최 종
연구보고서

밤을 이용한 기능성 발효제품의 개발

Development of a Fermented Food Product
Using Chestnut

연구기관 전 주 대 학 교

농 림 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “밤을 이용한 기능성 발효제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000 . 10 . 14.

주관연구기관명 : 전주대학교
총괄연구책임자 : 진 효 상
책 임 연 구 원 : 진 홍 승
연 구 원 : 양 은 진
연 구 조 원 : 김 종 범
연 구 조 원 : 김 현 진

요 약 문

Ⅰ. 제 목

밤을 이용한 기능성 발효 제품 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라의 밤 생산량은 세계 제2위로서, 년간 약 100,000톤을 생산하고 있는바, 그 중 30% 수출되고, 70%는 국내에서 소비된다. 그러나 소비가 거의 일반가정용으로 삶은 밤이나 군밤의 형태를 벗어나지 못하고 있는 관계로 실제 밤의 소비는 매우 저조하고, 또한 효과적인 밤 수확 기술의 개발도 미진한 상태에 있어 밤나무 재배농가는 의욕상실로 밤을 수확하지 않고 방치해 두는 실정이다. 이러한 중요한 임산자원의 유실을 막고, 밤나무 재배농가의 의욕을 고취시키기 위해서는 밤의 소비확대를 위한 대책이 필요하며, 밤을 이용한 다양한 제품의 개발이 요구된다. 본 연구에서는 밤의 활용도와 소비를 높여 임산 농가의 소득을 증대시키고, 유실되어 가고있는 임산자원의 활용율을 높이고, 생산성을 향상시키는 경제적인 직접효과를 줄 것으로 기대하여, 밤을 이용하여 기능성 발효제품으로 개발하고자 하였다.

밤을 이용한 발효제품의 개발은 기술적으로 (1) 식물성재료를 이용한 유산 발효에 관련한 기술을 개발하게 되어 다른 식물성 재료를 이용한 제품들의 개발을 촉진시키게 되고, (2) 밤이 가지는 에너지를 낮추고 대신 기능성을 가진 유기산과 유산균을 증가시켜 영양적 불균형을 해소하고 인체에 보다 이로운 식품으로 개발하게 되며, (3) 직접적으로 밤 소비를 촉진하여 밤

채취기, 재피기 등의 밤의 수확에 관련된 기술들을 촉진하게 된다.

이외에도, 옛부터 오랜 동안 내려온 전통적인 식품으로서의 개념을 가지고 있는 밤을 이용한 제품을 접하게 되므로 한국적 문화로서 국민들에게 친근감을 주게되며, 특히 우유문화에 익숙치 못한 사람들에게도 자연스럽게 인체에 이로운 젖산 발효제품을 가까이 하도록 만드는 긍정적인 영향도 주게 된다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

밤을 이용한 발효제품을 개발하기 위하여 본 연구는 미생물을 분리하고 배양조건을 검토하는 미생물연구와 분리된 미생물을 이용하여 공장에서 제품을 제조하는 과정을 검토하는 제조가공 연구로 구성되어 있으며 연구한 내용과 범위는 다음과 같다.

1. 미생물 연구

가. 미생물의 분리

1) 성인남녀 분변에서의 균분리

성인남녀의 분변에서 밤용액에서의 발효적성이 우수한 5균주씩을 분리하고 각각 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, F1R4로 명명하였다.

2) 시판 요구르트에서의 균분리

같은 요령으로 MGG1, MGG2, NBL1, PAP1, PAP2를 분리 명명하였다.

3) 분리균의 동정

분리된 10가지 균주는 rapid32A kit에 의한 생화학적 시험, fructose-6-phosphate phosphoketolase활성 및 발효물의 acetate/lactate 비를 검사하여 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, NBL1, PAP2는 *Bifidobactrium*으로 F1R4, MGG1, MGG2, PAP1는 *Lactobacillus*로 동정하였다.

나. 분리균주의 발효적성

1) 밤 현탁 용액의 발효시험

분리한 균들은 4%의 밤 현탁액에서 발효적성을 시험하였을 때, 대체로 분변에서 분리한 균들이 시판 유산균류 보다 산 생성이 더 좋았으며 적정산도는 0.81-2.11 ml(0.1N NaOH)의 범위를 나타내었다.

2) 밤 용액 중 증숙밤 함량의 영향

분리한 균들은 밤 현탁액에서 증숙밤의 농도를 2%에서 32%의 범위에서 증가시켰을 때 산을 더 많이 생산하였으며, 농도 증가에 의한 산생성 촉진의 크기는 F1R4와 PAP1가 가장 컸고, 4%에서 8%로 증가시킬 때 상승폭이 가장 커서 8% 농도를 사용함이 적당한 것으로 나타났다.

3) 산생성에 미치는 밤품종의 영향

밤은 품종별로 차이를 조사하기 위하여 산청산 은기와 이평 및 전북지역의 야생밤을 선택하고 발효성향이 비슷한 M1R1, MGG2, MGG1, F1R4, PAP1을 선정하여, 증숙밤 8%와 32% 및 증숙밤 8%와 영양보충한 밤용액에서 발효시킨 다음 산도를 비교하였을 때 산도는 밤의 품종에 의한 차이보다는 균주의 차이가 훨씬 컸다. 따라서 산도 면에서는 밤 품종에 의한 차이는 중요하지 않다고 사료되었다. 그러나 밤 용액의 향과 맛은 품종에 따라 차이가 나타나 최종 발효제품의 맛을 고려하는 단계에서는 이러한 차이를 조정해야 하겠다.

다. 배양조건의 검토

1) 당첨가의 효과

포도당을 0.5-8%의 범위에서 첨가하였을 때 *Lactobacillus*는 당 농도의 증가에 따라 산도가 증가하였으나 그 정도는 작았고, 나머지 *Bifidobacterium*들은 증가하지 않거나 감소하였다.

2) 영양물 보강의 효과

0.05%의 cysteine, 0.2%의 yeast extract와 각각 0.4%의 Gelysate peptone, Phyton peptone, Trypticase peptone을 첨가하였을 때, 거의 모든 균들의 산생성이 촉진되었지만 Phyton peptone을 첨가하였을 때 F1R4와 PAP1에서의 증가폭이 가장 컸다.

3) 당 종류의 영향

Lactose, maltose, sucrose의 이당류는 glucose에 비해 산생성 촉진이 같거나 작았다.

4) 종균 배양액 접종량의 영향

종균의 접종량은 0.5-8%의 범위에서 증가할수록 산생성이 증가하였으나 2.0-8.0%의 범위에서 산생성 증가율은 접종량의 증가율에 비해 낮았다. 따라서 본 발효에서는 생산조건에 따라 0.5-2%의 범위에서 알맞은 접종량을 선택할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서는 발효기간의 단축, 균주간의 발효특성 차이의 극대화, 오염균에 의한 영향 감소등을 고려하여 4%로 진행하기로 하였다.

5) 천연과즙 및 야채즙 보강의 효과

사과, 귤, 토마토, 배, 오이, 당근, 미나리 등의 천연 채소와 과일의 즙을 10% 농도에서 가하고 그 영향을 보았을 때 대부분 산생성이 촉진되었으나 그 중 F1R1, MGG1, PAP1가 가장 크게 촉진되었으며, F1R4는 당근과 미나리 즙에 의해, MGG1은 귤과 당근에 의해, PAP1은 오이, 당근, 미나리 즙에 의해 산 생성이 가장 크게 촉진되었다. 이에 따라 본 발효액의 배지는 맛 등을 고려하여 이러한 천연물의 즙을 보강하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

6) 발효시간 별 균체 생육의 영향

침전물을 제거하고 난 투명한 상증액으로 발효를 시행하고 시간별로 흡광도의 변화를 살핀 결과 일반적으로 48시간까지 탁도가 증가하였고 그 이상은 증가하지 않았으며, 24시간이면 거의 정상기에 진입하는 것으로 나타났

다. 따라서 발효시간은 제품의 요구되는 형편에 따라 24시간 또는 48시간까지 진행할 수 있는 것으로 생각된다. 균주별로는 F1R4, MGG1, PAP1이 최종 탁도가 가장 컸으며 이는 초기 접종액의 탁도에 비례하였다.

7) 발효형태의 영향

가) 액상 밤용액의 발효

8% 밤용액의 침전물을 제거한 후 균을 접종하고 경시적으로 발효하고 산도와 균수를 측정해본 결과 24시간 배양에서 생균수의 범위는 8.05-9.05의 분포를 나타내었고, 시험균 중 M1R1과 PAP1이 9.05와 9.03으로 가장 우수하였다. 48시간 배양에서 생균수는 8.28-9.15의 분포였고 시험균 중 PAP2와 M2R1가 9.15, 8.99로 가장 우수하였다. 시험균들은 소수의 예외는 있으나 일반적으로 24시간이면 배양이 완료되었다.

나) 호상 밤용액의 발효

증숙밤과 물을 1:1로 섞은 밤죽을 20ml 씩 용기에 넣고 접종액 0.8ml를 가한 다음 48시간 배양하고 산도와 균수를 측정한 결과는 산도는 F1R4와 PAP1이 3.26, 3.66으로 비교적 높았으나 생균수는 MGG1, MGG2, NBL1가 9.22, 9.16, 9.24로 비교적 더 우수하였다. 호상발효는 액상 발효에 비하여 산도와 균수가 약간 더 높았으나 그 차이는 크지 않았다. 밤 원료의 소요량이 증가하면 제품의 원가가 증가하기 때문에 호상발효의 선택에는 이러한 비용 문제나 점도의 증가에 의한 생산시설의 변화 등을 포함한 여러 가지 인자를 고려하여 결정해야 하겠다.

8) 가수분해에 의한 밤용액의 발효촉진

액화효소(α형 당화효소액)와 고지추출액(β형 당화효소액)에 의하여 양조공업식으로 가수분해시킨 밤현탁액을 엿기름 추출액에 의해 가수분해시킨 밤현탁액과 함께 각각 발효시키고 산도를 비교하였을 때 두가지 가수분해 방식은 모두 크게 산생성을 촉진시켰으며, 촉진된 값을 0.5% dextrose가 보

강된 군과 비교해 볼 때 훨씬 더 커서, 효소처리에 의한 촉진은 단지 당 생성의 증가에 의한 것이라고만 볼 수 없었다. 산 생성은 전자의 방법이 4.39-14.67의 범위로 후자의 방법에 의한 처리군의 3.35-9.52 범위 보다 더 효과가 더 컸다.

라. 발효균주의 선정

분리균주들은 발효액중의 생균수, 저장중 생존율, 관응적 특성에 따라 선정하였다.

1) 발효제품의 생균수의 비교

생균수는 8.58-9.32의 범위의 분포를 보여 각 분리균이 거의 비슷한 생육을 나타내었지만 F1R4, PAP1이 9.05, 9.32로 가장 높았으며, 이들의 산도는 각각 5.26, 5.21로서 1.30-2.45의 범위의 분산을 보인 다른 균들에 비해 두드러지게 높았다. 따라서 발효 직후의 발효액의 산도와 생균수 면에서는 F1R4와 PAP1이 가장 좋은 것으로 사료된다.

2) 발효용액의 저장 중 생균수 변화

저장 온도(5℃)에 발효액을 3주간 저장하고 저장중 발효액의 생균수 변화를 측정한 결과 3주간 저장 후의 잔여 생균수는 MGG1과 MGG2가 8.00과 8.03으로 가장 많았으며 최초균수인 8.66과 8.83에 비하여 감소가 적었다. F1R4와 PAP1은 최초균수 9.05와 9.32에서 3주 저장후 2.80과 3.00으로 가장 큰 감소를 보여 대비를 이루었다. F1R4와 PAP1의 산도가 가장 큰 점으로 보아 저장중의 생균수의 감소는 발효액의 산도가 클수록 증가함을 알 수 있었다.

3) 저장중 생균수 감소에 미치는 pH의 영향

발효액의 pH를 5.17로 조정하고 조정하지 않은 발효액을 5℃에서 12일까지 저장하면서 생균수의 변화를 비교한 결과 pH를 조정한 발효액의 생존균수는 6.76으로 조정하지 않은 발효액의 4.38에 비하여 비해 1000배이상 더 많았다. 따라서 제품의 생균수는 발효액의 산도에 의해 크게 영향을 받으므

로 저장중 제품의 생균수를 높게 유지시키기 위해서는 산미를 잃지 않는 범위내에서 최대한 pH를 올려야 된다는 점을 확인할 수 있었다.

4) 침전물의 영향

증숙밤의 현탁액은 침전물이 있어 발효와 저장 중 하단부분에 가라앉아 있기 때문에 침전물의 양이 발효와 저장 중에 산도와 균수에 어떠한 영향을 미치는지를 증숙밤 10% 농도에서 조사했을 때 , MGG1은 침전물이 없는 발효액의 배양직후 산도와 생균수는 1.43과 8.61였고, 23%의 침전물 발효액은 1.08과 8.26이어서 침전물에 의해 산도와 균수가 감소하는 경향을 보였고, F1R4의 경우도 4.42와 8.00 및 4.05와 7.56으로 같은 경향을 보였다. 12일간 저장 후 생균수는 MGG1은 침전물이 없는 경우 산도와 균수가 1.43과 8.14였고 23%의 침전물에서 1.13과 7.03이었으며, F1R4의 경우는 각각 4.70과 3.02 및 4.40과 3.68인 것으로 나타나 MGG1에서와는 달리 F1R4에서는 침전물이 발효액의 생균수의 감소를 저지시켰으나 그 영향은 매우 적었다.

5) 1차 관능검사에 의한 선별

발효액을 10명의 관능검사 요원에게 시음시키고 산미, 향, 맛, 음용감 등의 기호도를 평가하도록 한 결과 모든 균에서 밤용액의 발효제품은 산미, 맛, 향, 음용감의 모든 면에서 나쁜 것으로 나타났다. 이러한 결과는 살균에 의한 밤향의 감소, 용기에서 발생하는 불쾌한 냄새, 자극적인 산미, 점도저하로 인한 낮은 음용감의 저하 등으로 인하여 발생하였다.

6) 최종 선정

가) 혼합배양의 영향 및 호상 제품에서의 저장성

이상의 결과를 바탕으로 발효중 생육이 우수한 *Lactobacillus* PAP1과 생균수의 생존율이 우수한 *Lactobacillus* MGG2를 선정하였다. 이 둘의 혼합배양 발효액의 산도와 생균수는 각각의 단독배양액의 산도와 생균수에 비해 더 컸다.

발효액에 상증여액이 나타나지 않도록 증숙밤을 가하여 호상제품으로 만들고 3주 저장하였을 때 혼합 발효액의 생균수는 각각의 단독배양액 생균수의 합 보다 더 컸으며 pH를 5.17로 조정후 저장한 발효액 보다도 더 높아 저장성도 우수한 것으로 나타났다. 따라서 이들을 혼합하여 사용하기로 최종 선정하였다.

나) 액상 제품에서의 저장성

선정한 PAP1과 MGG2를 혼합배양하고 발효액에 증류수, 당액, 또는 당액과 밤용액의 혼합을 각각 1:1로 섞고, 5℃에서 3주까지 저장하면서 균수의 변화를 조사한 결과 혼합균주는 2주에서 3주 사이에 6.62에서 3.65로 균수가 감소되어 2주 이상의 저장에서는 균수의 유지에 문제가 있었다. 그러나 제품에 당, 밤용액 및 당과 밤용액의 혼합액을 각각 동량 가하고 3주까지 같은 온도에서 저장하면서 균수의 변화를 조사하였을 때 3주 저장액의 균수는 3.65에서 각각 4.60, 5.88 및 7.64로 증가되었다.

다) 수입 종균제품과의 비교 시험

본 연구에서 선정한 균주를 수입종균 Hansen YC-180(*S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 혼합) 및 MSK B2(*S. thermophilus*, *B. infantis* 및 *L. acidophilus*의 혼합)과 비교하였을 때, 24시간 배양 후의 생균수는 Hansen과 선정 균주가 MSK보다 우수하였고, 산도는 선정균주가 가장 컸다. 따라서 제품 생산에서의 용이성 등을 고려하여 제조가공연구에서는 Hansen 제품을 분리균과 병행 사용하도록 하였다.

라) 접종량에 대한 검토

분리균의 종균배양액의 접종량을 0.5% 이하로 낮추고 발효액의 산도와 생균수를 조사하였다. 접종량을 0.1%(MRS 18시간 배양 기준)까지 낮추어도 제품의 생균수는 거의 감소하지 않았다.

마. 배양조건의 선정

1) 첨가물 농도의 선정

당 첨가(0.5%)는 균수와 산생성을 증가시키지만 균수의 증가폭은 산도의 증가에 비하여 작았다. 발효액의 산도와 생육은 yeast extract보다 Phytone peptone 첨가에 의해 더 큰 영향을 받았다. 균수와 산도 는 Phytone peptone 0.8%, yeast extract 0.8%, glucose 0.5%의 첨가에서 5.11과 9.42로 가장 좋은 것으로 나타났으나, glucose 0.5%의 조건에서 yeast extract 0.2% 이상, Phytone pepton 0.4% 이상만 첨가하면 산도와 생균수가 각각 3.89와 9.0 이상으로 양호하였기 때문에 이 농도를 선정하였다.

2) 산업부산재료 및 천연재료를 이용한 발효제품의 구성성분의 결정

Phytone pepton과 Yeast Exract은 가격이 비교적 높기 때문에 이를 대체할 산업부산물로 대두박과 순물 및 맥주효모 대신 첨가하고 그 영향을 비교한 결과 맥주효모는 Yeast Extract에 비해 역가가 1/3에 불과하였지만 대두박과 순물은 Phytone peptone에 버금가는 역가를 나타내어 대체 가능성을 보여주었다.

3) 버섯 추출물 첨가의 영향

동충하초와 영지추출액을 보강하고 그 영향을 살펴보았을 때 40%(V/V)의 범위 안에서 균수와 산도에 저해작용을 나타내지 않았고, 오히려 촉진작용을 나타내었으나 증가의 크기는 작았다.

4) 안정제 첨가의 영향

두가지의 안정제 즉 pectin(Unipectine™ AMP285)과 sodium alginate를 0.5%의 범위 안에서 여러 농도로 첨가하고 그 영향을 검토한 결과 alginate는 발효액의 산도와 생균수를 증가시켰고, pectin은 산도와 균수를 감소시켰다. 따라서 안정제는 균의 생육을 고려할 때 alginate가 우수한 것으로 사료된다.

5). 최종 선정 및 관능 성적의 개선

지금까지의 결과를 토대로 최종 배지 조성을 밤은 8%, 대두박 0.4%, 효모 추출물 0.2%, 포도당 0.5%, sodium alginate 0.2%, modified starch 2%로 하였다. 그러나 발효제품은 관능성적이 매우 낮아 개선을 요구하였다.

가) 최적 당 구성

당은 10%가 가장 적당하였고, 구성은 서당+과당+꿀의 혼합이 가장 우수하였고, 다음은 서당 단독과 서당+고과당 물엿, 마지막이 고과당 물엿 단독의 순이었으나 경제성을 고려하여 서당 5%와 고과당 물엿을 5%로 구성하였다.

나) 최적 산도

발효액의 산도는 3.0-2.5에서 최적이었다.

다) 최적 향 농도 및 구성

향을 개선하기 위해서는 밤 향, 요구르트 향, 바닐라 향을 각각 0.08, 0.01, 0.01%의 비율로 첨가하는 것이 가장 좋았다.

이에 따라 조미 성분의 최종 구성은 서당 5%, 고과당 물엿5%, 밤향 0.08%, 요구르트 향 0.01%, 바닐라 향 0.01%로 하고 제품의 산도는 3.0으로 맞출 것을 제시하였다.

바. 종균배양배지의 개발

종균배지의 비용을 낮추기 위해 산업부산물과 값싼 농산물을 비교하였다.

1) 순물의 이용

두부 제조의 부산물인 순물은 단당류와 서당 등의 소당류가 다량 함유되어 있어 에너지원이 충분하고, 무기질이 많아 산을 중화시키기 때문에 유산발효에 적당할 것으로 사료된다.

가) 당의 보강 효과

순물에 포도당을 0.2-1.6%의 범위로 첨가하고 분리균주의 생육과 산도에 미치는 영향을 살핀 결과 0.2% 이하로 적게 첨가시키는 것이 적합하였다.

나) 대두박의 보강효과

대두박은 0.8% 이내의 범위에서 실험하였을 때, 0.4% 이상에서 생육을 증가시켰다.

다) 효모추출물의 보강효과

효모 추출물을 0.1-0.8%의 범위에서 시험하였을 때, 균체의 생육은 0.4%의 경우를 제외하고는 촉진하지 않았다.

라) 영양 보강 순물액의 종균배지로서의 가능성

위의 결과를 바탕으로 순물에 포도당 0.2%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.4%를 첨가한 종균배지를 구성하고, 분리균의 배양능력을 Lactobacillus MRS 배지와 비교한 결과 두 배지는 거의 같은 정도의 배양능력을 보여주었다. 따라서 순물에 영양을 보강한 배지는 좋은 종균배지로 사용 가능함을 알 수 있었다.

2) 고구마를 이용한 배지

고구마 용액의 산도와 균수는 2.18과 9.05로 같은 농도의 밤용액 1.30과 8.83에 비해 우수하였고, 양조공업식으로 가수분해한 각각의 발효액은 4.80과 9.33, 5.53과 8.83으로 유사한 발효적성을 보여주어 고구마로 밤을 대체할 가능성을 보여주었으나, 종균배지의 양을 4%까지 늘릴수록 고구마 향이 남아 맛에 영향을 주는 문제가 있었다.

2. 제조가공 연구

가. 밤 원료형태의 선정

깐밤, 증숙밤, 가당 증숙밤, 냉동 paste block의 4가지 밤의 원료들을 획득의 용이성, 저장기간의 장기성, 사용의 편의성, 저비용성 등의 4개 항목에 준하여 각각의 성적을 평가한 결과 냉동 paste block이 기술성과 경제성에서 가장 우수한 이용 원료 형태로 나타났고, 다음이 가당 증숙밤, 깐밤,

증숙밤의 순이었다.

나. 밤 품종별(은기, 옥광), 산지별(공주, 산청) 구성성분 조성

산청산 은기, 공주산 은기, 그리고 산청산 이평과 공주산 이평의 구성성분 함량과 색도를 비교 분석한 결과 지역간 품종간 성분함량의 차이가 거의 없었으나 색도는 a와 b Value에서 은기와 이평품종 간에 약간의 차이가 있었다.

또한, 우리나라 밤의 양대 집산지인 진주 농협과 공주 농협을 위시한 강원도 홍천등지의 현지 농협과 군청 등을 통하여 산지별 차이와 품종별 차이에 대한 현재의 우리나라 밤의 수매 집하와 이용에 관한 실태 내용을 문의 조사한 결과, 밤의 수매시 품종별로 구분하지 않고 혼합하여 수매하고 있어, 산지별 또는 품종별 구분은 의미가 있다해도 실제 사용 단계에서 전혀 이를 구별할 조건이 아니었다.

다. 제품의 포장, 형태의 선정

액상과 호상의 두 가지 형태 중, 우리 나라 시장에서는 액상 발효식품의 선호도가 2.8배 이상 높고, 호상 타입은 이스트의 오염 등으로 인한 미생물 사고 등이 빈번하게 일어나고 있고, 품질이 일정하지 못한 문제점이 있는 것으로 조사되어 액상 발효식품 형태로 정하였다.

라. 발효제품의 구성성분의 조성과 함유율

1) 1차 시안에 의한 문제점 도출

원료는 냉동 plaste block의 미립도를 150mesh로 하고, 탄소원으로 포도당 5%, lactose를 2% 첨가하며, 균주는 *Lactobacillus* + *Bifidobacterium*의 2 : 1 혼합균주를 사용하고 맛은 사과과즙 첨가로 조정하는 것을 근간으로 하며 가공 온도를 90℃ 125℃로하여 20 25분간 처리함을 기준으로 하여 시행한 결과 미립도와 가공온도 및 시간이 발효제품의 맛과 성상에 큰 영향을 준다는 사실을 알 수 있었다. 밤 맛의 bottom note는 좋으나 top

note가 매우 약하며, body감 역시 미약하게 느껴졌고, 고형분의 침전현상이 있었으며, 발효시간이 장시간이 소요되는 등의 문제점이 인정되었다.

2) 최적 구성성분의 결정

가)밤 함량의 설정

(1) 선호도 조사

밤 함량에 대한 선호도를 관능검사에 의하여 조사한 결과 10% 함유 시료와 15% 함유 시료가 5% 함유 시료에 대하여 유의적으로 더 선호되었다.

(2) 침전도 조사

밤의 함유량이 높으면 고형분의 침전 현상이 더욱 심하여 침전현상에 있어서는 밤의 함량은 5-10%가 타당한 것으로 판단되었고, 미생물 분야의 연구결과를 참고하여 최종 8% 선정하였다.

나) 당류의 선택

당류는 산 생성 면에서 포도당이 가장 우수하였으며 고과당, 설탕의 순이었다. 그리고 종균의 접종량은 100과 50U/250kg 사이에서 큰 차이가 없었다. 그러나 포도당이 가장 효과적으로 이용되고 있는 점과 함께 가격, 그리고 감미의 느낌 특성을 함께 고려할 때, 포도당과 고과당 물엿의 혼합 사용이 바람직 한 것으로 판단되었다. 종균의 사용은 생균수의 확보를 위하여 100U/250kg의 역가로 사용하기로 하였다.

다) 감미료의 구성결정

포도당과 고과당 물엿의 혼합 사용 시의 최적 혼합비율을 결정하기 위하여 세 가지의 조합 6:7, 3:9, 9:5로 구성하고 이에 대한 선호도를 조사하였을 때 6:7의 배합이 가장 좋았고 9:5조합이 가장 나빴지만, 통계적 처리결과 세 시료간에는 유의적인 차이는 없었다.

라) 식물 추출물의 첨가

솔잎, 참숯, 쑥 및 뽕잎 등의 4가지 식물 추출물과 영지와 동충하초의 두

가지 추출물을 각각 첨가하고 관능검사를 한 결과, 모든 추출물은 첨가하지 않은 제품에 비하여 선호도가 낮았다. 순위별로 보면 미첨가, 참숯, 동충하초, 솔잎, 영지, 뽕잎, 쑥 첨가의 순 이었다. 그러나 밤 고유의 맛을 변화시키는 쑥을 제외한 여타의 추출액들은 건강 기능성 부여의 목적으로 첨가하는 것도 좋을 것으로 판단되었다.

마) 음용감(body 감)의 설정

점도를 증가시켜 음용감을 향상시키고 동시에 침전현상을 개선하기 위하여, 안정제로 알긴산소다와 변성전분을 각각 0.2%와 2.0%로 단독 첨가하거나 혼합하여 2.2%로 첨가하한 결과 점도는 알긴산소다와 변성전분을 각각 단독으로 첨가한 경우가 74, 81인데 비하여 이들을 혼합하여 첨가한 경우는 104로 점도가 더욱 증가하였고, 침전은 각각을 단독으로 사용한 경우 보다 훨씬 적었으며, body감에서도 더욱 우수하여 이들을 혼합 사용하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

3) 제품 제조공정 설정

가) 밤 고형분의 침전방지

안정제의 첨가에도 불구하고 발생되는 밤 고형분의 침전 현상의 방지를 위한 초미세화 가공공정은 검토한 결과 50 미크론 이하로 초미립자화 시키면 침전현상이 방지되는 것으로 나타났지만 작업의 난이도를 고려하여, 100 미크론 정도로 가공하는 것이 현실적일 것으로 예측되었다.

나) 이취발생의 예방을 위한 살균온도 설정

열에 의해 밤 식품의 이취(異臭) 발생과 밤 특유의 향기가 소실되는 것을 개선하기 위하여, 살균온도의 영향을 살핀 결과 105℃ 이상의 살균은 이취가 매우 컸으며 75℃ 이하에서는 거의 발생하지 않았으나 작업시간을 고려하여 85℃로 시행함이 바람직 한 것으로 판단되었다.

다) 생균수를 고려한 발효시간의 설정

(1) 식품 위생법 상의 규격기준

발효유제품은 유통과정에서 보관온도의 관리 오류와 기간관리 소홀 등의 현실적 조건을 고려하여 가급적 생균수를 늘려 제조하여 생균수를 10.0(logCFU/ml) 이상으로 하지만 그러나 본 밤을 이용한 발효제품에서는 달성할 수 없어 9.0 이상으로 정하였다.

(2) 수입종균에 의한 발효시간의 설정

9.0 이상의 생균수 확보에는 지금까지 확보한 실험조건에서 발효하였을 때 19시간의 배양을 요하였다.

다) 분리균주의 이용을 위한 공정

본 연구의 미생물 연구에서 제시한 균주 *Lactobacillus* MGG1과 *Lactobacillus* PAP1을 이용하고자 할 때 종균 배양 공정은 순물에 포도당 0.2%, 대두박 0.4%와 효모추출물 0.4%을 첨가한 종균배지에서 37℃에서 15시간배양으로 하고, 본 발효 공정은 배지 구성성분비를 밤 8, 대두박 0.4, 효모추출물 0.2, 포도당 0.5, 알긴산소다 0.2, 변성전분 2.0, 정제수 100으로 하고 37℃에서 19시간배양하면 각각 9.0 이상의 생균수가 확보되었다.

위의 발효액은 맛과 저장성을 개선하기 위한 조미액의 첨가를 요구하였고, 조미액의 구성비는 서당 5, 고과당 물엿 5, 밤향 0.08, 바닐라향 0.01, 요구르트향 0.01, 발효액 100이었다. 이와 같이 제조한 제품은 맛이 본래의 밤에 유사하면서도 안정적인 맛을 지녔으며, 안정된 맛으로 인하여 살균공정에 의하여 발생하는 미약한 이취도 해소시키는 장점을 가지고 있었다.

라) 제조공정도

(1) 수입종균에 의한 제품 생산시

[밤증숙-->초미립자화-->냉동 block화-->배합 (밤 8% + 정제수 + 포도당 6% + 과당물엿 7% + 안정제 2.2%)-->균질화-->살균-->종균 접종-->발효-->

균질화-->용기충진밀전-->냉장]

(2) 분리균주에 의한 제품생산시

[밤증숙-->초미립자화-->냉동 block화-->배합 (밤 8% + 정제수 + 포도당 0.5% + 대두박0.4% + 효모추출액 0.2% + 안정제 2.2%)-->균질화-->살균-->종균 배양(순물 + 포도당 0.2% + 대두박 0.4% + 효모추출물 0.4%)-->종균접종-->발효-->조미액 첨가(서당5%, 고과당물엿5%, 밤향0.08%, 요구르트향 0.01%, 바닐라 0.01%)-->균질화-->용기충진밀전-->냉장]

4) 제조 품질 관리 기준 설정

지금까지의 연구결과를 종합하여 분리균주와 산업균주를 위한 제조관리 기준과 품질 규격을 각각 제시하였다.

5) 유통품질관리 기준 설정(생균수와 맛의 유지기간 설정)

제품을 냉장 show case에 보관하면서 생균수와 맛의 변화 여부를 관찰한 결과 생균수는 12일째 검체에서 약간의 감소가 있었고, 맛이 열화되었다고 진술한 관능검사 요원도 발생하였다.

결론적으로 밤을 이용한 발효음료는 출시 후 5℃이하에서 보관하여야 하며, 가능한 한 12-15일 이내에 소비할 수 있도록 유통관리가 이루어져야 한다.

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 개발결과

가. 밤을 원료로 하여 마시는 형태의 발효음료를 개발하였다.

나. 밤을 이용하여 발효 음료를 개발하는 데는 가열에 의한 이취문제와 밤 용액의 고형분에 의한 침전물의 생성 등이 주요 문제였다. 이 문제는

살균온도를 낮추고 발효액에 조미액으로 가하여 맛을 조정하고, 밤고형분의 입자를 100 미크론 이내로 감소시킴으로써 해소될 수 있었다.

다. 밤 용액에 좋은 발효 적성을 가지는 균주 *Lactobacillus* PAP1과 *Lactobacillus* MGG2를 분리하였으며, 동시에 우수한 상업용 종균 Hansen YC-180(*S. thermophilus*와 *L. bulagaricus*의 혼합)을 대안으로 제시하였다.

라. 이들을 이용하여 밤용액을 발효하여 최대의 생균수를 확보하기 위한 최적의 발효조건을 찾아 제시하였다.

마. 종균배양액으로 이용하기 위하여 분리균주를 배양할 저가의 배지를 개발하였다.

마. 분리균주를 이용하여 밤을 이용한 발효제품을 제조하기 위한 제반 공정을 구성하여 제시하였다.

바. 선정한 상업용 균주를 이용한 발효제품을 만들기 위한 제반 공정을 구성하여 제시하였다.

사. 분리균주와 상업용균주를 이용하여 제품을 만들 때 이용할 수 있는 제조품질 관리 기준과 규격기준을 각각 제시하였다.

아. 분리균주와 상업용균주를 이용하여 만든 제품을 안전하게 유통시키는데 필요한 유통 품질 관리기준을 제시하였다.

자. 위의 결론에 관한 세부 내용을 종합한 내용을 종합하면 다음과 같이 정리될 수 있다.

표 1. 연구개발 결과

순서	공정	내용	관리기준	비고
1	밤 증숙	제피, 증숙	무가당, 철분접촉 금지	공통
2	초미립자화	페이스트화	100 미크론 이하	공통
3	냉동block화	냉동 저장	영하 20℃이하 저장	공통
4	배합	원료 혼합	1. 상업용 종균시: 배합온도 65℃, 밤 8%, 포도당 6%,고과당 물엿 7%, 알긴산소다 0.2%, 변성전분 2.0%, 정제수 2. 분리 종균시: 배합온도 65℃, 밤 8%, 포도당 0.5%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.2%, 알긴산소다 0.2%,변성전분 2.0%,정제수 적량	구분
5	균질화	혼합완성	100kg/㎠, plain head, 75℃	공통
6	살균	배합액살균	1. 상업균주시: 85℃ 이하 2. 분리종균시: 120℃	구분
7	종균배양	유산균배양	순물, 포도당 0.2%, 대두박 0.4%, 효모 추물물 0.4%, 37℃,15시간	분리

(다음 쪽에 계속)

(표 1의 계속)

8	종균접종	유산균접종	1.*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* (Hansen YC-180) 100U/250kg 접종 2. 분리균주시: *Lactobacillus* PAP1+MGG2, 배양액 각각 2%	구분
9	발효	유산균발효	37℃, 19시간, 생균수1.0x109 이상	공통
10	혼합	조미액첨가	서당5%, 고과당물엿5%, 밤향0.08%,바닐라향0.01% 요구르트향 0.01%,	분리
11	균질화	curd의 파괴	100kg/㎠, plain head	공통
12	충진, 밀봉	용기에 충진	합성수지제 병 용기	공통
13	저장, 유통	냉장 보관	0-6℃, 12-15일내 소비, 생균수 1.0x 107이상 유지	공통

공통: 분리균과 수입종균에 공통으로 적용,
분리: 분리균에만 적용
구분: 분리균과 수입종균에 구분하여 각각 적용

2. 활용에 대한 건의

본 연구는 밤 소비를 늘려 유실되는 삼림자원의 이용율을 높이고, 농가 소득을 증대시키기 위한 방편으로, 밤을 이용하여 마시는 형태의 발효제품

으로 개발하였다.

본 기술은 발효업체에서 이용하도록 산업규모로 연구하였기 때문에 가정이나 농가에서 소규모로 이용하기는 어렵다. 따라서 본 기술을 활용하기 위해서는 발효업체에 개발결과를 제시하여 이용하도록 권장하는 일이 가장 좋은 활용방법이 될 것이다. 그러나 본 연구개발의 완료에 앞서, 이미 개발되어 생산 판매 중에 있는 토마토 요구르트를 보면 초기의 대대적인 홍보와 제품의 매력적인 특성에도 불구하고 현재는 극심한 판매부진으로 어려움을 겪고 있다. 따라서 유사한 식물성 발효식품인 본 제품의 전망은 밝다고 볼 수만은 없으며, 발효업체에서 본 제품에 관심을 유발하기 위한 대책이 요구된다.

발효업체에서는 본 제품이 가지는 독자적 장점과 높은 상품성을 확신하는 경우에만 관심을 가질 것이기 때문에, 기술을 업체에 단순히 제시하기에 앞서 본 밤 발효제품이 가지는 고유의 장점을 발굴하거나, 확실한 상품성을 가지도록 지속적으로 개선해서 이를 적극 홍보해야 할 것으로 사료된다. 이에 대하여는 별도의 연구가 필요하다.

SUMMARY

(영문요약문)

Ⅰ. Title

Development of a fermented food product using chestnut

Ⅱ. Objects and importance of the study

The annual amount of chestnuts produced in Korea, 30% of which is exported and the rest of which is consumed in domestic market, is about 100,000 tons and ranked second to the top production in the world. However all the chestnuts domestically available are not fully consumed and even left in the trees without harvest by the frustrated farmers because chestnut demand in the market is low. Low demand comes from the lack of the technologies to process the chestnuts into various commercial food products and the lack of the adequate technologies needed to harvest and peel. We tried to develope fermented food products using chestnuts in a way to increase usage of chestnuts which will increase the demand for the chestnuts in the market and prevent loss of chestnuts by the frustrated farmers who would be encouraged to harvest chestnuts in response to the increased demand caused by this technique.

Technically this study to develope fermented food product using chestnuts will (1) promote the development of various fermented plant

products by providing the basic techniques needed in fermentation of plant materials, (2) convert chestnuts with high content of energy, into the product with high organic acids and lactic acid bacteria, which will help consumer's health by correcting the balance of the gastrointestinal microflora, and (3) promote to develope technologies needed to make machines to harvest and peel the chestnuts. Finally this fermented products will make many Korean people, not familiar to fermented milk, more like the fermented foods because this products will be made of chestnuts familiar to most Koreans for thousands years.

Ⅲ. Results and Scopes of this development

There are two parts of studies in this research. One is microbial study, goal of which concerns the isolation of strains appropriate to ferment chestnut broth and the optimization of fermentation condition. The other is making process study, target of which deals with the optimum manufacturing process for the final products. The study results are as follows.

1. Microbial study

A. Isolation of the lactic strains

1) From human feces

Five strains which showed good fermenting properties were isolated from healthy men and women and named M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, F1R4 for the time being.

2) From the commercial yogurts

Five strains, MGG1, MGG2, NBL1, PAP1 and PAP2 were isolated and named in the same way.

3) Identification of the isolated strains

Ten isolated strains were identified by the properties gathered from the biochemical test of the Rapid32A Kit, activity test of fructose-6-phosphate phosphoketolase and the ratio of acetate/lactate in the culture, which identified M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, NBL1, PAP2 as *Bifidobactrium* and F1R4, MGG1, MGG2, PAP1 as *Lactobacillus*.

B. Properties in fermentation of chestnut broth by the isolated strains

1) Fermentation test in chestnut broth

When the 4% chestnut broths were fermented by the isolated strains, titrable acidities ranged from 0.81 to 2.11(ml, 0.1 N NaOH).

2) Effects of chestnut concentration on fermentation

Within the range of 2-32%, the higher were the concentrations of chestnut, the higher were the titrable acidities. The acidity increases were highest with F1R4 and PAP1. The acidity increase rate was highest when the concentration was increased from 4% to 8%, which means that 8% is the most economic.

3) Effects of chestnut kinds on fermentation

When the chestnut broths made separately of EunGee and EePyung from SanChong and the wild strains from Jeonbuk Province were fermented with each of M1R1, MGG2, MGG1, F1R4 and PAP1, the difference ranges of acidity were higher with different bacterial strains than with

different chestnut strains. This result means the difference of chestnut strains are not so important. However they may become so on manufacturing stage by the apparent difference of taste and flavour.

C. Examination on the fermentation conditions

1) Effect of sugar concentration

When glucose concentration were increased within the range of 0.5-8.0%, titrable acidities of the fermented broths were increased with *Lactobacillus* strains, but not with *Bifidobacterium* strains.

2) Effect of nutrient supplementation

When the chestnut broths were supplemented separately with 0.05% cysteine, 0.2% yeast extract, 0.4% each of Gelysate peptone, Phytone peptone, and Trypticase peptone, the acidities were increased with most of the strains, but the increase was highest with combination of F1R4 or PAP1 and Phytone peptone.

3) Effect of sugar kinds

Addition of disaccharides like Lactose, Maltose and Sucrose did not stimulate acid production higher than glucose.

4) Effect of seed culture size

The acidities of the broths were more increased with higher inoculation size within the range of 0.5-8.0%. However increase rates within the range of 2.0-8.0 were lower than the range of 0.5-2.0%.

5) Effect of vegetable and fruit extracts

When the extracts of apple, orange, tomato, pear, cucumber, carrot, and dropwort were added at 10%, the acidities of the broths were increased in most of the strains. The increase was highest with

combination of F1R4 and carrot(or dropwort), MGG1 and orange(or carrot), and PAP1 and cucumber(or carrot or dropwort).

6) Effect of fermentation time

When the turbities of the culture broths measured with time intervals were increased up to 48 hours. However, the increase approached the stationary phase by 24 hours. The turbidity were higher with F1R4, MGG1 and PAP1, but also the initial turbidity of the broth after inoculation were higher due to the higher turbidity of the inocula.

7) Effect of fermentation type

a. Fermentation of fluid type chestnut

The transparent liquids of 8% chestnut broth after removal of precipitates showed viable counts between 8.05 and 9.05($\log_{10}$CFU/ml) after cultivation of 24 hours, in which M1R1 and PAP1, 9.05 and 9.03, were highest among the tested strains. The 48 hour cultivations showed viable counts between 8.28 and 9.15 with PAP2 and M2R1, 9.15 and 8.99, highest.

b. Fermentation of custard type chestnut

When the mixtures of cooked chestnuts and water in ration of 1:1 , in which no liquid layers were shown, were inoculated with 0.8ml of seed cultures and cultivated for 48 hours, F1R4 and PAP1 were highest in acidities with 3.26 and 3,66, and MGG1, MGG2, and NBL1 were highest in viable counts with 9.22, 9.16 and 9.24.

8) Effect of chestnut hydrolysis

When the chestnut broth hydrolyzed by liquefying enzyme and Koji

showed higher acidities than those by malt extracts. The range of acidities of both were 4.39-14.67 and 3.35-9.52. When this results compared with those of glucose addition, the increases were beyond the sole sugar effects.

D. Selection of the best strains among the isolates

1) Comparison of the growth abilities

The viable counts and acidities of the fermented broth of 8% chestnut and nutrient supplement were much higher with F1R4(9.05 and 5.26) and PAP1(9.32 and 5.21) than with any other tested strains.

2) Changes of viable counts during storage

The initial viable counts of MGG1 and MGG2(8.66 and 8.83) were reduced to 8.00 and 8.03 after storage of 3 weeks in 5℃ refrigerator. However those of F1R4 and PAP1(9.05 and 9.32) were reduced to 2.80 and 3.00. This result means the higher the acidity of the broth, the smaller the viable counts after storage.

3) Effect of pH on the changes of viable counts during storage

When the fermented broth were kept at 5℃ for 12 days after adjustment of pH to 5.17, the viable counts were 1000 times higher than the unadjusted broths.

4) Effect of the precipitates on the viable counts

The chestnut broth made through heating and homogenization has precipitates. The effect of precipitate was surveyed. The precipitate did not much influence the microbial growth and acidity production when MGG1 and F1R4 strains were used within the precipitate range of 0-23%. However in case of F1R4, which shows high acidity and low

viable counts after storage, the precipitate(23%) reduced slightly the lowering of the viable counts of the fermented broth after storage of 12 days at 5℃.

5) Selection by sensory evaluation

When the fermented broths were evaluated sensuously by the panel of 10 personnels, the scores were all very low in acidity, flavor, taste and body sense. The causes of the overall bad scores were thought to be the reduction of chestnut flavor by the heat sterilization, bad flavors eluted from the fermenting vessels, the excess of acid flavor, unsatisfactory body sense by low viscosity.

6) Final selection

a. Effect of the mixed cultures on viable counts and storage of custard type products

Based on the analysis of test results above, PAP1 and MGG2 were selected. The mixed cultures of both were better in viable counts than the cultures of single strains each. The mixed cultures in custard type products gave higher numbers of viable counts than single cultures after 3 week storages at 5℃.

b. Effect of the mixed cultures on storage of fluid type products

The viable counts of fluid type products made by the mixed cultures decreased to 6.62 after 2 week storage and to 3.65 after 3 week storage. However, the viable counts after 3 weeks increased to 4.60, 5.88, and 7.64 by each supplementation after fermentation with equal volumes of sugar, chestnut broth and both.

c. Comparison between the selected strains and the commercial seed

cultures

When the selected strains, Hansen YC-180(S.thermophilus+L. bulgaricus), and MSK B2(S. thermophilus+B. infantis+L. acidophilus)were compared on their ability to growth and acid production in chestnut broths, the selected strains and Hansen were better in viable counts than MSK. Acidity was the best with the selected strains. So Hansen was used in the making process study because of the ease in use while the selected strains in microbial study.

d. Examination on the possible inoculation size

When the inoculation sizes are lowered to 0.1% from 0.5%, the viable counts of the products did not decreased so much.

E. Final selection of the fermentation conditions

1) Optimum concentration of nutrients

The optimum concentrations of Phytone peptone and yeast extract were 0.8 and 0.8 at 0.5% glucose and the acidity. On this condition, the acidity and the viable counts with mixed culture of PAP1 and MGG2 were 5.11 and 9.42. However, yeast extract more than 0.2% and Phytone peptone more than 0.4% were thought to be enough to get the acidity and viable counts no less than 3.89 and 9.00.

2) Substitution of supplements with industrial byproducts

When the industrial byproducts such as soybean meal, soywhey and beer yeast waste were examined to see the possibilities of substitution with Phytone peptone and yeast extract, the beer yeasts were 1/3 times active to yeast extract and found to be unable to

replace yeast extract. However soybean meal and soywhey were active as much as phytone peptone.

3) Supplementation of health improving mushrooms extracts

Two kinds of healthy improving mushrooms, *Ganderma lucidum* and *Cordyceps militalis*, were added up to 40% and found not to inhibit the acidity and viable counts of the fermented broth.

4) Effects of stabilizers on viable counts

Two kinds of stabilizer, pectin and sodium alginate, were added up to 0.5% to see the effects on the acidity and viable counts. Sodium alginate increased both of the acidity and viable counts and pectin reduced both. This result indicated sodium alginate is the better choice to get higher viable counts.

5) Final selection of the fermentation condition and improvement of the sensory quality

From the accumulated data, final composition for the fermentation was determined, which consists of chestnut 8%, soybean meal 0.4%, yeast extract 0.2%, glucose 0.5%, sodium alginate 0.2%, and modified starch 2.0%. However the fermented products made from this composition need improvement.

a. optimum ratio of sugars

The products with 10% sweetners were favored most. The sensory values of sweetness were best with the combination of sucrose 4%, high fructose syrup 4% and honey 2%. However the economy considered, the combination of sucrose 5% and high fructose syrup 5% was selected as practical one.

b. optimum acidity

The sensory value of the acidity was improved best adjusting the titrable acidity of the product to 2.5-3.0.

c. optimum combination of flavors

The sensory value of the flavor was greatly improved by adding the mixtre of chestnut, yogurt, and vanila flavors at the concentration of 0.08, 0.01 and 0.01% respectively.

F. Development of cheap seed culture media

1) Utilization of soywhey

Soywhey, the byproduct of DooBoo(bean curd) making, was thought to be a good substitution to expensive media like Lactobacillus MRS broth because it contains much monosacchrides and oligosaccharides, which can supply energy source to fermenting bacteria and also contains minerals, which can neutralize the lactic acid produced.

a. Supplementation with sugars

When glucose were added to soywhey at the range of 0.2-1.6%, the viable counts of the products were best at below 0.2%.

b. Supplementation with soybean meal

When soybean meal were added at the range of 0-0.8%, the viable counts increased above 0.4%.

c. Supplementation with yeast extract

Supplementation with yeast extracts at the range of 0.1-0.8% did not increase the viable counts of the products with exception of 0.4%.

d. Titer of the developed media compared to MRS

When the two seed culture media, the soywhey which was supplemented

with 0.2% glucose, 0.4% soybean meal and yeast extract 0.4%, and MRS were used in growth of the selected strains(PAP1 and MGG2), both produced similar viable counts, though MRS produced a little more. So the supplemented soywhey was found out to be a good seed culture medium.

2) Utilization of sweet potatoes

Sweet potato broths produced acidity of 2.18 and viable counts of 9.05 while chestnut broth 1.30 and 8.83 respectively. The sweet potato broths hydrolyzed by liquafying enzyme and Koji produced acidity of 4.80 and viable counts of 9.33 and the chestnut broth hydrolyzed by the same ways 5.53 and 8.83. So sweet potato seemed to be able to replace chestnut when it is used at small size to minimize the influence of the different flavour.

2. Study on the making processes

A. Selection of chestnut forms as raw materials

When four types of chestnut materials, peeled raw, cooked, sweetened cooked, and freezed paste block, were compared on the criteria based on availability, storage properties, convenience and cost, freezed paste block was the best material forms for the production of fermented chestnut products.

B. Comparison of the components in chestnuts from different origin and lands

The difference of the components and colors of the chestnuts originated from the difference of the kinds and the locations were

insignificant and can not deserve attention because of the indiscriminated gathering and selling in the market.

C. Selection of the fermentation types for the products

The fluid type fermentation was selected from the facts that fluid type products are more favored 2.8 times by Korean consumers and more free from microbial contamination and quality consistency than custard type product.

D. Composition and contents in raw ferment liquor

1) Problems from the first test fermentaion

Problems like low body sense in taste of products, precipitates, requirement of long fermentation time were detected on the first preliminary production using tentative composition and condition.

2) Trials to find the best compositions

a. Selection of chestnut contents

(1) Sensory evaluation

When three contents of chestnut in the products, 5, 10, and 15 %, were evaluated by sensory tests, 10 and 15 % were significantly more favored than 5 %.

(2) Precipitate comparison

The higher the chestnut concentration, the more the precipitate. So the concentration of 8% was selected on practical reason and the data from microbial study.

b. Selection of sugar kinds

Though glucose produced more acid than high fructose syrup and sucrose, mixture of glucose and high fructose syrup were thought to be

better by consideration on cost and sweet feeling. Seed size of 50U/250kg was not much inferior in acid production than 100. However to achieve higher viable counts of the products, 100U/250kg was thought to be better choice.

c. Selection of sweetener ratios

When three combination of glucose and high fructose syrup, 6:7, 3:9, and 9:5, were compared, 6:7 was the best, though insignificant.

d. Supplementation with plant and mushroom extracts

When four kinds of the plant extracts, pine leaves, coal, wormwood, and mulberry leaves, and two kinds of the mushroom extracts, *Ganderma lucidum* and *Cordyceps militalis*, were added to the chestnut broth, the sensory scores with any of the supplements were lower than the score without any supplement. The score was in order of coal, *Cordyseps*, pine leaves, *Ganderma*, mulberry leaves, and wormwood with the wormwood the worst by changing the original chestnut taste.

e. Selection of best body sense

When the mixture of sodium alginate and modified starch were used as stabilizer at the concentration of 0.2 and 2.0% each, the increase in the viscosity of the product and the score of body sense and decrease in the precipitate were higher than the products added with each stabilizer separately.

3) Selection of the making processes

a. Prevention of the precipitation

To prevent precipitates developed even in condition with stabilizers, the downsizing processes of colloidal particles were

examined. The precipitation was prevented when the particle size was less than 50μ. However, with the burdens of work needed to decrease the size, 100μ was thought to be enough as a practical size.

b. Selection of sterilization temperature

Sterilization above 105℃ generated bad flavors and decreased the original chestnut flavors, but not below 75℃. However working time considered, sterilization at 85℃ may be practical.

c. Maintenance of viable counts

(1) Regulations in the food sanitation law

The viable count of 10.0(logCFU/ml) is favored in circulation in the market to deal with the unfavorable storage temperature and period met in this real world. However this counts couldn't be achieved with chestnuts as material. So 9.0 was selected as standard viable count.

(2) Fermentation time to meet the regulations

The fermentation needed more than 19 hours to reach the viable count of 9.0(logCFU/ml) in products

d. Processes for the selected stains in this study

For *Lactobacillus* MGG1 and *Lactobacillus* PAP1, isolated in this study, the medium composition for seed culture was soywhey with 0.02% glucose, 0.4% soybean meal, 0.4% yeast extract and the medium composition for main fermentation was chestnut 8, soybean meal 0.4, yeast extract 0.2, glucose 0.5, sodium alginate 0.2, modified starch 2.0, clean water 100. Fermentation each for 15 and 19 hours at 37℃ was enough to meet the required viable counts above 9.0.

To improve the taste and viable count, mixture of sucrose 5, high

fructose syrup 5, chestnut flavor 0.08, yogurt flavor 0.01, Vanila flavor 0.01, should be added to fermented liquor after fermentation and before homogenization.

The products made with the mixture of flavors had stable and unique taste and flavor enough to cover the bad flavors generated from the high temperature sterilization.

e. Flow sheet of making processes

(1) For the selected commercial strains

[cooking-->supermicro-colloidalization-->freezing into block--> mixing(chestnut 8%+clear water + glucose 6% + high fructose syrup 7% + stabilizer 2.2%) -->homogenization-->sterilization-->inoculation with seed culture -->fermentation-->homogenization-->filling and sealing-->preservation in refrigerator]

(2) For the selected strains in this study

[cooking-->supermicro-colloidalization-->freezing into block--> mixing(chestnut 8%+clear water+glucose 0.5%+soybean meal 0.4%+yeast extract0.2%+stabilizer2.2%)-->homogenization -->sterilization --> cultivation of seed culture(chestnut 8%+glucose 0.2%+soybean meal 0.4%+yeast extract0.4%)-->inoculation with seed culture--> fermentation-->mixing(sucrose 5%+high fructose syrup 5%+chestnut flavor 0.08%+yogurt flavor 0.01%+vanila flavor 0.01%) --> homogenization --> filling and sealing --> preservation in refrigerator]

4) Selection of the standard making processes

Standards and criteria in making process were presented in summery

and also quality standards were noted.

5) Selection of the standard circulation period in the markets

When the products were stored at 5℃ in a refrigerator on the same condition as commercial stores, the viable counts were decreased after 12 days and change in the taste was noted by one of the sensory evaluators. So the products should be kept below 5℃ and managed not to be sold beyond 12 days.

CONTENTS

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 필요성

1. 경제 산업적 측면

우리나라는 전 국토의 75%가 임야로 구성되어 있는 삼림국가이다. 따라서 삼림자원의 육성과 이의 효과적인 이용기술의 개발을 통하여 생산성재고와 부가가치 창출을 이루어내야 할 필요성이 절실한 여건이다.

우리나라의 임산물 중, 밤나무(*Castana crenata*)는 함경도 북부지역을 제외하고는 한반도 전역에 걸쳐 분포되어 있는 낙엽성 교목으로서, 9 10월에 황갈색의 결실을 맺으며, 나무는 최상급의 목재로 이용되는 등 매우 효용성이 높은 수종이다. 특히 그 열매인 밤은 옛부터 우리의 조상들로부터 자양식품으로 오랜 동안 널리 이용되어 온 견과류로서, 제사용품, 명절 또는 혼례 등 경사시의 필수불가결한 음식물의 하나로서 이용되어 오고 있을 뿐 아니라, 대단히 우수한 맛으로 인한 높은 기호도를 가지고 있어서 현재에도 전 국민으로부터 즐겨 이용되고 있다.

밤은 맛뿐만 아니라 영양 면에서도 우수하다. 밤과육의 영양분 평균함유량을 살펴보면, 수분함량은 61%, 조지방 1%, 회분 1%, 조단백 8.5%, 전분 47%이며, 비타민 C, A, B 등과 칼륨, 칼슘, 인 등 미네랄 성분도 풍부하여 영양식품으로 널리 알려져 있다(보건복지부 1996). 또한 밤은 약용으로도 이용되어 오고 있어, 한방에서는 율자(栗子)라고하여 기(氣)를 더하고 보위(補胃)를 해주고 신기(腎氣)를 도우는 좋은 약재로 이용되고 있으며, 율피(栗皮), 율모각(栗毛殼)등 껍질들도 좋은 한방약으로 사용되고 있다(東醫寶

鑑).

밤나무는 역사적으로 고려시대부터 전국에 걸쳐 심도록 권장되어온 유실수로서, 조선시대에는 강제성을 띠어 밤을 생산하는 농민은 부역에서 제외됐을 정도로 적극 장려된 결과, 경남 밀양을 비롯한 낙동강, 금호강변의 밤나무 숲, 한강유역의 밤섬 등을 위시하여 전국에 걸쳐 밤나무가 분포되게 되었다. 1968년도부터는 유실수심기 운동의 일환으로 밤나무를 전국에 걸쳐 연평균 2만3천ha을 조림하여 1978년까지 약 14만ha이나 조림한 결과, 현재의 밤나무 재배면적은 79,155ha (1996년 기준)에 이르고 있어서 전국적으로 밤나무가 대단히 많이 분포되어 있고 52,697가구가 밤을 재배하고 있다 (1996년 기준). 주로 경남(41%, 800억원), 전남(22%, 400억원), 충남(16%, 280억원) 지방에서 전체의 80%를 생산하고 있고, 지역별로는 산청(11.0%), 광양(10.1%), 그리고 하동(7.8%) 등지에서 많이 생산하고 있다(산림청 1998).

이러한 전국적인 분포로 인하여 우리나라의 밤 생산량은 세계 제2위로서, 년간 약 100,000톤으로 약 1,900억원 상당을 생산하고 있는바((FAO 1993-1995), 그 중 30%인 년간 30,000톤은 거의 전량이 당적밤의 형태로 일본으로 수출되고 있으며, 70%는 국내에서 일반 소비자에 의해서 가정용으로 소비되고 있다.

그러나 밤은 높은 기호도. 풍부한 영양가와 많은 생산에도 불구하고, 국내의 밤 가공제품 물량은 극히 미미한 상태에 있어, 소비가 거의 일반가정용으로 삶은 밤이나 군밤의 형태를 벗어나지 못하고 있는 관계로 실제 밤의 소비는 매우 저조한 실정이다. 또한 효과적인 밤 수확 기술의 개발도 미진한 상태에 있어 밤나무 재배농가는 의욕상실로 밤을 수확하지 않고 방치해 두는 실정에 있다.

따라서 이러한 방치에 의한 중요한 임산자원의 유실을 막고, 밤나무 재배

농가의 의욕을 고취시키기 위해서는 밤의 소비확대를 위한 대책이나 가공기술의 개발이 절실히 요청된다. 특히 밤을 이용한 제품의 다양한 개발은 밤의 소비와 생산을 확대시켜 직접적으로 농민의 밤생산 의욕을 고취시키고 소득을 증대시키는 경제적 효과를 가져다주게 되므로 가장 시급히 요청되고 있는 과제라 하겠다.

본 연구는 농민의 소득 증대를 꾀하고, 나아가 유휴상태에 놓여있는 국내 임산자원의 새로운 용도 개발과 활용률 제고로 국가경제에 이바지하며, 본 제품을 이용하는 국민들의 건강증진에도 공헌할 목적으로, 밤 소비를 확대시키기 위한 방편의 하나로 밤을 이용하여 기능성 발효제품을 개발하고자 하였다.

결론적으로 토속적이고 전통적이며 국민에게 친숙한 식품재료인 밤을 이용한 발효제품의 개발은 전국에 걸쳐 널리 분포되어 있는 밤나무의 활용도를 높여 임산농가의 소득을 증대시키고, 유실되어 가고있는 국내 임산자원의 활용율을 높이고, 생산성을 향상시키는 경제적인 직접효과를 줄 것으로 기대하였다. 이외에도, 옛부터 오랜 동안 내려온 전통적인 식품으로서의 개념을 가지고 있는 밤을 이용한 제품을 접하게 되므로 한국적 문화로서 국민들에게 친근감을 주게되며, 특히 우유문화에 익숙치 못한 사람들에게도 자연스럽게 인체에 이로운 젖산 발효제품을 가까이 하도록 만드는 긍정적인 영향도 주게 된다.

2. 기술적 측면

이미 지적한 바와 같이 밤의 소비 확대를 위해서는 무엇보다도 먼저 밤을 이용한 다양한 제품을 개발할 필요가 있다. 이에 본 연구에서는 밤을 이용하는 제품을 개발하는 한 방편으로 기능성이 있는 발효제품을 개발하고자 하였으며 그 이유는 다음과 같다.

밤의 생산 저조의 원인 중의 하나는 밤의 수확 시 탈각 및 탈피 작업의 어려움 때문이라고 할 수 있다. 이러한 어려움을 해결하기 위하여 최근 자동탈피기가 개발되어 이의 실용화와 효율증대를 위한 연구가 활발히 진행되고 있는 상황에 있다. 그러나 이 밤 자동탈피기는 탈피되어 나오는 밤이 원형을 유지하지 못하고 세절편상으로 파쇄된 형태로 밤이 탈피된다는데 현재로서의 문제점이 있다(산림청 1998). 그러나 본 연구의 발효제품에 이용되는 밤 원료는 제조 가공 중에 파쇄되므로 형태는 중요하지 않다. 따라서 밤을 자동탈피하여 세절편상으로 파쇄된 상태의 과육도 아무런 어려움 없이 이용할 수 있으므로 현재의 한정적인 자동탈피기의 기술도 효과적으로 이용할 수 있다. 따라서 본 연구는 간접적으로 밤 수확 기술과 제피 가공기술 등의 개발에 활력을 불어넣게 되어 관련분야의 연구의욕 진작과 기술발전을 촉진하게 된다

밤을 이용한 가공 제품 개발의 방편으로 발효제품을 선택한 또 하나의 이유는 발효에 의해 밤이 가지는 영양적 균형과 기능을 개선하기 때문이다. 밤의 중요성분은 전분으로서 총 47%를 차지하여 밤을 섭취하면 주로 에너지원으로써 작용할 것임을 알 수 있다. 우리나라는 70년대 이후의 경제 발전으로 국민들의 식량 형편이 크게 개선되었으며 이로 인해 이제는 국민, 특히 청소년층의 비만이 사회 문제로 대두되고 있는 형편이다. 따라서 에너지를 많이 함유하는 식품은 다른 기능이 아무리 많다 해도 저에너지식이 계몽되는 추세에서는 궁극적으로 소비에 한계를 가질 수밖에 없다. 따라서 밤을 이용한 가공제품은 에너지를 낮추고 다른 기능을 살리는 것이 되어야 한다.

유산균을 이용하여 밤을 발효시키면 유산균은 밤이 가지는 전분 등의 당질을 발효하여 에너지를 얻기 때문에 에너지 함량을 낮추게 되며, 에너지 소비의 결과로 유산, 아세트산 등의 기능성 유기산을 발효하게 된다. 아세트산, 프로피오산, 부틸산 등의 단쇄사슬 유기산(Hoverstad 등, 1984)은 최

근 그 기능이 많이 연구되고 있어 잘 알려져 있으며, 이들은 장의 산도를 낮추어 병원성 균들의 착생을 막고, 장 세포의 주 에너지원으로 이용되어 장벽 세포에 활력을 주게됨으로 장으로 하여금 각종 독성물질이나 병원성 균등에 대하여 더 큰 내성을 가지게 하며, 암세포의 착생과 생육을 억제하여 최근 증가 추세에 있는 장암의 발생을 낮추게 된다(Rasic과 Kurmann, 1983). 뿐만 아니라 밤 발효제품에 포함된 유산균은 장내균총의 균형을 개선하여 더욱 건강한 장을 갖게 한다.

밤을 이용한 기능성 발효제품을 개발하고자 하는 또 하나의 주된 이유는 식물성 발효제품의 개발에 관련된 기술을 축적하는데 있다. 우유를 이용한 발효 유제품은 현재 많이 상품화되어 널리 이용되고 있고 그 사용량은 증가 추세에 있지만 아직 장, 노년층에는 유제품에 익숙하지 않은 많은 사람들이 있고 청소년층에도 유제품이 가지는 유당에 대한 비내성, 유제품 성분에 대한 알러지 증상, 유지방이 가지는 고에너지에 대한 거부 등을 보이는 경우가 있기 때문에 식물성재료를 이용한 유산균 발효식품을 만들고자 하는 시도가 있어 왔다(유등 1989, 진 1991a, 1991b).

식물성 재료를 이용한 발효제품은 재료가 가지는 성분의 차이로 인하여 발효유제품이 가지지 않은 많은 문제점을 가질 수 있다. 예를들어 식물성 식품에 많이 존재하는 전분, 셀룰로스 등의 다당류는 용액 중에서 용해되지 않아 침전이 생기게 되며 발효제품의 침전물은 제품에 음용상의 문제와 미각상의 문제를 주게된다. 또 하나의 예상되는 문제는 구성 당이 주로 포도당이어서 가열 중에 다른 성분과의 반응에 의해 악취를 형성하거나, 변색을 주게되어 제품의 기호도에 문제를 줄 가능성이 있다는 것이다. 이 밖에도 제품의 기호도는 다른 여러 가지 요인에 의해 유제품에 비해 나빠질 가능성이 있다. 식물성 발효용액은 점도가 낮아 음용할 때 진한 맛이 아쉽게 될 가능성이 있고, 유제품에 비해 완충성이 떨어져 산도에 비해 pH가 유제품에

비해 더 낮아 같은 산도에서 산미가 더 불쾌한 자극으로 느껴질 가능이 예상된다.

따라서 본 연구에서 겪게 되는 많은 문제는 그것을 해결하는 기술로 이어지게 되며, 이러한 기술은 다른 식물성 발효제품에 적용될 가능성을 가지게 되기 때문에 식물성 발효제품의 개발을 촉진하게 될 것이다.

결론적으로 밤을 이용한 발효제품의 개발은 직접적으로 밤 소비를 촉진하여 밤 채취기, 제피기 등의 밤의 수확에 관련된 기술들을 촉진하게되고, 밤이 가지는 에너지를 낮추고 대신 기능성을 가진 유기산과 유산균을 증가시켜 영양적 불균형을 해소하고 인체의 장의 건강을 도모하게되며, 식물성 재료를 이용한 유산 발효에 관련한 기술을 개발하게 되어 다른 식물성 재료를 이용한 제품들의 개발을 촉진시키게 된다.

제2절 국내 외 관련기술의 현황과 문제점

밤을 이용하여 식물성 젖산균 발효제품을 제조하는 연구 개발사례는 국내외에 거의 없다. 따라서 관련 기술의 현황과 문제점은 알려진 바 없다. 다만 우유제품에 대해 거부감을 갖거나 식물성 식품을 선호하는 사람들을 위한 쌀(Mok 등 1991, 박종현 등 1997) 또는 감자(신 등 1994) 등의 전분질 식품 이용 젖산균 발효제품, 두유이용 젖산균 발효제품(Tominaga와 Sato 1996, 진 1991), 과일 및 채소이용 젖산균 발효제품(박소영 1997, 김기현 등 1989) 등이 해외에서는 1990년도부터 활발히 연구된 바 있고, 국내에서도 이와 비슷한 시기부터 연구되었거나 연구되고 있는 중에 있으나, 균주의 선별이용, 성상, 맛, 기호도의 열등 등 몇 가지 해결해야 할 문제점들이 있어 제품화가 이루어지지 못하고 있거나 제품화된 경우에도 소비자들로부터

선호도가 낮아 소비가 저조하여 문제가 되고 있는 것이 현 실정이다.

따라서 본 연구에서는 국내에서 많이 생산되고 있으나 효율적으로 이용되지 못하고 있는 밤을 이용하여 발효 제품을 개발해 보고, 개발과정 중에서 겪게 되는 많은 문제들을 소개하고, 이를 해결하여 관련 기술을 알림으로써 이제 시작 단계인 식물성 발효제품의 개발연구에 유용한 정보를 제공하고, 농가나 산업체 등이 직접 제품 생산에 이용할 수 있도록 제반 공정과 과정을 만들어 내어 보급함으로써 농가 소득에 보탬이 되고자 하였다. 이를 위해 본 연구는 밤의 발효에 관련되는 제반과정을 포함하며, 이용되는 밤의 적정한 일차가공 형태와 규격기준을 선정에서부터 밤 이외의 구성성분의 내용, 함유율 조정, 그리고 이에 따른 균주의 선택, 배양조건, 제품화공정, 제조 품질관리기준 설정, 유통 품질관리기준 설정 등에 이르기까지 모든 과정의 구체적인 세부기술의 연구와 개발을 도모하였다.

제3절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발 목표와 내용

본 연구는 미생물 연구와 제조가공 연구의 두 분야로 구성되며, 미생물 연구의 목표는 밤 용액의 발효에 최적의 적성을 보이는 균주를 분리, 선정하고, 발효조건을 검토 확정하며, 종균배양 배지를 개발하는 일이며, 제조가공 연구의 목표는 원료의 성분 차이를 극복한 제조 공정을 구축하고, 제조 품질관리 기준과 유통 품질관리 기준을 검토, 선정하는 것을 목표로 한다.

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

본 연구는 2년 연속과제로 이루어 졌으며 연도별 연구개발과 목표는 다음과 같다. 1차년도에서는 원료로 이용할 밤의 1차 가공 기준을 선정하고, 밤의 품종별 구성성분의 함유율의 차이를 비교하고자 하였다. 이는 당의 함량 차이와 단백질의 함유율 차이로 유래될지도 모를 맛의 차이와 젖산균의 발효속도 차이 등의 원료기인 제품 편차를 극복하기 위한 사전 검토 과정이라고 하겠다. 본 연구에서 검토하고자 한 품종은 경남 산청, 충남 공주지역 등 우리나라의 대표적인 밤나무 재배지역 중 남쪽지방과 중부지방의 산지를 선택하여 9월초 수확의 중생종인 은기와 9월말이후 수확의 만생종인 옥광의 두 품종과 전북지역에서 자생하는 재래종을 대상으로 하였다. 이러한 밤의 원료형태 (제피율, 증숙율, 가당증숙율, 냉동 paste block 등)와 산지별(산청, 공주) 및 품종별(은기, 옥광) 성분함량차를 극복하는 최선의 원료구성 성분의 함유율을 도출하고, 아울러 유산 발효균을 선발(장내세균 분리와 시판 세균들로부터의 선발)하고, 밤용액을 기초 배지로 하고 분리한 유산균들의 발효적성과 이들의 생육과 발효를 촉진할 배양조건 설정(각종 첨가물의 영향을 검토)하며, 분리한 유산균을 보존하고 저장중 발효액 균주의 생존에 유리한 조건을 검토(사멸속도, pH 의존성, 칼슘 같은 무기질 등)하여, 원료의 선별과 발효균주의 분리에 이르기까지 관련되는 핵심적 기술을 개발하고자 하였다.

2차 연도에서는 분리한 균주들로부터 제품을 만들어 각종 특성을 비교하여 발효에 이용할 균주를 최종 선정하고, 제품의 제조에 최종 이용할 발효조건을 확정지으며, 종균배양 배지의 비용을 낮추기 위하여 산업 부산재료나 천연 농산물을 이용하여 사용가능한 종균배양 배지를 개발하고자 하였다. 아울러 원료의 배합, 살균공정, 발효공정 등의 조건을 검토하여 최종 제조공정을 설정하고, 제조시 나타날 각종 변화와 이에 대처하여 최종제품

의 품질을 균일하게 유지하는데 이용되는 품질관리 기준을 설정하며, 출하된 다음 제품이 겪게될 현행 유통과정의 조건을 바탕으로 유통 기간 중 제품의 특성과 품질의 변화를 검토하여 유통 중 품질의 열화를 방지할 수 있는 품질관리 기준을 설정하고자 하였다.

이러한 연도별 개발 내용과 범위는 다음의 표 2에 요약된다.

표 2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발목표	연구개발 내용과 범위
1차년도 (1998)	밤이용 발효제품 구성조건 연구	① 밤의 적정한 일차가공 기준 선정 (원료밤 : 깐밤, 증숙율, 가당증숙율, 냉동 paste block 중 택일) ② 구성성분의 조성과 내용 (맛과 기능성) ③ 밤 품종별(은기,옥광), 산지별(공주, 산청) 구성성분의 함유율 (맛과 기능성) ④ 젖산균 발효균주 선택 (효율,맛 : 장내세균 : *Lactobacillus, Bifidobacteria*의 분리,시판 : *L. acidophilus, L. casei, L. bulgaricus*의 발효적정시험) ⑤ 젖산균 발효조건 검토 (공정 맛:당의 영향, 질소원 및 무기질의 영향) ⑥ 젖산균 보존 배양조건 검토 (사멸속도 확인 및 Ca, 섬유질의 첨가에 의한 사멸 지연효과, pH 의존성)

(표 2의 계속)

		① 밤 품종별(은기,옥광), 산지별(공주, 산청) 성분차이를 극복한 최적의 구성성분의 조성과 내용 함유율 설정 (맛, 기능성)
		② 젖산균 발효균주 확정 (효율, 맛)
		③ 젖산균 발효 배양조건 설정 (공정,맛, 부산재료 사용)
2차년도 (1999)	밤이용 발효제품 제조기준 설정	④ 종균 배양 배지의 개발(천연재료를 이용)
		⑤ 제품의 포장, 형태 선정
		⑥ 제품 제조공정 설정(경제성, 용이성 고려)
		⑦ 제조 품질관리 기준 설정
		⑧ 유통 품질관리 기준 설정

제4절 추진과정과 방법

1. 1차적 개발

먼저 1차년도에는 현재까지 예비실험을 통하여 획득한 기초자료 등을 토대로 계속적으로 시제품을 제조하며 원료 밤의 형태를 선정하는 과정부터 실시하였다. 즉, 깐밤, 증숙율, 가당증숙율, 냉동 paste block 등의 원료를 밤의 형태별 경제성, 보존성, 맛에 미치는 영향 등을 검토하여 택일하고, 또한 맛을 위주로 하여 밤의 품종별(은기, 옥광) 및 산지별(공주, 산청) 대응의 구성성분의 조성과 내용을 설정하였다.

동시에 사람으로부터 장내세균을 분리하여 *Lactobacillus*와 *Bifidobacteria*의 균주들을 선발하고 이들과 시판 유제품으로부터 분리한

Lactobacillus 균주들의 발효적정을 비교하여 적정 균주의 선정을 시도하고 관능검사를 계속하면서 선호도가 높은 제품을 일차적으로 개발하였다.

세부적 연구 : 이 일차제품의 구성과 균주 선정을 기초로, 제조가공 연구부문에서 세부적인 맛과 성상에 의한 조성을 선택하고, 미생물 연구부문에서는 당의 영향과 질소원 및 무기질의 영향 등을 검토하여 균주의 경제적 배양조건을 기준으로 한 선택실험을 행하고 사멸속도 확인 및 칼슘, 섬유질의 첨가에 의한 사멸지연효과와 pH 의존성 등을 조사하여 가장 맛이 좋은 구성과 활성이 높은 균주의 선발을 도모하였다.

2. 2차적 개발

미생물 연구분야: 1차년도 연구 결과 품종 및 산지별 성분차이에 의한 영향은 미미하였으나 각종 첨가물의 영향은 컸다. 따라서 2차 년도에는 실제 공정에서 이들 첨가물의 효과를 얻되 경제성을 고려하여 천연물이나 산업부산재료로 대체하는 실험을 시행하였다. 즉 yeast extract 대신 yeast paste, Phytone peptone 대신에 대두박 또는 순물(두부제조 부산물) 등을 이용할 수 있도록 조건을 잡았다. 아울러 1차년도 실험에서 사용한 종균배양 배지인 lactose MRS broth를 대체할 저렴한 배지를 개발하기 위하여 저렴한 각종 천연 재료와 산업 부산물을 시험하고 선정하였다.

1차 개발에서 분리한 10가지 균주 중 생육적성이나 맛, 유통기간 중의 생존율 등을 고려하여 최종 균주를 2-3종 선정하고 이들을 이용한 시제품을 제조하고 시판 균주들과 발효특성을 비교하고, 관능검사를 시행하여, 최종 균주를 선정하였다.

제조가공 연구분야: 제품의 포장 형태는 마시는 형태, 또는 떠먹는 형태 등의 섭취형태, 일회당 섭취량, 용기의 획득 용이성 등의 기술적 측면과 현실적 산업화 가능성을 종합하여, 가장 실현성이 높고 적합한 형태의 제품

포장 형태를 선정하였다.

제품 제조공정은 일차 년도의 연구 개발 결과와 미생물 연구 부문의 연구 결과를 포함하여 당년도의 연구를 완성하여, 밤의 가공형태로부터 시작하여 완제품의 포장에 이르기까지의 제조 공정을 가공 요소별로 구분하여 표준화 함으로서, 가장 경제적이며 동시에 계속적이고 재현성 높은 최적 가공공정의 흐름도와 기준 조건을 설정하였다.

제조 품질관리 기준은 제조공정의 설정과 더불어, 가공공정의 요소별 최적의 품질표준을 설정한 다음, 가공 조건과 함께, 물리적 및 화학적 분석치의 표준화에 의하여 설정하였다. 온도 조건, 성상, 관능검사, Ph, Brix, 산가, 그리고 총균수 및 유산균수 등을 최적화하여 설정하였다.

유통 품질관리 기준은 제조 품질관리 기준과 유사한 방향에서, 제품의 시장 유통시의 품질 유지를 위한 품질관리 기준을 설정하는 연구를 수행하였으며, 주로 보관온도 등의 취급조건과 성상검사, 관능검사, Brix, 총균수 및 젖산균수 등의 검사기준치 등이 관리기준으로서 수치화 되고 표준화되었다.

최종개발: 최종 제품은 미생물 연구와 제조가공 연구간의 긴밀한 정보교환과 물적 교류를 바탕으로 완성하였다.

제5절 연구 참여자의 구성과 역할

표 3. 연구원의 구성과 역할

구 분	성 명	소 속	역 할
총괄연구 책임자	진효상	전주대학교 생명과학부 교수	총괄지휘 및 감독
세부과제 책임자	진효상	전주대학교 생명과학부 교수	미생물 연구분야
세부과제 책임자	진홍승	전주대학교 객원교수 우정식품연구소 소장	제조가공 연구분야
연구원	양은진	전주대학교 대학원 학생	미생물 연구 분야
연구 보조원	김현진	우정식품연구소 사원	제조가공 연구분야
연구 보조원	김종범	전주대학교 생명과학부 학생	미생물 연구분야

제2장 미생물 연구분야

제1절 서 설

유산균은 발효대사의 산물로 유산(lactic acid)을 생성하는 균을 말하며, 그람양성이고 포자를 형성하지 않으며 주로 비운동성이다. 이들은 순수하게 유산만을 발효하는 동형발효균(homofermentative)과 유산 외에 다른 물질, 주로 탄산가스와 ethanol을 발효하는 이형발효균(heterofermentative)으로 나뉘며 이는 fructose bisphosphate를 분해하는 aldolase의 유무에 의해 결정된다. 이들 대부분은 당을 대사하여 에너지를 얻고, 생합성 능력이 제한되어 복잡한 영양을 요구하기 때문에 당이 존재하고 기타 영양물이 풍부한 서식지에 국한하여 분포하게 된다. 유산균에서 주목되는 주요속으로는 *Streptococcus*, *Leuconostoc*, Pediococcus, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*등이 있으며 Leuconostoc을 제외하고 거의 다 동형발효에 속한다. 이 중 *Streptococcus*는 서식지가 뚜렷이 다른 다양한 균들을 포함하여 오늘날에는 낙농제품에서 서식하는 *Lactococcus*와 장에서 서식하여 분변에서 발견되는 *Enterococcus*와 나머지 균들인 *Streptococcus*로 분류되고 있다 (Madigan 등, 1997).

이들중 식품에서 주목되는 것은 *Streptococcus*(즉 *Lactococcus*)와 *Lactobacillus*이며 이들은 전통적으로 많은 발효유제품에 이용되어 왔으며 오늘날에도 많은 낙농제품의 제조에 이용되고 있다. 이들 유산균들이 요구르트 등의 형태로 오늘날 산업적으로 대량 소비되고 있는 이유는 이들이 probiotic으로서의 기능을 가진다는 것이 알려지면서이다. probiotic이란

antibiotic에 대비하여 조성된 말로 antibiotic이 생물의 생육을 억제하는 데 반하여 probiotic은 생물의 생육을 증진시킨다는 의미를 가지고 있다. 이 말을 최초 사용한 사람들은 Lilly와 Stillwell이며 이들은 "다른 생물의 생육을 촉진하는 원생동물에 의해 생산되는 물질"을 지칭하였으나, 최근에는 Fuller 등에 의해 "장내세균의 균형을 개선하여 숙주의 건강을 이롭게 하는 생균 보충식품"을 의미하는 말로 전환되었다(Fuller, 1989).

probiotic이 중요하게 인식되는 이유는 항생물질은 오직 발병 이후에 사용되어지고, 내성균을 전파시켜 그 사용량이 증가될 수밖에 없으며, 대다수 항생물질이 인체에 많은 부작용을 일으키는 문제를 가지는 반면 probiotic은 숙주의 자연 미생물 균총을 강화하여 감염을 사전에 예방하기 때문에 항생물질의 부작용을 근절시킬 수 있는 유일한 대안으로 등장하고 있기 때문이다. 이러한 면에서 유산균은 장내세균의 균총을 개선하여 장을 통해 감염되는 많은 질병을 예방할 수 있게 한다고 인식되고 있다(Fuller, 1989).

장내세균의 역할 중에 중요한 하나는 병원성 미생물의 감염을 예방하는 미생물 방벽(microbial barrier, or interference)으로서의 역할이다(Tanock 1981, 1984). 이는 장내세균이 침투한 병원성 균으로부터 장벽표면의 부착부위와 필수영양성분을 경쟁적으로 빼앗거나(Salvage, 1877), 단쇄지방산(short chain fatty acids: SCFA)(Rolfe, 1984) 및 bacteriocin 등의 여러 가지 억제물질(Salvage, 1877)을 생성하여 병원균을 억제하기 때문인 것으로 알려져 있다. 장내세균은 또한 여러 가지 대사적, 생화학적 기능을 수행하는데(Macfarlane과 Gibson, 1994) 예를들면 숙주 소화효소들이 분해하지 못하는 식사 성분 및 노폐 장벽세포 등의 중합체들을 가수 분해시키며, 아미노산을 deamination에 의해 ammonia로, decarboxylation에 의해 아민으로 전환시키거나, 방향성 아미노산을 deamination, transamination, dehydrogenation시켜 phenol성, indol성 화합물이 형성하며, 담즙산, 콜레

스테롤, 호르몬 등의 담즙 steroid물질은 세균효소에 의해 deconjugation(Wostmann, 1981), desulfuration, transformation(Eyssen과 Verhulst, 1984)된다. 이밖에도 장내세균은 면역 기능의 강화(Gordon과 Pesti, 1971), 소화, 흡수(Macfarlane과 Gibson, 1994), 음식물의 이동속도, 장벽세포의 재생율 등의 숙주 생리(Corring 등, 1981)에 대하여 영향을 미치는 것이 동물 대상 실험에서 확인되기도 하였다.

유산균 probiotic은 이러한 장내세균의 이로운 작용을 강화하거나 보충하여 인체의 건강을 돕는다는 많은 보고에 힘입어 요구르트 등의 음료 형태로 널리 소비되고 있을 뿐만 아니라 변비, 설사 등의 각종 특정 질환의 예방 또는 치료를 목적으로한 tablet 형태의 의약제재로도 이용되고 있다. 예를 들어 여행자 설사를 예방하는 방법으로 *Lactobacillus* GG(Oksanen 등, 1990)나 L. acidophilus, L. bulgarius, Bifidobacterium bifidum, *Streptococcus thermophilus*의 혼합균(Black 등, 1989)을 사용하며, 노인성 변비에는 요구르트형의 acidophilus milk가 사용되거나(Alm 등, 1983) *Lactobacillus*와 섬유소가 함께 처방된다(Floch와 Moussa, 1998).

요구르트는 전통적으로 우유를 유산균으로 발효시켜 만들어 왔으나, Allergy, lactose intolerance 등의 문제를 지닌 사람이나 저지방 다이어트를 행하는 사람에게는 기피되어 왔다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 최근 식물성 요구르트가 시도되어 우리나라에서도 당근(박소영 등 1997), 토마토, 가수분해한 쌀(박종현 등 1997), 계란 등의 원료를 이용한 발효제품 개발이 시도된 바 있으나 기존의 유제품에 비해 선호되고 있지 못하다. 이는 식물성 또는 동물성 요구르트가 유제요구르트에 길들여진 사람들의 미각에 익숙하지 못하거나, 제품이 가지는 유익한 특성을 규명하여 홍보하지 못한 때문으로 보여진다.

본 연구의 미생물 연구 분야에서는 사람 및 상업용 요구르트에서 균을 분

리하고, 밤용액에서 생육 적성, 발효액에서 장기간 보존 가능성, 발효제품의 맛 등을 고려 균주를 선정하고, 동정하며, 이들을 이용한 밤 용액의 발효 조건을 검토하고 최적 조건을 선정하며, MRS배지를 대체할 저비용의 seed culture 배지를 개발하고자 하였다. 그 이유는 밤이 가지는 기호도가 기존의 다른 식물성 혹은 동물성 원료에 비해 클 것이라는 생각과 밤이 가지는 특수한 성질 예를들면 전분질 식품으로서는 비교적 섬유소가 높아 변비를 가지는 사람들에게 권유되어 온 식품이라는 특수한 기능성이 고려되었기 때문이다.

제2절 연구재료 및 방법

1. 균주의 분리

실험에 자발적으로 참여를 원하는 20-26세의 전북지역 대학생들 중 정상적인 배변습관을 가지는 남학생 11인과 여학생 4인을 선정하고, 이들 중 최소 1주일 이상의 금주를 시행한 대상자들로부터 차례로 원하는 시간에 실험실에서 가까운 지정된 장소에서 분변시료를 제공케 하였다. 분변표본은 즉시 냉동저장용 배지(Balmer & Wharton,1989; BHI 37g, glycerol 100ml, cysteine 0.5g, resazurin 0.1% sol. 1ml, pH7)에 혐기적으로 희석하고 CO2 가스로 치환된 작은 병에 소액분주하여 -60℃냉동고에 보관하였다.

냉동보관된 시료를 실온에서 서서히 용해시킨 것을 희석용 배지에서 혐기적으로 희석하고 이중 10-1-10-6의 희석액을 선택배지(modified Tomato-juice agar 및 MRS agar with Bromcresol green)에 도말하고, 37℃ CO2하에서 2-3일 배양하였다. 평판배지에 나타난 집락들 중 그람 양성이고, 간균 또는 coryne형이고, catalase 음성인 균을 순수 분리하였다(Balow 등,

1991).

시판 요구르트 3종을 위의 절차로 희석하고 Lactobacillus MRS agar(Difco)에 도말하고 CO2로 충전된 Anaerobic jar에서 2-3일간 배양하고 집락을 관찰하여 그람 양성이고 간균 또는 coryne 형이며, catalase 음성인 균들을 순수 분리하였다.

2. 균주의 동정

분리된 장내세균의 속을 구별하기 위하여 Rapid ID 32A (bioMeieux, France)를 이용하여 urease activity, α- 및 β-galactosidase 활성, α-glucosidase 활성의 유무를 측정하였고, fructose-6-phosphate phosphoketolase(F6PPK)활성을 측정하고, 발효물의 형태를 HPLC(Shimadzu)로 확인하고 acetate/lactate 비를 계산하여 Chevalier 등(1990)의 분류법에 따라 동정하였다.

3. 밤용액 제조 및 발효

신선한 밤 2kg을 깨끗이 씻은 후 껍질 채 물에 잠길 정도로 넣고 30분간 자비하였다. 완숙된 밤은 칼과 작은 스푼을 사용하여 과육을 껍질로부터 파내어 1.5kg을 얻었다. 과육은 소량씩 비닐 밀봉 포장한 다음 냉동하고 필요시 사용하였다. 발효를 위하여 냉동 증숙밤을 증류수에 넣고 녹인 다음, 호모지나이저를 이용하여 균질화한 다음 일정액을 고무마게 달린 용기에 넣고 멸균한 다음 막 배양된 seed culture를 1-4% 접종하고 37℃ 배양기에서 1-2일 정치 배양하였다.

4. 성분 분석

발효액의 pH는 발효액 5ml를 취하여 50ml 용적의 비이커에 넣고 증류수 5ml를 가한 다음 pH 미터(TOA HM-20S)로 측정하였다. 산도는 위의 같은 용

기의 발효액에 페놀프탈레인 3방울을 가한 다음 자동적정기(Digitrate)를 사용하여 0.1N NaOH를 적가하고 중화에 소비된 NaOH용액의 ml수를 측정하였다. 균수를 측정하기 위해서는 발효액을 희석액(Mitsuoka: Mitsuoka 1980, 또는 1/4 역가의 린져액)에 10배씩 희석하고 적당한 배수의 희석액 한 방울(약25㎕)을 PTY 평판배지(Trypticase 10, Phytone 5, yeast extract 2.5. glucose 5, Tween 80, cysteine·HCl 0.5, K2HPO4 2, MgCl2·6H2O 0.5, ZnSO4·7H2O 0.25, CaCl2 0.15, FeCl3 0.03 g/l)에 도말하고 혐기배양기에서 37℃, CO2가스에서 2-3일간 배양하였다. Cream Image Analysis의 Bac Program을 이용하여 배양한 평판배지 위에 나타난 colony의 수를 세고 이 수에 희석배수를 곱하여 1ml중 균수를 계산하였다. 계산된 균수는 상용 log 표를 이용하여 Log10(CFU/ml) 값으로 환산하였다.

5. 관능 검사

발효액의 관능검사는 사전 교육된 학생 및 대학원생들로 구성된 10명의 검사 요원들에 의해 수행하였고 기호척도법에 따라 5점 평점법으로(5=아주 좋다, 3=보통이다, 1=아주 나쁘다) 평가하여 1단계의 채점으로 하였다.

제3절 연구결과

1. 미생물의 분리

가. 성인 남녀의 분변에서의 균 분리

성인남녀에서 분리한 균들을 형태적 관찰과 호기성 및 혐기성 배양시험, catalase 시험 등을 수행하여 1차 분리한 다음, 밤용액에서의 발효적성을 시험하여 최종 5균주를 분리하고 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, F1R4로 명명하였

다.

나. 시판 요구르트에서의 균 분리

위와 같은 과정으로 시판 요구르트에서 형태적 관찰, 호기성 및 혐기성 배양시험, catalase 시험, 그람염색 등을 통하여 1차 분리하고, 이들 중 밤 발효적성이 좋은 최종 5균주를 분리하고 MGG1, MGG2, NBL1, PAP1, PAP2로 명명하였다.

다. 분리균의 동정

분리된 10가지 균주를 동정하기 위하여 rapid32A kit를 이용하여 생화학적 특성을 조사하였다. 그 결과는 표 4와 같다.

표 4. 분리균주의 생화학적 특성

test	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
URE	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
αGAL	+	+	+	+	-	-	-	w	-	+
βGAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
βGP	w	w	w	w	-	-	-	+	-	w
αGLU	-	-	-	-	+	w	+	-	w	-
βGLU	+	+	+	+	w	+	+	+	+	+
αARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
βGUR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(다음 쪽에 계속)

(표 4의 계속)

βNAG	+	+	+	+	w	w	+	+	w	+
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RAF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
αFUC	-	-	-	-	w	+	w	-	+	-
NIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAL	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
ArgA	w	w	w	w	w	w	+	w	w	w
ProA	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
LGA	w	w	w	w	-	w	-	w	-	w
PheA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LeuA	w	w	+	+	+	+	+	+	+	w
PyrA	+	+	+	+	-	w	-	+	w	+
TyrA	w	+	+	w	-	w	-	w	w	w
AlaA	w	w	w	w	w	+	w	w	+	w
GlyA	w	w	w	w	-	w	-	-	-	w
HisA	+	+	+	+	+	+	w	+	+	+
GGA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SerA	+	+	+	+	+	w	w	+	+	+

유산균의 생화학적 특성을 비교하면 *Bifidobacterium*은 α-galactosidase (α-GAL)와 α-glucosidase (α-GLU)가 양성이며,

*Streptococcus*는 urease, α-GAL이 음성 β-galactosidase가 양성인 데 반하여 *Lactobacillus*는 α-GAL은 음성, α-GLU는 양성으로 알려져 있다 (Balow 등, 1991). 이러한 특성을 바탕으로 본 연구에서 분리된 균주들을 분류하면 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, NBL1, PAP2과 F1R4, MGG1, MGG2, PAP1의 두 그룹으로 분류할 수 있다. 이들을 Chevalier 등의 분류법 (Chevalier 등, 1990)에 의존하여 속 수준으로 최종 분류하기 위하여 각 균주들의 F6PPK 활성과 발효물의 acetate/lactate 비를 검사해본 결과 표 5와 같았다.

표 5. F6PPK 활성 및 발효산물의 분석

시험종목	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
F6PPK	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
acetate /lactate	1.36	1.80	1.82	1.92	0.04	0.01	0.02	2.50	0.01	2.10

분리된 균중 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, NBL1, PAP2는 acetic acid발효를 발효하고 F6PPK 활성을 가져 *Bifidobactrium*인 것으로 나타났고, F1R4, MGG1, MGG2, PAP1는 acetic acid를 거의 발효하지 않고 F6PPK 활성을 가지지 않아 *Lactobacillus*인 것으로 나타났다.

2. 분리균주의 발효적성

가. 밤 현탁 용액의 발효시험

이상의 10 균주들에 대하여 밤 현탁 용액에서의 발효적성을 시험하였다.

이를 위해 증숙밤 4g을 증류수 100ml에 가하고 균질화 시킨후 LK tube에 10ml씩 넣고, MRS 배지에서 하룻밤 배양한 seed culture를 4% 접종한 다음 37℃에서 배양하였다. 배양 후 36시간과 60시간에 발효액을 꺼내어 5ml를 취하고 동량의 물을 가한 다음 phenolphthalein 용액을 2-3 방울 가하고 0.1 N NaOH로 적정하여 산도를 측정한 결과는 표 6과 같다.

분변에서 분리한 균들과 시판 요구르트에서 분리한 균들은 모두 밤 현탁액에서 산을 형성하여 발효적성이 있음을 나타내었고, 대체로 분변에서 분리한 균들이 시판 유산균류 보다 산 생성이 더 좋았다. 일부 균은 60시간까지의 발효시간의 경과에 따라 산 생성을 증가시키지 않았지만 일부는 증가시켰기 때문에 이후 발효시간은 48시간으로 조정하여 발효조건을 조사하였다.

표 6. 밤용액에서의 발효시험

발효시간	적정산도*									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
36	1.58	1.59	1.64	1.37	1.65	0.84	0.88	0.81	1.58	0.72
60	2.11	1.69	1.61	0.72	1.67	0.71	0.74	0.78	1.74	0.82

밤농도: 4 g/100 ml 증류수

*: 적정에 소비된 0.1N NaOH 용액 량(ml)

나. 밤 용액 중 증숙밤 함량의 영향

전 실험의 낮은 농도의 밤 현탁액에서는 산 생성이 낮은 것으로 보아 균체의 생육이 저조한 것으로 사료되었다. 이에 증숙밤의 농도를 증가시키면

서 산생성의 변화를 조사하였다. 그 결과는 표 7에서와 같이 분리한 균들은 밤현탁액에서 증숙밤의 농도를 2%에서 32%의 범위에서 증가시켰을 때 산을 더 많이 생산하였으며, 농도 증가에 의한 산생성 촉진의 크기는 F1R4와 PAP1가 가장 컸고 4%에서 8%로 증가시킬 때 상승폭이 가장 컸다. 따라서 밤 농도는 8% 농도를 사용함이 가장 경제적인 것으로 사료되었다.

표 7. 발효액의 산도에 미치는 밤 농도의 영향

농도	적정산도									
(g/100ml 물)	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
2	1.19	1.10	1.15	1.23	1.58	0.80	1.12	0.79	1.53	0.55
4	1.84	1.94	1.62	2.12	1.85	0.78	0.88	1.01	2.16	0.96
8	2.75	2.12	2.63	2.28	4.56	0.99	1.27	1.48	4.97	1.28
16	3.23	3.02	3.20	2.76	8.09	1.35	1.77	2.29	7.79	1.85
32	3.84	3.72	4.15	3.78	9.08	2.47	2.42	3.23	8.88	3.22

다. 산 생성에 미치는 밤 품종의 영향

밤은 품종별로 크기와 조성이 다르기 때문에 발효시에는 이러한 차이를 고려해야 할 것으로 사료되어 은기, 이평, 야생종을 선정하여 발효시 산생성에서의 차이를 비교하여 보았다. 산생성에 미치는 지역별 밤품종의 영향을 살피기 위해 산청산 은기와 이평을 전북지역의 야생밤을 선택하고 발효성향이 비슷한 M1R1, MGG2, MGG1, F1R4, PAP1을 선정하여 발효시킨 다음 비교하였을 때 그 결과는 표 8와 같았다. 증숙밤 8%와 32% 및 증숙밤 8%와 영양보충한 밤용액에서 발효된 산도는 밤의 품종에 의한 차이보다는 균주의

차이가 훨씬 컸다. 따라서 산도 면에서는 밤 품종에 의한 차이는 중요하지 않다고 사료되었다. 다만 밤 과육을 준비하는 과정에서 밤의 맛은 품종에 따라 큰 차이가 나타났다. 따라서 최종 발효제품의 맛을 고려하는 단계에서는 이러한 차이를 고려해야 할 것으로 사료된다.

표 8. 밤 종류에 따른 산도 변화

발효조건	품종	적정산도				
		M1R1	MGG2	MGG1	F1R4	PAP1
C8	야생	1.88	0.60	0.66	2.45	2.39
	은기	1.73	0.74	0.63	2.33	2.44
	이평	1.92	0.72	0.65	2.21	2.29
C32	야생	3.26	1.46	1.60	6.18	6.06
	은기	3.26	2.22	1.96	6.94	6.80
	이평	2.82	1.81	1.82	5.96	6.18
C8S	야생	2.80	3.35	3.36	5.85	5.55
	은기	2.75	3.36	3.32	5.63	5.48
	이평	2.92	3.29	3.27	5.60	5.62

야생: 전북지역산, 은기, 이평: 산청산

C8: 밤 8g/100 ml 물, C32: 밤 32g/100 ml 물

C8S: 밤 8g/100 ml 물 + 영양보강(glucose 0.5%, Phytone 0.4%, 및 Yeast Extract 0.2%)

3. 배양조건 검토

가. 당 첨가의 효과

당을 0.5%에서 8%의 범위에서 다른 농도로 첨가하여 산생성이 증가되는지를 검토하였다. 그 결과 표 9에서와 같이 당의 첨가에 의해 산생성이 촉진되지 않았다. 이는 당 첨가에 의해 생성된 산에 의해 균의 생육이 억제되기 때문으로 생각되나 본 실험에서는 산도만을 측정하여 이를 확인할 수 없다. 당 첨가에 의해 추가 생성되는 산의 양은 균주의 종류에 의해 다르게 나타났다. F1R4, MGG1, MGG2, PAP1 등의 *Lactobacillus* 속의 균들은 첨가되는 당의 농도에 따라 산생성이 증가되었으나 나머지 *Bifidobacteria*들은 증가하지 않거나 감소하여 다른 경향을 나타내었다.

표 9. 산도에 미치는 당 함량의 영향

함량 (%)	적정산도									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0.5	2.37	1.98	2.29	1.07	1.80	3.32	3.12	0.82	2.49	0.92
1.0	2.18	2.01	2.14	0.81	1.89	3.66	3.15	0.92	2.75	1.05
2.0	2.16	2.17	2.06	0.81	2.22	3.71	3.20	1.03	3.06	0.91
4.0	2.20	2.24	2.33	1.01	2.76	3.76	3.60	0.91	3.57	0.83
8.0	2.26	2.07	2.35	1.10	3.12	3.48	3.31	0.79	3.69	0.85

밤함량: 8 g/100 ml 물

나. 영양물 보강의 효과

밤의 조성을 고려할 때 밤 용액은 당질을 풍부하게 포함하고 있다고 생각

되지만 다른 영양소는 충분치 않거나 당에 적절한 비례에 있지 않다고 생각되어 밤용액에 질소원과 생육 촉진 영양성분을 보강하고 산생성에 미치는 영향을 조사하였을 때 표 10과 같은 결과를 얻었다.

Cysteine은 질소 원으로서 뿐 아니라 환원성으로 인하여 흔히 혐기성 조건을 요구하는 균들의 생육을 촉진하기 위하여 첨가된다. Cysteine을 0.05%의 농도로 배지에 첨가한 결과 *Lactobacillus* 속의 균들은 오히려 산생성이 감소되는 경향을 보이는 데 반하여 *Bifidobacteria* 속의 균들은 증가되었다. 이는 *Lactobacillus*는 미호기성으로서 비교적 높은 양성의 OR potential을 요구하는데 비하여 *Bifidobacteria*은 혐기성 균으로써 음의 OR potential을 요구하는 차이에서 비롯되는 것으로 보인다. 따라서 최종 선정되는 균주의 발효배지를 조성할 때는 선정된 균주의 종류에 따라 OR potential을 고려하여 배지를 조성해야 할 것으로 사료된다.

제조 원료가 다른 3종의 peptone을 질소원으로 가한 결과는 균주와 peptone의 종류에 따라 산생성이 크게 달라지는 경향을 나타내었다. 일반적으로 *Lactobacillus*는 *Bifidobacteria*에 비해 peptone 첨가에 의하여 산생성이 더 크게 촉진되었다. 가장 큰 촉진은 Phytone peptone을 F1R4와 PAP1에 첨가할 때였고 모두 약 130%의 증가율을 보였다. 따라서 Phytone peptone이 밤용액의 영양적 불균형을 가장 잘 보완해주는 것을 나타났다.

*Lactobacillus*와 *Bifidobacteria*는 여러 가지 복잡한 영양물을 요구하는 것으로 알려져 있기 때문에 각종 비타민 등의 생육촉진 인자를 함유한다고 알려진 yeast extract를 배지에 0.2% 농도로 첨가하고 산생성의 촉진에 미치는 영향을 살펴본 결과는 M1R1을 제외한 대부분의 균주들에서 촉진되었고 F1R4와 PAP1에서 가장 컸다.

표 10. 발효액의 산도에 미치는 영양 보강물의 영향

보강성분	적정산도									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
Blank	2.83	1.81	2.09	1.85	2.38	3.00	2.93	0.86	2.54	0.92
Cys	2.59	2.24	2.16	2.23	1.90	2.70	2.97	0.92	2.17	0.78
GP	2.80	2.26	2.25	2.19	3.72	3.70	3.82	1.06	3.64	1.23
PP	2.91	2.24	2.30	2.31	5.53	3.63	3.64	1.68	5.92	1.70
TP	2.83	2.28	2.23	2.17	5.67	3.71	3.77	1.66	3.92	1.82
YE	2.68	2.29	2.34	2.08	3.34	3.68	3.75	1.10	3.33	1.40

Cys: Cysteine 0.05% ,GP: Gelysate Peptone 0.4%, PP:Phyton Peptone0.4%,
TP:Trypticase Peptone 0.4%, YE:Yeast Extract 0.2%
밤 농도: 8 g/100 ml 물

다. 당 종류의 영향

유산균은 발효 유제품에서 흔히 발견되고 모두 β-galactosidase 활성을 가지고 때문에 우유에 존재하는 당인 Lactose를 선호할 것으로 생각된다. 따라서 산 발효에 있어서 당의 특이성을 알아보기 위해 밤용액에 0.5% 농도로 포도당 및 몇 종의 이당류를 보강하고 산생성에 미치는 영향을 보았을 때 표 11과 같았다. 기대와는 달리 이당류 첨가에 의해 촉진되는 산의 양은 거의 모든 균에서 포도당의 촉진 수준을 넘지 않았다. 또한 같은 이당류를 비교하더라도 MGG2, NBL1, PAP2를 제외한 대다수 분리 균들은 산 발효에 있어서 lactose보다 maltose와 sucrose를 더 잘 이용하는 것으로 나타났다. 따라서 밤 용액의 발효에는 포도당이 가장 적합한 것으로 생각된다.

표 11. 발효액의 산도에 미치는 당 종류의 영향

종류	적정산도									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
포도당	2.47	2.01	1.94	1.86	6.05	3.25	3.36	1.67	5.74	1.82
유 당	2.47	1.97	1.96	1.90	3.91	0.97	3.95	1.78	3.89	1.88
엿 당	3.06	2.13	1.99	1.99	5.84	1.28	1.97	1.57	5.62	1.66
서 당	2.85	2.27	2.23	2.05	5.91	1.05	1.27	1.77	5.90	1.63

당 농도: 각 0.5%, 밤 농도: 8 g/100 ml 물
보강영양물: Yeast extract 0.2%, Phyton peptone 0.4%

라. 종균 배양액 접종 량의 영향

초기 종균 배양액의 접종 량이 산 생성에 어떤 영향을 미치는지를 살폈을 때 표 12와 같았다. 접종 량이 증가할수록 산 생성이 증가하였으나 0.5-8%의 범위에서 산 생성 증가율은 접종 량의 증가율에 비해 낮았다. 따라서 본 발효에서는 생산 조건에 따라 0.5-2%의 범위에서 알맞은 접종 량을 선택할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서는 발효기간의 단축, 균주간의 발효특성 차이의 극대화, 오염 균에 의한 영향 감소 등을 고려하여 4%로 진행하기로 하였다.

마. 천연과즙 및 야채즙 보강의 효과

사과, 귤, 토마토, 배, 오이, 당근, 미나리 등의 천연 채소와 과일의 즙을 10% 농도에서 가하고 산 생성에 미치는 영향을 본 결과는 표 13과 같다. 일반적으로 M2R1을 제외하고는 천연물 추출 액은 대부분의 균들에서 산 생성을 촉진하였다. 그 중 F1R1, MGG1, PAP1가 가장 크게 촉진되었으며, F1R4는 당근과 미나리 즙에 의해, MGG1은 귤과 당근에 의해, PAP1은 오이, 당

근, 미나리 즙에 의해 산 생성이 가장 크게 촉진되었다. 이에 따라 본 발효액의 배지는 맛 등을 고려하여 이러한 천연물의 즙을 보강하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

표 12. 발효액의 산도에 미치는 종균 접종액의 양

접종양 (%)	적정산도									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0.5	2.68	2.02	2.22	2.15	5.14	3.33	3.47	1.47	5.65	1.84
1.0	2.47	2.11	2.00	2.02	5.85	3.64	3.48	1.73	5.52	1.69
2.0	2.74	2.03	2.13	2.22	5.82	3.65	3.60	1.76	5.56	1.90
4.0	2.86	2.33	2.34	2.34	6.25	3.60	3.75	1.76	6.20	1.80
8.0	3.06	2.28	2.72	2.43	6.34	4.05	4.11	1.93	6.86	1.98

밤 농도: 8 g/100 ml 물
보강 영양물: yeast extract 0.2%, Phyton peptone 0.4%, glucose 0.5%

바. 발효시간 별 균체 생육의 영향

발효액의 배양 시간별 균체 량의 변화를 알아보기 위해 밤 현탁액을 원심분리하여 침전물을 제거하고 난 투명한 밤 용액으로 발효를 시행하고 시간별로 흡광도의 변화를 살핀 결과 표 14와 같았다.

생육곡선을 보면 일반적으로 48시간까지 탁도가 증가하였고 그 이상은 증가하지 않았으며, 24시간이면 거의 정상기에 진입하는 것으로 나타났다. 따라서 발효시간은 제품의 요구되는 형편에 따라 24시간 또는 48시간까지 진

표 13. 발효액의 산도에 미치는 과일 및 채소 추출액의 영향

첨가물	적정산도									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
미첨가	2.04	1.90	1.82	1.65	2.45	3.17	2.99	0.89	2.41	0.88
사 과	2.46	1.80	2.03	1.87	3.29	4.12	2.84	0.82	3.30	0.75
귤	2.22	1.82	1.69	1.62	4.12	4.94	3.66	0.78	4.01	0.88
토마토	2.37	2.06	2.10	2.01	4.13	4.51	3.62	0.83	4.17	0.83
배	2.67	1.88	2.05	1.85	3.53	4.61	3.18	1.22	3.49	1.09
오이	2.64	1.96	1.99	1.95	4.94	4.05	3.42	1.17	5.07	1.14
당근	2.65	1.78	1.88	1.77	5.76	4.92	3.85	1.42	5.78	1.34
미나리	2.81	2.30	2.20	2.18	5.38	3.80	3.69	1.90	5.42	1.14

첨가물의 농도: 10%(V/V), 추출액은 과일과 채소를 파쇄시킨 다음 천으로 여과함.
밤 농도: 8 g/100 ml 물
보강 영양물: 포도당 0.5%

행할 수 있는 것으로 생각된다. 균주별로 보면 F1R4, MGG1, PAP1 등은 최종 탁도가 가장 컸으나 초기 접종액의 탁도도 큰 것으로 나타났다. 따라서 F1R4와 PAP1이 밤용액에서의 나타내는 비교적 높은 산생성 능력은 seed culture의 균수의 차이에 따른 초기 접종 균수의 차이에 의한 것으로 사료되나 자세한 것은 균수 변화에 대한 조사에 의해 밝혀질 것이다.

표 14. 배양시간에 따른 배양액의 탁도의 변화

배양시간	흡광도(550 nm)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0	0.19	0.17	0.15	0.16	0.41	0.41	0.35	0.15	0.41	0.14
8	1.12	1.24	0.87	1.21	1.16	1.13	1.11	0.73	1.14	0.72
24	1.30	1.45	1.40	1.41	1.78	1.73	1.61	0.83	1.84	0.83
48	1.48	1.59	1.54	1.55	1.99	1.93	1.80	0.99	1.98	0.99
72	1.48	1.59	1.55	1.55	2.01	1.94	1.79	1.00	1.98	1.02

보강 영양물: Phyton peptone 0.4%, yeast extract 0.2%, glucose 0.5%
밤 농도: 8 g/100 ml 물

사. 발효형태의 영향

1) 액상 밤용액의 발효

위의 10가지 균주의 발효 및 생육특성을 살펴보면 다음과 같다. 밤용액의 침전물을 제거한 후 균을 접종하고 경시적으로 발효하고 산도와 균수를 측정해본 결과는 표 15와 같았다. 24시간 배양에서 산도는 0.80-2.05의 분포를 나타내었고 M1R1이 가장 높았고, 생균수는 8.05-9.05의 분포를 나타내었으며, 시험균 중 M1R1과 PAP1이 9.05와 9.03으로 가장 우수하였다. 48시간 배양에서는 산도는 0.90-2.15의 분포를 보였고 M1R1이 가장 높았으며, 생균수는 8.28-9.15의 분포였고 시험균 중 PAP2와 M2R1가 9.15, 8.99로 가장 우수하였다. 시험균들은 1-2 균주의 예외는 있으나 일반적으로 24시간이면 배양이 완료되었다.

표 15. 침전물이 제거된 밤 용액의 발효 특성

배양 시간	구분	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0	균수	7.27	7.19	7.15	7.12	7.24	7.03	7.18	7.00	7.37	7.13
	흡광도	0.28	0.27	0.50	0.27	0.44	0.48	0.39	0.29	0.25	0.26
	pH	5.00	5.17	4.46	5.14	4.56	4.50	4.63	5.05	5.19	5.18
	산도	0.58	0.45	1.00	0.48	0.65	0.60	0.63	0.50	0.45	0.45
24	균수	9.05	9.03	8.80	8.63	8.64	8.13	8.05	8.75	9.03	8.87
	흡광도	1.03	0.90	0.66	0.90	0.70	0.65	0.65	0.81	0.78	0.71
	pH	3.73	3.99	4.36	4.09	4.26	4.32	4.31	4.21	4.09	4.09
	산도	2.05	1.25	0.80	1.15	0.85	1.03	0.93	1.00	1.25	1.00
48	균수	8.28	8.99	8.67	8.51	8.70	8.93	8.72	8.74	8.73	9.15
	흡광도	1.15	1.11	0.82	1.01	0.82	0.93	0.84	0.88	0.87	0.99
	pH	3.77	3.88	4.10	4.05	4.26	4.10	4.17	4.16	4.07	3.94
	산도	2.15	1.73	1.25	1.28	0.90	1.20	1.03	1.03	1.13	1.40

균수= log(CFU/ml), 밤 농도: 8 g/100 ml 물

2) 호상 밤 용액의 발효

밤 용액의 발효는 침전물이 생성되었고 이 침전물은 각종 안정제에 의해 침전이 억제되지 않았다. 따라서 음료형태의 제품을 제조하기 위해서는 침전물을 제거해야하며 여기서 나오는 침전 부산물을 처리해야하는 문제가 발

생할 수 있다. 따라서 침전물이 발생하지 않도록 증숙밤 원료의 농도를 진하게 하여 상증 여액이 나타나지 않도록 호상 상태로 만들어 발효하는 방법을 생각하였다. 증숙밤과 물을 1:1로 섞은 밤죽을 20ml 씩 용기에 넣고 접종액 0.8ml를 가한 다음 2일 배양하고 산도와 균수를 측정한 결과는 표 16과 같다. 산도는 F1R4와 PAP1이 3.26, 3.66으로 비교적 높았으나 생균수는 MGG1, MGG2, NBL1이 9.22, 9.16, 9.24로 우수하였다. 호상 발효는 액상 발효에 비하여 산도와 균수가 약간 더 높았으나 그 차이는 크지 않았다. 밤 원료의 소요량이 증가하면 제품의 원가가 증가하기 때문에 죽상발효의 선택에는 이러한 비용 문제나 점도의 중가에 의한 생산시설의 변화 등을 포함한 여러 가지 인자를 고려하여 결정해야 하겠다.

표 16. 침전물로 포화된 죽상 밤용액의 발효

구분	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
균수	7.12	8.06	7.88	8.00	8.15	9.22	9.16	9.24	7.88	9.09
산도	1.55	1.46	1.44	1.51	3.26	1.35	1.53	1.35	3.66	1.60

균수= log(균수/ml). 균수 측정은 발효액 1g을 희석액 9ml에 serial dilution시키고 평판배지에 도말, 배양하여 집락을 계수하였고, 산도는 발효액 2g을 물에 희석하여 10ml를 만든후 같은 방법으로 적정하였다.

아. 가수분해에 의한 밤용액의 발효촉진

밤은 전분이 많아 곡물과 같은 성질을 가진다. 곡물을 발효에 이용하는 일은 전통적으로 양조공업에서 이루어져 왔다. 양조발효에 이용되는 곡물은 증숙 호화된 전분을 고지 등의 효소에 의해 가수분해하여 발효에 이용해 왔기 때문에, 양조공업에서 이용하는 당화법을 적용하여 밤용액을 당화시키면

발효가 촉진될 것으로 짐작되었다. 또한 식혜 등의 곡물 발효식품의 경우에 사용되는 엿기름을 분해효소로 사용하여도 같은 결과를 가져올 것으로 생각되어 양조공업에서 사용하는 당화법과 식혜제조에서 사용하는 당화법을 사용하여 밤용액을 당화시키고 이를 발효해 보았다.

밤현탁액을 가수분해 처리를 위해서는 증숙밤 100g을 200㎖의 물에 현탁하고, 액화효소(α형 당화효소액) 300㎕를 가한 다음 90℃에서 1시간 반응시킨 다음, 300㎖의 고지추출액(β형 당화효소액)을 가한 다음 55℃에서 2시간을 반응시켰다. 고지추출액은 12.5%의 고지액을 55℃에서 1시간 정치하여 얻었다. 엿기름 추출액은 50g의 엿기름을 200㎖의 물에 침지시키고 55℃에서 1시간 정치후 여과하여 얻은 후 고지추출액과 같은 조건으로 사용하였다. 이들을 사용한 발효시험 결과는 표 17와 같았다.

양조공업식 가수분해 효소 처리된 밤용액은 산도가 4.39-14.67의 범위로 크게 증가되었으며 촉진정도는 malt extract에 의한 처리군의 3.35-9.52 범위 보다 더 컸다. 이것을 0.5% dextrose가 보강된 군과 비교해볼 때 훨씬 더 커서, 효소처리에 의한 촉진은 단지 당 생성을 증가에 의한 것이라고만 볼 수 없다. 효소처리에 의해 당이 분해되면서 조직에 변화가 일어나 다른 성분도 함께 분해되어 용액 중 유기성분의 함량을 증가시키기 때문으로 보인다. 그러나 8g/100물의 밤용액과 같은 크기의 농도로 환산하면 대조구의 1/3희석액과 거의 비슷한데 1/3희석액의 산도 범위를 가수분해 처리하지 않고 발효한 자료의 범위와 비교해 볼 때 산도는 큰 차이가 없었다. 따라서 당화공정은 발효액에서 요구되는 특성을 고려하여, 예를들면 산도를 더 증가시킬 필요가 절실한 경우에는 추가될 수 있으며 이 경우에는 발효액의 산도, 생균수의 증가가 극대화되는 조건을 별도로 검토할 필요가 있는 것으로 사료된다.

표 17. 가수분해 처리된 밤 용액의 발효 후 산도

구분	적정산도(0.1N NaOH ml수)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
대조구	3.00	2.82	3.19	2.89	8.18	1.55	1.74	2.29	7.42	2.27
0.5%Dex	3.39	2.80	3.08	2.89	6.87	4.63	4.83	2.47	6.84	2.71
M	4.17	4.05	4.08	4.22	9.52	4.79	6.31	3.31	9.96	3.35
1/2M	3.06	2.88	3.42	3.12	7.77	2.59	3.30	1.97	7.42	1.84
1/4M	3.23	2.21	2.17	2.17	3.15	1.42	1.50	0.92	3.15	0.85
K	6.74	6.49	6.49	6.53	13.97	14.67	13.19	5.35	14.08	4.39
1/2K	4.76	4.40	4.46	4.83	11.00	11.50	11.65	2.48	9.81	2.30
1/4K	3.16	2.46	2.24	2.44	5.63	6.23	6.61	1.45	5.62	1.45

대조구: 밤용액 농도=25g/100ml 물, 0.5%Dex: dextrose가 0.5% 보강된 밤용액, M: Malt extract에 의해 가수분해된 밤용액, 1/2M: M의 1/2희석액, 1/4M: M의 1/4 희석액, K: α, β형 전분분해 효소 처리된 밤용액, 1/2K: K의 1/2희석액, 1/4K: K의 1/4희석액.

4. 발효균주의 선정

분리균주들은 밤용액에서의 발효적성과 발효조건의 변화에 의한 생육촉진 정도가 다르므로 어떤 균을 선정하느냐에 따라 최종 발효제품의 특성이 달라 질 수 있다. 따라서 어떤 균을 선정하느냐는 기준은 개발하고자 하는 최종 제품의 어떠한 특성을 중요하게 고려하느냐에 의존한다. 본 연구에서 개발하고자 하는 발효식품은 (1) 인체에 유익한 살아있는 생균을 많이 포함해

야 하며, (2) 밤용액은 우유에 비해 완충능력이 떨어져 산에 의한 균체의 사멸작용이 클 것이므로 낮은 산도에서 균체의 생존기간이 길수록 유리하다. (3) 또한 밤 발효용액은 발효유제품에 비해 미각과 향취가 크게 달라 발효유제품에 익숙해져 있는 사람들에게 낮은 기호도를 가질 가능성이 있으므로 발효제품의 관능적 특성을 고려하지 않으면 안된다. 따라서 이러한 가장 중요한 3가지 특성을 분리균주 별로 비교 조사하였다.

가. 발효제품의 생균수의 비교

밤용액을 분리한 균들로 접종하고 37℃, 48시간 배양한 다음 발효액 중의 생균수를 TPY 배지에서 Plate Counting 법에 의해 측정하였을 때 표 18과 같은 결과를 얻었다. 생균수는 8.58-9.32의 범위의 분포를 보여 각 분리균이 거의 비슷한 생육을 나타내었지만 F1R4, PAP1이 9.05, 9.32로 비교적 높았으며, 이들의 산도는 각각 5.26, 5.21로서 1.30-2.45의 범위의 분산을 보인 다른 균들에 비해 유의적으로 높았다. 따라서 발효 직후의 발효액의 산도와 생균수 면에서는 F1R4와 PAP1이 가장 좋은 것으로 사료된다.

표 18. 발효액 중 생균수

Factor	적정산도 및 균수									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
TA	2.45	1.70	1.81	1.62	5.26	1.37	1.30	1.76	5.21	1.83
Number	8.60	8.86	8.98	8.82	9.05	8.66	8.83	8.68	9.32	8.58

균수: Log10(CFU/ml), 적정산도: 적정에 소비된 0.1N NaOH 용액양(ml)

나. 발효용액의 저장 중 생균수 변화

시판 요구루트의 저장온도와 유사한 온도(5℃)에 각 분리균주로 발효한 발효액을 3주간 저장하면서 일주일 간격으로 발효액의 생균수를 측정하였다. 그 결과는 표 19과 같이 3주간 저장 후의 잔여 생균수는 MGG1과 MGG2가 8.00과 8.03으로 가장 많았으며 최초 균수인 8.66과 8.83에 비하여 감소가 적었다. F1R4와 PAP1이 최초균수 9.05와 9.32에서 3주 저장후 2.80과 3.00으로 가장 큰 감소를 보여 유통 저장면에서는 가장 좋지 않았고, MGG1과 MGG2가 가장 좋음을 알 수 있었다.

표 19. 저장 중 생균수의 변화

저장기간 (주)	생균수(Log10CFU/ml)									
	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
0	8.60	8.86	8.98	8.82	9.05	8.66	8.83	8.68	9.32	8.58
1	8.20	8.40	8.34	8.56	8.69	8.53	8.82	8.41	8.93	8.21
2	7.62	7.96	7.85	7.90	4.02	8.14	8.64	8.24	6.10	7.93
3	5.05	6.82	6.50	6.84	2.80	8.00	8.03	7.02	3.00	6.62

밤농도: 8 g/100 ml 물

다. 저장 중 생균수 감소에 미치는 pH의 영향

전 항의 실험에 의하면 시험균 중 F1R4와 PAP1의 생균수가 3주 저장 후 다른 균주의 생균수에 비해 현저히 낮았다. 그런데 이들 두 균주의 산도는 다른 균들에 비해 특히 낮으므로 균의 생존율이 산도에 의존할 가능성을 보

였다. 따라서 저장중의 생균수가 발효액의 pH에 의해 영향을 받는지를 알아보기 위해 저장성이 약한 F1R4를 선정하여 24시간과 48시간 동안 발효하여 산도를 비교하고 각각의 생균수를 비교하고, 또한 발효가 끝난 제품의 pH를 조정한 다음 12일까지 저장하여 균수가 발효액의 pH에 따라 변화되는 양상을 비교한 결과 표 20과 같았다.

표 20. 생균수에 미치는 발효시간 및 저장 pH의 영향

조건	측정	저장기간(일)		
		0	6	12
24시간 발효액	pH	3.64	3.63	3.59
	산도	3.25	2.95	3.23
	균수	8.45	8.47	4.38
48시간 발효액	pH	3.57	3.56	3.46
	산도	4.45	3.93	3.75
	균수	8.14	7.78	4.38
pH조정액	pH	5.17	5.71	5.17
	산도	1.03	0.52	0.70
	균수	7.61	8.00	6.76

log(CFU/ml), pH 조정액은 48시간 배양액의 pH를 조정한 것.

먼저 하루 배양한 발효액과 이틀 배양한 발효액은 산도와 생균수에서 차

이가 있었다. 24시간 배양액은 산도와 균수가 3.25와 8.45로 48시간 배양액의 4.45와 8.14에 비하여 산도는 낮았으나 생균수는 높았다. 이러한 결과는 배양기간이 길면 길수록 생성된 균수는 산에 의해 균이 사멸됨을 보여주어 산도가 높은 균일수록 배양시간을 짧게 줄여야함을 알 수 있었다. 또한 48시간 배양한 발효액의 pH를 5.17로 조정하고 조정하지 않은 발효액과 같은 조건에서 12일까지 저장하면서 생균수의 변화를 비교한 결과 pH를 조정한 발효액의 생존균수는 6.76으로 조정하지 않은 발효액의 4.38에 비하여 비해 1000배이상 더 많았다. 따라서 제품의 생균수는 발효액의 산도에 의해 크게 영향을 받으므로 저장중 제품의 생균수를 높게 유지시키기 위해서는 산미를 잃지 않는 범위내에서 최대한 pH를 올려야 된다는 점을 확인할 수 있었다.

라. 침전물의 영향

증숙밤의 현탁액에는 실험실 조건의 호모지나이저로 증숙밤을 분쇄하여도 침전물이 형성되어 발효액의 하단부분에 가라앉아 있음을 볼 수 있었다. 또한 이러한 침전물의 양은 증숙밤의 함량에 따라 달라져 약 50%가 되면 침전물이 발효액의 상단에 이르게 될 정도로 많아지는 것을 볼 수 있었다. 침전물은 일종의 섬유소나 전분 등 같은 polymer인 것으로 짐작되며 이들은 발효액 중에서 균이나 산에 대하여 다른 환경을 조성하는 micropocket을 형성할 수 있다고 생각되었다. 따라서 이러한 침전물의 양이 발효액의 산도와 균수에 어떠한 영향을 미치는지와 저장 중의 산도와 균수에 어떠한 영향을 미치는지를 검토하기 위하여. 증숙밤 10%의 육즙농도에, 별도로 원심분리하고 세척한 다음 건조시킨 침전물을 0-23% 범위에서 서로 다른 농도로 첨가하고 균을 접종시켜 발효시킨 다음 산도와 균수를 비교 관찰하였다. 이 실험을 위하여 산도와 생균수가 높은 F1R4와 산도는 낮지만 저장성이 있는 MGG1을 이용하였다. 그 결과는 표21에서와 같이 침전물은 균의 산에 대한

내성을 강화하여 균수를 증가시킬 것이라는 기대와는 달리 그 영향은 매우 적었다. MGG1의 경우 침전물이 완전 제거된 발효액의 배양직 후 산도와 생균수는 1.43과 8.61였고 23%의 침전물을 함유한 발효액은 1.08과 8.26이어서 오히려 침전물의 존재에 의해 산도와 균수가 감소하는 경향을 보였고, F1R4의 경우도 4.42와 8.00 및 4.05와 7.56으로 같은 경향을 보였다.

표 21. 저장 중 균수와 산도에 미치는 침전물 함량의 영향

균주	저장일수	측정	침전물의 함량(%)			
			0	2.3	10	23
MGG1	0	균수	8.61	8.12	8.63	8.28
		산도	1.43	1.25	1.20	1.08
	3	균수	8.64	8.34	8.74	8.76
		산도	1.05	0.98	1.15	1.05
	6	균수	8.15	8.13	8.82	8.30
		산도	1.20	1.60	1.13	1.21
	9	균수	8.18	8.36	8.60	8.04
		산도	1.18	1.10	1.25	1.15
	12	균수	8.14	7.49	7.38	7.03
		산도	1.43	1.15	1.28	1.13

(다음 쪽에 계속)

(표 21의 계속)

	0	균수	8.00	8.78	7.72	7.56
		산도	4.42	4.28	4.10	4.05
	3	균수	7.86	7.51	7.45	5.90
		산도	4.53	4.03	3.80	4.10
F1R4	6	균수	4.60	5.60	6.90	5.30
		산도	4.65	4.63	4.38	4.13
	9	균수	3.38	5.30	5.68	4.90
		산도	4.40	4.28	5.08	4.20
	12	균수	3.02	2.90	5.08	3.68
		산도	4.70	4.25	4.13	4.40

증숙밤농도 10%, 저장온도는 4℃, 균수는 log(1ml중 균수)값

12일간 저장 후 생균수를 조사하였을 때 MGG1은 침전물이 없는 경우 산도와 균수가 1.43과 8.14였고 23%의 침전물에서 1.13과 7.03이었으며, F1R4의 경우는 각각 4.70과 3.02 및 4.40과 3.68인 것으로 나타나 MGG1에서와는 달리 F1R4에서는 침전물이 발효액의 생균수의 감소를 저지시켰으나 그 영향은 매우 적었다.

마. 1차 관능검사에 의한 선별

균주의 차이가 발효액의 기호도에 영향을 미칠 것으로 생각되어 분리균주를 접종하고 배양한 발효액을 10명의 관능검사 요원에게 시음시키고 산미, 향, 맛, 종합적인 기호도를 평가하도록 한 결과 표 22와 같았다. 일반적으

로 모든 균에서 밤용액의 발효제품은 산미, 맛, 향, 음용감 등의 기호도면에서 나쁜 것으로 나타났다. 이러한 결과에 대하여 첫째, 밤용액의 살균에 의해 밤 특유의 향이 크게 감소되었고 둘째는 멸균중 용기에서 불쾌한 냄새가 발생하였으며, 셋째 산미가 너무 강하여 자극적이고, 넷째 너무 점도가 낮아 진한 맛이 떨어졌기 때문이라고 해석하였다. 따라서 밤을 이용한 발효제품은 당이나 향 등의 성분을 첨가하여 맛을 보강하거나 제조공정을 개선하여 향을 보존시키는 방법을 강구해야 하는 등의 대책을 요구하였다.

표 22. 발효액의 관능 시험 결과

구분	M1R1	M2R1	M2R6	M3R3	F1R4	MGG1	MGG2	NBL1	PAP1	PAP2
pH	3.14	3.60	3.52	3.58	3.01	3.65	3.67	3.61	3.00	3.52
산도	2.45	1.70	1.81	1.62	5.26	1.37	1.30	1.76	5.21	1.83
균수	8.60	8.86	8.98	8.82	9.05	8.66	8.83	8.68	9.32	8.58
산미	1.8	1.9	1.9	1.9	1.5	1.9	1.9	1.9	1.6	1.9
향	1.2	1.4	1.4	1.2	1.2	1.6	1.6	1.4	1.2	1.4
맛	1.6	1.8	1.7	1.7	1.4	1.8	1.8	1.8	1.4	1.6
음용감	1.1	1.4	1.4	1.4	1.1	1.4	1.4	1.4	1.1	1.4

관능검사 수치는 10명의 요원이 매우 좋음을 5로 매우 나쁨을 1로 하고 3회 반복하여 얻은 결과임.

바. 최종 선정

이상의 결과를 종합하면 밤 발효액의 맛은 적당한 산도와 원료가 가지는 향의 보존에 크게 의존하며 관능평가의 성적은 오히려 산도에 반비례하는

경향을 나타내어 산도가 높을수록 선호되는 발효유제품과는 전혀 다른 특성을 보여주었다. 따라서 밤 발효액 제조에 이용할 균주는 산생성 능력은 오히려 품질을 저하시킬 수 있기 때문에 발효 후의 생균수나 저장중 생존율을 고려하여 선택하는 것이 좋다고 여겨졌다. 분리 균주들 중에서 발효후 생균수 면에서는 PAP1, F1R4 등이 우수하고 저장 중 생균수의 보존성 면에서는 MGG1, MGG2 등이 우수하였다. 이들 중에서 PAP1과 MGG2를 선정하였다.

1) 혼합배양의 영향 및 호상 발효제품에서의 저장성

PAP1과 MGG2는 서로 상이한 성질을 가져 이들을 단독 선정하여 사용하면 제품의 특성이 매우 다르며 각각 장단점을 가져 최선을 가리기 어렵기 때문에 이들을 혼합 배양하였을 때 산도와 생균수 면에서 어떤지를 검토하였다. 그 결과 표23에서와 같이 혼합배양 발효액의 산도와 생균수는 0.99와 9.45로 MGG2와 PAP1 각각의 단독배양액의 산도와 생균수 0.71과 8.95 및 0.87과 9.39보다 더 컸다.

저장성을 살펴보기 위하여 발효액에 상증여액이 나타나지 않도록 증숙밤을 가하여 총 50%의 고형분이 되도록 조정한 다음 5℃에서 3주 저장 후 혼합 발효액의 산도와 생균수를 측정하였을 때 각각 0.72와 8.27였고, MGG2와 PAP1의 단독배양액은 각각 0.99와 8.03 및 0.73 3.00 였다. 따라서 혼합 발효액의 3주 저장 후 생균수는 각각의 단독배양 생균수의 합 보다 더 컸다. pH를 5.17로 조정후 3주 저장한 발효액의 산도와 생균수는 혼합배양액이 0.37과 7.64였고, MGG2와 PAP1의 단독배양액이 각각 0.72와 7.98 및 0.28과 4.00이었다. 이러한 결과는 3주까지의 저장에서 혼합배양액의 생균수는 pH 조정한 경우 보다 더 높아 저장성도 우수한 것으로 나타났다. 따라서 이들을 혼합하여 사용하는 것이 가장 좋은 것으로 생각되었다.

표23. 혼합배양의 영향 및 저장성

		0		1주		2 주		3주	
		산도	균수	산도	균수	산도	균수	산도	균수
MGG2	대조구	0.71	8.95	0.73	8.82	1.02	7.90	0.99	8.03
	pH조정	0.34	9.02	0.39	9.17	0.40	8.02	0.72	7.98
PAP1	대조구	0.87	9.39	0.83	8.69	0.82	7.30	0.73	3.00
	pH조정	0.45	9.46	0.43	9.27	0.49	7.86	0.28	4.00
M+P	대조구	0.99	9.45	0.73	8.89	0.83	7.91	0.72	8.27
	pH조정	0.41	9.31	0.38	8.90	0.43	7.91	0.37	7.64

M+P: MGG2+PAP1, 대조구: pH 미조정, pH조정: 발효액의 pH를 5.17로 조정

2) 액상 제품에서의 저장성

선정한 PAP1과 MGG2를 혼합배양하고 발효액에 증류수, 당액, 또는 당액과 밤용액의 혼합을 각각 1:1로 섞고, 5℃에서 3주까지 저장하면서 균수의 변화를 조사한 결과는 표 24와 같았다. 선정된 혼합균주는 2주에서 3주 사이에 6.62에서 3.65로 균수가 감소되어 2주 이상의 저장에서는 균수의 유지에 문제가 있음을 발견할 수 있었다. 이러한 문제를 발효 후 조미액을 첨가하여 해결될 수 있는지를 검토하기 위하여 당, 밤용액, 및 당과 밤용액의 혼합액을 각각 동량 가하고 3주까지 같은 온도에서 저장하면서 균수의 변화를 조사하였을 때 3주 저장액의 균수는 3.65에서 각각 4.60, 5.88 및 7.64로 증가되었다. 따라서 제품의 저장 중 균수는 제품의 구성성분에 크게 의존함

을 알 수 있었다.

표 24. 액상발효액의 저장조건에 다른 균수의 변화

저장기간	측정	증류수	당액	밤용액	당액+밤용액
	pH	3.32	3.32	3.32	3.32
0주	TA	1.77	1.77	1.77	1.77
	CFU	9.0	9.08	9.08	9.08
	pH	3.36	3.32	3.48	3.31
1주	TA	1.76	3.13	1.79	2.53
	CFU	7.39	7.95	7.74	9.22
	pH	3.48	3.41	3.58	3.39
2주	TA	1.91	2.40	2.06	2.57
	CFU	6.62	6.81	7.29	8.06
	pH	3.37	3.25	3.49	3.28
3주	TA	1.85	2.66	1.98	2.80
	CFU	3.65	4.60	5.98	7.64

당액: 10%액(정백당, 물엿, 꿀 혼합액), 밤용액: 8% 증숙밤 현탁액,
저장조건: 발효액 50ml와 조미액 50ml를 혼합하고 4℃ 냉장고에서 저장하며 조사함

3) 수입 종균제품과의 비교 시험

본 연구에서 분리한 균주가 발효유제품을 만드는 데 이용하는 균주와 비교하여 밤용액에서의 발효 능력에서 어떠한 차이를 나타내는지를 시험하기

표 25. 수입종균과 선정균주의 밤용액에서의 발효특성

종균의 종류	접종형태	측정	배양시간	
			0	24
PAP1+MGG2	배양액	pH	4.60	3.32
		산도	0.77	3.54
		균수	8.27	9.16
Hansen YC-180	분말	pH	5.98	3.84
		산도	0.38	2.00
		균수	8.15	9.15
N사 수입종균	분말	pH	5.89	3.53
		산도	0.44	2.66
		균수	8.32	8.51

위하여, 제조가공 연구부문에서 사용 시험중인 Hansen YC-180 (*S.thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 혼합)와 함께 생균수가 높은 것으로 타사의 제품에 대한 비교우위를 선전하고 있는 특정제품을 생산하는 국내의 N사에서 사용하고 있는 수입종균 제품, MSK B2(*S. thermophilus*, *B. infantis* 및 *L. acidophilus*의 혼합)을 선정하여 비교하였다. Phytone peptone 0.4%, yeast extract 0.2%, glucose 0.5%를 보충한 8%의 밤용액에 MRS배지에서 각각 분리하여 하룻밤 배양한 PAP1과 MGG2의 종균액을 각각 2%

씩 접종하고, 동시에 같은 밤용액에 Hansen은 0.4U/kg의 비율로, N사의 수입종균 제품은 0.2%(W/V) 접종하였다. 수입종균 제품은 종균을 따로 배양하지 않고 본 발효액에 파우더 상태로 직접 접종하였다. 그 결과는 표 25에서와 같이 접종직후의 생균수와 산도는 Hansen제품이 8.15와 0.38, N사 제품이 8.32와 0.44였고, PAP1과 MGG2의 혼합은 8.27와 0.77이어서, 생균수는 비슷하였으나 Hansen과 선정균주가 N사 제품에 비해 더 우수하였고, 산도는 선정한 균주가 가장 높았다. 24시간 배양 후의 생균수와 산도는 Hansen 제품이 9.15와 2.00, N사 제품이 각각 8.51과 2.66이었고, 선정한 균주는 9.16과 3.54였다. 따라서 본 연구에서 분리한 균은 발효유제품에서 최적인 제품에 비해 밤용액에 더 큰 적성을 나타내었지만 Hansen사에 비해 크게 우수하지 못하였다. 따라서 균주분리는 더욱 시간을 가지고 개발할 필요가 있었으며, 제품 생산에서의 용이성 등을 고려하여 제조가공연구에서는 Hansen 제품을 함께 연구하도록 하였다.

4) 접종량에 대한 검토

지금까지 분리균에 대한 각종 실험은 편의상 4%에서 시행되어 왔으나 실제 발효에 이용하기 위해서는 종균 량이 많아야 한다는 것은 제한적인 사용을 초래할 가능성이 있기 때문에 종균 량을 낮추고 그 영향을 검토하기로 하였다. 분리균의 종균배양액의 접종량을 0.5% 이하로 낮추고 발효액의 산도와 생균수를 조사하였다. 그 결과는 표 26에서와 같이 접종액의 감소는 전혀 생육의 감소를 초래하지 않았다. 따라서 본 연구에서 선정한 균은 종균배양액의 접종량을 0.1%(MRS 18시간 배양 기준) 까지 낮추어도 제품의 생균수를 크게 낮추지 않음을 알 수 있었다.

표 26. 접종량의 영향

접종량(%)	pH	산도	균수
0.1	3.89	2.06	9.42
0.3	3.90	2.04	9.42
0.5	3.90	2.07	9.49

밤 농도: 8g/100ml 물, 보강: 포도당 0.5%, 효모추출액 0.2%, 대두박 0.4%
접종량은 각각의 단독배양액 접종 농도의 합

5. 배양조건의 선정

가. 첨가물 농도의 선정

전 실험에서 선정한 균주를 바탕으로 배양조건의 검토에서 얻은 결과를 재 실험하여 정확한 조건을 선정하고자 하였다. 균주를 선정하는 과정에서 (표 20참고) 발효액의 생균수는 산도와 밀접한 관계를 가지고 있으며 48시간 배양액은 24시간 배양액에 비해 산도는 크나 생균수는 작게 나타났으므로 24시간으로 발효시간을 단축하기로 하였다. 또한 배양조건을 검토하는 과정에서 영양물 보충의 영향이 가장 컸고 그 중에서 Phytone peptone, yeast extract 및 glucose를 보충하였을 때의 발효촉진이 컸으므로 정확한 농도를 확인하기 위하여 각 성분의 농도를 변경시키면서 교차 혼합하고 그 영향을 살폈다. 그 결과는 표 27에서와 같이 당 첨가는 균수와 산생성을 증가시키지만 균수의 증가폭은 산도의 증가폭에 비하여 작았다. Yeast extract는 Phytone peptone의 낮은 농도에서는 산도와 균수를 증가시켰지만 높은 농도에서는 그렇지 않았다. Yeast extract의 첨가보다는 Phytone

peptone 첨가가 더 큰 산도와 생육 촉진효과를 나타내었다. 균수와 산도 면에서는 Phytone peptone 0.8%, yeast extract 0.8%, glucose 0.5%의 첨가가 가장 좋은 것으로 나타났으나, glucose 0.5%의 조건에서yeast extract 0.2% 이상, Phytone pepton 0.4% 이상의 조건에서는 균수가 9.0 이상으로 양호하였다. 따라서 첨가물이 최종 발효제품의 맛에 미치는 영향을 검토하여 나쁜 영향을 미치지 않는 조건에서 glucose 0.5, peptone 0.4, yeast extract 0.2%의 농도를 선택하였다.

표 27. Phytone Peptone과 Yeast Extract 첨가 농도의 영향

		Yeast Extract(%)									
Phytone (%)	측정	0	0.1	0.2	0.4	0.8	0	0.1	0.2	0.4	0.8
		Sugar 0%					Sugar 0.5%				
0	pH	3.83	3.87	3.90	3.95	4.03	3.21	2.98	2.95	3.07	3.24
	산도	0.91	1.19	1.39	1.55	2.30	2.87	3.33	3.85	4.01	4.56
	균수	8.39	8.45	8.48	8.49	9.06	8.79	8.70	8.80	8.86	9.07
0.2	pH	4.04	3.99	3.97	4.05	4.06	3.01	3.07	3.14	3.23	3.24
	산도	1.07	1.23	1.39	2.60	2.04	3.71	3.83	3.98	4.04	4.24
	균수	8.85	8.38	8.51	8.53	8.54	8.69	8.93	8.71	8.90	8.81
0.4	pH	4.19	4.11	4.12	4.09	4.09	3.08	3.10	3.08	3.17	3.23
	산도	1.05	1.06	1.36	1.59	1.99	3.67	3.72	3.89	4.33	4.52
	균수	8.78	8.92	8.54	8.77	8.75	9.21	8.87	9.14	8.65	8.80

(표 27의 계속)

	pH	4.45	4.39	4.30	4.29	4.29	3.25	3.32	3.33	3.36	3.48
0.8	산도	1.47	1.46	1.54	1.67	2.37	3.60	3.96	3.95	4.12	5.11
	균수	8.86	8.68	8.53	8.56	8.93	9.10	9.05	8.99	9.35	9.42
	pH	4.84	4.66	4.62	4.59	4.54	3.52	3.55	3.56	3.60	3.62
1.6	산도	1.56	1.74	1.69	1.85	2.22	3.93	4.07	4.14	4.58	4.57
	균수	9.23	8.84	9.23	8.84	9.16	9.31	9.21	9.26	9.36	9.23

나. 산업부산재료 및 천연재료를 이용한 발효제품의 구성성분의 결정

Phytone pepton과 yeast exract은 가격이 비교적 높기 때문에 이를 대체할 산업부산물을 찾아 대신 첨가하고 그 영향을 비교하였다. Phytone pepton은 soybean protein의 가수분해물이기 때문에 이를 대체할 산업부산물로는 대두박과 순물(두부 폐액:soywhey)을 들 수 있고, Yeast extract는 맥주제조에서 나오는 효모찌꺼기를 들 수 있다. 이들 산업 부산물 중 대두박과 효모는 각각 가수분해 효소 처리하여 분해하면 더 큰 효과를 볼 수 있다는 보고가 있지만(고, 1989, 김 등 1989), 효소 처리의 공정과 효소 비용을 고려하여 최소한의 처리만을 하기로 하였다. 즉 이들을 각각의 공장으로부터 얻고 대두박과 yeast extract의 경우는 건조시키고 유발에서 마쇄한 다음 열수로 추출하여 사용하였다. 그 결과는 표 28와 같았다. 효모부산물은 yeast extract에 비해 역가가 1/3에 불과하였지만 대두박과 순물은 Phytone peptone에 버금가는 역가를 나타내어 대체 가능성을 보여주었다.

표 28. 산업부산재료 첨가 효과

		DW	YE	YE+G	RY	RY+G
	pH	3.89	3.95	3.33	3.96	3.24
DW	산도	1.07	1.50	3.53	1.12	3.28
	균수	8.66	8.98	8.99	8.56	9.05
	pH	4.60	4.49	3.70	4.57	3.65
Pt	산도	1.33	2.05	4.08	1.54	3.81
	균수	8.93	8.91	9.46	8.93	9.18
	pH	4.24	4.21	3.49	4.26	3.41
SW	산도	1.38	3.84	3.68	1.19	3.33
	균수	9.00	8.92	9.01	8.84	8.91
	pH	4.12	4.12	3.45	4.16	3.36
SM	산도	1.12	1.63	3.67	1.18	3.34
	균수	8.98	8.85	9.08	8.92	9.21

DW: 증류수, Pt: Phytone peptone 0.8%, SW: 순물 25%(V/V), SM: 대두박 0.4%, YE: yeast extract 0.3%, G: glucose 0.6%, RY: 맥주제조 부산 효모(세척,건조후 유발에서 마쇄후 사용, 1%)

다. 버섯 추출물 첨가의 영향

밤 발효제품은 여러 가지 기능을 지니도록 특정 성분을 보충할 수 있다.

특히 버섯은 장내의 유산균을 증식시키는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (한 등, 1996). 이들 성분들은 첨가시에 맛과 발효에 영향을 주게 될 것으로 짐작된다. 따라서 전 실험에서 얻은 영양물 보강 조건 즉 0.4% Phytone pepton, 0.2% yeast extract, 0.5% gluocse를 기본으로 하고 여기에 최근 국내에서 건강보조제로 많이 이용되는 동충하초와 영지추출액을 보강하고 그 영향을 살펴보았다. 그 결과 표29과 같이 40%(V/V)의 범위 안에서 균수와 산도에 저해작용을 나타내지 않았고, 오히려 촉진작용을 나타내었으나 증가의 크기는 작았다. 따라서 동충하초와 영지추출액은 그 기능이 요구되는 경우에는 산 생성과 균주의 생육에 긍정적인 영향을 주면서 첨가될 수 있음을 알 수 있었다.

이들의 첨가가 맛에 미치는 영향은 제조가공 부문에서 다른 4가지 식물 추출물과 함께 수행되었으며 그 결과 첨가물은 제품의 맛에 개선을 가져오지 못하는 것으로 나타났다. 그러나 맛이 크게 변화되지 않아 첨가가 필요한 경우에는 고려해 볼 수 있었다. 위의 4가지 식물 첨가물의 산 생성 및 균체 생육에 미치는 영향은 조사하지 않았으며 그 이유는 이미 발효조건의 검토에서 식물 과일류의 첨가가 미치는 영향이 검토되었고 이들은 모두 산 생성을 촉진하였기 때문이었다.

라. 안정제 첨가의 영향

발효유제품과 마찬가지로 밤 발효제품은 균체의 침전으로 인한 시각적인 문제를 줄 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 안정제를 첨가하게 되며, 안정제 첨가로 인한 오염을 방지하기 위하여 안정제는 발효 전 원료에 첨가되므로 안정제는 발효액에 존재하면서 발효에 영향을 주게된다. 발효유

표 29. 버섯 추출물 첨가의 영양

첨가량(%, v/v)	측정	동충하초	영지추출액
0	pH	3.41	3.22
	TA	3.31	3.61
	CFU	8.89	8.99
5	pH	3.22	3.31
	TA	3.80	3.75
	CFU	9.03	9.04
10	pH	3.29	3.34
	TA	3.70	3.69
	CFU	9.03	9.04
20	pH	3.16	3.32
	TA	3.80	3.71
	CFU	9.06	9.07
40	pH	3.29	3.34
	TA	4.02	4.01
	CFU	9.11	9.14

동충하초액: 7% 보양액 영지추출액: 10%추출액

보강 영양물: Phytone peptone 0.4%, yeast exract: 0.2%, glucose: 0.5%

제품에서 사용하는 안정제는 대개 pectin과 그 유도물 및 sodium alginate 등이며, pectin과 alginate는 모두 산의 관능기를 가지는 polymer이다. 따라서 시중에 이용되는 두 가지의 안정제 즉 pectin과 sodium alginate를 0.5%의 범위 안에서 여러 농도로 첨가하고 그 영향을 검토하였다. 그 결과는 표 30와 같이 두 가지가 약간 다른 영향을 보였다. pectin은 낮은 농도에서 발효액의 산도와 생균수를 감소시킨 반면, alginate는 산도와 균수를 증가시켰다. 이러한 결과는 발효액의 생균수는 발효액의 산도에 의해 영향을 받으며 낮은 산도는 생균수를 감소시키는 경향을 고려할 때 모순이었다. 이것은 alginate가 높은 산도에서도 생균수의 생존을 더욱 보호하는 polymer로서의 작용이 더 우수한 것으로 짐작되었다.

표 30. 안정제 첨가의 영향

농도(%)	측정	alginate Na	pectin
0.00	pH	3.32	3.32
	TA	3.48	3.48
	CFU	8.99	8.99
0.10	pH	3.10	3.35
	TA	3.52	3.41
	CFU	9.01	8.63

(다음 쪽에 계속)

(표 30의 계속)

	pH	3.12	3.34
0.20	TA	3.57	3.29
	CFU	8.19	7.94
	pH	3.20	3.44
0.30	TA	3.83	3.39
	CFU	9.12	7.85
	pH	3.23	3.41
0.40	TA	3.85	3.59
	CFU	8.86	8.18
	pH	3.21	3.39
0.50	TA	3.87	3.89
	CFU	8.85	8.21

마. 최종 선정 및 관능 성적의 개선

지금까지 검토한 내용를 바탕으로 종합할 때 제품의 산도와 생균수를 최대로하기 위해서는 배지 조성은 밤은 8%가 적당하고 여기에 영양물로 대두박을 0.4%, 효모추출물 0.2%, 포도당 0.5%를 가하고 안정제로는 sodium alginate를 0.2%를 가하는 것이 가장 좋았다. 여기에 종균배양액을 각각 2%

씩 접종한 다음 37℃에서 약 24시간 배양하는 것이 좋았다. 그리고 영양을 증진시키는 기능성 성분은 맛을 고려하여 상황에 따라 적당량 첨가하는 것이 좋다는 것이 확인 되었다.

그러나 1차 관능검사에서, 열 살균에 의한 밤 고유의 향기 감소, 용기로부터의 악취, 자극적인 산미 등, 낮은 점도 등의 단점이 나타났고, 또한 배양액의 산도가 높음으로 인하여 저장 중 생균수가 감소되는 단점이 있었다. 이 중 낮은 점도의 문제는 제조가공 연구 부문으로부터 2%의 변형전분의 사용에 의해 개선될 수 있다는 자료를 바탕으로 그 효과를 시험하여 그 효능이 확인되었다.

나머지 문제들을 해결하기 위하여 발효액에 여러 가지 성분을 첨가하고 관능시험하기로 하였다.

1) 최적 당 구성

당은 발효중 산으로 전환되고 이로 인하여 균에 사멸되어 생균수가 낮아지므로 최적 배양조건에서는 당을 0.5%로 제한하였기 때문에 음용시 감미가 적어지게 된다. 이를 보완하기 위하여 당을 첨가하고 적당한 농도를 확인한 결과 10%가 가장 적당하였다(자료 생략).

감미 증진에는 서당(정백당), 포도당, 고과당 물엿, 꿀, 유당 등이 가능하나 서당, 고과당 물엿, 꿀이 확보하기 용이하다고 보고 이들을 혼합하고 그 기호도를 비교 조사하였다. 그 결과는 표 31와 같았고 서당+과당+꿀의 혼합이 가장 우수하였고, 다음은 서당 단독과 서당+고과당 물엿, 마지막이 고과당 물엿 단독의 순이었다. 서당과 꿀은 단맛의 품질에서 고과당 물엿에 비해 더 선호되었다. 그러나 꿀은 너무 가격이 비싸 경제성이 없다고 보고 서당과 고과당의 1:1 혼합을 사용하는 것으로 정하였다.

표 31. 당 구성에 대한 선호도

구성(%)	산미	감미	향	음용감
서당 10	2.3	3.8	2.5	3.8
서당 5 + 고과당 물엿 5	2.5	3.8	2.5	3.6
고과당 물엿 10	2.1	3.2	2.1	3.4
서당4 + 꿀 2 고과당 물엿 4	2.7	4.1	2.8	3.8

발효액의 조성: 밤 8%,포도당 0.5%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.2%, sodium alginate 0.2%, 변성전분: 2%, 시음온도: 5℃

2) 최적 산도

발효액의 산도는 제품의 기호도에서 매우 중요하였다. 따라서 가장 선호되는 산미가 어떤 산도에서 나타나는지를 조사하였다. 그 결과 표 32와 같이 가장 최적의 산도는 3.0-2.5인 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서 분리한 균주를 사용하기 위해서는 추가로 산도를 낮추는 과정이 불가피 하였다. 이를 위해서는 두 가지 방법이 가능하다. 하나는 발효액의 원료 성분 중 포도당을 0.5% 이하로 낮추는 방법과 또 하나는 발효액에 염기를 가하여 산도를 조정하는 방법이다. 이러한 방법은 실제 생산하는 과정에서 적당한 조건을 잡아가야 할 것으로 사료된다.

표 32. 산도에 대한 선호도

산도	산미	감미	향	음용감
3.7	3.0	3.8	2.7	3.8
3.0	3.8	3.9	2.4	3.9
2.5	3.8	3.9	2.4	3.9
2.0	2.8	3.9	2.3	3.8

발효액의 조성: 밤 8%,포도당 0.5%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.2%,
sodium alginate 0.2%, 변성전분 2%
당도: 서당 5% + 고과당 물엿 5%, 시음온도: 5 ℃
산도조정: 5N NaOH solution

3) 최적 향 농도 및 구성

밤 발효제품은 가열살균 중 이취가 발생되는 문제가 있고, 또한 밤 원료의 저장기간의 차이 등으로 인한 향의 차이가 있으므로 품질을 일정하게 유지하기 위해서는 밤 고유의 향과 약간의 차이를 가지더라도 향을 보강하여 선호되는 특정 향을 선정하는 것이 좋다고 사료되었다. 따라서 향을 개선하여 최선의 향을 확정하기 위하여 시중에서 발효유를 생산하는 업체들이 사용하는 향료들을 혼합 첨가하고 그 영향을 평가하였다. 그 결과 표 33에서와 같이 밤 향, 요구르트 향, 바닐라 향을 8:1:1의 비율로 첨가하는 것이 가장 좋았다.

이에 따라 조미액의 구성은 최종 서당 5%, 고과당 물엿5%, 밤향 0.08%, 요구르트 향 0.01%, 바닐라 향 0.01%로 하고 제품의 산도는 3.0으로 맞출 것을 제시하였다.

표 33. 밤 발효제품의 향성분에 대한 선호도

구성(x 0.01%)	향	산미	감미	기호도
밤향8+요구르트향2	3.0	3.8	3.4	3.5
밤향8+바닐라향2	3.4	4.2	3.7	3.7
밤향8+요구르트향1+바닐라1	4.1	4.2	4.1	4.4
밤향6+요구르트향2+바닐라2	3.9	4.2	3.9	4.1

발효액의 조성: 밤 8%,포도당 0.5%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.2%,sodium alginate 0.2%, 변성 전분 2%, 당도: 서당 5% + 고과당 물엿 5%, 시음온도: 5 ℃, 산도: 3.0

5. 종균배양배지의 개발

본 연구에서 사용한 종균배지인 Lactobacillus MRS 배지는 그 가격이 매우 높아 실제 산업에서 사용하기에 문제가 있으며 본 배양 배지를 종균배지로 사용하는 대안도 본 배양의 배지를 제조하는데 이용하는 주원료인 밤 또는 부 원료인 pepton, yeast extract 등이 저렴하지 않은 이유로 같은 문제를 지닌다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 저렴한 비용의 산업부산물이나 폐기물을 찾아 종균배양 배지로 이용가능한지를 검토하고자 하였다.

가. 순물의 이용

순물은 두부를 제조할 때 나오는 폐액으로서 두유에 존재하는 각종 유기물을 상당량 포함하여 미생물의 생육에 좋은 배지가 됨이 알려져 있다. 국내에서 나오는 순물의 일반 성분은 표 34와 같으며 아세트산과 유산등의 유기산을 비롯하여 단당류와 서당 등의 소당류가 다량 함유되어 있다. 특히 순물은 무기질이 많아 유산발효에서 산을 중화시키는 작용을 할 것이므로

더욱 좋을 것으로 사료된다.

표 34. 순물의 성분표

성분	양(mg/l)*	양(mg/l)**
BOD	7,325	3,312
Acetic acids	15	226
Lactic acids	10	1,080
Monosaccharides	980	*
Sucrose	5,740	*
Raffinose	990	*
Stachyose	3,080	*
Total Nitrogen	365	198.5
Total Phosphorus	242	133
pH	5.5	4.2
Calcium	430	22.3
Sodium	223	24.9

*:Jin, 1994 **:Kang 등,1993

1) 당의 보강 효과

순물에 포도당을 0.2-1.6%의 범위로 첨가하고 선정균주의 생육과 산도에 미치는 영향을 살핀 결과 표 35와 같았다. 포도당은 첨가 농도가 증가할수록 생균수가 감소하였으나 산도는 증가하였다. 이 결과는 산도가 증가하면 생균수가 감소하는 지금까지의 연구에 얻은 결과와 같았다. 따라서 당은 0.2% 이하로 적게 첨가시키는 것이 적합한 것으로 생각되었다.

표 35. 당 첨가 농도의 영향

농도(%)	pH	산도	균수
0.0	4.55	0.78	8.96
0.2	3.95	1.43	9.21
0.4	3.95	1.46	9.12
0.8	3.94	1.49	8.90
1.6	3.95	1.47	8.95

2) 대두박의 보강효과

대두박을 0.1-0.8%까지 보충하고 그 영향을 살핀 결과는 표 36과 같았다. 대두박은 2% 이하의 낮은 농도에서는 효과가 없었지만 0.4% 이상에서는 생육을 증진시키는 영향을 나타내었다. 이러한 결과에 따라 대두박은 0.4%로 첨가하는 것이 좋다고 사료되었다.

표 36. 대두박 첨가농도의 영향

농도(%)	pH	산도	균수
0.0	4.55	0.78	8.96
0.1	4.57	0.90	8.95
0.2	4.57	1.00	8.97
0.4	4.58	1.11	9.25
0.8	4.56	1.55	9.18

3) 효모추출물의 보강효과

효모 추출물은 유산균의 생육을 증가시키는 경향이 있으므로 순물에 첨가하였을 때의 촉진효과를 살폈다. 효모추출물을 0.1-0.8%의 범위에서 서로 다른 농도로 첨가하고 산도와 생육에 미치는 영향을 살핀 결과는 표 37과 같았다. 효모추출물은 산도를 증가시키지만 균체의 생육은 0.4%의 경우를 제외하고는 촉진하지 않는 경향을 보였다. 따라서 효모추출물은 0.4%의 범위 이내로 첨가하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

표 37. 효모 추출물의 첨가 농도의 영향

농도(%)	pH	산도	균수
0.0	4.55	0.78	8.96
0.1	4.55	0.90	8.91
0.2	4.55	1.01	8.98
0.4	4.53	1.23	9.22
0.8	4.48	1.66	8.89

4) 영양 보강 순물액의 종균배지로서의 가능성

위의 결과를 바탕으로 순물에 포도당 0.2%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.4%를 첨가한 종균배지를 구성하고, 분리균의 배양능력을 Lactobacillus MRS 배지와 비교하여 보았다. 그 결과는 표 38와 같이 MRS 배지는 보강순물에 비해 생균수가 약간 더 높았으나 두 배지는 거의 같은 정도의 배양능력을 보여주었다. 따라서 순물에 영양을 보강한 배지는 좋은 종균배지로 이용

이 가능함을 알 수 있었다.

표 38. 개발 종균배지와 MRS의 배양능력의 비교

종류	pH	산도	균수
MRS	4.46	4.29	9.47
보강순물	3.95	1.43	9.42

나. 고구마를 이용한 배지

고구마와 같은 더 값싼 천연식물을 이용하는 가능성도 타진하여 보았다. 증숙 고구마 현탁액과 고구마를 전분 분해효소로 처리한 배지를 이용하여 발효시킨 후 균수와 산도를 비교해 보았다. 그 결과는 표 39와 같았으며, 고구마 용액의 산도와 균수는 2.18과 9.05로 같은 농도의 밤용액 1.30과 8.83에 비해 우수하였고, 양조공업식으로 가수분해한 각각의 발효액은 4.80과 9.33, 5.53과 8.83으로 유사한 발효적성을 보여주어 고구마로 밤을 대체할 가능성을 보여주었으나, 종균배지의 양을 4%까지 늘릴수록 고구마 향이 남아 맛에 영향을 주는 문제가 있었다. 그러나 1%이하의 접종에서는 문제가 없었다.

표 39. 고구마 현탁액의 발효특성

구분	밤용액	가수분해밤용액	고구마 용액	가수분해고구마용액
산도	1.30	5.58	2.19	4.80
균수	8.83	9.36	9.05	9.33

증숙밤 및 증숙고구마 첨가비율: 각각 25g/100ml 물

제4절 요약

1. 미생물의 분리

가. 성인남녀 분변에서의 균분리

성인남녀의 분변에서 밤용액에서의 발효적성이 우수한 5균주씩을 분리하고 각각 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, F1R4로 잠정 명명하였다.

나. 시판 요구르트에서의 균분리

같은 요령으로 MGG1, MGG2, NBL1, PAP1, PAP2를 분리 명명하였다.

다. 분리균의 동정

분리된 10가지 균주는 rapid32A kit에 의한 생화학적 시험, fructose-6-phosphate phosphoketolase활성 및 발효물의 acetate/lactate 비를 검사하여 M1R1, M2R1, M2R6, M3R3, NBL1, PAP2는 *Bifidobactrium*으로 F1R4, MGG1, MGG2, PAP1는 *Lactobacillus*로 동정하였다.

2. 분리균주의 발효적성

가. 밤 현탁 용액의 발효시험

분리한 균들은 4%의 밤 현탁액에서 발효적성을 시험하였을 때, 대체로 분변에서 분리한 균들이 시판 유산균류 보다 산 생성이 더 좋았으며 적정산도는 0.81-2.11 ml(0.1N NaOH)의 범위를 나타내었다.

나. 밤 용액 중 증숙밤 함량의 영향

분리한 균들은 밤현탁액에서 증숙밤의 농도를 2%에서 32%의 범위에서 증가시켰을 때 산을 더 많이 생산하였으며, 농도 증가에 의한 산생성 촉진의

크기는 F1R4와 PAP1가 가장 컸고, 4%에서 8%로 증가시킬 때 상승폭이 가장 커서 8% 농도를 사용함이 적당한 것으로 나타났다.

다. 산 생성에 미치는 밤 품종의 영향

밤은 품종별로 차이를 조사하기 위하여 산청산 은기와 이평 및 전북지역의 야생밤을 선택하고 발효성향이 비슷한 M1R1, MGG2, MGG1, F1R4, PAP1을 선정하여, 증숙밤 8%와 32% 및 증숙밤 8%와 영양보충한 밤용액에서 발효시킨 다음 산도를 비교하였을 때 산도는 밤의 품종에 의한 차이보다는 균주의 차이가 훨씬 컸다. 따라서 산도 면에서는 밤 품종에 의한 차이는 중요하지 않다고 사료되었다. 그러나 밤 용액의 향과 맛은 품종에 따라 차이가 나타나 최종 발효제품의 맛을 고려하는 단계에서는 이러한 차이를 조정해야 하겠다.

3. 배양조건의 검토

가. 당첨가의 효과

초도당을 0.5-8%의 범위에서 첨가하였을 때 Lactobacillus는 당 농도의 증가에 따라 산도가 증가하였으나 그 정도는 작았고, 나머지 Bifidobacteria들은 증가하지 않거나 감소하였다.

나. 영양물 보강의 효과

0.05%의 Cysteine, 0.2%의 Yeast Extract와 각각 0.4%의 Gelysate Peptone, Phyton Peptone, Trypticase Peptone을 첨가하였을 때, 거의 모든 균들의 산생성이 촉진되었지만 Phyton peptone을 첨가하였을 때 F1R4와 PAP1에서의 증가폭이 가장 컸다.

다. 당 종류의 영향

Lactose, maltose, sucrose의 이당류는 glucose에 비해 산 생성 촉진이 같거나 작았다.

라. 종균 배양액 접종량의 영향

종균의 접종량은 0.5-8%의 범위에서 증가할수록 산 생성이 증가하였으나 0.5-8%의 범위에서 산 생성 증가율은 접종량의 증가율에 비해 낮았다. 따라서 본 발효에서는 생산 조건에 따라 0.5-2%의 범위에서 알맞은 접종량을 선택할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 본 실험에서는 발효기간의 단축, 균주간의 발효특성 차이의 극대화, 오염균에 의한 영향 감소등을 고려하여 4%로 진행하기로 하였다.

마. 천연과즙 및 야채즙 보강의 효과

사과, 귤, 토마토, 배, 오이, 당근, 미나리 등의 천연 채소와 과일의 즙을 10% 농도에서 가하고 그 영향을 보았을 때 대부분 산생성이 촉진되었으나 그 중 F1R1, MGG1, PAP1가 가장 크게 촉진되었으며, F1R4는 당근과 미나리 즙에 의해, MGG1은 귤과 당근에 의해, PAP1은 오이, 당근, 미나리 즙에 의해 산 생성이 가장 크게 촉진되었다. 이에 따라 본 발효액의 배지는 맛 등을 고려하여 이러한 천연물의 즙을 보강하는 것이 좋을 것으로 사료된다.

바. 발효시간 별 균체 생육의 영향

침전물을 제거하고 난 투명한 상증액으로 발효를 시행하고 시간별로 흡광도의 변화를 살핀 결과 일반적으로 48시간까지 탁도가 증가하였고 그 이상은 증가하지 않았으며, 24시간이면 거의 정상기에 진입하는 것으로 나타났다. 따라서 발효시간은 제품의 요구되는 형편에 따라 24시간 또는 48시간까지 진행할 수 있는 것으로 생각된다. 균주별로는 F1R4, MGG1, PAP1이 최종 탁도가 가장 컸으며 이는 초기 접종액의 탁도에 비례하였다.

사. 발효형태의 영향

1) 액상 밤용액의 발효

8% 밤용액의 침전물을 제거한 후 균을 접종하고 경시적으로 발효하고 산도와 균수를 측정해본 결과 24시간 배양에서 생균수의 범위는 8.05-9.05의

분포를 나타내었고, 시험균 중 M1R1과 PAP1이 9.05와 9.03으로 가장 우수하였다. 48시간 배양에서 생균수는 8.28-9.15의 분포였고 시험균 중 PAP2와 M2R1가 9.15, 8.99로 가장 우수하였다. 시험균들은 소수의 예외는 있으나 일반적으로 24시간이면 배양이 완료되었다.

2) 호상 밤용액의 발효

증숙밤과 물을 1:1로 섞은 밤죽을 20ml 씩 용기에 넣고 접종액 0.8ml를 가한 다음 48시간 배양하고 산도와 균수를 측정한 결과는 산도는 F1R4와 PAP1이 3.26, 3.66으로 비교적 높았으나 생균수는 MGG1, MGG2, NBL1가 9.22, 9.16, 9.24로 비교적 더 우수하였다. 호상발효는 액상 발효에 비하여 산도와 균수가 약간 더 높았으나 그 차이는 크지 않았다. 밤 원료의 소요량이 증가하면 제품의 원가가 증가하기 때문에 죽상발효의 선택에는 이러한 비용 문제나 점도의 증가에 의한 생산시설의 변화 등을 포함한 여러 가지 인자를 고려하여 결정해야 하겠다.

아. 가수분해에 의한 밤 용액의 발효촉진

액화효소(α형 당화효소액)와 고지추출액(β형 당화효소액)에 의하여 양조공업식으로 가수분해시킨 밤현탁액을 엿기름 추출액에 의해 가수분해시킨 밤현탁액과 함께 각각 발효시키고 산도를 비교하였을 때 두가지 가수분해 방식은 모두 크게 산 생성을 촉진시켰으며, 촉진된 값을 0.5% dextrose가 보강된 군과 비교해볼 때 훨씬 더 커서, 효소처리에 의한 촉진은 단지 당 생성의 증가에 의한 것이라고만 볼 수 없었다. 산생성은 전자의 방법이 4.39-14.67의 범위로 후자의 방법에 의한 처리군의 3.35-9.52 범위 보다 더 효과가 더 컸다.

4. 발효균주의 선정

분리균주들은 발효액중의 생균수, 저장중 생존율, 관능적 특성에 따라 선

정하였다.

가. 발효제품의 생균수의 비교

생균수는 8.58-9.32의 범위의 분포를 보여 각 분리균이 거의 비슷한 생육을 나타내었지만 F1R4, PAP1이 9.05, 9.32로 가장 높았으며, 이들의 산도는 각각 5.26, 5.21로서 1.30-2.45의 범위의 분산을 보인 다른 균들에 비해 두드러지게 높았다. 따라서 발효 직후의 발효액의 산도와 생균수 면에서는 F1R4와 PAP1이 가장 좋은 것으로 사료된다.

나. 발효용액의 저장 중 생균수 변화

저장 온도(5℃)에 발효액을 3주간 저장하고 저장중 발효액의 생균수 변화를 측정한 결과 3주간 저장 후의 잔여 생균수는 MGG1과 MGG2가 8.00과 8.03으로 가장 많았으며 최초균수인 8.66과 8.83에 비하여 감소가 적었다. F1R4와 PAP1은 최초균수 9.05와 9.32에서 3주 저장후 2.80과 3.00으로 가장 큰 감소를 보여 대비를 이루었다. F1R4와 PAP1의 산도가 가장 큰 점으로 보아 저장중의 생균수의 감소는 발효액의 산도가 클수록 증가함을 알 수 있었다.

다. 저장중 생균수 감소에 미치는 pH의 영향

발효액의 pH를 5.17로 조정하고 조정하지 않은 발효액을 5℃에서 12일까지 저장하면서 생균수의 변화를 비교한 결과 pH를 조정한 발효액의 생존균수는 6.76으로 조정하지 않은 발효액의 4.38에 비하여 비해 1000배이상 더 많았다. 따라서 제품의 생균수는 발효액의 산도에 의해 크게 영향을 받으므로 저장중 제품의 생균수를 높게 유지시키기 위해서는 산미를 잃지 않는 범위내에서 최대한 pH를 올려야 된다는 점을 확인할 수 있었다.

라. 침전물의 영향

증숙밤의 현탁액은 침전물이 있어 발효와 저장 중 하단부분에 가라앉아 있기 때문에 침전물의 양이 발효와 저장 중에 산도와 균수에 어떠한 영향을

미치는지를 증숙밤 10% 농도에서 조사했을 때 , MGG1은 침전물이 없는 발효액의 배양직후 산도와 생균수는 1.43과 8.61였고, 23%의 침전물 발효액은 1.08과 8.26이어서 침전물에 의해 산도와 균수가 감소하는 경향을 보였고, F1R4의 경우도 4.42와 8.00 및 4.05와 7.56으로 같은 경향을 보였다. 12일간 저장 후 생균수는 MGG1은 침전물이 없는 경우 산도와 균수가 1.43과 8.14였고 23%의 침전물에서 1.13과 7.03이었으며, F1R4의 경우는 각각 4.70과 3.02 및 4.40과 3.68인 것으로 나타나 MGG1에서와는 달리 F1R4에서는 침전물이 발효액의 생균수의 감소를 저지시켰으나 그 영향은 매우 적었다.

마. 1차 관능검사에 의한 선별

발효액을 10명의 관능검사 요원에게 시음시키고 산미, 향, 맛, 음용감 등의 기호도를 평가하도록 한 결과 모든 균에서 밤용액의 발효제품은 산미, 맛, 향, 음용감의 모든 면에서 나쁜 것으로 나타났다. 이러한 결과는 살균에 의한 밤향의 감소, 용기에서 발생하는 불쾌한 냄새, 자극적인 산미, 낮은 점도로 인한 음용감의 저하 등으로 인하여 발생하였다.

바. 최종 선정

1) 혼합배양의 영향 및 호상 제품에서의 저장성

이상의 결과를 바탕으로 발효중 생육이 우수한 *Lactobacillus* PAP1과 생균수의 생존율이 우수한 *Lactobacillus* MGG2를 선정하였다. 이 둘의 혼합배양 발효액의 산도와 생균수는 각각의 단독배양액의 산도와 생균수에 비해 더 컸다.

발효액에 상증여액이 나타나지 않도록 증숙밤을 가하여 호상제품으로 만들고 3주 저장하였을 때 혼합 발효액의 생균수는 각각의 단독배양액 생균수의 합 보다 더 컸으며 pH를 5.17로 조정후 저장한 발효액 보다도 더 높아 저장성도 우수한 것으로 나타났다. 따라서 이들을 혼합하여 사용하기로 최종 선정하였다.

2) 액상 제품에서의 저장성

선정한 PAP1과 MGG2를 혼합배양하고 발효액에 증류수, 당액, 또는 당액과 밤용액의 혼합을 각각 1:1로 섞고, 5℃에서 3주까지 저장하면서 균수의 변화를 조사한 결과 혼합균주는 2주에서 3주 사이에 6.62에서 3.65로 균수가 감소되어 2주 이상의 저장에서는 균수의 유지에 문제가 있었다. 그러나 제품에 당, 밤용액 및 당과 밤용액의 혼합액을 각각 동량 가하고 3주까지 같은 온도에서 저장하면서 균수의 변화를 조사하였을 때 3주 저장액의 균수는 3.65에서 각각 4.60, 5.88 및 7.64로 증가되었다.

3) 수입 종균제품과의 비교 시험

본 연구에서 선정한 균주를 수입종균 Hansen YC-180(S.thermophilus와 L. bulgaricus의 혼합) 및 MSK B2(S. thermophilus, B. infantis 및 L. acidophilus의 혼합)과 비교하였을 때, 24시간 배양 후의 생균수는 Hansen과 선정 균주가 MSK보다 우수하였고, 산도는 선정균주가 가장 컸다. 따라서 제품 생산에서의 용이성 등을 고려하여 제조가공연구에서는 Hansen 제품을 분리균주와 병행 사용하도록 하였다.

4) 접종량에 대한 검토

분리균의 종균배양액의 접종량을 0.5% 이하로 낮추고 발효액의 산도와 생균수를 조사하였다. 접종량을 0.1%(MRS 18시간 배양 기준) 까지 낮추어도 제품의 생균수는 거의 감소되지 않았다.

5. 배양조건의 선정

가. 첨가물 농도의 선정

당 첨가(0.5%)는 균수와 산생성을 증가시키지만 균수의 증가폭은 산도의 증가에 비하여 작았다. 발효액의 산도와 생육은 Yeast extract보다 Phytone peptone 첨가에 의해 더 큰 영향을 받았다. 균수와 산도는 Phytone peptone

0.8%, Yeast extract 0.8%, Glucose 0.5%의 첨가에서 5.11과 9.42로 가장 좋은 것으로 나타났으나, Glucose 0.5%의 조건에서 Yeast Extract 0.2% 이상, Phytone Pepton 0.4% 이상만 첨가하면 산도와 생균수가 각각 3.89와 9.0 이상으로 양호하였기 때문에 이 농도를 선정하였다.

나. 산업부산재료 및 천연재료를 이용한 발효제품의 구성성분의 결정

Phytone pepton과 Yeast Exract은 가격이 비교적 높기 때문에 이를 대체할 산업부산물로 대두박과 순물 및 맥주효모 대신 첨가하고 그 영향을 비교한 결과 맥주효모는 Yeast Extract에 비해 역가가 1/3에 불과하였지만 대두박과 순물은 Phytone peptone에 버금가는 역가를 나타내어 대체 가능성을 보여주었다.

다. 버섯 추출물 첨가의 영향

동충하초와 영지추출액을 보강하고 그 영향을 살펴보았을 때 40%(V/V)의 범위 안에서 균수와 산도에 저해작용을 나타내지 않았고, 오히려 촉진작용을 나타내었으나 증가의 크기는 작았다.

라. 안정제 첨가의 영향

두가지의 안정제 즉 pectin과 sodium alginate를 0.5%의 범위 안에서 여러 농도로 첨가하고 그 영향을 검토한 결과 alginate는 발효액의 산도와 생균수를 증가시켰고, pectin은 산도와 균수를 감소시켰다. 따라서 안정제는 균의 생육을 고려할 때 alginate가 우수한 것으로 사료된다.

마. 최종 선정 및 관능 성적의 개선

지금까지의 결과를 토대로 최종 배지 조성을 밤 8%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.2%, 포도당 0.5%, sodium alginate 0.2%, modified starch 2%로 하였다. 그러나 발효제품은 관능 성적이 매우 낮아 개선을 요구하였다.

1) 최적 당 구성

당은 10%가 가장 적당하였고, 구성은 서당+과당+꿀의 혼합이 가장 우수하

였고, 다음은 서당 단독과 서당+고과당 물엿, 마지막이 고과당 물엿 단독의 순이었으나 경제성을 고려하여 서당 5%와 고과당 물엿 5%로 구성하였다.

2) 최적 산도

발효액의 산도는 3.0-2.5에서 최적이었다.

3) 최적 향 농도 및 구성

향을 개선하기 위해서는 밤 향, 요구르트 향, 바닐라 향을 각각 0.08, 0.01, 0.01%의 비율로 첨가하는 것이 가장 좋았다.

이에 따라 조미 성분의 최종 구성은 서당 5%, 고과당 물엿5%, 밤향 0.08%, 요구르트 향 0.01%, 바닐라 향 0.01%로 하고 제품의 산도는 3.0으로 맞출 것을 제시하였다.

5. 종균배양배지의 개발

종균배지의 비용을 낮추기 위해 산업부산물과 값싼 농산물을 비교하였다.

가. 순물의 이용

두부 제조의 부산물인 순물은 단당류와 서당 등의 소당류가 다량 함유되어 있어 에너지원이 충분하고,, 무기질이 많아 산을 중화시키기 때문에 유산발효에 적당할 것으로 사료된다.

1) 당의 보강 효과

순물에 포도당을 0.2-1.6%의 범위로 첨가하고 분리균주의 생육과 산도에 미치는 영향을 살핀 결과 0.2% 이하로 적게 첨가시키는 것이 적합하였다.

2) 대두박의 보강효과

대두박은 0.8% 이내의 범위에서 실험하였을 때, 0.4% 이상에서 생육을 증가시켰다.

3) 효모추출물의 보강효과

효모 추출물을 0.1-0.8%의 범위에서 시험하였을 때, 균체의 생육은 0.4%

의 경우를 제외하고는 촉진하지 않았다.

4) 영양 보강 순물액의 종균배지로서의 가능성

위의 결과를 바탕으로 순물에 포도당 0.2%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.4%를 첨가한 종균배지를 구성하고, 분리균의 배양능력을 *Lactobacillus* MRS 배지와 비교한 결과 두 배지는 거의 같은 정도의 배양능력을 보여주었다. 따라서 순물에 영양을 보강한 배지는 좋은 종균배지로 사용 가능함을 알 수 있었다.

나. 고구마를 이용한 배지

고구마 용액의 산도와 균수는 2.18과 9.05로 같은 농도의 밤용액 1.30과 8.83에 비해 우수하였고, 양조공업식으로 가수분해한 각각의 발효액은 4.80과 9.33, 5.53과 8.83으로 유사한 발효적성을 보여주어 고구마로 밤을 대체할 가능성을 보여주었으나, 종균배지의 양을 4%까지 늘릴수록 고구마 향이 남아 맛에 영향을 주는 문제가 있었다.

제 3 장 제조가공 연구분야

제1절 서 설

밤을 이용한 발효음료의 제조는, 우리나라 임업계의 오랜 숙원인 밤 이용 식품의 개발과 판매에 의한 밤 재배의 활성화와 임업 농가의 수익성 증대라는 측면에서 매우 중요한 과제이다.

본 제조가공 분야의 연구는, 그 근본을 생산공장에서의 제조작업에 필요한 실행적인 사항들에 두고 수행하였으며, 가능한 한 실제적으로 산업현장에서 이용되고 있는 방법을 사용하도록 고려하였다. 그 이유는 실험실적 규모의 연구에서 얻어지는 정보는 정밀한 분석에의 의하여 수치를 제공하기 때문에, 간혹 산업현장에서 무시되는 생산적 효과의 차이도 실험실 자료에서는 유의적으로 높게 나타나는 경우가 있기 때문이다. 실제 현장 작업에서는 생산규모나 작업자의 작업 집중력 차이 등으로 인하여 생산성 차이가 나타나게 되어 실험실 자료의 유의적 효과가 반드시 인식되지 않는다. 때로 이러한 실험실과 생산공장의 생산성 차이를 고려하지 않은 개발들 중에 상당수는 다른 요인 예를 들면 원가상승 등과 함께 수익성의 악화나 판매부진 등에 의해 실패로 이어지는 경우도 있다.

이러한 관점에서, 본 연구는 현실적으로 우리 나라의 관련산업체에서 실행하고 있는 사항들을 고려하고, 현장 적용성에 보다 더 큰 비중을 두고 개발업무를 수행하였다.

제2절 연구조사, 재료 및 방법

본 연구에서 수행한 모든 실험과 분석은, 특별히 언급되지 않는 한, 식품위생법에 규정된 시험법(식품공전, 1998, 1999)에 의하여 수행되었으며, 3회 이상 시행하여 이들의 평균치에 의하여 표현되었다.

발효 시험에 사용한 기계장치는 음료 및 아이스크림 제조 실험용의 연속식 pilot 기계(Hoyer, Denmark, 용량 20 l/hr)이다.

1. 예비 조사

본 제조가공의 실제 연구에 앞서 예비적 단계로 국내의 유산균 발효식품 산업체의 기술적 조건과 실태에 대한 조사를 실시하였다.

가. 국내 산업체의 발효유산균 사용 실태

국내의 유산균 발효 식품 제조업체들의 종균 사용 실태는 표 40과 같다.

표 40에서 보는바와 같이, 국내 업체들은 Y유업의 한 회사를 제외하고는 모두 유산균 발효식품의 제조에 사용되는 종균을 전량 해외의 미생물 제재 전문회사의 제품을 구입하여 사용하고 있으며, Y 유업도 기술제휴 선인 일본 산업체의 종균을 구입 사용하고 있다. 구입되는 제품들은 대개 독일의 Wiesby, 미국의 Culture System, 불란서의 Sanofi, 핀랜드의 Valio, 덴마크의 C. Hansen 등, 세계 유수의 미생물 제재 회사의 제품들이며, 국내업체의 제품은 아직은 동물사료 발효용 정도로 이용되고 있는 수준으로 조사되었다.

표 40. 국내 발효식품 제조업체의 종균 사용실태

업체명	사용종균	사용이유	비 고
M유업	구입	품, 비	G, F
N유업	구입	품, 비	G, D
S유업	구입	품, 비	D, F
H사	구입	품, 비	D, N
B사	구입	품, 비	D, F
H유업	구입	품, 비	N, F
D유업	구입	품, 비	F, 기술제휴
Y유업	개발,구입	품, 비	J, 기술제휴
G유업	구입	품, 비	불명
B유업	구입	품, 비	불명

N: New Zealand, D: Denmark, F: France, J: Japan
품: 품질유지와 관리상의 편리함, 비: 비용(원가:cost)의 절감

종균을 자체 개발하여 사용하지 않고 외국 전문회사의 제품을 사용하는 이유는, (1) 종균의 관리와 생산 작업시의 오염 등 미생물 사고, (2) 보관 미생물의 역가 저하 현상, (3) 일정한 품질의 제품생산이 불가능한 품질 사고가 빈발하고, (4) 거액의 투자가 필요하고, (5) 종균의 유지관리와 사용에 비용이 과다하게 발생하는 등의 부정적 사항들 때문인 것으로 조사되었다.

나. 생산용 종균제품의 특성

현재 국내에 공급되고 있는 종균은 동결건조 제품(granule type)과 냉동 pellet 제품의 두 가지 형태로 공급되고 있는데, 전자는 취급은 간편하나 가격이 비싸고, 후자는 가격은 저렴하나 취급이 어렵다는 단점이 있어 사용업체가 원가(cost)와 품질을 감안하여 제품별로 선택하여 사용하고 있다. 두 종류의 종균제품 모두 계대 배양이나 전 발효 등 사전 처리 과정이 전혀 필요 없고, 즉시 본 발효에 투입하여 사용 할 수 있도록 가공된 편리한 제품이 공급되고 있다. 경우에 따라서는 종균공급 회사가 사용업체의 유산균 발효제품의 제조관련 기술을 제공하는 경우도 있다.

일반적으로 알려진 유산균류의 특성과 산업체에서의 적용례 등을 조사한 결과 대략 다음과 같다.

1) 유산구균류 (*Streptococus*)

S. thermophilus 가 주로 이용되고 있고, 그밖에 *S. lactis*, *S. cremoris* 등이 있다. acetaldehyde, diacetyl등을 생성하여 향기를 만들므로 시판 요구르트에 널리 애용되고 있다. 발육적온은 40-45℃이다.

2) 유산간균 (*Lactobacillus*)

*L. acidophillus*와 *L. bulgaricus*가 많이 이용되고 있다. 그 밖에 *L. casei*도 이용되는데, 일반적으로 단독보다는 다른 종류의 종균과 혼합하여 사용되는 경우가 많다. 유산발효의 유산생성능력이 우수한 균류가 많으며, 보통 0.3-1.6%까지 생산한다. 혐기성이며, 적정배양온도는 *L. acidophillus*가 35-38℃이고, *L. bulgaricus*는 40-43℃로 조금 높다.

유당이 아닌 다른 당류 이용성이 높고, 향미에도 바람직한 효과가 있다는 사실이 밝혀져 있어서, 비유제품, 특히 야채 발효음료에 자주 이용되고 있다. 밤을 이용하는 제품 개발에 적합한 균류로 판단된다.

3) 비피더스균 (*Bifidobacterium*)

*B. bifidum*이 단독 또는 혼합, 특히 유산 간균류와 혼합 사용되고 있다. 혐기성이며, 산생성 능력은 약한 편이지만, 맛과 산미의 기호성이 우수한 종균이 선발되어 이용되고 있다.

4) 기타

효모 (*Saccharomyces*)등이 이용되고 있으나, Kefir등의 알코올 함유 발효식품에 이용되는 균류로, 몇몇 학자들에 의해 실용화를 위한 실험이 수행된 바 있다.

최근에는 plain 맛보다는 과일류의 사용 등으로 다양한 맛을 만들어야 하고, 이 맛을 결정하는 요소가 균주 자체보다는 첨가원료에 의하여 좌우되는 부분이 크며, 그리고 소비자의 기호변화에 대하여 적시대응을 해야하는 기동성 때문에, 손쉽게 다양한 종류 가운데 선택사용이 가능한 미생물 전문회사 제품이 경제적이라고 인식하고 있었다.

이상의 검토 결과, 본 연구에서 미생물이 개발되기까지는 그리고 실제 사용하고 있는 산업체의 기술부문의 권장을 감안하여, 시판의 우수 종균제품을 선발하여 이용하는 것이 타당한 것으로 생각되었다. 따라서 본 제품개발 연구에서는, 균류의 특성을 고려할 때, 미생물 전문업체의 공급제품 중 *Streptococus*와 *Lactobacillus*를 이용함이 좋을 것으로 판단되었다.

다. 종균의 선택

본 연구는 미생물 연구 부문에서 종균으로 사용할 균주를 분리하기로 되어 있지만 분리가 진행중에도 제조가공에 관한 연구가 진행되어야 하므로 상업용 종균 중에서 적절한 균주를 선정할 필요가 있었다. 이를 위하여 현재 유산균 발효식품을 제조하고 있는 업체들의 기술 부문의 추천을 받아,

미생물 제재 업체(C. Hansen's Laboratory, Denmark)로부터 *S. thermophilus*(TH-3), *L. bulgaricus*(LB-12), 그리고 *S. thermophilus* 와 *L. bulgaricus*의 혼합(YC-180) 등 3가지의 접종용 종균을 공급받아, 산 생성량에 대한 예비실험을 실시하였다.

실험방법은, 탈지분유 10.0%와 정제수 90.0%로 구성된 starter 배양액을 125℃로 7.5분간 살균한 후, 여기에 유산균을 100U/250kg의 강도로 첨가하고, 42℃에서 배양한 다음, 10ml의 sample을 취하고 이를 정제증류수로 2배 희석한 다음, 지시약 페놀프타레인이 담적색으로 되는 중화되는 점까지의 소요된 0.1N NaOH의 ml수를 측정하였다.

그 결과, 표 41에서 보는 바와 같이, *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 단독 사용보다는 두 종균의 혼합 사용이 효율적이라는 사실이 나타났다. 이는 혼합 사용으로 두 균의 공생과 증식에 의하여 상승효과를 가져왔음을 나타낸 것으로 판단된다.

표 41. 종균의 사용 방법에 따른 산 생산성 비교

종균명	적정산도								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8시간
S. thermo.	2.0	2.0	2.3	3.2	4.0	4.5	5.2	5.5	5.8
L. bulgar.	2.0	2.0	2.4	3.0	3.8	5.1	6.2	6.5	7.0
S+L	2.0	2.0	2.2	3.9	6.0	7.8	9.5	9.9	10.5

S+L: *S. thermophilus* + *L. bulgaricus*

*Lactobacilus*는 산 생성의 효용성이 높고, *Streptococcus*는 acetaldehade 등의 향미성분의 생성 효과가 우수하다는 일반적인 설과, 가격면에서도 단독 균주 값이 혼합균주의 값과 거의 차이가 없으므로, 유산균을 단일균주보다는 *S. thermophilus*와 *L. bulgaricus*의 혼합 사용이 경제적이며 합리적인 것으로 판정되었다.

본 제조가공 연구가 진행 중에 미생물 연구 부문에서 미생물을 선정하였으나 제시된 자료에 의하면 미생물 연구에서 분리한 균주가 생균수와 산도에서 약간 우수하였지만 본 가공부문 연구에서 선정한 상업균주가 사용상 훨씬 간편하였기에 이후 본 제조가공 연구과제의 수행은, 특별히 언급되지 않는 한, 위의 두 균주의 혼합사용에 의하여 기본 조건을 잡아가기로 하였다.

다만 최초에 밤을 이용한 발효가 어떠한 특성을 나타내는지를 검토하기 위한 1차 시도에서는 최근 들어 많이 이용하기 시작한 *Bifidobacterium*을 *Lactobacillus*와 혼합하여 사용하였다.

2. 연구재료 및 방법

본 제품개발연구의 모든 발효실험은, 별도의 언급이 없는 한, 종균공급사의 권장 온도인 37-38℃에서 행해졌다.

가. 밤의 적정한 일차가공 기준 설정

경남, 전북, 충남등 의 유명 밤 집산지의 밤가공 전문 업체와 농협을 통하여, 미가공 알밤, 제피밤, 증숙밤, 그리고 초 미세 분쇄가공의 밤 페이스트 등을 구입하여 사용하였다. 공급가격, 생산작업시의 용이성, 창고비, 보존기간 등, 판단의 기준은 현재 밤 가공 제품을 사용하고 있는 산업체의 자료를 제공받아 선택하였다. 가격은 지역과 계절에 따라 편차가 심하므로 년

중 공급 가능가격을 해당 업체로부터 제공받아 기준으로 사용하였다.

나. 밤 품종별, 산지별 구성성분 조성 분석

은기와 옥광의 품종, 그리고 산청과 공주의 산지 구별은 밤 공급사의 분류와 산지의 위치에 의하여 구분하였다.

색도는 Color Difference Meter (Hunter Colorimeter, D25-9, Sensor-D25 Optical sensor)를 사용하여 L.a.b.법에 의하여 수행하였다.

다. 발효제품의 구성성분의 조성과 함유율

1) 밤 함량의 설정

가) 선호도 조사

설탕 12%, 알긴산소다(sodium alginate) 0.2%의 기본 배합에, 밤 페이스트를 각각 5%, 10%, 그리고 15%로 했을 때의 기호도 조사를 행하였다.

당의 함량은, 12%를 기준으로 하여 시행하였는데, 이는 식품, 특히 음용식품의 최적 감미도가 설탕을 기준으로 할 때 12-20%로서 유제품의 최적 감미도가 14-16%라는 보고 (Arbuckle 1977), 유제품의 감미도는 낮은 것(설탕 기준, 8-12%)을 좋아한다는 소비자의 선호도 조사 결과(H사 비공개 조사자료), 그리고 현제 우리나라의 산업체에서 소비자의 기호에 맞춰 사용하고 있는 일반적인 음료 당도가 8-16o Brix인 점을 고려하였다.

잘 훈련된 관능검사요원 12명이 순위검사(Rank Test: 이영춘 1982)를 하였으며, 분산분석 및 Duncan's 다중 검사법으로 유의성을 검정하였다.

나) 침전도 조사

밤 함량에 따른 고형분의 침전도 조사를 병행하였다. 배합물을 75oC에서

100kg/cm2의 압력으로 평판형 head를 사용하여 균질화시킨 다음 15ml 및 50ml 원심분리관 (centrifuge cell)으로 정치 실험을 하였다.

2) 당류의 선택

경제성을 고려한 효과적인 당류의 선택을 위하여, 탄수화물의 종류에 따른 산 생성도를 측정하였다.

당류는 국내에서 가장 구매의 용이성, 저장성, 가격의 저렴성과 변동이 적은 점등을 고려하여, 고과당 물엿 (삼양 제넥스, 고형분 72%), 포도당 (삼양 제넥스), 그리고 설탕 (제일제당)을 대상으로 실험하였다.

가격은 설탕>포도당>고과당 물엿의 순서이며, 저장성 역시 동일 순 이다. 감미도는 고과당 물엿(110-114)> 설탕(100)> 포도당(70) (Catsberg & Kempen-van Domelen, 1990)의 순서이다.

전술한 배양액에, 설탕, 포도당, 고과당 물엿을 각각 3% 씩 넣고, 125oC에서 7.5 분간 살균 한 다음, 종균을 50U/250kg과 100U/250kg의 강도로 첨가한 후 42oC에서 배양하면서 매 1분마다 5ml씩 sampling 하여 pH를 측정하였다.

pH의 측정은 digital 방식의 pH Meter(Piccolo ATC pH meter, Padova, Italy)에 의하여 시행하였다.

3) 추출성분들(Herbal Extract)의 첨가 실험

현재 국내에서 생산되어 구매가 용이하고, 품질수준이 일정하게 유지되며, 일반적으로 널리 알려진 추출성분들을 구입하여 첨가실험을 행하였다.

본 개발 제품은, 우리 나라 식품위생법에 의하여, 의약품이 아니므로 그 효능에 대하여 광고를 할 수 없으므로, 비교적 일반인들에게 널리 기능성이 알려진 추출성분들을 구매의 용이성과 품질의 일관성등을 고려하여 선발하

였다.

1차 선발된 추출물은 솔잎, 숯, 뽕잎 추출물, 그리고 쑥 등 4종의 식물과 영지, 동충하초 등 2종의 버섯이었다.

이들 추출물의 첨가 가능성 실험이 맛에 대한 선호도 검사로 실시되었다. 실험에 사용된 밤 발효음료의 기본 배합은, 용액 100에 대하여, 설탕 12%, 밤 페이스트 5%, 알긴산 소다 0.2%이며, 여기에 솔잎 추출물 0.3%, 숯 추출물 0.05%, 뽕잎 추출액 0.5%, 쑥 추출물 0.1%, 영잇 추출물과 동충하초 추출물이 각각 0.3%씩 첨가되었는데, 이는 사전 예비 관능검사에서 향미에 부정적 영향을 주지 않는 양으로 판단된 양이다.

선호도 측정은, 식품관능검사의 경험이 풍부한 식품기술 전문요원 5명에 의하여, 가장 선호하는 표본을 5점, 그리고 가장 낮은 선호도의 표본을 1점으로 하여 5개의 표본들을 평점한후 이를 무작위 독립변수로 환산하여 순위를 정하는 방법 (H제과 교재, 1983)에 의하여 평가하였다.

4) 감미료의 구성 설정

감미료의 구성 종류를 설정하기 위하여, 기준 감미도인 설탕 12%에 대하여, 원가를 고려하여, (1) 포도당 6% + 고과당 물엿 7%, (2) 포도당 3% + 고과당 물엿 9%, (3) 포도당 9% + 고과당 물엿 5%의 세가지의 경우로 만들어 이에 대하여 관능 검사를 하였다.

전문요원에 의한 3점법(한국공업규격 1983)을 원용한 방법을 사용하였다.

5) 음용감(Body 감)의 설정

적절한 음용감을 설정하기 위하여, 안정제의 첨가실험을 행하였다.

알긴산소다(주식회사 광일, 한국)와 변성전분(Modified Starch KYP, Excellpro Inc., U.S.A)을 제조사의 권장량인 0.2%와 2.0%를 각각 첨가하여

점도와 침전여부 실험을 행하여 종합 판단하였다.

침전은 15ml 원심분리 관에 넣어 정치한 다음 3시간 후 침전여부를 관찰하였고, 점도는 유동성식품 점도측정장치(Grindsted A/S, Brabrand, Denmark)를 이용하여 시판 농후요구르트와 비교하였다.

라. 제품 제조공정 설정

1) 밤 고형분의 침전방지

밤 고형분의 침전은 안정제만으로 해결되지 않으므로, 초미립자화 분쇄기(Supermascolloider, Wet, Japan)를 이용하여 미립자화 시켜 사용하기 위한 실험을 행하였다.

입자크기를 10, 30, 50, 100, 150미크론의 5종류로 가공한 후 원심분리 관에서 1주야 후의 침전여부를 정치 실험하였다.

2) 살균온도의 설정

밤이 함유된 음료의 제조 시 품질상의 문제점은, 갈변현상과 가열취이다. 갈변현상은 금속이온과의 접촉제거 등으로 해결되며, 가열취는 과도한 고온처리에 기인한 성분들 때문으로, 일반적인 가열살균과 다른 온도에서의 가공이 요구된다.

500ml의 삼각 후라스크에 시료를 넣고, 125℃에서 7.5분 처리하고, 이를 기준으로 하여 해당온도에서 이와 동일한 D value를 만족하는 시간동안 105℃, 95℃, 85℃, 75℃, 그리고 65℃로 살균한 후, 훈련된 관능검사요원에 의하여, 전술의 3점법을 이용한 방법으로 이취(異臭)여부를 검사하였다.

이 처리 온도들은, 식품공장에서 일반적으로 많이 이용되는 온도로서 보편화된 설비이며, 종업원들도 숙련되어 있기 때문에 실험대상 온도로 선택되었다.

마. 제조품질관리 기준 설정

이상의 실험결과들과 원가를 고려한 경제성 등을 고려하여, 각 공정별 실행 품질관리 기준치를 설정하였다.

바. 유통품질관리 기준 설정(생균수와 맛의 유지기간 설정)

1) 생균수 유지기간의 설정

유산균 발효제품의 생균수 유지는 식품위생법의 규격기준(1.0 x 107/gr, 식품공전 제 14-13-7항)이기 때문에 매우 중요하다.

완성된 제품을 0-6℃의 냉장 쇼케이스에 보관하면서 매 3일 마다 sampling 하여 생균수를 측정하였다. 보관 중 오전 10시부터 오후 6시까지 1회당 5분씩 1일 24회 (20분당 1회) 냉장 쇼케이스의 문을 열어두는 방법으로 판매 현장의 여건과 가능한 한 일치시키도록 하였다.

2) 유통중의 맛의 변화

전항의 생균수의 경시변화와 함께 맛의 변화 유무를 15일간 매 3일 마다 측정하였다.

맛의 변화유무는 고도로 훈련된 관능검사 전문요원 5명에 의해서 시행되었으며, 단 1명의 검사요원이라도 이취를 감지하면 이를 이취 발생으로 간주하였다. 이는 관능검사 결과를 통계처리 방법으로 평가했을 때의 오차 범위 내에 숨겨져 있는 부정적 오류를 방지하기 위한 현실적 방법으로서, 산업체의 생산과 판매 현장에서 훈련된 품질관리요원에 의하여 실행하고 있는 가장 효과적인 불량제품 적발 관능검사 방법중의 하나이다.

제3절 연구결과

1. 밤 원료형태의 선정

밤의 원료형태를 깐밤, 증숙밤, 가당증숙밤, 냉동 paste block 등으로 구분하여 검토하였다. 밤을 외피[外皮]와 내피[內皮]를 제거하여 박피율(剝皮栗), 즉 깐밤[生栗]을 만든후, ①이를 그대로 수침하여 갈변방지 하면서 이용하거나 : 깐밤, ②90 95℃에서 20분간 증숙하여 냉각 후 밀폐포장하여 0 6℃로 냉장하면서 사용하거나 : 증숙밤 ③ 50 Brix의 가당용액에서 120℃로 30분간 처리하여 증숙하여 밀폐포장 상태로 상온에서 보관하면서 이용하거나 : 가당 증숙밤, ④90 95℃에서 20분간 증숙한 밤을 으깨어 paste상으로 만든 다음 이를 40×60㎝의 PE봉지에 넣어 -30℃이하로 급속 냉동하여 ice block으로 만든 다음, 냉동 보관하면서 사용하는 형태 : 냉동 paste block 등 4가지 형태로 제조한 후 이들 중 가장 효과적인 이용 대상을 선발하였다.

선정기준은 ① 획득의 용이성, ② 저장기간의 장기성, ③ 사용의 편의성, ④ 저비용성 등의 4개항목을 설정하고, 이에 준하여 각각의 형태를 평가하였다. 그 결과는 표 42과 같았고, 현재의 우리나라 실정상 냉동 paste block이 기술성과 경제성에서 가장 우수한 이용 원료 형태라고 판단되어 이를 최적원료 형태로 선정하였다.

특히 냉동 paste block은 초기 가공시의 냉동비용과 저장비용으로 비용이 비교적 높으나, 장기적으로 볼 때 loss가 거의 없고 사용시점까지의 신선도를 유지하는 등 품질 보존에 탁월하고 년중 이용이 가능하여 결과적으로는 원가도 가장 저렴한 최적 원료형태인 것으로 판단되었다.

표 42. 밤 원료형태의 선정 기준비교표

형태	평점(순위)					
	획득용이성	저장장기성	사용편의성	저비용성	총점	비고
깐밤	0.4(1)	1.5(2)	0.2(4)	0.2(4)	2.3	2차가공 비용과다
증숙밤	0.3(2)	0.5(4)	0.6(2)	0.6(2)	2.0	장기저장 불가
가당 증숙밤	0.1(4)	1.0(3)	0.8(1)	0.4(3)	2.3	장기저장 불가
냉동 paste block	0.2(3)	2.0(1)	0.4(3)	0.8(1)	3.4	최우수
비중	10	50	20	20	100	현재여건상

* 순위점수 : 1위:4점, 2위:3점, 3위:2점, 4위:1점
** 총점계산 : ∑(기준별 순위 점×비중)

2. 밤 품종별(은기, 옥광), 산지별(공주, 산청) 구성성분 조성

밤의 품종별, 산지별 밤 원료의 성분차이에 의한 영향을 극복하는 연구를 시행해야한다는 지적을 받아 이를 연구계획 원안에 추가하여 보완적으로 수행하였다. 이에 따라 밤의 품종별 및 산지별 성분차이에 대하여 성분분석과 함께, 우리 나라의 현실과 여건 등을 광범위하게 조사한 결과는 다음과 같았다.

현재 우리 나라의 밤 수확 및 수매형태를 조사한 결과에 의하면, 품종은 은기, 옥광, 이평 등이 있고, 산지는 공주지방과 산청지방, 그리고 광양지방 등이 주산지로 인정되고 있고, 현재 집하 가능 품종은 은기 종과 이평 종이 주종을 이루고 있음이 조사결과 나타났다.

이를 근거로 우리 나라의 양대 밤 집산지인 공주지방과 진주지방의 농협에서 사전 구분의뢰에 의하여 수매 집하한 은기 종과 이평 종을 각각 산지별로 구별하여 구입하여 각 종의 성분함량을 분석하였다.

그 결과, 표 43에서와 같이 먼저 진주지방산 밤의 분석자료를 보면, 은기 품종의 경우 과육의 수분함량이 64.33±0.05%, 조단백질이 2.90±0.10%, 회분이 1.05±0.00%, 유리당이 11.01±0.12%, 전분이 49.55±1.25%로 나타났으며, 이평 품종의 경우에는 각각 수분함량이 62.52±0.11%, 조단백질이 3.19±0.08%, 회분이 0.83±0.01%, 유리당이 8.99±0.09%, 전분이 50.65±2.05%로 나타났고, 공주지방의 밤의 경우에는 은기품종과 이평품종의 경우, 각각 수분이 61.77±0.04%와 63.50±0.02%, 조단백질이 2.70±0.11%와 2.82±0.12%, 회분이 0.85±0.02%와 1.04±0.02%, 또 유리당이 9.28±0.04%와 9.73±0.13%, 그리고 전분의 함량이 은기의 경우 52.69±0.49%, 이평의 경우에는 52.90±1.87%로 나타났다.

그리고, 밤 과육의 색도를 비교한 결과를 보면, 산청산 은기, 공주산 은기, 그리고 산청산 이평과 공주산 이평의 경우 L Value와 a 및 b Value를 보면, 각각 60.54, 60.80, 그리고 60.57과 59.06의 L Value와 -3.34, -3.34, 그리고 -2.85와 -2.90의 a Value, 또한 20.65와 17.19, 그리고 19.44와 19.24의 b Value 등으로 나타나 산지별로는 차이가 없으나 품종간에는 큰 차이는 아니나 a와 b Value에서 은기와 이평품종 간에 과육의 색깔에 약간의 차이가 있음을 보여주었다.

표 43. 우리나라 밤의 품종별, 산지별 성분함량 비교표

시료명	함량(%)			
	산청산 은기	산청산 이평	공주산 은기	공주산 이평
수분	64.33±0.05	62.52±0.11	61.77±0.04	63.50±0.02
조지방	0.66±0.05	1.08±0.08	1.03±0.00	0.63±0.07
조단백	2.90±0.10	3.19±0.08	2.70±0.11	2.82±0.12
탄수화물	31.06±0.12	32.38±0.21	33.46±0.14	32.20±0.14
회분	1.05±0.00	0.83±0.01	0.85±0.02	1.04±0.02
당함량	11.01±0.12	8.99±0.09	9.28±0.04	9.73±0.13
전분함량	49.55±1.25	50.65±2.05	52.69±0.49	52.90±1.87
L Value	60.54±0.78	60.57±0.92	60.80±0.52	59.06±0.37
a value	-3.34±0.26	-2.85±0.28	-3.34±0.21	-2.90±0.22
b value	20.65±0.31	19.44±0.60	17.19±0.45	19.24±0.55

이를 면밀히 비교 분석할 때, 비록 품종간에 약간의 색도의 차이가 있음에도 불구하고, 성분 분석치 상의 성분함량 차이는 거의 없다는 사실이 확인되었으며, 각 지역과 품종에 따른 각 성분함량의 차이가 크지 않다는 사실을 말해주고 있다. 이는 1998년 3월 산림청이 발표한 바와 같이 은기와 옥광등 두 종류의 밤의 품종별 성분함량에 차이가 별로 없다는 결론 자료와 일치하는 결과였다(표 44).

표 44. 밤의 성분조성표(산림청 1998)

표본	성분함량(%)					
	수분	조단백	회분	조지방	환원당	전분
은기	62.43	3.91	1.39	1.75	0.12	30.40
	±1.16	±0.43	±0.21	±0.06	±0.01	±1.34
옥광	61.59	3.58	1.37	2.07	0.13	31.27
	±0.95	±0.10	±0.03	±0.10	±0.01	±0.90

* 3회실험 평균치±표준편차

또한, 우리나라 밤의 양대 집산지인 진주의 농협과 공주의 농협을 위시한 강원도 홍천등지의 현지 농협과 군청 등을 통하여 산지별 차이와 품종별 차이에 대한 현재의 우리나라 밤의 수매 집하와 실제적인 이용실태 내용을 문의 조사한 결과, 우리나라의 밤은 산지별 재배품종분포의 차이가 실제로는 크지 않으며, 동시에 밤의 수매시 대부분이 품종별로 수매하지 않고 품종의 구분 없이 혼합하여 수집하고 있기 때문에, 산지별 또는 품종별 구분은 실제 사용 단계에서는 전혀 이루어질 수도 없으며 의미가 없음이 인정되었으며, 이는 산림청 관계자들에 의해서도 확인된 바 있다.

그러므로 당 연구과제 수행에 있어서 원료 밤의 산지별, 품종별의 구분 실시는 의미가 없는 것으로 판단되었으며, 따라서 이에 대한 보완 연구는 그 필요성이 매우 희박하며, 그 보다는 이러한 혼합수매와 유통현실에 맞추어 조건들은 만족시키는 제품성분의 구성과 균주 선발 및 가공조건 설정을 위한 연구가 더 필요한 것으로 판단되었다.

3. 제품의 포장, 형태의 선정

밤을 이용한 기능성 발효제품을 제조하기 위하여, 이와 관련된 시장조사를 행하고, 기업체 등의 자료를 입수 검토하였다.

현재 우리 나라에는 떠먹는 형태의 호상 요구르트 타입과 액상 음용 요구르트 타입의 두 가지 형태가 시장에 유통되고 있다. 이 두 제품 모두가 합성수지제의 용기에 충진 포장되어 있는데, 호상 타입은 컵 형태의 용기에, 액상 타입은 병 형태의 용기에 포장되어 있다.

이 두 가지 형태 중, 우리 나라 시장에서는 액상 발효식품의 선호도가 2.8배 이상 높다. 이는 간단히 개봉하여 마시면 되는 액상 음용 타입에 비하여, 호상 타입은 섭취하기 위하여 숫가락을 필요로 하고, 따라서 두 손을 사용하여야 하며, 움직이지 않는 상태에서 떠먹어야 하는 등의 불편함이 있기 때문인 것으로 파악되고 있다.

호상 타입은 종균이 접종된 원액을 일정한 용기에 충진한 다음 발효시켜 제조하고, 액상 타입은 제품 탱크에서 발효시켜 발효를 완성한 다음, 이를 일정용기에 충진하여 제조하므로, 두 종류의 제품들은 제조 기술상 큰 차이가 있다.

따라서 현실적으로 호상 타입은 이스트의 오염 등으로 인한 미생물 사고 등이 빈번하게 일어나고 있고, 품질이 일정하지 못한 문제점이 있는 것으로 조사되었다. 이에 비하여 액상 음용 형태는 발효 탱크에서 제조완료 후 용기에 넣어 포장하므로, 품질관리가 용이하고, 보존기간이 길다는 장점도 가지고 있다.

이러한 시장성과 기술적 현실 등을 고려하여, 본 연구개발 제품의 형태는 호상보다는 마시는 형태의 액상 발효식품 형태로 정하였다.

4. 발효제품의 구성성분의 조성과 함유율

가. 1차 제조에 의한 문제점 도출

밤을 이용한 젖산 발효제품의 제조를 위한 구성성분의 조성과 함유율을 결정하는데, (1) 냉동 paste block을 이용하고, (2) 맛을 좋게 하며, (3) 발효효과를 극대화하는데 목표를 두고 개발연구를 수행하였으며, 밤을 주성분으로 하고, 젖산균의 탄소원으로 포도당을 5% 첨가하였으며, 유제품은 원가가 낮고 발효 효율이 높은 것으로 인정되고 있는 lactose를 이용하고, 균주는 예비 실험에서 성적이 우수했던 *Lactobacillus + Bifidobacterium*의 2 : 1 혼합균주를 사용하고 맛은 사과과즙 첨가로 조정하는 것을 근간으로 하여 수차의 조성 조정으로 시행되었다. 그 결과 잠정적으로 다음과 같은 성분 배합표가 1차적으로 도출되었다(표 45).

표 45에서 보여주고 있는 성분 배합표는, 원료를 사용함에 있어서 냉동 plaste block의 미립도를 150mesh 로 하고, 가공 온도를 90℃ 125℃로하여 20 25분간 처리함을 기준으로 하였을 경우에 도출된 것이며, 연구수행 과정 중 이러한 미립도와 가공온도 및 시간이 완성되는 밤이용 발효제품의 맛과 성상에 매우 큰 영향을 준다는 사실이 인정되어 있으므로, 이에 대한 세밀한 연구와 실험이 요구되었다.

전반적으로 볼 때, (1) 맛에 있어서는 밤이 가지고 있는 고유의 맛이 bottom note는 좋으나 top note에서 감지도가 매우 약하며, body 역시 밤 특유의 냄새와 맛이 미약하게 느껴지고 있고, (2) 고형분과 용액과의 분리와 침전현상이 인지되는 품질과 상품성의 미흡함이 있으며, (3) 숙성에 요하는 발효시간이 18시간 이상의 장시간이 소요되어 경제성에서 비효율적이라는 문제점등이 있어 아직 해결되어야 할 몇 가지의 미비점들이 있음이 인정되었다.

표 45. 밤 이용 발효제품을 위한 1차 성분배합표

분	세부성분	함량(%)	특기 사항
	밤	8	
	정제수	23.5	
발효원액	당류	6	설탕+포도당
	유제품	2	유당
	유산균 종균	0.5	L:B=2:1
당류		10	올리고당시도
과일즙		15	사과과즙
정제수		35	2차 참가량
계		100	

L: *Lactobacillus*, B:*Bifidobacterium*

이들은 밤의 성분조성과 물리화학적 특성, 부첨가원료의 물성과 향미, 기능적 특성들을 고려하여 연구가 계속 수행되어야 함을 알 수 있었다.

그리고 현재는 이러한 성분배합 조성과 조성성분의 성상 등의 밤 발효제품의 맛과 품질에 대한 영향과 함께 미생물연구 부문에서 선발한 특정 유산균의 발효에 의한 맛과 발효 효과에 대한 복합적인 영향을 고려해서 연구를 수행해야 최상의 제품을 개발할 수 있음을 알 수 있었다.

나. 최적 구성성분의 결정

1차 제조 시험을 위한 임시 구성성분과 공정으로 제조한 제품에서 물성,

맛, 비용 등에서 문제점이 발생되었으므로 이를 해결하고 최적의 조건을 찾기 위하여 몇 가지 중요한 항목을 검토하였다.

1)밤 함량의 설정

가) 선호도 조사

밤 함량에 대한 선호도를 관능검사에 의하여 조사한 결과는 표 46과 같다. 밤이 5, 10 및 15%로 함유된 세 시료는 농도가 진할수록 선호되었고 세 농도간의 유의적 차이는, 10% 함유 시료와 15% 함유 시료가 5% 함유 시료에 대하여 1% 수준에서 유의성을 갖는다.

따라서, 10%에서 15% 범위로 함유하는 제품이 시장성이 좋을 것으로 판단될 수 있다.

표46. 밤 함량에 대한 선호도

함유량(%)	순위점수*	비고
5	-6.8	유의적 차이
10	1.7	
15	5.1	

유의성 수준=1%

* 순위평점: 1=0.85, 2=0, 3=-0.85

나) 침전도 조사

밤 함량은 시장 경쟁력을 고려할 때, 원가 측면과 기술적 측면도 동시에 고려해야 하므로 단순하게 선호도만 높은 것으로 결정할 수 없다. 밤은 고가원료이므로, 적은 양이 투입 될 수록 원가가 낮아 시장 경쟁력을 갖게 된다. 기술적으로는 밤의 함량이 높을수록 침전현상이 심해지는 품질상의 문제가 있고, 이는 본 제품의 상품성을 떨어뜨리는 결함이 된다.

이러한 관점에서 고형분의 침전 정도를 검사하였는데, 그 결과는 표 47과 같다.

표 47. 밤 함유 음료의 고형분 침전성

함유량(%)	정치시간			비고
	4	16	24	
5	+	++	++	불량
10	++	+++	+++	불량
15	+++	++++	++++	극히불량

50ml 원심분리 관에 의한 정치관찰

표에서 보는바와 같이, 밤의 함유량이 높으면 고형분의 침전 현상이 심하여 상품성을 상실하게 되므로, 선호도와 침전성, 그리고 원가를 고려하여, 밤의 함량은 5-10% 사이에서 이우러지는 것이 적당하다고 생가되었고, 미생물 연구자료를 바탕으로 8%로 시행 하기로 하였다.

2) 당류의 선택

탄수화물의 종류에 따른 산 생성도를 측정하여, 경제성을 고려한 효과적인 당류의 선택을 시행하였는데, 자료는 표 48과 같다.

당류는 산생성 면에서 포도당이 가장 우수하였으며 고과당, 설탕의 순이었다. 그리고 종균의 접종량은 100과 50U/250kg 사이에서 큰 차이가 없었다.

표 48. 당류에 따른 pH의 경시변화

당류	접종량 (U/250kg)	pH 0	1	2	3	4	5	6	7시간
설탕	100	6.6	6.5	6.4	6.2	5.6	5.5	5.1	4.9
	50	6.6	6.6	6.5	6.4	5.7	5.7	5.3	5.0
고과당	100	6.6	6.5	6.4	6.1	5.7	5.4	4.9	4.7
	50	6.6	6.5	6.4	6.4	5.7	5.4	5.1	4.9
포도당	100	6.6	6.4	6.1	5.4	5.1	4.8	4.5	4.5
	50	6.6	6.5	6.4	6.2	5.6	5.3	5.1	4.8

포도당에서 유의적 차이($P<0.05$)

위의 결과, 포도당이 가장 효과적으로 이용되고 있는 점과 함께 가격, 그리고 감미의 느낌 특성을 함께 고려할 때, 포도당과 고과당 물엿의 혼합 사용이 바람직 한 것으로 판단되었다.

또한 종균의 사용은 제조업체가 권장하는 50U/250kg의 역가로 사용함이

경제적이라고 판단되었지만 최종제품의 생균수를 유지하기 위하여 100U/250kg으로 사용하였다.

3) 감미료의 구성결정

포도당과 고과당 물엿의 혼합 사용 시 최적 혼합비율을 결정하기 위하여 세 가지의 조합6:7, 3:9, 6:7로 구성하고 이에 대한 선호도를 조사하였다. 그 결과는 다음의 표 49와 같다.

표에서 보는 바와 같이, 감미료의 구성에 따라 선호도는 포도당 6%에 고과당 7%의 비율로 첨가하였을 때 점수가 가장 높았고 포도당 9%에 고과당 물엿 5%의 혼합일 경우가 가장 낮았으나, 통계적 처리결과 세 시료간에는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.

따라서 감미료의 구성은 포도당 6%와 고과당 물엿 7%로 조성하는 것이 좋다고 판단하였다.

표 49. 감미료의 혼합구성별 선호도

조합	선호도*
G6+HFC7	2.55
G3+HFC9	0.85
G9+HFC5	-3.4

G: 포도당, HFC: 고과당

*: 선호도 점수 1=0.85, 2=0, 3=-0.85

4) 식물 및 버섯 추출물의 첨가

건강에 좋다고 알려진 식물 및 버섯 추출물을 첨가하는 실험을 행하였다.

실험대상인 솔잎, 참숯, 쑥 및 뽕잎 등 4가지 추출액 및 영지와 동충하초의 두가지 버섯의 추출액을 각각 첨가량 예비시험(고온 정제수 첨가 평가방법)을 거쳐 정해진 양을 밤 발효음료에 첨가하여 관능검사를 하였다. 그 결과는 표 50과 같았다.

추출물을 첨가한 제품은 첨가하지 않은 제품에 비하여 선호도가 낮았다. 순위별로 보면 미첨가, 참숯, 동충하초, 솔잎, 영지, 뽕잎, 쑥 첨가의 순이었다. 그 중 특히 쑥은 밤을 함유하는 제품 고유의 맛과는 전혀 다른 맛으로 변화시키므로 첨가에 문제가 있었다. 따라서 쑥을 제외한 여타의 추출물들은 건강 기능성 부여의 목적으로 첨가하는 것도 좋을 것으로 판단되었다.

표 50. 식물 및 버섯 추출물의 첨가시 선호도

종류	선호도	순위점수*	순위	특기사항
밤	387	0.493	1	
밤+솔잎	322	0.134	4	
밤+뽕잎	248	-0.095	6	
밤+참숯	366	0.400	2	
밤+쑥	201	-0.551	7	맛이 변함
밤+동충하초	355	0.313	3	
밤+영지	285	0.114	5	

*: 무작위 독립변수 환산시

5) 음용감(body 감)의 설정

밤 8% 함유 발효음료의 점도는 시판 농후요구르트(100)와 비교 할 때, 58에 불과하였다. 따라서 이를 개선하여 음용감을 향상시키고 동시에 침전

현상을 개선하기 위하여, 안정제의 첨가 실험을 행하였다.

사용된 안정제는 알긴산소다와 변성전분으로서, 제조사의 권장첨가량에 준하여 각각 0.2%와 2.0%를 첨가하고 이들을 혼합하여 2.2%로 첨가하고 점도, 침전, body감등을 조사한 결과는 표 51과 같았다. 점도는 알긴산소다와 변성전분을 각각 단독으로 첨가한 경우가 74, 81인데 비하여 이들을 혼합하여 첨가한 경우는 104로 점도가 더욱 증가하였고, 침전은 각각을 단독으로 사용한 경우 보다 훨씬 적었다. 또한 body감에서도 우수하여 이들을 혼합 사용하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

표 51. 안정제 첨가에 의한 점도 변화와 침전현상 개선효과

안정제	첨가량(%)	점 도*	침전**	특기사항
알긴산소다(SA)	0.2	74	++++	body감 개선
변성전분(MS)	2.0	81	+++	양호
SA+MS	2.2	104	+	양호

*:농후요구르트 100 기준, **: overnight 후 측정

다. 제품 제조공정 설정

이상의 항목별 검토결과들을 종합하여 제조공정을 설정하였는데, 여기에 다음 몇 가지 사항이 추가 검토되었다.

1) 밤 고형분의 침전방지

안정제의 첨가에도 불구하고 발생되는 밤 고형분의 침전 현상의 방지를 위한 초 미세화 가공 공정이 검토되었다. 그 결과 표 52에서와 같이 50 미

크론 이하로 초 미립자화 시키면 침전현상이 방지되는 것으로 나타났다. 그러나 상품화 시에는 작업의 난이도를 고려할 때, 100 미크론 정도로 가공하는 것이 현실적일 것으로 예측되었다.

표 52. 초미세화 가공에 의한 밤 고형분의 침전 개선효과

입도(미크론)	침전	침전물 특성
150	++	미세 페이스트
100	+	미세 페이스트
50	-	초미세
30	-	초미세
10	-	초미세

2) 이취발생 예방 살균온도 설정

열에 의해 밤 식품의 이취(異臭) 발생과 밤 특유의 향기가 소실되는 것을 개선하기 위하여, 살균온도의 저온화가 요구되므로, 온도에 따른 이취 발생 정도를 측정하였다.

그 결과는 표 53에서와 같이 원액 살균시 105℃ 이상에서의 살균은 이취가 매우 컸으며 75℃ 이하에서는 거의 발생하지 않았으나 작업시간을 고려하여 85℃ 이하로 시행함이 바람직 한 것으로 판단되었다.

표 53. 살균 온도에 따른 이취 발생 여부

온도(℃)	이취정도	판정
125	+++	불가
105	+++	불가
95	++	가능
85	+	가능
75	-	가능
65	-	가능

3) 생균수의 확보

가) 식품위생법상의 규격기준

유산균을 이용한 발효식품은 식품위생법 상(식품공전 제 14-13-7항) 건강보조식품류에 속하는 '유산균 이용식품'이다. 동시에 대장균은 음성이어야 한다. 따라서, 시판 유통 중 생균수 107/gr 이상의 유산균을 함유하고 있어야 하고, 대장균이 음성인 상태를 유지하는 품질상의 조건을 만족시킬 수 있도록 제조공정이 정립되고 유통 품질관리가 시행되어야 한다.

나) 수입종균에 의한 발효시간의 설정

일반적으로 산업체에서 널리 이용되고 있는 생균수 규격 유지 방법을 조사한 결과, 대부분이 출고전 생균수를 1010CFU/ml로 관리하고 있음이 나타났다.

유통과정에서 보관온도의 관리 오류와 기간관리 소홀 등의 현실적 조건을 고려하여 실행하고 있는 제조 및 품질관리 방법으로서, 밤을 이용한 발효제

품의 경우에도 이를 고려하지 않으면 안된다고 판단되었다. 그러나 유산균의 밤 용액에서의 생육은 우유에서 보다 약간 떨어지는 경향을 보였다.

따라서 제조시의 생균수를 9.0(logCFU/ml) 이상으로 정하고, 이 생균수 확보에 필요한 제품의 발효 시간을 정하기 위한 실험을 실시하였다. 지금까지 확보한 실험조건으로 발효시간을 19시간까지 행하면서 제품 내의 유산균수와 대장균 검사를 행한 결과는 표 54와 같았다. 19시간까지의 발효로 9.0 이상에 도달할 수 있었고, 대장균은 전 발효과정에서 검출되지 않았다.

따라서 시중 출시시의 유산균 수를 1x109 이상으로 확보하기 위해서는 19 시간의 발효가 필요하였다.

표 54. 유산균의 경시적 변화

발효시간(hour)	균수(log10CFU/ml)	대장균
0	7.85	음성
6	8.06	음성
9	8.39	음성
12	8.71	음성
18	8.99	음성
19	9.16	음성

4) 분리균주의 이용을 위한 공정

본 연구의 미생물 연구에서는 *Lactobacillus* MGG1과 *Lactobacillus* PAP1을 분리하였고, 이 종균들은 본 제조가공 연구에서 사용한 수입종균에 비하

여 생균수가 높았으나 산도가 높아 맛과 저장성이 떨어지고 또한 종균을 배양하는 별도의 공정을 요구하는 등의 단점을 가지고 있었다. 이러한 단점을 보완하는 공정을 구성하고자 하였다.

먼저 종균을 배양하는 배지의 비용을 감소시키기 위하여 미생물 연구부문에서 얻은 자료를 바탕으로 종균배양 배지의 조성을 결정하였다(표 55). 이 배지를 이용하여 37℃에서 15시간을 배양한 결과 9.0(logCFU/ml)이상의 생균수를 얻을 수 있었다.

표 55. 종균 배양배지의 조성

성분	함량비
포도당	0.2
대두박	0.4
효모추출물	0.4
순물	100

미생물 연구에서 얻은 자료를 이용하여 구성한 최종 배양배지 조성과 발효조건은 표 56와 같았으며 이 조건에서 37℃, 19시간을 배양했을 때 9.0 이상의 생균수가 확보됨을 확인하였다.

맛과 저장성을 개선하기 위하여, 미생물 연구에서 제시한 자료를 바탕으로 발효액의 균질화 공정 전에 혼합공정을 첨가하여 그 효과를 확인하여 다음과 같이 조미성분의 배합비를 구성하였다(표 57).

이와 같이 제조한 제품은 맛이 본래의 밤에 유사하면서도 안정적인 맛을 지녀 살균공정에 의하여 발생하는 미약한 이취도 해소시키는 장점을 가지고 있었다.

표 56. 분리균주를 위한 발효배합비

성분	함량비
밤	8
대두박	0.4
효모추출물	0.2
포도당	0.5
알긴산소다	0.2
변성전분	2.0
정제수	100

표 57. 조미 성분의 배합비

성분	함량비
서당	5
고과당 물엿	5
밤향	0.08
바닐라향	0.01
요구르트향	0.01
발효액	100

5) 제조공정도

이상의 검토사항들을 종합하면, 사용할 종균에 따라 다음과 같이 밤 함유 발효제품의 제조과정을 다음과 같은 제조공정 흐름으로 표현 할 수 있다.

이 두 가지 공정에서 분리균주를 위한 공정에는 수입종균을 사용하여도 건의 같은 품질의 제품을 얻었으나 분리균주를 수입종균을 위한 공정에 적용하였을 때는 제품이 더 열악하였다.

가) 수입종균에 의한 제품 생산시

밤증숙-->**초미립자화**-->**냉동** block**화**-->**배합** (밤 8% + 정제수 + 포도당 6% + 과당물엿 7% + 안정제 2.2%)-->**균질화**-->**살균**-->**종균 접종**-->**발효**-->**균질화**-->**용기충진밀전**-->**냉장**

나) 분리균주에 의한 제품생산시

밤증숙-->**초미립자화**-->**냉동** block**화**-->**배합** (밤 8% + 정제수 + 포도당 0.5% + 대두박0.4% + 효모추출액 0.2% + 안정제 2.2%)-->**균질화**-->**살균**-->**종균 배양**(순물 + 포도당 0.2% + 대두박 0.4% + 효모추출물 0.4%)-->**종균 접종**-->**발효**-->**조미액 첨가**(서당5%, 고과당물엿5%, 밤향0.08%, 요구르트향 0.01%, 바닐라 0.08%)-->**균질화**-->**용기충진밀전**-->**냉장**

라. 제조품질관리 기준 설정

1) 제조 품질관리 기준

제조 품질관리(유통 품질 포함)의 기준은 수입종균을 사용하는 경우와 분리균주를 사용하는 경우가 다르며 각각 다음과 같이 같다.

가) 수입종균을 위한 공정 및 관리기준표

표 58. 수입종균을 위한 제조 품질관리 기준표

순서	공정	내용	관리기준
1	밤 증숙	제피, 증숙	무가당, 철분접촉 금지
2	초미립자화	페이스트화	100 미크론 이하
3	냉동block화	냉동 저장	영하 20oC이하 저장
4	배합	원료 혼합	배합온도 65oC, 밤 8%, 포도당 6%, 고과당물엿 7%, 알긴산소다 0.2%, 변성전분 2.0%, 정제수 적량
5	균질화	혼합완성	100kg/㎠, plain head, 75oC
6	살균	배합액살균	85oC이하
7	종균접종	유산균접종	*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* ready-to-use type, Hansen YC-180, 100U/250kg
8	발효	유산균발효	37oC, 19시간, 생균수1.0x109 이상
9	균질화	curd의 파괴	100kg/㎠, plain head
10	충진, 밀봉	용기에 충진	합성수지제 병 용기
11	저장, 유통	냉장 보관	0-6oC, 12-15일내 소비, 생균수 1.0 x 107이상 유지

나) 분리 균을 위한 공정 및 관리기준표

표 59. 분리균을 위한 제조 품질관리 기준표

순서	공정	내용	관리기준
1	밤 증숙	제피, 증숙	무가당, 철분접촉 금지
2	초미립자화	페이스트화	100 미크론 이하
3	냉동block화	냉동 저장	영하 20oC이하 저장
4	배합	원료 혼합	배합온도 65oC, 밤 8%, 포도당 0.5% 대두박 0.4%, 효모추출물 0.2%, 알긴산소다 0.2%, 변성전분 2.0%, 정제수 적량
5	균질화	혼합완성	100kg/cm2, plain head, 75oC
6	살균	배합액살균	120oC
7	종균배양	유산균배양	순물, 포도당 0.2%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.4%, 37℃, 15시간
8	종균접종	유산균접종	*Lactobacillus* PAP1+MGG2, 각2%
9	발효	유산균발효	37oC, 19시간, 생균수1.0x109 이상
10	혼합	조미액첨가	서당5%, 고과당물엿5%, 밤향0.08% 요구르트향 0.01%, 바닐라 0.08%
11	균질화	curd의 파괴	100kg/cm2, plain head
12	충진, 밀봉	용기에 충진	합성수지제 병 용기
13	저장, 유통	냉장 보관	0-6oC, 12-15일내 소비, 생균수 1.0x 107이상 유지

2) 제품의 품질 규격기준

본 연구에서 축적된 실험결과 들의 분산도를 검토하여 최종 종합한 제품의 규격기준은 표 60과 같다.

표 60. 제품의 규격기준

품질	규격1	규격2
제품의 산도	2.0%(유산기준)	3.0%
제품의 pH 범위	3.85 4.60	3.4-4.0
제품의 당도	15oBrix 이상	좌동
생균수	1.0x109CFU/ml 이상	좌동

규격1: Hansen YC-180 사용시

규격2: *Lactobacillus* PAP1 + *Lactobacillus* MGG2 사용시

마. 유통품질관리 기준 설정(생균수와 맛의 유지기간 설정)

유통 중의 생균수는 식품위생법의 규격기준을 충족시켜야 하므로 매우 중요하고, 맛의 변화도 없어야 한다. 유통 중의 품질 변화는 저장온도와 저장기간에 의존하게 되는데 저장온도는 판매점의 고정 쇼케이스에 의해 결정되어 조정이 불가능하다. 따라서 품질관리를 위해서는 유통기간을 설정하는 일이 중요하므로 적정한 유통기간을 설정하기 위하여 냉장 show case에 보관하면서 생균수의 변화와 함께 맛의 변화 여부를 관찰하였다. 그 결과는 표 61과 같았다. 생균수는 12일째 검체에서 약간의 감소가 있었고, 맛이 열화되었다고 진술한 관능검사 요원이 발생하였다.

결론적으로 밤을 이용한 발효음료는 출시 후 5℃이하에서 보관하여야 하며, 가능한 한 12-15일 이내에 소비할 수 있도록 유통관리가 이루어지도록

관리하여야 된다고 사료된다. 이러한 유통 품질 관리 기준은 표15에 정리 포함되었다.

본 연구에서 분리한 균주에 의한 제품도 유사한 저장성을 가져 동일한 유통관리 기준을 적용할 수 있었다.

표 61. 냉장 보관중의 생균수 변화.

저장기간(일)	생균수	맛
0	9.16	G
3	9.18	G
6	8.91	G
9	8.34	G
12	7.93	B
15	7.84	B

G: Good, B: Bad(12일과 15일 저장한 제품에 대하여
각각 관능검사요원 5명중 1명씩 지적)

제4절 요약

1. 밤 원료형태의 선정

깐밤, 증숙밤, 가당 증숙밤, 냉동 paste block의 4가지 밤의 원료들을 획득의 용이성, 저장기간의 장기성, 사용의 편의성, 저비용성 등의 4개 항목에 준하여 각각의 성적을 평가한 결과 냉동 paste block이 기술성과 경제성에서 가장 우수한 이용 원료 형태로 나타났고, 다음이 가당 증숙밤, 깐밤, 증숙밤의 순이었다.

2. 밤 품종별(은기, 옥광), 산지별(공주, 산청) 구성성분 조성

산청산 은기, 공주산 은기, 그리고 산청산 이평과 공주산 이평의 구성성분 함량과 색도를 비교 분석한 결과 지역간 품종간 성분함량의 차이가 거의 없었으나 색도는 a와 b Value에서 은기와 이평품종 간에 약간의 차이가 있었다.

또한, 우리나라 밤의 양대 집산지인 진주 농협과 공주 농협을 위시한 강원도 홍천등지의 현지 농협과 군청 등을 통하여 산지별 차이와 품종별 차이에 대한 현재의 우리나라 밤의 수매 집하와 이용에 관한 실태 내용을 문의 조사한 결과, 밤의 수매시 품종별로 구분하지 않고 혼합하여 수매하고 있어, 산지별 또는 품종별 구분은 의미가 있다해도 실제 사용 단계에서 전혀 이를 구별할 조건이 아니었다.

3. 제품의 포장, 형태의 선정

액상과 호상의 두 가지 형태 중, 우리 나라 시장에서는 액상 발효식품의 선호도가 2.8배 이상 높고, 호상 타입은 이스트의 오염 등으로 인한 미생물 사고 등이 빈번하게 일어나고 있고, 품질이 일정하지 못한 문제점이 있는 것으로 조사되어 액상 발효식품 형태로 정하였다.

4. 발효제품의 구성성분의 조성과 함유율

가. 1차 시안에 의한 문제점 도출

원료는 냉동 plaste block의 미립도를 150mesh로 하고, 탄소원으로 포도당 5%, lactose를 2% 첨가하며, 균주는 Lactobacillus + Bifidobacterium의 2 : 1 혼합균주를 사용하고 맛은 사과과즙 첨가로 조정하는 것을 근간으로 하며 가공 온도를 90℃ 125℃로하여 20 25분간 처리함을 기준으로 하여 시행한 결과 미립도와 가공온도 및 시간이 발효제품의 맛과 성상에 큰

영향을 준다는 사실을 알 수 있었다. 밤 맛의 bottom note는 좋으나 top note가 매우 약하며, body감 역시 미약하게 느껴졌고, 고형분의 침전현상이 있었으며, 발효시간이 장시간이 소요되는 등의 문제점이 인정되었다.

나. 최적 구성성분의 결정

1)밤 함량의 설정

가) 선호도 조사

밤 함량에 대한 선호도를 관능검사에 의하여 조사한 결과 10% 함유 시료와 15% 함유 시료가 5% 함유 시료에 대하여 유의적으로 더 선호되었다.

나) 침전도 조사

밤의 함유량이 높으면 고형분의 침전 현상이 더욱 심하여 침전현상에 있어서는 밤의 함량은 5-10%가 타당한 것으로 판단되었고 미생물 분야 연구를 참고하여 최종 8%를 선정하였다.

2) 당류의 선택

당류는 산 생성 면에서 포도당이 가장 우수하였으며 고과당, 설탕의 순이었다. 그리고 종균의 접종량은 100과 50U/250kg 사이에서 큰 차이가 없었다. 그러나 포도당이 가장 효과적으로 이용되고 있는 점과 함께 가격, 그리고 감미의 느낌 특성을 함께 고려할 때, 포도당과 고과당 물엿의 혼합 사용이 바람직 한 것으로 판단되었다. 사용 종균량은 생균수 확보를 위하여 100U/250kg의 역가로 사용하기로 하였다.

3) 감미료의 구성결정

포도당과 고과당 물엿의 혼합 사용시 최적 혼합비율을 결정하기 위하여 세 가지의 조합 6:7, 3:9, 9:5로 구성하고 이에 대한 선호도를 조사하였을 때 6:7의 배합이 가장 좋았고 9:5조합이 가장 나빴지만, 통계적 처리결과 세 시료간에는 유의적인 차이는 없었다.

4) 식물 및 버섯 추출물의 첨가

솔잎, 참숯, 쑥 및 뽕잎의 4가지 식물과 영지와 동충하초의 두가지 버섯 추출물을 각각 첨가하고 관능검사를 한 결과, 모든 추출물은 첨가하지 않은 제품에 비하여 선호도가 낮았다. 순위별로 보면 미첨가, 참숯,동충하초, 솔잎,영지, 뽕잎, 쑥 첨가의 순 이었다. 그러나 밤 고유의 맛을 변화시키는 쑥을 제외한 여타의 추출액들은 건강 기능성 부여의 목적으로 첨가하는 것도 좋을 것으로 판단되었다.

5) 음용감(body 감)의 설정

점도를 증가시켜 음용감을 향상시키고 동시에 침전현상을 개선하기 위하여, 안정제로 알긴산소다와 변성전분을 각각 0.2%와 2.0%로 단독 첨가하거나 혼합하여 2.2%로 첨가하한 결과 점도는 알긴산소다와 변성전분을 각각 단독으로 첨가한 경우가 74, 81인데 비하여 이들을 혼합하여 첨가한 경우는 104로 점도가 더욱 증가하였고, 침전은 각각을 단독으로 사용한 경우 보다 훨씬 적었으며, body감에서도 더욱 우수하여 이들을 혼합 사용하는 것이 좋은 것으로 나타났다.

다. 제품 제조공정 설정

1) 밤 고형분의 침전방지

안정제의 첨가에도 불구하고 발생되는 밤 고형분의 침전 현상의 방지를 위한 초미세화 가공공정을 검토한 결과 50 미크론 이하로 초미립자화 시키면 침전현상이 방지되는 것으로 나타났지만 작업의 난이도를 고려하여, 100 미크론 정도로 가공하는 것이 현실적일 것으로 예측되었다.

2) 이취발생의 예방을 위한 살균온도 설정

열에 의해 밤 식품의 이취(異臭) 발생과 밤 특유의 향기가 소실되는 것을 개선하기 위하여, 살균온도의 영향을 살핀 결과 105℃ 이상의 살균은 이취가 매우 컸으며 75℃ 이하에서는 거의 발생하지 않았으나 작업시간을 고려

하여 85℃로 시행함이 바람직 한 것으로 판단되었다.

3) 생균수를 고려한 발효시간의 설정

가) 식품 위생법 상의 규격기준

발효유제품은 유통과정에서 보관온도의 관리 오류와 기간관리 소홀 등의 현실적 조건을 고려하여 가급적 생균수를 늘려 제조하여 생균수를 10.0(logCFU/ml) 이상으로 하지만 그러나 본 밤을 이용한 발효제품에서는 달성할 수 없어 9.0 이상으로 정하였다.

나) 수입종균에 의한 발효시간의 설정

9.0 이상의 생균수 확보에는 지금까지 확보한 실험조건에서 발효하였을 때 19시간의 배양을 요하였다.

4) 분리균주의 이용을 위한 공정

본 연구의 미생물 연구에서 제시한 균주 *Lactobacillus* MGG1과 *Lactobacillus* PAP1을 이용하고자 할 때 종균 배양배지는 순물에 포도당 0.2%, 대두박과 효모추출물은 각각 0.4%씩 가하여 제조하고, 37℃에서 15시간 배양으로 9.0(logCFU/ml) 이상의 생균수를 얻을 수있었다. 배양배지 구성성분비는 밤 8, 대두박 0.4, 효모추출물 0.2, 포도당 0.5, 알긴산소다 0.2, 변성전분 2.0, 정제수 100이었고 발효조건은 37℃에서 19시간이었으며 이 조건에서 9.0 이상의 생균수가 확보되었다.

위의 발효액은 맛과 저장성을 개선하기 위한 조미액의 첨가를 요구하였고, 조미액의 구성비는 포도당 5, 고과당 물엿 5, 밤향 0.08, 바닐라향 0.01, 요구르트향 0.01, 발효액 100이었다. 이와 같이 제조한 제품은 맛이 본래의 밤에 유사하면서도 안정적인 맛을 지녔으며, 안정된 맛으로 인하여 살균공정에 의하여 발생하는 미약한 이취도 해소시키는 장점을 가지고 있었다.

5) 제조공정도

가) 수입종균에 의한 제품 생산시

[**밤증숙**-->**초미립자화**-->**냉동** block**화**-->**배합** (밤 8% + 정제수 + 포도당 6% + 고과당물엿 7% + 안정제 2.2%)-->**균질화**-->**살균**-->**종균 접종**-->**발효**-->**균질화**-->**용기충진밀전**-->**냉장**]

나) 분리균주에 의한 제품생산시

[**밤증숙**-->**초미립자화**-->**냉동** block**화**-->**배합** (밤 8% + 정제수 + 포도당 0.5% + 대두박0.4% + 효모추출액 0.2% + 안정제 2.2%)-->**균질화**-->**살균**-->**종균 배양**(순물 + 포도당 0.2% + 대두박 0.4% + 효모추출물 0.4%)-->**종균접종**-->**발효**-->**조미액 첨가**(서당5%, 고과당물엿5%, 밤향0.08%, 요구르트향 0.01%, 바닐라 0.01%)-->**균질화**-->**용기충진밀전**-->**냉장**]

라. 제조 품질 관리 기준 설정

지금까지의 연구결과를 종합하여 분리균주와 산업균주를 위한 제조관리 기준과 품질 규격을 각각 제시하였다.

마. 유통품질관리 기준 설정(생균수와 맛의 유지기간 설정)

제품을 냉장 show case에 보관하면서 생균수와 맛의 변화 여부를 관찰한 결과 생균수는 12일째 검체에서 약간의 감소가 있었고, 맛이 열화되었다고 진술한 관능검사 요원도 발생하였다.

결론적으로 밤을 이용한 발효음료는 출시 후 5℃이하에서 보관하여야 하며, 가능한 한 12-15일 이내에 소비할 수 있도록 유통관리가 이루어져야 한다.

제4장 결 론

1. 밤을 원료로 하여 마시는 형태의 발효음료를 개발하였다.
2. 밤을 이용하여 발효 음료를 개발하는 데는 가열에 의한 이취문제와 밤용액의 고형분에 의한 침전물의 생성 등이 주요 문제였다. 이 문제는 살균온도를 낮추고 발효액에 조미액으로 가하여 맛을 조정하고, 밤고형분의 입자를 100 미크론 이내로 감소시킴으로써 해소될 수 있었다.
3. 밤 용액에 좋은 발효 적성을 가지는 균주 *Lactobacillus* PAP1과 *Lactobacillus* MGG2를 분리하였으며, 동시에 우수한 상업용 종균 Hansen YC-180(*S. thermiphilus*와 *L. bulgaricus*의 혼합)을 대안으로 제시하였다.
4. 이들을 이용하여 밤용액을 발효하여 최대의 생균수를 확보하기 위한 최적의 발효조건을 찾아 제시하였다.
5. 분리균주를 배양하여 종균배양액을 제조하는데 이용할 저가의 배지를 개발하였다.
6. 분리균주를 이용하여 밤을 이용한 발효제품을 제조하기 위한 제반 공정을 구성하여 제시하였다.
7. 상업용 균주를 이용하여 발효제품 을 만들기 위한 제반 공정을 구성하여 제시하였다.
8. 분리균주와 상업용균주를 이용하여 제품을 만들 때 이용할 수 있는 제조품질 관리 기준과 규격기준을 각각 제시하였다.
9. 분리균주와 상업용균주를 이용하여 만든 제품을 안전하게 유통시키는데 필요한 유통 품질 관리기준을 제시하였다.
10. 위의 결론에 관한 세부 내용을 종합한 내용을 종합하면 다음과 같이

요약된다.

표 62. 연구개발 내용의 요약표

순서	공정	내용	관리기준	비고
1	밤 증숙	제피, 증숙	무가당, 철분접촉 금지	공통
2	초미립자화	페이스트화	100 미크론 이하	공통
3	냉동block화	냉동 저장	영하 20oC이하 저장	공통
4	배합	원료 혼합	1. 상업용 종균시: 배합온도 65oC, 밤 8%, 포도당 6%, 고과당 물엿 7% 알긴산소다 0.2%, 변성전분 2.0%, 정제수 적량 2. 분리 종균시: 배합온도 65oC, 밤 8%, 포도당 0.5%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.2%, 알긴산소다 0.2%, 변성전분 2.0%, 정제 수 적량	구분
5	균질화	혼합완성	100kg/cm2, plain head, 75oC	공통
6	살균	배합액살균	1. 상업균주시: 85oC 이하 2. 분리종균시: 120oC	구분

(다음 쪽에 계속)

(표 61의 계속)

7	종균배양	유산균배양	순물, 포도당 0.2%, 대두박 0.4%, 효모추출물 0.4% 37℃, 18시간	분리
8	종균접종	유산균접종	1. *S. thermophilus* + *L. bulgaricus* (Hansen YC-180) 100U/250kg 접종 2. 분리균주시: *Lactobacillus* PAP1+MGG2, 배양액 각각 2%	구분
9	발효	유산균발효	37℃, 19시간, 생균수1.0x109 이상	공통
10	혼합	조미액첨가	서당5%, 고과당물엿5%, 밤향0.08%,바닐라 0.08% 요구르트향 0.01%,	분리
11	균질화	curd의 파괴	100kg/㎠, plain head	공통
12	충진, 밀봉	용기에 충진	합성수지제 병 용기	공통
13	저장, 유통	냉장 보관	0-6℃, 12-15일내 소비, 생균수 1.0x 10⁷이상 유지	공통

공통: 분리균과 수입종균에 공통으로 적용,
분리: 분리균에만 적용
구분: 분리균과 수입종균에 구분하여 각각 적용

참고문헌

강성옥.조경덕.임왕진.조홍연.양한철. 1993. 두부공업폐수를 이용한 광합성 세균 *Rhodospirillum rubrum* P17의 균체생산. 한국산업미생물학회지, 21:622-627.

고영태. 1989. 미생물 protease 또는 papain으로 처리된 두유에서 젖산균의 산생성과 대두요구르트의 제조. 한국식품과학회지. 21:379-386.

김경희, 방일령, 고영태. 1989. 두유의 단백질분해효소 처리가 젖산균의 산생성 및 대두요구르트의 품질에 미치는 영향. 한국식품과학회지. 21:92-99.

김기현, 여익현, 구영조, 유진영. 1989. 야채 발효음료 제조방법. 특허공보 제1653호.

동의보감. 1985. 허준저. 김의건역. 대성출판사

박소영, 고영태, 이주연, 목철균, 박종현, 지근억. 1997. Bifidobacterium에 의한 당근발효. 식품과학회지. 29:571-575.

박종현, 송혜경, 안준배, 지근억, 목철균. 1997. 한국인 유래의 amylolytic Bifidobacterium에 의한 쌀발효. 한국식품과학회지. 29:581-587.

보건복지부 식품의약품안전본부. 1996. 한국식품성분표. 도서출판 특수교육 pp76-78.

산림청자료. 1998. 밤박피 기계개발에 관한 연구. 연구기관 한국식품개발연구원

식품공전, 1998, 1999, 한국식품공업협회.

신용서, 성현주, 김동환, 이갑상. 1994. 감자를 이용한 요구르트의 제조와 특성. 한국식품과학회지. 26:266-271.

유주현, 유인덕, 진효상. 1989. *Lactobacillus acidophilus* 와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 두유의 발효중 당 이용에 미치는 상호작용, 한국산업미생물학회지, 17(6),533-538.

이영춘 1982 식품공업의 품질관리, 학연사, pp91-92

H제과 1983 식품공업품질관리 직능대학원 R&D과정 교재

FAO. 1993-1995. Production Yearbook. 농림수산통계연보. 농림수산부.

진효상. 1991. *Lactobacillus helveticus*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양, 전주대학교 자연과학연구소 논문집, 제3권 2호, 45-51.

진효상.1991. *Lactobacillus casei*와 *Saccharomyces uvarum*의 혼합배양에 의한 두유의 젖산발효, 전주대학교 자연과학연구소 논문집, 제4권 1호, 77-83.

한국공업규격 1983 KSA7001

한명주, 배은아, 이영경, 김동현. 1996. 버섯의 장내유산균 증식 효과. 한국식품과학회지.28:947-952.

Arbuckle, W. S. 1977 Ice Cream, AVI Publishing Co. Ltd., p. 39

Balow A, Hausler WJ, Herrmann KL, Isenberg HD, and Shadomy HJ. 1991. Manual of clinical microbiology, 5th edition.American society for microbiology. p525.

Black FT, Anderson PL, Arskov F, Gaarslev K, and Laulund S. 1989. Prophylactic efficacy of lactobacilli on travellers diarrhoea. Travel Medicine 5:333-335.

Chevalier P, Roy D and Ward P. 1990. Detection of Bifidobacterium species by enzymatic methods. J. Appl. Bacteriol. 68:619-624.

C. M. E. Catsberg and G. J. M. Kempen-van Domelen, 1990, Food Handbook, p312

Conway PL and A Henriksson. 1994. Strategies for the isolation and characterization of functional probiotics. p79. in Human Health: The Contribution of Microorganisms. ed. by SAW Gibson. Springer-Verlag London.

Corring T, Juste C and Simoes-Nunes C. 1981. Digestive enzymes in the germ-free animal. Reprod Nutr Dev 21: 355-370.

Eyssen H and Verhulst A. 1984. Biotransformation of linoleic acid and bile acids by *Eubacterium lentum*. Appl Environ Microbiol 47: 39-43.

Floch MH and Moussa K. 1998. Probiotics and dietary fiber: the clinical coming of age of intestinal microecology [editorial] [see comments]. J Clin Gastroenterol, 27:99-100.

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals(A Review). J Appl Bacteriol 66: 365-378.

Gordon HA and Pesti L. 1971. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. Bacteriol Rev 35: 390-429.

Hoverstad T, Fausa O, Bjorneklett A & Bohmer T. 1984. Short-chain fatty acids in the normal human feces.Scand. J. Gastroenterol. 19:375-381.

Hyo-Sang Jin. 1994 Utilization of Soybean Curd Waste Broth for the Production of probiotics. *Kor.J.Environ.Biol.*, Vol.12: 59-64

Macfarlane GT and Gibson GR. 1994. Metabolic activities of the normal colonic flora.in: Gibson SAW (eds) Human Health: the contribution of microorganisms. Springer-Verlag, London, New York, Hong Kong, pp17-52.

Mitsuoka T, A Color Atlas of Anaerobic Bacteria. Sobunsha. Tokyo. Japan, 1980.

Mok C, Han J, Kim YJ, N Kim, Kim DY, and Nam YJ. 1991. Risogurt, a mixture of lactic acid fermented rice and soybean protein: Development and properties. Kor. J. Food. Sci. Technol. 23:745-749.

MT Madigan, JM Martinko, and J Parker. 1997. Lactic acid bacteria. Brock Biology of Microbiology. Prentice Hall. pp718-722.

OksanenPJ, Salminen S, Saxelin M, and Hemeleinen P. 1990. Prevention of travellers diarrhoea by Lactobacillus GG. Ann. Med. 22: 58-63.

Rasic JL and Kurmann JA 1983. Nutritive and health values of dairy foods containing bifidobacteria. in Bifodobacteria and their role. Birkhauser Verlag.

Rolfe RD. 1984. Role of volatile acids in colonization resistance to *Clostridium difficile*. Infect Immun 45: 185-191.

Savage DC. 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. Ann Rev Miocrobiol 31: 107-133.

Tannock GW. 1984. Control of gastrointestinal pathogens by normal microflora. in: Klug MJ, Reddy CA (eds) Current Perspectives in Microbial Ecology. American Society for Microbiology, Washington, DC pp374-382, .

Tanock GW. 1981. Microbial interference in the gastrointestinal tract. ASEAN J Clin Sci 2: 2-34.

Tominaga M. and K. Sato.1996. Lactic fermentation of saccharified solution from rice flour. J. Food Sci. 61: 627-631.

Wostmann BS. 1981. The germfree animal in nutritional studies. Ann Rev Nutr

1: 257-279.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서 입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.