Screening and Identification of Soy Curd-Producing Lactic Acid Bacteria

Ro-Ui Kim¹, Soon-Cheol Ahn², Sun-Nyoung Yu², Kwang-Youn Kim², Jong-Hwan Seong¹, Young-Guen Lee¹, Han-Soo Kim¹ and Dong-Seob Kim^{1*}¹Department of Food Science & Technology, Pusan National University, Miryang 602-706, Korea²Department of Microbiology and Immunology, Pusan National University School of Medicine, Yangsan 626-870, Korea

Received October 15, 2010 / Accepted December 1, 2010

The purpose of this study was to isolate soy curd forming bacterial strains. Soy curd forming bacteria were isolated from Kimchi, a traditional Korean vegetable food that is fermented using lactic acid bacteria. Among 196 bacterial strains, ten isolates (strain No. 2-2-2, 2-15-2, 2-18-1, 2-19-2, 3-4-1, 3-4-2, 3-8-1, 3-8-3, 3-17-1, 4-39-5) formed firm soy curd. The isolated bacterial strains were identified by molecular biological and biochemical analyses. The genomic DNAs extracted from the isolated bacterial strains were used as a template for PCR amplification of 16S rDNA region. By comparing the results of the 16S rDNA sequences with GenBank data, the isolated strains were identified as *Leuconostoc mesenteroides* group and *Lactobacillus sakei* group. The phylogenetic position of soy curd forming strains and their related taxa were investigated using neighbor-joining method. *L. mesenteroides* group was further identified as *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* based on biochemical properties. *L. sakei* group was named *Lactobacillus* sp., because it showed a variety of biochemical properties.

Key words : Soy curd, lactic acid bacteria, identification

서 론

현대인들의 패스트 푸드, 육류 섭취의 증가로 인한 식생활의 변화가 비만증, 동맥경화증, 당뇨병과 같은 성인병을 증가시키는 심각한 문제로 대두되고 있다. 따라서 동물성 식품을 대체하기 위한 다양한 식물성 식품을 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

식물성 유래 식품의 대표적인 콩은 다양한 생리활성 물질을 가지고 있어서 현대인의 성인병 예방에 중요한 역할을 하고 있다[5,12,13]. 미국 식품의약안전국 (FDA)은 하루 콩 단백질 25 g 이상을 섭취하면 심장질환의 발생 위험을 줄일 수 있다고 보고하였으며[15], 미국인보다 약 20-50 배 정도 더 많은 대두를 섭취하는 아시아 국가들은 유방암과 전립선암의 발병률이 낮은 것으로 연구되었다[8,17]. 콩은 영양가가 높다고 알려져 있는 반면, 소화율이 낮고 콩 비린내를 유발하는 lipoygenase와 위와 장에서 gas를 생산하는 trypsin inhibitor, phytic acid 등이 함유되어 있어서 이를 개선하기 위해 콩을 발효하는 가공법이 시도되고 있다[9].

한편 유산균은 자연계에 널리 분포하며 여러 가지 식품을 발효시키는데, 특히 김치 유산균의 경우 혈중 콜레스테롤 저하, 면역 증강, 항암, 정장효과 등이 알려져 있다[20]. 요구르트는 단백질과 지방의 소화 흡수를 증진시키고, 유당의 소화를

돕고[10], 혈중 콜레스테롤을 저하시키며[11], 세균성 식중독 억제[2], 항암작용[18] 등을 나타내는 것으로 알려져 있다. 특히 유산균은 탈지 두유보다는 두유에서 우수한 생육을 보였으며[14], 두유에 유산균을 배양하면 생리 기능적 측면에서도 여러 가지 유효활성이 향상되는 것으로 보고되고 있다. 대표적인 예로써 항산화 활성 증가[19], 유산균의 β -glucosidase 활성에 의하여 대두 isoflavone 무배당체가 체내 흡수 속도가 빠른 isoflavone 무배당체(특히 daidzein, genistein, glycitein)로의 형태로 전환되며[3,4] γ -aminobutyric acid (GABA)와 유리 아미노산의 함량이 증가하는 것으로 알려져 있다[16].

발효된 두유는 우유보다 경제적이며 고단백의 높은 영양적 가치를 제공하는 이점을 가지고 있다[6]. 그러나 점차 다양해지고 있는 소비자의 요구와는 상반되게 시중에 판매되고 있는 요구르트의 형태는 우유를 이용한 액상 요구르트가 대부분이다. 액상형태의 요구르트와는 달리 curd 형태의 생산물은 영양학적 가치 외에도 치료적인 측면에서 개발되어 왔다[1]. 따라서 curd 형태의 두유 요구르트가 건강식품으로서 개발할 가치가 충분하다고 사료되어 두유를 순두부 형태의 식물성 요구르트로 만들고자 김치 유래 젖산균으로부터 두유를 curd 형태로 만드는 균을 분리하고 동정하였다.

재료 및 방법

시료

부산 지역의 가정에서 수거한 김치 국물 시료 56 개를 -20℃

*Corresponding author

Tel : +82-55-350-5356, Fax : +82-55-350-5359
E-mail : dskim1961@hotmail.com

에 보관하며 사용하였다. 멸균 증류수에 김치 국물을 적절한 배수로 희석한 뒤 MRS (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) 한천 평판배지에 도말하여 37℃에서 24 시간 평판배지에서 서로 다른 형태의 균락을 분리하였다.

젖산균의 분리

곡산대두 100 g과 증류수 1,000 ml를 두유제조기 (NSM-6200, 엔유씨전자, 대구, 한국)에 넣어 두부 기능(33 분)을 작동시키고 게르마늄 컵에 거름망 안에 비지를 제외한 두유를 50 ml씩 넣어 40~45℃로 식혔다. MRS 액체배지에 37℃에서 24 시간 배양한 196 개의 김치 유래 분리균주 배양액 100 µl (0.2%)를 준비한 두유에 접종하고 37℃에서 18 시간 배양하여 curd를 형성하는 균주들을 선별하였다.

분리균주의 분자생물학적 분석

두유에서 curd를 형성하는 균주를 MRS 액체배지에서 37℃에서 24 시간 동안 배양하여 Bacterial Genomic DNA Purification Kit (Dokdo-Prep, ElpisBiotech. Inc., Taejeon, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 16s rDNA의 gene은 thermal cyler (My Cycletm thermal cyler, Bio-Rad, California, USA)를 이용하여 증폭시켰다. 실험을 위한 PCR mixture는 20 pmol oligonucleotide primer bact_f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 1 µl와 20 pmol bact_r (5'-ACGGCTACCTTGTT ACGACTT-3') 1 µl, Taq polymerase (ElpisBiotech. Inc., Taejeon, Korea) 1U, 2.5mM deoxynucleoside triphosphate (Labo Pass, COSMO co, Ltd., Seoul, Korea) 1 µl, Taq polymerase를 위한 10× buffer 2 µl, 멸균증류수 14 µl, 주형 DNA 1 µl를 넣어 혼합하였다. 16s rDNA의 gene은 thermal cyler (My Cycletm thermal cyler, Bio-Rad, California, USA)를 이용하여 증폭시켰다. 조건은 95℃에서 initial denaturation시킨 다음 30 cycle로 95℃에서 1분 동안 denaturation, 60℃에서 1 분 동안 annealing, 72℃에서 1 분 동안 extension하고 마지막으로 72℃에서 10 분 동안 extension 시키고 4℃에서 보관하였다.

염기서열은 Genetex program으로 pairwise alignment를 하여 GenBank의 BLAST database에서 표준 균주의 DNA 크기가 1,200 bp 이상인 신뢰성 있는 데이터만을 선별하여 sequence match하였다. Genetex program과 Bioedit program을 이용하여 선별 균주와 표준 균주의 염기서열간의 multi-alignment를 수행하여 상동성을 비교하고, Bioedit program과 Mega software ver. 4.0을 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다. Distance option은 Kimura 2-parameter를 이용하였고 replication은 1,000 번하여 Neighbor-joining tree를 작성하였다.

분리균주의 생화학적 분석

API 50 CHL kit (bioMérieux sa, Marcy-l'Etoile, France)를

사용하여 선별균주를 대상으로 49 종의 탄수화물에 대한 발효능을 확인하였다. 선별균주를 MRS 액체배지에 30℃에서 24 시간 배양한 뒤 스트립 튜브에 분주하여 30℃에서 48 시간 동안 호기적으로 배양하였다. 실험 결과는 동정용 프로그램 ApiwebTM에서 확인하거나 Bergey's manual을 참고하였다.

CO₂ 생성을 확인하기 위하여 시험관에 MRS 액체배지 5 ml을 넣고 기포가 생기지 않게 Durham tube을 넣은 다음 12 1℃에서 15 분간 멸균하였다. 선별된 균주를 준비된 시험관에 접종한 뒤 30℃에서 48 시간 배양하여 Durham tube 내의 기포 발생 여부를 확인하였다.

분리균주의 형태학적 분석

Gram staining하기 위하여 slide glass에 선별된 균주를 약한 불로 고정하여 crystal violet 시약으로 1 분간 염색한 뒤 세척하고, Gram' iodine을 1 분간 처리하여 세척하였다. 마지막으로 95% 에탄올로 10~20 초 동안 탈색한 다음 세척하여 현미경으로 관찰하였다.

전자현미경으로 균의 형태를 관찰하기 위해서 1 시간 동안 2.5% glutaraldehyde로 1 차 고정하고 1 시간 동안 1% osmium tetroxide로 2 차 고정을 한 뒤, 10~15 분 동안 에탄올 (50, 70, 90, 95%)을 이용하여 단계별로 탈수하고 100% 에탄올로 10 분씩 2번 탈수하였다. Hexametyldisilazane (HMDS)으로 10 분씩 2 번 처리하여 시료를 air-dry한 후, 이온증착기 (hitachi E-1010, Japan)를 이용하여 백금이나 금으로 코팅하고 Scanning electron microscope (SEM, hitachi S-3500N, Japan)으로 관찰하였다.

분리 균주의 whole cell protein의 특성

선별된 균주를 MRS 액체배지에 접종하여 30℃에서 24 시간 배양한 후, 1 ml을 13,000 rpm으로 1 분간 원심분리하여 침전물을 멸균증류수로 2 번 세척하고 멸균 증류수 200 µl를 넣어 초음파쇄분쇄기(Sonics & Materials INC., Newtown, USA)를 이용하여 단백질을 추출하였다.

선별 균주로부터 단백질을 추출한 시료를 13,000 rpm으로 30 초간 원심분리하고 상등액 100 µl에 5× loading buffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.5 M DTT, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue, 50% glycerol)를 20 µl 첨가하여 12%, 15% polyacrylamide gel에 각 시료 30 µl씩 loading하고 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 뒤 0.05% Coomassie brilliant blue R-250 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)로 2 시간 동안 염색하고 destaining buffer I (40% methanol 160 ml, 10% acetic acid 40 ml), destaining buffer II (methanol 5% 20 ml, acetic acid 7% 28 ml)로 순차적으로 탈색하여 Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 나타나는 단백질 band를 분석하였다.

결과 및 고찰

두유 curd 형성 균주의 분리

김치로부터 분리하여 균락의 색깔, 모양이 서로 다른 196 개의 단일 균주 중 10 개의 균주(strain No. 2-2-2, 2-15-2, 2-18-1, 2-19-2, 3-4-1, 3-4-2, 3-8-1, 3-8-3, 3-17-1, 4-39-5)에서 순 두부와 같이 비교적 단단한 두유 curd를 형성하였다(Fig. 1A). 10 개의 균주를 제외한 다른 균주들은 두유에 접종 시 무른 curd가 형성되거나(Fig. 1B), 두유의 위층에 막이 형성되면서 그대로 부패되는 것이 관찰되었다(Fig. 1C).

두유 curd 형성 균주의 분자생물학적 분류와 동정

두유 curd를 형성하는 10 개의 균주(strain No. 2-2-2, 2-15-2, 2-18-1, 2-19-2, 3-4-1, 3-4-2, 3-8-1, 3-8-3, 3-17-1, 4-39-5)

Fig. 1. Soy curds formed by bacteria isolated from Kimchi. (A) strain No. 4-39-5 (hard-curd), (B) strain No. 3-12-2 (soft-curd), (C) strain No. 4-36-4 (pseudo-curd)

에서 얻어진 genomic DNA를 template으로 하여 16S rDNA를 PCR한 결과 1.5 kb의 PCR 산물을 얻을 수 있었다(data not shown). 선별 균주와 표준 균주의 16S rDNA 염기서열간의 상동성을 비교한 결과, 선별된 균주들은 *Leuconostoc mesenteroides*와 *Lactobacillus sakei* 등 2개의 group으로 동정되었다(Table 1).

그러나 *L. sakei* group과 선별된 4 개의 균주(strain No. 2-2-2, 3-8-1, 3-8-3, 3-17-1)의 homology는 99~100%로 나타났으나, *L. sakei* subsp. *carneus*, *L. sakei* subsp. *sakei* 등과 같이 16S rDNA 염기서열들간의 차이가 나타나지 않아 아종 수준의 정확한 동정이 되지 않았다(Fig. 2). 또한 *L. mesenteroides* group (strain No. 2-15-2, 2-19-2, 2-18-1, 3-4-1, 3-4-2, 4-39-5)의 경우에도 *L. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* 등 아종 간의 16S rDNA에 의한 염기서열들의 차이가 거의 없거나 전혀 없는 경우가 많아 구별이 쉽지 않을 뿐만 아니라 *L. mesenteroides*가 *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc kimchi* 등과도 비슷한 염기서열로 되어있어 정확한 균주의 동정을 위해 분자생물학적인 방법 이외의 추가 실험이 필요하였다.

두유 curd 형성 균주의 생화학적 분류와 동정

분리된 균주들을 분류, 동정하기 위해 API test를 한 결과, 16S rDNA 염기서열분석에서 *L. mesenteroides*로 동정된 선별 균주의 경우, Table 2와 같이 API test 결과 strain No. 2-19-2에서 보여지는 일부 탄수화물 발효 양상을 제외하고는 대체적으로 일치하여 API test로도 비교적 정확한 동정이 가능하였다. 반면에 16S rDNA에 의한 염기서열분석에서 *L. sakei*로 확인된 선별 균주의 경우에는 rhamnose, mannitol, α-methyl-D-glucoside, salicin, maltose, trehalose, raffinose, gentiobiose 등의 탄수화물 발효 양상에서 차이를 보여 분자생물학적 결과와 API test가 일치하지 않았으며(Table 3), API 50 CHL에서 확인할 수 있는 균주 목록에 포함되어 있지 않음을 확인할 수 있었다. 동일 균주일 경우에도 상태에 따라 탄수화물 발효가 일어나는 조건이 조금씩 다를 수 고려해 본다면 API test만으로 10 개의 선별 균주가 모두 다른 균주라고 단정짓는 것은 어려울 것이라 사료된다. 김치 젖산균의 경우 대표적인 몇몇의 균 이외의 균들은 연구가 많이 행해지지 않았으며 표준화된 동정방법이 부족한 실정이며 최근 일부 연구에서 API test로 동정되

Table 1. List of identified isolate strains by 16S rDNA analysis

Strain No.	Closest relative	% Identity	Gene bank accession number
2-15-2, 2-18-1, 2-19-2, 3-4-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	99~100%	GQ351322
3-4-2, 4-39-5	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	99%	GU130195
2-2-2, 3-8-1, 3-8-3, 3-17-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	99~100%	EU 794737

Fig. 2. Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of isolate strains. The branching pattern was generated by the neighbor-joining method. Bootstrap values are expressed as percentage of 1,000 replicates. The sequence of *Escherichia coli* served as outgroup sequence.

Table 2. Characteristics of carbohydrate fermentation of isolate strains by API 50 CHL

Carbohydrates	<i>L. mesenteroides</i>						<i>L. sakei</i>			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
L- Arabinose	+	+	+ ^W	+	+	+	+	+	+	+
Ribose	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+	+	+	+
D-Xylose	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	-	+ ^W	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	+	+ ^W	+ ^W
Mannitol	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	-	+	-	-
α-Methyl-D-glucoside	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
Amygdaline	+ ^W	+ ^W	+	+	-	+	-	-	+ ^W	-
Arbutine	+ ^W	+ ^W	+	+	+	+	-	+ ^W	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+ ^W
Cellobiose	+ ^W	+ ^W	+	+	-	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Lactose	+ ^W	+ ^W	-	+	-	+	+ ^W	+	+	+ ^W
Trehalose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Raffinose	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Gentiobiose	+ ^W	+ ^W	+	+	-	+ ^W	-	+	+	+
D-Turanose	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Gluconate	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+	+	+ ^W
2 Keto-gluconate	-	-	+ ^W	-	+ ^W	+ ^W	-	+ ^W	-	-
5 Keto-gluconate	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	+ ^W	-	-	-	-	-

+: positive, +^W: weak positive, -: negative

1: strain No. 3-4-1, 2: strain No. 4-39-5, 3: strain No.2-18-1, 4: strain No. 2-15-2, 5: strain No. 2-19-2, 6: strain No. 3-4-2, 7: strain No. 2-2-2, 8: strain No. 3-17-1, 9: strain No. 3-8-3, 10: strain No. 3-8-1

지 않는 젖산균이 상당수 존재하는 것으로 밝혀졌다[7]. 또한 김치 젖산균의 경우 동정 기준이 모호하고 균의 특성에 대한 연구가 부족하여 동정하는데 어려움이 많은 것으로 여겨진다. 특히 *L. sakei*의 경우 API test로도 확인할 수 없는 균주임을

감안할 때 젖산균의 탄수화물 발효연구와 같은 생화학적 방법의 연구가 더 많이 이루어져야 하며, 앞으로 명확한 젖산균 동정을 위한 분자 생물학적 동정과 생화학적 분석이 필요할 것으로 여겨진다.

Table 3. Identification of isolate strains by API 50 CHL and 16S rDNA analysis

Strain No.	Identification results	
	16S rDNA analysis	API 50 CHL
2-15-2, 2-18-1, 2-19-2, 3-4-1, 3-4-2, 4-39-5	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> (99~100%)	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> / <i>dextranicum</i> (82~99.7%)
2-2-2, 3-8-1, 3-8-3, 3-17-1	<i>Lactobacillus sakei</i> (99~100%)	<i>Lactobacillus plantarum</i> (88.6%) <i>Lactobacillus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> (79%) <i>Lactobacillus fermentum</i> (39.1%) <i>Lactobacillus brevis</i>

CO₂ 생성 실험에서는 API test와 16S rDNA 동정에서 *L. mesenteroides*로 확인되었던 6개의 균주(strain No. 2-15-2, 2-19-2, 2-18-1, 3-4-1, 3-4-2, 4-39-5)에서 모두 CO₂가 활발하게 발생하였다(data not shown). 한편, 16S rDNA 를 이용한 동정에서 *L. sakei*로 확인된 균주 중 strain No. 3-8-1, 3-17-1은 CO₂ gas가 생성되지 않은 반면, strain No. 2-2-2, 3-8-3의 경우 소량의 CO₂ gas가 발생하는 차이를 확인하였다(data not shown).

두유 curd 형성 균주의 형태학적 분류

선별된 균주들을 동정하여 *L. mesenteroides*로 나타난 균주를 대표하는 strain No. 2-15-2, 2-19-2와 분자생물학적, 생화학적 동정 결과 *L. sakei*를 대표하는 균주 strain No. 3-8-1, 3-17-1를 gram staining하여 현미경으로 관찰한 결과, 모두 gram positive로 보라색으로 염색되는 것을 볼 수 있었으며 *L. mesenteroides*는 구균, *L. sakei*는 간균으로 확인할 수 있었다(data not shown). 또한 전자현미경으로 관찰한 결과, *L. mesenteroides*는 구균으로 크기가 1~2×1 μm, *L. sakei*는 간균의 형태로 크기가 0.6~0.8×2~3 μm로 관찰되었다(Fig. 3).

두유 curd 형성균주의 whole cell protein pattern 다양성

16S rDNA 동정에서 *L. mesenteroides*로 확인되었던 6개의

(A)

(B)

Fig. 3. SEM micrographs of isolated strain No. 3-17-1 (A) and strain No. 3-4-1 (B) (A: left, ×2,000; right, ×10,000) (B: left, ×2,000; right, ×9,000)

균주(strain No. 3-4-1, 4-39-5, 3-4-2, 2-15-2, 2-18-1, 2-19-2)의 whole cell protein의 SDS-PAGE에서의 단백질 band 양상이

(A)

(B)

Fig. 4. SDS PAGE profiles of whole cell proteins of type strain and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from Kimchi. (A) 12% polyacrylamide gel, (B) 15% polyacrylamide gel. M : Pagerulaer™ Prestained Protein ladder, 1: strain No. 2-15-2, 2: strain No. 2-18-1, 3: strain No. 2-19-2, 4: strain No. 3-4-1, 5 : strain No. 3-4-2, 6 : strain No. 4-39-5, 7: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* (KCTC 3530)

Fig. 5. SDS PAGE profiles of whole cell proteins of type strain and *Lactobacillus sakei* isolated from Kimchi. (A) 12% polyacrylamide gel, (B) 15% polyacrylamide gel. M : Pageruler™ Prestained Protein ladder, 1: strain No. 2-2-2, 2: strain No. 3-8-1, 3: strain No. 3-8-3, 4: strain No. 3-17-1, 5: *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* (KCTC 3598)

표준균주 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum* (KCTC 3530)와 동일한 형태로 나타났다(Fig. 4).

반면, 16S rDNA 를 이용한 동정에서 *L. sakei*로 확인된 균주 strain No. 3-8-1, 3-17-1, 2-2-2, 3-8-3의 경우 SDS-PAGE에서의 band 양상이 표준균주 *L. sakei* subsp. *sakei* (KCTC 3598)와 약 17 kDa, 34~43 kDa, 60 kDa 부근에서 단백질 band의 차이가 확인되어 생화학적 분류에서 사용한 탄수화물의 발효 양상과 같이 다양한 결과를 확인하였다(Fig. 5). 단백질 band를 비교해 본 결과, CO₂ 발생 실험에서 나누어진 group과 동일하게 strain No. 2-2-2, 3-8-3과 strain No. 3-8-1, 3-17-1로 나눌 수 있었다.

감사의 글

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

References

1. Aneja, R. P., B. N. Mathur, R. C. Chandan, and S. K. Banerjee. 2002. Cultured/ Fermented products. In: Traditional Indian Milk Products Handbook on Process Technology Modernization for Professionals, Entrepreneurs and Scientists, pp. 158-182, In Gupta, P. R. (ed.), New Delhi, India: Dairy India Publication.
2. Baek, Y. J., C. S. Huh, and J. Y. Lee. 1998. Utilization of fermented milk and its health promotion. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **17**, 58-71.
3. Chien, H. L., H. Y. Huang, and C. C. Chou. 2006. Transformation of isoflavone phytoestrogens during the fermentation of soy milk with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **23**, 772-778.
4. Choi, Y. B., J. G. Woo, and W. S. Noh. 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.
5. Hendrich, S., W. Lee, X. Xu, J. H. Wang, and P. A. Murphy. 1994. Defining food component as new nutrient. *J. Nutr.* **124**, 1789-1792.
6. Karleskind, D., I. Laye, E. Halpin, and C. V. Morr. 1991. Improving acid production in soy based yogurt by adding cheese whey proteins and mineral salts. *J. Food Sci.* **56**, 999-1001.
7. Kim, T. W., S. H. Jung, J. Y. Lee, S. K. Choi, S. H. Park, J. S. Jo, and H. Y. Kim. 2003. Identification of lactic acid bacteria in Kimchi using SDS-PAGE profiles of whole cell proteins. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 119-124.
8. Lee, H. P., L. Gourley, S. W. Duffy, J. Esteve, J. Lee, and N. E. Day. 1991. Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore. *Lancet* **337**, 197-200.
9. Lim, S. J., Y. T. Kho, and J. C. Yoo. 1984. Manufacture of yogurt from soy protein concentrate. *Food Sci. Biotechnol.* **16**, 143-148.
10. MacGregor, G., A. J. Smith, B. Thakker, and J. Kinsella. 2002. Yoghurt biotherapy contraindicated in immunosuppressed patients? *Postgrad. Med. J.* **78**, 366-367.
11. Mann, G. V. and A. Spoerry. 1974. Studies of a surfactant and cholesteremia in the massi. *Am J. Clin. Nutr.* **27**, 464-469.
12. Messina, M. 1995. Modern applications for an ancient bean: soybeans and the prevention and treatment of chronic disease. *J. Nutr.* **125**, 567-569.
13. Messina, M., V. Persky, K. D. R. Setchell, and S. Branes. 1994. Soy intake and cancer risk, A review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr. Cancer* **21**, 113-131.
14. Mun, S. A. and Y. T. Ko. 1986. Keeping quality of yogurt beverage prepared from soy protein isolate. *Food Sci. Biotechnol.* **18**, 124-129.
15. Schneeman, B. O. 1986. Physical and chemical properties, methods of analysis, and physiological effects. *Food Technol.* **40**, 104-110.
16. Park, K. B. and S. H. Oh. 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.
17. Peterson, G. 1995. Evolution of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J. Nutr.* **125**, 784-789.
 18. Reddy, G. V., K. M. Shahani, and M. R. Banerjee. 1973. Inhibitory effect of yogurt on Ehrlich ascites tumor cell proliferation. *J. Natl. Cancer Inst.* **50**, 815-817.
 19. Wang, Y. C., R. C. Yu, and C. C. Chou. 2006. Antioxidant activities of soymilk fermented with lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Food Microbiol.* **23**, 128-135.
 20. Yoon, S. Y. and S. J. Hwang. 2005. A survey on the level of recognizing Kimchi among housewives in Seoul Area. *Korean J. Food Culture* **20**, 405-415.

초록 : 두유 커드를 생산하는 김치 유래 젖산균의 동정

김로의¹ · 안순철² · 유선녕² · 김광연² · 성종환¹ · 이영근¹ · 김한수¹ · 김동섭^{1*}

(¹부산대학교 식품공학과, ²부산대학교 의학전문대학원 미생물학 교실)

본 연구의 목적은 두유 curd를 형성하는 미생물을 분리하는 것이다. 두유 curd를 형성하는 미생물은 채소를 젖산균으로 발효시킨 전통적인 한국의 음식, 김치로부터 분리하였다. 분리 균주 196개 중 10개의 균주(strain No. 2-2-2, 2-15-2, 2-18-1, 2-19-2, 3-4-1, 3-4-2, 3-8-1, 3-8-3, 3-17-1, 4-39-5)가 단단한 두유 curd를 형성하였고 분자생물학적 · 생화학적 분석법에 의해 동정되었다. 분리균주로부터 추출한 genomic DNA는 16S rDNA 지역의 PCR 증폭을 위한 주형으로 사용하였다. GenBank 데이터로 16S rDNA 염기서열을 비교한 결과, 분리 균주들은 *Leuconostoc mesenteroides* group과 *Lactobacillus sakei* group으로 동정되었다. 두유 curd를 형성하는 균주들의 계통 발생학적 위치와 분류군은 neighbor-joining 방법을 이용하여 확인하였다. 또한, *L. mesenteroides* group은 생화학적 특성에 의해 *L. mesenteroides* subsp. *dextranicum*으로 동정되었다. 하지만 *L. sakei* group은 생화학적 특성 비교 시 다양성을 보여 *Lactobacillus sp.*로 명명하였다.