0.15	6.23	X
L-9	<i>L. acidophilus</i> CSLA301	CSI	MK-LP-004	0.12	6.73	X
L-10	<i>L. acidophilus</i> LA4962	CSI	MK-LP-005	0.15	6.51	X
L-11	<i>L. acidophilus</i> LA96	Chr. Hansen	MK-LP-007	0.47	4.96	O
L-12	<i>L. acidophilus</i> MK-07	매일유업	MK-LP-008	0.15	6.49	X
L-13	<i>L. bulgaricus</i> Lb12	Chr. Hansen	상업종균	0.16	6.24	X
L-14	<i>L. bulgaricus</i> CS209	CSI	상업종균	1.12	3.98	O
L-15	<i>L. bulgaricus</i> 십승	십승요구르트		0.12	6.75	X
L-16	<i>L. casei</i> 431	Chr. Hansen	상업종균	0.68	4.51	O
L-17	<i>L. casei</i> 01	Chr. Hansen	상업종균	0.16	6.25	X
L-18	<i>L. casei</i> LC910	CSI	상업종균	0.18	6.13	X
L-19	<i>L. casei</i> LC107	CSI	상업종균	0.62	4.50	O
L-20	<i>L. casei</i> F19	Medipharm.(?)	상업종균	0.61	4.61	O
L-21	<i>L. casei</i> E5	CSI	상업종균	0.63	4.54	O
L-22	<i>L. casei</i> LC911	CSI	상업종균	0.69	4.41	O
L-23	<i>L. casei</i> LC939	CSI	상업종균	0.13	6.66	X
L-24	<i>L. casei</i> L26	DSM	상업종균	0.67	4.45	O
L-25	<i>L. gasserii</i> LG354	CSI	상업종균	0.42	5.05	O
L-26	<i>L. gasserii</i> LG21	분리균주 (meiji)	MK-LP-015	0.60	4.57	O
L-27	<i>L. gasserii</i> LG351	CSI	MK-LP-016	0.28	6.54	△
L-28	<i>L. gasserii</i> MK-03	매일유업	MK-LP-017	0.30	5.37	O

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
L-29	<i>L. paracasei</i> L21	매일유업	MK-LP-019	0.40	5.09	O
L-30	<i>L. gasserii</i>	JCM1131	MK-LP-023	0.63	4.46	O
L-31	<i>L. helveticus</i> B02	Chr. Hansen	상업종균	0.13	6.54	X
L-32	<i>L. helveticus</i> LH166(CS166)	CSI	상업종균	0.13	6.70	X
L-33	<i>L. helveticus</i> 7	Danisco(wisby)	상업종균	0.23	5.78	△
L-34	<i>L. helveticus</i> choozit helv7	Danisco(wisby)	상업종균	0.14	6.39	X
L-35	<i>L. helveticus</i> LBK-16	Valio	상업종균	0.12	6.76	X
L-36	<i>L. helveticus</i>	화인쿨종균 (?L-518)	MK-LP-028	0.15	6.34	X
L-37	<i>L. plantarum</i>	CSI	상업종균	0.41	5.04	O
L-38	<i>L. plantarum</i> LPT	CSI	상업종균	0.75	4.36	O
L-39	<i>L. plantarum</i>	KCTC3099 (항암서울대)	MK-LP-026	0.20	5.96	X
L-40	<i>L. plantarum</i> D3	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-007	0.60	4.58	O
L-41	<i>L. rhamnosus</i> 40	Lallemand(Rosell)	상업종균(캐나다)	0.16	6.21	X
L-42	LGG	Valio	상업종균	0.16	6.29	X
L-43	<i>L. rhamnosus</i> D4	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-008	0.18	6.25	X
L-44	<i>L. delbruekii</i>	KCTC1058	MK-LP-022	0.18	6.01	X
L-45	<i>L. lactis</i>	ATCC7962 (항암서울대)	MK-LP-027	0.42	4.97	O
L-46	<i>Lactococcus lactis</i> 30	CSI	상업종균	0.38	5.05	O
L-47	<i>L. fermentum</i> gut HD-1	Maeil		0.50	4.95	O
L-48	<i>L. sakei</i> probio-65	프로바이오틱스	상업종균	0.43	4.14	O
L-49	<i>L. confuses</i> Wiljek	분리균주 (남양 위력)	MK-LP-014	0.31	5.43	O
L-50	<i>L. reuteri</i>	Chr. Hansen	MK-LP-020	0.58	4.82	O
L-51	<i>L. paracasei</i> JCM8130	KCTC	MK-LP-018	0.17	6.27	X
L-52	<i>L. paracasei</i> B2	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-004	0.59	4.62	O
L-53	<i>L. paracasei</i> B3	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-005	0.65	4.51	O
L-54	<i>L. paracasei</i> B4	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-006	0.69	4.38	O
L-55	<i>Lactobacillus</i> 23-2	상용균주 (일본제품)	MK-LP-001	0.26	5.59	O
L-56	<i>Lactobacillus</i> L21-2	상용균주 (일본제품)	MK-LP-002	0.16	6.18	X
L-57	<i>Laobacillus</i> YA-70	65mL 요구르트 균주	MK-LP-021	0.18	6.15	X
L-58	NCFM	상용균주	MK-LP-025	0.47	4.85	O
L-59	<i>Lactobacillus</i> (large colony)	분리균주 (KW-yo)	MK-LP-029	0.74	4.28	O
L-60	<i>Lactobacillus</i> (mediu colony)	분리균주 (KW-yo)	MK-LP-030	0.77	4.26	O
L-61	<i>Lactobacillus</i> (small colony)	분리균주 (KW-yo)	MK-LP-031	0.75	4.27	O
L-62	<i>Lactobacillus</i> A2	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-001	0.25	5.81	X
L-63	<i>Lactobacillus</i> A4-1	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-002	0.57	4.90	O
L-64	<i>Lactobacillus</i> A4-2	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-003	0.55	4.89	O
L-65	<i>Lactobacillus</i> D4-1	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-009	0.53	4.91	O
L-66	<i>Lactobacillus</i> D5	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-010	0.59	4.48	O

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
L-67	<i>Lactobacillus</i> E1	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-011	0.60	4.50	O
L-68	<i>Lactobacillus</i> Y02	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-012	0.36	5.11	O
L-69	<i>Lactobacillus</i> Y05	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-013	0.70	4.47	O
L-70	<i>Lactobacillus</i> Y06	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-014	0.69	4.45	O
L-71	<i>Lactobacillus</i> Y10	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-015	0.49	4.82	O
L-72	<i>actobacillus</i> Y13	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-016	0.51	4.74	O
L-73	<i>Lactobacillus</i> Y22	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-017	0.68	4.41	O
L-74	<i>Lactobacillus</i> Y23	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-018	0.63	4.49	O
L-75	<i>Lactobacillus</i> Y25	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-019	0.61	4.51	O
L-76	<i>Lactobacillus</i> Y28	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-020	0.70	4.37	O
L-77	<i>Lactobacillus</i> Y29	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-021	0.61	4.50	O
L-78	<i>Lactobacillus</i> Y32	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-022	0.46	4.85	O
L-79	<i>Lactobacillus</i> Y33	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-023	0.56	4.66	O
L-80	<i>Lactobacillus</i> Y38	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-024	0.45	4.95	O
L-81	<i>Lactobacillus</i> Y40	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-025	0.56	4.58	O
L-82	<i>Lactobacillus</i> Y44	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-026	0.38	5.10	O
L-83	<i>Lactobacillus</i> Y48	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-027	0.35	5.14	O
L-84	<i>Lactobacillus</i> -85	연세대정건섭 (비지관련)	MK-LW-028	0.71	4.41	O
L-85	<i>Lactobacillus</i> -56	연세대정건섭 (비지관련)	MK-LW-029	0.60	4.51	O
L-86	<i>Lactobacillus</i> -38	연세대정건섭 (비지관련)	MK-LW-030	0.73	4.28	O
L-87		L-46 Plate에서 분리		0.37	5.10	O
L-88	<i>Lactobacillus brevis</i> L62	LALLEMAND		0.68	4.51	O
L-89	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14	Danisco		0.37	5.07	O
L-90	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VEGE/Start60 CHR		0.72	4.35	O
L-91	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NOCKS		0.68	4.40	O
L-92	<i>P.penosaceus</i>			0.29	5.44	X

Bifidobacteria

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
B-1	<i>Bif. adolescentis</i> MK-K8	매일유업	MK-BP-011	0.59	4.84	O
B-2	<i>Bif. angulatum</i> ATCC27535	KCTC	MK-BP-002	0.33	5.32	△
B-3	<i>Bif. breve</i> K-4	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-001	0.81	4.45	O
B-4	<i>Bif. breve</i> K-5	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-002	0.76	4.54	O
B-5	<i>Bif. breve</i> ATCC15700	KCTC	MK-BP-003	0.90	4.46	O
B-6	<i>Bif. catenulactum</i> ATCC27539	KCTC	MK-BP-004	0.25	5.59	X
B-7	<i>Bif. infantis</i> BBI-410	CSI	상업종균	0.73	4.52	O
B-8	<i>Bif. infantis</i> B-94	DSM	상업종균	0.83	4.49	O
B-9	<i>Bif. infantis</i> MAEIL-K9	매일유업	MK-BP-006	0.87	4.46	O

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
B-10	<i>Bif. lactis</i> BB-12	Chr. Hansen	상업종균	0.92	4.44	O
B-11	<i>Bif. lactis</i> 420	Danisco (wisby)	상업종균	0.88	4.44	O
B-12	<i>Bif. longum</i> BB-46	Chr. Hansen	상업종균	0.74	4.55	O
B-13	<i>Bif. longum</i> MK-G7	매일유업		0.53	4.77	O
B-14	<i>Bif. longum</i> BB536	Morinaga	상업종균	0.46	4.96	O
B-15	<i>Bif. longum</i> K-2	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-003	0.74	4.54	O
B-16	<i>Bif. longum</i> K-3	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-004	0.76	4.53	O
B-17	<i>Bif. longum</i> ATCC15707	KCTC	MK-BP-008	0.89	4.19	O
B-18	<i>Bif. longum</i> BB-730	CSI	MK-BP-012	0.78	4.49	O
B-19	<i>Bif. longum</i> BL-720	CSI	상업종균	0.88	4.42	O
B-20	<i>Bif. longum</i> BL-710	CSI	상업종균	0.79	4.51	O
B-21	<i>Bif. longum</i> BL-730	CSI	상업종균	0.87	4.41	O
B-22	<i>Bifidobacterium</i> RD-001	분리균주 (G7 project)	MK-BW-005	0.19	5.99	X
B-23	<i>Bifidobacterium</i> RD-003	분리균주 (G7 project)	MK-BW-006	0.21	5.89	X
B-24	<i>Bifidobacterium</i> RD-011	분리균주 (G7 project)	MK-BW-007	1.02	4.49	O
B-25	<i>Bifidobacterium</i> RD-027	분리균주 (G7 project)	MK-BW-009	0.16	6.35	X
B-26	<i>Bifidobacterium</i> RD-031	분리균주 (G7 project)	MK-BW-010	0.11	6.85	X
B-27	<i>Bifidobacterium</i> RD-032	분리균주 (G7 project)	MK-BW-011	0.11	6.81	X
B-28	<i>Bifidobacterium</i> RD-033	분리균주 (G7 project)	MK-BW-012	0.11	6.85	X
B-29	<i>Bifidobacterium</i> RD-037	분리균주 (G7 project)	MK-BW-013	0.11	6.86	X
B-30	<i>Bifidobacterium</i> RD-051	분리균주 (G7 project)	MK-BW-015	0.13	6.58	X
B-31	<i>Bifidobacterium</i> RD-052	분리균주 (G7 project)	MK-BW-016	0.12	6.65	X
B-32	<i>Bifidobacterium</i> RD-055	분리균주 (G7 project)	MK-BW-017	0.11	6.83	X
B-33	<i>Bifidobacterium</i> RD-057	분리균주 (G7 project)	MK-BW-018	0.15	6.41	X
B-34	<i>Bifidobacterium</i> RD-062	분리균주 (G7 project)	MK-BW-019	0.11	6.84	X
B-35	<i>Bifidobacterium</i> RD-064	분리균주 (G7 project)	MK-BW-020	0.15	6.39	X
B-36	<i>Bifidobacterium</i> RD-067	분리균주 (G7 project)	MK-BW-021	0.88	4.62	O
B-37	<i>Bifidobacterium</i> RD-068	분리균주 (G7 project)	MK-BW-022	0.11	6.85	X
B-38	<i>Bifidobacterium</i> RD-070	분리균주 (G7 project)	MK-BW-023	0.15	6.4	X
B-39	<i>Bifidobacterium</i> RD-072	분리균주 (G7 project)	MK-BW-024	0.12	6.75	X
B-40	<i>Bifidobacterium</i> RD-073	분리균주 (G7 project)	MK-BW-025	0.18	6.13	X
B-41	<i>Bifidobacterium</i> RD-077	분리균주 (G7 project)	MK-BW-027	0.95	4.39	O
B-42	<i>Bifidobacterium</i> RD-079	분리균주 (G7 project)	MK-BW-028	0.98	4.36	O
B-43	<i>Bifidobacterium</i> RD-082	분리균주 (G7 project)	MK-BW-029	0.65	4.43	O
B-44	<i>Bifidobacterium</i> RD-084	분리균주 (G7 project)	MK-BW-030	0.65	4.4	O
B-45	<i>Bifidobacterium</i> RD-087	분리균주 (G7 project)	MK-BW-031	0.38	5.18	△
B-46	<i>Bifidobacterium</i> RD-089	분리균주 (G7 project)	MK-BW-032	0.11	6.67	X
B-47	<i>Bifidobacterium</i> RD-090	분리균주 (G7 project)	MK-BW-033	0.16	6.33	X
B-48	<i>Bifidobacterium</i> RD-091	분리균주 (G7 project)	MK-BW-034	0.73	4.57	O

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
B-49	<i>Bifidobacterium</i> RD-092	분리균주 (G7 project)	MK-BW-035	0.75	4.44	O
B-50	<i>Bifidobacterium</i> RD-094	분리균주 (G7 project)	MK-BW-036	0.15	6.37	X
B-51	<i>Bifidobacterium</i> RD-096	분리균주 (G7 project)	MK-BW-037	0.67	4.59	O
B-52	<i>Bifidobacterium</i> RD-097	분리균주 (G7 project)	MK-BW-038	0.57	4.66	O
B-53	<i>Bifidobacterium</i> RD-098	분리균주 (G7 project)	MK-BW-039	0.86	4.59	O
B-54	<i>Bifidobacterium</i> RD-102	분리균주 (G7 project)	MK-BW-040	0.11	6.44	X
B-55	<i>Bifidobacterium</i> RD-106	분리균주 (G7 project)	MK-BW-041	0.15	6.73	X
B-56	<i>Bifidobacterium</i> RD-107	분리균주 (G7 project)	MK-BW-042	0.78	4.49	O
B-57	<i>Bifidobacterium</i> RD-112	분리균주 (G7 project)	MK-BW-045	0.62	4.52	O
B-58	<i>Bifidobacterium</i> RD-117	분리균주 (G7 project)	MK-BW-047	0.62	4.51	O
B-59	<i>Bifidobacterium</i> RD-118	분리균주 (G7 project)	MK-BW-048	0.58	4.59	O
B-60	<i>Bifidobacterium</i> RD-119	분리균주 (G7 project)	MK-BW-049	0.56	4.58	O
B-61	<i>Bifidobacterium</i> RD-120	분리균주 (G7 project)	MK-BW-050	0.70	4.6	O
B-62	<i>Bifidobacterium</i> RD-121	분리균주 (G7 project)	MK-BW-051	0.11	6.72	X
B-63	<i>Bifidobacterium</i> RD-13	분리균주 (G7 project)	MK-BW-052	0.82	4.5	O
B-64	<i>Bifidobacterium</i> RD-134	분리균주 (G7 project)	MK-BW-053	0.45	4.95	O
B-65	<i>Bifidobacterium</i> RD-147	분리균주 (G7 project)	MK-BW-054	0.16	6.36	X
B-66	<i>Bifidobacterium</i> RD-149	분리균주 (G7 project)	MK-BW-055	0.10	6.78	X
B-67	<i>Bifidobacterium</i> RD-28	분리균주 (G7 project)	MK-BW-057	0.83	4.52	O
B-68	<i>Bifidobacterium</i> RD-5	분리균주 (G7 project)	MK-BW-058	0.89	4.46	O
B-69	<i>Bifidobacterium</i> RD-50	분리균주 (G7 project)	MK-BW-059	0.20	5.97	X

Streptococci

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
S-1	<i>Str. thermophilus</i> ST-B01	Chr. Hansen	상업종균	0.65	4.44	O
S-2	<i>Str. thermophilus</i> ST-M3	Chr. Hansen	상업종균	0.70	4.36	O
S-3	<i>Str. thermophilus</i> TH-4	Chr. Hansen	상업종균	0.63	4.46	O
S-4	<i>Str. thermophilus</i> STAM3	Danisco(wisby)	상업종균	0.65	4.45	O
S-5	<i>Str. thermophilus</i> TH-3	Chr. Hansen	상업종균	0.72	4.41	O
S-6	<i>Str. thermophilus</i> ST-36	Chr. Hansen	상업종균	0.73	4.32	O
S-7	<i>Str. thermophilus</i> St-body-2	Chr. Hansen	상업종균	0.72	4.39	O
S-8	<i>Str. thermophilus</i> St-body-1	Chr. Hansen	상업종균	0.73	4.34	O
S-9	<i>Str. thermophilus</i> ST-M6	Chr. Hansen	상업종균	0.71	4.33	O
S-10	<i>Str. thermophilus</i> ST2	Culture system	상업종균	0.62	4.46	O
S-11	<i>Str. thermophilus</i> ST-1	Culture system	상업종균	0.68	4.40	O
S-12	<i>Str. thermophilus</i> TA052	Culture system	상업종균	0.65	4.44	O
S-13	<i>Str. thermophilus</i> ST-5	Culture system	상업종균	0.72	4.34	O
S-14	<i>Str. thermophilus</i> 십승	십승요구르트		0.63	4.47	O
S-15	<i>Str. thermophilus</i> St-body-3	Chr. Hansen	상업종균	0.58	4.51	O

No.	Type strains	Source	Remark	산도	pH	카드
S-16	<i>Str. thermophilus</i> A	Danisco(wisby)	상업종균	0.54	4.54	O
S-17	<i>Str. thermophilus</i> Choozit 985	Danisco(wisby)	상업종균	0.41	5.01	O
S-18	<i>Str. thermophilus</i> LBB-36	LB bulgaricum	MK-SP-001	0.64	4.49	O
S-19	<i>Str. thermophilus</i> LBB-554	LB bulgaricum	MK-SP-002	0.64	4.48	O
S-20	<i>Str. thermophilus</i> TH-1	Chr. Hansen (ABT-1)	MK-SP-008	0.59	4.53	O
S-21	<i>Str. thermophilus</i> TH-2	Chr. Hansen (ABT-2)	MK-SP-009	0.44	4.92	O
S-22	<i>Str. thermophilus</i> TH-5	Chr. Hansen (ABT-5)	MK-SP-0012	0.42	4.98	O
S-23	<i>Str. thermophilus</i> JST-1	분리균주 (일본제품)	MK-SW-001	0.56	4.62	O
S-24	<i>Str. thermophilus</i> JST-2	분리균주 (일본제품)	MK-SW-002	0.63	4.47	O
S-25	<i>Str. thermophilus</i> JST-3	분리균주 (일본제품)	MK-SW-003	0.41	4.99	O
S-26	<i>Str. thermophilus</i> JST-7	분리균주 (일본제품)	MK-SW-004	0.64	4.49	O
S-27	<i>Str. thermophilus</i> JST-8	분리균주 (일본제품)	MK-SW-005	0.66	4.41	O
S-28	<i>Str. thermophilus</i> JST-9	분리균주 (일본제품)	MK-SW-006	0.70	4.37	O

Table 2. Acid formation activity in Korea made soymilk.

Lactobacilli

No.	Type strains	Source	Remark	1차			2차		
				산도	pH	카드	산도	pH	카드
L-1	<i>L. acidophilus</i> La NA001	Chr. Hansen	상업종균	0.35	5.29	O	0.33	5.33	O
L-2	<i>L. acidophilus</i> CSLA	CSI	상업종균	1.08	3.85	O	1.03	3.88	O
L-3	<i>L. acidophilus</i> La5	Chr. Hansen	상업종균	1.07	3.83	O	0.96	3.90	O
L-4	<i>L. acidophilus</i> 50	Lallemand(Rosell)	상업종균	1.12	3.85	O	0.98	3.93	O
L-5	<i>L. acidophilus</i> L10	DSM	상업종균	1.06	3.89	O	1.06	3.95	O
L-6	<i>L. acidophilus</i>	Danisco(wisby)	상업종균	1.03	3.88	O	1.08	3.84	O
L-7	<i>L. acidophilus</i> probio-40	프로바이오틱스(주)	상업종균	1.02	3.92	O	0.97	3.85	O
L-8	<i>L. acidophilus</i> ATCC4356	KCTC	MK-LP-003	0.85	4.16	O	0.79	4.04	O
L-9	<i>L. acidophilus</i> CSLA301	CSI	MK-LP-004	0.75	4.22	O	0.74	4.12	O
L-10	<i>L. acidophilus</i> LA4962	CSI	MK-LP-005	0.72	4.37	O	1.10	3.83	O
L-11	<i>L. acidophilus</i> LA96	Chr. Hansen	MK-LP-007	0.50	4.78	O	0.48	4.72	O
L-12	<i>L. acidophilus</i> MK-07	매일유업	MK-LP-008	0.38	5.11	O	1.02	3.83	O
L-13	<i>L. bulgaricus</i> Lb12	Chr. Hansen	상업종균	0.30	5.53	O	0.32	5.31	O
L-14	<i>L. bulgaricus</i> CS209	CSI	상업종균	1.36	3.70	O	1.30	3.68	O
L-15	<i>L. bulgaricus</i> 십승	십승요구르트		0.20	6.02	x	0.62	4.30	O
L-16	<i>L. casei</i> 431	Chr. Hansen	상업종균	1.10	3.88	O	0.97	3.93	O
L-17	<i>L. casei</i> 01	Chr. Hansen	상업종균	0.30	5.48	O	0.38	4.99	O
L-18	<i>L. casei</i> LC910	CSI	상업종균	0.29	5.48	O	0.83	4.13	O
L-19	<i>L. casei</i> LC107	CSI	상업종균	0.93	4.07	O	0.90	4.01	O
L-20	<i>L. casei</i> F19	Medipharm.(?)	상업종균	1.17	3.86	O	1.02	3.89	O
L-21	<i>L. casei</i> E5	CSI	상업종균	0.91	4.08	O	0.89	4.01	O

No.	Type strains	Source	Remark	1차		2차			
				산도	pH	카드	산도	pH	카드
L-22	<i>L. casei</i> LC911	CSI	상업종균	1.40	3.76	○	1.33	3.69	○
L-23	<i>L. casei</i> LC939	CSI	상업종균	1.35	3.76	○	1.35	3.67	○
L-24	<i>L. casei</i> L26	DSM	상업종균	1.15	3.86	○	1.06	3.87	○
L-25	<i>L. gasser</i> LG354	CSI	상업종균	1.17	3.84	○	1.01	3.92	○
L-26	<i>L. gasser</i> LG21	분리균주 (meiji)	MK-LP-015	0.78	4.25	○	0.63	4.39	○
L-27	<i>L. gasser</i> LG351	CSI	MK-LP-016	0.90	4.00	○	0.86	4.07	○
L-28	<i>L. gasser</i> MK-03	매일유업	MK-LP-017	0.95	3.98	○	0.86	4.05	○
L-29	<i>L. paracasei</i> L21	매일유업	MK-LP-019	0.33	5.40	○	0.37	5.00	○
L-30	<i>L. gasser</i>	JCM1131	MK-LP-023	0.98	4.01	○	0.87	4.00	○
L-31	<i>L. helveticus</i> B02	Chr. Hansen	상업종균	0.98	3.94	○	0.86	3.99	○
L-32	<i>L. helveticus</i> LH166	CSI	상업종균	0.25	3.99	○	0.97	3.90	○
L-33	<i>L. helveticus</i> 7	Danisco(wisby)	상업종균	0.45	4.87	○	0.45	4.75	○
L-34	<i>L. helveticus</i>	Danisco(wisby)	상업종균	0.95	3.98	○	0.87	3.93	○
L-35	<i>L. helveticus</i> LBK-16	Valio	상업종균	0.93	4.02	○	0.90	3.94	○
L-36	<i>L. helveticus</i>	화인콜종균 (?L-518)	MK-LP-028	1.17	3.83	○	1.11	3.81	○
L-37	<i>L. plantarum</i>	CSI	상업종균	0.64	4.58	○	0.69	4.23	○
L-38	<i>L. plantarum</i> LPT	CSI	상업종균	0.95	4.09	○	0.89	3.94	○
L-39	<i>L. plantarum</i>	KCTC3099 (항암서울대)	MK-LP-026	0.91	4.16	○	0.84	4.04	○
L-40	<i>L. plantarum</i> D3	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-007	0.86	4.18	○	0.77	4.06	○
L-41	<i>L. rhamnosus</i> 40	Lallemand(Rosell)	상업종균	1.05	4.13	○	0.56	4.43	○
L-42	LGG	Valio	상업종균	0.27	5.82	△	0.18	5.98	△
L-43	<i>L. rhamnosus</i> D4	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-008	0.72	4.38	○	0.70	4.18	○
L-44	<i>L. delbruekii</i>	KCTC1058	MK-LP-022	0.36	5.20	○	0.33	5.11	○
L-45	<i>L. lactis</i>	ATCC7962 (항암서울대)	MK-LP-027	0.58	4.57	○	0.55	4.51	○
L-46	<i>Lactococcus lactis</i> 30	CSI	상업종균	0.81	4.20	○	0.39	4.94	○
L-47	<i>L. fermentum</i> gut HD-1	Maeil		0.77	4.48	○	0.71	4.45	○
L-48	<i>L. sakei</i> probio-65	프로바이오닉(주)	상업종균	0.87	4.20	○	0.83	4.03	○
L-49	<i>L. confuses</i> Wiljek	분리균주 (남양 위력)	MK-LP-014	0.23	5.64	△	0.66	4.43	○
L-50	<i>L. reuteri</i>	Chr. Hansen	MK-LP-020	0.90	4.20	○	0.83	4.21	○
L-51	<i>L. paracasei</i> JCM8130	KCTC	MK-LP-018	0.25	5.81	△	0.73	4.21	○
L-52	<i>L. paracasei</i> B2	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-004	1.23	3.80	○	1.11	3.79	○
L-53	<i>L. paracasei</i> B3	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-005	1.27	3.79	○	1.13	3.78	○
L-54	<i>L. paracasei</i> B4	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-006	1.16	3.88	○	0.99	3.86	○
L-55	<i>Lactobacillus</i> 23-2	상용균주 (일본제품)	MK-LP-001	0.29	5.60	△	0.44	4.58	○
L-56	<i>Lactobacillus</i> L21-2	상용균주 (일본제품)	MK-LP-002	0.26	5.55	○	0.41	4.82	○
L-57	<i>Laobacillus</i> YA-70	65mL 요구르트 균주	MK-LP-021	0.32	5.55	○	0.33	5.29	○
L-58	NCFM	상용균주	MK-LP-025	1.15	3.88	○	1.08	3.87	○

No.	Type strains	Source	Remark	1차			2차		
				산도	pH	카드	산도	pH	카드
L-59	<i>Lactobacillus</i> (large)	분리균주 (KW-yo)	MK-LP-029	1.18	3.84	O	0.98	3.84	O
L-60	<i>Lactobacillus</i> (medium)	분리균주 (KW-yo)	MK-LP-030	1.14	3.83	O	1.02	3.84	O
L-61	<i>Lactobacillus</i> (small)	분리균주 (KW-yo)	MK-LP-031	1.15	3.83	O	1.04	3.83	O
L-62	<i>Lactobacillus</i> A2	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-001	0.39	5.13	O	0.35	5.17	△
L-63	<i>Lactobacillus</i> A4-1	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-002	0.79	4.46	O	0.68	4.45	O
L-64	<i>Lactobacillus</i> A4-2	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-003	0.80	4.45	O	0.68	4.44	O
L-65	<i>Lactobacillus</i> D4-1	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-009	0.80	4.46	O	0.71	4.44	O
L-66	<i>Lactobacillus</i> D5	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-010	0.80	4.23	O	0.80	4.10	O
L-67	<i>Lactobacillus</i> E1	분리균주 (LGG 임상)	MK-LW-011	0.92	4.07	O	0.91	3.97	O
L-68	<i>Lactobacillus</i> Y02	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-012	0.61	4.56	O	0.69	4.26	O
L-69	<i>Lactobacillus</i> Y05	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-013	1.11	3.99	O	0.88	4.20	O
L-70	<i>Lactobacillus</i> Y06	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-014	1.18	3.87	O	1.03	3.93	O
L-71	<i>Lactobacillus</i> Y10	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-015	0.69	4.38	O	0.85	4.02	O
L-72	<i>actobacillus</i> Y13	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-016	0.80	4.36	O	0.73	4.21	O
L-73	<i>Lactobacillus</i> Y22	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-017	0.93	4.15	O	0.85	4.19	O
L-74	<i>Lactobacillus</i> Y23	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-018	0.84	4.15	O	0.90	4.09	O
L-75	<i>Lactobacillus</i> Y25	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-019	0.83	4.15	O	0.96	3.93	O
L-76	<i>Lactobacillus</i> Y28	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-020	1.16	3.88	O	1.05	3.86	O
L-77	<i>Lactobacillus</i> Y29	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-021	0.84	4.15	O	0.87	3.98	O
L-78	<i>Lactobacillus</i> Y32	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-022	0.76	4.30	O	0.70	4.19	O
L-79	<i>Lactobacillus</i> Y33	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-023	0.82	4.17	O	0.81	4.00	O
L-80	<i>Lactobacillus</i> Y38	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-024	0.71	4.36	O	0.68	4.24	O
L-81	<i>Lactobacillus</i> Y40	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-025	0.83	4.16	O	0.79	4.04	O
L-82	<i>Lactobacillus</i> Y44	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-026	0.64	4.42	O	0.73	4.16	O
L-83	<i>Lactobacillus</i> Y48	분리균주 (GUT 임상)	MK-LW-027	0.63	4.47	O	0.70	4.25	O
L-84	<i>Lactobacillus</i> -85	연세대정건섭(비지관련)	MK-LW-028	1.14	3.85	O	1.05	3.86	O
L-85	<i>Lactobacillus</i> -56	연세대정건섭(비지관련)	MK-LW-029	0.82	4.12	O	0.92	3.94	O
L-86	<i>Lactobacillus</i> -38	연세대정건섭(비지관련)	MK-LW-030	1.19	3.87	O	1.05	3.89	O
L-87		L-46 Plate에서 분리		0.37	4.10	O	0.91	3.98	O
L-88	<i>Lactobacillus brevis</i> L62	LALLEMAND		1.03	3.97	O	0.97	3.88	O
L-89	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Danisco		0.93	4.05	O	0.95	3.90	O
L-90	<i>Lactobacillus plantarum</i>	VEGE/Start60 CHR		0.72	4.05	O	0.96	3.86	O
L-91	<i>Lactobacillus plantarum</i>	NOCKS		0.85	4.07	O	0.89	3.95	O
L-92	<i>P.penosaceus</i>			0.45	4.84	O	0.60	4.51	O

Bifidobacteria

No.	Type strains	Source	Remark	1차			2차		
				산도	pH	카드	산도	pH	카드
B-1	<i>B. adolescentis</i> MK-K85	매일유업	MK-BP-011	0.88	4.37	O	0.84	4.44	O
B-2	<i>Bif. angulatum</i> ATCC27535	KCTC	MK-BP-002	0.54	4.49	O	0.195	6.06	X
B-3	<i>Bif. breve</i> K-4	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-001	0.89	4.04	O	0.825	4.12	O
B-4	<i>Bif. breve</i> K-5	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-002	0.91	4.12	O	0.87	4.05	O
B-5	<i>Bif. breve</i> ATCC15700	KCTC	MK-BP-003	0.87	4.42	O	0.76	4.43	O
B-6	<i>Bif.</i> ATCC27539	KCTC	MK-BP-004	0.95	4.04	O	1.05	3.89	O
B-7	<i>Bif. infantis</i> BBI-410	CSI	상업종균	0.98	4.05	O	0.94	3.94	O
B-8	<i>Bif. infantis</i> B-94	DSM	상업종균	0.87	4.41	O	0.81	4.37	O
B-9	<i>Bif. infantis</i> MAEIL-K9	매일유업	MK-BP-006	0.89	4.38	O	0.855	4.35	O
B-10	<i>Bif. lactis</i> BB-12	Chr. Hansen	상업종균	0.87	4.45	O	0.79	4.4	O
B-11	<i>Bif. lactis</i> 420	Danisco (wisby)	상업종균	0.77	4.33	O	0.72	4.24	O
B-12	<i>Bif. longum</i> BB-46	Chr. Hansen	상업종균	0.93	4.42	O	0.96	4.26	O
B-13	<i>Bif. longum</i> MK-G7	매일유업		0.75	4.35	O	0.66	4.21	O
B-14	<i>Bif. longum</i> BB536	Morinaga	상업종균	0.97	4.12	O	0.82	4.05	O
B-15	<i>Bif. longum</i> K-2	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-003	0.95	4.1	O	0.84	4.06	O
B-16	<i>Bif. longum</i> K-3	분리균주 (김응률학위)	MK-BW-004	0.76	4.37	O	0.75	4.21	O
B-17	<i>Bif. longum</i> ATCC15707	KCTC	MK-BP-008	1.13	3.98	O	0.99	3.9	O
B-18	<i>Bif. longum</i> BB-730	CSI	MK-BP-012	0.95	4.09	O	0.83	4.03	O
B-19	<i>Bif. longum</i> BL-720	CSI	상업종균	0.95	4.16	O	0.96	4.23	O
B-20	<i>Bif. longum</i> BL-710	CSI	상업종균	0.88	4.43	O	0.905	4.3	O
B-21	<i>Bif. longum</i> BL-730	CSI	상업종균	0.95	4.3	O	0.93	4.21	O
B-22	<i>Bifidobacterium</i> RD-001	분리균주 (G7 project)	MK-BW-005	0.79	4.34	O	0.75	4.21	O
B-23	<i>Bifidobacterium</i> RD-003	분리균주 (G7 project)	MK-BW-006	1.02	4.3	O	1.02	4.2	O
B-24	<i>Bifidobacterium</i> RD-011	분리균주 (G7 project)	MK-BW-007	1.04	4.29	O	1.16	4.07	O
B-25	<i>Bifidobacterium</i> RD-027	분리균주 (G7 project)	MK-BW-009	0.95	4.07	O	1.17	4.07	O
B-26	<i>Bifidobacterium</i> RD-031	분리균주 (G7 project)	MK-BW-010	0.87	4.56	O	0.94	4.18	O
B-27	<i>Bifidobacterium</i> RD-032	분리균주 (G7 project)	MK-BW-011	0.91	4.4	O	0.89	4.29	O
B-28	<i>Bifidobacterium</i> RD-033	분리균주 (G7 project)	MK-BW-012	1.08	4.33	O	0.99	4.21	O
B-29	<i>Bifidobacterium</i> RD-037	분리균주 (G7 project)	MK-BW-013	1.11	4.27	O	1.09	4.11	O
B-30	<i>Bifidobacterium</i> RD-051	분리균주 (G7 project)	MK-BW-015	0.36	5.4	O	0.47	4.78	△
B-31	<i>Bifidobacterium</i> RD-052	분리균주 (G7 project)	MK-BW-016	1.00	4.39	O	0.88	4.31	O
B-32	<i>Bifidobacterium</i> RD-055	분리균주 (G7 project)	MK-BW-017	1.17	4.23	O	1.03	4.19	O
B-33	<i>Bifidobacterium</i> RD-057	분리균주 (G7 project)	MK-BW-018	1.02	4.28	O	0.94	4.23	O
B-34	<i>Bifidobacterium</i> RD-062	분리균주 (G7 project)	MK-BW-019	0.39	5.25	△	0.79	4.4	O
B-35	<i>Bifidobacterium</i> RD-064	분리균주 (G7 project)	MK-BW-020	1.06	4.28	O	1.11	4.16	O
B-36	<i>Bifidobacterium</i> RD-067	분리균주 (G7 project)	MK-BW-021	0.57	4.77	O	0.425	4.96	△
B-37	<i>Bifidobacterium</i> RD-068	분리균주 (G7 project)	MK-BW-022	0.23	6.21	X	0.21	6.04	X

No.	Type strains	Source	Remark	1차			2차		
				산도	pH	카드	산도	pH	카드
B-38	<i>Bifidobacterium</i> RD-070	분리균주 (G7 project)	MK-BW-023	0.83	4.35	O	0.73	4.3	O
B-39	<i>Bifidobacterium</i> RD-072	분리균주 (G7 project)	MK-BW-024	1.19	4.18	O	1.19	4.1	O
B-40	<i>Bifidobacterium</i> RD-073	분리균주 (G7 project)	MK-BW-025	0.88	4.41	O	1.09	4.17	O
B-41	<i>Bifidobacterium</i> RD-077	분리균주 (G7 project)	MK-BW-027	0.82	4.54	O	0.72	4.51	O
B-42	<i>Bifidobacterium</i> RD-079	분리균주 (G7 project)	MK-BW-028	0.95	4.37	O	0.92	4.31	O
B-43	<i>Bifidobacterium</i> RD-082	분리균주 (G7 project)	MK-BW-029	0.68	4.37	O	0.65	4.29	O
B-44	<i>Bifidobacterium</i> RD-084	분리균주 (G7 project)	MK-BW-030	0.77	4.24	O	0.74	4.16	O
B-45	<i>Bifidobacterium</i> RD-087	분리균주 (G7 project)	MK-BW-031	0.71	4.62	O	0.8	4.37	O
B-46	<i>Bifidobacterium</i> RD-089	분리균주 (G7 project)	MK-BW-032	0.62	4.77	O	0.65	4.53	O
B-47	<i>Bifidobacterium</i> RD-090	분리균주 (G7 project)	MK-BW-033	0.94	4.38	O	0.85	4.33	O
B-48	<i>Bifidobacterium</i> RD-091	분리균주 (G7 project)	MK-BW-034	1.02	4.29	O	1.16	4.1	O
B-49	<i>Bifidobacterium</i> RD-092	분리균주 (G7 project)	MK-BW-035	0.72	4.37	O	0.95	4.19	O
B-50	<i>Bifidobacterium</i> RD-094	분리균주 (G7 project)	MK-BW-036	0.97	4.38	O	1	4.19	O
B-51	<i>Bifidobacterium</i> RD-096	분리균주 (G7 project)	MK-BW-037	0.93	4.51	O	0.94	4.24	O
B-52	<i>Bifidobacterium</i> RD-097	분리균주 (G7 project)	MK-BW-038	1.15	4.28	O	1.09	4.16	O
B-53	<i>Bifidobacterium</i> RD-098	분리균주 (G7 project)	MK-BW-039	1.10	4.26	O	1.18	4.09	O
B-54	<i>Bifidobacterium</i> RD-102	분리균주 (G7 project)	MK-BW-040	0.99	4.34	O	1.23	4.07	O
B-55	<i>Bifidobacterium</i> RD-106	분리균주 (G7 project)	MK-BW-041	0.89	4.43	O	0.96	4.21	O
B-56	<i>Bifidobacterium</i> RD-107	분리균주 (G7 project)	MK-BW-042	1.08	4.27	O	1.01	4.21	O
B-57	<i>Bifidobacterium</i> RD-112	분리균주 (G7 project)	MK-BW-045	0.86	4.49	O	0.81	4.35	O
B-58	<i>Bifidobacterium</i> RD-117	분리균주 (G7 project)	MK-BW-047	1.17	4.15	O	0.75	4.17	O
B-59	<i>Bifidobacterium</i> RD-118	분리균주 (G7 project)	MK-BW-048	0.71	4.34	O	0.65	4.26	O
B-60	<i>Bifidobacterium</i> RD-119	분리균주 (G7 project)	MK-BW-049	0.71	4.28	O	0.69	4.2	O
B-61	<i>Bifidobacterium</i> RD-120	분리균주 (G7 project)	MK-BW-050	0.87	4.24	O	0.89	4.14	O
B-62	<i>Bifidobacterium</i> RD-121	분리균주 (G7 project)	MK-BW-051	1.04	4.31	O	1	4.2	O
B-63	<i>Bifidobacterium</i> RD-13	분리균주 (G7 project)	MK-BW-052	1.01	4.33	O	0.85	4.16	O
B-64	<i>Bifidobacterium</i> RD-134	분리균주 (G7 project)	MK-BW-053	1.08	4.3	O	0.99	4.22	O
B-65	<i>Bifidobacterium</i> RD-147	분리균주 (G7 project)	MK-BW-054	0.88	4.42	O	1.1	4.12	O
B-66	<i>Bifidobacterium</i> RD-149	분리균주 (G7 project)	MK-BW-055	0.97	4.29	O	0.81	4.2	O
B-67	<i>Bifidobacterium</i> RD-28	분리균주 (G7 project)	MK-BW-057	1.09	4.26	O	1.05	4.17	O
B-68	<i>Bifidobacterium</i> RD-5	분리균주 (G7 project)	MK-BW-058	1.02	4.36	O	0.98	4.25	O
B-69	<i>Bifidobacterium</i> RD-50	분리균주 (G7 project)	MK-BW-059	1.07	4.27	O	0.915	4.27	O

Streptococci

No.	Type strains	Source	Remark	1차			2차		
				산도	pH	카드	산도	pH	카드
S-1	<i>Str. thermophilus</i> ST-B01	Chr. Hansen	상업종균	0.76	4.20	O	0.68	4.22	O
S-2	<i>Str. thermophilus</i> ST-M3	Chr. Hansen	상업종균	0.72	4.22	O	0.65	4.25	O
S-3	<i>Str. thermophilus</i> TH-4	Chr. Hansen	상업종균	0.75	4.19	O	0.65	4.23	O

No.	Type strains	Source	Remark	1차			2차		
				산도	pH	카드	산도	pH	카드
S-4	<i>Str. thermophilus</i> STAM3	Danisco(wisby)	상업종균	1.23	3.79	O	1.09	3.85	O
S-5	<i>Str. thermophilus</i> TH-3	Chr. Hansen	상업종균	0.66	4.42	O	0.69	4.27	O
S-6	<i>Str. thermophilus</i> ST-36	Chr. Hansen	상업종균	0.65	4.41	O	0.67	4.25	O
S-7	<i>Str. thermophilus</i> St-body-2	Chr. Hansen	상업종균	1.24	3.79	O	1.10	3.86	O
S-8	St-body-1	Chr. Hansen	상업종균	0.70	4.36	O	0.72	4.21	O
S-9	<i>Str. thermophilus</i> ST-M6	Chr. Hansen	상업종균	0.72	4.31	O	0.67	4.28	O
S-10	<i>Str. thermophilus</i> ST2	Culture system	상업종균	0.67	4.40	O	0.68	4.28	O
S-11	<i>Str. thermophilus</i> ST-1	Culture system	상업종균	0.66	4.44	O	0.67	4.28	O
S-12	<i>Str. thermophilus</i> TA052	Culture system	상업종균	0.73	4.28	O	0.65	4.28	O
S-13	<i>Str. thermophilus</i> ST-5	Culture system	상업종균	0.66	4.45	O	0.68	4.26	O
S-14	<i>Str. thermophilus</i> 십승	십승요구르트		0.72	4.38	O	0.70	4.27	O
S-15	St-body-3	Chr. Hansen	상업종균	0.69	4.40	O	0.69	4.28	O
S-16	<i>Str. thermophilus</i> A	Danisco(wisby)	상업종균	0.66	4.39	O	0.61	4.36	O
S-17	<i>S. thermophilus</i> Choozit 985	Danisco(wisby)	상업종균	0.65	4.39	O	0.60	4.38	O
S-18	<i>Str. thermophilus</i> LBB-36	LB bulgaricum	MK-SP-001	0.67	4.36	O	0.65	4.33	O
S-19	<i>Str. thermophilus</i> LBB554	LB bulgaricum	MK-SP-002	0.65	4.36	O	0.65	4.31	O
S-20	<i>Str. thermophilus</i> TH-1	Chr. Hansen (ABT-1)	MK-SP-008	0.58	4.49	O	0.58	4.46	O
S-21	<i>Str. thermophilus</i> TH-2	Chr. Hansen (ABT-2)	MK-SP-009	0.50	4.70	O	0.57	4.56	O
S-22	<i>Str. thermophilus</i> TH-5	Chr. Hansen (ABT-5)	MK-SP-0012	0.66	4.43	O	0.63	4.38	O
S-23	<i>Str. thermophilus</i> JST-1	분리균주 (일본제품)	MK-SW-001	0.65	4.43	O	0.62	4.38	O
S-24	<i>Str. thermophilus</i> JST-2	분리균주 (일본제품)	MK-SW-002	0.75	4.26	O	0.68	4.22	O
S-25	<i>Str. thermophilus</i> JST-3	분리균주 (일본제품)	MK-SW-003	0.65	4.39	O	0.61	4.37	O
S-26	<i>Str. thermophilus</i> JST-7	분리균주 (일본제품)	MK-SW-004	0.61	4.49	O	0.67	4.27	O
S-27	<i>Str. thermophilus</i> JST-8	분리균주 (일본제품)	MK-SW-005	0.70	4.28	O	0.71	4.20	O
S-28	<i>Str. thermophilus</i> JST-9	분리균주 (일본제품)	MK-SW-006	0.65	4.36	O	0.66	4.30	O

4. 효소활력 측정

가. 재료 및 방법

1) Soy broth 제조

배지는 국산대두를 원료로 제조한 soy medium을 사용하였다. Soy medium 제조는 대두(강원 인제, 2005년산)중량의 7배 증류수를 121°C에서 15분간 열처리를 한 후, 여과망을 이용하여 대두를 제거하고, 그 여과액의 pH를 3.5로 조절(Hcl conc.)한 다음 침전된 단백질을 원심분리기(10,000g, 15분)를 이용하여 상층액을 회수한 후 pH를 6.5로 다시 조정(10N NaOH)하여 filter paper로 여과시켜서 사용하였다.

2) Soy broth 당 조성 분석

시료 0.5g에 증류수 4ml을 첨가하고 80°C 항온수조에서 2시간 진탕한 후 10ml이 되도록 에탄올을 첨가하여 80°C 항온수조에서 30분간 시료내의 당을 추출하였다. 10,000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 0.2 μ m membrane filter로 여과하여 HPLC 분석을 시행하였다.

HPLC	Agilent 1100 series
Column	Sugar-Pak TM1, 6.5cm x 300mm (Waters, USA)
Column temp.	80°C
Mobile phase	Water
Detector	RID (Waters, USA)
Flow rate	0.5 ml/min

3) 조효소액 제조

modified MRS broth에서 2회 계대배양한 후 Soy broth에 배양(37°C, 24시간)하여 배양액을 원심분리(10,000 \times g, 5min)한 후 상등액을 extracellular 조효소액으로 사용하였다. 균체를 회수하여 sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 2회 세척한 후 1% lysozyme을 처리하여 37°C, 30분간 정치시킨 후 균체를 얼음 상에서 초음파 세포 파쇄기를 이용하여 1분간 sonication을 실시하였다. 그리고 다시 원심분리(10,000 \times g, 5min)하여 상등액을 intracellular 조효소액으로 사용하였다.

4) α -galactosidase, β -glucosidase, phytase 효소활성 측정

α -galactosidase 활성 측정을 위하여 10mM p-nitrophenyl- α -D-galactopyranoside (PNPG, Sigma Chemical Co.)를 함유한 50mM sodium phosphate buffer (pH6.0)와 β

-glucosidase 활성 측정을 위해 10mM p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside(PNPG, Sigma Chemical Co.)를 함유한 50mM sodium phosphate buffer (pH6.0) 50μl에 조효소액을 각각 50μl씩 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 0.5M Na₂CO₃ 용액 100μl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 유리되는 p-nitrophenol(PNP, Sigma Chemical Co.)의 양은 414nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 단위는 1분 동안 1 μmole의 PNP를 유리시키는데 필요한 효소량을 1 unit으로 정의하였다.

phytase 활성 측정을 위하여 2mM sodium phytate를 함유한 0.2M sodium acetate buffer(pH 4.0) 60μl에 조효소액 15μl를 첨가하여 37°C에서 15분간 반응시킨 후 5% TCA(Trichloroacetic acid) 75μl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 1.5% ammonium molybdate in 5.5% sulphuric acid solution와 2.7% ferrous sulphate solution을 4:1로 혼합한 color reagent를 75μl 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 690nm에서 흡광도를 측정하였다.

나. 결과 및 고찰

α-galactosidase와 β-glucosidase의 활성을 측정하기 위해 사용한 soy broth의 당조성을 측정한 결과 추출된 수용성 당성분의 조성이 일반적인 대두의 당조성과 비교하여 sucrose, stachyose, raffinose, glucose 순으로 거의 일치하는 것을 알 수 있었다.

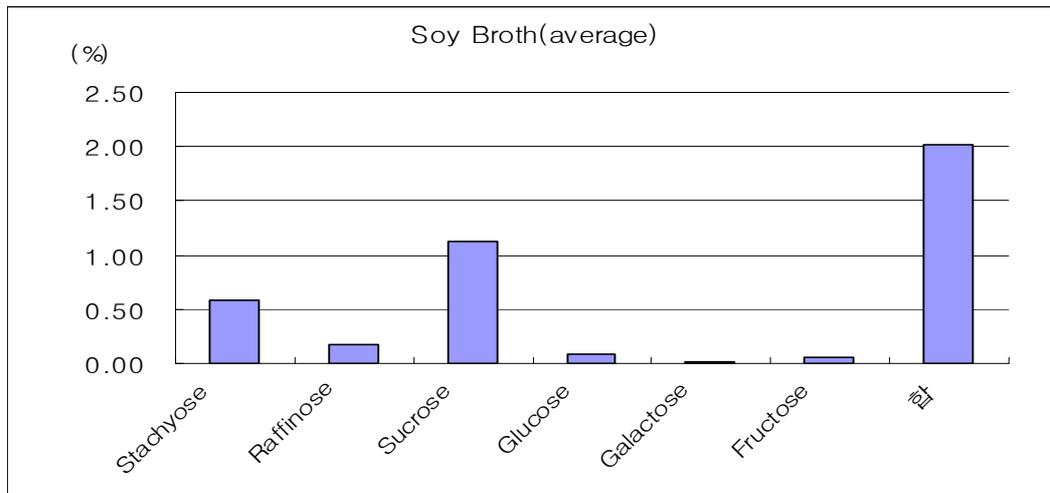


Fig. 1. Sugar composition of soy broth.

α -galactosidase 활성측정 결과 주로 Lactobacilli에서 높은 활성을 보였고, 특히 L14, L22은 매우 높은 α -galactosidase 활성을 보였다. β -glucosidase 활성측정 결과 전체적으로 큰 차이는 볼 수 없어 균주간의 β -glucosidase 활성을 비교하긴 쉽지 않았다.

phytase는 열에 매우 약하기 때문에 phytase 활성을 측정하기 위하여 modified MRS broth를 고온멸균한 후 냉각하여 sodium phytate를 실린지 필터로 2mM이 되도록 첨가한 다음 유산균주(189종)를 각각 1% 접종하여 37°C에서 24시간 배양하여 위와 동일한 방법으로 조효소액을 제조하였다. 690nm에서 흡광도를 측정하여 phytase로부터 유리되는 인의 양을 계산한 결과 extracellular는 전체적으로 차이가 거의 없었으나 intracellular는 미비한 차이가 있었다.

Table 3. α -galactosidase, β -glucosidase and phytase activity.

Lactobacilli

No.	Type strains	1차		2차		1차		2차				
		α -gal		β -glu		α -gal		β -glu		phytase		
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra			
L-1	<i>L. acidophilus</i> La NA001	0.90	0	0.87	0.48	0.08	0	0.11	0	264.0	10.44	21.04
L-2	<i>L. acidophilus</i> CSLA	0.28	1.01	0.18	0.84	0.37	0.54	0.16	0.29	292.9	9.56	20.15
L-3	<i>L. acidophilus</i> La5	0.08	0.74	0.12	1.01	0.65	0	0.11	0	256.9	10.00	13.48
L-4	<i>L. acidophilus</i> 50	0.38	0.62	0.57	1.10	0.08	0.44	0.19	0	295.6	46.44	50.37
L-5	<i>L. acidophilus</i> L10	0.38	0.80	0.53	1.07	0.10	0.17	0.25	0	292.4	42.00	43.70
L-6	<i>L. acidophilus</i>	0.41	0.65	0.25	0.43	0.84	0	0.19	0	281.8	11.33	21.04
L-7	<i>L. acidophilus</i> probio-40	1.17	0.41	0.26	0.14	0.86	0	0.24	0	257.3	18.44	45.04
L-8	<i>L. acidophilus</i> ATCC4356	0.31	0.64	0.43	0.69	0.25	0	0.21	0	296.0	7.33	19.26
L-9	<i>L. acidophilus</i> CSLA301	0.36	0.65	0.19	0.37	0.06	0	0.06	0	253.8	8.22	9.04
L-10	<i>L. acidophilus</i> LA4962	0.47	0.60	0.42	1.00	0.06	0	0.11	0	259.6	46.00	48.15
L-11	<i>L. acidophilus</i> LA96	0.30	0.90	0.31	0.98	0.06	0	0.10	0	276.9	12.22	10.81
L-12	<i>L. acidophilus</i> MK-07	0.16	0.45	0.09	0.48	0.06	0	0.10	0	294.2	13.11	15.26
L-13	<i>L. bulgaricus</i> Lb12	3.82	0.94	4.26	0.32	0.06	0.03	0.13	0	294.7	10.89	18.81

No.	Type strains	1차		2차		1차		2차				
		α -gal		β -glu		α -gal		β -glu		phytase		
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra
L-14	<i>L. bulgaricus</i> CS209	159.66	0.59	0.41	0.34	94.87	0	0.16	0	296.9	28.67	23.26
L-15	<i>L. bulgaricus</i> 십승	0.01	1.18	0.05	1.11	0.19	0	0.10	0	227.1	53.56	36.15
L-16	<i>L. casei</i> 431	0.01	0.06	0.09	0.49	0.06	0	0.14	0	275.1	15.78	19.70
L-17	<i>L. casei</i> 01	0	1.25	0.09	0.97	0.06	0	0.14	0	291.6	11.33	19.70
L-18	<i>L. casei</i> LC910	0.00	0.75	0.19	0.56	0.11	0	0.17	0.37	304.4	22.89	22.81
L-19	<i>L. casei</i> LC107	0.00	0.78	0.01	0.53	0.10	0.08	0.22	0.08	258.2	40.22	30.81
L-20	<i>L. casei</i> F19	0.01	0.40	0.02	0.58	0.11	0.19	0.29	0.17	306.2	18.44	29.93
L-21	<i>L. casei</i> E5	0.01	0.09	0.00	0.80	0.17	0.75	0.22	0.29	243.1	31.33	35.70
L-22	<i>L. casei</i> LC911	108.44	0.25	0.03	0.07	101.94	0.54	0.19	0.60	300.4	37.56	37.04
L-23	<i>L. casei</i> LC939	63.78	0.57	0.05	0.65	103.37	0.67	0.19	0.43	264.4	47.78	33.04
L-24	<i>L. casei</i> L26	0.16	0.61	0.04	0.68	0.19	0.38	0.16	0.14	300.4	12.67	35.26
L-25	<i>L. gasserii</i> LG354	0.11	0.46	0.05	0.75	0.21	0.78	0.19	0.51	256.0	12.22	17.48
L-26	<i>L. gasserii</i> LG21	0.08	0	0.03	0	0.24	0.63	0.33	0.35	299.1	7.33	11.70
L-27	<i>L. gasserii</i> LG351	0	0.39	0.09	0.72	0.05	0.62	0.11	0.71	281.8	10.44	12.15
L-28	<i>L. gasserii</i> MK-03	0	0.50	0.05	0.37	0.08	0.49	0.21	0.44	324.4	7.33	15.26
L-29	<i>L. paracasei</i> L21	0	0.29	0.15	0.71	0.10	1.22	0.27	0.27	242.7	13.11	17.93
L-30	<i>L. gasserii</i>	0	0.76	0.22	0.87	0.05	1.02	0.13	0.78	260.0	13.11	24.59
L-31	<i>L. helveticus</i> B02	0	0.40	0	0.58	0.13	0.76	0.24	0.32	284.9	21.11	21.48
L-32	<i>L. helveticus</i> LH166(CS166)	0	0.49	0	0.58	0.21	1.16	0.37	0.32	313.3	9.56	27.26
L-33	<i>L. helveticus</i> 7	0.01	0.57	0	0.93	0.06	0.35	0.08	0.38	249.3	12.67	15.26
L-34	<i>L. helveticus</i> choozit helv7	0.01	0.06	0	0.15	0	0.71	0.03	0.49	260.4	18.00	24.59
L-35	<i>L. helveticus</i> LBK-16	0.01	0.36	0.03	0.05	0.02	0.94	0.08	0.59	248.4	16.22	23.26
L-36	<i>L. helveticus</i>	0.08	0.23	0.03	0.43	0.02	0.68	0.08	0.46	340.9	11.78	15.70
L-37	<i>L. plantarum</i>	0.11	0.46	0.01	0.72	0	0.62	0.06	0.41	232.0	6.89	14.37
L-38	<i>L. plantarum</i> LPT	0.12	0.17	0.04	0.31	0.02	0.81	0.06	0.27	266.2	18.00	9.93
L-39	<i>L. plantarum</i>	0.03	1.09	0.09	0.76	0.02	0.83	0.05	0.35	220.9	42.44	29.04
L-40	<i>L. plantarum</i> D3	0.01	1.21	0.11	0.87	0.00	0.86	0.11	0.90	268.4	36.22	43.26
L-41	<i>L. rhamnosus</i> 40	0.00	0.52	0.12	0.74	0.00	1.03	0.06	1.03	236.9	38.00	25.48
L-42	LGG	0.00	0	0.31	0.07	0	0.63	0.06	0.25	233.8	18.44	18.37
L-43	<i>L. rhamnosus</i> D4	0.03	0.37	0.01	0.31	0.03	0.08	0.14	0.24	260.4	15.33	13.93
L-44	<i>L. delbruekii</i>	0.03	0.84	0	1.02	0.05	0.86	0.13	0.22	245.8	14.44	13.04
L-45	<i>L. lactis</i>	0.01	0.97	0.00	1.26	0.14	0.25	0.06	0.16	283.6	2.44	8.15
L-46	<i>Lactococcus lactis</i> 30	0.09	0.38	0.03	0.60	0.11	0.41	0.06	0.22	283.6	14.00	21.48
L-47	<i>L. fermentum</i> gut HD-1	0.04	0.88	0.05	0.87	0.05	0	0.08	0.02	217.3	22.00	60.59
L-48	<i>L. sakei</i> probio-65	0.06	0.46	0.04	0.52	0.05	0.14	0.06	0.05	286.2	38.89	41.04
L-49	<i>L. confusus</i> Wiljek	0.17	0.77	0.05	1.16	0.06	0.79	0.13	0.44	272.0	14.00	18.81
L-50	<i>L. reuteri</i>	0.20	0.49	0.10	1.02	0.10	0.33	0.17	0.11	245.3	23.33	66.81

No.	Type strains	1차				2차				1차		2차	
		α -gal		β -glu		α -gal		β -glu		phytase			
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra	
L-51	<i>L. paracasei</i> JCM8130	0	0.39	0.05	0.07	0.10	0.11	0.14	0	324.4	18.00	21.04	
L-52	<i>L. paracasei</i> B2	0.01	0.33	0.17	0.44	0.17	0.21	0.24	0.03	257.8	17.11	24.59	
L-53	<i>L. paracasei</i> B3	0.00	0.19	0.16	0.37	0.13	0.86	0.24	0.46	280.4	13.11	21.48	
L-54	<i>L. paracasei</i> B4	0	0.44	0.23	0.50	0.11	0	0.21	0	275.6	14.89	17.48	
L-55	<i>Lactobacillus</i> 23-2	0.01	0.55	0	0.68	0.10	0.38	0.25	0.21	254.7	43.78	45.48	
L-56	<i>Lactobacillus</i> L21-2	0.03	0.48	0.01	0.45	0.11	0.63	0.27	0.43	257.3	8.67	28.59	
L-57	<i>Laobacillus</i> YA-70	0.03	0.19	0.00	0.63	0.05	0.35	0.10	0.03	257.3	12.67	14.81	
L-58	NCFM	0.49	0.86	0.00	0.84	0.24	0.59	0.08	0.38	255.6	10.44	20.15	
L-59	<i>Lactobacillus</i> (large colony)	0.09	0.08	0.02	0	0.13	0.25	0.16	0.16	255.1	9.11	15.70	
L-60	<i>Lactobacillus</i> (mediu colony)	0.04	0.43	0.06	0.22	0.03	0.24	0.06	0.19	252.4	5.56	15.70	
L-61	<i>Lactobacillus</i> (small colony)	0.17	0.49	0.05	0.10	0.03	0.14	0.08	0	241.3	9.56	18.37	
L-62	<i>Lactobacillus</i> A2	0.46	6.95	0.03	0.21	0.10	3.94	0.10	0.21	297.3	10.89	29.04	
L-63	<i>Lactobacillus</i> A4-1	0.43	0.38	0.11	0.70	0.81	0.56	0.11	0.44	246.7	20.22	52.15	
L-64	<i>Lactobacillus</i> A4-2	0.38	0.35	0.15	0.24	0.25	0.41	0.11	0.14	222.7	27.33	49.04	
L-65	<i>Lactobacillus</i> D4-1	0.43	0.41	0.17	0.45	0.49	0.54	0.10	0.57	236.0	27.78	79.26	
L-66	<i>Lactobacillus</i> D5	0.01	0	0.38	0.77	0.03	0.62	0.08	0	157.3	18.44	12.59	
L-67	<i>Lactobacillus</i> E1	0.06	0.26	0.16	0.55	0.05	0.32	0.13	0	227.1	9.11	9.93	
L-68	<i>Lactobacillus</i> Y02	0.09	0.61	0.06	0.96	0.08	0.29	0.13	0.44	223.1	37.56	33.93	
L-69	<i>Lactobacillus</i> Y05	0.57	0.21	0.04	0.47	1.49	0.05	0.08	0	198.2	28.67	78.81	
L-70	<i>Lactobacillus</i> Y06	0.16	0	0.16	0.39	0.11	0.14	0.16	0.03	212.4	25.56	23.70	
L-71	<i>Lactobacillus</i> Y10	0.08	0.50	0.09	1.01	0.05	0	0.11	0	194.7	39.33	26.81	
L-72	<i>actobacillus</i> Y13	0.14	0.86	0.08	1.07	0.40	0.86	0.10	0.79	201.3	23.78	80.59	
L-73	<i>Lactobacillus</i> Y22	0.46	0.34	0.09	0.43	1.22	2.14	0.10	1.86	190.2	17.56	61.04	
L-74	<i>Lactobacillus</i> Y23	0.55	0	0.13	0.28	0.27	0	0.21	0	198.2	18.44	53.04	
L-75	<i>Lactobacillus</i> Y25	0.09	0.67	0.09	0.76	0.10	1.00	0.13	0.54	198.2	33.56	29.48	
L-76	<i>Lactobacillus</i> Y28	0.03	0.75	0.08	0.54	0.03	0	0.11	0	215.6	18.89	21.48	
L-77	<i>Lactobacillus</i> Y29	0.04	0.36	0.15	0.78	0.10	0	0.22	0	275.1	32.67	30.81	
L-78	<i>Lactobacillus</i> Y32	0.04	0.41	0.25	1.03	0.05	0.44	0.14	0.41	210.7	35.33	34.37	
L-79	<i>Lactobacillus</i> Y33	0.08	0.27	0.09	1.04	0.14	0.08	0.22	0	189.8	33.11	27.70	
L-80	<i>Lactobacillus</i> Y38	0.09	0.41	0.02	0.91	0.16	0.30	0.29	0.44	276.4	42.00	33.48	
L-81	<i>Lactobacillus</i> Y40	0.08	0.47	0.03	0.41	0.06	0.21	0.08	0.32	200.4	38.44	36.15	
L-82	<i>Lactobacillus</i> Y44	0.09	0.16	0.05	0.71	0.05	0.65	0.08	0.57	217.8	40.22	37.48	
L-83	<i>Lactobacillus</i> Y48	0.11	0.63	0.06	0.79	0.03	0.29	0.06	0.41	217.3	45.56	37.93	
L-84	<i>Lactobacillus</i> -85	0.08	0.48	0.08	0.15	0.13	0.10	0.19	0.05	233.8	35.78	27.70	
L-85	<i>Lactobacillus</i> -56	0.12	0.16	0.08	0.43	0.17	0	0.11	0	222.7	33.11	36.59	
L-86	<i>Lactobacillus</i> -38	0.19	0	0.08	0.66	0.11	0	0.13	0.11	272.9	35.33	35.26	

No.	Type strains	1차				2차				1차		2차	
		α-gal		β-glu		α-gal		β-glu		phytase			
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra	
L-87		0.06	0.08	0.08	0.52	0.11	0	0.13	0	267.6	42.89	38.81	
L-88	<i>Lactobacillus brevis</i> L62	0.06	0.95	1.40	1.26	0.05	0.54	0.17	0.33	215.1	12.22	42.81	
L-89	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA14	0.03	0.63	1.12	0.51	0.03	0.52	0.17	0.08	217.3	24.67	25.48	
L-90	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.06	0.59	1.76	0.59	0.03	0	0.33	0	254.7	10.44	5.48	
L-91	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0.03	1.33	0.00	0.15	0.06	0.00	0.24	0	203.6	21.56	24.15	
L-92	<i>P.penosaceus</i>	0.12	1.46	0	0.67	0.10	1.83	0.19	0.30	248.4	38.00	29.93	

Bifidobacteria

No.	Type strains	1차				2차				1차		2차	
		α-gal		β-glu		α-gal		β-glu		phytase			
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra	
B-1	<i>Bif. adolescentis</i> MK-K8	0.20	0.52	0.83	0.44	0.14	1.30	0.25	0.35	131.1	16.67	39.70	
B-2	<i>Bif. angulatum</i> ATCC27535	0.12	3.70	0.02	0.62	0.27	2.17	0.10	0.52	173.8	3.78	16.15	
B-3	<i>Bif. breve</i> K-4	0.14	0.60	0.06	0.71	0.16	0.90	0.19	0.46	181.8	20.67	20.59	
B-4	<i>Bif. breve</i> K-5	0.14	0.55	1.11	0.80	0.13	0.73	0.32	0.17	168.9	27.33	38.37	
B-5	<i>Bif. breve</i> ATCC15700	0.20	1.15	0.28	0.63	0.14	0.59	0.24	0.44	106.2	14.89	31.70	
B-6	<i>Bif. catenulactum</i> ATCC27539	0.31	1.10	0.10	1.31	0.21	0.54	0.19	0.95	196.0	27.33	40.59	
B-7	<i>Bif. infantis</i> BBI-410	0	0.41	0.34	0.46	0.22	0.60	0.27	0.27	180.9	26.44	31.70	
B-8	<i>Bif. infantis</i> B-94	0	1.29	0.21	0.58	0.21	0.65	0.24	0.27	144.9	11.78	27.26	
B-9	<i>Bif. infantis</i> MAEIL-K9	0	0.78	0.28	0.79	0.13	0.08	0.27	0.25	120.4	6.44	49.04	
B-10	<i>Bif. lactis</i> BB-12	0.30	0.88	2.17	0.70	0.14	0.33	0.24	0.43	115.6	20.22	39.70	
B-11	<i>Bif. lactis</i> 420	0.00	0.87	0	1.05	0.27	0.24	0.30	0.65	140.9	23.33	66.37	
B-12	<i>Bif. longum</i> BB-46	0.01	0.26	0.15	0.55	0.44	0.73	0.67	1.11	113.8	9.56	47.26	
B-13	<i>Bif. longum</i> MK-G7	0.03	0.87	0.00	0.52	0.52	0.32	0.48	0.25	168.0	18.00	73.04	
B-14	<i>Bif. longum</i> BB536	0.03	0.60	0.00	0.26	0.16	0.35	0.14	0.35	184.9	25.56	30.81	
B-15	<i>Bif. longum</i> K-2	0.09	0.84	0.02	0.76	0.11	0.44	0.11	0.71	133.8	21.56	56.59	
B-16	<i>Bif. longum</i> K-3	0.08	1.21	0.04	0.93	0.41	0.67	0.38	0.76	131.1	21.56	37.04	
B-17	<i>Bif. longum</i> ATCC15707	0.06	1.01	0.04	0.66	0.11	0.75	0.37	0.44	164.0	20.22	73.04	
B-18	<i>Bif. longum</i> BB-730	0.14	1.46	0.06	1.38	0.11	1.76	0.19	1.65	149.3	23.78	33.48	
B-19	<i>Bif. longum</i> BL-720	0.09	1.26	0.27	0.97	0.60	0.24	0.67	0.49	119.1	14.89	34.81	
B-20	<i>Bif. longum</i> BL-710	0.09	0.66	0.60	0.51	0.22	0.71	0.43	0.29	120.9	15.33	22.81	
B-21	<i>Bif. longum</i> BL-730	0.28	1.03	0.18	1.08	1.51	0.59	0.54	0.48	120.4	21.11	46.37	
B-22	<i>Bifidobacterium</i> RD-001	0.11	1.18	0.20	1.46	0.11	0.57	0.30	0.65	144.0	32.67	40.15	
B-23	<i>Bifidobacterium</i> RD-003	0.12	0.66	0.63	0.92	0.29	0.76	0.97	0.49	134.2	24.67	44.59	
B-24	<i>Bifidobacterium</i> RD-011	0.11	0.97	0.30	1.13	0.40	0.75	0.49	0.46	66.2	19.78	18.81	
B-25	<i>Bifidobacterium</i> RD-027	0.16	0.58	0.05	0.59	1.43	0.60	0.03	0.24	111.6	-0.67	6.81	

No.	Type strains	1차				2차				1차		2차	
		α -gal		β -glu		α -gal		β -glu		phytase			
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra	
B-26	<i>Blifidobacterium</i> RD-031	0.12	1.52	0.39	0.92	0.25	0	0.19	0.19	140.0	4.22	23.70	
B-27	<i>Blifidobacterium</i> RD-032	0.14	0.75	0.40	0.79	0.44	0	0.65	0	123.1	6.44	44.15	
B-28	<i>Blifidobacterium</i> RD-033	0.11	0.44	0.09	0.74	0.05	0.32	0.03	0.13	216.9	4.22	30.81	
B-29	<i>Blifidobacterium</i> RD-037	0.60	1.12	0.11	0.66	0.29	0.57	0.13	0.19	141.3	1.56	13.93	
B-30	<i>Blifidobacterium</i> RD-051	0.43	2.22	0.16	0.92	0.10	2.27	0.06	0.41	118.2	5.11	22.81	
B-31	<i>Blifidobacterium</i> RD-052	0.17	0.72	0.08	0.84	0.67	0.51	0.24	0.32	114.2	6.89	23.70	
B-32	<i>Blifidobacterium</i> RD-055	0.01	0.95	0.24	0.76	0.00	0.60	0.08	0.27	124.4	7.33	27.70	
B-33	<i>Blifidobacterium</i> RD-057	0.12	0.50	0.12	0.09	0.16	0.46	0.08	0.00	239.6	16.67	9.04	
B-34	<i>Blifidobacterium</i> RD-062	0.22	1.67	0.17	1.25	0.40	0.52	0.25	1.02	225.3	3.78	16.15	
B-35	<i>Blifidobacterium</i> RD-064	0.03	0.67	0.33	1.08	0.22	0.25	0.30	0.59	223.6	20.67	13.93	
B-36	<i>Blifidobacterium</i> RD-067	0.79	48.50	0.04	0.86	0.41	6.00	0.29	0.59	218.7	27.33	14.37	
B-37	<i>Blifidobacterium</i> RD-068	0.73	10.16	0.03	0.08	0.67	0.73	0.30	0.46	209.3	0.67	9.04	
B-38	<i>Blifidobacterium</i> RD-070	0.09	0.25	0.07	0.92	0.02	0.44	0.03	0.67	209.8	3.33	46.37	
B-39	<i>Blifidobacterium</i> RD-072	0.14	2.05	0.15	0.74	0.05	0.17	0.03	0.33	236.9	2.00	20.15	
B-40	<i>Blifidobacterium</i> RD-073	0.08	0.46	0.19	0.87	0.00	0.22	0.06	0.37	216.0	6.89	19.26	
B-41	<i>Blifidobacterium</i> RD-077	0.11	1.16	0.06	0.39	0.02	0.16	0.03	0.37	192.4	2.44	19.26	
B-42	<i>Blifidobacterium</i> RD-079	0.14	0.41	0.34	0.36	0.02	0	0.05	0	246.2	22.00	24.59	
B-43	<i>Blifidobacterium</i> RD-082	0.04	0.68	0.15	0.66	0.03	0.10	0.05	0.02	243.1	5.11	12.59	
B-44	<i>Blifidobacterium</i> RD-084	0.06	0.65	0.22	0.87	0.03	0.67	0.10	0.40	237.8	5.11	33.48	
B-45	<i>Blifidobacterium</i> RD-087	0.04	0.59	0.19	0.47	0.29	0.83	0.06	0.78	201.8	1.56	27.26	
B-46	<i>Blifidobacterium</i> RD-089	0.33	2.73	0.27	0.62	0.08	0.41	0.06	0.29	406.7	6.44	11.70	
B-47	<i>Blifidobacterium</i> RD-090	0.06	0.74	0.48	0.85	0.03	0.33	0.17	0.03	238.2	1.56	47.26	
B-48	<i>Blifidobacterium</i> RD-091	0.09	0.97	0.26	0.74	0.03	0.35	0.10	0.14	217.8	7.33	39.26	
B-49	<i>Blifidobacterium</i> RD-092	0.08	0.61	0.12	0.62	0.33	0.52	0.19	0.33	263.6	3.33	19.26	
B-50	<i>Blifidobacterium</i> RD-094	0.11	0.17	0.04	0.18	0.13	0.16	0.17	0.35	249.3	3.33	9.48	
B-51	<i>Blifidobacterium</i> RD-096	0.20	0.65	0.08	0.55	0.27	0.35	0.17	0	277.8	10.44	8.59	
B-52	<i>Blifidobacterium</i> RD-097	0.12	0.38	0.05	0.62	0.21	0.68	0.22	0.60	260.9	11.33	14.37	
B-53	<i>Blifidobacterium</i> RD-098	0.12	0.54	0.22	0.60	0.19	0.67	0.21	0.38	246.2	6.89	21.93	
B-54	<i>Blifidobacterium</i> RD-102	0.28	0.48	0.16	0.93	0.33	0.52	0.25	0.40	271.1	9.11	22.37	
B-55	<i>Blifidobacterium</i> RD-106	0.84	1.79	0.74	0.78	0.71	3.79	0.24	0.75	268.4	8.67	12.15	
B-56	<i>Blifidobacterium</i> RD-107	0.78	2.27	0.87	1.37	0.25	0.56	0.38	0.46	222.2	10.89	36.59	
B-57	<i>Blifidobacterium</i> RD-112	0.70	0.13	0.83	0.59	0.24	0.25	0.24	0.24	288.0	9.56	28.59	
B-58	<i>Blifidobacterium</i> RD-117	0.65	0.51	0.84	0.38	0.13	0.49	0.38	0.41	262.2	15.33	16.15	
B-59	<i>Blifidobacterium</i> RD-118	0.68	0.48	0.62	0.52	0.13	0.48	0.25	0.10	263.1	11.78	27.26	
B-60	<i>Blifidobacterium</i> RD-119	0.68	0.21	0.65	0.93	0.25	0.63	0.33	0.17	262.2	20.67	26.81	
B-61	<i>Blifidobacterium</i> RD-120	0.70	0.57	0.88	0.69	0.29	0.52	0.17	0.54	217.3	4.22	35.26	
B-62	<i>Blifidobacterium</i> RD-121	0.87	2.62	0.69	0.88	0.21	0.71	0.16	0.79	219.6	1.56	27.70	
B-63	<i>Blifidobacterium</i> RD-13	0.73	0.23	0.80	0.89	0.24	0	0.14	0	255.6	2.00	65.93	

No.	Type strains	1차				2차				1차		2차
		α-gal		β-glu		α-gal		β-glu		phytase		
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra
B-64	<i>Blifidobacterium</i> RD-134	0.90	1.38	0.67	0.60	0.52	0.63	0.25	0.35	231.1	7.78	25.93
B-65	<i>Blifidobacterium</i> RD-147	0.71	0.82	0.66	0.63	0.25	0.41	0.13	0.30	240.4	-0.22	17.48
B-66	<i>Blifidobacterium</i> RD-149	0.81	0.34	0.79	0.40	0.17	0.44	0.16	0.52	237.8	11.33	43.70
B-67	<i>Blifidobacterium</i> RD-28	0.66	0.06	0.71	0.37	0.24	0.70	0.21	0.38	260.9	5.56	20.59
B-68	<i>Blifidobacterium</i> RD-5	0.65	0.17	0.73	1.32	0.25	0.24	0.32	0.06	310.2	8.67	37.04
B-69	<i>Blifidobacterium</i> RD-50	0.71	0.56	0.63	0.74	0.24	0.71	0.22	0.17	267.6	7.33	18.81

Streptococci

No.	Type strains	1차				2차				1차		2차
		α-gal		β-glu		α-gal		β-glu		phytase		
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra
S-1	<i>Str. thermophilus</i> ST-B01	0.47	0.40	0.69	0	0.02	0.41	0.17	0.13	254.7	5.11	9.04
S-2	<i>Str. thermophilus</i> ST-M3	0.25	0.30	0.23	0	0	0.06	0.14	0.29	321.3	6.44	9.04
S-3	<i>Str. thermophilus</i> TH-4	0.28	0	0.47	0	0.02	0.16	0.21	0	281.3	5.11	13.04
S-4	<i>Str. thermophilus</i> STAM3	1.82	0.12	2.77	0	0.10	0.05	0.35	0	257.3	10.44	18.37
S-5	<i>Str. thermophilus</i> TH-3	2.04	0.79	2.63	0.33	0.06	0	0.24	0	272.9	32.67	29.48
S-6	<i>Str. thermophilus</i> ST-36	2.57	0.18	4.19	0	0.17	0	0.37	0	281.3	31.33	29.04
S-7	<i>Str. thermophilus</i> St-body-2	1.43	0.29	3.34	0	0.08	0.02	0.22	0	257.3	11.78	10.81
S-8	<i>Str. thermophilus</i> St-body-1	1.44	0.78	1.72	0.10	0.06	0.30	0.27	0.03	254.2	16.22	17.04
S-9	<i>Str. thermophilus</i> ST-M6	2.22	0.44	2.42	0.07	0.03	0	0.32	0	252.0	34.00	28.59
S-10	<i>Str. thermophilus</i> ST2	2.22	0.05	3.24	0	0.08	0	0.32	0	264.4	33.11	28.59
S-11	<i>Str. thermophilus</i> ST-1	2.24	0.74	3.04	0	0.10	0.27	0.48	0	240.0	34.44	29.93
S-12	<i>Str. thermophilus</i> TA052	0.82	0.61	0.76	0	0.17	0.14	0.51	0	223.6	32.22	29.93
S-13	<i>Str. thermophilus</i> ST-5	2.28	0.13	3.21	0	0.02	0.25	0.06	0.24	243.1	36.22	27.26
S-14	<i>Str. thermophilus</i> 십송	2.51	0.45	3.87	0.08	0.02	0	0.06	0	236.0	34.89	25.93
S-15	<i>Str. thermophilus</i> St-body-3	2.27	0.69	3.12	0.06	0.00	0	0.11	0.19	232.4	41.11	25.93
S-16	<i>Str. thermophilus</i> A	0.27	1.17	0.37	0.16	0.00	0	0.11	0.43	304.4	7.33	8.15
S-17	<i>Str. thermophilus</i> Choozit 985	0.19	0.66	0.33	0	0.11	0.16	0.05	0.19	262.2	2.89	9.48
S-18	<i>Str. thermophilus</i> LBB-36	0.27	1.03	0.48	0.02	0.13	0.37	0.11	0.19	301.8	4.67	12.59
S-19	<i>Str. thermophilus</i> LBB-554	0.25	0.51	0.47	0.39	0.00	0	0.05	0	270.2	12.22	7.70
S-20	<i>Str. thermophilus</i> TH-1	0.43	1.15	0.94	0.20	0.00	0	0.10	0	277.3	2.00	10.81
S-21	<i>Str. thermophilus</i> TH-2	2.92	0.37	3.11	0.19	0.03	0	0.14	0	268.9	11.33	9.04
S-22	<i>Str. thermophilus</i> TH-5	0.22	0.81	0.28	0.31	0.00	0	0.10	0	309.3	5.11	10.81
S-23	<i>Str. thermophilus</i> JST-1	0.19	0.78	0.28	0	0.24	0.02	0.22	0.48	274.7	11.78	10.81
S-24	<i>Str. thermophilus</i> JST-2	0.31	0.63	0.47	0	0.06	0.06	0.35	0	309.8	4.67	16.59
S-25	<i>Str. thermophilus</i> JST-3	0.39	0.10	0.28	0	0.05	0.00	0.10	0.17	308.0	2.00	9.93
S-26	<i>Str. thermophilus</i> JST-7	0.65	1.08	1.13	0.11	0.06	0	0.08	0.35	288.0	2.00	32.15

No.	Type strains	1차				2차				1차		2차		
		α -gal		β -glu		α -gal		β -glu		phytase				
		Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Intra	Extra	Extra	Intra	Intra		
S-27	<i>Str. thermophilus</i> JST-8	0.39	1.20	0.39	0.33	0.06	0.16	0.16	0	252.0	9.56	29.93		
S-28	<i>Str. thermophilus</i> JST-9	0.36	0.34	0.47	0	0.10	0	0.13	0.37	282.7	3.78	23.26		

5. 20종의 유산균주 1차 선발(Lac. 7종, Bif. 8종, Str. 5종)

국산대두로 만든 두유원액에서 성장력 및 산생성능이 우수한 유산균 중 Lactobacilli 7종은 대두에 많이 존재하는 난소화성 대두올리고당을 분해하여 소화흡수율을 높일 수 있는 α -galactosidase의 역가 위주로 선발하였고, Bifidobacteria 8종은 두유에서 배당체형태로 존재하는 이소플라본을 체내흡수율이 높은 비배당체 이소플라본, 즉, aglycones형태로 전환시키는 β -glucosidase의 역가 위주로 선발하였다. Streptococci는 일본제품에서 분리한 균주를 제외하고 모두 상업용 종균이라 β -glucosidase 역가가 높은 균주 중 종균 회사별로 Chr. Hansen 2종, Culture System 2종, Danisco 1종(총 5종)을 선발하였다. 그러나 β -glucosidase 활성측정 결과 전체적으로 유의적인 차이가 없어 3반복 2회에 걸쳐 실험을 진행하였다. 유산균주 189종의 phytase 활성측정 결과는 유의적인 차이가 없고 두유의 발효과정 중 생리활성을 개선시키는데 중요하지 않을 것으로 판단되어 1차 유산균주 선발 기준에서 제외시켰다. (Table 5)

Table 4. 20 kinds of selected lactic acid bacteria.

Lactobacilli(7종)	Bifidobacteria(8종)	Streptococci(5종)
L-6 <i>L. acidophilus</i>	B-12 <i>B. longum</i> BB-46	S-5 <i>S. thermophilus</i> TH-3
L-14 <i>L. bulgaricus</i> CS209	B-16 <i>B. longum</i> K-3	S-8 <i>S. thermophilus</i> St-body1
L-22 <i>L. casei</i> LC911	B-18 <i>B. longum</i> BB-730	S-11 <i>S. thermophilus</i> St-1
L-23 <i>L. casei</i> LC939	B-19 <i>B. longum</i> BL-720	S-12 <i>S. thermophilus</i> TA052
L-58 NCFM	B-21 <i>B. longum</i> BL-730	S-16 <i>S. thermophilus</i> A
L-69 <i>Lactobacillus</i> Y05	B-22 <i>Bifidobacterium</i> RD-001	
L-73 <i>Lactobacillus</i> Y22	B-34 <i>Bifidobacterium</i> RD-062	
	B-62 <i>Bifidobacterium</i> RD-121	

6. 후산 발효

가. 재료 및 방법

국산 대두로 추출한 두유원액을 121℃에서 15분간 멸균하여 무균적으로 Falcon tube에 30ml씩 분주하여 1차 선발된 유산균주 20종을 2회 계대배양 후 1%씩 접종하여 37℃에서 배양하였다. 배양액을 10℃, 15℃에서 각각 15일간 보관하여 2-3일 간격으로 각 시료의 유산균수, pH, 산도를 측정하였다. 유산균수 측정 시 0.85% NaCl에 희석하여 Lactobacilli는 MRS agar plate, Streptococci는 M17 agar plate, Bifidobacteria는 BL agar plate에 각각 도말하여 37℃에서 48시간 배양한 후 colony를 counting 하였다.

나. 결과 및 고찰

Lactobacilli와 Bifidobacteria는 산도 0.80%에서 배양을 종료하였고 Streptococci는 산생성이 많이 되지 않는 점을 감안하여 산도 0.65%에서 배양을 종료하였다. 후산발효 정도를 측정한 결과 Lactobacilli는 후산발효 정도가 강한 편이었고, Bifidobacteria는 15℃ 보관 시 후산발효가 진행되었으며, Streptococci는 S12균주를 제외하고 후산발효 정도가 약한 편이었다.

Table 5. Changes of pH, acidity, lactic acid bacteria for 2 weeks.

일차	온도	내용	L-6	L-14	L-22	L-23	L-58	L-69	L-73	B-16	B-18	B-34
0일		균수	1.2×10^8	1.1×10^8	3.5×10^8	3.2×10^8	1×10^8	1.2×10^9	1.2×10^9	3.8×10^8	1.6×10^9	5×10^8
		pH	4.29	4.28	4.30	4.29	4.31	4.28	4.29	4.32	4.28	4.32
		산도	0.80	0.81	0.80	0.81	0.80	0.80	0.80	0.79	0.81	0.80
2일	10℃	균수	9×10^7	1×10^8	2.5×10^8	2.7×10^8	9×10^7	1×10^9	1.2×10^9	3.3×10^8	1.6×10^9	5.3×10^8
		pH	4.29	4.26	4.28	4.28	4.20	4.26	4.27	4.30	4.22	4.32
		산도	0.81	0.83	0.82	0.81	0.86	0.82	0.81	0.81	0.85	0.81
	15℃	균수	8.3×10^7	1×10^8	1×10^8	2.5×10^8	9×10^7	9×10^8	1.2×10^9	3.4×10^8	1.7×10^9	6×10^8
		pH	4.20	4.19	4.24	4.26	4.19	4.15	4.26	4.26	4.16	4.31
		산도	0.86	0.87	0.84	0.83	0.88	0.92	0.83	0.84	0.90	0.80
4일	10℃	균수	8.5×10^7	9.3×10^7	2.3×10^8	2.3×10^8	8.3×10^7	8×10^8	1.3×10^9	2.3×10^8	3.3×10^9	3.2×10^7
		pH	4.27	4.20	4.26	4.27	4.21	4.26	4.26	4.30	4.20	4.31
		산도	0.84	0.86	0.84	0.83	0.85	0.83	0.83	0.81	0.86	0.80
	15℃	균수	8×10^7	8×10^7	8.8×10^7	2.5×10^8	1×10^8	8×10^8	1×10^9	4×10^8	1.6×10^9	4.5×10^8
		pH	4.19	4.17	4.24	4.20	4.19	4.13	4.25	4.25	4.10	4.29
		산도	0.87	0.89	0.82	0.86	0.92	0.95	0.84	0.84	0.94	0.81
6일	10℃	균수	5×10^7	5.1×10^7	5×10^7	5×10^7	6.7×10^7	3×10^8	8.3×10^8	3×10^8	2×10^9	5.5×10^8
		pH	4.25	4.10	4.21	4.25	4.21	4.23	4.25	4.29	4.20	4.32
		산도	0.85	0.93	0.88	0.83	0.86	0.84	0.84	0.82	0.86	0.81
	15℃	균수	5×10^7	5×10^7	5.3×10^7	4.5×10^7	6.1×10^7	3×10^8	8×10^8	3×10^8	1.7×10^9	6.5×10^8
		pH	4.12	4.08	4.11	4.12	4.09	4.16	4.23	4.25	4.10	4.29
		산도	0.94	0.97	0.95	0.94	0.95	0.92	0.85	0.84	0.96	0.82
9일	10℃	균수	3.3×10^7	3×10^7	4.5×10^7	5×10^7	4×10^7	3×10^8	6×10^8	3×10^8	1.5×10^9	6.7×10^8
		pH	4.13	3.87	3.84	3.85	3.94	4.23	4.18	4.22	3.91	4.28
		산도	0.83	0.99	1.05	1.02	0.9	0.83	0.87	0.87	1.08	0.82
	15℃	균수	3×10^7	4×10^7	2.9×10^7	1×10^8	5×10^7	5×10^8	1.1×10^9	1.3×10^7	1.7×10^9	6.5×10^8
		pH	3.98	3.77	3.75	3.73	3.82	4.12	4.15	4.05	3.78	4.30
		산도	1.00	1.05	1.10	1.12	1.02	0.92	0.90	0.92	3.78	4.30
12일	10℃	균수	2×10^7	1.1×10^7	4.3×10^7	4.3×10^7	2.4×10^7	5.5×10^8	2.2×10^8	1.1×10^7	1.5×10^9	5.5×10^8
		pH	3.94	3.96	3.87	3.94	4.00	4.01	4.03	3.99	3.81	4.12
		산도	0.99	1.00	1.03	1.00	0.94	0.89	0.86	0.89	1.13	0.88
	15℃	균수	2×10^7	1×10^7	2.9×10^7	2.9×10^7	2×10^7	2×10^8	1×10^9	9×10^7	1.3×10^9	5×10^8
		pH	3.83	3.80	3.77	3.77	3.82	4.18	4.15	4.00	3.89	4.16
		산도	1.04	1.17	1.23	1.21	1.04	0.93	0.97	1.01	1.17	0.95
15일	10℃	균수	2.1×10^7	1×10^7	3×10^7	3×10^7	2×10^7	5×10^8	2.1×10^8	1.3×10^7	1.5×10^9	5×10^8
		pH	3.95	3.96	3.88	3.90	4.02	4.03	4.02	4.00	3.80	4.10
		산도	0.99	1.01	1.03	1.01	0.94	0.90	0.86	0.89	1.14	0.89
	15℃	균수	1.9×10^7	1.2×10^7	2.5×10^7	2.7×10^7	2.2×10^7	3×10^8	1.1×10^9	8×10^7	1.3×10^9	2×10^8
		pH	3.81	3.79	3.76	3.73	3.79	4.15	4.15	3.93	3.86	4.15
		산도	1.10	1.22	1.20	1.20	1.07	0.95	0.98	1.10	1.17	0.94

일자	온도	내용	S-5	S-8	S-11	S-12	S-16	B-12	B-19	B-21	B-22	B-62
0일		균수	9×10^7	2.5×10^8	1×10^8	2.8×10^8	8×10^7	1.6×10^8	2.3×10^8	1.5×10^8	6×10^7	4×10^7
		pH	4.40	4.39	4.40	4.41	4.44	4.31	4.29	4.25	4.21	4.20
		산도	0.65	0.65	0.65	0.65	0.63	0.79	0.81	0.80	0.78	0.80
1일	10℃	균수	8.7×10^7	2×10^8	1.1×10^8	2×10^8	8.1×10^7	1.5×10^8	2×10^8	1.1×10^8	7×10^7	4.1×10^7
		pH	4.40	4.38	4.40	4.40	4.43	4.31	4.30	4.26	4.22	4.20
		산도	0.64	0.66	0.64	0.65	0.63	0.79	0.81	0.80	0.78	0.80
	15℃	균수	8.8×10^7	2.4×10^8	1×10^8	2.3×10^8	7.6×10^7	1.6×10^8	2×10^8	1.3×10^8	5.5×10^7	4×10^7
		pH	4.38	4.33	4.37	4.32	4.36	4.29	4.29	4.25	4.29	4.28
		산도	0.66	0.72	0.66	0.71	0.67	0.82	0.83	0.83	0.80	0.83
3일	10℃	균수	9×10^7	2.1×10^8	1.1×10^8	2×10^8	8.2×10^7	1.6×10^8	2.2×10^8	1.1×10^8	7×10^7	4×10^7
		pH	4.36	4.37	4.39	4.37	4.38	4.29	4.27	4.27	4.29	4.29
		산도	0.64	0.68	0.65	0.66	0.66	0.80	0.83	0.82	0.80	0.81
	15℃	균수	8.8×10^7	2.4×10^8	1.2×10^8	2.2×10^8	7.6×10^7	1.5×10^8	2×10^8	1.5×10^8	5.3×10^7	4×10^7
		pH	4.33	4.30	4.34	4.29	4.31	4.26	4.28	4.24	4.28	4.27
		산도	0.68	0.73	0.67	0.73	0.69	0.83	0.85	0.85	0.81	0.84
6일	10℃	균수	9×10^7	2×10^8	1×10^8	2×10^8	7×10^7	1.5×10^8	1.8×10^8	1×10^8	7×10^7	4×10^7
		pH	4.38	4.37	4.37	4.35	4.35	4.28	4.26	4.26	4.28	4.26
		산도	0.65	0.67	0.66	0.66	0.66	0.81	0.84	0.83	0.81	0.82
	15℃	균수	1×10^8	8×10^7	1.1×10^8	3.7×10^8	8×10^7	1.5×10^8	2.4×10^8	1.7×10^8	6×10^7	3.2×10^7
		pH	4.35	4.28	4.29	4.23	4.29	4.29	4.25	4.16	4.25	4.27
		산도	0.69	0.75	0.69	0.76	0.71	0.86	0.88	0.88	0.87	0.86
8일	10℃	균수	9.1×10^7	1.6×10^8	1×10^8	2×10^8	6.8×10^7	1.5×10^8	1.8×10^8	1.1×10^8	6.9×10^7	4.2×10^7
		pH	4.38	4.37	4.37	4.35	4.36	4.29	4.27	4.26	4.26	4.16
		산도	0.65	0.67	0.66	0.68	0.66	0.82	0.84	0.82	0.85	0.83
	15℃	균수	1×10^8	7.7×10^7	1×10^8	3.2×10^8	7.8×10^7	1×10^8	2×10^8	1.5×10^8	6×10^7	3.4×10^7
		pH	4.21	4.19	4.15	4.03	4.19	4.32	4.25	4.23	4.21	4.05
		산도	0.71	0.77	0.75	0.88	0.70	0.92	0.89	0.87	0.87	0.86
10일	10℃	균수	8×10^7	1×10^8	1×10^8	1.5×10^8	6.8×10^7	1.5×10^8	1.5×10^8	1.1×10^8	6.9×10^7	3.8×10^7
		pH	4.35	4.36	4.35	4.25	4.33	4.28	4.27	4.24	4.25	4.15
		산도	0.69	0.67	0.68	0.73	0.68	0.82	0.84	0.84	0.85	0.83
	15℃	균수	9.8×10^7	7×10^7	9.5×10^7	3×10^8	7.8×10^7	9×10^7	1.1×10^8	9×10^7	6.1×10^7	3.3×10^7
		pH	4.20	4.13	4.14	4.01	4.16	4.25	4.19	4.18	4.16	4.02
		산도	0.73	0.80	0.79	0.90	0.74	0.98	0.91	0.90	0.93	0.86
13일	10℃	균수	8×10^7	1.1×10^8	1×10^8	1.5×10^8	6.6×10^7	1.5×10^8	1.7×10^8	1.1×10^8	7×10^7	3.9×10^7
		pH	4.35	4.36	4.35	4.25	4.32	4.25	4.23	4.19	4.25	4.11
		산도	0.69	0.67	0.68	0.73	0.68	0.84	0.85	0.87	0.85	0.85
	15℃	균수	9×10^7	7×10^7	9.1×10^7	3×10^8	8×10^7	9×10^7	1×10^8	8.9×10^7	6×10^7	3.1×10^7
		pH	4.20	4.13	4.14	3.98	4.18	4.18	4.19	4.17	4.16	4.02
		산도	0.75	0.80	0.79	0.92	0.76	1.00	0.91	0.91	0.93	0.86

제 2 절 대두 원산지별 이취성분 및 생리활성 비교/분석

1. 대두의 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 휘발성 향미성분 분석

가. 재료 및 방법

1) 두유 발효유의 휘발성 향미성분, 이취성분 추출법 확립

원산지에 따라 분류된 두유원액과 두유배양액의 휘발성 향미성분을 추출하기 위해서 SPME를 이용하였고, Carboxen-Polydimethylsiloxane(Carboxen-PDMS 75 μ m) fiber를 사용하였다. 시료는 3 $^{\circ}$ C에서 보관하였으며, 실험을 수행하기 30분전에 상온에 꺼내놓았다. 이후 60ml-vial에 시료 20ml을 넣고, NaCl 2.00g과 내부표준물질로 500ppm(v/v in ethanol) 1-dodecanol을 50 μ l 첨가하고 60 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 평형상태에서 유지시킨 후 SPME fiber를 삽입하여 30분 동안 휘발성 향미성분들을 흡착하였다.

2) GC-MS 분석 조건

SPME를 사용하여 추출한 두유원액과 두유배양액의 휘발성 향미성분은 GC-MS(Gas Chromatograph-Mass Spectrometry)에 의하여 분석되었다. GC-MS는 HP 5975 series GC/HP 5975 mass selective detector(Hewlett-packed Co. USA)로 수행하였으며, column은 DB-5MS(30m length x 0.25mm i.d. x 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. Oven의 온도는 50 $^{\circ}$ C에서 6분간 유지시킨 후, 분당 7 $^{\circ}$ C씩 올려 200 $^{\circ}$ C에서 10분간 유지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 200 $^{\circ}$ C와 250 $^{\circ}$ C 이었으며, mass selective detector의 조건은 ionization energy, 70eV; mass range, 50-550 a.m.u.; scanning rate, 1.4 scans/s와 같았다. 이동상 기체는 helium으로 유속은 0.8ml/min을 유지하고, splitless mode를 사용하였다. SPME fiber에 흡착된 휘발성 향미성분들을 액체 질소에 injector 부분의 column 일부를 담그는 방식의 cryo-focusing 법을 적용하여 200 $^{\circ}$ C에서 5분간 탈착하였다.

나. 실험 결과

Table 6은 대두의 원산지에 따른 두유원액과 두유배양액의 주요 휘발성 향미성분들을 비교한 결과이다. 원산지에 따른 두유원액과 두유배양액의 휘발성 향미성분들을 비교한 결과 두유배양액이 두유원액보다 휘발성 향미성분의 양이 상대적으로 많이 분석되었다. 2-Ethylfuran의 경우 국내에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유배양액에서 가장 많이 검출되었고, hexanal은 국내에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유원액과 미국에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유배양액에서 다른 시료보

다 상대적으로 많이 검출되었다. 2-Heptanone과 2-nonanone의 경우는 중국에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유원액에서는 분석되지 않았지만, 호주에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유원액과 미국에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유배양액에서 많은 양이 분석되었다. 반면, benzaldehyde와 2-pentylfuran은 중국에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유원액에서 높은 양이 검출되었지만 상대적으로 호주와 미국에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유원액에서는 적게 정량되었다. 1-Octen-3-ol, linalool과 nonanal의 경우는 대체적으로 중국과 호주에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유배양액에 다량으로 함유되어 있었지만, 미국에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유원액에서는 그 함량이 적거나 분석되지 않았다.

Table 6. Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilks of different origins.

Compounds	중국산 두유원액	중국산 발효유	호주산 두유원액	호주산 발효유	미국산 두유원액	미국산 발효유	국내산 두유원액	국내산 발효유
2-ethylfuran	1.30 ^a	2.50	1.25	2.50	1.81	3.04	3.80	7.81
hexanal	1.51	1.77	3.29	1.77	3.78	6.14	8.35	4.75
2-Heptanone	0.00	5.06	1.04	5.06	0.45	31.83	0.31	0.25
benzaldehyde	10.48	2.02	0.18	2.02	0.23	2.29	0.15	0.26
1-octen-3-ol	1.28	18.73	8.50	18.73	1.61	10.70	1.81	2.32
2-pentylfuran	4.32	3.09	0.06	3.09	0.02	2.50	3.17	3.14
2-nonanone	0.00	4.49	8.23	4.49	2.24	8.38	1.40	2.81
linalool	2.22	14.43	0.75	14.43	0.00	10.92	0.00	0.00
nonanal	2.69	4.33	3.64	4.33	0.00	2.75	0.20	0.27

a: Average of relative percentage of peak area(%) = peak area of each compound / peak area of internal standard^b(50 μ l of 500ppm 1-Dodecanol) \times 100.

2. 대두의 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 비휘발성 유기산 분석

가. 재료 및 방법

1) 비휘발성 유기산 성분의 추출법 확립

20종의 유산균 중 두유에서 가장 빠르게 커드를 형성하는 L14 균주를 이용하여 두유배양액을 제조하였다. 두유배양액의 발효과정에서 생긴 비휘발성 성분인 유기산을 추출하기 위해 Jeniece의 방법(Hope, Prazen, Nilsson, Lidstrom & Synovec, 2005)을 일부 수정하여 사용하였다. 두유배양액 10ml과 methanol 14ml을 60ml vial에 넣어 75°C의 항온수조에서 40분 동안 평형시킨 후 상온에서 30분 냉각시켰다. 이 시료를 원심분리기 tube에 나누어 담았고, 3차 증류수 14ml과 chloroform 7ml을 함께 담아 원심분리기(10°C, 3,000rpm)로 10분간 2회 원심분리 시켰다. 이렇게 두유배양액의 비휘발성 성분이 들어있는 층과 그렇지 않은 층이 서로 분리되면 위에 있는 aqueous fraction에 비휘발성 성분이 녹아 있으므로 aqueous fraction을 분리하여 rotary evaporator에 약 25분간 용매를 증발시켜 1ml로 시료를 농축시켰다. 이것을 다시 vacuum oven에 넣어 약 24시간 동안 건조시켜 수분을 제거하였다. 최종적으로 건조된 약 1ml에 acetonitrile 400 μ l과 N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide(BSTFA) 400 μ l를 첨가하여 75°C에서 40분 동안 반응시켰다. 이것을 syringe를 사용하여 1 μ l를 취한 후 GC-MS에 주입하였다.

2) GC-MS 분석 조건

대두 원산지에 따른 두유배양액의 비휘발성 유기산 성분은 GC-MS(Gas Chromatography-Mass Spectrometry)에 의하여 분석하였다. GC-MS는 HP 5980A series II GC/HP 5972 mass selective detector(Hewlett-packard Co., USA)를 사용하였으며, column은 DB-5MS(30m length x 0.25mm i.d x 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. Oven의 온도는 80°C에서 1분간 유지시킨 후 분당 3°C씩 올려 280°C에서 1분간 유지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 200°C와 250°C이었으며, 나머지 mass selective detector의 조건은 ionization energy, 70eV; mass range, 50-550 a.m.u.; scanning rate. 1.4 scans/s와 같았다. 이동상 기체는 helium으로 유속은 0.8ml/min을 유지하고 split ratio는 30:1로 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

GC-MS에 의해 얻어진 mass spectrum은 Wiley library 275.I에 의하여 manual search한 후 그 retention index (RI)를 비교하여 동정하였다. RI는 각 성분의 동정을 위해 GC chromatogram에서 확인된 C₇-C₂₂의 alkane 표준물질의 retention time과 비교하여 구하였다. 비휘발성 유기산 성분의 정량은 동정된 peak area의 면적과 전

체 peak area를 비교하여 나타내었다. 최적화된 추출법을 이용한 두유 발효유의 휘발성 유기산 성분은 보다 정확한 정량을 위해 내부표준물질로 5000ppm농도의 1-dodecanol 0.4ml을 사용하여 상대적인 peak 면적비로 구하였다. 두유 발효유의 주요 유기산 성분으로는 lactic acid, propanoic acid, pentanoic acid, succinic acid, glutaric acid, benzenepropanoic acid, 1H-Indole-3-acetic acid, citric acid, mannoonic acid 등 9가지가 동정되었다. 이 중에서 lactic acid가 가장 많이 검출되었다. Table 7은 원료의 원산지에 따른 두유 발효유의 휘발성 향미성분을 내부표준물질에 따라 나타낸 상대적 peak 면적 결과이다. Lactic acid의 경우 미국에서 얻은 원료를 이용해서 생산된 두유 발효유에서 다른 시료에 비해 다량 검출되었다. 반면 Citric acid나 Mannoonic acid의 경우는 모든 시료에서 비슷한 양이 분석되었다.

Table 7. Relative peak areas of organic acids in fermented soymilks of different origins.

No.	Compounds	KOREA	CHINESE	AUSTRALIA	AMERICA
1	Lactic acid	4.105 ^a	5.584	4.029	6.241
2	Propanoic acid	0.013	0.028	0.007	0.009
3	Pentanoic acid	0.009	0.003	0.010	0.016
4	Succinic acid	0.048	0.090	0.085	0.120
5	Glutaric acid	0.021	0.024	0.015	0.030
6	Benzenepropanoic acid	0.026	0.015	0.020	0.022
7	1H-Indole-3-acetic acid	0.010	0.014	0.005	0.011
8	Citric acid	0.318	0.318	0.239	0.330
9	Mannoonic acid	0.003	0.004	0.001	0.003

a: Average of relative percentage of peak area(%) = peak area of each compound / peak area of internal standard^b(400 μ l of 5000ppm 1-dodecanol) \times 100.

3. 대두의 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 metabolomic profiling 의 변화

가. 재료 및 방법

1) 대사체의 효율적인 추출법

NMR을 이용한 두유배양액의 metabolome 분석을 위해서는 0.1g의 시료를 뚜껑이 있는 centrifuge tube에 옮기고 5 ml의 50% methanol 과 5ml의 chloroform을 tube에 넣었다. 30초간 vortexing한 다음 1분간 sonication(JAC ultrasonic, Kodo Co., Hwasung, Gyonggido, Korea)을 실시했다. 이후에 2,000 rpm에서 20분간 centrifugation (Hanil SME Co., Siheung, Gyonggido, Korea)을 수행했다. 이와 같은 방법으로 2회 반복하여 추출하고, aqueous 와 organic fraction을 나누어서 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan)에서 증발농축시켜 완전히 건조된 fraction 들은 1ml의 deuterium solvent(D₂O 또는 CDCl₃)에 용해시켰다.

2) NMR 분석용 용매(D₂O, CDCl₃, MeOD)조건 및 가동조건

모든 NMR spectra는 Bruker (Billerica, MA) Avance-600 NMR spectrometer을 이용하여 측정했다. 각각의 sample들에 대해서 128scan을 기본으로 하여 0.126/point, pulse width (PW)=30° (4.0 us), 그리고 relaxation delay (RD)=0.3 Hz로 설정하여 측정했다. 각각의 spectra들은 organic fraction에 대해서는 CHCl₃ peak를 7.26ppm으로 설정하고, aqueous fraction에 대해서는 trimethyl silane propionic acid (TSP, 0.01%, w/v)를 기준으로 설정했다. aqueous fraction의 NMR 분석용 용매 조건은 pH 변화에 따른 metabolome peak의 미세한 변화를 방지하기 위하여 KH₂PO₄로 buffering이 되면서 pH가 6.0으로 조절된 D₂O를 용매로 사용하였고 organic fraction의 NMR 분석용 용매 조건은 CDCl₃를 단독으로 사용했을 때가 MeOD와 혼합하여 사용한 경우와 비교해서 더 많은 peak들을 나타내었기 때문에 organic fraction 분석을 위한 NMR 용매로 CDCl₃를 단독으로 사용하기로 했다.

3) NMR 가동조건

NMR scan 수는 scan 수가 증가함에 따라 signal to noise ratio가 증가하여서 분명한 peak pattern을 얻을 수 있었으므로 128scan 이 scan수로서 적합하다고 사료 되어 128scan 조건으로 실험을 수행하였다.

4) 다변량 변수 분석

¹H-NMR spectra는 Amix(version 3.7, Bruker Biospin) 프로그램을 이용하여서 ASCII file의 형태로 축소하고 0ppm부터 10ppm까지의 data들이 0.04ppm 간격으로 bucketing됐다. aqueous fraction의 경우에는 물peak들로 생각되는 4.6-4.9 ppm의 data들은 제외하고 organic fraction의 경우에는 7.1-7.5 ppm의 data들이 PCA(principal component analysis)분석에서 제외했다. PCA는 SIMCA(Umetrics, Sweden)을 이용하여 수행하였다.

5) Free-radical scavenging activity 분석

Free-radical scavenging activity 분석을 위하여 추출되어진 sample에 무수 ethanol에 녹인 DPPH 시약(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)을 1:19 비율로 섞은 후 30분간 37도에서 반응시킨다. 반응이 끝난 후, 얼음에 넣어 반응을 정지시키고, UV spectrometer(Genius pro, Tecan Co., zurich, switzerland) 492nm에서 측정한다. 샘플의 농도는 50, 25, 12.5 mg/mL로 희석시켜 실험하였고, 대조군은 ascorbic acid로 사용하였다.

6) Total phenolic 분석

Free-radical scavenging activity 분석을 위하여 추출되어진 sample을 사용하였다. 1.5 mL UV cuvettes에 D.W. 520ul와 sample 40ul를 넣고 vortexing했다. Folin & Ciocalteu's phenol reagent 를 40ul 더 첨가시키고, mix 한 후 6분간 정치시켰다. 정치 후 7% Na₂CO₃ solution 400ul를 첨가한 후 실온에서 90분간 방치시켰다. UV 750nm에서 absorbance를 측정한다. 샘플의 농도는 50, 25, 12.5 mg/mL로 희석 시켜 실험하였고, 대조군은 gallic acid로 사용하였다.

7) Total flavonoid 분석

Free-radical scavenging activity 분석을 위하여 추출되어진 sample을 사용하였다. 1.5mL UV cuvettes에 D.W. 400ul 와 sample 100ul, 5% NaNO₂ 60ul를 넣고 vortexing 후 5분간 정치시켰다. 10% AlCl₃ 를 60ul 더 첨가시키고, 6분간 방치했다. 방치 후 200ul의 1M NaOH와 D.W 240ul 를 첨가한 후 vortexing하고 즉시, UV 510nm에서 absorbance를 측정한다. 샘플의 농도는 50, 25, 12.5 mg/mL로 희석시켜 실험하였고, 대조군은 catechin을 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 원산지별 두유원액 및 두유배양액 metabolomic profile

Fig. 2는 원산지별 두유배양액의 ¹H NMR 분석 결과를 대표적인 다변량 통계분석법의 하나인 주성분분석법에 의하여 분석한 결과이다. Fig. 2에서 확인할 수 있는 바와 같이 NMR 분석에 의한 metabolome변화를 분석한 결과, 동일 원산지 별로 metabolome의 차이가 크지 않아서 plot 들이 모여 있음을 알 수 있었다. 그러나 각각의 원산지별 대두를 동일조건으로 배양하면 metabolome의 차이가 발생하여 한국산과 중국산 두유배양액의 metabolome이 유사하였고, 상대적으로 미국과 호주산 두유배양액의 metabolomic profile 차이가 컸음을 알 수 있다.

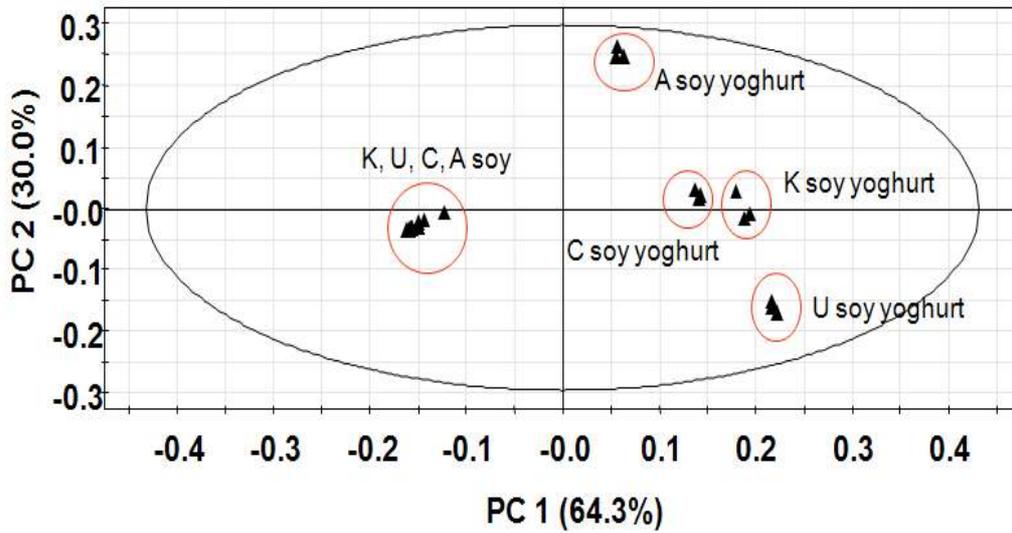


Fig. 2. Score plot of metabolomic profiling in soy yogurts at different origin using principal component analysis.(K : Korea, C : China, A : Australia, U : U.S.A.)

2) lactic acid peak 제외한 원산지별 두유원액 및 두유배양액 metabolome profiling

대두 발효유 peak assignment 결과 lactic acid peak가 큰 비중을 차지하는 것을 알 수 있었다. 주성분 PC1이 78%가 분석에 기여하였다. Lactic acid를 제외한 원산지별 두유원액, 두유배양액의 metabolome 변화를 분석한 결과는 Fig. 3에서 볼 수 있다. 원산지 별로 국산, 중국산, 미국산 두유원액의 metabolome의 차이가 크지 않음을 볼 수 있었고, 이에 반해 호주산 두유배양액의 metabolome profiling은 세 국가에 비해 차이가 컸고, 두유배양액의 metabolome은 한국산, 중국산, 미국산의 plot들이 모여 있음을 알 수 있었다.

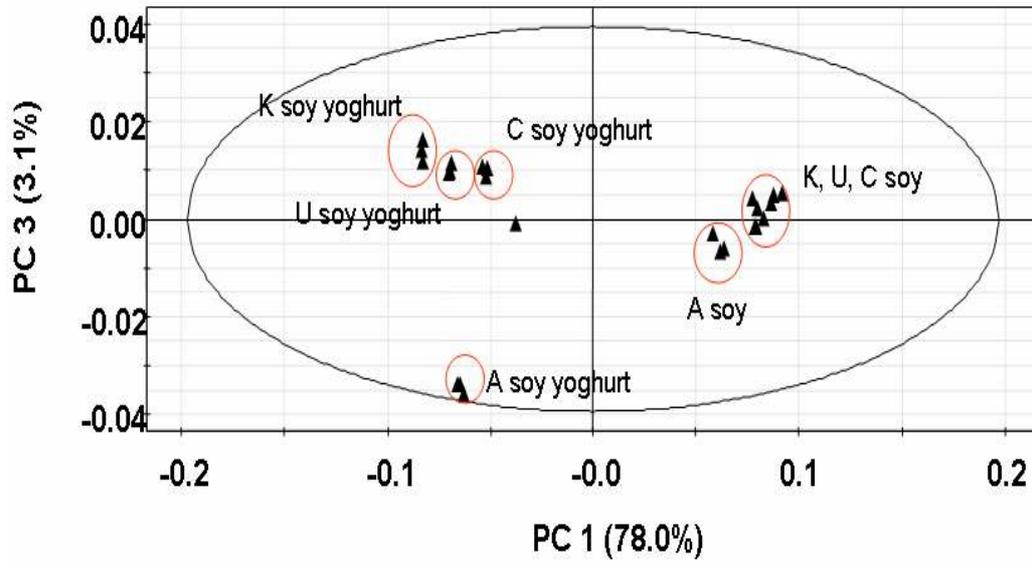


Fig. 3. Score plot of metabolomic profiling in soy yogurts except for lactic acid at different origin using principal component analysis.(K : Korea, C : China, A : Australia, U : U.S.A.)

3) 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 free-radical scavenging activity

Fig. 4는 원산지별 두유원액(a) 및 두유배양액(b)을 50, 25g/L 농도로 free-radical scavenging activity를 본 결과이다. 두유원액의 경우 농도 50g/L에서 호주산이 우수한 free-radical scavenging activity를 나타내는 것을 볼 수 있었다. 반면, 농도 25g/L일 때는 국산 두유원액에서 우수한 항산화 활성을 보였다. 두유배양액은 농도 50g/L일 때, 국산 배양액이 우수한 free-radical scavenging activity를 나타내었고, 농도 25g/L에서는 원산지별로 항산화 효과의 차이가 크지 않음을 알 수 있었다.

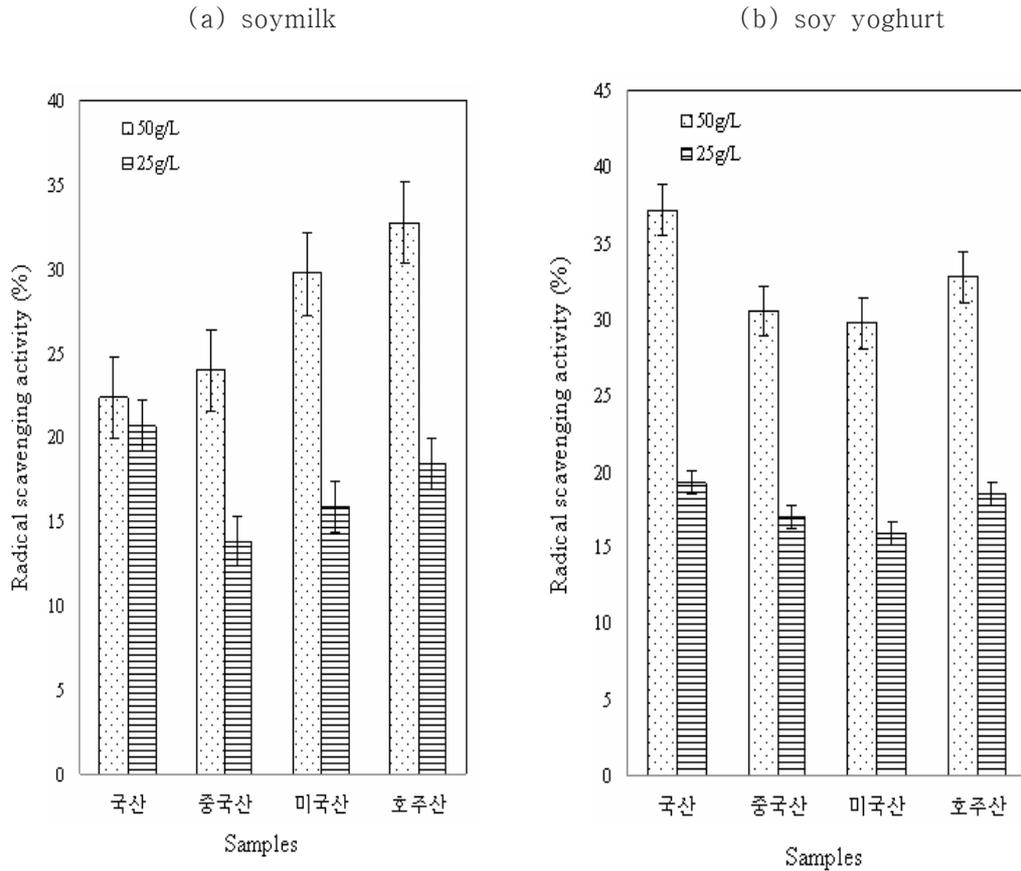


Fig. 4. Free-radical scavenging activities at different origins.

4) 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 total phenolics 분석

원산지별 두유원액(a), 두유배양액(b)의 total phenolics 함량을 분석한 결과는 Fig. 5에서 볼 수 있다. 두유원액, 두유배양액을 50% methanol로 추출한 시료를 50, 25g/L농도에서 원산지별 대두의 phenolic 함량을 조사한 결과, 중국산 두유원액이 높게 나타났다. 두유배양액의 경우 Fig. 5(b)와 같이 농도50 g/L에서 국산과 호주산 두유배양액의 phenolics 함량이 높은 것으로 보였다.

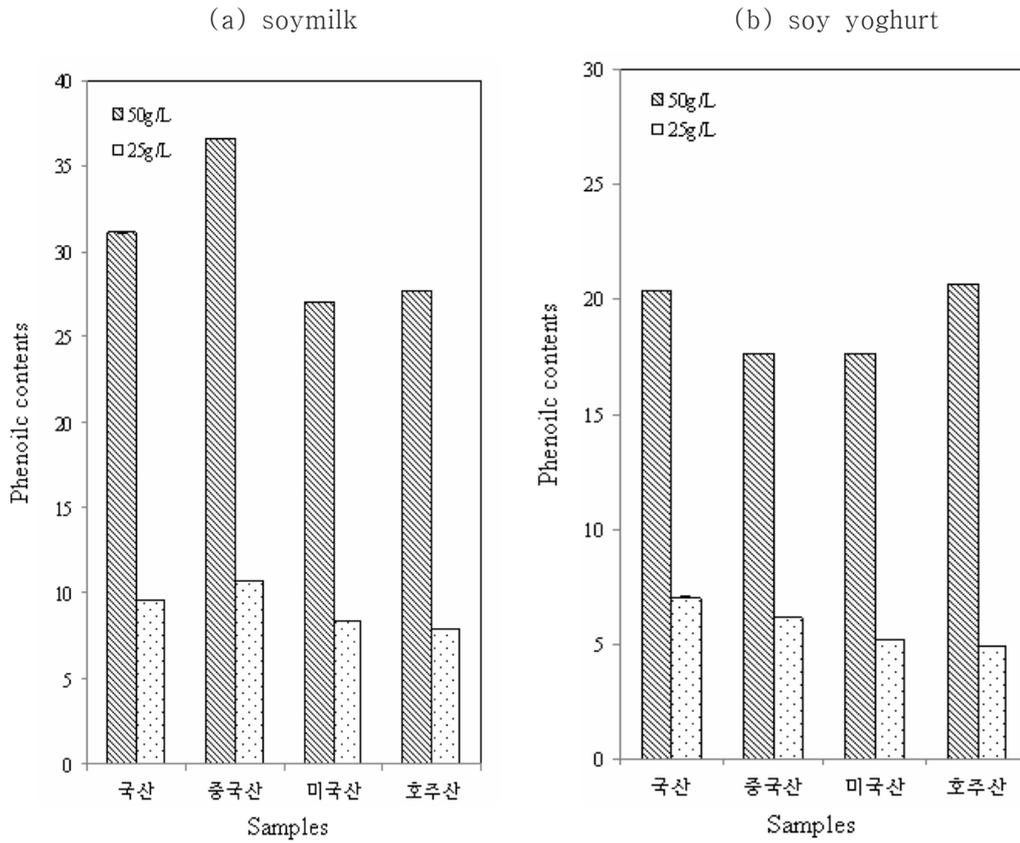


Fig. 5. Total phenolic contents at different origins.

5) 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 total flavonoid 분석

원산지별 두유원액(a), 대두 발효유 (b)의 total flavonoid를 분석한 결과는 Fig. 6에서 볼 수 있다. 농도 50, 25g/L농도에서 두유원액의 flavonoid 함량은 호주산 두유원액의 flavonoid 함량이 높아, 국산, 중국산, 미국산의 두유원액과 유의적인 차이를 보였다. 두유배양액은 두유원액보다 flavonoid 함량이 약 3배정도 높았다. 국산과 호주산 두유배양액의 flavonoid 함량이 높았고, 미국산 두유배양액의 함량이 가장 낮음을 알 수 있었다.

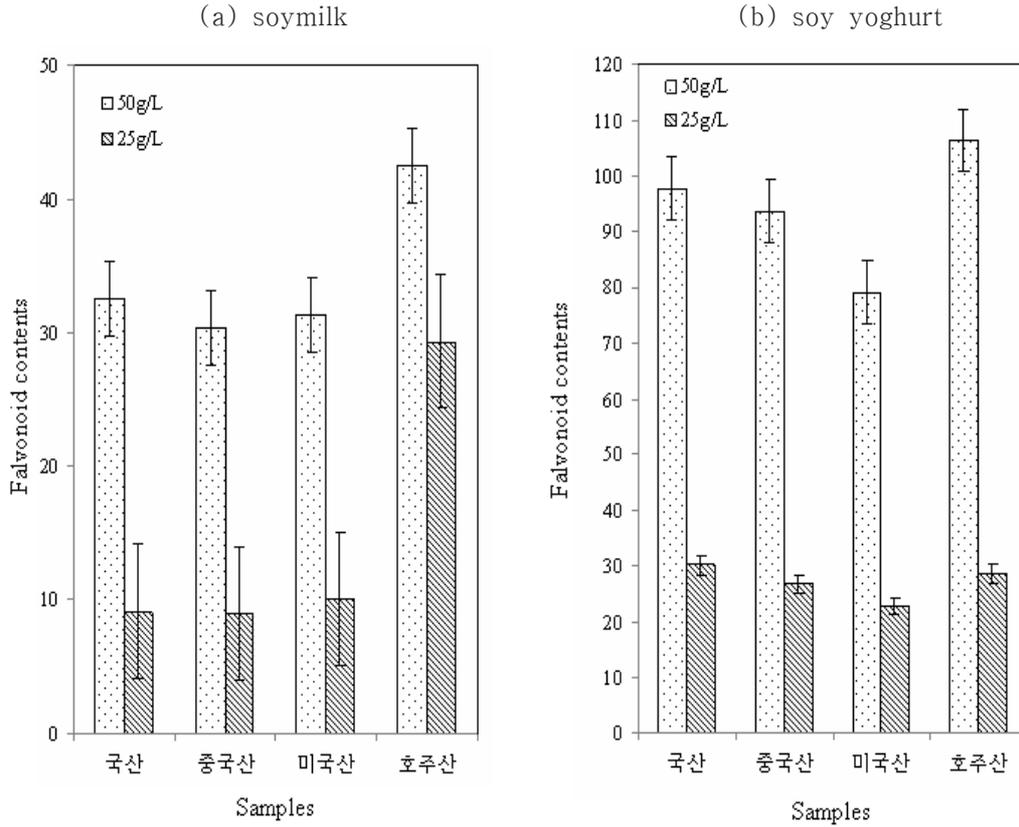


Fig. 6. Total flavonoid contents at different origins.

4. 대두의 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 이소플라본 분석

가. 재료 및 방법

시료 1g에 internal standard solution 0.1g을 넣고 acetonitril 7ml, 3차 증류수 3ml, 0.1N HCL 2ml을 첨가하여 vortexing한 후 Shaker를 사용하여 1시간 동안 교반시켰다. 그리고 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 여과지로 거른 후 여액을 1ml 취하여 10 ml 시료병에 넣고 질소를 불어 넣어 용매를 제거했다. 용매가 제거되면 1ml 메탄올을 첨가하여 녹인 후 실린지 필터(Acrodisc, CR PTEE 0.2 μ m, 25mm syringe filter filtering)로 여과하여 HPLC 분석을 시행하였다.

HPLC	Hitachi
Column	Waters Nova-Pak C18 4 μ m 3.9x150mm (reverse phase)
Mobile phase	Solvent A(1% acetic acid in water) Solvent B(100% acetonitrile)
Detector	L-2400 UV
Flow rate	0.6 ml/min

나. 결과 및 고찰

대두 원산지별 두유원액 및 두유배양액의 총 이소플라본 함량을 분석한 결과 호주산과 미국산이 중국산과 국산에 비해 상대적으로 높게 분석되었다.

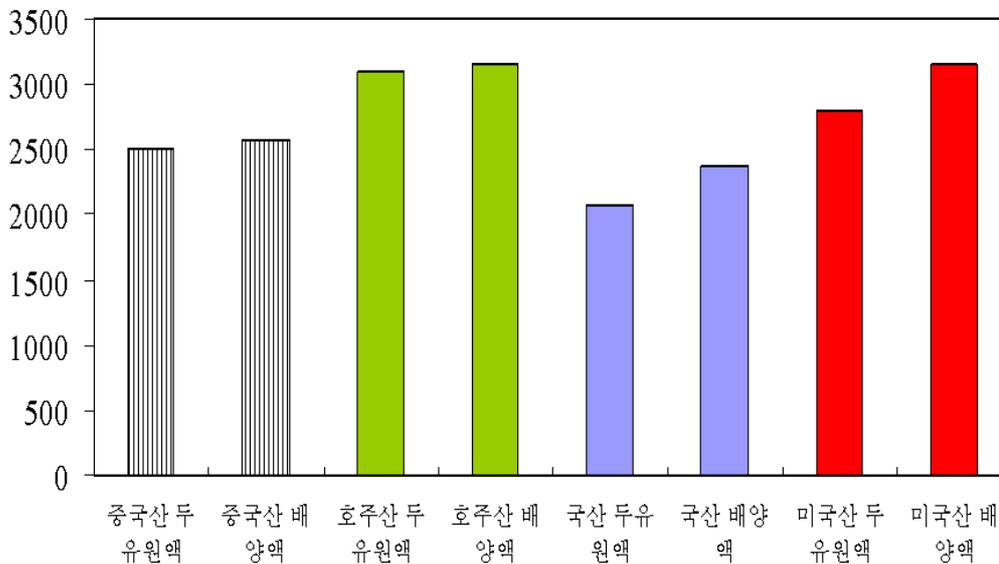


Fig. 7. The relative contents of total isoflavones at different origins.

제 3 절 1차 선발된 20종 유산균주의 이취성분 및 생리활성분 분석

1. 1차 선발된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 휘발성 향미성분 분석

가. 재료 및 방법

1) 두유배양액의 휘발성 향미성분, 이취성분 추출법 확립

두유원액과 20종 두유배양액의 휘발성 향미성분을 추출하기 위해서 SPME를 이용하였고, Carboxen-Polydimethylsiloxane(Carboxen-PDMS 75 μ m) fiber를 사용하였다. 시료는 3 $^{\circ}$ C에서 보관하고 실험을 수행하기 30분전에 상온에 꺼내놓았다. 시간이 경과한 후 시료를 60ml-vial에 20ml을 넣고, NaCl 2.00g과 내부표준물질로 1%(w/v in methyl chloride)의 geraniol을 3.3 μ g 첨가한 뒤 60 $^{\circ}$ C에서 45분 동안 평형상태에서 유지시킨 후 SPME fiber를 삽입하고 30분 동안 휘발성 향미성분들을 흡착하였다.

2) GC-FID 분석 조건

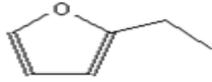
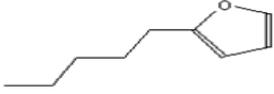
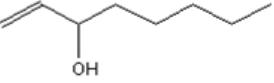
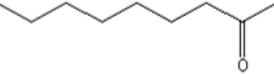
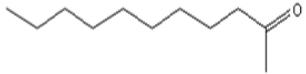
두유원액과 두유배양액의 휘발성 향미성분을 정량하기 위해 GC(HP 6890 series GC)에 flame ionization detector(FID)를 설치하고 fused GC capillary column DB-5(30m length x 0.25mm i.d. x 0.25 μ m film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)가 사용되었다. Oven의 온도는 50 $^{\circ}$ C에서 6분간 유지시킨 후, 분당 7 $^{\circ}$ C씩 올려 200 $^{\circ}$ C에서 다시 10분간 유지시켰다. Injector와 detector의 온도는 각각 200 $^{\circ}$ C와 250 $^{\circ}$ C 이었으며, 이동상 기체는 helium으로 유속은 0.8ml/min을 유지하고, splitless mode를 사용하였다. SPME fiber에 흡착된 휘발성 향미성분은 액체 질소에 injector 부분의 column 일부를 담그는 방식의 cryo-focusing 법을 적용하여 200 $^{\circ}$ C에서 5분간 탈착하였다.

나. 결과 및 고찰

예비 실험에서 두유 원액 및 두유 발효유에서 분석대상 이취성분으로 8종을 선정하였고, 이들의 구조, 역치값 및 관능적 향 특성은 Table 8에 나타내었다. 1-octen-3-ol은 두유 제조의 전처리 과정으로서 물에 콩을 침지하는 중에 생성된다고 보고 되어 있다. 두유의 가장 일반적인 생성물인 2-pentylfuran은 2-alkylfuran이 alkoxyradical로부터 vinyl hydroperoxide를 경유하여 만들어지는데, 이는 산화된 linoleic acid가 C₉ hydroperoxide를 거쳐서 유도되어진다고 하였다. 각 휘발성 향미성분이 가지고 있는 역치값이 낮을수록 그 시료에 대한 영향력이 크기 때문에 odor

activity value 고려한 결과, 두유발효유과 두유원액에서 분석한 휘발성 향미성분들 중 2-ethylfuran, 2-pentylfuran, n-hexanal, 1-octen-3-ol의 영향이 상대적으로 큰 것으로 분석하였고, 콩 비린내는 역치값이 낮은 화합물과 관계가 깊다고 보고 되었다.

Table 8. Major off-odorants in fermented soymilks extracted by SPME(CAR/PDMS).

Major compounds	structure	Threshold ^a (in water mg/kg)	Odor description ^b
2-ethylfuran		-	sweet like coffee
2-pentylfuran		0.006	Buttery, green bean-like
n-hexanal		0.005	Cut grass, tallowy, leaf-like
2-heptanone		0.14	Soapy, fruity
1-octen-3-ol		0.001~0.0014	Earthy, Mushroom-like
2-nonanone		0.04	Cucumber
2-undecanone		0.007	Orange oily
benzaldehyde		0.35	Cherry-like

a: L.J. van Gemert. Comilation of odour threshold value in air and water(1999). TNO Nutrition and Food Research Institute, published by Boelens aroma chemical information service.

b: FENAROLI's Handbook of flavor ingredients (5th edition).

Table 9는 두유원액을 비롯한 두유배양액 20종류 시료의 휘발성 향미성분 및 이취성분의 주요 compounds를 비교한 relative peak area 결과를 나타낸 것이다. L-6, L-14, L-73, S-12, S-16 등의 이취성분들이 상대적으로 적은 것으로 분석되었다. 또 B-12는 L-14에 비하여 2-ethylfuran의 성분이 많이 검출되었다. 8종류의 이취성분 중 대체적으로 2-nonanone의 양이 적었으며, 1-octen-3-ol, 2-pentylfuran, benzaldehyde의 양이 많았다.

Table 9. Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilks extracted by SPME(CAR/PDMS).

시료	2-ethylfuran	2-pentylfuran	hexanal	2-heptanone	1-octen-3-ol	2-nonanone	2-undecanone	benzaldehyde
B-12	65.05 ^a	17.20	2.720	1.92	13.92	1.16	7.04	22.12
B-16	63.13	26.58	27.63	3.15	28.54	3.78	5.12	12.02
B-18	28.11	18.13	2.93	2.89	13.61	3.78	4.97	9.14
B-19	13.34	20.23	0.96	2.42	27.65	3.67	4.70	20.48
B-21	22.79	22.65	4.40	3.14	49.67	4.50	4.62	6.58
B-22	47.30	23.57	10.32	1.44	23.01	3.42	4.66	6.17
B-34	10.20	30.48	1.36	1.66	144.91	2.67	4.87	12.42
B-62	13.04	23.95	1.15	2.58	47.69	5.16	5.59	10.76
L-6	28.23	19.96	6.84	3.87	16.94	1.47	4.52	26.18
L-14	2.01	18.34	2.02	22.45	15.18	23.45	3.97	7.74
L-22	5.71	37.64	10.48	62.87	50.36	81.95	4.47	20.20
L-23	7.87	23.96	15.47	31.40	32.16	49.75	11.72	26.48
L-58	4.46	48.27	1.94	10.99	50.96	2.65	5.06	23.06
L-69	22.09	26.83	7.56	1.65	42.52	1.17	4.30	5.13
L-73	8.81	20.09	3.44	2.70	15.02	1.67	5.62	9.38
S-5	13.12	21.26	1.34	3.96	21.22	4.01	4.59	8.50
S-8	7.43	24.12	4.83	6.77	32.78	13.65	5.11	8.85
S-11	55.34	1.89	22.27	3.35	23.67	4.46	4.84	12.37
S-12	8.99	16.16	2.99	4.96	23.78	6.51	4.52	7.65
S-16	15.41	21.80	3.77	3.05	26.28	5.95	5.14	23.32
두유 원액	-	37.38	5.80	0.73	31.07	-	0.51	9.12

a: Average of relative percentage of peak area(%) = peak area of each compound / peak area of internal standard^b(3.3 μ g of 1% Geraniol) \times 100.

2. 1차 선별된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 지방산 분석 및 Lipoxygenase 활성도

가. 재료 및 방법

1) 조지방 추출

동결 건조된 두유발효유 시료 5-10 g을 정량하여 soxhlet(속시렛)장치에 넣은 후 150 mL의 n-hexane을 추출용매로 하여 물로 중탕하면서 2-3시간 동안 조지방을 추출하였다. 추출된 조지방은 50°C의 hot plate에서 질소가스를 이용하여 용매를 제거하였고 농축된 조지방의 무게를 측정하여 조지방 함량을 계산하였다.

2) 지방산 분석

lipid 100 mg 을 20 mL bottle에 넣고 0.5N NaOH 4 mL와 섞는다. 끓는 물에서 10분간 중탕한 후 냉각하여 중성지방을 지방산과 글리세롤로 분해시켰다(Saponification과정). 14% BF₃ (boron trifluoride) 4 ml를 섞어 끓는 물에서 5분간 중탕한 후 냉각하여 지방산 말단에 methyl 그룹을 ester결합 시킨다(methyl esterification과정). 여기서 methyl 그룹은 용매로서 존재하고, BF₃는 이 반응의 촉매 역할을 한다. FAME(fatty acid methyl est) 이외의 물질과 결합하여 염을 형성하고 침전시키기 위하여 saturated NaCl 6 mL를 섞어주었고 FAME를 추출하기 위하여 n-hexane 3 mL를 섞어서 분리될 때까지 기다린다. 빈 bottle에 수분을 제거하기 위해서 sodium thiosulfate anhydride를 bottle바닥에 깔릴 정도로 넣어 주고, 위에서 만든 상층액을 넣는다. 탈수 반응을 30초 이상 지속시켜준 후 액체부분만 회수하여 GC분석을 시행하였다.

GC	HP 5890 plus
Column	DB-23 (60 m, 0.25 mm, 0.25 μ m)
Oven	100°C 1min (initial time) to 195°C (rate 1: 15°C/min) to 210°C (rate 2: 1°C/min) to 240°C (rate 3: 5°C/min) 7.5 m
Injector	260°C
Detector	FID, 260°C

두유원액(Control)을 포함하여 21종의 시료들의 지방산을 분석한 결과 시료 간에 일부 지방산의 유의적인 차이는 있었으나 전체적으로 큰 차이는 보이지 않았고 (Table 10, 11), 포화지방산에 대한 불포화지방산의 비(u/s)는 control이 6.3이었고 평균적으로 Lactobacilli는 6.3, Bifidobacteria는 6.1, Streptococci는 5.9였다. Lipoxigenase 활성도 측정 결과 21종의 시료 중 유의적인 차이를 보인 시료는 없었고 그 차이는 두유원액 제조 시 열처리 공정에 의한 효소활성도 저해로 판단되었다.

Table 10. Fatty acid compositions from fermented soymilks.

시료	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0	USFA	SFA	u/s
L-6	9.69	3.29	22.00	54.18	9.93	0.30	0.18	0.43	86.3	13.7	6.3
L-14	9.71	3.24	21.74	54.36	10.06	0.30	0.18	0.43	86.3	13.7	6.3
L-22	9.70	3.24	21.67	54.40	10.08	0.29	0.18	0.43	86.3	13.7	6.3
L-23	9.70	3.27	21.78	54.30	10.05	0.30	0.18	0.43	86.3	13.7	6.3
L-58	9.67	3.25	21.88	54.29	10.01	0.29	0.18	0.43	86.4	13.6	6.3
L-69	9.66	3.27	21.92	54.22	10.00	0.30	0.18	0.43	86.3	13.7	6.3
L-73	9.70	3.35	22.17	54.01	9.84	0.31	0.18	0.46	86.2	13.8	6.2
B-12	9.81	3.61	22.62	53.59	9.37	0.33	0.23	0.44	85.8	14.2	6.0
B-16	9.64	3.34	22.16	54.17	9.77	0.31	0.18	0.43	86.3	13.7	6.3
B-18	9.65	3.30	22.21	54.09	9.84	0.30	0.19	0.43	86.3	13.7	6.3
B-19	9.80	3.64	22.69	53.51	9.34	0.34	0.23	0.45	85.8	14.2	6.0
B-21	9.78	3.61	22.71	53.56	9.34	0.33	0.22	0.45	85.8	14.2	6.1
B-22	9.82	3.85	23.51	53.06	8.76	0.34	0.22	0.44	85.6	14.2	5.9
B-34	9.67	3.30	21.85	54.31	9.95	0.30	0.18	0.43	86.3	13.7	6.3
B-62	9.78	3.80	23.34	53.23	8.86	0.34	0.22	0.44	85.6	14.4	6.0
S-5	9.92	3.71	22.71	53.41	9.25	0.33	0.22	0.45	85.6	14.4	5.9
S-8	9.83	3.80	23.08	53.27	9.01	0.34	0.22	0.45	85.6	14.4	5.9
S-11	9.82	3.79	23.29	53.17	8.93	0.34	0.21	0.44	85.6	14.4	5.9
S-12	9.95	3.75	22.77	53.33	9.19	0.34	0.22	0.45	85.5	14.5	5.9
S-16	9.91	3.69	22.69	53.48	9.23	0.33	0.22	0.44	85.6	14.4	6.0
Control	9.66	3.30	21.85	54.30	9.93	0.31	0.23	0.43	86.3	13.7	6.3

Table 11. Fatty acid contents of freeze dried samples.

시 료	mg fatty acid / g sample	시 료	mg fatty acid / g sample
L-6	173	B-22	165
L-14	189	B-34	190
L-22	194	B-62	175
L-23	169	S-5	162
L-58	172	S-8	172
L-69	224	S-11	162
L-73	199	S-12	167
B-12	190	S-16	159
B-16	189	Control	197
B-18	204		
B-19	202		
B-21	205		

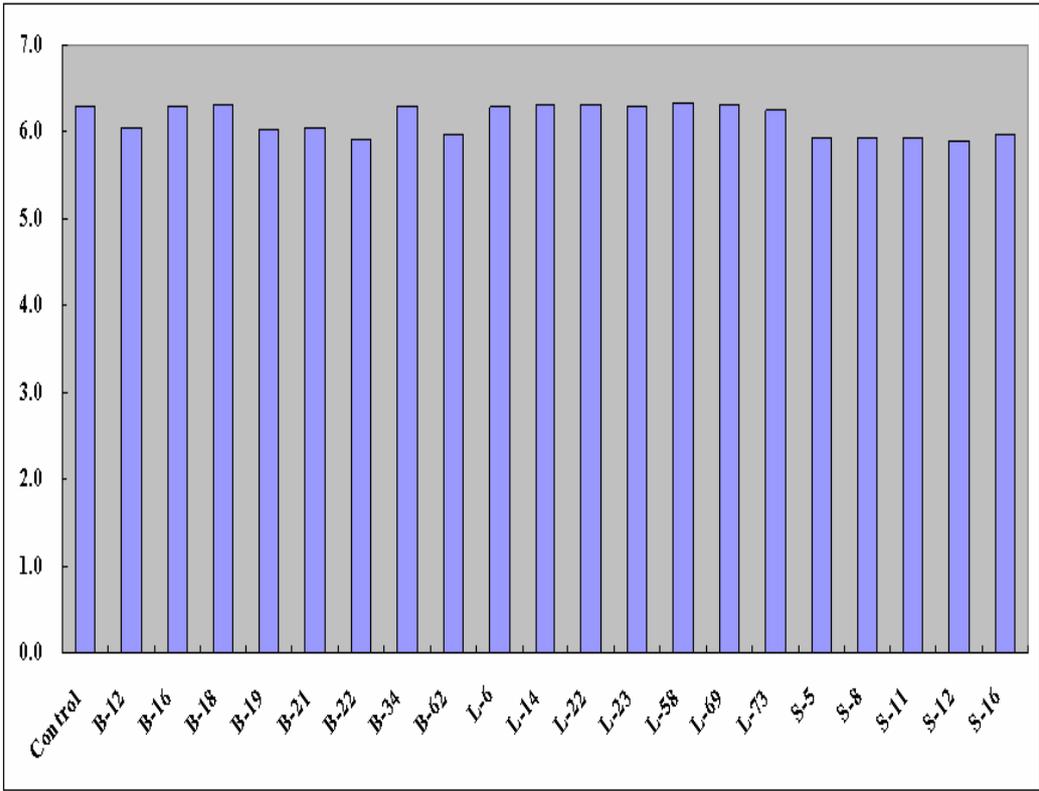


Fig. 8. USFA/SFA ratio from fermented soymilks.

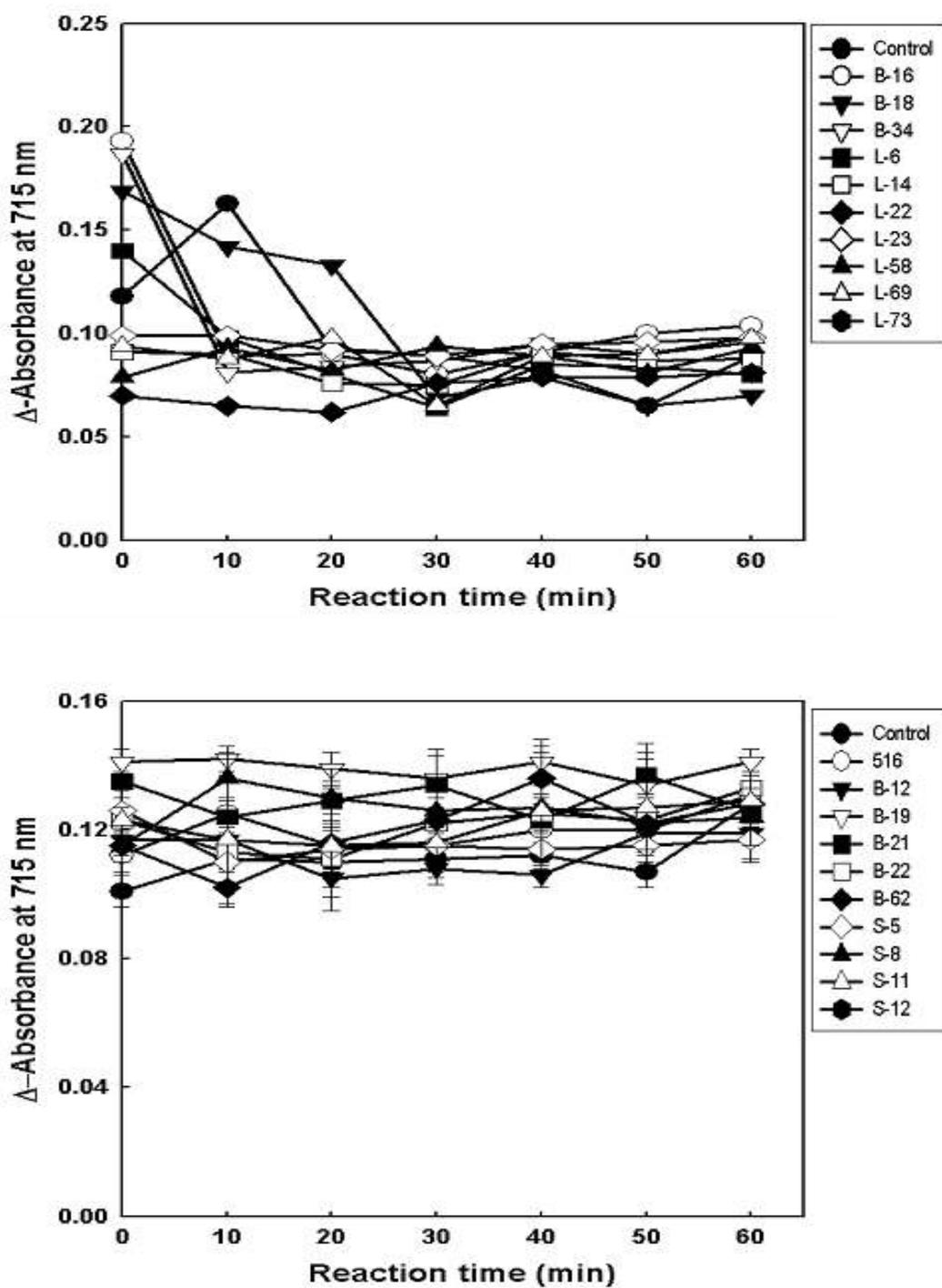


Fig. 9. Lipoxygenase activity from fermented soymilks.

3. 1차 선별된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 이소플라본 분석

가. 재료 및 방법

시료 1g에 internal standard solution 0.1g을 넣고 acetonitril 7ml, 3차 증류수 3ml, 0.1N HCL 2ml을 첨가하여 vortexing한 후 Shaker를 사용하여 1시간 동안 교반 시켰다. 그리고 5000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 여과지로 거른 후 여액을 1ml 취하여 10 ml 시료병에 넣고 질소를 불어 넣어 용매를 제거했다. 용매가 제거되면 1ml 메탄올을 첨가하여 녹인 후 시린지 필터(Acrodisc, CR PTEE 0.2 μ m, 25mm syringe filter filtering)로 여과하여 HPLC 분석을 시행하였다.

HPLC	Hitachi
Column	Waters Nova-Pak C18 4 μ m 3.9x150mm (reverse phase)
Mobile phase	Solvent A(1% acetic acid in water) Solvent B(100% acetonitrile)
Detector	L-2400 UV
Flow rate	0.6 ml/min

나. 결과 및 고찰

두유배양액 시료의 이소플라본을 분석한 결과 전체 이소플라본 함량은 Lactobacilli와 control이 가장 높게 나왔고 Bifidobacteria와 Streptococci는 전체적으로 큰 차이가 없었다(Fig. 10). 발효과정 시 β -glucoside와 aglycones로 전환된 상대 비교 결과 Lactobacilli는 aglycones보다 β -glucoside 비율이 매우 높았고, Bifidobacteria와 Streptococci는 aglycones 비율이 매우 높았다. 특히 B-34 시료는 발효에 의하여 aglycones로 거의 100% 전환되었다.(Fig. 11)

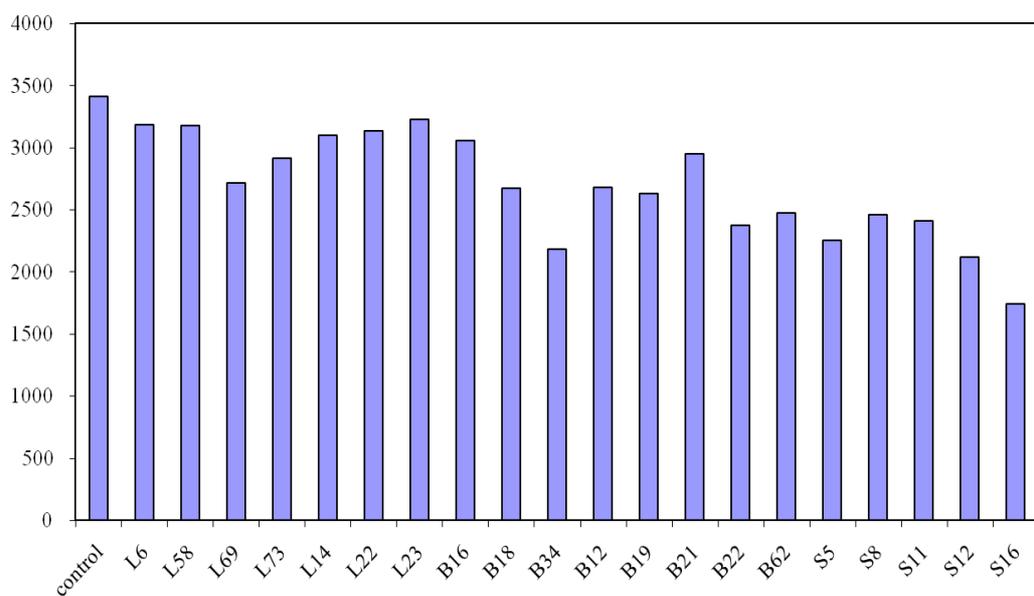


Fig. 10. Total isoflavones from fermented soymilks(ug/g).

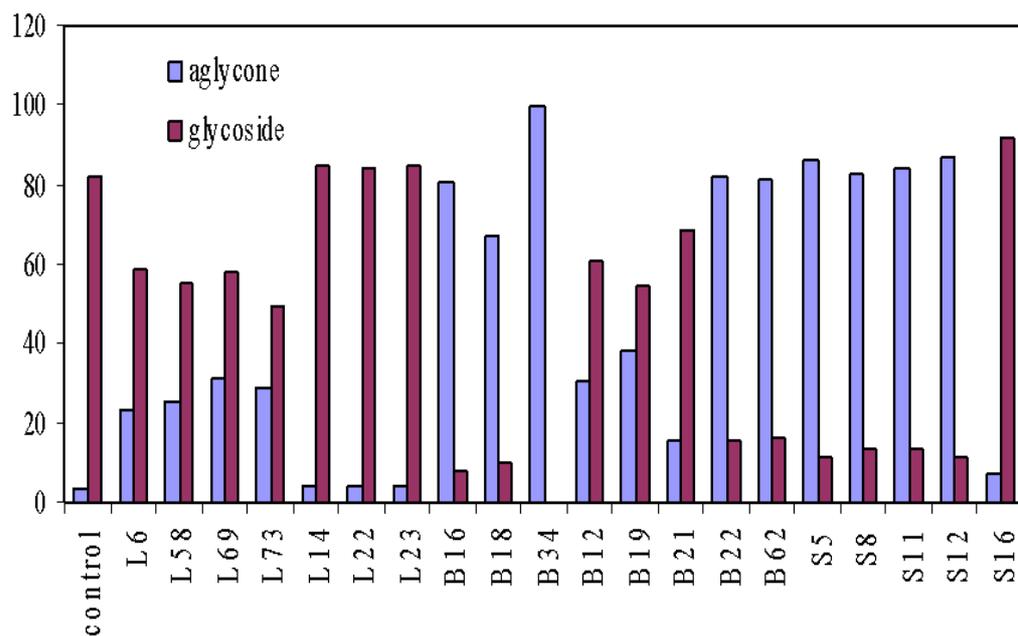


Fig. 11. Comparisons of aglycones and β -glucosides from fermented soymilk.

4. 1차 선별된 20종 유산균주로 제조한 두유배양액의 항산화 활성

가. 재료 및 방법

1) 시료로 사용된 균 종류별 대두 발효유, 원산지별 대두 원액, 대두 발효유와 발효시기별 vitamin A, C, E 첨가 및 무첨가 대두 발효유, 질소충전 대두 원액, 대두 발효유는 매일유업으로부터 제공받았다. NMR 측정을 위해 chloroform, methanol, potassium phosphate monobasic은 Daejung Chemical Co. (Siheung, Gyonggido, Korea)에서 구입하였고, deuterium oxide는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St, Louis, MO, USA), sodium deuterioxide, chloroform-D는 Cambridge Isotope Lab. (MA, USA)에서 구입하였다. 대두발효유의 시료 전처리는 매일유업에서 동결건조시킨 두유발효유 시료를 공급받아 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ deep freezer에 보관하면서 사용하였다. 전처리 방법으로는 시료 0.1 g을 100 mL의 50% methanol 에 넣고, 18시간 shaking시켜 추출한다. Filter paper 이용하여 filtering 후 농축하여 100 mg당 1 mL 농도로 희석시킨다.

2) Free-radical scavenging activity 분석

Free-radical scavenging activity 분석을 위하여 추출되어진 sample에 무수 ethanol에 녹인 DPPH 시약(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)을 1:19 비율로 섞은 후 30분간 37도에서 반응시킨다. 반응이 끝난 후 얼음에 넣어 반응을 정지시키고, UV spectrometer (Genios pro, Tecan Co., zurich, switzerland) 492 nm에서 측정한다. 샘플의 농도는 50, 25, 12.5mg/mL로 희석시켜 실험하였고, 대조군은 ascorbic acid로 사용하였다.

나. 결과 및 고찰

1) 두유원액 및 두유배양액 추출물의 수용성 분획물 NMR spectrum assignment

다음의 그림에서 보는 바와 같이 두유원액(Fig. 12)과 두유배양액(Fig. 13)의 수용성 분획물의 ^1H NMR 분석을 통하여 spectrum 의 peak를 assign 하였으며, lactic acid, acetic acid, citrate, choline derivatives, raffinose, stachyose, sucrose 들이 동정되었다. 이들 ^1H NMR peak 들을 이용하여 다변량 통계분석을 수행하였다.

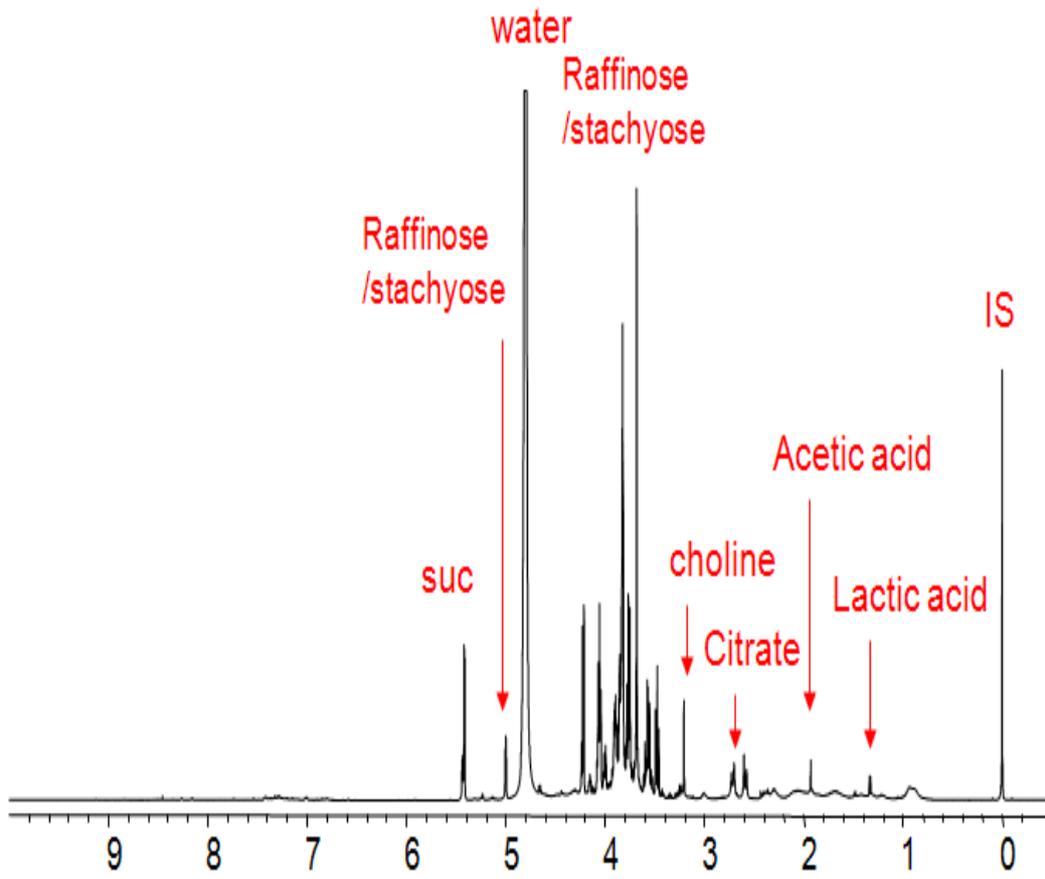


Fig. 12. ^1H NMR spectrum of soymilk extracts.

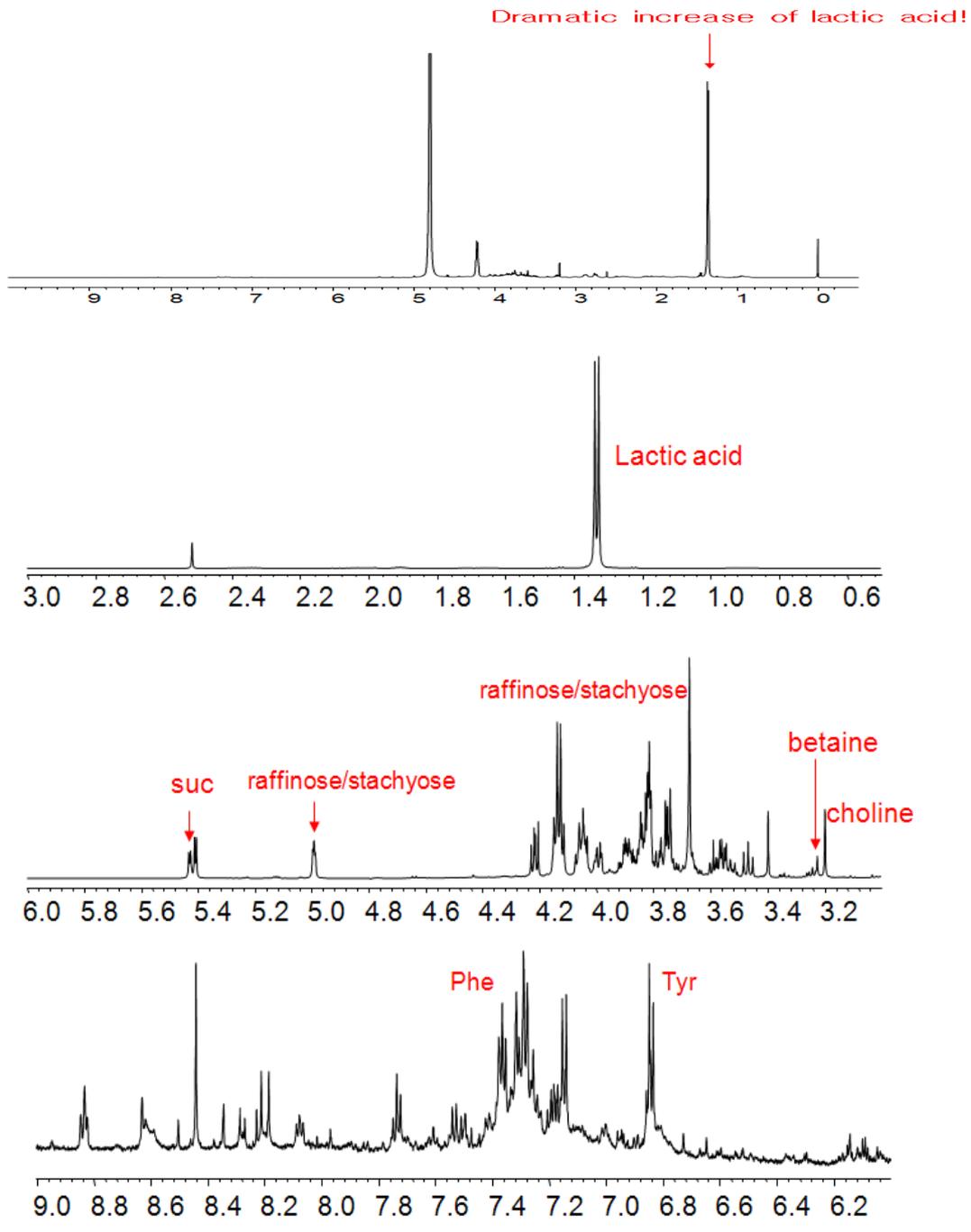


Fig. 13. ^1H NMR spectrum of fermented soymilk extracts.

2) 주성분 분석에 의한 균주별 두유배양액의 metabolomic profiling의 변화

Fig. 14는 균주별 두유배양액의 ^1H NMR 분석 결과를 대표적인 다변량 통계분석법의 하나인 주성분분석법에 의하여 분석한 결과이다. 그림에서 확인할 수 있는 바와 같이 발효시간 별로 plot 들이 모여 있었으며 그 plot들의 상대적인 거리로부터 metabolome 들의 유사성을 유추할 수 있었다. 다시 말해서 거리가 멀면 멀수록 metabolome profile들의 다름의 정도가 큼을 의미한다.

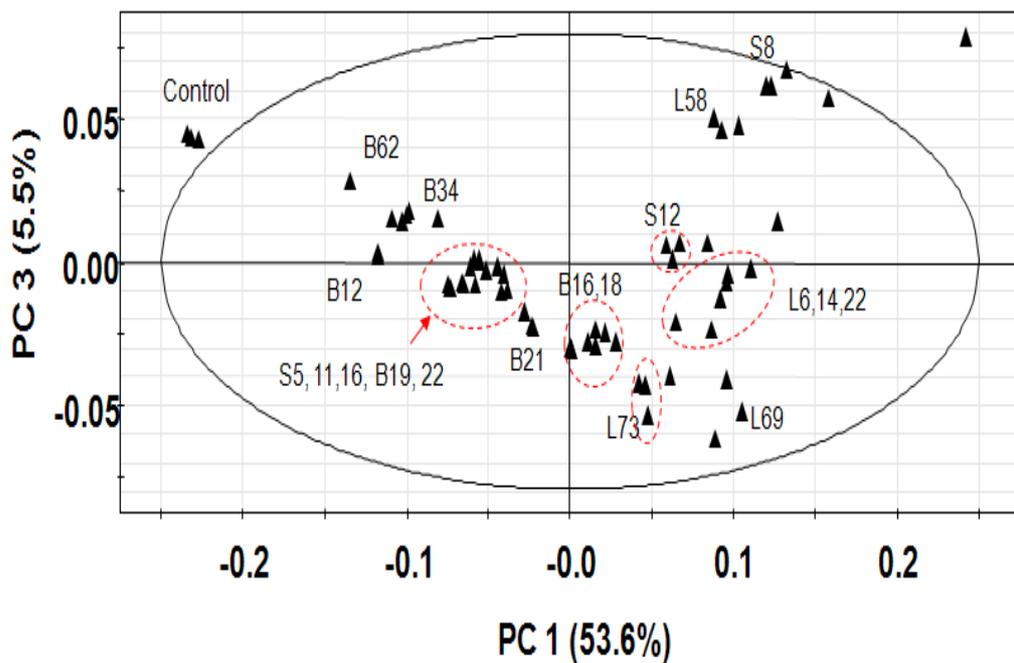


Fig. 14. Score plot of metabolomic profiling in fermented soymilks at different LAB using principal component analysis.

3) Free-radical scavenging activity

Fig. 15는 균주별 대두 발효유의 free-radical scavenging activity를 분석한 결과이다.

control을 free-radical scavenging 활성 100%로 보았을 때, B16, B18, L14, B62, S5, S12 균주 대두 발효유는 control보다 높은 활성을 보였고, L69균주 대두 발효유에서는 control보다 2배 이상 좋은 free-radical scavenging activity를 보였다.

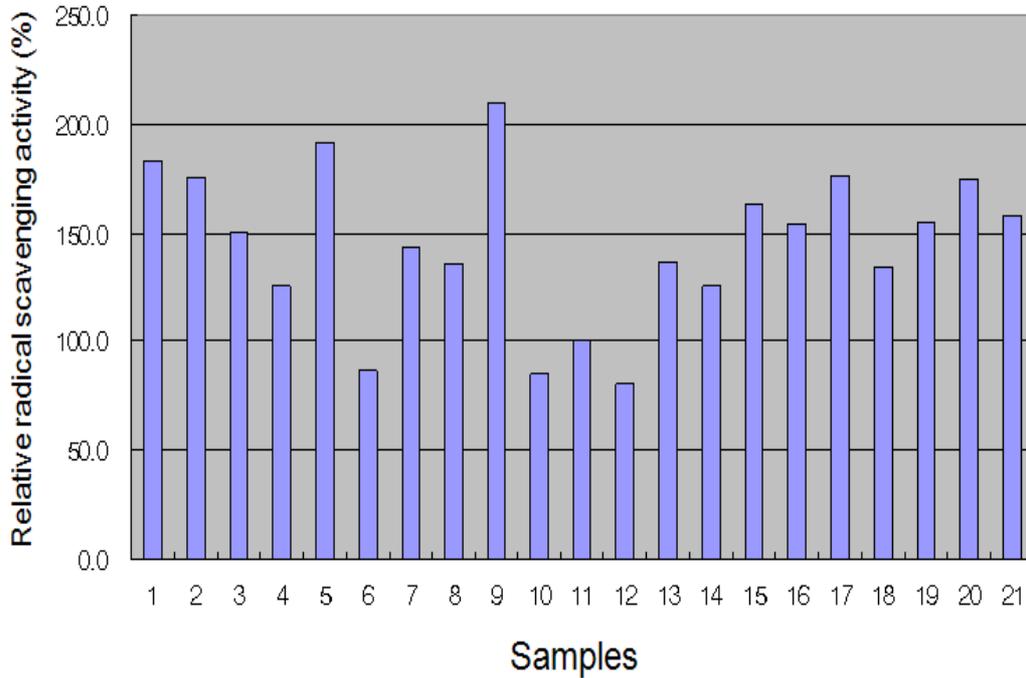


Fig. 15. Free-radical scavenging activities in fermented soymilks at different LAB.

(1: B16, 2: B18, 3: B34, 4: L6, 5: L14, 6: L22, 7: L23, 8: L58, 9: L69, 10: L73, 11: control, 12: B12, 13: B19, 14: B21, 15: B22, 16: B62, 17: S5, 18: S8, 19: S11, 20: S12, 21: S16)

5. 6종의 유산균주 2차 선발(L14, L69, B34, B62, S5, S12)

20종의 1차 선발된 유산균주로 제조한 두유배양액의 이취성분, 특히 n-hexanal 성분이 배양과정 중 저감화되고, 비배당체 이소플라본(aglycones)으로의 전환율이 높으며, 항산화 활성이 높은 기준을 토대로 Lactobacilli 2종(L14, L69), Bifidobacteria 2종(B34, B62), Streptococci 2종(S5, S12)을 2차 선발하여 복합유산균 Lac.-Bif.-St 형태로 혼합하여 두유배양액을 제조하였다. 각각의 균주를 0.3333%씩 접종하여(총 1%) 배양온도별(42°C, 37°C, 30°C)로 배양하여 최종 산도 0.60%에서 배양을 종료하고, 냉각 및 숙성 후 매일유업(주) 중앙연구소 연구원 중 패널 15명을 대상으로 관능검사를 실시하고 관능 결과는 분산분석(ANOVA), DUNCAN의 다범위 검정과 STATISTICAL CHART 1(Methods for Sensory Evaluation of Foods, Canada Dept. of Agriculture, p42~43, 1973)으로부터 통계적 유의성 검증을 실시하였다.

Table 12. The results of 1st sensory test.

SAMPLE	발효두유종미		이미, 이취			전체
	발효두유종미	산미	생콩취	플냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
42-L14B34S5	4.40±1.18(15)	4.60±1.24(15)	4.93±1.62(15)	4.40±2.13(15)	4.40±2.16(15)	4.67±1.29(15)
42-L14B34S12	3.80±1.37(15)	4.00±1.51(15)	5.67±1.91(15)	4.47±2.07(15)	4.87±2.20(15)	4.13±1.51(15)
42-L14B62S5	4.20±1.57(15)	4.53±1.25(15)	5.33±1.54(15)	4.13±2.13(15)	4.67±2.23(15)	4.87±1.25(15)
42-L14B62S12	3.87±1.60(15)	3.80±1.86(15)	5.53±2.33(15)	4.07±2.15(15)	4.73±2.25(15)	4.20±1.74(15)
SAMPLE	발효두유종미		이미, 이취			전체
	발효두유종미	산미	생콩취	플냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
42-L69B34S5	4.60±1.35(15)	4.13±1.55(15)	4.80±1.52(15)	4.93±1.83(15)	4.47±2.00(15)	4.13±1.30(15)
42-L69B34S12	4.33±1.59(15)	4.20±1.66(15)	5.20±1.70(15)	4.73±1.58(15)	4.93±2.34(15)	4.47±1.77(15)
42-L69B62S5	3.73±1.10(15)	3.67±1.59(15)	4.87±1.41(15)	5.07±1.58(15)	4.87±2.13(15)	4.20±1.42(15)
42-L69B62S12	4.40±1.55(15)	4.13±1.85(15)	5.27±2.09(15)	4.80±2.08(15)	4.53±2.07(15)	4.13±1.60(15)
SAMPLE	발효두유종미		이미, 이취			전체
	발효두유종미	산미	생콩취	플냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
37-L14B34S5	4.87±1.60(15)a	3.93±1.03(15)	4.60±1.35(15)	4.47±1.41(15)	4.27±1.62(15)	5.40±1.45(15) a**
37-L14B34S12	4.60±1.06(15) a	4.53±1.30(15)	4.93±1.33(15)	4.60±1.18(15)	4.47±1.60(15)	4.73±1.53(15) ab**
37-L14B62S5	4.20±1.61(15) ab	4.13±1.77(15)	5.07±1.62(15)	4.53±1.51(15)	4.93±1.53(15)	4.27±1.44(15) bc**
37-L14B62S12	3.53±1.06(15)b	4.07±1.79(15)	5.40±1.35(15)	5.47±1.85(15)	5.40±1.88(15)	3.33±0.62(15) c**
SAMPLE	발효두유종미		이미, 이취			전체
	발효두유종미	산미	생콩취	플냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
37-L69B34S5	4.67±1.23(15)	4.53±1.77(15)	4.93±1.39(15)	5.07±1.33(15)	4.60±1.40(15)	4.87±1.55(15)a*
37-L69B34S12	3.87±1.25(15)	3.73±1.75(15)	5.33±2.02(15)	5.40±1.88(15)	5.07±1.94(15)	3.20±1.70(15) b*
37-L69B62S5	4.53±1.85(15)	4.27±1.58(15)	4.60±1.35(15)	5.00±1.36(15)	4.67±1.29(15)	4.60±1.80(15) a*
37-L69B62S512	4.00±1.31 (15)	3.67±1.68(15)	5.07±1.58(15)	5.27±1.49(15)	4.80±1.66(15)	3.60±1.76(15)ab*
SAMPLE	발효두유종미		이미, 이취			전체
	발효두유종미	산미	생콩취	플냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
30-L14B34S5	5.27±1.33(15)	5.20±1.52(15)	4.13±1.55(15)	4.60±1.24(15) ab	4.53±1.73(15)	5.27±1.22(15)
30-L14B34S12	5.20±1.15(15)	4.53±1.30(15)	4.40±1.72(15)	4.73±1.16(15) ab	4.27±1.53(15)	4.53±1.46(15)
30-L14B62S5	5.53±1.51(15)	5.60±1.45(15)	3.93±1.58(15)	3.93±1.28(15) b	4.27±1.39(15)	5.60±1.55(15)
30-L14B62S12	4.80±1.97(15)	4.73±1.62(15)	4.73±1.53(15)	5.07±1.44(15) a	4.13±1.85(15)	4.93±1.62(15)
SAMPLE	발효두유종미		이미, 이취			전체
	발효두유종미	산미	생콩취	플냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
30-L69B34S5	5.13±1.41(15) ab	5.13±1.36(15) ab	4.33±1.54(15)	3.80±1.26(15) b	3.40±1.30(15)b	5.13±1.41(15) ab**
30-L69B34S12	5.47±1.73(15) a	5.67±1.35(15) a	4.47±1.77(15)	4.07±1.44(15) ab	3.73±1.28(15) ab	5.73±1.53(15) a**
30-L69B62S5	4.87±1.41(15) ab	4.73±1.44(15) ab	5.00±2.00(15)	4.27±1.39(15) ab	4.13±1.46(15) ab	4.40±1.24(15) bc**
30-L69B62S512	4.07±1.28(15) b	4.20±1.42(15) b	5.07±1.83(15)	5.07±1.79(15) a	4.60±1.68(15) a	3.60±1.18(15) c**

6. 4종의 유산균주 3차 선발(B34, B62, S5, S12)

전체적으로 유의적인 차이는 없었으나, 패널들의 일반적인 의견은 신맛이 너무 강하므로 배양액의 산도를 하향조정했으면 하는 의견이 많았다. 또한 배양온도별 전체적인 풍미차이는 30℃에서 배양한 두유배양액의 발효풍미가 37℃, 42℃와 비교하여 높은 선호도를 나타냈다. 관능결과로 미루어 볼 때 배양온도가 낮을수록 고소한 맛이 더 풍부하다고 판단된다. 또한, Lactobacilli가 후산발효가 강하여 배양종료 후 냉각과정에서 산생성이 많이 이루어진 것으로 판단된다. Lactobacilli의 향산화 활성이 높지만 풍미를 저하시키는 것으로 판단되어 Bifidobacteria와 Streptococci 2개의 genus 조합으로 37℃, 30℃에서 배양하여 두유배양액을 제조, 관능검사를 재 실시 하였다.

Table 13. The results of 2nd sensory test.

SAMPLE	발효두유풍미		이미, 이취			전체
	발효두유풍미	산미	생콩취	풀냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
37-B34S5	4.00±1.60(15)a**	6.07±1.58(15)a*	3.40±1.24(15)c*	3.33±0.90(15)b*	3.20±1.21(15)b*	6.33±1.50(15)a*
37-B34S12	4.93±1.22(15)b**	5.27±1.22(15)ab*	4.13±1.64(15)bc*	4.13±1.55(15)ab*	4.53±1.60(15)a*	5.00±1.36(15)b*
37-B62S5	3.37±1.06(15)c**	4.47±1.55(15)b*	4.80±1.86(15)ab*	4.87±1.88(15)a*	4.67±1.88(15)a*	3.80±1.15(15)c*
37-B62S12	3.37±1.06(15)c**	4.87±1.41(15)b*	5.40±1.76(15)a*	5.20±1.86(15)a*	5.20±1.97(15)a*	3.67±1.05(15)c*
SAMPLE	발효두유풍미		이미, 이취			전체
	발효두유풍미	산미	생콩취	풀냄새	흙(버섯)냄새	전체적인 선호도
30-B34S5	5.40±1.18(15)	5.00±1.93(15)	4.13±1.64(15)b	4.00±1.51(15)b	4.87±1.55(15)	5.20±1.47(15)a
30-B34S12	5.67±1.29(15)	5.07±1.16(15)	4.20±1.32(15)b	4.07±1.22(15)ab	4.40±1.68(15)	4.47±1.55(15)b
30-B62S5	5.00±1.46(15)	4.73±1.44(15)	5.07±1.75(15)ab	4.53±1.25(15)ab	4.73±1.53(15)	4.60±1.40(15)b
30-B62S12	4.60±1.59(15)	3.93±1.53(15)	5.47±1.60(15)a	5.13±1.64(15)a	5.00±1.77(15)	5.57±1.39(15)a

제 4 절 Bif-St 복합유산균주(4종)의 이취성분 및 생리활성 분석

1. Bif-St 복합유산균주(4종)의 휘발성 향미성분 분석

가. 재료 및 방법

상동

나. 결과 및 고찰

Table 14와 Fig. 16은 30°C와 37°C의 다른 발효 온도에서 24시간동안 4종류의 유산균을 각각 2종류씩 조합하여 발효시킨 8종류의 두유 발효유의 휘발성 향미성분을 500ppm의 50µl를 내부표준물질로 GC/MS total ion chromatogram상의 상대적인 peak 면적을 나타낸 것이다. 30°C와 37°C의 다른 발효 온도에 따라 휘발성 향미성분의 정량된 상대적인 peak 면적을 살펴보았을 때 상대적으로 37°C에서 24시간동안 발효시킨 시료에서 휘발성 향미성분의 양이 많이 분석되었다. Table 14에서 볼 수 있듯이 30°C에서 *Bifidobacterium* RD-121(B62)와 *Str. thermophilus* TH-3(S5)이 혼합배양된 시료에서 상대적으로 적게 휘발성 향미성분들이 검출되었다. 그리고 모든 시료에서 1-octen-3-ol과 2-pentyl furan이 유의적으로 분석되었다. 8종류의 시료 중에서 30°C에서 24시간동안 *Bifidobacterium* RD-062(B62)와 *Str. thermophilus* TH-3(S5)이 혼합배양된 시료에서 휘발성 향미성분들이 상대적으로 가장 많이 나온 것으로 나타났다.

Table 14. Relative peak areas of volatile compounds in soymilks fermented at 30°C and 37°C, respectively, with 2 types of lactic acid bacteria.

Compounds	RI ^a	30B34S5	30B34S12	30B62S5	30B62S12	37B3425	37B34S12	37B62S5	37B62S12	ID ^b
2-ethylfuran	877 ^c	0.200	0.300	0.113	0.176	0.205	0.205	0.189	0.236	MS/RI
hexanal	910	0.112	0.066	0.043	0.184	0.076	0.091	0.156	0.142	MS/RI
1-hexanol	945	0.904	0.119	0.070	0.161	0.075	0.105	0.132	0.224	MS
benzaldehyde	1001	0.228	0.110	0.152	0.254	0.176	0.187	0.322	0.316	MS/RI
1-octen-3-ol	1015	1.720	0.958	0.461	0.493	1.253	1.015	1.189	1.042	MS/RI
2-pentylfuran	1025	0.615	0.339	0.332	0.528	0.542	0.359	0.548	0.632	MS/RI
1-limonene	1056	0.025	0.016	0.012	0.022	0.014	0.017	0.025	0.036	MS/RI

a: Retention indices were determined using n-paraffins C₇-C₂₂ as external references.

b: Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectrum database (1995) (HewlettPackard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures(Kondjoyan and Berdague, 1996;Acree, 1997); MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

c: Average of relative percentage of peak area(%) = peak area of each compound / peak area of internal standard(400 µl of 500ppm 1-Dodecanol) × 100.

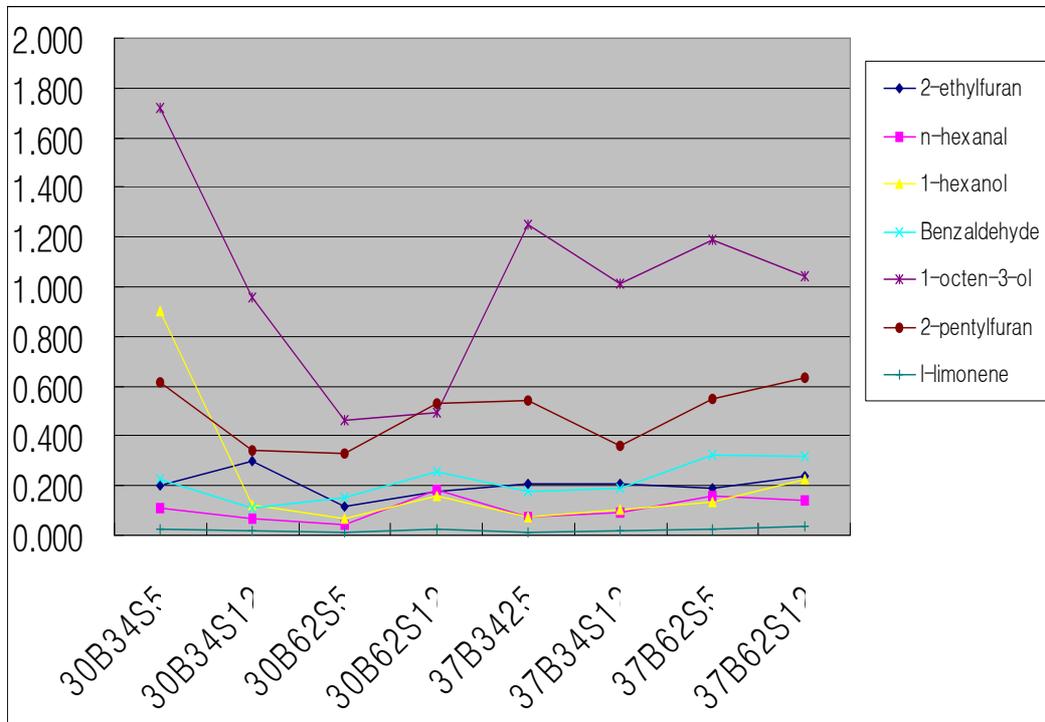


Fig. 16. Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilks at 30°C and 37°C, respectively, with 2 types of lactic acid bacteria.

2. Bif-St 복합유산균주(4종)의 이소플라본 분석

가. 재료 및 방법
상동

나. 결과 및 고찰

복합유산균주를 이용하여 배양온도별(30°C, 37°C)로 두유배양액을 제조하여 이소플라본을 측정치를 상대적으로 비교한 결과 B34S12 균주와 B62S12 균주의 총 이소플라본 함량이 5%정도 높게 나타났다.

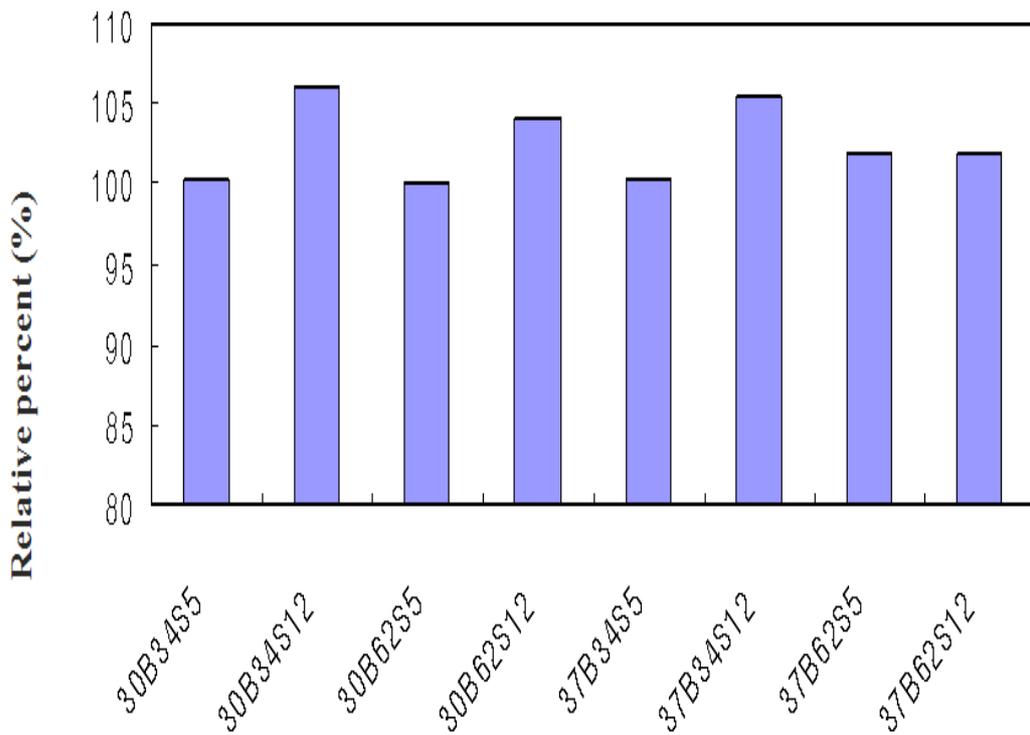


Fig. 17. Relative percent of total isoflavones in fermented soymilk at 30°C and 37°C, respectively, with 2 types of lactic acid bacteria.

이소플라본 변화를 분석한 결과 복합유산균주별로 유의적인 차이는 없었고, 모든 시료에서 87% 이상의 aglycone을 보였다. 또한, 37°C에서 배양한 시료가 30°C에서 배양한 시료에 비해 aglycone이 조금 높게 나타났다.

Table 15. Relative percentage of isoflavone derivatives in fermented soymilk at 30°C and 37°C, respectively, with 2 types of lactic acid bacteria.

	aglycone(%)	Beta-glucoside(%)	Acetyl-glucoside(%)	Malonyl-glucoside(%)
30B34S5	87.24	3.76	2.38	6.62
30B34S12	87.51	4.07	3.10	5.31
30B62S5	87.81	7.18	1.95	3.05
30B62S12	88.61	4.17	1.15	6.07
37B34S5	92.77	4.06	0.30	2.86
37B34S12	89.40	4.72	1.02	4.86
37B62S5	89.16	4.65	2.37	3.82
37B62S12	88.66	4.55	1.32	5.47

3. Bif-St 복합유산균주(4종)의 free-radical scavenging activity 분석

가. 재료 및 방법

상동

나. 결과 및 고찰

37°C에서 배양한 두유배양액에서는 B34S12 균주가 높은 활성을 보였고, 30°C에서 배양한 두유배양액에서는 B62S12 균주가 높은 활성을 보였으나, 유의차는 없었다.

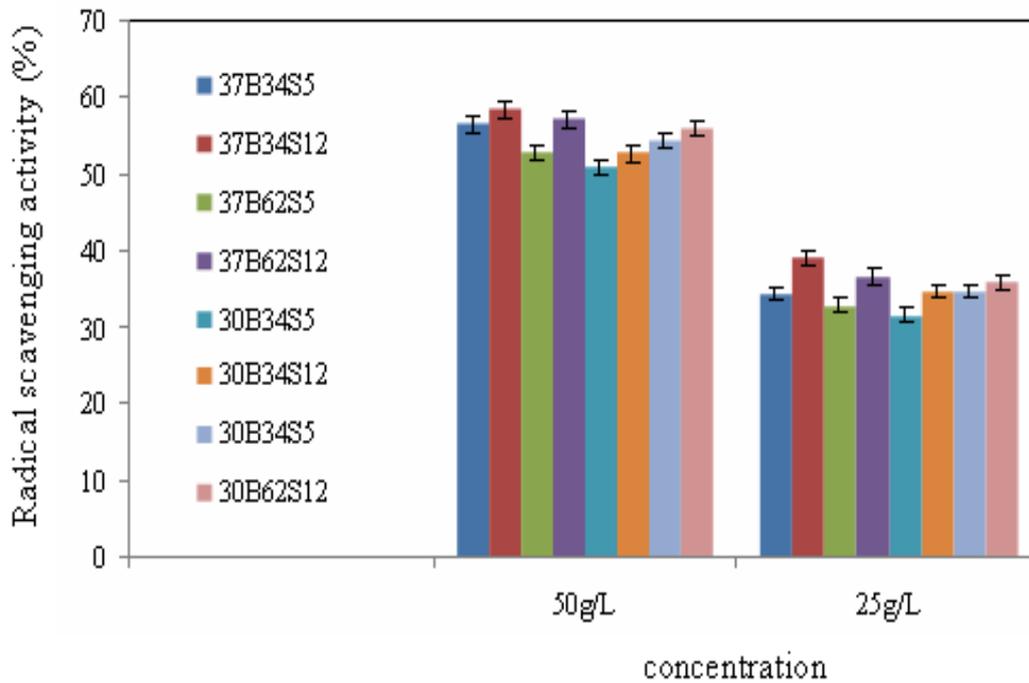


Fig. 18. Free-radical scavenging activities in fermented soymilk at 30°C and 37°C, respectively, with 2 types of lactic acid bacteria.

4. 최종 복합유산균주 1종 선발(B62-S12)

Bif-St 복합유산균주(4종)를 이용하여 배양온도별로(30℃, 37℃) 두유배양액을 제조하여 휘발성향미성분 및 이소플라본 분포, 지방산, 향산화 활성을 분석하였다. 관능검사 결과 배양온도가 낮을수록 고소한 풍미는 높은 편이었다. 휘발성 향미성분은 37℃보다 30℃에서 배양한 시료에서 비교적 적은양이 검출되었는데 특히, 1-octen-3-ol의 경우 30℃에서 배양한 시료가 유의적으로 낮게 검출되었다. 반면, 37℃에서 배양한 시료의 향산화 활성 및 aglycone 전환율이 높게 나타났으나 균주간의 유의적인 차이가 없어 이취가 낮고 고소한 풍미가 높은 30℃에서 배양시료 중 B62-S12균주의 aglycone 전환율이 가장 높아 B62-S12균주를 최종 선발하여 제품화하였다. B62 균주는 매일유업(주)에서 분리한 자사종균으로써 동정이 필요로 하고, S12 균주는 상업용 종균으로써 *Streptococcus thermophilus*(Culture System Industry)이다.

가. S12균주의 두유에서의 성장곡선(Growth curve) 측정

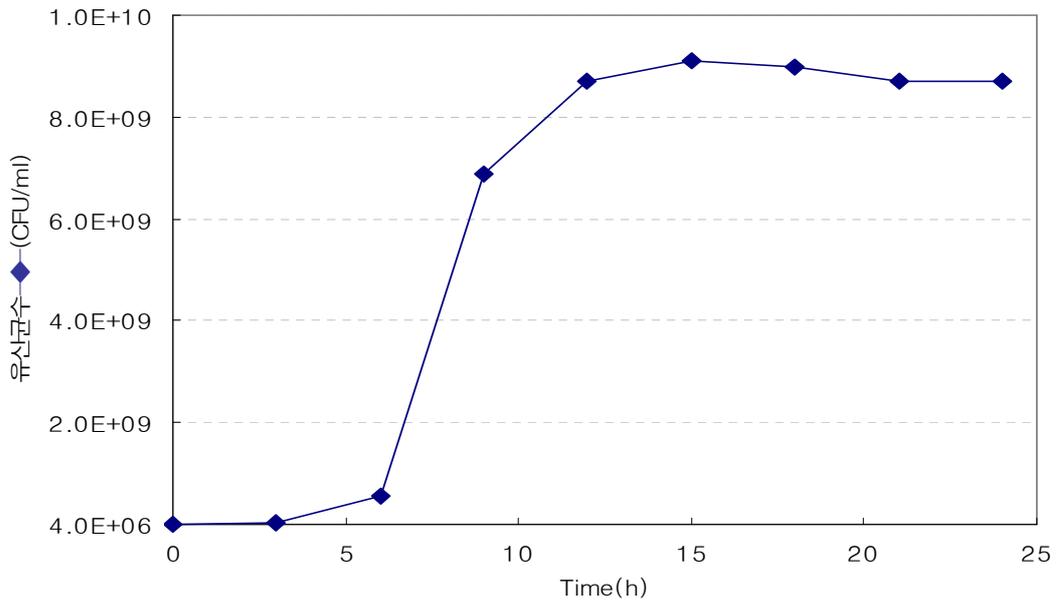
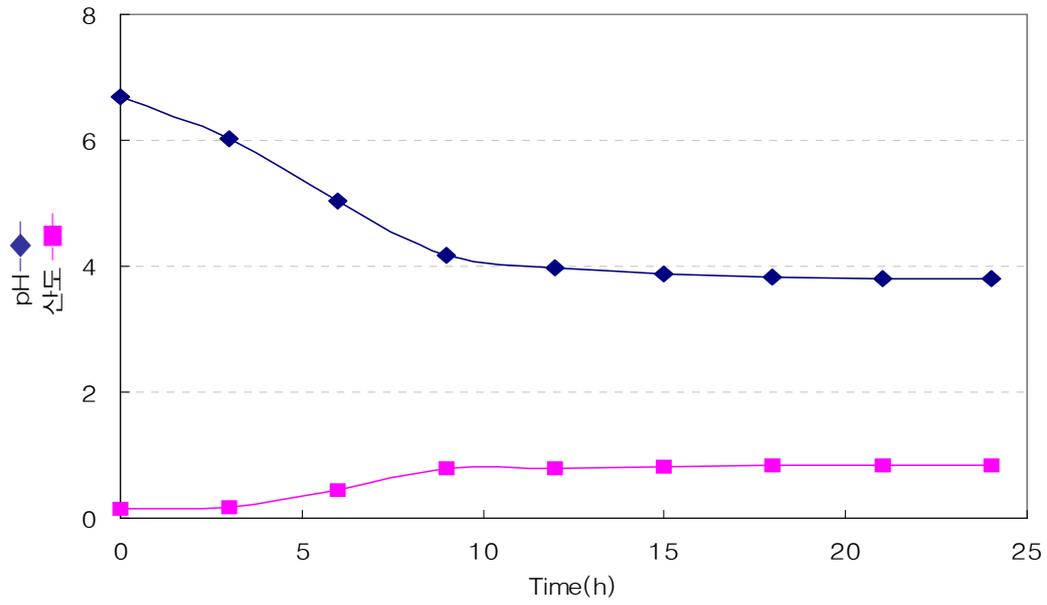


Fig. 19. Growth curve of lactic acid bacteria S12 in fermentation.

나. B62균주의 두유에서의 성장곡선(Growth curve) 측정

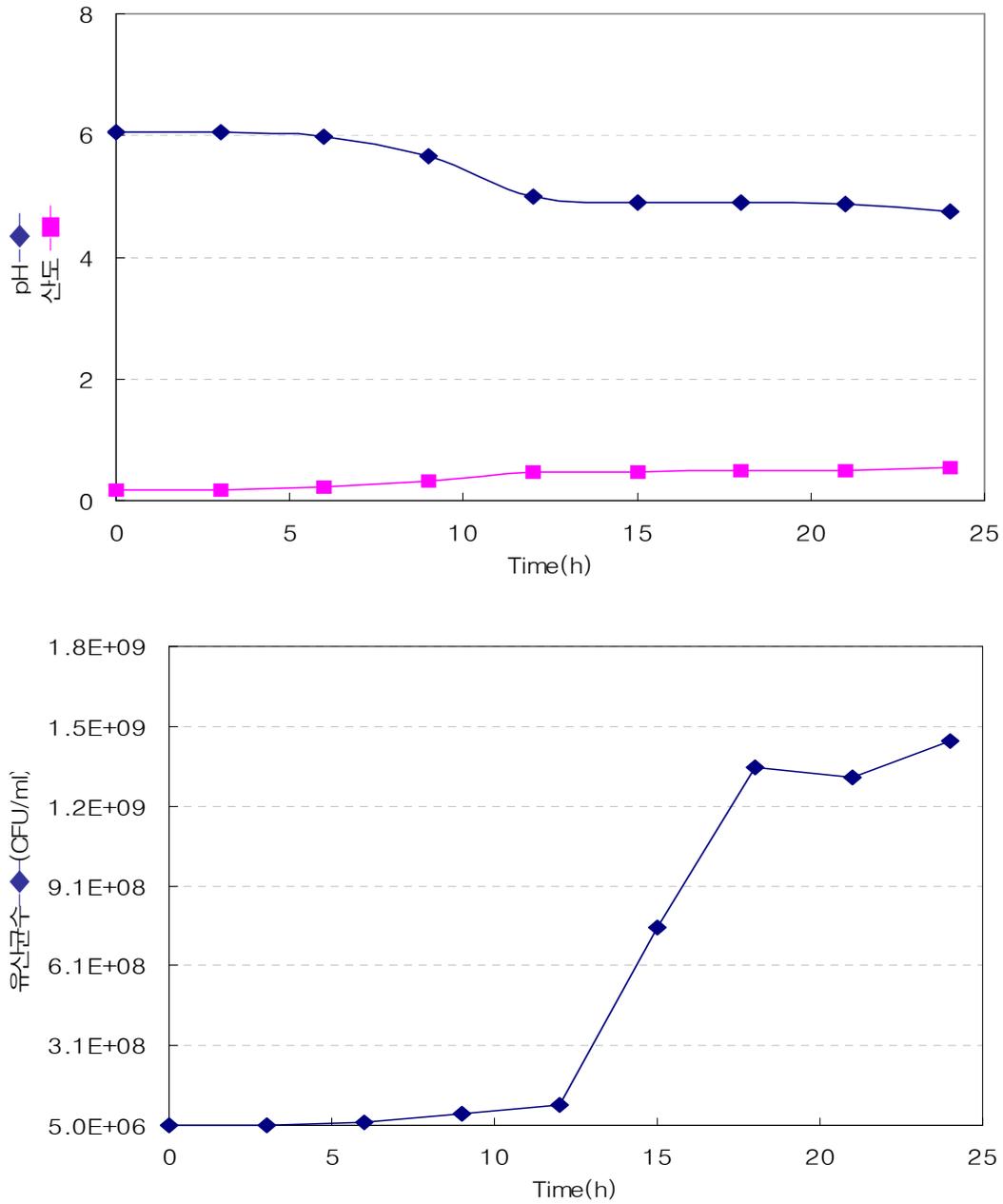


Fig. 20. Growth curve of lactic acid bacteria B62 in fermentation.

다. B62-S12 복합유산균주의 두유에서의 성장곡선(Growth curve) 측정

1) B62-S12 복합유산균주의 배양시간별 총 유산균수 측정 결과가 Bifidobacteria 균수보다 낮게 측정되었다. 이는 총 유산균수를 측정하는 배지가 BCP agar로 Bifidobacteria가 이 배지에서 원래의 균수보다 낮게 측정되었을 것으로 추측된다.

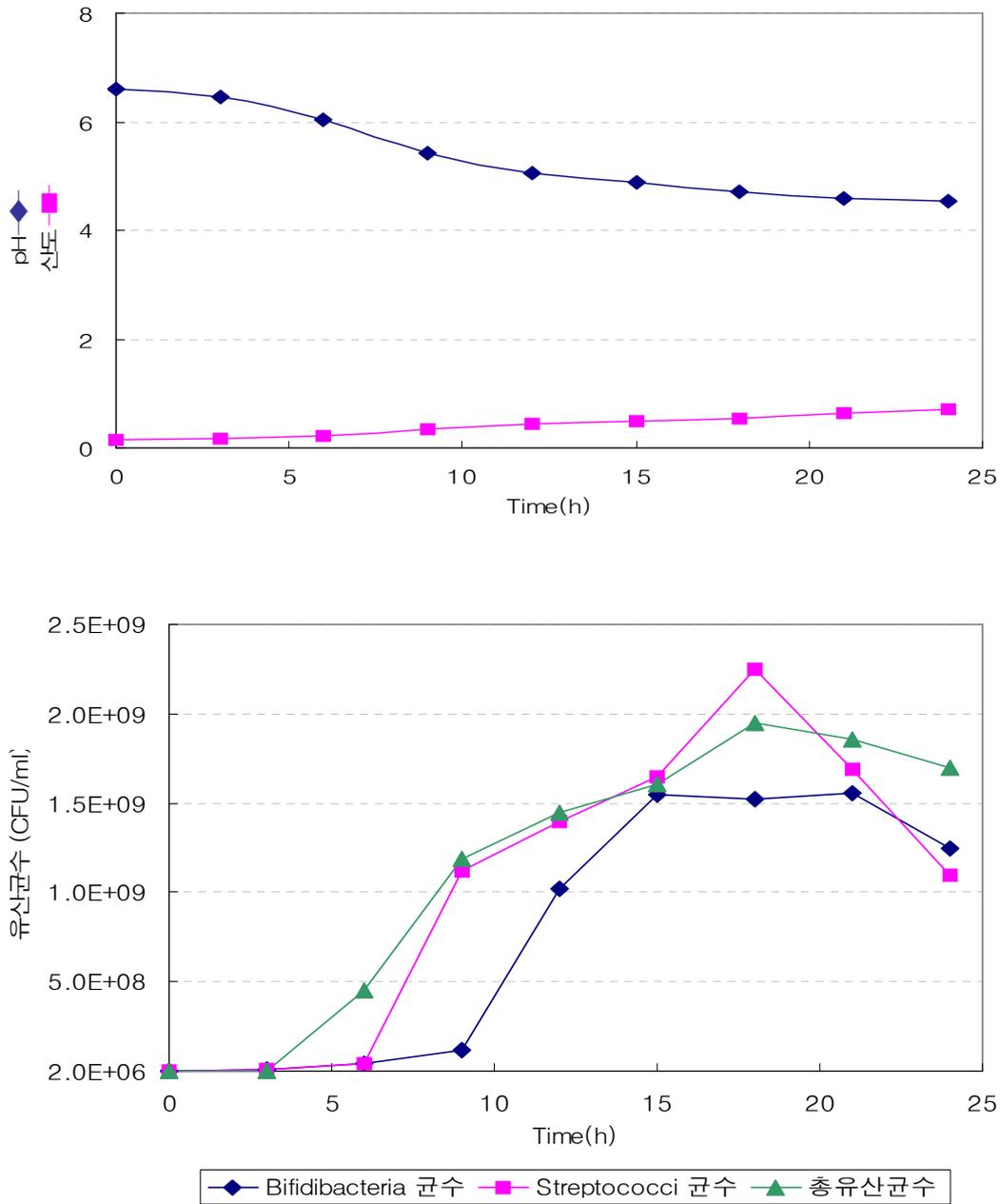
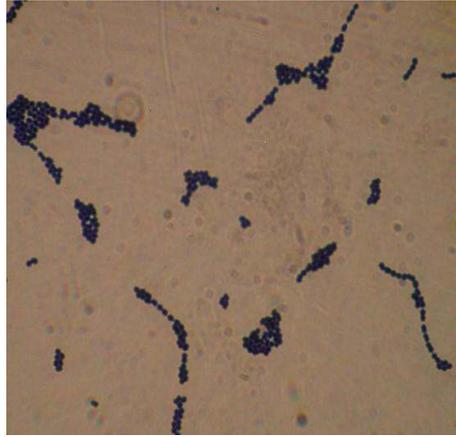


Fig. 21. Growth curve of mixed lactic acid bacteria B62-S12 in fermentation.

2) B62균주와 S12균주의 광학현미경상 morphorlogy



B62



S12

Fig. 22. Morphorlogy of lactic acid bacteria B62, S12 in optical microscope.

제 5 절 B62-S12균주를 이용하여 제품화를 위한 생산공정 검토

1. B62-S12균주를 이용하여 제조한 두유배양액의 지방산화물과 이취성분과의 관계 규명

1-1. 이취성분 저감화 검토

두유배양액의 이취성분의 저감화를 위하여 사용된 첨가제는 maltodextrin 3종류와 cyclodextrin 3종류였다. maltodextrin은 dextrose equivalent(DE)정도에 따라 DE 4.0-7.0, DE 13.0-17.0, DE 16.5-19.5 3종류를 첨가하였다. 이에 비해 cyclodextrin은 α -, β -, γ 3종류를 각각 첨가하였다. 총 12 종류의 휘발성 이취성분이 동정되었으며, 정량된 양은 전체 peak 면적당 각 화합물의 peak 면적으로 나누어 백분율로 계산하였다. Table 16은 두유배양액의 이취성분 저감화를 위한 상대적인 peak 면적을 나타낸 것이다. 첨가제를 넣은 대부분의 시료에서 휘발성 이취성분의 양이 감소함을 볼 수 있었다. 특히, hexanal의 경우 커다란 감소 경향을 보였으며, cyclodextrin을 첨가한 경우보다 maltodextrin을 첨가한 경우가 이취성분의 감소 정도가 상대적으로 크게 나타났다. 그 중에서도 maltodextrin DE 4.0-7.0과 maltodextrin DE 13.0-17.0을 첨가한 시료의 이취성분들이 크게 감소한 것으로 보였다. 그러나, 1-hexanol이나 2-heptanone은 감소하지 않았거나, 큰 차이가 나지 않았다.

Table 16. Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilks with or without additives(maltodextrin or cyclodextrin).

No.	Compounds	control	malto 1 ^b	malto 2 ^b	malto 3 ^b	cyclo α ^b	cyclo β ^b	cyclo γ ^b
1	Hexanal	2.37 ^a	0.49	0.26	0.44	0.47	0.53	0.48
2	1-Hexanol	1.64	1.83	1.98	1.85	1.61	1.36	1.98
3	2-Heptanone	1.07	0.99	1.13	1.27	1.19	0.95	1.22
4	2-Heptenal	0.55	0.36	0.44	0.51	0.54	0.49	0.57
5	Benzaldehyde	0.86	0.55	0.62	0.69	0.85	0.78	1.07
6	Heptanol	0.57	0.51	0.49	0.42	0.52	0.53	0.41
7	1-Octen-3-ol	1.96	1.24	1.70	1.90	1.92	1.98	2.28
8	2-Pentylfuran	1.34	0.69	0.99	1.22	1.53	1.65	1.72
9	3-Octanol	0.57	0.44	0.51	0.50	0.56	0.67	1.37
10	2,4-Heptadienal	0.35	0.27	0.21	0.23	0.25	0.21	0.16
11	Benzyl alcohol	0.41	0.40	0.34	0.24	0.55	0.22	0.26
12	2-Nonanone	0.55	0.30	0.36	0.36	0.54	0.49	0.68

a: average of relative percentage of peak area(%) = [peak area of each compound / total peak area] \times 100

b: malto 1= maltodextrin DE 4.0-7.0, malto 2= maltodextrin DE 13.0-17.0, malto 3= maltodextrin DE 16.5-19.5, cyclo α = α -cyclodextrin, cyclo β = β -cyclodextrin, cyclo γ = γ -cyclodextrin

1-2. Vitamin A, C, E를 첨가한 두유배양액의 휘발성 성분 분석

가. 재료 및 방법

두유원액의 배양과정 및 배양 후 지방이 산화되는 것을 방지하기 위하여 항산화제(Vit A, C, E)를 각각 0.05%씩 첨가하여 두유배양액을 제조하였다.

나. 결과 및 고찰

Table 17와 Fig 23는 발효시간에 따른 Vitamin A, C, E를 첨가한 것과 첨가하지 않은 두유 배양액의 휘발성 향미성분들의 변화를 나타낸 것이다. 항산화제를 첨가한 시료에서 대체적으로 적은 양의 휘발성 성분이 검출되었다. 주요 휘발성 향미 성분으로는 furan계열 5종류로 2-ethylfuran, 2-butylfuran, 2-methylfuran, 3-methylfuran, 2-pentylfuran이었고, ketone계열이 3종류로 2-heptanone, 2-octanone, 3-octanone이 분석되었고, aldehyde계열로 heptanal, 2-hetanal, hexanal, nonanal, benzaldehyde 5종류, alcohol계열로 1-heptanol, 1-hexanol, 1-octanol, 3-octanol, 1-octen-3-ol 5종류 분석되었으며, 기타 4-H-pyran-4-one과 naphthalene 총 20 종류의 휘발성 향미성분이 검출되었다. 발효 초기에 2-heptanal과 benzaldehyde의 경우는 항산화제를 첨가한 시료에서 상대적으로 많이 검출되었다. 항산화제를 첨가한 시료에서는 첨가하지 않은 시료에서 검출되지 않은 naphthalene($C_{10}H_8$)이 검출되었다. 이는 Vitamin A, C, E의 용매 등에서 유래된 것으로 여겨진다. 전체적으로 두유배양액의 휘발성 성분들은 대체적으로 발효시간이 증가할수록 줄어드는 경향을 보였다.

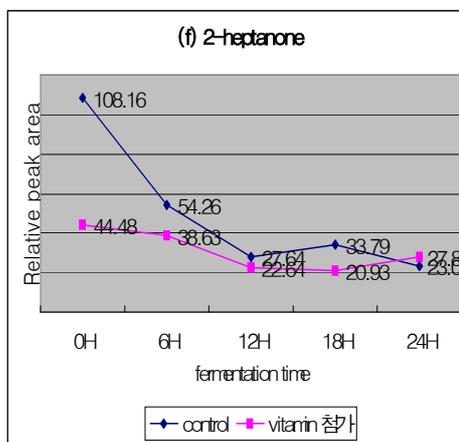
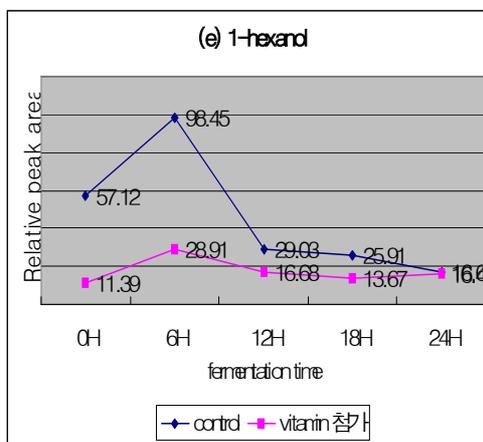
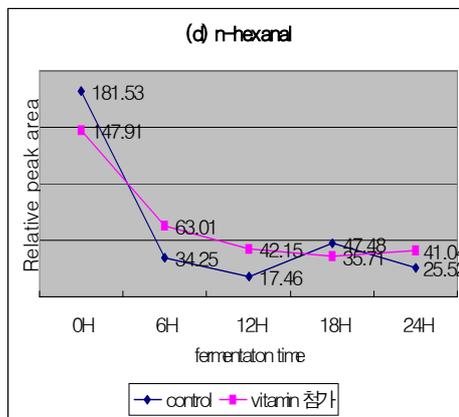
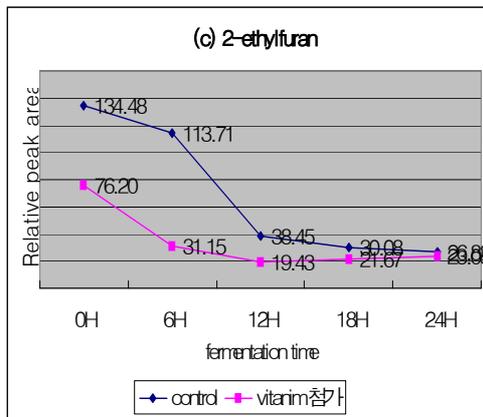
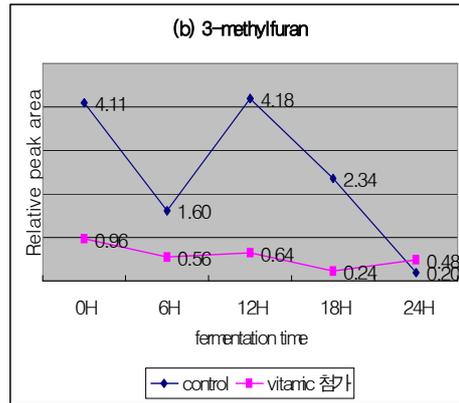
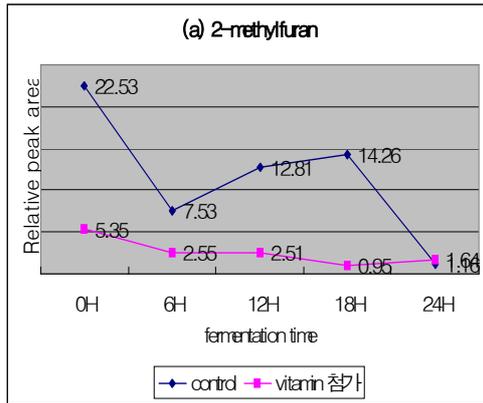
Table 17. Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

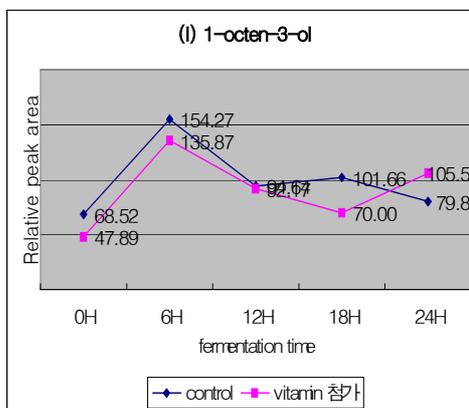
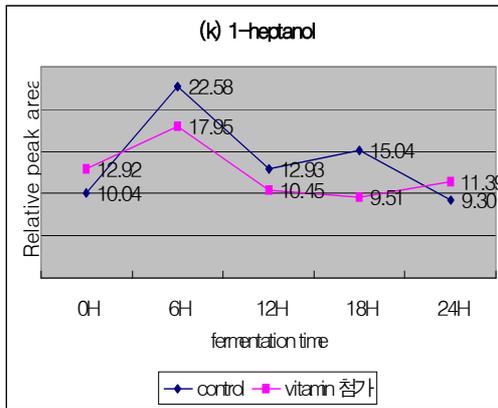
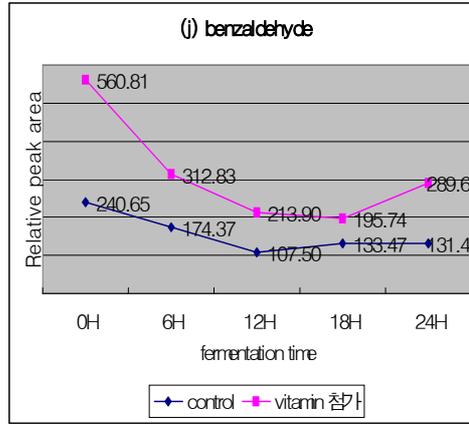
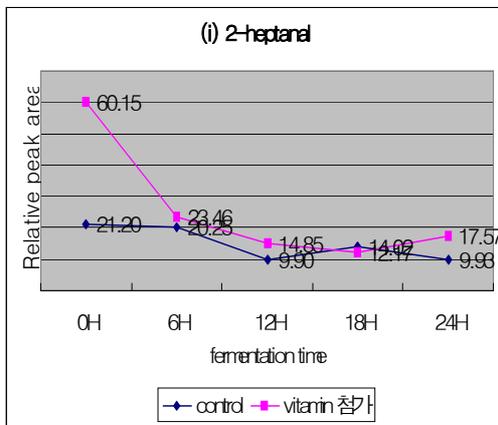
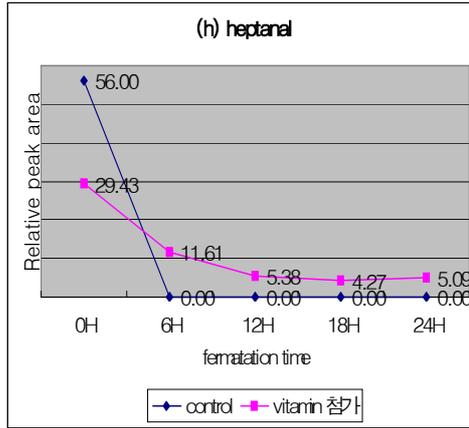
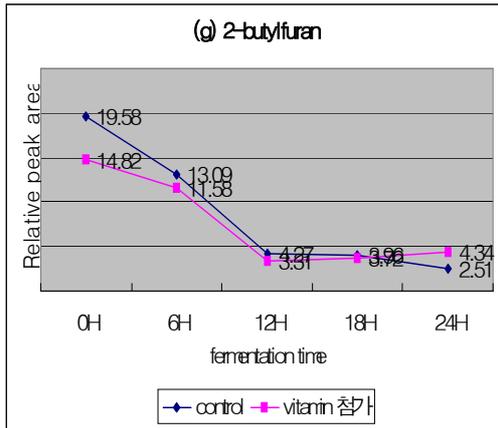
Compounds	0H ^b	6H	12H	18H	24H	ACE ^a -0H	ACE -6H	ACE -12H	ACE -18H	ACE -24H	
Furans	2-ethylfuran	134.5 ^{c,d}	113.7	38.4	30.1	26.8	88.6	44.6	13.8	22.4	17.3
	2-butylfuran	19.6	13.1	4.3	4.0	2.5	18.9	14.5	3.3	4.3	5.6
	2-methylfuran	22.5	7.5	12.8	14.3	1.2	6.2	3.8	2.3	0.7	1.8
	3-methylfuran	4.1	1.6	4.2	2.3	0.2	1.1	0.8	0.6	0.2	0.4
	2-pentylfuran	266.1	213.6	82.6	57.2	52.2	394.2	105.4	93.6	78.8	110.7
Ketones	2-heptanone	108.2	54.3	27.6	33.8	23.0	56.0	45.7	22.2	21.4	32.4
	2-octanone	42.5	17.2	9.4	9.0	6.8	24.9	5.5	9.8	5.4	9.7
	3-octanone	21.3	20.7	13.2	15.9	7.8	13.0	19.8	10.0	11.6	19.2
Aldehydes	heptanal	56.0	-	-	-	-	35.8	14.4	6.0	4.8	6.3
	2-hetanal	21.2	20.3	9.9	14.0	9.9	43.5	28.6	14.1	11.5	20.1
	hexanal	181.5	34.2	17.5	47.5	25.5	180.1	81.6	44.4	24.5	42.0
	nonanal	26.6	7.0	2.1	3.7	3.4	60.0	19.0	0.7	0.8	1.1
	benzaldehyde	240.7	174.4	107.5	133.5	131.5	691.8	391.4	184.2	177.2	319.9
Alcohols	1-heptanol	10.0	22.6	12.9	15.0	9.3	15.4	21.6	10.6	9.0	13.6
	1-hexanol	57.1	98.4	29.0	25.9	16.7	13.5	33.1	14.6	12.9	18.6
	1-octanol	164.3	52.5	26.9	35.9	31.6	114.4	71.9	23.1	26.0	36.8
	3-octanol	0.0	42.4	21.7	21.9	13.2	37.3	42.5	19.6	16.9	23.4
	1-octen-3-ol	68.5	154.3	94.6	101.7	79.8	61.1	165.2	88.3	69.3	121.8
기타	4-H-pyran-4-one	91.8	158.1	222.6	194.2	199.6	129.2	312.0	129.3	110.2	226.0
	naphthalene	-	-	-	-	-	75.2	49.6	22.5	19.6	27.1

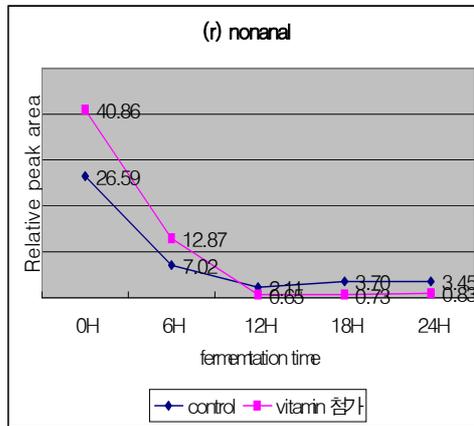
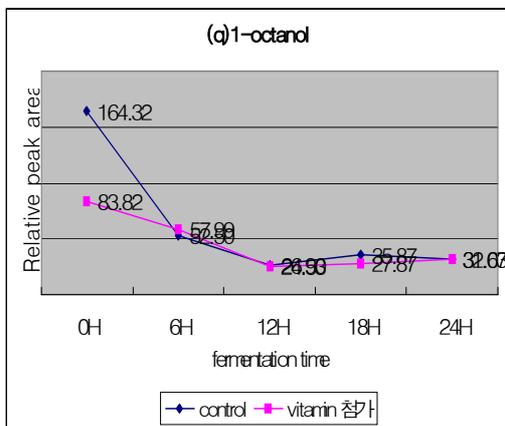
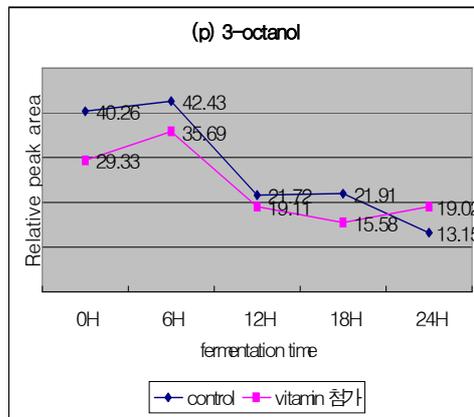
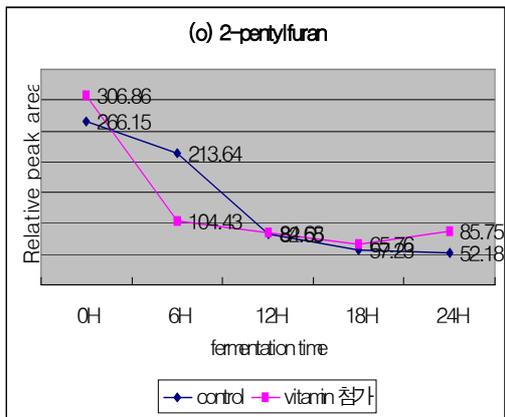
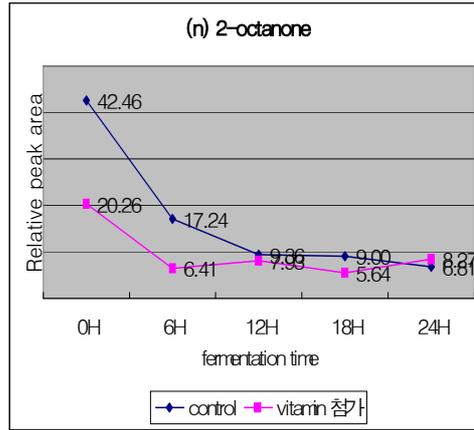
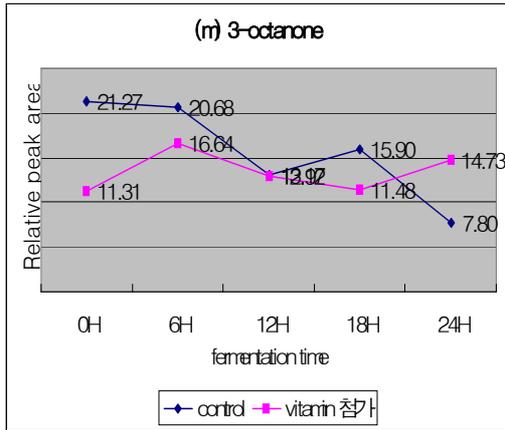
a. ACE는 항산화제로서 Vitamin A, C, E를 첨가한 시료를 나타낸 것이다.

b. 0H, 6H, 12H, 18H, 24H는 30°C에서 두유발효유를 발효한 시간 정도를 나타낸 것이다.

c: Average of relative percentage of peak area(%) = [peak area of each compound / peak area of internal standard(50µl of 500ppm 1-dodecanol)] × 100.







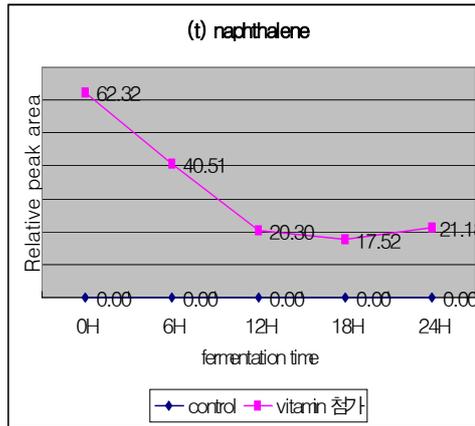
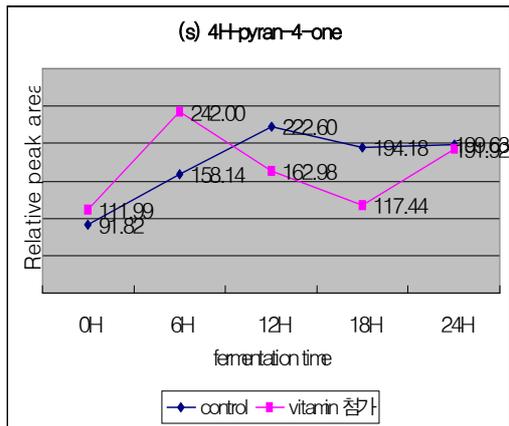


Fig. 23 Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

(a) ethylfuran, (b) 3-methylfuran, (c) 2-ethylfuran, (d) n-hexanal, (e) 1-hexanol, (f) 2-heptanone, (g) 2-butylfuran, (h) heptanal, (i) 2-hetanal, (j) benzaldehyde, (k) 1-heptanol, (l) 1-octen-3-ol, (m) 3-octanone, (n) 2-octanone, (o) 2-pentylfuran, (p) 3-octanol, (q) 1-octanol, (r) nonanal, (s) 4H-pyran-4-one, (t) naphthalene

1-3. N₂를 이용하여 용존산소를 제거한 두유배양액의 휘발성 향미성분 분석

가. 재료 및 방법

두유원액의 배양과정 및 배양 후 지방이 산화되는 것을 방지하기 위하여 두유원액에 질소를 충전하면서 deaerator로 용존산소를 제거한 후 두유배양액을 제조하였다.

나. 결과 및 고찰

Table 18.은 O₂에 의한 지방산화를 감소시키기 위하여 N₂를 이용하여 용존산소를 제거한 것과 제거하지 않은 두유원액과 두유배양액 시료의 휘발성 향미성분들을 분석한 결과이다. 대체적으로 N₂를 충전하지 않은 두유배양액에서 휘발성 성분들이 많이 나왔다. 특히, 2-pentylfuran이 가장 많이 나왔고, benzaldehyde, 1-octen-3-ol 순으로 휘발성 성분이 검출되었다. 2-ethylfuran의 경우는 N₂를 충전하지 않은 두유배양액에서만 더 많이 검출될 뿐 나머지 시료에서의 2-ethylfuran의 양은 비슷하였다. 결론적으로 질소충진하여 용존산소를 제거한 후 두유원액을 배양시키면 휘발성 향미성분이 용존산소를 제거하지 않은 시료에 비해 많이 줄어드는 경향을 볼 수 있다.

Table 18. Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilks with or without N₂ purging.

Compounds	용존산소제거한 두유원액	용존산소제거한 두유배양액	무처리한 두유원액	무처리한 두유배양액
2-ethylfuran	0.05 ^{a,b}	0.05	0.05	0.09
hexanal	0.17	0.16	0.12	0.36
1-hexanol	0.12	0.33	0.14	0.34
2-heptanone	0.10	0.41	0.11	0.25
heptanal	0.06	0.11	0.09	0.08
benzaldehyde	0.17	0.23	0.18	0.26
1-octen-3-ol	0.11	0.31	0.11	0.46
2-pentylfuran	0.25	0.35	0.38	0.55
octanal	0.04	0.11	0.04	0.07
benzyl alcohol	0.07	0.07	0.04	0.13
2-nonanone	0.07	0.11	0.06	0.12

a: Average of relative percentage of peak area(%) = peak area of each compound / peak area of internal standard^b(50 μl of 500ppm 1-Dodecanol) × 100.

b: Internal standard was 50 μl of 500ppm 1-Dodecanol in ethanol.

2. B62-S12균주를 이용하여 제조한 두유배양액의 이소플라본 분석

2-1. Vitamin A, C, E를 첨가한 두유배양액의 이소플라본 분석

가. 재료 및 방법

상동

나. 결과 및 고찰

최종 선별된 복합유산균주의 배양시간별 이소플라본 함량 분포를 분석한 결과 배양이 진행됨에 따라 전체적으로 총 이소플라본 함량은 감소하였으며, 배양시간이 증가할수록 aglycone 함량은 모두 증가하여 70% 이상의 높은 aglycone 전환율을 나타내었다. 비타민 A, C, E를 첨가한 시료의 경우 beta-glucoside 가 aglycone으로 전환되는 양이 상대적으로 적어 배양종료 후에도 비타민을 첨가하지 않은 시료에 비해 beta-glucoside가 많이 검출되었다.

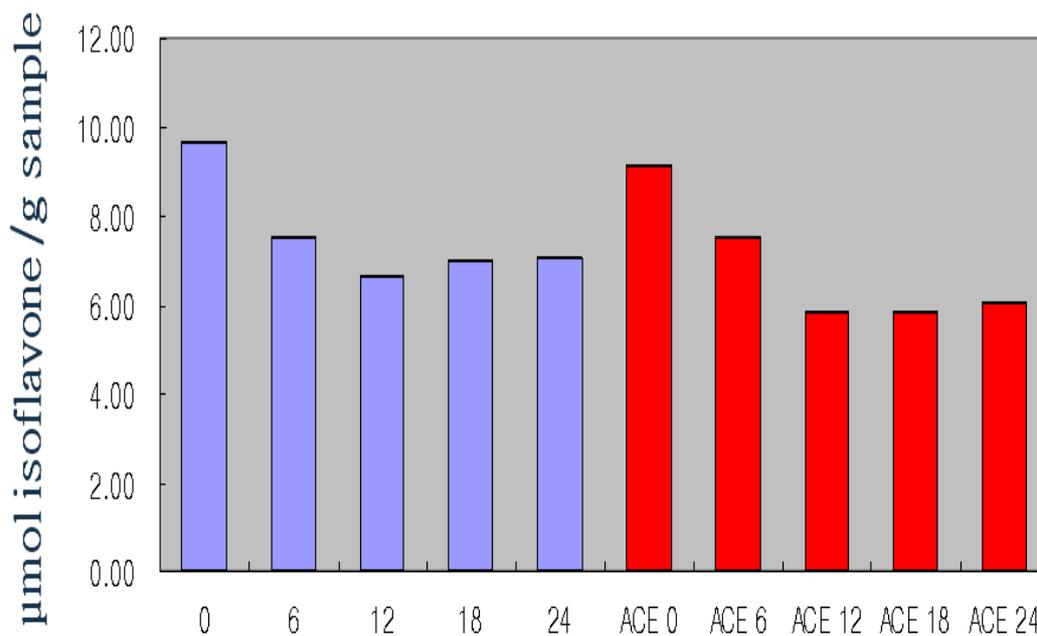


Fig. 24. Relative contents of total isoflavones in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

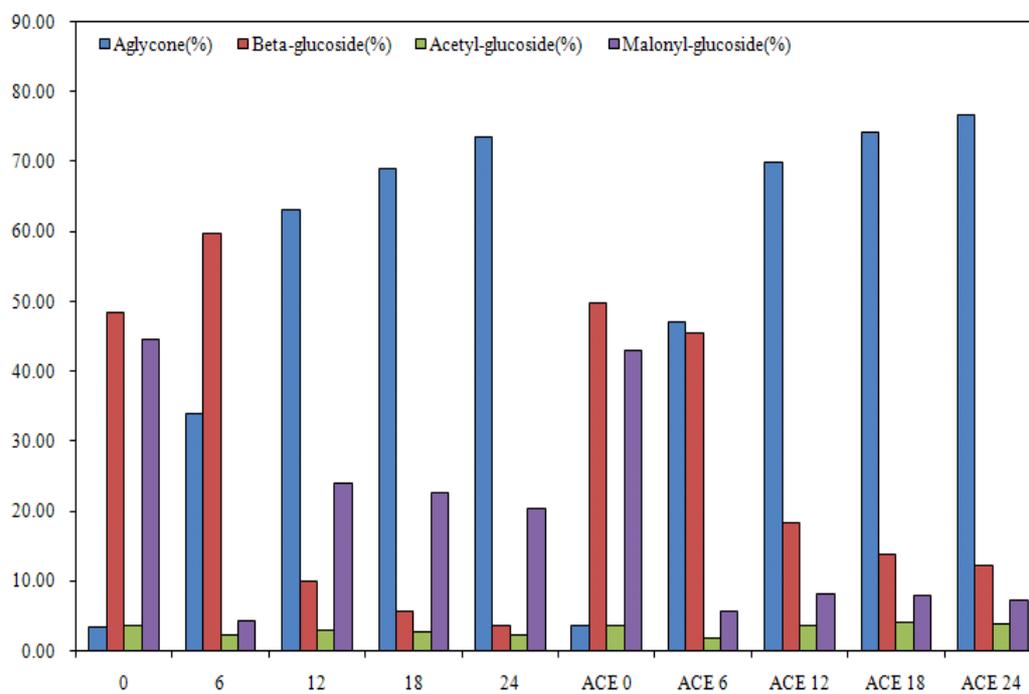


Fig. 25. Distribution of isoflavones in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

2-2. N₂를 이용하여 용존산소를 제거한 두유배양액의 이소플라본 분석

가. 재료 및 방법

상동

나. 결과 및 고찰

질소 충전한 시료와 무처리 시료의 이소플라본 함량은 유의적인 차이가 없었다. 질소충진 배양액의 aglycone 함량이 무처리 배양액보다 약간 증가하지만 이 역시 유의차는 없었으며, 배양을 했을 경우 총 이소플라본 함량이 두유원액보다 2mmol/g 정도 줄어들었는데 이것은 이소플라본 metabolite로 전환됐을 가능성이 있을 수 있다.

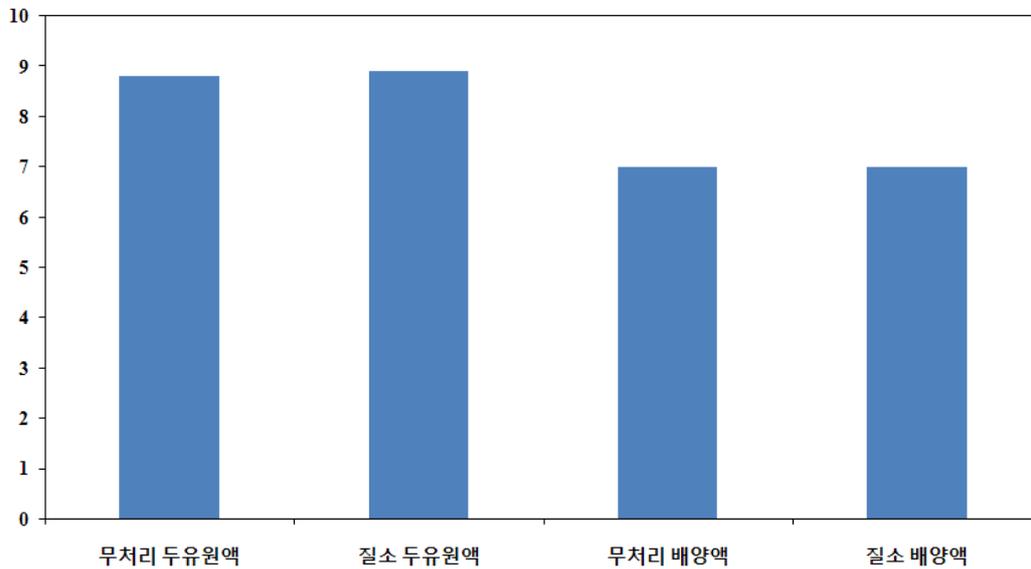


Fig. 26. Relative contents of total isoflavones in fermented soymilks with or without treatment N₂

3. B62-S12균주를 이용하여 제조한 두유배양액의 metabolome, 항산화 및 항염증 활성 분석

3-1. Vitamin A, C, E를 첨가한 두유배양액의 metabolome, 항산화 및 항염증 활성 분석

가. 재료 및 방법
상동

나. 결과 및 고찰

1) Fig. 27은 배양시기별 Vit A, C, E 무첨가 대두발효유의 수용성 분획물의 $^1\text{H-NMR}$ 결과를 비교한 spectrum이다. 배양이 진행될수록 lactic acid peak이 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 반면, 배양이 진행될수록 3.2-4.5ppm 사이의 peak의 metabolome 성분들이 전체적으로 감소하는 것을 육안으로 확인할 수 있었다. 또한 5.4 ppm에서 발견되는 sucrose peak 역시 발효가 진행됨에 따라 감소 경향을 보였다.

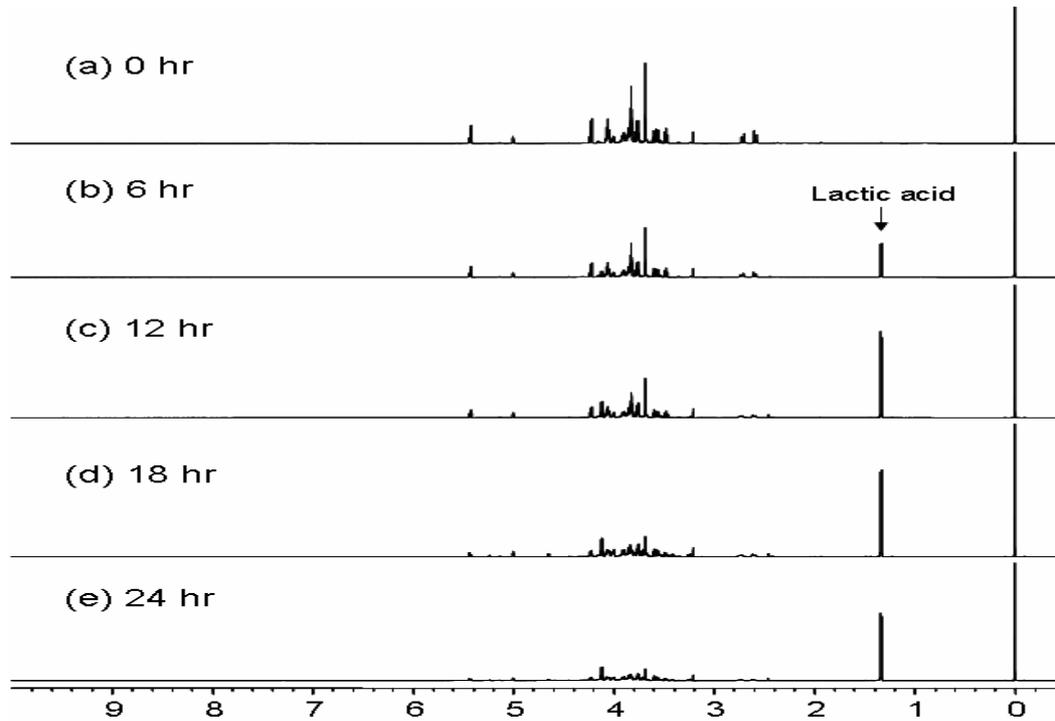


Fig. 27. ^1H NMR spectrum in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

2) Fig. 28은 배양시간별 vitamin A, C, E 무첨가 대두발효유의 수용성 분획물의 ^1H NMR을 분석한 spectrum이다. spectrum들의 peak를 확인하였으며, 1, lactate; 2, alanine; 3, acetic acid; 4, succinic acid; 5, citric acid; 6, choline; 7, oxalacetate 8, raffinose/stachyose 9, sucrose 10, fumarate 11, tyrosine 12, phenylalanine; 13, formic acid들로 동정되었다. 이런 ^1H NMR spectrum의 digital 정보들을 이용하여 다변량 통계분석을 수행하였다

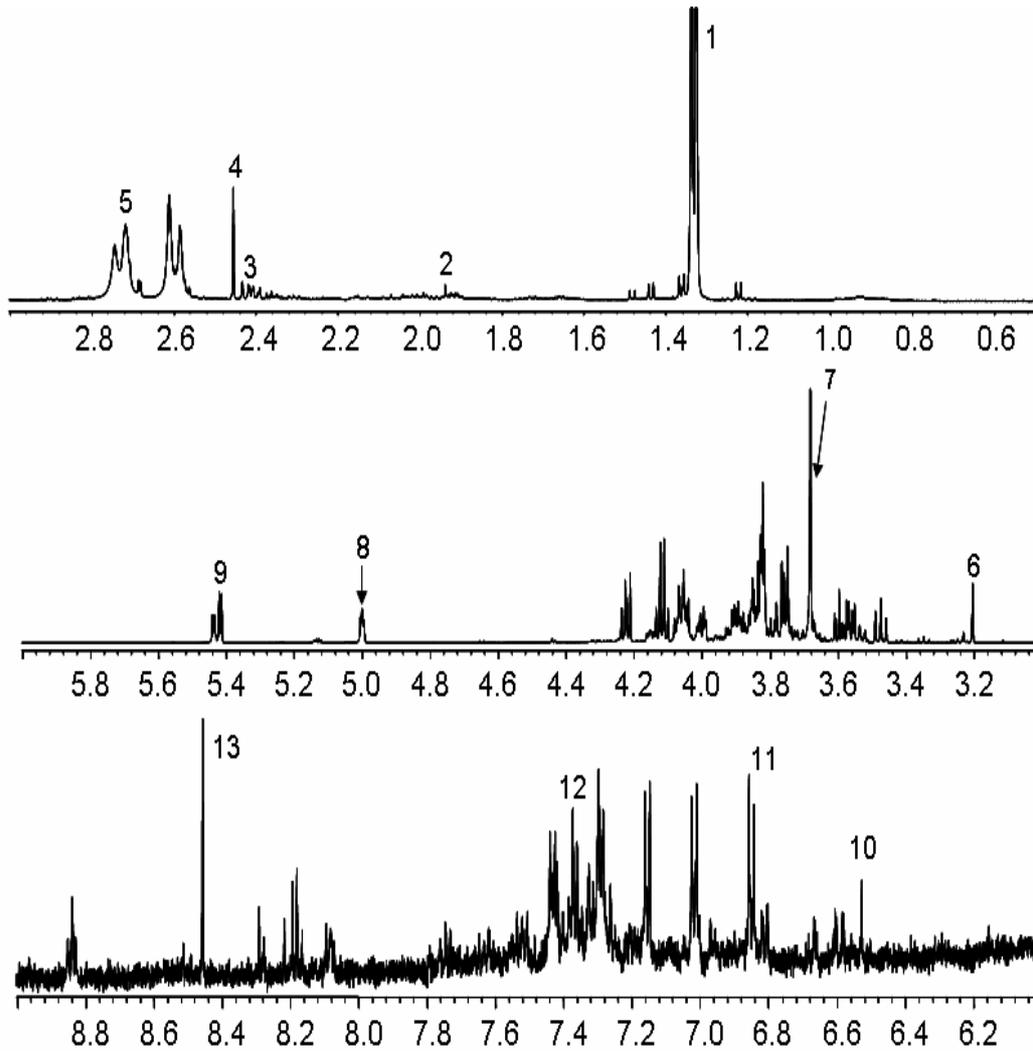


Fig. 28. Metabolome profiling peak assignment in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

3) Fig. 29는 배양시간별 Vit A, C, E 무첨가 대두 발효유의 ^1H NMR 분석 결과를 대표적인 다변량 통계분석법의 하나인 주성분분석법에 의하여 분석한 결과이다. 주성분 PC1(44%)과 PC3(10.4%)가 분석에 기여하였다. NMR 분석에 의한 metabolome 변화를 분석한 결과, 발효시간 0에서 6시간 사이의 metabolome의 차이는 크지 않으나, 그 이후 발효가 진행될 수록 12-24시간 사이의 metabolome은 발효초기인 0-6시간 시료들에 함유되어 있는 metabolome과 차이가 커짐을 알 수 있었다.

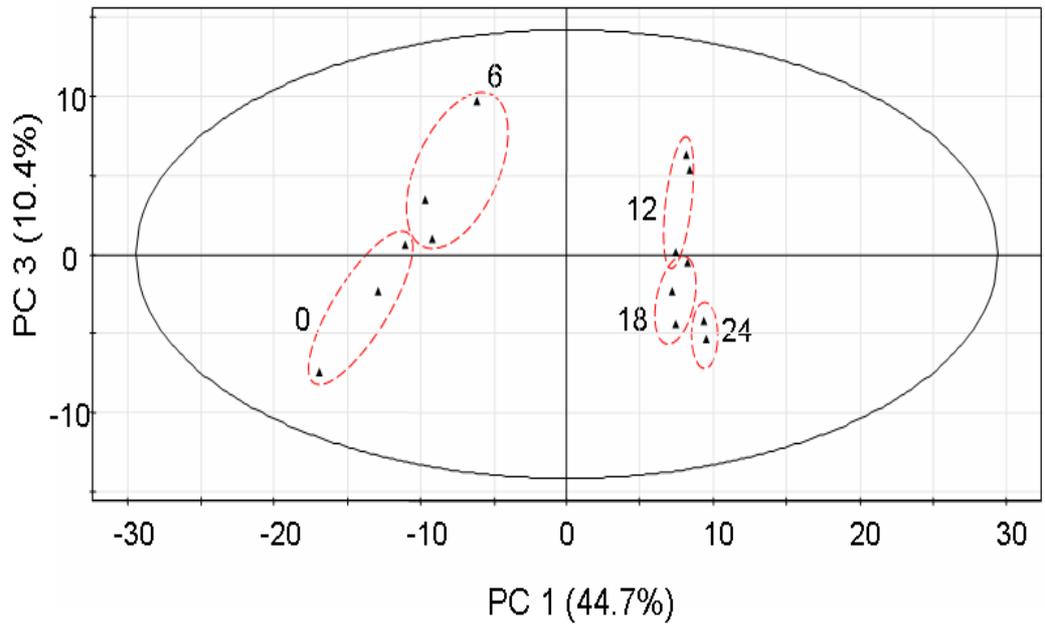


Fig. 29. Score plot of metabolomic profiling in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

4) Fig. 30은 배양시간별 Vit A, C, E 무첨가 시료의 metabolite 분석한 결과에 따라 assignment 되었던 peak들의 relative intensity를 비교한 결과이다. Lactic acid는 발효가 진행됨에 따라 relative intensity가 증가하는 경향을 보였고, malic acid는 6시간까지 증가하는 경향을 보인다. 12시간부터 발효가 진행될수록 감소하는 것을 볼 수 있었다. 또한 succinic acid는 발효가 진행됨에 따라 증가하였고, citric acid, oxalacetic acid, sucrose, phenylalanine은 발효가 진행될수록 감소경향을 보였다. raffinose와 stachyose는 발효시간이 경과함에 따라 서서히 감소하는 경향을 관찰할 수 있었다.

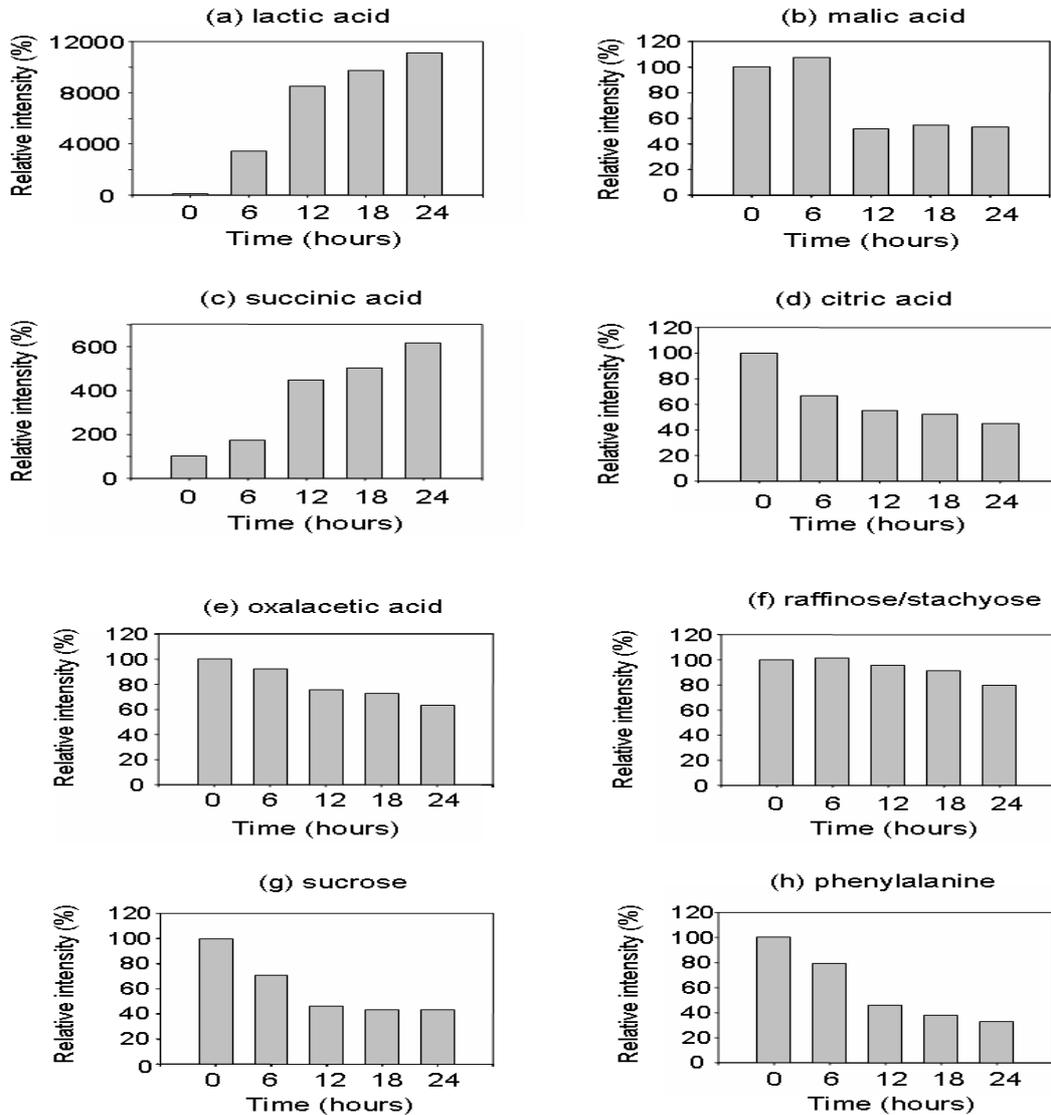


Fig. 30. Relative metabolites intensities in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

5) 배양시간별 Vit A, C, E 첨가 및 무첨가 두유배양액의 free-radical scavenging activity

그림 15는 발효시간별 vitamin A, C, E 첨가 (a) 혹은 무첨가 (b) 대두발효유 샘플을 50, 12.5 g/L 농도에서 free-radical scavenging activity를 본 결과이다. vitamin A, C, E가 첨가된 두유배양액은(a) 농도 50g/L일 때 6시간 이후부터 발효초기보다 항산화 효과가 우수해짐을 알 수 있었고, vitamin A, C, E 무첨가 두유배양액은(b) 발효시간이 진행 될수록 발효 초기보다 free-radical scavenging activity가 우수해지는 것을 볼 수 있었다. 상대적인 activity는 vitamin 첨가 발효유가 무첨가 발효유보다 약 3배정도 좋은 것으로 나타났다.

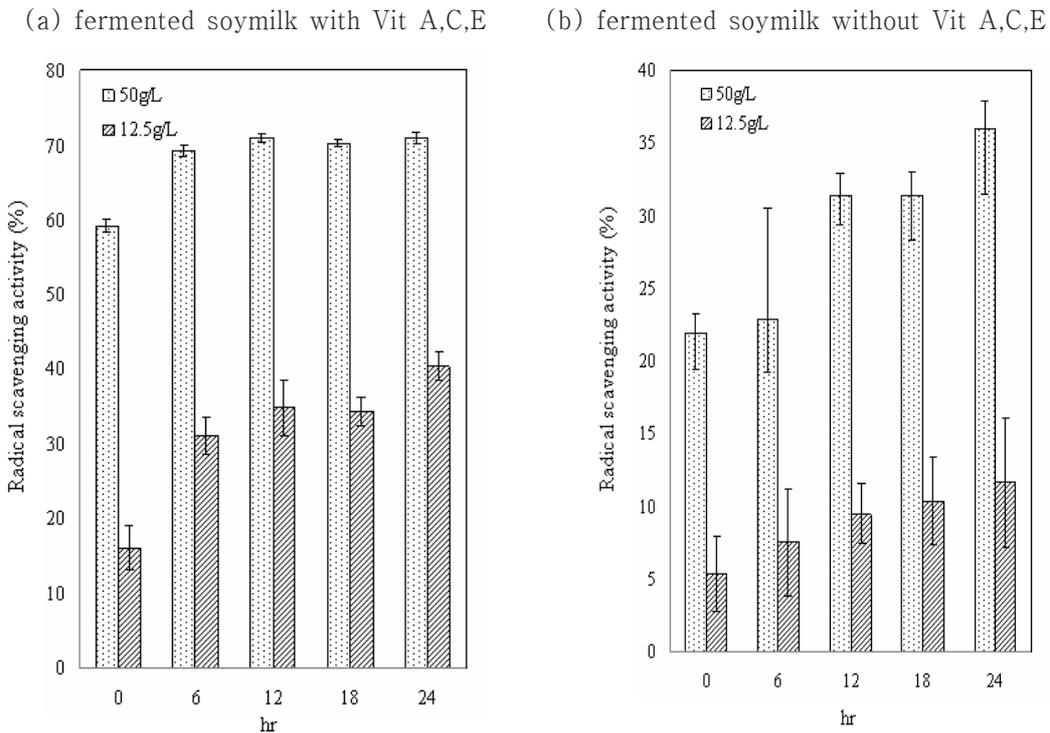


Fig. 31. Free-radical scavenging activities in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

6) 배양시간별 Vit A, C, E 첨가 및 무첨가 두유배양액의 total phenolics

배양시간별 vitamin A, C, E 첨가(a), 무첨가(b) 두유배양액의 total phenolic 분석 결과는 Fig. 23에서 볼 수 있다. 농도는 50g/L과 12.5g/L로 실험하였고, vitamin A, C, E 첨가 두유배양액의 경우, 발효시간이 증가 할수록 phenolic 함량이 유의적으로 증가 하는 것을 볼 수 있었다. vitamin A, C, E 무첨가 대두발효유 농도 50g/L은, 발효초기보다 12시간째 phenolic 함량이 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한 vitamin A, C, E를 첨가한 샘플의 phenolic 함량은 무첨가 샘플보다 약 4배 이상 높은 것으로 보였다.

(a) fermented soymilk with Vit A,C,E (b) fermented soymilk without Vit A,C,E

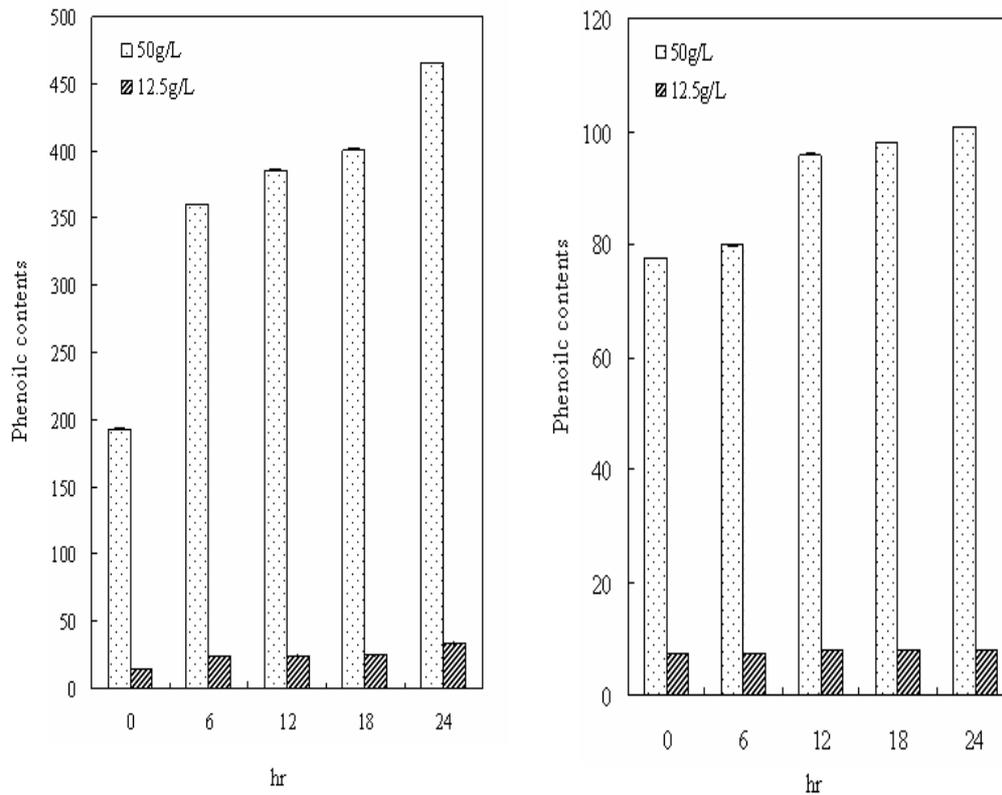


Fig. 32. Total phenolic contents in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

7) 배양시간별 Vit A, C, E 첨가 및 무첨가 두유배양액의 total flavonoid 분석
 발효시간별 vitamin A, C, E 첨가(a), 무첨가(b) 두유배양액의 total flavonoid
 결과는 Fig. 33에서 볼 수 있다. 농도는 50, 12.5g/L로 실험하였고, vitamin A, C, E
 첨가 두유배양액의 경우 발효가 진행될수록 flavonoid 함량이 증가하였고, 발효시간
 24시간 쯤, 발효 초기보다 대략 2배 정도 flavonoid 함량이 증가하는 것을 알 수 있
 었다. vitamin A, C, E 무첨가 대두 발효유도 발효가 진행됨에 따라 flavonoid 값은
 증가하였으나, vitamin을 첨가한 두유배양액보다는 그 증가율이 적었다.

(a) fermented soymilk with Vit A,C,E (b) fermented soymilk without Vit A,C,E

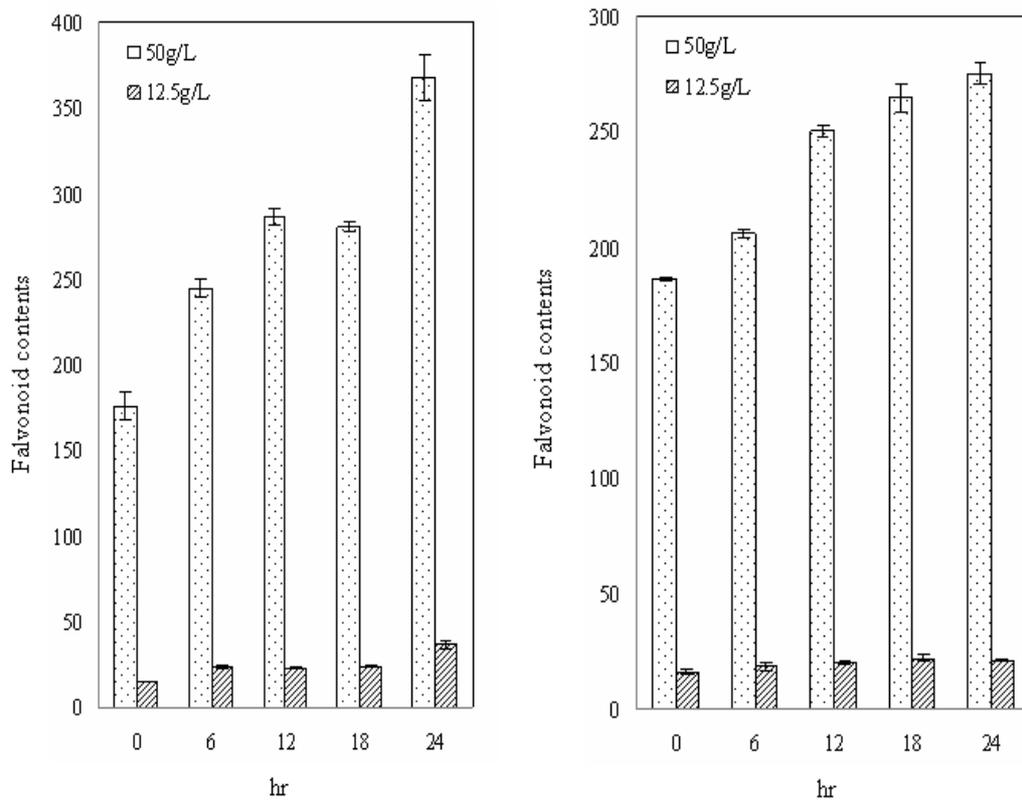


Fig. 33. Total flavonoid contents in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

8) 배양시간별 Vit A, C, E 첨가 및 무첨가 두유배양액의 항염증 활성 분석

가) 시료 추출법

시료 0.1g을 100mL의 50% methanol 에 넣고, 18시간 shaking시켜 추출하고, Filter paper를 이용하여 filtering 후 농축하여 100mg당 1mL 농도로 희석시킨다.

나) MTT assay

세포를 96 well plate에 80~90% 정도 골고루 MEM(5% FBS)배지에 배양시키고, MEM (0.1% FBS)배지로 교환 후, 24시간 배양 하였다. vitamin A, C, E첨가, 무첨가 샘플의 대두 추출물을 각각 20, 40, 80 160, 320 μ g/mL농도로 20시간 처리하였다. MTT solution을 각 well마다 20 μ l 넣고 4시간동안 배양하고 4시간 동안 배양 후 배지를 제거하고 well마다 200 μ l의 DMSO를 넣고 30분 잘 섞은 후 570nm에서 흡광도 측정하였다.

세포독성을 알아보는 MTT assay 결과는 Fig. 34에서 보는 바와 같이 vitamin A, C, E 첨가 시료와 무첨가 시료의 유의적인 차이가 없는 것으로 보였다. 이는 두유배양액 추출물시료에서 세포독성이 나타나지 않음을 의미한다.

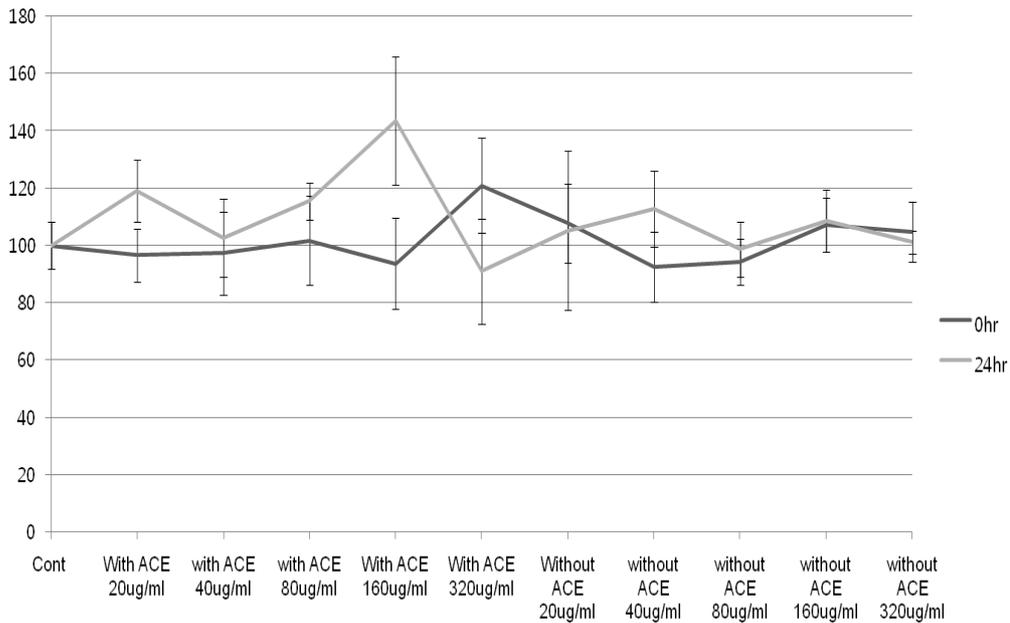


Fig. 34. MTT assay in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

다) COX-2 Luciferase assay (I)

세포를 80~90%정도 골고루 MEM(5% FBS)배지에 배양하고 MEM(0.1% FBS) 배지로 교환 후 24시간 배양하였다. vitamin A, C, E 첨가, 무첨가 시료를 0, 12, 24시간 배양한 대두 추출물을 각각 20, 40 μ g/mL의 농도로 1시간 전처리 하고, TPA를 20 mg/mL의 농도로 하여 24시간 배양한 후, Luminometer를 이용하여 COX-2 Luciferase의 발현정도를 확인하였다.

세포 항염증 활성을 알아보는 COX-2 활성 결과는 Fig. 35에서 볼 수 있다. 대두 발효유의 항산화 활성 실험 결과, 항산화 효과가 확인되어 이 결과를 기반으로 항염증 활성 효과가 있을 것을 기대하였으나, 당초 예상과 다르게 활성 수치가 전반적으로 100 이상으로 나타나 각 시료별로 항염 활성 효과가 있지 않음을 알 수 있었다.

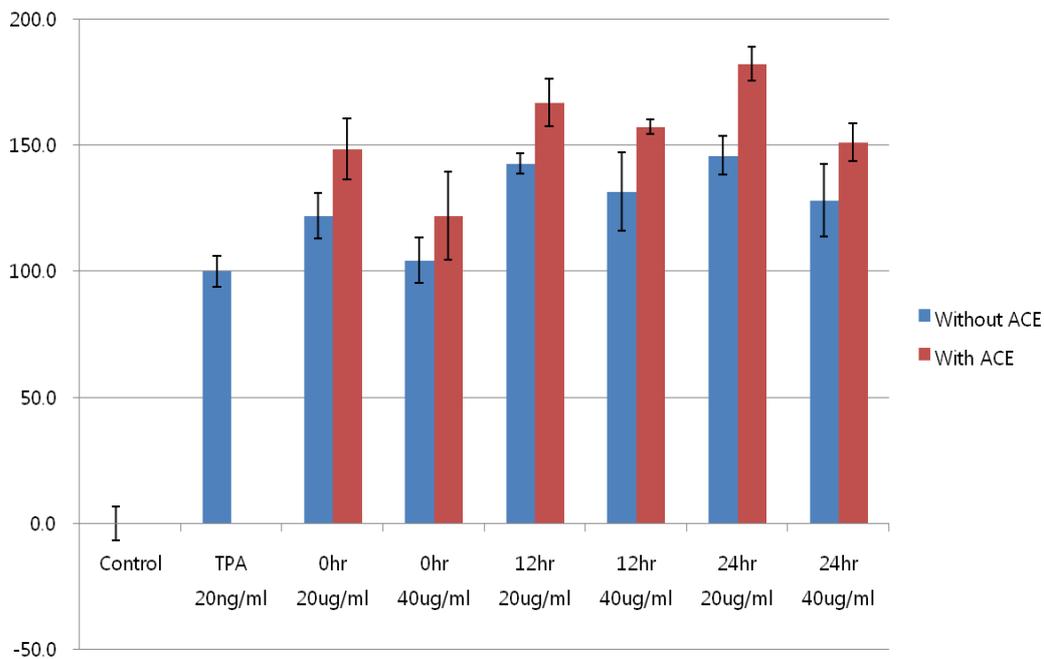


Fig. 35. The results of COX-2 Luciferase assay in fermented soymilks with or without antioxidants according to fermentation times.

3-2. N₂를 이용하여 용존산소를 제거한 두유배양액의 metabolome, 항산화 활성

가. 재료 및 방법

상동

나. 결과 및 고찰

1) 질소충진 시료의 metabolome 분석

Fig. 36은 질소 충전 유무에 따른 두유원액과 두유배양액의 수용성 분획물의 ¹H-NMR 결과를 비교한 spectrum들이다. 두유배양액에서 질소 첨가 여부에 상관없이 두유원액보다 lactic acid peak가 크게 나타나는 것을 볼 수 있었고, 반면, 두유원액보다 두유배양액의 3.5-4.5 peak들 (sugar region)은 전체적으로 감소하는 것을 알 수 있었다.

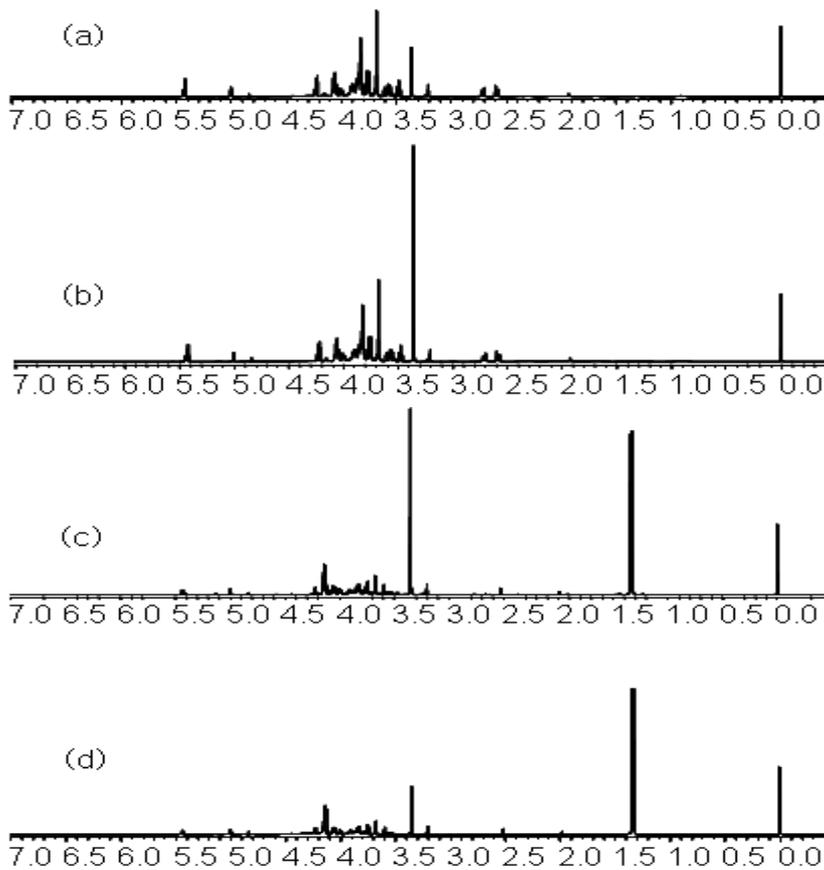


Fig. 36. The comparison of ¹H spectrum in fermented soymilks with or without treatment N₂.

(a): 질소충진 두유 원액, (b): 두유 원액, (c): 질소충진 대두 발효유, (d): 대두 발효유

2) 질소충진 시료의 free-radical scavenging activities

Fig. 37은 질소충진 두유원액, 두유배양액의 샘플을 50, 25 g/L 농도로 free-radical scavenging activity를 본 결과이다. 대두 발효유는 두유원액보다 50, 25 g/L 농도에서 유의적으로 차이를 보이며 우수한 항산화 효과를 보였고, 질소 충전 유무에 따른 두유원액, 두유배양액의 radical scavenging activity는 질소충진 효과의 영향을 받지 않는 것으로 보였다.

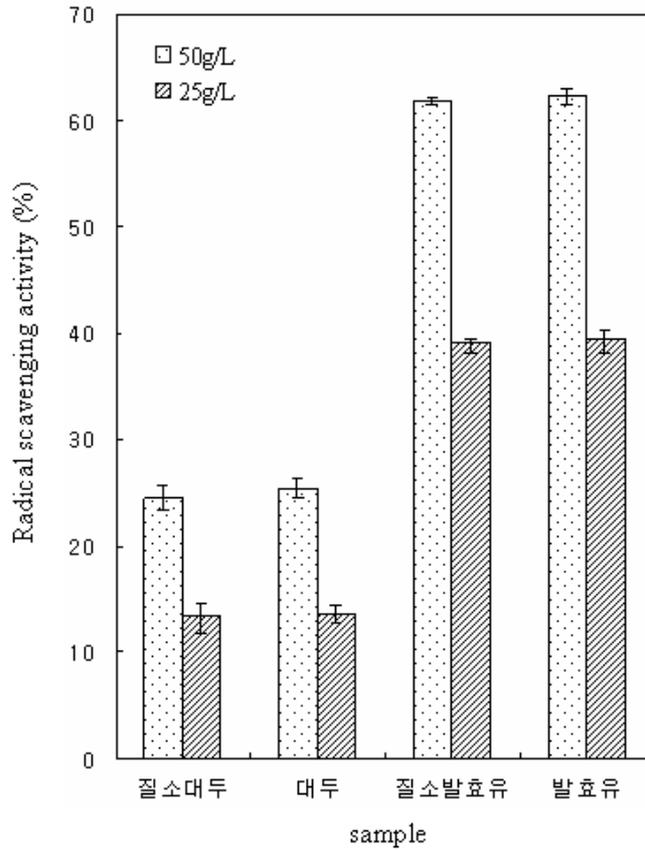


Fig. 37. Free-radical scavenging activities in fermented soymilks with or without treatment N₂.

3) 질소충진 시료의 total flavonoid 분석

질소충진 두유원액, 두유배양액의 total flavonoid 결과는 Fig. 38에서 볼 수 있다. 샘플의 농도는 50 과 25g/L로 실험하였고, 질소충진 두유배양액의 flavonoid 함량은 질소충진 대두 원액 보다 높은 유의적인 차이를 보였고, 두유배양액의 경우 질소충진 영향에 따른 flavonoid 함량차이는 유의적으로 차이가 없는 것을 알 수 있었다.

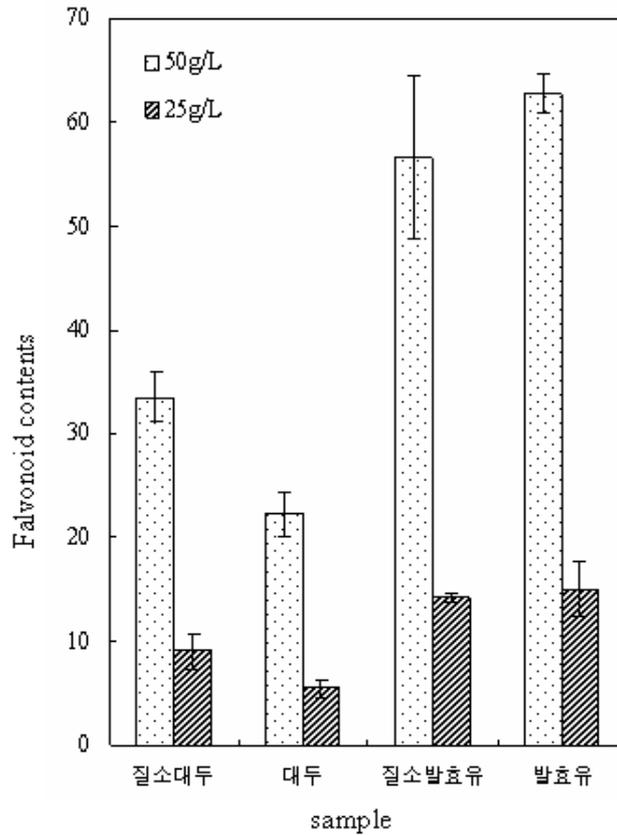


Fig. 38. Total flavonoid contents in fermented soymilks with or without treatment N₂.

제 6 절 시제품 생산

1. 생산내용

가. 생산일시 : 2008년 4월 3일 ~ 5일(3일간)

나. 생산공장 : 매일유업(주) 광주공장

2. 성분 배합비율

구분	자재명	소공정배합비(%)	투입량(kg)	전체배합비(%)
두유 배양액	두유원액(국산대두)	99.9467	2,998.401	69.96269
	유산균(B62)	0.05	1.5	0.035
	유산균(ST3)	0.0033	0.099	0.00231
	소계	100	3,000	70
당액	백설탕	16.6667	214.2857	5
	바나나향(A8346)	0.1333	1.7143	0.04
	오렌지향(KS5722)	0.1333	1.7143	0.04
	Masking flavor(A7482)	0.0667	0.8571	0.02
	정제수	83	1,067.1428	24.9
	소계	100	1,285.7142	30
조합액	배양액		3,000	70
	요구르트 당액		1,285.7142	30
	소계		4,285.7142	100
저장액	조합액	100.0	4,285.7142	100.0

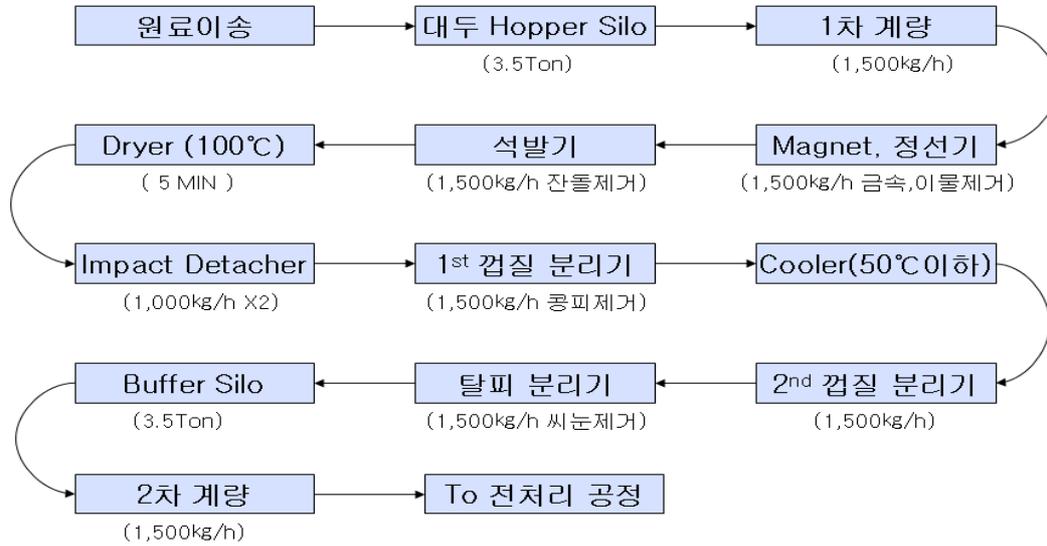
3. 제품 규격

구분	검사항목	검사규격	온도
조유액	비중	1.023 ± 0.002	15℃
	Brix	11.4 ± 0.3	15℃
	pH	7.0 ± 0.2	15℃
	지방	3.0 ± 0.3	15℃
	산도	0.08 ± 0.02	15℃
배양후	산도	0.55 ± 0.02	10℃
요구르트당액	Brix	16.7 ± 0.3	10℃
	비중	1.070 ± 0.002	10℃
조합액/저장액	산도	0.40 ± 0.02	10℃
	Brix	8.1 ± 0.3	10℃
	비중	1.024 ± 0.002	10℃
	지방	2.1 ± 0.2	10℃

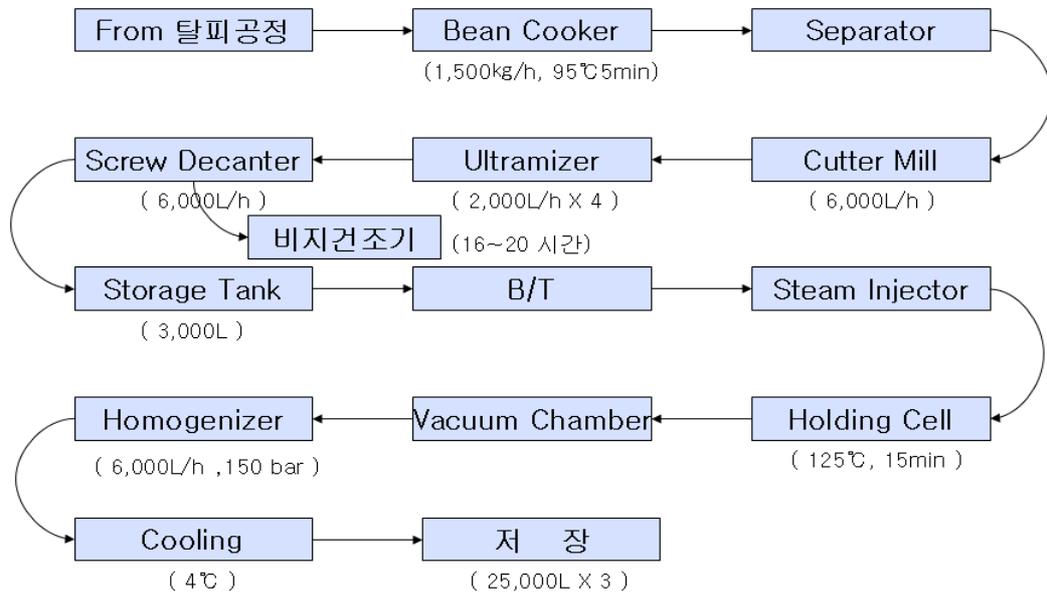
4. 제조공정도

가. 두유원액 제조공정도

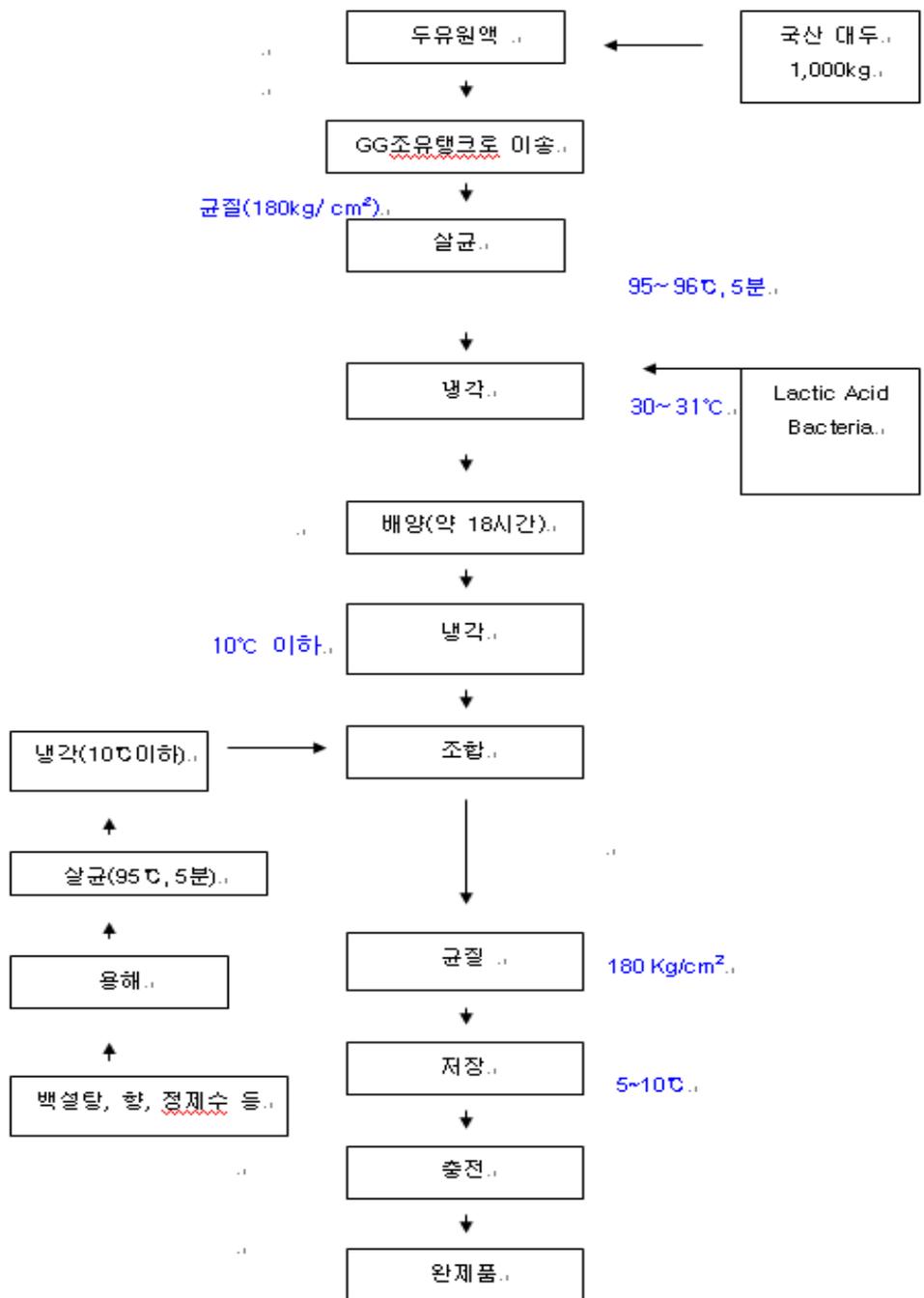
1) 탈피공정



2) 전처리공정



나. 두유발효유 제조공정도



5. 시제품 생산 일지

가. 조유액 제조

- 1) 국산대두 1,000kg를 투입하여 두유원액 5,700kg 생산
(Brix 10.65, 총고형분 9.14%)
- 2) 조유액(두유원액, 3,000kg)을 조유탱크로 이송
- 3) 95℃, 5분간 살균하여 30℃로 냉각한 후 배양탱크로 이송
- 4) 유산균주(B62, S12) 접종 및 배양

나. 배양액 조합탱크로 이송

- 1) 배양종료(약 16시간, 산도 0.55%) 후 교반기로 배양액 커드를 깨어 냉각
- 2) 냉각된 배양액 조합탱크로 이송

다. 당액 제조 후 조합탱크로 이송

- 1) 일정량의 정제수를 계량한 후 가온(50℃)
- 2) 백설탕을 계량/투입하여 용해(20분)
- 3) 향료 투입 후 교반, 살균/냉각 후 조합탱크로 이송

라. 완제품 생산

- 1) 조합액을 30분간 교반하여 균질화 과정을 거친 후 저장탱크로 이송
- 2) 저장액을 충전하여 제품 생산

6. 시제품 생산 결과

가. 제품 규격

- 1) 두유원액 이송 시 가수되어 총고형분 함량 10%에 조금 미달된 9.14% 두유원액 생산
- 2) 당액 규격 양호
- 3) 조합액 및 저장액 규격 양호

나. 문제점 및 보완사항

조합액 교반 시 두유의 특성상 버블이 많이 발생하였고, 균질 후 저장탱크로 이송되어 충전기 호퍼에서 공병(매일유업(주) 생산제품인 액티브 지지(발효유) PS 공병)에 150ml로 충전 시에도 버블 발생으로 인해 액량이 10~20ml 미달충진 되었다. 시제품 보존검사 시 공병리드를 개봉했을 때 15℃, 20℃에서 보존했던 제품은 버블이 굳어 있었다. 차후 제품화시킬 때 제시험생산을 실시할 경우 다음과 같은 문제점을 보완하여야 될 것으로 판단된다.

- 1) 첫째, 소포제를 투입하여 검토
- 2) 둘째, 두유배양액과 당액의 조합비율이 7:3이므로 두유배양액을 하향조정하여 배합비 검토
- 3) 셋째, 생산공장 재검토 : 매일유업(주) 광주공장의 경우 저장탱크에서 충전기로 내용물을 이송시킬 때 펌프를 사용하여 강압적으로 액을 이송시키는데 이부분에서도 버블이 많이 발생된다. 반면, 매일유업(주) 청양공장은 저장탱크가 2층에 있어 아래로 내용물이 자연낙하하면서 충전되므로 버블발생을 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

7. 시제품 이취성분 및 생리활성 분석

가. 이취성분 분석

Table 19는 앞에서 설명한 방법을 이용하여 최종적으로 생산된 시제품의 휘발성 향미성분들을 분석한 결과이다. 최종적으로 생산된 시제품은 다른 시료들에 비해 다양한 휘발성 향미성분들이 다량으로 분석되었다. 총 41개의 휘발성 향미성분이 분석되었는데, 대체적으로 과일향의 향기성분을 나타내는 휘발성 향미성분이 검출되었다. 이는 원료(향료)와 기타 가공조건들이 변화하였기 때문으로 사료된다. 특히, 사과향, 파인애플향 및 달콤한 향기 성분인 3-methylbutyl acetate, 2-methylbutyl acetate, butyl acetate, *l*-limonene, linalool 등이 다량으로 정량되었으나, 반면 2-ethylfuran이나 hexanal과 같은 지방산화로 인한 이취성분들은 동정되지 않았다.

Table 19. Relative peak areas of volatile compounds in fermented soymilk product.

No.	RI ^a	Compounds	R.P.A ^b	ID ^c
1	845	2-Pentanone	75.47	MS
2	848	2-Ethylfuran	29.37	MS/RI
3	854	Acetic acid	346.23	MS
4	877	Isobutyl acetic acid	220.10	MS
5	883	1,2-Propanediol	45.87	MS
6	891	Ethyl butyrate	583.72	MS/RI
7	899	Butyl acetate	386.21	MS/RI
8	921	2-Hexenal	347.65	MS/RI
9	929	2-Hexen-1-ol	73.96	MS/RI
10	930	1-Hexanol	65.67	MS/RI
11	935	3-Methybutyl acetate	2813.19	MS
12	936	2-Methybutyl acetate	1212.14	MS
13	942	2-Heptanone	261.32	MS/RI
14	958	1-Pentyl acetate	33.68	MS
15	975	Pentanoic acid	30.45	MS
16	988	Isobutyl butyrate	339.69	MS
17	992	Benzaldehyde	153.66	MS/RI
18	1006	1-Octen-3-ol	440.19	MS/RI
19	1014	2-Pentylfuran	121.34	MS/RI
20	1019	Butyl acetoacetate	1070.77	MS
21	1021	Ethyl hexanoate	110.53	MS
22	1027	cis-3-Hexen-1-yl acetate	431.08	MS
23	1033	Hexyl acetate	468.98	MS/RI
24	1047	<i>l</i> -limonene	1572.62	MS/RI
25	1051	Benzylalcohol	49.85	MS
26	1070	Isomyl butyrate	645.39	MS/RI
27	1071	n-Butyl-2-methylbutyrate	136.84	MS
28	1081	1-Octanol	271.93	MS/RI
29	1090	Allyl hexanoate	86.28	MS
30	1098	2-Nonanone	45.91	MS/RI
31	1106	Linalool	1076.24	MS/RI
32	1112	Isomyl isovalerate	474.66	MS
33	1161	4-Ethylphenol	35.86	MS
34	1169	1-Nonanol	52.25	MS
35	1190	Fenchyl alcohol	127.57	MS
36	1220	6-Octen-3-3,7-dimethyl-ol	40.77	MS
37	1238	2-Methyl-5-isopropenyl-2-cyclohexenone	39.71	MS
38	1261	2,6-3,7-dimethyl octadienal	90.64	MS
39	1286	2-Undecanone	29.27	MS/RI
40	1393	Tetradecane	20.97	MS/RI
41	1486	Ethyl undecanoate	53.12	MS

a: Retention indices were determined using n-paraffins C₇-C₂₂ as external references.

b: Average of relative percentage of peak area(%) = peak area of each compound / peak area of internal standard^c(50 μ l of 500ppm 1-Dodecanol) \times 100.

c: Tentative identification was performed as follows: MS/RI, mass spectrum was identical with that of Wiley mass spectrum database (1995) (HewlettPackard Co., Palo Alto, CA, USA), and retention index was consistent with that of the literatures(Kondjoyan and Berdague, 1996; Acree, 1997); MS, mass spectrum was consistent with that of Wiley mass spectrum database.

나. 시제품과 타사제품의 이소플라본 분포 비교

매일유업(주) 시제품과 국내 J사 제품, 그리고 일본 S사 제품의 두유발효유 시료의 isoflavone의 프로파일은 유의적인 차이를 보였다. 매일유업(주) 시제품의 aglycone 함량이 경쟁사보다 1mmol/g 정도 높았다. 매일유업 시제품의 전체 이소플라본 함량은 1.65 mmol/g로 J사의 1.24 mmol/g 보다는 높았으나 S사의 3.42 mmol/g 보다는 낮았다. 반면 aglycone 함량은 매일유업 제품이 1.42 mmol/g로 S사의 0.4 mmol/g 나 J사의 0.35 mmol/g 보다 1mmol/g 정도 높았다. S사의 경우 이소플라본의 beta-glucoside 형태가 많은 것으로 보아 삶은 콩을 위주로 사용하였으나 균주의 beta-glucosidase 활성이 낮은 것으로 판단되고, 또한, S사와 J사의 경우 malonyl 형태가 많은 것으로 보아 충분한 열처리가 진행되지 않은 것으로 사료된다. 지방의 추출수율은 서로 유의적인 차이가 없으나 18:3 n-3 지방산은 1.6~2% 차이를 보였다. 결과적으로 S사 제품의 18:3 n-3 지방산의 함량이 더 높은 함량을 보였으며, 또한 추출 수율에서도 매일유업 시제품 및 J사 시료에 비해 높은 추출 수율을 보였다.

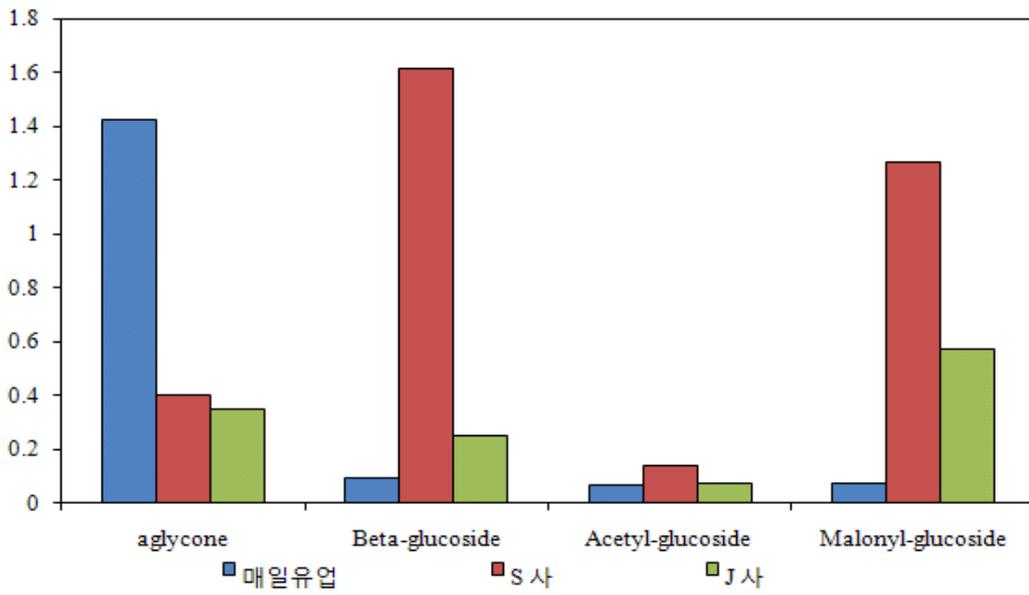


Fig. 39. Distribution of isoflavones in different manufacturing products(mmole/g).

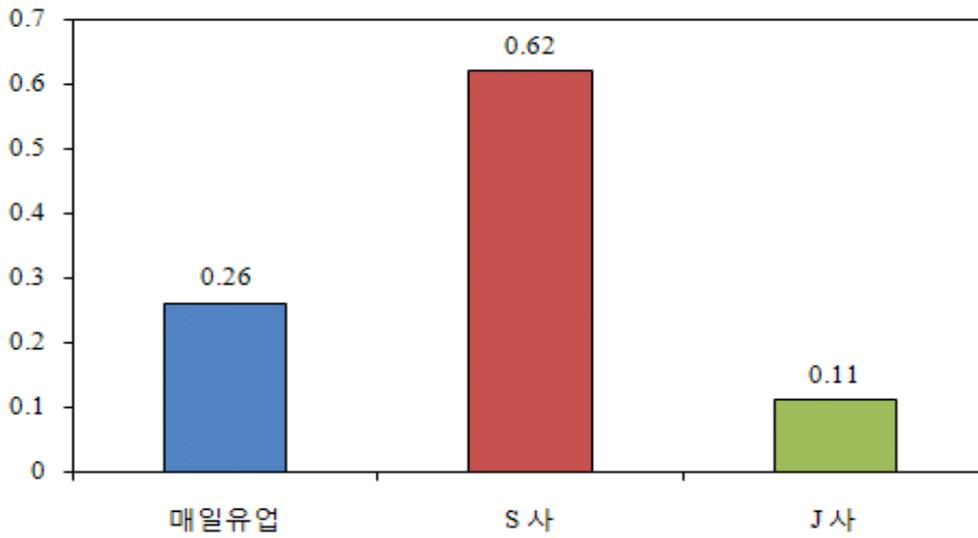


Fig. 40. Yield of fat extraction in different manufacturing products.

Table 20. Fatty acid compositions in 3 types of fermented soymilk.

FFA	매일 평균	soy평균	정석평균
16:0	11.5	10.3	10.9
18:0	4.0	4.0	4.0
18:1 cis	20.3	21.0	19.0
18:2 cis	53.9	55.9	55.4
18:3 n-3	10.3	8.7	10.7
total	100	100	100
SFA ²⁾	15.5	14.4	14.9
USFA ¹⁾	84.5	85.6	85.1
U/S ³⁾	5.5	6.0	5.7
N-3	10.3	8.7	10.7

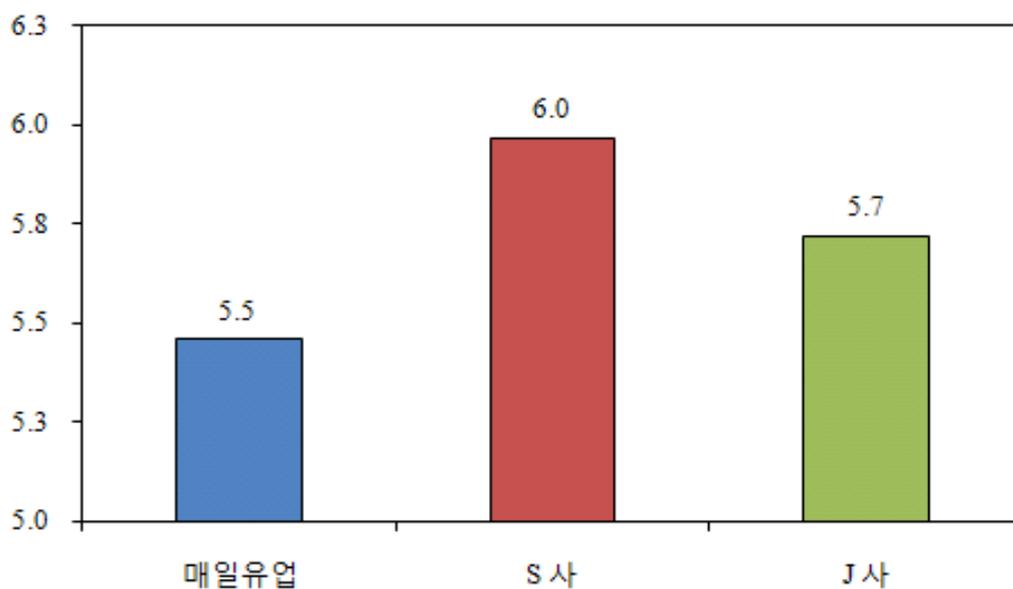


Fig. 41. Unsaturated/Saturated in different manufacturing products(U/S).

8. 시제품의 GMO 검증

가. 재료 및 방법

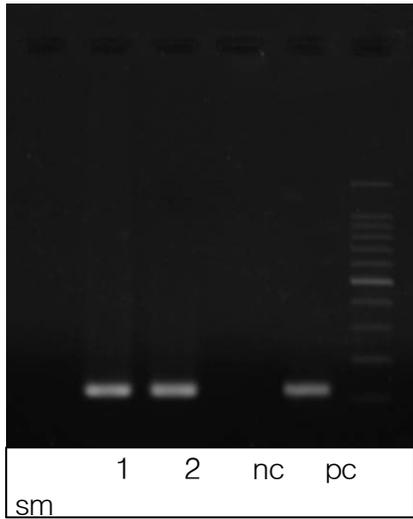
Sample	Liquids(3ml) + 65°C AP1 (10ml) + Rnase (20ul)	
Lysis	65°C / 60mins	
Centrifuge	3,000g / 10mins	
Precipitation	상등액(7ml) + Qiagen AP2 (2.5ml) => 15ml new tube	
Holding	Ice / 15mins	
Centrifuge	3,000g / 35mins	
Lilac column	상등액전체	
Centrifuge	3,000g / 5mins	
Mix	여과액(7ml) + AP3 (10ml) => 50ml new tube	
Spin column	전체액 원심분리 (3,000g / 5mins)	
Washing	AW (12ml) 첨가후 원심분리 (3,000g / 10mins)	
△ tube	Column을 50ml new tube	
Elution	65°C AE (500ul) 첨가후 5분 holding	2회 반복
Centrifuge	3,000g / 5mins	
Mix	Add AP3 1.5ml	
Spin column	650 μl 씩 4회 원심분리 (6,000g / 1mins)	
Washing	AW 500 μl 첨가 후 원심분리 (6,000g / 1mins)	
Washing	AW 500 μl 첨가 후 원심분리 (20,000g / 2mins)	
△ tube	1.5ml new tube	
Elution	65°C AE 50 μl 첨가 후 5분 holding	
Centrifuge	6,000g / 1mins	
PCR		RT-PCR
Electrophoresis		

나. 결과 및 고찰

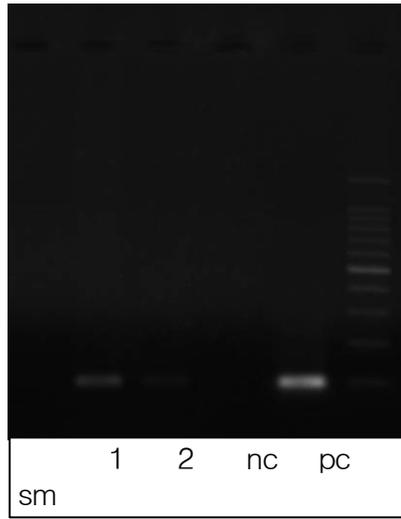
1) 범례 : 1. 수입산대두, 2. 국산대두, nc. 음성대조구, pc. 양성대조구, sm. 사이즈마커

2) 수입산 대두로 만든 두유원액과 국내산 대두로 시험생산한 두유원액의 GMO 분석을 실시한 결과 국내산 대두로 만든 시제품에선 RRS 구조 유전자가 발견되지 않았다.

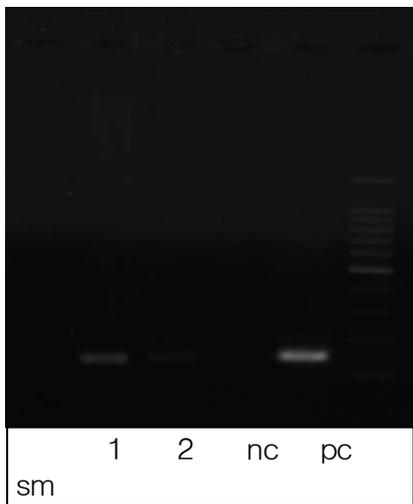
Lectin(대두 내재 유전자)



(P35S promoter)



NOS terminator



RRS(GMO 구조 유전자)

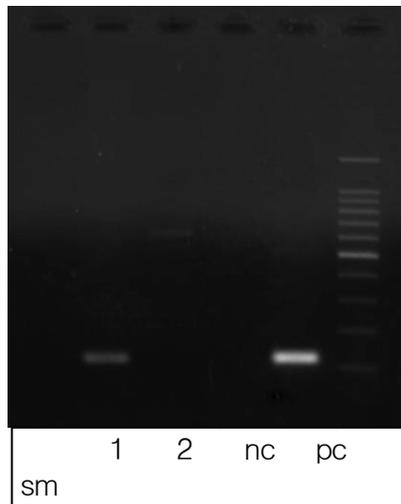


Fig. 42. The results of GMO verification.

제 7 절 유산균 동정

1. 재료 및 방법 - 매일유업(주)에서 분리한 균주 B62에 대한 동정을 실시하였다.

가. Genomic DNA의 분리

본 실험에서의 genomic DNA의 분리는 P. chagnaud의 방법을 약간 변경하여 진행하였고, 그 방법은 다음과 같다. 10ml의 modified MRS broth배지에 유산균주를 Overnight 배양하였고, cell pellet을 회수하기 위해서 2500rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 회수된 미생물에서 배지성분을 제거하기 위하여 PBS buffer(pH 7.2)를 10ml 첨가하여 다시 2500rpm에서 원심분리 하였다. 회수된 cell pellet을 -20℃에서 5시간 동안 보관 후, lysis buffer(lysozyme 10mg/ml, 1mM EDTA, 10mM Tris, pH 8) 400μl를 첨가하여 37℃에서 12시간 배양하였다. 배양이 완료된 후 12000rpm에서 원심분리하여 pellet을 남기고 상등액은 제거하고, 20mM(pH 8.0)의 Tris를 400μl첨가하여 튜브를 tapping하여 pellet을 완전히 현탁시킨 뒤 10%의 SDS용액을 40μl를 첨가하여 상온에서 30분간 더 배양하였다. 배양이 완료된 후 55μl의 NaCl를 첨가하고 4℃에 보관된 500μl의 phenol: chloroform: amylalcohol(25:24:1)를 첨가하여 앞뒤로 잘 섞어서 12000rpm에서 5분간 원심분리하였고, 그 상등액을 새로운 튜브에 취하였다. 새로운 튜브에 취해진 용액에서 genomic DNA의 회수를 위하여 isopropanol 600 μl를 첨가한 뒤 잘 섞어서 12000rpm에서 원심분리를 실시하였다. 원심분리가 완료되면 DNA pellet을 남겨두고 상등액은 제거하였다. 70%의 washing 용액(Ethanol 70%)을 1ml 첨가한 후 원심분리를 실시하여 DNA pellet을 형성시켰고, 3반복 진행하였다. DNA pellet의 건조는 상온에서 이루어졌으며, RNA를 제거하기 위하여 ml 당 30g의 RNase가 함유된 TE(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.6)용액을 30μl를 첨가한뒤 37℃의 항온수조에서 30분간 배양하였다. 배양 완료 후 1μl를 1% 아가로스젤에 로딩하여 genomic DNA의 유무를 확인하였다.

나. 프라이머의 준비

본 실험에서 사용된 프라이머는 bifidobacteria의 genus level동정과 species level 동정을 위하여 디자인되었다. 먼저, bifidobacteria의 genus level 동정을 위하여 사용된 프라이머는 Bif-F와 Bif-R(H-S. Kwon et al., 2005)이다. Bif-F의 oligonucleotides(5'→3')는 ctc ctg gaa acg ggt gg이며, Bif-R oligonucleotides(5'→3')는 ggt gtt ctt ccc gat att cta ca이다. Species level의 동정을 위하여 사용된 프

라이머는 유니버설프라이머인 27F 와 1492R(Mitsuo Sakamoto, 2003)와 *B.pseudocatenulatum* 의 16S rRNA의 부분동정을 위하여 Pcate 16F와 Pcate 16R(Reetta M. Satokari et al., 2003)을 사용하였다. 각 프라이머의 oligonucleotides(5'→3')는 27F는 aga gtt tga tcc tgg ctc ag이고, 1492R은 tac ggt tac ctt gtt acg act t이며, Pcate16F는 cgg atg ctc cga ctc ct이고, Pcate16R은 cga agg ctt gct ccc gat이다.

다. PCR 반응

PCR반응은 Sul, Su-Yeon(2007)의 방법을 약간 변형하여 수행하였으며, authorized thermal cycler(effendorf)에 의해서 수행되었다. 반응에 사용된 premix는 AccuPower PCR Premix K-2012(bioneer)를 사용하였으며, 용량은 20 μ l이다. DNA의 농도는 200ng을 사용하였고, 각각의 프라이머는 100pmol 농도로 사용하였다. 반응조건은 프라이머의 종류에 따라 다음과 같이 진행하였다. 먼저, 균주를 genus level에서 동정하기 위해서 사용된 g-Bifid-F와 g-Bifid-R의 반응조건은 94 $^{\circ}$ C-5분간 먼저 반응시킨 후, 30cycle로 94 $^{\circ}$ C-1분, 53 $^{\circ}$ C-30초, 72 $^{\circ}$ C-30초로 진행하였다. 마지막으로 72 $^{\circ}$ C-6분간 진행하여 반응을 종료하였으며, 최종 반응산물의 확인은 1% agarose gel을 이용하여 확인하였다(Sul, Su-Yeon, 2007).

2. 결과 및 고찰

본 실험의 PCR 반응산물의 염기서열 분석은 프라이머 Bif-F와 Bif-R를 사용하여 진행한 샘플에 대해서 진행하였다. 샘플준비는 PCR 반응산물을 AccuPrep PCR Purification Kit(bioneer)을 이용하여 정제한 방법은 다음과 같다. 1) PCR 반응 용량의 5배에 대한 PB buffer를 첨가한 후 binding column 튜브를 2ml 튜브에 꽂아둔 후, 반응산물(20 μ l)을 PB buffer가 담겨진 튜브로 첨가했다. 2) 반응산물이 binding column 튜브를 통과할 수 있게 원심분리를 약 1분간 실시했다. 3) 튜브를 통과한 액체는 버리고, 새로운 2ml 튜브에 binding column 튜브를 꽂았다. 4) binding column 튜브에 결합된 DNA를 washing하기 위하여 WB buffer 500 μ l를 첨가한 뒤 1분간 원심분리를 실시했으며, 이 방법은 3번 반복하여 실시했다. 5) 원심분리를 2분간 실시하여 binding column 튜브에 결합된 DNA를 건조시켰다. 6) binding column 튜브를 새로운 1.5ml 튜브에 결합시킨 후, 30 μ l의 EL buffer를 첨가하여 DNA를 추출했다. 추출된 DNA의 양을 260nm의 흡광도에서 측정한 뒤 염기서열분석을 (주) 마크로젠에 의뢰하였다.

가. PCR 반응

본 실험에 사용된 *Bifidobacteria*의 genomic DNA를 분리한 후 1%의 agarose gel에 로딩한 결과 밴드를 확인할 수 있었다. 먼저, bifidobacteria를 genus level에서 동정하기 위해서 사용된 프라이머 Bif-F와 Bif-R를 이용한 PCR반응에서는 사이즈가 약 500bp의 단일밴드를 확인할 수 있었다. 종차원에서 동정을 위하여 사용된 프라이머 Pcate 16F와 Pcate 16R를 이용한 반응에서도 약 250bp의 단일밴드를 확인할 수 있었으며, 유니버셜프라이머인 27F와 1492R에서도 약 1500bp의 단일밴드를 확인할 수 있었다.

나. 염기서열 분석

*Bifidobacteria*의 종을 동정하기 위해서 유니버셜프라이머인 27F와 1492R을 사용하여 증폭된 단일밴드의 염기서열을 분석한 결과 1363bp로 나타났고 염기서열은 Table 21에 나타나 있으며, chromatogram은 Fig. 45와 같다.

다. 염기서열의 블라스팅

분석이 완료된 염기서열에 대해서는 균주동정을 위하여 RDP analysis tools(<http://rdp.cme.msu.edu/>)을 이용하였고, 결과는 *Bifidobacterium pseudocatenulatum*과 가장 일치도가 높게 나타났으며, Fig. 46에 결과를 나타냈다.

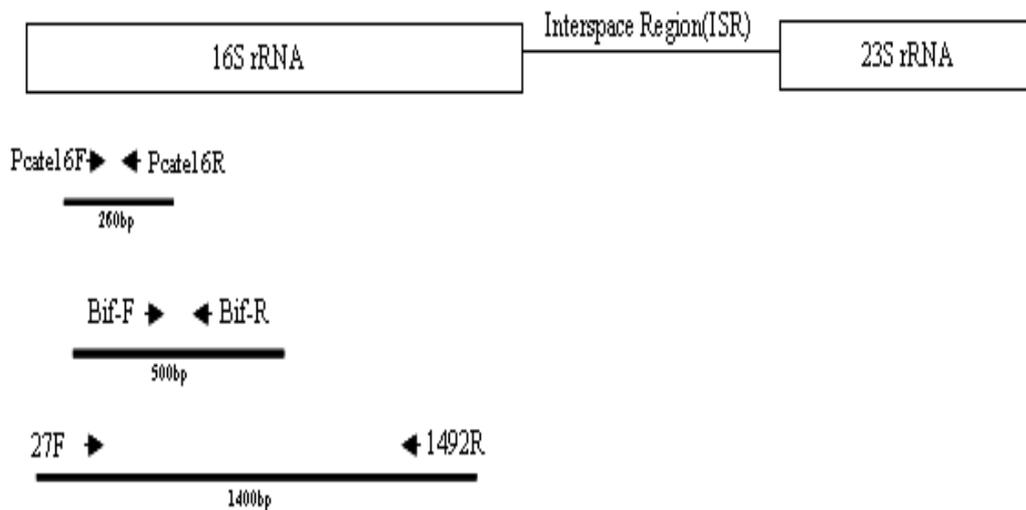


Fig. 43. Alignment of the approximate location of the PCR primer and amplicon sizes of of each PCR product.

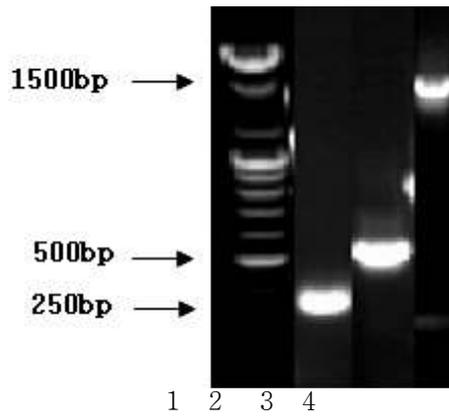


Fig. 44. Agarose gel electrophoresis of PCR products of each primer.

Lane 1: 100bp ladder, lane 2: 프라이머 Pcate 16F, 16R에 의해서 증폭된 산물(크기 약 260bp), lane 3: 프라이머 Bif-F, R에 의해서 증폭된 산물(크기 약 500bp), lane 4: 유니버설프라이머 27F와 1492R에 의해서 증폭된 산물(크기 약 1400bp).

Table 21. The 16S rRNA sequence(5'– 3')of strain B62 by analyzing PCR products amplified with universal primers, 27F and 1492.

CTTTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCA
AGTCGAACGGGATCCATCAGGCTTTGCTTGGTGGTGAGAGTGGCGAACGGGTGAG
TAATGCGTGACCGACCTGCCCCATACCCGGAATAGCTCCTGGAAACGGGTGGTA
ATGCCGGATGCTCCGACTCCTCGCATGGGGTGTCTGGGAAAGATTATATCGGTATGG
GATGGGGTTCGCGTCCATCAGGTAGTCGGCGGGGTAACGGCCACCGAGCCTACG
ACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCA
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATG
CAGCGACGCCGCGTGCGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCGCTTTTGATCGG
GAGCAAGCCTTCGGGTGAGTGTACCTTTCGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA
GGGCTCGTAGGCGGTTTCGTTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAACGGTGGAT
CTGCGCCGGGTACGGGCGGGTGGAGTGCGGTAGGGGAGACTGGAATTCGGGTG
TAACGGTGAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCT
GGGCCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCACGG
GTTCCGTGTCGGAGCTAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAG
GCTAAAACCTCAAAGAAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGCGGAGCATGCGGATT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACAGCCGTA
GAGATATGGCCTCCCTTCGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCT
CGTGTTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCCTGTGTT
GCCAGCACGTCATGGTGGAACTCACGGGGGACCGCCGGGTCAACTCGGAGGAA
GGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTACGTCCAGGGCTTCACGCATGCTA
CAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACACGGCGACGTGGAGCGGATCCCTGAAAAC
CGGTCTCAGTTCGGATTGGAGTCTGCAACCCGACTCCATGAAGGCGGAGTCGCTA
GTAATCGCGGATCAGCAACGCCGCGGTGAATGCGTTCCCGGGCCTTGTACAC

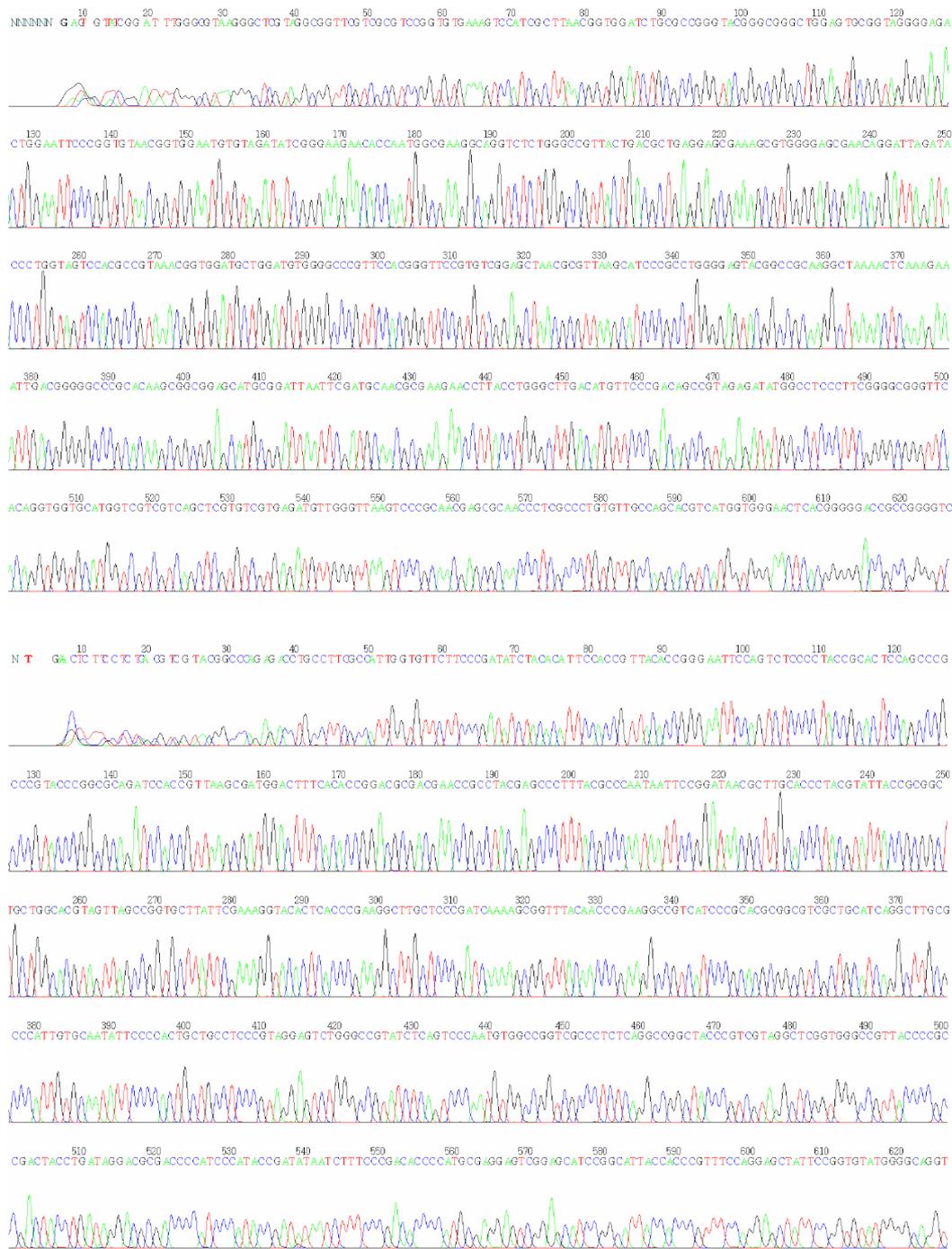


Fig. 45. The chromatograms of 16S rRNA sequence of strain B62 by analyzing PCR products amplified with universal primers, 27F and 1492R.

domain Bacteria (20) (match sequences)				
phylum Actinobacteria (20)				
class Actinobacteria (20)				
subclass Actinobacteridae (20)				
order Bifidobacteriales (20)				
family Bifidobacteriaceae (20)				
genus Bifidobacterium (20)				
S000340193	not_calculated	0.928	1173	uncultured bacterium (human infant) S7B; AF253366
S000340194	not_calculated	0.956	1283	uncultured bacterium (human infant) S7A; AF253367
S000340199	not_calculated	0.938	1277	uncultured bacterium (human infant) L14B; AF253372
S000340200	not_calculated	0.943	1172	uncultured bacterium (human infant) L157C; AF253373
S000340539	not_calculated	0.913	1158	uncultured Bifidobacterium sp. 13D; AF275884
S000340548	not_calculated	0.943	1238	uncultured Bifidobacterium sp. 9B; AF275893
S000394075	not_calculated	0.941	1346	Bifidobacterium catenulatum; ATCC27539; AF432082
S000414116	not_calculated	0.888	1411	Bifidobacterium dentium (T); ATCC 27534; D86183
S000414120	not_calculated	0.983	1413	Bifidobacterium pseudocatenulatum (T); JCM 1200; D86187
S000436343	not_calculated	0.892	1081	Bifidobacterium catenulatum (T); ATCC 27539; M58732
S000468747	not_calculated	0.950	1345	Bifidobacterium sp. h12; AY856700
S000637330	not_calculated	0.964	1257	uncultured bacterium; B982; DQ326030
S000784400	not_calculated	0.934	1295	uncultured bacterium; RL181_aah41c09; DQ798349
S000805615	not_calculated	0.951	1190	Bifidobacterium longum bv. Infantis; KLD5 2.0611; EF203955
S000811658	not_calculated	0.977	1397	uncultured bacterium; SJTU_E_02_51; EF399717
S000811978	not_calculated	0.986	1395	uncultured bacterium; SJTU_E_08_10; EF400037
S000812120	not_calculated	0.981	1395	uncultured bacterium; SJTU_E_09_91; EF400179
S000812553	not_calculated	0.986	1395	uncultured bacterium; SJTU_E_15_73; EF400612
S000812572	not_calculated	0.981	1393	uncultured bacterium; SJTU_E_16_05; EF400631
S000817285	not_calculated	0.986	1396	uncultured bacterium; SJTU_G_02_53; EF405344

Fig. 46. The similarity levels of 16S rRNA sequence of strain B62 obtained by RDP analysis tools.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연차별 연구개발 목표달성도

1. 1차년도 목표달성도

구분	세부연구목표	달성도	평가의 착안점 및 기준
1차 년도	○ 유산균주 탐색 및 동정 - 두유배지에서의 성장력 및 산생성능이 우수한 유산균과 보존 중 후산발효능이 약한 유산균 탐색 - 두유의 이취성분 농도를 배양과정 중에 저감화 시키는 유산균 탐색 - Phytase, α-galactosidase 그리고 β-glucosidase 생성능이 우수한 유산균 탐색	100% 100% 100%	- 두유배지에서의 성장력 및 산생성능이 우수한 유산균과 보존 중 후산발효 능력이 약한 유산균 선발 여부 - 두유의 이취성분 농도를 배양과정 중에 저감화 시키는 유산균 선발 여부 - Phytase, α-galactosidase 그리고 β-glucosidase 생성능이 우수한 유산균 선발 여부
	○ 두유발효유의 향미성분 분석 - 휘발성 향미성분, 유기산 및 이취성분 추출법 및 분석법 확립 - 휘발성 향미성분, 유기산 및 이취성분의 동정 및 정량 - 향기활성성분의 분석	100% 100% 100%	- 향미성분 추출법 및 분석조건 확립 여부 - 정성 및 정량 분석 여부 - 향기활성성분 분석 여부
	○ 두유발효유로부터 지방산 분석 - BF ₃ 및 sodium methoxide이용 추출법 연구 ○ 가공공정에 따른 지방산 정성 및 정량 분석 - GC/FID, GC/MS, 내부표준물질 이용 정량 ○ Lipoxygenase 활성 측정법 확립 ○ 가공 공정에 따른 lipoxygenase 활성도 분석	100% 100% 100%	- 지방산 추출법 및 분석조건의 민감도 및 재현성 확보 - 가공 공정에 따른 지방산화 정도 판별 - Lipoxygenase 활성변화여부
	○ 대두발효유 가공 조건에 따른 항산화 활성 대사체 분석 - 대두발효유로부터 NMR분석용 대사체 추출 방법 확립 - 대두발효유 추출물의 항산화 활성 분석법 확립 - NMR분석 대사체의 다변량통계분석	100% 100% 100%	- 대사체 추출 방법의 적합성 - 항산화 활성 평가의 적합성 - 대사체 차이 규명 여부

2. 2차년도 목표달성도

구분	세부연구목표	달성도	평가의 착안점 및 기준
2차 년도	<ul style="list-style-type: none"> ○ 제품화를 위한 생산공정 개발 <ul style="list-style-type: none"> - 선별된 유산균주의 배양조건 검토 - 이취 저감화 생산공정 검토 - 지방산화 억제 생산공정 검토 - 시제 생산 	100% 100% 100% 100%	<ul style="list-style-type: none"> - 배양조건 확립 - 이취저감화 생산공정 확립 - 지방산화억제 생산공정 확립 - 시제 생산 수행
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 가공공정에 따른 두유발효유의 이취성분분석 및 저감화 <ul style="list-style-type: none"> - 휘발성 향미성분, 유기산 및 이취성분의 분석 - 후산발효 및 이취성분 저감화 - 지방산화물과 이취성분과의 관계 규명 	100% 100% 100%	<ul style="list-style-type: none"> - 가공공정에 따른 향미성분 및 이취성분의 정성 및 정량적 비교분석 여부 - 이취성분의 저감화 여부 - 지방산화물, 이취성분의 관계 규명 여부
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 두유발효유로부터 이소플라본 추출 및 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 용매 추출법의 최적화를 통한 발효유 matrix 영향 최소화 ○ HPLC를 이용한 정성 및 정량 	100% 100%	<ul style="list-style-type: none"> - 이소플라본 추출법 및 분석 조건 확립 - 정성 및 정량 분석 여부
	<ul style="list-style-type: none"> ○ 대두발효유 가공 조건에 따른 항산화 활성 대사체 분석 <ul style="list-style-type: none"> - 대두발효유 추출물의 항염증 활성 분석법 확립 - NMR분석 대사체의 다변량통계분석 (PCA, PLSR) 	100% 100%	<ul style="list-style-type: none"> - 항산화 활성 평가의 적합성 - 대사체 차이 규명 여부

3. 연구성과

가. 논문 및 포스터 발표

- 1) 논문 게재 확정(2008년 10월호 게재 예정)
Distribution of Isoflavones and Fatty Acids in Soymilk Fermented with Lactobacilli, Bifidobacteria, or Streptococci,
Food Science & Biotechnology
- 2) 논문 투고(심사 진행 중)
Metabolic profiling and free-radical scavenging activities of fermented soymilk during fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**
- 3) 포스터 발표
Study on the distribution of isoflavone and fatty acid in fermented soymilk. **한국식품과학회**(2007. 6)

나. 지적재산권

- 1) 특허출원(출원번호 2007-0140066)원료, 스트렙토코커스속 유산균 스타터를 이용한 두유발효유 및 그 제조방법

제 2 절 관련분야에의 기여도

1. 기대 효과

가. 기술적 측면

- 1) 유산균 탐색 및 제품화
- 2) 두유발효기술의 응용 및 체계적 활용을 통한 산업화
- 3) 국내외 기술이전을 통한 기술우위 확보
- 4) 두유발효유의 향미성분 분석 및 이취개선
- 5) Emulsion destabilization을 이용한 미량 성분 분석법 확립
- 6) 이취성분 저감화 공정 확립
- 7) 두유발효유의 지방산화 분석 및 이소플라본 연구
- 8) 지방산화 기전확인을 통한 이취 생성 최소화 가능성 제시
- 9) 이소플라본 종류 및 함량 변화의 과학적 근거 제시

나. 경제적·산업적 측면

- 1) 두유발효유 제품화를 통한 국산대두 소비촉진 및 농가 소득 증대
- 2) 고부가가치 제품 생산을 통한 식품업계의 수익창출 및 활성화
- 3) 고 기능성 식품 섭취에 의한 국민 건강증진 기여
- 4) 생리활성 성분의 체계적 분석을 통한 두유발효유의 기능성 제고
- 5) 국내 및 국제적인 경쟁력을 갖는 고 기능성 두유발효유 생산

제 5 장 연구개발 결과의 활용 계획

1. 연구 결과 활용 방안

가. 풍미 및 생리활성이 개선된 고 기능성 두유발효유를 개발하여 출시함으로써 자사의 이익창출 및 국민건강 증진에 기여할 것으로 판단된다.

나. 지식 재산권 취득

이취 저감화 및 생리활성을 개선시킨 두유발효유 개발에 적합한 유산균주에 대하여 지적재산권을 가지고, 또한 새로운 두유 발효기술을 보유함으로써 고부가가치 창출을 위한 경쟁력을 보유한다.

다. 기술이전

국산 대두 소비 촉진을 위한 효율적인 가공처리 및 발효기술 전수하고, 본 연구에서 개발한 유산균주 및 발효기술을 상업화하여 다양한 산업분야에서의 활용도 증진에 기여한다.

라. 제품 고급화

값싼 수입산 대두의 가격경쟁력에 밀린 국산 대두의 부가가치를 상승시켜 고기능성, 고급화 제품을 출시하여 GMO, 과다한 농약살포 등의 우려가 있는 수입산 농산물을 사용한 제품과 차별화시킬 필요성이 대두된다.

마. 시장 개척

국내 형성되지 않은 두유발효유 시장을 개척하고 선점함으로써 해마다 감소하는 음료, 발효유 소비량을 증가시키는데 이바지한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 콩 가공 및 이용분야의 신기술

가. 콩(대두) 분말의 미립화 기술

콩 분말 제품은 건습법, 반 건습법의 기존 공정이 개선되어 분말의 품질이 크게 향상되었을 뿐만 아니라 고주파 자기장 탈취, 초미립 분쇄, 자동 과립제조기술 및 효소 분해 기술 등의 하이테크 기술이 적용되어 에너지 절약, 용해성 개선, 원가 절감, 품질 향상 측면에 큰 발전이 있다. 일반 콩 분말이 가장 작은 입자가 200mesh를 겨우 통과하는 반면 미립 대두분은 300~1500mesh의 체를 통과할 수 있다. 미립화 기술로 제조된 대두분은 우수한 분산성과 표면 특이성을 가지며, 특히 효소활성이 살아있는 무변성의 미립 대두분(전지활성대두분)은 두유와 두부 제조, 육류 및 유제품에 이용되고 있다.

나. 단백질 공학 기술

콩 단백질의 겔 형성능, 유화능, 보습성 등 물성을 조정하기 위한 물리적 및 효소적 공정의 개발을 비롯하여, 단백질의 가수분해를 통한 조미소재 개발, 생리활성을 보유한 콩 펩타이드를 대량 생산하기 위한 효소 분해공정의 산업화 등 단백질 공학 분야의 연구가 활발히 진행되고 있다.

다. 기능성 강화 기술

세계적인 콩단백의 메이커인 미국의 센트럴소야사는 물추출법으로 이소플라본이 풍부히 함유된 기능성 농축콩단백을 개발하여 「소야리치」란 상품명으로 발매했다. 이 제품은 분말음료 믹스나 뉴트리션바(영양보급용 스낵) 및 시리얼에 고품질의 단백질과 함께 높은 수준의 이소플라본을 강화할 수 있다. 최근 일본에서는 콩 이소플라본 함유량이 많은 차 제품의 판매가 증가하고 있으며 특히 여성들을 겨냥한 드링크 제품에 많이 이용되고 있다.

라. 건강보조식품으로서의 이용

콩의 기능성 성분 중 가장 주목받고 있는 것이 이소플라본이다. 콩은 이소플라본을 함유한 소수의 식물 중 그 함량이 높아 0.1~0.4%를 함유하고 있다. 특히 콩

배축의 이소플라본 함량은 3%로 높아 유럽의 쏘이라이프사, 일본의 후지꼬사는 배축으로부터 아이소플라본을 추출하여 제품화하였으며, 미국의 ADM사는 농축 콩단백 제조사의 부산물인 당시럽으로부터 이소플라본을 제조하고 있다. 일본의 기꼬만사는 최근 체내 흡수성이 높은 콩 이소플라본 아글리콘(비당체성분)이 30% 이상 함유된 건강식품소재 「소이악트」를 개발하였는데, 누룩균 발효로 미리 당을 분리한 아이소플라본 아글리콘을 주성분으로 삼는 소재이다. 일본의 콩 아이소플라본 시장은 규모가 80억엔 정도인 것으로 집계되고 있다.

마. 기타 콩 가공분야의 신기술

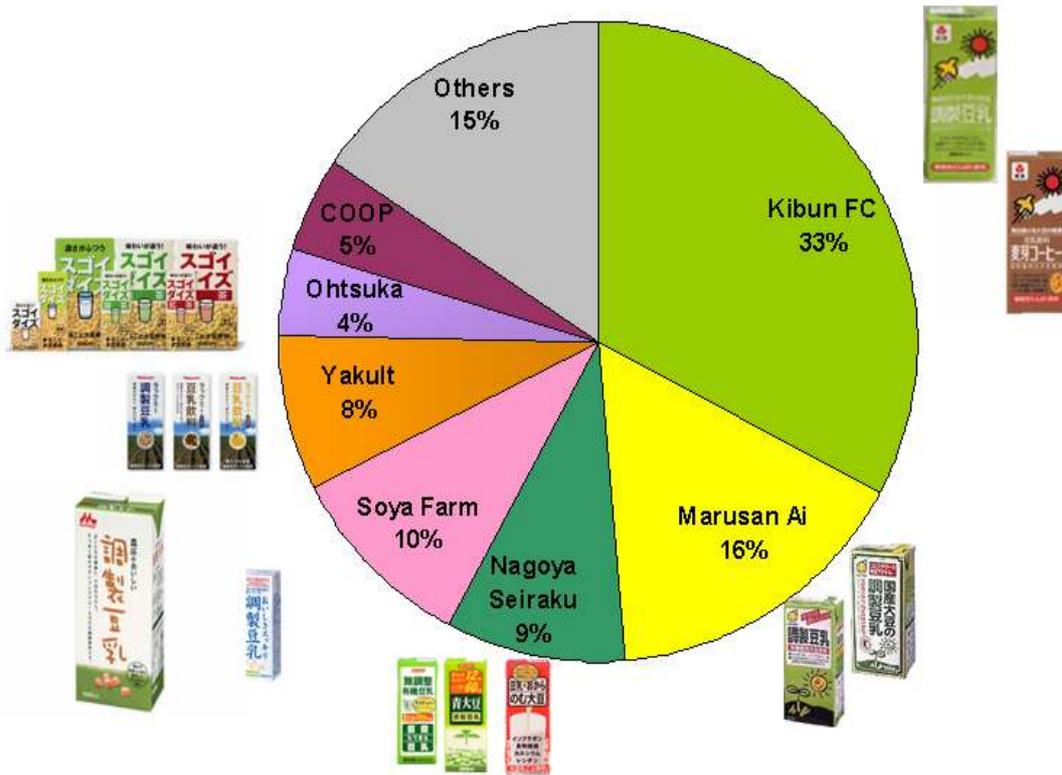
막분리 기술은 콩의 기능성 식품 개발에 크게 영향을 끼친 기술로서 콩 단백질의 분리와 회수, 올리고당 추출, 인지질 정제 분야에서 활용되고 있다.

미세 캡슐화 기술은 용도가 다양하고 발전 속도가 빠른 신기술이다. 이 기술은 고체, 액체, 혹은 기체물질을 반투과성 혹은 밀폐 캡슐 안에 포장하는 과정으로 캡슐의 크기는 일반적으로 직경 5~299 μm 이다. 미세 캡슐화 기술은 물질의 상태를 변경하여 민감한 성분을 보호하며, 휘발성을 낮추고 활성성분을 격리시켜 안정화시킬 수 있을 뿐만 아니라 불용성 성분을 혼합하는 목적으로도 이용된다. 이 기술은 콩 가공 중 분말 유지, 분말 인지질, 생리활성 물질의 캡슐화에 응용될 것으로 전망된다.

2. 일본 두유시장 점유율

가. 자료출처 : Fuji Keizai(2007)

나. Total segment sales : 39,300 million Yen



제 7 장 참고문헌

Abd El-Gawad IA, El-Sayed EM, Hafez SA, El-Zeini HM, Saleh FA. Inhibitory effect of yoghurt and soya yoghurt containing bifidobacteria on the proliferation of Ehrlich ascites tumour cells in vitro and in vivo in a mouse tumour model. *Br J Nutr* (2004)92:816.

Allaoua Achhour, Joyce Irene Boye, Youness Zamani. (2006). Identification of volatile compounds in soymilk using solid-phase microextraction-gas chromatography. *Food Chemistry*, 99, 759-766.

Badenhop, A. F. and Wilkens, W. F. (1996). The formation of 1-octen-3-ol in soybeans during soaking. *Journal of American Oil Chemists Society*, 46, 179-182.

Belton PS, Colquhoun IJ, Kemsley EK, Delgadillo I, Roma P, Dennis MJ, Sharman M, Holmes E, Nicholson JK, Spraul M. Application of chemometrics to the ¹H NMR spectra of apple juices: discrimination between apple varieties. *Food Chem* (1998)61:20713.

Brescia MA, Caldarola V, de Giglio A, Benedetti D, Fanizzi FP, Sacco A. Characterization of the geographical origin of Italian red wine based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations. *Anal Chim Acta* (2002)458:17786.

Brunton, N. P., Cronin, D. A. and Monahan, F. J. (2001). The effects of temperature and pressure on the performance of Carboxen/PDMS fibers during solid-phase microextraction (SPME) of headspace volatiles from cooked and raw turkey breast. *Flavour Fragrance Journal*, 16, 294-302.

Chang, S. S., Smouse, T.T., Krishnamurthy, R.G., Mookherjee, B. D., and Reddy, R.B. (1966). Isolation and identification of 2-pentylfuran as contributing to the reversion flavor of soybean oil. *Chemistry Industry*, 19, 26.

Chien HL, Huang HY, Chou CC. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria.

Food Microbiol (2006)23:7728.

Chien, J. T., Hsieh, H. C., Kao, T. H., & Chen, B-H. (2005). Kinetic model for studying the conversion and degradation of isoflavones during heating. *Food Chemistry*, 91(3), 425–434.

Choi HK, Yoon JH, Kim YS, Kwon DY. Metabolomic profiling of Cheonggukjang during fermentation by ¹H NMR spectrometry and principal components analysis. *Process Biochem* (2007)42:2636.

Choi Y. B., Sohn H. S., (1998), Isoflavone Content in Korean Fermented and Unfermented Soybean Foods, *Korean J. Food SCI. Tech.*, Vol. 30, No. 4, 745–750.

Coulibaly, K. and Jeon, J. J. (1992). Solid-phase extraction of less volatile flavor compounds from ultrahigh-temperature processed milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 612–616.

Coward, L., Smith, M., Kirk, M., & Barnes, S. (1998). Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 68(6), 1486–1491.

Duarte I, Barros A, Belton P, Righelato R, Spraul M, Humpfer E, Gil AM. High resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. *J Agric Food Chem* (2002)50:247581.

Eisen, B., Ungar, Y., & Shimoni, E. (2003). Stability of isoflavones in soy milk stored at elevated and ambient temperatures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(8), 2212–2215.

Eriksson L, Johansson E, Kettaneh-Wold N, Wold S. Multi- and megavariate data analysis. Ume, Sweden: Umetrics Academy (2001).

Hendrich S, Wang GJ, Xu X, Tew BY, Wang HJ, Murphy PA. Human bioavailability of soy bean isoflavones. pp. 150–156. In: *Influences of Diet, Dose, Time, and Gut Microflora*. Shibamoto T (ed). American Chemistry Society Symposium Series, Washington DC, USA (1998).

Hendrich, S., Wang, G. J., Lin, H. K., Xu, X., Tew, B. Y., Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1999). Isoflavone metabolism and bioavailability. In A. M. Papas, Antioxidant status, diet, nutrition, and health, (pp. 211–230). Boca Raton FL: CRC press.

Hendrich, S., Wang, G. J., Xu, X., Tew, B. Y., Wang, H. J., & Murphy, P. A. (1998). Human bioavailability of soy bean isoflavones. In T. Shibamoto, Influences of diet, dose, time, and gut microflora, (pp. 150–156). Washington DC: American Chemistry Society Symposium Series.

Hoke, K., Houka, M., Prchov, J., Gabrovsk, D., Vaculov, K., & Paul, I. (2007). Optimisation of puffing naked barley. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1016–1022.

Hsieh ML, Chou CC. Mutagenicity and antimutagenic effect of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Int J Food Microbiol* (2006)111:437.

Hwang, K. T., Kim, J. E., Park, J. N., & Yang, J. S., (2007). Effects of roasting, powdering and storing irradiated soybeans on hydrocarbon detection for identifying post-irradiation of soybeans. *Food Chemistry*, 102(1), 263–269.

Im, M. H., Choi, J. D., & Choi, K. S. (1995). The oxidation stability and flavor acceptability of oil from roasted soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry and Biotechnology*, 38(5), 425–430.

In - Soo Kong, Jung - Soo Lee, Yong - Joon Chung, In - Deok Lew, Doo - Whna Oh and Ju - Hyun Yu. (1987). Lactic Acid Fermentation of Soymilk by Mixed Cultures of *Lactobacillus acidophilus* and *Saccharomyces uvarum*. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 19(4), 355–360.

Jae-Hyun Jeoung. (1998). Flavor acceptability of lactic fermented soy milks. *Chungju National University*, 33(2), 779–784.

Kang S. K., Kang S. K., Chung H. J., (1998), Phytase-producing Microorganisms and Their Effects on the Fermentation of Soybean and Corn Meals. -Isolation of Phytase-producing Microorganisms and Conditions for Enzyme Production-, *Kor. J. Appl. Microbiol.* Vol. 16, No. 6, 433–473.

Kevin, M., Baraem, I., Carlos, M. C., & Kirby D. H. (2006). Heat and pH effects on the conjugated forms of genistin and daidzin isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (20), 7495 –7502.

Kim, H. W., Chung, S. Y., Woo, S. J. (1999). Studies on the physicochemical characteristics of sesame with roasting temperature. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 31(5), 1137 –1143.

Kim, J. S., Kim, J. G., & Kim, W. J. (2004). Changes in isoflavone and oligosaccharides of soybeans during germination. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 36(2), 294–298.

Klein, B. P., Perry, A. K., & Adair, N. (1995). Incorporation soy proteins into baked products for use in clinical studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 125, 666– 674.

Kyung – Hee Kim and Young – Tae Ko. (1987). Study on Growth and Acid Production by Lactic Acid Bacteria in Soy Milk. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 19(2), 151–165.

Lee Jong–Ho, My–Hye Kim and Sang–Sun Im. (1991). Antioxidative Materials in Domestic Meju and Doenjang. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20(2): 148~155

Lee S. Y., Lee J. E., Park M. J., Kwon Y. S., Studies on the Growth Characteristics of Bifidobacteria, Organic Acids and n–hexanal Contents During the Fermentation of Enzyme Treated Soy Yogurt, (1998), *Korean J. Soc. Food Sci.*, Vol. 14, No 5.

Lee, J. H, Renita, M, Fioritto, R. J., St. Martin, S. K., Schwartz, S. J., & Vodovotz, Y. (2004). Isoflavone characterization and antioxidant activity of Ohio soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9), 2647–2651.

Lee, J. H., Kang, J. H. and Min, D. B. (2003). Optimization of solid–phase microextraction analysis of headspace volatile compounds in Kimchi, a traditional Korean fermented vegetable product. *Journal of Food Science*, 68, 844–848.

Lee, S. J., Chung, I. M., Ahn, J. K., Lee, S. K., Kim, S. H., & Yoo, N. H. (2002). Variation in antioxidative activity of soybean (*Glycine max* L.) varieties with crop year and duration of storage time. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 11(6), 649–653.

Lew, In-Duk. (1997). Effect of Proteolytic enzymes on the off flavor of Soybean Products. *Chungju National University*, 32(2), 613–623.

Liu, K. (1997). Soybeans, chemistry, technology and utilization. An Aspen Publication. p. 96~102

M. Zamudio, et al. (2001), *Lactobacillus plantarum* phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. *Letters in Appl. Microbiol.*, Vol. 32, 181–184.

MacLeod, G. and Ames, J. (1988). Soy flavor and its improvement. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 27 : 218~400

Macleod, G. and Ames, J. (1988). Soy flavor and its improvement. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 27, 219–401.

Maria De Angelis, Giovanna Gallo, Maria Rosaria Corbo, Paul L.H. McSweeney, Michele Faccia, Marinella Giovine, Marco Gobbetti, (2003), Phytase activity in sourdough lactic acid bacteria: purification and characterization of a phytase from *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, *International J. of Food Microbiology*, 87, 257–270.

Matisova, E., Medvedoval, M., Vraniakova, J. and Simon, P. (2002). Optimization of solid-phase microextraction of volatiles. *Journal of Chromatography Analysis*, 960, 159–164.

Messina, M. and Barnes, S. (1991). The role of soy products in reducing risk of cancer. *JNCI*. 83: 541

Messina, M. and Messina, V. (1991). Increasing use of soyfoods and their potential role in cancer prevention. *J. Am. Diet. Assoc.* 91: 836

Mun S. A., Kim Y. B., Ko Y. T., (1986), Growth of Lactic Acid Bacteria in Soy Milk and Flavor of Soy Yoghurt, Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 18, No. 2.

Murphy, P. A., Song, T., Buseman, G., Barua, K., Beecher, G. R., Trainer, D., & Holden, J. (1999). Isoflavones in retail and institutional soy foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2697–2704.

Ohr, L. M. (2003). The latest scope on soy. *Food Technol.* 57(8) : 87~91

Ohta T, Nakatsugi S, Watanabe K, Kawamori T, Ishikawa F, Morotomi M, Sugie S, Toda T, Sugimura T, Wakabayashi K. Inhibitory effects of Bifidobacterium-fermented soy milk on 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b]pyridine-induced rat mammary. *Carcinogenesis* (2000)21:93741.

Ott KH, Aranibar N, Singh B, Stockton QW. Metabonomic classifies pathway affected by bioactive compounds. Artificial neural network classification of NMR spectra of plant extracts. *Phytochemistry* (2003)62:97185.

Payne, F. A., Taraba, J. L., & Saputra, D. (1989). A review of puffing processes for expansion of biological products. *Journal of Food Engineering*, 10(3), 183–197.

Pinthong, R., Macrae, R. and Dick, J. (1980). The development of a soya-based yoghurt. *Journal of Food Technology*, 15, 647667.

Polesello, A., Cesare, L. F. and Nani, R. (1989). Aroma recovery from fruit and vegetables by solid phase extraction. *Industrie delle Bevande*, 18(100), 93–101.

Prosen, H. and Zupancic-Kralj, L. (1999). Solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 18(4), 272–282.

Sanghwa Lee. (1998). Effect of storage conditions on the flavor components of soymilk, Seowon university, 34(3), 139–151.

Setchell KD. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavone. *Am J Clin Nutri* 68: 1333–1346 (1998).

Shimoni, E. (2004). Stability and shelf life of bioactive compounds during food processing and storage: soy isoflavone. *Journal of Food Science*, 69(6), 160–166.

Simine de Fatima Viana, Valeria Monteze Guimaraes, Ines Chamel Jose, Maria Goreti de Almeida e Oliveira, Neuza Maria Brunoro Costa, Everaldo Goncalves de Barros, Maurilio Alves Moreira, Sebastiao Tavares de Rezende, (2004), Hydrolysis of oligosaccharides in soybean flour by soybean α -galactosidase, *J. Food Chemistry*, 45.

Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American J Enol Viticult*, (1965)16:14458.

Snyder, H. E. and Kwon, T. W. (1987). Soybean utilization. *An avi Book*. p. 31~37

Sung - Ae Mun , Young - Bae Kim and Young - Tae Ko. (1986). Growth of Lactic Acid Bacteria in Soy Milk and Flavor of Soy Yogurt, *Korean Journal of Food Science and Technology*, 18(2), 118–123.

Suratman L. L. I., Jeon I.J. and Schmidt K.A. (2004). Ability of cyclodextrins to entrap volatile beany flavor compounds in soymilk. *Journal of Food Science*, 69(2), 109–113.

Teede, H. J., McGrath, B. P., DeSilva, L., Cehun, M., Fassoulakis, A., & Nestel, P. J. (2003). Isoflavones reduce arterial stiffness: a placebo-controlled study in men and postmenopausal women. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biotechnology*, 23(6), 1066–1071.

Trenna D. Blagden and Stanley E. Gilliland. (2005). Reduction of levels of volatile components associated with the "Beany" flavor in soymilk by Lactobacilli and Streptococci. *Journal of Food Science*, 70(3), 186–189.

Trenna D. Blagden, S. E. Gilliland, (2005), Reduction of Levels of Volatile Components Associated with the "Beany" Flavor in Soymilk by Lactobacilli and Streptococci, *J. Food Science*, Vol 70. M186–189.

Tsangalis, D., Wilcox, G., Shah, NP. and Stojanovska, L. (2005). Bioavailability of isoflavone phytoestrogens in postmenopausal women consuming soya milk fermented with probiotic bifidobacteria. *Br J. Nutr.* 93(6) : 867~877

Tweeddale H, Notley-McRobb L, Ferenci T. Effect of slow growth on metabolism of *Escherichia coli*, as revealed by global metabolite pool ("Metabolome") analysis. *Bacteriol* (1998)180:510916.

Uzzan, M. and Labuza, T. P. (2004). Critical issues in R&D of soy isoflavone-enriched foods and dietary supplementants. *J Food Sci.* 69(3) : 77~86

Uzzan, M., & Labuza, T. P. (2004). Critical issues in R&D of soy isoflavone enriched foods and dietary supplements. *Journal of Food Science*, 69(3), 77-86.

Vas, G. and Vekey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 233-254.

Wang YC, Yu RC, Chou CC. Antioxidative activities of soymilkfermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiology* (2006)23:12835.

Wei QK, Chen TR, Chen JT. Using of lactobacillus and bifidobacterium to product the isoflavone aglycones in fermented soymilk. *Intl J Food Microbiol* (2007)117:120-24.

Wilkens, W. F. and Lin, F. M. (1970). Gas chromatographic and mass spectral analyses of soybean milk volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 18, 333-336.

Xu, Z.; Wu, Q.; & Godber, J. S. (2002). Stabilities of daidzin, glycitin, genistin, and generation of derivatives during heating. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25); 7402-7406.

Yang, S. O., Chang, P. S., Lee, J. H. (2006). Isoflavone distribution and -glucosidase activity in Cheonggukjang, a traditional Korean whole soybean-fermented food. *Food Science and Biotechnology*, 15(1), 96-101.

Yang-Bong Lee, Hae-Reung Park, Mi-Jeong Kim, Soo-Hee Kim and In-Kyeong Hwang. (1996). Mechanism on the formation and methods of removal of beany flavor and its analytical methods. Korea Soybean Society, 13, 32-42.

Z. H. Wang, J. Dou, D. Macura, T. D. Durance and S. Nakai. (1997), Solid phase extraction for GC analysis of beany flavours in soymilk, Food Research International, 30(7), 503-511.

Zheng, G., & Zhu, S. (1999). Antioxidant effects of soybean isoflavones. In T. K. Basu, N. J. Temple, & M.L. Garg, Antioxidants in human health and disease, (pp. 123-130). Wallingford UK: CABI Publishing.

Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem (1999)64:555-9.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산물식품부에서 시행한 농림기술개발 사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산물식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.