

Research Article

## $\gamma$ -Aminobutyric Acid 생산 유산균을 이용한 기능성 발효 두유 제조

한민희<sup>1</sup> · 양정모<sup>1</sup> · 주영철<sup>2</sup> · 문기성<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>한국교통대학교 생명공학전공, <sup>2</sup>바이셀

## Production of Functional Fermented Soymilk by $\gamma$ -Aminobutyric Acid Producing Lactic Acid Bacteria

Min-Hui Han<sup>1</sup>, Jeong-Mo Yang<sup>1</sup>, Young-Chul Joo<sup>2</sup> and Gi-Seong Moon<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Korea National University of Transportation, Jeungpyeong 27909, Korea, <sup>2</sup>Vicell, Chungbuk 28041, Korea



Received: Dec. 3, 2019  
Revised: Dec. 17, 2019  
Accepted: Dec. 19, 2019

\*Corresponding author :  
Gi-Seong Moon  
Department of Biotechnology,  
Korea National University of  
Transportation, Jeungpyeong  
27909, Korea.  
Tel: +82-43-820-5251,  
E-mail: gsmoon@ut.ac.kr

### ORCID

Min-Hui Han  
<https://orcid.org/0000-0001-5681-1863>  
Jeong-Mo Yang  
<https://orcid.org/0000-0002-1984-7311>  
Young-Chul Joo  
<https://orcid.org/0000-0001-9184-2745>  
Gi-Seong Moon  
<https://orcid.org/0000-0003-3033-5250>

### Abstract

Soymilk has been substituted for milk for people who are suffering from lactose-intolerance. In this study  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacterium, *Lactobacillus plantarum* LP2, was applied to ferment soymilk for improving its functionality. GABA production was proved in MRS broth supplemented 3% monosodium glutamate (MSG) and soymilk including 10% (w/v) soymilk powder and 5%(w/v) fructooligosaccharide where *L. plantarum* LP2 was applied. In addition to the soymilk, isolated soy protein (ISP), which was enzyme-treated, was added to it for improving the content of free amino acids including glutamic acid. *L. plantarum* LP2 was well grown and produced GABA in the soymilk medium.

### Keywords

soymilk, GABA, *Lactobacillus plantarum*, glutamic acid, fermentation

## 서론

최근, 장내미생물과 함께 프로바이오틱스(Probiotics)균주에 대한 관심이 높아지고 있다. 장내미생물은 뇌와 상호작용을 하며 다양한 대사질환, 질병들에 연관되어 있으며, 이를 과학적으로 규명하고자 많은 연구들이 진행되고 있다(Sarkar *et al.*, 2016). 프로바이오틱스는 장내미생물의 균형을 잡아주며 혈중 콜레스테롤의 감소, 과민성대장증후군의 개선, 항암작용, 혈압조절 등 인체에 유익한 작용을 한다(Speck, 1976; Gilliland, 1989; Salminen and Tanaka, 1995; Amara and Shibl, 2015; Lee *et al.*, 2015). 프로바이오틱스는 *Lactobacillus* 속(genus)과 *Bifidobacterium* 속 등 유산균이 대부분이다. 유산균은 장까지 도달함과 동시에 정착능이 우수하며, 장내미생물과의 상호작용으로 인체 건강에 도움을 준다. 또한 오랜 기간 인간이 섭취해 온 균주로서 안전성이 입증되었으며, 다양한 발효식품의 주요 균종으로서 맛에도 기여한다.

$\gamma$ -Aminobutyric acid(GABA)는 비단백질성의 아미노산으로 신경계, 혈액 속에 함유되어 있으며, 대

부분은 뇌의 골수에 존재한다. L-Glutamate의 탈탄산반응에 의해 만들어지며, glutamate decarboxylase(GAD)가 GABA 합성을 촉매한다. GABA는 신경전달물질인 아세틸콜린을 증가시키며, 뇌 대사기능을 촉진시키는 생리작용을 한다. 이외에도 항산화 작용, 성장호르몬의 분비조절, 통증 완화, 혈압 저하 등 많은 기능을 가지고 있다(Krogsgaard-Larsen 1989; Chang *et al.*, 1992; Light, 1992; Almond *et al.*, 1996; Shelp *et al.*, 1999; Kayahara, 2001; Park *et al.*, 2002; Leventhal *et al.*, 2003). 그런 이유로 GABA는 기능성 소재로서 가치가 있으며, 다양한 식품에 함유되어 판매된다. GABA는 일반식품에도 미량 존재하지만, 효능을 보기에는 부족하다(Oh, 2003). 따라서 GABA 생성 유산균을 적용하여 GABA 함량이 증가된 발효식품 등의 개발이 활발히 진행되고 있다(조석철 등, 2012). 특히 유산균 중 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* 속 등이 GABA를 생산한다고 알려져 있다(Dhakal *et al.*, 2012).

두유는 유당불내증 및 우유 알레르기를 가지고 있는 사람들에게 우유 대체품으로 사용되어 왔다. 두유는 우유와 유사한 탄수화물, 지방, 단백질의 비율을 가지고 있으면서 다양한 기능성 성분이 함유되어 있다(손동화, 1997). 그 중 가용성 식이섬유 및 콩 올리고당은 변비, 대장암에 효과가 있으며(승정자, 1995), 토코페롤 및 리놀렌산은 심장병 예방과 함께 항암효과를 갖는다(Swern, 1987; Yeo, 1995). 그리고 생리활성 펩타이드는 혈압 강하 및 면역 활성 기능을 가지고 있다(손동화, 1997). 본 연구의 목적은 GABA를 생성하는 유산균을 이용하여 기능성 발효 두유를 개발하는 것이다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 재료

본 연구에서 사용된 두유 분말, 분리대두단백(ISP), 프럭토올리고당, 결정과당은 ㈜바이셀(괴산, 한국)에서 제공받아 사용하였으며, 단백질 분해효소는 아피스바이오켄 사(社)의 Protamex(100g), Flavourzyme 500MG(100g)를 사용하였다. GABA 생성 균주는 선행연구를 통하여 자연치즈에서 분리한 *Lactobacillus plantarum* LP2 균주를 사용했으며, 생육배지로 MRS broth(BD, Sparks, MD, USA)를 사용하였다. 균주는 -75°C 초저온냉동고(㈜일신바이오베이스, 동두천, 한국)에 보관하면서 실험에 사용하기 전에 2회 이상 계대배양하여 활성화시킨 후 사용하였다.

### *L. plantarum* LP2 균주의 GABA 생성능 확인

*L. plantarum* LP2 균주의 GABA 생성능 확인을 위해 MRS broth(BD)에 Monosodium glutamate(MSG, Sigma-Aldrich,

USA)를 3% 첨가한 후 멸균하여 사용하였으며, 이에 균주를 1%(v/v) 접종하고 37°C에서 0, 24, 48시간 배양한 후 배양액을 취해 원심분리(13,000rpm, 5분)하고, 상등액을 주사여과(0.45µm; ANYLAB)하여 시료로 사용하였다. GABA 분석은 박층크로마토그래피(thin layer chromatography; TLC)법으로 수행하였으며, silica gel 60 F<sub>254</sub> TLC plate(10×20cm)(MACHEREY-NAGEL, Duren, Germany)를 사용하였다. 전개용매는 n-부탄올: 아세트산: 물을 4:1:1 (v/v/v) 비율로 혼합하여 사용하였으며, 2시간의 전개 후 TLC plate를 80°C에서 15분간 건조하였다. 이 과정을 1회 더 반복하였다. 이후 0.2% ninhydrin 용액(에탄올 용해)에 넣고 10분간 건조한 후 GABA 표준물질(Sigma-Aldrich)의 위치와 비교하였다.

### 두유에서 *L. plantarum* LP2의 GABA 생성능 확인

3% MSG가 함유된 MRS 배지에서 GABA 생성능이 확인된 *L. plantarum* LP2 균주가 두유에서 GABA를 생성하는지 확인하였다. 두유 분말(10%, w/v)과 프럭토올리고당(5%, w/v)을 이용하여 두유를 제조한 뒤, 85°C, 30분 조건에서 살균하였다. 이에 *L. plantarum* LP2 균주를 최종농도 1%(v/v)로 접종한 후 경시적(0, 12, 24, 48, 72시간)으로 생균수, pH 및 GABA 생성능을 확인하였으며, 생균수 및 pH 측정은 3반복 실험을 수행하여 평균값으로 나타내었다.

### 분리대두단백(ISP) 분해

GABA의 생산량을 높이기 위하여 유리 아미노산의 확보 차원에서 ISP를 단백질분해효소로 처리하였다. Cha와 Yoon의 방법(Cha and Yoon, 1993)을 변형하여 ISP(8%, w/v)와 결정과당(2%, w/v) 용액(200mL)에 단백질 분해효소(Protamex, Flavourzyme)를 첨가한 후 항온수조(50°C, 100rpm)에서 반응하였다. 이후 항온수조의 조건(80°C, 10분)을 변경하여 효소를 불활성화시켰다. 단백질의 분해 정도를 확인하기 위하여 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 수행하였다.

### 기능성 발효 두유 제조

기능성 발효 두유를 제조하기 위하여 두유분말, 효소처리 ISP, 프럭토올리고당, 결정과당을 적절한 농도로 첨가하여 두유를 제조한 후 *L. plantarum* LP2 균주를 접종하였다. 이후 경시적(0, 24, 48시간)으로 생균수 및 pH를 측정하였으며, 시료를 취해 원심분리(13,000rpm, 5min)하고 그 상등액을 주사여과(0.45µm; ANYLAB)한 후 동결건조하여 TLC 분석을 수행하였다. 생균수 및 pH 측정

은 3반복 실험을 수행하여 평균 값으로 나타내었다.

## 결 과

### *L. plantarum* LP2 균주의 GABA 생성능 확인

MRS 배지와 3%(w/v) MSG가 첨가된 MRS 배지에 *L. plantarum* LP2를 1%(v/v) 접종한 뒤 37°C에서 배양하면서 경시적(0, 24, 48 시간)으로 GABA의 생성능을 TLC 분석으로 확인하였다. 그 결과, MSG 무첨가 배지에서는 GABA가 확인되지 않은 반면, MSG가 첨가된 배지에서는 GABA가 확인되어 사용한 *L. plantarum* LP2 균주가 MSG를 활용하여 GABA를 생산하는 능력이 있는 것으로 확인되었다(Fig. 1).

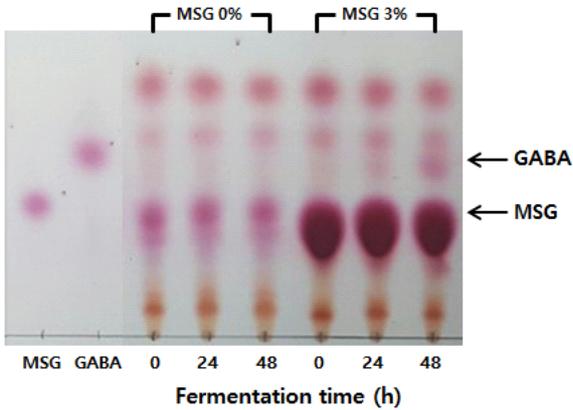
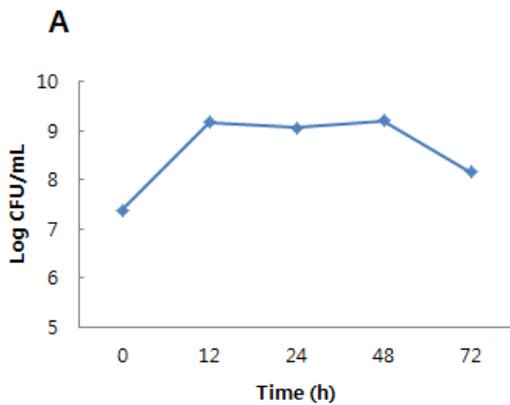


Fig. 1. Thin layer chromatography of samples from fermentation of *Lactobacillus plantarum* LP2 cultured in MRS broth supplemented with 3% monosodium glutamate (MSG) or not. GABA, γ-aminobutyric acid.



### 두유에서 *L. plantarum* LP2의 GABA 생성능 확인

두유 분말(10%, w/v)과 프럭토올리고당(5%, w/v)이 함유된 두유에 *L. plantarum* LP2 균주를 접종한 후 37°C에서 배양하면서 경시적으로 생균수와 pH를 측정하였을 때, 12시간째에 정상기 (stationary phase)에 도달하여 9.2 Log CFU/mL의 생균수를 나타냈으며, 24시간째 pH는 3.7까지 떨어졌으며 이후 유지되었다 (Fig. 2). 또한 TLC 분석 결과, 미미하지만 경시적으로 GABA 함량이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 3).

### 분리대두단백(ISP) 분해

유리 아미노산의 확보를 위해 ISP를 상업적 효소를 활용하여 분해하였다. 분해 정도는 SDS-PAGE를 통하여 확인하였다. 그 결과,

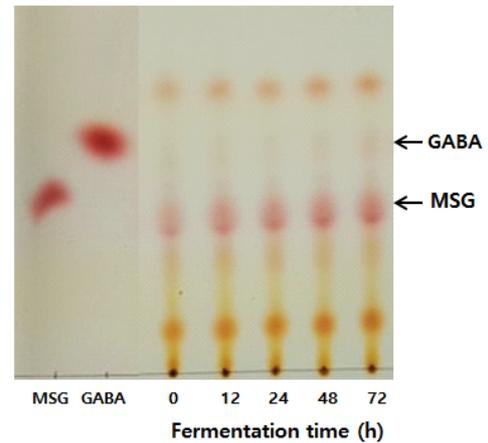


Fig. 3. Thin layer chromatography of samples from fermentation of *Lactobacillus plantarum* LP2 cultured in soymilk medium including 10% soy powder and 5% fructooligosaccharide.

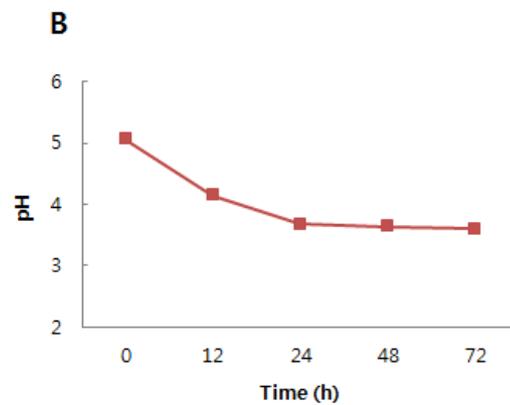


Fig. 2. Viable cell count (A) and pH (B) during fermentation of *L. plantarum* LP2 in soymilk medium including 10% soy powder and 5% fructooligosaccharide.

Flavourzyme은 3시간 반응 시 완전히 분해되는 반면, Protamex는 처리 후 즉시 ISP가 완전히 분해되는 것으로 확인되어 Protamex의 효율이 훨씬 우수한 것으로 나타났다(Fig. 4).

### 기능성 발효 두유 제조

두유분말, 효소처리 ISP, 프럭토올리고당, 결정과당을 적절한 농도로 첨가하여 두유를 제조한 후 *L. plantarum* LP2 균주를 접종하였다. 37°C에서 배양하면서 경시적으로 생균수와 pH를 측정하고, 24시간째 정상기에 도달하여 9.3 Log CFU/mL의 생균수를 나타냈으며, pH는 24시간째 4.2까지 떨어졌으며 이후 유지되었다(Fig. 5). GABA 함량의 경우, 두유 자체에서는 GABA가 검출되지

않았지만 *L. plantarum* LP2 균주로 발효한 두유의 경우 경시적으로 GABA 함량이 증가되었다(Fig. 6).

### 고찰

선행연구를 통하여 분리한 *L. plantarum* LP2 균주는 MSG 3% (w/v)가 함유된 MRS broth와 두유에서 GABA 생성능이 확인되었다. 이 균주를 활용하여 기능성 발효 두유를 제조하였으며, 제조 과정 중에 경시적으로 시료를 취하여 생균수, pH, GABA 함량을 분석한 결과, 생균수의 경우 24시간째 9.3 Log CFU/mL에 도달하였고, pH는 동시간대에 4.2까지 떨어져 균의 성장이 활발하게

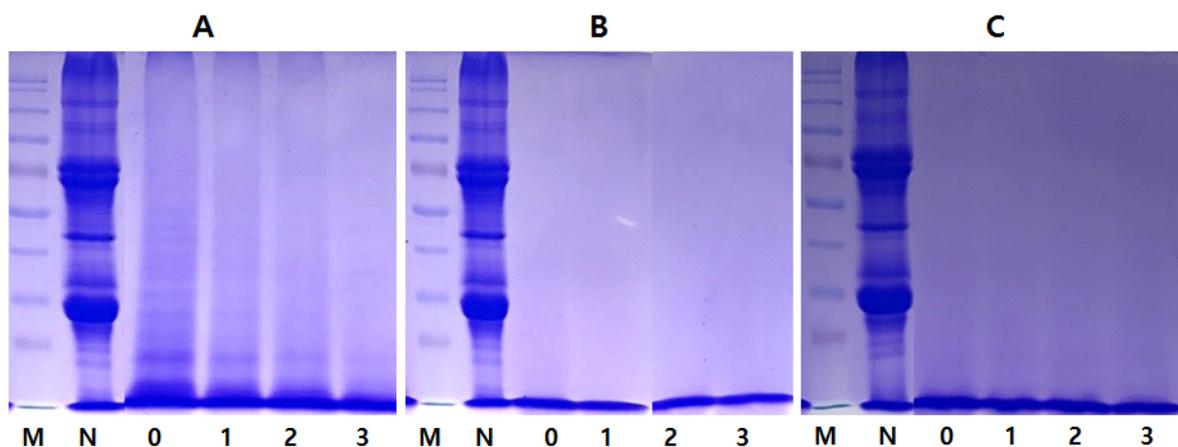


Fig. 4. Protein profiles of digested isolated soy protein (ISP) by enzymes Flavourzyme and Protamex on SDS-PAGE gels. A, Flavourzyme (0.2%); B, Protamex (0.2%); C, Flavourzyme (0.1%) + Protamex (0.1%). M, size marker; N, no treatment; 0, just after treatment; 1-3, 1-3 h after treatment.

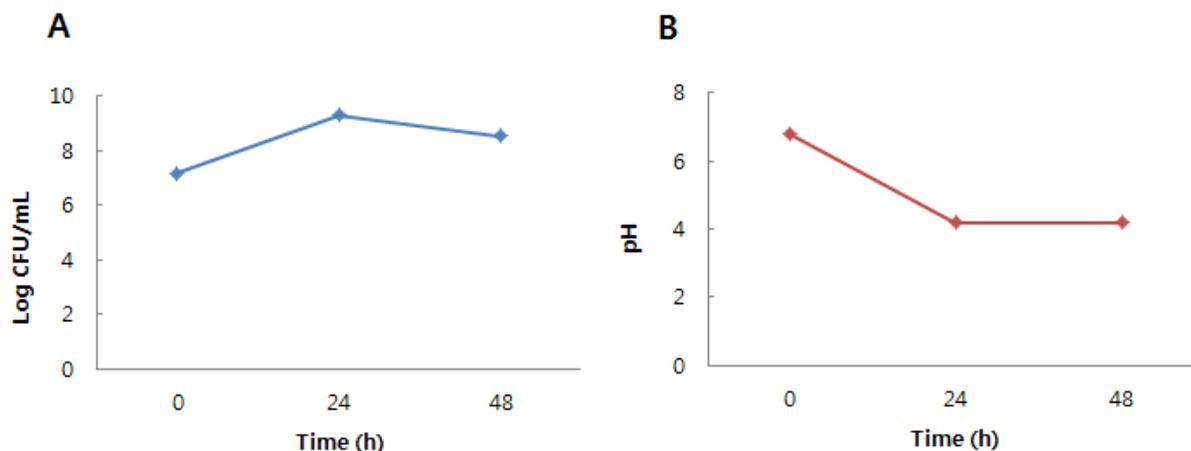
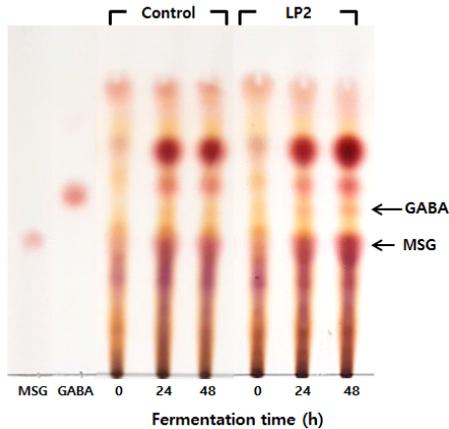


Fig. 5. Viable cell count (A) and pH (B) during fermentation of *L. plantarum* LP2 in the modified soymilk medium including soy powder, ISP, fructooligosaccharide, and fructose.



**Fig. 6.** Thin layer chromatography of samples from fermentation of *Lactobacillus plantarum* LP2 cultured in the modified soymilk medium including soy powder, ISP, fructooligosaccharide, and fructose. MSG, monosodium glutamate; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; Control, no inoculation; LP2, *L. plantarum* LP2 strain was inoculated.

이루어졌으며 GABA 함량의 경우 경시적으로 증가하는 것이 확인되었다.

지금까지 유산균의 발효능력을 활용한 건강기능성 식품의 개발은 활발하게 이루어지고 있으며, 주로 *Lactobacillus* 속, *Leuconostoc* 속 등이 사용되고 있다(이갑량, 2009). 이러한 발효과정을 통하여 향산화, 항암, 정장기능 등의 건강기능성 물질들이 생산된다. 본 연구에서는 뇌기능 촉진, 성장호르몬의 분비조절, 통증완화 등의 기능성을 갖는 GABA 생성능 유산균을 두유에 접목하여 GABA 함유 기능성 발효 두유를 개발하고자 하였다. 콩 단백질에는 알라닌, 아스파르트산, 글리신 등 다양한 아미노산이 존재하며, 특히 GABA의 전구체로 사용되는 글루탐산이 다량 함유되어 있다(Jeong et al., 2006; Choi and Rho, 2013). 따라서 두유는 GABA 생산의 좋은 원료가 될 수 있으며, 본 연구를 통해 GABA 생성능의 유산균이 발효균주로 사용될 경우 GABA가 함유된 기능성 발효 두유가 생산될 수 있음을 확인하였다. 향후 원료 및 발효조건 등의 변화를 통하여 GABA 함량이 강화된 발효 두유를 개발할 예정이다.

## 감사의 글

본 논문은 중소기업청에서 지원하는 2017년도 기술개발사업(No. C0489862)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

## References

1. Almond JR, Westrum LE, and Henry MA (1996) Post-

embedding immunogold labeling of gamma-aminobutyric acid in lamina II of the spinal trigeminal subnucleus pars caudalis: I. A qualitative study. *Synapse* **24**, 39-47.

2. Amara AA, and Shibl A (2015) Role of probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. *Saudi. Pharm. J.* **23**, 107-114.

3. Cha MH, and Yoon S (1993) Modification of functional properties of soy protein isolate by proteolytic enzymes. *Korean J. Food. Sci. Technol.* **25**, 39-45.

4. Chang JS, Lee BS, and 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.

5. Choi NE, and Rho JS (2013) Nobody not told the Story about Umami and MSG. *Reebook*, Paju, Korea, pp. 25-140.

6. Dhaka IR, Bajpai VK, and Baek KH (2012) Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.* **43**, 1230-1241.

7. Gilliland SE (1979) Beneficial interrelationships between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food. Prot.* **42**, 164-167.

8. Gilliland SE (1989) Acidophilus milk products: A review of potential benefits to consumers. *J. Dairy. Sci.* **72**, 2483-2494.

9. Goldin BR (1998) Health benefits of probiotics. *Br. J. Nutr.* **80**, 203-207.

10. Jeong DH, Lee HC, Shim, SK, and Han BR (2006) *Fermented Soy Paste*. Hongikjae, Seoul, Korea, 500-502.

11. Kayahara H (2001) Recent studies on biological functions of GABA-On improvements of hypertension and brain function. *Food Processing and Ingredients* **36**, 4-6.

12. Krosggaard-Larsen P (1989) GABA receptors. In: *Receptor Pharmacology and Function*. Williams M, Glennon RA, Timmermans PMWM.

13. Lee SH, Kim YH, Kim MG, Kang JH, and Kang DJ



- (2015) Cholesterol lowering effect of *Enterococcus faecium* ID9201 isolated from breast milk-fed Korean infant. *Current Topic in Lactic Acid Bacteria and Probiotics* **3**, 41-45.
14. Leventhal AG, Wang Y, Pu M, Zhou Y, and Ma Y (2003) GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* **300**, 812-815.
15. Light AR (1992) The Initial Processing of Pain and Its Descending Control: Spinal and Trigeminal Systems. Karger Publishers.
16. Oh SH (2003) Stimulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/ glutamic acid germination solution and calcium/ calmodulin. *BMB Reports* **36**, 319-325.
17. Park JH, Han SH, Shin MK, Park KH, and Li KC (2002) Effect of hypertention falling of functional GABA green tea. *Korean J. Med. Crop. Sci.* **10**, 37-40.
18. Salminen S, and Tanaka R (1995) Annual review on cultured milks and probiotics [*Saccharomyces boulardii*]. *Nutrition Newsletter*.
19. Sarkar A, Lehto SM, Harty S, Dinan TG, Cryan JF, and Burnet PW (2016) Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals. *Trends Neurosci.* **39**, 763-781.
20. Shelp BJ, Bown AW, and McLean MD (1999) Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends. Plant. Sci.* **4**, 446-452.
21. Speck ML (1976) Interactions among lactobacilli and man. *J. Dairy. Sci.* **59**, 338-343.
22. Swern D (1982) Bailey's industrial oil and fat products.
23. Yeo YK (1995) Effects of dietary n-3 fatty acids on glycerophospholipid metabolism with emphasis on ether-linked lipids. *식품과학과 산업* **28**, 58-67.
24. 손동화 (1997) 두유와 우유의 영양 및 생리활성성분. *한국공 연구회지* **14**, 66.
25. 손동화 (1997) 건강기능성 식품 펩타이드 및 그 응용. *식품과 학과 산업* **30**, 22-29.
26. 승정자 (1995) 건강 및 기능성식품: 식이섬유의 생리활성과 이용. *식품과학과 산업* **28**, 2-23.
27. 이갑량 (2009) 유산균과 비피더스균 발효를 이용한 화장품 소재 개발. 한국과학기술정보연구원.
28. 조석철, 김동현, 박장서, 고종호, 변유량, 국무창 (2012) 유산균 발효에 의한 GABA 함유 토마토 페이스트의 생산. *한국식품영양학회지* **25**, 26-31.