pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 6, pp. 618~629 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.6.618

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

김치 유래 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 팽화 검은콩 발효물의 제조 및 품질특성

황운식[1] · 정소연[1] · 박수연[1] · 박미선[1] · 강민지[1] · 유청빈[1] · 서현지[1] · 이은수[1] · 윤상만[2] · 박훈[1] · 서희재[1]*
[1]선문대학교 식품과학과 식품바이오 융합연구소, [2]천부협동조합

Manufacturing and Quality Characteristics of Puffed Black Bean Fermented by *Lactobacillus plantarum* Strains Isolated from Kimchi

Un-Sik Hwang[1], So-Yeon Jeong[1], Soo-Yeon Park[1], Mi-Sun Park[1], Min-Ji Kang[1], Cheong-Bin You[1], Hyun-Ji Seo[1], Eun-Soo Lee[1], Sang-Man Yun[2], Hoon Park[1], Hee-Jae Suh[1]*
[1]*Department of Food Science, Research Center for Food and Bio Convergence, Sun Moon University, Asan, Korea*
[2]*Cheonbu Cooperation, Geumsan, Korea*

(Received November 28, 2020/Revised December 9, 2020/Accepted December 11, 2020)

ABSTRACT - The purpose of this study was to optimize the fermentation condition of black bean by lactic acid bacteria (LAB) and to evaluate the quality characteristics of fermented black bean. *Lactobacillus plantarum* SU22 isolated from kimchi was selected as a starter for the fermentation of black bean because the strain exhibited strong antimicrobial activity against pathogenic bacteria and did not produce biogenic amines or a carcinogenic enzyme, β-glucuronidase. Fermentation was performed with broth containing puffed black bean (PBB) inoculated with 1% (v/v) of *L. plantarum* SU22 at 37°C for 48h. The viable cell count of LAB was over 9 Log CFU/mL in PBB (20%) broth fermented with *L. plantarum* SU22. Fermentation of alcalase-treated PBB (20%) broth with *L. plantarum* SU22 was found to be the optimal condition, increasing viable cell count of LAB up to 10.30 Log CFU/mL. Under the optimal condition, the total polyphenol content (94.02 mg GAE/g) and DPPH radical scavenging activity (92.50%) were significantly increased, compared to non-fermented control (87.74 mg GAE/g, 83.14%).

Key words : Puffed, Black bean, Quality, Fermentation

콩[Glycine max (L.) Merrill]은 한반도 일대가 원산지로 오랫동안 우리나라의 식생활에서 양질의 식물성 단백질과 필수아미노산을 제공하는 역할을 하고 있다. 일반적으로 섭취되는 콩의 종류는 대두, 검은콩, 녹두, 강낭콩, 완두콩, 쥐눈이콩 등으로 다양하며, 된장, 청국장, 간장, 고추장 등 발효식품뿐만 아니라 두부, 두유 등 단백질 함유 가공식품의 주원료로 이용되고 있다[1]. 콩에는 단백질이 풍부할 뿐만 아니라[2], isoflavone, saponin, lecithin, 펩타이드, 식이섬유 등의 각종 생리활성 물질이 함유되어 있으므로 항암작용, 면역증강, 콜레스테롤 저하, 치매예방 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다[3]. 그러나 콩은 조직이 견고하고 트립신 저해제 등 소화를 방해시키는 물질과 lipoxigenase에 의해 생성되는 휘발성 화합물 hexanal, hexanol, pentanol 등의 비린내 성분을 갖는 단점[4]이 있으므로 가열처리[5], 미생물을 이용한 발효[6], 효소처리[7] 등에 의해 소화 흡수율이 증대되고 비린내를 저감화 시킬 수 있는 연구가 수행되어왔다.

유산균은 수 천 년 동안 김치, 발효유, 젓갈, 치즈 등 다양한 발효식품 제조에 이용되어 왔기 때문에 식용 가능한 안전한 미생물(GRAS, generally recognized as safe)로 인정되고 있다. 특히 프로바이오틱스(probiotics) 특성을 갖고 있는 유산균은 위산 및 담즙산에 대한 내성을 지니며 소화 흡수 향상, 설사 변비 치료 효과, 장내 균총 개선, 장내 유해균의 생육 억제, 비타민 생성, 콜레스테롤 저하, 항산화 활성, 면역조절 작용 등 다양한 기능을 나타내는 것

*Correspondence to: Hee-Jae Suh, *Department of Food Science, Sun Moon University, Asan 31460, Korea*
Tel: +82-41-530-2267, Fax: +82-41-530-2917
E-mail: suhhj@sunmoon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal 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.

으로 보고되고 있다[8,9]. 특히, 최근에는 단백질분해효소 처리를 한 대두요구르트에서 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*의 생육이 촉진되고 콩 비린내가 저감화 되었으며[10], *Bacillus*와 *Lactobacillus*를 혼합 배양할 때 두유 요구르트에서 '산의 생성이 증가하고 풍미가 향상되었다'[11]는 보고도 있다.

콩의 발효에 대한 연구는 콩 자체보다는 두유 또는 대두 추출물의 유산균 발효와 관련된 연구가 주를 이루고 있으며[12], 대두콩을 원료로 한 전통 장류에 대한 연구가 대부분이다[13]. 그러나, 단백질 함량이 높은 콩 발효 식품들은 미생물의 작용에 의해 히스타민과 티라민 등의 유해성 바이오제닉 아민 생성의 위험이 보고되고 있다[14]. 따라서 콩을 발효할 경우 바이오제닉 아민 생성능이 없거나 미량인 균주를 스타터로 이용하는 것이 발효식품의 안전성 확보를 위해 선행되어야 한다. *Lactobacillus plantarum*은 바이오제닉 아민의 생산을 방지하거나 분해하는 유산균으로서 발효과정에서 병원성 미생물의 증식억제에도 관여하는 것으로도 알려져 있다[15].

팽화(Puffing)는 짧은 시간에 고온 및 고압 상태에서 급격히 압력을 감소시켜 처리하는 공법으로 식품에서 전분의 호정화를 유도하고, 재료 내 수분 제거 및 조직 팽창, 단백질 변성 및 효소 불활성화 등 이화학적 변화를 일으켜 제품의 품질 향상에 기여할 수 있다고 알려져 있다[16,17]. 현재까지 홍삼, 옥수수, 밀, 쌀 등에 팽화 공법을 적용하여 품질을 향상시키려는 연구가 다양하게 진행되고 있으나 콩을 원료로 수행된 연구는 매우 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 검은콩의 비린내 감소 및 소화율 향상을 위하여 팽화 기법을 활용하였으며, 팽화된 검은콩에 김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum*을 스타터로 이용하여 팽화 검은콩 발효물을 제조하고 그 품질특성과 항산화 활성을 측정함으로써 기능성이 강화된 검은콩 발효물 제조의 기초자료를 확보하고자 하였다.

Materials and Methods

실험 재료

실험 재료로 사용된 팽화 검은콩(서리태)과 대조군으로 사용된 일반 검은콩(서리태)은 2020년 9월에 천부협동조합(Geumsan, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 유산균은 천안 지역의 가정에서 담근 배추김치로부터 분리하였으며, 비교 유산균으로는 상업용 유산균인 *Lactobacillus rhamnosus* GG (KCTC 5033)를 생물자원센터에서 분양 받아 사용하였다. 상업용 단백질 분해효소는 Alcalase 2.4L (Novozymes, Bagsvaerd, Denmark)와 Flavourzyme 1000L (Daejong, Seoul, Korea)를 구입하였다. 항산화 분석에 이용된 Folin & Ciocalteu's phenol, Na_2CO_3, Gallic acid, DPPH, ethanol, rutin등은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 바이오제닉 아민 분석에 이용된 Typtamine, Putrescine, Cadaverine, Histamine, Tyramine, Spermidine, Spermine은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

유산균의 분리 및 Protease 생산 균주 선별

김치 시료 25 g에 225 mL의 멸균 생리식염수를 첨가한 후 Stomacher (BagMixer® 400W, Interscience, Saint Nom, France)를 이용하여 3분 동안 마쇄하였다. 마쇄된 용액을 십진법에 의해 희석한 후, 희석액을 DeMan Rogosa Sharpe 고체배지(MRS, Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하여 37°C에서 24시간 배양하였다. MRS 고체배지(Difco, Detroit, MI, USA)에서 분리된 단일 콜로니 중 균락의 크기가 큰 것을 BCP 고체배지(Eiken chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 도말하여 배양한 후 젖산 생성으로 노란색을 보이는 콜로니를 유산균으로 판단하고 분리하였다. 분리된 유산균을 MRS 고체배지에 skim milk가 최종 농도 1%(v/v)가 되도록 첨가하여 제조된 배지에 도말하고 37°C에서 24시간 배양하여 clear-zone을 형성하는 균주를 protease 활성이 있는 유산균으로 판단하였다. 선별된 균은 MRS 액체배지(Difco, Detroit, MI, USA)에 접종하여 배양한 후 25%(v/v) glycerol stock으로 -70°C에서 보관하여 사용하였다.

유산균의 분리 및 동정

현미경(Microscope World, AE31 Trinocular, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 선별된 유산균주의 형태학적 특성을 관찰하였으며, Gram 염색 및 catalase 활성을 확인하였다. 선별된 유산균주의 동정을 위하여 16S rRNA gene sequencing을 수행하였다. 유전자 증폭은 universal rRNA gene primer (27F and 1492R)를 사용하였으며 PCR 산물은 전기영동으로 증폭여부를 확인하였고 각 과정은 BIOFACT사(Daejeon, Korea)를 통하여 진행하였다. 분석된 16S rRNA sequencing 결과는 National Center for biotechnology Institute (NCBI)의 BLAST online program[18]을 이용하여 Genbank database와 비교하여 동정하였다.

유산균의 항균활성 측정

유산균의 항균활성은 Paper disc diffusion assay 방법[19]을 이용하여 측정하였다. *Escherichia coli* KCTC 1039, *Listeria monocytogenes* KCTC 40307, *Salmonella* Typhimurium KCTC 2515, *Staphylococcus aureus* KCCM 11335를 병원성 지시균주로 사용하였다. MRS 액체배지에서 배양(37°C, overnight)한 유산균 배양액(1.5 mL)을 원심분리(12,000xg, 4°C, 5 min, CT15RE, Hitachi Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)한 후 0.45 μm syringe filter를 사용하여 균체를 제거하여 상등액만을 취했다. 지시균주를 tryptic soy broth

(BD™ Difco, Franklin Lake, NJ, USA)에 각각 접종하고 배양(37°C, 24시간)하여 얻어진 배양액을 동일한 농도로 희석한 후 tryptic soy agar 표면에 접종하고 멸균한 면봉으로 도말하였다. 지시균주가 도말된 평판배지 위에 paper disc (8 mm)를 올려놓고 균체가 제거된 유산균 상등액을 100 µL씩 균일하게 분주하였다. 균주의 항균활성은 37°C에서 24시간 배양한 후 paper disc 주변에 형성된 억제환의 크기를 측정하였다.

API ZYM을 이용한 유산균의 효소 활성

유산균의 효소활성은 API ZYM kit (BioMerieux Co., Marcy l'Etoile, France)를 사용하여 측정하였다. MRS 액체배지에서 37°C, 24시간 동안 배양한 유산균을 원심분리(12,000xg, 4°C, 10 min, CT15RE, Hitachi Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)하여 PBS용액으로 두 번 세척하고 균체만을 회수하였다. 회수한 균체를 API KIT 큐플에 65 µL씩 분주하고 37°C에서 4시간 배양한 후 ZYM A와 ZYM B 시약을 각 한 방울씩 첨가하여 5분간 실온 반응시켰다. 이후 각 큐플에서 색 변화를 관찰하여 기질 효소에 대한 활성 여부를 판독하였다.

분리균주의 바이오제닉 아민 측정

유산균의 바이오제닉 아민 생성 여부를 확인을 위해 Yang 등[20] 방법을 일부 변형하여 진행하였다. MRS 액체배지에 각 분리균주를 접종한 후 37°C shaking incubator (BF-150SIR-2R, Biofree, Seoul, Korea)에서 150 rpm, 24시간 동안 전 배양을 실시하였다. 전 배양한 1 mL 배양액을 tryptophan, orthine, lysine, histidine, tyrosine, arginine (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)등 바이오제닉 아민의 전구체가 0.1% 포함된 9 mL MRS 액체배지에 접종하고 37°C로 조정된 shaking incubator에서 150 rpm으로 균질화하며 24시간 동안 본 배양하였다. 본 배양액을 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고 상등액을 바이오제닉 아민 분석을 위한 시료로 사용하였다. 바이오제닉 아민 7종 표준품(Typtamine, Putrescine, Cadaverine, Histamine, Tyramine, Spermidine, Spermine, Sigma-Aldrich)을 0.1 N HCl에 1,000 mg/L 농도로 녹여 표준용액으로 사용하였다.

시료와 표준용액을 각각 1 mL 취한 후 0.3 mL 포화 $NaHCO_3$ 용액(Sigma-aldrich), 0.2 mL 2 M NaOH, 2 mL 1% dansyl chloride solution (Sigma-aldrich)을 차례로 혼합한 후 암실(40°C)에서 45분 동안 유도체화 하였다. 유도체가 완료된 시료에 0.1 mL의 25% Ammonium Hydroxide (Fluka, Maston ford road, USA)을 가해 반응을 멈춘 후 acetonitrile로 최종 부피를 5 mL로 정용하고 0.2 µm syringe filter (Sartorius, Göttingen, Germany)로 여과하여 바이오제닉 아민 시험용액으로 사용하였다.

바이오제닉 아민은 HPLC 1260 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) 시스템과 Symmetry® C18컬럼(4.6×250 mm, 5 µm, Waters™, Milford, MA, USA)을 사용하여 254 nm에서 35분간 분석하였다. 분석에 이용된 이동상은 선행연구[21]를 참고하여, 0.1 M ammonium acetate (A)와 acetonitrile (B)을 농도구배 조건으로 분석하였다: 0-5분(B 35%), 5.1-10분(B 45%), 10.1-17분(B 80%), 17.1-26.2분(B 90%), 26.3-35분(B 35%).

팽화 검은콩 제조

금산소재 천부협동조합에서 구입한 검은콩을 곡물 팽화기(GAS45AA, Xingtai Tianruo Machinery Co. Ltd., Hebei, China)에 넣고 Fig. 1과 같은 과정으로 팽화를 진행하였다. 팽화 정도는 압력, 온도, 시간에 따라 달라지므로 예비실험을 거친 후 압력 5 kgf/cm^2, 150°C, 10분 동안 팽화하는 것으로 최종조건을 설정하였으며, 동일한 조건으로 팽화한 검은콩을 실험에 이용하였다.

검은콩 발효

검은콩과 팽화 검은콩 분말 시료 10-30%(w/v)를 멸균증류수에 첨가하여 100°C에서 10분 동안 열처리한 후 발효배지로 사용하였다. 효소처리 배지는 멸균이 끝난 검은콩 배지에 시판 식품용 효소 Alcalase 2.4 L (Novozyme, Bagsvaerd, Denmark) 와 Flavourzyme 1000 L (Daejong, Seoul, Korea)를 검은콩 고형분의 1%(w/v) 농도로 첨가한 후 60°C Shaking incubator에서 160 rpm, 6시간 동안 반응 한 후 끓는 물에서 10분간 열처리하여 효소를 불활성화한 것을 발효 배지로 사용하였다.

항균활성과 protease 활성이 높은 균주 2종(*L. plantarum* SU22, *L. plantarum* SU64)을 종균으로 선정하여 검은콩 발효를 진행하였다. MRS 액체배지에서 37°C, 16시간 동안 배양한 유산균 배양액($OD_{600\ nm}$ = 2, 10^9 CFU/mL)을 발효 배지 100 mL에 1%(v/v) 접종한 후 37°C, 160 rpm에서

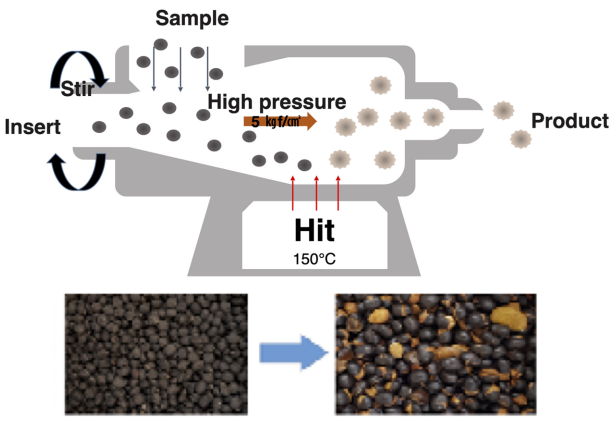


Fig. 1. Puffing process of black beans.

48시간 동안 배양하였다. 배양 배지의 초기 pH는 7.0으로 조절하였다.

발효 검은콩의 유산균 생균수, pH, 산도 측정

유산균 생균수는 발효액 시료를 멸균한 생리식염수에 10단계로 희석한 후, 희석액을 MRS 고체배지에 도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 나타난 콜로니 수를 계산하여 측정하였다. pH meter (pH / Ion S220, Mettler-Toledo AG 8603, Ohio, USA)를 사용하여 pH를 측정하였고, 총산 함량은 시료 5 g을 100 mL로 mess up하고 삼각플라스크에 25 mL를 분주한 후 1% phenolphthalein 용액을 1방울 넣고, 0.1 N NaOH 용액으로 중화 적정하여 환산계수가 0.009인 젖산 함량(%)으로 나타내었다.

총 폴리페놀 분석

총 폴리페놀 함량은 Ahn 등[22]방법을 일부 변형하여 Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-aldrich)가 시료의 폴리페놀성 화합물에 의해 환원되며, 몰리브덴 청색으로 발색하는 것을 원리로 측정하였다. 검은콩 발효액은 brix가 1%가 되도록 80% methanol로 희석한 후 원심분리기(Jeio Tech Co., Itd, Daejeon, Korea)로 10,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 상등액을 취하여 0.2 μm membrane filter (Whatman Co., Maidstone, England)로 여과한 것을 시험용액으로 하였다. 시험용액 0.5 mL를 취해 2% Na_2CO_3 용액을 3 mL 첨가한 후 1 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent (Sigma-aldrich)를 0.3 mL 가하고 30분 동안 실온에서 반응시켜 720 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 gallic acid를 표준물질로 사용하여 gallic acid equivalent (mg GAE/g)로 환산하여 나타내었다. 모든 시료는 3회 반복 측정하였다.

DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH (2,2-diphenyl1-1-picryl hydrazyl) 라디칼 소거능은 Wang 등[23]의 방법을 일부 변형하여 진행하였다. 0.1 mM DPPH 용액의 흡광치를 0.97-0.99로 맞춘 후 상기에서 제조된 시료 여과액 2 mL를 0.4 mM DPPH 에탄올 용액 2 mL와 혼합하고 실온에서 30분 동안 암실 반응한 후 혼합액을 원심분리(12,000xg, 4°C, 10 min, CT15RE, Hitachi Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)하여 상등액만을 회수하였다. 회수된 상등액을 517 nm에서 흡광도를 측정하고 다음의 계산식을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능(%)을 계산하였다. 대조구는 증류수를 사용하였다. 모든 실험은 3회 반복 측정하였다.

$$\text{DPPH radcal 소거능}(\%) = \left(\text{blank} - \frac{\text{sample}}{\text{blank}}\right) \times 100 \quad (1)$$

통계분석

실험결과의 유의성 검증은 SPSS program (IBM, 2019, New York, USA)을 이용하여 실시하였다. 각 처리별 유의성은 Duncan's multiple range test로 검증하였고 대조군과 비교하였을 때, $P<0.05$ 이면 유의적이라고 판단하였다.

Results and Discussion

유산균의 분리 및 동정

김치시료를 BCP agar에 접종하여 배양한 결과 젖산 생성으로 노란색 환을 형성하고 크기가 상대적으로 큰 단일 콜로니를 산 생성 능력이 우수한 유산균으로 판단하고 총 180 종의 유산균을 분리하였다. 선별된 균주 중 내산성, 내담즙성 및 항균활성이 우수한 균주 27종을 2차 선별하여 1%(w/v) skim milk가 첨가된 MRS agar에서 생육시킨 후 colony 주변에 뚜렷한 clear-zone을 형성하는 균주를 protease활성이 있는 유산균으로 간주하고[24], 활성이 가장 높은 2종의 균주(*Lactoabacillus plantarum* SU22, *Lactoabacillus plantarum* SU64)를 최종 선별하였다. 최종 선별된 2종의 균주를 대상으로 생화학적, 형태적 특성을 확인한 결과 catalase 음성, Gram 양성균으로 판명되었고 포자 형성을 하지 않고 운동성이 없는 간균으로 확인되었다[25]. 선별된 유산균주의 16S RNA gene sequence를 NCBI의 BLAST online program을 이용하여 Genbank database에서 상동성을 검토한 결과 *Lactoabacillus plantarum* SU22와 *Lactoabacillus plantarum* SU64로 각각 99.10% 이상의 높은 상동성을 보이며 동정되었다.

유산균의 항균활성 측정

선별된 유산균의 항균활성을 paper disc방법을 이용하여 *E. coli, S. aureus, L. monocytogenes, S.* Typhimurium 등 4종의 균주에 대하여 측정한 결과는 Table 1과 같다. *L.*

Table 1. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* strains

	E. coli	*S. aureus*	*S.* Typhimurium	*L. monocytogenes*
L. plantarum SU22	+++[3]	+++	+++	+++
L. plantarum SU64	+++	+++	+++	+++
L. rhamnosus GG	++[2]	+++	++	+[1]

[1] +, 5-7 mm; [2] ++, 8-10 mm; [3] +++, >11 mm.

plantarum SU22와 *L. plantarum* SU64균주는 4종의 병원성 미생물에 대하여 11 mm 이상의 저해환을 나타내어 항균활성이 매우 우수한 것으로 확인되었다. 특히 프로바이오틱 상업균주인 *L. rhamnosus* GG (LGG)와 비교하여 *E. coli, S. aureus, L. monocytogenes* 균주에 대한 항균 효과가 높은 것으로 나타났다. 이는 유산균이 젖산과 초산을 비롯한 유기산, 과산화수소, diacetyl, bacteriocin 등을 생성하여 병원성 세균과 부패 미생물의 생육을 억제한다는 기존 보고[26]와 일치하는 결과이다.

API ZYM을 이용한 유산균의 효소 활성

API ZYM kit을 이용하여 총 19종의 효소에 대한 *L. plantarum* SU22와 *L. plantarum* SU64 균주의 효소활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 선별된 2종의 균주들은 leucine arylamidase와 valine arylamidase 계열의 protease에 대한 높은 활성을 지니고 있으며, 당 분해효소인 α-glucosidase에 대한 약한 활성도 나타내는 것으로 확인되었다. 유당분해효소인 β-galactosidase에 대한 높은 활성을 나타내어 lactose에 대한 유당불내증 저하에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대된다. 안전성 측면에서 프로바이오틱스로 이용되는 유산균은 benzopyrene 등과 같은 발암성 전구물질이 간에서 무독화 되어 장에 보내졌을 때 발암물질로 재 전환시키는 β-glucuronidase 효소를 생성하지 않아야한다[27]. 본 연구에서 선별된 2종의 균주(SU22, SU46)는 발암효소인 β-glucuronidase에 대한 활성이 없는 것으로 확인되어 발효물 제조에 사용할 수 있는 안전한 종균으로 인정된다.

분리균주의 바이오제닉 아민

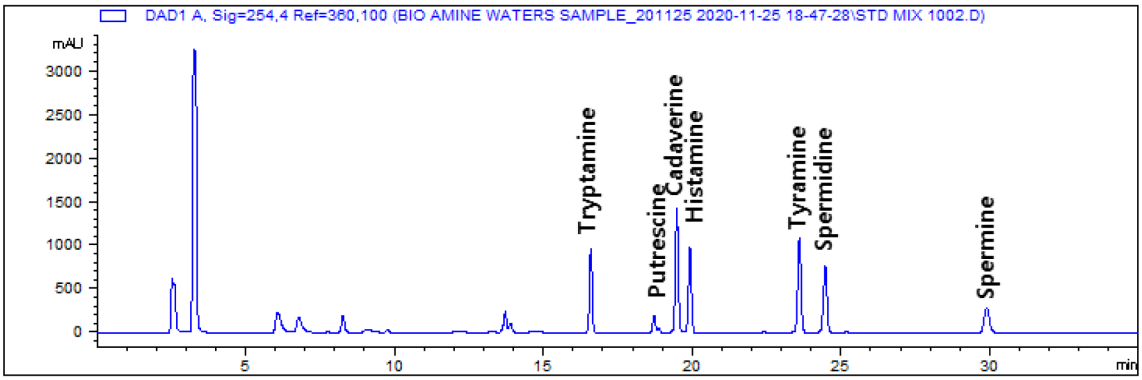
바이오제닉 아민 7종에 대한 HPLC 동시분석 결과는 Fig. 2의 크로마토그램에 나타난 것과 같이 우수한 분리능을 나타내었으며, 검량선의 직선성 또한 0.999 이상으로 (Table 3) 우수하였으므로 바이오제닉 아민 분석법의 타당성이 확보되었다. 바이오제닉 아민은 주로 단백질 함유량이 높은 식품에서 미생물의 탈탄산 반응 혹은 아미노기전달효소에 의한 아미노기 전이반응에 의해 생성되는 저분자 유기질소 성분이다. 식품 중에 함유되어 있는 tryptophan, orthine, lysine, histidine, tyrosine, arginine 등의 아미노산이 각각 발효 과정에서 미생물에 의해 typtamine, putrescine, cadaverine, histamine, tyramine, spermidine, spermine 등의 바이오제닉 아민으로 전이되면, 체내에서 직간접적으로 신경전달 물질로서 작용하거나 심혈관계에도 영향을 미치게 된다고 한다. 바이오제닉 아민을 섭취하더라도 대부분의 경우 체내에서 효소적 대사과정을 거쳐 독성물질이 해독

Table 2. Enzyme activity of *Lactobacillus* strains

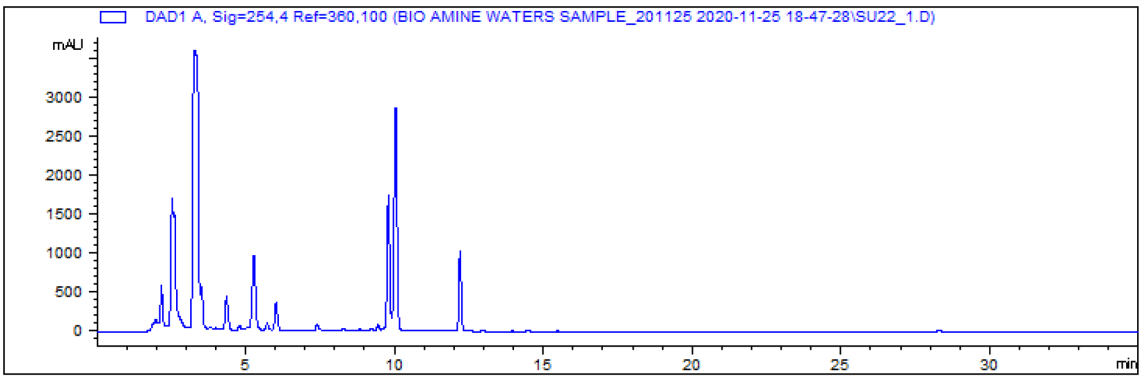
	Enzyme	*L. plantarum* SU22	*L. plantaru*m SU64	*L. rhamnosus* GG
1	Control	0[1)]	0	0
2	Akaline phosphatase	0	0	1
3	Esterase (C4)	1[2)]	1	3[3)]
4	Esterase lipase (C18)	1	1	1
5	Lipase (C14)	0	0	2
6	Leucine arylamidase	5[4)]	5	5
7	Valine arylamidase	4[3)]	4	4
8	Cystine arylamidase	0	0	0
9	Trypsin	0	0	0
10	α-chymotrypsin	0	0	1
11	Acid phosphatase	2[2)]	2	2
12	Naphthol-AS-phosphohydrolase	1	1	1
13	α-galactosidase	0	0	0
14	β-galactosidase	5	5	4
15	β-glucuronidase	0	0	0
16	α-glucosidase	2	2	1
17	β-glucosidase	5	5	4
18	N-acetyl-β-glucosaminidase	4	4	0
19	α-mannosidase	0	0	0
20	α-frucosidase	0	0	2

0 to 5; [1)] 0, none; [2)] 1-2, weak; [3)] 3-4, normal; [4)] 5, strong.

A) Standards of biogenic amine



(B) *L. plantarum* SU22



(C) *L. plantarum* SU64

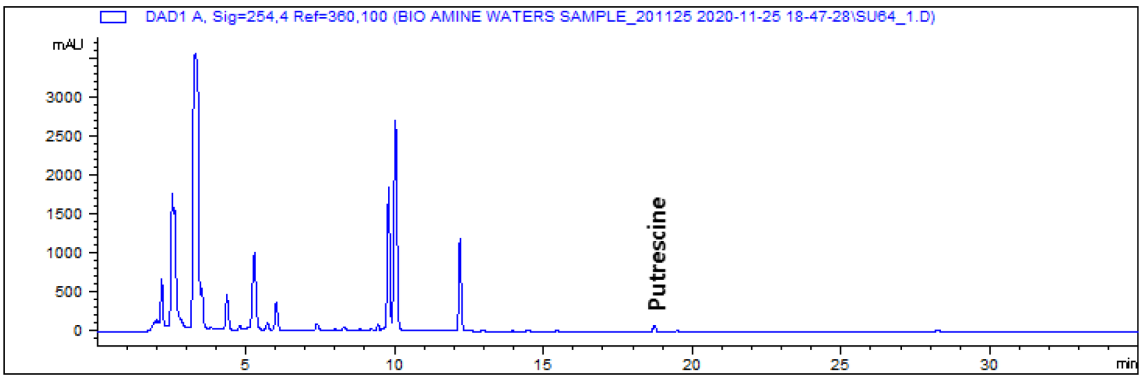


Fig. 2. Chromatogram of biogenic amine standards (A), *Lactobacillus plantarum* SU22 (B) and *Lactobacillus plantarum* SU64 (C) obtained from HPLC analysis.

되는 것으로 알려져 있으나, 과량의 바이오제닉 아민 섭취 또는 바이오제닉 아민 대사 효소생산에 문제가 있을 경우 인체에 심각한 유해성을 줄 수 있다는 것이 보고되고 있다[28].

바이오제닉 아민의 전구체에 해당하는 tryptophan, orthine, lysine, histidine, tyrosine, arginine이 함유된 MRS 배지에 선별 균주 2종을 접종 및 배양한 후 histamine 등 7종의 바이오제닉 아민을 분석한 결과는 Table 4와 같다. *L. plantarum* SU22 균주에서는 histamine과 tyramine 같은 대표적인 바이오제닉 아민[3]을 비롯한 7종의 바이오제닉 아민이 모두 정량한계 이하인 것으로 나타나 안전한 종균으로 확인되었지만, *L. plantarum* SU64 균주의 경우 putrescine, cadaverine, histamine, spermidine이 0.2-45.6 mg/L의 범위로 검출되었다. Lim 등[29]은 된장으로부터 분

Table 3. Calibration curve of biogenic amines standard solution

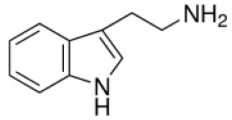
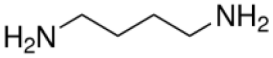
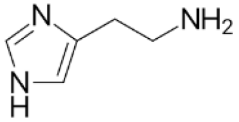
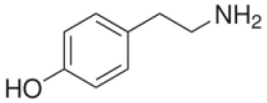
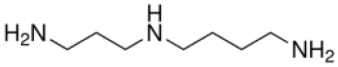
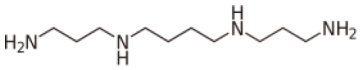
Standard	Structure	Standard curve	Linearity (R^2)
Tryptamine		y = 58.679x - 17.155	1.0000
Putrescine		y = 13.424x - 10.835	0.9999
Cadaverine		y = 100.92x-21.949	1.0000
Histamine		y = 69.398x - 20.905	1.0000
Tyramine		y = 86.303x - 20.482	1.0000
Spermidine		y = 64.005x - 15.834	1.0000
Spermine		y = 35.321x + 2.3296	0.9999

Table 4. Results of biogenic amines in *Lactobacillus* strains

Standard	*L. plantarum* SU22 (mg/kg)	*L. plantarum* SU64 (mg/kg)
Tryptamine	N.D[1)]	N.D
Putrescine	< LOQ[2)]	45.6
Cadaverine	< LOQ	0.7
Histamine	N.D	0.2
Tyramine	N.D	< LOQ
Spermidine	< LOQ	0.2
Spermine	< LOQ	< LOQ

[1)] N.D, indicates not detected.
[2)] LOQ, indicates limit of quantification.

리된 *Bacillus subtilis* MJ226과 *Enterococcus faecalis* D08 균주가 각각 628.7 mg/L와 1,045.8 mg/L의 histamine을 생성하고, *Enterococcus faecium* D12와 *Enterococcus faecalis* D08 균주가 각각 661.4 mg/L와 237.9 mg/L의 tyramine을 생성한다고 보고하였으며, 유산균의 균주에 따라 생성하는 바이오제닉 아민의 종류에 차이가 있었고 생성량도 상이하다고 보고하였다. Cho 등[30)]은 된장에서 histamine과 tyramine이 각각 952 mg/kg과 1,430.7 mg/kg 검출되었으며, Seo 등[31)]은 시중에서 유통되고 있는 청국장 37건에 대한 조사에서 tyramine이 평균 113.7 mg/kg 검출되었다고 보고하였다. 일반적으로 histamine과 tyramine이 약 100 mg/L 이상 존재하는 식품을 섭취해야 중독 증상을 일으킬 수 있다고 보고되어[32)], 본 연구에서 김치로부터 분리한 *L. plantarum* SU22와 *L. plantarum* SU64 균주에서 생성되는 histamine과 tyramine은(정량한계이하-0.2 mg/L) 유해한 수준이 아님을 확인하였다.

검은콩 발효

검은콩 종류 중 하나인 서리태는 서리를 맞은 후에 수확하는 콩으로 종피에 안토시아닌이 풍부하게 함유되어 있어 항산화 효과가 높다고 알려져 있다[33)]. 팽화 처리한 검은콩과 처리하지 않은 검은콩 분말이 함유된 배지에 *L. plantarum* SU22와 *L. plantarum* SU64 균주를 각각 1%(v/v) 접종하고 배양하면서 유산균의 생육특성을 분석하였다 (Table 5). 팽화 처리하지 않은 검은콩이 10%와 20% 함유된 배지에서 24시간 발효 후 *L. plantarum* SU22와 *L. plantarum* SU64 균주의 생균수는 9.09-9.15 Log CFU/mL까지 증가하였으나 48시간 발효 후에는 생육이 저해되어 8.19-8.95 Log CFU/mL까지 생균수가 감소하는 경향을 나타내었다. 팽화 처리한 검은콩이 10%와 20% 함유된 배

Table 5. Viable cell count of lactic acid bacteria in non-puffed and puffed black bean broth after 24-h and 48-h fermentation

Strains	Initial[1)]	B[2)]	F[3)]	Viable cell count (Log CFU/mL)		
				10%	20%	30%
L. plantarum SU22	7.28±0.14	NP[4)]	24 h	9.15±0.06	9.13±0.15	9.47±0.04
			48 h	8.80±0.02	8.32±0.20	8.92±0.35
		P[5)]	24 h	9.34±0.02	9.30±0.01	9.30±0.21
			48 h	9.16±0.06	9.35±0.09	9.05±0.06
L. plantarum SU64	7.32±0.15	NP	24 h	9.10±0.04	9.09±0.04	9.34±0.02
			48 h	8.19±0.02	8.95±0.14	8.96±0.35
		P	24 h	9.27±0.01	9.41±0.06	9.27±0.06
			48 h	9.10±0.11	9.12±0.02	9.28±0.07

[1)] Initial, Initial cell count.
[2)] B, Black bean broth.
[3)] F, Fermention time.
[4)] NP, non-puffed black bean broth.
[5)] P, puffed black bean broth.

Table 6. The pH and acidity in non-puffed and puffed black bean broth after 24-h and 48-h fermentation

Strains	B[1)]	F[2)]	pH			Acidity(%)		
			10%	20%	30%	10%	20%	30%
L. plantarum SU22	NP[3)]	0 h	6.96±0.00	6.86±0.00	6.81±0.00	0.18±0.00	0.24±0.00	0.36±0.00
		24 h	4.55±0.02	4.72±0.01	4.83±0.02	0.71±0.01	1.02±0.03	1.44±0.03
		48 h	4.47±0.01	4.54±0.03	4.69±0.01	0.84±0.02	1.26±0.01	1.62±0.02
	P[4)]	0 h	6.90±0.00	6.86±0.00	6.75±0.00	0.10±0.00	0.12±0.00	0.31±0.00
		24 h	4.74±0.02	4.80±0.01	4.96±0.01	0.41±0.01	0.81±0.01	1.15±0.02
		48 h	4.93±0.01	4.87±0.02	4.86±0.02	0.53±0.01	0.96±0.02	1.29±0.01
L. plantarum SU64	NP	0 h	6.96±0.00	6.86±0.00	6.81±0.00	0.18±0.00	0.24±0.00	0.36±0.00
		24 h	4.65±0.01	4.87±0.02	4.94±0.02	0.72±0.01	0.96±0.01	1.20±0.01
		48 h	4.58±0.02	4.65±0.01	4.71±0.02	0.78±0.01	1.32±0.06	1.56±0.10
	P	0 h	6.90±0.00	6.86±0.00	6.75±0.00	0.10±0.00	0.12±0.00	0.31±0.00
		24 h	4.75±0.02	4.74±0.01	4.98±0.03	0.41±0.02	0.79±0.02	1.17±0.02
		48 h	4.95±0.01	4.91±0.02	4.86±0.02	0.52±0.01	0.86±0.02	1.23±0.01

[1)] B, Black bean broth.
[2)] F, Fermention time.
[3)] NP, non-puffed black bean broth.
[4)] P, puffed black bean broth.

지에서 24시간 발효 후 *L. plantarum* SU22와 *L. plantarum* SU64 균주의 생균수는 9.27-9.41 Log CFU/mL까지 증가하였으며 48시간 발효 후에도 9.10-9.35 Log CFU/mL 수준의 높은 생균수를 유지하여 팽화 처리가 유산균의 생육을 촉진시키고 생존율을 높여주는 것으로 나타났다. 이는 팽화하는 과정에서 고온과 고압에 의해 전분이 호정화 되면서[34)], 유산균이 이용할 수 있는 당의 함량이 증가하기 때문에 생육 활성화가 일어난 것으로 사료된다. 반면에 30% 농도의 팽화콩 시료가 함유된 배지에서는 추가적으로 생균수의 증가가 관찰되지 않았다. 이는 유산균 생육에 필요한 수분의 양 감소 때문인 것으로 추정된다.

L. plantarum SU22 또는 *L. plantarum* SU64 균주가 검은콩이 10-30% 함유된 시료에서 배양될 때 발효시간이 증가함에 따라 pH가 낮아졌다(Table 6). 48시간 발효물을 비교해 볼 때 팽화 처리하지 않은 검은콩 배지의 pH는 4.47-4.71, 산도는 0.78-1.62%이었고, 팽화 처리한 검은콩 배지의 pH는 4.86-4.95, 산도는 0.52-1.29% 범위를 나타내어 팽화 처리하지 않은 검은콩 배지에서 더 많은 산이 형성되는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 팽화 처리하지 않은 검은

Table 7. Viable cell count, pH and acidity in 20% puffed black bean broth treated with alcalase or flavourzyme during fermentation

Strain	Enzyme Treatment		Fermented time				
			0 h	12 h	24 h	36 h	48 h
L. plantarum SU22	Non[1)]	Viable cell count[4)]	7.13±0.21	9.05±0.08	9.19±0.22	8.92±0.08	9.17±0.05
	A[2)]			9.42±0.05	10.30±0.25	9.25±0.05	9.21±0.11
	F[3)]			9.82±0.04	9.79±0.09	8.68±0.25	9.11±0.07
L. plantarum SU64	Non		7.28±0.26	9.08±0.53	9.12±0.21	8.70±0.17	9.04±0.07
	A			9.45±0.07	9.48±0.06	9.34±0.15	9.11±0.03
	F			9.69±0.05	9.68±0.06	9.33±0.04	8.99±0.19
L. plantarum SU22	Non	pH	6.96±0.01	5.51±0.01	5.00±0.01	4.82±0.01	4.74±0.01
	A		7.00±0.01	5.19±0.01	4.98±0.02	4.97±0.01	4.97±0.02
	F		7.01±0.01	4.76±0.01	4.75±0.01	4.72±0.01	4.77±0.01
L. plantarum SU64	Non		6.96±0.01	5.52±0.01	5.00±0.01	4.81±0.01	4.97±0.01
	A		7.00±0.01	5.19±0.01	4.95±0.01	4.98±0.01	4.95±0.01
	F		7.01±0.01	4.79±0.01	4.72±0.01	4.72±0.01	4.70±0.01
L. plantarum SU22	Non	Total acidity (%)	0.36±0.10	0.65±0.10	1.22±0.10	1.44±0.10	1.80±0.10
	A		0.72±0.01	1.80±0.10	2.09±0.10	2.16±0.10	2.38±0.10
	F		0.72±0.01	2.08±0.10	2.52±0.10	2.58±0.01	2.52±0.10
L. plantarum SU64	Non		0.36±0.10	0.65±0.10	1.22±0.10	1.44±0.10	1.66±0.10
	A		0.72±0.01	1.65±0.10	2.23±0.10	2.16±0.01	2.38±0.10
	F		0.72±0.01	2.09±0.10	2.52±0.10	2.58±0.01	2.66±0.10

[1)] Non, Non-treated.
[2)] A, Alcalase (20% puffed black bean broth treated with 1%(w/w)).
[3)] F, Flavourzyme (20% puffed black bean broth treated with 1%(w/w)).
[4)] Viable cell count, Log CFU/mL.

콩 배지에서는 영양원 부족, 산 생성량 증가, 낮은 pH가 유산균의 생육을 억제하였기 때문에 나타난 결과로 사료된다. 또한 검은콩 함유 농도는 20%와 30%에서 유산균 생육 정도에 큰 차이를 나타내지 않았으며, 30% 농도는 유동성이 거의 없는 반고체 형태를 나타내기 때문에, 20%의 팽화 검은콩 분말을 함유한 배지를 유산균 발효의 최적 조건으로 선정하고 이후의 실험을 진행하였다.

효소와 유산균 병행 발효 특성

검은콩의 유산균 발효율을 향상시키기 위해 팽화 처리한 검은콩을 사용하고, 단백질 분해효소를 처리하여 발효율을 비교하였다. 팽화 검은콩 배지의 농도는 앞에서 서술하였듯이 20%로 선택하였고, 여기에 산업적으로 활용도가 높은 단백질 분해효소로 alcalase와 flavourzyme을 처리한 후 *L. plantarum* SU22와 *L. plantarum* SU64를 각각 접종하여 48시간 동안 배양하였다. 배양시간에 따른 생균수, pH, 산도 분석결과는 Table 7과 같이 나타났다. *L. plantarum* SU22는 Alcalase로 처리한 배지에서 24시간 발효 후 10.30 Log CFU/mL의 가장 높은 생균수를 나타내었으며, 효소처리 하지 않은 대조군(9.19 Log CFU/mL)에 비해 생균수가 10배(1 Log) 이상 증가되는 것으로 확인되었다. *L. plantarum* SU64는 Alcalase와 Flavourzyme으로 처리한 배지에서 12시간 발효 후 각각 9.45 Log CFU/mL와 9.69 Log CFU/mL의 생균수를 나타내었지만, 이후 추가적으로 증가하지는 않았다. 한편, pH와 산도의 결과는 효소처리를 한 경우가 *L. plantarum* SU22와 *L. plantarum* SU64 발효액 모두에서 산 생성량이 더 많은 것으로 나타났으며, 24시간 발효할 때까지는 이 현상이 두드러지다가 이후부터 둔화되는 경향을 나타내었다.

Alcalase는 endoprotease 계열, flavourzyme은 exopeptidase 계열의 protease로 유산균 발효 특성의 차이는 균주 특성과 protease 특성에 기인하는 것으로 사료되며, 단백질분해효소 처리에 의한 질소원 증가로 유산균의 발효능이 향상되었다고 판단된다. Anh 등[35)]은 alcalase 또는 flavourzyme으로 처리한 대두단백질 추출물에서 amino acid와 저분자 peptide가 증가되어 수용성 단백질의 함량이 증가되고 점도가 감소하였다고 보고하였다.

본 연구에서 사용된 *L. plantarum* SU22 균주는 팽화 검은콩 배지에서 특별한 영양원의 첨가 없이 9 Log CFU/mL 이상의 생육이 이루어져 팽화 검은콩을 이용한 유산

Table 8. Total polyphenol content and DPPH radical scavenging activity of 20% puffed black bean broth treated with alcalase or flavourzyme during fermentation

Sample		Total polyphenol content (mg GAE[1)]/g)			DPPH (%)		
		Non[3)]	A[4)]	F[5)]	Non	A	F
Control[2)]		41.16±0.31^{cB}	87.74±0.62^{aD}	78.48±1.11^{bC}	85.80±0.97^{aB}	83.14±0.22^{bC}	85.80±0.22^{aD}
L. plantarum SU22	24 h	43.58±0.46^{cA}	94.02±0.44^{aC}	88.58±2.18^{bA}	85.94±0.22^{bB}	92.50±0.33^{aA}	92.26±0.30^{aA}
	48 h	43.22±0.28^{cA}	97.81±2.71^{aA}	88.35±0.39^{bA}	82.76±1.23^{bC}	92.64±0.51^{aA}	91.22±0.22^{aB}
L. plantarum SU64	24 h	43.58±0.16^{bA}	91.97±0.44^{aC}	90.04±1.36^{aA}	88.65±0.82^{bA}	92.45±0.49^{aA}	89.70±0.22^{bC}
	48 h	44.45±1.33^{cA}	95.92±2.13^{aB}	87.30±0.55^{bB}	82.48±0.99^{bC}	90.74±0.65^{aB}	92.07±0.83^{aA}

Data are the means±SD.
Values in the same row with different superscripts (a-c) and in the same column with different superscripts (A-D) are significantly different at $P<0.05$.
[1)] GAE, Gallic acid equivalents.
[2)] Control, 20% puffed black bean broth.
[3)] Non, Non-treated.
[4)] Alcalase, 20% puffed black bean broth treated with Alcalase.
[5)] Flavourzyme, 20% puffed black bean broth treated with Flavourzyme.

균 발효 제품의 제조에 이용 가능한 우수한 종균으로 판단되었다. 또한 추가적으로 Alcalase 처리에 의해 24시간 발효 후 생균수가 10.3 Log CFU/mL까지 증가하여 Alcalase 처리와 *L. plantarum* SU22 균주의 병행 발효가 팽화 검은콩 발효액 제조에 최적 조건임을 확인하였다.

효소처리 팽화 검은콩 발효물의 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능

팽화 검은콩을 alcalase와 flavourzyme으로 처리한 배지에서 유산균 발효 후 총플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과는 Table 8에 나타내었다. alcalase와 flavourzyme으로 처리한 배지 시료의 총 폴리페놀 함량은 각각 87.74, 78.48 mg GAE/g으로 나타나, 처리하지 않은 시료(control, 41.16 mg GAE/g)와 비교하여 alcalase는 2.1배, flavourzyme은 1.9배 총 폴리페놀 함량을 증가시키는 것으로 나타났다. Kim 등[36)]은 10% 홍삼현탁액에 홍삼 중량의 1% Alcalase 처리한 시료에서 대조구에 비하여 총페놀 화합물의 함량이 1.8배 증가하였다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 반면에 효소를 처리하지 않은 팽화 검은콩 배지(control)의 DPPH 라디칼 소거능은 85.80%로 매우 높은 항산화 활성을 나타내었으며, alcalase 또는 flavourzyme 처리에 의해 증가되지 않았다. 효소처리를 하지 않은 시료(control)로 유산균 발효를 진행한 경우 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능의 변화가 없었으나, alcalase와 flavourzyme로 처리한 시료의 경우는 유산균 발효 시간에 따라 발효물의 총 폴리페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능이 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 항산화 실험에서 20% 팽화 검은콩 함유물을 alcalase로 처리한 후 *L. plantarum* SU22 균주를 접종하여 24시간 발효했을 때 총 폴리페놀 함량은 94.02 mg GAE/g, DPPH 라디칼 소거능은 92.50%로 발효 전 대조군(87.74 mg GAE/g, 83.14%)에 비해 유의적으로 증가한다는 것을 알 수 있었다($P<0.05$). 이는 단백질 분해효소로 처리한 배지에서 유산균의 생육과 효소활성이 활발해진 것에 기인하는 것으로 사료되며, 미생물 발효에 의한 항산화 활성 증가는 총 폴리페놀함량 증가 및 펩타이드 증가에 따른 것으로 알려져 있다.[37,38)]

Acknowledgement

본 연구는 한국식품산업클러스터진흥원에서 지원하는 2020년도 우리식품세계로 기술지원 사업(중기기술지원) 연구수행 결과물임을 밝힙니다.

국문요약

본 연구에서는 유산균에 의한 검은콩의 최적 발효조건을 확립하고 발효된 검은콩의 품질특성을 평가하였다. 가정에서 제조된 배추김치로부터 분리한 *Lactobacillus plantarum* SU22는 병원성 세균에 대해 강한 항균 활성을 보였고 생체 아민과 발암성 효소인 β-glucuronidase를 생성하지 않았기 때문에 검은콩 발효의 스타터로 선정되었다. 검은콩은 5 kgf/cm^2, 150^{o}C로 조절된 팽화기에서 10분 동안 팽화 처리한 것과 처리하지 않은 것으로 각각 10-30% 혼합액을 만들고 *L. plantarum* SU22를 1%(v/v) 접종하여 37^{o}C로 48시간 동안 진탕 배양하면서 유산균의 생육특성을 비교하였다. 유산균의 생균수는 *L. plantarum* SU22로 발효된 팽화 검은콩(20%) 배양액에서 9 Log CFU/mL 이상이었다. 20% 팽화 검은콩 배양액을 alcalase로 가수분해한 후 *L. plantarum* SU22로 발효하는 것이 최적 조건

인 것으로 밝혀졌으며 유산균의 생균수가 10.30 Log CFU/mL까지 증가하였다. 최적 조건에서 총 폴리페놀 함량(94.02 mg GAE/g)과 DPPH 라디칼 소거능(92.50%)이 비 발효 대조군(87.74 mg GAE/g, 83.14%)에 비해 현저하게 증가하였다(P<0.05). 결론적으로 검은콩을 팽화한 후 alcalase 처리와 *L. plantarum* SU22를 병행하여 발효할 때 바이오제닉 아민이 없는 검은콩 발효액을 효과적으로 제조할 수 있으며, 총 폴리페놀과 DPPH 라디칼 소거능을 유의적으로 증가시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest

ORCID

Un-Sik Hwang	https://orcid.org/0000-0002-7317-5472
So-Yeon Jeong	https://orcid.org/0000-0001-6609-5741
Soo-Yeon Park	https://orcid.org/0000-0001-8891-3039
Mi-Sun Park	https://orcid.org/0000-0002-9853-8153
Min-Ji Kang	https://orcid.org/0000-0002-2012-1067
Cheong-Bin You	https://orcid.org/0000-0002-5301-7100
Hyun-Ji Seo	https://orcid.org/0000-0003-4535-3582
Eun-Soo Lee	https://orcid.org/0000-0003-4613-8999
Sang-Man Yun	https://orcid.org/0000-0002-4491-5048
Hoon Park	https://orcid.org/0000-0003-4463-9976
Hee-Jae Suh	https://orcid.org/0000-0003-0631-3270

References

1. Kang, S.H., Lee, S., Ko, J.M., Hwang, I.K., Comparisons of the phytochemical characteristics of korean traditional soy sauce with varying soybean seeding periods and regions of production. *Korean J. Food Nutr.*, **24,** 761-769 (2011).
2. Im, J.Y., Kim, S.C., Kim, S., Choi, Y., Yang, M.R., Cho, I.H., Kim, H.R., Protein and amino-acid contents in backtae, seoritae, huktae, and seomoktae soybeans with different cooking methods. *Korean J. Food Cook Sci.*, **32,** 567-574 (2016).
3. Lee, H.S., Eom, K.Y., Choi, H.S., Kim, D.H., Yoo, S.H., Kim, W.J., Functional properties of germinated whole soy flour. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **38,** 483-487 (2006).
4. Kim, S.H, Lee, Y.B., Hwang, I.K., Studies on volatile compounds in lipoxygenase deficient-soybean and its products. *Korean J. Food Nutr.,* **13,** 118-124 (2000).
5. Shin, Y.M., Cho, K.M., Seo, W.T., Choi, J.S., Quality characteristics and antioxidant activity of soybean meat using heat-treated soybean powder. *J. Agric. & Life Sci.*, **48**, 105-117 (2014).
6. Lee, S.Y., Seo, B.Y., Eom, J.S., Choi, H.S., Quality characteristics of fermented soybean products produced by lactic acid bacteria isolated from traditional soybean paste. *Korean J. Food Preserv.*, **24,** 187-195 (2017).
7. Meinlschmidt, P., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. *Food Sci. Nutr.,* **4(1),** 11–23 (2015).
8. Quinto, E., Jiménez, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J., Girbés, T., Probiotic Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food Sci. Nutr.,* **5**, 1765-1775 (2014).
9. Kim, B., Mun, E.G., Kim, D., Kim, Y., Park, Y., Lee, H.J., Cha, Y.S., A survey of research papers on the health benefits of kimchi and kimchi lactic acid bacteria. *J. Nutr. Health.*, **51,** 1-13 (2018).
10. Rhee, S.J., Lee, J., Lee, C., Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods. *Microb. Cell. Fact.,* **10,** S5 (2011).
11. Lee, J.E., Lee, S.Y., Growth characteristics of *Bifidobacteria* and quality characteristics of soy yogurt propared with different proteolytic enzymes and starter culture. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **33,** 603-610 (2001).
12. Cho, E.K., Cho, H.Y., Kim, B.C., Shin, H.H., Cho, S.C., Kook, M.C., Pyun, Y.R., Development of pretreatment and mixed culture processes for plant originated lactic acid to produce a functional lactic acid beverage. *Korean J. Food & Nutr.*, **24(1),** 117-123 (2011).
13. Kim, H.E., Han, S.Y., Jung, J.B., Ko, J.M., Kim, Y.S., Quality characteristics of doenjang (soybean paste) prepared with germinated regular soybean and black soybean. *Korean J. Food Sci. Technol*., **43(3),** 361-368 (2011).
14. Choi, H.J., Lim, B.R., Kim, D.W., Kwon, G.S., Joo, W.H., Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi. *J. Life. Sci.,* **24**, 1231-1237 (2014).
15. Yang, J., Ding, X., Qin, Y., Zeng, Y., Safety assessment of the biogenic amines in fermented soya beans and fermented bean curd. *J. Agric. Food Chem.*, **62(31),** 7947-54 (2014).
16. Sim, Y.J., Jung, B.M., Rhee, K.C., Quality characteristics of extruded formulated products prepared from blends of rice flour, corn flour and fish muscle by single-screw extrusion. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **33,** 45-49 (2001).
17. Kim, J.M., Cho, J.H., Seo, W.D., Youn, K.S., Quality characteristics of extruded rice snacks based on the rice cultivar and corn flour ratio. *Korean J. Food Preserv.*, **27(5),** 617-626 (2020).
18. NCBI BLAST online program, (2020, August 5), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/
19. Kim, S.I., Kim, I.C., Chang, H.C., Isolation and identification of antimicrobial agent producing microorganisms and sensitive strain from soil. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **28,** 526-533 (1999).
20. Yang, H.J., Jeong, S.J., Jeong, S.Y., Ryu, M.S., Jeong, D.Y., Isolation of biogenic amine non-producing *Lactobacillus brevis* SBB07 and its potential probiotic properties. *Korean. J. Life Sci.*, **28**, 68-77 (2018).
21. Shukla, S., Park, H.K., Kim, J.K., Kim, M.H., Determination of biogenic amines in Korean traditional fermented soybean paste (Doenjang). *Food Chem. Toxicol.*, **48**, 1191-1195 (2010).

22. Ahn, J.B., Park, J.A., Jo, H.J., Woo, I.H., Lee, S.H., Jang, K.I., Qiality characteristics and antioxidant activity of commercial doenjang and traditional doenjang in Korea. *Korea J. Food & Nutr.*, **25(1)**, 142-148 (2012).
23. Wang, Y., Zhou, J., Xia, X., Zhao, Y., Shao, W., Probiotic potential of *Lactobacillus paracasei* FM-LP-4 isolated from Xinjiang camel milk yoghurt. *Int. Dairy J.*, **62,** 28-34 (2016).
24. Choi, Y.H., Lee, J.S., Bae, S.Y., Yang, K.J., Yeom, K.W., Jo, D.H., Kang, O.H., Baik, H.S., Isolation of bacteria with protease activity from cheonggukjang and purification of fibrinolytic enzyme. *J. Life Sci.,* **23(2)**, 259-266 (2013).
25. Lim, Y.S., Kim, J.Y., Kang, H.C., Isolation and identification of lactic acid bacteria with probiotic activities from kimchi and their fermentation properties in milk. *J. Milk Sci. Biotechnol.,* **37(2)**, 115-128 (2019).
26. Ouwehand, A.C., 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S., Von Wright A. (Ed.), lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects, 2nd edition (edited by). Marcel Dekker, New York, NY, USA, pp. 139-159.
27. Lee, N.K., Kim, S.Y., Han, K.J., Eom, S.J., Paik, H.D., Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. *Food Sci. Technol.*, **58,** 130-134 (2014).
28. Park, J.H., Lee, S.C., Moon, H.J., Oh, J.H., Song, G.B., HPLC-based analysis of biogenic amines in aging-cheese. *J. Milk Sci. Biotechnol.,* **34(3)**, 187-191 (2016).
29. Lim, E.S., Lee, E.W., Quality characteristics of *Cheonggukjang* by mixed culture of biogenic amine producing and degrading-bacteria. *Korean J. Food Preserv.,* **26(5),** 521-531 (2019).
30. Cho, T.Y., Han, G.H., Bahn, K.N., Son, Y W., Jang, M.R., Lee, C.H., Kim, S.H., Kim, D.B., Kim, S.B., Evaluation of biogenic amines in korean commercial fermented foods. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **38,** 730-737 (2006).
31. Seo, M.J., Lee, C.D., Lee, J.N., Yang, H.J., Jeong, D.Y., Lee, G.H., Analysis of biogenic amines and inorganic elements in *Cheonggukjang*. *Korean J. Food Preserv.,* **26(1),** 101-108 (2019).
32. Choi, J.Y., Hong, S.W., Chung, K.S., Selection of biogenic amine-reducing microorganisms from a traditional Korean-style fermented food, Cheonggukjang. *Korean J. Food Sci. Technol.,* **44,** 196-201 (2012).
33. Jeong, S.Y., Kang, S.N., Lee, N.R., Ryu, S.M., Wu, X., Kim, D.S., Park, S.M., Production and physicochemical properties of black bean yogurt made with lactic acid bacteria isolated from vinegar and kimchi. *Korea J. Food Sci Technol.,* **50(1)**, 76-82 (2018).
34. Li, X.X., Yi, Y.H., Characteristics of yoghurt and yoghurt ice cream added with rice powder or puffed rice powder. *Food Eng. Prog.*, **22,** 17-23 (2018).
35. Anh, T.L.Q., Hoa, N.T.Q., Nguyen, P.D.T., Thanh, H.V., Nguyen, P.B., Anh, L.T.H., Dao, D.T.A., Soybean protein extraction by alcalase and flavourzyme, combining thermal pretreatment for enteral feeding product. *Catalysts*, **10**, 829 (2020).
36. Kim, D.H., Lee, T.J., In, M.J., Potential of proteolytic enzyme treatment for production of korean red ginseng extract. *J. Appl. Biol. Chem.,* **62(4)**, 385-389 (2019).
37. Landete, J.M., Curiel, J.A., Rodriguez, H., de las Rivas B., Munoz R., Aryl glycosidases from *Lactobacillus plantarum* increase antioxidant activity of phenolic compounds. *J. Funct. Food.,* **7**, 322-329 (2014).
38. Park, I.S., Yang, M., Kwak, J.S., Jang, S., Jia, Y., Antioxidant activity of soybean yougurt added tomato extract by *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.,* **26**, 280-286 (2013).