(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0020471
(43) 공개일자 2014년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0086901
(22) 출원일자 2012년08월08일
심사청구일자 2012년08월08일

(71) 출원인
한국식품연구원
경기도 성남시 분당구 안양판교로1201번길 62 (백현동)
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(뒷면에 계속)
(72) 발명자
임상동
경기 오산시 양산로 422, 106동 604호 (양산동, 오산세마효성백년가약)
조성아
경기 부천시 소사구 소사로78번길 42, 101동 902호 (소사본동, 풍림아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

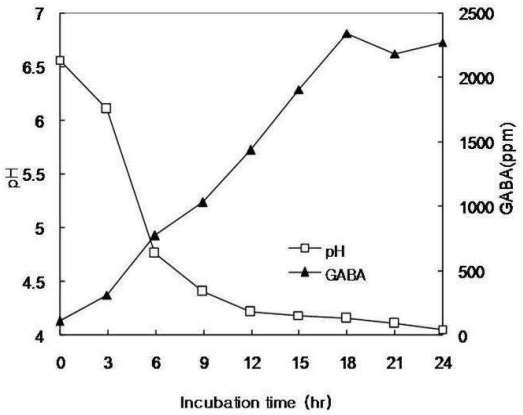
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 락토바실러스 헬베티커스 RMK85 균주 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 발효유 제조에 적합한 젖산 및 감마-아미노부티르산 생성능력이 있는 신규한 젖산균인 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명의 젖산균은 종래에 발견된 젖산 발효균보다 감마-아미노부티르산 생성능력이 뛰어나며, 발효유를 제조하는데 적합하다.

대 표 도 - 도4



(71) 출원인

(주)옴니허브

대구 수성구 신천동로 136, 한방산업지원센터 101호 (상동)

주식회사 비락

부산광역시 남구 자성로 152 (문현동)

(72) 발명자

이삼빈

대구 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)

양선아

대구 달성군 다사읍 대실역남로 93, 203동 1402호 (죽곡청아람2단지)

허담

대구 수성구 용학로 149, (지산동)

최성기

서울 송파구 올림픽로 99, 140동 1202호 (잠실동, 잠실엘스아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A001100388
부처명	지식경제부
연구사업명	지역기술개발사업
연구과제명	인지기능 향상 한방발효 소재 발굴 및 산업화
기 여 율	1/1
주관기관	(주)옴니허브
연구기간	2011.12.07 ~ 2013.11.30

특허청구의 범위

청구항 1

감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생산능력이 우수한 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주.

청구항 2

락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주를 배지에 배양하는 단계; 및

상기 배양물로부터 GABA를 분리하는 단계를 포함하는 GABA 생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 배지에는 0.1 내지 1 중량% 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 및 8 내지 12 중량% 환원 탈지유를 더 첨가하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산방법.

청구항 4

제1항에 따른 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주에 의한 발효물을 포함하는 식품 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 균주 및 이를 이용한 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)의 생산방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)은 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로, 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.

[0003] GABA의 기능으로는 뇌의 혈류를 개선하여 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사 향상 및 의욕저하 등의 치료제로 사용되어 brain food 라고도 하며 이 외에도 연수의 혈관중추에 작용하여 항이뇨호르몬인 바소프레신의 분비를 억제하고 혈관을 확장시켜 혈관을 낮추는 고혈압 저하효과(anti-hypertensive effect) 및 이뇨효과(diuretic effect) 등 여러 생리작용이 보고되고 있다(Mody et al, Trends Neurosci. 17, 517, 1994).

[0004] 현재 GABA는 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 약간 함유되어 있으나, 그 함량이 낮아 자연 식품으로 섭취하는 양으로는 생리활성을 기대하기 어려운 실정이다. 지난 수 년 동안 GABA의 대량생산에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으나 합성 GABA의 경우 식욕부진, 변비, 설사 등의 부작용이 있어 발효제법을 이용한 GABA의 생산이 연구되고는 있으나 아직은 수율이 낮은 형편이다. GABA는 대략 홍국쌀(red mold rice)에 20㎎/100g 건물량, 가바론티(Gabaron tea)에 150㎎/100g 건물량, 불린 쌀눈(soaked rice germ)에 400㎎/100g 건물량이 함유하고 있다(Kono & Himeno, Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 617, 2000; Tsushida et al, Nippon Nogeikagaku kaishi. 61, 817, 1987; Saikura et al, J. Agric. Food Chem. 42, 1122, 1994; Saikusa et al, Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 48, 196, 2001).

[0005] GABA를 생산하는 젖산균에 관한 연구(Nomura et al. International Journal of Systematic Bacteriology. 49, 163, 1999)로 *Lactococcus lactis*가 GABA를 생산하는 능력이 있음을 밝힌 바 있으나 높은 GABA 생성 젖산균으로 발효유에 이용된 사례는 없다.

[0006] 한편, 한국출원번호 제10-2010-0068711호, 한국등록특허 제0549094호, 한국등록특허 제0631857호, 한국등록특허 제0755508호 등에서 GABA 생산 균주 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법에 대해 개시하고 있으나, 본 발명자들이 분리한 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 균주에 대해서는 언급이 없다. 따라서, 본 발명자들은 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 균주를 원유에서 분리하고 상기 균주가 우유응고력 및 GABA 생성능이 우수하다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 GABA 생성능이 우수한 신규한 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주를 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 배양하여 배양물로부터 GABA를 생산하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생산능력이 우수한 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주를 제공한다.

[0010] 본 발명의 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주는 원유에서 분리되었으며, 후술하는 실시예의 방법에 따라 스크리닝 및 동정하였다. 미생물의 동정은 그의 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 기초로 하여 이루어졌다.

[0011] 또한 본 발명은 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주를 배지에 배양하는 단계; 및 상기 배양물로부터 GABA를 분리하는 단계를 포함하는 GABA 생산방법을 제공한다.

[0012] 상세하게는, 상기 배지에는 0.1 내지 1 중량% 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 및 8 내지 12 중량% 환원 탈지유를 더 첨가하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 상기 배지로는 MRS 배지가 바람직하나, 상기 균주의 배양에 적합한 배지라면 특별히 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 상기 MSG의 첨가량이 0.1 중량% 이하인 경우 GABA 생성에 필요한 전구물질이 부족하게 되는 문제가 발생할 수 있고, 1.0 중량%을 초과하는 경우 GABA로 전환되지 않은 MSG가 남아 있게 되는 문제가 발생할 수 있다.

[0015] 또한, 환원 탈지유 첨가량이 8 중량% 미만인 경우 영양성분 부족으로 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 균주의 성장이 느린 반면, 12 중량%를 초과하는 경우 영양이 충분하므로 더 이상 균주의 성장속도가 증가하지 않는다.

[0016] 한편, 배지에 축적된 GABA는 다양한 방법으로 회수할 수 있다. 예를 들어, 배양액을 분무 건조하면 저농도의 GABA-함유 분말을 대량으로 얻을 수 있으며, GABA의 함량을 높이기 위해서는 배양액을 감압 증발기를 이용하여 농축한 후 동결건조를 진행하면 가능하다. 또한, 고순도의 GABA를 얻기 위해서는 이온교환수지를 이용한 정제방법을 사용한 후 농축 및 건조 공정을 수행하면 된다. GABA는 온도 및 pH의 변화에 크게 영향을 받지 않고, 공정 안정성이 있기 때문에, 회수 공정상의 제한은 없다.

[0017] 또한 본 발명은 상기 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주에 의한 발효물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 얻어진 배양물은 바람직하게는 액체배양을 하여 세포를 회수한 후 동결건조하여 g당 함량을 측정한 다음 동결건조 파우더의 형태로서 다양한 식품조성물에 첨가되어질 수 있다. 또한 상기 식품조성물은 발효유, 치즈,

김치, 요구르트의 발효식품일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0019] 본 발명자들이 원유에서 분리한 젖산 발효균인 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85(KACC91721P) 균주는 종래에 발견된 젖산 발효균보다 GABA 생성 능력이 뛰어나므로, 상기 균주를 배양하여 이용하면 고함량의 GABA가 포함된 발효유 등의 기능성 식품을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85를 10% 환원탈지유에 접종하였을 때의 성장을 나타낸 그래프이다.

도 2는 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85를 10% 환원탈지유에 접종하였을 때의 pH변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 담즙첨가 유무에 따라 L-시스테인이 함유된 MRS배지에서의 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85의 성장을 나타낸 그래프이다.

도 4는 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85를 배양시간에 따른 pH와 GABA함량에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0022] **< 실시예 1 > 미생물의 분리**

[0023] 시료로 사용된 원유는 국내 각 지역의 목장에서 수거하여 브롬크레졸 퍼플(Bromcresol purple)과 소듐아자이드(sodium azide)를 첨가한 변형 MRS배지(표 1)에 0.3㎖씩 평면도말법으로 접종한 후 37℃에서 48시간 배양하였다. 그런 다음, 각각의 균락을 전기 변형 MRS 배지에서 순수분리하고, 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였다. 선발된 균주는 전기 변형 MRS 배지에 3회 백금이로 도말한 후 호기배양 하여 순수분리하였다. 순수분리 균주를 10% 환원 탈지유(Difco Laboratories, USA)에 접종하고 37℃에서 24시간 동안 배양하여 응고여부를 확인하였다.

표 1

[0024] 본 발명에서 미생물 분리에 사용된 변형 MRS 배지의 조성

성 분	성분비(그람/리터)
프로테오스 펩톤 #3	10.0
쇠고기 추출물	10.0
효모 추출물	5.0
락토오스	20.0
트윈 80	1.0
암모늄 시트레이트	2.0
소디움 아세테이트	5.0
마그네슘 설페이트	0.1
망간 설페이트	0.05
디포타시움 포스페이트	2.0
소듐 아자이드	0.25
브롬크레졸 퍼플	0.04

[0025] **< 실시예 2 > GABA 생산 젖산균주 선발**

[0026] 상기에서 분리된 젖산균과 상업용 젖산균 1%를 글루탐산모노나트륨(monosodium glutamate, MSG) 1% 첨가된 10% 환원탈지유에 37℃에서 18시간 배양 후 pH와 GABA 생산 양을 측정한 결과는 다음 표 2와 같다.

표 2

[0027]

보관 젖산균	출 처	탈지유 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
		24hr	48hr		
*L. acidophilus**	NCFM, Rhone-poulenc	+	+	4.21	32.50
*L. acidophilus**	Culture System	+	+	4.53	22.65
*Streptococcus themophilus**	Culture System	+	+	4.32	30.53
*L. acidophilus**	NCFM, Rhone-poulenc	+	+	4.12	23.64
L. lactis subsp. lactis	ATCC 21053	+	+	5.81	5.91
L. lactis	ARRL B-633	+	+	6.07	9.85
L. diacetylactis	NRRL B-2356	+	+	4.75	6.89
L. casei	ATCC 393	+	+	5.44	5.91
L. acidophilus	ATCC 11506, IFO 3205	+	+	5.45	5.91
L. cremoris	KFRI 00349	+	+	5.66	3.94
L. delbrueckii subsp. lactis	ATCC 7830, IFO 3376	+	+	5.30	5.94
L. bulgaricus	ATCC 33409	+	+	5.30	8.86
L. amylophilus	NRRL B-4437	+	+	6.07	5.91
L. reuteri	KFRI 00661	+	+	5.84	10.83
선발 젖산균 RMK85		+	+	4.33	2,303.76

[0028] 주) * 상업균주

[0029] **< 실시예 3 > 미생물의 동정**

[0030] 미생물의 분류학적 동정은 Hammes 등[The prokaryotes, 1563-1578, 2nd Edition, Springer-Verlag Co.(1992)]의 방법에 따라 수행하였으며, 그 결과는 표 3에서 보는 바와 같다. 이들 균주는 공히 그램 양성, 간균이며, 산소유무와 상관없이 잘 생장하였고, 카탈라제와 운동성은 음성이었다. 또한, 15℃와 45℃에서 생장하였으며, 글루코스(glucose)로부터 가스를 생성하지 않았고, 알긴산으로부터 암모니아를 생성하지 않아 *Lactobacillus* 속(genus)에 속하였다. 종(species)을 정하기 위하여 API 50CHL kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시한 결과, 락토스 등 14종으로부터 산을 생성하였고, ATB 동정시스템에 입력하여 조사한 결과와 16S rRNA Gene Sequence를 이용하여 얻어진 결과가 일치되어 락토바실러스 헬베티커스로 판명되었다. 본 발명은 원유에서 분리한 탈지유 응고균주들 중 탈지유 응고속도와 GABA 생성 능력이 우수한 균주를 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helv*eticus) RMK85로 명명하고, 2012년 05월 23일 농업생명공학연구원 한국농업미생물자원센터(KACC)에 기탁번호 KACC91721P로 기탁하였다.

표 3

[0031] 본 발명의 신규 미생물 락토바실러스 헬베티커스 RMK85의 생리적 및 생화학적 특성

그램 반응		+	
세포 형태		간균	
포자 형성		-	
운동성		-	
호기적 성장		+	
혐기적 성장		+	
카탈라제 반응		-	
15℃에서 성장		+	
45℃에서 성장		+	
포도당으로 부터 가스생성		-	
알기닌으로 부터 암모니아 생성		-	
당이용 능력			
글리세롤	-	D-사이로스	-
에리티톨	-	L-사이로스	-
D-아라비노스	-	아도니톨	-
L-아라비노스	-	β-메칠-D-사이로사이드	-
리보스	-	갈락토스	+
글루코스	+	수크로스	+
프락토스	+	트레할로스	+
만노스	+	이눌린	-
소르보스	-	멜레지토스	-
람노스	-	라피노스	-
둘시톨	-	스타치	+
이노시톨	-	글리코겐	-
만니톨	-	실리톨	-
솔비톨	-	겐티오비오스	+
a-메칠-D-만노사이드	-	D-투라노스	-
a-메칠-D-글루코사이드	-	D-라이소스	-
N 아세칠 글루코스아민	-	D-타가토스	-
아미그달린	+	D-후코스	-
아르부틴	-	L-후코스	-
에스쿨린	+	D-아라비톨	-
살리신	+	L-아라비톨	-
셀로비오스	+	글루코네이트	-
말토스	+	2-케토-글루코네이트	-
락토스	+	5-케토-글루코네이트	-
멜리비오스	-		

[0032] 발효유용 스타터로서 적합한지 여부를 확인하기 위하여 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85를 10% 환원탈지유에 배양하면서 시험에 사용하였다.

[0033] **< 실시예 4 > 미생물의 생장시험**

[0034] 젖산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% 탈지분유 150㎖에 젖산균을 1㎖용 피펫으로 1방울 접종한 후 34, 37, 40℃에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% 펩톤용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35℃에서 48시간 배양하여 계수하였고, 온도 및 시간별로 pH 변화를 측정하고 결과를 도 1과 도 2에 나타내었다. 도 1과 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 최적온도는 40℃이며, 발효유의 최적 pH 조건인 pH 4.3-4.4에 도달하는데 15시간 소요되었다.

[0035] **< 실시예 5 > 항생제 내성시험**

[0036] 항생제 내성시험은 트립틱 소이 브로스(tryptic soy broth, Difco, USA)를 사용하여 2배 희석방법에 의해 생장 여부를 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 정하였으며, 측정한 결과는 표 4에 나타내었다.

표 4

[0037] 락토바실러스 헬베티커스 RMK85의 항생제 감수성

항생제	최저억제농도(㎍/㎖)
아미노글리코사이드계	
아미카신 Amikacin	320
겐타마이신	640
가나마이신	3200
네오마이신	3200
스트렙토마이신*	800
β-락탐계	
페니실린-G*	20
메치실린 Methicillin	320
옥사실린	60
암피실린	1280
그램-양성 스펙트럼	
바시트라신*	120
리팜피신	120
노보바이오신	30
린코마이신	800
그램-음성 스펙트럼	
폴리마이신B*	1200
광범위 스펙트럼	
클로람페니콜	320

[0038] * : units/㎖

[0039] 표 4에서 볼 수 있는 바와 같이 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85는 타 계열의 항생제에 비해 아미노글리코사이드계 특히 가나마이신, 네오마이신 및 스트렙토마이신에 대해 내성이 높은 반면, 페니실린-G에 가장 감수성이 높았다.

[0040] **< 실시예 6 > 효소활성 시험**

[0041] 효소활성 시험은 MRS 액체배지에서 37℃, 18시간 동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여 10^5 - 10^6 cfu/㎖ 수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 37℃에서 5시간 동안 배양한 다음 효소반응을 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0-5의 수치로 표시한 결과는 표 5에 나타내었다.

표 5

[0042] 락토바실러스 헬베티커스 RMK85의 효소활성 비교

효 소	효소활성
알칼라인 포스파타제	3
에스테라제(C4)	3
에스테라제 리파제(C8)	1
리파제(C14)	1
류신 아릴아미다제	1
발린 아릴아미다제	0
시스틴 아릴아미다제	1
트립신	0
카이모트립신	0
산 포스파타제	4
나프톨-AS-BI-포스포하이드로라제	3
α-갈락토시다제	1
β-갈락토시다제	0
β-글루크로니다제	0
α-글루코시다제	0
β-글루코시다제	0
N-아세칠-β-글루코스아민니다제	0
α-만노시다제	0
β-푸코시다제	0

[0043] * : 0 에서 5까지 단계별로 표준색이 명시되어 있으며, 0은 음성이고 5는 최대의 강도를 나타낸다. 1은 5나노몰(nanomoles), 2는 10나노몰, 3은 20나노몰, 4는 30나노몰, 5는 40나노몰 이상의 효소활성을 나타냄.

[0044] 표 5에서 볼 수 있는 바와 같이 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85는 산 포스파타제, 알칼라인 포스파타제, 에스테라제, 나프톨-AS-BI-포스포하이드로라제에서 효소 활성이 높게 나타났다.

[0045] **< 실시예 7 > 담즙내성 시험**

[0046] 담즙내성시험은 길리랜드와 월커의 방법(Gilliland & Walker, J. Dairy Sci., 73, 905, 1990)에 따라 측정한 결과는 도 3에 나타내었다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이 OD값이 0.3 증가하는데 소요되는 시간은 담즙을 첨가하지 않을 때는 1.9시간, 담즙을 첨가할 때는 2.2시간 소요됨에 따라 거의 억제를 받지 않아 담즙에 대한 내성이 있는 것으로 나타났다.

[0047] **< 실시예 8 > pH 내성 시험**

[0048] pH 내성시험은 클라크 등의 방법(Clark et al., Cultured Dairy Products J., 28(4), 11, 1993)에 따라 측정한 결과는 표 6에 나타내었다.

표 6

[0049] 염산용액에서 3시간 후의 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 내성 비교[단위 : CFU per mℓ(Log number)]

배양시간 (hr)	pH 1	pH 2	pH 3	pH 6.4
0	6.85	9.15	8.98	9.41

1	0	9.02	8.92	9.41
2	0	8.84	8.77	9.43
3	0	8.68	9.43	9.45

[0050] 상기 표 6에서 볼 수 있는 바와 같이 대조구 pH인 6.4에 비해 강산인 pH 2에서 조차도 거의 영향이 없음에 따라 내산성이 있음을 보였다.

[0051] **< 실시예 9 > 항균력 시험**

[0052] 항균력 시험은 길리랜드와 스펙(Gilliland & Speck, J. Food Prot., 40(12), 820, 1977)에 따라 측정한 결과는 표 7에 나타내었다.

표 7

[0053] MRS 배지에서 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85의 식중독균 억제(*)

식중독균	식중독균[a]		*L. helveticus* RMK85[a]		억제율(%)
	CFU/mℓ	pH	CFU/mℓ	pH	
Escherichia coli	1.28×10^{6}	6.48	5.35×10^{5}	4.99	28.52
Salmonella typhimurium	2.19×10^{5}	6.53	1.0×10^{4}	4.99	39.27
Staphyloccous aureus	3.76×10^{5}	6.53	2.56×10^{5}	4.94	33.24

[0054] * *L. helveticus* RMK85의 초기 수 : 2.05×10^{7}CFU/mℓ

[0055] [a] 37℃에서 6시간 배양 후 측정

[0056] 상기 표 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85가 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*)에 대해 28.52%, 살모넬라 타이피머리움(*Salmonella typhimurium*)에 대해 39.27%, 스테피로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해 33.24%의 억제력을 보였다.

[0057] **< 실시예 10 > GABA 생산 최적배양조건 설정**

[0058] 1. 환원탈지유 함량과 MSG 첨가량이 GABA함량에 미치는 영향

[0059] 환원탈지유 및 MSG 함량별로 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85를 1% 접종하고 37℃에서 18시간 배양한 후 GABA 함량을 측정한 결과는 다음 표 8과 같다.

표 8

[0060]

환원 탈지유	MSG 0.1%	MSG 0.5%	MSG 1.0%
	GABA 함량(단위 : ppm)		
8 %	475.05±119.84	773.23±67.82	700.23±21.46
10 %	951.23±201.20	951.79±98.79	1,084.88±114.35
12 %	1,147.77±93.45	1,279.73±47.48	1,152.82±91.84

[0061] 환원 탈지유 농도가 증가할수록 GABA 함량이 증가하는 경향을 나타내었으나 MSG 첨가량에 따른 GABA 함량은 환원 탈지유의 농도에 따라 변화가 있었다. 따라서 환원탈지유는 12%, MSG는 0.5% 첨가했을 때가 가장 적합한 조건이었다.

[0062] 2. 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 첨가량 및 배양온도가 GABA 함량에 미치는 영향

[0063] 상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.5%를 첨가하고, 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 첨가량 및 배양온도별로 18시간 배양했을 때의 GABA 함량을 측정한 결과는 다음 표 9와 같다.

표 9

[0064]

균 첨가량	34℃	37℃	40℃
	GABA 함량 (단위 : ppm)		
0.1 %	430.80±11.05	802.56±17.87	2,237.14± 90.53
0.5 %	835.56±35.74	806.92±61.64	2,279.81±101.36
1.0 %	944.49±28.65	945.05±52.41	2,375.27±232.55

[0065] 표 9에서 보는 바와 같이 균 첨가량이 증가할수록, 배양온도가 증가할수록 GABA 함량이 증가하였다. 따라서 균 첨가량은 1.0%, 배양온도는 40℃가 최적조건이었다.

[0066] 3. 배양시간에 따른 pH와 GABA함량에 미치는 영향

[0067] 상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.5%를 첨가하고, 락토바실러스 헬베티커스(*Lactobacillus helveticus*) RMK85 첨가량 1.0% 및 배양온도를 40℃로 했을 때 배양시간에 따른 pH와 GABA함량을 측정한 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 18시간 배양할 때 감마-아미노부티르산 함량이 2340.46ppm이었다.

수탁번호

[0068]

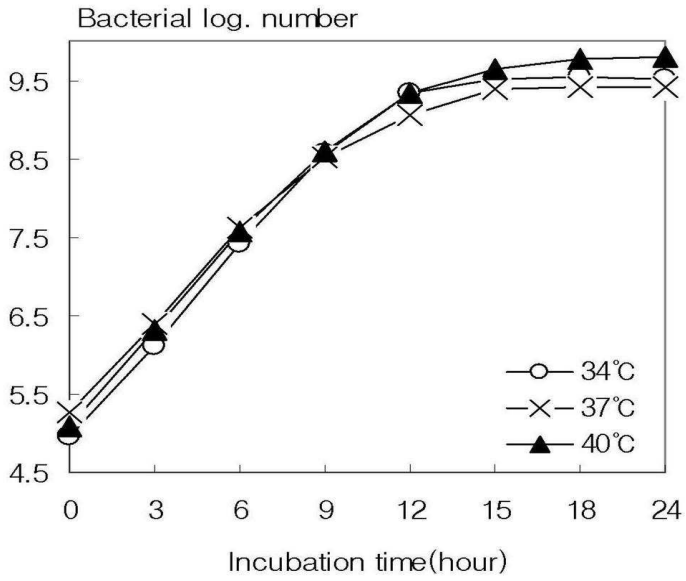
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91721

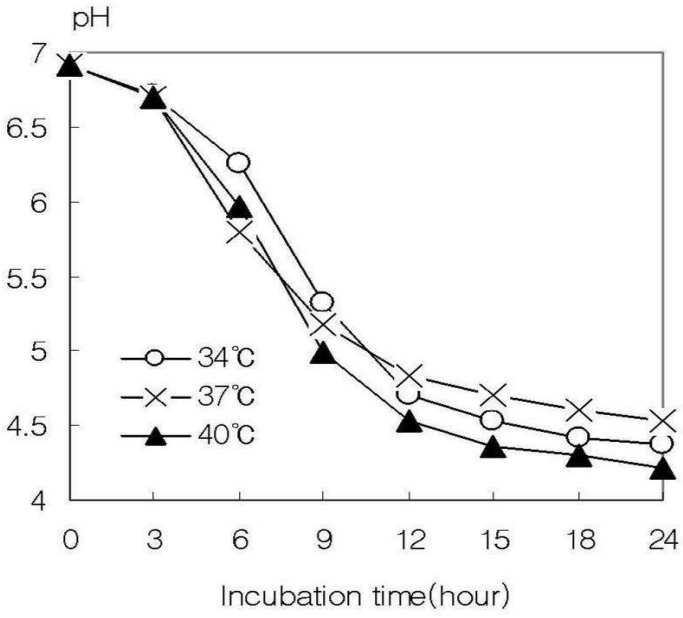
수탁일자 : 20120523

도면

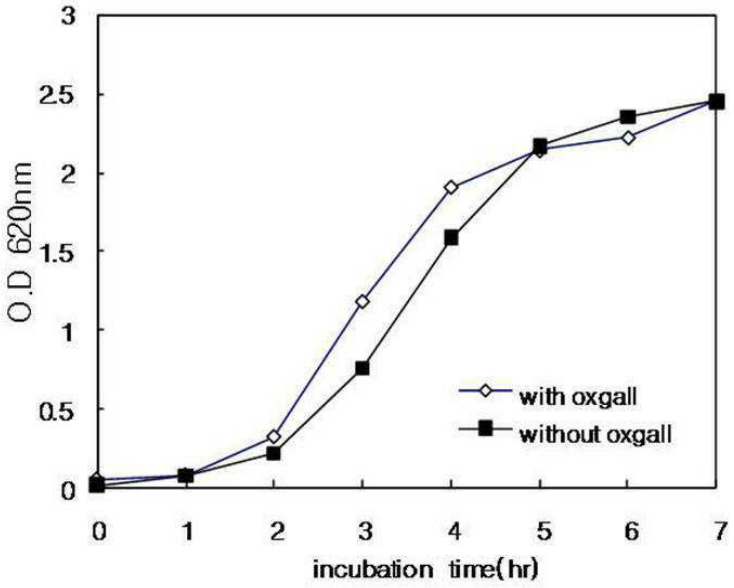
도면1


Bacterial log. number
9.5
8.5
7.5
6.5
5.5
4.5
0
3
6
9
12
15
18
24
34℃
37℃
40℃
Incubation time(hour)

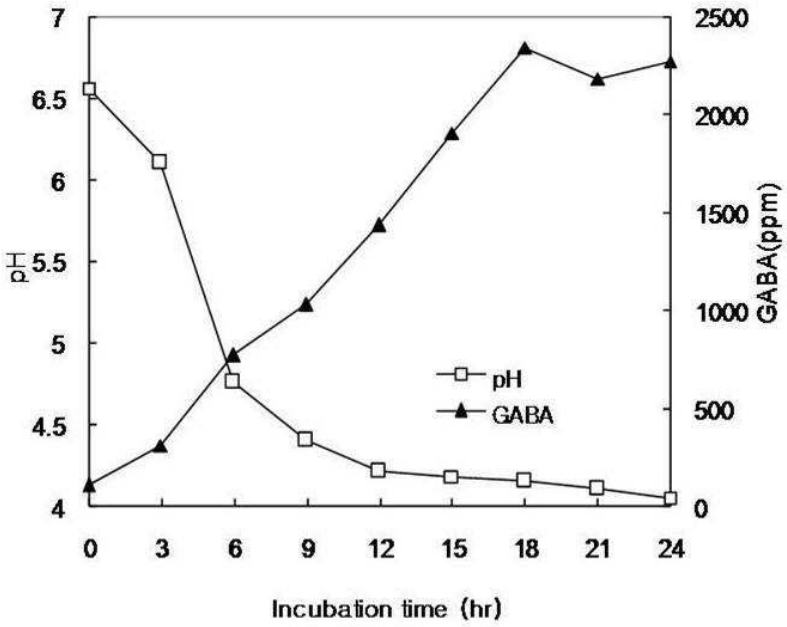
도면2


pH
7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
0
3
6
9
12
15
18
24
34℃
37℃
40℃
Incubation time(hour)

도면3


O.D 620nm
incubation time(hr)
with oxgall
without oxgall

도면4


pH
GABA(ppm)
Incubation time (hr)
pH
GABA