

## 관능이 개선된 발효두유 제조를 위한 젖산균 분리·동정 및 특성

정민기<sup>1</sup>, 김수인<sup>1</sup>, 허남윤<sup>2</sup>, 성종환<sup>1</sup>, 이영근<sup>1</sup>, 김한수<sup>1</sup>, 정현식<sup>1</sup>, 김동섭<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 식품공학과

<sup>2</sup>오산대학교 호텔조리계열

Received: November 13, 2015 / Revised: January 27, 2016 / Accepted: February 13, 2016

### Isolation, Identification, and Characteristics of Lactic Acid Bacteria for Production of Fermented Soymilk which Has Improved Sensory Quality

Min-Gi Jung<sup>1</sup>, Su-In Kim<sup>1</sup>, Nam-Youn Hur<sup>2</sup>, Jong-Hwan Seong<sup>1</sup>, Young-Geun Lee<sup>1</sup>, Han-Soo Kim<sup>1</sup>, Hun-Sik Chung<sup>1</sup>, and Dong-Seob Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 50463, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Hotel & Culinary Arts Division, Osan University, Osan 18119, Republic of Korea

In order to improve the sour taste and foul odor of fermented soymilk, bacteria were isolated from kimchi and identified. Of the 89 bacterial strains isolated from kimchi, 3 isolates produced fermented soymilk with a sour taste and foul odor. The selected bacterial strains R53, R83, and R84 were identified by morphological, biochemical, and 16S rRNA analyses as *Weissella koreensis*. The strain R83, which produced fermented soymilk having the mildest sour taste and foul odor, was selected for further investigation and named *W. koreensis* KO3. The optimum culture condition for the fermentation of soymilk by *W. koreensis* KO3 was at 30°C for 12 h. When soymilk was fermented under the optimum culture conditions, the viable cell count reached up to  $8.71 \times 10^8$  CFU/ml and pH and acidity reached as low as 6.02 and as high as 0.33%, respectively. Twenty-seven amino acids and their derivatives were detected in fermented soymilk. The amounts of serine, glycine, threonine, alanine, and aspartic acid, which contribute to a sweeter taste, increased during fermentation. Ornithine, which was not detected before fermentation, increased during fermentation. Sensory evaluation showed that *W. koreensis* KO3-fermented soymilk has improved bean, roasted nut, and sour flavors as well as an enhanced mouthfeel, appearance, preferability, and overall acceptability compared with those of standard fermented soymilk. With further study and development, soymilk fermented by *W. koreensis* KO3 could serve as a health-promoting food with favorable sensory qualities.

**Keywords:** Fermented soymilk, lactic acid bacteria, kimchi, *Weissella koreensis*, sour taste, foul odor

## 서 론

대두의 영양성분 함량은 단백질 36.2%, 지방 17.8%, 탄수화물 30.7%[46]로 구성되어 단백질의 90%가 수용성 glycinin이며, 탄수화물 20%가 섬유소, 지방 중 80% 이상이 불포화 지방산으로 구성되어 있다. 이외에도 대두에는 식물성 스테롤, 올리고당, 사포닌, 아이소플라본, 대두 펩타이드 등 많은 기능성 성분[19, 20, 23, 24, 47]들을 함유하고 있어 혈중 콜레스테롤 저하[57], 항암[49, 58], 면역 증강효과[36], 골다공

증[1–3], 폐경 증후군[3, 4], 심혈관질환[18] 등 다양한 생리 활성을 가진다.

대두를 이용한 식품으로는 두유, 두부, 청국장, 된장, 일본의 natto, 인도네시아의 temphe 등이 있으며[31], 그 중 두유는 대두를 분쇄하여 수용성으로 추출한 가공식품 중 하나로서, 양질의 단백질과 필수지방산이 풍부하고 유당을 함유하고 있지 않아 우유 알레르기에 대한 대용식품으로서 각광 받고 있다[13, 54].

통계청[56]에 따르면 국내 두유 시장은 1995–2005년의 연평균 생산량이 159,035 kl, 2000–2005년에는 177,336 kl로 연평균 성장률이 1.97%에서 5.05%로 증가한 것을 확인할 수 있으며 최근 2010–2014년도 연평균 생산량은 243,267 kl로 꾸준히 증가하고 있는 추세를 보이고 있다.

### \*Corresponding author

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

E-mail: kds@pusan.ac.kr

© 2016, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

대두는 높은 영양가와 기능성 성분들을 함유하고 있지만 낮은 소화율과 콩취로 인한 이취(off-flavor)가 식품선호도를 낮춘다고 알려져 있다. 이취의 생성 원인은 주로 lipoxygenase에 의한 것으로 이의 활성을 억제하기 위해 열처리법(hot-grinding method, rapid-hydration hydrothermal cooking)이나 기질추출법, 수증기 증류법 및 protease 처리법 등의 여러 방법이 시도되고 있으며[11, 30, 35]. 그 외 다른 방법은 두유를 발효시키면 이취를 개선하고 소화율과 기능성을 높일 수 있는 장점이 있다[44, 48]. 1934년 Kellogg가 처음으로 두유에 젖산균 발효를 시도하였으며 그 이후 많은 연구자들에 의해 국내외적으로 젖산균을 이용한 발효두유 연구가 활발히 진행되고 있다[55].

젖산균은 일반적으로 그람양성, 무아포, 비운동성으로서 구균 또는 간균 형태의 세균이다[15]. 젖산균은 탄수화물을 이용하여 젖산을 생성하는 미생물로서 오랫동안 산업에 이용되어 왔으며 발효 시 당, 단백질 및 지방성분 등을 이용하여 풍미를 증진시키고 영양학적 가치를 높여준다[43]. 또한, 유기산[43], 과산화수소[9, 12], diacetyl[27], 박테리옌 등의 물질로 인해 보존성을 증진시킨다[39]. 젖산균은 Schleifer와 Ludwig(1995년)에 의해 형태, 발효형식, 생육조건 등을 통해 *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* 속으로 분류되었다[50]. 균주에 따라 두가지 발효 방식을 거치는데, homolactic fermentation의 경우 Embden-Meyerhof-Parnas 경로를 거쳐 최종적으로 lactic acid를 생성해내며, heterolactic fermentation의 경우 phosphoketolase 경로를 거쳐 CO<sub>2</sub>, lactic acid, acetate, ethanol을 생성하는 것으로 알려져 있다. homo type 젖산균으로는 *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* 속과 group I, II lactobacilli가 있으며 hetero type 유산균에는 *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* 속, group III의 lactobacilli가 해당된다[14].

한편, 김치는 배추나 무를 주원료로 하여 저농도의 소금에 절여 파, 마늘, 젓갈, 생강 등의 양념을 혼합하여 발효시킨 우리나라의 대표적인 전통 발효식품으로 최근에는 김치의 효능에 관한 연구가 활발해지면서 김치 발효과정에 관여하는 젖산균에 대한 관심이 높아지고 있다. 김치 발효 젖산균으로는 *Lactobacillus* 속, *Pediococcus* 속, *Streptococcus* 속, *Leuconostoc* 속, *Weissella* 속 등의 주요 발효균이 있으며 이들이 김치 발효에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[10, 21, 22, 41]. 이러한 김치 젖산균들은 항균[38], 항암[29, 34], 항진작용[7] 및 지질개선[52], 면역기능 강화[52, 53] 등의 다양한 건강 증진 기능이 보고되고 있다.

앞서 연구되었던 발효두유는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lab. bulgaricus*, *Lab. plantarum*, *Lab. paracasei*와 같은

젖산균을 이용하여 제조한 사례[25, 32, 42]가 있으나, 이는 젖산균 특유의 산미와 이취 때문에 발효두유로서 음용하기에는 무리가 있다. 따라서 본 연구에서는 선행 발효두유의 특유의 산미와 이취를 개선시키고 두유의 영양학적 가치를 높이기 위한 기초 연구로서 한국 전통발효식품인 김치로부터 젖산균을 분리 및 동정하고 발효두유를 제조하여 특성을 살펴보았다.

## 재료 및 방법

### 시료

시중에 판매되고 있는 김치와 가정에서 섭취하고 있는 김치를 수집하여 시료로 사용하였다. 수집한 시료의 김치 국물을 연속 희석하여 MRS(Becton, Dickison and Company, New Jersey, USA) 한천 평판배지에 도달한 후 30°C에서 24시간 동안 배양하여 서로 다른 형태의 균락을 분리하였다.

### 젖산균 분리

국산대두 100 g을 25°C에서 6시간 물에 불린 다음 물기를 제거하고 증류수 800 ml를 넣고 마쇄 후 비지를 제거한 콩물을 121°C에서 15분간 살균시켜 두유를 제조하였다. 제조된 두유를 식힌 후 분리된 89주의 균주를 2% 접종하여 30°C에서 24시간 발효시켜 임의로 산미 이취를 생성하지 않는 균 3주를 분리했다.

### 분리균주의 염기서열 분석

분리된 균의 염기서열은 chelex bead를 이용한 boiling 방법으로 genomic DNA를 추출하였으며, 균의 16S rRNA를 universal primer인 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3') primer를 사용하여 PCR을 진행하였다. PCR 산물은 Big Dye Terminator v3.1 cycle sequencing kit(Applied biosystems, Lennik, Belgium)를 이용하여 ABI 3730XL DNA analyzer(Applied biosystems, Lennik, Belgium)로 염기서열을 분석하였다. 분석결과는 Genetyx program으로 pairwise alignment를 하여 GenBank에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 상동성을 비교하고 Bioedit program과 Mega software ver. 6.0을 이용하여 계통도를 나타내었다.

### 생화학적 특성

CO<sub>2</sub> 발생유무는 Durham tube이 들어간 시험관 MRS 액체배지에 분리된 균주를 준비된 시험관에 접종한 뒤 30°C에서 48시간 동안 배양하여 Durham tube 내의 가스 발생여부를 확인하였다.

Catalase 실험은 분리된 균주를 slide glass에 옮기고 3%

hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 2-3방울 떨어뜨려 산소발생 유무를 관찰하였다.

API 50 CHL kit(bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France)를 사용하여 분리 균주를 대상으로 49종의 탄수화물 이용성을 확인하였다. 배양된 분리균주를 API 50 CHL medium과 혼합한 뒤 스트립 튜브에 기포가 생기지 않게 분주하였다. 30°C에서 48시간 동안 호기적 배양 후 당 발효성에 따른 색 변화를 관찰하였다.

### 형태학적 특성

주사전자현미경(SEM) 이용하여 균의 형태를 관찰하기 위해 1시간 동안 2.5% glutaraldehyde로 전 고정 후 osmium tetroxide로 1시간 후 고정하였다. 탈수는 ethanol 50, 60, 70, 90, 100%를 단계별로 15분씩 탈수 후 hexamethyldisilazane(HMDS)로 건조시킨 시료를 SEM(SEM, HITACHI S3500N, Japan)으로 관찰하였다.

그람염색은 분리균주를 crystal violet으로 1분간 염색 후 Lugol 용액으로 다시 1분간 반응시켰다. 에탄올로 탈색 후 Safranin O로 30초간 대조염색 후 세척하여 광학현미경(×1,000)으로 관찰하였다.

### 분리균주의 최적배양조건

분리된 균주는 24시간 종배양하고 MRS 액체배지에 1% 접종한 주 배양액을 실험에 사용하였다. 배양액을 25, 30, 35, 37, 40°C의 온도로 24시간 3시간 간격으로 배양하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 발효두유에서의 미생물 생육변화

발효두유에서의 미생물 생육 변화를 관찰하기 위해 배양 온도를 달리하여 48시간 동안 발효시키면서 멸균된 증류수로 적절히 희석하여 6시간 단위로 MRS plate에 도말한 후 30°C에서 배양하였다. 생균수는 배양 후 생성된 colony를 계수하여 log<sub>10</sub> CFU/ml로 나타내었다.

### pH 및 적정산도 측정

pH는 온도와 시간을 달리하여 발효한 두유를 homogenizer로 균질화한 후 pH-meter(pH-200L, Istek, Korea)를 이용하여 측정하였다.

한편, 산도는 발효된 두유 10 ml에 distilled water를 10 ml를 첨가하여 충분히 교반 후 0.1 N NaOH를 가하여 최종 pH가 8.3이 될 때까지 적정하였다. 소요된 0.1 N NaOH 양을 다음의 계산식을 이용하여 젖산으로 환산하였다.

$$\text{Acidity (\%)} = \frac{\text{ml of 0.1 N NaOH} \times \text{factor} \times \text{dilution rate} \times 0.009}{\text{Weight of sample (ml)}} \times 100$$

### 일반성분 분석

발효두유의 일반성분은 수분은 105°C 상압가열건조법, 조회분은 직접회화법, 조지방은 속실텯 추출법, 조단백질은 킬달중류법, 조섬유는 헨네베르크 스트오만개량법을 이용하여 분석[5]하였다.

### 총당 및 환원당 정량

총당은 phenol-sulfuric acid법[16]을 이용하였다. 동결건조된 두유분말을 산분해 반응시킨 후 여과하였다. 일정한 농도로 희석한 여과액 1 ml, 5% phenol 1 ml, 그리고 진한황산 5 ml과 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총당 정량은 glucose를 일정농도로 희석 제조하여 표준곡선을 작성하여 계산하였다.

환원당은 DNS법[45]을 이용하였다. 두유분말을 증류수와 교반 후 10% trichloroacetic acid(v/v in water)를 소량 첨가하여 단백질을 침전시킨 후 여과하였다. 여과액을 일정량으로 희석하고 희석한 여과액 1 ml, 3,5-dinitrosalicylic acid 시약 3 ml을 혼합한 후 90°C 항온수욕조에서 10분간 발색 후 냉각한 다음 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 정량은 glucose를 일정 농도별로 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

### 아미노산 분석

시료 1 g에 70% 에탄올 30 ml를 넣고 실온에서 24시간 진탕 추출한 후 3,000 rpm에서 20분간 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 amino acid analyzer(Sykam, Germany)를 이용하여 분석하였다.

### 관능평가

선행 발효두유(대조구)와 분리균주로 발효한 두유를 콩취, 고소한 맛, 외관, 식감, 맛 선호도를 항목으로 하여 '1: 대단히 좋지 않다 2: 아주 좋지 않다 3: 보통으로 좋지 않다. 4: 약간 좋지 않다. 5: 좋지도 싫지도 않다. 6: 약간 좋다 7: 보통으로 좋다. 8: 아주 좋다 9: 대단히 좋다' 항목으로 나누어 9점 평점법으로 두 가지의 발효두유를 평가하였다.

### 통계처리

screening 과정을 제외한 모든 실험결과 값은 mean ± SD (standard deviation)로 나타내었다. 통계처리는 SPSS ver. 21.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하였다. 5% 수준에서 분석분석(ANOVA)을 이용한 Duncan's multiple range test 또는 paired t-test를 실시하여 유의적 차이를 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### 젖산균 분리

김치 국물을  $10^{-7}$  이상 희석한 각각의 시료를 MRS(Becton, Dickison and Company, New Jersey, USA) 한천 평판배지에 도말하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 서로 색깔, 모양이 다른 균락 89주를 분리하였다.

### 발효두유에서 산미이취가 없는 젖산균 분리

국산대두 100 g을 25°C에서 6시간 물에 불린 다음 물기를 제거하고 증류수 800 ml를 넣고 마쇄 후 비지를 제거한 콩물을 121°C에서 15분간 살균시켜 두유를 제조하였다. 제조된 두유를 약 40°C까지 식힌 후 1차 분리된 89주를 2% 접종하여 30°C에서 24시간 발효시켜 임의로 산미 및 이취를 생성하지 않는 균 3주(Strain No. R53, R83, R84)를 선별하였다.

### 발효두유 젖산균 분류 및 동정

발효두유 제조를 위해 분리한 3주의 균(Strain No. R53, R83, R84)을 동정하기 위해 염기서열 분석 및 생화학적·형태학적 분석을 실시하였다.

염기서열 분석에서, 선별균주와 표준 균주의 16S rRNA 상동성을 비교한 결과, 선별된 3주의 균들은 *Weissella koreensis* (accession number: CP002899)와 99% 일치하였다.

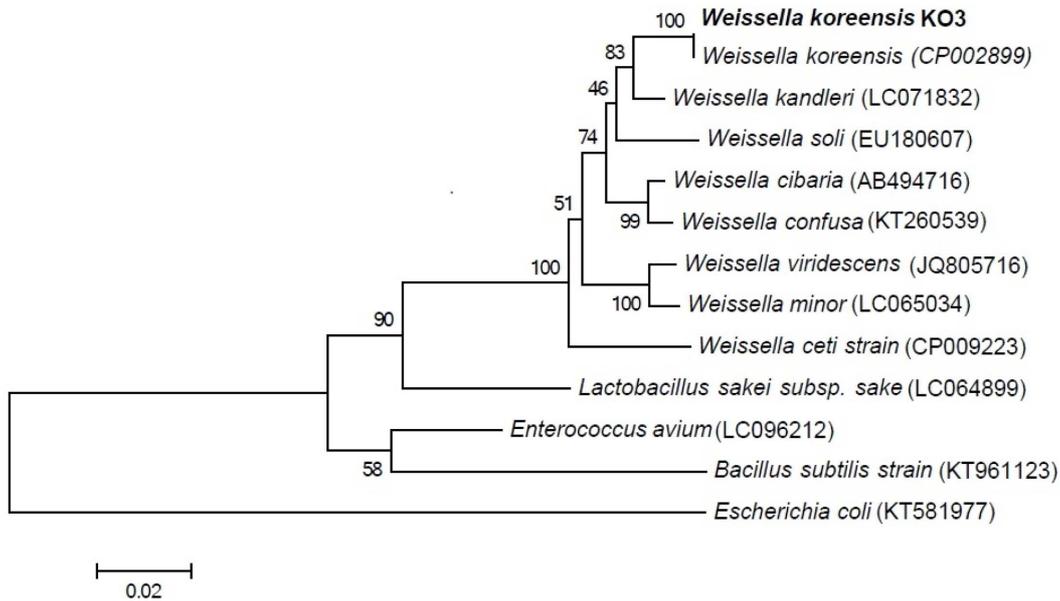
선별된 균주들의 형태학적 특성 생화학적 특성으로는 3주의 균 모두 gram positive, 포자를 형성하지 않는 구균 또는 단간균으로 관찰되었다. 그리고 당을 이용하여 CO<sub>2</sub>를 생성하였고 catalase negative 균으로 확인되었다.

API 50 CHL kit를 이용하여 당 발효성을 관찰한 결과 (Table 1) 3주의 균 모두 공통적으로 L-arabinose, D-ribose, D-glucose, D-mannose, N-acetylglucosamine, potassium 2-ketogluconate 이용하였으며 R53의 경우 D-galactose, R83의 경우 D-fructose, D-xylose, R84의 경우 D-xylose를 추가로 이용하여 발효하는 양상을 나타내었다. 일부 당 발효 양상을 제외하고는 대체적으로 일치하였으며 이러한 결과는 Yu[59]가 분리한 *W. koreensis* OK1-6의 당 발효양상 및 균주의 특성과 유사하였다. 염기서열 분석 결과 3주의 균은 *W. koreensis* 동정되었고, 당 발효 양상과 형태학적, 생화학적 분석 결과 차이가 거의 없기 때문에 최종적으로 3주의 균을 1개의 *W. koreensis* 그룹으로 분류하였다. 그리고 이 그룹에서 가장 이취·산미를 가장 적게 생성한다고 판단되는 Strain No. R83을 본 실험 균주로 사용하였으며, 이를 *W. koreensis* KO3로 명명하였다. 그리고 16S rRNA database를 토대로 유전학적 계통도를 작성하였다(Fig. 1).

**Table 1. Biochemical characteristics of the strains isolated from Kimchi.**

Characteristics	Reaction		
	R53	R83	R84
Glycerol			
Erythritol			
D-Arabinose			
L-Arabinose	+	+	w
D-Ribose	+	+	w
D-Xylose	-	+	+
L-Xylose			
D-Adonitol			
Methyl-βD-Xylopyranoside			
D-Galactose	w	-	-
D-Glucose	+	+	+
D-Fructose	-	w	-
D-mannose	+	w	w
L-Sorbose			
L-Rhamnose			
Dulcitol			
Inositol			
D-Mannitol			
D-Sorbitol			
Methyl-αD-Mannopyranoside			
Methyl-αD-Glucopyranoside			
N-Acetylglucosamine	+	w	w
Amygdalin			
Arbutin			
Esculin ferric citrate			
Salicin			
D-Cellobiose			
D-Maltose			
D-Lactose			
D-Melibiose			
D-Saccharose (sucrose)			
D-Trehalose			
Inulin			
D-Melezitose			
D-Rafinose			
Amidon			
Glycogen			
Xylitol			
Gentiobiose			
D-Turanose			
D-Lyxose			
D-Tagatose			
D-Fucose			
D-Arabitol			
L-Arabitol			
potassium gluconate			
potassium 2-ketogluconate	+	w	w
potassium 5-ketogluconate			

+: positive reaction, -: negative reaction, w: weak positive



**Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequence of strains isolated from Kimchi.** The sequences have been retrieved from the NCBI, showing the phylogenetic relationships of *W. koreensis* KO3 and other related microorganisms found in the GenBank database. The numbers indicate 1,000 bootstrap values for the branch points.

**Table 2. Effect of different incubation temperature on growth of *W. koreensis* KO3 for 24 h.**

Temperature (°C)	Absorbance (OD <sub>600</sub> nm)								
	0 h	3 h	6 h	9 h	12 h	15 h	18 h	21 h	24 h
25	0.21 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.23 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.78 ± 0.00 <sup>d</sup>	1.38 ± 0.01 <sup>e</sup>	1.55 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.68 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.76 ± 0.01 <sup>h</sup>	1.82 ± 0.01 <sup>i</sup>
30	0.21 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.01 <sup>c</sup>	1.17 ± 0.01 <sup>d</sup>	1.60 ± 0.00 <sup>e</sup>	1.73 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.83 ± 0.01 <sup>g</sup>	1.87 ± 0.01 <sup>h</sup>	1.88 ± 0.00 <sup>i</sup>
35	0.21 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.00 <sup>c</sup>	1.00 ± 0.00 <sup>d</sup>	1.40 ± 0.00 <sup>e</sup>	1.55 ± 0.00 <sup>e</sup>	1.64 ± 0.00 <sup>g</sup>	1.68 ± 0.00 <sup>i</sup>	1.65 ± 0.00 <sup>h</sup>
37	0.21 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.24 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.57 ± 0.00 <sup>c</sup>	1.07 ± 0.00 <sup>d</sup>	1.45 ± 0.00 <sup>e</sup>	1.58 ± 0.00 <sup>f</sup>	1.69 ± 0.00 <sup>g</sup>	1.73 ± 0.00 <sup>h</sup>	1.72 ± 0.01 <sup>h</sup>
40	0.21 ± 0.00 <sup>de</sup>	0.19 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.20 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.21 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.21 ± 0.00 <sup>d</sup>	0.21 ± 0.00 <sup>de</sup>	0.21 ± 0.00 <sup>ef</sup>	0.21 ± 0.00 <sup>ef</sup>

<sup>a-i</sup>Means in the same row with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Values are means ± standard deviation of three independent experiments.

### 분리균주의 최적배양조건

*W. koreensis* KO3의 최적 배양 온도와 시간을 알기 위해 종 배양액을 MRS 배지에 1% 접종한 후 25°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C 온도별로 24시간 동안 배양하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다(Table 2).

*W. koreensis* KO3은 25–37°C까지 잘 자랐으며, 3–12시간 사이에서 급격한 성장을 보이며 이후에는 점차 성장속도가 감소하여 24시간에서 가장 높은 생육을 나타내었다. 온도별, 시간별 생육도를 비교하였을 때 분리균주의 최적 배양 조건은 30°C, 9시간으로 정하였다.

### *W. koreensis* KO3를 이용한 최적 발효 두유 제조

최적 발효두유 조건 알아보기 위해 *W. koreensis* KO3 주 배양액을 두유에 2%씩 접종하여 온도별 시간별 생균수를 측

정하였다(Table 3).

30°C에서 가장 빠른 생육을 나타내 12시간까지 발효 했을 때 생균수가  $8.71 \times 10^8$  CFU/ml로 가장 높았으며 그 이후에는 생균수가 비슷한 수준을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 식품공전에서 명시된 발효유 유산균 기준  $10^6$  CFU/ml을 훨씬 넘는 수치였다. 온도 및 시간별 생균수를 비교하였을 때 발효두유 제조를 위한 최적 조건은 30°C, 12시간으로 정하였다.

### pH 및 산도

최적 발효조건에서 배양시간에 따른 pH 및 산도의 관찰 결과는 Fig. 2, Fig. 3과 같다. pH 및 산도는 발효시간 경과에 따라 유의적으로 감소하였으며 산도는 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 이는 젖산균 배양에서 일반적으로 관찰

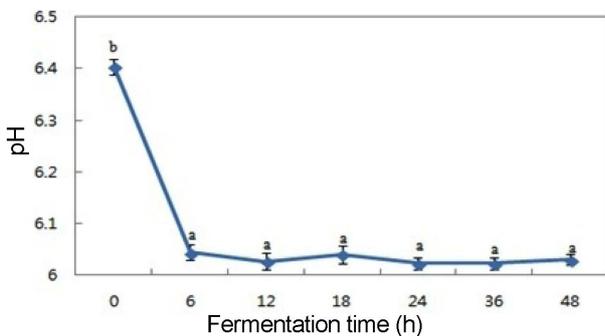
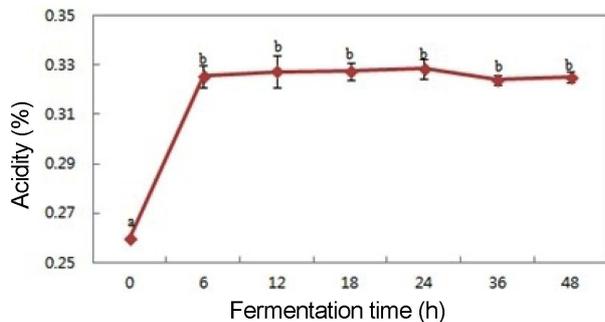
**Table 3. Viable microbial counts ( $\log_{10}$  CFU/ml) of soymilk fermented with *W. koreensis* KO3 at each temperature for 48 h.**

Temperature (°C)	$\log_{10}$ CFU/ml change						
	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	36 h	48 h
15	$6.09 \pm 0.02^a$	$7.61 \pm 0.02^b$	$8.31 \pm 0.01^c$	$8.63 \pm 0.03^d$	$8.77 \pm 0.06^e$	$8.75 \pm 0.02^e$	$8.61 \pm 0.07^d$
20	$6.09 \pm 0.21^a$	$8.00 \pm 0.04^b$	$8.50 \pm 0.04^c$	$8.65 \pm 0.03^d$	$8.72 \pm 0.02^e$	$8.72 \pm 0.02^e$	$8.82 \pm 0.01^f$
25	$6.09 \pm 0.02^a$	$8.24 \pm 0.03^b$	$8.65 \pm 0.01^c$	$8.71 \pm 0.03^{cd}$	$8.76 \pm 0.05^d$	$8.69 \pm 0.02^c$	$8.67 \pm 0.07^c$
30	$6.09 \pm 0.02^a$	$8.50 \pm 0.01^b$	$8.71 \pm 0.04^c$	$8.71 \pm 0.06^c$	$8.54 \pm 0.04^b$	$8.64 \pm 0.02^c$	$8.63 \pm 0.07^c$
35	$6.09 \pm 0.02^b$	$8.17 \pm 0.01^{cd}$	$8.62 \pm 0.01^e$	$8.26 \pm 0.02^d$	$8.12 \pm 0.03^c$	$6.10 \pm 0.09^b$	$4.36 \pm 0.10^a$

Values are means of  $\log_{10}$  CFU/ml in soymilk fermented with *W. koreensis* KO3 at different temperatures.

<sup>a-e</sup>Means in the same row with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Values are means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

**Fig. 2. Change in pH during fermentation at 30°C for 48 h with *W. koreensis* KO3.** <sup>a-b</sup>Means with different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).**Fig. 3. Change in titrable acidity at 30°C for 48 h with *W. koreensis* KO3.** <sup>a-b</sup>Means with different letter are significantly different ( $p < 0.05$ ).

되는 유기산 생산에 따라 pH는 감소하고 산도는 증가하는 현상과 일치하였다. 특히, 처음과 6시간 사이에 변화폭이 가장 컸으며 그 이후에는 pH 및 산도는 약 6.02, 0.33% 정도의 수준으로 이어졌다. pH가 약 3.9–4.2, 산도는 0.64–1.12%인 선행연구의 발효두유[36, 37]에 비해서 낮은 산 생성능력을 갖기 때문에 젖산균 특유의 산미가 없는 것을 확인할 수 있었다.

**Table 4. Proximate composition in soymilk fermented by *W. koreensis* KO3.** Unit (%)

Proximate composition	Non fermented soymilk	Fermented Soymilk
Mositure	$93.98 \pm 0.06$	$94.06 \pm 0.07$
Crude ash	$0.19 \pm 0.01$	$0.18 \pm 0.03$
Crude protein	$2.91 \pm 0.09^b$	$2.71 \pm 0.04^a$
Crude fat	$1.17 \pm 0.02$	$1.16 \pm 0.02$
Crude fiber	$0.04 \pm 0.00^b$	$0.01 \pm 0.00^a$

Soymilk was fermented by *W. koreensis* KO3 at 30°C for 12 h.

Values are means  $\pm$  standard deviation of three independent experiments.

<sup>a-b</sup>Means in the same row with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 일반성분

발효 전과 발효 후 두유의 일반성분은 Table 4에 나타나 있다. 발효 후 수분은 약 94.06%, 조회분은 0.18%, 조지방은 1.16% 조단백질은 2.71%, 조섬유 0.01%로서 조회분, 지방, 수분은 차이가 없지만 조단백질과 조섬유의 함량은 차이가 있었다. 발효 후 단백질의 경우 2.91%에서 2.71%로 감소하였고, 조섬유의 경우 0.04%에서 0.01%로 감소하였다. 조단백질의 경우 유산균의 단백질 분해효소에 의해 분해되어 각종 peptide와 아미노산들이 생성되었을 것이라고 생각되며, 조섬유의 경우 유산균의 섬유소분해효소(cellulase) 작용에 의한 것으로 사료된다[26, 40].

### 총당 및 환원당 함량

발효한 두유와 발효 전 두유(대조구)의 총당 및 환원당 결과값은 Table 5에 나타내었다. 대조구에 비해서 총당은 거의 차이는 없었으나, 단당류, 엿당, 젖당 등에 속하는 환원당은 0.062%에서 0.052%로 약 16.1% 감소하였다. 이러한 차이는 유산균이 증식하면서 영양원으로 환원당을 이용하였기 때문이라는 보고와 유사하였다[36].

**Table 5. Contents of total and reducing sugar in soymilk fermented by *W. koreensis* KO3.**

	Unit (%)	
	Total sugar	Reducing sugar
Non-fermented soymilk	0.72 ± 0.032 <sup>a</sup>	0.062 ± 0.002 <sup>b</sup>
Fermented soymilk	0.675 ± 0.026 <sup>a</sup>	0.052 ± 0.001 <sup>a</sup>

Soymilk was fermented by *W. koreensis* KO3 at 30°C for 12 h. Values are means ± standard deviation of three independent experiments.

<sup>a-b</sup>Means with different superscript letter within column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 아미노산 함량

*W. koreensis* KO3를 이용하여 30°C에서 12시간 발효한 두유의 아미노산 분석을 실시한 결과 총 27종의 아미노산 및 유도체들이 확인되었다(Table 6). 발효 전에 비해 대부분의 아미노산들은 유의적으로 증가, 감소하는 경향을 나타냈으며 필수 아미노산 중에서는 L-valine이 22.80 ± 0.80 mg/100 g으로 가장 높았으며 L-tryptophan은 검출되지 않았다. 그리고 단맛을 가지는 아미노산[33]으로 L-serine, L-glycine, L-threonine, L-alanine, L-aspartic acid은 발효 전 보다 증가하였으며 특히, glycine보다 단맛이 강하고 감칠맛 상승효과

**Table 6. Amino acid content of soymilk fermented by *W. koreensis* KO3.**

(Unit : mg/100 g)

Amino acid		Non-fermented soymilk	Fermented soymilk
Essential amino acid	L-Threonine	10.00 ± 1.00 <sup>a</sup>	14.00 ± 0.50 <sup>b</sup>
	L-Valine	16.00 ± 1.00 <sup>a</sup>	22.80 ± 0.80 <sup>b</sup>
	L-Isoleucine	9.00 ± 0.95 <sup>a</sup>	13.40 ± 0.40 <sup>b</sup>
	L-Leucine	13.00 ± 1.00 <sup>b</sup>	9.00 ± 0.10 <sup>a</sup>
	L-Methionine	6.30 ± 0.58 <sup>b</sup>	4.90 ± 0.32 <sup>a</sup>
	L-Tryptophan	N.D	N.D
	L-Lysine	6.50 ± 0.50 <sup>a</sup>	12.00 ± 1.00 <sup>b</sup>
	L-Phenylalanine	18.50 ± 0.50 <sup>b</sup>	10.70 ± 0.64 <sup>a</sup>
Non-essential amino acid & derivatives	Phosphoserine	6.00 ± 1.00	5.80 ± 0.25
	Taurine	2.00 ± 1.00	2.60 ± 0.53
	L-Aspartic acid	19.60 ± 0.53 <sup>a</sup>	26.50 ± 0.50 <sup>b</sup>
	L-Serine	10.00 ± 1.00 <sup>a</sup>	13.50 ± 0.50 <sup>b</sup>
	Asparagine	44.70 ± 1.53 <sup>b</sup>	35.60 ± 0.50 <sup>a</sup>
	L-Glutamic acid	42.00 ± 2.00 <sup>a</sup>	51.20 ± 1.04 <sup>b</sup>
	L- $\alpha$ -Aminoadipic acid	5.40 ± 0.53	5.90 ± 0.12
	L-Proline	11.80 ± 0.76	13.30 ± 1.15
Non-essential amino acid & derivatives	L-Glycine	9.20 ± 0.25 <sup>a</sup>	13.50 ± 0.50 <sup>b</sup>
	L-Alanine	26.00 ± 1.00 <sup>a</sup>	62.60 ± 0.51 <sup>b</sup>
	L-Citrulline	1.00 ± 0.10 <sup>a</sup>	7.80 ± 0.25 <sup>b</sup>
	$\beta$ -Alanine	7.50 ± 0.43 <sup>a</sup>	5.20 ± 0.76 <sup>b</sup>
	DL- $\beta$ -Aminoisobutyric acid	6.00 ± 0.53	6.70 ± 0.58
	$\gamma$ -Aminobutyric acid	55.00 ± 1.00 <sup>b</sup>	51.00 ± 1.00 <sup>a</sup>
	L-Histidine	10.70 ± 0.64 <sup>b</sup>	9.20 ± 0.26 <sup>a</sup>
	L-carnosine	40.70 ± 2.08	41.00 ± 1.00
	L-Ornithine	N.D	53.30 ± 2.08
	L-Arginine	97.30 ± 1.16 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.50 <sup>a</sup>
L-Tyrosine	N.D	N.D	
Total amino acid		474.20 ± 0.78	493.40 ± 0.58

All values are based on dry weight.

Values are means ± standard deviation of three independent.

<sup>a-b</sup>Means in the same row with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

N.D: Not Detected.

가 있다고 알려진 alanine의 경우에는  $26.00 \pm 1.00$  mg/100 g에서  $62.60 \pm 0.51$  mg/100 g으로 약 2.4배 증가하였다. 그리고 L-arginine, asparagine, L-phenylalanine, L-leucine이 감소하여 젖산균이 이러한 유리아미노산들을 생육인자로 이용하는 것을 확인할 수 있었다.

한편, 근육합성, 비만예방, 피부미용 등에 효과가 있다고 알려져 있는 ornithine[17, 28, 51]의 경우 발효 전에는 검출되지 않았으나, 발효 후  $53.30 \pm 2.08$  mg/100 g의 함량을 나타내어 기존에 없던 물질이 새로 생산된 것을 확인할 수 있었다. 본 실험의 arginine이  $97.30 \pm 1.16$  mg/100 g에서  $1.00 \pm 0.50$  mg/100 g 감소하였는데 이는 젖산균이 arginine deiminase(ADI) pathway를 통해 arginine을 분해하고 citrulline을 경유하여 ornithine, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>를 생성한다고 알려져 있으며[6, 8], ornithine이 생성된 것으로 보아 본 실험 균주가 ADI pathway를 통해 ornithine을 생성해냈다고 생각된다. 이외에도 *W. koreensis*의 ornithine 생성능에 관한 보고가 있어[59], 향후 젖산균의 ornithine을 생성 효소의 분리나 유전자에 대한 체계적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

### 관능평가

부산대학교 식품공학과 학생 20명을 대상으로 콩취, 고소한 맛, 신맛, 외관, 식감, 맛 선호도, 전반적인 바람직성을 항목으로 하여 관능검사를 실시한 결과는 Table 7과 같다. 점수가 1-9점으로 값이 높을수록 우수한 관능을 나타내는데, 선행 발효 두유에 비해 모든 항목에서 개선된 평가를 얻었다. 특히, 선행 발효두유와 비교해서 고소한 맛, 산미에 대해 큰 점수 차이를 나타냈으며, 외관과 식감에 있어서의 점수 차이는 선행 발효두유의 경우 높은 산 생성으로 인해 커드를 생성하기 때문이라고 생각된다. 또한 콩취, 맛 선호도, 두유로서 전반적인 바람직성 항목에서도 개선된 평가를 얻었다.

**Table 7. Sensory evaluation of soymilk fermented with *Lactobacillus sakei* 383 and *W. koreensis* KO3.**

Item	Strains	
	<i>L. sakei</i> 383 <sup>a</sup>	<i>W. koreensis</i> KO3 <sup>b</sup>
Beany flavor	$3.73 \pm 1.83$	$5.80 \pm 1.32$
Roasted nutty	$2.67 \pm 1.23$	$6.53 \pm 1.55$
Sour taste	$2.13 \pm 0.74$	$6.40 \pm 1.63$
Appearance	$4.47 \pm 1.68$	$6.67 \pm 1.23$
Mouthfeel	$4.26 \pm 1.70$	$6.33 \pm 1.23$
Flavor preference	$2.13 \pm 1.06$	$5.80 \pm 1.61$
Overall acceptability	$2.86 \pm 0.92$	$6.00 \pm 1.36$

All values are mean  $\pm$  SD of 20 replications.

<sup>a,b</sup>Means in the same row with different superscript letters are significantly at ( $p < 0.05$ ) between two groups.

다. 따라서 이러한 관능검사 결과와 앞서 실시한 pH 및 산도 그리고 유리 아미노산 결과를 토대로 볼 때 *W. koreensis* KO3로 제조한 발효두유는 음료로서 적합하다고 여겨지며, 추후에 기능성 성분에 대한 분석이 더 이루어진다면 새로운 형태의 건강기능식품이 될 가능성이 있다고 생각된다.

### 요약

본 연구에서는 선행 발효두유에서의 산미·이취를 개선시키기 위해 한국 전통발효식품인 김치로부터 젖산균을 분리 및 동정하였다. 분리된 89주의 균주 중 두유 발효 시 산미·이취를 생성하지 않는 균 3주(Strain No. R53, R83, R84)를 임의로 분리하였다. 생물학적, 형태학적 및 16S rRNA 유전자 염기서열 등과 같은 생화학적 분석 결과 최종적으로 3주의 균은 *W. koreensis* 동정되었다. 최종적으로 이 3주의 균 중 가장 산미·이취를 적게 생성하는 것으로 판단되는 Strain No. R83을 최종 실험 균주로 사용하였으며 이 균주를 *W. koreensis* KO3로 명명하였다. *W. koreensis* KO3을 이용하여 최적 발효두유를 제조하였으며 이화학적 특성을 알아보았다. 30°C에서 12시간 발효시켰을 때 생균수가  $8.71 \times 10^8$  CFU/ml로 가장 생육이 뛰어났으며, 이때의 pH와 산도는 각각 6.02, 0.33%를 나타내었다. 일반성분은 수분 94.06%, 조회분 0.18%, 조단백 2.71%, 조지방 1.16%, 조섬유 0.01%로 측정되었다. 아미노산 분석 결과 27종의 아미노산과 유도체들이 확인되었다. 단맛을 가지는 아미노산으로 알려진 serine, glycine, threonine, alanine, aspartic acid 함량이 증가하였고 발효 전에는 검출되지 않았던 ornithine이 생성되었다. 관능평가에 있어서는 선행 발효두유에 비해 모든 항목에서 개선된 평가를 얻었다. 따라서 관능검사, pH 및 산도 그리고 아미노산 분석을 결과를 토대로 볼 때 *W. koreensis* KO3로 제조한 발효두유는 음료로서 가능성이 있다고 생각되며 향후 연구를 통해 기능성 성분이 탐색된다면 새로운 형태의 건강식품개발의 기초 자료로서 활용 가능할 것으로 보인다.

### Acknowledgments

This work was supported by a 2-Year Research Grant of Pusan National University.

### References

- 1st International Symposium on the Role of Soy Preventing and Treating Chronic Disease. Mesa, Arizona. USA. February 20-23, 1994. *J. Nutr.* **125**: 567S-808S (1995).
- 2nd International Symposium on the Role of Soy Preventing and

- Treating Chronic Disease. 1998. Brussels, Belgium, September 15–18, 1996. *Am. J. Clin. Nutr.* **68**: 1329S–1544S.
3. 3rd International Symposium on the Role of Soy Preventing and Treating Chronic Disease. 2000. Washington DC, USA, October 31–November 3, 1999. Proceedings and abstracts. *J. Nutr.* **130**: 653S–711S.
  4. 4th International Symposium on the Role of Soy Preventing and Treating Chronic Disease. San Diego, USA, November 4–7, 2001. <http://www.aocs.org/meetings/soy/>. Accessed.
  5. AOAC. 1990. Official methods of analysis, 15th ed. *Association of Analytical Chemists*. Washington, DC.
  6. Arena ME, Saguir FM, de Nadra MM. 1999. Arginine, citrulline and ornithine metabolism by lactic acid bacteria from wine. *Int. J. Food Microbiol.* **52**: 155–161.
  7. Baek YJ. 1993. Lactic acid bacteria and human health. *Korean J. Food Nutr.* **6**: 53–65.
  8. Behr J, Gänzle MG, Vogel RF. 2006. Characterization of a highly hop-resistant *Lactobacillus brevis* strain lacking hop transport. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 6483–6492.
  9. Chang IS, Kim BH, Shin PK. 1997. Use of sulfite and hydrogen peroxide to control bacterial contamination in ethanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1–6.
  10. Choi HJ, Cheugh CI, Kim SB, Lee JC, Lee DW, Choi SW, et al. 2002. *Weissella kimchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium from Kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 507–511.
  11. Choi MJ, Heo TR. 1992. Hydrolysis of Lactose in whey by the Beta-D-Galactosidase. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 46–52.
  12. Hollins EB, Aramaki K. 1980. Production of hydrogen peroxide by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.* **63**: 353–357.
  13. Chou CC, Hou JW. 2000. Growth of bifidobacteria in soymilk and their survival in the fermented soymilk drink during storage. *Int. J. Food Microbiol.* **56**: 113–121.
  14. Collins MD, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow JAE, Martinez-Murcia A, et al. 1991. Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **77**: 5–12.
  15. De Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. **3**: 464–465.
  16. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers P, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* **28**: 350–356.
  17. Evain-Brion D, Donnadieu M, Roger M, Job J. 1982. Simultaneous study of somatotrophic and corticotrophic pituitary secretions during ornithine infusion test. *Clin. Endocrinol.* **17**: 119–122.
  18. Food and Drug Administration. 1999. Food labeling Health Claims; Soy protein and coronary heart disease. *Fed Regist.* **64**: 57699–57733.
  19. Graf E, Eaton JW. 1990. Antioxidant functions of phytic acid, free radic. *Biol. Med.* **8**: 61–69.
  20. Graf E, Eaton JW. 1993. Suppression of colonic cancer by dietary phytic acid. *Nutr. Cancer.* **19**: 11–19.
  21. Han HL. 1991. The ecology of Kimchi lactic acid bacteria. *Korean J. Microbiol.* **7**: 68–75.
  22. Han HU, Lim CR, Park HK. 1990. Determination of microbial community as an indicator of Kimchi fermentation. *Korean J Food. Sci. Technol.* **22**: 26–32.
  23. Harland BF, Oberleas D. 1987. Phytate in foods. *World Rev. Nutr. Diet.* **52**: 235–259.
  24. Henn RL, Netto FM. 1998. Biochemical characterization and enzymatic hydrolysis of different commercial soybean protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* **46**: 3009–3015.
  25. Hwang JE, An MJ, Lee HY, Lee BY, Kim HT, Ko JM, et al. 2014. Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* P1201 to produce soy-yogurt with enhanced antioxidant activity. *J. Food Sci. Technol.* **46**: 556–565.
  26. Jang MH, Kim MD. 2010. Exploration of  $\beta$ -glucosidase activity of lactic acid bacteria isolated from Kimchi. *Food Eng. Progress.* **19**: 243–248.
  27. Jay JM. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 525–532.
  28. Jeevanandam M, Holaday NI, Petersen SR. 1996. Ornithine-  $\alpha$ -ketoglutarate (OKG) supplementation is more effective than its component salts in traumatized rats. *J. Nutr.* **126**: 2141–2150.
  29. Jeong EJ, Kim JY, Moon SH, Park KY. 2010. Characteristics, antioxidative activities and growth inhibitory effects in AGS human gastric adenocarcinoma cells of soymilk fermented by *Bacillus subtilis* KC-3 during fermentation. *J. Food Sci. Nutr.* **39**: 1113–1118.
  30. Johnson LA, Deyoe CW, Hoover WJ. 1981. Yield and quality of soymilk processed by steam-infusion cooking. *J. Food. Sci.* **46**: 239–248.
  31. Jung DH, Sim SK. 1994. Fermented soybean foods. *Pond of intellect, Korea*. p.3.
  32. Jung HK, Kim ER, Yae HS, Choi SJ, Jung JY, Juhn SL. 2000. Cholesterol-lowering effect of lactic acid bacteria and fermented milk as probiotic functional food. *Food Ind. Nutr.* **5**: 29–35.
  33. Kang BS. 2015. Study on the correlation between amino acids and sensory characteristics in makgeolli brewing by means of electronic tongue and nose. Ph.D. Korea University. Korea.
  34. Kato L, Endo K, Yokokura T. 1994. Effects of oral administration of *Lactobacillus casei* on antitumor responses induced by tumor reaction in mice. *Int. J. Immunopharmacol.* **16**: 29–36.
  35. Kim CJ. 1988. Physico-chemical, nutritional, and flavor properties of soybean extracts processed by rapid-hydration hydrothermal cooking. *Retrospective Theses and Dissertations*. Paper 8857.
  36. Kim JS. 1996. Current research trends of bioactive function of soybean. *Korea Soybean Digest.* **13**: 17–24.
  37. Kim KO, Kim WH. 1994. Changes in properties of Kimchi prepared with different kinds and levels of salted and fermented seafoods during fermentation. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **26**: 324–329.
  38. Kim SJ. 2005. Physicochemical characteristic of Yogurt prepared with Lactic acid Bacteria Isolated from Kimchi. *Korean J. Food Culture.* **20**: 337–340.

39. Klaenhammer TR. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. *Biochimie*. **70**: 337–349.
40. Law J, Haandrikman A. 1997. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **7**: 1–11.
41. Lee JS, Lee KC, Ahn JS, Mheen TI, Byun YR, Park YH. 2002. *Weissella koreensis* sp. nov., isolated from Kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**: 1257–1261.
42. Lee S, Jang DH, Choi HJ, Park YS. 2013. Optimization of soymilk fermentation by the protease-producing *Lactobacillus paracasei*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **45**: 571–577.
43. Leroy F, De Vuyst L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* **15**: 67–78.
44. Lim SJ, Kho TT, Yoo JC. 1984. Manufacture of yogurt from soy protein concentrate. *Food Sci. Biotechnol.* **16**: 143–148.
45. Miller GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* **31**: 426–428.
46. Ministry of Food and Drug Safety Korea. Food and Nutritional Data base. <http://www.foodnara.go.kr>. Accessed.
47. Ramakrishna MBV, Mital BK, Gupta KC, Sand NK. 1989. Determination of phenolic acids in different soybean varieties by reversed high performance liquid chromatography. *J. Food Sci. Technol.* **26**: 154–155.
48. Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12**: 163–171.
49. Ryu KJ, Xin Z, Bak SS, Kim BK, Jeon JT, Park KY. 2008. In vitro anti-cancer effect of chungkukjangs from Folk Villages of SunChang region in HT-human colon cancer cells. *Cancer Prev Res.* **13**: 62–67.
50. Schleifer KH, Ludwig W. 1995. Phylogeny of genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**: 461–467.
51. Shi HP, Fishel RS, Efron DT, Williams JZ, Fishel MH, Barbul A. 2002. Effect of supplemental ornithine on wound healing. *J. Surgical Res.* **106**: 299–302.
52. Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani K, et al. 1988. *Lactobacillus Casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **115**: 278–287.
53. Shida K, Yasui H, Matsuzaki T, Yokokura T. 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. In *Lactic acid bacteria: Genetics, metabolism and applications*. Springer Netherlands. 383–389.
54. Shin HC, Seong HS, Sohn HS. 2004. The industrial development and health benefits of the soymilk. *Korean Soybean Digest.* **21**: 15–27.
55. Shurtleff W, Aoyagi A. 2012. *History of Soy Yogurt, Soy Acidophilus Milk and Other Cultured Soymilks (1918–2012)*. Soyinfo Center.
56. Statistics Korea. 2015. mining industry & manufacturing industry (1995–2015). <http://kostat.go.kr>. Accessed Nov. 30, 2015.
57. Sugano M, Goto S, Yamada Y, Yoshida K, Hashimoto Y, Matsuno T, et al. 1999. Cholesterol-lowering activity of various undigested fraction of soybean protein in rats. *J. Nutr.* **125**: 977–981.
58. Sung MK. 1996. The anticarcinogenic properties of soybeans. *Korea Soybean Digest.* **13**: 19–31.
59. Yu JJ, Park HJ, Kim SG, Oh SH. 2009. Isolation, identification, and characterization of *Weissella* strains with high ornithine producing capacity from Kimchi. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 339–345.