(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월04일
(11) 등록번호 10-1381090
(24) 등록일자 2014년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23C 9/12 (2006.01) *A23C 9/127* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0030399
(22) 출원일자 2013년03월21일
심사청구일자 2013년03월21일
(56) 선행기술조사문헌
JP2001120179 A
KR1020090096776 A
KR1020080077970 A

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
임종순
경북 의성군 봉양면 도원길 2,
김지은
대구 달서구 대명천로12안길 40, 1동 302호 (성당동, 대영하이츠)
(74) 대리인
특허법인태백

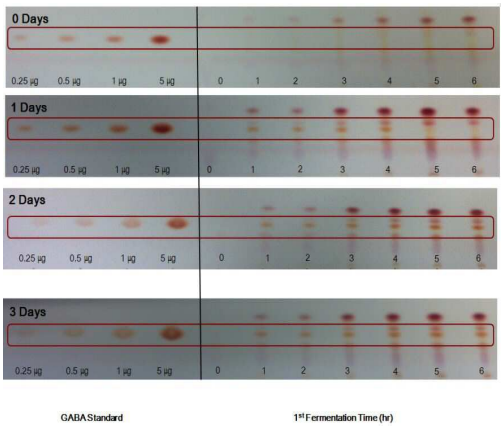
전체 청구항 수 : 총 6 항 심사관 : 김윤경

(54) 발명의 명칭 **고초균과 젖산균을 이용한 이단발효를 통한 ＧＡＢＡ와 펩타이드가 증진된 발효유 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단 발효를 통해 펩타이드와 GABA가 생산된 기능성 발효유를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하는 단계; 상기 고초균 스타터를 우유, 두유, 전지분유 및 탈지분유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 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 타이로신(Tyrosine)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 발효유 제조방법에 관한 것이다. 또한 상기의 방법에 의해 제조된 기능성 발효유는 식품 및 기능성 식품 소재로 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	미부여
부처명	지식경제부
연구사업명	지역혁신센터사업(RIC 사업)
연구과제명	생물전환기술을 이용한 기능성 식품소재개발 및 상품화
기 여 율	1/1
주관기관	계명대학교 산학협력단
연구기간	2013.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하는 단계;

상기 고초균 스타터를 우유, 두유, 전지분유 및 탈지분유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 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 타이로신(Tyrosine)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 발효유 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P)인 것을 특징으로 하는 타이로신(Tyrosine)과 GABA가 증진된 발효유 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 젖산균은 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)(KCCM 11297P)인 것을 특징으로 하는 타이로신(Tyrosine)과 GABA가 증진된 발효유 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 1차 발효 단계는 37 내지 42℃에서, 1 내지 96시간 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 타이로신(Tyrosine)과 GABA가 증진된 발효유 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 2차 발효 단계는 25 내지 30℃에서, 1 내지 3일 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 타이로신(Tyrosine)과 GABA가 증진된 발효유 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 제조된 타이로신(Tyrosine)과 GABA가 증진된 발효유.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단발효를 통해 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 및 펩타이드(peptide)가 증진된 발효유를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 발효유는 유즙을 유산균 또는 효모로 발효하여 상쾌한 산미와 함께 양질의 영양, 다양한 생리 기능성 특성이 있는 유제품으로 구미(美) 여러 나라에서 오래전부터 섭취되어 왔으며, 세계적으로 수요가 꾸준히 증가하고 있다. 현재 국내에서는 1970년대 초에 액상 요구르트가 시판되기 시작하였으며, 그 판매량이 꾸준히 증가하여 2001년에는 53만여 톤에 이르렀다. 또한 수년 전부터는 유고형분 함량과 젖산균수가 많은 커드(curd)상 요구르트(농후발효유)가 개발되어 판매되고 있다. 발효유는 우유 성분 이외에 유산균에 의해 생성된 유기산과 아미노산, 펩티드, 유산균 균체 등 식품으로서의 영양뿐만 아니라, 장내 유해 세균의 억제 유용균의 증진, 면역계의 자극에 의한 항암 작용, 혈중 콜레스테롤의 저하 효과 등 현대인의 성인병 예방과 건강 증진에 탁월한 기능을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

[0003] 2단 발효에 이용되는 고초균인 바실러스(*Bacillus*) 속은 그람(Gram) 양성, 간균, 호기성으로 아포를 형성한다고

알려져 있는 산업적으로 중요한 균주 중 하나로서, 다양한 효소와 항생물질을 다량 분비한다고 알려져 있다. 바실러스(*Bacillus*) 속이 산업적으로 중요한 균주로 주목받는 이유로는 빠른 생육시간에 따른 짧은 발효주기와 그들이 세포 외로 많은 양의 단백질을 분비하고, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) 같은 속들은 식품 및 의약산업에서의 사용에 있어 안전한 GRAS 미생물로 인정되기 때문이다. 바실러스(*Bacillus*)를 이용한 고초균 발효에 의해 생산되는 생리활성 물질로 단백질 및 탄수화물 가수분해 효소, 혈전분해효소, 기능성 펩티드(pepetide) 및 고분자 점질물(γ-polyglutamic acid) 등을 포함한다.

[0004] 식품단백질은 소화 및 가공 공정 중에 각종 효소에 의하여 가수분해되며 소화, 흡수를 촉진하는 영양적 기능뿐만 아니라 혈압강하, 진통마취, 칼슘흡수촉진, 항알러지 및 혈청 콜레스테롤 레벨 저하 작용 등의 생리활성을 가지는 펩티드(pepetide)를 생산한다. 펩티드(pepetide)는 다양한 조합의 아미노산이 펩타이드 결합에 의해 중합물을 형성하고 있는 것으로 일반적으로 분자량 10,000 이하의 것을 말한다. 식품 중에 존재하는 펩티드는 아미노산을 공급하는 영양 기능, 맛이나 용해성, 유화성 등에 관여하는 감각 기능, 여러 생리활성을 나타내는 생체 조절 기능 등에 모두 관여한다.

[0005] 젖산균은 당류를 발효시켜 젖산을 생성하는 유익한 미생물로서 일상생활에서 김치, 치즈, 젓갈류, 발효소세지 및 발효유 등의 과채류 발효식품이나 음료 등을 통하여 비교적 용이하게 섭취할 수 있으며 사람이나 동물의 장관에 서식하여 장내 균총을 형성하면서 장내 환경의 개선작용과 정장작용을 하는 미생물이다. 젖산균이 생성하는 젖산은 제품의 우수한 보존성을 부여, 장내 유해 미생물의 성장을 억제하는 작용, 미세한 커드 입자들의 침전에 의한 유단백질의 소화력을 향상, 위 저장물의 배설을 촉진, 칼슘·인·철의 이용을 향상 및 위액의 분비를 촉진시키는 등 여러 가지의 생리 생물학적 장점을 가지고 있다.

[0006] 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)은 단백질에서 발견되지 않는 비단백질성 아미노산으로 뇌와 척추에 존재하는 신경 전달물질로 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜, 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다. GABA는 신경전달물질 중 아미노산계 신경전달물질의 대표억제 물질로서 중풍, 치매예방, 기억력증진, 불면 등에 효과가 있어 수험생 관련 기능성 식품에 응용할 수 있으며, 식욕과 포만감에 영향을 주어 체중을 감소시키는 효과가 있다. GABA의 생성 기작은 세포 내막에서 글루탐산(glutamic acid)이 글루타메이트 디카르복실라제(glutamate decarboxylase; GAD)의 효소에 의하여 탈탄산 반응이 이루어지면서 글루타메이트(glutamate)가 안티포터(antiporter)에 의하여 세포 내로 쉽게 들어가게 하며 결과적으로 GABA가 세포 밖으로 유출되어 나온다. GABA는 아미노산의 전이 반응에 의해 숙시닉 세미알데히드(succinic semialdehyde)로 전환된 다음 산화에 의하여 숙신산(succinate)이 된다. 이와 같이 GABA의 대사는 에너지를 생산하고 TCA 회로에서 산화를 위한 탄소의 제공, 질소 저장화합물 및 아미노산 대사산물 등의 여러 가지 기능이 알려져 있다. GABA의 기능성이 알려지면서 의약품으로써 뿐만 아니라, 기능성 식품소재로써 관심이 높아지고 있다. 현재 GABA는 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 약간 함유되어 있는데, GABA가 일반 곡류에 존재하는 함량은 일반미에 1-40 mg/100g, 현미에 4-8 mg/100g, 발아현미에 10-100 mg/100g으로 자연상태에서의 식물체 GABA 함유량으로는 극히 적어 활용이 어려운 실정이라 미생물을 이용한 연구가 수행되고 있다. 유산균을 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.

[0007] 따라서, 본 발명자들은 유제품에 고초균(*Bacillus subtilis* HA)을 접종하여 타이로신을 생산하는 1차 발효단계와 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis* YC)를 접종하여 발효하는 2차 발효 단계를 거쳐 펩타이드(타이로신)와 GABA가 함유된 기능성 발효유를 제조하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 유제품에 고초균과 젖산균을 이용한 2단 발효를 통하여 펩타이드 및 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 함유된 기능성 발효유를 제조하는데 의의가 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하는 단계; 상기 고초

균 스타터를 우유, 두유, 전지분유 및 탈지분유로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나에 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 타이로신(Tyrosine)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 발효유 제조방법을 제공한다.

[0010] 상세하게는, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P)이고, 상기 젖산균은 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)(KCCM 11297P)인 것을 특징으로 한다.

[0011] 상세하게는, 상기 1차 발효 단계는 37 내지 42℃에서, 1 내지 96시간 동안 발효하는 것이고, 상기 2차 발효 단계는 25 내지 30℃에서, 1 내지 3일 동안 발효하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명에 사용된 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P) 균주는 전통 청국장에서 분리 및 동정한 균주로서, 한국등록특허 제 10-0864850호(등록일 2008.10.16)에 개시되어 있다.

[0013] 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.

[0014] 본 발명에 있어서, "타이로신(Tyrosine)"은 단백질을 구성하는 20가지의 표준 아미노산 중 하나로서, 비필수아미노산인 동시에 방향족 아미노산이다. 뇌의 신경세포의 전달물질 중 중요한 도파민, 에피네프린, 노르에피네프린, 갑상선 호르몬, 피부의 멜라닌 성분의 생성에 필요한 성분으로 알려져 있다. 또한, 스트레스를 다스리고 집중력 향상에 효과가 있는 아미노산으로서, 우울증 및 치매 치료에 사용되기도 한다.

[0015] 한편, 발효물의 펩타이드(peptide) 생성 정도를 측정하기 위하여 발효물 중에 존재하는 타이로신(tyrosine) 함량을 측정한 것이며, 상기 펩타이드가 타이로신으로 한정되는 것은 아니다.

[0016] 또한 본 발명은 상기의 방법에 의해 제조된 타이로신(Tyrosine)과 GABA가 증진된 발효유를 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단발효를 통해 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 및 펩타이드가 증진된 발효유를 제조하는 방법에 관한 것으로, 혼합 발효 형태인 2단 발효를 수행함으로써 풍미가 우수하고 점질물, GABA, 타이로신 등을 포함하는 기능성 발효유를 제조함으로써, 이를 활용하여 기능성 음료 및 식품 개발의 가능성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 MSG 첨가 유무에 따른 타이로신 함량을 나타낸다. 1; 10% MFS, 2; 10% MFS + 2% MSG, 3; 우유, 4; 우유 + 2% MSG

도 2는 MSG 첨가 유무에 따른 SDS-PAGE 결과이다. (A) 우유, (B) 우유, 2% MSG, (C) 10% MFS, (D) 10% MSF, 2% MSG. 1; 0 hr, 2; 12 hr, 3; 24 hr, 4; 36 hr

도 3은 유제품의 종류에 다른 SDS-PAGE 결과이다. A : 전지분유, B : 탈지분유

도 4는 MSG첨가 유무와 발효 시간에 따른 우유 및 MFS의 SDS-PAGE 결과이다. (A) 우유, (B) 10% MFS. 1; 0 hr, 2; 3 hr, 3; 6hr, 4; 9 hr

도 5는 전지분유의 발효시간에 따른 SDS-PAGE 결과이다.

도 6은 우유의 발효시간에 따른 SDS-PAGE 결과이다.

도 7은 우유 및 탈지분유를 이용한 2차 발효 후의 산도를 나타낸다.

도 8은 우유 및 탈지분유를 이용한 2차 발효 후의 타이로신 함량을 나타낸다.

도 9는 우유의 2차 발효에 따른 GABA 생성 확인을 위한 TLC 측정 결과이다.

도 10은 탈지분유의 2차 발효에 따른 GABA 생성 확인을 위한 TLC 측정 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0020] **< 실시예 1 > 스타터 배양 및 배양배지**

[0021] 1. 기본 배지

[0022] 기본 배지로 사용된 유제품으로 두유는 E마트(Korea, Seoul) 검은콩 고칼슘두유를 구입하여 사용하였으며, 베지밀은 정식품(Korea, Cheongju) 베지밀 B를 구입하여 사용하였다. 우유는 매일우유(Korea, Seoul)는 매일유업 제품을 구입하였고, 초미세 생대두 분말(micronized full-fat soybean flour, MFS)은 동양 하이텍(Korea, Daegu)사로부터 제공받아 사용하였으며, 전지분유와 탈지분유는 서울우유(Korea, Seoul) 제품을 구입하여 사용하였다.

[0023] 2. 사용 균주 및 스타터 배양액 제조

[0024] 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P) 균주는 소이 밀크(soy milk) 배지를 121℃에서 15분간 멸균한 액체 배지 50 mL에 MRS agar plate에서 배양(42℃, 24 hr)한 고초균인 바실러스 서브틸리스 HA를 1회 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Ltd., Korea)에서 42℃, 24시간 동안 배양하여 스타터로 사용하였다.

[0025] 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC; KCCM 11297P) 균주는 계명대학교 식품가공학과 식품소재개발연구실에서 분리하였으며, 10% 스킴 밀크(skim milk) 배지와 MRS broth를 121℃에서 15분간 멸균한 액체 배지 200 mL에 MRS agar plate에서 배양(30℃, 24 hr)한 락토코커스 락티스 YC를 1회 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Ltd., Korea)에서 30℃, 24시간 동안 배양하여 스타터로 사용하였다. MRS broth에서 배양한 스타터는 원심분리(8,000 rpm, 20 min)하여 균체를 분리한 후 멸균생리식염수 50 mL에 현탁하여 스타터로 사용하였다.

[0026] **< 실시예 2 > 바실러스 서브틸리스 HA 균주를 이용한 1차 발효의 최적화**

[0027] 1. pH 및 산도 측정

[0028] pH는 pH meter(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발효물 1 g에 증류수 9 mL을 혼합한 후 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 g에 증류수 9 mL을 첨가하여 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정한 소비량을 젖산(lactic acid) 함량(%, v/w)으로 환산하였다.

[0029] 2. 생균수 측정

[0030] 생균수는 발효물 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 $10^{4,}$ 10^{5}, 10^{6} 배로 단계별 희석하여 MRS broth agar 배지에 20 μL 도말한 후, 바실러스 서브틸리스 HA는 42℃ 항온배양기에서, 락토코커스 락티스 YC는 30℃ 항온배양기에서 24시간 배양한 후의 생균수를 CFU (colony forming unit)/mL으로 나타내었다.

[0031] 3. 타이로신(Tyrosine) 함량 측정

[0032] 발효물의 펩티드(peptide) 생성 정도를 측정하기 위하여 폴린 페놀(Folin phenol) 시약을 이용하여 발효물 중에 존재하는 타이로신(tyrosine) 함량을 측정하였다. 15,000rpm에서 15분간 원심분리한 각 발효물의 상등액을 증류수로 희석하여 상등액 0.7 mL에 0.44 M TCA (trichloroacetic acid) 0.7 mL를 첨가하여 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na_2CO_3 2.5 mL과 페놀 시약(phenol reagent; 원액을 3배로 희석한 액) 0.5 mL을 차례로 넣고 혼합한 후, 37℃ 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 분광광도계(spectrophotometer; Uvikon, Kontron Co., Ltd., Milano, Italy)로 660 nm에서 측정하였다.

[0033] 4. 프로테아제(Protease) 활성 측정

[0034] 프로테아제(Protease)는 원심분리(15,000 rpm)하여 상등액으로부터 효소액을 조제한 다음 효소활성을 측정하였다. 프로테아제(Protease) 활성은 Anson의 방법을 변형하여 측정하였다(Science 147 (1965) 747-748). 0.6% 카제인 용액(casein solution) 0.35 mL을 기질로 하여 시험용과 공시험용 각각의 테스트-튜브(test-tube)에 희석한 효소액을 0.35 mL 넣은 후 37℃에서 10 분간 반응시킨다. 0.44 M TCA 0.7 mL을 첨가하여 반응을 정지시키고, 단백질을 침전시킨 후 37℃에서 30분간 반응시킨 후, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL 에 0.55 M Na_2CO_3 2.5 mL 과 페놀 시약(phenol reagent; 원액을 3배 희석한 액) 0.5 mL을 혼합한 후 37℃ 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 분광광도계(spectrophotometer; Uvikon, Kontron Co., Ltd., Milano, Italy)로 660 nm에서 측정하였다. 이 반응 조건하에서 1분 동안 타이로신(tyrosine) 1 ㎍을 유리하는 효소량을 1 unit 로 하였다. 공시험은 조효소액을 첨가하기 전에 0.44 M TCA를 넣은 후 동일하게 실시하였다.

[0035] 5. SDS-PAGE

[0036] 발효유의 단백질 가수분해 패턴을 알아보기 위하여 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(sodium dodecyl sulfate polyacylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)을 수행하였다. SDS-샘플 완충액(50 mM 소듐 포스페이트 완충액; sodium phosphate buffer, pH 7.0, 0.1% β-머캡토에탄올(β-mercaptoethanol))에 녹인 후 원심분리(15,000 rpm)하여 상등액과 5×샘플 완충액(sample buffer)을 혼합하여 100℃에서 5분간 가열하여 단백질의 변성을 유도한 후 전기영동(Hofer Scientific Instruments, CA)을 실시하였다. 젤(Gel) 염색은 인스턴트 블루(Instant blue 용액; Comassie dye, ethanol, phosphoric acid, solubilizing agent)을 사용하였다.

[0037] 6. 결과

[0038] (1) 유제품의 종류에 따른 1차 발효의 최적화

[0039] 유제품의 단백질 생산 및 풍미 향상을 위해서 청국장에서 분리한 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 균주를 이용하여서 발효하였다. 'E마트 검은콩 고칼슘 두유', '정식품 베지밀 B', '매일우유', 10% MFS (w/v%)를 소이밀크(soymilk) 배지에서 24시간 배양한 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 스타터를 1% 접종하여 96시간까지 24시간 간격으로 발효하였다. pH는 96시간까지 모두 증가하여 10% MFS에서 7.84로 나타났다. 프로테아제(Protease) 활성은 우유를 72시간 발효 시에 39.72 unit/mL로 다른 유제품에 비해 높은 효소 활성을 보였으며(표 1), 타이로신(tyrosine) 함량은 96시간 발효 시 베지밀이 223.05 mg%, 검은콩 213.03 mg%로 나타났으며 초기 타이로신(tyrosine) 함량에 비해 24시간 발효 시에 우유가 4.79 mg%에서 156.88 mg%로 가장 많이 분해되는 것을 알 수 있다(표 2). 우유와 10% MFS는 24시간에 쓴맛이 났으며, 검은콩과 베지밀은 48시간 발효에 쓴맛이 나타났다.

표 1

[0040] 유제품의 종류와 발효시간에 따른 프로테아제(protease) 활성(unit/mL)

	발효 시간(Fermentation Time; hr)			
	24	48	72	96

두유	10.54	19.13	20.21	26.32
베지밀	0.85	20.86	23.04	22.64
우유	15.00	38.59	39.72	31.79
10% MFS	9.21	25.88	25.67	26.14

표 2

[0041] 유제품의 종류와 발효시간에 따른 타이로신 함량(mg%)

	발효 시간(Fermentation Time; hr)				
	0	24	48	72	96
검은콩	45.12	93.74	149.28	186.49	213.03
베지밀	42.06	76.82	157.13	167.95	223.05
우유	4.79	156.88	191.82	157.18	118.46
10% MFS	42.13	113.82	200.74	220.15	200.56

[0042] (2) MSG 첨가 유무에 따른 1차 발효의 최적화

[0043] 표 1 및 2에서 프로테아제(protease) 및 타이로신(tyrosine) 함량을 비교하여 우유와 10% MFS를 대조군으로 하고, 발효물의 점질물 생성을 위해 2% MSG를 첨가하여 첨가 유무에 따라 단백질 분해 정도를 비교하였다. 1% 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 스타터를 접종하고 36시간까지 12시간 간격으로 발효하였다. 프로테아제(protease) 활성은 우유를 72시간 발효하였을 때 13.74±2.11 unit/mL로 나타났고(표 3), 타이로신(tyrosine) 함량은 우유와 우유에 MSG 첨가된 배지에서 72시간 발효하였을 때 118.97±0.73, 106.41±1.81 mg%로 MFS에 비해 높은 함량을 나타냈다(도 1). 우유는 12시간, MFS는 36시간에 쓴맛이 나타났으며, 발효시간에 따른 가수분해를 확인하기 위해서 SDS-PAGE로 확인하였다. 우유는 12시간 발효 시에 모두 가수분해되어 젤(gel)에서 분자량을 확인할 수 없었으며, 10% MFS는 40 kDa의 분자량을 보이며 25 kDa까지 분해된 것을 볼 수 있다(도 2).

표 3

[0044] MSG 첨가 유무에 따른 프로테아제(protease) 활성(unit/mL)

	MSG (%)	발효 시간(Fermentation Time; hr)		
		12	24	36
10% MFS	0	-	2.50±1.09	2.03±0.04
	2	3.02±1.31	3.41±1.99	8.03±1.41
우유	0	5.38±1.51	7.63±1.89	13.74±2.11
	2	1.76±1.73	8.76±2.54	5.29±1.80

[0045] (3) MFS와 유제품의 종류에 따른 1차 발효의 최적화

[0046] MSG의 첨가가 타이로신(tyrosine) 함량 및 프로테아제(protease) 활성의 비교 결과 차이가 없는 것으로 보아, MSG를 첨가하지 않고 MFS와 유제품의 종류 및 발효시간에 따라 1차 발효를 하였다. 우유, 10% MFS, 전지분유 및 탈지분유에 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 스타터 1%를 접종하고, 12시간까지 3시간 간격으로 발효하였다.

[0047] 발효물의 pH는 초기 pH 탈지분유의 6.01에서 전지분유 12시간 발효시 6.67까지 증가하였으며, 발효시간이 짧아서 pH의 변화는 크게 나타나지 않았다(표 4). 타이로신 함량은 12시간 발효 시 탈지분유가 198.71±2.71 mg%로 가장 높게 나타났으며(표 5), 우유에서는 3시간째, 전지분유 및 탈지분유는 6시간째 발효물의 쓴맛이 나타났다. 타이로신 함량의 증가와 함께 발효물의 쓴맛이 나타나는 것을 보아 단백질 가수분해로 인한 펩티드 생성의 증가로 쓴맛이 나타나는 것으로 보인다.

[0048] 프로테아제(protease) 활성은 우유가 24.63±4.83 unit/mL로 나타났다(표 6). 가공된 분말인 10% 전지분유와 탈지분유의 발효 시간에 따른 가수분해 정도를 알아보기 위해서 SDS-PAGE로 확인하였다. 10% 전지분유와 탈지분유

모두 30 kDa의 분자량은 보였으나 3시간 발효시 모두 분해되어 12 kDa 정도의 분자량이 남아있는 것을 볼 수 있었고, 6시간부터 전지분유가 탈지분유보다 저분자의 단백질이 더 많이 분해된 것을 볼 수 있다(도 3).

표 4

[0049] 발효시간과 유제품의 종류에 따른 pH 변화

	발효 시간(Fermentation Time; hr)				
	0	3	6	9	12
MFS	6.37±0.03	5.92±0.05	5.38±0.01	5.21±0.08	5.47±0.29
우유	6.65±0.04	6.54±0.01	6.5±0.03	6.54±0.01	6.65±0.1
전지분유	6.28±0.01	6.37±0.01	6.46±0.02	6.46±0.01	6.67±0.01
탈지분유	6.01±0.01	6.16±0.01	6.27±0.01	6.25±0.04	6.47±0.02

표 5

[0050] 발효시간과 유제품의 종류에 따른 타이로신 함량(mg%)

	발효 시간(Fermentation Time; hr)				
	0	3	6	9	12
MFS	41.68±0.9	51.12±1.96	52.92±1.24	58.63±0.24	67.72±0.52
우유	4.66±0.27	51.42±0.49	141.48±6.23	167.14±0.8	173.09±5.22
전지분유	8.82±0.1	37.78±0.26	146.73±4.3	149.29±4.91	155.57±8.31
탈지분유	17.1±0.05	38.12±1.39	181.13±6.38	194.36±0.05	198.71±2.71

표 6

[0051] 발효시간과 유제품의 종류에 따른 프로테아제(protease) 활성(unit/mL)

	발효 시간(Fermentation Time; hr)				
	0	3	6	9	12
MFS	-	-	-	1.33±0.30	2.21±0.51
우유	-	-	10.46±1.41	15.83±0.5	24.63±4.83
전지분유	-	0.33±0.01	11.84±0.75	13.59±0.01	13.10±0.62
탈지분유	-	1.3±0.61	7.63±0.79	10.83±0.9	13.35±0.9

[0052] (4) 유제품의 발효시간에 1차 발효의 최적화

[0053] 유단백질의 가수분해 정도를 조절하기 위해서 발효시간을 6시간까지 줄여 1%의 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)를 이용한 1차 발효를 하였다. 발효물의 pH는 초기 pH와 큰 차이를 보이지 않았으며(표 7), 타이로신 함량은 6시간 발효 시 우유 159.12 mg%, 탈지분유 156.74 mg%, 전지분유 134.4 mg%까지 증가하였으며, 초기 타이로신에 비해 우유가 3시간 후 발효물의 타이로신 함량의 증가율에 높아지는 것을 알 수 있다(표 8, 도 4). 10% 전지분유의 발효시간에 따른 가수분해 정도를 SDS-PAGE로 확인한 결과 25, 35 kDa의 분자량이 발효 1시간에 모두 가수분해된 것을 확인할 수 있다(도 5).

표 7

[0054] 유제품의 발효시간에 따른 pH 변화

	발효 시간(Fermentation Time; hr)						
	0	1	2	3	4	5	6
전지분유	6.41	6.4	6.41	6.52	6.61	6.75	6.77
탈지분유	6.36	6.31	6.31	6.37	6.41	6.31	6.35
우유	7.04	6.64	6.91	6.8	6.79	6.67	6.72

표 8

[0055] 유제품의 발효시간에 따른 타이로신 함량(mg%)

	발효 시간(Fermentation Time; hr)						
	0	1	2	3	4	5	6
전지분유	9.20 ±0.05	15.01 ±1.52	17.35 ±2.02	25.88 ±4.19	67.4 ±5.21	132.83 ±7.7	134.4 ±0.51
탈지분유	12.78 ±0.01	32.58 ±0.01	24.11 ±0.05	28.44 ±0.01	45.10 ±0.01	100.03 ±0.07	156.74 ±1.12
우유	4.11 ±0.02	30.64 ±0.01	41.7 ±0.02	107.1 ±0.03	152.5 9±0.05	162.58 ±0.01	159.12 ±5.36

[0056] (5) 우유의 가수분해 정도에 따른 SDS-PAGE 분석

[0057] 도 4에서 우유가 3시간 내로 젤(gel)에서 모두 분해된 결과를 토대로, 우유의 단시간 내 가수분해 정도를 비교하고자 30, 60, 120, 180분 간격으로 고초균 발효를 하였다. pH는 초기 pH와 큰 차이를 보이지 않았고, 180분에 8.68×10^{7} CFU/mL의 생균수를 나타냈다. 타이로신은 발효 전 5.88 mg%에서 3시간 후에 15.72 mg%으로 나타났다(표 9). SDS-PAGE를 이용한 우유의 가수분해를 비교해보면, 발효시간 30분 후에 25, 35 kDa의 분자량이 대부분 가수분해된 것으로 보아, 우유는 단시간에 단백질 가수분해율이 높은 것을 확인할 수 있었다(도 6).

표 9

[0058] 우유의 발효시간에 따른 이화학적 평가

	발효 시간(Fermentation Time; hr)				
	0	30	60	120	180
pH	6.61	6.63	6.59	6.54	6.55
생균수 (Cell Viable) (CFU/mL)	-	7.98×10^{6}	7.33×10^{6}	2.01×10^{7}	8.68×10^{7}
타이로신 함량 (mg%)	5.88±0.01	11.78±2.99	11.62±0.88	12.14±0.43	15.72±1.1

[0059] **< 실시예 3 > 우유와 탈지분유의 2차 발효**

[0060] (1) GABA 함량 측정

[0061] TLC 전개는 사각 챔버(chamber) (30×25×10 cm)에서 수행하고, 실리카겔(silica gel) TLC plate는 10×20 cm의 크기로 잘라서 사용하였다. GABA 생성능 비교를 위한 표준(standard)으로 GABA 0.25, 0.5, 1, 5 μL를 사용하였다. 전개용매는 n-부틸 알코올(n-butyl alcohol) : 빙초산(acetic acid glacial) : 증류수(distilled water)를 3:1:1의 비율로 혼합하여 실온에서 4시간 이상 포화시켰다. 각 샘플은 TLC plate의 끝에서 20 mm 되는 위치에 2 μL를 점적하였고, 샘플 간격은 15 mm를 유지하였다. 점적 후 TLC plate의 샘플을 건조시킨 후 전개하고, 전개가 끝난 TLC plate는 건조시킨다. 건조된 TLC plate에 발색시약 0.2% 닌하이드린(ninhydrin)을 뿌리고, 100℃ 오븐에서 5-10분 동안 발색 시킨 후 GABA 스팟(spot)을 확인하였다.

[0062] (2) 우유와 탈지분유를 이용한 2차 발효

[0063] 우유와 탈지분유에 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)를 이용하여 1차 발효를 한 후, 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)를 이용하여 2차 젖산 발효로 요거트(yogurt)를 생산하였다. 0-6시간까지 1시간 간격으로 42℃에서 고초균 발효(1차 발효)를 하고, 1일 간격으로 3일까지 30℃에서 젖산발효(2차 발효)를 하였다. 2차 발효가 진행되면서 우유와 탈지분유의 pH가 4.22, 4.37까지 감소하고, 산도가 1.36, 1.21%까지 증

가하였다(도 7). 1차 발효시간의 증가함에 따라 타이로신 함량이 초기 4.11, 12.78 mg%에서 159.12, 156.74 mg%까지 증가하고, 2차 발효 따른 타이로신 함량의 증가는 미비하였다(도 8). 발효물의 GABA 생성능을 TLC를 이용하여 측정하였다. 우유와 10% 탈지분유(skim milk)를 이용하여 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)로 1차 발효를, 락토코커스 락티스 YC(*Lactococcus lactis* YC)로 2차 발효를 한 결과(도 9 및 도 10), 모두 2차 발효 시간이 증가할수록 GABA 생성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 1차 발효 시간이 증가할수록 GABA 생성은 0.5 μg/mL로 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)로 인한 가수분해에 의해 GABA 생성량이 증가하는 것을 확인하였다.

수탁번호

[0064]

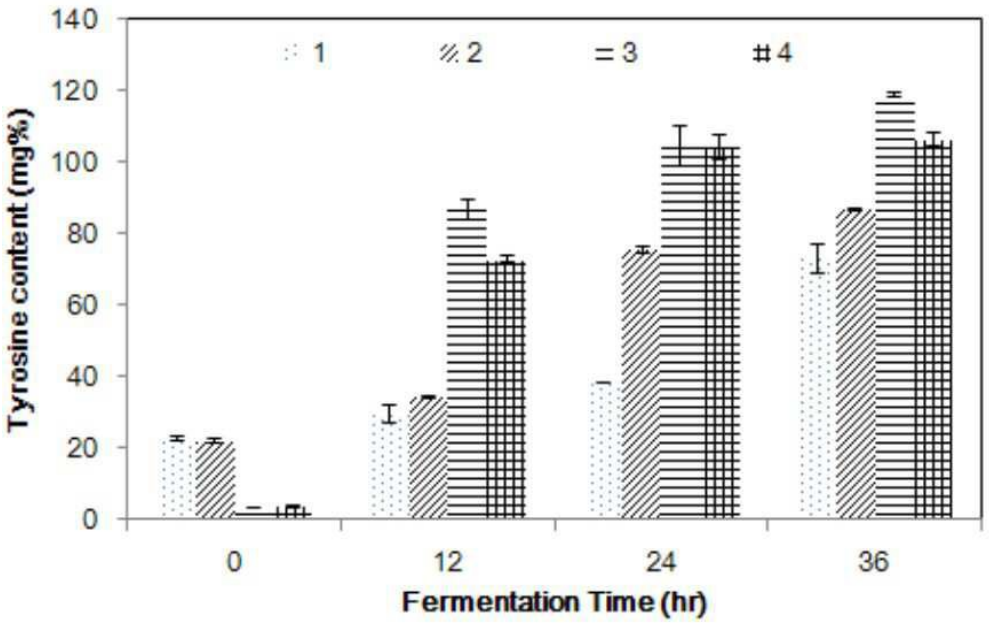
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11297P

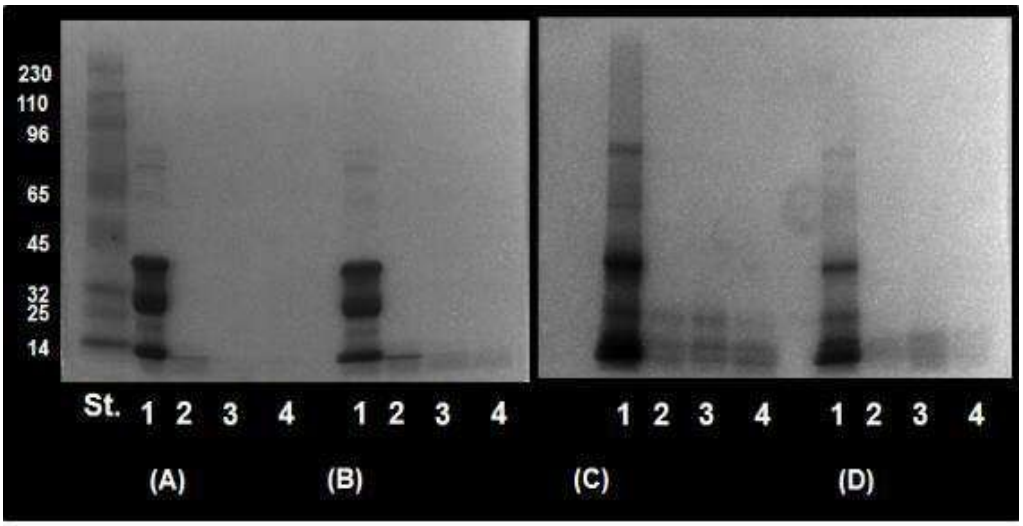
수탁일자 : 20120829

도면

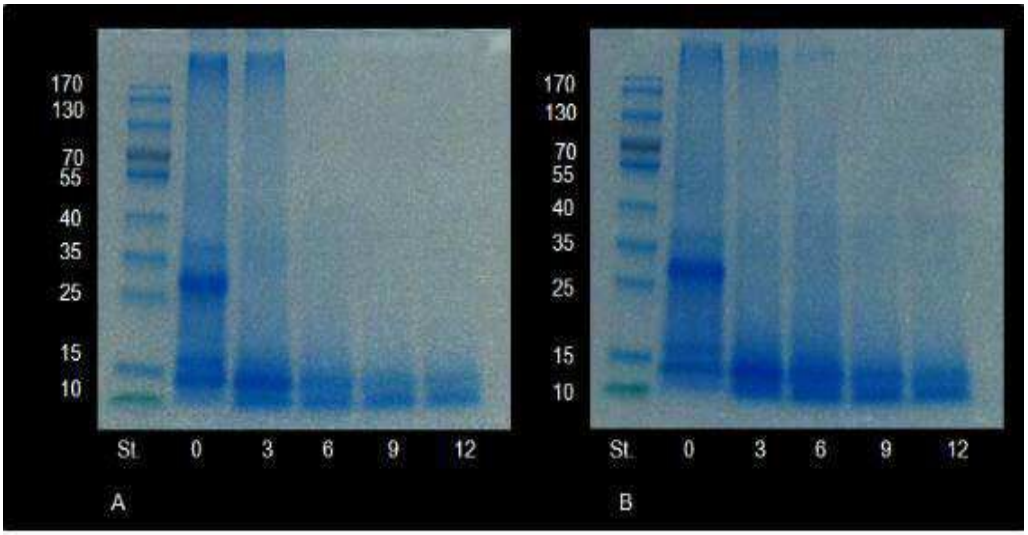
도면1



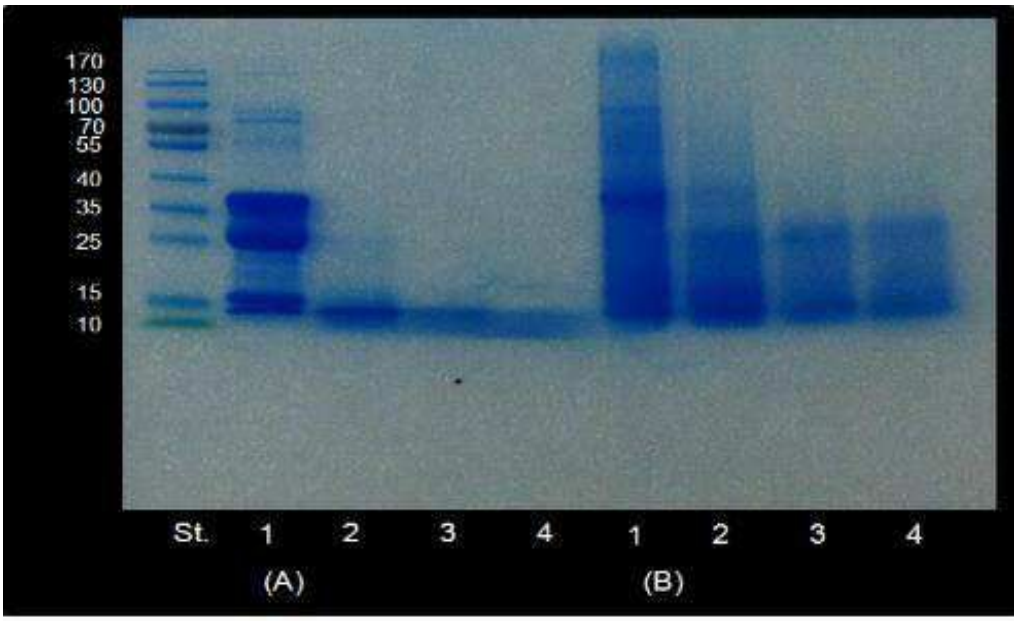
도면2


230
110
96
65
45
32
25
14
St. 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
(A) (B) (C) (D)

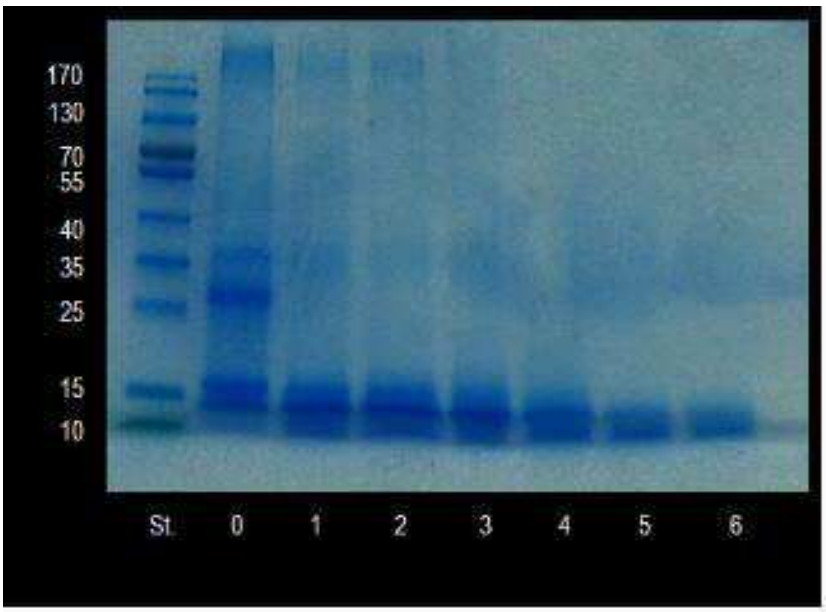
도면3


170
130
70
55
40
35
25
15
10
St 0 3 6 9 12
A
170
130
70
55
40
35
25
15
10
St 0 3 6 9 12
B

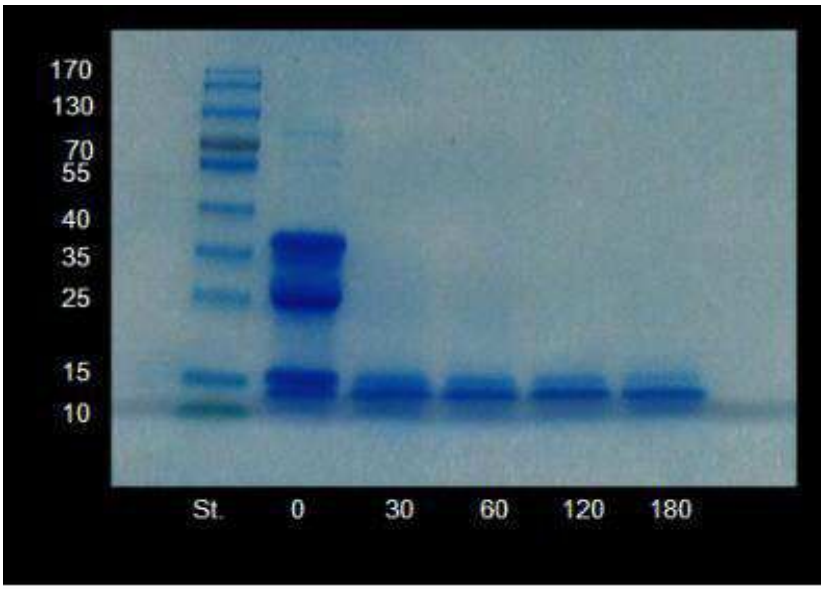
도면4


170
130
100
70
55
40
35
25
15
10
St.
1
2
3
4
1
2
3
4
(A)
(B)

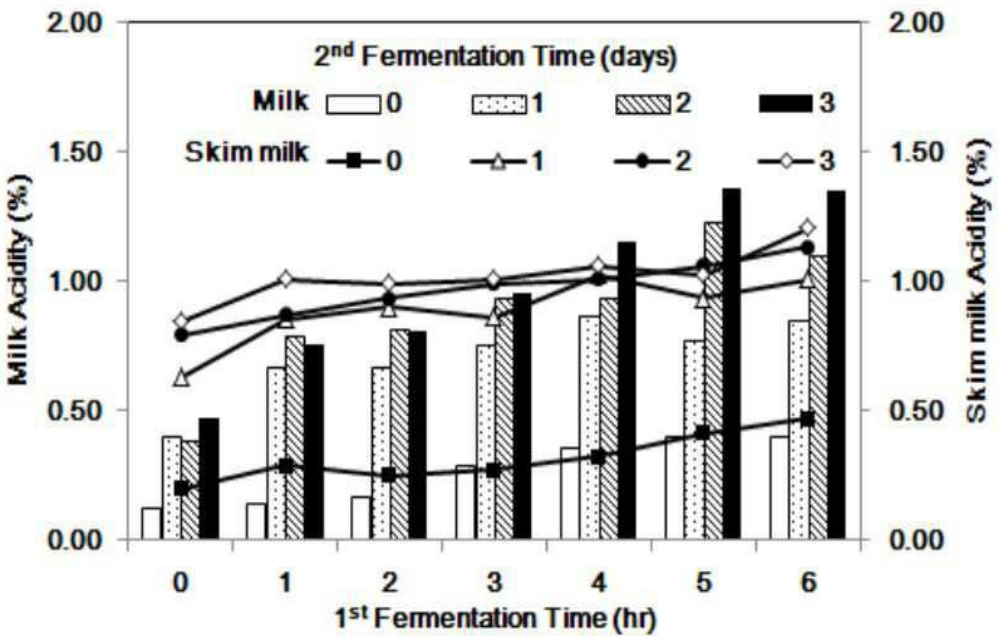
도면5


170
130
70
55
40
35
25
15
10
St
0
1
2
3
4
5
6

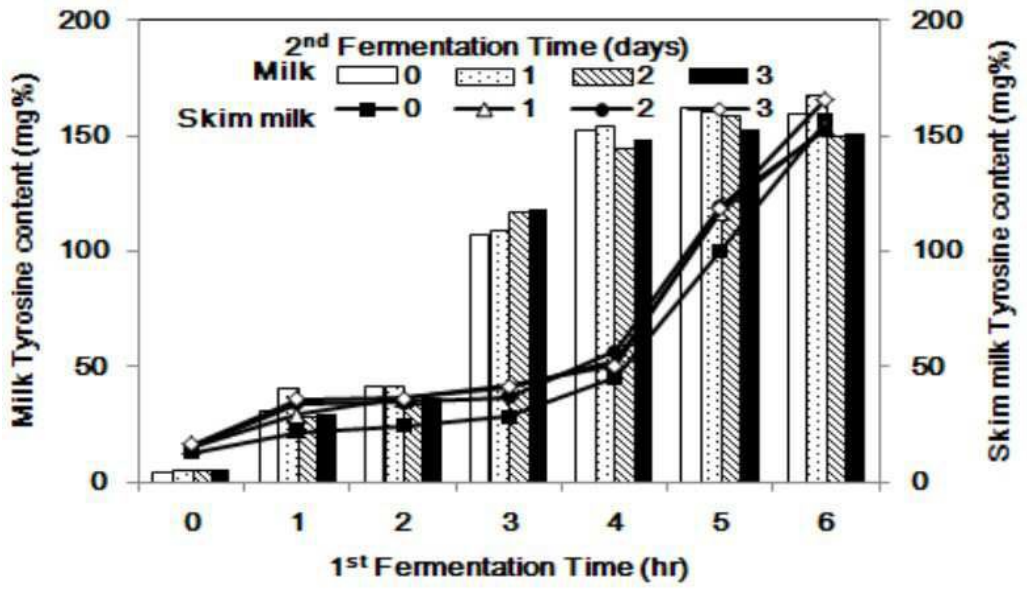
도면6


170
130
70
55
40
35
25
15
10
St.
0
30
60
120
180

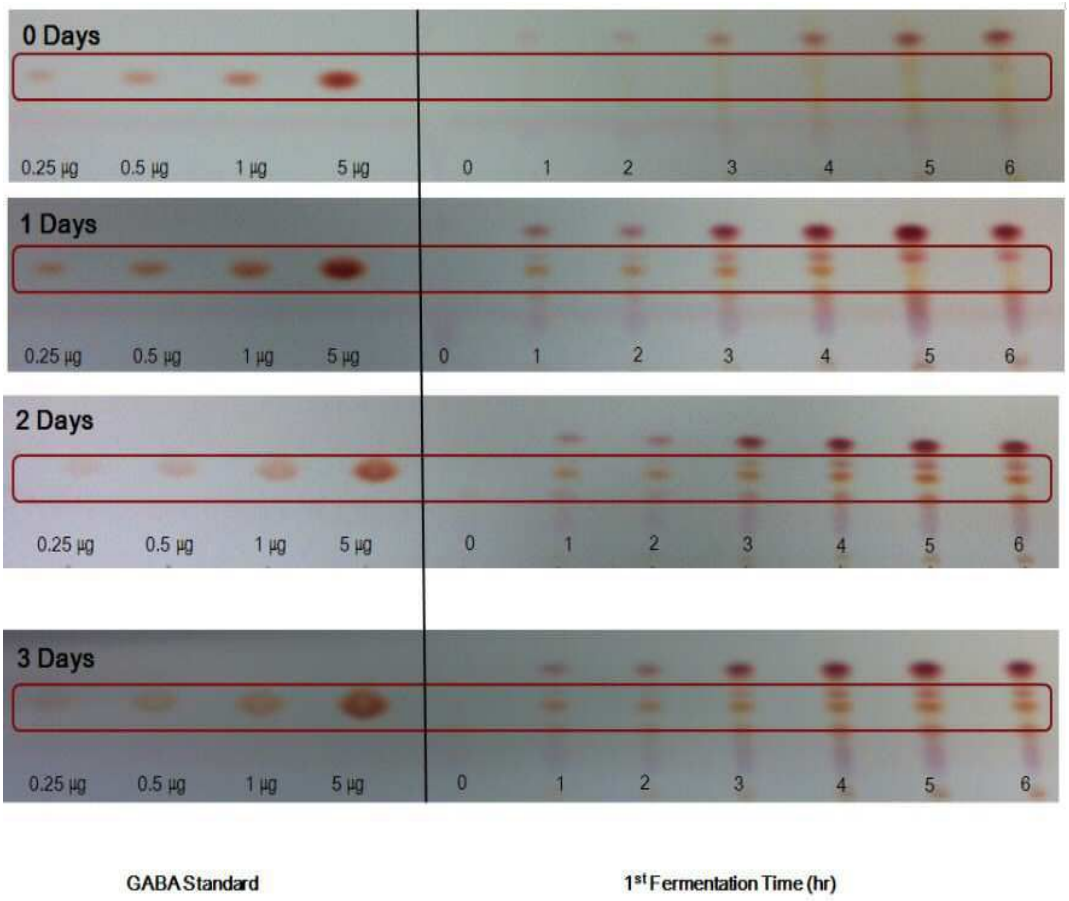
도면7


2nd Fermentation Time (days)
Milk 0 1 2 3
Skim milk 0 1 2 3
Milk Acidity (%)
Skim milk Acidity (%)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
0 1 2 3 4 5 6
1st Fermentation Time (hr)

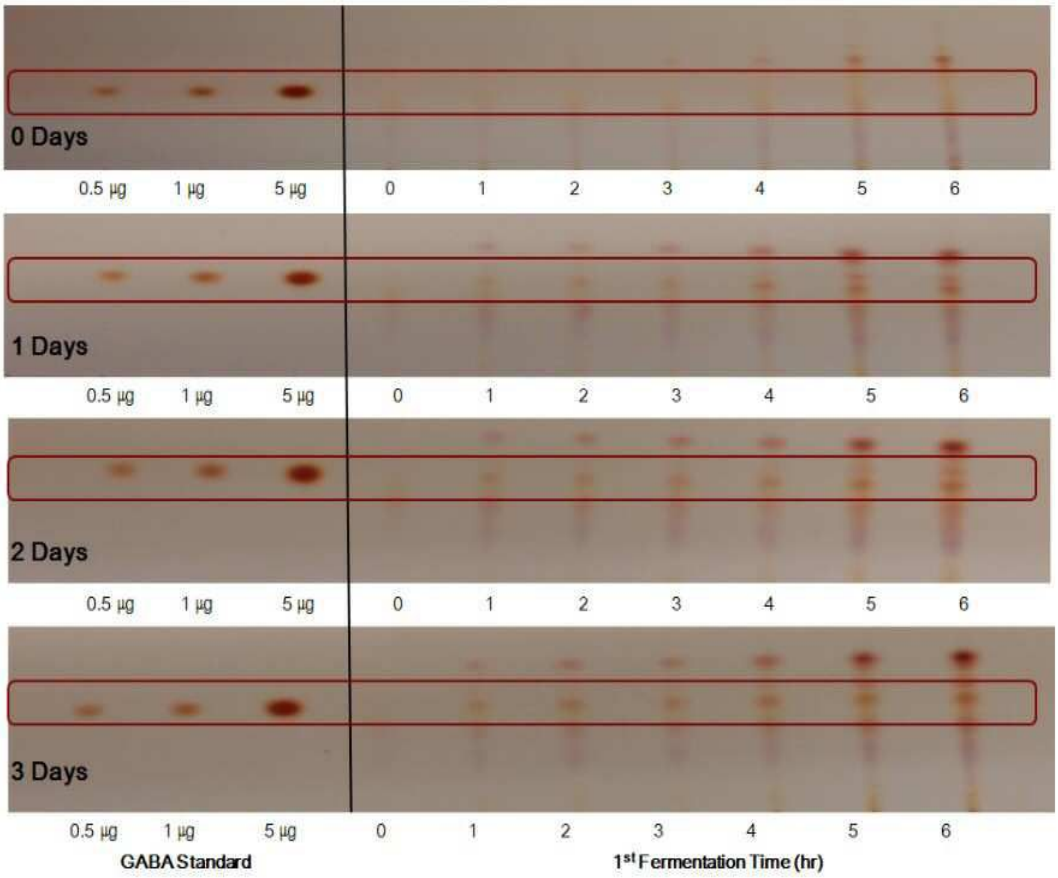
도면8


2nd Fermentation Time (days)
Milk 0 1 2 3
Skim milk 0 1 2 3
Milk Tyrosine content (mg%)
Skim milk Tyrosine content (mg%)
200
150
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6
1st Fermentation Time (hr)

도면9


0 Days
1 Days
2 Days
3 Days
0.25 μg
0.5 μg
1 μg
5 μg
0 1 2 3 4 5 6
GABA Standard
1st Fermentation Time (hr)

도면10


0 Days
1 Days
2 Days
3 Days
0.5 μg
1 μg
5 μg
0
1
2
3
4
5
6
GABA Standard
1st Fermentation Time (hr)