



## Enhanced biological effect of fermented soy-powder milk with *Lactobacillus brevis* increasing in $\gamma$ -aminobutyric acid and isoflavone aglycone contents

Chung Eun Hwang<sup>1</sup> · Su Cheol Kim<sup>1</sup> · Jin Hwan Lee<sup>2</sup> · Su Young Hong<sup>3</sup> · Kye Man Cho<sup>1</sup>

### 가바와 비당체 이소플라본이 증가된 *Lactobacillus brevis* 발효 콩-분말 두유의 생리활성 증진 효과

황정은<sup>1</sup> · 김수철<sup>1</sup> · 이진환<sup>2</sup> · 홍수영<sup>3</sup> · 조계만<sup>1</sup>

Received: 22 May 2018 / Accepted: 13 August 2018 / Published Online: 30 September 2018  
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2018

**Abstract** The research was aimed to analyze the functional constituents (GABA and isoflavone), radical (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), and hydroxyl) scavenging activities and enzyme ( $\alpha$ -glucosidase and lipase) inhibitory effects of soy-powder milk (SPM) and fermented soy-powder milk (FSPM) with varied *Lactobacillus brevis*. Ten  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria that showed 96-99% similarity with *L. brevis*, according to 16S rRNA gene sequence analysis, were isolated from fermented kimchi. The conversion rates of GABA were obtained 66.96-93.51, 63.76-84.58, and 57.05-69.75% in monosodium glutamate, gluten and soy protein, respectively. The levels of pH and glutamic acid of FSPM were found lower than

those of SPM, but the acidity and GABA contents were higher. The GABA conversion rate of FSPM with BMK484 strain was attained the highest 69.97%. The contents of isoflavone glycoside (1290.93  $\mu\text{g/g}$ ) was higher in SPM, but the content of isoflavone aglycone (287.27-501.9  $\mu\text{g/g}$ ) was higher in FSPM. The levels of isoflavone aglycone such as daidzein, glycitein and genistein, were found as the highest 240.2, 61.24 and 200.45  $\mu\text{g/g}$ , respectively, when FSPM was made with BMK484 strain. The DPPH, ABTS and hydroxyl radical scavenging and  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase inhibitory activities of FSPM made with BMK484 strain were the relatively higher 60.31, 88.10, 61.25, 52.71, and 39.37%, respectively. Therefore, the *L. brevis* can be used as a material capable of simultaneously enhanced GABA and isoflavone aglycone in FSPM.

Kye-Man Cho (✉)  
E-mail: kmcho@gntech.ac.kr

<sup>1</sup>Department of Food Science, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Republic of Korea

<sup>2</sup>Division of Research Development and Education, National Institute of Chemical Safety, Ministry of Environment, Daejeon, 34111, Republic of Korea

<sup>3</sup>Food Science Research Institute, Kolmar BNH Inc., Sejong 30003, Republic of Korea

This is an Open Access article 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.

**Keywords** Antioxidant activity · Fermented soy-powder milk · Gamma-aminobutyric acid · Isoflavone · *Lactobacillus brevis*

### 서론

콩(*Glycine max*)은 영양성분의 구성이 가장 이상적이고 식물성 단백질이 풍부하여 밭에서 나는 쇠고기보다 잘 알려져 있으며 이를 이용한 가공식품으로는 두부, 두유, 청국장, 된장 등이 있다. 콩은 발효 중에 미생물이 생성하는 여러 가수분해 효소 활성으로 인해 트립신 저해제, 페놀산, 여러 비타민류의 함량이 증대되어 다양한 생리활성 효과가 있는 것으로 보고되었다[1,2]. 이

러한 콩에는 여러 생리활성 물질이 고루 함유되어 있고 특히 여성호르몬과 화학 구조식이 유사한 이소플라본이 함유되어 있으며 섭취 시 항암 효과, 심혈관 질환 감소 등의 우수한 생리활성을 나타내게 된다[3]. 이소플라본은 배당체(glycosides)와 비당체(aglycones) 형태로 분류되어 있으며 콩 품종과 종자 색깔 등에 따라 조금씩 차이는 있으나 일반적인 장류콩의 경우에는 glycosides (25%), malonyl-glycosides (70%), acetyl-glycosides (3%), aglycones (2%) 형태로 존재한다[4]. 특히 비당체 형태들은 우수한 항산화 작용을 갖고 있으나 대략 2%에 불과하여 화학적 처리방법 등으로 함량을 증가시키지만 안전성 문제로 인해 미생물을 이용한 발효공법을 주로 이용하고 있다. 특히 콩 발효 과정 중에는 발효 균주에 따라 비당체(daidzein, glycitein, 및 genistein) 형태가 30~80%까지 증가하게 된다[5].

Gamma-aminobutyric acid (GABA)는 탄소 4개로 구성된 비단백성 아미노산으로 glutamate decarboxylase (GAD)에 의해 글루탐산(glutamic acid, GA)으로부터 탈탄산 반응에 의해 GABA로 전환된다[6]. GABA는 중추신경계 신경전달물질로 주요 기능으로는 혈압과 심박수와 같은 심혈관계 기능 조절에 관여하며 통증과 불안감 해소를 완화 시켜주는 것으로 알려져 있다[7]. 이는 뇌의 정보전달 기능에 있어 GA의 흥분 유발과 GABA의 흥분 억제라는 상반된 신호 체계에 의한 균형유지로 정상적인 뇌의 기능을 가능케 함이 보고되었다[8]. 또한 현미, 녹차 또는 빵잎 등에는 GABA가 함유되어 있으나 약리작용을 나타내기에는 그 함량이 매우 낮은 관계로 GABA의 효능을 기대하기는 어려운 실정이다[9,10]. 이러한 이유로 오래 전부터 GABA 함량을 증가시키기 위한 합성 연구가 활발히 진행되었으나 변비 및 설사와 같은 부작용 사례가 보고되어 화학적 합성방법이 아닌 생물전환기술 등으로 GABA 함량을 증대시키는 연구가 대부분 보고되었다. 대표적으로 현미[11] 또는 콩[12]의 발아 및 발효[13] 그리고 열이나 저온충격과 같은 스트레스 요법[14]과 혐기적 처리 방법 등의 연구가 보고되었다[15]. 특히 Bouche와 Fromm [16]은 원료콩에 비해 발아콩에서 글루탐산 함량이 현저하게 증가한다고 하였으며 Huang 등[17]과 Lin과 Lai [18], Devi 등[19]은 GABA 생성과 동시에 수용성 페놀릭스 및 이소플라본과 같은 기능성 물질들이 생성된다고 보고하였다. 그러므로 콩에는 GABA 전구물질인 GA가 다량 함유되어 있어 미생물 발효를 통해 GABA를 증가시킬 수 있으며 특히 GABA 생산 능력이 있는 미생물 탐색 결과, Oh [20]와 Park과 Oh [21]는 *Lactobacillus* 유산균이 고농도의 GABA를 생성한다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 유산균 발효를 통해 비당체 이소플라본 뿐만 아니라 GABA 함량을 동시에 증진시켜 기존의 발효두유보다 식품영양학적 측면에서 영양소 강화 및 발효 연구의 수준을 향상시키기 위해 실시하였다. 즉, 발효식품으로부터 GABA 생성 유산균을 선별하고 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 기존에 알려져 있던 유산균과 이들의 accession number와 비교하여 계통발생학적 관계를 조사하였고 이들 균주의 GABA 전환율을 GA 기질 종류에 따라 비교 측정하였다. 또한, GABA 고 생성 유산균을 종균으로 사용하여 콩-분말 두유(soy-powder milk, SPM)를 발효하여 발효 콩-분말 두유(fermented soy-powder milk, FSPM) 제조 후 각각의 균주 종류에 따른 발효 특성, 이소플라본 및 생리활성을 비교 분석하였다.

## 재료 및 방법

### 재료, 시약 및 기기

새단백콩 품종은 농촌진흥청 국립식량과학원 남부작물부에서 제공 받아 사용하였고 monosodium glutamate (MSG), 활성 글루텐과 콩 단백질은 시중의 대형 할인마트에서 구입하여 사용하였다. 유산균 배양은 *Lactobacilli* MRS broth (MRS, Difco Co., Becton Dickinson Co., Sparks, MD, USA) 배지를 구입하여 사용하였다. 6종류의 이소플라본 유도체 중 비당대체(daidzein, glycitein 및 genistein)는 Sigma-Aldrich, Inc. (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)에서 구입하였고 배당체(daidzin, glycitin 및 genistin)는 Indofine (Hillsborough, NJ, USA)에서 구입하였다. 2N Folin-Cialteu phenol, GA, GABA, 2,2-diphenyl-1-picryldrazyl (DPPH), 2,4,6-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), thiobarbituric acid (TBA), trichloroacetic acid (TCA), *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside (*p*-NPG), *p*-nitrophenyl-butyrate (*p*-NPB),  $\alpha$ -glucosidase 및 pancreatic lipase는 Sigma-Aldrich, Inc. 제품을 사용하였다. Thin layer chromatography (TLC) 분석은 silica gel 코팅 유리판(0.5 mm, Merck KGaA)을 사용하였다. HPLC용 methanol, acetonitrile, water 및 acetic acid 등의 시약과 유기용매는 Fisher Scientific International, Inc. (Fairlawn, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였으며 그 외 기타시약은 필요에 따라서 분석용 1급 또는 특급시약을 구입하여 사용하였다.

GABA를 포함한 유리아미노산 함량은 아미노산 자동분석기(Hitachi, L-8900, Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였고, 페놀릭스 함량, 항산화 활성 및 소화효소 저해활성 측정은 분광광도계(UV-1800 240V, Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다. 이소플라본 함량은 high performance liquid chromatography (HPLC, Agilent 1260 series, Waldbronn, Germany)를 사용하여 분석하였다.

### GABA 생성 유산균 분리

GABA 생성 유산균 확보를 위해 김치 등의 발효식품을 적당히 희석하고 일정량 취하여 37 °C 조건하에서 MRS 평판배지에 도말 배양하였다. 도말 배양하여 나타난 각기 다른 집락들에 대해 MRS 평판배지에 각각 순수 분리하여 최종 약 500여종의 유산균을 분리 및 확보하였으며 MRS 평판배지 혹은 20% (v/v) glycerol에 저장 후 -70 °C에서 보관하면서 필요에 따라 활성화시켜 사용하였다. GABA 생성 유무 확인은 5% GA가 함유된 MRS 액체배지에 각각의 유산균들을 접종하여 30 °C에서 48시간 동안 배양 후 원심 분리하여 상등액을 준비하였다. TLC plate에 5% GA 및 GABA 표준품과 유산균 배양 상등액을 각각 2  $\mu$ L씩 spotting하였고 부탄올:초산:증류수 (4:1:1, v/v/v)에서 20분간 전개시킨 후 건조하고 1% ninhydrin 발색용액에 침지 후 다시 건조시켜 100 °C에서 약 10초간 발색시켜 GABA 생성 유무를 확인하였다[22]. 한편, GABA 생성능이 우수하다고 보고된[22] *Lactobacillus brevis* KCTC3320 균주는 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에서 분양 받아 양성 대조군으로 사용하였다.

**16S rRNA 염기서열 분석**

최종 10종의 GABA 생성 유산균을 선발하였고 이들 균주 확인을 위하여 16S rRNA 염기서열 분석을 실시하였다. 각각의 유산균을 MRS 액체배지에 접종하여 30 °C에서 48시간 배양한 후 균체를 모은 후 G-spin Genomic DNA Purification Kit (iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 16S rRNA 유전자의 polymerase chain reaction (PCR) 증폭을 위한 primer는 정방향 #1F (5'-CGG AGA GTT TGA TCC TGG-3')와 역방향 #2R (5'-TAC GGC TAC CTT ACG AC-3')를 사용하였으며, PCR은 95 °C에서 5 분간 변성 후 94 °C-30초, 49 °C-30초, 72 °C-1분 30초 반응을 30회 반복 수행하였으며 72 °C에서 10분간 반응 후 4 °C로 온도를 내려 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 PCR Purification Kit (iNtRON Biotechnology)를 사용하여 정제한 후 1% 아가로오스 겔 상에서 전기영동을 실시하여 확인 후 이를 주형으로 하여 시슬중결합법로 염기서열을 분석하였다. 16S rRNA 유사성 값은 DNAMAN analysis system (Lynnon Biosoft, Quebec, Canada)을 사용하여 alignments 및 evolutionary distance로부터 계산하였다[23].

**GA 기질 종류에 따른 GABA 함량, 전환율 및 유리아미노산 분석**

GA 기질은 MSG, 활성 글루텐과 콩 단백질을 사용하였다. MRS 액체배지 0.05% MSG를 첨가한 후 121 °C에서 15분 살균한 후 GABA 생성 유산균 배양액을 2.5% 접종하여 30 °C에서 60시간 배양하여 분석하였다. 한편, 정제수 50 mL에 2% 설탕 및 5% 활성 글루텐 혹은 5% 콩 단백질 분말을 혼합하고 121 °C에서 15분 살균한 후 GABA 생성 유산균 배양액을 2.5% 접종하여 30 °C에서 60시간 배양하였다.

유리아미노산 분석은 각 시료 1 mL에 증류수 4 mL를 가한 후 60 °C에서 1시간 반응시키고 10% 5-sulfosalicylic acid 1 mL를 첨가하여 4 °C에서 2시간 방치시켜 단백질을 침전시키고 원심분리 후 상등액을 0.45 μm membrane filter (Dismic-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이 여과액을 60 °C에서 감압농축하고 건조시킨 뒤 pH 2.2 lithium buffer 2 mL를 첨가하여 용해 후 0.45 μm membrane filter로 다시 여과시킨 것을 아미노산 자동분석기로 분석하였다[24]. 한편 GABA 전환율은 유리아미노산 분석 후 아래와 같은 식으로 GABA 전환율을 확인하였으며 각각의 유리아미노산 함량은 mg/100 mL로 환산하여 나타내었다.

$$\text{GABA 전환율(\%)} = [\text{GABA} \div (\text{GA} + \text{GABA})] \times 100$$

**콩-분말 두유와 발효 콩-분말 두유 제조**

새단백콩 1,000 g을 6시간 수침하고 물기를 제거한 후 100 °C에서 30분간 증자한 후 55 °C에서 건조하고 분쇄하여 100 mesh 콩-분말을 제조하였다. 발효 콩-분말 두유 제조는 콩-분말 10 g에 증류수 100 mL와 설탕 2 g을 첨가하고 용해시킨 뒤 121 °C에서 15분 살균하여 콩-분말 두유(SPM)을 제조하였다. 제조된 SPM에서 선발 유산균을 2.5%씩 접종하여 30 °C에서 72 시간 발효를 유도하여 발효 콩-분말 두유(FSPM)를 제조하였다[23].

**pH, 산도 및 생균수**

pH는 pH meter (MP 220 pH meter, London, UK)를 사용하여 측정하였고 산도는 증류수 50 mL에 시료 1 mL를 첨가하여 분산시킨 후 0.1 N NaOH 용액으로 pH 8.3±0.2까지 중화시킨 후 젓산 양으로 환산하여 %로 나타내었다. 생균수 확인은 시료를 10 단 희석법으로 희석하고 MRS 평판배지에 도말하고 30 °C에서 48시간 배양한 후 30-300개 정도의 집락이 생성된 평판배지를 선택하여 생균수를 측정하여 log CFU/mL로 나타내었다.

**총 페놀릭스 분석**

SPM과 FSPM을 동결건조 한 후 분쇄시켜 분말로 제조하고 분말 1 g에 50% 메탄올 10 mL를 첨가하여 상온에서 12시간 추출하고 상등액을 0.45 μm membrane filter로 여과하여 추출물을 제조하였다. 추출물 0.5 mL와 25% 탄산나트륨(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) 용액 0.5 mL를 시험관에 분주하고 3분간 정치시킨 후 2 N Folin-Ciocalteu phenol 시약 0.25 mL를 첨가하여 혼합한 다음 37 °C에서 1시간 동안 발색시켜 750 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다[23].

**이소플라본 분석**

이소플라본 함량 분석은 HPLC를 사용하여 Cho 등[4]의 방법에 준하여 실시하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Lichrophore 100 RP C18 column (4.6×250 mm, 5 μm, Merck KGaA)을 사용하였고 이동상 용매는 0.2% 초산 함유 HPLC water (solution A)와 0.2% 초산 함유 acetonitrile (solution B)로 분석하였다. 이동상 조건은 A 용매 기준으로 0분때 100%, 15분-90%, 25분-80%, 35분-75%, 45분-65% 및 50분-65%로 분석하였다. 분석 시료는 20 μL를 주입하였으며 이동상 속도는 30 °C에서 1 mL/min으로 유지하였다. 검출기는 diode array detector를 사용하여 UV 254 nm에서 검출하였다. 검출된 각각의 이소플라본 peak들은 표준품 검량곡선에 대입하여 함량을 계산하였다.

**라디칼 소거활성**

DPPH, ABTS 및 hydroxyl 라디칼 소거활성은 Hwang 등[24]의 방법을 따라 측정하였다. 추출물(0.5 mg/mL) 0.2 mL에 DPPH 용액 0.8 mL를 가하여 상온에서 30분간 방치 후 525 nm에서 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성은 7 mM ABTS 용액과 2.45 mM potassium persulfate (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)를 1:1로 섞고 암실에서 12-16시간 보관하여 ABTs radical (ABTS<sup>+</sup>)을 형성시켰다. 이 후 추출물(0.25 mg/mL) 0.1 mL에 ABTS 용액 0.9 mL를 첨가하여 3분 후에 분광광도계를 이용하여 732 nm에서 측정하였다. Hydroxyl 라디칼 소거능은 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O-EDTA (10 mM) 0.2 mL, 2-deoxyribose (10 mM) 0.2 mL, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) 0.2 mL와 각각의 추출물(0.5 mg/mL) 1.4 mL를 혼합하고 37 °C에서 4시간 동안 반응시켰다. 이 반응물에 TBA (1%)와 TCA (2.8%)를 각각 1 mL씩 가하여 100 °C에서 20분간 발색시켜 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 및 ABTS의 음성대조구는 시료대신 증류수를 사용하였고 hydroxyl 라디칼 소거능의 음성 대조구는 PBS 완충액(NaCl 8.76 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.11 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.596 g)을 사용하여 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 소화효소 저해활성

$\alpha$ -Glucosidase 저해활성은 pH 6.8로 조정된 인산나트륨 완충액 (200 mM) 50  $\mu$ L에 시료와  $\alpha$ -glucosidase 효소 50  $\mu$ L를 첨가하여 37 °C에서 10분간 예비 반응시킨 후 여기에 인산나트륨 완충액(100  $\mu$ L)과 *p*-NPG (5 mM) 100  $\mu$ L를 가하여 37 °C에서 10분간 반응을 시킨 후 탄산나트륨(100 mM) 0.75 mL를 가하여 반응을 종료시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다[24]. Pancreatic lipase 저해활성은 각각의 추출물 50  $\mu$ L, pancreatic lipase (1.0 U/mL) 효소용액 50  $\mu$ L 및 pH 6.8로 조정된 인산나트륨 완충액(100 mM) 50  $\mu$ L를 혼합하여 37 °C의 수욕상에서 10분간 예비 반응시키고 인산나트륨 완충액에 녹인 *p*-NPB (5 mM) 100  $\mu$ L를 첨가 후 다시 10분간 반응시킨 후 탄산나트륨 (100 mM) 0.75 mL를 가해 효소반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다[25].  $\alpha$ -Glucosidase와 pancreatic lipase 저해활성 측정에 사용된 음성 대조구는 추출물 대신 증류수를 사용하였고 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다.

### 통계처리

각 실험은 삼 반복 수행하였고 이 결과는 SPSS 12.0 package를 사용하여 분산 분석을 수행하였고 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며 각각의 분석 결과는 유의성 검정을 위해 분산분석 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

### 결과 및 고찰

GABA 생성 유산균 선발 및 기질에 따른 GABA 전환율 비교 TLC로 확인한 결과 GA 표준품의 경우 *R<sub>f</sub>* 0.8과 GABA 표준품의 경우 *R<sub>f</sub>* 2.0이었다. WCP02, LAB28, LAB40, LAB48, LAB62, LAB112, LAB224, BMK41, BMK184, BMK484로 명명된 유산균들에게서 GA로부터 GABA를 생성하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 10종의 GABA 생성 유산균들의 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과 모두 *Lactobacillus brevis*와 96-99%의 상동성을 보였다(Supplementary data Table 1S).

선발 유산균의 기질에 따른 GABA 전환율을 살펴본 결과 Table 1과 같았다. MSG 기질의 경우 GA 및 GABA 함량은 각각 844.58 및 42.86 mg/100 mL가 검출되었고 WCP02 균주는 43.72 mg/100 mL로 GA 함량이 감소하였고 GABA 함량은 629.79 mg/100 mL로 증가하였으며 전환율은 93.51%로 이들 중

가장 높은 것으로 나타났다. 한편 LAB28 균주는 66.96%로 이들 중 가장 낮은 GABA 전환율을 보였으며 이외 나머지 균주들은 평균 80% 이상의 우수한 GABA 전환율을 나타내었다. 활성 글루텐의 GA 및 GABA 함량은 각각 25.73 및 1.12 mg/100 mL가 검출되었고 MSG 기질에서 전환율이 가장 우수하였던 WCP02 균주는 82.93%의 비교적 우수한 전환율을 나타내었으며 LAB62와 LAB224 균주는 63.76%와 64.54%로 조금 낮은 전환율을 나타내었고 이외 균주들은 70% 이상의 전환율을 보였다. 콩 단백질의 GA 함량은 250.69 mg/100 mL였으며 GABA는 27.09 mg/100 mL가 검출되었다. LAB40 균주는 69.75%로 가장 전환율이 우수하였고 LAB62 균주는 57.05%로 이들 중 가장 낮은 전환율을 보였으며 이외 균주들은 약 60% 이상의 전환율을 나타내었다(Table 1).

이전의 많은 연구 결과들을 통해 *Lactobacillus sakei*, *L. brevis* 및 *Lactobacillus plantarum*과 같은 여러 유산균들이 GABA를 생성할 수 있는 능력이 있는 것으로 보고되고 있다 [22,26-28]. Tung 등[29]은 탈지유에 MSG를 각각 0.1, 0.6, 1.2%만큼 첨가한 후 *L. plantarum* NTU 102 균주를 배양한 결과 0.6% MSG 농도에서 GABA (33 mg/L) 함량이 가장 높았으며, Kook 등[28]은 3% MSG 함유 탈지유에서 *L. sakei* 유산균은 17,014 mg/L만큼 GABA를 생성한다고 보고하였다. Cagno 등[26]과 Stragusa 등[30]은 *L. plantarum*의 경우 498과 125 mg/L가 생성됨을 보고하였다. 따라서 본 연구 결과를 바탕으로 MSG (66.96-93.51%), gluten (63.76-82.93%), 및 soy-protein (57.05-64.42%)을 기질로써 첨가하였을 시 대부분 균주들은 GABA 전환율이 우수하였으며 특히 MSG와 gluten 첨가 시 GABA 전환율이 우수하므로 향후 GABA 생성을 위한 유산균 배양에서는 MSG나 gluten을 발효기질로 첨가하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

### SPM과 FSPM의 이화학적 특성 및 유리아미노산 함량 비교

선발된 GABA 생성 유산균을 이용하여 발효 두유를 제조한 후 이화학적 특성과 GABA 전환율을 비교한 결과는 Table 2와 Fig 2에 나타내었다. SPM의 경우 pH는 6.49, 산도는 0.32%였으며, GA와 GABA의 함량은 각각 175.59 mg/100 mL 및 27.86 mg/100 mL가 검출되었다. FSMP은 SPM보다 pH는 약간 감소하였으며, 이에 상응하여 산도와 생균수는 증가하였으나, 균주별 차이는 없었다(Table 2). 대조구로 사용한 KCTC3320 균주로 발효시킨 FSPM은 GA가 조금 감소하였고 GABA는 약간 증가하였다(Fig. 2). 특히 BMK484 균주로 발효시킨 FSPM은

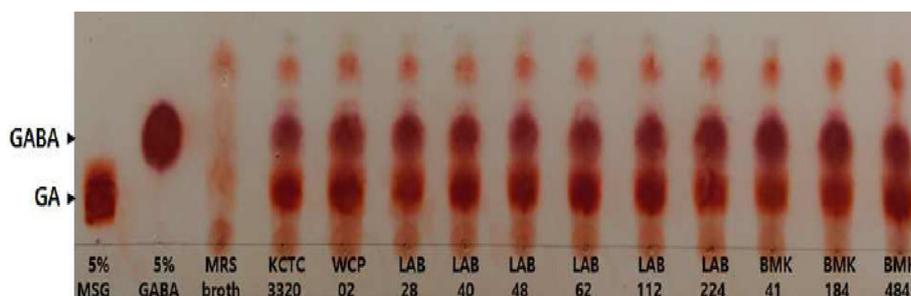


Fig. 1 Thin layer chromatography (TLC) profiles of GA and GABA standards and culture medium of *Lactobacillus brevis*

**Table 1** Comparison of glutamic acid and  $\gamma$ -aminobutyric acid contents and conversion rate on monosodium glutamate, gluten, and soy-protein substrates by the various *Lactobacillus brevis*

Isolates	Contents <sup>a</sup> (mg/100 mL)								
	0.05% MSG			5% Gluten			5% Soy-protein		
	GA	GABA	Conversion rate <sup>b</sup> (%)	GA	GABA	Conversion rate (%)	GA	GABA	Conversion rate (%)
SPM <sup>c</sup>	844.58±42.23 <sup>a</sup>	42.86±2.14 <sup>d</sup>	-	25.73±1.29 <sup>a</sup>	1.12±0.06 <sup>d</sup>	-	250.69±12.53 <sup>c</sup>	27.09±1.35 <sup>d</sup>	-
FSPM <sup>d</sup>									
KCTC3320	66.65±3.33 <sup>f</sup>	581.43±29.07 <sup>b</sup>	89.72	4.08±0.20 <sup>c</sup>	23.58±1.18 <sup>b</sup>	85.25	135.56±6.78 <sup>e</sup>	193.43±9.67 <sup>a</sup>	58.79
WCP02	43.72±2.19 <sup>g</sup>	629.79±31.49 <sup>a</sup>	93.51	4.83±0.24 <sup>c</sup>	23.47±1.17 <sup>b</sup>	82.93	108.89±5.44 <sup>f</sup>	197.19±9.86 <sup>a</sup>	64.42
LAB28	236.62±11.83 <sup>b</sup>	479.56±23.98 <sup>b</sup>	66.96	6.71±0.34 <sup>c</sup>	18.56±0.93 <sup>c</sup>	73.45	115.64±5.78 <sup>f</sup>	169.08±8.45 <sup>b</sup>	59.07
LAB40	97.17±4.86 <sup>e</sup>	586.30±29.32 <sup>b</sup>	85.78	9.07±0.45 <sup>b</sup>	24.01±1.20 <sup>b</sup>	72.58	61.39±3.07 <sup>b</sup>	141.56±7.08 <sup>c</sup>	69.75
LAB48	81.08±4.05 <sup>e</sup>	588.88±29.44 <sup>b</sup>	87.90	8.07±0.40 <sup>b</sup>	24.92±1.25 <sup>b</sup>	75.54	123.18±6.16 <sup>e</sup>	197.65±9.88 <sup>a</sup>	61.61
LAB62	98.73±4.94 <sup>e</sup>	577.21±28.86 <sup>b</sup>	85.39	12.13±0.61 <sup>b</sup>	21.34±1.07 <sup>b</sup>	63.76	142.36±7.12 <sup>e</sup>	189.06±9.45 <sup>a</sup>	57.05
LAB112	107.39±5.37 <sup>d</sup>	609.92±30.50 <sup>b</sup>	85.03	9.17±0.46 <sup>b</sup>	23.68±1.18 <sup>b</sup>	72.09	113.28±5.66 <sup>e</sup>	200.65±10.03 <sup>a</sup>	63.92
LAB224	101.58±5.08 <sup>d</sup>	578.41±28.92 <sup>b</sup>	85.06	10.39±0.52 <sup>b</sup>	18.91±0.95 <sup>b</sup>	64.54	117.54±5.88 <sup>e</sup>	195.98±9.80 <sup>a</sup>	62.51
BMK41	120.97±6.05 <sup>c</sup>	576.27±28.81 <sup>b</sup>	82.65	6.43±0.32 <sup>c</sup>	35.28±1.76 <sup>a</sup>	84.58	88.48±4.42 <sup>g</sup>	174.29±8.71 <sup>b</sup>	66.33
BMK184	131.69±6.58 <sup>c</sup>	558.92±27.95 <sup>c</sup>	80.93	6.78±0.34 <sup>c</sup>	32.11±1.61 <sup>a</sup>	82.56	120.29±6.01 <sup>d</sup>	189.19±9.46 <sup>a</sup>	61.13
BMK484	78.65±3.93 <sup>f</sup>	530.70±26.54 <sup>c</sup>	87.09	5.94±0.30 <sup>c</sup>	24.84±1.24 <sup>b</sup>	80.70	113.78±5.69 <sup>e</sup>	185.29±9.26 <sup>a</sup>	61.96

<sup>a</sup>All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

<sup>b</sup>GABA conversion rate were determined using the following equation: % GABA =  $[GABA \div (GA + GABA)] \times 10$ ; GA, glutamic acid; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid.

<sup>c</sup>SPM: soy-powder milk

<sup>d</sup>FSPM: fermented soy-powder milk

**Table 2** Comparison of physiochemical property and GA, GABA, and ornithine contents on the soy-powder milk (SPM) and fermented SPM with the various *Lactobacillus brevis*

Samples/ Isolates	Index <sup>a</sup>			Contents <sup>a</sup> (mg/100 mL)		
	pH	Acidity (% as lactic acid)	Viable cell numbers (log CFU/mL)	GA	GABA	Ornithine
SPM <sup>b</sup>	6.49±0.32 <sup>a</sup>	0.32±0.02 <sup>b</sup>	7.24±0.36 <sup>b</sup>	175.59±8.78 <sup>a</sup>	27.86±1.39 <sup>c</sup>	3.70±0.19 <sup>a</sup>
FSPM <sup>c</sup>						
KCTC3320	5.56±0.28 <sup>b</sup>	0.45±0.02 <sup>b</sup>	11.24±0.56 <sup>a</sup>	101.52±5.08 <sup>d</sup>	49.11±2.46 <sup>d</sup>	346.49±17.32 <sup>a</sup>
WCP02	5.57±0.28 <sup>b</sup>	0.45±0.02 <sup>b</sup>	11.01±0.55 <sup>a</sup>	119.04±5.95 <sup>g</sup>	65.89±3.29 <sup>d</sup>	331.05±16.55 <sup>a</sup>
LAB28	5.66±0.28 <sup>b</sup>	0.52±0.03 <sup>a</sup>	10.88±0.54 <sup>a</sup>	122.45±6.12 <sup>c</sup>	61.87±3.09 <sup>d</sup>	338.88±16.94 <sup>a</sup>
LAB40	5.61±0.28 <sup>b</sup>	0.54±0.03 <sup>a</sup>	10.78±0.54 <sup>a</sup>	131.10±6.56 <sup>c</sup>	63.97±3.20 <sup>d</sup>	346.30±17.32 <sup>a</sup>
LAB48	5.67±0.28 <sup>b</sup>	0.55±0.03 <sup>a</sup>	10.99±0.55 <sup>a</sup>	131.06±6.55 <sup>c</sup>	61.09±3.05 <sup>d</sup>	372.38±18.62 <sup>a</sup>
LAB62	5.55±0.28 <sup>b</sup>	0.61±0.03 <sup>a</sup>	11.45±0.57 <sup>a</sup>	110.32±5.52 <sup>d</sup>	88.27±4.41 <sup>c</sup>	332.61±16.63 <sup>a</sup>
LAB112	5.64±0.28 <sup>b</sup>	0.58±0.03 <sup>a</sup>	11.09±0.55 <sup>a</sup>	133.04±6.65 <sup>b</sup>	77.39±3.87 <sup>d</sup>	328.28±16.41 <sup>a</sup>
LAB224	5.62±0.28 <sup>b</sup>	0.57±0.03 <sup>a</sup>	10.99±0.55 <sup>a</sup>	87.30±4.37 <sup>e</sup>	87.24±4.36 <sup>c</sup>	313.60±15.68 <sup>a</sup>
BMK41	5.51±0.28 <sup>b</sup>	0.42±0.02 <sup>b</sup>	11.54±0.58 <sup>a</sup>	134.12±6.71 <sup>c</sup>	72.36±3.62 <sup>d</sup>	340.92±17.05 <sup>a</sup>
BMK184	5.48±0.27 <sup>b</sup>	0.48±0.02 <sup>b</sup>	11.44±0.57 <sup>a</sup>	50.70±2.54 <sup>f</sup>	106.24±5.31 <sup>b</sup>	3.97±0.20 <sup>b</sup>
BMK484	5.40±0.27 <sup>b</sup>	0.46±0.02 <sup>b</sup>	10.45±0.52 <sup>a</sup>	47.94±0.90 <sup>g</sup>	111.72±6.59 <sup>a</sup>	3.29±0.16 <sup>b</sup>

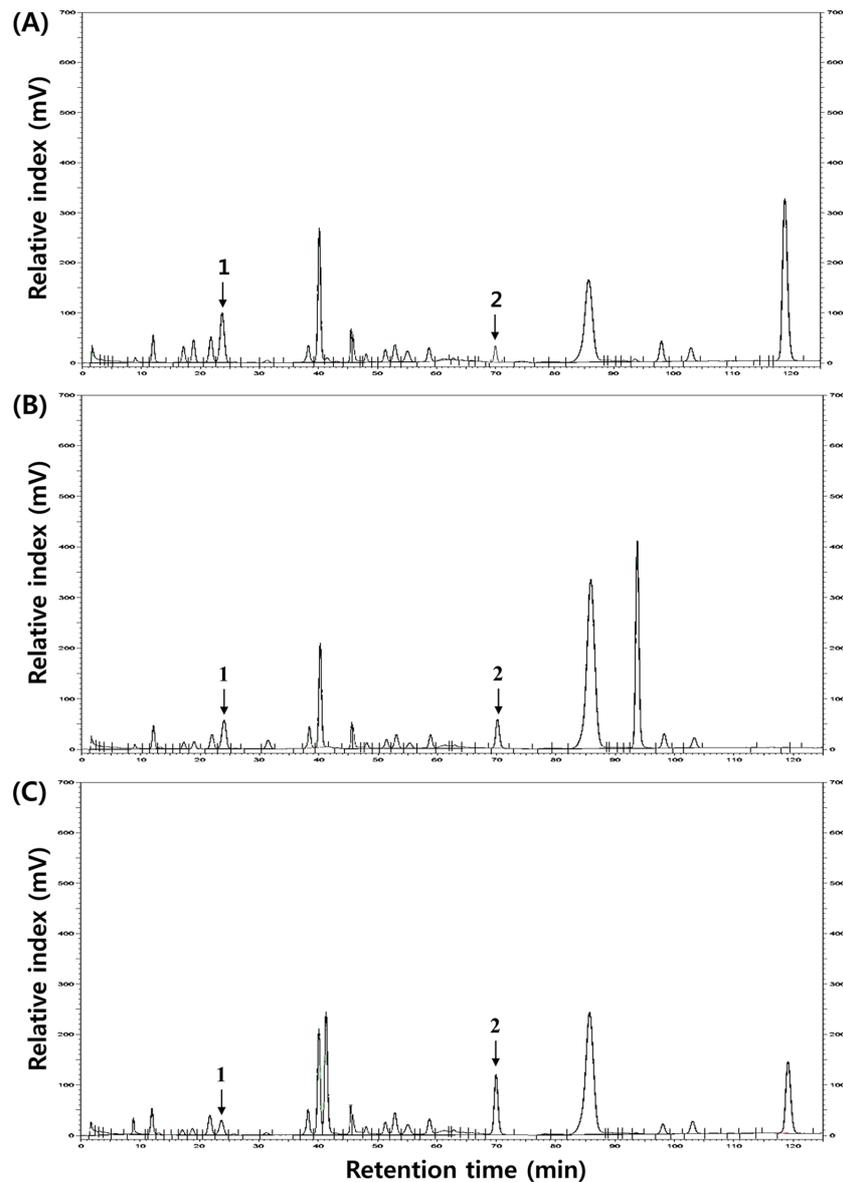
<sup>a</sup>All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

<sup>b</sup>SPM: soy-powder milk

<sup>c</sup>FSPM: fermented soy-powder milk

GA 함량이 47.94 mg/100 mL로 급격히 감소하였고 이에 상응하여 GABA 함량은 111.72 mg/100 mL로 가장 크게 증가하였으며 GABA 전환율은 69.97%로 가장 우수하였다(Table 2). 한편 ornithine은 대부분의 FSPM에서 높은 함량이 검출되었고 특히 LAB48 균주의 FSPM에서는 372.38 mg/100 mL로 가장 많은 함량이 검출되었고 BMK184 (3.97 mg/100 mL) 및 BMK484

(3.29 mg/100 mL)를 제외한 나머지 FSPM들 역시 313.60 mg/100 mL (LAB224) 346.30 mg/100 mL (LAB40) 수준으로 비교적 높은 함량이 검출되었다(Table 2). Taurine은 두유에서는 검출되지 않았으나, FSPM에서 검출되었고 이는 유산균 발효에 의해 생합성 된 것으로 추정하였다. Aspartic acid, serine, alanine의 경우 두유와 비교하였을 시 발효 후에 감소하였고

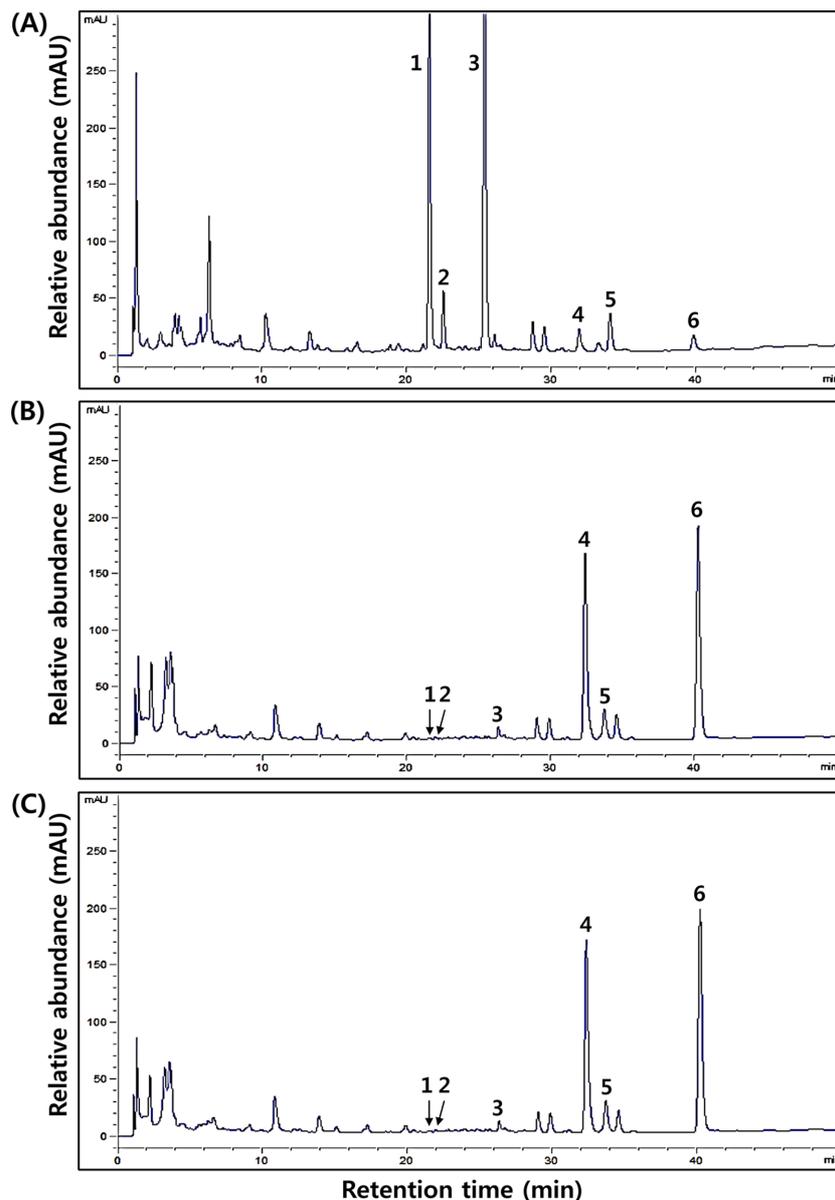


**Fig. 2** Comparison of GA and GABA chromatogram on the soy-powder milk (SPM) and fermented SPM with the various *Lactobacillus brevis*. A; SPM, B; KCTC3320 strain using FSPM, and C; BMK484 strain using FSPM. 1; GA and 2; GABA

LAB48 균주 이용 FSPM에서는 공통적으로 aspartic acid와 serine이 검출되지 않았다. 총 유리미노산 함량은 SPM보다 FSMP에서 낮게 검출됨에 따라 발효 과정 중 생성된 젖산 혹은 아미노산 분해효소에 의해 분해된 것으로 추정되었다 (Supplementary data Table 2S).

여러 식물체 내의 GABA 생합성 경로는 저온 충격, 저산소증, 온도, 탈수현상 및 발아 등과 같은 스트레스 조건에 노출되었을 시 식물체 스스로가 방어하기 위한 물질로서 GABA를 생성하게 된다[31,32]. Park과 Oh [33]의 연구에서는 현미를 발아시킨 후 유산균 발효를 진행한 결과 *L. plantarum* KCTC3103은 30.09 nmol/mL의 GABA를 생성한 반면, *L. brevis* OPY-1은 8,003.29 nmol/mL를 생성하였고 일반적으로 *L. plantarum* 보다는 *L. brevis*의 GABA 생성력이 우수하다고 보고한바 있다.

GABA 생성은 GAD 효소 반응에 의해  $\text{CO}_2$ 가 방출되면서 GA로부터 GABA가 생성되게 된다[34]. 좀더 상세하게는, GABA가 생성되기 위해서는 여러 전구물질들이 필요하며 특히 GAD가 가장 대표적인 필요성분 중 하나이다. 즉, GAD 활성에 의해 결과적으로 GA로부터 GABA가 생성되게 되며 Snedden 등 [35] 및 Oh와 Cha [36]는  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin 단백질이 GAD 활성을 유도시키며 이는 중성의 조건보다 산성일수록 GAD 활성이 촉진됨을 보고하였다. 또한 Kook과 Cho [37]의 연구 결과에서도 마찬가지로 pH 감소에 따라 GAD 활성이 증가하며 이에 따라 GABA가 생성되고 이는 유산균이 생성하는 젖산 농도에 따른 것으로 보고하였다. 한편 Jo 등[38]은 본 연구와 유사한 콩 발효식품인 된장의 GABA 함량을 분석한 결과 숙성 1년 후 43.8 mg/kg이었고 3년 후에는 120.6 mg/kg으로 증가함에



**Fig. 3** Comparison of isoflavone HPLC chromatogram on the soy-powder milk (SPM) and fermented SPM with the various *Lactobacillus brevis*. A; SPM, B; KCTC3320 strain using FSPM, and C; BMK484 strain using FSPM. 1; daidzin, 2; glycitin, 3; genistin, 4; daidzein, 5; glycitein, and 6; genistein

따라 전구물질인 GA는 감소한다고 보고하였다. 이는 발효 후에 GA 함량이 감소하면서 이에 비례적으로 GABA 함량이 증가하는 본 연구 결과와도 일치하였다. 또한 GABA가 함유되어 있는 녹차의 경우 혐기적 조건에서 처리하였을 때 GA는 감소하고 GABA 함량이 현저하게 증가한다고 보고되어있다[39]. 이러한 현상 역시 녹차에 함유된 GA가 GAD에 의해 이산화탄소가 방출되어 GABA가 생성되는 것으로 보고되어있다[38,40,41]. 최근 Hwang 등[22]은 새단백콩의 발아조건에 따라 GABA 전구물질인 GA 함량에 따라 GABA 생성량은 101.6 mg/100 mL로 보고하였다. 따라서 본 연구 결과 역시 FSPM은 유산균이 생성하는 GAD 활성에 의해 최종적으로 GABA는 증가하고 전구체인 GA가 감소되는 것으로 사료된다.

Diana 등[42]의 연구 결과에서는 치즈 숙성 초기 단계에서 ornithine이 유산균의 GAD 효소활성 의해 생성된다고 보고하였으며 본 연구에서 BMK184와 BMK484를 제외하고 8종의 선발 유산균들에서는 많은 양의 ornithine이 검출되어 유산균 발효 중 GAD 활성에 따른 결과로 추정되었다. 한편 GABA가 생성되는 주요 요인은 앞서 기술한 바와 같이 GABA 생성 유산균들의 GAD 효소활성에 반응하여 GABA로 전환된다. Kurata 등[43]은 스트레스가 유도된 mice에게 ornithine을 경구 투여했을 시 항우울증 효과가 있음을 보고하였으며, Sugino 등[44]은 ornithine은 간의 독성 암모니아를 제거한다고 보고하였다. Hwang 등[22]은 새단백콩의 발아와 유산발효에 필수아미노산이 약간 증가한다고 보고하였으나, 본 연구에서는 약간 감소하였다.

**Table 3** Comparison of isoflavone contents on the soy-powder milk (SPM) and fermented SPM with the various *Lactobacillus brevis*

Samples/ Isolates	Isoflavone contents <sup>a</sup> (µg/g d.w.)									
	Glycosides					Aglycones				
	Daidzin	Glycitin	Gentisin	Total	Distribution rate <sup>b</sup> (%)	Daidzein	Glycitein	Genistein	Total	Distribution rate (%)
SPM <sup>c</sup>	485.06±24.25 <sup>a</sup>	198.29±9.91 <sup>a</sup>	607.58±30.38 <sup>a</sup>	1290.93±64.55 <sup>a</sup>	95.61	26.85±1.34 <sup>c</sup>	16.19±0.81 <sup>c</sup>	16.22±0.81 <sup>c</sup>	59.26±2.96 <sup>c</sup>	4.39
FSPM <sup>d</sup>										
KCTC 3320	24.45±1.22 <sup>c</sup>	20.25±1.01 <sup>c</sup>	13.72±0.69 <sup>b</sup>	58.42±2.92 <sup>c</sup>	11.09	227.03±11.35 <sup>a</sup>	56.13±2.81 <sup>b</sup>	185.30±9.27 <sup>b</sup>	468.45±23.42 <sup>a</sup>	88.91
WCP 02	25.06±1.25 <sup>c</sup>	21.23±1.06 <sup>c</sup>	13.20±0.66 <sup>b</sup>	59.49±2.97 <sup>c</sup>	10.88	236.21±11.81 <sup>a</sup>	57.92±2.90 <sup>b</sup>	193.16±9.66 <sup>a</sup>	487.29±24.36 <sup>a</sup>	89.12
LAB 28	24.38±1.22 <sup>c</sup>	20.46±1.02 <sup>c</sup>	10.34±0.52 <sup>b</sup>	55.18±2.76 <sup>c</sup>	12.38	214.65±10.73 <sup>a</sup>	53.16±2.66 <sup>b</sup>	178.03±8.90 <sup>b</sup>	445.84±22.29 <sup>a</sup>	87.62
LAB 40	24.84±1.24 <sup>c</sup>	21.69±1.08 <sup>c</sup>	11.12±0.56 <sup>b</sup>	57.66±2.88 <sup>c</sup>	11.46	214.83±10.74 <sup>a</sup>	52.80±2.64 <sup>b</sup>	177.79±8.89 <sup>b</sup>	445.43±22.27 <sup>a</sup>	88.54
LAB 48	24.12±1.21 <sup>c</sup>	20.77±1.04 <sup>c</sup>	10.44±0.52 <sup>b</sup>	55.33±2.77 <sup>c</sup>	16.15	210.28±10.51 <sup>a</sup>	51.41±2.57 <sup>b</sup>	25.59±1.28 <sup>d</sup>	287.27±14.36 <sup>b</sup>	83.85
LAB 62	24.00±1.20 <sup>c</sup>	21.48±1.07 <sup>c</sup>	10.72±0.55 <sup>b</sup>	56.20±2.81 <sup>c</sup>	11.32	212.27±10.61 <sup>a</sup>	52.27±2.61 <sup>b</sup>	175.82±8.79 <sup>b</sup>	440.36±22.02 <sup>a</sup>	88.68
LAB 112	24.26±1.21 <sup>c</sup>	23.01±1.15 <sup>c</sup>	10.19±0.51 <sup>b</sup>	57.46±2.87 <sup>c</sup>	12.33	195.38±9.77 <sup>b</sup>	49.64±2.48 <sup>b</sup>	163.50±8.18 <sup>b</sup>	408.52±20.43 <sup>a</sup>	87.67
LAB 224	20.33±1.02 <sup>c</sup>	9.57±0.48 <sup>c</sup>	8.83±0.44 <sup>b</sup>	38.73±1.94 <sup>d</sup>	7.82	220.19±11.01 <sup>b</sup>	54.02±2.70 <sup>b</sup>	182.58±9.13 <sup>a</sup>	456.79±22.82 <sup>a</sup>	92.18
BMK 41	95.09±4.75 <sup>b</sup>	70.07±3.50 <sup>b</sup>	12.82±0.64 <sup>b</sup>	177.98±8.90 <sup>b</sup>	29.13	198.27±9.91 <sup>b</sup>	48.13±2.41 <sup>b</sup>	186.69±9.33 <sup>a</sup>	433.08±21.65 <sup>a</sup>	70.87
BMK 184	20.24±1.01 <sup>c</sup>	14.39±0.72 <sup>d</sup>	9.36±0.47 <sup>b</sup>	43.99±2.20 <sup>c</sup>	8.85	218.06±10.90 <sup>a</sup>	54.05±2.70 <sup>b</sup>	180.85±9.04 <sup>a</sup>	452.97±22.65 <sup>a</sup>	91.15
BMK 484	24.04±1.20 <sup>c</sup>	15.93±0.80 <sup>d</sup>	9.99±0.50 <sup>b</sup>	49.97±2.50 <sup>c</sup>	9.05	240.20±12.01 <sup>a</sup>	61.24±3.06 <sup>a</sup>	200.45±10.02 <sup>a</sup>	501.90±25.10 <sup>a</sup>	90.95

<sup>a</sup>All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at  $p < 0.05$  by Duncan's multiple range test

<sup>b</sup>The distribution rates of isoflavone were determined using the following equation: % glycosides = total glycosides / total isoflavones × 100 and % aglycones = total aglycones / total isoflavones × 100

<sup>c</sup>SPM: soy-powder milk

<sup>d</sup>FSPM: fermented soy-powder milk

따라서 이전의 결과를 토대로 본 연구에서는 김치로부터 분리한 10종의 GABA 생성 균주인 *L. brevis*가 생성한 GAD 활성화에 의해 ornithine 혹은 GABA로 전환된 것으로 판단되며, 기질의 사용에 따라 ornithine 혹은 GABA의 생성량이 다른 것으로 판단되었다.

**SPM과 FSPM의 총 페놀릭스 및 이소플라본 함량 비교**

SPM과 FSPM의 총 페놀릭스 함량 비교 결과, SPM은 0.42 mg/g이 검출되었고 FSPM에서 0.64-0.67 mg/g 수준으로 약간 높은 함량이 검출되었다(Supplementary data Fig. 1S).

폴리페놀 화합물은 C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>의 수소 중 하나가 -OH로 치환된 물질을 말하며 -OH를 2개 이상 갖고 있는 물질을 총칭한다. 이러한 구조를 갖는 화합물은 자연계에 많이 존재하며 특히 녹차에 함유되어있는 catechin이 가장 대표적이며 이 외 커피는 chlorogenic acid, 포도나 검정콩 등에는 anthocyanin 형태로 함유되어있다. 폴리페놀 화합물들은 오래 전부터 대표 항산화 물질로 알려져 있으며 열처리, 발효 등의 가공처리에 의해서 수용성 페놀릭스 함량이 증가한 것으로 보고되어 있으며[1], 특히 콩 발효식품인 청국장, 된장뿐만 아니라 두유 요구르트에서 함량이 증가하는 것으로 보고되어 있다[22,23,45]. 따라서 본 연구에서 유산균 발효를 통해 제조된 FSPM은 발효 중 유산균이 생성하는 젖산 또는 β-glucosidase와 같은 효소활성에 의해 SPM에서보다는 총 페놀릭스 함량이 증가된 것으로 추정된다.

SPM과 FSPM 모두에서 공통적으로 이소플라본 화합물 6종류가 검출되었고 SPM의 경우 배당체인 daidzin과 genistin이 주요 화합물로 검출되었으나(Fig. 3A), 대조구로 사용한 KCTC3320 균주와 BMK484 균주를 사용한 FSPM은 비당체인 daidzein과 genistein이 주요 화합물로 검출되었다(Fig. 3B-C). 배당체인 daidzin, glycitin과 genistin 함량은 SPM에서 각각 485.06, 198.29, 및 607.58 μg/g이었고 FSPM에서는 크게 감소하여 평균 30.07, 23.53, 및 10.98 μg/g 수준이었고, 이와 반대로 비당체인 daidzein, glycitein과 genistein 함량은 평균 26.85,

16.19, 및 16.22 μg/g (SPM)에서 217.63, 53.71, 및 168.16 μg/g (FSPM) 수준으로 증가하였다. 즉, SPM에서는 배당체 화합물의 분포도가 4.39%에 불과하였으나, FSPM에서는 비당체 화합물의 분포도가 평균 87.23% 수준으로 크게 증가하였다(Table 3).

콩은 배당체 이소플라본(glycosides, malonyl-acetyl glycosides)을 대부분 함유하고 있으나 화학적 가수분해 처리 또는 여러 종류의 미생물에 의해 발효 과정 중 배당체는 감소하고 비당체가 증가하는 것이 많은 연구를 통해 보고되었다[3]. Hwang 등 [23]은 *L. plantarum* 균주를 사용하여 두유 발효 시 48시간째 배당체 이소플라본은 감소하고 비당체 이소플라본은 약 35% 정도 증가하는 것으로 보고하였고 Donkor와 Shah [46]의 두유 발효에서는 *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* 및 *Bifidobacterium*에 의해 배당체 함량이 감소하고 이에 따라 비당체 함량이 증가함을 보고하였다. 특히 *L. acidophilus* L10 유산균의 경우에는 발효 36시간째 비당체 함량이 약 63% 가량 증가하였고 *B. lactis* B94 및 *L. casei* 균주들은 발효 24시간 및 12시간째 각각 77%와 71% 증가함을 보고하였다[46]. 배당체 이소플라본 함량이 감소하고 비당체 이소플라본 함량이 증가하는 이러한 연구 결과는 본 연구 결과와도 일치하는 경향을 나타내었으나 각각의 이소플라본 함량 차이는 있는 것으로 나타났다. 이러한 차이는 원료 콩의 품종과 재배환경(토양, 광량, 기후 등), 발효 미생물 종류와 미생물이 생성하는 각기 다른 효소와 그 활성도 차이 또는 연구에 사용되는 콩 품종, 발효 환경 등에 따라 여러 양상에 의한 것으로 판단되었다.

**SPM과 FSPM의 라디칼 소거활성 및 소화효소 저해활성 비교**

SPM과 FSPM의 항산화 활성(DPPH, ABTS 및 hydroxyl) 및 소화효소 저해활성(α-glucosidase 및 pancreatic lipase) 결과는 Table 4와 같았고, SPM보다 FSPM의 활성이 높게 나타났다.

DPPH 라디칼 소거활성은 SPM의 경우 47.25% 활성을 보였고 FSPM에서는 활성이 증가하여 57.09-65.19%를 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 전체적으로 DPPH보다는 그 활성이

**Table 4** Comparison of biological relative activity on the soy-powder milk (SPM) and fermented SPM with the various *Lactobacillus brevis*

Samples/ Isolates	Radical scavenging activities <sup>a</sup> (%)			Enzyme inhibitory activities <sup>a</sup> (%)	
	DPPH	ABTS	Hydroxyl	α-Glucosidase	Pancreatic lipase
SPM <sup>b</sup>	47.25±2.36 <sup>b</sup>	53.80±2.69 <sup>b</sup>	25.83±1.29 <sup>b</sup>	6.49±0.32 <sup>b</sup>	15.02±0.75 <sup>d</sup>
FSPM <sup>c</sup>					
KCTC3320	61.32±3.07 <sup>a</sup>	93.07±4.65 <sup>a</sup>	60.23±3.01 <sup>a</sup>	53.04±2.65 <sup>a</sup>	34.81±1.74 <sup>b</sup>
WCP02	63.65±3.18 <sup>a</sup>	98.82±4.94 <sup>a</sup>	62.52±3.13 <sup>a</sup>	55.11±2.76 <sup>a</sup>	41.12±2.06 <sup>a</sup>
LAB28	63.54±3.18 <sup>a</sup>	98.56±4.93 <sup>a</sup>	62.42±3.12 <sup>a</sup>	52.38±2.62 <sup>a</sup>	40.83±2.04 <sup>a</sup>
LAB40	60.58±3.03 <sup>a</sup>	91.24±4.56 <sup>a</sup>	59.50±2.98 <sup>a</sup>	50.87±2.54 <sup>a</sup>	32.81±1.64 <sup>b</sup>
LAB48	58.89±2.94 <sup>b</sup>	87.06±4.35 <sup>a</sup>	57.83±2.89 <sup>a</sup>	53.88±2.69 <sup>a</sup>	28.22±1.41 <sup>c</sup>
LAB62	65.19±3.26 <sup>a</sup>	95.42±4.77 <sup>a</sup>	61.17±3.06 <sup>a</sup>	53.69±2.68 <sup>a</sup>	37.39±1.87 <sup>b</sup>
LAB112	62.06±3.10 <sup>a</sup>	94.90±4.75 <sup>a</sup>	60.96±3.05 <sup>a</sup>	50.31±2.52 <sup>a</sup>	36.82±1.84 <sup>b</sup>
LAB224	58.25±2.91 <sup>b</sup>	85.49±4.27 <sup>a</sup>	57.21±2.86 <sup>a</sup>	49.27±2.46 <sup>a</sup>	26.50±1.33 <sup>c</sup>
BMK41	57.09±2.85 <sup>b</sup>	82.61±4.13 <sup>a</sup>	56.06±2.80 <sup>a</sup>	54.96±2.75 <sup>a</sup>	23.35±1.17 <sup>c</sup>
BMK184	63.49±3.17 <sup>a</sup>	98.43±4.92 <sup>a</sup>	62.36±3.12 <sup>a</sup>	51.25±2.56 <sup>a</sup>	40.69±2.03 <sup>a</sup>
BMK484	60.31±3.02 <sup>a</sup>	88.10±4.41 <sup>a</sup>	61.25±3.06 <sup>a</sup>	52.71±2.64 <sup>a</sup>	39.37±1.97 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>All values are presented as the mean ± SD of triplicate determination. All values within a column with different superscript letters are significantly different from each other at *p* < 0.05 by Duncan's multiple range test

<sup>b</sup>SPM: soy-powder milk

<sup>c</sup>FSPM: fermented soy-powder milk

높게 나타났고 SPM에서는 53.80%의 활성을 나타내었고 FSPM에서는 이 보다 높은 82.61-98.82%의 라디칼 소거활성을 나타내었다. Hydroxyl 라디칼 소거활성 역시 DPPH 및 ABTS와 마찬가지로 전체적인 경향이 유사하였고 SPM에서는 25.83%의 다소 낮은 라디칼 소거활성을 보였으나 FSPM에서는 56.06-62.52%로 활성이 크게 증가하였다(Table 4).

탄수화물 분해효소인  $\alpha$ -glucosidase 저해활성 결과로는 SPM의 경우 6.49%의 아주 낮은 활성을 나타내었으나 FSPM의 경우 대부분 약 50%가 넘는 저해활성을 나타내었다. 지방분해 효소 저해활성인 pancreatic lipase는 SPM의 경우 15.02%를 나타내었고 FSPM은 23.35-41.12%로 활성이 증가하였다(Table 4). 특히 FSPM에서 GABA 생성능이 우수한 BMK484의 경우 라디칼 소거활성과 소화효소 저해활성 역시 우수하였다.

라디칼 소거활성은 폴리페놀과 이소플라본 화합물 함량에 비례적으로 증가하는 것으로 Choi 등[5]과 Cho 등[45]은 보고하였다. 특히 이소플라본 중 비당체 형태인 daidzein과 genistein이 강력한 항산화 물질임을 Tyug 등[47]은 보고하였고 콩의 물 추출액(두유)과 콩 분말 두유를 비교 측정하였을 시 콩 분말 두유의 라디칼 소거활성이 더 우수하다 보고하였다. 또한 Hwang 등[23]은 비지가 제거된 일반 두유보다 콩-분말 두유가 라디칼 소거활성 역시 높은 것으로 보고하였다. 이러한 결과들은 콩 껍질에 생리활성 물질이 더 많이 함유되어있기 때문이며 이는 본 연구 결과와도 유사한 것으로 판단된다. 한편 원료 콩에 비해 콩 발효를 통해 daidzin→daidzein, genistin→genistein으로 화합물의 변화가 일어나는 것은 유산균이 발효 과정 중에 생성하는  $\beta$ -glucosidase 활성에 의한 것임을 Donkor와 Shah [46]는 보고하였고 본 연구 역시 이들의 결과와 일치하였다. 또한 혈당과 지방흡수를 저해시키는데 도움이 될 수 있는 물질은 플라보노이드 화합물인 것으로 Kim 등[48]의 연구 결과에서 보고되었다. 한편 Behloul와 Wu [49] 및 Lee 등[50]의 연구에서는 3T3-L1 지방전구 세포에 daidzein 및 genistein 추출물을 투여하였을 시 혈당과 혈중 지질 농도를 유의적으로 감소시키는 것으로 나타나 이들 화합물들은 항당뇨와 항비만 효능이 있는 것으로 보고하였다. 본 연구 역시 원료 콩이 발효됨에 따라 폴리페놀과 비당체 이소플라본 증가에 따라 항산화 활성 및 항비만 효과가 나타나는 것으로 추정되었다. 따라서 지금까지의 연구결과를 바탕으로 본 연구에서 제조한 FSPM은 GABA와 비당체 이소플라본 함량이 증대되어 우수한 항산화 효과와 함께 SPM에 비해 소화효소 저해활성이 개선되므로 기능성 소재로 발전 가능성이 높을 것으로 기대된다. 또한 현재까지 유산균을 이용한 GABA 생성 연구는 MSG나 GA를 인위적으로 첨가하여 증가시키는 결과들이 대부분 보고되었다. 그러나 본 연구에서는 기질을 첨가하지 않고 콩에 함유되어 있는 천연 기질 성분으로만 GABA를 생성시키는 연구로써 학술적 가치가 우수할 것으로 사료된다.

## 초 록

본 연구는 *Lactobacillus brevis* 균주들을 이용하여 제조된 발효 콩-분말 두유(fermented soy-power milk, FSPM)의 기능성물질 함량(GABA 및 isoflavone)과 항산화 활성 및 소화효소 저해활성을 비교 측정하였다. 김치로부터 가바 생성 유산균 10종을 분

리하였고 16S rRNA 유전 분석 결과 *L. brevis*와 96-99% 상동성을 나타내었다. GABA 전환율은 MSG, 활성 글루텐과 콩 단백질에서 각각 66.96-93.51%, 63.76-84.58%과 57.05-69.75% 있었다. FSPM은 콩-분말 두유(SPM)보다 pH와 GA 함량은 낮았으나, 산도와 GABA 함량은 높았다. BMK484 균주 FSPM의 GABA 전환율은 69.97%로 가장 우수하였다. 한편, SPM은 배당체 이소플라본의 함량(1290.93  $\mu\text{g/g}$ )이 높았으나, FSPM은 배당체 이소플라본의 함량(287.27-501.9  $\mu\text{g/g}$ )이 높았다. BMK484 균주 FSPM의 경우 배당체 이소플라본인 daidzein, glycitein과 genistein 함량이 각각 240.2, 61.24과 200.45  $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았다. BMK484 균주 FSPM의 DPPH, ABTS와 hydroxyl 라디칼 소거활성 및  $\alpha$ -glucosidase와 pancreatic lipase 저해활성은 각 60.31, 88.10와 61.25 및 52.71와 39.37%로 비교적 우수하였다. 따라서 본 연구의 *L. brevis*들은 발효 콩-분말 두유에서 GABA 및 배당체 이소플라본을 동시에 강화할 수 있는 소재로서 사용될 수 있다.

**Keywords** 가바 · 발효 콩-분말 두유 · 이소플라본 · 항산화 활성 · *Lactobacillus brevis*

**감사의 글** 이 논문은 2016년도 교육부의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(과제번호: 2016R1D1A1B01009898)의 지원과 2017년도 산림청의 재원으로 한국임업진흥원의 산림생명자원 소재발굴연구사업(과제번호: 2017023A00-1720-BA01)의 지원에 의해 이루어진 결과입니다.

## References

- Kim JS (1996) Current research trends on bioactive function of soybean. Korea Soybean Digest 13: 17–24
- Lee CH, Youn Y, Song GS, Kim YS (2011) Immunostimulatory effects of traditional Doenjang. J Korean Soc Food Sci Nutr 40(9): 1227–1234
- Zhao DP, Shah N (2014) Changes in antioxidant capacity, isoflavone profile, phenolic and vitamin contents in soymilk during extended fermentation. LWT-Food Sci Technol 58: 454–462
- Cho KM, Lee JH, Yun HD, Ahn BY, Kim H, Seo WT (2011) Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavonols and phenolic acids) during *Cheonggukjang* soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. J Food Comp Anal 24: 402–410
- Choi YB, Woo JG, Noh WS (1999) Hydrolysis of  $\beta$ -glycosides bonds of isoflavone conjugates in the lactic acid fermentation of soy milk. Korean J Food Sci Technol 31: 189–195
- Mann SY, Kim EA, Lee GY, Kim RU, Hwang DY, Son HJ, Kim DS (2013) Isolation and identification of GABA-producing microorganism from *Cheungkookjang*. J Life Sci 23: 102–109
- Mody I, Dekoninck Y, Otis TS, Soltesz I (1994) Bringing the cleft at GABA synapses in the brain. Trends Neurosci 17: 517–525
- Lim SD, Yoo SH, Yang HD, Kim SK, Park SY (2009) GABA productivity in yogurt fermented by freeze dried culture preparations of *Lactobacillus acidophilus* RMK567. Korean J Food Sci Ani Resour 29: 437–444
- Sawai Y, Konomi K, Odaka Y, Yoshitomi H, Yamaguchi Y, Miyama D, Takeuchi A (1999) Repeating treatment of anaerobic and aerobic incubation increases the amount of  $\alpha$ -aminobutyric acid in tea shoots. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 46: 462–466
- Kum JS, Choi BK, Lee HY, Park JD (2004) Physicochemical properties of germinated brown rice. Korean J Food Preserv 11: 182–188
- An MK, Ahn JB, Lee SH, Lee KG (2010) Analysis of  $\gamma$ -aminobutyric acid content in germinated pigmented rice. Food Sci Tech 42: 632–636

12. Pyo YH (2008) Effect of monascus-fermentation on the content of GABA and free amino acids in soybean. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 47: 1208–1213
13. Jeo G, Lee MY, Yoon JY, Jang S, Jung M, Jeong HS, Lee J (2010) Effects of heat treatment and selected medicinal plant extracts on GABA content after germination. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 154–158
14. Katagiri M, Shimizu S (1989)  $\alpha$ -aminobutyric acid accumulation in bean sprouts (soybean, black gram, green gram) treated with carbon dioxide. *Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi* 36: 916–919
15. Lim AD, Kim KS (2009) Effects and utilization of GABA. *Korean J Dairy Sci Technol* 27: 45–51
16. Bouche N, Fromm H (2004) GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Sci* 9: 111–115
17. Huang X, Cai W, Xu B (2014) Kinetic changes of nutrients and antioxidant capacities of germinated soybean (*Glycine max.* L) and mung bean (*Vigna radiata* L.) with germination time. *Food Chem* 143: 268–276
18. Lin PY, Lai HM (2006) Bioactive compounds in legumes and their germinated products. *J Agric Food Chem* 54: 3807–3814
19. Devi MKA, Gondi M, Sakthivelu G, Giridhar P, Rajasekarn, T, Ravishankar GA (2009) Functional attributes of soybean seeds and products, with reference to isoflavone content and antioxidant activity. *Food Chem* 114: 771–776
20. Oh SH (2006) GABA production and development of functional food products with enhanced levels of GABA using lactic acid bacteria from kimchi. *Food Indus* 24: 74–80
21. Park KB, Oh SH (2007) Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresource Technol* 98: 312–319
22. Hwang CE, Haque MA, Lee JH, Joo OS, Kim SC, Lee HY, Um BS, Park KS, Cho KM (2018) Comparison of  $\gamma$ -aminobutyric acid and isoflavone aglycone contents, to radical scavenging activities of high-protein soybean sprouting by lactic acid fermentation with *Lactobacillus brevis*. *Korean J Food Preserv* 25(1): 7–18
23. Hwang CE, An MJ, Lee HY, Lee BW, Kim HT, Ko JM, Baek IY, Seo WT, Cho KM (2014) Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* P1201 to produce soy-yogurt with enhanced antioxidant activity. *Korean J Food Sci Technol* 46(5): 556–565
24. Hwang CE, Joo OS, Lee JH, Song YH, Hwang IG, Cho KM (2017) Changes of physicochemical and biological activity during the fermentation of *Doenjang* with bitter melon (*Momordica charantia* L.) *Korean Soc Food Preserv* 24(1): 134–144
25. Cho KM, Hwang CE, Kim SC, Joo OS (2018) Physicochemical properties, phytochemicals, and biological activities of heat-treated *Elaeagnus multiflora* juice and vinegar. *Korean J Food Preserv* 25(1): 52–61
26. Cagno RD, Mazzacane F, Rizzello CG, Angelis MD, Giuliani G, Meloni M, Servi BD, Gobetti M (2010) Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 731–741
27. Kim JY, Lee MY, Ji GE, Lee YS, Hwang KT (2009) Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100. *Int J Food Microbiol* 130: 12–16
28. Kook MC, Seo MJ, Cheigh CI, Pyun YR, Cho SC, Park H (2010) Enhanced production of  $\gamma$ -aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *J Microbiol Biotechnol* 20: 763–766
29. Tung YT, Lee BH, Liu CF, Pan TM (2011) Optimization of culture condition for acei and GABA production by lactic acid bacteria. *J Food Sci* 76(9): 585–591
30. Stragusa S, Angelis DM, Cagno DR, Rizzello CG, Coda R, Gobetti M (2007) Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria isolated from Italian cheese varieties. *Appl Environ Microbiol* 73: 7283–7290
31. Brown AW, Shelp BJ (1997) The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). *Plant Physiol* 115: 1–5
32. Crawford LA, Brown AW, Breikreuze, KE, Guinel FC (1994) The synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol* 104: 865–871
33. Park KB, Oh SH (2005) Production and characterization of GABA rice yogurt. *Food Sci Biotechnol* 14: 518–522
34. Barry JS, Robert TM, Jeffrey CW (2012) Compartmentation of GABA metabolism raises intriguing questions. *Cell Press* 17: 57–59
35. Snedden WA, Arazi T, Fromm H, Shelp BJ (1995) Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiol* 108: 543–549
36. Oh SH, Cha YS (2000) Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid production in tobacco plants by expressing a mutant calmodulin gene. *Agric Biochem Biotech* 42: 69–73
37. Kook MC, Cho SC (2013) Production of GABA (gamma amino butyric acid) by lactic acid bacteria. *Korean J Food Sci An* 33: 377–389
38. Jo SJ, Hong CO, Yang SY, Choi KK, Kim HK, Yang H, Lee KW (2011) Changes in contents of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and isoflavones in traditional Korean *Doenjang* by ripening periods. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40(4): 557–564
39. Chang JS, Lee BS, Kim YG (1992) Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves. *Korean J Food Sci Technol* 24: 315–319
40. Mayer R, Cherry J, Rhodes D (1990) Effects of heat shock on amino acid metabolism of cowpea cells. *Plant Physiol* 94: 796–810
41. Toshinobu M, Tojiro T (1987) Conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions. *Agric Biol Chem* 51: 2865–2871
42. Diana, M, Rafecas M, Arco C, Quilez J (2014) Free amino acid profiles of spanish artisanal cheeses: Importance of gamma-aminobutyric acid (GABA) and ornithine content. *J Food Comp Anal* 35: 94–100
43. Kurata K, Nagasawa M, Tomonaga S, Aoki M, Morishita K, Denbow DM, Furuse M (2011) Orally administered L-ornithine elevates brain L-ornithine levels and has an anxiolytic-like effect in mice. *Nutr Neurosci* 14: 243–248
44. Sugino T, Shirai T, Kajimoto Y, Kajimoto O (2008) L-ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism. *Nutr Res* 28: 738–743
45. Cho KM, Hong SY, Math RK, Lee JH, Kambiranda DM, Kim JM, Islam SMA, Yun MG, Cho JJ, Lim WJ, Yun HD (2009) Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. *Food Chem* 114: 413–419
46. Donkor ON, Shah NP (2008) Production of  $\alpha$ -glucosidase and hydrolysis of isoflavone phytoestrogens by *Lactobacillus acidophilus*, *bifidobacterium lactis*, and *Lactobacillus casei* in soymilk. *Food Microbiol Safet* 73: 15–20
47. Tyug TS, Prasad NK, Ismail A (2010) Antioxidant capacity, phenolics and isoflavones in soybean by-products. *Food Chem* 123: 583–589
48. Kim JE, Joo SJ, Seo JH, Lee SP (2009) Antioxidant and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of tartary buckwheat extract obtained by the treatment of different solvent and enzymes. *Korean J Soc Food Sci Nutr* 38: 989–995
49. Behloul N, Wu G (2013) Genistein: a promising therapeutic agent for obesity and diabetes treatment. *Eur J Pharmacol* 698: 31–38
50. Lee BH, Lo YH, Pan TM (2013) Anti-obesity activity of *Lactobacillus* fermented soy milk products. *J Funct Foods* 5: 905–913