한국축산식품학회지
Korean J. Food Sci. Ani. Resour.
Vol. 28, No. 5, pp. 596~603(2008)

모유 섭취 신생아 유래 *Lactobacillus acidophilus*에 의한 발효유 내 풍미형성

박정규 · 송원호 · 홍성문 · 김철현*
단국대학교 동물자원학과

Production of Flavor Compounds in Fermented Milk by *Lactobacillus acidophilus* Isolated from Breast-Fed Infants

Jeong-Gyu Park, Won-Ho Song, Sung-Moon Hong, and Cherl-Hyun Kim*
Department of Animal Resource & Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea

Abstract

Lactobacillus acidophilus is a normal inhabitant of the human intestine and its numerous health benefits have been reported. This organism is referred to as a "starter culture". This study was conducted to verify that the production of flavor compounds in fermented milk was obtained using a good probiotic strain of *L. acidophilus* from breast-fed infant feces. The bitter-tasting amino acids, such as arginine and histidine were produced in larger amounts than other free amino acids when *L. acidophilus* strains were inoculated in skim milk. The lactic acid was the major acid produced from glucose. *L. acidophilus* NB 209 was the best producer of lactic acid. This *L. acidophilus* NB 209 produced higher amounts of acetaldehyde than other *L. acidophilus* strains. *L. acidophilus* NB 209 gave higher flavor and taste score of the yogurt produced than other *L. acidophilus* strains in sensory evaluation. These results indicate that *L. acidophilus* NB 209 has the potential to be developed as a starter culture for fermented milk products.

Key words : probiotics, *Lactobacillus acidophilus*, organic acids, carbonyl compounds

서 론

*Lactobacillus acidophilus*는 조건적 혐기성 간균이며 인간과 동물의 장에 존재하는 토착 우점 균종(Tannock, 1995)으로 소화관내의 낮은 pH, 담즙산 및 lysozyme에 대한 저항성이 있고 장관 상피세포에 흡착할 수 있는 성질 등이 있어서 소화기관내에서 생존력과 정착성이 우수하며 특히 회장 말단 부위에서의 생장력이 높은 것으로 보고되고 있다(Conway *et al.*, 1987 Libeck *et al.*, 1987; Hood and Zottola, 1988). 또한 여러 연구자들에 의해 *L. acidophilus*에 의한 장내 균총 안정화, 콜레스테롤 저하, 유해세균 증식 억제 등과 같은 생리적 기능들에 대한 연구가 이루어져 왔으며(Gilliland, 1989; Takiguchi *et al.*, 1997), 이로 인해 *L. acidophilus*는 각종 건강기능식품, 발효유 및 동물약품 등에 probiotics로 다양하게 사용되고 있다. 그중 인체에 유익한 probiotics의 가장 효과적인 섭취방법은 이러한 유용균들이 풍부하게 함유된 각종 발효유의 상식이라고 할 수 있으며, 따라서 *L. acidophilus* 및 *Bifidobacterium*과 같이 인체 유용성이 확인된 probiotics가 starter culture와 더불어 상업적 발효유의 생산에 사용되는 경향이 매우 높아지고 있다(Salminen *et al.*, 1996; Lourens-Hattingh and Viljoen, 2001).

이와 같은 추세에 따라 상업적 발효유 제조 시 사용되는 probiotics의 안전성, 기능성뿐만 아니라 우유에서의 생장 및 관능적 특성과 같은 기술적 특성이 함께 고려되어야 하며, 그 중 발효유의 적절한 섭취를 유도하기 위해선 첨가되는 probiotics에 의한 발효유의 맛(taste), 향미(aroma) 및 조직감(texture) 등과 같은 관능적인 특성이 발효유 적용 시 적합하여야 한다(Holzapfel and Schillinger, 2002). 발효유의 관능적 특성은 주로 유기산, 휘발성 향미성분, 아미노산 및 지방산 등에 의해 좌우되며 그 중 발효과정 중 젖산균에 의해 생성되는 유기산과 휘발성 향미성분이 가장 중요한 영향을 미치게 된다(Beshkova *et al.*, 1998). 또한 발효유의 품질저하의 한 가지 요인으로 인식되고 있는 후산생성(post-acidification) 현상은 주로 *L. acidophilus*와 *B. bifidum*의 유통과정 중 증식에 의해 형성되는 lactic

*Corresponding author : Cherl-Hyun Kim, Department of Animal Resource & Science, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea. Tel: 82-41-550-3656, Fax: 82-41-551-3656, E-mail: hichkim@dankook.ac.kr

acid와 acetic acid 때문으로 이러한 probiotic 균주들이 발효유의 향미에 많은 영향을 미지는 것으로 알려져 있다(Ishibashi and Shimamura, 1993). Marshall과 Cole(1983)은 *L. acidophilus*가 acetaldehyde를 환원하여 ethanol을 생성하는 alcohol dehydrogenase를 가지고 있어 *L. acidophilus*를 이용한 발효유 제조 시 주요 풍미 성분인 acetaldehyde의 함량이 부족하여 발효유 고유의 향미에 결함이 생긴다고 하였다.

따라서 이 연구에서는 모유를 섭취하고 있는 생후 7일 이내의 신생아로부터 분리 및 선발된 *L. acidophilus*를 이용하여 제조된 발효유의 풍미성분의 확인을 통해 상업적 발효유제조 시 사용가능성을 탐색하고자 실시하였다.

재료 및 방법

사용 젖산균 및 발효액 제조

모유를 섭취하고 있는 생후 7일 이내의 신생아로부터 분리하여 *L. acidophilus*로 동정된 젖산균주 중 내산성, 담즙산 내성, 유단백질 분해활력, β-galactosidase 활성 및 동결건조 후 장기 저장 안정성 시험을 통해 선발된 9종의 *L. acidophilus*(NB 201-209)를 8% 탈지유(w/w)에 각각 1% 접종(w/w)하여 37°C에서 24시간 배양한 후 각각의 성분들을 측정하였다.

유리 아미노산

유리아미노산의 전처리는 Liu(1994)의 AQC-precolumn derivatization방법으로 실시하였으며, HPLC(Alliance M2690XE, Waters, Co., USA) 조건은 Table 1에 나타난 바와 같다. 표준시료용액은 아미노산표준용액(Pierce Co., USA) 40 μL를 취하여 3차 증류수 960 μL을 첨가하여 사용하였으며, 내부표준용액(internal standard)은 aaa-amino-butyric acid(Sigma, USA)를 0.1 M HCl에 2.5 mM의 농도로 첨가하여 조제하였다. 시료의 유도체화는 6-aminoquinolyl-N-hydroxy succinimidyl carbamate(AQC), 0.2 M borate buffer 및 DNA-grade acetonitrile로 구성된 유도체화시약 kit(Millipore Ltd., USA)을 사용하였으며, 유도체 시약인 AQC는 acetonitrile 1을 첨가한 후 55°C에서 10분간 가열하며 용해하여 사용하였다.

표준용액의 유도체화는 내부표준용액 40 μL와 아미노산 표준용액 40 μL에 물 920 μL를 첨가한 용액을 10 μL 취하여 0.2 M borate buffer 70 μL를 첨가한 후 수초간 잘 혼합하고 여기에 AQC용액 20 μL를 첨가한 후 실온에서 1분간 방치하고, 55°C에서 10분간 가열하여 유도체화 한 후 표준용액으로 하였으며, 시료의 전처리는 배양액 5 g에 증류수 5 mL를 첨가한 후 혼합액에 1 g의 sulphosalicylic acid(Sigma)를 첨가하고 4°C에서 1시간 방치한 후 4,350×g로 15분간 원심분리하고 그 상징액을 0.2 μm membrane필터(Gelman Sci., USA)로 여과한 후 유리아미노산 전처리 시료로 하여 표준용액과 동일한 방법으로 유도체화하였다.

Table 1. Instrument and operating conditions of HPLC for the analysis of free amino acids

Instrument	Alliance M2690XE system (Waters, USA)			
Detector	Fluorscence (5 μL cell vol.), Ex: 250 nm, Em: 390 nm			
Column	AQC-TagC_{18}, 3.9×150 mm (Waters)			
Mobile phase	A: AQC-Tag eluent concentrate A, 100 mL: water, 900 mL (v/v) B: 60% acetonitrile (v/v)			
Oven temp.	37°C			
Flow rate	1 mL/min			
Injection vol.	5 μL			
	Time (min)	Flow rate	Gradient (%)	
			A	B
Gradient table	Initial	1.0	100.0	0.0
	0.50	1.0	98.0	2.0
	15.00	1.0	93.0	7.0
	19.00	1.0	90.0	10.0
	32.00	1.0	67.0	33.0
	33.00	1.0	67.0	33.0
	34.00	1.0	0.0	100.0
	37.00	1.0	0.0	100.0
	38.00	1.0	100.0	0.0
	40.00	1.0	100.0	0.0

유기산

발효액내 유기산은 Laye 등(1993)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 측정하였다. 발효 과정 중 각 시간대별 배양액 5 g을 취하여 여기에 0.0085N H_2SO_4(Matsunoen Chem. Ltd., Japan) 25 mL를 첨가한 후 실온에서 2시간 방치하고, 4,350×g로 10분간 원심분리한 후 얻어진 상징액을 0.2 μm membrane필터로 여과하여 분석 시료로 사용하였다. 유기산 분석은 HPLC(LC6A, Shimazu Co., Japan)를 이용하였으며 분석 조건은 Table 2에 나타난 바와 같고 사용된 유기산 표준용액은 HPLC 등급의 lactic acid(Showa Chem. Inc., Japan), citric acid(Junsei, Japan), acetic acid, butyric acid 및 formic acid(Sigma)로 각각 시료의 전처리 방법과 동일하게 제조하여 실험에 사용하였다.

휘발성 향미성분

발효액의 휘발성 향미성분은 Bassette과 Ward(1975)의 방법을 일부 수정하여 다음과 같이 분석하였다. 배양액 50 g을 kemmerer-hallet type micro-kjeldahl distillation unit의 증류 플라스크에 넣고 내부표준용액으로 ethyl acetate(Showa, Japan) 5 ppm을 첨가한 후, 증류시켜 증류액 5 mL를 수집하고 이중 2 mL를 20 mL의 space vial에

Table 2. Instrument and operating conditions of HPLC for the analysis of organic acids

Instrument	SPD-6AV (Shimazu, Japan)
Detector	UV/Visible detector
Column	Aminex HPX-87H (Bio-Rad, USA)
Mobile phase	0.0085 N H_2SO_4
Flow rate	0.6 mL/min
Wavelength	210 nm
Oven temp.	65°C
Injection vol.	20 μL

취한 후 여기에 Na_2SO_4 anhydrous(Showa, Japan) 0.5 g을 첨가한 후 teflon 마개로 막고 60°C 수조에서 2분간 정치시킨 후, 5분간 교반하고 다시 8분간 정치시킨 후 headspace 1mL를 취하여 GC(Agilent 6890N, Agilent Technologies Co., USA)로 분석하였으며, 분석 조건은 Table 3에 나타난 바와 같다. 정량분석 한 성분은 발효유의 주요 휘발성 향미성분인 acetaldehyde, acetone, ethanol 및 diacetyl (Sigma, USA)이었다.

시험 발효유 제조와 관능검사

선발된 *L. acidophilus*를 이용하여 제조된 발효유의 관능적 특성을 확인하기 위해 Culture system사(USA)에 의뢰하여 약 10^9 CFU/g로 균수가 조정되어 제조된 각각의 분말 시험 균주와 상업적 발효유 제조에 사용 중인 *L. acidophilus* 145(Rhodia Ltd., USA)를 대조구로 하고 *S. thermophilus* TH3(Rhodia Ltd.)에 각각 혼합하여 호상(gel type) 발효유를 다음과 같이 제조하였다. 60°C로 가온한 원유(Seoul Dairy Co-op., Korea) 2,700 g에 탈지분유(Seoul Dairy Co-op.) 159 g과 포도당(Doosan Co., Korea) 60 g을 용해한 후 95°C에서 10분간 살균하고 37°C로 냉각한 후, 선발된 9종의 *L. acidophilus*와 *L. acidophilus* 145를

Table 3. Instrument and operating conditions of GC for the analysis of volatile aroma compounds

Instrument	Agilent 6890N (Agilent Technologies Co., USA)
Detector	FID
Column	Supelcowax-10 fused slilica capillary column (Supelco Inc., USA) (30 m×0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness)
Flow rate	Split ratio: 20:1 Carrier (N_2): 1.2 mL/min Air: 300 mL/min H_2: 30 mL/min Make-up gas (N_2): 28.2 mL/min
Temperature	Injector: 250°C Detector: 250°C Oven: hold at 35°C for 5 min → 15 °C/min to 140°C → hold at 140°C for 30 min
Injection vol.	1 mL

0.002%(w/v)의 수준으로 각각 0.002%(w/v)의 *S. thermophilus* TH3와 혼합하여 접종하고, 적정산도가 0.9%에 도달한 배양 7시간째 급속 냉각과 동시에 커드를 파쇄하며 발효를 중지시킨 후, 적정 관능성을 유지하기 위해 각각의 시료에 과당을 5%(w/w, Doosan Co., Korea) 수준으로 첨가하여 호상 발효유를 제조하고 4°C에서 저장하였다.

제조된 발효유의 관능검사는 잘 훈련된 관능검사 요원 7명이 맛(taste), 향미(aroma) 및 조직감(texture)에 대해 9점 척도법을 사용하여 관능적 특성을 2개 시험군으로 나누어 3회 평가하였으며, 결과는 SAS(1996) program을 이용하여 Duncan's multiple range test로 평균 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

시험균주에 의한 유리 아미노산 생성

선발된 *L. acidophilus*를 8% 탈지유에 배양하여 생성되는 유리아미노산을 측정하였으며 결과는 Table 4 및 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 모든 처리구에 있어 arginine의 함량이 가장 높게 나타났으며 histidine의 함량도 비교적 높아 전반적으로 쓴맛에 연관된 유리아미노산의 생성량이 높게 나타났다. 총 쓴맛 아미노산은 *L. acidophilus* NB 208의 생성량이 가장 높았으며 *L. acidophilus* NB 209가 가장 낮았다. Aspartic acid, histidine, arginine, threonine, valine, isoleucine 및 leucine 등이 함유된 펩타이드내의 쓴맛 아미노산이 구성비율에 따라 발효유의 맛에 좋지 않은 영향을 준다고 알려져 있으나(Fox, 1983), 이 실험에서는 단독 균주로서 *L. acidophilus*를 사용하였기 때문에 상업적 발효유 제조 시 주로 사용되는 혼합 젖산균주들간의 아미노산 대사가 이루어질 경우 쓴맛 아미노산의 함량은 좀 더 감소하리라 생각된다(Lew and Yu, 1987). Kim 등(1999)은 *L. acidophilus*가 포함된 혼합균주로 발효유를 제조한 결과 이들에 의한 아미노산 대사과정에서 각 아미노산의 이용성이 단독 균주로 제조한 발효유에 비해 더욱 향상되었다고 하였으며, Park 등(1986)은 서로 다른 젖산균을 혼합 배양하였을 경우 균주들간 아미노산 생성능이 다르기 때문에 서로 상호 보완 작용을 하여 아미노산의 이용성이 높아짐에 따라 산생성과 젖산균의 생육이 촉진된다고 하였다. 또한 Shankar(1977)는 *Lactobacillus*의 막표면에 결합된 protease에 의해 단백질이 분해되어 생성된 threonine 또는 methionine 함유 펩타이드들이 방출된 후 *S. thermophilus*의 peptidase와 aldolase의 작용으로 acetaldehyde가 생성된다고 하였는데, 실험 결과 발효유의 주요 풍미인 acetaldehyde의 형성에 관여하는 threonine과 methionine의 경우 *L. acidophilus* NB 202와 *L. acidophilus* NB 208 및 NB 209에서 높게 생성되었다.

Table 4. Free amino acids concentration in 8% skim milk fermented with *L. acidophilus* isolate at 37°C for 24 hr

(Unit: nmol/mL)

FAAs[1)]	Strains of *L. acidophilus*[2)]								
	NB 201	NB 202	NB 203	NB 204	NB 205	NB 206	NB 207	NB 208	NB 209
Asp.	1.17±0.12	6.60±0.32	1.69±0.24	0.67±0.06	1.05±0.15	0.94±0.06	0.99±0.17	9.07±1.64	1.11±0.05
Ser.	1.25±0.07	4.17±0.66	2.75±0.37	2.01±0.25	0.97±0.22	1.81±0.10	1.21±0.07	4.44±0.48	2.82±0.24
Glu.	2.58±0.36	9.04±2.18	4.91±1.37	5.79±0.96	2.81±0.15	4.77±0.41	4.67±0.54	12.90±2.07	6.25±0.67
Gly.	0.62±0.03	2.54±0.51	0.28±0.02	0.35±0.02	0.41±0.04	0.35±0.02	0.33±0.04	2.99±0.15	0.29±0.03
His.	4.05±0.21	1.68±0.15	2.37±0.17	2.61±0.24	3.65±0.56	3.09±0.31	3.24±0.12	1.79±0.20	3.18±0.36
Arg.	22.17±3.84	17.48±4.16	20.04±2.86	20.65±3.78	21.19±4.20	19.81±3.84	19.71±2.77	17.98±3.16	19.60±3.67
Thr.	0.49±0.04	3.08±1.12	0.58±0.06	0.57±0.05	0.46±0.07	0.62±0.28	0.49±0.11	3.03±0.67	3.52±0.26
Ala.	2.52±0.18	4.86±0.25	8.55±1.34	6.77±1.08	2.23±0.15	5.76±1.24	2.11±0.39	6.39±0.55	6.97±1.31
Pro.	2.41±0.15	0.08±0.01	1.57±0.08	1.75±0.17	2.16±0.12	1.76±0.11	2.90±0.12	1.04±0.09	1.56±0.15
Cys	0.80±0.02	1.10±0.07	0.70±0.05	0.71±0.05	0.77±0.09	0.57±0.03	0.70±0.08	0.99±0.04	0.67±0.07
Tyr.	0.25±0.01	0.77±0.10	0.51±0.11	0.31±0.15	0.14±0.03	0.20±0.05	0.22±0.04	0.90±0.08	0.16±0.02
Val.	0.12±0.01	1.22±0.02	0.07±0.01	0.07±0.01	0.10±0.02	0.09±0.01	0.19±0.02	1.64±0.03	1.06±0.03
Met.	0.22±0.02	0.59±0.04	0.33±0.02	0.31±0.01	0.18±0.03	0.23±0.04	0.36±0.02	0.65±0.01	0.46±0.01
Lys.	0.79±0.04	0.93±0.03	1.27±0.06	0.65±0.03	0.38±0.01	0.24±0.05	0.42±0.02	1.50±0.05	0.46±0.03
Ile.	0.32±0.04	0.92±0.05	0.32±0.02	0.32±0.01	0.31±0.02	0.31±0.02	0.35±0.02	1.07±0.04	0.31±0.06
Leu.	0.09±0.01	0.99±0.08	0.11±0.01	0.11±0.01	0.79±0.04	0.05±0.01	0.12±0.01	1.20±0.02	0.07±0.01
Phe.	0.15±0.04	1.71±0.02	1.04±0.05	0.52±0.05	0.15±0.02	0.25±0.03	0.19±0.02	1.71±0.04	0.34±0.01
Total BACs[3)]	28.32	31.37	26.45	25.26	27.38	24.74	25.01	35.36	23.72

[1)] Free amino acids.
[2)] Each data indicates a mean of triplicate (S.D.).
[3)] Bitter amino acid (Asp., His., Arg., Tyr., Val., Ile., Leu., Phe.).

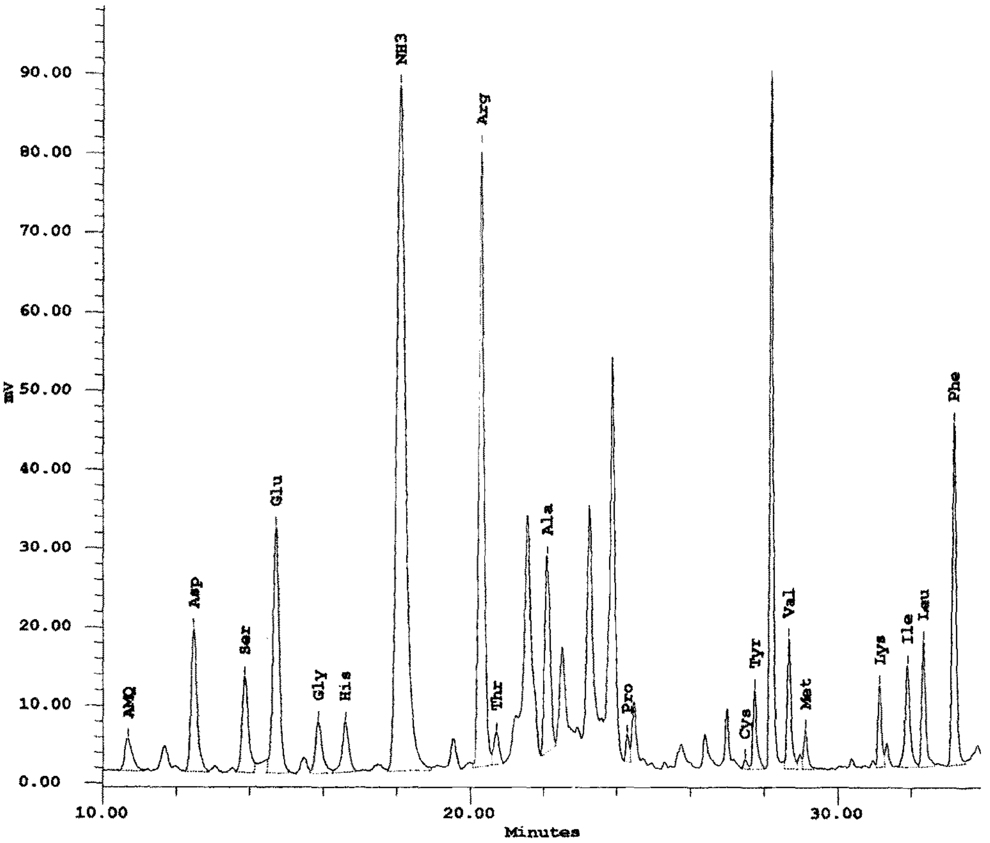

Fig. 1. HPLC chromatogram of free amino acids in 8% skim milk fermented with *L. acidophilus* NB 208 at 37°C for 24 hr.

시험 균주에 의한 유기산 생성

선발된 *L. acidophilus*를 8% 탈지유에 배양하여 생성되는 유기산을 측정하였으며 결과는 Table 5 및 Fig. 2에 나타난 바와 같다. 시험 균주 중 *L. acidophilus* NB 209에 의해 제조된 발효액 내 유기산 함량이 전체적으로 높았으며 *L. acidophilus* NB 206으로 제조된 발효액 내 함량은 낮게 나타났다. Lactic acid의 경우 전 처리구에서 다른 유기산에 비해 높게 생성되어 전형적인 젖산발효가 이루어졌다.

젖산균에 의한 유당 대사과정 중 생성되는 glucose는 Embden-Meyerhof(EMP) 대사경로를 통해 pyruvate로 전환되고 대부분의 homo 젖산발효 젖산균이 함유하고 있는 lactate dehydrogenase에 의해 약 95%가 lactic acid로 전환되며, 이를 통해 생성된 lactic acid는 발효유제품의 풍미, 조직 및 영양 면에서 중요한 역할을 담당하게 된다(Ostlie *et al.*, 2003). 반면 Olieman과 de Vries(1988)는 생성된 lactic acid는 D(-), L(+) 및 DL-lactic acid로 구분되고 이는 균종, 배지, 배양 온도 및 시간 등에 따라 생성비가 달라지며, D(-)-lactic acid는 L(+)-lactic acid 보다 대사의 속

Table 5. Organic acids concentration in 8% skim milk fermented with *L. acidophilus* isolates at 37°C for 24 hr

Strain	Concentration of the organic acids (mg/g)[1]				
	Citric acid	Lactic acid	Acetic acid	Formic acid	Butyric acid
NB 201	0.36±0.03	6.5±0.46	0.64±0.03	0.15±0.02	0.36±0.05
NB 202	0.28±0.02	4.8±0.23	0.52±0.08	ND[2]	0.35±0.06
NB 203	0.31±0.02	5.7±0.41	0.65±0.07	0.09±0.03	0.49±0.02
NB 204	0.48±0.05	9.3±0.09	0.72±0.06	0.14±0.01	ND
NB 205	0.27±0.02	5.2±0.81	0.48±0.05	0.17±0.03	0.37±0.06
NB 206	0.21±0.01	3.8±0.35	0.29±0.01	ND	0.41±0.01
NB 207	0.45±0.01	8.7±0.36	0.81±0.06	0.12±0.03	ND
NB 208	0.61±0.02	8.3±0.25	1.21±0.08	0.17±0.02	0.51±0.03
NB 209	0.56±0.03	11.3±0.36	1.39±0.05	0.16±0.02	0.53±0.03

[1] Each data indicates a mean of triplicate (S.D.).
[2] Not detected.

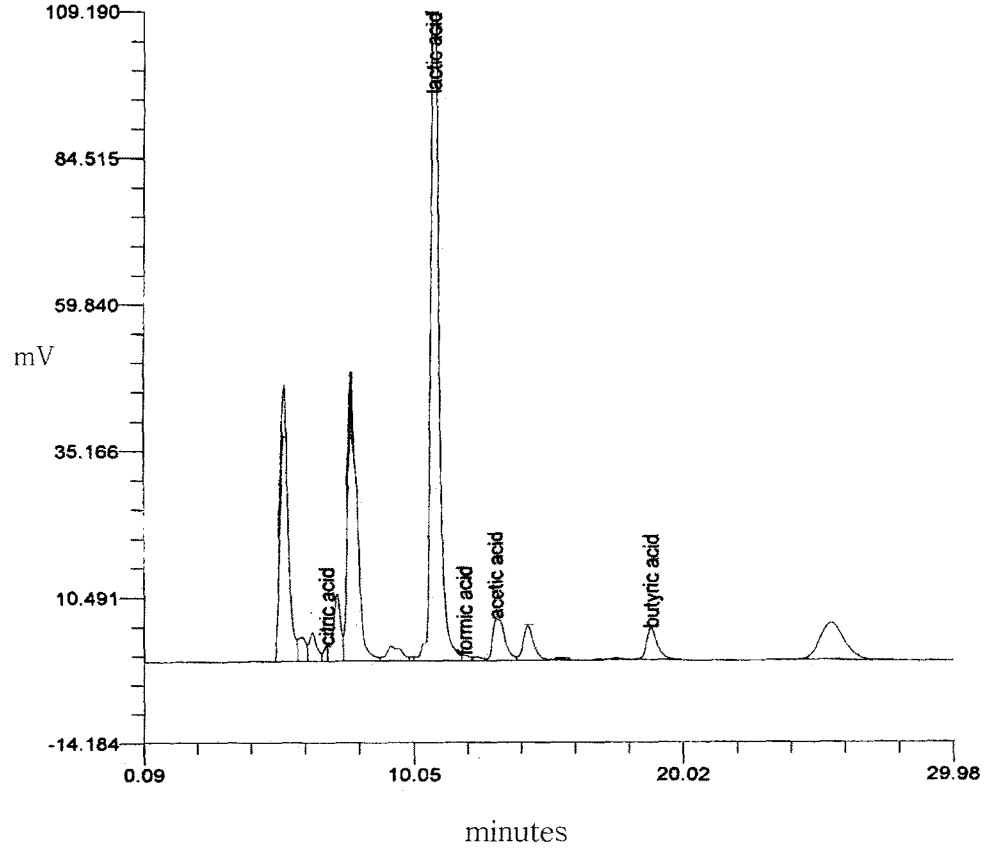

Fig. 2. HPLC chromatogram of organic acid in 8% skim milk fermented with *L. acidophilus* NB 209 at 37°C for 24 hr.

도가 현저히 느리기 때문에 혈액 중에 축적되어 산중독을 발생시킬 수 있으므로 섭취량이 제한되어야 한다고 하였는데, Lee 등(1998)은 *L. acidophilus* NCFM에 의한 D(-)-lactic acid의 생성은 극히 적게 나타났다고 하였다.

실험 결과 acetic acid도 다른 유기산에 비해 높게 생성되었는데 Ostlie 등(2003)은 lactic acid에 의해 배지의 pH가 저하하면 젖산균의 세포내 pH도 감소하며 세포내의 pH를 높게 유지하면서 젖산균을 배양하면 lactate dehydrogenase의 활성이 낮아져서 homo 젖산발효 젖산균이라 해도 다량의 acetic acid를 생성하게 된다고 하였다. Ishibashi와 Shimamura(1993)는 발효유에 있어 후산 생성(post-acidification)에 의한 품질저하 현상이 유발되며, 이러한 현상은 주로 *L. acidophilus*와 *B. bifidum*의 유통과정 중 증식에 의해 형성되는 lactic acid와 acetic acid 때문으로 이러한 probiotic 균주들이 발효유의 향미에 많은 영향을 미친다고 하였고, Bevilacqua와 Califano(1989) 등도 *L. acidophilus*가 첨가된 발효유에서 lactic acid와 acetic acid의 함량이 다른 유기산에 비해 가장 높게 생성되었다고 보고하였다.

시험균주에 의한 휘발성 향미성분 생성

선발된 *L. acidophilus*를 8% 탈지유에 접종하여 생성되는 휘발성 향미성분을 분석하였으며 결과는 Table 6에 나타난 바와 같다. 발효유의 휘발성 향미성분 중 acetaldehyde, diacetyl, acetone, acetoin 및 butanone-2가 주요 향미성분으로 그 중 acetaldehyde가 가장 큰 영향을 미치는데(Kang *et al.*, 1988), 실험 결과 대부분의 균주에 있어 acetaldehyde가 다른 휘발성 향미성분에 비해 생성량이 높게 나타났고, 그 중 *L. acidophilus* NB 209의 생성량이 가장 높았으며 *L. acidophilus* NB 201의 생성량이 가장 낮게 나타났다. Bottazzi와 Vescovo(1969)는 acetaldehyde와 acetone의 생성 비율이 2.8:1일 경우 발효유의 가장 적합한 향미를 느낄 수 있다고 하였는데 acetone의 경우 역시 *L. acidophilus* NB 209의 생성량이 높았으며, acetaldehyde와 acetone의 생성 비율이 2.95:1.23으로 나타나 *L. acidophilus* NB 209가 가장 적합한 향미 생성능을 가진 것으로 나타났다. 그러나 시험결과 *L. acidophilus*에 의한 전체적인 acetaldehyde의 생성량이 다른 연구자들의 보고에 비해 낮게 나타났는데, 이는 젖산균의 생장과 대사에 영향을 줄 수 있는 배지조성에서 기인된 것으로 생각되며, Gonzalez 등(1994)은 *L. acidophilus*와 같은 probiotic 균주에 의한 acetaldehyde의 생성은 탄수화물이나 tryptone과 같은 아미노산 급원 등에 따라 큰 영향을 받으므로 첨가물에 의해 acetaldehyde의 생성량을 조절할 수 있다고 하였다. 또한 Ostlie 등(2003)은 우유에 상업용 *L. acidophilus*를 접종하여 발효시킨 결과 발효 24시간째에는 acetaldehyde가 9.7-12.6 ppm 가량 생성되었고, 발효 24시간 이후에는 acetaldehyde의 생성량이 70-110 ppm으로 급격히 증가하여 acetaldehyde에 의한 적절한 발효유의 향미 형성을 위해선 발효시간의 조절이 필요하다고 보고하였다.

Table 6. Volatile aroma compounds produced in 8% skim milk fermented with *L. acidophilus* isolates at 37°C for 24 hs

Strain	Concentration of the aroma compounds (ppm)[1)			
	Acetaldehyde	Acetone	Ethanol	Diacetyl
NB 201	2.13±0.19	0.64±0.04	0.22±0.07	0.46±0.06
NB 202	3.46±0.16	1.94±0.16	0.19±0.05	0.43±0.08
NB 203	4.49±0.22	2.57±0.08	0.20±0.04	0.25±0.02
NB 204	3.51±0.08	1.71±0.05	0.43±0.09	0.37±0.04
NB 205	3.24±0.13	1.69±0.07	0.36±0.03	0.41±0.02
NB 206	2.57±0.25	0.53±0.07	0.24±0.02	0.25±0.04
NB 207	4.36±0.43	1.79±0.08	0.51±0.12	0.36±0.06
NB 208	3.45±0.67	0.84±0.05	0.48±0.11	0.48±0.07
NB 209	5.89±0.44	2.46±0.05	0.63±0.06	0.52±0.06

[1) Each data indicates a mean of triplicate (S.D.).

또한 diacetyl의 생성량은 0.2-0.5 ppm의 수준으로 비교적 낮게 나타났는데, diacetyl은 우유내 citrate가 젖산균의 citrate lyase에 의해 acetate와 oxaloacetate로 분해되며, 이 과정에서 생성된 acetate는 균체 외부로 분리되고 oxaloacetate는 탈탄산화되어 pyruvate로 전환되며, 이 반응에서 diacetyl은 pyruvate로부터 acetyl CoA를 거쳐 합성된다. Rasic과 Kurmann(1978)은 diacetyl이 발효유에 미량 존재하지만 acetaldehyde의 함량이 낮을 때 발효유의 향미에 더욱 크게 기여하고, 발효유의 산뜻한 향미와 주로 연관이 있다고 하였다. 또한 Oberman과 Libudzisz(1998)은 일반적인 발효유에 있어 diacetyl이 5 ppm 미만으로 다른 휘발성 향미성분에 비해 낮게 존재하나 발효유의 부드러운 지방취를 형성하여 주는 주요 향미 성분이라고 하였으며, Tamime과 Robinson(1999)은 *L. acidophilus*의 경우 acetaldehyde과 diacetyl 생성능이 있어 이들에 의한 향미 기여도가 높다고 하였다.

Ethanol의 경우 모든 시험 균주에 의해 미량 생성되었는데, Marshall과 Cole(1983)은 *L. acidophilus*가 threonine aldolase의 활성을 가지고 있어 threonine으로부터 acetaldehyde를 생성하지만, 이와 더불어 acetaldehyde를 환원하여 ethanol을 생성하는 alcohol dehydrogenase를 가지고 있어 이러한 효소활성으로 인해 *L. acidophilus*를 이용한 발효유 제조 시 주요 향미 성분인 acetaldehyde의 함량이 부족해 질 수 있어 발효유 고유의 향미에 결함이 생긴다고 하였으며, 젖산발효 과정 중 생성되는 소량의 ethanol은 발효유의 향미에 큰 영향을 미치지 않는다고 하였다.

시험균주로 제조한 발효유의 관능검사

선발된 *L. acidophilus*가 발효유의 관능적 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 호상 발효유를 제조한 후 상업

용 균주로 제조된 발효유와 기호도를 비교하였으며 결과는 Table 7에 나타난 바와 같다. 제시된 발효유의 3가지 특성에 있어 *L. acidophilus* 145가 첨가된 대조구의 기호도가 전반적으로 높게 나타났으며, 시험 균주 중 *L. acidophilus* NB 209의 맛과 향미에 대한 기호도가 높은 것으로 나타났는데 이러한 결과는 *L. acidophilus* NB 209의 경우 이미 제시된 바와 같이 lactic acid와 acetaldehyde의 생성량이 다른 시험 균주에 비해 높기 때문으로 생각된다. 또한 조직감에 대한 기호도는 시험 균주 모두가 7.0 이상으로 다른 특성에 비해 높았으며, 특히 *L. acidophilus* NB 203과 NB 205의 조직감에 대한 기호도가 대조구보다 높게 나타났다.

*L. acidophilus*는 발효유제조에 사용되는 starter culture와는 달리 주로 probiotics 개념으로 사용되고 있으나 저장 또는 판매 중 이로 인해 형성되는 배양액의 풍미와 조직감은 발효유제품의 품질에 큰 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며(Imhof *et al.*, 1995; Ostlie *et al.*, 2003), 발효유에 사용된 *Bifidobacterium*의 경우 발효과정 중 지나친 acetic acid를 생성하여 발효유의 기호도를 저하시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Hoier, 1992). 이와 더불어 Samona 등(1996)은 *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium*의 혼합 사용 시 *L. acidophilus*에 의한 지나친 산생성으로 인해 기호도가 저하될 뿐만 아니라 함께 사용된 *Bifidobacterium*의 급격한 사멸을 초래할 수도 있다고 하였다. 최근 세계적으로 생산되고 있는 발효유에 *L. acidophilus*와 같은 probiotic 젖산균이 함유된 제품의 생산은 지속적인 증가 추세에 있으며(Lourens-Hattingh와 Viljoen, 2001), 따라서 이들에 의한 관능적 특성은 사용 균주의 선정 시 매우 중요한 요인이 되고 있으므로 기능성과 관능성이 우수한 발효유 제조를 위해선 이러한 기준에 적합한 *L. acidophilus* 및 *Bifidobacterium*과 같은 probiotic 젖산균의 개발이 매우 필요한 것으로 생각된다.

Table 7. Sensory analysis data of gel type yogurt fermented with *L. acidophilus* isolates and commercial lactic acid bacteria

Strain	Characteristics of the yogurt (Mean±S.D.)[1]		
	Taste	Flavor	Texture
Control[2]	7.15±0.11[a]	7.19±0.23[a]	7.62±0.26[a]
NB 201	5.73±0.12[c]	6.16±0.15[c]	7.43±0.32[ab]
NB 202	5.82±0.21[c]	6.79±0.21[ab]	7.32±0.16[ab]
NB 203	6.13±0.15[bc]	6.83±0.13[ab]	7.63±0.19[a]
NB 204	6.21±0.16[bc]	6.86±0.22[ab]	7.27±0.21[bc]
NB 205	6.16±0.22[bc]	6.32±0.18[bc]	7.66±0.23[a]
NB 206	5.94±0.13[c]	6.18±0.24[c]	7.47±0.27[ab]
NB 207	6.43±0.14[b]	6.19±0.27[c]	7.36±0.33[a]
NB 208	5.87±0.23[c]	6.56±0.24[b]	7.29±0.27[bc]
NB 209	6.86±0.12[ab]	6.86±0.31[ab]	7.12±0.31[c]

[1] Means within a column with different letters differ significantly (p<0.05)
[2] *L. acidophilus* 145 (Rhodia Ltd.)

요 약

이 연구는 모유를 섭취하고 있는 생후 7일 이내의 신생아로부터 분리 및 선발된 9종의 *L. acidophilus*를 이용하여 제조된 발효유의 풍미성분의 확인을 통해 상업적 발효유제조 시 사용가능성을 탐색하고자 수행하였다. 시험 균주에 의한 유리아미노산의 생성은 전반적으로 arginine 및 histidine과 같은 쓴맛을 내는 유리아미노산의 생성량이 높았으며, 유기산은 lactic acid의 경우 전 처리구에서 다른 유기산에 비해 높게 생성되었고, 전체적인 유기산 생성량은 *L. acidophilus* NB 209 처리구가 가장 높았다. 또한 acetaldehyde의 함량이 다른 휘발성 향미성분에 비해 높게 생성되었으며 *L. acidophilus* NB 209에 의한 acetaldehyde 생성량이 가장 높게 나타났다. 시험 균주로 발효유를 제조하여 관능검사를 실시한 결과 맛과 향미는 *L. acidophilus* NB 209로 제조된 발효유에 대한 기호도가 다른 처리군에 비해 높게 나타났으나 조직감은 다른 시험 균주에 비해 조금 낮게 나타났고, 상업적 발효유 제조에 사용 중인 *L. acidophilus* 145에 비해 전반적으로 기호도가 낮게 나타났다. 따라서 *L. acidophilus* NB 209의 제품 적용가능성이 가장 높은 것으로 나타났으나 상업적인 이용을 위해 향후 최적배양조건 선정 실험을 통한 관능성의 개선 관련 연구가 필요한 것으로 생각된다.

감사의 글

이 연구는 2008년도 단국대학교 대학연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Bassette, R. and Ward, G. (1975) Measuring parts per billion of volatile materials in milk. *J. Dairy Sci.* **58**, 428-435.
2. Beshkova, D., Simona, E., Frengova, G., and Simov, Z. (1998) Production of flavor compounds by yogurt starter culture. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* **20**, 180-190.
3. Bevilacqua, A. E. and Califano, A. N. (1989) Determination of organic acids in dairy products by high performance liquid chromatography. *J. Food Sci.* **54(4)**, 1076-1079.
4. Bottazzi, V. and Vescovo, M. (1969) Carbonyl compounds produced by yogurt bacteria. *Neth. Milk Dairy J.* **23**, 71-77.
5. Conway, P. L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. (1987) Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70**, 1-12.
6. Fox, P. F. (1983) Developments in dairy chemistry I. Applied Science Publication, NY, pp. 218-220.
7. Gilliland, S. E. (1989) Acidophilus milk producers: a review

of potential benefits to consumers. *J. Dairy Sci.* **72**, 2483-2494.

8. Gonzalez, S., Ambrosini, V. M., Nadra, M. M., Ruiz Holgado, A., and Oliver, G. (1994) Acetaldehyde production by strains used as probiotics in fermented milk. *J. Food Prot.* **57**, 436-440.
9. Hoier, E. (1992) Use of probiotic starter cultures in dairy products. *Food Tech. Australia* **44**, 418-420.
10. Holzapfel, W. H. and Schillinger, U. (2002) Introduction to pre-and probiotics. *Food Res. Int.* **35**, 104-116.
11. Hood, S. K. and Zottola, E. A. (1988) Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. *J. Food Sci.* **53**, 1514-1516.
12. Imhof, R., Glatti, H., and Basset, J. O. (1995) Volatile organic compounds produced by thermophilic and mesophilic single strain dairy starter cultures. *Lebensm. Wiss. Techol.* **28**, 78-85.
13. Ishibashi, N. and Shimamura, S. (1993) Bifidobacteria: Research and development in Japan. *Food Technol.* **47**, 129-134.
14. Kang, Y. J., Frank, J. F., and Lilard, D. A. (1988) Gas chromatographic detection of yogurt flavor compounds and changes during refrigerated storage. *Cultured Dairy Prod. J.* **23**, 6-12.
15. Kim, C. H., Shin, Y. K., Baick, S. C., and Kim, S. K. (1999) Changes of oligosaccharide and free amino acid in soy yogurt fermented with different mixed culture. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **31(3)**, 739-745.
16. Laye, I., Karleskind, D., and Morr, V. V. (1993) Chemical, Microbiological and Sensory properties of plain nonfat yogurt. *J. Food Sci.* **58**, 991-997.
17. Lee, K. W., Shin, Y. K., and Baick, S. C. (1998) D(-) and L(+)-Lactic acid determination of *Lactobaillus acidophilus* during fermentation and storage period. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **30(1)**, 168-174.
18. Lew, I. D. and Yu, J. H. (1987) Interaction between *Lactobacillus acidophilus* and *Kluyveromyces fragilis* on the metabolism of galacto-oligosaccharides in soy milk. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **15**, 253-260.
19. Libeck, A., Gustafsson, J., and Nord, C. E. (1987) Impact of *Lactobacillus acidophilus* supplements on the human intestinal microflora. *Scand. J. Infect. Dis.* **19**, 531-537.
20. Liu, H. J. (1994) Determination of amino acids by precolumn derivatization with 6-aminoguinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and HPLC with ultraviolet detection. *J. Chromatography A* **670**, 59-66.
21. Lourens-Hattingh, A. and Viljoen, B. C. (2001) Yogurt as probiotic carrier food. *Int. Dairy J.* **11**, 1-17.
22. Marshall, V. M. and Cole, W. M. (1983) Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. *J. Dairy Res.* **46**, 42-57.
23. Oberman, H. and Libudzisz, Z. (1998) Fermented milks. In: Wood, B. J. B. ed. Microbiology of fermented foods. Blackie Academic and Professional. *London.* pp. 309-350.
24. Olieman, C. and de Vries, E. S. (1988) Determination of D- and L-lactic acid in fermented dairy products with HPLC. *Neth. Milk Dairy J.* **42**, 111-116.
25. Ostlie, H. M., Helland, M. H., and Narvhus, J. A. (2003) Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *Int. J. Food Microbiol.* **87**, 17-27.
26. Park, C. K., Lew, I. D., and Yu, J. H. (1986) Effect of peptide on the mixed fermentation of *Lactobacillus helveticus* YH-1 and *Streptococcus lactic* ML3 in skim milk. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 487-493.
27. Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. (1978) Yogurt: Scientific grounds, technology, manufacture and preparations. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen, p. 90-97.
28. Salminen, S., Laine, M., Wright, A., Vuopiovarkila, J., Korhonen, T., and Mattila-Sandholm, T. (1996) Development of selection criteria for probiotic strains to assess their potential in functional foods: a nordic and european approach. *Bioscience Microflora* **15**, 61-67.
29. Samona, A., Robinson, R. K., and Marakis, S. (1996) Acid production by bifidobacteria and yoghurt bacteria during fermentation and storage of milk. *Food Microbiol.* **13**, 275-280.
30. SAS (1996) SAS/STAT Software for PC. Release 6.11, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
31. Shankar, P. A. (1977). Dairy starter culture. Ph. D. thesis, University of Reading, Reading, England.
32. Takiguchi, R., Mochizuki, E., Suzuki, Y., Nakajima, I., and Benno, Y. (1997) SBT 2062 and Bifidobacterium longum SBT 2928 on harmful intestinal bacteria. *J. Int. Microbiol.* **11**, 11-17.
33. Tamine, A. Y. and Robinson, P. K. (1999) Yoghurt: Science and Technology. Woodhead Publishing, Cambridge, England, pp. 433-485.

(2008.10.14 접수/2008.11.11 수정1/2008.11.17 수정2/ 2008.11.18 채택)