(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0044161
(43) 공개일자 2014년04월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12P 13/14* (2006.01) *C12P 7/52* (2006.01)
*C12N 1/20* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0110196
(22) 출원일자 2012년10월04일
심사청구일자 2012년10월04일

(71) 출원인
**계명대학교 산학협력단**
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
**이삼빈**
대구 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
**김정석**
대구 달서구 월곡로27길 97, (상인동)
**김지은**
대구 달서구 대명천로12안길 40, 1동 302호 (성당동, 대영하이츠)
(74) 대리인
**특허법인태백**

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **고초균과 젖산균을 이용한 이단발효를 통한 γ-ＰＧＡ와 ＧＡＢＡ가 증진된 발효물 제조방법**

## (57) 요 약

본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단 발효를 통해 γ-PGA와 GABA가 생산된 기능성 발효물을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하는 단계; 상기 고초균 스타터를 살균된 제한배지에 접종하고 배양하는 1차 발효 단계; 2차 발효를 위한 젖산균 스타터를 준비하는 단계; 및 상기 젖산균 스타터를 상기 1차 발효 단계 발효물에 접종하고 배양하는 2차 발효 단계를 포함하는 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; γ-PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 발효물 제조방법에 관한 것이다. 또한 상기의 방법에 의해 제조된 기능성 발효물은 식품 및 기능성 식품, 화장품, 사료 소재로 이용할 수 있다.

*대 표 도* - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 2011-0723 |
| 부처명 | 농림수산식품부 |
| 연구사업명 | 고부가 식품산업 전문인력 양성사업 |
| 연구과제명 | 전통식품의 현대적 제조공정 및 기능성 향상 공정조합 기술 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 주관기관 | 계명대학교 산학협력단 |
| 연구기간 | 2011.07.01 ~ 2012.12.31 |

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하는 단계;

상기 고초균 스타터를 살균된 제한배지에 접종하고 배양하는 1차 발효 단계;

2차 발효를 위한 젖산균 스타터를 준비하는 단계; 및

상기 젖산균 스타터를 상기 1차 발효 단계 발효물에 접종하고 배양하는 2차 발효 단계를 포함하는 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; γ-PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 발효물 제조방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)인 것을 특징으로 하는 γ-PGA와 GABA가 증진된 발효물 제조방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 젖산균은 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 중의 어느 하나인 것을 특징으로 하는 γ-PGA와 GABA가 증진된 발효물 제조방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 1차 발효 단계는 37 내지 42℃에서, 24 내지 72시간 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 γ-PGA와 GABA가 증진된 발효물 제조방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 2차 발효 단계는 25 내지 30℃에서, 24 내지 120시간 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 γ-PGA와 GABA가 증진된 발효물 제조방법.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 제조된 γ-PGA와 GABA가 증진된 발효물.

## 명 세 서

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단발효를 통해 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; γ-PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 액상 발효물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단발효법을 통해 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; γ-PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)를 동시에 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고초균(*Bacillus subtilis*)를 이용한 1단 발효를 수행한 후 젖산균(*Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactococcus lactis*)과의 혼합 발효 형태인 2단 발효를 수행함으로써 풍미가 우수하고 점질물, GABA, 혈전용해효소 등을 포함하는 기능성 발효물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0003] γ-PGA는 글루탐산 단량체(monomer glutamic acid)의 α-아미노기와 γ-카르복실기 사이의 아미드 결합(amide linkage)에 의해 결합된 동종중합체(homopolymer)이며, 발효 산물(fermentation product)로서 고초균(*Bacillus subtilis*)에 의해 배지 내로 분비된다는 사실이 밝혀졌다. 일본의 전통발효식품인 낫토(natto)의 점액성 물질이

고초균(*Bacillus*)에 의해 생산되는 대표적인 ɣ-PGA로서 바실러스 낫토 사와무라(*Bacillus natto Sawamura*)에 의해 생산되었다는 보고가 있다. 최근 수년간의 연구 결과 우리나라 전통발효 식품인 청국장에서도 ɣ-PGA를 생산하는 고초균(Bacillus sp.)이 분리된 후 활발하게 연구 중이며, 특히 청국장에서 분리된 균주에 의해 생산되는 ɣ-PGA는 낫토(natto)에서 분리된 균주에 의해 생산되는 ɣ-PGA보다 높은 생산성과 큰 분자량을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 일반적으로 ɣ-PGA는 수용성, 음이온성, 무독성, 생분해성, 생체적합성, 식용 등의 다양한 특성을 가지고 있기 때문에 다양한 분야에서 응용되고 있다.

[0004] 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)은 억제성 신경전달물질로서 혈압상승을 억제하고 시력증진에 효과가 있으며 불안감, 초조감 등을 진정시키는 작용을 하는 것으로 알려진 물질이다. 동물의 경우 뇌, 심장, 폐, 신장 등에 분포되어 있으며, 식물의 경우 발아현미, 녹차 등에서 주로 발견되고 있다. 스트레스에 시달리는 현대인이나 수험생, 알코올 과다 섭취자의 경우 뇌와 혈중 GABA 농도가 낮은 것으로 보고되어 있으며, 체내 GABA 농도의 극심한 부족은 발작, 경련, 간질 증세를 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0005] 이러한 GABA의 기능성이 알려지면서 의약품으로서 뿐만 아니라 기능성 식품 소재로서 관심이 높아지고 있다. 현재 GABA는 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 약간 함유되어 있으나, 그 함량이 낮아 자연 식품으로 섭취하는 양으로는 생리활성을 기대하기 어렵다. 식물을 원재료로 한 GABA의 생산에는 한계가 있으므로 GABA 대량생산을 위해 미생물을 이용한 많은 연구가 수행되고 있다. 이중 젖산균은 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물의 한 종류로서 예로부터 발효 유제품을 중심으로 장류, 김치, 젓갈, 소시지, 의약품 등에 걸쳐 인류생활에 폭넓게 활용되어 내려오고 있다. 젖산균을 스타터(starter)로 하여 만들어진 치즈와 젖산균 발효유에서 GABA가 생산되고 있으며, GABA를 생산하는 젖산균으로는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)등이 보고되고 있다.

[0006] 따라서, 본 발명자들은 제한 배지에 고초균(*Bacillus subtilis*)을 접종하여 ɣ-PGA를 생산하는 1차 발효단계와 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*)를 접종하여 발효하는 2차 발효 단계를 거쳐 ɣ-PGA와 GABA가 함유된 기능성 발효물을 제조하여 본 발명을 완성하였다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0007] 본 발명의 목적은 제한 배지에서 고초균과 젖산균을 이용하여 2단 발효를 하여 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; ɣ-PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 함유된 기능성 발효물을 제조하는데 의의가 있다.

### *과제의 해결 수단*

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하는 단계; 상기 고초균 스타터를 살균된 제한배지에 접종하고 배양하는 1차 발효 단계; 2차 발효를 위한 젖산균 스타터를 준비하는 단계; 및 상기 젖산균 스타터를 상기 1차 발효 단계 발효물에 접종하고 배양하는 2차 발효 단계를 포함하는 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; ɣ-PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 발효물 제조방법을 제공한다.

[0009] 상세하게는, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)이고, 상기 젖산균은 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 또는 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 중의 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

[0010] 상세하게는, 상기 1차 발효 단계는 37 내지 42℃에서, 24 내지 72시간 동안 발효하는 것이고, 상기 2차 발효 단계는 25 내지 30℃에서, 24 내지 120시간 동안 발효하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명에 있어서, "스타터(starter)"란 발효물을 제조하는 경우에 사용하는 미생물 배양액을 말한다. 따라서 스타터 미생물의 종류는 그 제품의 특성을 결정하게 되며 제품의 품질에 중요한 영향을 미친다. 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등을 들 수 있으며, 이것을 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.

[0012] 또한 본 발명은 상기의 방법에 의해 제조된 ɣ-PGA와 GABA가 증진된 발효물을 제공한다.

## 발명의 효과

[0013] 본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단발효법을 통해 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; ɣ-PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)를 동시에 생산하는 방법에 관한 것으로, 혼합발효 형태인 2단 발효를 수행함으로써 풍미가 우수하고 점질물, GABA, 혈전용해효소 등을 포함하는 기능성 발효물을 제조함으로써, 이를 활용하여 기능성 음료 및 식품 개발의 가능성을 높일 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 ɣ-PGA와 GABA가 함유된 기능성 발효물을 제조하기 위한 발효 공정도를 나타낸다.

도 2는 락토바실러스 헬베티커스 RMK85(*Lactobacillus helveticus* RMK85)를 이용한 2차 발효를 통해 생성된 GABA를 TLC로 확인한 결과이다.

도 3은 락토바실러스 플란타룸 K154(*Lactobacillus plantarum* K154)를 이용한 2차 발효를 통해 생성된 GABA를 TLC로 확인한 결과이다.

도 4는 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)를 이용한 2차 발효를 통해 생성된 GABA를 TLC로 확인한 결과이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0016] **< 실시예 1 > 스타터 배양 및 제한배지**

[0017] 1. 스타터 배양 방법

[0018] 청국장에서 분리한 고초균인 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)는 락토바실러스 MRS 고체 배지(*Lactobacilli* MRS agar; Difco co., Ltd.)에서 42℃ 항온기를 이용하여 활성화시킨 후, 한 콜로니를 따서 121℃에서 15분 동안 멸균 된 5% 콩분말용액에 접종한 후 42℃ 항온기에서 24시간 150 rpm에서 진탕 배양시켜 스타터 종균으로 사용하였다.

[0019] 김치에서 분리한 젖산균인 락토바실러스 헬베티커스 RMK85(*Lactobaiilus helveticus* RMK85), 락토바실러스 플란타룸 K154(*Lactobaiilus plantarum* K154)와 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)는 단일 콜로니(colony)가 나타나게 배양한 후, MRS 배지(broth)에 접종한 후 30℃에서 24시간 동안 배양하여 스타터 종균으로 사용하였다.

[0020] 2. 제한배지 조성

[0021] 본 발명의 이단발효법에 사용된 제한배지의 조성은 아래 표 1과 같다.

*표 1*

[0022]

| 조성 | 중량(%) |
|---|---|
| $Na_2HPO_4$ | 0.1 |
| $KH_2PO_4$ | 0.1 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 0.5 |

| | |
|---|---|
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.05 |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.04 |
| Biotin | 0.01 |
| Glucose | 3 |
| Glutamate | 3 |

[0023] 3. γ-PGA 분자량 및 함량 측정방법

[0024] 건조한 점질물을 0.1 M $Na_2SO_4$/0.05 M $NaN_3$[빙초산(glycial acetic acid)으로 pH를 4로 조정] 용액에 1% 되게 녹인 다음, 원심분리 후 상층액 만을 0.45 ㎛ 실린지 필터(syringe filter)로 여과하여 젤 투과 크로마토그래피(Gel Permeation Chromatography; GPC)로 분석하였다. 분석조건은 검출기로 RI를 이용하였으며, GPC column은 Shodex SB 805 HQ(Japan)를 이용하여 이동상을 0.1 M $Na_2SO_4$/0.05 M $NaN_3$([빙초산(glycial acetic acid)으로 pH를 4로 조정]로 유속은 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었다. 표준 곡선은 각기 다른 분자량(130, 400, 770, 1200 kDa)을 가진 덱스트란(dextran) (American Polymer Corporation, USA)을 이용하여 작성하여 분자량을 측정하였다. γ-PGA의 함량은 정제한 γ-PGA를 표준물질로 사용하여 GPC 분석을 실시하고 생성된 peak area를 이용하여 계산하였다. 표 2는 1차 발효 후, 발효물에서의 γ-PGA 함량, 균체량 및 γ-PGA 분자량을 나타낸다. 표 2의 γ-PGA 함량은 2차 발효 후에도 유지된다.

*표 2*

[0025] 1차 발효물에서의 γ-PGA 함량

| | |
|---|---|
| γ-PGA 함량 (g/L) | 22.5 |
| 균체량 (g/L) | 4.1 |
| γ-PGA 분자량 (kDa) | 1,220 |

[0026] 4. TLC 측정방법

[0027] 샘플에 생성된 GABA 함량은 TLC(Silica gel 60 F254, Merck)로 확인하였다. 배양액에 2배 볼륨에 해당하는 이소프로필 알코올(isopropyl alchol)을 첨가하여 점질물을 제거한 후 상등액을 TLC plate에 2uL 점적하였다. 분석 시 전개용매로는 아세트산(acetic acid): n-부틸 알콜(n-butyl alcohol): 증류수(distilled water) (2:6:2, v/v/v)의 비율로 조제하여 4시간 이상 포화시킨 용매를 사용하였고, 발색 시약으로 0.2% 닌하이드린 용액(ninhydrin solution)을 분무하여 95℃에서 5분간 발색시켜 스팟(spot)을 확인하였다.

[0028] 5. HPLC를 이용한 GABA 및 유리아미노산 정량방법

[0029] 샘플에 생성된 GABA 및 유리아미노산 함량을 정량하기 위해 HPLC를 이용하였다. 시료 30 uL를 완전히 건조하여 페닐 이소티오시아네이트(phenyl isothiocyanate; PITC)로 유도체화시킨다. 컬럼은 Waters Nova-Pak C18을 사용하였고 HPLC pump는 HP 1100 series를 이용하였다. 이동상으로 140 mM의 NaHAc, 0.1% TEA, 6% $CH_3CN$ (pH 6.1)을 A용매로 60% $CH_3CN$를 B용매로 UV 254 nm에서 30분 동안 분석하였다(표 3).

*표 3*

[0030]

| 시간 | %B | 유량(ml/min) |
|---|---|---|
| 0 | 0 | 1 |
| 12 | 8 | 1 |
| 13 | 12 | 1 |
| 15.2 | 20 | 1 |
| 22.5 | 46 | 1 |
| 22.72 | 100 | 1.5 |

| | | |
|---|---|---|
| 23.2 | 100 | 1.5 |
| 25 | 100 | 1.5 |
| 25.7 | 100 | 1.5 |
| 26 | 0 | 1.5 |
| 29 | 0 | 1.5 |
| 30 | 0 | 1 |

[0031] **< 실시예 2 > 락토바실러스 헬베티커스 RMK85(*Lactobaiilus helveticus* RMK85)를 이용한 2차 발효물의 GABA 생성능 확인**

[0032] 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)를 배지 용량의 5% 첨가하여 72시간 발효하였을 때 pH는 6.5로 증가하고 γ-PGA가 함유된 점질물의 함량이 8.36%까지 증가하였다. 또한 발효물의 점성이 증가하여 점도가 8.62 $Pa \cdot s^n$으로 나타났으며 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)의 생균수가 $6.8\times10^8$ CFU/m로 나타나 1차 발효인 고초균 발효가 잘 이루어졌고, 특히 γ-PGA를 포함한 다당류가 다량 생성된 점성이 높은 발효물이 생성되었다. 1차 발효물이 완성된 삼각플라스크에 1차 발효물 용량의 5%의 락토바실러스 헬베티커스 RMK85(*Lactobaiilus helveticus* RMK85)를 첨가하고 30℃에서 24~120 시간 동안 발효하였다. 락토바실러스 헬베티커스 RMK85(*Lactobaiilus helveticus* RMK85)는 김치에서 분리된 젖산균으로 GABA 생성능이 우수한 균주로 발효가 진행되면 1차 발효물에 비해 pH가 낮아지고 산도는 증가하는 경향을 보였다. 젖산 발효에 의한 pH 감소로 발효물의 점성이 감소하여 점질물 함량은 감소하나 생균수는 $1\sim2\times10^9$ CFU/mL로 발효는 적절히 이루어졌다. GABA 함량이 발효 시간이 길어질수록 증가하고 72시간 이후에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 3가지의 젖산균 중에 GABA 생산이 가장 우수한 것으로 나타났다.

*표 4*

[0033]

| | | pH | 총산도 (%) | 점질물 함량 (%) | 점조도 ($Pa \cdot s^n$) | *Lactobacillus helveticus* RMK85 생균수 (CFU/mL) | *B. subtilis* 생균수 (CFU/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1차 발효물 | | 6.50 | - | 8.36 | 8.62 | - | $6.8\times10^6$ |
| 2차 발효물 | 24 시간 | 4.43 | 1.12 | 1.94 | 0.52 | $1.68\times10^8$ | $5.0\times10^6$ |
| | 48 시간 | 4.47 | 1.02 | 2.41 | 0.30 | $2.10\times10^9$ | $5.0\times10^6$ |
| | 72 시간 | 4.60 | 0.87 | 1.87 | 0.04 | $1.86\times10^9$ | - |
| | 96 시간 | 4.46 | 0.87 | 1.98 | 0.02 | $1.55\times10^9$ | - |
| | 120 시간 | 4.68 | 0.79 | 1.64 | 0.02 | $2.08\times10^9$ | - |

[0034] **< 실시예 3 > 락토바실러스 플란타룸 K154(*Lactobaiilus plantarum* K154)를 이용한 2차 발효물의 GABA 생성능 확인**

[0035] 1차 발효물은 실시예 2와 동일한 조건으로 제조된 발효물을 사용하였다. 락토바실러스 플란타룸 K154(*Lactobaiilus plantarum* K154)는 김치에서 분리된 젖산균으로 GABA 생성능이 우수한 균주로 발효가 진행되면 1차 발효물에 비해 pH가 낮아지고 산도는 증가하는 경향을 보였다. 젖산 발효에 의한 pH 감소로 발효물의 점성이 감소하여 점질물 함량은 감소하나 생균수는 $1\sim2\times10^9$ CFU/mL로 발효는 적절히 이루어졌다. GABA 함량이 발효 시간이 길어질수록 증가하나 48시간 이후에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났고 락토바실러스 헬베티커스 RMK85(*Lactobaiilus helveticus* RMK85) 보다는 GABA 생산량은 작은 것으로 나타났다.

표 5

[0036]

| | | pH | 총산도 (%) | 점질물 함량 (%) | 점조도 ($Pa \cdot s^n$) | *Lactobacillus plantarum* K154 생균수 (CFU/mL) | *B. subtilis* 생균수 (CFU/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1차 발효물 | | 6.50 | - | 8.36 | 8.62 | - | $6.8\times10^6$ |
| 2차 발효물 | 24 시간 | 4.48 | 0.82 | 2.46 | 0.47 | $1.74\times10^9$ | $5.0\times10^6$ |
| | 48 시간 | 4.43 | 0.87 | 2.34 | 0.25 | $1.95\times10^9$ | $1.0\times10^6$ |
| | 72 시간 | 4.55 | 0.72 | 1.87 | 0.17 | $2.45\times10^9$ | $1.0\times10^6$ |
| | 96 시간 | 4.75 | 0.62 | 1.93 | 0.02 | $2.10\times10^9$ | - |
| | 120 시간 | 4.82 | 0.52 | 1.64 | 0.08 | $1.95\times10^9$ | - |

[0037] **< 실시예 4 > 락토코서스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)를 이용한 2차 발효물의 GABA 생성능 확인**

[0038] 1차 발효물은 실시예 2와 동일한 조건으로 제조된 발효물을 사용하였다. 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)는 김치에서 분리된 젖산균으로 GABA생성능이 우수한 균주로 발효가 진행되면 1차 발효물에 비해 pH가 낮아지고 산도는 증가하는 경향을 보였으나 앞은 두가지 젖산균 보다는 산도가 낮았다. 젖산 발효에 의한 pH 감소로 발효물의 점성이 감소하여 점질물 함량은 감소하나 생균수는 발효 48시간까지는 $2\times10^8$ CFU/mL을 유지하고 이 후에는 $1\times10^7$ CFU/mL로 생균수가 감소되는 경향을 보였다. GABA 함량은 발효 시간이 길어질수록 증가하나 72시간 이후에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

표 6

[0039]

| | | pH | 총산도 (%) | 점질물 함량 (%) | 점조도 ($Pa \cdot s^n$) | *Lactococcus. lactis* YC 생균수 (CFU/mL) | *B. subtilis* 생균수 (CFU/mL) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1차 발효물 | | 6.50 | - | 8.36 | 8.62 | - | $5.0\times10^6$ |
| 2차 발효물 | 24 시간 | 4.45 | 0.85 | 1.85 | 0.37 | $8.45\times10^8$ | $5.0\times10^6$ |
| | 48 시간 | 4.41 | 0.94 | 1.52 | 0.22 | $2.65\times10^8$ | - |
| | 72 시간 | 4.69 | 0.70 | 1.20 | 0.13 | $8.00\times10^7$ | - |
| | 96 시간 | 4.86 | 0.58 | 0.98 | 0.02 | $1.50\times10^7$ | - |

[0040] **< 실시예 5 > HPLC를 이용한 혼합 발효물의 GABA 및 유리아미노산 함량 확인**

표 7

[0041]

| | 1차 발효물 (*Bacillus subtilis* HA) | 2차 발효물 (*Lactobacillus plantarum* K154) |
|---|---|---|
| GLU (ug/mL) | 12,925.21 | 4,054.01 |
| GABA (ug/mL) | - | 8,588.51 |
| TOTAL | 12,925.21 | 12,642.52 |

[0042] 1차 발효물에서는 제한 배지 제조 시 첨가한 글루타민산(GLU, 3%)의 약 57%가 γ-PGA 생산에 이용되어 12.925

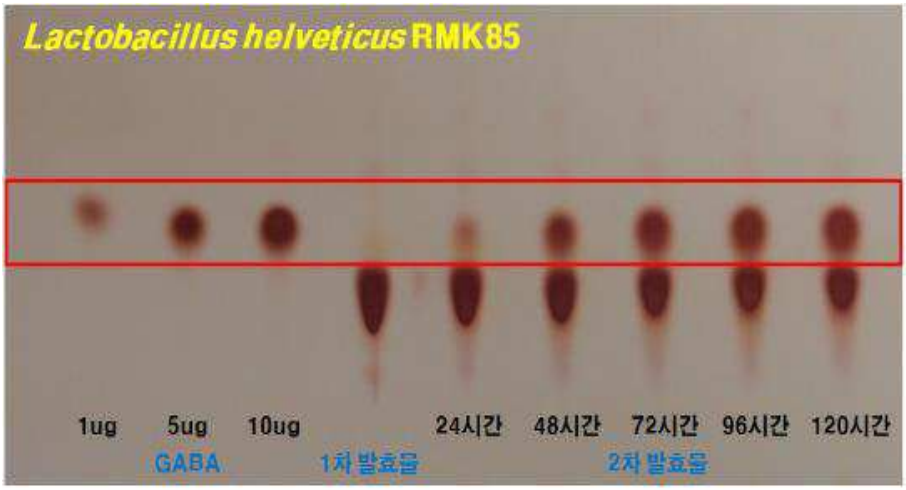
ug/mL로 감소하였고, γ-PGA 함량은 22.5 g/L로 증가되었다(표 2). 2차 발효시에도 잔존하는 글루타민산이 소비되어 4,054 ug/mL로 함량이 줄어들었고 GABA 생산량은 8,588 ug/mL로 배양액 중 0.8%정도 함유하고 있는 것으로 나타났다. 따라서 제한 배지에 첨가한 3% 글루타민산은 1차 발효 후 1.3% 남아있고, 2차 발효 후 0.4% 남아 있는 것으로 나타나 글루타민산 전환율은 약 87%인 것으로 확인되었다.

## 도면

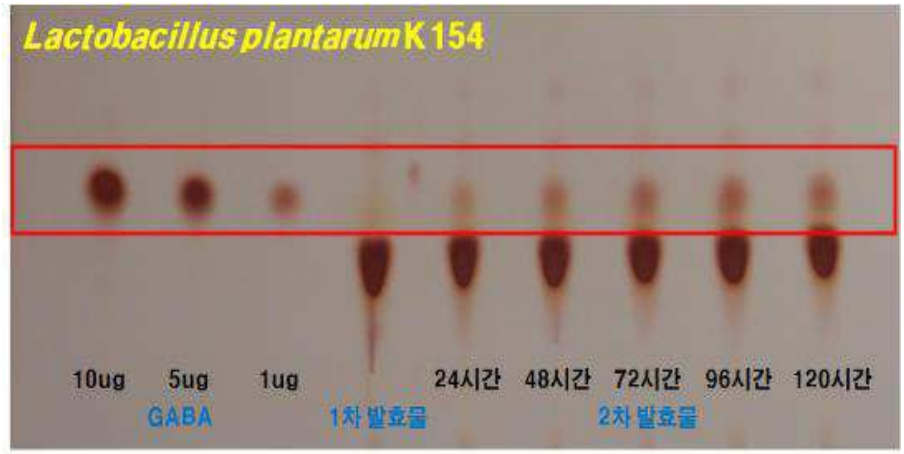
### 도면1



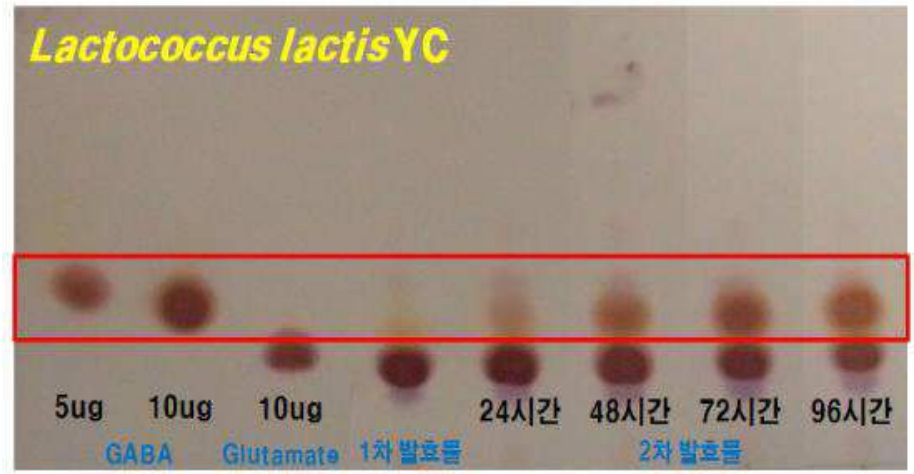
도면2


Lactobacillus helveticus RMK85
1ug
5ug
10ug
GABA
1차 발효물
24시간
48시간
72시간
96시간
120시간
2차 발효물

도면3


Lactobacillus plantarum K154
10ug
5ug
1ug
GABA
1차 발효물
24시간
48시간
72시간
96시간
120시간
2차 발효물

도면4


Lactococcus lactis YC
5ug
10ug
10ug
GABA
Glutamate
1차 발효물
24시간
48시간
72시간
96시간
2차 발효물