

김치에서 분리한 *Leuconostoc mesenteroides* KC51을 이용한 대두 발효유의 제조

오남순¹ · 인만진*

청운대학교 식품영양학과, ¹공주대학교 식품공학과

Production of a Fermented Soymilk using a New Strain *Leuconostoc mesenteroides* KC51 Isolated from Kimchi

Nam-Soon Oh¹ and Man-Jin In*

Department of Human Nutrition and Food Science, Chungwoon University, Hongseong 350-701, Korea
¹Department of Food Science and Technology, Kongju National University, Yesan 340-802, Korea

Received February 11, 2008; Accepted March 6, 2008

Key words: fermented soymilk, Kimchi, *Leuconostoc mesenteroides*, soybean

서 론

대두는 단백질(40%), 탄수화물(35%), 지방(20%)의 함량이 높을 뿐만 아니라 미네랄, 비타민이 풍부하며, 대두 올리고당, saponin, isoflavones 등과 같은 생리 활성 성분이 함유되어 있어 영양학적으로 매우 중요한 식품 재료이다.¹⁾ 그러나 가공 중 지질의 산화나 분해에 의한 대두 특유의 불쾌한 냄새 때문에 기호성이 저하되는 문제점이 지적되고 있다. 이를 감소시키기 위한 방법 중 두유를 발효시키는 방법은 새로운 방향성 성분에 의한 풍미 개선과 불쾌취 제거, 대두의 소화율 향상 등의 효과가 있는 것으로 보고되어 있다.²⁻⁴⁾ 또한 두유에 유산균을 배양하면 생리적인 기능성 측면에서도 여러 가지 기능성이 향상되는 것으로 보고되고 있다. 예로써 항산화 활성이 크게 증가되며,⁵⁾ 유산균의 β -glucosidase 활성에 의하여 대두 isoflavone 배당체가 체내 흡수 속도가 빠른 isoflavone aglycones (특히 daidzein, genistein, glycitein)의 형태로 전환되며,^{6,7)} γ -aminobutyric acid(GABA)와 유리 아미노산의 함량이 증가한다는⁸⁾ 결과가 알려져 있다. 또한 유산균이 증식함에 따라 대두에 함유되어 있는 난소화성 당류인 raffinose와 stachyose의 함량이 감소하므로^{9,10)} 대두 식품의 과다 섭취에 의한 가스발생으로 유발되는 고창현상(flatulence)을 완화시킬 수 있는 장점이 있다. 그러나 raffinose와 stachyose는 대두 올리고당으로 유산균과 비피더스균과 같은 장내 유익균의 증식인자인 prebiotics의 한 종류이므로 이들의 감소는 생리적인 측면에서 단점이 되기도 한다.

한편, 두유 발효에는 주로 *Lactobacillus*속의 유산균^{7,8)} 또는

*Bifidobacterium*속의 비피더스균¹¹⁾을 단독으로 사용하거나 또는 *Lactobacillus*속의 유산균과 *Streptococcus thermophilus*의 혼합균주,^{4,9)} 혹은 *Bifidobacterium*속의 비피더스균의 혼합균주^{5,6)}를 사용하는 것이 일반적이다. 그러나 이들 미생물은 대부분 우유와 같은 동물성 원료에서 요구르트의 발효에 사용되는 균주이며, 곡류, 두류와 같은 식물성 원료에 적합한 유산균에 대한 연구는 미미한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 우리나라의 식물성 발효 식품인 김치에서 생육과 산 생성이 우수한 유산균을 분리, 동정하였으며, 분리한 유산균을 이용하여 식물성 원료 중 prebiotic인 대두 올리고당이 함유되어 있는 두유에 배양하면서 생육 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

재료. 유산균의 분리에 사용한 배추김치는 대형마트에서 구입하였으며, 콩은 2006년 국내산 백태를 사용하였다. 미생물 분리, 배양 및 보존에 사용된 배지는 모두 Difco사(Detroit, MI)의 제품이었다.

유산균의 분리 및 동정. 김치 국물을 멸균 식염수에 혼합하여 10진법으로 적절하게 희석한 후 0.03% CaCO₃를 함유한 *Lactobacilli* MRS agar 평판에 도말하고 30°C에서 24-48시간 배양하였다. 생육이 빠르고 산 생성이 우수하여 투명한 큰 colony를 분리하여 MRS agar 평판에서 2-3회 순수 분리한 후 MRS agar 사면 배지에 보관하였다. 분리된 균을 API 50 CHL kit(bioMerieux Inc., Marcy l'Etoile, France)와 16S rDNA의 염기 서열 분석을 통하여 동정하였다.¹²⁾

대두 발효유의 제조. 사면 배지에 보관 중인 분리균인 *Leuconostoc mesenteroides* KC51를 *Lactobacilli* MRS broth에

*Corresponding author
Phone: +82-41-630-3278; Fax: +82-41-632-3278
E-mail: manjin@chungwoon.ac.kr

1백금이 접종하여 30°C에서 24시간 회전 진탕 배양하여 starter를 준비하였다. 두유는 일반적인 두유 제조 공정¹³⁾에 따라 다음과 같이 제조하였다. 대두를 10배의 증류수에 15시간 침지시킨 후 100°C에서 30분간 증자하고 마쇄하였다. 마쇄액을 2겹의 cheesecloth로 여과하여 제조한 두유를 autoclave한 후 미리 준비한 starter를 5%(v/v)접종하고 30°C에서 정지 배양하면서 시간 별로 적정 산도, pH, 생균수를 측정하였다.

적정산도 및 pH. 발효 중 적정산도의 변화는 발효액 5 g에 멸균 증류수 45 g을 가하여 잘 혼합한 후 10 ml를 취하여 0.01 N NaOH로 적정하고 젯산으로 환산하여 나타내었으며, 발효액의 pH는 pH-meter(Orion 420A, Orion Research Inc., Milford, MA)를 이용하여 직접 측정하였다.

생균수 측정. 배양 중 젯산균의 총균수는 배양액 1 g에 멸균 식염수 9 ml를 혼합하여 10진법으로 적절하게 희석하였다. plate에서 희석액 1 ml에 멸균한 MRS agar 배지를 부어 혼합하고 30°C에서 48시간 배양하여 형성된 colony를 계측하여 시료 g당 colony forming units(CFU/g)로 나타내었다.

유기산 분석. 두유 발효액의 유기산 함량은 HPLC(Dionex, Sunnyvale, CA)를 이용하여 측정하였다. 컬럼은 Aminex HPX-78H(Bio-Rad Lab., Hercules, CA), 용매는 8 mM H₂SO₄(유속 0.7 ml/min), 검출기는 UV detector(210 nm)를 사용하였다.

결과 및 고찰

유산균의 분리 및 동정. 곡류, 두류와 같은 식물성 원료에 적합한 유산균을 분리하기 위하여 식물성 발효 식품인 김치 국물로부터 CaCO₃를 함유한 MRS 평판 배지에서 생육이 빠르고 산 생성이 우수하여 투명환을 크게 생성하는 colony를 분리하여 API 50 CHL kit와 16S rDNA의 염기 서열 분석을 통하여 동정하였다. API 50 CHL에 의한 탄수화물 발효성 실험 결과들(Table 1) ATB identification program으로 분석하고 16S rDNA의 염기 서열 분석을 행한 결과(Fig. 1) 본 연구에서 분리한 균주는 *Leuconostoc mesenteroides*와 99% 유사한 것으로 판명되어 최종적으로 *Leuconostoc mesenteroides* KC51로 명명하였다.

대두 발효유에서의 생육 특성. 두유에 *Leuconostoc mesenteroides* KC51을 접종 한 후 30°C에서 18시간 정지 배양하면서 3시간 간격으로 총균수, 적정산도와 pH의 변화를 측정하였다. 두유에서 KC51 균주의 생육은 탁월하여 총균수는 접종 후 9시간까지 급격히 증가하였으며 9시간 이후 완만하게 증가하여 배양 12시간에는 2.70×10⁹ CFU/g까지 증가하였다(Fig. 2A). 대두 발효유에서 이와 같은 유산균의 생육 결과는 두유에 *Lactobacillus* 속의 유산균을 단독 배양하거나, *Lactobacillus*속의 유산균과 *Streptococcus thermophilus*와 혼합 배양한 경우 혹은 *Bifidobacterium*속의 비피더스균과 혼합 배양한 경우 통상 약 10⁸ CFU/g의 생균수를 나타내는 결과보다 매우 우수한 것으로^{3,14-16)} 김치에서 분리한 *Leuc. mesenteroides* KC51 균주가 식물성 원료를 이용한 유산균 발효유의 제조에 적합한 것을 알 수 있다. 또한 우리나라에서 요구르트의 성분 규격은 신선한 액상 및 호상 요구르트의 생균수는 각각 10⁷과 10⁸ CFU/ml 이상으로 되

Table 1. Carbohydrate fermentation of the strain KC51 isolated from *Kimchi*

Carbohydrate	Reaction	Carbohydrate	Reaction
Control	-	Esculine	+
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	-
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	+	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
Methyl-β-xyloside	-	Melezitose	-
D-Galactose	+	D-Raffinose	+
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β-Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
Ethyl-α-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
Methyl-α-D-glucoside	+	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamine	+	Gluconate	-
Amygdaline	-	2-Keto-gluconate	-
Arbutine	-	5-Keto-gluconate	-

+: Positive reaction, -: Negative reaction.

어 있어¹⁷⁾ 본 연구의 결과를 활용하여 두유 요구르트를 제조하는 경우 생균수 측면에서는 어려움이 없을 것으로 판단된다.

발효 시간에 따른 적정산도는 배양 9시간까지 급격히 증가하고(0.081% → 0.35%) 그 이후 완만하게 증가하였으며, 발효액의 pH도 역시 배양 9시간까지 급격하게 감소하여(pH 6.59 → pH 4.70) 모두 총균수의 변화와 유사한 경향을 나타내었다(Fig. 2. B). 두유에 *Leuc. mesenteroides* KC51 균주를 12시간 배양한 결과, 적정산도 0.35%는 일반적으로 탈지분유에서 배양한 결과¹⁸⁾의 30-40% 수준으로 낮으나 두유에 *Lactobacillus acidophilus* 단독 배양 또는 *L. acidophilus*와 *Bifidobacterium longum*의 혼합 배양의 결과^{10,14)} 보다 높은 값을 나타냈다. 또한 배양시간에 따라 유기산의 농도를 HPLC로 분석한 바(구체적 결과 제시는 생략함), 12시간 배양액의 유기산 농도는 젯산과 초산의 함량이 각각 0.56%와 0.10%로 두유에 *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* RBL 00079를 배양한 경우 젯산과 초산의 함량이 각각 0.38-0.39%와 0.01-0.05%라는 결과¹⁶⁾보다 매우 높은 값을 보였다. 이상의 결과는 두유에서 KC51 균주의 산생성 능력이 우수함을 나타낸다. 12시간 배양액의 pH는 4.52로 측정되었다. 그러나 KC 51 균주를 이용하여 두유 요구르트를 제조하는 경우 요구르트의 바람직한 pH 범위는 pH 3.27-4.53이라는 보고¹⁹⁾와 비교하면 다소 산의 생성이 부족함을 알 수 있다. Lactic acid bacteria의 단독 배양보다 lactic acid bacteria와 bifidobacteria의 혼합 배양에서 높은 산도를 얻을 수 있다는 보고²⁰⁾를 참고하면

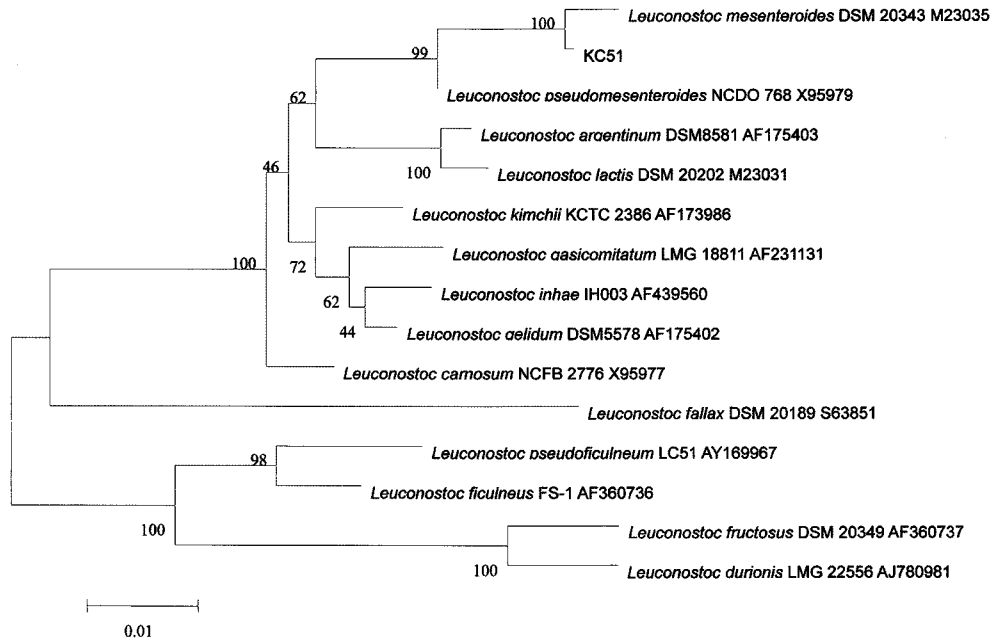


Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences showing the positions of KC51, *Leuconostoc* species and some other related taxa.

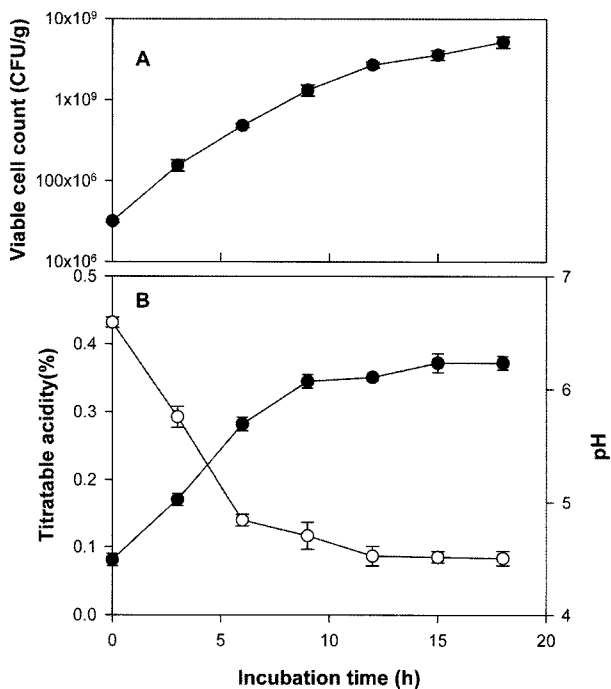


Fig. 2. Changes of growth of *Leuconostoc mesenteroides* KC51 (panel A), titratable acidity (● in panel B) and pH (○ in panel B) of fermented soymilk during lactic acid fermentation at 30°C.

KC51 균주와 bifidobacteria의 혼합 배양에 의한 산도 향상에 관한 추가적인 검토가 필요할 것으로 사료된다.

대두 발효유의 품질 특성. *Leuc. mesenteroides* KC51 균주로 12시간 배양한 두유 발효액의 점도를 Brookfield DV-II+ viscometer(Brookfield Engineering Laboratories, Inc., Middleboro, MA)의 3번 spindle을 60 rpm으로 회전시키며 실온에서 측정하

였으나 배양액의 점도는 10 cps로 배양 전후 점도의 차이가 없었다. 통상 *Leuconostoc mesenteroides*를 배양하면 다당류인 dextran이 생합성되어 배양액의 점도가 증가하나²¹⁾ 본 연구에서는 점도의 증가가 관찰되지 않았다. 이는 두유에서 낮은 탄소원의 농도와 짧은 배양 시간에 기인하는 것으로 사료된다.

발효시키지 않고 설탕을 10% 첨가한 두유와 12시간 발효 후 설탕을 첨가한 두유 발효액의 관능적 특성을 색, 향미, 신맛의 강도와 전체적인 기호도 측면에서 5점 척도로 비교하였다. 신맛의 강도에서는 두유 발효액이 월등히 높았으며(두유 1점, 발효액 2.7점), 향(두유 3.9점, 발효액 3.1점)과 기호도(두유 4점, 발효액 3.6점)는 두유가 다소 높은 평가를 받았다. 두유가 매우 친숙한 가공 식품인 점을 고려한다면 KC51 균주를 이용하여 제조하는 두유 요구르트는 관능적으로도 무난할 것으로 판단된다.

발효유는 제조 후 저온에서 유통되므로 저장 기간 중 품질의 변화를 확인하기 위하여 15시간 발효시킨 후 4°C에서 냉장 보관하면서 저장성을 조사한 결과(Table 2), 2주일의 저장기간 동안 pH와 적정산도의 변화는 매우 미미하였다. 저장 중 생균수는 14일 후 3.6×10^9 CFU/g에서 3.3×10^8 CFU/g으로 다소 감소하였다. 이와 같은 결과는 *L. acidophilus*, *B. infantis*, *B. longum*, *S. thermophilus*를 배양하여 제조한 두유 발효 음료를 5°C에서 10일간 보관하는 경우 pH와 생균수의 변화가 미미하였다는 보고¹⁴⁾와 잘 일치하는 것이다.

초 록

숙성 중인 김치에서 생육과 산 생성이 우수한 유산균을 분리하여 API 50 CHL kit로 확인하고 16S rDNA의 염기 서열을 분석한 결과 *Leuconostoc mesenteroides*로 동정되어 *Leuconostoc mesenteroides* KC51로 명명하였다. 대두에 10배의 증류수를 가하여 제조한 두유에 KC51 균주를 접종하고 30°C

Table 2. Changes in quality of fermented soymilk during storage at 4°C

	Period of storage (days)					
	0	5	9	12	14	16
pH	4.58	4.53	4.58	4.52	4.53	4.51
Titrateable acidity (%)	0.38	0.39	0.38	0.40	0.39	0.41
Viable cell counts (CFU/g)	3.6×10 ⁹	2.8×10 ⁹	1.0×10 ⁹	1.5×10 ⁹	3.3×10 ⁸	3.0×10 ⁸

에서 정치 배양한 결과, 생균수는 접종 후 9시간까지 급격히 증가하였으며 그 이후 완만하게 증가하여 배양 12시간에는 2.70 ×10⁹ CFU/g까지 증가하였다. 적정산도는 배양 12시간에 0.35%까지 증가하였으며, pH는 pH 4.52까지 감소하였다. 이때 유기산 농도는 젖산과 초산의 함량이 각각 0.56%와 0.10%로 분석되었다. 두유 발효액에서 *Leuconostoc mesenteroides*의 증식에 의한 점도의 증가는 관찰되지 않았으며, 관능적으로도 신맛을 제외한 항목에서 두유와 유사하였다. 또한 4°C에서 두유 발효액은 2주일의 저장기간 동안 pH, 적정산도와 생균수의 변화는 미미하였다.

Key words: *Leuconostoc mesenteroides*, 김치, 대두, 대두 발효유

감사의 글

본 연구는 2007년도 청운대학교 학술연구조성비의 지원을 받아 수행하였습니다.

참고문헌

- Messina, M. and Bames, S. (1991) The role of soy products in reducing cancer risk. *J. Nat. Cancer Inst.* **83**, 541-545.
- Cheng, Y. J., Thompson, L. D. and Brittin, H. C. (1990) Sogurt, a yogurt like soybean product: development and properties. *J. Food Sci.* **55**, 1178-1179.
- Park, M. J. and Lee, S. Y. (1997) Effects of lactose and yeast on the growth of lactic acid bacteria and sensory characteristics during the fermentation of soy yogurts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **29**, 533-538.
- Park, D. J., Oh, S., Ku, K. H., Mok, C., Kim, S. H. and Imm, J. -Y. (2005) Characteristics of yogurt-like products prepared from the combination of skim milk and soymilk containing saccharified-rice solution. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **56**, 23-34.
- Wang, Y. -C., Yu, R. -C. and Chou, C. -C. (2006) Antioxidant activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **23**, 128-135.
- Chien, H. -L., Huang, H. -Y. and Chou, C. -C. (2006) Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soymilk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **23**, 772-778.
- Choi, Y. B., Woo, J. G. and Noh, W. S. (1999) Hydrolysis of β-glycosidic bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 189-195.
- Park, K. -B. and Oh, S. -H. (2007) Production of yogurt with

enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource Technol.* **98**, 1675-1679.

- 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. *Korean J. Food Sci. Technol.* **31**, 739-745.
- Wang, Y. -C., Yu, R. -C., Yang, H. -Y. and Chou, C. -C. (2003) Sugar and acid contents in soymilk fermented with lactic acid bacteria alone or simultaneously with bifidobacteria. *Food Microbiol.* **20**, 333-339.
- Shimakawa, Y., Matsubara, S., Yuki, N., Ikeda, M. and Ishikawa, F. (2003) Evaluation of *Bifidobacterium breve* strain Yakult-fermented soymilk as a probiotic food. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 131-136.
- Yoon, J. H., Lee, S. T. and Park, Y. H. (1998) Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioidea* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 187-194.
- Son, T. W., Sung, J. W., Kang, W. W. and Moon, K. D. (2003) In *Food Processing*. Hyungseul Publishing Co., Seoul, Korea.
- Wang, Y. -C., Yu, R. -C. and Chou, C. -C. (2002) Growth and survival of bifidobacteria and lactic acid bacteria during the fermentation and storage of cultured soymilk drinks. *Food Microbiol.* **19**, 501-508.
- Lin, F. -M., Chiu, C. -H. and Pan T. -M. (2004) Fermentation of a milk-soymilk and *Lycium chinense* Miller mixture using a new isolate of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NTU101 and *Bifidobacterium longum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 559-564.
- Farnworth, E. R., Mainville, I., Desjardins, M. -P., Gardner, N., Fliiss, I. and Champagne, C. (2007) Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *Int. J. Food Microbiol.* **116**, 174-181.
- Korea Foods Industry Association. (2002) In *Code of Food* Monyoungsa, Seoul, Korea.
- Cho, J. -R., Kim J.H. and In, M. -J. (2007) Effect of garlic powder on preparation and quality characteristics of yogurt. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **50**, 48-52.
- Chameber, J. V. (1979) Culture and processing techniques important to the manufacture of good quality yogurt. *Cult. Dairy Prod. J.* **14**, 28-34.
- Matsuyama, J., Hirata, H., Yamagishi, T., Hayashi, K., Hirano, Y., Kuwata, K., Kiyosawa, I. and Nagasawa, T. (1992) Fermentation profiles and utilization of sugars of bifidobacteria in soymilk. *J. Jpn. Soc. Food Sci. Technol.* **39**, 887-893.
- Yoo, S. K., Kim, D. and Day D. F. (2001) Co-production of dextran and mannitol by *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 880-883.