

Ceriporia lacerata 배양액과 고정화 *Lactobacillus plantarum* K154를 이용한 감마아미노뷰티르산 생산 최적화

이은지¹ · 이삼핀^{1,2,*}

¹계명대학교 식품가공학과, ²계명대학교 TMR 센터

Optimization of γ -Aminobutyric Acid (GABA) Production Using Immobilized *Lactobacillus plantarum* K154 in Submerged Culture of *Ceriporia lacerata*

Eun-Ji Lee¹ and Sam-Pin Lee^{1,2,*}

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University

²The Center for Traditional Microorganism Resource (TMR), Keimyung University

Abstract The production of GABA was optimized by co-cultivation of immobilized *Lactobacillus plantarum* K154 (ILK) with *Ceriporia lacerata* cultures. The mycelial culture of *C. lacerata* was performed in a defined medium containing 3% glucose, 3% soybean flour, and 0.15% MgSO₄ in a submerged condition for 7 days at 25°C, resulting in the production of 29.7 g/L mycelia, 3.1 g/L exopolysaccharides, 2% (w/w) β -glucan, 68.96 unit/mL protease, and 10.37 unit/mL α -amylase. ILK in *C. lacerata* culture showed viable cell counts of 3.13×10⁹ CFU/mL for immobilized cells and 1.48×10⁸ CFU/mL for free cells after 1 day. GABA production in the free and immobilized cells was 9.96 mg/mL and 6.30 mg/mL, respectively, after 7 days. A recycling test of ILK in the co-fermentation was consequently performed five times at 30°C for 15 days, resulting in the highest production of GABA. GABA could also be efficiently overproduced by co-cultivation with the produced polysaccharides, β -glucan, peptides, and probiotics.

Keywords: Ca-alginate bead, immobilization, γ -aminobutyric acid, *Lactobacillus plantarum*, *Ceriporia lacerata*

서 론

동양에서 버섯은 식의약품으로 사용에 대한 오랜 역사를 가지고 있으며, 다양한 생리활성물질을 포함하고 있어서 잠재적인 약학 소재로 보고되고 있다(1). 담자균류에 속하는 백색 부후균으로 알려진 *Ceriporia lacerata*는 참나무나 적송에 부생하며, 목재 내 리그닌을 선택적으로 분해시켜 부후가 진행되면서 백색으로 변하는 형태학적 특징을 가지고 있다(2). 버섯 균사체를 포함한 액체 배양물은 배지의 영양성분 조성 및 배양조건에 따라 항균, 항당뇨, 항암 및 산화방지(3) 활성을 가지는 다양한 대사산물을 얻을 수 있었다(4). 최근, *Ceriporia lacerata* 버섯의 액체배양물이 텍사메타손(dexamethasone) 스트레스에 의한 인슐린 분비 INS-1 세포의 보호효과에 대한 연구결과를 보고된 바 있다(5). 특히 *C. lacerata* 버섯은 다른 버섯류에 비해 균사 생장이 매우 빨라 액체배양의 효율성을 극대화할 수 있는 장점이 있다.

감마아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid)은 신경전달 억제물질로서 일본에서는 건강 식품소재로 되면서, GABA를 첨가한 식품

이나 음료가 개발되어 판매되고 있다. 최근에는 미생물의 발효를 통한 GABA의 생산이 연구되고 있으며(6), 김치에서 분리한 *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum* 등의 젖산세균이 고농도의 GABA를 생산한다고 알려져 있다(7,8). 특히, 혼합발효를 통한 GABA 생산 연구로서 젖산세균 *Streptococcus thermophilus*와 *L. delbrueckii* 균주의 co-culture를 통해서 산생성과 GABA 생산이 증진되었다는 보고가 있었다(9). 그러나 다양한 발효미생물을 복합적으로 이용하여 GABA 대량 생산 최적화에 관한 연구는 미비한 실정이다.

프로바이오틱(probiotic)으로서 젖산세균은 통성혐기성균으로 젖산을 생산하지만, 경구 섭취 시 위의 강한 산성 환경에서 대부분이 사멸하며, 소장에서 분비되는 소화효소와 담즙산염 등에 의해서 생육이 저해되는 것으로 알려졌다(10). 젖산세균 고정화는 담체에 젖산세균을 고정화시켜 외부환경으로부터 보호하거나 원하는 시점에서 방출시킬 수 있어서(11), 발효산업인 간장(12), 알코올(13), 식초(14) 및 바이타민(15) 등의 생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 미생물의 고정화 과정은 수용성 고분자 알긴산소듐(sodium alginate) 분산액을 염화칼슘 용액에 소량씩 적하하면 알긴산칼슘(Ca-alginate) 비드가 형성된다(16). 미생물 균체 고정화 기술은 이러한 고정화 균체를 이용한 발효기술은 장기간 균체를 사용할 수 있으며, 연속 발효가 가능하여 생산성을 높일 수 있고, 오염을 방지할 수 있는 장점이 있다(17). Tipayang과 Kozaki(18)는 *Lactobacillus* sp.를 알지네이트(alginate)를 이용하여 비드를 제조하였으며, 발효가 진행되면서 비드 내 고정화된 미생

*Corresponding author: Sam-Pin Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea
Tel: 82-53-580-5554
Fax: 82-53-580-6447
E-mail: splee@kmu.ac.kr
Received January 28, 2015; revised April 8, 2015;
accepted May 7, 2015

물 수가 증가한다고 보고하였다. Kim 등(19)의 보고에 의하면 *L. acidophilus* IFO3205를 알긴산칼슘으로 비드를 제조한 결과, 실온에서 3주까지 비드 내에 미생물이 생존하였고, 13주까지 57%로 감소한 것으로 나타났다. 따라서 젖산세균 고정화 기술은 외부 스트레스 요인으로부터 젖산세균을 보호하여 생존력을 높이기 위한 효과적인 방법으로서 식품, 의약 등 다양한 분야에서 산업적 적용이 확대될 필요성이 있다.

따라서 본 연구는 버섯 배양물을 이용하여 GABA생산 젖산세균의 혼합배양을 통해서 다양한 생리활성물질과 GABA 생산을 최적화하고자 하였으며, 이를 위해서 1차적으로 *C. lacerata* 버섯 종균의 액체배양을 통해서 생리활성물질을 포함한 균사체 배양을 최적화하였으며, 2차적으로 고정화된 젖산세균의 혼합배양 기술을 통해서 GABA물질이 강화된 버섯배양물 소재의 생산을 최적화하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

포도당(glucose), 에틸알코올(ethyl alcohol), 황산마그네슘(7수염) ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), $CaCl_2$ 는 덕산 화학(Ansan, Korea)제품을 구입하였고, 글루탐산소듐(sodium L-glutamate)은 Yakuri Pure Chemicals (Kyoto, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 탈지 콩가루는 유성식품(Gwangju, Korea)에서 구입하여 밀봉한 후 암소에서 보관하여 사용하였다. 탈지우유 분말은 서울우유(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였으며, 균체 고정화 제조에 사용한 알긴산은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

사용균주

본 시험에 사용한 버섯 균주는 (주)월드바이오텍(Gimcheon, Korea)에서 분양 받은 *C. lacerata*로 potato dextrose agar (PDA, Difco. Co. Maryland, NY, USA) 배지에 접종하여 25°C, pH 5.1±0.2, 암소 조건에서 10일간 배양하여 사용하였다. GABA를 생산하는 젖산세균은 김치에서 분리한 것으로, *L. plantarum* K154 (KACC 91727)를 Lactobacilli MRS broth agar (Difco. Co.) 배지에 접종하여 30°C, pH 6.5±0.2, 24시간 배양하여 사용하였다.

C. lacerata 균사체 배양

C. lacerata 버섯을 액체배양의 균사체 생산을 최적화하기 위해 성립된 배지 조성으로 glucose 3% (w/v), soybean flour 3% (w/v), 황산마그네슘($MgSO_4$) 0.15% (w/v)를 혼합하여 구성된 GSM (glucose, soybean flour, $MgSO_4$)을 기본 배지로 사용하였다. GSM 배지를 121°C에서 15분간 멸균하여 5L자 발효기(Fermentec Co. Ltd., Cheongwon, Korea)에서 진탕 배양하였다. PDA 배지에서 배양된 *C. lacerata* 버섯 종균을 펀치(punch)를 이용하여 지름 1.5 cm로 절개한 다음 potato dextrose broth 100 mL에 첨가한 후 균질기(homogenizer) (10,000 rpm, 3 min)로 균질화 하여 첨가하였다. 배양 조건으로 온도 25°C, 공기주입량 1 vvm, 회전속도 300 rpm으로 하여 7일간 진탕 배양한 후 화학적 특성을 평가하였다.

젖산세균 고정화 제조 및 혼합배양

알긴산소듐 1.5%와 3%에 MRS 배지에서 배양한 젖산세균을 5% 첨가한 후 혼합하여 cell suspension 용액을 얻은 후, 0.1 M $CaCl_2$ 에 적하여 알긴산칼슘 비드를 제조하였다. 제조된 비드는 멸균 증류수로 2회 세척한 다음 배지에 첨가하였다. 혼합배양에 사용한 배지 조성으로 *C. lacerata* 버섯 배양물에 skim milk 5%

(v/v), 글루탐산소듐 2% (w/v)를 첨가한 후 세포배양플라스크(cell culture flask) (SPL Co., Pocheon, Korea)를 이용하여 30°C에서 7일간 정지 배양하였다. 젖산세균 고정화의 재사용에 의한 GABA 생산 과정은 비드는 지속적으로 사용하면서 3일간 배양 후 기존의 배지는 제거하고, 새로운 배지를 첨가하여 3일 간격으로 5회 간 배지를 교체하면서 혼합배양을 하였다.

pH, 산도 및 당도 측정

pH는 배양액 10 mL을 취하여 pH 미터(Digital pH meter 420A+, Thermo Orion, Washington, DC, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도는 pH meter를 이용하여 배양액의 pH가 8.3에 도달할 때 까지 0.1 N 수산화소듐(NaOH)으로 적정하고, 그 소비량을 타타르산(tartaric acid) 및 젖산 함량(% (v/v))으로 환산하여 나타내었다(20). 당도는 전자굴절당도계(0-93°Bx, Refractometer, ATAGO Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하였다.

총 당 및 환원당 함량 측정

총 당 함량은 페놀-황산(phenol- H_2SO_4)법(21)에 따라 시료액 1 mL에 80% 페놀 용액 25 μ L를 가한 뒤 황산 2.5 mL를 첨가하여 격렬히 반응 시킨 후 실온에서 30분간 정치시켜 485 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 DNS (dinitrosalicylic acid)법에 의해 측정하였다(22). 희석한 시료 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 가하고, 100°C에서 5분간 발색시킨다. 실온의 암소에서 40분간 냉각 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총당 및 환원당 함량은 포도당(glucose)을 표준물질로 하여 표준곡선을 작성한 후 산출하였다.

균사체 및 다당류 함량 측정

C. lacerata 균사체 배양물에 함유된 균사체와 세포의 다당류 함량은 Lee 등(23)의 방법을 변형하여 측정하였다. 배양액 200 mL씩 취하여 원심 분리(1,500xg, 20 min)하여 침전물과 상층액으로 분리하였다. 침전물은 균사체 성분으로 증류수로 2회 세척하여 냉동건조하여 무게를 측정하였고, 상층액에 함유된 세포의 다당류를 분리하기 위하여 차가운 아이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 배양액 대비 2배 첨가하여 4°C에서 하룻밤 방치하였다. 아이소프로필 알코올에 침전된 다당류는 원심 분리(1,500xg, 20 min)하여 회수한 후, 냉동건조하여 무게를 측정하였다.

베타글루칸(β -Glucan) 및 타이로신(tyrosine) 함량 측정

C. lacerata 균사체 배양물의 냉동건조 분말 100 mg을 정량하여 Megazyme kit (K-BGLU, Megazyme International Ireland, Co. Wicklow, Ireland)를 이용하여 베타 글루칸 함량을 측정하였다(24). 반응액의 흡광도를 510 nm에서 측정하였으며, 총 글루칸과 알파 글루칸 함량의 차이를 베타 글루칸 함량으로 계산하였다. 버섯 배양물에서 생산된 펩타이드(peptide) 함량을 측정하기 위하여 folin 시약을 이용하여 tyrosine 함량을 측정하였다(25).

단백질가수분해효소(Protease) 및 알파아밀레이스(α -amylase) 활성 측정

C. lacerata 버섯에서 유래되는 단백질 가수분해효소와 녹말 분해효소활성을 측정하기 위해 Protease의 활성도는 Kim 등의 방법(26)을 변형하여 측정하였다. 기질은 0.6% 카세인을 사용하였고, 시료 상층액을 0.02 M 인산완충용액(phosphate buffer, pH 7.0)로 희석하여 조효소액을 조제하여 단백질 가수분해 효소 활성을 측정하였다. α -Amylase 활성은 아이오딘 전분반응으로 측정되었

다(27). 기질로는 1% 가용성 전분을 사용하였으며, 요오드화 용액(0.005% I₂, 0.05% KI)으로 발색시켜 구하였다.

생균수 측정

생균수는 비드 내에 고정화된 젖산세균수와 배지에 유리된 젖산세균수를 각각 측정하여 비교하였다. 비드 내의 젖산세균수는 고정화된 비드의 피복물질을 1 M phosphate buffer (pH 7.0)에 용해시킨 후 peptone 1% 용액으로 십진 희석하여 측정하였다(28). 배지에 유리된 젖산세균 생균수 측정은 배양액을 십진 희석하여 121°C에서 15분간 살균한 MRS broth agar 배지에 20 µL를 도말한 후, 30°C 항온배양기에서 24시간 배양한 젖산세균의 생균수를 콜로니 형성단위 CFU/mL로 나타내었다(29).

GABA 함량 측정

2차 젖산 발효한 *C. lacerata* 균사체 배양물의 글루탐산(glutamic acid)의 전환에 따른 GABA 생산을 thinlayer chromatography (TLC) 분석으로 확인하였다(30). 전개용매는 노말 부틸알코올(n-butyl alcohol):핑초산:중류수(3:1:1-v/v/v)를 혼합하였고, 발색시약으로 0.2% ninhydrin을 사용하여 GABA spot을 확인하였다. *C. lacerata* 균사체 배양물의 젖산발효 기간에 따른 glutamic acid 잔존량과 생성된 GABA 함량을 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 통해 측정하였다(31). 건조시킨 시료를 상온에서 30분간 phenyl isothiocyanate (PITC), 메탄올(MeOH):H₂O:TEA:PITC=7:1:1:1)를 가하여 유도체화한 다음, 100% 용매 A (140 mM NaOAc, 0.1% TEA, 6% CH₃CN, pH 6.1)와 100% solvent B (60% CH₃CN)로 25분간 녹인 후, 원심 분리한 상층액을 HPLC (Hewlett packard 1100 series, Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. Column은 Waters Nova-Pak C18 4 µm (Waters, Milford, DE, USA)를 사용하였으며, flow rate는 1.0 mL/min으로 하였고, 254 nm에서 측정하였다.

주사전자현미경법(Field emission scanning electron microscopy (FESEM))에 의한 비드 형태 관찰

고정화 젖산세균의 표면 및 단면 형태의 자세한 관찰을 위하여 전계방사형 주사전자현미경(FESEM, CFE, S-4800, Hitachi, Tokyo, Japan)을 이용하였다. 젖산세균 비드를 냉동건조한 후 표면을 오스뮴(osmium, Os)으로 코팅시켜 전도성을 갖게 하였으며, 가속전압(3 kV, SE Image)모드로 40배에서 100배로 하여 관찰하였다.

통계처리

실험 결과는 평균값과 표준오차(mean±SE)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (statistical package for social science, ver. 21.05, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 일원배치분실 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

C. lacerata 균사체 배양물의 이화학적 특성

C. lacerata 균사체 액체 배양의 최적배양 조건으로 glucose 3%, 콩가루 3%, 황산마그네슘(MgSO₄) 0.15%를 혼합한 배지 조성을 이용하여 5 L jar fermentor에서 7일 동안 진탕 배양한 *C. lacerata* 균사체 액체 배양물의 이화학적 특성을 분석하였다(Table 1). pH는 배양 전 pH 6.49로 중성으로 나타났고, 7일 배양 후에는 pH 5.52로 약산성을 나타내었다. 산도를 측정한 결과, 배양 전 0.05%에서 7일 배양 후 0.32%로 증가하였다. 당도에서 배양 초기 4.37°Bx로 나타났고, 배양 7일 후 2.83°Bx로 발효가 진행될수록 감소하였다. 총당과 환원당 함량을 측정한 결과, 배양이 지속될수록 감소하는 경향을 보였다. 환원당은 염기성 용액에서 알데하이드 또는 케톤을 형성하는 당의 일종으로 포도당, 과당, 엿당, 글리세르알데히드 및 아라비노오스 등이 여기에 속한다. 이러한 버섯 배양물 중의 환원당은 배지 원료로 사용된 glucose, soybean flour가 *C. lacerata* 균사체 성장에 이용되어 소모된 것으로 판단된다.

배양 7일째, 균사체 함량은 29.70 g/L, 세포 외 수용성 다당류 함량은 3.10 g/L로 높게 나타났다. Lee와 Lee(32)은 쌀겨를 이용하여 *C. lacerata* 균사체 액체 배양을 플라스크(flask)에서 7일간 배양한 후 분석한 결과, 균사체 함량 11.2 g/L, 다당류 함량은 3.0 g/L로 나타난 것으로 볼 때, 본 실험 결과에서 *C. lacerata* 균사체 배양물의 균사체 및 다당류 함량이 매우 높은 것을 알 수 있었다. 분리된 다당류로부터 β-glucan 함량을 측정한 결과, 배양 7일째 2.00% (w/w)로 나타났으며, fermentor를 이용한 액체 배양을 통해서 균사체, 다당류, β-glucan 생산이 우수하였다.

C. lacerata 균사체 배양물의 단백질 가수분해 정도를 간접적으로 확인할 수 있는 tyrosine 함량을 측정한 결과, 배양 전에는 130.71 µg/mL에서 7일 배양하였을 때 580.84 µg/mL로 나타나 tyrosine 함량이 높은 경향을 보였다. 이는 *C. lacerata* 균사체 배

Table 1. Physicochemical properties of submerged *C. lacerata* culture broth

	Fermentation time (days)			
	0	3	5	7
pH	6.49±0.01 ^d	4.42±0.01 ^c	4.38±0.01 ^b	5.52±0.01 ^a
Acidity (%)	0.05±0.01 ^d	0.17±0.01 ^c	0.29±0.02 ^b	0.32±0.01 ^a
Soluble solid content (°Bx)	4.37±0.12 ^a	4.43±0.06 ^a	3.57±0.12 ^b	2.83±0.06 ^c
Total sugar content (%)	3.62±0.02 ^a	2.94±0.02 ^b	2.13±0.11 ^c	1.24±0.02 ^d
Reducing sugar content (%)	3.29±0.16 ^a	2.95±0.07 ^b	1.58±0.04 ^c	0.45±0.01 ^d
Mycelia dry weight (g/L)	ND ¹⁾	20.70±0.10 ^b	21.30±0.30 ^b	29.70±1.30 ^a
Exopolysaccharide (g/L)	ND	2.40±0.20 ^b	2.70±0.50 ^{ab}	3.10±0.10 ^a
β-Glucan content (% w/w)	ND	1.11±0.19 ^b	1.72±0.05 ^a	2.00±0.34 ^a
Tyrosine content (µg/mL)	130.71±0.92 ^c	441.37±4.21 ^b	537.95±5.53 ^a	580.84±5.79 ^a
Protease activity (unit/mL)	ND	37.12±8.73 ^b	68.94±0.67 ^a	68.96±9.33 ^a
α-Amylase activity (unit/mL)	ND	4.85±1.80 ^b	7.91±1.46 ^a	10.37±1.69 ^a

¹⁾ND: Not detected. Each value is a mean±SE (n≥3); ^{a-d}Means in a same row with different alphabets are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

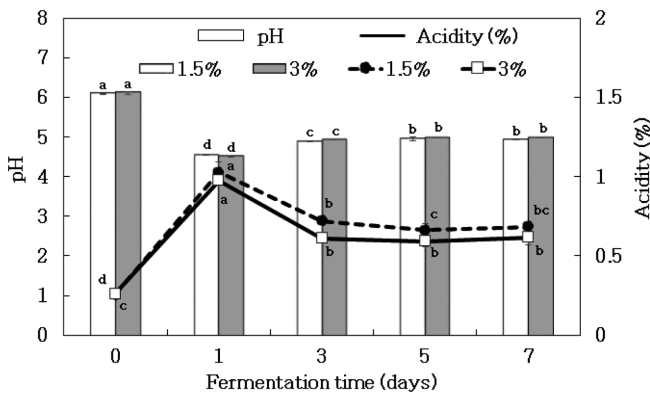


Fig. 1. Changes of pH and acidity in *C. lacerata* culture broth fermented by *L. plantarum* K154 immobilized with different sodium alginate concentration. ^{a-d}Means in a same row with different alphabets are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

양물의 배양 기간에 따라서 단백질 가수분해에 의한 펩타이드 생산이 증가되는 것으로 생각된다. 또한 버섯 배양물의 protease 활성을 측정된 결과, 배양 7일 제 68.96 unit/mL로 나타나는 높은 가수분해효소 활성을 보였다. Park (33)은 현미에서 배양한 장수버섯과 상황버섯 균사체 배양물의 protease 활성을 측정된 결과, 20일 배양 시 장수버섯 배양물에서 42.18 unit/mL, 상황버섯 배양물은 효소 활성이 24.81 unit/mL로 나타난 것으로 보아, 본 실험 결과에서 7일 배양한 *C. lacerata* 버섯 배양물의 protease 활성이 매우 뛰어난 것을 알 수 있다. *C. lacerata* 버섯에서 유래되는 단백질 분해효소의 작용에 의해서 배지에 첨가되는 soybean flour 등이 단백질 가수분해에 의해 펩타이드 생산이 증진되는 것으로 생각된다. *C. lacerata* 균사체 배양물의 α -amylase 활성을 측정된 결과에서 배양 3일 제는 4.85 unit/mL로 나타났고, 배양 기간 중 급격히 증가하여 배양 7일 제는 10.37 unit/mL로 효소 활성이 높게 나타났다.

고정화 젖산세균의 GABA 생산을 위한 혼합배양 최적화의 pH, 산도 및 생균수 변화

알긴산칼슘을 이용한 젖산세균 고정화는 높은 밀도의 고정화 미생물에 의해 발효 생산성을 높이며(34), 균체 회수와 재사용이 가능하여 높은 세포 농도로 발효가 가능한 장점이 있다(35). 고정화된 젖산세균을 이용하여 *C. lacerata* 버섯 균사체 배양물로부터 GABA 생산을 위해 혼합발효를 하였으며, 7일간 젖산발효 후 sodium alginate 1.5%와 3%에 따라서 pH와 산도를 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 알지네이트 농도에 따른 젖산세균을 고정화한 비드의 직경을 측정된 결과, 비드 크기는 알지네이트 1.5%, 3%로 제조하였을 때 평균적으로 각각 2.09 mm 및 2.63 mm로 나타났다. Jeon (17)의 연구에서 GABA 생산을 위해 젖산세균 고정화 비드의 직경을 평균 2.2 mm로 제조하여 사용하였으며, 이러한 비드의 크기가 균체 고정화시 균체의 활성에 영향을 미치면서, 발효의 효율적인 생산과 관련이 있다고 보고한 바에 따라 이와 유사한 비드의 크기를 사용하였다.

C. lacerata 균사체 배양물에 skim milk 5%와 MSG 2%를 첨가한 2차 젖산발효물의 초기 pH는 알지네이트 1.5%와 3%로 제조한 비드의 경우, 각각 pH 6.09, pH 6.11로 약산성으로 나타났다. 산도를 측정된 결과, 배양 전 0.26%로 나타났고, 배양 1일 후 0.97%로 급격히 증가하였으나 배양 3일 후 0.61%로 감소하여 배

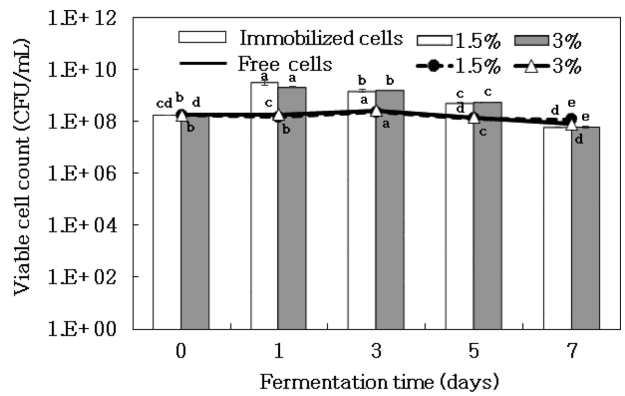


Fig. 2. Viable cell counts in *C. lacerata* culture broth fermented by *L. plantarum* K154 immobilized with different sodium alginate concentration. ^{a-c}Means in a same row with different alphabets are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

양기간 동안 유지하였다. *C. lacerata* 균사체 배양에 사용된 배지만을 이용하여 젖산세균 고정화에 의한 젖산발효를 하였을 때, 배양기간이 지속될수록 산도가 완만하게 증가하는 경향을 보였다(data not shown). 그러나 *C. lacerata* 균사체 배양물을 이용하여 고정화 젖산세균에 의한 혼합발효를 하였을 때, 배양 3일 후부터 배양기간에 따라서 산도가 유지하는 상이한 결과가 나타났다. 이는 젖산세균이 배지에 존재하는 발효성 당을 이용하여 지속적으로 젖산을 생성하는 것으로 생각되며, *C. lacerata* 균사체 배양물은 버섯 발효로 인해 탄소원이 소비되어 젖산세균이 배양에 사용할 수 있는 발효성 당이 부족하므로 혼합발효 시 배양 초기에는 산도가 증가하였지만 배양이 지속될수록 산생성이 활발하지 못할 것으로 생각된다. 특히, GABA생산 젖산세균이 글루탐아메이트(glutamate)를 세포내 glutamate decarboxylase 효소작용에 의한 수소이온의 제거를 통해서 젖산세균의 산성 환경에 대한 저항을 보인다는 연구결과(36)와 연관이 있다고 생각된다.

C. lacerata 균사체 배양물로부터 알지네이트 농도에 따른 젖산세균 고정화 비드에 의한 혼합발효 후 생균수를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 생균수 측정은 비드 내에 고정화된 젖산세균 생균수와 배지에 유리된 젖산세균 생균수를 측정하여 비교하였다. 알지네이트 1.5%를 이용하였을 때, 배양 1일 제 비드 내에서 젖산세균 수가 3.13×10^8 CFU/mL로 높게 나타났고, 배양기간이 지속될수록 약간 감소하였지만 높은 값을 보였다. 반면에, 배지에서는 생균수는 낮았지만 배양기간 동안 1.48×10^8 CFU/mL로 생균수가 일정하게 유지하는 것으로 보아 균주의 안정성이 높은 것을 알 수 있었다. 알지네이트 농도에 따라서 배지와 비드 내에서 젖산세균의 생균수에서 차이가 없었으며, 젖산세균수가 배양기간이 지속될수록 유지되는 것을 알 수 있었다. 혼합발효 시 skim milk의 첨가로 인해 젖산세균의 생육을 높일 수 있고, 이러한 *L. plantarum* 균주의 높은 생균수가 *C. lacerata* 균사체 배양물을 이용한 혼합발효 기간 동안 glutamate가 GABA로 생물 전환되는 것에 기여하는 것으로 생각된다. 젖산세균은 생육환경과 배양시간에 따라 균주의 생육 정도가 달라질 수 있고, *L. plantarum* 균주 배양액의 pH는 배양 2일 후 생균수를 급격히 감소시킨다는 연구결과가 보고된 바 있지만(37), 혼합발효 결과에서 생균수가 일정하게 유지되는 것은 *C. lacerata* 균사체 배양물의 영양분 강화에 따른 배양환경의 개선에 기인하는 것으로 생각된다.

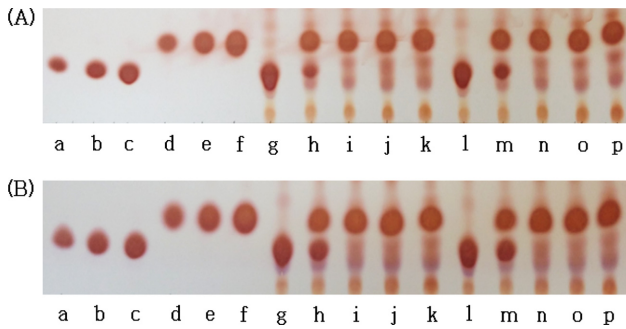


Fig. 3. GABA production pattern in co-fermentation by immobilized *L. plantarum* K154 using *C. lacerata* culture broth. Test sample (A) beads for immobilized cells, (B) culture broth for free cells. Spots for standard material: (a-c): sodium glutamate 0.25%, 0.5%, 1.0%, (d-f): GABA 0.25, 0.5, 1.0%; Spots (g-k): sodium alginate 1.5% (lactic acid fermentation time: 0-7 days), (l-p): sodium alginate 3% (0-7 days). The lactic acid bacteria (LAB) fermentation was carried out after fortification of 5% skim milk and 2% MSG

GABA 함량 측정

C. lacerata 균사체 배양물로부터 고정화 젯산세균을 이용한 혼합발효를 통하여 생성된 GABA 함량을 TLC를 통해 분석한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 배양기간 동안 비드 내에서 생성된 GABA 함량을 측정된 결과, 3% 알지네이트를 사용하였을 때 1.5% 알지네이트를 사용하였을 때보다 GABA spot의 크기가 더 크게 나타났다. 배양 1일 째 GABA 함량이 급격히 증가하여 배양 기간이 지속될수록 0.5% 이상의 GABA 함량이 유지되었으며, 배양 3일 후 글루탐산소염이 대부분 소진되었다(Fig. 3A). 배지에서 생성된 GABA 함량을 측정할 결과, 3% 알지네이트를 사용하였을 때 GABA 농도가 더 증가하였으며, 배양 1일 째 GABA가 0.25% 정도 생성되어 배양 3일 후 글루탐산소염이 대부분 소진되면서 GABA spot이 급격히 커지는 것을 볼 수 있다. 배양 7일 째, 3% 알지네이트를 사용하였을 때 GABA 함량이 0.5% 이상으로 나타났다(Fig. 3B). TLC를 측정할 때, 시료를 2배 희석하여 측정하였으며, 최종적으로 *C. lacerata* 균사체 배양물로부터 젯산세균 고정화를 이용한 혼합발효물의 배양 7일 째 배지와 비드 내에서 GABA가 모두 1% 정도 생성된 것을 알 수 있었다.

혼합 발효물로부터 배지와 비드 내에서 생성된 GABA 함량을 알지네이트 농도에 따라서 HPLC를 통해 정량 분석한 결과는 Table 2와 같다. 알지네이트 1.5%를 사용하였을 때, 배양 7일 후 비드 내에서 GABA 함량이 6.30 mg/mL가 생성되었고, 배지에서는 9.96 mg/mL로 나타났다. 알지네이트 3%를 사용하였을 때, 배양 7일 후 생성된 GABA 함량이 비드 내에서 5.85 mg/mL, 배지에서 9.93 mg/mL로 나타났다. 따라서 알지네이트 농도에 따른 고

정화 젯산세균에 의한 GABA생산은 배지에 존재하는 글루탐산소염이 비고정화 젯산세균에 의해서 효과적으로 전환되며, 동시에 알지네이트 비드 내부로 유입된 글루탐산소염이 고정화 젯산세균에 의해서 GABA로 전환되었다. 이는 알지네이트로 고정화시킨 젯산세균을 이용한 GABA생산에서 기질인 글루탐산소염이 비드 바깥쪽에서 생육하는 젯산세균에 의해서 효과적으로 GABA로 전환됨 알 수 있었다.

젯산세균은 산에 대한 내성 기작의 일환으로서 glutamate decarboxylase (GAD)는 glutamate로부터 GABA를 생산하기 위해 중요한 효소이다(38). 또한 효소의 작용과정에서 세포 내의 수소이온의 소비는 세포 내의 pH가 중립을 향하도록 이동하며, 미생물의 산 저항성을 만들어내는 역할을 한다(9). GAD활성을 위해 요구되는 세포 내에는 배양액에 의해 공급되는 것으로 생각되며, 산의 감소를 초래하는데, 이는 젯산발효 기간 동안 산도가 낮게 측정되는 결과에서 알 수 있다. *L. plantarum* K154 균주는 탈지분유가 강화된 *C. lacerata* 균사체 배양액을 이용하여 산생성능과 동시에 장기간의 젯산발효 동안 높은 생균수를 유지하면서 GABA 생산능이 월등히 높은 것으로 나타났다. 최종적인 혼합발효에 의한 젯산발효물은 GABA, 다당류, 젯산과 프로바이오틱 활성이 강화되었다.

균체 고정화의 FESEM 관찰

젯산세균을 고정화시킨 비드의 형태와 표면 및 단면 특성을 보다 자세히 관찰하기 위해 FESEM을 이용하여 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 알지네이트 1.5%로 제조한 비드는 냉동건조 후 비드의 표면이 갈라지고 비드의 일부분이 파괴되어 관찰이 어려웠다(data not shown). 이는 -80°C 급속 냉동과 같은 시료 전처리 과정이 외부충격 요인으로 작용하였다는 보고가 있었다(10). 따라서 알지네이트 3%를 cell suspension 용액으로 제조한 젯산세균 비드를 FESEM을 통해 형태를 관찰한 결과, 알지네이트 1.5%로 제조한 비드에 비해 비교적 손상 받지 않으면서 구형을 나타내었다. 비드를 칼로 절단 한 후 단면을 관찰한 결과 다공성 구조임을 확인하였고, 이러한 형태는 높은 농도의 알지네이트로 비드를 제조하여 비드 자체에 내구성이 부여된 것으로 보여진다.

배양 7일 후, 알지네이트 3%로 제조한 젯산세균 비드의 표면을 관찰한 결과, 장기간 발효로 인해 젯산세균이 고정화하고 있는 담체와 조밀한 결합으로 비드 표면에 미세한 주름을 나타내는 것을 확인하였다. 단면을 관찰하였을 때, 배양 전 보다 비드 내의 다공성이 치밀하게 채워진 형태를 나타내었다.

따라서 알긴산칼슘 비드는 알지네이트 농도 및 발효공정에 의해서 비드 입자 직경, 입자내부 밀도 등의 조절이 가능할 것으로 생각되었다. 비드의 물성은 알지네이트의 원료, 응고체의 조성에 따라 결정되며, 비드의 형태는 알지네이트의 점도에 상당히 의존하며(39), 알긴산칼슘 비드는 다공성임을 보고되었다(40). 이러한

Table 2. GABA contents in co-fermented culture by immobilized *L. plantarum* K154 using *C. lacerata* culture broth

Amino acids (mg/mL)	Fermentation time (days)							
	Alginate 1.5%				Alginate 3%			
	Immobilized cells		Free cells		Immobilized cells		Free cells	
	0	7	0	7	0	7	0	7
Glutamic acid	7.30±0.66 ^b	0.07±0.01 ^c	12.48±3.58 ^a	0.12±0.02 ^c	6.10±0.15 ^b	0.07±0.01 ^c	11.29±0.80 ^a	0.11±0.02 ^b
GABA	0.10±0.01 ^c	6.30±0.07 ^b	0.02±0.01 ^c	9.96±0.65 ^a	0.04±0.01 ^b	5.85±0.32 ^a	0.02±0.01 ^b	9.93±0.45 ^a

Each value is a mean±SE ($n \geq 3$); ^{a-c}Means in a same row with different alphabets are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

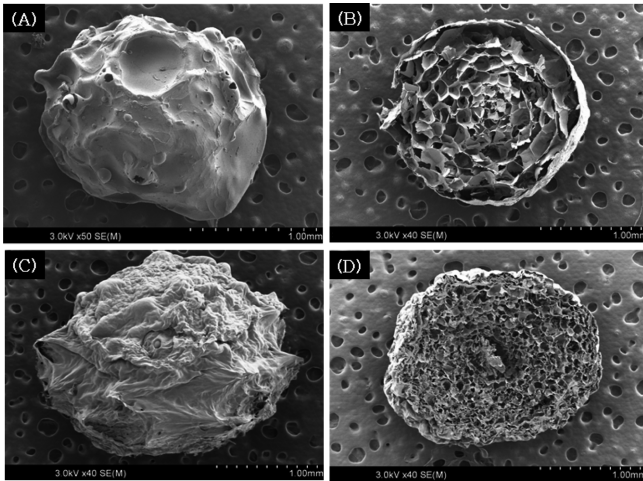


Fig. 4. FESEM of Ca-alginate bead immobilized *L. plantarum* K154 in alginate 3%. Lactic acid bacteria fermentation time: 0 day; (A-B), 7 day; (C-D). (A, C): outer surface, (B, D): inner surface. $\times 40$.

알긴산칼슘의 형성 메커니즘을 통해 *C. lacerata* 균사체 배양물로부터 젖산세균 고정화를 이용한 GABA 생산과 같은 식품분야에서 활용이 가능하고, 내부 활성 물질의 지속적인 방출 및 외부 환경으로부터의 보호 등의 목적으로 의약, 화장품, 식품 등 다양한 분야에서 활용이 기대된다(41,42).

젖산세균 고정화의 재사용에 의한 GABA 생산 및 특성

식품산업에서 젖산세균의 고정화는 고정화 균체를 장시간 사용할 수 있고, 연속 발효가 가능하여 생산성을 높일 수 있는 특징을 가지고 있다. 따라서 GABA 생산을 증진시키기 위해 제조한 고정화시킨 젖산세균 비드를 장시간 사용하면서 3일간 발효 후 기존의 배지는 제거하고, 새로운 배지를 첨가하면서 5회 연속 혼합발효를 하여 pH와 산도를 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 알지네이트 1.5%를 이용하여 제조한 젖산세균 고정화의 pH를 측정된 결과, 배양 전 pH 6.16에서 3일 배양 후 pH 4.17로 감소하였다. 발효 1회 이후에 2회 때부터 5회간 새로운 배지를 공급할 때, 배양 전 pH 5.10으로 나타났으며, 새로운 배지를 공급한 후 각각의 배양 기간에 따라서 pH가 감소하였다. 알지네이트 3%를 이용하여 제조한 젖산세균 고정화의 pH를 측정된 결과, 배양 전 6.15로 나타났으며, 3일 배양 후 4.28로 감소하였다. 발효 2, 3회 때, 새로운 배지를 공급하는 배양 전 pH는 5.35로 나타났으며, 3일 배양 후 pH 4.22로 감소하였다. 발효 4회와 5회 때, 배양 전

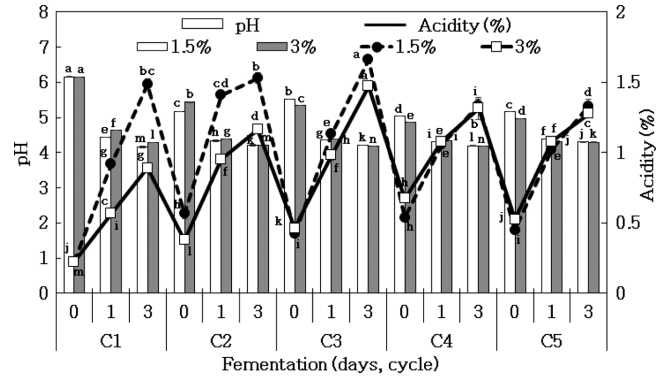


Fig. 5. Changes of pH and acidity in *C. lacerata* culture broth co-fermented repeatedly using *L. plantarum* K154 immobilized with different sodium alginate concentration. ^{a-m}Means in a same row with different alphabets are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

4.89로 낮게 나타났으며, 3일 배양 후 pH 4.29로 감소하였다.

알지네이트 1.5%를 이용하였을 때, 산도를 측정된 결과, 배양 3일 제 발효 1회 후 1.4%로 높게 나타났으며, 발효 3회 후 1.66%로 증가하였으나, 발효 4, 5회 이후 1.33%로 감소하였다. 알지네이트 3%를 이용하였을 때, 배양 3일 제 발효 1회 후 0.89%로 나타났고, 발효 3회 후 1.47%로 증가하였으나, 발효 4, 5회 후 1.27%로 감소하였다. 고정화 균체를 장시간 사용하면서 혼합발효 기간 동안 지속적으로 배지를 첨가하여 젖산세균의 생육에 영향을 주어 pH는 감소하고 산도가 증가하였다.

젖산세균 고정화 비드의 재사용 과정에서 배지에 유리된 생균수를 측정된 결과, 알지네이트 1.5%를 이용하였을 때, 발효 5회 동안 3.52×10^8 CFU/mL로 유지하였다(data not shown). 알지네이트 3%를 이용하였을 때, 3일 배양 후 발효 1회에서 2.60×10^8 CFU/mL로 나타났으며, 발효 5회 후 2.95×10^8 CFU/mL로 높게 나타났다. 이는 장시간 혼합발효에도 불구하고 배지에 skim milk의 첨가로 인해 젖산세균의 배양환경에 긍정적인 영향을 주어 발효 기간 동안 생균수가 10^8 CFU/mL을 유지하는 것으로 생각된다.

젖산세균 고정화 비드를 이용하여 혼합발효를 통해 배지에서 생성된 GABA 함량을 분석한 결과, 발효 1회 이후 2회 때부터 GABA 생산이 급격히 증가하여 혼합발효 5회 동안 0.5% 이상 GABA 함량이 유지되었다(data not shown). 고정화 균체를 장시간 사용하면서 3일간 발효 후 지속적으로 *C. lacerata* 균사체 배양물과 skim milk의 첨가로 젖산세균의 생육을 높이고, 고정화된 균체의 안정화와 GABA 생산에 도움을 준 것으로 생각된다.

혼합발효기간 동안 생성된 GABA 함량을 HPLC를 통해 정량

Table 3. GABA contents in repeatedly co-fermented culture broth by immobilized *L. plantarum* K154

Amino acids (mg/mL)	Fermentation time (days, cycles, C)					
	0	3 (1C)	3 (2C)	3 (3C)	3 (4C)	3 (5C)
Alginate 1.5%						
Glutamic acid	8.01±0.31 ^a	0.11±0.02 ^b	0.11±0.03 ^b	0.10±0.03 ^b	0.10±0.02 ^b	0.09±0.03 ^b
GABA	0.02±0.01 ^c	4.97±0.02 ^b	6.24±0.03 ^a	6.25±0.03 ^a	6.34±0.02 ^a	6.41±0.03 ^a
Alginate 3%						
Glutamic acid	9.60±0.37 ^a	0.41±0.01 ^a	0.10±0.01 ^b	0.09±0.02 ^c	0.08±0.01 ^d	0.08±0.02 ^c
GABA	0.02±0.01 ^c	4.52±0.02 ^a	5.39±0.02 ^d	5.49±0.58 ^c	5.89±0.01 ^b	6.04±0.05 ^a

Each value is a mean±SE ($n \geq 3$); ^{a-c}Means in a same row with different alphabets are significantly different by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

분석한 결과는 Table 3과 같다. 알지네이트 1.5%를 사용하였을 때, glutamic acid 함량은 배양 전 8.01 mg/mL에서 배양 3일 후 0.11 mg/mL로 급격히 감소하여 배양기간 동안 유지하였다. GABA 함량은 배양 3일 후 4.97 mg/mL로 생성되었으며, 새로운 배지를 첨가할수록 GABA 함량이 증가하여 혼합발효 2회 때 6.24 mg/mL로 나타났고, 혼합발효 5회 때 배지에서 6.41 mg/mL의 GABA 함량이 생성되었다. 알지네이트 3%를 사용하였을 때, glutamic acid 함량은 배양 전 9.60 mg/mL로 나타났으며, 배양기간이 지속될수록 소진되어 GABA로 전환되었다. GABA 함량은 배양 3일 후 4.52 mg/mL로 생성되었고, 혼합발효 2회 때 5.39 mg/mL로 증가하였으며, 새로운 배지를 첨가하여 발효 횟수가 많아질수록 GABA 함량이 지속적으로 증가하여, 혼합발효 5회 때 배지에서 생성된 GABA가 6.04 mg/mL로 나타났다.

담체에 균체를 고정화하는 것을 이용한 발효에 대해 보고된 연구로서 장기간 발효가 가능한 균주로는 검정고지곰팡이(*Aspergillus niger*)가 104일 가능하다고 보고되었고(43), 집합효모속(*Zygosaccharomyces*)이 30일(44), *Streptomyces aureofaciens*는 36일(45)까지 발효에 이용할 수 있다고 보고되었다. 따라서 *C. lacerata* 균사체 배양물을 이용하여 *L. plantarum* K154 균체의 고정화에 의해 GABA 생산을 위한 장기간 발효가 가능하다고 생각된다.

요 약

L. plantarum K154 고정화와 *C. lacerata* 균사체 배양물을 이용한 혼합발효를 통해서 다당류, β -glucan과 같은 생리활성물질과 기능성 GABA 생산을 최적화 하고자 하였다. *C. lacerata* 균사체의 최적 배양 조건으로 glucose 3%, soybean flour 3%, $MgSO_4$ 0.15%를 혼합하여 배지로 사용하였고, 5 L jar fermentor를 이용하여 25°C에서 7일간 진탕 배양하였다. 배양물은 균사체 함량 29.7 g/L, 다당류 함량 3.1 g/L, β -glucan 2% (w/w), protease 활성 68.96 unit/mL, α -amylase 활성 10.37 unit/mL로 매우 높게 나타났다. *C. lacerata* 균사체 배양물을 이용하여 젯산세균 고정화에 의한 혼합발효물의 생균수를 측정된 결과, 배양 1일째 비드 내에서 젯산세균의 수는 3.13×10^9 CFU/mL로 높게 나타났고, 배지에 유리된 젯산세균의 수는 배양기간 동안 1.48×10^8 CFU/mL로 유지하였다. 알지네이트 1.5%를 사용하여 비드를 제조하였을 때, GABA 함량을 측정된 결과 배양 7일째 비드 내에서 6.30 mg/mL, 배지에서 9.96 mg/mL로 높게 나타났다. 젯산세균 고정화의 재사용 가능성을 확인하기 위해 고정화 비드를 5회간 재사용하여 30°C에서 15일간 혼합발효한 결과, GABA 생산이 급격히 증가하여 배양 기간 동안 유지하였다. 결론적으로 *C. lacerata* 균사체 배양물로부터 고정화된 젯산세균을 이용한 혼합발효는 고농도 GABA를 포함한 기능성 소재를 생산할 수 있었으며, 이는 식품 및 생물 산업의 원료로 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터와 농림축산식품부 농생명산업기술개발사업으로 수행된 연구결과로 이에 감사드립니다.

References

1. Lindequist U, Niedermeyer THJ, Jlich WD. The pharmacological potential of mushrooms. *Evid.-Based Compl. Alt. Med.* 2: 285-299

(2005)

2. Hong CY, Gwak KS, Lee SY, Kim SH, Jeong HS, Choi IG. *Ceriporia* sp. ZLY-2010 in biodegradation of polychlorinated biphenyls: Extracellular enzymes production and effects of cytochrome P450 monooxygenase. *J. Korean Wood Sci. Technol.* 39: 469-480 (2011)

3. Shon MY, Seo KI, Choi SY, Sung NJ, Lee SW, Park SK. Chemical compounds and biological activity of *Phellinus baumii*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35: 524-529 (2006)

4. Tang YJ, Zhu LW, Li HM, Li DS. Submerged culture of mushrooms in bioreactors-Challenges, current state-of-the-art, and future prospects. *Food Technol. Biotech.* 45: 221-229 (2007)

5. Kim JH, Park YK, Kim JE, Lee SP, Kim BC, Jang BC. Crude extract of *Ceriporia lacerata* has a protective effect on dexamethasone-induced cytotoxicity in INS-1 cells via the modulation of P13K/PKB activity. *Int. J. Mol. Med.* 32: 179-186 (2013)

6. Lim SD, Kim KS, Do JR. Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus acidophilus* RMK567 isolated from raw milk. *Korean J. Food Sci. An.* 29: 15-23 (2009)

7. Tran TTB. Production of gamma amino butyric acid (GABA) using lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* K203 isolated from kimchi. Ms thesis, Chonnam national University, Gwangju, Korea (2012)

8. Park SY, Shim HY, Kim KS, Lim SD. Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K74 isolated from kimchi. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* 31: 143-152 (2013)

9. Watanabe Y, Hayakawa K, Ueno H. Effects of co-culturing LAB on GABA production. *J. Biol. Macromol.* 11: 3-13 (2011)

10. Lee SD. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* cells in Calcium alginate beads by emulsification/internal gelation. Ms thesis, Yonsei university, Seoul, Korea (2000)

11. Bakan JA. Microencapsulation of foods and related products. *Food Technol.* 27: 34-38 (1973)

12. Osaki K, Okamoto Y, Akao T, Nagata S, Takamatsu H. Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* 50: 1289-1292 (1985)

13. Nam KD, Choi MH, Kim WS, Kim HS, Ryu BH. Simultaneous saccharification and alcohol fermentation of unheated starch by free, immobilized and coimmobilized systems of glycoamylase and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol.* 66: 427-432 (1988)

14. Mori A. Production of vinegar by immobilized cells. *Process Biochem.* 20: 67-74 (1985)

15. Yongsmith B, Chutima K. Production of vitamin B₁₂ by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels. *J. Ferment. Technol.* 64: 593-602 (1983)

16. Lee GY. A study on the color removal of dyeing wastewater using the white rot fungi encapsulated by alginate bead. Ms thesis, Hoseo university, Asan, Chungnam, Korea (2009)

17. Jeon JH. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by immobilization of lactic acid bacteria isolated from salt fermented anchovy. PhD thesis, Kyungsung University, Busan, Korea (2009)

18. Tipayang P, Kozaki M. Lactic acid production by a new *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus vaccinostercus* Kozaki and Okada sp. nov., immobilized in calcium alginate. *J. Ferment. Technol.* 60: 595-598 (1982)

19. Kim HS, Kamara BJ, Good IC, Enders GL. Method for the preparation of stable microencapsulated lactic acid bacteria. *J. Ind. Microbiol.* 3: 253-257 (1988)

20. Kim JE, Hwang K, Lee SP. ACE inhibitory and hydrolytic enzyme activities in textured vegetable protein in relation to the solid state fermentation period using *Bacillus subtilis* HA. *Food Sci. Biotechnol.* 19: 487-495 (2010)

21. Shin JH, Kang MJ, Yang SM, Lee SJ, Ryu JH, Kim RJ, Sung NJ. Comparison of physicochemical properties and antioxidant activities of korean traditional *kanjang* and garlic added *kanjang*. *J. Agri. Life Sci.* 44: 39-48 (2010)

22. Luchsinger WW, Cornesky RA. Reducing power by the dinitrosalicylic acid method. *Anal. Biochem.* 4: 364-347 (1962)

23. Lee WY, Park YK, Ahn JK, Park SY. Production of mycelia and water soluble polysaccharides from submerged culture of *Gano-*

- derma applanatum* using different types of bioreactor. *Mycobiology* 34: 1-6 (2006)
24. Kim KJ. Optimization for β -glucan extraction from *Sparassis crispa* using response surface methodology. MS thesis, Hanyang University, Seoul, Korea (2010)
 25. Oh SM, Kim CS, Lee SP. Characterization of the functional properties of soy milk cake fermented by *Bacillus* sp. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 704-709 (2006)
 26. Kim HJ, Lee JJ, Cheigh MJ, Choi SY. Amylase, protease, peroxidase and ascorbic acid oxidase activity of kimchi ingredients. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1333-1338 (1998)
 27. Park JM, Oh HI. Changes in microflora and enzyme activities of traditional *kochujang meju* during fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 27: 56-62 (1995)
 28. Ryoo HJ. Lactic acid fermentation characteristics of liquorice extract by the immobilized lactic acid bacteria. PhD thesis, Dongguk University, Seoul, Korea (2005)
 29. Lee IS, Lee SO, Kim HS. Preparation and quality characteristics of yogurt added with *Saururus chinensis* (Lour.) bail. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31: 411-416 (2002)
 30. Kook MC, Cho SC. Production of GABA (γ -amino butyric acid) by lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* 33: 377-389 (2013)
 31. Park MJ. Physicochemical characteristics of *cheommyuncho* fruit (*Opuntia humifusa*) fermented by lactic acid bacteria and the manufacture of jam. MS thesis, Keimyung University, Daegu, Korea (2013)
 32. Lee EJ, Lee SP. Novel bioconversion of sodium glutamate to γ -amino butyric acid by co-culture of *Lactobacillus plantarum* K154 in *Ceriporia lacerata* culture broth. *Food Sci. Biotechnol.* 23: 1997-2005 (2014)
 33. Park HS. Studies on the physiological activities and application of fermented brown rice with *Fomitella fraxinea* and *Phellinus linteus* mycelia. PhD thesis, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, Korea (2010)
 34. Cassidy MB, Lee H, Trevors JT. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *J. ind. Microbiol.* 16: 79-101 (1996)
 35. Park JK, Chang HN. Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnol. Adv.* 18: 303-319 (2000)
 36. Feehily C, Karatzas, KAG. Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses. *J. Appl. Microbiol.* 114: 11-24 (2012)
 37. Ingham CJ, Beerthuyzen M, van Hylckama Vlieg J. Population heterogeneity of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 microcolonies in response to and recovery from acid stress. *Appl. Environ. Microb.* 74: 7750-7758 (2008)
 38. Fonda ML. L-Glutamate decarboxylase from bacteria. *Method. Enzymol.* 113: 11-16 (1985)
 39. Yong DH. Physical and sensory characteristics of persimmon calcium alginate bead spherified by molecular gastronomy. MS thesis, Kyunghee university, Seoul, Korea (2010)
 40. Choi WM, Son TW. Preparation of alginate fibers using wet spinning. In: The Korean Society of Dyers and Finishers Conference. November 2, Yeungnam university, Gyeongsan, Gyeonnam, Korea. The Korean Society of Dyers and Finishers, Daegu, Korea (2007)
 41. Kim CJ, Lee PI. Composite poly (vinyl alcohol) beads for controlled drug delivery. *Pharm. Res.* 9: 10-16 (1992)
 42. Kim A, Park SJ, Lee JR. Stabilization of liquid crystal-in-water dispersion with polymer/surfactant mixture: Nematic curvilinear aligned phase composite film. *J. Colloid Interf. Sci.* 197: 119-125 (1998)
 43. Horitsu H, Adachi S, Takahashi Y, Kawai K, Kawano Y. Production of citric acid by *Aspergillus niger* immobilized in polyacrylamide gels. *Appl. Microbiol. Biot.* 22: 8-12 (1985)
 44. Hamada T, Ishiyama T, Motai H. Continuous fermentation of soy sauce by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an airlift reactor. *Appl. Microbiol. Biot.* 31: 346-350 (1989)
 45. Mahmond W, Rehm HJ. Chlortetracycline production with immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Appl. Microbiol. Biot.* 26: 333-337 (1987)