

녹각 추출액의 젓산발효를 통한 고농도 감마-아미노부티르산 생산 최적화

권순영¹ · 이삼빈^{1,2,*}

¹계명대학교 식품가공학과, ²계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터

Enrichment of gamma-aminobutyric acid (GABA) in old antler extract fermented by *Lactobacillus plantarum*

Soon Young Kwon¹ and Sam Pin Lee^{1,2,*}

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University

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

Abstract Optimization of the lactic acid fermentation process was carried out to produce an old antler extract fortified with γ -aminobutyric acid (GABA). An old antler extract (OAE; 5%, w/v) obtained using a herbal extractor showed the highest contents of solids (1.75%) and proteins (980 $\mu\text{g}/\text{mL}$). It also showed the highest total amino acid contents of 13,659 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with glycine, proline, and glutamine concentrations of 1,945, 3,405, and 1,641 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. For the over-production of GABA, OAE was fermented with *Lactobacillus plantarum* EJ2014 in the presence of 0.5%, 1.5% glucose, and 3.5% MSG at 30°C for 7 days. The fermented OAE showed high viable cell count of 2.0×10^8 CFU/mL, pH of 6.56 and 0.77% acidity after 7 days. In particular, the acidity was greatly decreased by fermentation for 3 days, and 1.4% GABA was produced by the efficient conversion of the substrate, mono sodium glutamate.

Keywords: GABA, *Lactobacillus plantarum*, extract, free amino acid

서 론

젓산균은 젓산을 포함한 다양한 대사산물을 생산하는 프로바이오틱스(probiotics)로서 김치, 요구르트 등의 발효식품에 관여하며, 건강 증진 및 질병 예방을 위한 건강기능식품 등에 산업적 활용이 증가되고 있다(1). 또한 젓산균이 정장작용, 아토피 개선 및 면역작용에 관여하는 연구가 보고 되면서 젓산균을 이용한 기능성 발효제품 개발이 활발하다(2-4). 전통발효식품에서 관여하는 *Lactobacillus plantarum* 균주는 포도당으로부터 젓산을 주로 생산하는 homo-type 균주로서 발효제품의 신맛과 저장성을 향상시켜 주며, 기능성물질인 γ -aminobutyric acid (GABA)를 생산하는 특징을 가지고 있다(5,6). GABA는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 동물의 척수 또는 뇌에 존재하는 신경전달물질이며(7), 대부분은 뇌와 골수에 존재하여 acetylcholine을 증가시키고, 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 한다고 알려져 있다(8,9). 식품에 존재하는 GABA 함량은 일반미 1-4 mg%, 현미 4-8 mg%, 발아현미 10-100 mg%, 녹차 35-205 mg%, 빵잎 56 mg%인데 반해, 유산균 발효를 통해서 250-700 mg%로 함량이 크게 증가됨이 보고되었다(10,11).

녹각(old antler, *Cornu cervi*)은 한방에서 보혈강장제로 이용되

며 창상, 응종, 어혈 등에 효력이 있으며(12), 미국 FDA에서는 관절염 치료 및 운동 경기력 향상이 보고(13)되었으며, 주성분은 교질 25%이고 인산칼슘과 탄산칼슘 등의 염화물로 구성되어 있다(14). 또한 글리신, 프롤린, 글루탐산 등의 아미노산과 콜라겐, 당단백질 및 칼슘(calcium)과 마그네슘(magnesium) 등의 무기질 등이 함유되어 있다(15). 녹각은 발육촉진작용, 조혈작용, 강심작용 등의 약리작용이 있고(16), 면역기능과 간 장애에 대한 영향(17-19) 및 골다공증(20)에 대한 연구가 보고되었다. Choi 등(21)에 따르면 발효를 통해 기존 한약재의 약효를 증가시키는 것으로 보고되고 있고, Kim 등(22)의 연구에 의하면 발효녹용은 우론산(uronic acid), sulfated glycoaminoglycan (S-GAG), sialic acid 등 생리활성 물질을 많이 함유하였으며, 항보체 활성과 라디칼 소거능이 증진됨을 보고하였다. 녹용에 비해 저렴한 녹각을 이용한 건강제품의 개발이 필요하며, 특히 발효를 통한 기능성물질을 강화시킨 녹각소재의 개발에 대한 연구는 녹용에 비해 미비한 실정이다.

따라서 본 연구는 녹용의 부산물인 녹각을 이용하여 원래 가지고 있던 효력에 더불어 발효를 통해 기능성물질인 GABA가 강화된 고부가가치 기능성발효소재 개발을 위해서 젓산발효의 최적화를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 녹각(*Cervi cornu*)은 보광약업사(Daegu, Korea)에서 구입하여 사용하였고 GABA는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 yeast extract (YE)는 (주)조흥(Ansan, Korea)과 GABA

*Corresponding author: Sam Pin Lee, Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu, 42601, Korea
Tel: +82-53-580-5554
Fax: +82-53-580-5729
E-mail: splee@kmu.ac.kr
Received August 24, 2017; revised October 16, 2017;
accepted October 17, 2017

생산의 기질로 사용한 mono sodium L-glutamic acid (MSG)는 Yakuri pure chemicals Co., LTD. (Kyoto, Japan)에서 구입하여 사용하였다. MRS broth는 Difco™ Lactobacilli MRS (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 제품을 구입하여 사용하였고 분석에 사용된 시약은 특급 이상을 구입하여 사용하였다.

사용균주 및 스타터(starter) 제조

계명대학교 식품공학학과 식품소재개발연구실에서 미강으로부터 분리한 GABA 생산 균주인 *Lactobacillus plantarum* EJ2014 (KCCM 11545P)를 이용하여 젖산발효를 수행하였다(23). *L. plantarum* EJ2014를 Difco™ Lactobacilli MRS broth agar (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)배지에 도말한 후, 30°C 항온배양기 IS-971R (Jeio Tech. Kimpo, Korea)에서 24시간 배양 하였다. 그 다음 단일 콜로니를 취하여 2회 계대배양한 후, 121°C에서 15분간 살균한 MRS broth에 *L. plantarum* EJ2014를 한 백금이 접종하여, 30°C에서 24시간 배양하여 스타터로 사용하였다.

추출조건에 따른 젖산발효 최적화

녹각을 세척한 후 증류수를 첨가하여 녹각 5% (w/w)를 제조하여 autoclave (121°C, 30 min), 한약추출기(100°C, 40 h), 약탕기 (90°C, 48 h)의 추출장치를 이용하여 추출을 진행하였다. GABA 생산을 위한 젖산 발효배지는 녹각 추출물 100 mL에 포도당 (glucose) 0-3 g, MSG 2.5-4.5 g, YE 0-0.5 g을 첨가 한 후 121°C에서 15분간 멸균하여 제조하였다. *L. plantarum* EJ2014 starter는 MRS 액체배지에서 30°C에서 1일 동안 배양시킨 후 1% (v/v)를 접종하여 30°C 항온배양기에서 7일간 발효하여 분석에 사용하였다.

녹각 발효물의 이화학적 분석

pH는 pH 측정기(model 420+, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)로 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 mL에 증류수 9 mL을 첨가하여 0.1 N 수산화나트륨(NaOH)를 이용해 pH 8.3까지 적정한 소비량을 젖산 함량(% , v/v)으로 환산하였다.

생균수는 발효물 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 10배 희석법을 이용하여 10⁴, 10⁵, 10⁶배로 희석된 것을 MRS agar plate에 20 µL 도말한 후, 30°C 항온배양기에서 48시간 배양한 후 생균수를 CFU (colony forming unit)/mL으로 나타내었다(24).

단백질 정량

시료를 희석배수에 따라 제조한 다음 100 µL을 취하여 4배 희석된 염색시약을 5 mL을 가하여 30분간 반응시켜 반응액의 흡광도를 595 nm에서 측정하였다. 표준물질로 bovine serum albumin (BSA) 단백질을 이용하여 최종농도가 0, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL 용액이 되도록 조제하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였고, 작성된 표준곡선을 바탕으로 시료의 단백질 농도를 측정하였다.

GABA 및 글루탐산(glutamic acid) 함량 분석

MSG 및 GABA의 정성 분석을 위해 실리카 겔(silica gel) TLC plate는 10×20 cm의 크기로 잘라서 사용하였고, TLC 전개는 사각 chamber (30×25×10 cm)에서 수행하였다(25). MSG 잔존량과 GABA 함량 비교를 위한 standard로 MSG 0.5-1%와 GABA 0.5-1%를 사용하였다. 전개용매는 acetic acid glacial:n-butylalcohol:증류수(distilled water)를 1:3:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 실온에서 3시간 이상 포화시켰다. 발효물은 증류수로 2배 희석한 후 각각 시료와 standard 용액을 TLC plate의 아래에서 15 mm 되는 위치

에 2 µL를 점적하였고, 간격은 10-15 mm를 유지하였다. 점적 후 TLC plate의 sample을 건조한 다음 전개하였고, 전개가 끝난 TLC plate는 50°C 감압건조기에서 건조시킨다. 건조된 TLC plate에 발색시약인 0.2% ninhydrin 용액을 뿌리고, 100°C 감압건조기에서 5-10분 동안 발색 시킨 후 발효물의 glutamic acid와 GABA spot을 확인하였다.

유리 아미노산 함량 측정은 건조시킨 시료를 실온에서 30분 동안 유도체화 하여 건조시킨 후 A 용매와 함께 혼합하여 원심 분리 하였다(26). 상층액을 0.45 µm syringe filter로 여과하여 분석시료로 사용하였으며 HPLC 분석에 사용된 조건과 용매는 각각 column (Agilent SB-C18 infinity (2.1 mm×150 mm), 1.8 µm), A (140 mM NaHAc, 0.1% triethanolamine, 6% CH₃CN, pH 6.1) 100%로 용출 후 25분 동안 B (60% CH₃CN) 100%가 되도록 혼합하면서 분당 1 mL로 흘러주었다. 아미노산 측정은 254 nm에서 분당 0.4 mL 흘러주었고, UV 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 평균값과 표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 통계처리는 SPSS (statistical package for social science, 23, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 one-way ANOVA 분석을 실시한 후 Duncan's multiple range test로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

추출물의 고형분 및 단백질 함량 분석

녹각 5% (w/v)를 autoclave (121°C, 30 min), 가정용 한약추출기(100°C, 40 h), 업체용 약탕기 (90°C, 48 h) 세 가지 추출방법에 따른 고형분 및 단백질 함량을 분석 해 본 결과는 Table 1과 같다. 추출물의 고형분 함량은 각각 0.78%, 1.75%, 1.10%로 나타났으며 한약추출기를 이용해 추출 조건에서 가장 높았고 약탕기, autoclave 순으로 높았다. 단백질 함량 또한 한약추출기에서 980.2 µg/mL로 가장 높았고 auto clave, 약탕기 각각 393.6, 266.9 µg/mL로 나타났다. 따라서 업체용 약탕기를 이용한 추출 조건에서 고형분 함량과 단백질함량이 가장 높게 나타난 한약 추출기의 추출방법이 녹각으로부터 유용성분이 가장 많이 용출 된 것으로 판단되었다.

추출물의 총 아미노산 함량

녹각의 추출조건에 따른 총 아미노산 성분을 분석한 결과는 Table 2에서 나타내었다. Autoclave, 한약추출기, 약탕기 추출액의 glycine 함량은 각각 1424.46, 3405.99, 2348.48 µg/g이었으며 아미노산 함량 중 가장 큰 비율을 차지하였고 한약추출기 추출물에서 glycine 함량이 가장 높았고, 약탕기, autoclave 순으로 높게 차지하였다. Ha 등(27)은 녹각에서 녹용보다 glycine 함량이 5배 이상 많은 경향으로 녹각을 구성하는 아미노산 중 glycine이 차지하는 비율이 가장 높다고 보고하였다. 또한, Kim 등(28)에서 녹각에서 분리한 단백질의 총 아미노산 중 glycine의 함량이 24.51%로 가장 많으며 그 다음으로 proline 11.09%, glutamine 10.26%로 비슷하게 나타났다. Glycine 다음으로 함량이 각각 797.52, 1943.94, 1310.18 µg/g로 한약추출기에서 가장 높은 아미노산은 proline이며, 그 다음으로 함량이 높은 아미노산은 glutamine이었고, 그 함량은 각각 665.70, 1641.92, 1015.81 µg/g이었으며 한약추출기에서 가장 높은 것을 알 수 있었다.

Autoclave, 한약추출기, 약탕기 세 가지 추출물에서 총 아미노

Table 1. Protein and solid content of old antler extract (OAE)

	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾
Solid content (%)	0.78±0.08 ^c	1.75±0.14 ^a	1.10±0.14 ^b
Protein content (µg/mL)	393.6±13.9 ^b	980.2±62.4 ^a	266.9±37.9 ^c

Data represent the mean±standard deviation (n=3). Different letters indicate significant differences at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

¹⁾A: 121°C, 30 min extraction

²⁾B: 100°C, 40 h extraction

³⁾C: 90°C, 48 h extraction

Table 2. Free amino acid composition of OAE

AA (µg/g)	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾
CYS	0.00	0.00	0.00
ASX	386.80	926.94	466.52
GLX	665.70	1641.92	1015.81
SER	202.21	485.88	321.43
GLY	1424.46	3405.99	2348.48
HIS	60.49	161.45	83.33
ARG	477.22	1198.79	820.72
THR	134.80	280.63	199.75
ALA	558.22	1411.77	978.57
PRO	797.52	1943.94	1310.18
TYR	21.92	94.88	52.29
VAL	136.25	368.52	207.08
MET	41.11	119.96	67.98
ILE	70.15	177.57	100.82
LEU	161.74	452.15	246.00
PHE	125.49	379.92	225.77
TRP	0.00	52.66	17.02
LYS	223.79	556.65	289.32
Total	5487.85	13659.60	8751.08

¹⁾A: 121°C, 30 min extraction

²⁾B: 100°C, 40 h extraction

³⁾C: 90°C, 48 h extraction

산 함량은 각각 5487.85, 13659.6, 8751.08 µg/g로 한약추출기에서 총 아미노산의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 앞선

실험결과 고형분 함량과 단백질 함량과 마찬가지로 총 아미노산 함량이 가장 높은 한약추출기에서 유용성분이 가장 많이 추출된 것으로 판단되었다.

GABA 고농도 생산을 위한 젖산발효 최적화

녹각의 추출조건에 따른 젖산발효의 GABA 생산 최적화를 위한 선행연구로서 autoclave, 한약추출기, 약탕기를 이용해 추출한 녹각 추출물에 GABA생산의 전구물질인 MSG 1.5%와 탄소원 및 질소원으로 포도당 1.5% 및 YE 0.5%를 첨가하고 *L. plantarum* EJ2014 균주의 starter를 5% 접종하여 7일 동안 정치배양 조건에서 젖산발효를 진행하였다. 한약추출기에서 얻어진 녹각 추출액이 다른 추출방법에 비해서 GABA생산이 효과적임을 나타내었다. 초기 pH 6.2에서 녹각 발효물은 pH 4.3으로 감소하였으며, 산도는 초기 0.18%에서 발효 1일에 1.0%로 증가한 후 발효가 진행되면서 완만하게 감소하는 경향을 보였다(Table 3). 특히 젖산 발효 5일 만에 대부분의 MSG가 소진되면서 GABA로 전환되는 결과를 나타내었다(Fig. 1). 따라서 앞선 실험결과 고형분 함량과 단백질 함량과 마찬가지로 총 아미노산 함량이 가장 높은 한약추출기에서 유용성분이 가장 많이 추출되어 발효에 영향을 준 것으로 사료된다.

YE 농도에 따른 젖산발효 최적화

한약추출기를 이용하여 얻은 녹각 추출액의 젖산발효를 통한 GABA 생산 시에 YE 농도에 따른 효과를 분석하였다(Fig. 2). 질소원과 탄소원으로 MSG 1.5%, 포도당 1.5%를 추가적으로 혼합한 녹각 추출액에 YE를 0, 0.25, 0.5% 수준으로 첨가하여 젖산 발효를 진행했을 때 결과는 다음과 같다.

pH와 산도의 경우에 YE 0, 0.25% 첨가했을 때 발효 0일 각각 pH 7.05, pH 6.66으로 YE가 첨가됨에 따라 pH가 약간 감소하였는데, 이는 Song(29)의 연구에서 YE가 첨가되면 발효물의 pH가 감소하는 결과와 비슷한 경향으로 나타내었다. YE 0% 조건에서 발효 시간이 지남에 따라 pH가 감소하였으나 0.25% 조건에서 발효 3일 pH 5.12에서 발효 7일 pH 6.45로 증가하였다. Lee 등, Kim(30,31)에 따르면 이는 미생물에 의한 GABA가 생성될 때 glutamate decarboxylase (GAD)에 의한 glutamate가 decarboxylation되면서 GABA로 전환될 때 proton이 소비됨으로써 GABA의 생성과 더불어 pH를 높이는 것으로 보고하였다. 따라서 젖산균 발효에 의해 젖산이 생성됨에도 불구하고 발효물의 pH가 유지되

Table 3. Chemical and viable cell analysis of various OAE fermented

OAE		Lactic acid fermentation time (days)				
		0	1	3	5	7
pH	A ¹⁾	6.12±0.00 ^a	4.35±0.00 ^b	4.20±0.00 ^c	4.21±0.00 ^d	4.30±0.00 ^c
	B ²⁾	6.27±0.01 ^a	4.43±0.01 ^d	4.55±0.00 ^b	4.52±0.00 ^c	4.40±0.00 ^b
	C ³⁾	6.22±0.01 ^a	4.33±0.04 ^b	4.17±0.05 ^d	4.17±0.00 ^d	4.27±0.01 ^c
Acidity (%)	A	0.18±0.03 ^c	1.03±0.00 ^d	1.40±0.00 ^c	1.48±0.00 ^a	1.42±0.00 ^b
	B	0.18±0.00 ^c	1.01±0.03 ^b	0.88±0.00 ^d	0.99±0.01 ^c	1.10±0.00 ^a
	C	0.11±0.01 ^d	0.54±0.04 ^c	0.79±0.05 ^b	0.86±0.00 ^a	0.75±0.11 ^b
Viable cell count (CFU/mL)	A	4.00×10 ^{7d}	2.00×10 ^{9ab}	1.70×10 ^{9a}	3.20×10 ^{9a}	3.10×10 ^{8bc}
	B	3.60×10 ^{7d}	5.20×10 ^{8a}	2.47×10 ^{8c}	2.63×10 ^{8b}	2.20×10 ^{8c}
	C	6.00×10 ^{7c}	1.32×10 ^{9a}	6.20×10 ^{8b}	2.31×10 ^{8c}	2.40×10 ^{8d}

¹⁾A: 121°C, 30 min extraction

²⁾B: 100°C, 40 h extraction

³⁾C: 90°C, 48 h extraction

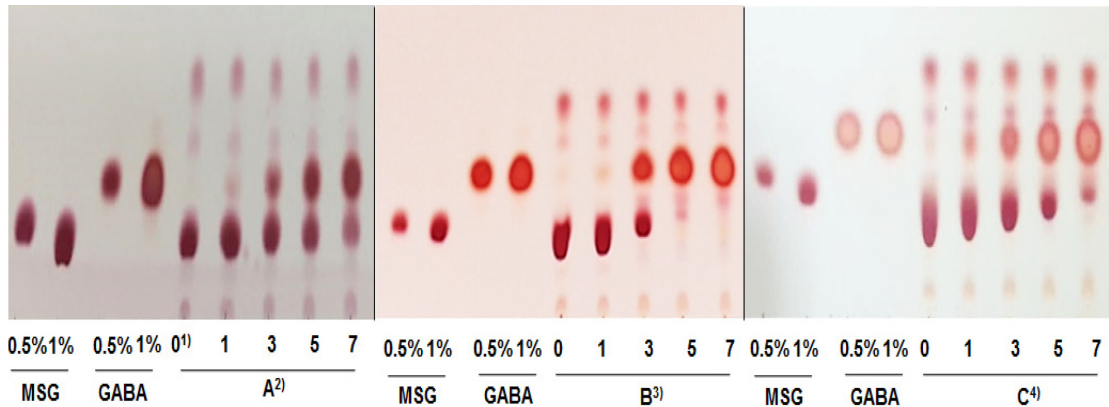


Fig. 1. TLC profile of GABA in the OAE fermented by *L. plantarum* for 7 days. ¹⁾Fermentation time (days) ²⁾A: 121°C, 30 min extraction ³⁾B: 100°C, 40 h extraction ⁴⁾C: 90°C, 48 h extraction

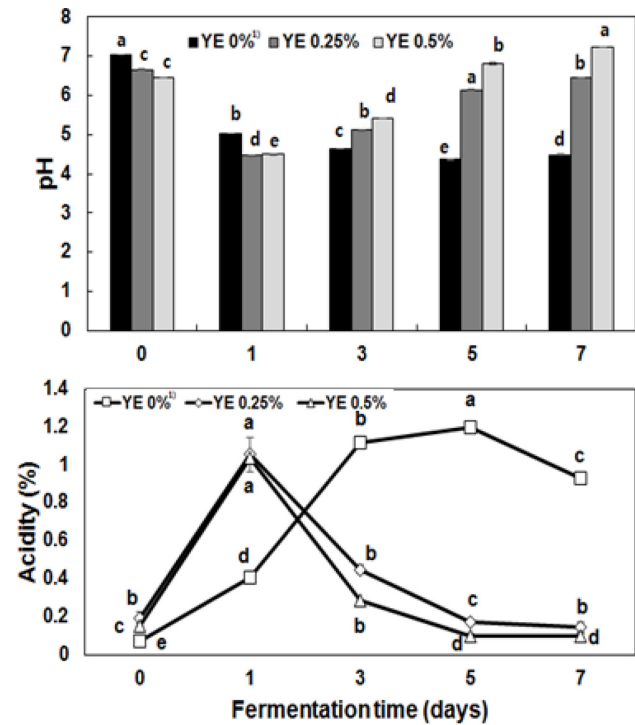


Fig. 2. Effect of YE concentration on pH (A) and acidity (B) of the fermented OAE. Data represent the mean±standard deviation ($n=3$). Different letters indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test. ¹⁾YE : yeast extract

거나 증가하는 결과로 보아 발효 중에 기질인 MSG가 GABA로 전환되는 것으로 판단되었다.

녹각 추출액의 젖산 발효 중에 산도는 발효 0일에 0.07-0.19%로 낮은 값을 보였으며, YE 0.25% 조건에서 약간 더 높은 것으로 나타났다. YE 0% 조건에서 젖산발효를 통해서 증가하는 경향을 보이면서 발효 5일에 1.20%로 가장 높은 값에 도달한 후 감소하면서 발효 7일에 0.93%를 나타내었다. YE 0.25% 조건에서 발효 1일에 산도 값 1.06%로 급격히 증가하다가 이후에는 감소하는 경향을 보이면서 발효 7일째 0.14%로 크게 감소하였다 (Fig. 2B). 이는 YE 0.25% 조건에서 젖산발효가 활발하게 진행되면서 발효 초기에 산생성이 높았으며, 동시에 전구물질인 MSG로부터 GABA가 생성되는 것을 의미하는 것으로 GABA 생성 젖

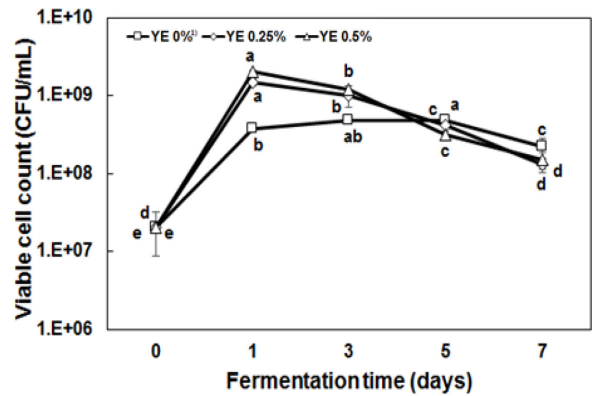


Fig. 3. Effect of YE concentration on viable cell counts of the fermented OAE. Data represent the mean±standard deviation ($n=3$). Different letters indicate significant differences at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test. ¹⁾YE: yeast extract

산균에 의한 젖산발효과정에서 GABA 생성을 간접적으로 확인할 수 있었다.

젖산균 생균수를 측정된 결과는 Fig. 3에서 보는바와 같이 녹각 추출물의 YE 함량에 따른 젖산발효를 수행하였을 때, 발효 1일째 각각 4.0×10^8 CFU/mL, 2.0×10^8 CFU/mL로 급격히 증가하였으며 0.5% 첨가 조건에서 가장 높은 생균수를 나타내었다. 모든 조건에서 각각 발효 7일에 생균수는 감소하였지만 2.0×10^8 CFU/mL 이상으로 높은 생균수 값을 유지하였다.

녹각 추출물의 젖산발효에 따른 GABA 생산을 비교하기 위해 TLC를 이용하여 확인한 결과는 Fig. 4에서 보는바와 같이 YE 0% 조건에서 젖산 발효가 진행됨에 따라 기질인 MSG가 GABA로 전환되지 않고 대부분이 잔존하였고, YE 0.25% 첨가 조건에서 발효 3일째 GABA 생성을 보였다. YE 0.25% 조건에서 젖산 발효를 통해서 MSG가 일부 GABA로 전환되었으며, 이때 발효물의 산도는 급격하게 감소하면서 YE 0% 조건과 큰 차이를 나타내었다. 반면에 YE 0.5% 첨가 조건에서 발효 7일째 MSG가 모두 GABA로 전환되는 결과를 얻었다.

Ha 등(32)에 따르면 식물추출물에 MSG 3%, YE 0.5% 첨가했을 때 젖산발효 3일째에 GABA가 생성되는 것을 보고하였다. 따라서 녹각 추출물 젖산발효에서 첨가된 YE 농도는 MSG가 GABA로 전환되는 과정에서 중요한 인자로 작용하는 것으로 사료되었으며, YE 0.5% 첨가 조건이 GABA전환의 최적 조건으로 판단되었다.

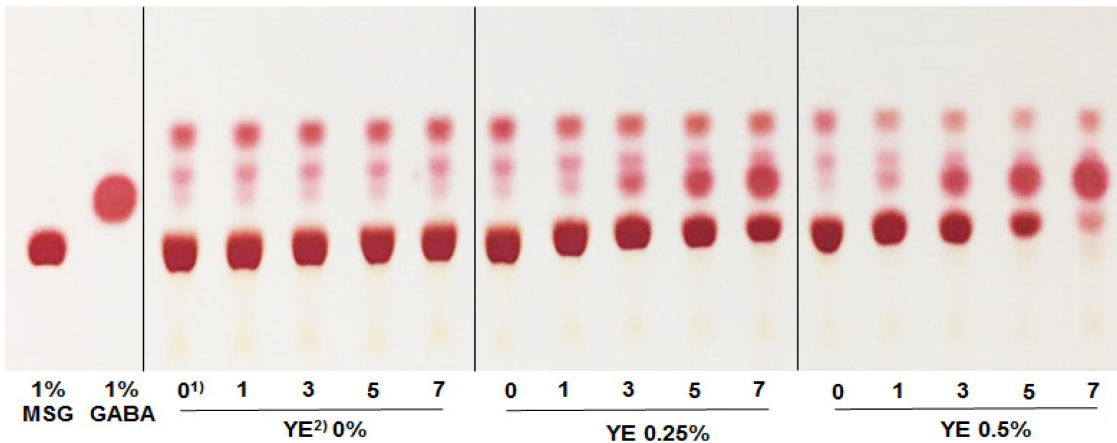


Fig. 4. TLC profile of GABA in fermented OAE with different YE concentrations. ¹⁾Fermentation time (days) ²⁾YE: yeast extract

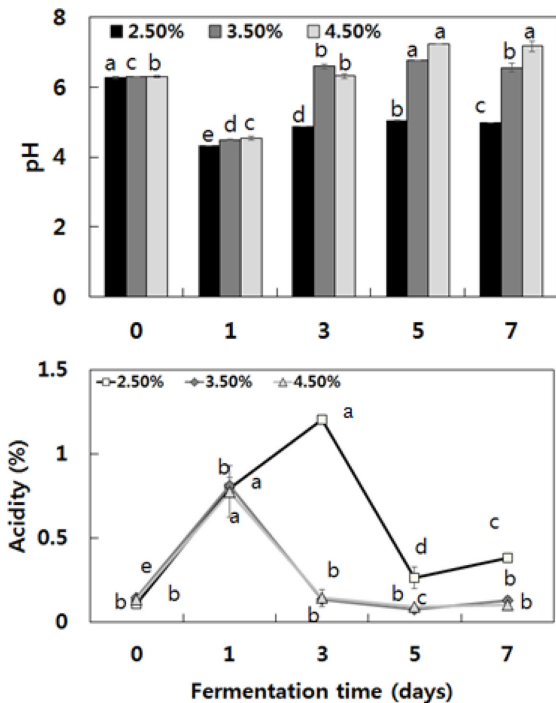


Fig. 5. Effect of MSG concentration on pH (A) and acidity (B) of the fermented OAE. Data represent the mean±standard deviation (n=3). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

MSG 농도에 따른 젖산발효 최적화

한약추출기를 이용하여 얻은 녹각 추출액의 젖산발효를 통한 GABA생산 최적화를 위해서 포도당 1.5%, YE 0.5%를 포함한 녹각 추출액에 MSG 2.5-4.5% 농도별로 첨가하여 젖산발효를 수행하였다. 녹각 발효물의 pH 및 산도를 측정된 결과는 Fig. 5에 표시하였다. MSG를 2.5, 3.5, 4.5% 첨가했을 때 발효 0일 각각 pH 6.27, pH 6.30, pH 6.30으로 pH는 큰 차이 없었다. 발효 1일째 각각 pH 4.32, pH 4.49, pH 4.54로 젖산발효가 진행됨에 따라 급격히 감소하였고 MSG 함량이 적을수록 pH가 약간 더 낮았다. 발효 3일째 각각 pH 4.88, pH 6.59, pH 6.32로 증가하였으며, 발효 7일째 각각 pH 4.99, pH 6.56, pH 7.17로 발효시간이 지남에 따라 증가하였고 MSG농도가 높을수록 발효물의 pH가 더 크게 증가하는 것으로 나타났다. 이는 MSG 농도가 높아짐에 따라 발

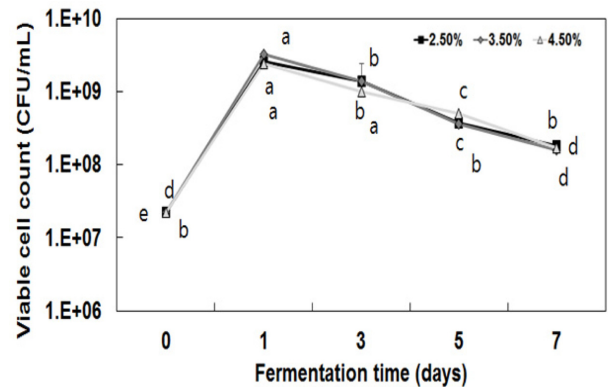


Fig. 6. Effect of MSG concentration on viable cell counts of the fermented OAE. Data represent the mean±standard deviation (n=3). Different letters indicate significant differences at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

효물의 pH가 올라간다는 Song(29)의 연구결과와 일치하는 것으로 나타났으며, MRS 액체배지에 MSG가 존재하는 경우에 젖산 발효기간이 증가하면서 발효물의 pH가 증가하는 결과를 보고하였다(33). 또한 세포내 효소 GAD에 의해서 glutamate가 GABA로 전환될 때 proton이 필요하며, 이 proton 소비에 의해서 pH를 증가시킨다는 연구결과와 일치하였다(30,31). MSG 첨가농도에 따라 측정된 산도 값은 각각 0.11, 0.14, 0.14%로 유사한 값을 보였으며, MSG 2.5% 조건에서 발효 3일째 1.20%로 급격히 증가한 후 감소하는 경향을 보이면서 발효 7일에 0.38%로 감소하는 것으로 나타났다. MSG 3.5, 4.5% 조건에서 발효 1일째 각각 0.77, 0.79%로 급격히 증가한 후 감소하면서 발효 7일째에 각각 0.10, 0.12%로 낮은 산도 값을 나타내었다. MSG 농도가 낮을수록 젖산의 생성을 위한 발효시간이 지속되면서 높은 산도를 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며, MSG 농도가 높은 경우에 젖산 발효물의 산도를 낮게 유지된 후 감소하는 경향을 보였다.

Fig. 6에서 보는바와 같이 녹각 추출물의 MSG함량에 따른 젖산발효를 수행하였을 때 젖산균 수는 발효 1일 각각 3.0×10^9 , 3.0×10^9 , 2.0×10^9 CFU/mL로 균수가 급격히 증가하였고, 발효 7일째 2.0×10^8 CFU/mL로 발효 시간이 지남에 따라 약간 감소하는 것으로 나타났으나 높은 생균수를 유지하였다.

녹각 추출물의 젖산발효에 따른 젖산균의 GABA 생산을 비교하기 위해 Fig. 7에 나타난 것처럼 MSG 2.5, 3.5, 4.5% 조건 모

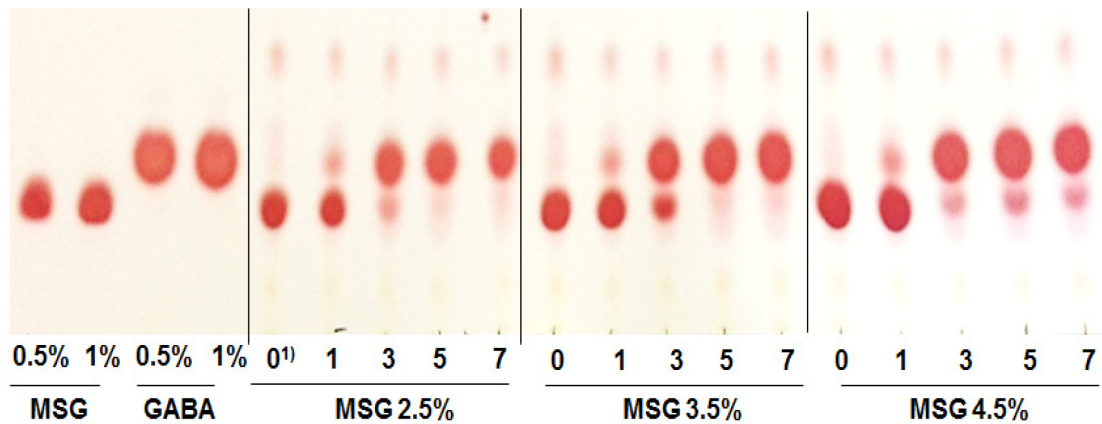


Fig. 7. GABA profile in fermented OAE with different MSG concentrations. ¹⁾Fermentation time (days)

Table 4. Changes in content of glutamic acid and GABA during fermentation of OAE ($\mu\text{g/mL}$)

Fermentation time (days)	Glutamic acid	GABA
0 day	19499	0
7 day	4835	14328

두 발효 3일째 GABA 함량이 크게 증가하면서 효과적으로 생성되는 것을 확인할 수 있었고 MSG 2.5% 조건에서 발효 5일째 MSG가 모두 GABA로 전환되었다. MSG 3.5% 조건에서 발효 5일째 MSG가 GABA로 모두 전환되는 것으로 나타났으며, MSG 4.5% 조건에서 대부분의 MSG는 발효 3일에 전환되면서 일부 MSG가 잔존하는 것으로 나타났다. 이는 젖산발효 과정에서 첨가된 높은 농도의 MSG는 효과적으로 GABA로 전환되었으며, MSG 3.5% 첨가 조건에서 발효 3일 만에 대부분이 GABA로 전환됨으로서 고농도 GABA를 함유한 녹각 젖산 발효물을 제조할 수 있었다. 따라서 녹각 추출액에 포도당 1.5%, YE 0.5%, MSG 3.5%가 첨가된 녹각 추출액이 GABA생산의 최적조건으로 판단되었다. 최종 녹각 추출액의 젖산발효물의 HPLC를 이용하여 분석한 GABA 함량은 1.43%로 나타났다(Table 4).

Song 등(34)은 톳 추출액의 유리 아미노산 함량을 정량한 결과, glutamic acid는 발효 중 감소하여 발효 전 11285.35 mg/L에서 발효 120시간 이후에는 147.29 mg/L로 대폭 감소되었으며, 반면에 GABA 함량은 발효 전 110.01 mg/L에서 발효 후 6588.73 mg/L로 약 60배 이상 증가된다고 보고하였다. 오미자 열매 추출액을 3일 동안 젖산 발효시킨 후 GABA 함량을 HPLC로 정량한 결과 유리 아미노산 총량은 발효 초기에 16.1 mg/mL에서 발효 후 15.0 mg/mL로 약간 감소하는 경향이었으나, 발효 초기 전구물질인 MSG는 14.3 mg/mL에서 발효 후에 4.3 mg/mL 감소되었으며, GABA는 발효 초기 0.2 mg/mL에서 9.2 mg/mL로 크게 증가하는 것으로 나타나 발효 중 GABA가 생성된 것으로 보고한 바 있다(35). 녹각추출물의 젖산발효를 통한 고농도 GABA생산에 관한 연구는 지금까지 없었으며, 녹각 추출물의 기존의 유용 성분과 발효를 통한 기능성 성분의 강화로 부가가치를 높이는 유용한 연구결과로 판단되었다.

요 약

본 연구에서는 녹각 추출물을 이용하여 GABA 생산 최적화를

위해 추출액의 농도, 질소원인 YE, 탄소원 포도당, GABA 생성 전구물질 MSG 농도에 따른 최적조건으로 YE 0.5%, 포도당 1.5%, MSG 3.5%를 첨가하여 30°C에서 7일간 젖산발효를 하였다. 발효 7일 pH 6.56, 산도 0.77%로 나타났으며 2.0×10^8 CFU/mL로 높은 균수를 유지하였고 GABA를 1.4% 생성하는 것으로 나타났다. 결론적으로 녹각 추출액의 젖산균을 이용한 정치배양을 통해 고농도의 GABA 생산이 가능하였으며, 발효물은 GABA, 프로바이오틱(probiotic) 등을 함유하여 식품 및 기능성 소재로 이용가능성이 높다고 사료되었다.

감사의 글

이 연구는 중소기업청 기업부설연구소설치지원사업의 지원(C1093775) 및 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품 기술기획평가원의 기술사업화지원사업의 지원을 받아 연구되었습니다(NO. 314082-3)

References

- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378 (1989)
- Seo JH, Lee H. Characteristics and immunomodulating activity of lactic acid bacteria for the potential probiotics. *Korean J. Food Sci. Technol.* 39: 681-687 (2007)
- Wood BJ. The lactic acid bacteria. Vol I. The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Appl. Sci., London pp. 3-21 (1992)
- Cha SK, Hong SS, Ji GE, Mok CK, Park JH. Isolation of macrophage-activating *Bifidobacterium* for the manufacture of fermented rice products. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 509-514 (1999)
- Han SB, Kim YH. Production method of γ -aminobutyric acid-enforced fermentative products by lactic acid bacteria, γ -aminobutyric acid-enforced fermentative products produced by the method and their utilization. Korea Patent. 10-0547018 (2006)
- Jeun JH, Kim HD, Lee HS, Ryu BH. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced γ -aminobutyric acid (GABA) form traditional slat fermented anchovy. *Korean J Food Nutr.* 1: 72-79 (2004)
- Fibiger HC, Lloyd KG. Neurobiological substances of tardive dyskinesia: The GABA hypothesis. *Trends Neurosci.* 7: 462-464 (1984)
- Chang JS, Lee BS, Kim YG. Changes in aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions of anaerobically treated green tea leaves. *Korean J. Food Sci. Tech-*

- nol. 24: 315-319 (1992)
9. Manyam BV, Katz L, Hare TA, Kaniefski K, Tremblay RD. Isoniazid-induced elevation of CSF GABA levels and effects on chorea in Huntington's disease, *Ann. Neurol.* 10: 35-37 (1981)
 10. Maras B, Sweeney G, Barra D, Bossa F, John RA. The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 206: 93-98 (1992)
 11. Yu JJ, Oh SH. γ -Aminobutyric acid production and glutamate decarboxylase activity of *Lactobacillus sakei* OPK2-59 isolated from Kimchi. *Korean J. Microbiol.* 47: 316-322 (2011)
 12. Kim YJ. Pharmaceutical resources botany. Dongmyung Publishing, p.69 (1974)
 13. Kawtikwar PS, Bhagwat DA, Sakarkar DM. Deer antlers-Traditional use and future perspectives. *Indian J. Traditional Knowledge* 9: 245-251 (2010)
 14. Ann YG. A study on overgrown antler kimchi. *Korean J. Food Nutr.* 16: 123-129 (2003)
 15. Kim YE, Lee SG, Yoon WC. Studies on the components and biological functions of animal hard tissue. A Study of a scleroprotein extracted from deer horn. *Korean Biochem. J.* 16: 13-26 (1973)
 16. Ann YH. A study on overgrown antler Kimchi. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 16: 123-129 (2003)
 17. Kim HS. Studies on the Immunological characteristic of *Cervi cornu* extract. MS thesis, Chungang University, Seoul, Korea (1992)
 18. Park EM. Effect of old antler extracts on the galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. MS thesis, Yeungnam University, Kyungsan, Korea (1991)
 19. Kim MJ. Effect of *Cervi cornu* on benzo(a)pyrene induced hepatotoxicity in rats. MS thesis, Yeungnam University, Kyungsan, Korea (1993)
 20. Kim YM. A study on the trend of fermented herb medicines. MS thesis, Gachon University, Seongnam, Korea (2009)
 21. Choi YK, Sul JU, Park Sk, YU SN, Kim SH, Rhee MS, Ahn SC, Shin MS. Research trends of fermented medicinal herbs-Based on their clinical efficacy and safety assessment. *J. Life Sci.* 22: 1729-1739 (2012)
 22. Kim MK, Jung EY, Shin KS, Kim YK, Ra KS, Park CS, Woo MJ, Lee SH, Lee HS, Kim JS, Suh HJ. Isolation of strain for the preparation of the fermented antler and its physiological activities. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1237-1242 (2009)
 23. Lee HS, Kwon SY, Lee SO, Lee SP. Production of fermented omija (*Schizandra chinensis*) beverage fortified with high content of gamma-amino butyric acid using *Lactobacillus plantarum*. *Korean J. Food Preserv.* 23: 326-334 (2016)
 24. 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)
 25. Kang SK. Changes in organic acid, mineral, color, curcumin and bitter substance of *Curcuma Longa* L. and *Curcuma atomatica* Salib according to picking time. *Korean J. Food Preserv.* 14: 633-638 (2007)
 26. Jung SH. Optimization of curcumin extraction from turmeric (*Curcuma longa* L.) using supercritical fluid and related physiological effects. PhD thesis, Chungnam National University, Daejeon, Korea (2003)
 27. Ha H, Yoon SH. Analytical Studies of Constituents of Antlers. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25: 279-282 (1996)
 28. Kim YE, Lee SK, Yoon UC. Studies on the components and biological functions of animal hard tissue. *Korean Biochem. J.* 6: 13-26 (1973)
 29. Song YC. Optimized Production of Dextran, Mannitol and GABA by Co-fermentation using lactic acid bacteria isolated from kimchi. MS thesis, Keimyung University, Daegu, Korea (2013)
 30. Lim JS, Lee SP. Production of set-type yogurt fortified with peptides and γ -aminobutyric acid by mixed fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 167-172 (2014)
 31. Kim DS. Study on the condition of fermentation in lactic acid bacteria for the production of γ -aminobutyric acid. MS thesis, Hannam University, Daejeon, Korea (2009)
 32. Ha HS. Physiological activities of ice plant and production of γ -aminobutyric acid from it using *Lactobacillus plantarum*. MS thesis, Gyeongsang National University, Jinju, Korea (2016)
 33. Cho YR, Chang JY, Chang HC. Production of γ -aminobutyric acid by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 104-109 (2007)
 34. Song HS, Kim HK, Min HO, Choi JD, Kim YM. Changes in physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by fermentation of lactic acid bacteria. *Korean J. Fish Aquat. Sci.* 44: 104-115 (2011)
 35. Jeon CP, Lee JG, Lee JB, Park SC, Choi CS, Kim JE, Kwon GS. Biological activities of fermented *Dioscorea batatas* Dence by two stage fermentation. *Korean J. Microbiol.* 48: 29-36 (2012)