

유청을 이용한 *Bacillus subtilis*와 *Lactobacillus plantarum*의 혼합발효를 통한 γ -aminobutyric acid와 생리활성물질 강화

김근영¹ · 임종순² · 이삼빈^{1,2,*}

¹계명대학교 식품가공학과, ²계명대학교 TMR 센터

Fortification of γ -aminobutyric acid and bioactive compounds in whey by co-fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*

Geun-young Kim¹, Jong-soon Lim², and Sam-pin Lee^{1,2,*}

¹Department of Food Science and Technology, Keimyung University

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

Abstract Biologically active substances including gamma-aminobutyric acid (GABA) were added into whey by co-fermentation using *Bacillus subtilis* HA and *Lactobacillus plantarum* EJ2014. The first fermentation using *B. subtilis* HA with 5% monosodium glutamate (MSG) and 2% glucose enhanced the production of poly- γ -glutamic acid (PGA), resulting in higher consistency of 4.09 Pasⁿ as well as whey protein peptides. After the second fermentation using *L. plantarum* EJ2014, the remaining MSG (3.40%) as a precursor was completely converted to 2.21% GABA. Furthermore, the lactose content in whey decreased from 6.73 to 3.68% after co-fermentation, and the tyrosine content increased from 20.47 to 38.24%. Peptides derived of whey proteins were confirmed by SDS-PAGE. Viable cell counts of *B. subtilis* and *L. plantarum* were 5.83 log CFU/mL and 9.20 log CFU/mL, respectively. Thus, co-fermentation of whey could produce the novel food ingredient fortified with biologically active compounds including GABA, γ -PGA, peptides, and probiotics.

Keywords: whey, GABA, peptides, *B. subtilis*, *L. plantarum*

서 론

유청은 치즈 제조과정에서 생산되는 부산물로서 수용성 단백질, 바이타민, 무기질 등의 영양성분이 풍부하며 피부의 노화, 색소침착, 주름개선, 항균작용, 질병예방, 장내 미생물 균총 조절, 항바이러스 작용 및 항암작용 등의 기능성(Bounous, 2000; Jakubowicz 등, 2014; Kimura 등, 2014)을 가지고 있다. 반면에 유청 중에 젖당(lactose)은 젖당못견딤증을 유발함으로써 식품소재로의 활용이 제한적이었지만, 최근 식품소재와 첨가물로 활용 가능성이 높아지면서 유제품, 제과제빵, 육제품, 기능성 식품 및 음료 등 널리 활용되고 있으며(Gallardo-Escamilla 등, 2005; Kim, 2011), 식품과 화장품소재로 이용하고자 하는 연구들이 진행되었다(Wu 등, 2015; Kim, 2015a).

치즈의 생산량이 증가함에 따라 유청의 생산량이 높아지면서 가공식품소재로 유청을 대량으로 활용하며 동시에 기능성 소재로 전환시키기 위한 연구개발이 요구되고 있다. 최근까지 유청의 젖산균 발효를 통한 기능성 강화소재 개발을 위한 연구가 진행되면서, 젖산균에 의한 유청 단백질의 가수분해를 통한 면역증진 생리활성 펩타이드를 생산하는 방법(Beaulieu 등, 2007a; Luz 등,

2018; Qian 등, 2011)이 보고되었다. 젖산균은 발효식품에 널리 이용되는 대표적인 프로바이오틱스(probiotics) 발효미생물로서 다양한 대사산물을 생산하면서 식품의 맛, 저장성 향상에 기여하지만, 단백질 분해효소 활성이 비교적 약하다. 반면에 *Bacillus subtilis*와 곰팡이 등은 단백질 분해 효소활성이 강하여 다양한 전통 발효식품에 이용되고 있다. 최근 우유를 이용한 *B. subtilis* 발효를 통해 우유 단백질의 부분적인 가수분해를 통해서 펩타이드가 증진되면서 *Lactococcus lactis*에 의한 요구르트 제조 시 유청 분리 없이 안정한 호상형 요구르트 커드 제조에 도움을 주는 것을 보고하였다(Lim 등, 2014). 최근 스피룰리나를 원료로 *B. subtilis*와 *Lactobacillus plantarum*을 이용한 발효를 통해서 단백질 가수분해 및 이취 제거에 대한 연구는 보고(Bao 등, 2018) 되었지만, 유청을 이용한 *B. subtilis*와 *L. plantarum* 균주를 이용한 혼합발효를 통해서 전구물질인 monosodium glutamate (MSG)로부터 기능성 물질인 poly- γ -glutamic acid (γ -PGA)와 poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) 생산을 최적화하는 연구는 없는 실정이다.

콩을 원료로 하는 청국장발효와 다양한 식품용 효소생산에 사용되는 고초균은 Generally Recognised as Safe (GRAS) 균주로 안전성이 입증된 상업적 발효미생물이다(Jeong 등, 2015; Schumann, 2007). *B. subtilis*은 발효 과정 중 단백질 가수분해 효소 등이 관여하면서 기능성 펩타이드, 고분자 점질물인 γ -PGA, 혈전 및 면역력 기능 강화 효과 등의 다양한 생리활성 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다(Kim 등, 2010; Kwon 등, 2004). 생리활성 물질 중 고분자 점질물은 글루탐산이 중합된 γ -PGA와 과당으로 이루어진 프락탄(fructan)형태의 레반(levan)으로 구성된 수용성 고분자로서 기능성 식품 및 화장품소재로 인증받아 사용되고 있다

*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 September 5, 2018; revised November 13, 2018;
accepted November 13, 2018

(Lee 등, 2014; Sung 등, 2005).

젖산균은 젖당(lactose)을 탄소원으로 이용하며 바이타민과 무기질의 생체이용률 증가, 위장염 억제, 압 생성 억제, 혈중 콜레스테롤 수치와 혈압 감화 효과 등 체내 대사활성에 좋은 영향을 준다(Carr 등, 2002; Kim 등, 2017). 김치 발효에 주로 관여하는 대표적인 프로바이오틱스 균주인 *L. plantarum*에 의해 생산되는 GABA는 아미노산계 신경전달물질의 대표억제 물질로 우울증, 치매예방, 기억력증진, 불면, 산화방지 작용 및 혈압저하작용 등의 여러 효과들이 보고되고 있다(Chuang 등, 2011; Yamatsu 등, 2015). 최근까지 기능성 물질이 강화된 유청을 생산하기 위한 발효는 알코올 단일 발효, 젖산균 단일 혹은 혼합 발효를 이용한 것으로 고초균과 젖산균의 혼합발효에 대한 연구는 미비한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 모짜렐라 치즈제조과정에서 생산된 유청을 발효 미생물인 *B. subtilis*과 *L. plantarum* 혼합발효과정을 통해서 유청 단백질의 가수분해물인 펩타이드 생성 및 전구물질인 MSG로부터 기능성물질인 γ -PGA와 GABA생산을 최적화시키며, 동시에 젖당(lactose) 저감화 및 산화방지능 향상을 통해서 영양적 및 기능적으로 우수한 유청 발효소재를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용된 유청은 모짜렐라 치즈 생산의 부산물로 매일유업(Maeil Dairies Co., Seoul, Korea)으로부터 제공받아 사용하였고 발효 시 γ -PGA 생성과 GABA 생성을 위해 첨가한 부원료인 MSG는 Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd. (Kyoto, Japan), 포도당은 Ducksan Pure Chemical Co. (Ansan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Nutrient broth와 MRS broth는 각각 Difco™ Nutrient broth와 Difco™ Lactobacilli MRS (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) 제품을 사용하였다. SDS-PAGE pattern size는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA)에서 구입하여 사용하였고, 항산화활성 측정에 쓰인 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, potassium persulfate, vitamin C, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, butylated hydroxy anisole 시약은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 그 외 실험에 사용된 시약은 특급이상을 사용하였다.

사용균주 및 starter 제조

B. subtilis HA (KCCM 10775P)는 재래식 청국장장에서 분리한 후 기탁한 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM), Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다. *B. subtilis* HA를 MRS agar plate에서 42°C, 24시간 배양한 다음 121°C에서 15분간 멸균한 Nutrient broth (w/v)에 *B. subtilis* HA 한 백급이를 접종하여 42°C에서 24시간 동안 160 rpm으로 진탕 배양하였다. 그 다음 원심분리기(TH220, Omni International, Waterbury, CT, USA)를 이용하여 7,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 균체를 멸균수에 분산해 10배 농축 *B. subtilis* HA 스타터로 사용하였다.

L. plantarum EJ2014는 미강으로부터 분리한 균주(KCCM 11545P)를 한국미생물보존센터에 기탁한 후 분양받아 사용하였다. 이 균주를 MRS agar plate에서 계대배양한 후, 멸균한 MRS broth에 순수 배양된 *L. plantarum* EJ2014를 한 백급이를 접종하여 30°C에서 24시간 동안 정지 배양하여 2차 젖산발효 스타터로 사용하였다.

유청의 혼합발효

유청 농축액을 2배 희석한 후 autoclave (MLS-3020, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)에서 121°C에서 15분간 멸균하였다. *B. subtilis* 발효 시 γ -PGA 생성을 위해 2% 포도당, 5% MSG를 첨가한 후 *B. subtilis* HA 농축스타터 5% (v/v)를 접종하여 진탕배양기(SI-900R, JeioTech. Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 42°C, 160 rpm으로 1일간 발효 후 잔존하는 MSG는 GABA로 전환시키기 위하여 *L. plantarum* EJ2014 starter를 2% (v/v)를 접종한 뒤 30°C 항온배양기(IS-971R, JeioTech. Co., Ltd., Kimpo, Korea)에서 7일간 발효를 진행하였다.

pH, 산도, 생균수, 점질물 함량 및 점조도 측정

pH는 시료 1 mL에 증류수 9 mL을 가하여 희석 후 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 mL에 증류수 9 mL을 가한 다음 pH 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 사용된 소비량을 젖산 함량(% , v/v)으로 환산하여 측정하였다.

생균수는 발효물 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가해 10배 희석법을 이용하여 10⁴, 10⁵ 및 10⁶배로 희석한 것을 MRS agar plate에 20 μ L 도말한 후 항온배양기에서 24시간 배양한 다음 측정하였다. *B. subtilis* HA는 42°C 항온배양기에서 배양하고, *L. plantarum* EJ2014는 30°C 항온배양기에서 배양한 후 log CFU (colony forming unit)/mL로 나타내었다.

점질물은 유청 발효물 5 g을 7,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 균체 및 불용성 성분을 제거하고 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액에 2배 부피 아이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 생고분자 고형분을 침전시켜 50°C 열풍 건조기에서 24시간 건조하였다. 이후 건조 무게를 측정하여 점질물 함량을 확인하였다.

점조도는 Rheometer System (HAKKE Rheo Stress 1, Karlsruhe, Germany)에 cone plate device (Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter, gap clearance 1.00 mm)를 장착하여 측정하였다. 유청 발효물 1 mL을 원형 plate에 골고루 퍼지게 취한 후 cone plate를 하강시켜 시료와 1 mm 간격으로 유지시켰다. 전단속도(shear rate, 1/s) 변화에 따른 전단응력(shear stress, Pa) 값을 구간 당 10 초 동안의 평균값을 측정하여 점조도 값을 나타내었으며, 측정온도는 20°C에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1-100 s⁻¹의 범위로 유동특성을 알아보고자 하였고 점조도 지수는 Power law model로 평가하였다.

$$\text{Power law model: } \sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pasⁿ), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s⁻¹), n은 유동성 지수(flow behavior index)이다.

환원당 및 유당 함량측정

유청 발효물의 환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS)법에 따라 측정하였다(Luchsinger과 Cornesky, 1962). 시료를 원심분리 (15,000 rpm, 20 min)하여 얻은 상층액을 희석한 시료 1 mL에 DNS 시약 3 mL을 첨가하고, 5분간 100°C에서 발색시킨다. 40분간 암소에서 실온으로 냉각한 후 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 환원당 함량은 포도당을 표준물질로 하여 표준곡선을 작성한 후 산출하였다.

유당 함량 측정은 시료 10 mL에 에탄올 20 mL을 가하여 상온에서 20분간 교반 추출(C3, 60 rpm, SLRM-2M, Seongnam, Korea)하여 원심분리(15,000 rpm, 20 min)한 후 상층액을 모아 여과 (Advantec, 5A, Tokyo, Japan)한 다음 감압 농축하였다. 농축한 시

료는 증류수로 최종 부피를 다시 10 mL로 정용한 후 0.45 μ L syringe filter로 여과한 후 분석하였다. HPLC (High performance liquid chromatography, Knauer K-501 system, Knauer Co., Berlin, Germany)에 NH2P-50 4E column 4.6 \times 250 mm (Shodex, Tokyo, Japan)을 장착한 후 5% acetonitrile로 분당 1 mL로 흘려주어 RI 검출기(Knauer K-2301)로 분석하였다.

펩타이드 함량측정

유청 발효물의 펩타이드 생성정도를 간접적으로 측정하기 위하여 Folin phenol 시약을 이용하여 발효물 중에 존재하는 tyrosine 함량을 측정하였다(Matsushita 등, 1966). 발효물 1 mL에 증류수 2 mL를 넣어 희석한 시료를 e-tube에 취하여 15,000 rpm에서 15 분간 원심분리 하였다. 상층액 0.7 mL에 0.44 M trichloroacetic acid (TCA, Pyeongtaek, Korea) 0.7 mL를 첨가하였다. 이후 37°C에서 30분간 반응시켜 15,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상층액 1 mL에 0.55 M 탄산소듐 (Na_2CO_3) (Ansan, Korea) 2.5 mL와 원액을 3배 희석한 Folin phenol 시약 0.5 mL를 차례대로 넣어 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 다음 반응액의 흡광도를 UV 분광광도계(Ultrospec2100 pro, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)로 660 nm에서 측정하였다.

SDS-PAGE 분석

유청 발효물의 단백질 패턴을 알아보기 위해 4-15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 전기영동을 수행하였다. 시료를 13,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 2배 농축된 SDS-sample buffer (2 \times laemmli sample buffer 4.75 μ L, β -mercaptoethanol 0.25 μ L)에 녹인다. 100°C에서 5분간 가열하여 단백질 변성을 유도한 다음 전기영동(Hofer Inc., Holliston, MA, USA)을 실시하였다. Gel의 염색은 Instant Blue (Expedeon, Cambridgeshire, UK) 용액을 사용하였으며, 표준 단백질은 10, 15, 25, 35, 40, 55, 70, 130, 170 kDa으로 조합되어 있는 marker를 사용하였다.

항산화 활성측정

유청 발효물 10 g을 메탄올 400 mL에 넣고 24시간 간격으로 30°C에서 3회 반복 진탕 추출, 여과(Advantec, 5A)한 후 여과액을 감압 농축 후 동결 건조하여 발효 유청 추출물을 항산화 활성 측정 시료에 사용하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free 라디칼 제거 활성측정은 Blois(1958)의 방법을 일부 변형하여 실험하였다. 시료 160 μ L와 에탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 40 μ L를 가하여 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 발효물의 추출물에 대한 유리 라디칼 제거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는 데 필요한 시료의 농도인 RC_{50} 값으로 나타내었다. 이 때 활성 비교를 위하여 butylated hydroxy anisole (BHA)를 사용하였다.

2,2-Azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) 라디칼 제거 활성측정은 Re 등(1999)의 방법을 일부 변형하여 실험하였다. 7 mM ABTS와 2.45 mM 과황산포타슘(potassium persulfate)를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 반응하여 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 흡광도 값이 0.70 \pm 0.02이 되게 인산완충식염수(PBS, pH 7.4, New York, NY, USA)로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180 μ L에 시료 20 μ L 가하여 정확히 1분 동안 방치한 후 흡광도를 측정하였다.

GABA 분석

MSG 및 GABA의 정성 분석을 위한 실리카 젤 TLC plate는 10 \times 20 cm의 크기로 잘라서 사용하였고, TLC 전개를 사각 chamber (30 \times 25 \times 10 cm)에서 수행하였다(Kook 등, 2013). 전개용매는 n-butyl alcohol:acetic acid glacial:distilled water를 3:1:1 (v/v)의 비율로 혼합하여 사각 chamber에 넣고 실온에서 4시간 이상 포화시켰다. 발효물은 증류수로 2-3배 희석한 후 각각 시료와 표준 용액을 TLC plate의 아래에서 15 mm되는 위치에 2 μ L를 점적하였고, 간격은 10-15 mm를 유지하였다. 점적 후 TLC plate의 시료를 건조시킨 다음 전개하였고, 전개가 끝난 TLC plate는 50°C 감압건조기에서 건조하였다. 건조한 TLC plate에 발색시약인 0.2% 닐하이드린(ninhydrin) 용액을 뿌리고, 100°C 감압건조기에서 5-10 분 동안 발색시킨 후 발효물의 MSG와 GABA spot을 확인하였다.

GABA 전환율의 확인을 위한 유리 아미노산 함량 측정은 건조시킨 시료를 실온에서 phenylisothiocyanate (PITC) 용액 20 μ L (MeOH:H₂O:TEA:PITC=7:1:1:1)에 30분 동안 유도체화 하여 건조시킨 후, A용매(140 mM NaHAc, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH₃CN, pH 6.1)와 함께 혼합하여 원심분리 하였다. 상층액을 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 분석시료로 사용하였다. 분석은 HPLC (Hewlett Packard 1100 Series, Palo Alto, CA, USA)에 C₁₈ column (Waters Nova-Pak C₁₈ 4 μ m (3.9 \times 300 mm)을 장착한 후 mobile phase는 각각 A (140 mM NaHAc, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH₃CN) 100%로 elution 후 25분 동안 B (60% CH₃CN, 0.015% EDTA) 100%가 되도록 혼합하면서 분당 1 mL로 흘려주었다. 아미노산 측정은 254 nm에서 UV 흡광도를 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 평균값과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내었고 통계 처리는 Statistical Package for the Social Science (SPSS, version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하였으며 one way-ANOVA 분석을 한 후 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 결과의 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

유청 농축액의 이화학적 분석

본 연구에서 사용된 유청 농축액의 일반성분 분석한 결과 pH 5.87, 산도 0.50%, 고형분 24%, 젖당(lactose) 139.19 mg/g, 단백질 2.85%, 지방 2.32%, 콜레스테롤 44.25 μ g/g, 회분 1.47%를 나타냈다. 바이타민 A, C를 분석한 결과, 각각 1.41, 9.58 μ g/g을 함유하고 있었다. K, Ca, Na 등을 포함한 9종의 무기질 함량을 측정된 결과 K이 4671.96 μ g/g으로 가장 높은 함량을 나타내었고, Na는 1401.60 μ g/g, Ca는 1079.01, P는 1281.99 μ g/g으로 나타났다 (Table 1).

Kim(2015)의 국내 유청의 무기질 성분 분석에서 Na 23.76 mg%, Ca 40.72 mg%, Mg 8.03 mg%를 보고하였으며, 본 연구에 쓰인 유청 농축액의 Na, Ca, Mg 무기성분들이 2-5배 높은 함량을 나타내었다. 이는 모짜렐라 치즈제조과정에서 생산된 유청이 농축과정을 통해서 무기질 성분이 크게 증가하였다고 사료되었다.

MSG 농도별 *B. subtilis* 발효물의 최적화

유청 농축액을 증류수로 2배 희석시킨 후, *B. subtilis*에 의한 발효를 통해 고분자 점질물(γ -PGA) 생산의 최적화를 위해 탄소원 포도당 2%와 질소원 MSG 농도를 0, 1, 3, 5%로 첨가하여 3

Table 1. Physicochemical properties of the whey

Component	Value	
pH	5.87	
Acidity (% w/v)	0.50	
Soluble solid content (% w/v)	24	
Lactose content (mg/g)	139.19	
Protein (% w/w)	2.85	
Fat (% w/w)	2.32	
Cholesterol (µg/g)	44.25	
Ash (% w/w)	1.47	
Vitamin (µg/g)	A	1.41
	C	9.58
Minerals (µg/g)	K	4671.96
	Ca	1079.01
	Na	1401.60
	P	1281.99
	Mg	252.12
	Zn	0.90
	Cu	0.20
	Mn	0.07
	Se	0.19

일간 진탕 배양하여 분석하였다. *B. subtilis*에 의한 유청 발효물의 pH, 산도를 측정된 결과, 발효 기간 동안 모든 조건에서 pH가 증가한다. 초기 pH 5.90-6.26으로 MSG 농도가 높아질수록 초기 pH가 증가하였으며 발효가 진행됨에 따라 MSG 1, 3, 5% 첨가 조건에서 발효 2일째 가장 높은 값을 나타낸 뒤 감소하는 경향을 보였다. 산도는 발효 전 0.24-0.32%로 비슷한 수치를 나타냈으며 발효가 진행됨에 따라 MSG 1, 3, 5% 첨가 조건에서 발효 2일째 각각 0.11, 0.16, 0.22%로 가장 낮은 값을 나타내었고 MSG 농도가 높을수록 높은 산도 값을 보였다(Table 2).

Table 2. Effect of monosodium glutamate (MSG) concentration on the physicochemical properties and viable cell counts in whey fermented by *B. subtilis* for 3 days

MSG concentration (%)	Fermentation time (days)	pH	Acidity (%)	Viable cell counts (log CFU/mL)	Mucilage content (%)	Consistency index (Pas ⁿ)
0	0	5.90±0.02 ^a	0.26±0.02 ^{ab}	7.44±0.07 ^a	0.00±0.00	0.01±0.01 ^a
	1	6.34±0.02 ^d	0.25±0.06 ^a	7.69±0.02 ^a	0.00±0.00	0.03±0.02 ^a
	2	5.94±0.01 ^b	0.32±0.00 ^b	7.08±0.50 ^a	0.00±0.00	0.03±0.01 ^a
	3	6.10±0.00 ^c	0.32±0.02 ^b	6.58±0.52 ^a	0.00±0.00	0.05±0.02 ^b
1	0	6.03±0.01 ^a	0.24±0.02 ^c	7.44±0.07 ^a	0.00±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a
	1	7.05±0.00 ^c	0.15±0.02 ^b	8.45±0.08 ^b	1.96±0.09 ^b	0.76±0.02 ^b
	2	7.27±0.01 ^d	0.11±0.00 ^a	8.67±0.06 ^b	2.60±0.31 ^c	1.29±0.02 ^d
	3	6.99±0.02 ^b	0.17±0.01 ^b	8.41±0.18 ^b	2.68±0.08 ^c	1.12±0.02 ^c
3	0	6.08±0.01 ^a	0.30±0.01 ^c	7.44±0.07 ^a	0.00±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
	1	6.89±0.02 ^b	0.20±0.01 ^b	8.37±0.06 ^b	4.10±0.35 ^b	1.27±0.95 ^b
	2	7.24±0.03 ^d	0.16±0.02 ^{ab}	8.64±0.10 ^b	4.05±0.06 ^b	3.17±0.15 ^c
	3	7.03±0.01 ^c	0.11±0.05 ^a	8.63±0.10 ^b	4.80±0.10 ^c	2.88±0.19 ^c
5	0	6.26±0.01 ^a	0.32±0.00 ^b	7.44±0.07 ^a	0.00±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a
	1	6.51±0.11 ^b	0.32±0.07 ^b	8.39±0.07 ^b	6.06±0.67 ^c	4.09±0.57 ^b
	2	7.01±0.01 ^d	0.22±0.03 ^a	8.66±0.08 ^b	6.49±0.25 ^c	4.17±0.07 ^b
	3	6.87±0.01 ^c	0.23±0.00 ^a	8.56±0.15 ^b	6.40±0.45 ^c	3.93±0.15 ^b

Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same column indicate significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05).

생균수 결과는 MSG 1, 3, 5% 첨가조건에서 발효 1일째 8.37-8.45 log CFU/mL의 높은 균 활성을 보였으며 발효 3일째 유지하는 것을 확인하였다. MSG 무첨가 조건은 발효 3일째 6.58 log CFU/mL로 균수가 급격히 감소하였으며(Table 2), Park(2016)의 흑대추를 이용한 고초균 발효에서 MSG 무첨가시 생균수가 발효 1일째 10⁸에서 10⁵으로 감소하였으며 Choi(2016)연구에서는 MSG 무첨가 조건에서 발효 1일째부터 10⁵으로 감소한 결과와 유사한 경향을 보였다. 이는 영양성분 질소원인 MSG첨가가 *B. subtilis*의 생육에 영향을 미치는 것으로 사료되었다.

점질물은 MSG를 첨가한 모든 조건에서 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 생성량은 MSG농도가 높을수록 증가하는 것으로 나타났다. 발효 3일째 MSG 1, 3 및 5% 조건에서 각각 2.68, 4.80 및 6.40%로 점질물이 증가함을 확인하였으며 이를 통해 MSG 5% 첨가 조건이 고분자 점질물을 가장 많이 생성하는 것으로 판단하였다. 유청분말을 발효배지로 이용하여 *B. subtilis* 발효를 3일 동안 수행한 결과에 따르면 고분자(polysaccharide)가 768 mg/L 생산되었다는 보고(Cagri-Mehmetoglu 등, 2012)에 비해서 매우 높은 점질물 함량을 나타내었다. 이는 고분자 γ-PGA 합성의 전구물질로서 MSG를 5% 수준으로 첨가함으로써 고분자 γ-PGA가 생산되었다. Yu 등(2017)에 따르면 포도당은 고분자 점질물을 만들 때 탄소원으로 사용되는 것으로 보고하였으며, 현 연구에서 유청 발효 초기에 추가적으로 첨가된 포도당은 고분자 다당류 프락탄(fructan)의 생산에 기여한 것으로 사료되었다.

유청 발효물의 점조도는 MSG를 첨가한 모든 조건에서 *B. subtilis* 발효가 진행될수록 높은 값을 보였으나 MSG 무첨가 조건은 발효기간 동안 점조도 값이 0.01-0.05 Pasⁿ로 차이를 보이지 않았다. MSG를 첨가한 조건 중 특히 MSG 5% 첨가 조건에서 발효 1일째부터 4.09 Pasⁿ으로 높은 값을 보였으며 발효 3일째까지 3.93 Pasⁿ로 높은 값을 나타내었다(Table 2).

유청의 고초균 발효에서 탄소원으로 포도당을 첨가하는 경우에 단백질이 풍부한 배지임에도 불구하고, *B. subtilis* 발효물의 고유한 냄새가 없었으며 요구르트와 같은 향미가 생성되는 특성을

Table 3. Changes in the pH, reducing sugar, acidity in whey co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

	Fermentation time (days)					
	1 st fermentation		2 nd fermentation			
	0	1	1	3	5	7
pH	6.16±0.01 ^c	6.43±0.03 ^d	4.50±0.03 ^a	5.18±0.05 ^b	4.55±0.10 ^a	4.57±0.02 ^a
Reducing sugar (%)	11.07±0.05 ^f	9.45±0.03 ^e	7.15±0.08 ^d	6.59±0.04 ^c	5.48±0.03 ^b	4.97±0.13 ^a
Lactose content (%)	6.73±0.08 ^c	6.72±0.03 ^c	4.30±0.02 ^b	4.02±0.62 ^b	3.80±0.17 ^a	3.68±0.05 ^a
Acidity (%)	0.16±0.02 ^a	0.27±0.00 ^a	1.39±0.13 ^c	0.74±0.03 ^b	1.30±0.07 ^c	1.73±0.06 ^d

Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same fermentation time indicate significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

Table 4. ABTS and DPPH radical scavenging activities in whey co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014

	Fermentation time (days)			Control
	Before fermentation	<i>B. subtilis</i> fermentation for 1 day	<i>L. plantarum</i> fermentation for 7 days	
ABTS RC ₅₀ ¹⁾ (mg/g)	26.81±4.01 ^b	9.06±0.27 ^a	8.78±0.03 ^a	6.39±0.04 (µg/mL) (Vitmin C)
DPPH RC ₅₀ (mg/g)	17.58±2.65 ^b	11.05±0.73 ^a	10.38±0.68 ^a	26.01±7.40 (µg/mL) (BHA ³⁾)

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS, DPPH radical at 1, 30 min after starting the reaction, respectively.

²⁾Vitamin C indicates ascorbic acid.

³⁾BHA indicates butylated hydroxy anisole.

Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same fermentation time indicate significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

보였다(unpublished results). 따라서 유청을 이용한 *B. subtilis* 발효에서는 포도당 2%, MSG 5% 첨가한 조건에서 1일간 진탕 발효조건을 *B. subtilis* 발효의 최적 조건이라고 판단하였다. 유청의 *B. subtilis* 발효물에 잔존하는 MSG는 2차 *L. plantarum* 발효를 통해서 기능성 물질인 GABA로 전환됨으로서 *B. subtilis*과 *L. plantarum*의 혼합발효의 최적화를 통해서 전구물질인 MSG를 효과적으로 전환시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

2차 젖산 발효물의 이화학적 분석

고초균 발효를 1일 동안 진행한 후 GABA 생성과 탄소원으로 젖당의 소진을 위해 *L. plantarum*을 이용한 젖산발효를 7일간 수행하였다. 그 결과 *B. subtilis* 발효 후 pH는 6.43이었으나 젖산발효 1일째에 pH가 4.50로 감소하였으며 젖산 발효 7일째까지 유지하는 경향을 보였다. 젖산균에 의한 GABA 생산은 산성 환경에서 적응하는 방법으로 proton이온을 소비하는 것으로 보고되었다(Laroute 등, 2016). 젖산균 발효과정에서 glutamate로부터 GABA로의 전환에 기인하는 glutamate decarboxylase (GAD)효소의 발현을 조절하는 데 필요한 유전자들(gadA, gadB, aidA)의 최적 pH는 4-5정도이며, GAD효소 유전자들의 최적 pH보다 높은 경우 GABA로의 전환율이 급격히 감소된다고 보고하였다(Kim, 2009; Laroute 등, 2016). 따라서 2차 젖산발효의 진행과정에서 유기산 생성에 의한 pH가 낮아지는 것은 GABA 생성에 도움이 될 것으로 판단되었다.

*B. subtilis*와 *L. plantarum*을 이용한 혼합발효과정에서 발효시간에 따라 환원당 값의 변화를 측정하였다. 발효 전 환원당 함량은 11.07%에서 *B. subtilis* 발효에 의해서 9.45%로 감소한 후, 젖산발효 1일째 7.15%에서 젖산발효 7일째 4.97%까지 크게 감소하는 것으로 보아 *L. plantarum*균의 발효에 의해 젖당을 포함한 발효성 당이 탄소원으로 이용된 것으로 판단되었다. 발효물의 젖당 함량을 HPLC로 정량분석 한 결과, 발효 전 6.73%에서 1차 *B. subtilis* 발효에 의한 변화는 없었으며, 2차 젖산 발효 1일째 4.30%로 감소하기 시작하였다. 이후 지속적으로 감소하여 젖산

발효 7일째 3.68%까지 젖당이 소진되어 발효 전에 비해 50% 정도 감소하였다. 고초균 발효 시 줄어든 환원당은 발효초기에 첨가된 포도당이 소진된 것으로 사료되었다. Yang 등(2014)에서 표고버섯과 유청 혼합물의 젖산발효를 통해서 환원당 함량을 비교한 결과 발효 전 4.83%에서 발효 후 2.61% 감소한 연구 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 유청의 혼합발효를 통해 젖당의 농도와 pH를 낮춘 발효 유청은 젖당못견딜증을 가진 소비자들을 위한 기능성 식품소재로서의 활용이 가능하다고 사료되었다.

유청 발효물의 산도는 발효 전 0.16%에서 젖산발효 1일째에 1.39%로 급격히 증가하여 젖산이 생산되는 것을 알 수 있었으며, 젖산 발효 3일째 산도가 급격히 감소 후 일정하게 증가하는 것으로 나타났다. 이는 일반적인 젖산균 발효에서 발효성당으로부터 젖산의 생성에 의해 산도가 증가하는 경향과 대조적인 결과를 보였다. 젖산 발효 3일째 산도의 감소는 MSG가 GABA로 전환되면서 proton이온이 소비되면서 산도는 감소하고 pH는 증가한 것으로 판단되었다(Shan 등, 2015). 따라서 젖산발효 중에 증가하던 산도가 유지하거나 감소하는 경향은 전구물질인 MSG의 생물전환을 통한 GABA 생성이 수반되는 것을 간접적으로 나타내는 지표라 판단하였다(Table 3).

유청 혼합발효물의 생균수 측정 결과 *B. subtilis* HA의 생균수는 2차 젖산 발효 전 8.69 log CFU/mL을 나타낸 뒤 젖산발효가 진행됨에 따라 감소하여 젖산발효 7일째 5.83 log CFU/mL까지 생균수가 감소하는 경향을 나타내었다. 반면에 2차 젖산균 발효에 사용된 *L. plantarum* EJ2014의 스타터 생균수는 5.73 log CFU/mL에서 젖산균 발효가 진행되면서 증가하여 발효 7일째 9.20 log CFU/mL를 나타내었다(Fig. 1).

유청 발효물의 펩타이드 함량

혼합발효를 통해 유청 단백질로부터 생성된 펩타이드 함량을 측정하기 위해서 타이로신 함량을 확인해 본 결과, 발효 전 20.47 mg%에서 *B. subtilis* 발효가 시작되면서 35.80 mg%로 증가하였고 *L. plantarum* 발효 7일째까지 증가하여 38.24 mg%을 나타내면서

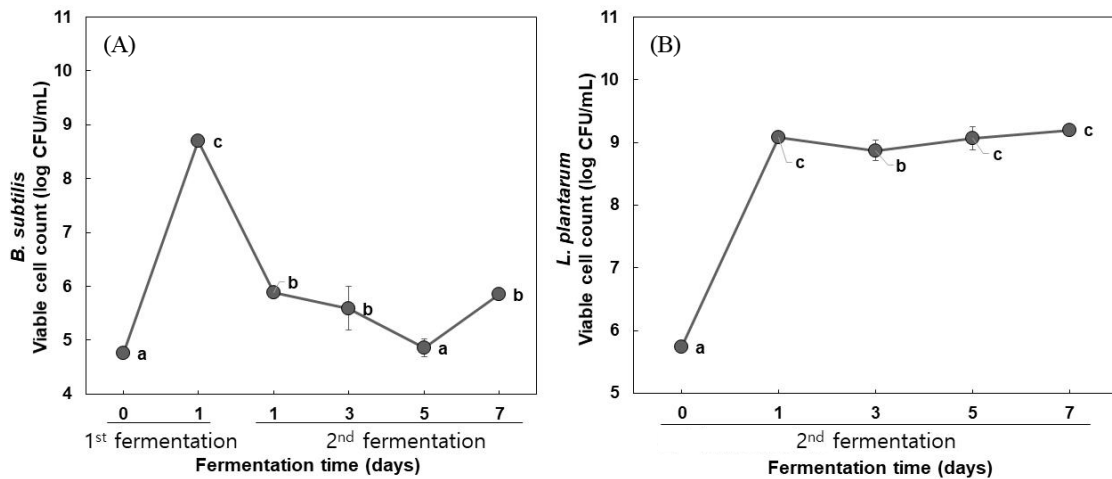


Fig. 1. Changes in the (A) *B. subtilis* and (B) *L. plantarum* viable cell count in whey co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014. Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same fermentation time indicate significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

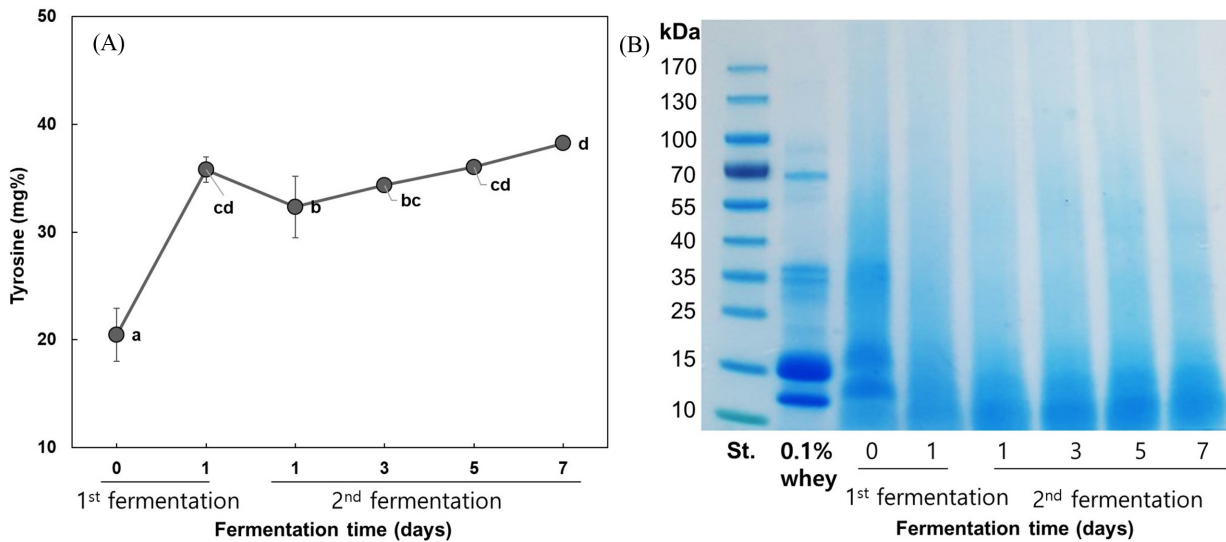


Fig. 2. Changes in (A) tyrosine content and (B) SDS-PAGE pattern in the whey co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014. Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same fermentation time indicate significant difference by Duncan's multiple range test ($p<0.05$).

초기보다 2배 정도 높은 함량을 나타내었다. 유청의 2차 젖산균 발효에서 타이로신 함량이 크게 증가하지 않는 것으로 보아 *L. plantarum*에 의한 유청 단백질의 가수분해능력은 미비한 것으로 판단되었다. 또한 SDS-PAGE를 통해 발효물의 유청 단백질 가수분해 정도를 확인하였다. *B. subtilis* 발효에 의해 생성된 단백질 분해효소에 의해서 유청에 존재하는 베타락토글로불린(β -lactoglobulin) 단백질과 일부 카세인 단백질이 대부분 가수분해되어 10 kDa이하의 펩타이드로 전환되었다. 이는 *B. subtilis* 발효 1일째에 타이로신 함량이 크게 증가하는 이유와 연관이 있는 것으로 사료되었다(Fig. 2). Lim 등(2014b)는 고초균 발효시간에 따라 각각 젖산 발효를 진행하여 tyrosine 함량을 분석한 결과에 의하면, 1차 고초균 발효 없이 젖산균 발효를 진행한 조건에서는 초기 타이로신 함량 3.86 mg%에서 젖산발효 후 타이로신 함량이 큰 차이가 없었다. 그러나 1차 고초균 발효를 진행한 모든 조건에서 타이로신 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 1차 고초균 발효를 4시간 이상 수행한 발효유의 타이로신 함량은 80

mg% 이상으로 크게 증가함을 보고하였다. 따라서 우유 관련 제품의 단백질은 *B. subtilis* 발효를 통해서 효과적으로 분해되면서 펩타이드를 생성하는 것으로 판단되었다.

유청 발효물의 항산화 활성 분석

DPPH 라디칼 제거 활성법은 짙은 자색 시약이 노란색으로 탈색된 DPPH 형태로 바뀌는 것을 이용하여 항산화 소재의 수소공여능을 확인하는 방법이다. 발효 전 유청의 DPPH 라디칼 제거 활성을 나타내는 RC₅₀값이 17.58 mg/g에서 *B. subtilis*와 *L. plantarum* 발효 후 각각 11.05와 10.38 mg/g으로 나타내었다. ABTS 라디칼 제거활성을 바이타민 C와 비교 측정한 결과 유청을 발효하기 전 RC₅₀값은 26.81 mg/g에서 *B. subtilis* 발효 후 9.06 mg/g, *L. plantarum* 발효 후 8.78 mg/g로 발효 전후에 따른 라디칼 제거 활성이 증가하였다. 유청 발효물의 ABTS 라디칼 제거활성이 DPPH 라디칼 제거활성에 비해서 *B. subtilis*와 *L. plantarum* 발효 후 RC₅₀값이 더 낮은 것으로 나타났다. 이는 ABTS* 라디칼은 물

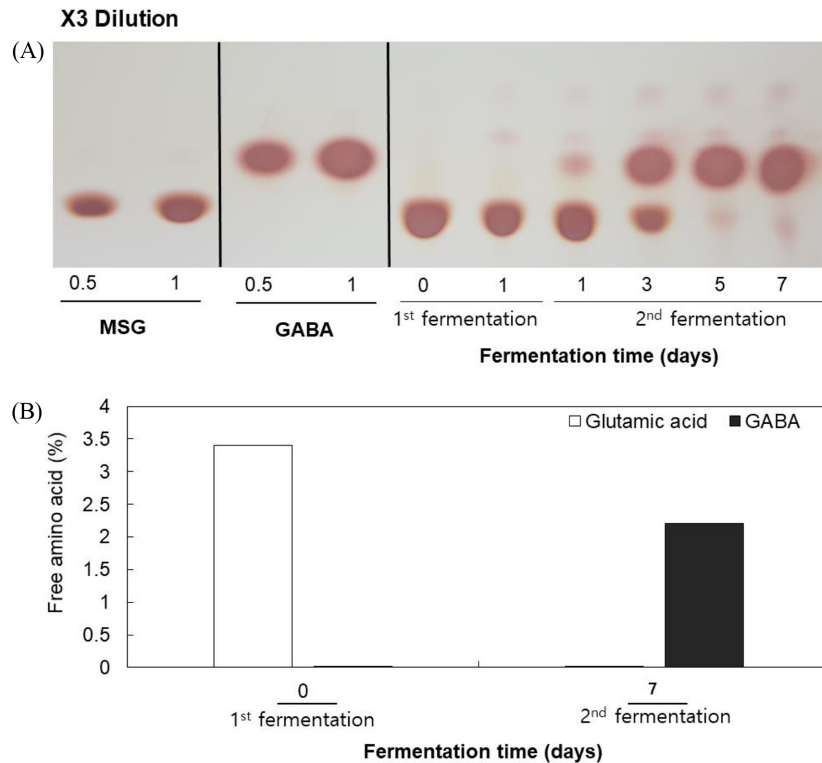


Fig. 3. Changes in (A) gamma-aminobutyric acid (GABA) production (TLC analysis) and (B) monosodium glutamate (MSG) and GABA contents in the whey co-fermented by *B. subtilis* HA and *L. plantarum* EJ2014.

과 용매에 용해되면서 효소와 이산화망가니즈(manganese dioxide) 등의 화합물에 의해서 생성되며 항산화 식품소재의 친수성 및 소수성 성질에 기인해서 소거된다. 반면에 DPPH 라디칼은 유기용매(알코올)에서 용해되면서 바로 생성되며 항산화소재의 소수성 성질에 의해서 측정되는 차이가 있다는 보고(Armao, 2000)와 관련이 있는 것으로 사료되었다.

Inoue(2016)의 보고에서 유청의 고초균 발효시 항산화 효과가 높아진다는 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. Cho 등(2017)의 연구에서 *B. subtilis*는 저분자량 항산화제인 글루타싸이온(glutathione) 대사에 관여하는 γ -글루타밀펩타이드 전달효소를 생산한다고 보고하였으며, Anne(2006)의 연구에서 카세인 단백질의 가수분해물이 가지는 항산화 물질은 히스티딘(histidine), 라이신(lysine), 프롤린(proline)과 타이로신(tyrosine)이며 이를 포함하는 펩타이드로 되었을 때 항산화 활성이 높다는 연구결과를 보고하였다. 이로보아 유청의 *B. subtilis* 발효가 진행됨에 따라 항산화 활성을 증대시키는 효소 및 아미노산의 생성으로 유청 발효물의 항산화 활성이 높아지는 것으로 판단된다.

L. plantarum 균주를 이용한 발효유의 ABTS 라디칼 제거활성을 측정된 결과 100-270 $\mu\text{mol/L}$ Trolox equivalents로 보고된바 있으며(Aguilar-Toal 등, 2017), Luz 등(2018)의 연구에서도 동결건조 유청을 *L. plantarum* 균주별 발효물의 항산화 활성을 측정된 결과 발효 시간이 지남에 따라 항산화능이 증가된다고 보고하였다. 본 연구에서 1차 *B. subtilis* 발효물에 비하여 2차 *L. plantarum* 발효물의 항산화능이 유의적으로 감소하지 않은 것으로 보아 이는 젖산균주마다 생산하는 단백질 분해력이 달라 항산화능에 영향을 미치는 것으로 보인다. 유청 단백질의 분자량 3-10 kDa 이하에서 항산화 활성이 가장 우수하다는 연구 결과(Anne 2006; Woo 등, 2009) 및 동물실험에서 유청의 젖산균을 이용한 발효물

의 섭취를 통해 세포내 글루타싸이온의 수치 증가와 면역력 증강 연구보고(Beaulieu 등, 2007)와 유사하게 유청의 *B. subtilis*와 *L. plantarum* 혼합발효를 통해 생리활성능이 증가된 유청 발효물의 생산이 가능하다고 판단되었다.

유청 발효물의 GABA 함량

*B. subtilis*와 *L. plantarum*에 의한 혼합발효물의 GABA 함량 변화를 측정하기 위해, 발효물을 3배 희석한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 TLC를 이용하여 정성분석 하였다. *L. plantarum* 발효 1일째부터 GABA가 생성되는 것을 볼 수 있으며 *L. plantarum* 발효 5일째 MSG가 GABA로 모두 전환되어 고농도의 GABA spot이 나타났다(Fig. 3a). 발효물의 GABA 함량을 HPLC로 정량 분석한 결과 GABA의 기질인 글루탐산(glutamic acid)은 *L. plantarum* 발효 전 3.40%정도 존재하였고, 젖산 발효 후 대부분 이용되어 소진되었으며 2.21%의 GABA를 생성한 것으로 나타났다(Fig. 3b). 최근까지 유청을 이용한 GABA생산에 관한 연구는 보고되지 않았으며, Shan 등(2015)에서 5% MSG와 18% whole milk, 2% skim milk를 영양성분으로 첨가한 조건에서 83 mg/100 mL의 GABA생산을 보고하였다. 이는 유청 혼합발효물에서 생산된 것과 비교할 때 매우 낮은 GABA함량으로 판단되었다. 유청을 이용한 1차 *B. subtilis* 발효와 2차 *L. plantarum* 발효를 통해서 MSG를 효과적으로 생물전환시켜서 고농도의 GABA생산이 다른 연구와 차별성 있는 연구결과라고 판단되었다. 또한 *B. subtilis* 발효를 이용한 유청배지의 *L. plantarum* 발효 시 추가적인 영양성분 첨가 없이도 잔존하는 MSG가 GABA로 전환되었다. 이는 1차적으로 *B. subtilis*에 의한 배양물이 2차 *L. plantarum*에 의한 혼합발효를 통한 GABA생산에 필요한 영양성분을 포함한 유리한 발효환경을 제공한 것으로 판단되었다. 특히 유청의 *B.*

subtilis 발효 후에 2차 *L. plantarum* 발효를 통해서 발효 5일 만에 전구물질인 MSG가 GABA로 완전히 전환되는 결과를 얻었다. 천연물을 이용하여 *L. plantarum*만을 이용한 발효 시에 전구물질 MSG로부터 GABA전환 정도와 전환시간이 장기간 소요되는 현상을 나타내었다(Kwon과 Lee, 2018; Lee 등, 2016).

젖산균에 의한 발효를 통해서 GABA 생성하는 GAD효소는 바이타민 B₆의 유도체인 pyridoxal-5-phosphate (PLP)를 요구한다. 유청에 존재하는 바이타민 B₆ 외 영양성분이 사멸 과정에서 파괴되었다는 보고로 보아(Kilshaw 등, 1982) 본 연구의 열처리 과정에서 유청의 바이타민 B₆가 일부 파괴될 것으로 판단된다. 하지만 Rosenberg 등(2017)은 다양한 미생물이 대사과정을 통해 바이타민 B₆를 생산한다는 보고에서 *Saccharomyces* sp.은 3 mg/L, *Bacillus* sp.는 41-65 mg/L의 바이타민 B₆를 생산한다고 보고하였으며, 유청의 *B. subtilis* 발효를 통해 바이타민 B₆가 일부 생산된 것으로 사료되었다.

Komastsuzaki 등(2005)연구에서 분리한 *L. paracasei*의 최적조건으로 18 μM PLP를 첨가하여 302 mM GABA를 전환한 결과를 보고하였으나, Okuda 등(2015)연구에 의하면 *B. subtilis*의 단백질 유전자인 *gabT*, *gabD*와 *GabR*가 GABA생산 효소 GAD의 조효소인 PLP를 발현하는 전사조절제로서 *B. subtilis* 발효에 의해 GAD 효소작용을 촉진하여 GABA 생산에 도움을 준다는 보고를 바탕으로 유청 발효 시 PLP 첨가 없이도 *B. subtilis*와 *L. plantarum*의 혼합발효를 통해 고농도의 GABA 생산이 가능한 것으로 판단되었다.

결론적으로 모짜렐라 치즈 제조과정에서 분리된 유청을 *B. subtilis*와 *L. plantarum*의 혼합 발효를 통해 동일전구물질인 MSG 첨가만으로 γ-PGA, GABA 등의 기능성 물질을 단계적으로 생산하여 기능성이 강화된 발효물을 생산하였다.

요 약

본 연구는 모짜렐라 치즈 제조과정에서 분리된 유청을 *B. subtilis* HA와 *L. plantarum* EJ2014의 혼합 발효를 통해 γ-PGA, GABA 등의 기능성 물질이 강화된 발효물을 생산하고자 하였다. 유청 *B. subtilis* 발효 1일차의 시료 분석결과, pH는 6.51, 산도는 0.32%, 생균수는 8.39 log CFU/mL을 나타냈으며, 점질물과 점조도는 각각 6.06%와 4.09 Pas^s로 발효 전보다 유의적으로 증가하였다. 2차 *L. plantarum* 발효를 통해 유청 혼합발효물의 최종 pH는 4.57까지 감소하였고 산도는 *L. plantarum* 발효 1일째 1.39%로 증가하여 최종 산도는 1.73%를 나타내었다. *B. subtilis* 생균수는 2차 *L. plantarum* 발효가 진행됨에 따라 5.83 log CFU/mL까지 감소하였으나 *L. plantarum* 생균수는 5.73 log CFU/mL에서 *L. plantarum* 발효 1일째 9.08 log CFU/mL로 급격히 증가한 후 *L. plantarum* 발효 7일까지 유지하였다. TLC 정성분석한 결과 *L. plantarum* 발효 5일 이후 MSG가 모두 소진되어 GABA로 전환되는 것을 확인할 수 있었다. HPLC 정량분석으로 MSG는 *L. plantarum* 발효 초기 3.40%에서 *L. plantarum* 발효 7일째 거의 소진되면서 혼합발효물의 GABA 함량은 2.21%를 보였다. 환원당과 젖당 함량은 각각 발효 전 11.07과 6.73%에서 *L. plantarum* 발효 7일째 각각 4.97과 3.68%로 크게 감소하는 것을 보였다. 타이로신 함량은 발효가 진행되는 동안 증가되어 *L. plantarum* 발효 7일째 38.24 mg%를 나타내었다. 단백질 가수분해 정도를 확인하기 위해 SDS-PAGE를 통해 발효 후 유청 단백질들이 대부분 가수분해되어 저분자화되는 것을 확인하였다. 유청의 발효 전 후에 따른 항산화 활성을 측정된 결과 ABTS RC₅₀값은 26.81 mg/

g에서 발효 후 8.78 mg/g, DPPH RC₅₀값 또한 발효 전 17.58 mg/g에서 발효 후 10.38 mg/g으로 감소하면서 혼합발효를 통해 전자공여능이 향상되는 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 “커뮤니티비즈니스 활성화사업” 지원을 받아 연구되었습니다.

References

- Aguilar-Toal JE, Santiago-Lpez L, Peres CM, Peres C, Garcia HS, Vallejo-Cordoba B, Gonzalez-Crdova AF, Hernandez-Mendoza A. Assessment of multifunctional activity of bioactive peptides derived from fermented milk by specific *Lactobacillus plantarum* strains. *J. Dairy Sci.* 100: 65-75 (2017)
- Anne P. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *Int. Dairy J.* 16: 1306-1314 (2006)
- Arnao MB. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 419-421 (2000)
- Bao J, Zhang X, Zheng JH, Ren DF, Lu J. Mixed fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by random-centroid optimization. *Food Chem.* 30: 64-72 (2018)
- Beaulieu J, Dubuc R, Beaudet N, Dupont C, Lemieux P. Immunomodulation by a malleable matrix composed of fermented whey proteins and lactic acid bacteria. *J. Med. Food* 10: 67-72 (2007)
- Bounous G. Whey protein concentrate (WPC) and glutathione modulation in cancer treatment. *Anticancer Res.* 20: 4785-4792 (2000)
- Cagri-Mehmetoglu A, Kusakli S, van de Venter M. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *J. Dairy Sci.* 95: 3643-3649 (2012)
- Carr FJ, Chil D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit. Rev. Microbiol.* 28: 281-370 (2002)
- Cho HB, Roy JK, Park WJ, Jeon BO, Kim YW. Overproduction of a γ-glutamyltranspeptidase from *Bacillus amyloliquefaciens* in *Bacillus subtilis* through medium optimization. *Korean J. Food Sci. Technol.* 49: 610-616 (2017)
- Choi JW. Optimized production of poly-γ-glutamic acid and γ-amino butyric acid from *Dendropanax morbifera* extracts by *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum*. MS thesis, Keimyung University, Daegu, Korea (2016)
- Chuang CY, Shi YC, You HP, Lo YH, Pan TM. Antidepressant effect of GABA-rich monascus-fermented product on forced swimming rat model. *J. Agr. Food Chem.* 59: 3027-3034 (2011)
- Gallardo-Escamilla FJ, Kelly AL, Delahunty CM. Sensory characteristics and related volatile flavor compound profiles of different types of whey. *J. Dairy Sci.* 88: 2689-2699 (2005)
- Inoue M. Glutathionists in the battlefield of gamma-glutamyl cycle. *Arch. Biochem. Biophys.* 595: 61-63 (2016)
- Jakubowicz D, Froy O, Ahrn B, Boaz M, Landau Z, Bar-Dayan Y, Ganz T, Barnea M, Wainstein J. Incretin, insulinotropic and glucose-lowering effects of whey protein pre-load in type 2 diabetes: a randomised clinical trial. *Diabetologia* 57: 1807-1811 (2014)
- Jeong SJ, Yang HJ, Jeong SY, Jeong DY. Identification of characterization and statistical optimization of constituent for *Bacillus subtilis* SCJ4 isolated from Korean traditional fermented food. *Korean J. Microbiol.* 51: 48-60 (2015)
- Kilshaw PJ, Heppell LM, Ford JE. Effects of heat treatment of cow's milk and whey on the nutritional quality and antigenic properties. *Arch. Dis. Child.* 57: 842-847 (1982)
- 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)
- Kim SH. Studies on production of health beverage using whey protein and whey. MS thesis, Konkuk University, Seoul, Korea (2011)

- Kim SH. Quality characteristics of whey *Makgeolli* by *Kluyveromyces marxianus*. MS thesis, Sunchon National University, Sunchon, Korea (2015)
- Kim DH, Jeong D, Kang IB, Kim H, Song KY, Seo KH. Dual function of *Lactobacillus kefir* DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR- α in adipose tissue. *Mol. Nutr. Food Res.* 61: 1700252 (2017)
- Kim SR, Kim MJ, Lee HH, Seo MJ, Kang BW, Joo WH, Park JU, Rhu EJ, Hwang YH, Jeong YK. Fibrinolytic activity and antioxidant effects of the newly developed agavean fermented of product produced by *Bacillus* sp. *J. Life Sci.* 20: 1711-1717 (2010)
- Kimura Y, Sumiyoshi M, Kobayashi T. Whey peptides prevent chronic ultraviolet B radiation-induced skin aging in melanin-possessing male hairless mice. *J. Nutr.* 144: 27-32 (2014)
- Komastuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 22: 497-504 (2005)
- Kook MC, Cho SC. Production of GABA (gamma aminobutyric acid) by lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* 33: 377-389 (2013)
- Kwon HY, Kim YS, Kwon GS, Kwon GS, Sohn HY. Isolation of immuno-stimulating strain *Bacillus pumilus* JB-1 from *Chungkook-jang* and fermentational characteristics of JB-1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 291-296 (2004)
- Kwon SY, Lee SP. Enrichment of gamma-aminobutyric acid (GABA) in old antler extract fermented by *Lactobacillus plantarum*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 50: 37-43 (2018)
- Laroute V, Yasaro C, Narin W, Mazzoli R, Pessione E, Cocaign-Bousquet M, Loubire P. GABA production in *Lactococcus lactis* is enhanced by arginine and co-addition of malate. *Front. Microbiol.* 7: 1050 (2016)
- Lee HS, Kwon SY, Lee SO, Lee SP. Production of fermented *Omija* (*Schizandra chinensis*) beverage fortified with high content of gamma-aminobutyric acid using *Lactobacillus plantarum*. *Korean J. Food Preserv.* 23: 326-334 (2016)
- Lee SW, Park HJ, Park SH, Kim N, Hong S. Immunomodulatory effect of poly- γ -glutamic acid derived from *Bacillus subtilis* on natural killer dendritic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443: 413-421 (2014)
- Lim JS, Lee SP. Production of set-type yogurt fortified with peptide and γ -aminobutyric acid by mixed fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*. *Korean J. Food Sci. Technol.* 46: 162-172 (2014)
- Luz C, Izzo L, Graziani G, Gaspari A, Ritieni A, Maes J, Meca G. Evaluation of biological and antimicrobial properties of freeze-dried whey fermented by different strains of *Lactobacillus plantarum*. *Food Funct.* 9: 3688-3697 (2018)
- Matsushita S, Iwami N, Nitta Y. Colorimetric estimation of amino acids and peptides with the Folin phenol reagent. *Anal. Biochem.* 16: 365-371 (1966)
- Okuda K, Kato S, Ito T, Shiraki S, Kawase Y, Goto M, Kawashima S, Hemmi H, Fukada H, Yoshimura T. Role of the aminotransferase domain in *Bacillus subtilis* GabR, a pyridoxal 5'-phosphate-dependent transcriptional regulator. *Mol. Microbiol.* 95: 245-257 (2015)
- Park YS. The production optimization of fermented black jujube enhanced with poly- γ -glutamic acids by *Bacillus subtilis* and the production of functional fried batter with fermented substance. MS thesis, Keimyung University, Daegu, Korea (2016)
- Qian B, Xing M, Cui L, Deng Y, Xu Y, Huang M, Zhang S. Antioxidant, antihypertensive, and immunomodulatory activities of peptide fractions from fermented skim milk with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* LB340. *J. Dairy Res.* 78: 72-79 (2011)
- Rosenberg J, Ischebeck T, Commichau F.M. Vitamin B₆ metabolism in microbes and approaches for fermentative production. *Biotechnol. Adv.* 35: 31-40 (2017)
- Schumann W. Production of recombinant proteins in *Bacillus subtilis*. *Adv. Appl. Microbiol.* 62: 137-189 (2007)
- Shan Y, Man CX, Han X, Li L, Guo Y, Deng Y, Li T, Zhang LW, Jiang YJ. Evaluation of improved γ -aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *J. Dairy Sci.* 98: 2138-2149 (2015)
- Sung MH, Park C, Kim CJ, Poo H, Soda K, Ashiuchi M. Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production and applications. *Chem. Rec.* 5: 352-366 (2005)
- Woo SH, Jhoo JW, Kim GY. Antioxidant activity of low molecular peptides derived from milk protein. *Korean J. Dairy Sci. Ani. Resour.* 29: 633-639 (2009)
- Yamatsu A, Yamashita Y, Maru I, Yang J, Tatsuzaki J, Kim M.. The improvement of sleep by oral intake of GABA and *Apocynum venetum* leaf extract. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 61: 182-187 (2015)
- Yang HS, Jo JH, Choi YJ, Jung HK, Park TY, Jin SW, Choi BS, Seo KS, Huh CK. Preparation of a functional drink by mixed fermentation of oak mushrooms extract and whey. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* 32: 111-119 (2014)
- Yu W, Chen Z, Ye H, Liu P, Li Z, Wang Y, Li Q, Yan S, Zhong CJ, He N. Effect of glucose on poly- γ -glutamic acid metabolism in *Bacillus licheniformis*. *Microb. Cell Fact.* 16: 22 (2017)