

Characteristics of Soycurd-forming Lactic Acid Bacteria that Produce Gamma-aminobutyric Acid (GABA) from *Kimchi*

Eun-Ah Kim¹, So-Yon Mann¹, Su-In Kim¹, Ga-Young Lee¹, Byong-Won Lee² and Dong-Seob Kim^{1*}

¹Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 627-706, Korea

²Department of Functional Crop Nat'l. Institute of Crop Science, RDA, Miryang 627-803, Korea

Received September 16, 2013 / Revised December 2, 2013 / Accepted January 3, 2014

Lactobacillus sakei 383, which showed the highest GABA content in fermented soycurd, survived in artificial gastric fluid (pH 3.0) up to 3 h, and the survival rate was 88%. *L. sakei* 383 was tolerant to bile juice during incubation in MRS broth with 0.3% oxgall, and the survival rate was 99%. The survival ratio of *L. sakei* 383 was high in media containing less than 6% NaCl. *L. sakei* 383 produced an antibacterial substance against various pathogens, including *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Salmonella typhi*. The quality characteristics of soycurd fermented with *L. sakei* 383 were measured during the fermentation period. The viable cell number reached a peak (10^{11} CFU/ml) 36 h after fermentation and then slowly decreased. According to the fermentation time of *L. sakei* 383, the acidity of soycurd increased and the pH decreased until 12 h, and they were maintained thereafter. The moisture, crude ash, crude protein, crude fat, and crude fiber content was 94.88, 0.22, 2.38, 1.16, and 0.03%, respectively. The content of total and reducing sugar was comparatively higher in the soycurd fermented with *L. sakei* 383 than in nonfermented soycurd. The essential and nonessential amino acid content was 11.2 and 38.65 mg/100 g.

Key words : Gamma-aminobutyric acid (GABA), *Kimchi*, lactic acid bacteria, soycurd

서 론

최근 경제성장과 더불어 국민소득이 증대됨에 따라 사람들의 식생활 패턴이 서구화되고 각종 성인병의 증가가 심각한 문제로 대두되고 있다. 그러나 대두 가공식품을 많이 섭취하는 아시아 국가들은 성인병 발병률이 상당히 낮다는 것이 알려지면서 성인병 퇴치에 중요한 역할을 하는 대두에 대한 관심이 집중되고 있다[39]. 대두는 발효 과정 중에 미생물과 여러 효소들의 작용으로 인해 isoflavones, trypsin inhibitor, 식이 섬유소, 비타민 E와 유리 phenolic acid 등의 함량이 증가되며 다양한 생리 활성 물질들이 함유되어 있어 혈중 콜레스테롤 저하, 혈압 강하, 항산화, 항암, 항비만, 고지혈증 등에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[22, 29].

젖산균은 당류를 발효해서 젖산을 생성하는 미생물로서 발효 유제품을 중심으로 장류, 김치, 발효 소시지 등의 발효식품이나 의약품 및 가축 사료 첨가제 등에 이르기까지 인류 생활에 광범위하게 이용되어 왔다. 젖산균이 생성하는 대사산물인

젖산은 식품의 저장성을 향상시키고 식품의 향미와 조직을 개선하는 것으로 알려져 있다[12, 14]. 또한 젖산균은 bacteriocin과 H₂O₂ 및 diacetyl 생성으로 인한 항균작용을 나타내며 혈중 콜레스테롤 수준의 감소, 항돌연변이성, 항암작용, 면역증강작용 및 식품의 영양학적 가치의 증진과 같은 프로바이오틱 효과가 보고되고 있다[25, 36]. 발효식품 제조에 이용되는 젖산균이 인체에 섭취되어 프로바이오틱 효과를 나타내기 위해서는 장내에서 서식 및 정착이 가능할 뿐만 아니라 소화기관의 최종 부위에 도달할 때까지 생존할 수 있어야 한다[18].

최근에는 소득 수준이 향상되면서 건강식품을 선호하는 소비자층이 증가하는 추세이다. 프로바이오틱 미생물로서 식품에의 활용은 건강 기능성 식품의 중요한 분야로 인식되고 있으며 활용 범위도 점점 더 확대되어 가고 있다. 특히 김치, 장류와 같은 한국의 전통발효식품의 현대적인 생산을 위한 접종균의 개발에 있어서 프로바이오틱 미생물을 응용하는 연구가 이루어져야 한다[3].

따라서 본 연구에서는 김치로부터 분리된 GABA 생산능이 우수한 유산균인 *Lactobacillus sakei* 383의 프로바이오틱 기능에 대하여 알아보고 이를 이용하여 제조한 soycurd의 품질 특성을 규명하여 우리나라 사람의 기호성에 적합한 새로운 형태의 발효 식품을 개발하고자 한다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5356, Fax : +82-55-350-5359

E-mail : kds@pusan.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

인공 위액에 대한 내성

인공 위액은 pepsin을 첨가한 MRS 배지를 이용하였다. 1 N HCl을 사용하여 pH 2.5 및 3.0으로 조정된 MRS (Difco, Sparks MD, USA) 배지를 121°C에서 15분 멸균하였다. Pepsin (Sigma, St. Louis, USA) 용액은 0.45 µm membrane filter로 여과한 후 pH가 조정된 MRS 배지에 최종 농도가 1,000 units/ml이 되도록 첨가하여 인공 위액을 제조하였다. 분리 균주를 MRS 배지에서 2회 계대 배양한 후 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 균체를 세척한 다음 37°C로 유지된 인공 위액을 첨가하여 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 배양액을 MRS 한천평판배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양 후 생성된 균락을 계측하여 생균수를 측정하였다.

인공 담즙액에 대한 내성

인공 위액에서 3시간 배양한 배양액을 12,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 균체를 세척하여 회수하였다. 회수된 균체에 oxgall (Difco, Sparks MD, USA)이 각각 0.1%, 0.3% 및 0.5% 첨가된 MRS 배지(pH 6.8)를 첨가하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 MRS 한천평판배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양 후 생성된 균락을 계측하여 생균수를 측정하였다.

NaCl에 대한 내성

NaCl을 0, 2, 4, 6, 8, 10%의 농도로 조정된 0.2% potassium phosphate에 MRS 배지에서 24시간 배양한 분리 균주를 1% 접종하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양액을 MRS 한천평판배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양 후 생성된 균락을 계측하여 생균수를 측정하였다.

항균 활성

항균 활성 검색을 위하여 well diffusion method법을 변형하여 실험하였다[9]. 선별 균주를 MRS 배지에서 2회 계대 배양하여 균의 활성을 높인 전배양액 1%를 MRS 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하여 본 배양하였다. 본 배양액을 멸균된 eppendorf tube에 옮긴 후 원심분리(12,000 rpm, 5 min)하여 균체는 제거하고 액은 회수하여 이를 조항균물질로 사용하였다. Soft agar (0.75% agar)를 적당히 식힌 후 미리 배양해 둔 감수성 균주 배양액을 1% 접종하여 petri dish에 분주하였다. 분주한 petri dish를 실온에서 정치시켜 배지를 균한 후 pasteur pipette을 이용하여 직경 7 mm의 well을 만들어 각각의 well에 유산균 배양액 30 µl를 첨가하였다. 상온에서 1시간 방치하여 배양액이 확산되게 한 후 37°C에서 24시간 배양하면서 저해환의 생성 유무를 확인 하였다. 유해 균주로는 *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli, *Salmonella typhi*를 사용하였다.

Lactobacillus sakei 383을 이용하여 제조한 soycurd의 품질 특성

Soycurd의 제조

두유는 대두 100 g을 6시간 동안 물에 침지하여 불린 다음 물기를 제거하고 증류수 800 ml을 넣고 마쇄하여 비지를 제거한 콩즙을 autoclave에서 121°C에서 15분간 살균시켜 두유를 제조하였다. 두유는 상온에서 40~45°C로 냉각시키고 게르마늄 컵에 50 ml씩 넣어 미리 배양해 둔 *Lactobacillus sakei* 383을 2% 접종한 후 35°C에서 18시간 동안 발효시켜 soycurd를 제조하였다.

미생물의 변화

균질화한 시료를 무균적으로 1 ml을 채취하여 멸균된 증류수로 10^{-5} ~ 10^{-6} 까지 단계별로 희석하였다. 희석된 시료 100 µl를 MRS 한천평판배지에 도말하여 37°C에서 48시간 동안 배양한 뒤 형성된 균락을 계측하여 colony forming units (CFU/ml)로 나타내었다.

pH 및 적정 산도

시료 5 g에 멸균 증류수 45 ml를 가하여 균질화한 다음 여과지(Whatman No. 4)로 여과하여 사용하였다. 여과액 10 ml를 취하여 pH는 pH meter로 측정하였고 산도는 0.1 N NaOH를 이용하여 pH 8.3에 도달할 때까지 소비된 0.1 N NaOH의 양을 lactic acid (%)로 환산하여 나타내었다.

일반 성분 분석

일반 성분은 AOAC법에 준하여 측정하였다[1]. 즉, 수분은 시료를 105°C 상압건조법, 회분은 550°C에서 직접회화법을 이용하여 분석하였다. 조단백질은 Kjeldahl법($N \times 6.25$)으로 자동단백질분석기(Kjeltec 2400, AUT Foss Tecator, Sweden)로 분석하였다. 조지방은 Soxhlet법에 의해서 측정하였으며 조섬유는 효소중량법으로 측정하였다.

총당

시료 0.5 g에 25% HCl (v/v water) 1 ml와 증류수 9 ml를 첨가하여 100°C water bath에서 2시간 동안 산 분해시킨 후 여과지(Whatman filter paper No.2)로 여과하여 phenol-sulfuric acid법[7]으로 정량하였다. 즉 여과한 여액 1 ml에 5% phenol 1 ml와 95% H₂SO₄ 5 ml를 가하여 혼합한 후 15분간 상온 발색하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였으며 동일한 파장으로 작성한 glucose standard curve로부터 총당을 환산하여 glucose 농도로 표시하였다.

환원당

시료 1 g에 증류수 10 ml를 가하여 30°C에서 120 rpm으로 2시간 교반한 후 여과지(Whatman filter paper No.2)로 여과하여 DNS법[33]으로 정량하였다. 즉, 여과한 여액 1 ml에

3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) 시약 3 ml를 넣고 섞어준 뒤 90°C 끓는 수조에서 10분간 발색시킨 후 냉수에서 급냉하여 2분간 정지한 다음 535 nm에서 흡광도를 측정하였으며 동일한 과정으로 작성한 glucose standard curve로부터 총당을 환산하여 glucose 농도로 표시하였다.

유리아미노산 분석

시료 1 g에 70% ethanol 10 ml을 가하여 실온에서 24시간 진탕 추출한 후 4,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상등액은 50°C에서 감압 농축한 후 lithium citrate loading buffer (pH 2.2) 5 ml를 가하여 정용한 다음 0.22 µm membrane filter (Milipore Co., MA, USA)로 여과 후 아미노산 자동 분석기 (Biochrom 30 amino acid analyzer, Cambridge, UK)로 분석하였다.

결과 및 고찰

인공 위액에 대한 내성

프로바이오틱은 '장내 미생물 균형을 개선시키거나 면역계를 활성화시켜 소비자에게 유익한 영향을 미치는 살아있는 미생물 식품 보충제'라고 정의된다[11]. 그러나 이런 프로바이오틱이 식품으로 섭취되었을 때 여러 가지 건강증진 효과를 나타내려면 생체 내에서 생존할 수 있는 능력이 중요하다. 즉, 위의 낮은 pH와 소장의 담즙과 같은 악조건을 견디어 낼 수 있어야 한다[23]. 한편 Martini 등[31]은 섭취된 음식물의 완충 작용으로 인하여 위의 pH가 3.0이나 그 이상으로 다소 높아지기 때문에 pH 3.0에서의 생존율이 중요하다고 하였다. 본 실험에서는 *Lactobacillus sakei* 383 균주의 위액에 대한 내성을 알아보기 위하여 pH 2.5 및 pH 3.0으로 조정된 인공위액에서 3시간 동안 배양한 후 생존 정도를 조사하였다(Fig. 1). pH 2.5에서 *Lactobacillus sakei* 383의 초기 생균수는 8.04 log CFU/ml이었으나 시간이 지남에 따라 점차 사멸하여 3시간 경과 후에는

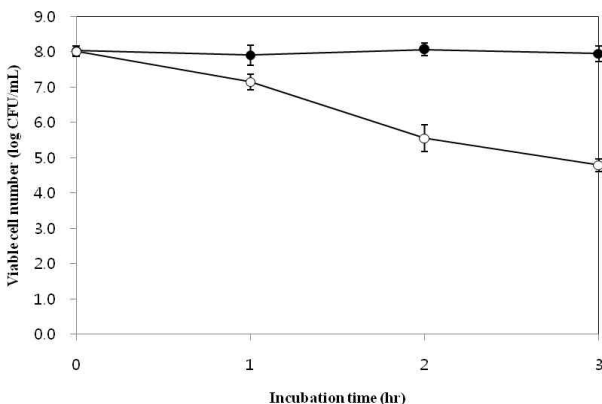


Fig. 1. Viability of *Lactobacillus sakei* 383 in artificial gastric juice. The bacterium was incubated in artificial gastric juice at pH 3.0 (●) and pH 2.5 (○) at 37°C for 3 hr.

약 60%의 생존율을 보였다. pH 3.0에서는 3시간 경과 후에도 전혀 사멸하지 않고 99%가 넘는 높은 생존율을 나타내었다. 김 등[21]은 *Lactobacillus* 균주는 위액에 대해 1% 내외의 생존율을 보인다고 보고하였는데 본 실험에 사용된 *Lactobacillus sakei* 383은 *Lactobacillus* 균주임에도 불구하고 99%의 높은 생존율을 나타내어 특이성을 보였다.

인공 담즙액에 대한 내성

식품과 함께 섭취된 프로바이오틱 미생물이 효과적으로 작용하기 위해서는 위액에 대한 내성뿐만 아니라 장내 담즙에 대한 내성도 있어야 한다[36]. 담즙산은 간에서 taurine이나 glycine과 결합하여 복합형 담즙산이 되며 장에서 유리형 담즙산으로 분해된다[32]. 담즙산과 아미노산의 결합은 어떠한 분해효소에 의해서도 분해가 되지 않고 bile salt hydrolase (BSH)라는 효소에 의해서만 분해되는 것으로 알려져 있다[15]. 장내 미생물 중에서는 *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* 등이 BSH를 가지고 있으며[16, 30] BSH 생성능이 있는 젖산균은 담즙을 탈 중합하여 생성된 taurine, glycine을 생육에 이용할 수 있다[2].

Lactobacillus sakei 383에 대한 담즙 내성 결과를 알아보기 위하여 인공 위액에서 3시간 동안 배양한 균체를 인공 담즙산에서 24시간 동안 배양하여 생존 정도를 알아보았다(Fig. 2). 배양 초에는 oxgall 농도에 관계없이 생균수가 증가하였다가 24시간 배양 시 생균수가 감소하였으며 oxgall 농도가 증가할수록 균의 생육이 저해되는 것으로 나타났다. 0.1% oxgall에서 24시간 배양 시 97%의 생존율을 보였으며 장내 담즙농도인 0.3% oxgall에서 배양 시 88%의 생존율을 나타내었다. 그보다 고농도인 0.5% oxgall에서는 85%의 생존율을 나타내었다. Gilliland 등[13]과 Flock 등[10]은 일반적으로 *Lactobacillus* 속의 미생물이 담즙산에 대한 내성이 약하다고 보고하였는데 본 실험에서 사용된 *Lactobacillus sakei* 383은 0.1, 0.3% oxgall

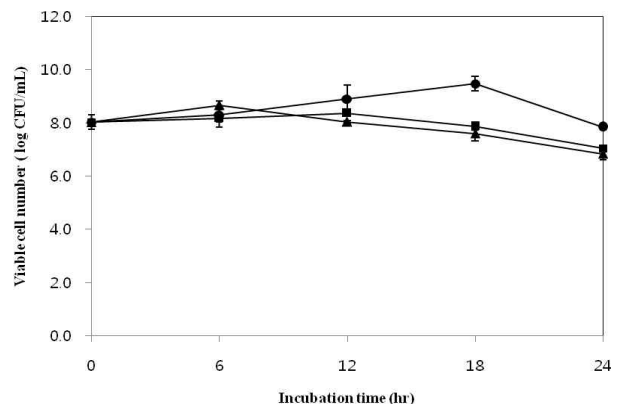


Fig. 2. Viability of *Lactobacillus sakei* 383 in bile juice. The bacterium was incubated in 0.1% (●), 0.3% (■) and 0.5% (▲) bile for at 37°C 24 hr after exposure to artificial gastric juice (pH 3.0) at 37°C for 3 hr.

뿐만 아니라 0.5% oxgall에서도 85%가 넘는 높은 담즙내성을 가지고 있었다. 따라서 *Lactobacillus* 속이라 할지라도 담즙산에 대한 내성이 다르다는 것을 확인할 수 있었으며 *Lactobacillus sakei* 383은 인공위액에서 생존이 가능하고 담즙에서도 높은 내성을 보였으므로 프로바이오틱 적용에 대한 잠재성을 확인할 수 있었다.

NaCl에 대한 내성

우리나라 사람들은 가공식품뿐만 아니라 조리해 소금(NaCl)을 사용하며 주로 김치류, 간장, 된장, 고추장, 젓갈 등의 소금함량이 높은 식품을 과다하게 섭취하고 있다. 2005년도 국민건강영양조사 결과[34] 한국인의 평균 나트륨 섭취량은 하루 5,279 mg으로 한국영양학회의 목표 섭취량인 2,000 mg의 두 배가 넘으며 소금 섭취량은 하루 13.4 g으로 세계보건기구(WHO) 일일 소금 섭취 권장량인 5 g의 거의 3배에 달하는 것으로 조사됐다. 이러한 NaCl 섭취에 노출된 현대인의 식생활 환경에서 *Lactobacillus sakei* 383이 생균제로서 역할을 하기 위해서는 NaCl에 대한 내성이 있어야 한다.

Lactobacillus sakei 383의 NaCl 농도에 따른 내성을 측정하기 위하여 NaCl을 0, 2, 4, 6, 8, 10%의 농도로 조정된 0.2% potassium phosphate에 균을 접종하여 37°C에서 4시간 배양 후 생균수를 측정하였다(Table 1). NaCl 4% 농도까지는 초기 균수 $5.34 \pm 0.02 \log \text{CFU/ml}$ 에서 $5.18 \pm 0.15 \log \text{CFU/ml}$ 로 4시간이 지난 후에도 비슷하게 유지하였으며 NaCl 농도 6% 이상부터는 생육이 저해되기 시작하여 10% 농도에서는 생육이 매우 저해되었다. 강[19]은 김치로부터 분리한 *Pediococcus pentosaceus* KL-6을 7%의 NaCl 농도에서 4시간 동안 배양하였을 때, 10^8CFU/ml 의 강한 내성을 나타내었다고 보고하였다. *Lactobacillus sakei* 383은 NaCl 농도 6% 내외의 식품과 함께 섭취 시 생균제로서의 작용을 할 수 있을 것으로 판단된다.

항균 활성

Table 1. Viability of *Lactobacillus sakei* 383 in NaCl solutions

Incubation time (hr)	NaCl (%)	Viable cell number (log CFU/ml)
0	0	5.34 ± 0.02^{bc}
	0	5.61 ± 0.10^a
4	2	5.42 ± 0.05^b
	4	5.18 ± 0.15^c
	6	3.26 ± 0.12^d
	8	1.74 ± 0.02^e
	8	1.74 ± 0.02^e
	10	0.85 ± 0.02^f

The bacterium was incubated in potassium phosphate including 0, 2, 4, 6, 8, 10% NaCl at 37°C for 4 hr.

Each value is mean \pm SD of three replicate experiments (n=3).

^{a-f}Means with the different letters are significantly different at $p < 0.05$ as Duncan's multiple range test.

Table 2. Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* 383 against various pathogenic bacteria

Pathogens	Antibacterial activity (mm)	
	<i>Streptococcus thermophilus</i> 40430	<i>Lactobacillus sakei</i> 383
A	+ (8.5 \pm 0.04)	++ (13.0 \pm 0.10)
B	- (7.5 \pm 0.01)	++ (12.5 \pm 0.15)
C	- (7.6 \pm 0.02)	- (7.8 \pm 0.01)
D	++ (12.0 \pm 0.12)	++ (12.5 \pm 0.08)
E	+ (9.0 \pm 0.05)	++ (12.5 \pm 0.02)

+: positive (clear zone diameter: 8~10 mm), ++: strong positive (clear zone diameter: 10~13 mm), -: negative. A: *Bacillus cereus*, B: *Listeria monocytogenes*, C: *Staphylococcus aureus*, D: *Escherichia coli*, E: *Salmonella typhi*

Each value is mean \pm SD of three replicate experiments (n=3).

식품에서 유산균은 발효식품의 맛과 발효산물의 특징을 결정하고 대사산물로 젖산 및 초산과 같은 유기산, hydrogen peroxide, bacteriocin 등의 항균물질을 생산하며 병원성 미생물과 부패균의 생육을 억제하여 식품보존성에 기여한다[26]. 현재 유산균의 항균물질에 관한 연구들이 활발히 진행되고 있으며 유산균의 항균효과는 식품을 비롯해 다양한 형태로 활용되고 있다. *Lactobacillus sakei* 383의 병원성 균주에 대한 항균력은 well diffusion method를 이용하여 저해환 형성 유무를 확인하였다(Table 2). 비교 균주로는 한국 미생물 보존센터에서 분양 받은 *Streptococcus thermophilus* 40430을 이용하였다. *Lactobacillus sakei* 383 균주는 *Listeria monocytogenes* 1421, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*의 성장을 억제하였다. 특히 *Streptococcus thermophilus* 40430은 나타내지 않은 *Listeria monocytogenes* 1421에 대한 항균력을 보였으며 다른 병원성 균주에 대해서도 *Streptococcus thermophilus* 40430보다 저해환이 크고 선명하게 나타나 항균력이 더 뛰어난 것으로 나타났다. 이상의 결과를 보았을 때 여러 병원성균에 대해 항균활성을 가지는 *Lactobacillus sakei* 383을 이용해 발효두부 제조 시 유해균의 번식을 억제할 수 있는 천연 보존제로서의 가능성을 확인할 수 있었다. 그러나 *Lactobacillus sakei* 383에서 나타난 항균력이 유기산에 의한 pH 영향 때문인지 bacteriocin 등에 의한 것인지는 더 깊은 연구가 필요할 것이라 사료된다.

Lactobacillus sakei 383로 제조한 soycurd의 특성

미생물의 변화

발효 전의 유산균 수는 $6.34 \log \text{CFU/ml}$ 으로 나타났지만 발효 초기인 12시간 사이에 활발하게 증식하여 약 4 log cycle 정도 증가하였다. 36시간 후에 약 $11.5 \log \text{CFU/ml}$ 로 균이 최대로 증식하였다가 이후에는 서서히 감소하여 72시간 후에는 $8.1 \log \text{CFU/ml}$ 을 나타내었다(Fig. 3). 이는 식품공전에 명시되어 있는 발효유 유산균 기준 $10^6/\text{ml}$ 을 넘는 수치였다.

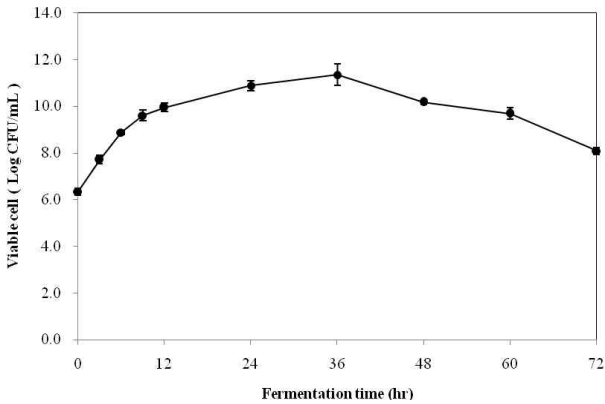


Fig. 3. Changes of viable cell number of soycurd fermented by *Lactobacillus sakei* 383. Soycurd was fermented by *Lactobacillus sakei* 383 at 35°C for 72 hr.

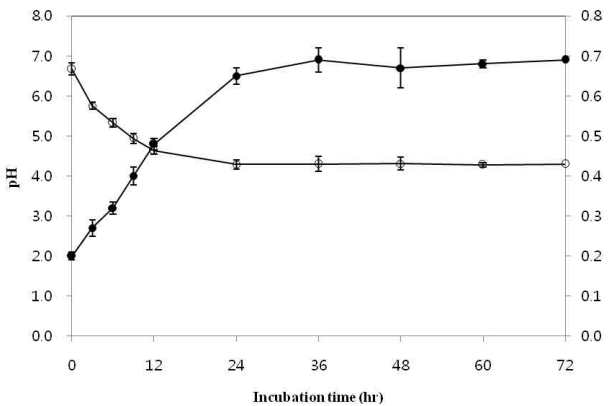


Fig. 4. Changes of pH and titratable acidity of soycurd fermented by *Lactobacillus sakei* 383. Soycurd was fermented by *Lactobacillus sakei* 383 at 35°C for 72 hr.

pH 및 적정산도

Lactobacillus sakei 383을 starter로 이용하여 35°C에서 제조한 soycurd의 발효시간에 따른 pH와 산도 변화는 Fig. 4와 같다. 발효시간이 증가함에 따라 pH가 급격하게 감소하여 24시간 발효 시 pH 4.3 정도를 나타내었으며 24시간 이후에는 pH의 변화가 없이 거의 일정하였다. 이는 soycurd를 제조하기 위해 두유에 접종시킨 *Lactobacillus sakei* 383이 유도기 없이 대수적으로 성장하면서 활발히 젖산을 생산하였기 때문인 것으로 보인다. 유산균은 대사과정에서 탄수화물을 혐기적으로 발효하여 젖산을 생성하며 pH를 저하시킨다. 보통 유산균은 균체의 증식과 함께 젖산이 생성되어 pH가 약 3.9~ 4.5 정도 까지 내려가는데 이는 *Lactobacillus sakei* 383의 pH 변화와 일치하였다. Soycurd의 시간에 따른 산도 변화는 pH 변화와 동일한 경향을 나타내었다. 발효가 진행 됨에 따라 산도는 0.2%에서 0.6%정도까지 증가하였다가 24시간 이후부터 pH가 일정해지면서 산도도 일정하게 유지되었다. 이는 유산균 배양에서 일반적으로 관찰되는 젖산 등의 유기산 생산에 따라

pH는 감소하고 산도는 증가하는 현상과 일치한다. Yang 등 [40]과 Oh 등[36]은 pH 감소는 주로 당을 발효 원으로 하는 각종 미생물의 대사 작용에 의한 유기산의 증가에 의한 것이라고 하였다. 발효식품의 starter를 선정하는 기준 중 영양가 적 측면은 사용하는 주재료에 따른 다양한 발효방식 때문에 식품마다 다르지만 저장성 향상을 위해서는 발효 초기 유기산 생산이 관건이다[28]. 따라서 *Lactobacillus sakei* 383은 발효초기에 빠른 pH 저하를 도와 soycurd의 저장성을 높일 수 있을 것으로 예상 된다.

일반성분 분석

Soycurd의 일반성분 분석 결과는 Table 3와 같다. Soycurd의 수분함량은 94.88±0.02%로 분석되었다. Chang 등[4]은 일반적으로 시판되고 있는 국산 두부의 수분함량이 75~82% 정도라고 보고하였으며 Egziabher 등[8]은 단단한 두부의 수분함량은 75~79%, 부드러운 두부의 수분함량은 82~88%라고 보고하였다. 회분 함량은 0.22±0.05%로 다소 낮은 함량을 나타내었는데 최[6]는 두부의 품질규격에서 회분은 7.0% 이하여야 한다고 하였다. 조단백질 함량은 2.38±0.07%로 분석되었으며 Zee [41]가 보고한 6~8%보다 낮은 함량이었다. 조지방 함량은 1.16±0.15%로 식품분석표[17] 제시된 2.7~5.5%에 비해 낮은 함량을 나타내었으며 Egziabher 등[8]과 Zee [41]는 3.5%의 지방을 함유한다고 보고한바 있다. 조섬유 함량은 0.03±0.01%로 나타났으며 식품분석표[17] 상에서 제시된 0.3%보다 10배 정도 낮은 함량이었다. 식품분석표에 따르면 대두에 비해 일반두부의 조섬유 함량은 현저히 낮은 것으로 나타나 있는데 이는 일반두부 제조 시 식이섬유가 비지와 함께 제거되어 두부에는 거의 남아있지 않음을 의미한다. *Lactobacillus sakei* 383를 이용해 발효한 soycurd의 경우 일반두부와 비교하여 수분을 제외한 일반성분이 모두 낮은 함량을 나타내었는데 이는 soycurd 제조 시 사용되는 두유 제조과정에서 대두 량에 비해 첨가하는 물의 양이 많았기 때문이라고 생각되며 물의 비율을 줄여 상대적으로 두유의 고형분 함량을 높인다면 일반두부와 비슷한 수준의 일반성분 함량을 나타낼 수 있을 것이라 사료 된다.

Table 3. Proximate composition of soycurd fermented by *Lactobacillus sakei* 383

Component	Soycurd (%)
Moisture	94.88±0.02
Crude ash	0.22±0.05
Crude protein	2.38±0.07
Crude fat	1.16±0.15
Crude fiber	0.03±0.01

Soycurd was fermented by *Lactobacillus sakei* 383 at 35°C for 18 hr.

Proximate composition was analyzed by AOAC method. Each value is mean±SD of three replicate experiments (n=3).

Table 4. Content of total and reducing sugar of soycurd fermented by *Lactobacillus sakei* 383

	Non-fermented soycurd (%)	Fermented soycurd (%)
Total sugar	1.712±0.122 ^a	0.616±0.009 ^b
Reducing sugar	0.037±0.006 ^a	0.028±0.005 ^b

Non-fermented soycurd: commercial tofu

Fermented soycurd: soycurd fermented by *Lactobacillus sakei* 383 at 35°C for 18 hr.

Each value is mean±SD of three replicate experiments (n=3).

^{a,b}Means within same row with the different letters are significantly different at $p<0.05$ as Duncan's multiple range test.

총당과 환원당

총당 및 환원당 함량은 시중에 판매되는 (주)풀무원 국산 콩 순두부를 비발효두부로 하여 *Lactobacillus sakei* 383으로 제조한 soycurd와 비교하였다(Table 4). 총당과 환원당 함량 모두 *Lactobacillus sakei* 383으로 제조한 soycurd에서 더 낮게 측정되었는데 이는 *Lactobacillus sakei* 383이 당을 영양분으로 사용하여 초산, 알코올 및 CO₂로 분해하여 총당 및 환원당 함량이 감소한 것으로 생각된다. Cho 등[5]은 배추김치 발효 중 환원당이 미생물의 작용으로 젖산, 초산 및 그 외 여러 물질들로 변하기 때문에 환원당 함량이 감소한다고 보고하였고, Kim 등[24] 또한 발효 시 미생물들이 당을 분해하여 에너지원으로 이용함으로써 총당 및 환원당이 감소한다고 보고하였다.

유리아미노산 분석

Lactobacillus sakei 383을 이용하여 35°C에서 18시간 발효시킨 soycurd의 아미노산은 15종이 검출되었으며 함량은 Table 5와 같다. 18시간 발효된 soycurd의 총 아미노산 함량은 47.31±3.63 mg/100 g으로 나타났으며, 그 중 필수 아미노산의 함량은 10.45±1.04 mg/100 g으로 전체 아미노산의 약 22%를 차지하였다. 필수 아미노산 중 tryptophan이 5.09±0.49 mg/100 g으로 가장 높았고, phenylalanine, leucine, lysine, valine, methionine 순이었으며 threonine과 isoleucine은 검출되지 않았다. 비필수 아미노산의 함량은 36.86±2.59 mg/100 g이었으며 arginine이 12.90±0.36 mg/100 g을 나타내어 가장 높았다. GABA의 함량은 8.65±0.40 mg/100 g이며 GABA의 전구체로 작용하는 glutamic acid는 5.76±0.86 mg/100 g으로 나타났다. GABA의 함량은 다양한 미생물의 발효에 의해 증가하며 쌀, 콩, 김치 등의 발효식품에서 분리한 유산균이 고농도의 GABA를 생산한다고 알려져 있다[37]. 본 연구에 사용된 *Lactobacillus sakei* 383는 GABA를 생산하는 김치유래 유산균으로 균주의 형태학적 및 생화학적 특성이 조사된 바 있다[20]. 한편 단맛을 내는 glycine, threonine, alanine 중에서는 alanine만 검출되었으며 2.63±0.03 mg/100 g을 나타내었다. Kim 등[28]은 우유를 첨가한 발효 두부에서 유리 아미노산 함량을 분석한 결과, 총 유리 아미노산이 발효초기에 비해 18

Table 5. Amino acid content of soycurd fermented by *Lactobacillus sakei* 383

	Amino acid	Soycurd (mg/100 g)
Essential amino acid	L-Threonine	ND
	L-Valine	0.52±0.03
	L-Methionine	0.25±0.05
	L-Isoleucine	ND
	L-Leucine	1.56±0.10
	L-Phenylalanine	2.28±0.33
	L-Lysine	0.75±0.04
	L-Tryptophan	5.09±0.49
	Non-essential amino acid	L-Asparagine
L-Glutamic acid		5.76±0.86
L-Serine		ND
Glycine		ND
L-Alanine		2.63±0.03
L-Cystine		2.11±0.48
L-Tyrosine		1.42±0.11
β-Alanine		0.76±0.02
L-Homocystine		ND
Ethanolamine		ND
δ-Hydroxylysine		ND
L-Ornithine		ND
L-Histidine	1.02±0.15	
L-Arginine	12.90±0.36	
L-Aspartic acid	1.61±0.18	
GABA	8.65±0.40	
Total amino acids		47.31±3.63

Soycurd was fermented by *Lactobacillus sakei* 383 at 35°C for 18 hr.

ND: Not detected

Each value is mean±SD of three replicate experiments (n=3).

배 정도 증가하였고 필수 아미노산은 32배 정도 증가하였다고 보고하였다. 따라서 *Lactobacillus sakei* 383으로 발효한 soycurd는 영양학적으로 우수한 발효식품이라고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구되었기에 이에 감사드립니다.

References

1. AOAC. 1997. Official Methods of Analysis. pp. 5-37, 17th eds., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
2. Begley, M., Hill, C. and Gahan, C. G. M. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* **72**, 1729-1738.
3. Cha, S. K. 2000. Probiotic microorganisms and lactic acid

- bacterial foods. *Korean J Microbiol* **26**, 13-21.
4. Chang, C. I., Lee, J. K. and Kim, W. J. 1990. Comparison of soybean varieties for yield, chemical, and sensory properties of soybean curd. *Korean J Food Sci Technol* **22**, 439-444.
 5. Cho, Y. and Lee, H. S. 1991. Effect of lactic acid bacteria and temperature on *Kimchi* fermentation. *Korean J Soc Food Sci* **7**, 15-21.
 6. Choi, K. S. 1988. Some problems against tofu goods-composition and market circulation system. *Korea Soybean Digest* **5**, 1-2.
 7. Dubois, M., Gillers, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal Chem* **28**, 350-352.
 8. Egziabher, A. G. and Summer, A. K. 1988. Preparation of high protein curd from Fild Peas. *Korean J Food Sci* **48**, 375-377.
 9. Fazeli, M. R., Amin, G., Attari, M. M. A., Ashtiani, H., Jamalifar, H. and Samadi, N. 2007. Antimicrobial activities of Iranian sumac and avishan-e shirazi (*Zataria multiflora*) against some food borne bacteria. *Food Control* **18**, 646-649.
 10. Flock, M., Binder, H. J., Filbum, B. and Gershengoren, W. 1992. The effect of bile acids on intestinal microflora. *Am J Clin Nutr* **25**, 1418-1423.
 11. Fuller, R. 1989. A review, Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* **66**, 365-378.
 12. Gilliland, S. E. 1979. Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J Food Prot* **42**, 164-167.
 13. Gilliland, S. E., Staley, T. E. and Bush, L. T. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *J Dairy Sci* **67**, 3045-3049.
 14. Goldin, B. R. 1998. Health benefits of probiotics. *Br J Nutr* **80**, 203-207.
 15. Gopal-Srivatava, R. and Hylemon, P. B. 1988. Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium perfringens*. *J Lipid Res* **29**, 1079-1085.
 16. Grill, J. P., Schneider, F., Crociani, J. and Ballongue, J. 1995. Purification and characterization of conjugated bile salt hydrolase from *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2577-2582.
 17. Joo, H. K., Jao, H. Y., Park, C. K., Cho, G. S., Chai, S. S. and Ma, S. C. 2000. *Methods of Food Analysis*. pp. 600-604, Hakmunsa, Seoul, Korea.
 18. Kang, D. G., Kang, S. P., Chang, D. H., Kim, S. H. and Yoon, S. S. 2001. Isolation and characterization of *Lactobacillus* strains isolated from Korean feces. *Korean J Food Sci Technol* **33**, 567-573.
 19. Kang, K. M. 2010. Effect of on the quality characteristics and anti-oxidative activity of fermented tofu inoculated with lactic acid bacteria. M. D. dissertation, Catholic University, Daegu, Korea.
 20. Kim, E. A., Mann, S. Y., Kim, S. I., Lee, G. Y., Hwang, D. Y., Son, H. J., Lee, C. Y. and Kim, D. S. 2013. Isolation and identification of soycurd forming lactic acid bacteria which produce GABA from *Kimchi*. *Korean J Food Preserv* **20**, 705-711.
 21. Kim, G. B., Lee, J. H., Lim, K. S., Huh, C. S., Bae, H. S., Baek, Y. J. and Kim, H. U. 1999. Bile salt deconjugation activity of *Lactobacillus* strains isolated from yogurt products. *Korean J Appl Microbiol Biotechnol* **27**, 385-390.
 22. Kim, J. S. 1996. Current research trends on bioactive function of soybean. *Korea Soybean Digest* **13**, 17-24.
 23. Kim, K., Jang, K. I., Kim, C. H. and Kim, K. Y. 2002. Optimization of culture conditions and encapsulation of *Lactobacillus fermentum* YL-3 for probiotics. *Korean J Food Sci Technol* **34**, 255-262.
 24. Kim, K. O. and Kim, W. H. 1994. Changes in properties of *Kimchi* prepared with different kinds and levels of salted and fermented seafoods during fermentation. *Korean J Food Sci Tech* **26**, 324-329.
 25. Kim, S. J. 2005. Physicochemical characteristics of yogurt prepared with lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Korean J Food Culture* **20**, 337-340.
 26. Kim, S. Y., Kim, J. D., Son, J. S., Lee, S. K., Park, K. J. and Park, M. S. 2011. Biochemical and molecular identification of antibacterial lactic acid bacteria isolated from *Kimchi*. *Korean J Food Sci Technol* **43**, 446-452.
 27. Kim, T. Y., Kim, J. M., Yoon, I. H. and Chang, C. M. 1994. Changes in chemical components of soybean cheese making from cow's milk added soybean curd. *J Korean Soc Food Nutr* **23**, 837-844.
 28. Kostinek, M., Specht, I., Edward, V. A., Pinto, C., Egonlety, M., Sossa, C., Mbugua, S., Dortu, C., Thonart, P., Taljaard, L., Mengu, M., Franz, C. M. A. P. and Holzapfel, W. H. 2007. Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International J Food Microbiol* **114**, 342-351.
 29. Lee, J. J., Kim, A. R., Lee, H., Kim, C. H., Chang, H. C. and Lee, M. Y. 2011. Effects of soybean, *Cheonggukjang* and *Doenjang* on serum cholesterol level and weight reduction in rats fed a high-fat/high-cholesterol diet. *Korean J Food Preserv* **18**, 226-235.
 30. Lundeen, S. and Savage, D. C. 1992. Characterization of an extracellular factor that stimulates bile salt hydrolase activity in *Lactobacillus sp.* strain 100-100. *FEMS Microbiol Lett* **94**, 121-126.
 31. Martini, M. C., Bolweg, G. L. Levitt, M. D. and Savaiano, D. A. 1987. Lactose digestion by yoghurt β -galactosidase: Influence of pH and microbial cell integrity. *Am J Clin Nutr* **45**, 432-437.
 32. Midtvedt, T. 1974. Microbial bile acid transformation. *Am J Clin Nutr* **27**, 1341-1343.
 33. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 426-428.
 34. Ministry of Health and Welfare. 2006. The 3rd National Health and Nutrition Examination (KNHANES III).
 35. Moon, H. Y., Dong, M. K., Yong, H. K., Jung, H. K., Hong, B. and Myung, J. C. 2008. Antitumor activity of CBT-AK5 purified from *Lactobacillus casei* against sarcoma-180 infected ICR mice. *Korean J Dairy Sci Technol* **26**, 23-30.
 36. Oh, H. I. and Park, J. M. 1997. Changes in quality character-

- istics of traditional *kochujang* prepared with a *meju* of different fermentation period during aging. *Korean J Food Sci Technol* **29**, 1166-1174.
37. Oh, S. H., Moon, Y. J. and Oh, C. H. 2003. γ -Aminobutyric acid(GABA) content of selected uncooked foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **8**, 75-78.
38. Paik, H. D., Jung, M. Y., Jung, H. Y., Kim, W. S. and Kim, K. T. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD for oral bacteriotherapy of gastrointestinal disorders. *Korean J Food Sci Technol* **34**, 73-78.
39. Steele, M. G. 1992. The effect on serum cholesterol levels of substituting milk with a soya beverage. *Australian J Nutr Diet* **49**, 24-28.
40. Yang, S. H., Choi, M. R., Kim, J. K. and Chung, Y. U. 1992. Characteristics of the taste in traditional Korean soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **21**, 443-448.
41. Zee, J. A., Boudreau, A., Bourgeois, M. and Breton, R. 1988. Chemical composition and nutrition quality of Faba Bean (*Vicia Faba L. Minor*) based Tofu. *J Food Sci* **53**, 1772-1773.

초록 : 김치로부터 GABA를 생산하는 커드 형성 젖산균의 특성

김은아¹ · 맹소연¹ · 김수인¹ · 이가영¹ · 이병원² · 김동섭^{1*}

(¹부산대학교 식품공학과, ²농촌진흥청 두류유지작물과)

발효된 soycurd에서 가장 높은 GABA 함량을 나타낸 *Lactobacillus sakei* 383은 인공위액(pH 3.0)에서 3시간 경과 후에도 99%가 넘는 높은 생존율을 나타내었으며 0.3% oxgall이 함유된 MRS 배지에서는 88%의 생존율을 나타내었다. 또한 *Lactobacillus sakei* 383은 6% NaCl 이하로 함유된 배지에서 생육저해가 낮은 것으로 나타났다. *Lactobacillus sakei* 383은 저해환의 생성 유무를 통해 *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*를 포함한 다양한 병원균에 대항하는 항균물질을 생성함을 확인할 수 있었다. *Lactobacillus sakei* 383에 의해 발효된 soycurd의 발효 과정 중 품질 특성을 측정하였다. 생균수는 발효 36시간 후에 최대치(10^{11} CFU/ml)를 나타낸 후 서서히 감소하였다. *Lactobacillus sakei* 383에 의한 발효가 진행됨에 따라 soycurd의 산도는 증가하고 pH는 감소하였으며 12시간 이후에는 일정하였다. 수분, 조회분, 조단백, 조지방 및 조섬유의 함량은 각각 94.88 ± 0.02 , 0.22 ± 0.05 , 2.38 ± 0.07 , 1.16 ± 0.15 및 $0.03 \pm 0.01\%$ 을 나타내었으며 총당과 환원당의 함량은 비발효 두부 보다 *Lactobacillus sakei* 383에 의해 발효된 soycurd에서 더 높은 함량을 나타내었다. 필수아미노산과 비필수 아미노산의 함량은 10.45 ± 1.04 mg/100 g와 36.86 ± 2.59 mg/100 g을 나타내었다.