

최 종
연구보고서

GABA 생산 젖산균주 선발 및 이를 이용한
발효유 개발 연구

Development of Fermented milk by Lactic
acid bacteria producing GABA

연구기관
한국식품연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “GABA 생산 젓산균주 선발 및 이를 이용한 발효유 개발 연구”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006년 07월 14일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 임 상 동

세부연구책임자 : 차 성 관

연 구 원 : 김 기 성

연 구 원 : 성 기 승

연 구 원 : 김 영 봉

연 구 원 : 오 나 리

요 약 문

I. 제 목

GABA 생산 젖산균주 선발 및 이를 이용한 발효유 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 목적은 원유에서 GABA 생산 젖산균 탐색 및 발굴하여 젖산균 특성 조사와 발효조건을 설정한 다음 발효유를 개발하고 동물실험을 통해 효능이 입증된 제품을 개발하고자 하는데 그 목적이 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 젖산균 분리 및 수집

- Bromcresol purple첨가 Milk agar를 이용 원유에서 젖산균 분리
- 상업균주에서 젖산균 수집
- monosodium glutamate가 첨가된 Skim milk배지를 이용 GABA 생산 젖산균 수집

2. GABA 생산 균주 선발

- Skim milk배지내에 monosodium glutamate를 농도별로 첨가하여 우수한 GABA 생산 균주 선발
- GABA 분석

3. GABA 생산 균주 동정

- 당발효 시험, 현미경관찰, Gram 염색, 호기적 및 혐기적 성장, catalase생성, 15°C 및 45°C에서의 성장, glucose로부터 가스생성, arginine으로부터 ammonia 생성 등의 시험

4. 선발 젖산균의 특성조사

- 젖산균의 성장, 젖산균의 단백질분해, 항생제 내성시험, 효소활성 시험, 담즙내성 시험, pH 내성 시험, 항균력 시험, Glutamate decarboxylase 활성 시험

5. GABA 생산 최적배양조건 설정

- 배지조건 : 환원 탈지유 농도

- monosodium glutamate 농도
- GABA 균주의 첨가량
- 배양조건 : 온도, pH, 시간

6. 최적 배합조성물 개발

- monosodium glutamate를 포함한 발효유에 첨가되는 소재에 대한 기본 Base 설정
- 관능평가에 의한 최적 배합비 설정

7. GABA 생산 균주의 발효조건 설정

- GABA 생산 균주의 첨가량 설정
- 최적 발효온도 및 시간 설정

8. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사

- 제조공정 설정
- GABA 함량 및 이화학 성분 분석

9. 동물실험

- 혈당억제 및 콜레스테롤 억제효과
- 학습능력 실험

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 젖산균 분리 및 수집

가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 북부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소 및 제주도 축산진흥원에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS배지에 Bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37℃에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선발하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 triptic soy agar slant에 37℃에서 18시간 배양한 다음 보관하였다. 이때 1502개의 균주를 분리하였다.

나. 상업균주 수집

한국식품연구원내에서 보관 중인 ATCC, NRRL, NCFB, KFRI 등의 젖산균주 10종과 상업균주(론프랑, Culture System) 4종을 확보하였다.

다. monosodium glutamate가 첨가된 Skim milk베지를 이용 GABA 생산 젖산

균 수집

발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37℃에서 24시간과 48시간 배양하여 응고된 균주가 각각 510개 균주와 1,039개 균주이었다.

2. GABA 생산 균주 선발

분리균주 중 A-56 균주는 GABA 생산량이 1,815.45ppm, A-268 균주는 685.71ppm, A-275 균주는 2,303.76ppm, D-66 균주는 521.02ppm, K-520 균주는 717.64ppm, K-567 균주는 711.40ppm, K-573균주는 1,298.31ppm이었다.

3. GABA 생산 균주 동정

동정된 균주명은 A-56 균주 : *Enterococcus faecium*, A-268 균주 : *Enterococcus faecium*, A-275 균주 : *Enterococcus faecium*, D-66 균주 : *Enterococcus faecalis*, K-520 균주 : *Lactobacillus fermentum*, K-567 균주 : *Lactobacillus crispatus*, K-573 균주 : *Lactobacillus fermentum*이었다.

4. 선발 젖산균의 특성조사

GABA 생산량이 높은 젖산균 중 7종을 선발하여 특성조사를 실시하여 동정된 젖산균은 *Enterococcus faecium* A56, *Enterococcus faecium* A268, *Enterococcus faecium* A275, *Enterococcus faecalis* D66, *Lactobacillus fermentum* K520, *Lactobacillus crispatus* K567, *Lactobacillus fermentum* K573으로 명명하였다.

가. 젖산균 생장

Enterococcus faecium A56, *Enterococcus faecium* A268, *Enterococcus faecium* A275, *Lactobacillus fermentum* K520, *Lactobacillus crispatus* K567, *Lactobacillus fermentum* K573 균주 공히 40℃, *Enterococcus faecalis* D66 균주는 37℃가 최적온도로 나타났다.

나. 젖산균의 단백질 분해

Enterococcus faecalis D66 균주는 tyrosine함량이 6.8mg/TCA 5ml을 나타내 매우 높은 단백질 분해력을 나타내었고, *Lactobacilli* 균주 중에는 *L. fermentum* K520균주가 가장 높은 단백질 분해력을 보였다.

다. 항생제 내성 시험

Enterococci 4종의 젓산균은 Lactobacilli 3종에 비해 Gentamycin, Neomycin, Ampicillin, Bacitracin, Polymyxin B 및 Chloramphenicol 등의 항생물질에 대하여 내성이 강하였다. *E. faecium* A56 균주는 Amikacin, Gentamycin 및 Oxacillin에 대해 내성이 강하였고, *L. fermentum* K573 균주는 Penicillin-G에 대해 내성이 강한 반면 *E. faecalis* D66 균주는 내성이 약하였다. 또한, *L. fermentum* K520 균주는 Rifampicin에 대해 내성이 약하였고, 특히 타 균주에 비해 전체적으로 항생물질에 대한 내성이 약하였다.

라. 효소활성

E. faecium A275 균주는 Acid phosphatase, *E. faecalis* D66 균주는 Alkaline phosphatase, *L. fermentum* K520 균주는 Esterase lipase, Leucine arylamidase, α -galactosidase 및 α -glucosidase, *L. crispatus* K567 균주는 Leucine arylamidase, β -galactosidase 및 β -glucosidase, *L. fermentum* K573 균주는 Esterase lipase, α -galactosidase 및 β -galactosidase에 효소활성이 높았다.

마. 담즙내성

oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우간에 큰 차이를 나타내지 않아 7종의 젓산균 모두 담즙내성이 있는 것으로 나타났다. 다만, *Enterococcus faecium* A268 균주가 다른 균주에 비해 성장이 완만하였다.

바. pH 내성

4종의 Enterococci 중 *Enterococcus faecium* A275 균주가 가장 내산성이 높았고, 3종의 Lactobacilli 중 *L. crispatus* K567 균주가 가장 내산성이 높은 것으로 나타났다.

사. 항균력

*Escherichia coli*에 대해 *Enterococcus faecium* A268이, *Salmonella typhimurium*에 대해 *Enterococcus faecalis* D66이, *Staphylococcus aureus*에 대해 *Lactobacillus fermentum* K573이 가장 억제효과가 큰 것으로 나타났다.

아. Glutamate decarboxylase 활성

Lactobacillus fermentum K573은 8.5mmol/L, *Enterococcus faecium* A275은 9.0mmol/L, *Lactobacillus crispatus* K567은 7.6mmol/L이었다.

5. GABA 생산 최적배양조건 설정

가. *Enterococcus faecium* A275

최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.5%를 첨가하고, *Enterococcus faecium* A275 첨가량 1.0% 및 배양온도 40℃에서 18시간 배양했을 때 pH 4.15이었고, 이때 GABA 함량은 2,340.46ppm이었다.

나. *Lactobacillus crispatus* K567

최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.1%를 첨가하고, *Lactobacillus crispatus* K567 첨가량 0.5% 및 배양온도 40℃에서 18시간 배양했을 때 pH 4.3이었고, 이 때 GABA 함량이 704.5ppm이었다.

6. 최적 배합조성물 개발

개발제품의 배합비를 보면, 원유 80.682%, 탈지분유 3.234%, 올리고당 5.0%, 액상과당 2.0%, 딸기잼(45%) 또는 블루베리잼(40%) 8.0%, MSG 0.084%, 정제수 1.0%이었다.

7. GABA 생산 균주의 발효조건 설정

Enterococcus faecium A275 균주를 이용한 발효액 제조시 GABA 함량의 최적조건인 pH 4.2를 맞추는데 균 첨가량이 0.5% 및 1.0%의 경우 약 15시간, 2%에선 12시간이 소요되며, *Lactobacillus crispatus* K567 균주를 이용한 발효액은 pH 4.4를 맞추는데 균 첨가량이 0.5%에서는 9시간, 1.0%에서는 7시간, 2% 첨가량에서는 6시간이 소요되었다.

8. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사

각각의 발효조에 원유 96.05%, 탈지분유 3.85%와 monosodium glutamate 0.1%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus crispatus* K567 균주(발효조 A)와 *Enterococcus faecium* A275 균주(발효조 B)를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4와 pH 4.2으로 감소할 때까지 배양하였다. 이때 *Enterococcus faecium* A275 균주를 이용한 발효액(발효조 B)은 90℃에서 30분간 열처리하며, 두 배양액을 조합탱크에 비율함량에 맞춰 발효조 A와 B를 혼합(전체의 84%)한 다음 딸기잼 (또는 블루베리잼)8.0%, 올리고당 5%, 액상과당 2%, 정제수 1.0%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다. 단일균주를 사용할 경우는 발효조 A와 동일하다.

개발제품의 성분을 보면, 무지유고형분 10.0%, 유지방 3.34~3.46%, 젖산균수 $1.19\sim 2.98\times 10^9$ CFU/mL, GABA함량은 709.66~1,271.64ppm이었다.

9. 동물실험

GABA 생산균주를 이용한 발효유의 혈당저하, 콜레스테롤 강하, 학습능력 향상 증진 효과를 알아보기 위하여 수컷 랫트와 수컷 마우스를 대상으로 하여 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유와 *Enterococcus faecium* A275 균주이용 발효유(90°C, 30min 열처리)를 7 : 3 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 A와 5 : 5 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 B, *Lactobacillus crispatus* K567 균주만 이용 발효유를 투입한 그룹 C를 설정하여 경구투여 방법을 선택하여 각각의 혼합 발효유를 랫트와 마우스에 각각 8 ml/kg/day씩 위내로 직접 투여하였다. 대조군은 시판 발효유를 투여한 대조군(Control)을 두었다. 혈당의 변화를 측정한 결과 3주까지는 유의성이 없었으나 4주 후부터 유의성이 나타나기 시작하여 6주에서는 대조군에 비해 처리군이 B군, A군, C군 순으로 유의성을 나타내었다. 지질의 경우, B군이 8주령과 10주령에서 HDL, LDL, TG, GPT, LDH에서 유의성이 있었고, 10주령에서는 총콜레스테롤, GOT에서 유의성이 있는 반면, A군은 HDL(10주령), LDL(8, 10주령), GPT(8주령)에서 유의성이 있었다. 학습능력은 5주 동안 발효유를 포함한 실험식이를 급여하여 수(水) 미로 찾기에 소요되는 시간을 나타낸 결과 급여 1주차 이후 대조군에 비해 유의성이 있었고, 특히 2주차에서 5주차까지 대조군에 비해 B군, A군, C군 순으로 유의성이 있었다.

SUMMARY

I. Title

Development of Fermented milk by Lactic acid bacteria producing GABA

II. Objective of research

The objective of the study was to develop fermented milk containing GABA, which was isolated from lactic acid bacteria under specific conditions.

III. Research scope and area

1. Collection and isolation of lactic acid bacteria
2. Selection of lactic acid bacteria producing GABA
3. Identification of lactic acid bacteria
4. Characteristics of lactic acid bacteria selected
 - Growth of lactic acid bacteria, proteolytic activity, antibiotic tolerance, enzyme activity test, bile tolerance, pH tolerance, antibacterial activity
5. Establishment of optimum cultivation condition in lactic acid bacteria producing GABA
 - Medium condition
 - Concentration of reconstituted skim milk
 - Concentration of monosodium glutamate
 - The addition dosage of lactic acid bacteria producing GABA
6. Development of optimum formula
 - Selection of best materials added to fermented milk
 - Establishment of optimum formula by Sensory test
7. Establishment of fermentation condition in lactic acid bacteria producing GABA
 - Determination of addition dosage of lactic acid bacteria producing GABA

- Determination of optimum fermentation temperature and time
- 8. Product development and physicochemical properties
 - Establishment of processing technology
 - GABA concentration and analysis of physicochemical ingredients
- 9. Animal experiments
 - Measurement of blood sugar, cholesterol
 - Learning ability

IV. Result of research and suggestion of application

1. Collection and isolation of lactic acid bacteria

a. Isolation of lactic acid bacteria from raw milk

Raw milk was collected from several farms under support of Raw milk testing lab. within the jurisdiction of Central, North, Western guidance division (part of Kyoung Gi Do and Gang Won Do) in Seoul Dairy Cooperation, Provincial institute for livestock promotion (Jeonbuk, Kyoungbuk, Jeju). 1502 bacteria were isolated from modified MRS media.

b. Collection of commercial strain

10 lactic acid bacteria such as ATCC, NRRL, NCFB, KFRI source were collected from KFRI. 4 commercial strains were collected from Rhone-poulenc and Culture System company.

c. Collection of lactic acid bacteria producing GABA by reconstituted skim milk added monosodium glutamate

510 and 1,039 bacteria were further isolated after the microbes were inoculated on 10% the reconstituted skim milk followed by incubation at 37°C for 24hr and 48hr, respectively.

2. Selection of lactic acid bacteria producing GABA

The concentration of GABA in individual strain was 1,815.45ppm in A-56, 685.71ppm in A-268, 2,303.76ppm in A-275, 521.02ppm in D-66, 717.64ppm in K-520, 711.40ppm in K-567, 1,298.31ppm in K-573, respectively.

3. Identification of lactic acid bacteria

Designation of lactic acid bacteria producing GABA were A-56 : *Enterococcus faecium*, A-268 : *Enterococcus faecium*, A-275 : *Enterococcus faecium*, D-66 : *Enterococcus faecalis*, K-520 : *Lactobacillus fermentum*, K-567 : *Lactobacillus crispatus*, K-573 : *Lactobacillus fermentum* in the result of Gram staining, fractography, sporogenesis, aerobic and anaerobic growth, catalase formation, growth in 15°C and 45°C, gas formation from glucose, ammonia formation from arginine, and sugar fermentation test.

4. Characteristics of lactic acid bacteria selected

a. Growth of lactic acid bacteria

Optimal growth temperature of *Enterococcus faecalis* D66 was 37°C, while that of the other 6 lactic acid bacteria was 40°C.

b. Proteolytic activity of lactic acid bacteria

Enterococcus faecalis D66 showed the highest proteolytic activity, while *Lactobacillus fermentum* K520 among Lactobacilli showed the highest proteolytic activity.

c. Antibiotic tolerance

All 4 Enterococci had stronger resistance than 3 Lactobacilli against antibiotics such as Gentamycin, Neomycin, Ampicillin, Bacitracin, Polymyxin B and Chloramphenicol.

d. Enzyme activity test

Enterococcus faecium A275 showed higher activity on Acid phosphatase, *E. faecalis* D66 had relatively higher activity on Alkaline phosphatase, *L. fermentum* K520 on Esterase lipase, Leucine arylamidase, α -galactosidase and α -glucosidase, *L. crispatus* K567 on Leucine arylamidase, β -galactosidase and β -glucosidase, *L. fermentum* K573 on Esterase lipase, α -galactosidase and β

-galactosidase than the other microbes.

e. Bile tolerance

6 lactic acid bacteria were seldomly affected, while *Enterococcus faecium* A268 was strongly affected by bile salt.

f. pH tolerance

Livability of *Enterococcus faecium* A275 among 4 Enterococci was not affected, while *L. crispatus* K567 among 3 Lactobacilli was not affected by pH.

g. Antibacterial activity

Enterococcus faecium A268 resisted superbly against *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* D66 resisted against *Salmonella typhimurium* and *Lactobacillus fermentum* K573 resisted against *Staphylococcus aureus*.

h. Glutamate decarboxylase activity

Glutamate decarboxylase activity was 8.5mmol/L in *Lactobacillus fermentum* K573, 9.0mmol/L in *Enterococcus faecium* A275, 7.6mmol/L in *Lactobacillus crispatus* K567, respectively.

5. Establishment of optimum cultivation condition in lactic acid bacteria producing GABA

a. *Enterococcus faecium* A275

Incubation at 40°C for 18hrs with 12% reconstituted skim milk, 0.5% MSG and 1% *Enterococcus faecium* A275 shown pH 4.15 and 2,340.46ppm of GABA concentration.

b. *Lactobacillus crispatus* K567

Incubation at 40°C for 18hrs with 12% reconstituted skim milk, 0.1% MSG and 0.5% *Lactobacillus crispatus* K567 shown pH 4.3 and 704.5ppm of GABA concentration.

6. Development of optimal formula

The formulae for the developed products was 80.682% raw milk, 3.234% skim milk powder, 5.0% oligosaccharide, 2.0% fructose syrup, 8.0% strawberry jam(or blue berry jam), 0.084% MSG, and 1.0% water.

7. Establishment of fermentation conditions in lactic acid bacteria producing GABA

When 0.5 and 1.5% of *Enterococcus faecium* A275 were added for fermentation, about 15 hrs were needed to reach pH 4.2 whereas 12 hrs were needed as 2.0% of *Enterococcus faecium* A275 was added. When 0.5, 1.0, and 2.0% of *Lactobacillus crispatus* K567 were added, it took 9, 7, and 6 hrs to reach pH 4.4, respectively.

8. Product development and physicochemical properties

One percent of *Lactobacillus crispatus* K567(fermentor A) and *Enterococcus faecium* A275(Fermentor B) were inoculated and fermented till pH of the mixture, which was mixed with 96.05% raw milk, 3.85% skim milk powder, 0.1% MSG followed by autoclaved at 90C for 30 min and cooled to 40C, reached to 4.4 and 4.2. Fermentor B was heated at 90C for 30min and combined with fermentor A to produce fermented milk of having 8.0% of straw berry(or blue berry)jam, 5.0% oligosaccharide, 2.0% fructose syrup, and 1.0% water. The product contained non-fat milk solid 10.0%, milk fat 3.34~3.46%, lactic acid bacteria $1.19\sim 2.98\times 10^9$ CFU/mL, GABA concentration was 709.66~1,271.64ppm.

9. Animal experiments

To examine hypoglycemic, hypocholesterolemic, and learning ability effect of fermented milk, SD rats were arranged into 3 groups and group A was fed with mixture of *Lactobacillus crispatus* K567 inoculated and *Enterococcus faecium* A275 inoculated ones(90°C, 30min heating) with 7 : 3 ratios whereas group B was fed with the mixture of 50 : 50. Group C was fed solely with *Lactobacillus crispatus* K567 added fermented milk. Although there was no

significant difference in blood glucose level between groups till 3 weeks, group B showed the lowest blood glucose levels followed by group A and C. There were significant differences in HDL, LDL, TG, GPT, and LDH in group B between 8 and 10 weeks and TC, and GOT at 10 weeks. There were significant differences in HDL(10 weeks), LDL(8 and 10 weeks), GPT(8 weeks) in group A. Learning ability was determined by measuring time to escape water maze. There was significant difference between control and fermented milk fed groups after 1week. Group B had the best result followed by group A and C.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	17
Chapter 2. Art status of domestic and abroad	20
1. Market and development trend of fermented milk	20
2. Art status of domestic and abroad	22
Chapter 3. Scopes and results of the research project	31
1. Materials	31
2. Method	32
3. Result and discussion	45
a. Collection and isolation of lactic acid bacteria	45
b. Selection of lactic acid bacteria possessing immuno-activity	68
c. Identification of lactic acid bacteria	83
d. Characteristics of lactic acid bacteria selected	86
e. Establishment of optimum cultivation condition in lactic acid bacteria producing GABA	109
f. Development of optimum formula	115
g. Establishment of fermentation condition in lactic acid bacteria producing GABA	119
h. Product development and physicochemical properties	124
i. Animal experiments	127
Chapter 4. Attainability of the research goal and contribution to related fields	138
Chapter 5. Application of research results	141
Chapter 6. Reference	142

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황	20
제 1 절 발효유의 시장현황 및 제품개발 동향	20
제 2 절 국내외 기술개발 현황	22
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	31
제 1 절 재료	31
제 2 절 방법	32
제 3 절 연구결과 및 고찰	45
1. 젖산균 분리 및 수집	45
2. GABA 생산 균주 선발	68
3. GABA 생산 균주 동정	83
4. 선발 젖산균의 특성조사	86
5. GABA 생산 최적배양조건 설정	109
6. 최적 배합조성물 개발	115
7. GABA 생산 균주의 발효조건 설정	119
8. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사	124
9. 동물실험	127
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	138
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	141
제 6 장 참고문헌	142

제 1 장 연구개발과제의 개요

최근 각종 암, 고혈압, 당뇨병 등에 대한 치료제를 자연자원에서 찾고자 하는 시도가 미국 국립 암연구소(NCI)를 비롯 미국립보건원, 중국 과학원 약물연구소, 일본 과학기술청 등 세계 각국에서 추진되고 있으며 이미 식물 및 바다생물들로부터 신종 항암물질인 Bryostatin, Dolasstatin, Halomon 등을 개발하여 연간 수백억불의 새로운 시장을 개척하는 등 신 기능성 물질 탐색분야는 21세기의 최대 첨단 산업으로 급성장하고 있고 이에 대한 선진국들의 연구조사비 투자도 천문학적인 수치에 이르고 있다. 국내에서도 대학, 국립연구소 또는 일반 기업체 연구소 등 80여 회사 연구소들이 생명공학산업에 새로이 도전하고 있으며 일부 중견 기업연구소는 새로운 기능성 물질을 개발하여 해외에 로열티를 받고 수출하는 등 그 시장성이 날로 증대되고 있다. 국내 학계 및 기업을 중심으로 이루어지고 있는 기능성 식품관련 연구는 항산화, 항암, 순환기 질환, 장내균총 조절, 당뇨조절 등에 초점을 두고 있으며 다양한 원료 및 제품 개발에 투자하고 있다. 하지만 아직 대부분이 수입된 기능성 원료에 의존하고 있어 국내 기능성 식품산업이 국제경쟁력을 가지기 위해서는 우리만의 고유한 신기술이나 외국 신기술을 방어 또는 대체할 기술의 확보가 요구되고 있다. 즉 우리 고유의 농산식품이나 한약재소재와 같이 수천년간의 임상경험을 바탕으로 한 기능성 소재의 발굴 및 이의 작용기전을 밝히는 것이 필요하다. 최근 국민들의 평균수명이 높아지면서 고령화 인구비율이 증가하는 추세이며, 개개인은 건강한 활동력을 유지하면서 장수하고자 하는 욕구가 증대되고 있지만 피로, 스트레스, 잘못된 식생활 등으로 면역력이 저하되어 암 등 성인병이 발생되고 있는 실정이다. 따라서, 기능성 식품을 필두로 예방의학의 중요성이 부각되고 있으며 관련 제품들에 대한 잠재적 수요는 폭발적으로 증가할 것으로 사료된다.

국내의 발효유제품은 저가에서 고가의 기능성 드링크류가 주도하고 있으며, 국내에 개발된 제품으로는 위궤양을 일으키는 원인중의 하나인 헬리코박터 파이로리를 사멸시키는 기능성 발효유, 혈중 콜레스테롤 저하 발효유, 식중독을 유발하는 O-157 대장균, 포도상구균, 살모넬라균, 리스테리아균 등 유해세균을 사멸시키는 발효유 등 주로 젖산균을 이용한 제품이 주류를 이루고 있다. 또한, 경기침체에 의

한 우유소비 둔화로 분유재고는 2003년 3월 17,161톤이었으나 젖소도태 및 검은콩 우유제품 신장 등으로 2006년 5월말 현재 11,111톤으로 감소되었으나 아직도 적정 분유 재고량 3,000톤보다 많은 재고를 가지고 있어 유업체 및 낙농가의 피해가 큼에 따라 발효유의 소비촉진을 통하여 주재료인 분유 소비촉진 유도 방안이 절실히 요구되고 있다.

유제품 가격, 경쟁력 취약에 따른 시유 위주생산으로 국내원유의 소비는 점차 줄어들고 있어, 다양한 유제품 소비욕구를 국내 잉여 원유로 대체할 수 있도록 유제품 개발이 시급하다.

국내 기능성 식품은 1989년 건강보조식품과 특수영양식품을 제도화하고 해당품목이 늘어나면서 특허출원이 지속적으로 늘어나고 있으나 일본이 미국시장과 유럽에 각각 119건 63건의 특허를 출원한 반면, 우리나라는 미국에만 18건으로 일본의 1/10 수준에 불과할 뿐더러 외국에서 경쟁할 수 있을 정도의 핵심기술이 거의 없는 실정이다.

유럽연합시장 역시 미국과 일본이 각각 271건, 63건을 출원하고 있지만 우리나라는 거의 없는 실정이며 미국과 일본이 국내 시장에 각각 87건, 74건을 출원하고 있는 것에 비하여도 아주 낮은 수준 뿐만 아니라 2002년 기준 약 1조 3,500억원 규모를 형성한 국내 건강보조 식품 시장은 수입완제품이 17%를 차지하고 있으며 국내 제조품이더라도 핵심소재의 80% 이상이 수입되고 있다.

국내에서는 파마바이오(주)에서 김치로부터 GABA 생성능 젖산균을 분리하여 pilot plant 단계까지 왔으나 수율이 30%로서 낮고 직접 발효유제품의 스타터로서의 GABA 생성능 젖산균이 아니기 때문에 우유원에서 GABA 생성 젖산균 분리 기술과 수율 향상을 위한 최적 발효조건 설정기술, 대량생산 기술 및 동물실험을 거쳐 효능 입증 등이 이와 같은 문제점을 해결해야 할 과제이다.

소득수준의 향상과 식생활 개선으로 원유의 소비는 그동안 계속 증가하여 왔다. 1980년대에는 1인당 원유소비량이 29kg 정도이었으나 1990년대에는 평균 48kg이며, 2000년에는 59.2kg에 이르러 소비량이 비약적으로 증가하였다. 그동안 국내 원유수급은 다소 불균형을 이루었으나 1990년 이전까지는 늘어나는 소비를 충당할 수 있어 국내 유제품 소비를 거의 자급하여 왔다. 그러나 1990년 초부터 순차적으로 시작된 유제품의 수입이 1995년에 완전 개방되어 값싼 혼합탈지분유와 원료치즈가 대량 수입되었고, 이로서 원유의 자급율도 하락하게 되었다. 탈지분유와 원료치즈 시장이 외국산으로 거의 대체된 1996년 이후는 자급율이 20%나 떨어진 80%

선에 머무르고 있다. 국내산 원유는 대부분이 시유의 생산에 사용되고 있으며, 가격경쟁력을 잃은 원료유제품은 외국산으로 거의 모두 대체되었다. 1999년에는 이러한 현상이 더욱 심화되어 원유의 자급율은 하락하고 원유의 소비는 시유 생산에 대한 의존도가 더욱 높아졌다. 시유의 국산 원유 총생산량에 대한 점유비율은 77.7%를 차지하고 있으며, 점유비율은 점점 증가할 것으로 예상된다. 농촌경제연구원 발표한 2000년 농업전망을 보면 수입자유화에 따라 국산 원유생산량의 시유 소비 비율이 2005년에는 86%로 점차 높아지고, 2010년에는 98%로 국내산 원유의 대부분은 시유에 사용하고, 일반 유제품은 수입원료로 대체 생산될 것으로 전망하고 있다. 또한 우유 및 유제품의 주 소비자가 어린이 및 청소년층에 집중되어 있는데 반해 어린이 출생비율이 감소추세에 있음에 따라 소비증가는 정체 내지는 완만한 증가세를 보이고 있는 실정이다.

한편, 세계 건강기능성식품 시장은 97년 650억불 규모이었으나 2005년에는 현재 시장의 10배이상 증가되며, 한국의 경우 수 조원이상, 세계적으로 수 백조원 이상으로 예상되고 있다. 수입현황을 보면 2000년도에 1,733억원으로 주로 미국 1,118억원, 일본 257억원, 중국 63억원이며, 2002년도 건강보조식품 시장은 전년대비 17% 정도 성장한 약 1조 3,500억원 시장에 이를 것으로 전망된다.

이에 따라 본 연구를 통하여 GABA 생성능이 있는 젖산균을 이용한 발효유제품을 개발하여 국내 원유 소비 촉진 및 국제경쟁력을 향상시킴으로써, 국내 원유를 이용한 유 및 유제품의 시장을 확보하는 것이 급선무로 보여지며, 만일 이에 대한 대비를 소홀히 하여 품질이 우수한 외국의 유제품이 국내에 유입될 경우 우리나라 낙농산업은 파산될 가능성이 농후하다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절. 발효유의 시장현황 및 제품개발 동향

1. 시장현황

소비자들의 기호가 70년대와 80년대 초까지는 발효유 시장의 대부분을 차지했던 액상 발효유에서 80년대 말부터는 소비 패턴의 변화와 고급화·기능화 되면서 점차적으로 농후 발효유로 소비패턴의 전환이 이루어져 90년대 초 액상과 호상 발효유 제품의 시장 점유비율(매출액 기준)이 61.7%와 34.3%였으나 2000년에는 액상, 호상, 드링크 발효유의 비율이 43.2%, 20.6%, 36.2%를 나타내었고, 2004년에는 36%, 18%, 46%로서 드링크 발효유의 비율이 증가하고 있는 추세이다. 발효유 시장은 지속적인 신제품 개발로 2000년에는 9% 증가한 8,400억원, 2001년에는 1조원, 2005년에는 1.2조원 대에 이를 것으로 전망된다. 최근에는 한국야쿠르트(메치니코프, 윌, 쿠퍼스), 남양유업(불가리스, 위력), 매일유업(장애는 GG, 구트), 롯데햄우유(루테리), 빙그레(닥터캡슐녹차), 서울우유(혜파스) 등 기능성 드링크발효유 경쟁이 치열하다.

2. 발효유의 제품개발 동향

유럽국가를 비롯한 미국·일본 등 세계 여러나라 발효유의 특징은 소비자들의 건강지향성, 자연지향성 욕구에 맞추어 기능성을 강조한 제품들이 활발하게 개발되고 있다. 즉 식이 섬유나 올리고당 또는 키토산, DHA & EPA 등과 같은 기능성 소재를 첨가한 제품, 저지방 및 당류 대체에 의한 저칼로리제품 또는 인체에 유용한 효과를 나타내는 유산균을 스타터로 사용한 프로바이오틱(probiotic) 제품 등이 개발 시판되고 있다. 몇가지 예를들면 다음과 같다.

가. 인체에 유용한 효과 발휘하는 유산균주 사용

정장작용, 면역부활작용, 노화억제, 항종양효과, 혈중 콜레스테롤치 저하 등의 효과가 있는 유산균주를 선발 또는 유전공학적인 방법으로 육종하여 스타터로 사용한다. 즉 사람의 장내에서 분리한 균주로 혈중 암모니아 감소, 장내부패균의 증식억제, 부패산물 생성효소의 감소, 면역활성효과, 항암효과, 설사예방, 칼슘흡수촉진 등의 효능이 입증되어 최근 각광을 받고있는 Bifidus균과 역시 사람으로부터 분리, 선발한 균주로서 장내 정착성이 높고 설사를 완화해 주고 유해균의 증식억제 효

과가 있는 *L. casei* GG의 사용, 콜레스테롤치의 저하가 임상적으로 입증되었다고 하는 *Enterobacter* 균주나 *L. acidphilus* Gilliland, 면역부활과 항암효과가 높고 설사를 완화해주고 유해균의 증식억제의 효과가 있는 *L. casei* Shriota 또는 정장 효과가 입증되었다는 *L. acidphilus* Lc1 등을 이용한 제품개발이 활발하게 이루어지고 있다. 최근에는 위장질환의 원인균인 *Helicobacter pylori*의 성장을 억제하는 두가지 유산균을 개발해 종균으로 사용한 제품이 출시되고 있다.

나. 올리고당 첨가로 장내 유해균 증식 억제

장내 비피더스균 증식인자로서 최근 각광을 받고 있는 올리고당을 첨가하여 장내 유해균의 증식을 억제함으로써 병원균에 의한 감염방지와 변비를 예방한다는 요쿠르트 제품들도 시장점유율을 넓혀가고 있다. 올리고당은 소당류 또는 과당류라고도 불리우며, 2분자 이상 6분자 이하의 단당류가 탈수적으로 축합된 것으로 지금까지 개발된 생리적 기능성을 올리고당은 20여 종류에 이르고 있다. 이 당의 특징은 사람의 소화효소로서 분해되지 않고 산이나 알칼리에도 비교적 강하여 위산의 범위에서 분해되지 않는 난소화성 당류로서 장내까지 이행되어 비피더스균의 증식에 이용되며, 저칼로리 당류로서 칼슘 및 철분의 흡수를 촉진하고 항우식성(치석형성방지)기능도 있는 것으로 알려지고 있다. 그러므로 올리고당 섭취에 의해 장내 비피더스균이 증가함으로써 장의 연동운동이 활발해지고, 유해균의 증식이 억제되기 때문에 병원성균의 감염방지와 변비예방에 효과가 있다는 것이다.

다. 후로즌 요쿠르트(Frozen yogurt)

후로즌 요쿠르트는 아이스크림에 요쿠르트를 첨가하여 만든 것으로 미국의 아이스크림 시장에서 10%정도의 점유율을 차지할 정도로 최근 판매량이 증가하고 있다. 이와 같이 후로즌 요쿠르트가 인기를 끌고 있는 이유는 기존 아이스크림보다 지방함량이 적는데다 아이스크림의 미각적 특징을 살리면서 요쿠르트가 갖고 있는 여러 가지 장점이 더해지기 때문이다. 후로즌요쿠르트에는 유산균이 제품에 살아 있는 것과 살균처리하여 유산균이 사멸된 것이 있으며, 아직까지 세계적으로 공통된 명확한 규정이 없으며 국가마다 차이가 있다.

라. 코코아 첨가 휘핑 요쿠르트

건강식품으로 무설탕, 저지방 과즙요쿠르트 또는 혈압을 낮추고 혈중콜레스테롤치 저하효과가 있다고 선전하는 코코아 첨가 휘핑 요쿠르트 등이 개발되고 있다.

마. 커스터드와 요쿠르트 겸용

대용식 또는 간식용으로 요쿠르트 밑바닥에 커스터드를 깔아 커스터드와 요쿠르트의 맛을 함께 즐길 수 있는 제품이 젊은이들 사이에 인기를 끌고 있다.

바. 향 첨가 요쿠르트

그 외에 키위과즙이나 허브(라벤더·카모밀) 또는 카레·생강 등을 첨가하여 기존 요쿠르트에 독특한 맛을 부여한 제품들도 시판되고 있다.

제 2 절. 국내외 기술 현황

1. 국내 기술 현황

GABA(Gamma-Amino Butyric Acid)는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 포유동물의 뇌나 척수에 존재하는 신경 전달 물질로 의약품으로는 뇌의 혈류를 개선하여 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사 향상 및 의욕저하 등의 치료제로 사용되어 brain food라고도하며 이 외에도 연수의 혈관중추에 작용하여 항이노호르몬인 바소프레신의 분비를 억제하고 혈관을 확장시켜 혈관을 낮추는 고혈압 저하효과(anti-hypertensive effect) 및 이뇨효과(diuretic effect) 등 여러 생리작용이 보고되고 있다.

그러나 GABA는 배아미, 녹차 및 빵잎 등에 다소 함유되어 있으나 약리작용을 발휘하기에는 턱없이 함량이 낮아 자연적인 섭취로 GABA의 생리작용을 기대하기는 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. 국내에서는 벤처업체인 파마바이오(주)가 김치에서 GABA를 생산하는 균주를 분리하여 대량생산체계 단계에 와 있으나, 발효유제품의 스타터로서는 우유원이 아니기 때문에 유제품에 접목하기가 어려운 실정이다.

2. 국외 기술 현황

가. GABA의 추적

일본 식품종합연구소의 津志田박사는 혐기성 조건하에서 차 잎의 대사를 연구하던 중 GABA와 알라닌의 대량축적이 일어남을 발견하였다.

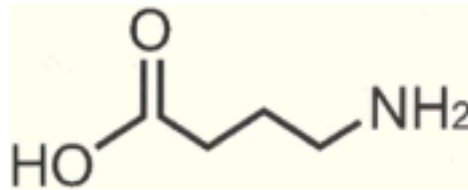
일반적으로 GABA의 합성경로는 글루탐산탈탄산효소(GDC)가 작용하여 글루탐산으로부터 만들어진다는 것이 알려져 왔으나 그 후 아미노트랜스페라아제에 의해 알라닌과 호박산 세미알데하이드로 분해된다는 것이 농수성 농업연구센터의 三枝貴代박사들의 연구로 밝혀졌다. 三枝박사들의 연구를 종합하여 보면 GABA 축적의 원인은 여러 가지로 생각되지만 스트레스, 산소결핍, 홍수, 갈수, 무기염부족,

한냉조건, 방사선조사, 약산성, 암소처리, callus배양 등의 주된 것이다.

최근에는 발효에 의한 GABA증강 방법도 개발되어 있다. 특히 GABA가 축적되기 위해서는 GABA의 원료로 되는 글루탐산이 많아야 될 뿐만 아니라 GDC의 활성이 높고 또 GABA를 분해하는 효소군의 활성이 낮아야 된다는 것이 주요사항이다(茅原紘, 2002).

나. 인체에 있어 GABA의 기능

우선 수용액 중에서 GABA의 구조는 어떻게 되어있는지를 고찰해 본다. 田中들에 의하면 수용액 중에서는 양성이온으로 존재하고 있으며, folded 또는 extended형을 취하고 있다고 추정하였다. 최근 Crittenden 등(2001)은 GABA수화물의 에너지계산에 의해 GABA수화물이 가장 안정된 형태는 이 양성이온이 분자 내에서 수소결합하고 있는 환상화합물이라고 결론지었다. 이는 GABA수용체의 구조를 추정하는데 도움이 될 수 있다.



GABA의 구조식

GABA의 약리학적인 견해로서 지금까지 GABA수용체에 GABAa와 GABA_b가 알려져 있는데, GABAa는 알파, 베타, 감마, 델타의 sub-unit를 가진 heteromer이며 GABA_b는 sub-unit μ 를 가진 monomer이다. 수용체 GABAa는 그 구조 중에 염소이온channel을 가지고 있다. 사람이 불안상태에 빠지면 大脳辺縁系를 중심으로 흥분이 높아진 때에 생체방어반응으로서 GABA 신경세포에서 GABA가 방출된다. 방출된 GABA는 수용체와 결합하고 수용체의 구조 변화가 일어나 염소이온channel이 열려 염소이온이 세포 내에 유입된다. 그 결과 세포막 내부가 과분극으로 된다. GABA의 작용개시에는 나트륨이온과 같이 양으로 하전되어 있는 이온의 GABA신경세포에의 유입이 필요하다. 유입되면 바로 세포의 흥분성이 감소되고 GABA의 신경억제효과가 나타나 불안상태가 완화된다.

수용체 GABA_b의 생체기능으로서는 欠神發作發現에 일부 관여한다는 것이나 기

억에 관계하는 海馬長期증강현상, 조울증의 발현 등에 관계하고 있다는 것이 알려져 있다.

뇌에 있어 정보전달은 글루탐산 등의 흥분성과 GABA 등의 억제성의 2가지 신호가 상호 조절하여 그 미묘한 균형에 의해 뇌 기능이 정상으로 유지되고 있다는 것은 확실하며, GABA가 이 균형을 유지하는데 중요한 역할을 하고 있다는 것도 이론은 없다. 따라서 만일 GABA가 체내에서 현저히 결핍되면 흥분이 과도하게 되어 Bernard 등(2000)이 지적한 바와 같이 간질증상 등이 나타난다. 한편 현저히 증대하면 억제 효과가 지나쳐 Tinuper 등(1992) 및 Fibiger와 Lloyd(1984)가 지적한 바와 같이 의식의 혼탁이나 마비증상을 나타내게 된다.

다. GABA의 생리활성

GABA는 신경전달, 혈압강하 효과 유도, 특히 폐경기 나 갱년기중에 발생하는 불면, 우울, 불안 등에 대한 신경안정 효과 등의 생리활성 기능이 있다 (Stanton, 1963; Omori 등, 1987; Okada 등, 2000).

의약품으로서의 뇌의 혈류를 개선하여 산소공급량을 증가시켜 뇌대사를 항진시키는 작용을 하므로 뇌졸중이나 두부외상 후유증 뇌동맥 후유증에 의한 두통 귀울림, 의욕저하 등의 치료에 응용되고 있다. 지금까지의 연구에 따르면 GABA는 건망증세 등을 나타내는 노인성 치매나 정신증상을 보이는 파킨슨병인 경우 수액중의 농도가 감소한다는 것이 밝혀졌다(Manyam 등, 1980). 또 중적 발작을 보이는 간질 환자의 수액에 GABA농도가 저하되어 있다는 사실로부터 GABA에 신경의 흥분을 억제하는 작용이 있을 것으로 추측하고 있다(大熊誠太郎 등, 1997). 더욱이 Petty 등(1990)과 Roy 등(1991)은 기분장애나 알콜성 억울증 환자에서 수액 중 GABA농도가 감소하고 있음을 보고하였고 Ishikawa와 Saito(1978)는 우울증 치료약인 desipamine이나 aminotriptyline의 작용기작으로서 GABA전달계를 게재하여 GABA의 유리를 촉진하므로써 우울증의 개선에 기여한다고 생각하여 감정장애나 불안장애의 발증 메카니즘에 GABA계가 크게 관여하고 있음을 밝혔다(西川 徹, 1996; Petty 등, 1990; Roy 등, 1991). 또 Ishikawa와 Saito(1978)가 쥐를 대상으로 한 GABA의 뇌실내 투여를 행한 실험 결과 명암변별 학습과제의 경우 GABA투여 후 학습능력이 유의적으로 증강됨을 보여 GABA가 장기 기억의 촉진에 공헌하고 있음을 보고하였다. 더욱이 중추이외에 미치는 작용으로서의 연수의 혈관운동증추에 작용하여 항이노호르몬인 바소프레신의 분비를 억제하고 혈관을 확장시켜 혈압을 낮추는 작용이 지적되었고 본태성 고혈압 자연발증 쥐를 사용한 실험에서 GABA가 혈압상승을 억제하는 작용이 있음을 보고하였다(大森正司 등,

1987).

이와 같이 다수의 생리작용이 보고되어 있는 GABA는 식물체에도 함유되어 있는 물질로서 배아미나 녹차 등의 식품에도 함유되어 있으므로 경구적으로 섭취하는 것이 가능하다. 그러나 이들 식품에 함유된 GABA의 양은 결코 많지 않아 종래에는 약리작용을 발휘하기 위한 필요량을 식품에서 섭취하는 것은 곤란하였다. 그러나 일본 농림수산성 중국 농업시험장의 Saikusa 등(1994)이 연구를 추진한 결과 현미에 내재되어 있는 글루타민산 탈탄산효소가 가수조건하에서 미립 중의 글루타민산을 대량으로 또 급속히 GABA로 전환시킨다는 것을 발견하였고, 이 사실을 응용하여 GABA를 고농도로 축적시킨 탈지 쌀배아 식품의 개발에 성공하였다(Onoda 등, 1998). 이로부터 종래 식물로부터의 자연섭취에는 양적으로 한계가 있던 GABA를 생리작용이 기대될수 있는 양까지 많이 섭취하는 것이 가능하게 되었다. 한편 갱년기 장애 및 초로기에 나타나기 쉬운 불면이나 조급함 등의 정신장애, 자율신경 장애는 심경내과, 정신과에 있어서도 치료가 대단히 어려운 질환의 하나이다. GABA는 지금까지 신경내과, 정신과 영역에서 임상연구가 진행되어 왔는데 GABA가 뇌 속에서 신경흥분을 안정시키는 작용을 한다는 것과 이와는 반대로 감정장애나 기분장애, 치매 등에 있어서는 수액중의 GABA농도가 감소한다는 것이 알려져 있다(西村 健, 1988). 또 신경불안증의 환자, 예를 들면 필요 이상의 불안으로 가위눌리는 발작이 나타나는 정신질환에 있어서도 역시 뇌 속에 존재하는 GABA량이 감소한다는 것이 알려져 있다(平野 誠, 1992). 결국 뇌 속에 존재하는 GABA량의 감소는 정신흥분이나 불안과 대단히 밀접한 관계가 있다는 것이 강하게 시사되었다.

즉 갱년기 장애의 주된 증상인 불안 등의 기분장애 또는 초로기 우울증 등의 정신장애를 나타내는 환자에 있어서는 GABA계의 기능이 저하되어 있을 가능성이 높다. 이와 같은 환자에 있어서는 경구적으로 GABA를 보급함에 의해 증상의 개선이 기대될 수 있을 것이라고 하였다(Okada 등, 2000).

우선 지금까지 알려져 있는 GABA 및 GABA함유식품의 효능을 요약 열거하면 다음과 같다(茅原紘, 2002).

- ① 혈압을 정상으로 한다.
- ② 혈액중의 콜레스테롤이나 중성지방의 증가를 억제한다.
- ③ 심장, 간장이나 췌장의 활동을 활성화한다.
- ④ 혈당치의 상승을 억제한다.
- ⑤ 뇌의 혈류를 좋게 하여 뇌 세포의 대사를 활발하게 한다.

- ⑥ 비만방지작용
- ⑦ 알콜대사 촉진작용
- ⑧ 체취, 구취, 생리취, 노인취, 노취 등의 소취 효과
- ⑨ 감정장해, 불안장해의 해소
- ⑩ 뇌졸중 후유증 개선작용
- ⑪ 대장암 억제작용
- ⑫ 성장호르몬 분비촉진작용

라. GABA의 자연계분포

감마아미노부티르산(GABA)은 자연계에 널리 분포하는 아미노산의 일종으로서 포유동물의 뇌나 척수에 존재하는 억제계의 신경전달물질이다. GABA는 대략 red mold rice에 20mg/100g 건물량, Gabaron tea에 150mg/100g 건물량, soaked rice germ에 400mg/100g 건물량이 함유하고 있다(Kono와 Himeno, 2000; Tsushida 등, 1987; Saikusa 등, 1994; Saikusa 등, 2001).

glutamate의 탈카르복실화를 촉매하는 Glutamate decarboxylase(GAD)는 박테리아(Gale, 1946), 고등식물(Okunuki, 1937; Schales 등, 1946)과 동물(Blindermann 등, 1978; Robert와 Frankel, 1951)에서 γ -aminobutyric acid(GABA)를 생산한다.

마. GABA를 생산하는 젖산균

Nomura 등(1999)은 *Lactococcus lactis*가 GABA를 생산하는 능력을 검사한 결과 *L.lactis* subsp.*lactis* 균주는 이 산을 생산한 반면 *L.lactis* subsp.*cremoris*는 생산하지 못하였다고 보고하였다. lactobacilli의 일부 균주는 glutamate를 탈카르복실화하여 최종산물로 GABA와 CO₂를 생성한다고 하였다(Hanaoka, 1967). Hayakawa 등(1997)은 glutamate decarboxylase에 의해 glutamic acid로부터 많은 양의 GABA를 신속히 생산하는 젖산균인 *Lactobacillus brevis*를 분리하였는데 glucose-yeast extract-Polypeptone 배지에서 59mM glutamic acid에서 50mM GABA를 생산하였다고 하였다. 그러나 고가의 배지 배양액이 문제점이었고, glutamic acid를 보충없이 GABA를 생산하는 경제적이고 단순한 공정의 필요성이 대두되어 Yokoyama 등(2002)은 알콜증류 지게미에서 glutamic acid의 첨가 없이도 젖산균인 *Lactobacillus brevis* IFO-12005가 GABA를 생산하였다고 발표하였다.

바. GABA 개발 현황

1) 가바론 차

일본식품종합연구소의 津志田藤二郎박사, 농업연구센터의 三枝貴代박사, 大森正司大妻여자대학교수들이 개발하였다. 녹차의 풍미를 손상시키지 않고 보존하는 방법을 연구하던 중 녹차 생엽을 질소가스 농도를 높여 밀봉하면 GABA가 고농도 강화된다는 것을 발견하였다.

이 제조방법의 특징은 혐기처리와 호기처리를 여러번 반복함에 의해 호기처리에 글루탐산 함량이 회복되고 그 후의 혐기처리로 GABA함량이 증가하는데 잎보다도 줄기에 GABA함량이 높기 때문에 줄기를 제거하지 않고 마무리를 한다. 가바론 차 100g 중에 GABA를 약 200mg함유한다.

2) 발아현미

도마(주)의 塚原菊一사장, 생물계 특정산업기술연구 추진기구의 小野田彦박사, 식품종합연구소 들의 그룹에서 개발, 제품화되었다.

현미의 배아에는 100g 중 원래 500mg 정도의 GABA가 함유되어 있지만, 현미를 물에 수 시간 침적시키면 배아 중의 글루탐산이 GDC의 작용으로 GABA로 변화된다. 유전자해석으로부터 GABA를 만드는 이 효소는 세포내의 칼슘에 반응하여 활성화된다는 것이 알려져 있으며, 현미가 발아할 때에 세포내의 칼슘이 증대하는데 GABA가 축적된다. 발아현미 중에는 현미의 약 2.8배, 백미의 약 10배의 GABA가 함유되어 있다. 특히 농수성 중국농업시험장에서 개발된 배아 부분을 약 3할 정도 증가시킨 거대 배아미를 발아시킨 “거대 배아 발아현미”도 시판되고 있다. 거대 배아 발아현미의 GABA함유량은 원료인 거대 배아미 보다도 약 7배나 증가하였다는 보고도 있다. 또 발아현미의 제품화로서는 종래의 습식 타입과 건식 타입이 있으며, 또 발아현미 분말, 발아현미 누룩도 시판되고 있다. 발아현미는 주식으로 될 수 있다는 점에서 발아현미 및 발아현미를 이용한 제품을 취급하는 기업이 급증하고 있는데, 원료인 현미의 종류, 생산공정의 차이, 제품의 다양화 등으로 각기 차별화하여 판촉에 열을 올리고 있다.

3) 현미 GABA액

물에 침적시켜 GABA함유량을 증가시킨 “GABA 강화 쌀배아 추출물”을 원료로 사용한 기능성 음료가 있다. 중국농업시험장에서 개발, (유)라이스크리에이트에서 판매, 1병(30ml)에 GABA 10mg 함유하고 있다. 최근에는 “현미 GABA 미세분말”도 개발되어 판매예정에 있다.

4) GABA강화 쌀배아

중국농업시험장과 오리자油化(주)와의 공동연구에 의해 GABA를 강화시킨 쌀배아의 대량생산에 성공하였다. 이 제조방법으로 가공 전 쌀배아 중의 GABA함량이 25~50mg/100g이던 것이 350~400mg/100g 까지 증가시키는 것이 가능하게 되었다. 식품에의 응용도 이루어지고 있는데, GABA강화 쌀배아 미세분말, GABA강화 쌀 배아의 물추출 농축분말 등이 시판되고 있다. “오미자 GABA 21”은 GABA를 강화시킨 쌀배아의 supplement(정제)인 100g에 GABA 250mg을 함유하고 있다.

5) Super GABA

후짓코(주)에서는 일본의 전통적 발효식품인 糠漬에 눈을 돌려 (주)大阪생물환경과학연구소와 공동연구로 겨상(糠床)의 환경을 모방한 GABA 발효생산법을 확립하고 고농도로 GABA를 함유하는 분말상 식품소재인 “Super GABA”를 개발하였다. GABA를 5% 이상 함유하고 있으며, 유산균, 효모의 혼합배양에 의한 발효물이기 때문에 양호한 풍미, 산미를 가지고 있다. 또 수용성이 대단히 높고 가열 조건하, 넓은 pH영역에서 안정하므로 식품가공이 용이하다는 것을 특징으로 하고 있다.

6) GABA 발효대두

池田당화공업(주)에서는 글루탐산을 풍부하게 함유한 대두를 원료로 하여 발효법에 의한 GABA의 증강방안을 검토하였다. 그 결과 인도네시아의 전통적인 발효식품인 템페(temphe)에 사용되고 있는 템페균을 사용, GABA증강 발효대두식품의 개발에 성공하였다. GABA 발효 대두분말의 GABA함량은 1g/100g 이상이다.

7) GABA 락토엑기스

大洋향료(주)에서는 발효식품의 스타터로서 사용되고 있는 유산균 중에서 GABA를 고농도로 그리고 효율 좋게 생성하는 유산균주를 발견하여 유제품 등을 주성으로 하는 GABA 고함유식품인 GABA 락토엑기스를 개발하였다. GABA 함유량은 800mg/100g이상이라고 보고되어 있다. GABA 락토엑기스는 유제품을 주원료로 하여 식용유산균으로 발효시켰기 때문에 범용성, 기호성이 높아 일상적으로 섭취하는 것이 가능하다.

8) GABA 증강 클로렐라

클로렐라공업(주)에서는 미세조류에 속하는 클로렐라 세포 내에 고농도의

GABA를 축적시키는 방법을 검토하여 낮은 pH하에서 GDC에 의해 고농도의 GABA를 축적시키는데 성공하였다. GABA증강 클로렐라의 강압작용은 교감신경계를 억제하여 부교감신경을 우위로 하는 작용에 기초를 두고 있다.

9) GABA 고함유 호박

(주)롯데는 大妻여자대학의 大森正司교수와 공동연구에서 GABA 고함유 호박제품을 개발하였다. 꽃가루, 야채, 과일 등에서 GABA가 많이 함유되고, 그 위에 GDC활성이 높은 것을 탐색하여 호박을 후보로 삼았다. 호박에서 효소를 추출하여 글루탐산을 GABA로 변화시키는 조건을 검토한 결과 20%이상의 GABA를 함유하는 GABA 고함유 호박제품의 개발에 성공하였다. 현재 “GABA·20” 드링크 및 “GABA·20” 정제가 잇달아 출시되고 있는데 1병 또는 1정 중에 GABA 함량 20mg이 되도록 설계되어 있다.

10) GABA 함유 발효 아가리쿠스

(주)야에가끼 발효기연·기술개발연구소에서는 姫路공업대학 환경인간학부의 공동연구에서 GABA함유 발효 아가리쿠스의 상품화에 성공하였다. 아가리쿠스버섯이 함유하는 GDC의 작용으로 액체 배지 중에 글루탐산으로부터 변환된 GABA가 고농도 축적된다는 것을 발견하였다. 버섯유래의 GABA 고농도제품은 최초이며 더구나 아가리쿠스가 무용버섯, 표고버섯, 양송이 보다 GABA 축적량이 많다는 것도 밝혀졌다. 이미 판매되고 있는 GABA를 2.5~3.0% 함유한 분말타입 외에 수용성 타입도 판매할 예정이다.

11) GABA함유 치즈

農水省·畜産試驗場(1997)에 따르면 치즈에는 통상 거의 GABA를 함유하지 않지만 GABA 생성능을 가진 유산균을 사용하여 혈압 강하작용을 지닌 GABA의 함량을 크게 향상시킨 치즈와 동시에 유청음료를 개발하였다고 하였다.

12) 쌀배아, 미강을 축매로 한 GABA 대량생산

新潟縣농업총합연구소에서는 쌀배아 및 미강을 축매로 하여 글루탐산과 GDC의 보조소인 피리독살인산을 pH 5.5, 40℃, 6시간 반응시킴에 의해 GABA의 대량생산방법을 개발하였다. 쌀배아인 경우 GABA의 생산량은 배아 100g당 29g, 미강인 경우 미강 100g당 17g이 된다고 보고되어 있다.

13) 발아현미 GABA Whole Powder

킷스비健全食(주)이 개발한 제품으로 현미를 발아시켜 특수고압가열제법으로 알파화 시키고 분말로 하여 제품화하고 있으며, GABA 함유량은 25mg/10g이다.

14) 미강 발효식품

바이오뱅크(주)가 개발한 발효식품으로 배아 및 미강을 독자의 방법으로 손수 발효시킨 현미영양소 발효식품이다. 본 식품에는 GABA가 169mg/100g함유되어 있는데 과립상으로 시판되고 있다.

15) GABA증강 온실 메론

靜岡縣 농업시험장에서는 각종 농작물 중의 GABA 함유량을 비교실험한 바, 온실 메론 100g 중에 74mg의 GABA가 함유되어 있음을 발견하였다. 이 값은 온실 메론 1개중의 약 56잔 분량의 GABA가 함유된 것이라 보고되어 있다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 재료

1. 원유

서울우유 중부, 북부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소 및 제주도 축산진흥원에서 지원받아 목장별 원유를 사용하였다.

2. 시유

서울우유에서 제조한 시유를 구입하여 사용하였다.

3. 탈지분유

서울우유협동조합에서 제조한 단백질 35.0%, 유지방 1.0%, 탄수화물(유당) 52.5%, 회분 및 기타 8.5%, 수분 3.0%인 제품을 사용하였다.

4. 액상과당

삼양제넥스에서 제조한 과당 55%이상, 포도당 39%이상, 올리고당 6%이하인 제품을 사용하였다.

5. 올리고당

대상(주)에서 제조한 이소말토올리고당 99%, 말토올리고당 1%인 제품을 사용하였다.

6. 딸기잼

동원 F&B에서 제조한 딸기 45%인 제품을 사용하였다.

7. 블루베리잼

(주)오뚜기에서 제조한 블루베리40%(미국산), 백설탕, 물엿, 액상포도당, 펙틴으로 구성된 제품을 사용하였다.

8. Monosodium glutamate

Sigma에서 수입한 제품을 사용하였다.

제 2 절 방법

1. 젖산균의 분리 및 수집

각 목장별 원유를 수거하여 사용하였으며, peptone 희석액으로 총미생물이 $10^6 \sim 10^7$ cfu/ml 수준으로 희석하여 NaN_3 를 첨가한 개선된 MRS배지(Table 1)에 0.1ml씩 평면도말법으로 접종한 후 37°C에서 48시간 배양하고 각 균락을 개선된 MRS배지에서 순수분리한 다음 노란색으로 변한 균락을 잠정적 젖산균으로 선발하였다. 선발된 균주는 개선된 MRS배지에 3회 백금이로 도말한 후 호기배양하여 순수분리 하였고 여기서 얻어진 colony는 triptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양한 다음 보관하였다.

Table 1. Composition of Modified MRS agar

Component	gram/liter
Proteose Peptone #3	10.0
Beef Extract	10.0
Yeast Extract	5.0
Lactose	20.0
Tween 80	1.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Azide	0.25
Bromocresol purple	0.04
Agar	15.0

2. GABA(γ -aminobutyric acid) 정량법

가. 시료의 전처리

eppendorf tube에 시료 0.1g와 methanol 400 μ l를 넣고 잘 섞은 다음 60~70°C로 예열된 water bath에서 완전 건조(약 30분 소요)시켰다. 여기에 70mM LaCl_3 1 ml을 가하여 잘 섞고 13,600g(10,000rpm정도)에서 5분간 원심분리 후 상등액 700 μ l와 0.1M KOH 160 μ l을 eppendorf tube에 가한 다음 3~5분간 교반하였다. 다시

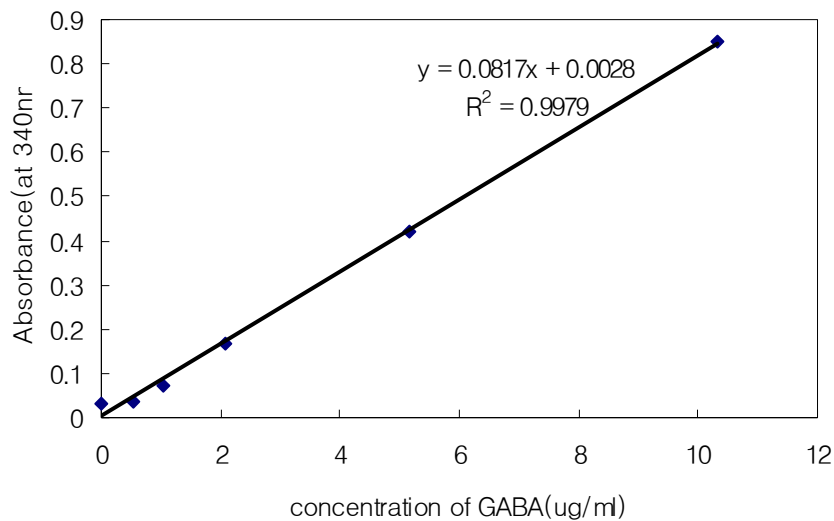
13,600g에서 5분간 원심분리 후 상등액(buffer로 1/5 dilution 하여 사용함) 550 μ l
를 cuvette에 넣었다.

나. standard 준비 및 GABA의 정량법

GABA(mM)	0	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	sample	blank
①1mM GABA	0(ml)	0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	0.55	0
②0.5M K ₄ P ₂ O ₇	0.75	0.745	0.74	0.73	0.7	0.65	0.2	0.75
③4mM NADP	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
④2.0units Gabase/ml	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
⑤20mM α -KG	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

①②③④번을 혼합하여 340nm에서 흡광도 측정(initial A)하고 ⑤ α -KG를 가하여 1시간 동안 실온에서 방치한 후 340nm에서 흡광도 측정(final A)한 다음 표준 곡선을 그리고, 측정된 흡광도(final A-initial A)를 대입하여 GABA량을 구하였다. 그러나 실제 GABA량은 측정된 GABA \times (100/55 \rightarrow 0.1g에 LaCl₃ 1ml를 가하여 700 μ l를 취하고 나중에 550 μ l을 취했으므로) \times 5(희석배수)

GABA standard curve



3. 젖산균의 동정

분리 선발된 젖산균주는 MRS 액체배지에서 2회이상 계대배양하여 활력을 회복시킨 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 순수분리된 균주는 Gram염색, 포자생성, 호기적 및 혐기적 생장, catalase생성, 15℃ 및 45℃에서의 생장, glucose로 부터 가스생성, arginine으로 부터 ammonia 생성, 현미경관찰과 API 50CHL kit와 API 20 STREP kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당발효 시험을 실시한 결과를 ATB identification system(bioMerieux, France)에 입력하여 젖산균의 genus와 species를 결정하였다.

4. 선발 젖산균의 특성조사

가. 젖산균의 생장

젖산균의 생장은 생균수, pH를 측정하여 시험하였다. 생균수는 10% 탈지분유 150ml에 젖산균을 1ml용 피펫 1drop 접종한 후 34, 37, 40℃에서 3시간 간격으로 24시간까지 배양한 각 시료를 0.1% peptone용액에 희석하여 BCP plate count agar 평판에서 부어 굳힌 후 35℃에서 48시간 배양하여 계수하였고, 온도 및 시간 별로 pH 변화를 측정하였다. 이때 pH는 pH meter(Mettler model 345, England)로 측정하였다.

나. 젖산균의 단백질 분해

1) 시료의 전처리

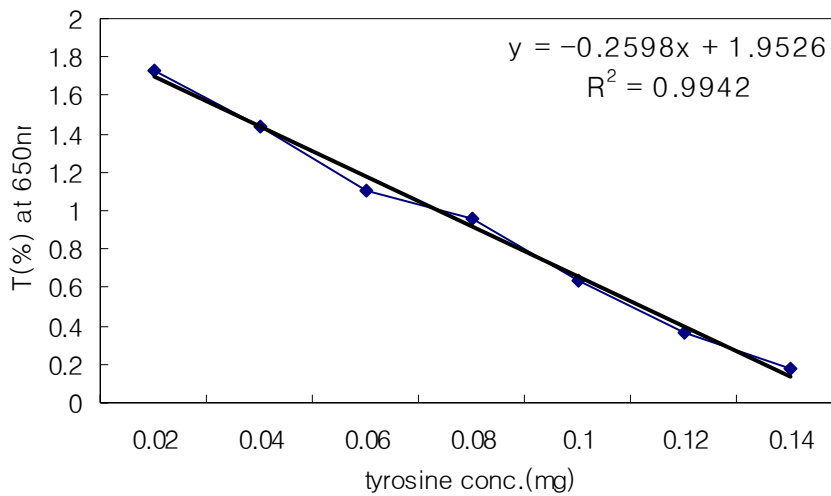
10% 환원탈지유를 65℃에서 30분간 살균하여 단백질 분해력 측정배지로 사용하였다. MRS 액체배지에서 18시간 배양된 각 균주를 1%접종하고 32℃에 배양하면서 일정한 시간별로 시료를 채취하여 pH를 측정하고, Hull(1947)의 방법에 따라 시료 5ml를 취하여 0.72N Trichloroacetic acid 10ml와 섞어 흔든 후 10분간 정지한 다음 whatman No. 42 여과지에 여과된 시료를 다시 5ml 취하여 sodium carbonate-sodium tetrphosphate solution 10ml와 잘 섞은 다음 phenol reagent 3ml를 다시 섞어서 5분동안 잘 흔들어 청색 발색시킨 후 spectrophotometer (Hitachi model 200-20, Japan)를 이용하여 650nm에서 측정한 값을 미리 만들어진 tyrosine standard의 값으로 환산하여 값을 구하였다.

2) Tyrosine standard solution

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
tyrosine	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000
TCA	4500	4000	3500	3000	2500	2000	1500	1000	500	0

Tyrosine standard solution은 tyrosine을 농도를 달리하여 총 volume 5ml 되도록 TCA로 맞추었다. spectrophotometer를 이용하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 이 값으로 표준곡선을 그리고 시료의 흡광도를 대입하여 tyrosine 농도를 구하였다.

Tyrosine STD curve



다. 항생제 내성 시험

항생제 내성 시험은 MRS액체배지에 각 균주를 접종하여 30℃에서 18시간 배양한 후 0.1% peptone용액에 적정농도로 희석하였다. 각 항생제가 각 농도별로 포함된 tryptic soy 액체배지에 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml 수준으로 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 성장여부를 결정하였다. 항생제 내성측정은 2배 희석방법을 사용하였으며, 억제된 가장 낮은 농도를 MIC(Minimal inhibitory

concentration) 값으로 결정하였다. 항생제는 Sigma Chemical Co.(USA)로 부터 구매하여 사용하였다. 항생제는 Amikacin, Gentamicin, Kanamycin, Neomycin, Streptomycin, Penicillin-G, Methicillin, Oxacillin, Ampicillin, Bacitracin, Rifampicin, Novobiocin, Lincomycin, Polymyxin B 및 Chloramphenicol를 시험에 사용하였다.

라. 효소활성 시험

MRS 액체배지에서 30℃, 18시간동안 배양한 균주를 생리식염수로 희석하여 $10^5 \sim 10^6$ cfu/ml 수준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 30℃에서 5시간 배양한 다음 효소반응 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0 ~ 5의 수치로 표시하였으며, 대조구 이외의alkaline phosphatase, esterase(C4), esterase lipase(C8), lipase(C14), leucine arylamidase, valine arylamidase, cystine arylamidase, trypsin, chymotrypsin, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, α -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, β -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase, α -mannosidase, β -fucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

마. 내담즙성 실험

Gilliland와 Walker(1990)의 방법에 따라 0.05% cysteine이 함유된 MRS액체 배지에 0.3% oxgall을 첨가한 후 liquid paraffin을 증층한 다음 MRS액체배지에서 37℃, 18시간 배양된 각각의 균주를 1%접종하여 37℃의 water bath에서 배양하면서 시간별로 OD₆₂₀값을 측정하였다.

바. pH 내성 실험

Clark 등(1993)의 방법에 따라 37% HCl을 증류수에 섞어 pH 1,2,3용액과 대조구로서 pH 6.4용액을 제조하였고, 제조된 pH용액 10ml에 0.05% cysteine이 함유된 MRS액체배지에서 37℃, 24시간 배양된 각각의 균주를 1ml씩을 섞은 후 37℃에서 배양하면서 0, 1, 2, 3시간 후의 생균수를 37℃, 48시간 혐기 배양한 다음 계수하였다.

사. 항균력 실험

Gilliland와 Speck(1977)의 방법에 따라 항균력 측정에 사용한 지시균인 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* 및 *Staphylococcus aureus*는 한국식품 연구원으로 부터 분양받았으며, 지시균의 증식배지로서 *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*는 nutriunt 액체배지에서 호기적으로 37°C, 24시간 배양하였다. 혼합배양 및 대조군에 사용된 배지는 MRS 액체배지로서 젖산균과 지시균을 각각 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 선택배지로서 *Escherichia coli*는 EMB agar, *Salmonella typhimurium*은 Bismuth sulfite agar, *Staphylococcus aureus* 는 Baird parker agar를 사용하여 37°C에서 6시간 배양하였다. 젖산균에 의한 지시균의 억제율은 다음의 식으로 구하였다.

$$\frac{(\text{대조군의 균수 CFU/ml}) - (\text{혼합배양 후의 균수 CFU/ml})}{(\text{대조군의 균수 CFU/ml})}$$

아. Glutamate decarboxylase 활성 시험

GDC 활성 측정은 ¹⁴CO₂-trapping method(Urena-Guerrero 등, 2003)에 따라 측정하였다. L-[1-¹⁴C]-glutamic acid를 기질을 사용하였고, 시료는 0.32M sucrose에서 균질화시켰다. 균질화된 시료 90 μ l에 PLP(0.2mM) 20 μ l와 Glutamate 20 μ l 그리고 [¹⁴C]-Glutamate 20 μ l를 잘 섞어 반응시켰다. 반응시킨 시료는 37°C에서 30분 동안 shaking incubator에서 배양한 다음 6N H₂SO₄ 200 μ l를 첨가하여 반응을 정지시켰다. 방출된 ¹⁴CO₂는 200 μ l of hyamine hydroxide에 걸리게 된다. 분석은 각 sample을 3 반복, 2개의 blank를 포함해서 1개의 반응 시료와 단백질 변성된 또 다른 1개의 시료를 측정하였다. LS 6000 SE Beckman Spectrometer를 사용하여 30분 동안 protein에서 방출된 ¹⁴CO₂ per mg을 측정함으로써 GDC activity를 확인하였다.

5. 제품분석

가. 수분

칭량관에 정제해사 15g과 작은 유리봉을 넣고, 105±1℃ 의 건조기(Circulation air cool strilize oven, Seoul Scientific Co., Korea)에서 항량이 될 때 까지 건조한 다음 데시케이터에 방냉하여 무게를 잰 후 시료 약 4g을 정확히 달아 앞의 칭량관에 넣고 수욕조상에서 내용물을 때때로 저어 섞으면서 가열하였다. 대부분의 수분을 증발시킨 후 앞의 건조기에 옮겨 3시간 건조시킨 후 칭량관을 꺼내어 데시케이터에 30분간 방냉하고 무게를 재었다. 이 조작을 여러번 반복하고 반복간의 무게 차이가 ±1mg이하가 될 때를 최종무게로 하였다.

$$\text{시료 중 수분(\%)} = (W_1 - W_0)/W \times 100$$

W : 시료의 사용량(g)

W₀ : 칭량관의 무게(g)

W₁ : 건조 후 시료가 들어 있는 칭량관의 무게(g)

나. 단백질

시료 0.5-1g을 정확히 달아서 분해촉매제(Kjeltabs auto, Tecator, Sweden) 2 tablets(1 tablet:1.5g K₂SO₄, 7.5mg Se), 진한황산 12ml와 함께 분해플라스크에 넣고 단백질 분해장치(Digestion system 20 1015 digester, Tecator, Sweden)에서 약 350℃로 가열하였다. 분해플라스크의 내용액이 투명해지면 실온으로 냉각하고 증류수 75ml로 희석한 후 증류적정장치(Kjeltec Auto 1030 Analyzer, Tecator, Sweden)를 사용하여 0.1N HCl 적정량을 구한 다음 다음과 같은 계산식으로 단백질 함량을 구하였다.

$$\text{시료 중 단백질 함량} = \frac{0.1 \times \text{ml HCl} \times f \times 14.007 \times 6.25}{\text{mg 시료} \times 100}$$

f : 0.1N HCl의 보정계수

다. 유지방

국제표준방법(IDF 50B : 1986)에 의해 조지방을 분석하였다. 시료를 약 1 ~ 2g을 비이커에 정량한 후 8 ~ 10ml HCl을 첨가한 다음 시료용액이 까맣게 태우

지 않도록 주의하면서 모든 입자가 완전히 용해될 때까지 열판 위에서 서서히 가열하였다. 완전히 용해된 시료용액을 냉각하여 분액깔대기에 옮긴 다음 EtOH 10ml을 첨가하여 혼합한 후 여기에 Diethyl ether 25ml, Light petroleum 25ml로 연속하여 세척하였다. 용매를 가한 후 분해플라스크에 마개를 막고 1분간 격렬하게 흔들어준 다음 30분정도 정치하여 상층액을 무게를 알고 있는 지방수기에 모았고 나머지 용액을 분액깔때기에 모은 다음 Ether와 Light petroleum를 각각 15ml 첨가하여 2차, 3차 추출하였다. 여기에서 얻은 상등액을 같은 지방수기에 모은 후 용매를 evaporator에서 증발시킨 다음 지방수기를 dry oven에서 1시간 정도 건조한 후 데시케이터에서 실온으로 방냉한 후 무게를 측정하였다. 측정무게의 차이가 $\pm 1\text{mg}$ 이하가 될 때까지 이 조작을 반복하여 최종무게로 하였다.

$$\text{시료 중 지방(\%)} = (W_1 - W_0) / W \times 100$$

W : 시료의 중량(g)

W₁ : 건조 후 지방수기의 중량(g)

W₀ : 수기중량(g)

라. 회분

시료를 약 1-2g을 정량하여 무게를 알고 있는 자제도가니아에 취하고 전기로 (Muffle furnace, Blue-M, U.S.A)에 넣고 온도를 350℃까지 서서히 올리고 연기가 더 이상 나지 않으면 다시 550℃까지 온도를 올려서 약 3시간 동안 회화시켰다. 회화가 끝난 후 자제도가니를 데시케이드에 넣어 실온으로 방냉한 다음 무게를 측정하였다. 이 조작을 여러 번 반복하고 반복간의 무게의 차이가 $\pm 1\text{mg}$ 이하가 될 때를 최종무게로 하였다.

$$\text{시료 중 조회분(\%)} = (W_1 - W_0) / W \times 100$$

W₁ : 회화 전의 자제도가니의 무게(g)

W₀ : 회화 후의 자제도가니 무게(g)

W : 시료의 사용량(g)

마. 적정산도

시료를 철저히 혼합한 다음, 37 \pm 1℃로 가온한 뒤 시료 9g에 증류수 18ml를

가하여 희석하고 1% 페놀프탈레인 용액 0.5ml를 첨가한 다음 0.1N NaOH용액으로 30초간 분홍색이 지속될 때 까지 적정하였다.

0.1N NaOH용액 1ml= 0.009g 젖산

$$\text{적정률(\%)} = \frac{0.1N \text{ NaOH 적정량(ml)} \times 0.009}{\text{시료량(g)}} \times 100$$

바. 젖산균수

시료 11g을 무균적으로 채취하여 99ml 펩톤용액에 넣어 7초동안 30cm간격으로 25회 세계 흔들어 준 후 십진법으로 희석하고 BCP(Brom cresol purple) 평판 측정용 배지에 희석시료를 넣어 35℃에서 48시간 배양한 다음 발생한 황색의 집락을 유산균의 집락으로 계측하였다.

사. 관능검사

제품의 관능검사는 한국식품연구원내의 연구원들로 실시하였으며, 제품의 색, 맛, 조직감, 종합적기호도 및 구입의사를 9점 기호척도법으로 실시하여 그 결과를 통계처리에 의한 유의성 검정을 하였다.

관 능 검 사

날짜 : 년 월 일

성명 :

본 시료는 발효유의 관능평가입니다.

본 시료를 시식하신 후 9점 만점으로 아래의 평가기준에 따라 다음 항목에 대하여 평가하여 주시기 바랍니다.

----- 채점기준 -----

관능평가기준

9점:극도로 좋다. 8점:대단히 좋다. 7점:보통으로 좋다. 6점:약간 좋다.

5점:좋지도 싫지도 않다. 4점:약간 싫다. 3점:보통으로 싫다. 2점:대단히 싫다.

1점:극도로 싫다.

시료번호	색	맛	조직감	종합적기호도	구입의사

6. 동물실험

가. 시료 조제 및 투여량 선정

본 실험에 사용한 GABA 생산균주를 이용한 발효유의 혈당저하, 콜레스테롤 강하, 학습능력 향상 증진 효과를 알아보기 위하여 수컷 랫트와 수컷 마우스를 대상으로 하여 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유와 *Enterococcus faecium* A275 균주이용 발효유(90°C, 30min 열처리)를 7 : 3 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 A와 5 : 5 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 B, *Lactobacillus crispatus* K567 균주만 이용 발효유를 투입한 그룹 C를 설정하여 이 제제의 임상 적용 경로인 경구투여 방법을 선택하여 각각의 혼합 발효유를 랫트와 마우스에 각각 8 ml/kg/day씩 위내로 직접 투여하였다.

대조군은 시판 발효유인 퓨오레를 투여한 대조군(Control)을 두었다. 시료 용량은 시판되고 있는 드링크 발효유 480ml/성인 체중 60kg을 1일 기준으로 결정하였다.

나. 검사 항목

1) 혈당실험

실험에 사용된 동물은 한림실험동물에서 평균체중이 250g 되는 흰쥐(S.D. rat)를 사용하였다. 실험처리전 STZ (streptozotocin, A0130, Sigma)를 흰쥐 체중 1kg당 40mg이 되도록 0.1M citrate buffer(pH 4.0)에 녹여 0.2ml 정도 복강주사 (intraperitoneal injection)로 당뇨병(DM, diabetes mellitus)을 유발하고, STZ투여 후 7일에 Precision PlusTM Electrodes (Medisense Contract Manufacturing Ltd, United Kingdom)를 이용하여 혈당을 측정하여 200mg/dl 이상 되는 쥐를 선별하였으며, 난괴법(randomized complete block design)으로 처리군 당 10마리씩 배치하였다. 검역, 순화, 사육기간 및 시험기간 중 동물은 온도 20±2°C, 상대습도 50±5%, 환기횟수 10-12회/hr, 조명시간은 오전 7시부터 오후 7시까지, 조도는 150-200Lux로 조정하여 사육하였고, 물과 실험식은 자유급이(ad libitum)시켰다.

2) 콜레스테롤실험

실험에 사용된 동물은 한림실험동물에서 생후 4주령 된 평균체중이 120g 되는 일반흰쥐(S.D. rat)를 사용하였다. 1주간 순화사육 기간을 거쳐 사육기간 중 일

반 증상을 관찰하여 증상이 없고 체중감소가 없는 건강한 동물을 60마리 골라 임의로 10마리씩 4군으로 배치하였다. 흰쥐용 사료(commercial formulated feed)에 돼지기름(lard, 10%)과 콜레스테롤(Sigma Co., 시약급, 1%)을 각각 중량비(w/w)로 첨가한 식이(HFCD, high fat and cholesterol diet)를 기본 실험식으로 하고, 실험개시 후 5주 동안 모든 식이군에 HFCD를 급여하였으며, 각각 2주와 4주에 흰쥐의 안와정맥총(眼窩靜脈叢, orbital plexus)으로부터 혈액을 채취하여 콜레스테롤함량을 조사하였다. 실험개시 후 6주째부터 대조군을 제외한 실험군은 9주 까지 4주 동안 발효유 추출물을 매일 일정량 經口投與하면서 혈청 콜레스테롤함량에 미치는 영향을 검토하였다.

Table 2. Composition of experimental diets

Ingredients	Contents(%)
Moisture	3.62 ± 0.24
Protein	19.91 ± 0.05
Fat	2.72 ± 0.10
Crude fiber	5.00 ± 0.03
Crude ash	5.44 ± 0.06
Calcium	0.99 ± 0.05
phosphorus	0.60 ± 0.01

Table 3. Composition of high fat diets

Ingredients	Contents(%)
Moisture	3.76 ± 0.18
Protein	22.61 ± 0.09
Fat	14.07 ± 0.02
Crude fiber	5.00 ± 0.04
Crude ash	6.16 ± 0.05
Calcium	0.95 ± 0.34
phosphorus	0.55 ± 0.02

3) 학습능력실험

실험에 사용된 동물은 한림실험동물에서 생후 4주령 된 평균체중이 20g 되는 SPF ICR 마우스 수컷 62마리를 사용하였다. 1주간 순화사육 기간을 거쳐 사육 기간 중 일반 증상을 관찰하여 증상이 없고 체중감소가 없는 건강한 동물을 60마리 골라 임의로 15마리씩 4군으로 나누어 총 5주 동안 발효유를 포함한 실험식을 급여하여 학습행동을 측정하였다. 水迷路는 複數의 T迷路를 짜맞추어 시작점(starting point)으로부터 목표점(goal)까지 많은 선택 갈림길을 설치한 複合 T迷路를 이용하였다. Biel型 수미로는 이 같은 미로에 물을 채운 것으로서 1940년 Biel에 의해 創案되어 water filled multiple T-maze라고도 한다. 이것은 정위치의 시작점으로부터 목표점까지의 위치관계 認知와, 그것에 덧붙여 각 장소의 분지점에서 좌우 選擇反應의 順序系列의 기록을 평가할 수 있다. Biel型 水迷路 시험의 관찰지표는 시작점으로부터 회피용 발판(escape platform)까지의 游泳時間과 과제 수행 중 선택지점에서의 막다른 골목(blind alley)에 들어간 誤 反應數의 합계이다.

다. 조사항목과 분석방법

체중과 식이섭취량은 7일 간격으로 조사하고, 장기무게는 실험종료일 전 12시간 절식시킨 다음 ethyl ether로 마취시켜 실험동물을 희생시켜서 장기를 적출하여 여과지로 닦아내고 칭량하였다. 혈당(serum glucose)은 임상실험용 효소법을 이용하여 비색법으로 분석하였다. 혈중지질(TC, TG, HDL, LDL 콜레스테롤)과 간기능치(GOT, GPT, LDH)는 녹십자분석실에 의뢰하여 분석하였다.

실험결과는 SAS package를 이용하여 실험군당 평균±표준편차로 표시하고, 실험군간 평균치의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

제 3 절 연구결과 및 고찰

1. 젖산균 분리 및 수집

가. 원유에서 젖산균 분리

서울우유 중부, 북부, 서부지도소 관할 원유검사소(경기도 및 강원도 일부), 전북 축산시험연구소, 경북 가축위생시험소 및 제주도 축산진흥원에서 지원받아 목장별 원유를 채취하여 MRS배지에 Bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37℃에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선발하였고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 tryptic soy agar slant에 37℃에서 18시간 배양한 다음 보관하였다. 이때 2082개의 균주를 분리하였다.

또한 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37℃에서 24시간과 48시간 배양하여 응고된 균주가 각각 861개 균주와 1,619개 균주이었다(표 4 ~ 표 9).

나. 상업균주 수집

한국식품연구원내에서 보관 중인 ATCC, NRRL, NCFB, KFRI 등의 젖산균주 10종과 상업균주(룽프랑, Culture System) 4종을 확보하였으며, 다음 표 10과 같다.

표 10. 한국식품연구원에서 보관 젖산균주

보관 젖산균주명	Source
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM, Rhone-poulenc
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Culture System
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Culture System
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	NCFM, Rhone-poulenc
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	ATCC 21053
<i>Lactococcus lactis</i>	ARRL B-633
<i>Lactococcus diacetylactis</i>	NRRL B-2356
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 393
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 11506, IFO 3205
<i>Lactococcus cremoris</i>	KFRI 00349
<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis</i>	ATCC 7830, IFO 3376
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	ATCC 33409
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	NRRL B-4437
<i>Lactobacillus reuteri</i>	KFRI 00661

다. monosodium glutamate가 첨가된 Skim milk배지를 이용 GABA 생산 젖산균 수집

monosodium glutamate 1%가 첨가된 10% 환원탈지분유에 24시간내에 응고시킨 분리균주 861개를 접종한 후 37℃에서 18시간 배양한 다음 pH와 GABA양을 측정된 결과는 다음 표 4 ~ 표 9와 같다.

표 4. 경기도 중부지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양후 GABA 함량

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
A-1		+			A-41	+	+	5.19	16.13
A-2		+			A-42		+		
A-3		+			A-43		+		
A-4	+	+	5.47	12.78	A-44	+	+	5.26	5.8
A-5		+			A-45		+		
A-6		+			A-46	+	+	5.28	7.38
A-7		+			A-47		+		
A-8		+			A-48		+		
A-9		+			A-49		+		
A-10	+	+	5.46	11.48	A-50		+		
A-11					A-51	+	+	5.20	39.51
A-12		+			A-52	+	+	5.28	54.14
A-13	+	+	5.53	20.51	A-53		+		
A-14		+			A-54	+	+	4.96	19.00
A-15					A-55	+	+	4.93	29.25
A-16	+	+	5.27	14.76	A-56	+	+	4.96	1815.45
A-17					A-57	+	+	4.96	29.53
A-18					A-58	+	+	5.14	25.70
A-19					A-59		+		
A-20					A-60		+		
A-21					A-61	+	+	5.06	10.94
A-22					A-62	+	+	5.00	4.92
A-23					A-63	+	+	5.69	6.56
A-24					A-64	+	+	5.54	5.19
A-25					A-65	+	+	5.21	35.13
A-26					A-66	+	+	5.10	48.12
A-27	+	+	5.24	19.14	A-67	+	+	5.30	33.22
A-28	+	+	5.20	14.49	A-68		+		
A-29	+	+	5.14		A-69		+		
A-30		+			A-70	+	+	5.82	29.39
A-31	+	+	5.26	6.28	A-71	+	+	5.32	42.52
A-32	+	+	5.23	4.44	A-72	+	+	5.63	5.33
A-33	+	+	5.29	9.02	A-73		+		
A-34		+			A-74	+	+	4.96	32.95
A-35					A-75		+		
A-36		+			A-76		+		
A-37		+			A-77				
A-38	+	+	5.67	10.23	A-78	+	+	5.21	44.70
A-39	+	+	5.14	4.37	A-79	+	+	5.27	17.50
A-40	+	+	5.11	3.01	A-80	+	+	5.44	54.14

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
A-81	+	+	5.40	19.28	A-121		+		
A-82	+	+	5.56	30.37	A-122		+		
A-83					A-123	+	+	5.30	31.58
A-84	+	+	5.24	20.78	A-124	+	+	5.23	23.92
A-85	+	+	5.12	21.46	A-125				
A-86	+	+	5.32	18.73	A-126	+	+	5.35	27.20
A-87	+	+	5.18	9.93	A-127	+	+	5.30	50.31
A-88		+			A-128				
A-89	+	+	5.38	2.73	A-129		+		
A-90	+	+	5.16	9.71	A-130		+		
A-91	+	+	5.18	4.24	A-131	+	+	5.34	45.52
A-92	+	+	5.06	22.83	A-132				
A-93					A-133				
A-94		+			A-134				
A-95					A-135	+	+	5.18	5.88
A-96		+			A-136				
A-97		+			A-137		+		
A-98		+			A-138	+	+	5.03	5.33
A-99					A-139	+	+	5.19	1.09
A-100					A-140				
A-101					A-141		+		
A-102					A-142		+		
A-103		+			A-143		+		
A-104	+	+	5.10	23.79	A-144		+		
A-105		+			A-145	+	+	5.04	6.15
A-106	+	+	5.10	15.84	A-146	+	+	5.13	10.80
A-107		+			A-147				
A-108					A-148	+	+	5.11	8.89
A-109					A-149	+	+	5.05	14.88
A-110					A-150	+	+	5.10	8.32
A-111	+	+	5.02	2.19	A-151	+	+	5.12	9.55
A-112		+			A-152				
A-113					A-153	+	+	5.00	18.73
A-114					A-154	+	+	5.04	3.55
A-115	+	+	5.09	7.89	A-155	+	+	5.08	7.11
A-116		+			A-156	+	+	5.22	7.66
A-117	+	+	5.29	17.91	A-157	+	+	5.45	0.68
A-118	+	+	5.31	25.43	A-158				
A-119		+			A-159				
A-120		+			A-160		+		

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
A-161	+	+	5.47	4.92	A-201		+		
A-162					A-202		+		
A-163	+	+	5.22	20.51	A-203		+		
A-164					A-204		+		
A-165					A-205	+	+	5.18	6.58
A-166	+	+	5.55	18.87	A-206				
A-167					A-207		+		
A-168					A-208				
A-169					A-209		+		
A-170					A-210		+		
A-171	+	+	5.03	15.04	A-211		+		
A-172					A-212				
A-173	+	+	5.36	1.78	A-213	+	+	5.04	3.83
A-174		+	5.54		A-214		+		
A-175	+	+	5.45	4.24	A-215		+		
A-176		+			A-216				
A-177		+			A-217		+		
A-178		+			A-218		+		
A-179	+	+	5.05	19.69	A-219	+	+	5.06	12.41
A-180					A-220		+		
A-181	+	+	5.09	12.17	A-221				
A-182	+	+	5.40	9.71	A-222		+		
A-183					A-223		+		
A-184	+	+	5.50	3.01	A-224		+		
A-185					A-225		+		
A-186	+	+	4.90	4.65	A-226	+	+	4.96	20.37
A-187	+	+	5.13	21.19	A-227		+		
A-188					A-228		+		
A-189					A-229	+	+	4.90	6.84
A-190		+			A-230	+	+	4.72	19.14
A-191					A-231	+	+	4.74	21.60
A-192		+			A-232	+	+	5.57	17.22
A-193					A-233		+		
A-194		+			A-234		+		
A-195		+			A-235		+		
A-196					A-236	+	+	4.91	9.43
A-197		+			A-237	+	+	5.51	12.30
A-198		+			A-238	+	+	5.65	9.43
A-199		+			A-239		+		
A-200		+			A-240	+	+	5.51	271.50

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
A-241					A-281				
A-242	+	+	5.08	40.46	A-282				
A-243	+	+	5.20	18.71	A-283				
A-244	+	+	5.33	11.21	A-284		+		
A-245					A-285	+	+	5.24	7.11
A-246		+			A-286		+		
A-247	+	+	5.41	11.48	A-287	+	+	5.28	8.84
A-248	+	+	5.12	8.48	A-288		+		
A-249					A-289		+		
A-250	+	+	5.31	271.50	A-290		+		
A-251		+			A-291	+	+	5.34	19.00
A-252	+	+	5.62	4.92	A-292	+	+	5.58	19.82
A-253	+	+	5.06	53.04	A-293		+		
A-254	+	+	5.15	5.74	A-294	+	+	5.36	308.41
A-255	+	+	5.17	6.84	A-295				
A-256	+	+	5.11	13.40	A-296		+		
A-257	+	+	5.30	5.15	A-297	+	+	5.23	16.54
A-258	+	+	5.39	9.57	A-298		+		
A-259		+			A-299	+	+	5.33	30.21
A-260		+			A-300	+	+	5.12	11.76
A-261	+	+	5.43	4.37	A-301		+		
A-262	+	+	5.34	66.85	A-302				
A-263	+	+	5.38	23.10	A-303		+		
A-264					A-304		+		
A-265		+			A-305		+		
A-266		+			A-306	+	+	5.54	40.46
A-267		+			A-307	+	+	5.42	4.24
A-268	+	+	5.59	685.71	A-308				
A-269		+			A-309		+		
A-270					A-310				
A-271		+			A-311	+	+	5.27	14.22
A-272	+	+	5.06	50.17	A-312		+		
A-273					A-313		+		
A-274					A-314				
A-275	+	+	5.38	2303.76	A-315		+		
A-276					A-316	+	+	5.32	13.67
A-277	+	+	5.37	20.37	A-317				
A-278		+			A-318				
A-279					A-319	+	+	5.29	23.51
A-280	+	+	5.26	24.06	A-320				

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
A-321					A-361		+		
A-322	+	+	5.20	58.78	A-362	+	+	4.98	11.48
A-323		+			A-363	+	+	5.15	15.99
A-324					A-364		+		
A-325		+			A-365		+		
A-326		+			A-366				
A-327					A-367				
A-328					A-368	+	+	5.42	14.35
A-329					A-369	+	+	4.98	13.53
A-330					A-370				
A-331					A-371				
A-332	+	+	5.48	25.02	A-372				
A-333					A-373				
A-334	+	+	5.17	12.58	A-374		+		
A-335	+	+	5.18	8.89	A-375		+		
A-336		+			A-376	+	+	5.69	20.10
A-337					A-377	+	+	5.27	8.75
A-338					A-378	+	+	4.96	28.84
A-339					A-379				
A-340					A-380	+	+	5.01	11.89
A-341		+			A-381		+		
A-342		+			A-382	+	+	5.21	13.26
A-343		+			A-383	+	+	5.17	6.15
A-344		+			A-384		+		
A-345		+			A-385		+		
A-346					A-386		+		
A-347		+			A-387				
A-348					A-388	+	+	4.95	12.85
A-349					A-389	+	+	4.84	37.05
A-350		+			A-390		+		
A-351		+			A-391		+		
A-352		+			A-392		+		
A-353		+			A-393		+		
A-354		+			A-394	+	+	4.95	12.30
A-355					A-395		+		
A-356		+			A-396		+		
A-357					A-397		+		
A-358		+			A-398	+	+	5.29	47.16
A-359					A-399		+		
A-360	+	+	5.24	32.26	A-400	+	+	5.30	17.16

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
A-401	+	+	5.06	11.46	A-441		+		
A-402					A-442		+		
A-403	+	+	5.08	5.39	A-443				
A-404	+	+	5.14	16.68	A-444	+	+	5.32	2.32
A-405	+	+	5.39	22.19	A-445		+		
A-406		+			A-446	+	+	5.30	17.50
A-407	+	+	5.47	26.50	A-447	+	+	5.20	5.47
A-408	+	+	5.44	37.87	A-448	+	+	5.31	12.99
A-409	+	+	4.96	40.19	A-449	+	+	5.46	15.86
A-410	+	+	5.36	1.37	A-450		+		
A-411	+	+	5.37	127.55	A-451				
A-412	+	+	5.21	2.22	A-452		+		
A-413		+			A-453	+	+	5.30	23.10
A-414	+	+	5.43	9.71	A-454		+		
A-415		+			A-455		+		
A-416	+	+	5.15	0.55	A-456				
A-417		+			A-457		+		
A-418					A-458		+		
A-419		+			A-459				
A-420					A-460		+		
A-421					A-461	+	+	5.52	1.14
A-422	+	+	5.36	8.20	A-462				
A-423					A-463		+		
A-424	+	+	5.79	8.89	A-464		+		
A-425		+			A-465				
A-426		+			A-466		+		
A-427		+			A-467				
A-428	+	+	5.11	10.25	A-468		+		
A-429		+			A-469				
A-430					A-470				
A-431					A-471	+	+	5.10	18.95
A-432		+			A-472				
A-433					A-473	+	+	5.34	17.91
A-434		+			A-474				
A-435	+	+	5.44	11.48	A-475	+	+	5.11	4.58
A-436	+	+	5.44	4.10	A-476				
A-437	+	+	5.67	9.98	A-477	+	+	5.69	11.44
A-438		+			A-478				
A-439	+	+	5.66	3.01	A-479	+	+	4.98	13.14
A-440	+	+	5.12	6.56	A-480				

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
A-481	+	+	5.25	5.59	A-521				
A-482	+	+	5.03	6.69	A-522				
A-483		+			A-523				
A-484					A-524	+	+	5.30	23.38
A-485					A-525				
A-486					A-526				
A-487	+	+	5.04	13.21	A-527				
A-488		+			A-528	+	+	4.85	10.24
A-489		+			A-529				
A-490	+	+	5.02	9.65	A-530		+		
A-491		+			A-531				
A-492		+			A-532		+		
A-493		+			A-533		+		
A-494		+			A-534				
A-495	+	+	4.73	13.26	A-535		+		
A-496	+	+	5.30	25.15	A-536		+		
A-497	+	+	5.47	50.17	A-537		+		
A-498					A-538				
A-499					A-539				
A-500					A-540	+	+	5.47	27.34
A-501	+	+	5.53	24.61	A-541				
A-502	+	+	5.43	2.32	A-542				
A-503	+	+	5.22	28.16	A-543		+		
A-504	+	+	5.23	28.57	A-544		+		
A-505	+	+	5.23	32.67	A-545		+		
A-506	+	+	4.78	41.01	A-546	+	+	5.20	20.23
A-507	+	+	4.65	12.85	A-547	+	+	5.24	41.29
A-508					A-548				
A-509					A-549	+	+	5.38	25.84
A-510					A-550	+	+	5.15	42.11
A-511	+	+	4.92	8.45	A-551		+		
A-512	+	+	5.38	9.78	A-552		+		
A-513					A-553		+		
A-514		+			A-554		+		
A-515	+	+	4.97	16.68	A-555		+		
A-516		+			A-556	+	+	5.31	1.37
A-517	+	+	4.95	36.23	A-557	+	+	5.31	5.74
A-518	+	+	5.02	38.00	A-558	+	+	5.25	55.55
A-519	+	+	4.93	47.98	A-559	+	+	5.28	40.87
A-520		+							

표 5. 경기도 서부지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양 후 GABA 함량

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
B-1	+	+	5.22	5.91	B-41				
B-2		+			B-42	+	+	5.11	7.88
B-3		+			B-43		+		
B-4					B-44	+	+	5.03	0.98
B-5	+	+	5.67	4.92	B-45				
B-6		+			B-46				
B-7	+	+	5.40	0.98	B-47		+		
B-8		+			B-48	+	+	4.58	3.94
B-9		+			B-49	+	+	4.75	12.56
B-10	+	+	5.39	1.97	B-50	+	+	5.14	2.95
B-11		+			B-51		+		
B-12		+			B-52				
B-13		+			B-53				
B-14	+	+	5.21	2.95	B-54		+		
B-15					B-55		+		
B-16	+	+	5.95	3.94	B-56	+	+	6.19	10.83
B-17	+	+	4.66	5.91	B-57				
B-18		+			B-58		+		
B-19		+			B-59	+	+	5.20	0.98
B-20	+	+	4.89	4.92	B-60		+		
B-21					B-61				
B-22					B-62		+		
B-23		+			B-63	+	+	5.25	3.94
B-24		+			B-64		+		
B-25	+	+	4.88	0.98	B-65		+		
B-26		+			B-66	+	+	5.20	5.91
B-27		+			B-67		+		
B-28					B-68				
B-29					B-69		+		
B-30		+			B-70	+	+	4.58	14.78
B-31	+	+	6.05	1.97	B-71		+		
B-32		+			B-72				
B-33		+			B-73				
B-34		+			B-74				
B-35	+	+	5.14	3.94	B-75	+	+	5.25	7.88
B-36	+	+	4.64	12.58	B-76		+		
B-37		+			B-77		+		
B-38					B-78		+		
B-39					B-79	+	+	5.20	2.95
B-40	+	+	5.01	6.89	B-80	+	+	4.72	2.95

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
B-81	+	+	5.07	4.92	B-121	+	+	5.05	5.91
B-82		+			B-122		+		
B-83	+	+	5.18	5.91	B-123		+		
B-84	+	+	4.70	12.78	B-124				
B-85	+	+	4.69	5.91	B-125	+	+	5.35	1.97
B-86		+			B-126		+		
B-87					B-127		+		
B-88					B-128	+	+	4.77	3.94
B-89		+			B-129	+	+	5.50	4.92
B-90	+	+	4.87	2.95	B-130	+	+	4.60	2.58
B-91		+			B-131				
B-92	+	+	4.57	5.91	B-132	+	+	4.95	9.68
B-93					B-133		+		
B-94		+			B-134		+		
B-95	+	+	5.45	0.98	B-135	+	+	4.65	7.88
B-96		+			B-136	+	+	4.76	2.95
B-97					B-137		+		
B-98					B-138				
B-99		+			B-139				
B-100	+	+	5.24	9.85	B-140		+		
B-101		+			B-141	+	+	4.84	5.91
B-102	+	+	4.90	6.89	B-142		+		
B-103		+			B-143	+	+	4.88	2.98
B-104		+			B-144	+	+	5.31	4.50
B-105	+	+	5.08	0.98	B-145				
B-106		+			B-146				
B-107					B-147	+	+	4.93	12.80
B-108		+			B-148		+		
B-109	+	+	4.71	0.98	B-149		+		
B-110		+			B-150	+	+	5.41	4.92
B-111	+	+	4.88	25.8	B-151		+		
B-112		+			B-152		+		
B-113		+			B-153				
B-114	+	+	4.91	2.95	B-154		+		
B-115		+			B-155	+	+	5.23	8.86
B-116		+			B-156	+	+	5.43	27.58
B-117	+	+	4.91	1.97	B-157				
B-118	+	+	5.22	3.98	B-158		+		
B-119	+	+	4.72	1.97	B-159		+		
B-120		+			B-160	+	+	5.04	2.95

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
B-161	+	+	5.37	4.98	B-201	+	+	4.52	14.77
B-162		+			B-202	+	+	5.04	10.83
B-163		+			B-203		+		
B-164					B-204		+		
B-165	+	+	4.59	11.82	B-205	+	+	5.57	1.97
B-166		+			B-206	+	+	4.82	2.95
B-167		+			B-207				
B-168					B-208				
B-169	+	+	4.92	1.97	B-209		+		
B-170		+			B-210	+	+	5.31	13.79
B-171		+			B-211	+	+	4.65	12.80
B-172					B-212				
B-173	+	+	5.28	12.80	B-213				
B-174		+			B-214		+		
B-175		+			B-215	+	+	4.64	12.80
B-176	+	+	4.59	10.83	B-216		+		
B-177		+			B-217	+	+	4.54	0.98
B-178		+			B-218	+	+	5.13	7.88
B-179					B-219		+		
B-180					B-220		+		
B-181	+	+	4.56	2.95	B-221	+	+	5.02	2.95
B-182	+	+	4.59	14.77					
B-183	+	+	4.58	10.83					
B-184									
B-185									
B-186									
B-187									
B-188	+	+	4.63	1.97					
B-189		+							
B-190		+							
B-191	+	+	5.12	15.76					
B-192		+							
B-193									
B-194	+	+	4.53	3.98					
B-195		+							
B-196		+							
B-197	+	+	4.50	20.68					
B-198		+							
B-199	+	+	4.55	6.98					
B-200	+	+	4.62	9.85					

표 6. 경기도 북부지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양 후 GABA함량

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
C-1	+	+	5.25	5.91	C-41	+	+	4.58	15.76
C-2		+			C-42		+		
C-3		+			C-43	+	+	5.24	11.82
C-4	+	+	5.59	6.89	C-44	+	+	5.16	4.92
C-5	+	+	4.92	14.77	C-45		+		
C-6	+	+	5.36	0.98	C-46				
C-7					C-47				
C-8					C-48	+	+	5.08	26.59
C-9					C-49		+		
C-10	+	+	5.38	5.91	C-50	+	+	5.50	13.79
C-11		+			C-51				
C-12		+			C-52				
C-13	+	+	4.57	15.76	C-53	+	+	5.62	20.68
C-14		+			C-54		+		
C-15		+			C-55	+	+	5.46	14.77
C-16	+	+	5.65	8.86	C-56				
C-17		+			C-57				
C-18		+			C-58		+		
C-19	+	+	5.25	17.76	C-59	+	+	5.29	13.79
C-20	+	+	5.06	15.76	C-60		+		
C-21		+			C-61		+		
C-22					C-62	+	+	6.19	25.61
C-23					C-63		+		
C-24	+	+	5.41	16.74	C-64				
C-25		+			C-65				
C-26		+			C-66				
C-27	+	+	5.31	12.80	C-67	+	+	5.38	13.79
C-28		+			C-68		+		
C-29		+			C-69	+	+	5.39	3.94
C-30	+	+	5.13	8.86	C-70	+	+	5.37	2.85
C-31	+	+	5.19	1.97	C-71	+	+	5.37	12.22
C-32	+	+	4.82	15.76	C-72		+		
C-33					C-73				
C-34					C-74				
C-35					C-75		+		
C-36					C-76	+	+	4.56	6.58
C-37	+	+	4.65	4.89	C-77		+		
C-38	+	+	4.57	11.48	C-78	+	+	5.48	6.74
C-39	+	+	5.27	14.71	C-79		+		
C-40					C-80	+	+	4.55	1.25

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
C-81	+	+	5.55	5.14					
C-82	+	+	5.21	6.55					
C-83	+	+	4.72	17.13					
C-84		+							
C-85									
C-86		+							
C-87	+	+	5.31	19.84					
C-88	+	+	5.20	20.41					
C-89									
C-90		+							
C-91	+	+	5.32	5.47					
C-92	+	+	4.66	6.89					
C-93		+							
C-94	+	+	5.33	15.62					
C-95		+							
C-96	+	+	4.64	1.97					
C-97		+							
C-98	+	+	5.82	3.68					
C-99									
C-100		+							
C-101	+	+	4.92	8.97					
C-102		+							
C-103									
C-104	+	+	5.00	15.24					
C-105		+							
C-106	+	+	5.88	20.11					
C-107									
C-108	+	+	5.91	1.49					
C-109		+							
C-110		+							
C-111	+	+	4.70	8.47					
C-112									
C-113		+							
C-114	+	+	5.68	5.14					
C-115		+							
C-116	+	+	5.39	5.89					
C-117									
C-118		+							
C-119	+	+	5.19	10.54					
C-120	+	+	5.11	9.65					

표 7. 경상도 지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양 후 GABA 함량

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
D-1	+	+	4.83	8.86	D-41	+	+	4.83	9.85
D-2	+	+	5.08	5.44	D-42	+	+	5.10	6.89
D-3		+			D-43		+		
D-4	+	+	4.70	13.79	D-44	+	+	4.74	0.98
D-5		+			D-45				
D-6					D-46	+	+	4.74	18.71
D-7					D-47		+		
D-8	+	+	4.79	10.83	D-48	+	+	4.93	1.97
D-9		+			D-49				
D-10	+	+	5.15	23.64	D-50	+	+	4.79	15.76
D-11	+	+	4.89	5.91	D-51				
D-12					D-52				
D-13	+	+	4.77	15.76	D-53	+	+	4.77	14.77
D-14		+			D-54		+		
D-15	+	+	4.81	7.88	D-55		+		
D-16					D-56	+	+	4.74	12.80
D-17					D-57				
D-18					D-58	+	+	4.77	6.89
D-19					D-59		+		
D-20					D-60	+	+	4.79	18.71
D-21	+	+	5.00	4.92	D-61				
D-22	+	+	4.85	11.82	D-62	+	+	4.88	15.76
D-23					D-63				
D-24					D-64	+	+	4.74	12.80
D-25	+	+	4.80	2.95	D-65				
D-26					D-66	+	+	4.79	521.02
D-27	+	+	4.50	7.88	D-67				
D-28	+	+	4.93	7.88	D-68		+		
D-29		+			D-69	+	+	4.88	15.76
D-30					D-70		+		
D-31	+	+	4.66	13.79	D-71	+	+	4.89	4.92
D-32					D-72				
D-33					D-73	+	+	4.79	3.94
D-34					D-74				
D-35					D-75				
D-36	+	+	4.84	7.88	D-76	+	+	4.89	18.71
D-37		+			D-77				
D-38					D-78				
D-39	+	+	4.84	3.94	D-79		+		
D-40	+	+	4.77	5.49	D-80	+	+	4.67	0.98

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
D-81	+	+	4.62	1.97	D-121		+		
D-82					D-122		+		
D-83		+			D-123	+	+	4.81	17.73
D-84					D-124	+	+	5.15	13.79
D-85	+	+	4.70	6.89	D-125		+		
D-86		+			D-126	+	+	4.64	0.98
D-87	+	+	4.67	8.86	D-127				
D-88					D-128				
D-89					D-129				
D-90	+	+	5.15	1.97	D-130	+	+	4.49	7.88
D-91		+			D-131		+		
D-92					D-132	+	+	4.99	19.03
D-93					D-133		+		
D-94	+	+	4.64	0.98	D-134		+		
D-95		+			D-135	+	+	5.29	14.77
D-96		+			D-136		+		
D-97					D-137				
D-98					D-138				
D-99	+	+	4.49	6.89	D-139	+	+	4.94	19.70
D-100		+			D-140				
D-101		+			D-141				
D-102	+	+	4.62	8.86	D-142		+		
D-103					D-143	+	+	4.73	5.46
D-104		+			D-144		+		
D-105	+	+	4.73	38.41	D-145				
D-106		+			D-146				
D-107		+			D-147	+	+	5.02	14.77
D-108	+	+	4.70	2.95	D-148	+	+	4.73	7.88
D-109	+	+	4.78	3.94	D-149		+		
D-110					D-150		+		
D-111					D-151		+		
D-112					D-152	+	+	5.39	5.91
D-113					D-153	+	+	5.15	13.79
D-114	+	+	5.04	12.80	D-154		+		
D-115					D-155	+	+	4.78	0.98
D-116		+			D-156				
D-117					D-157				
D-118	+	+	4.72	20.68	D-158	+	+	5.62	11.82
D-119					D-159	+	+	5.04	0.98
D-120		+			D-160				

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
D-161					D-201				
D-162					D-202	+	+	5.06	12.80
D-163	+	+	4.72	6.89	D-203		+		
D-164					D-204				
D-165		+			D-205				
D-166	+	+	4.62	8.86	D-206	+	+	5.33	9.85
D-167					D-207				
D-168					D-208				
D-169	+	+	4.74	2.95	D-209				
D-170		+			D-210	+	+	5.34	17.73
D-171	+	+	5.19	9.85					
D-172		+							
D-173									
D-174									
D-175	+	+	4.70	3.94					
D-176	+	+	4.79	5.91					
D-177		+							
D-178									
D-179		+							
D-180	+	+	4.71	5.91					
D-181	+	+	4.83	3.94					
D-182									
D-183									
D-184		+							
D-185	+	+	5.58	6.85					
D-186		+							
D-187									
D-188	+	+	4.84	15.76					
D-189	+	+	4.84	1.97					
D-190		+							
D-191	+	+	5.60	4.77					
D-192		+							
D-193		+							
D-194	+	+	5.46	13.77					
D-195		+							
D-196	+	+	4.78	1.95					
D-197	+	+	4.46	3.94					
D-198									
D-199	+	+	5.45	8.71					
D-200		+							

표 8. 전라도 지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양 후 GABA 함량

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
E-1					E-41				
E-2		+			E-42				
E-3		+			E-43		+		
E-4	+	+	4.60	20.68	E-44		+		
E-5					E-45	+	+	4.81	11.55
E-6					E-46				
E-7					E-47				
E-8		+			E-48		+		
E-9	+	+	5.44	27.58	E-49	+	+	4.89	17.73
E-10					E-50		+		
E-11					E-51				
E-12	+	+	4.69	18.71	E-52				
E-13		+			E-53	+	+	5.14	34.47
E-14		+			E-54				
E-15	+	+	4.69	15.76	E-55				
E-16		+			E-56	+	+	4.49	42.57
E-17					E-57		+		
E-18	+	+	5.24	16.54	E-58		+		
E-19					E-59				
E-20					E-60		+		
E-21	+	+	4.68	40.38	E-61				
E-22		+			E-62	+	+	5.12	19.70
E-23					E-63				
E-24	+	+	4.65	34.47	E-64				
E-25					E-65		+		
E-26	+	+	4.62	53.18	E-66	+	+	4.66	18.71
E-27					E-67		+		
E-28					E-68				
E-29					E-69				
E-30	+	+	4.59	7.88	E-70	+	+	5.00	21.67
E-31					E-71				
E-32					E-72				
E-33	+	+	4.82	12.58	E-73		+		
E-34					E-74				
E-35					E-75	+	+	4.58	20.68
E-36		+			E-76				
E-37	+	+	4.71	13.79	E-77				
E-38		+			E-78		+		
E-39	+	+	5.21	37.43	E-79		+		
E-40		+			E-80		+		

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
E-81	+	+	5.03	14.77	E-121		+		
E-82					E-122		+		
E-83		+			E-123		+		
E-84		+			E-124	+	+	4.93	17.76
E-85					E-125	+	+	5.02	15.76
E-86		+			E-126		+		
E-87		+			E-127		+		
E-88		+			E-128		+		
E-89	+	+	4.56	17.73	E-129		+		
E-90		+			E-130		+		
E-91					E-131				
E-92					E-132	+	+	4.56	11.82
E-93					E-133				
E-94	+	+	4.60	29.55	E-134				
E-95		+			E-135		+		
E-96					E-136	+	+	4.61	9.85
E-97					E-137		+		
E-98	+	+	5.01	32.50	E-138		+		
E-99					E-139	+	+	6.18	20.68
E-100					E-140		+		
E-101		+			E-141		+		
E-102		+			E-142	+	+	4.62	18.71
E-103	+	+	5.19	3.94	E-143	+	+	4.67	12.80
E-104					E-144				
E-105					E-145				
E-106					E-146				
E-107		+			E-147				
E-108	+	+	4.60	27.58	E-148		+		
E-109					E-149	+	+	4.50	22.65
E-110					E-150		+		
E-111					E-151		+		
E-112	+	+	5.12	7.88	E-152	+	+	4.51	13.79
E-113					E-153				
E-114					E-154				
E-115					E-155	+	+	4.98	1.97
E-116		+			E-156				
E-117		+			E-157				
E-118	+	+	4.89	0.98	E-158	+	+	4.65	4.92
E-119		+			E-159		+		
E-120		+			E-160	+	+	4.68	5.91

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
E-161	+	+	4.67	13.79	E-201	+	+	4.55	16.74
E-162		+			E-202				
E-163		+			E-203				
E-164		+			E-204				
E-165		+			E-205		+		
E-166					E-206	+	+	5.34	28.56
E-167					E-207				
E-168					E-208		+		
E-169					E-209	+	+	4.61	7.88
E-170		+			E-210				
E-171		+			E-211				
E-172		+			E-212	+	+	5.18	0.98
E-173					E-213		+		
E-174		+			E-214		+		
E-175					E-215		+		
E-176					E-216		+		
E-177		+			E-217	+	+	5.41	19.70
E-178	+	+	4.68	8.86	E-218		+		
E-179		+			E-219		+		
E-180					E-220				
E-181					E-221	+	+	5.47	14.77
E-182	+	+	6.16	0.98	E-222		+		
E-183					E-223	+	+	5.18	16.74
E-184		+			E-224	+	+	5.12	46.29
E-185	+	+	5.15	4.92	E-225				
E-186					E-226				
E-187					E-227		+		
E-188		+			E-228				
E-189	+	+	4.69	17.73	E-229	+	+	5.22	15.76
E-190		+			E-230				
E-191					E-231		+		
E-192					E-232	+	+	5.27	21.67
E-193	+	+	5.34	15.76	E-233		+		
E-194		+			E-233				
E-195		+			E-235	+	+	4.88	3.94
E-196	+	+	5.28	15.76	E-236				
E-197		+			E-237		+		
E-198		+			E-238				
E-199	+	+	6.18	13.79	E-239		+		
E-200		+			E-240		+		

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
E-241	+	+	4.60	14.77	E-281				
E-242		+			E-282		+		
E-243		+			E-283	+	+	4.61	2.95
E-244					E-284				
E-245	+	+	4.66	21.67	E-285		+		
E-246		+			E-286	+	+	4.54	15.76
E-247					E-287		+		
E-248	+	+	4.66	17.73	E-288				
E-249		+			E-289				
E-250					E-290	+	+	4.99	6.89
E-251	+	+	5.87	13.79	E-291		+		
E-252					E-292		+		
E-253					E-293				
E-254					E-294				
E-255					E-295	+	+	4.57	2.95
E-256					E-296				
E-257					E-297				
E-258					E-298		+		
E-259					E-299				
E-260					E-300		+		
E-261					E-301				
E-262	+	+	5.24	2.95	E-302				
E-263		+			E-303		+		
E-264		+			E-304		+		
E-265	+	+	5.68	11.82	E-305		+		
E-266					E-306		+		
E-267					E-307		+		
E-268	+	+	5.44	8.86	E-308		+		
E-269					E-309		+		
E-270					E-310				
E-271	+	+	4.79	12.80	E-311				
E-272					E-312				
E-273					E-313				
E-274		+			E-314				
E-275		+			E-315				
E-276	+	+	5.12	16.74	E-316				
E-277		+			E-317				
E-278					E-318		+		
E-279					E-319		+		
E-280	+	+	5.09	15.76	E-320		+		

표 9. 제주도 지역에서 분리한 균주의 탈지유 응고여부와 배양 후 GABA 함량

균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)	균 주	skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr				24hr	48hr		
F-1					F-41				
F-2		+			F-42		+		
F-3		+			F-43		+		
F-4		+			F-44		+		
F-5		+			F-45				
F-6	+	+	4.83	12.80	F-46				
F-7					F-47		+		
F-8					F-48				
F-9		+			F-49		+		
F-10	+	+	4.78	2.95	F-50		+		
F-11		+			F-51	+	+	4.80	6.89
F-12					F-52				
F-13					F-53				
F-14	+	+	4.46	15.76	F-54		+		
F-15					F-55		+		
F-16		+			F-56		+		
F-17		+			F-57	+	+	4.50	5.91
F-18	+	+	5.15	16.74	F-58				
F-19		+			F-59				
F-20		+			F-60				
F-21	+	+	5.08	11.82	F-61		+		
F-22		+			F-62		+		
F-23		+			F-63		+		
F-24		+			F-64	+	+	4.66	2.95
F-25					F-65		+		
F-26					F-66				
F-27					F-67				
F-28	+	+	4.82	11.62	F-68				
F-29					F-69				
F-30		+			F-70				
F-31		+			F-71				
F-32					F-72		+		
F-33	+	+	4.81	14.77					
F-34									
F-35		+							
F-36		+							
F-37		+							
F-38		+							
F-39									
F-40		+							

지역별 원유에서 분리한 균주의 GABA 함량(건물량 기준) 분포를 보면 표 11에서 보는 바와 같이 분리균주 861개 중 96%가 50ppm/g미만이었고, 100ppm/g 이상이 34개 균주였으며, 특히 7개 균주는 500ppm/g 이상이였다. 분리균주 중 A-56 균주는 GABA 생산량이 1,815.45ppm, A-268 균주는 685.71ppm, A-275 균주는 2,303.76ppm, D-66 균주는 521.02ppm, K-520 균주는 717.64ppm, K-567 균주는 711.40ppm, K-573 균주는 1,298.31ppm으로서 A-275 균주가 GABA 생산량이 많았다.

표 11. 지역별 분리균주의 GABA 함량 분포

단위 : GABA(ppm/g건물)

지역 GABA함량	경기도 중부	경기도 서부	경기도 북부	경상도	전라도	제주도
1~9	89	62	26	52	19	4
10~49	355	20	26	28	53	6
50~99	86	-	-	-	1	-
100~199	17	-	-	-	-	-
200~499	10	-	-	-	-	-
500이상	6	-	-	1	-	-
Total	563	82	52	81	73	10

표 12. 상업균주 및 한국식품연구원에서 보관 젖산균주의 탈지유 응고여부와 배양 후의 pH 및 GABA 함량

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

주) * 상업균주

상업균주 및 한국식품연구원에서 보관 젖산균주 모두 탈지유를 24시간 내에 응고하였고, 상업균주가 배양후의 pH가 낮으며, GABA 생산 역시 높게 생성되었다.

2. GABA 생산 젖산균주 선발

원유에서 분리한 6개 균주와 상업균주 4개균주를 대상으로 monosodium glutamate 첨가량별로 각각 1%, 3%, 5%로 첨가된 10% 환원탈지분유에 35℃에서 18시간 배양 후 pH와 GABA 생산량을 측정된 결과는 다음 표 13과 같다.

표 13. 선발된 젖산균에 monosodium glutamate 첨가량별 pH 및 GABA 양 측정

균주		skim milk 응고 반응		pH	GABA (ppm/g건물)
		24hr	48hr		
A-411	1%	+	+	5.37	127.55
	3%	+	+	4.80	9.85
	5%	+	+	4.83	13.79
A-56	1%	+	+	4.96	1815.45
	3%	+	+	4.97	589.96
	5%	+	+	4.97	846.03
A-240	1%	+	+	5.51	271.50
	3%	+	+	5.23	36.44
	5%	+	+	4.80	9.98
A-268	1%	+	+	5.59	685.71
	3%	+	+	5.26	642.16
	5%	+	+	5.41	426.46
A-275	1%	+	+	5.38	2303.76
	3%	+	+	4.83	1208.48
	5%	+	+	4.91	640.19
A-294	1%	+	+	5.36	308.41
	3%	+	+	4.76	291.53
	5%	+	+	4.73	231.45
<i>L. acidophilus</i> *	1%	+	+	4.21	32.50
	3%	+	+	4.35	30.53
	5%	+	+	4.50	33.49
<i>L. acidophilus</i> *	1%	+	+	4.53	22.65
	3%	+	+	4.55	32.50
	5%	+	+	4.61	45.31
<i>Streptococcus thermophilus</i> *	1%	+	+	4.32	30.53
	3%	+	+	4.51	30.53
	5%	+	+	4.60	24.62
<i>L. acidophilus</i> *	1%	+	+	4.12	23.64
	3%	+	+	4.40	25.61
	5%	+	+	4.37	26.59

주) * : 시중 발효유 제조용 상업균주

분리균주에서는 monosodium glutamate 첨가량을 높일수록 pH는 낮아지고

GABA 함량이 떨어지는 경향을 보였는데, 이는 monosodium glutamate가 젖산균 성장에 저해하거나 GABA를 분해하는 효소균의 활성이 높기 때문(茅原紘, 2002)으로 보인다. 상업균주는 GABA 함량이 20-30ppm 수준으로 선발 분리균주에 비해 매우 낮은 것으로 나타났다. 특히 A-275 균주는 GABA 함량이 2,303.76ppm/g(건물량)으로서 실제 발효유에 적용하면 발효유 100g 중에 23mg의 GABA가 함유된 것으로 볼 수 있다. GABA는 대략 red mold rice에 20mg/100g 건물량, Gabaron tea에 150mg/100g 건물량, soaked rice germ에 400mg/100g 건물량이 함유되어 있다(Kono와 Himeno, 2000; Tsushida 등, 1987; Saikusa 등, 1994; Saikusa 등, 2001)고 보고한 것과 비교할 때 비슷하거나 높은 수치의 결과를 얻었다.

한편, 최근 Enterococcus 균에 대한 건강 위해 가능성이 제기됨에 따라 추가로 Lactobacillus 균을 선발코저 Gram 염색한 후 rod 형태의 균락만을 대상으로 GABA 생성량을 측정하여 표 14에 나타내었다.

표 14. 원유에서 분리한 균주를 대상으로 탈지유 응고여부와 배양후의 GABA생산

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-1	+	+	38.746	K-26	-	+	
K-2	+	+	20.215	K-27	+	+	45.484
K-3	-	+		K-28	+	+	26.953
K-4	+	+	75.807	K-29	+	+	50.538
K-5	+	+	55.591	K-30	+	+	18.530
K-6	+	+	48.853	K-31	+	+	3.369
K-7	+	+	52.222	K-32	+	+	32.007
K-8	+	+	38.746	K-33	+	+	20.215
K-9	+	+	25.269	K-34	+	+	26.953
K-10	+	+	47.169	K-35	-	+	
K-11	+	+	53.907	K-36	+	+	35.376
K-12	+	+	15.161	K-37	+	+	16.846
K-13	+	+	16.846	K-38	+	+	3.369
K-14	+	+	33.692	K-39	+	+	18.530
K-15	+	+	57.276	K-40	-	+	
K-16	+	+	77.491	K-41	+	+	20.215
K-17	+	+	45.484	K-42	+	+	30.323
K-18	-	+		K-43	+	+	37.061
K-19	-	+		K-44	+	+	35.376
K-20	+	+	38.746	K-45	+	+	20.215
K-21	+	+	38.746	K-46	+	+	40.430
K-22	+	+	10.108	K-47	+	+	10.108
K-23	-	+		K-48	-	+	
K-24	+	+	16.846	K-49	+	+	42.115
K-25	+	+	30.323	K-50	+	+	30.323

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-51	+	+	47.169	K-76	+	+	30.323
K-52	+	+	70.753	K-77	-	+	
K-53	+	+	43.799	K-78	+	+	15.161
K-54	-	+		K-79	+	+	33.692
K-55	+	+	43.799	K-80	-	+	
K-56	+	+	33.692	K-81	+	+	30.323
K-57	+	+	11.792	K-82	+	+	21.900
K-58	+	+	28.638	K-83	+	+	18.530
K-59	-	+		K-84	+	+	64.014
K-60	+	+	23.584	K-85	+	+	16.846
K-61	+	+	30.323	K-86	+	+	8.423
K-62	+	+	15.161	K-87	+	+	26.953
K-63	+	+	6.738	K-88	-	+	
K-64	+	+	48.853	K-89	+	+	30.323
K-65	+	+	21.900	K-90	+	+	35.376
K-66	-	+		K-91	+	+	21.900
K-67	+	+	38.746	K-92	+	+	53.907
K-68	+	+	33.692	K-93	-	+	
K-69	+	+	43.799	K-94	+	+	6.738
K-70	+	+	20.215	K-95	+	+	38.746
K-71	-	+		K-96	-	+	
K-72	-	+		K-97	+	+	23.584
K-73	+	+	48.853	K-98	+	+	30.323
K-74	+	+	25.269	K-99	+	+	32.007
K-75	+	+	16.846	K-100	+	+	30.323

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-101	-	+		K-126	+	+	15.16
K-102	+	+	20.215	K-127	-	+	
K-103	+	+	33.692	K-128	+	+	6.74
K-104	+	+	47.169	K-129	-	+	
K-105	+	+	26.953	K-130	-	+	
K-106	+	+	13.477	K-131	+	+	20.22
K-107	-	+		K-132	-	+	
K-108	+	+	40.430	K-133	-	+	
K-109	+	+	26.953	K-134	-	+	
K-110	+	+	38.746	K-135	+	+	1.69
K-111	+	+	47.169	K-136	+	+	58.96
K-112	+	+	43.799	K-137	-	+	
K-113	+	+	42.115	K-138	+	+	33.69
K-114	+	+	23.584	K-139	-	+	
K-115	+	+	42.115	K-140	-	+	
K-116	+	+	47.169	K-141	-	+	
K-117	+	+	43.799	K-142	+	+	35.38
K-118	+	+	18.530	K-143	+	+	15.16
K-119	+	+	35.376	K-144	-	+	
K-120	-	+		K-145	-	+	
K-121	+	+	37.06	K-146	+	+	13.48
K-122	+	+	18.53	K-147	-	+	
K-123	+	+	13.48	K-148	-	+	
K-124	-	+		K-149	-	+	
K-125	+	+	8.42	K-150	+	+	10.11

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-151	+	+	60.65	K-176	+	+	40.43
K-152	-	+		K-177	-	+	
K-153	-	+		K-178	+	+	109.84
K-154	+	+	13.48	K-179	+	+	116.91
K-155	-	+		K-180	-	+	
K-156	-	+		K-181	-	+	
K-157	+	+	5.05	K-182	+	+	52.22
K-158	+	+	32.01	K-183	-	+	
K-159	-	+		K-184	-	+	
K-160	-	+		K-185	+	+	139.48
K-161	-	+		K-186	+	+	28.64
K-162	-	+		K-187	+	+	33.02
K-163	+	+	6.74	K-188	+	+	37.74
K-164	+	+	40.43	K-189	-	+	
K-165	-	+		K-190	+	+	60.31
K-166	-	+		K-191	-	+	
K-167	+	+	67.38	K-192	+	+	73.79
K-168	-	+		K-193	+	+	53.91
K-169	+	+	60.65	K-194	+	+	33.86
K-170	-	+		K-195	+	+	48.01
K-171	-	+		K-196	+	+	54.08
K-172	+	+	26.95	K-197	+	+	34.37
K-173	+	+	40.43	K-198	+	+	34.70
K-174	-	+		K-199	+	+	10.44
K-175	-	+		K-200	+	+	33.86

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-201	+	+	43.799	K-226	-	+	
K-202	+	+	50.538	K-227	+	+	47.169
K-203	+	+	50.538	K-228	+	+	21.900
K-204	+	+	28.638	K-229	+	+	35.376
K-205	+	+	42.115	K-230	+	+	50.538
K-206	+	+	40.430	K-231	-	+	
K-207	+	+	40.430	K-232	+	+	48.853
K-208	+	+	18.530	K-233	+	+	52.222
K-209	+	+	25.269	K-234	+	+	47.169
K-210	+	+	48.853	K-235	+	+	53.907
K-211	+	+	23.584	K-236	+	+	57.276
K-212	+	+	62.330	K-237	+	+	42.115
K-213	-	+		K-238	+	+	128.029
K-214	+	+	37.061	K-239	+	+	77.491
K-215	+	+	42.115	K-240	+	+	94.674
K-216	-	+		K-241	-	+	
K-217	+	+	53.907	K-242	+	+	64.688
K-218	-	+		K-243	-	+	
K-219	+	+	45.484	K-244	-	+	
K-220	+	+	58.961	K-245	-	+	
K-221	+	+	43.799	K-246	+	+	10.276
K-222	+	+	53.907	K-247	-	+	
K-223	+	+	18.530	K-248	+	+	29.986
K-224	+	+	55.591	K-249	-	+	
K-225	+	+	40.430	K-250	+	+	34.366

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-251	+	+	34.703	K-276	-	+	
K-252	-	+		K-277	-	+	
K-253	+	+	61.993	K-278	+	+	129.545
K-254	-	+		K-279	-	+	
K-255	-	+		K-280	-	+	
K-256	-	+		K-281	-	+	
K-257	-	+		K-282	-	+	
K-258	+	+	35.545	K-283	-	+	
K-259	+	+	41.609	K-284	-	+	
K-260	+	+	111.014	K-285	+	+	220.176
K-261	-	+		K-286	+	+	228.767
K-262	+	+	32.681	K-287	-	+	
K-263	-	+	109.835	K-288	+	+	20.552
K-264	+	+	7.749	K-289	-	+	
K-265	-	+		K-290	-	+	
K-266	+	+	55.928	K-291	+	+	107.477
K-267	-	+		K-292	+	+	97.706
K-268	-	+		K-293	-	+	
K-269	-	+		K-294	-	+	
K-270	+	+	41.778	K-295	-	+	
K-271	+	+	32.344	K-296	-	+	
K-272	+	+	33.355	K-297	+	+	135.273
K-273	+	+	48.179	K-298	-	+	
K-274	+	+	70.584	K-299	-	+	
K-275	-	+		K-300	-	+	

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-301	-	+		K-326	+	+	53.233
K-302	-	+		K-327	-	+	
K-303	-	+		K-328	+	+	70.079
K-304	-	+		K-329	+	+	15.835
K-305	+	+	47.842	K-330	+	+	104.445
K-306	-	+		K-331	-	+	
K-307	+	+	130.050	K-332	-	+	
K-308	-	+		K-333	-	+	
K-309	-	+		K-334	+	+	42.620
K-310	+	+	142.516	K-335	+	+	52.054
K-311	+	+	29.817	K-336	+	+	48.179
K-312	-	+		K-337	-	+	
K-313	-	+		K-338	-	+	
K-314	-	+		K-339	+	+	16.172
K-315	-	+		K-340	-	+	
K-316	+	+	32.513	K-341	-	+	
K-317	+	+	34.197	K-342	-	+	
K-318	+	+	120.448	K-343	-	+	
K-319	+	+	104.950	K-344	-	+	
K-320	-	+		K-345	-	+	
K-321	-	+		K-346	-	+	
K-322	+	+	45.821	K-347	-	+	
K-323	-	+		K-348	+	+	19.710
K-324	+	+	94.674	K-349	+	+	36.050
K-325	-	+		K-350	+	+	32.850

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-351	+	+	52.728	K-376	-	+	
K-352	-	+		K-377	+	+	79.176
K-353	-	+		K-378	-	+	
K-354	+	+	48.011	K-379	+	+	39.588
K-355	-	+		K-380	-	+	
K-356	-	+		K-381	-	+	
K-357	-	+		K-382	+	+	46.495
K-358	+	+	48.853	K-383	+	+	40.599
K-359	+	+	52.728	K-384	+	+	52.728
K-360	+	+	59.129	K-385	+	+	102.76
K-361	-	+		K-386	-	+	
K-362	-	+		K-387	+	+	50.032
K-363	-	+		K-388	+	+	41.946
K-364	+	+	52.728	K-389	+	+	54.244
K-365	+	+	52.222	K-390	+	+	47.505
K-366	+	+	51.548	K-391	+	+	57.781
K-367	+	+	50.875	K-392	-	+	
K-368	-	+		K-393	+	+	56.434
K-369	-	+		K-394	+	+	79.344
K-370	-	+		K-395	+	+	31.670
K-371	+	+	43.462	K-396	+	+	89.452
K-372	+	+	45.484	K-397	+	+	88.609
K-373	-	+		K-398	-	+	
K-374	-	+		K-399	+	+	42.115
K-375	-	+		K-400	-	+	

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-401	-	+		K-426	+	+	49.359
K-402	+	+	48.516	K-427	-	+	
K-403	-	+		K-428	-	+	
K-404	-	+		K-429	+	+	50.032
K-405	+	+	16.846	K-430	-	+	
K-406	+	+	58.118	K-431	+	+	221.524
K-407	+	+	52.728	K-432	+	+	35.545
K-408	-	+		K-433	+	+	22.910
K-409	+	+	91.810	K-434	-	+	
K-410	-	+		K-435	+	+	27.122
K-411	+	+	39.588	K-436	-	+	
K-412	+	+	29.649	K-437	-	+	
K-413	+	+	52.728	K-438	+	+	30.323
K-414	-	+		K-439	+	+	26.953
K-415	-	+		K-440	-	+	
K-416	-	+		K-441	+	+	22.237
K-417	+	+	48.179	K-442	+	+	34.871
K-418	-	+		K-443	-	+	
K-419	-	+		K-444	+	+	49.022
K-420	-	+		K-445	-	+	
K-421	+	+	47.674	K-446	-	+	
K-422	+	+	44.979	K-447	-	+	
K-423	+	+	44.642	K-448	-	+	
K-424	+	+	46.832	K-449	+	+	40.936
K-425	+	+	53.570	K-450	+	+	35.713

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-451	+	+	28.975	K-476	-	+	
K-452	-	+		K-477	+	+	68.226
K-453	-	+		K-478	+	+	31.839
K-454	-	+		K-479	-	+	
K-455	+	+	37.061	K-480	-	+	
K-456	-	+		K-481	-	+	
K-457	-	+		K-482	-	+	
K-458	-	+		K-483	+	+	24.427
K-459	-	+		K-484	-	+	
K-460	+	+	87.262	K-485	+	+	132.072
K-461	-	+		K-486	-	+	
K-462	-	+		K-487	+	+	40.430
K-463	-	+		K-488	+	+	63.172
K-464	+	+	71.427	K-489	+	+	65.194
K-465	-	+		K-490	+	+	22.237
K-466	-	+		K-491	-	+	
K-467	-	+		K-492	+	+	107.645
K-468	-	+		K-493	+	+	82.545
K-469	-	+		K-494	-	+	
K-470	+	+	94.169	K-495	+	+	81.366
K-471	-	+		K-496	+	+	37.229
K-472	+	+	11.287	K-497	-	+	
K-473	+	+	69.910	K-498	-	+	
K-474	-	+		K-499	+	+	39.756
K-475	+	+	96.190	K-500	+	+	48.179

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-501	+	+	24.427	K-526	-	+	
K-502	+	+	54.412	K-527	-	+	
K-503	+	+	49.358	K-528	+	+	23.584
K-504	-	+		K-529	-	+	
K-505	-	+		K-530	+	+	21.057
K-506	+	+	40.767	K-531	+	+	19.710
K-507	-	+		K-532	-	+	
K-508	-	+		K-533	+	+	23.416
K-509	-	+		K-534	+	+	15.161
K-510	-	+		K-535	+	+	17.014
K-511	+	+	31.839	K-536	+	+	19.710
K-512	+	+	32.681	K-537	-	+	
K-513	+	+	272.904	K-538	-	+	
K-514	+	+	51.548	K-539	+	+	19.878
K-515	-	+		K-540	+	+	27.290
K-516	-	+		K-541	-	+	
K-517	-	+		K-542	+	+	35.713
K-518	-	+		K-543	+	+	14.319
K-519	+	+	65.867	K-544	+	+	24.595
K-520	+	+	717.635	K-545	+	+	20.552
K-521	+	+	18.194	K-546	+	+	19.541
K-522	+	+	2.695	K-547	+	+	23.753
K-523	-	+		K-548	-	+	
K-524	-	+		K-549	+	+	10.444
K-525	-	+		K-550	-	+	

Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)	Sample	skim milk 응고반응		GABA (ppm/g건물)
	24hr	48hr			24hr	48hr	
K-551	-	+		K-576	+	+	47.169
K-552	+	+	0.168	K-577	+	+	372.126
K-553	+	+	70.247	K-578	+	+	49.864
K-554	+	+	47.505	K-579	+	+	490.721
K-555	+	+	30.996	K-580	+	+	12.466
K-556	+	+	12.466				
K-557	+	+	19.878				
K-558	+	+	22.574				
K-559	+	+	15.330				
K-560	+	+	28.638				
K-561	+	+	11.624				
K-562	+	+	18.025				
K-563	-	+					
K-564	+	+	8.591				
K-565	+	+	26.953				
K-566	+	+	345.004				
K-567	+	+	711.402				
K-568	+	+	12.634				
K-569	+	+	25.774				
K-570	-	+					
K-571	+	+	24.763				
K-572	-	+					
K-573	+	+	1298.313				
K-574	-	+					
K-575	+	+	28.133				

K520 균주는 GABA 함량이 717.64ppm/g, K567 균주는 711.40ppm/g, K573균주는 1,298.31ppm/g으로 추가로 분리되었다.

3. GABA 생산균주 동정

GABA 생산량이 높은 7 균주를 선발하여 동정실험을 한 결과는 다음과 표 15와 같다.

Table 15. Biochemical and physiological characteristics of lactic acid bacteria isolated from raw milk

strains	A-56	A-268	A-275	D-66	K-520	K-567	K-573
Gram stain	+	+	+	+	+	+	+
Cell morphology	cocci	cocci	cocci	cocci	rod	rod	rod
Spore formation	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Aerobic growth	+	+	+	+	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	+	+	+	+	-	-	-
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Ammonia from arginine	-	-	-	-	-	-	-

API 20 STREP

Strains	A-56	A-268	A-275	D-66
Pyruvate	+	+	+	-
Hippurate	+	+	-	-
Esculin	-	+	+	+
Pyrrrolidonyl 2 naphthylamide	-	+	+	+
6-Bromo-2-naphyl α -D-glucuronate	-	+	+	-
Naphthol AS-BI β -D-glucuronate	-	-	-	-
2-naphthyl- β -D-galactopyranoside	-	+	+	-
2-naphthyl phosphate	-	-	-	-
L-leucine-2-naphthylamide	-	+	-	-
Arginine	+	+	+	+
Ribose	+	+	+	+
L-Arabinose	-	-	+	-
Mannitol	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	+
Starch	+	+	+	-
Glycogen	-	-	-	-

API 50 CHL

Strains	K-520	K-567	K-573	Strains	K-520	K-567	K-573
Glycerol	-	-	-	D-xylose	-	-	+
Erythritol	-	-	-	L-xylose	-	-	-
D-arabinose	-	-	-	Adonitol	-	-	-
L-arabinose	-	-	-	β -Methyl-D-Xyloside	-	-	-
Ribose	+	-	+	Galactose	+	+	+
Glucose	+	+	+	Sucrose	+	+	+
Fructose	+	+	+	Trehalose	-	+	-
Mannose	+	+	+	Inulin	-	-	-
Sorbose	-	-	-	Melezitose	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	Raffinose	+	-	+
Dulcitol	-	-	-	Starch	-	+	+
Inositol	-	-	-	Glycogen	-	+	-
Mannitol	-	-	-	Xylitol	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	Gentiobiose	-	+	-
α -Methyl-D-Mannoside	-	-	-	D-turanose	-	-	-
α -Methyl-D-Glucoside	-	-	-	D-lyxose	-	-	-
N acetyl glucosamine	-	+	-	D-tagatose	-	-	-
Amygdalin	-	+	-	D-fucose	-	-	-
Arbutin	-	+	-	L-fucose	-	-	-
Esculin	-	+	-	D-arabitol	-	-	-
Salicin	-	+	-	L-arabitol	-	-	-
Cellobiose	-	+	-	Gluconate	+	-	+
Maltose	+	+	+	2-keto-gluconate	+	+	+
Lactose	+	+	+	5-keto-gluconate	-	-	+
Melibiose	+	-	+				

ATB identification system에 입력한 결과 동정된 균주명과 ID값은 다음과 표 16과 같다.

Table 16. Identification of lactic acid bacteria

Stain	Identification
A-268	<i>Enterococcus faecium</i> 99.9%
A-275	<i>Enterococcus faecium</i> 99.5%
A-56	<i>Enterococcus faecium</i> 98.5%
D-66	<i>Enterococcus faecalis</i> 90.9%
K-520	<i>Lactobacillus fermentum</i> 99.9%
K-567	<i>Lactobacillus crispatus</i> 98.3%
K-573	<i>Lactobacillus fermentum</i> 99.9%

4. 선발 젖산균의 특성조사

GABA 생산량이 많은 균주 7종을 선발하여 특성조사를 실시하였다. 다음 이하는 A-56 균주(*Enterococcus faecium*)는 *Enterococcus faecium* A56, A-268 균주(*Enterococcus faecium*)는 *Enterococcus faecium* A268, A-275 균주(*Enterococcus faecium*)는 *Enterococcus faecium* A275, D-66 균주(*Enterococcus faecalis*)는 *Enterococcus faecalis* D66, K-520 균주(*Lactobacillus fermentum*)는 *Lactobacillus fermentum* K520, K-567 균주(*Lactobacillus crispatus*)는 *Lactobacillus crispatus* K567, K-573 균주(*Lactobacillus fermentum*)는 *Lactobacillus fermentum* K573으로 각각 명명하였다.

가. 젖산균의 성장

Fig. 1~14에서 보는 바와 같이 젖산균 7종의 성장속도를 알기 위하여 10% 환원탈지유 150ml에 젖산균 배양액을 1ml용 피펫으로 1방울 접종한 후 34℃, 37℃, 40℃ 별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양시험 한 결과 *Enterococcus faecium* A56 균주는 40℃가 가장 성장 속도가 빨랐으며, pH에서는 9시간까지가 34℃, 15시간이후는 40℃가 산생성이 많았다. *Enterococcus faecium* A268, *Enterococcus faecium* A275, *Lactobacillus fermentum* K520, *Lactobacillus crispatus* K567, *Lactobacillus fermentum* K573 균주 공히 40℃가 가장 성장 속도가 빨랐으며, pH 역시 40℃가 산생성이 많았다. 반면, *Enterococcus faecalis* D66 균주는 37℃가 가장 적정온도로 나타났다. 발효유의 최적 pH 4.3에 도달하는데 *Lactobacillus fermentum* K520과 *Enterococcus faecalis* D66 균주는 다른 균주에 비해 산 생성속도가 다소 느려 약 18시간이 소요되었다.

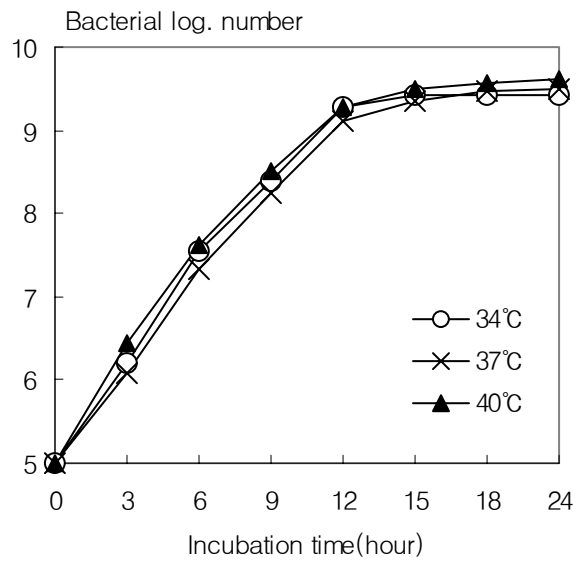


Figure 1. Growth of *Enterococcus faecium* A56 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

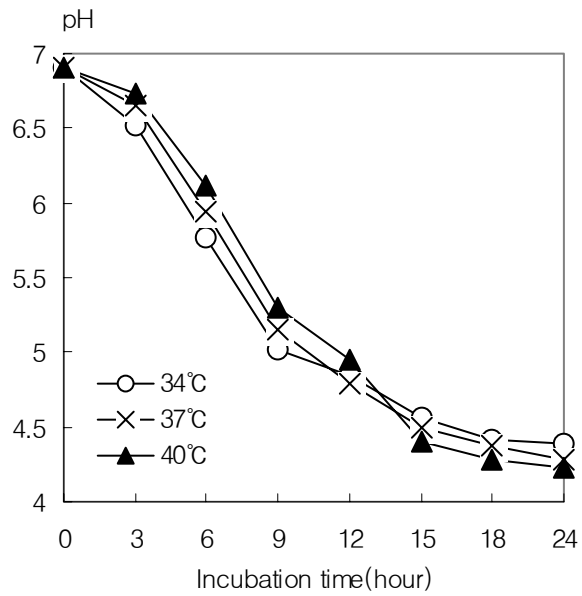


Figure 2. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Entero. faecium* A56 at various temp.

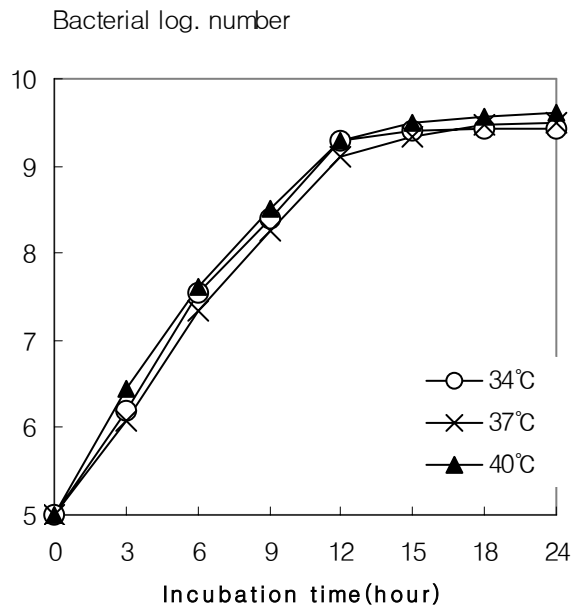


Figure 3. Growth of *Enterococcus faecium* A268 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

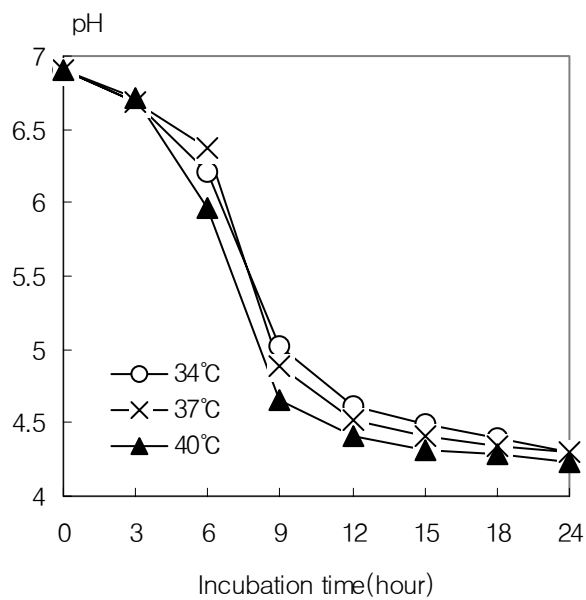


Figure 4. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Enterococcus faecium* A268 at various temp.

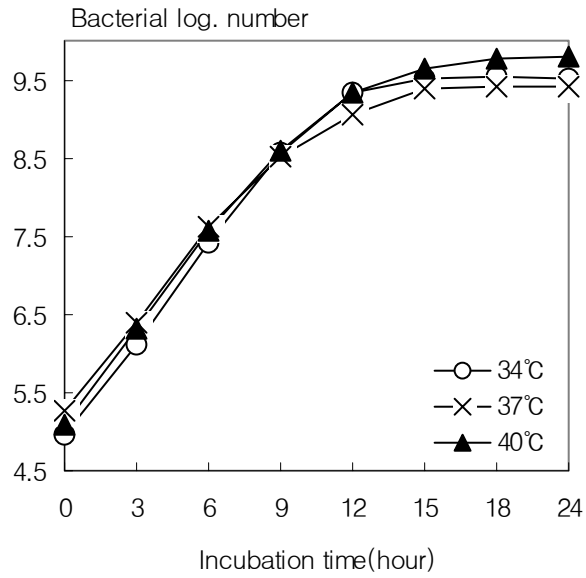


Figure 5. Growth of *Enterococcus faecium* A275 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

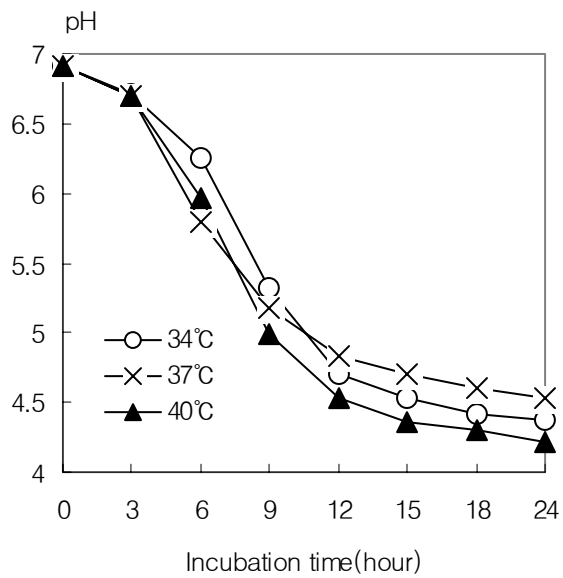


Figure 6. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Enterococcus faecium* A275 at various temp.

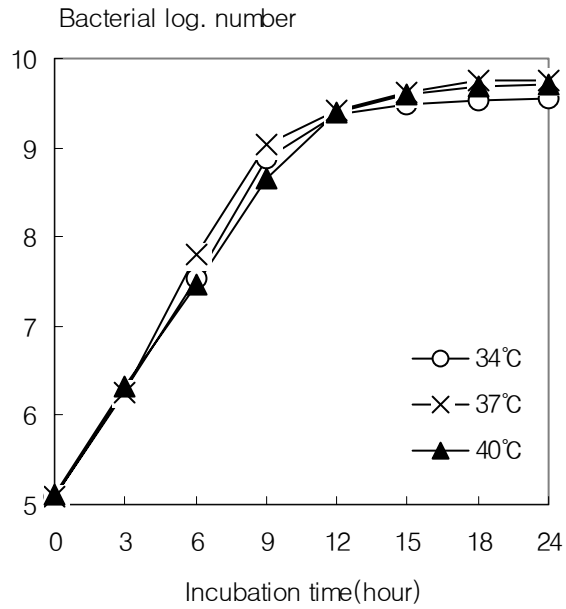


Figure 7. Growth of *Enterococcus faecalis* D66 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

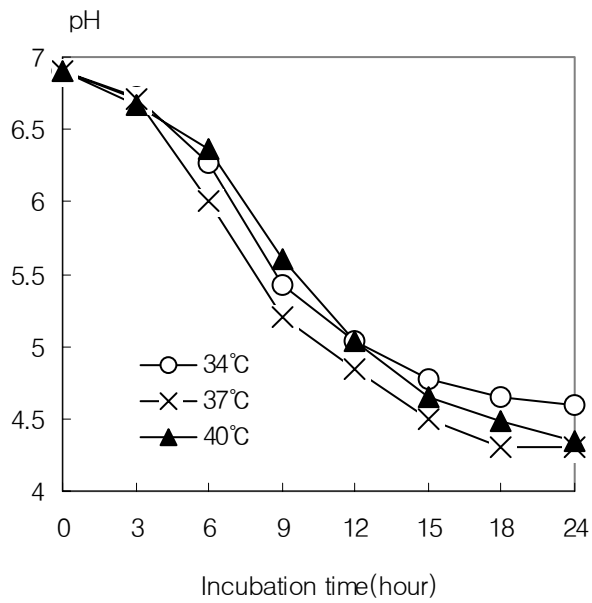


Figure 8. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Enterococcus faecalis* D66 at various temp.

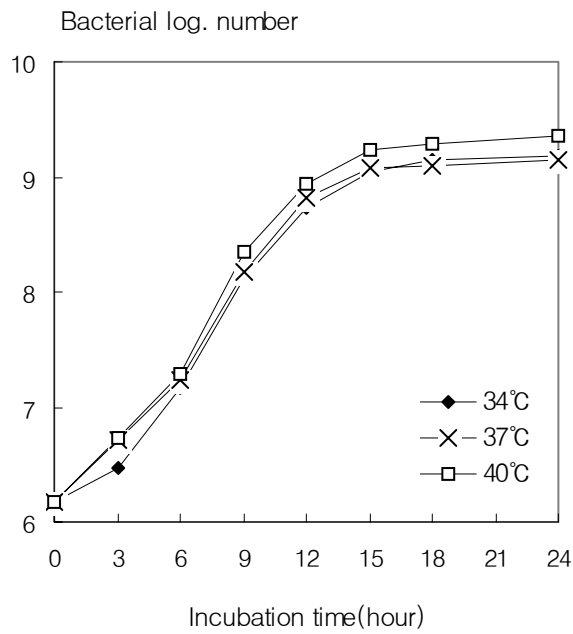


Figure 9. Growth of *Lactobacillus fermentum* K520 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

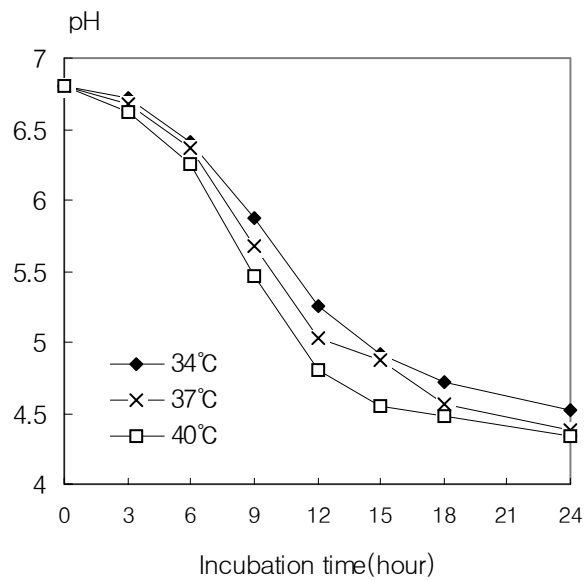


Figure 10. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus fermentum* K520 at various temperature

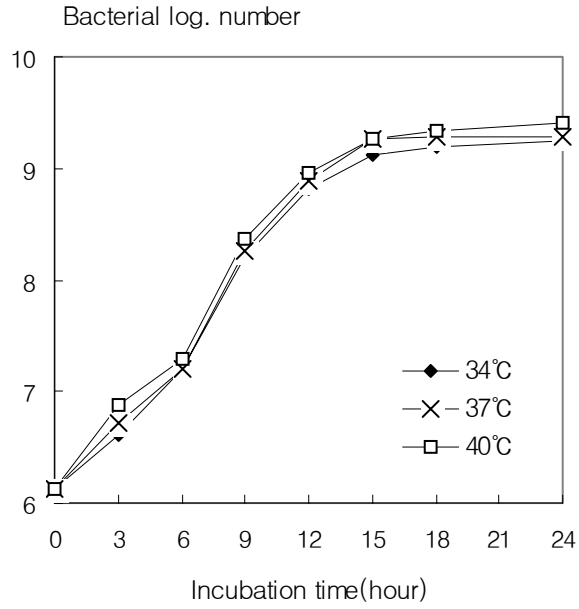


Figure 11. Growth of *Lactobacillus crispatus* K567 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

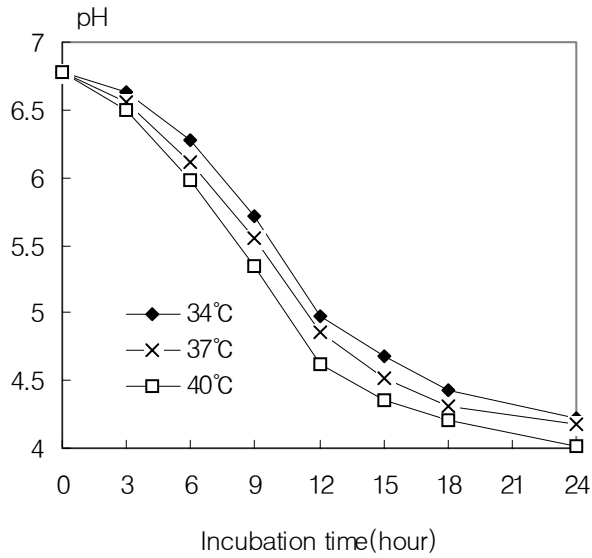


Figure 12. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus crispatus* K567 at various temperature

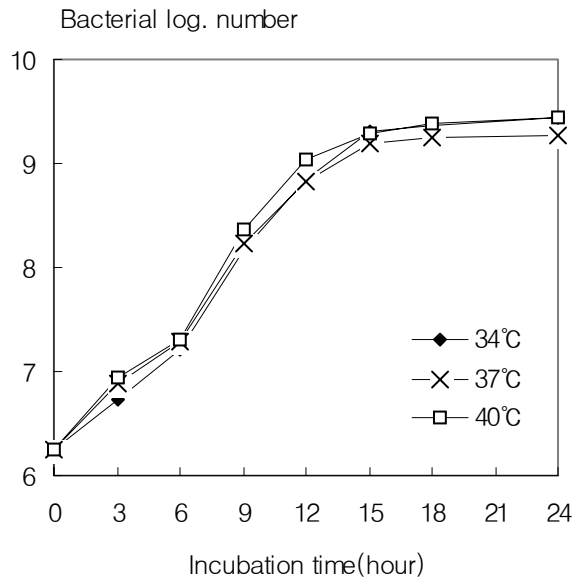


Figure 13. Growth of *Lactobacillus fermentum* K573 in 10% reconstituted skim milk at various temperatures

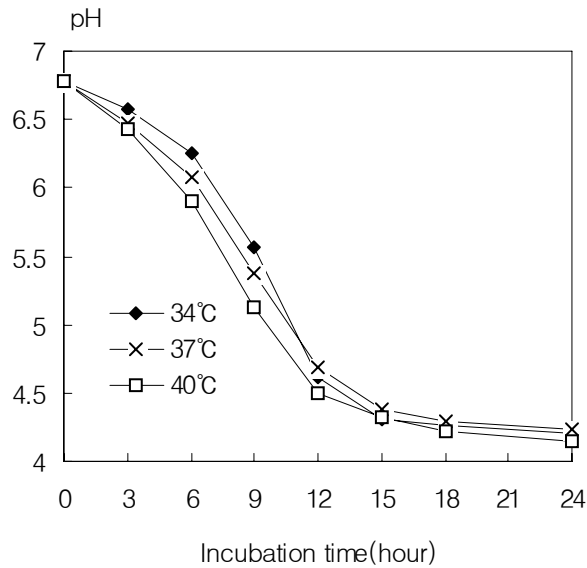


Figure 14. pH changes of 10% reconstituted skim milk during the growth of *Lactobacillus fermentum* K573 at various temperature

나. 젖산균의 단백질분해

10% 환원탈지유에 배양하면서 Hull(1947)의 방법에 따라 측정하고 TCA가용성 추출액 5ml 중 tyrosine의 mg으로 표시한 단백질 분해력의 변화는 Fig. 15와 표 17에서 보는 바와 같다.

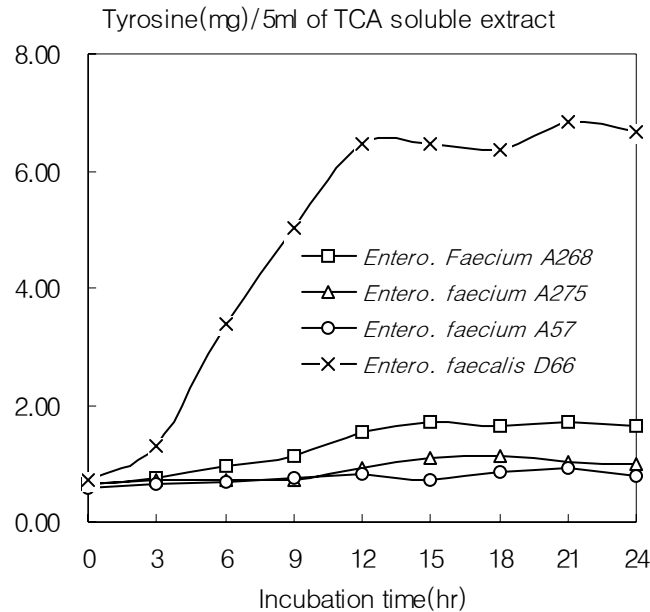


Figure 15. Proteolytic activity of *Enterococcus faecium* A268, *Enterococcus faecium* A275, *Enterococcus faecium* A56, *Enterococcus faecalis* D66 in 10% reconstituted skim milk at 37°C

Table 17. Proteolytic activity of *L. fermentum* K520, *L. crispatus* K567 and *L. fermentum* K573 in 10% reconstituted skim milk at 37°C

strains	incubation time 0 hr	incubation time 16 hr
	tyrosine(mg)	
K520	0.534073	1.181984
K567	0.552653	0.809647
K573	0.542048	1.073295

3종의 *Enterococcus faecium* A56, *Enterococcus faecium* A268, *Enterococcus faecium* A275 균주는 약간의 증가를 보인 반면 *Enterococcus faecalis* D66 균주는 3시간 이후부터 증가하기 시작하여 12시간까지 증가하여 tyrosine함량이 6.8mg/TCA 5ml을 나타내 매우 높은 단백질 분해력을 나타내었다. Lactobacilli 균주 중에는 *L. fermentum* K520 균주가 가장 높은 단백질 분해력을 보였다.

다. 항생제 내성

항생제 내성 시험은 tryptic soy broth(Difco)를 사용하여 2배희석방법에 의해 성장여부를 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 정하였으며, 그 결과는 Table 18에서 보는 바와 같다.

Table 18. Antibiotics susceptibility of lactic acid bacteria

Antimicrobial agents	strains						
	<i>E.faecium</i> A268	<i>E.faecium</i> A275	<i>E.faecium</i> A56	<i>E.faecalis</i> D66	<i>L.fermentum</i> K520	<i>L.crispatus</i> K567	<i>L.fermentum</i> K573
————— minimal inhibitory concentrations($\mu\text{g}/\text{ml}$) —————							
Aminoglycosides							
Amikacin	320	320	640	160	160	160	160
Gentamycin	640	640	1280	1280	160	160	160
Kanamycin	3200	3200	3200	3200	1600	1600	3200
Neomycin	3200	3200	3200	3200	1600	1600	1600
Streptomycin*	1600	800	1600	1600	800	1600	1600
β -lactams							
Penicillin-G*	20	20	20	10	20	20	40
Methicillin	160	320	320	160	160	160	320
Oxacillin	120	60	240	60	60	120	60
Ampicillin	1280	1280	1280	1280	640	640	640
Gram-positive spectrum							
Bacitracin*	120	120	120	120	50	50	50
Rifampicin	120	120	120	120	60	120	120
Novobiocin	30	30	30	30	30	30	30
Lincomycin	800	800	400	400	400	400	400
Gram-negative spectrum							
Polymyxin B*	1200	1200	1200	1200	600	600	600
Broad spectrum							
Chloramphenicol	320	320	320	320	80	80	80
Vancomycin*					800	400	400

* : units/ml

Enterococci 4종의 젖산균은 Lactobacilli 3종에 비해 Gentamycin, Neomycin, Ampicillin, Bacitracin, Polymyxin B 및 Chloramphenicol 등의 항생물질에 대하여 내성이 강하였다. *E. faecium* A56 균주는 Amikacin, Gentamycin 및 Oxacillin에 대해 내성이 강하였고, *L. fermentum* K573 균주는 Penicillin-G에 대해 내성이 강한 반면 *E. faecalis* D66 균주는 내성이 약하였다. 또한, *L. fermentum* K520 균주는 Rifampicin에 대해 내성이 약하였고, 특히 타 균주에 비해 전체적으로 항생물질에 대한 내성이 약하였다. 다만, Vancomycin에 대해서는 타 간균에 비해 내성이 강한 것으로 나타났다. 7개 균주 공히 Novobiocin에 대한 내성이 동일하였다.

라. 효소활성

젖산균 7종의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며, 그 결과는 Table 19에서 보는 바와 같다.

Table 19. Enzyme patterns of lactic acid bacteria

	Strains						
	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>L.fermentum</i>	<i>L.crispatus</i>	<i>L.fermentum</i>
	A268	A275	A56	D66	K520	K567	K573
Alkaline phosphatase	2	3	2	4	1	0	1
Esterase(C4)	3	3	3	3	3	1	3
Esterase lipase(C8)	1	1	1	1	3	0	3
Lipase(C14)	0	1	0	0	0	0	0
Leucine arylamidase	1	1	0	1	5	4	1
Valine arylamidase	1	0	1	1	1	1	0
Cystine arylamidase	1	1	0	0	1	1	0
Trypsin	0	0	0	0	0	0	0
Chymotrypsin	1	0	0	0	0	0	0
Acid phosphatase	2	4	2	2	2	2	2
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	3	3	3	2	3	0	3
α -galactosidase	0	1	2	1	3	0	3
β -galactosidase	0	0	1	1	3	4	3
β -glucuronidase	0	0	0	0	1	1	0
α -glucosidase	0	0	0	0	3	1	2
β -glucosidase	0	0	0	0	0	3	0
N-acetyl- β -glucosaminidase	0	0	0	0	0	0	0
α -mannosidase	0	0	0	0	0	0	0
α -fucosidase	0	0	0	0	0	0	0

* : A value ranging from 0 to 5 is assigned to the standard color, Zero represents a negative ; 5 represent a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength ; 1 corresponds to the liberation of 5 nanomoles, 2 to 10 nanomoles, 3 to 20 nanomoles, 4 to 30 nanomoles and 5 to 40 nanomoles or more.

E. faecium A275 균주는 Acid phosphatase, *E. faecalis* D66균주는 Alkaline phosphatase, *L. fermentum* K520 균주는 Esterase lipase, Leucine arylamidase, α -galactosidase 및 α -glucosidase, *L. crispatus* K567 균주는 Leucine arylamidase, β -galactosidase 및 β -glucosidase, *L. fermentum* K573 균주는 Esterase lipase, α -galactosidase 및 β -galactosidase에 효소활성이 높았다. 특히 Benzopyrene을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β -glucuronidase의 경우에는 1이하로서 안전성이 있었으며, 특히 유당분해를 일으키는 β -galactosidase 활성은 구균보다는 간균이 높았다.

마. 담즙내성

담즙에 대한 균주의 내성을 시험하기 위하여 oxgall(Difco)을 첨가하지 않은 것과 첨가한 배지에서 각 균주의 내성을 시험한 결과는 각각 Fig. 16~ Fig. 19에서 보는 바와 같다.

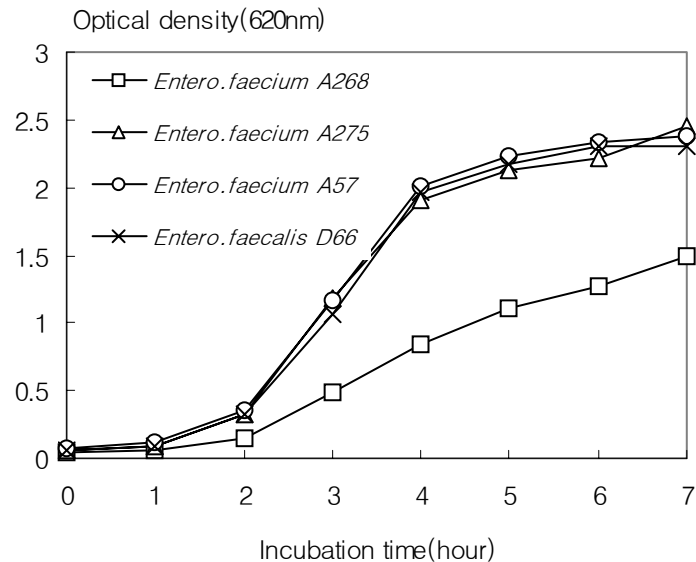


Figure 16. Growth of cultures in MRS broth containing 0.05% L-cysteine without 0.3% oxgall

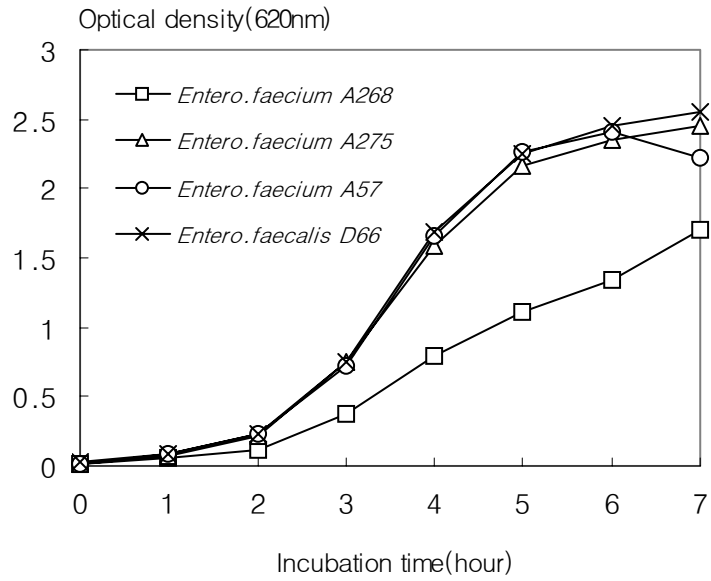


Figure 17. Growth of cultures in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall

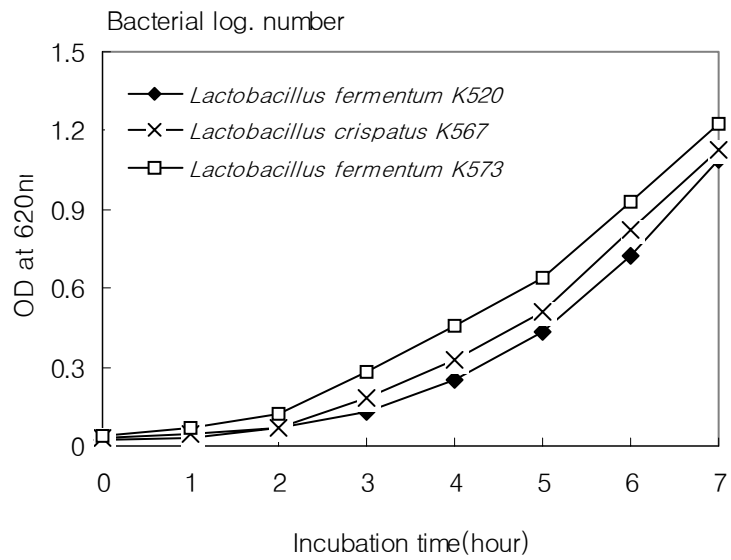


Figure 18. Growth of cultures in MRS broth containing 0.05% L-cysteine without 0.3% oxgall

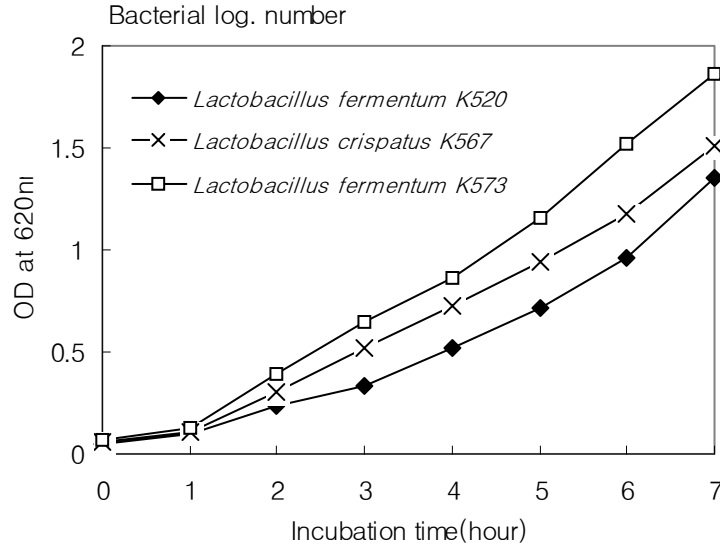


Figure 19. Growth of cultures in MRS broth containing 0.05% L-cysteine with 0.3% oxgall

Fig. 16~Fig. 19에서 보는 바와 같이 oxgall을 첨가하지 않은 경우와 첨가한 경우 간에 큰 차이를 나타내지 않아 4종의 Enterococci 젖산균 모두 담즙내성이 있는 것으로 나타났는데, OD값이 0.3에 도달하는데 소요되는 시간을 측정하여 보면 oxgall 무첨가구는 *E. faecium* A56 균주가 1.7시간, *E. faecium* A275 균주와 *E. faecalis* D66 균주가 1.86시간, *E. faecium* A268 균주가 2.46시간 순이었으며, oxgall 첨가구는 *E. faecium* A56 균주, *E. faecium* A275 균주와 *E. faecalis* D66 균주 공히 2.16시간, *E. faecalis* D66 균주 2.74시간으로 나타났다.

또한 3종의 Lactobacilli 균 역시 4종의 Enterococci 균에 비해 담즙내성은 약하였으나 내성이 있는 것으로 나타났다. OD값이 0.3에 도달하는데 소요되는 시간을 측정하여 보면 oxgall 무첨가구는 *L. fermentum* K573 균주가 1.7시간, *L. crispatus* K567 균주가 2시간, *L. fermentum* K520 균주가 2.7시간 순이었으며, oxgall 첨가구는 *L. fermentum* K573 균주가 3.0시간, *L. crispatus* K567 균주가 3.75시간, *L. fermentum* K520 균주가 4.3시간 순으로 나타났다. 이는 임 등(1996)에 따르면, 상업용 혼합균주가 5.68시간 소요되었다는 보고와 비교해 볼 때 분리한 젖산균이 oxgall에 크게 영향을 받지 않은 것으로 나타났다. 또한 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121과 *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4962의 경우 0.3% oxgall 무첨가시 2.73시간과 3.97시간을, 첨가시는 2.93시간과 5.27시간을 각각 나타

났다고 보고한 바 있다(Gilliland 와 Walker, 1990). Cha와 Kim(1994)은 0.3% oxgall 첨가시 *Bifidobacterim longum* KFRI 977이 3.5시간, *Bifidobacterim infantis* KFRI 974는 5시간, *Bifidobacterim bifidum* KFRI 973은 6시간을 각각 나타났다고 한 결과와 비교해 볼 때 담즙에 대한 내성이 강한 것으로 나타났다.

바. pH 내성

위산과 비슷한 정도의 pH에 대한 내성을 알아보기 위하여 젖산균주를 pH 1, 2, 3의 증류수에서 3시간까지의 생존여부를 시험한 결과는 Fig. 20~Fig. 26에서 보는 바와 같다.

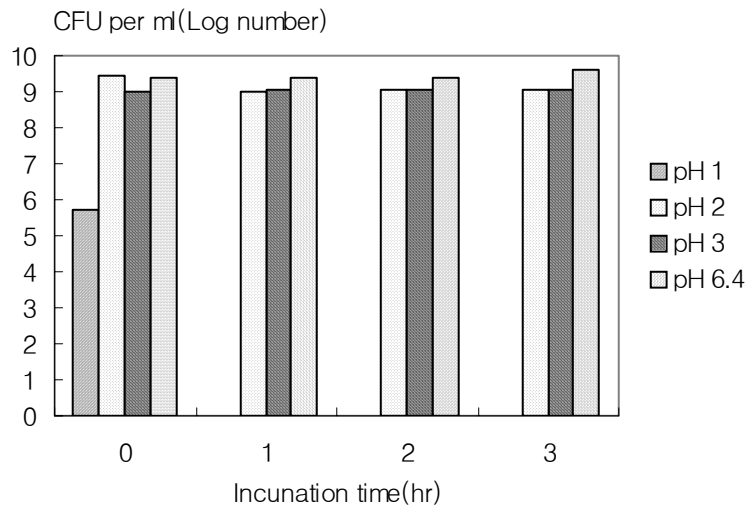


Figure 20. Survival of *Enterococcus faecium* A56 after three hours in HCl(pH 1,2,3)

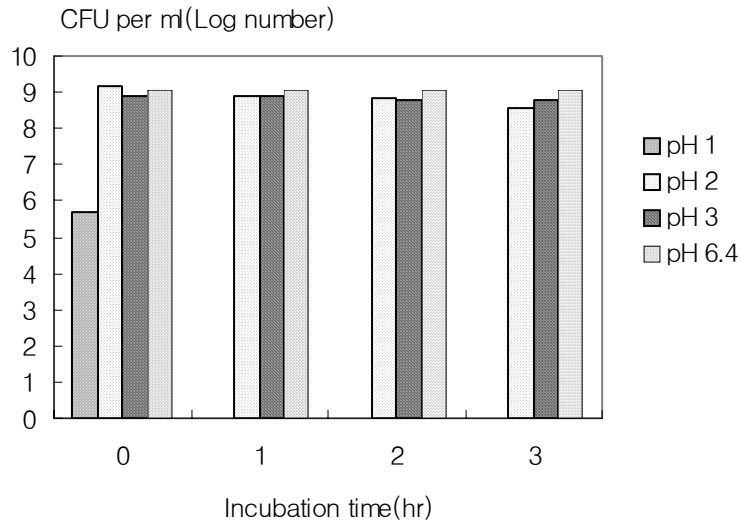


Figure 21. Survival of *Enterococcus faecium* A268 after three hours in HCl(pH 1,2,3)

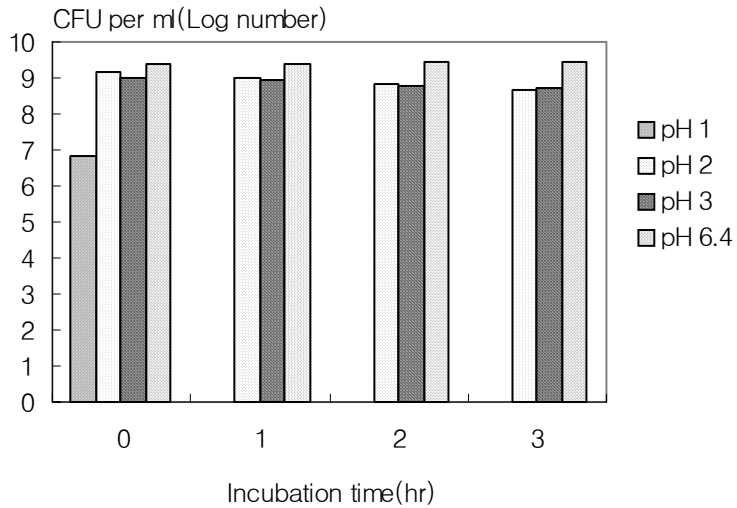


Figure 22. Survival of *Enterococcus faecium* A275 after three hours in HCl(pH 1,2,3)

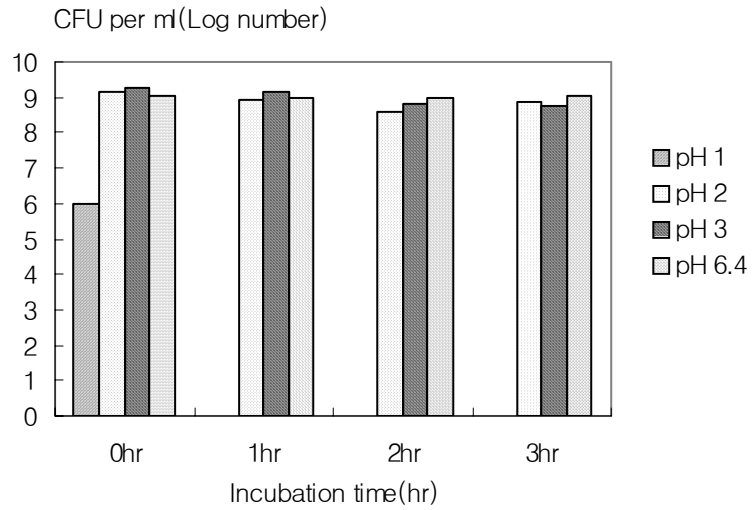


Figure 23. Survival of *Enterococcus faecalis* D66 after three hours in HCl (pH 1,2,3)

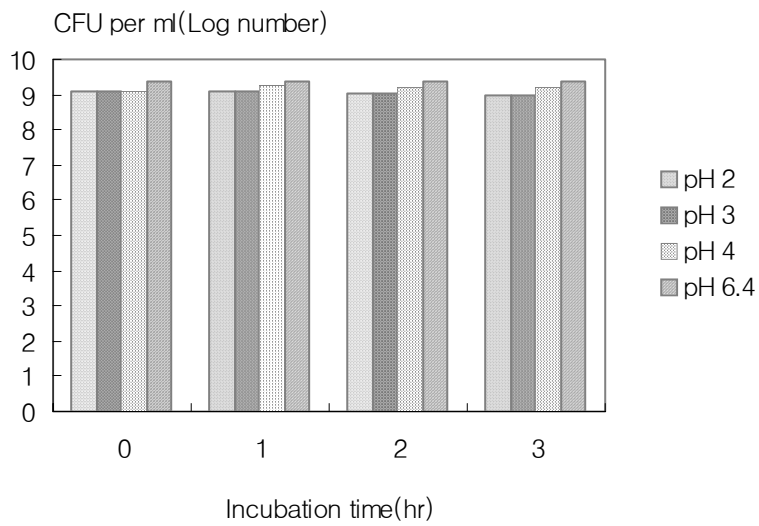


Figure 24. Survival of *Lactobacillus fermentum* K520 after three hours in HCl (pH 2,3,4)

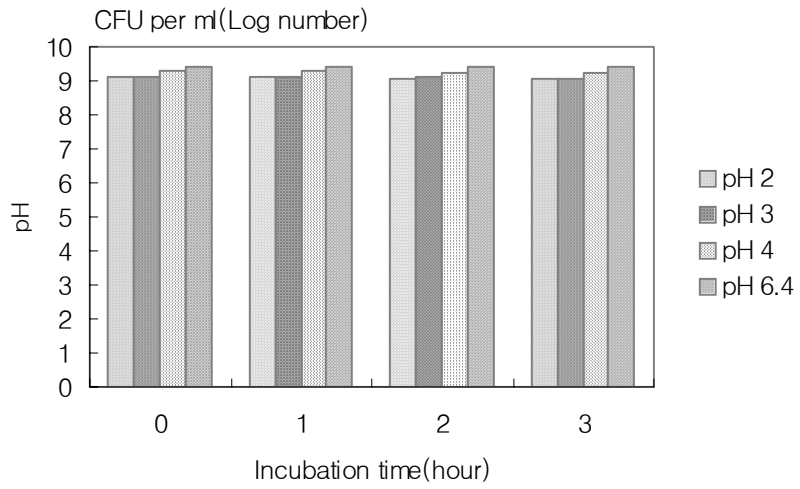


Figure 25. Survival of *Lactobacillus crispatus* K567 after three hours in HCl (pH 2,3,4)

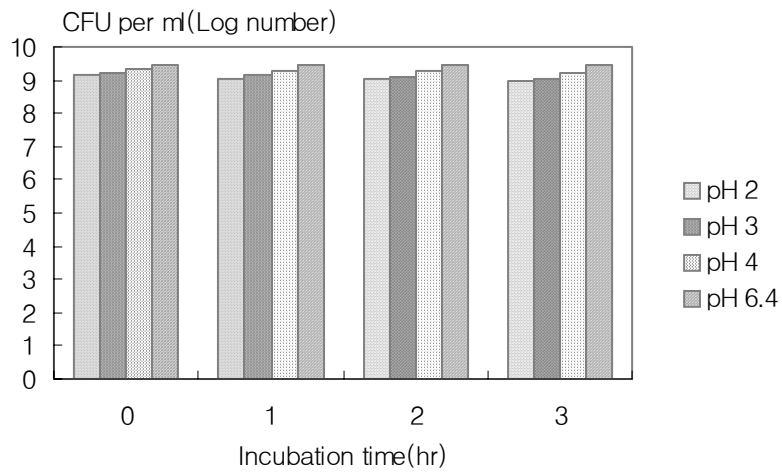


Figure 26. Survival of *Lactococcus fermentum* K573 after three hours in HCl (pH 2,3,4)

pH 2와 pH 3의 증류수에서는 3시간까지 생존률에 큰 영향이 없었으나 pH 1의 증류수에는 모든 균주가 0시간에도 크게 감소를 보였고, 다만, *Enterococcus faecium* A275 균주는 2 log 정도의 감소로서 다른 균주의 3 log 정도의 감소에 비

해 pH 내성이 있는 것으로 나타났다. 그러나 1시간 이후에는 모든 균주가 사멸하였다. 이는 Clark 등(1993)이 *B. longum* 균주에 있어서 3시간까지 어느정도 생존력을 보여준 실험결과에 비해 pH 내성이 약한 반면, Conway 등(1987)이 *Lactobacillus acidophilus* 2균주, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*에 대한 실험에서 모든 균주가 pH 1에서 1시간 이후에 모두 사멸하였다는 보고와는 비슷한 경향을 보여주었다. 이에 따라 Lactobacilli 균주에 대해서는 pH 1을 배제하여 pH 2, 3, 4 와 pH 6.4를 대상으로 실험을 실시하였다. *L. fermentum* K520균주는 대조구인 pH 6.4에서의 균수와 비교한 결과 pH 2와 3에서 0시간에는 생존율이 56.5%이던 것이 3시간 이후에는 37.6%와 40%로 감소하였고, pH 4에서 0시간에는 78.3%의 생존율이 64%로 감소하였다. *L. crispatus* K567 균주는 pH 2와 3에서 0시간에는 생존율이 53.9%이던 것이 3시간 이후에는 40.0%로 감소하였고, pH 4에서 0시간에는 73.1%의 생존율이 66.7%로 감소하였다. *L. fermentum* K573 균주는 pH 2와 3에서 0시간에는 생존율이 50.0%, 57.1%이던 것이 3시간 이후에는 32.8%와 34.5%로 감소하였고, pH 4에서 0시간에는 75.01%의 생존율이 58.6%로 감소하였다. 따라서 3종의 Lactobacilli 중 *L. crispatus* K567균주가 가장 내산성이 높은 것으로 나타났다.

사. 항균력 시험

젖산균이 식중독균에 대해 어느정도 억제하는지를 측정하기 위해 혼합배양을 실시한 결과는 Table 20~26과 같다.

Table 20. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecium* A56 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>E. faecium</i> A56 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.28×10 ⁶	6.48	1.79×10 ⁵	4.93	44.92
<i>Salmonella typhimurium</i>	2.19×10 ⁵	6.53	1.28×10 ⁴	4.98	34.25
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.76×10 ⁵	6.53	2.29×10 ⁵	4.94	39.10

* Initial count of *Enterococcus faecium* A56 : 1.0×10⁷CFU/ml

^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Table 21. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecium* A268 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>E. faecium</i> A268 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.28×10 ⁶	6.48	4.7×10 ⁵	4.92	62.50
<i>Salmonella typhimurium</i>	3.76×10 ⁵	6.53	2.52×10 ⁵	4.98	29.52
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.19×10 ⁵	6.53	1.8×10 ⁴	4.93	41.55

* Initial count of *Enterococcus faecium* A268 : 1.58×10⁷CFU/ml

^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Table 22. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecium* A275 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>E. faecium</i> A275 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.28×10 ⁶	6.48	5.35×10 ⁵	4.99	28.52
<i>Salmonella typhimurium</i>	2.19×10 ⁵	6.53	1.0×10 ⁴	4.99	39.27
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.76×10 ⁵	6.53	2.56×10 ⁵	4.94	33.24

* Initial count of *Enterococcus faecium* A275 : 2.05×10⁷CFU/ml

^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Table 23. Inhibition of pathogens by *Enterococcus faecalis* D66 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>E. faecalis</i> D66 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.28×10 ⁶	6.48	7.3×10 ⁵	5.40	12.50
<i>Salmonella typhimurium</i>	2.19×10 ⁵	6.53	2.33×10 ⁴	4.94	48.40
<i>Staphylococcus aureus</i>	3.76×10 ⁵	6.53	4.4×10 ⁵	4.91	42.90

* Initial count of *Enterococcus faecalis* D66 : 1.79×10⁷CFU/ml

^a Determined after 6h of incubation at 37°C

Table 24. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus fermentum* K520 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>L. fermentum</i> 520 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.78x 10 ⁷	6.65	1.75× 10 ⁷	5.55	1.97
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.28x 10 ⁷	6.65	1.08× 10 ⁷	5.68	15.63
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.49x 10 ⁷	6.68	1.99× 10 ⁷	5.35	20.08

* Initial count of *Lactobacillus fermentum* K520 : 1.5×10⁶CFU/ml

^a Determined after 6hr of incubation at 37°C

Table 25. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus crispatus* K567 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>L. crispatus</i> K567 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.78x 10 ⁷	6.65	1.26× 10 ⁷	5.04	29.21
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.28x 10 ⁷	6.65	7.8× 10 ⁶	4.93	39.06
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.49x 10 ⁷	6.68	1.21× 10 ⁷	4.98	51.40

* Initial count of *Lactobacillus crispatus* K567 : 1.32×10⁶CFU/ml

^a Determined after 6hr of incubation at 37°C

Table 26. Inhibition of pathogens by *Lactobacillus fermentum* K573 in MRS broth

Pathogens	Growth				Inhibition (%)
	Pathogens ^a		<i>L. fermentum</i> K573 ^a		
	CFU/ml	pH	CFU/ml	pH	
<i>Escherichia coli</i>	1.78x 10 ⁷	6.65	1.8× 10 ⁷	4.90	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.28x 10 ⁷	6.65	7.45× 10 ⁶	4.75	41.80
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.49x 10 ⁷	6.68	1.19× 10 ⁷	4.99	52.21

* Initial count of *Lactobacillus fermentum* K573 : 1.82×10⁶CFU/ml

^a Determined after 6hr of incubation at 37°C

Enterococcus faecium A56은 식중독균간에 억제효과가 큰 차이는 없었으나 *Escherichia coli*에 대해 44.92%로서 억제효과가 가장 큰 반면, *Salmonella typhimurium*에 대해 34.25%로서 억제효과가 가장 적었으며, 대조구인 식중독균은 pH 6.48~6.53이며, 혼합배양액은 pH 4.93~4.98이었다. *Enterococcus faecium* A268은 *Escherichia coli*에 대해 억제효과가 62.5%로서 억제효과가 가장 큰 반면, *Salmonella typhimurium*에 대해 29.52%로서 억제효과가 가장 적었으며, 대조구인 식중독균은 pH 6.48~6.53이며, 혼합배양액은 pH 4.92~4.98이었다.

Enterococcus faecium A275는 식중독균간에 억제효과가 큰 차이가 없었지만 *Salmonella typhimurium*에 대해 39.27%로서 억제효과가 가장 컸으며, 대조구인 식중독균은 pH 6.48~6.53이며, 혼합배양액은 pH 4.94~4.99이었다.

Enterococcus faecalis D66은 *Salmonella typhimurium*과 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 48.40%와 42.90%로서 억제효과가 큰 반면 *Escherichia coli*에 대해 12.50%로서 억제효과가 상대적으로 낮았으며, 대조구인 식중독균은 pH 6.48~6.53이며, 혼합배양액은 pH 4.91~5.40이었다.

Lactobacillus fermentum K520은 *Salmonella typhimurium*과 *Staphylococcus aureus*에 대해 각각 15.63%와 20.08%로서 다른 균주에 비해 억제율이 낮았고, 특히 *Escherichia coli*에 대해 거의 억제효과가 없는 것으로 나타났으며, 대조구인 식중독균은 pH 6.65~6.68이며, 혼합배양액은 pH 5.35~5.68이었다.

Lactobacillus crispatus K567은 *Salmonella typhimurium*와 *Escherichia coli*에 대해 억제율이 39.06%와 29.21%였고, 특히 *Staphylococcus aureus*에 대해 억제율이 51.4%로서 상대적으로 억제효과가 높은 것으로 나타났으며, 대조구인 식중독균은 pH 6.65~6.68이며, 혼합배양액은 pH 4.93~5.04이었다.

Lactobacillus fermentum K573은 *Escherichia coli*에 대해 억제효과가 없는 것으로 나타난 반면, *Staphylococcus aureus*에 대해 억제율이 52.21%로서 다른 균에 비해 억제효과가 가장 높은 것으로 나타났으며, *Salmonella typhimurium*에 대해 억제율이 41.80%로서 비교적 높은 억제효과를 보였다.

이상의 결과로 볼 때 *Escherichia coli*에 대해 *Enterococcus faecium* A268이, *Salmonella typhimurium*에 대해 *Enterococcus faecalis* D66이, *Staphylococcus aureus*에 대해 *Lactobacillus fermentum* K573이 가장 억제효과가 큰 것으로 나타났다.

8) Glutamate decarboxylase(GDC) 활성

다음 표 27은 선발된 젖산균 중 GABA 함량이 높은 균주를 대상으로 GABA 함량과 GDC 활성과의 관계를 나타낸 결과로서 GABA 함량과 GDC 활성이 비례하였는데, 이는 GABA가 축적되기 위해서는 GDC의 활성이 높아야 된다는 보고(茅原紘, 2002)와 일치하였다. Xu 등(2004)에 따르면, *Lactococcus lactis* 01-7의 GDC는 0.51mmol/L, *Lactobacillus brevis* IFO 12005는 9.3mmol/L, *Lactococcus lactis* SYFS 1009는 1.9mmol/L로서 *Lactobacillus brevis* IFO 12005가 선발균주인 *Enterococcus faecium* A275와 유사한 활성을 나타내었다.

Table 27. 선발균주별 GABA 함량과 GDC 활성

균 주	GABA 함량(ppm)	GDC Activity (mmol/L)
<i>Lactobacillus fermentum</i> K573	1298.31	8.5
<i>Enterococcus faecium</i> A275	1298.31	9.0
<i>Lactobacillus crispatus</i> K567	711.40	7.6

5. GABA 생산 최적배양조건 설정

젖산균의 특성조사에서 얻어진 결과와 GABA 생산량이 많은 젖산균인 *Enterococcus faecium* A275와 *Lactobacillus crispatus* K567 균주를 대상으로 최적조건을 설정하였다.

가. 환원탈지유 함량과 Monosodium glutamate(MSG) 첨가량이 GABA 함량에 미치는 영향

1) *Enterococcus faecium* A275

환원탈지유 및 Monosodium glutamate 함량별로 첨가된 환원탈지유에 *Enterococcus faecium* A275 젖산균을 1% 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 GABA 함량을 측정된 결과는 다음 Table 28과 같다.

Table 28. The effect of reconstituted skim milk content and the addition dosage of MSG on GABA content during 18hr incubation of *Enterococcus faecium* A275¹⁾ at 37°C

(Unit : ppm)

reconstituted skim milk	MSG 0.1%	MSG 0.5%	MSG 1.0%
	GABA content		
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

¹⁾dosage of *Enterococcus faecium* A275 : 1%

환원 탈지유 농도 8%와 12%에서는 MSG 0.5% 첨가했을 때가 MSG 1.0% 첨가했을 때보다 GABA 함량이 높게 나왔는데, 이는 실험상의 오차나 첨가량의 한계치가 아닌가 사료되었다. 환원 탈지유 농도 10%에서는 MSG 0.1%와 0.5%간에는 차이가 없었으나 1.0%에서는 GABA 함량이 가장 높은 값을 얻었다.

또한, MSG를 기준으로할 때 MSG 첨가량과 상관없이 환원탈지유 농도가 증가할

수록 GABA 함량이 증가하였다. 따라서 환원탈지유는 12%, MSG는 0.5% 첨가했을 때가 가장 적합한 조건이었다.

2) *Lactobacillus crispatus* K567

환원탈지유 및 MSG 함량별로 *Lactobacillus crispatus* K567을 1% 접종하고 37°C에서 18시간 배양한 후 GABA 함량을 측정된 결과는 다음 표 29와 같다.

Table 29. The effect of reconstituted skim milk content and the addition dosage of MSG on GABA content during 18hr incubation of *Lactobacillus crispatus* K567¹⁾ at 37°C

(Unit : ppm)

reconstituted skim milk	MSG 0.1%	MSG 0.5%	MSG 1.0%
	GABA content		
8 %	719.74±14.65	566.25±25.23	411.38±32.56
10 %	666.82±56.27	587.14±26.56	602.13±13.41
12 %	739.98± 9.08	558.50±36.33	553.11±11.21

¹⁾dosage of *Lactobacillus crispatus* K567 : 1%

환원 탈지유 농도가 증가할수록, MSG 첨가농도가 감소할수록 GABA 함량이 증가하는 경향을 나타내었다. 따라서 환원탈지유는 12%, MSG는 0.1% 첨가했을 때가 가장 적합한 조건이었다.

나. 젖산균 첨가량 및 배양온도가 GABA함량에 미치는 영향

1) *Enterococcus faecium* A275

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.5%를 첨가하고, *Enterococcus faecium* A257 첨가량 및 배양온도별로 18시간 배양했을 때의 GABA 함량을 측정된 결과는 다음 Table 30과 같다.

Table 30. The effect of the addition dosage of *Enterococcus faecium* A257 and incubation temperature on GABA content during 18hr incubation in 12% reconstituted skim milk added 0.5% MSG

(Unit : ppm)

Incubation Temp. Starter	34℃	37℃	40℃
	GABA content		
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

Enterococcus faecium A275 첨가량이 증가할수록 GABA 함량이 증가하였는데, 이는 상기 젖산균에서와 비슷한 경향을 보였다. 특히 첨가량보다는 배양온도에 영향이 크게 나타났고, 34℃와 37℃보다는 40℃에서 GABA 함량이 크게 증가한 것으로 나타났다. 이는 이 균의 최적온도가 40℃로서 균이 증가함에 따라 glutamate decarboxylase 함량이 많아져 MSG 분해정도가 많아져 GABA 함량이 증가하지 않았나 사료되었다. 따라서 *Enterococcus faecium* A275 첨가량은 1.0%, 배양온도는 40℃가 최적조건이었다.

2) *Lactobacillus crispatus* K567

가) *L. crispatus* K567 첨가량이 GABA 함량에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.1%를 첨가하고, *L. crispatus* K567 첨가량별로 37℃에서 18시간 배양했을 때의 GABA 함량을 측정된 결과는 다음 표 31과 같다.

표 31. *L. crispatus* K567 첨가량이 GABA 함량에 미치는 영향

(단위: ppm)

균 첨가량	0.1%	0.5%	1.0%
GABA 함량	672.49±11.95	741.84±1.53	733.58±0.68

표 31에서 보는 바와 같이 균 첨가량 0.5%일 때 GABA 함량이 741.84ppm으로서 가장 높은 값을 나타내었다.

나) 배양온도가 GABA 함량에 미치는 영향

상기에서 얻어진 최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.1%를 첨가하고, *L. crispatus* K567 첨가량 0.5%로 한 다음 배양온도별로 18시간 배양했을 때의 GABA 함량을 측정한 결과는 다음 표 32와 같다.

표 32. 배양온도가 GABA 함량에 미치는 영향

(단위 : ppm)

배양온도	34℃	37℃	40℃
GABA 함량	660.98±2.47	727.46±0.64	745.66±0.99

표 32에서 보는 바와 같이 GABA 생산 최적배양조건은 환원탈지유 12%, MSG 첨가량 0.1%, *L. crispatus* K567 첨가량 0.5% 및 배양온도 40℃에서 18시간 배양할 때 감마-아미노부티르산 함량이 745.66ppm이었다.

다. 배양시간에 따른 pH와 GABA 생성량에 미치는 영향

1) *Enterococcus faecium* A275

최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.5%를 첨가하고, *Enterococcus faecium* A275 첨가량 1.0% 및 배양온도 40℃로 했을 때 배양시간에 따른 pH와 GABA 함량을 측정한 결과는 Fig. 27과 같다.

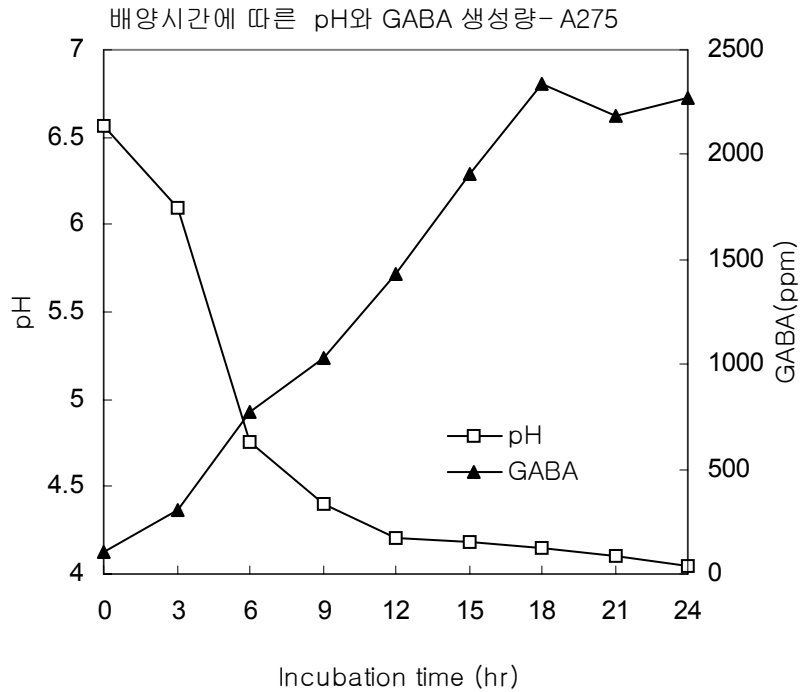


Fig. 27. The effect of incubation time on pH and GABA content in 12% reconstituted skim milk added 0.5% MSG and 1% *Enterococcus faecium* A257

배양 18시간까지 GABA함량은 지속적으로 증가하다가 21시간 이후에는 감소 또는 정체를 보였다.

2) *Lactobacillus crispatus* K567

최적조건인 환원 탈지유 농도 12%에 MSG 0.1%를 첨가하고, *Lactobacillus crispatus* K567 첨가량 0.5% 및 배양온도 40°C로 했을 때 배양시간에 따른 pH와 GABA 함량을 측정한 결과는 Fig. 28과 같다.

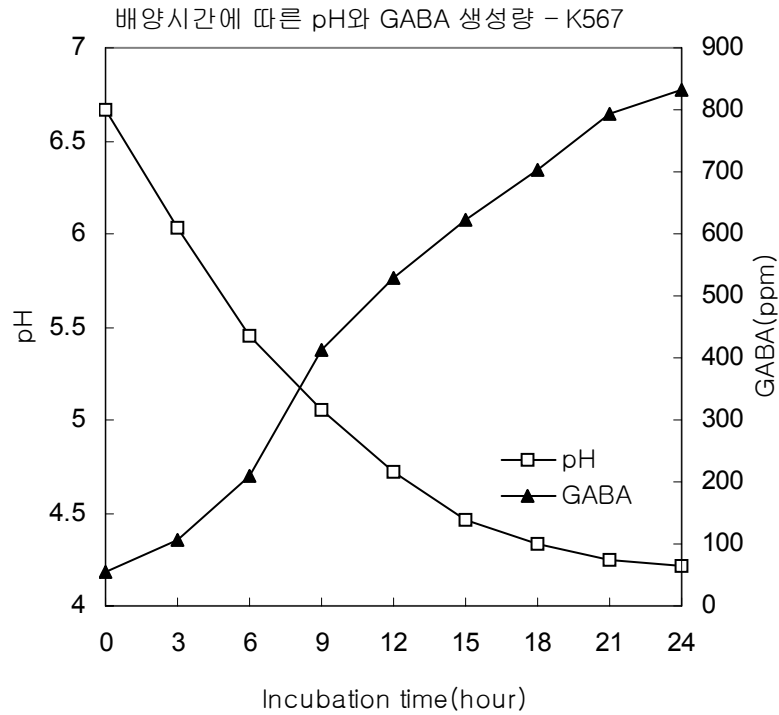


Fig. 28. The effect of incubation time on pH and GABA content in 12% reconstituted skim milk added 0.1% MSG and 0.5% *Lactobacillus crispatus* K567 at 40°C

배양 24시간까지 GABA 함량은 지속적으로 증가하여 GABA 함량이 833.3ppm을 나타내었으나 발효유의 최적 pH 조건을 감안하였을 때는 배양 18시간이 적당하였고, 이 때 GABA 함량이 704.5ppm을 나타내었다.

6. 최적 배합조성물 개발

가. 제조 공정

Lactobacillus crispatus K567 균주를 이용한 발효유는 GABA 함량이 *Enterococcus faecium* A275 균주를 이용한 발효유에 비해 GABA 함량이 낮은 문제점이 있고, 또한 최근 대두되고 있는 Enterococci 균에 대한 위해성 논란이 대두되고 있어 보다 GABA 함량이 높고 안정적인 제품개발을 위해 *Lactobacillus crispatus* K567 균주를 이용한 발효액에 *Enterococcus faecium* A275 균주를 이용하여 배양한 발효액을 열처리하고 혼합하는 방법이 강구되었다. 이때 열처리한 발효액에서의 GABA 함량이 감소하는지 여부를 다음 표 33에 나타내었다.

표 33. *Enterococcus faecium* A275 균주를 이용한 발효액을 90℃에서 30분간 살균에 의한 GABA 함량 변화

구 분	살균 발효액	비살균 발효액
GABA 함량(ppm)	2030.04±5.01	1996.97±6.82

표 33에서 보는 바와 같이 거의 열에 영향이 없는 것으로 나타남에 따라 혼합하여도 문제가 없는 것으로 나타났다.

또한, *Enterococcus faecium* A275 균주에 MSG 0.5%를 첨가할 때가 GABA 함량이 가장 높았으나 문제는 제품에 MSG 특유의 느끼한 맛이 약간 남아 있어 기호성이 떨어지는 문제점 때문에 GABA 함량이 큰 차이가 나지 않은 MSG 0.1%를 첨가하는 것이 바람직하였다.

이에 따라 원유 96.05%, 탈지분유 3.85%와 monosodium glutamate 0.1%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 선택균주를 1%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양하였다. 발효가 완료된 후 다양한 소재를 첨가하여 호상발효유를 제조한 다음 관능검사를 실시하여 최적 배합조성물을 완성하였다.

나. 배합비

플레인 발효액에 딸기잼을 농도별로 첨가하여 배합조성비(표 34)를 설정한 다음 관능검사를 실시한 결과는 표 35와 같다.

표 34. 선발균주를 이용한 개발제품의 배합비

재 료	배합비(%)		
	A	B	C
원 유	80.682	80.682	80.682
탈지분유	3.234	3.234	3.234
올리고당	5	5	5
액상과당	2	2	2
딸기잼 또는 블루베리잼	4	6	8
monosodium glutamate	0.084	0.084	0.084
정 제 수	5.0	3.0	1.0
Total	100	100	100

표 35는 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecium* A275 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 30분간 열처리한 제품(II)을 7 : 3 비율로 혼합한 딸기 발효유의 관능검사 한 결과이다.

표 35. I과 II를 7 : 3 비율로 혼합한 딸기 발효유의 관능적 품질평가¹⁾

관능기준 딸기잼	Mean±Std				
	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	5.33±1.56 ^b	5.58±1.68 ^a	5.58±1.73 ^a	5.42±1.88 ^a	5.33±1.97 ^a
A	5.50±0.90 ^b	5.42±1.31 ^a	5.58±1.08 ^a	5.58±1.08 ^a	5.67±1.30 ^a
B	6.00±0.85 ^{ab}	6.17±1.34 ^a	6.00±1.13 ^a	5.83±1.03 ^a	5.58±1.08 ^a
C	6.50±1.17 ^a	6.00±1.81 ^a	6.25±1.22 ^a	6.17±1.64 ^a	5.83±1.80 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

²⁾ 서울우유 퓨오레(허브)이다.

^{a,b} 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 36은 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecium* A275 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 30분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합한 딸기 발효유의 관능검사 한 결과이다.

표 36. I과 II를 5 : 5 비율로 혼합한 딸기 발효유의 관능적 품질평가¹⁾

Mean±Std					
관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	4.36±0.92 ^c	6.09±1.58 ^a	5.91±1.30 ^a	5.64±1.29 ^a	5.45±1.63 ^a
A	5.45±1.13 ^b	4.91±1.04 ^b	5.45±0.93 ^a	5.45±0.93 ^a	5.18±0.98 ^a
B	6.18±0.87 ^{ab}	6.27±1.10 ^a	5.73±1.19 ^a	6.05±1.06 ^a	5.91±1.38 ^a
C	6.45±1.13 ^a	6.09±1.30 ^a	5.82±0.87 ^a	6.36±1.12 ^a	6.18±1.17 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

²⁾ 서울우유 퓨오레(허브)이다.

^{a,b} 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 37은 *Lactobacillus crispatus* K567 균주만을 이용 딸기 발효유(I)의 관능검사 한 결과이다.

표 37. *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 딸기 발효유의 관능적 품질평가¹⁾

Mean±Std					
관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	5.33±1.72 ^b	6.42±1.44 ^{ab}	6.42±1.38 ^a	6.25±1.42 ^a	6.00±1.81 ^a
A	5.92±0.90 ^{ab}	5.42±1.31 ^b	5.92±1.08 ^a	5.58±0.90 ^a	5.33±1.07 ^a
B	6.58±0.79 ^a	6.58±1.08 ^a	6.58±1.08 ^a	6.50±1.09 ^a	6.33±0.98 ^a
C	6.25±1.06 ^{ab}	6.42±1.24 ^{ab}	6.33±0.78 ^a	6.50±1.17 ^a	6.33±1.07 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

²⁾ 서울우유 퓨오레(허브)이다.

^{a,b} 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 38은 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecium* A275 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 30분간 열처리한 제품(II)을 7 : 3 비율로 혼합한 블루베리 발효유의 관능검사 한 결과이다.

표 38. I과 II를 7 : 3 비율로 혼합한 블루베리 발효유의 관능적 품질평가¹⁾

Mean±Std					
관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	5.25±1.42 ^a	5.92±1.38 ^a	5.58±1.24 ^a	5.67±1.15 ^a	5.67±1.07 ^a
A	5.67±1.30 ^a	5.67±1.37 ^a	5.83±1.19 ^a	5.75±0.97 ^a	5.50±1.09 ^a
B	6.33±1.15 ^a	6.50±0.80 ^a	5.83±0.94 ^a	5.92±0.90 ^a	5.75±0.97 ^a
C	6.25±0.97 ^a	6.50±1.31 ^a	5.83±1.27 ^a	6.17±1.03 ^a	6.00±1.21 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

²⁾ 서울우유 퓨오레(허브)이다.

^{a,b} 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 39는 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecium* A275 균주 이용 발효유를 제조한 다음 90℃, 30분간 열처리한 제품(II)을 5 : 5 비율로 혼합한 블루베리 발효유의 관능검사 한 결과이다.

표 39. I과 II를 5 : 5 비율로 혼합한 블루베리 발효유의 관능적 품질평가¹⁾

Mean±Std					
관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	5.75±1.48 ^a	6.17±1.40 ^a	6.00±1.21 ^a	6.17±1.27 ^a	6.08±1.16 ^a
A	5.67±1.30 ^a	4.08±1.08 ^b	4.83±0.83 ^b	3.83±1.11 ^b	3.67±1.07 ^b
B	6.25±1.06 ^a	4.42±1.51 ^b	4.92±1.08 ^b	4.33±1.56 ^b	4.42±1.38 ^b
C	6.00±0.95 ^a	4.58±1.68 ^b	5.17±1.47 ^{ab}	4.50±1.73 ^b	4.25±1.42 ^b

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

²⁾ 서울우유 퓨오레(허브)이다.

^{a,b} 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

표 40은 *Lactobacillus crispatus* K567 균주만을 이용 블루베리 발효유(I)의 관능검사한 결과이다.

표 40. *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 블루베리 발효유의 관능적 품질평가¹⁾
Mean±Std

관능기준 딸기잼	색	맛	조직감	종합적 기호도	구입의사
control ²⁾	5.50±1.09 ^a	5.67±1.61 ^a	6.08±1.38 ^a	5.58±1.56 ^a	5.50±1.57 ^a
A	5.83±1.64 ^a	5.17±1.19 ^a	5.42±1.44 ^a	5.17±1.53 ^a	5.17±1.53 ^a
B	6.17±1.34 ^a	6.17±1.19 ^a	5.75±1.42 ^a	6.08±1.16 ^a	5.92±1.24 ^a
C	5.83±1.03 ^a	6.17±1.40 ^a	5.75±1.48 ^a	6.17±0.94 ^a	6.00±1.04 ^a

¹⁾ 1~9점까지의 점수를 13명의 평가단에 의한 평균값이다.

²⁾ 서울우유 퓨오레(허브)이다.

^{a,b} 같은 평가기준에서 동일한 문자는 SNK 다중 비교의 5% 수준에서 통계적으로 유의성이 없음을 의미한다.

7. GABA 생산 균주의 발효조건 설정

가. *Enterococcus faecium* A275 균주

원유 96.05%, 탈지분유 3.85%와 monosodium glutamate 0.1%를 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 30분간 살균하였으며, 40°C로 냉각시킨 다음 *Enterococcus faecium* A275 균주를 접종량 별로 0.5%, 1%, 2%(v/v)로 접종하고, 배양 12시간까지 배양하여 젖산균 수, 적정산도 및 pH 변화를 측정된 결과는 Fig. 29~31과 같다.

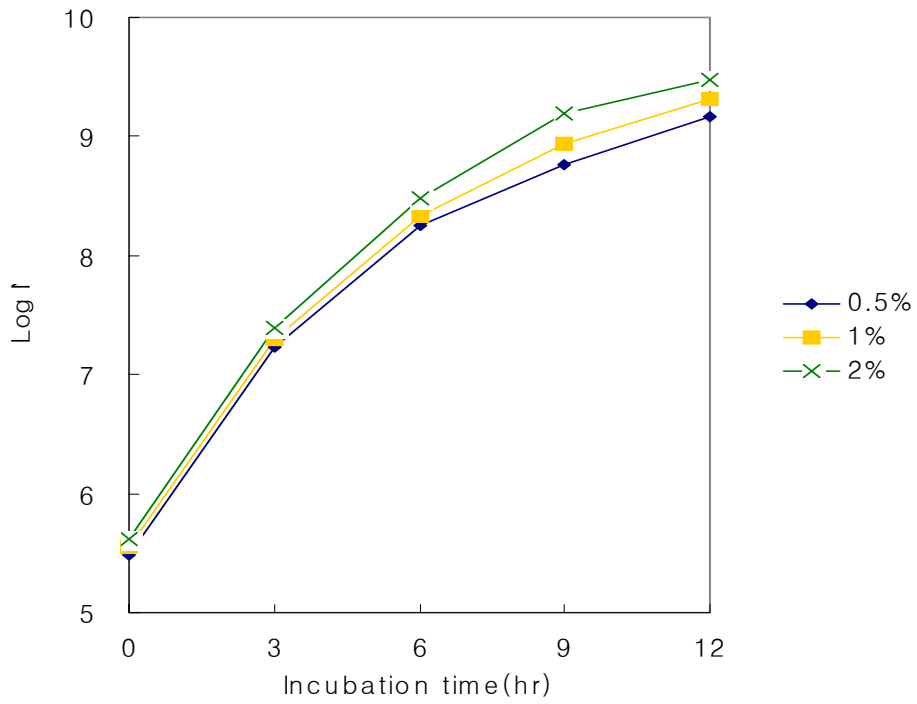


Fig 29. *Enterococcus faecium* A275 균주 첨가량 및 배양시간별 젖산균 수 변화

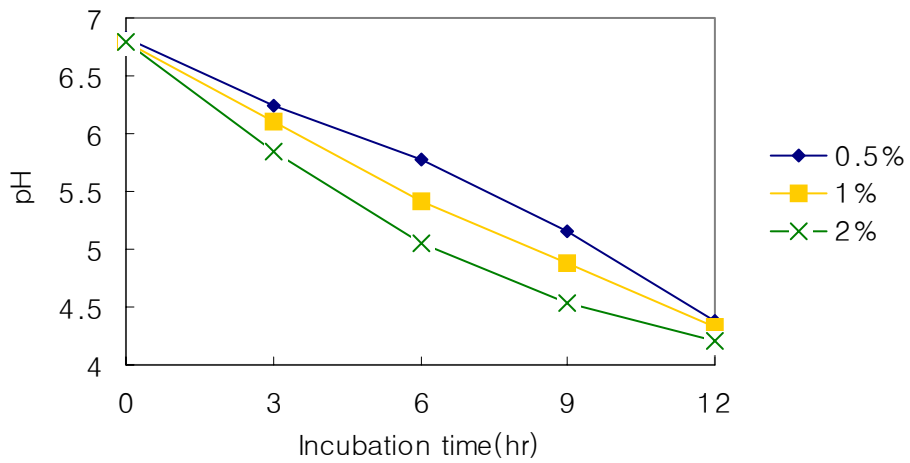


Fig 30. *Enterococcus faecium* A275 균주 첨가량 및 배양시간별 pH 변화

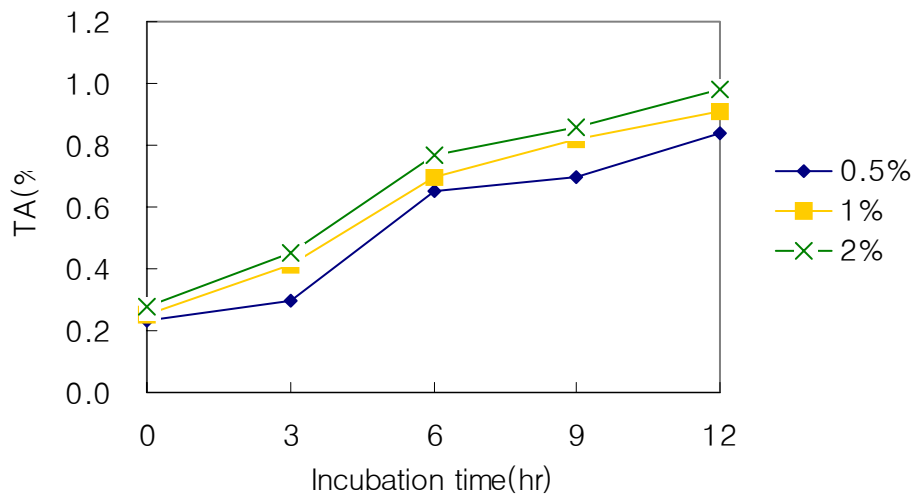


Fig 31. *Enterococcus faecium* A275 균주 첨가량 및 배양시간별 적정산도 변화

발효유 제조의 최적조건인 pH 4.3~4.4와 적정산도 0.9~1.0%에 도달하는데 젖산균 첨가량이 0.5%와 1.0%는 약 12시간이 소요되었고, 2% 첨가량에서는 11시간이 소요되었다. 젖산균 수는 0.5%와 1.0% 첨가량에서는 10^9 cfu/ml 도달하는데 12시간이 소요된 반면, 2% 첨가량에서는 9시간이 소요되었다. 그러나 GABA 함량의 최적조건인 pH 4.2에서는 젖산균 첨가량이 2%에선 12시간, 0.5% 및 1.0%의 경우 약 15시간이 소요될 것으로 보인다.

나. *Lactobacillus crispatus* K567 균주

원유 96.05%, 탈지분유 3.85%와 monosodium glutamate 0.1%를 첨가하고 65°C에서 배합하여 완전히 녹인 후 90°C에서 30분간 살균하였으며, 40°C로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus crispatus* K567 균주를 접종량 별로 0.5%, 1%, 2%(v/v)로 접종하고, 배양 12시간까지 배양하여 젖산균 수, 적정산도 및 pH 변화를 측정된 결과는 Fig. 32~34와 같다.

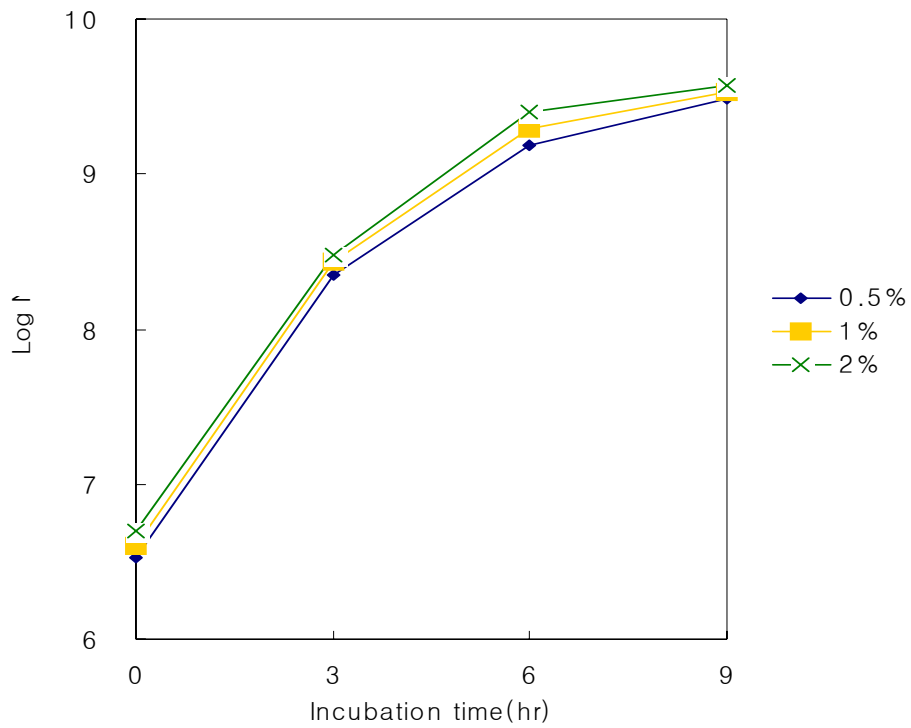


Fig 32. *Lactobacillus crispatus* K567 균주 첨가량 및 배양시간별 젖산균 수 변화

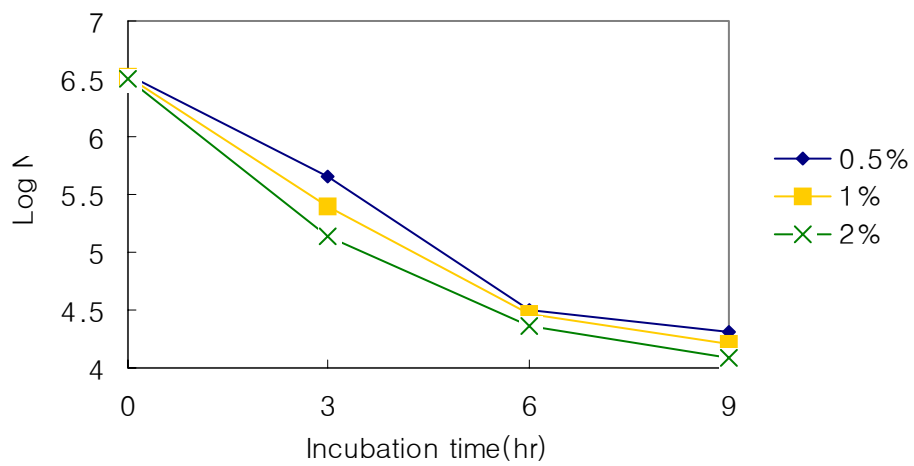


Fig 33. *Lactobacillus crispatus* K567 균주 첨가량 및 배양시간별 pH 변화

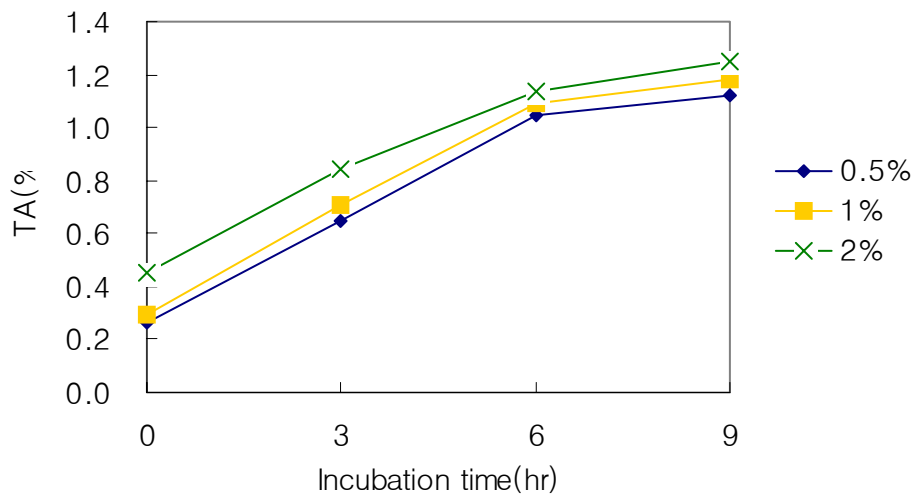


Fig 34. *Lactobacillus crispatus* K567 균주 첨가량 및 배양시간별 적정산도 변화

발효유 제조의 최적조건인 pH 4.3~4.4와 적정산도 0.9~1.0%에 도달하는데 젖산균 첨가량이 0.5%에서는 9시간, 1.0%에서는 7시간이 소요되었고, 2% 첨가량에서는 6시간이 소요되었다. 젖산균 수는 모든 첨가량이 10^9 cfu/ml 도달하는데 6시간이 소요되어 발효능력이 매우 빠른 것을 알 수 있다.

8. 제품 개발 및 이화학적 특성 조사

가. 제품개발

1) 혼합균주 사용할 경우

가) 발효조 A : 원유 96.05%, 탈지분유 3.85%와 monosodium glutamate 0.1%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus crispatus* K567 균주를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양하였다.

나) 발효조 B : 원유 96.05%, 탈지분유 3.85%와 monosodium glutamate 0.1%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Enterococcus faecium* A275 균주를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.2으로 감소할 때까지 배양한 다음 90℃에서 30분간 열처리하였다.

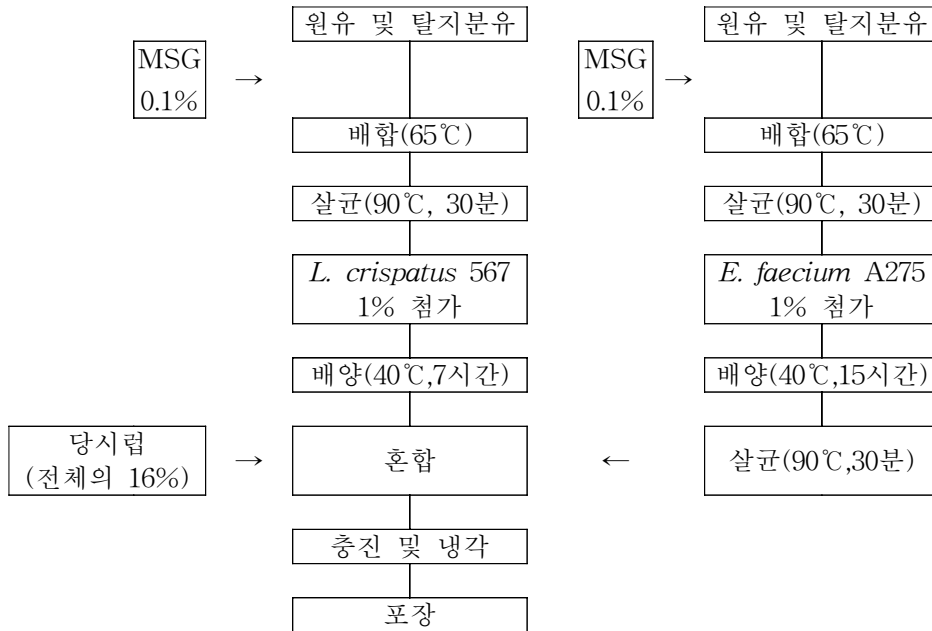
다) 조합탱크 : 비율함량에 맞춰 발효조 A와 B를 혼합(전체의 84%)한 다음 딸기잼 (또는 블루베리잼)8.0%, 올리고당 5%, 액상과당 2%, 정제수 1.0%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

2) 단일균주 사용할 경우

발효조 A : 원유 96.05%, 탈지분유 3.85%와 monosodium glutamate 0.1%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 *Lactobacillus crispatus* K567 균주를 1.0%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양한 액(전체의 84%)에 딸기잼(또는 블루베리잼)8.0%, 올리고당 5%, 액상과당 2%, 정제수 1.0%를 첨가하고 교반하여 호상발효유를 제조하였다.

나. 제조공정 설정

1) 혼합균주 사용할 경우



2) 단일균주 사용할 경우

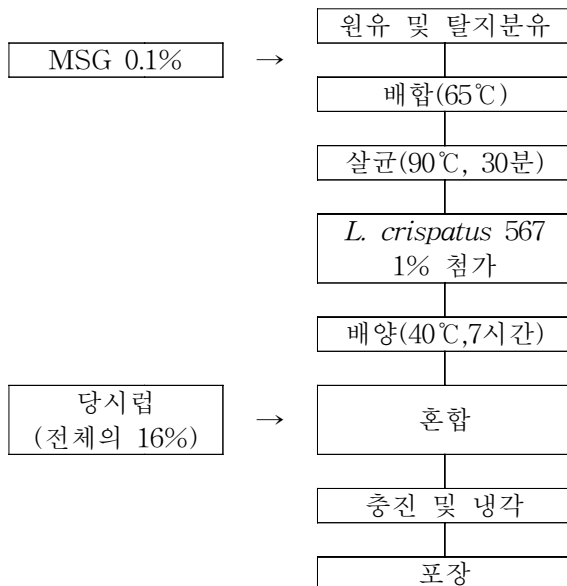


Fig. 35. 호상발효유의 제조공정도

다. GABA 함량 및 이화학 성분 분석

상기와 같이 제조한 후 GABA 함량 및 이화학 성분 분석 결과는 다음 표 41과 같다.

표 41. 개발 제품의 GABA 함량 및 이화학 성분 분석

성분 제품	수분(%)	단백질(%)	지방(%)	회분(%)	GABA함량 (ppm)	젖산균수 (cfu/ml)
A ¹⁾	85.34±0.06	4.35±0.06	3.34±0.05	1.03±0.07	1091.67±3.37	2.42×10 ⁹
B ²⁾	86.25±0.56	4.45±0.04	3.44±0.03	0.92±0.02	1271.64±30.01	1.19×10 ⁹
C ³⁾	85.11±0.13	4.23±0.01	3.46±0.03	0.90±0.02	709.66±14.43	2.98×10 ⁹

¹⁾ *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecium* A275 균주 이용 발효유(II)의 혼합비 = 7 : 3

²⁾ *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유(I)와 *Enterococcus faecium* A275 균주 이용 발효유(II)의 혼합비 = 5 : 5

³⁾ *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유

축산물 가공기준 및 규격(2005)에 따르면, 호상발효유의 경우 무지유고형분 8.0%, 젖산균수 1억 cfu/ml 이상으로서 모두 합격이었으며, 다만 A와 B제품은 배양조가 2개가 필요하고 공정이 복잡한 단점이 있는 반면, GABA 함량이 높다는 장점이 있어 업체의 상황에 따라 선택하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

9. 동물실험

가. 혈당억제

1) 식이섭취량 및 체중변화

실험 기간에 따른 체중 변화를 보면 동일 기간 내에 실험군의 평균 체중은 처리군과 대조군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 *Lactobacillus crispatus* K567 젓산균 함유 발효유가 랫트의 체중 변화에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다.

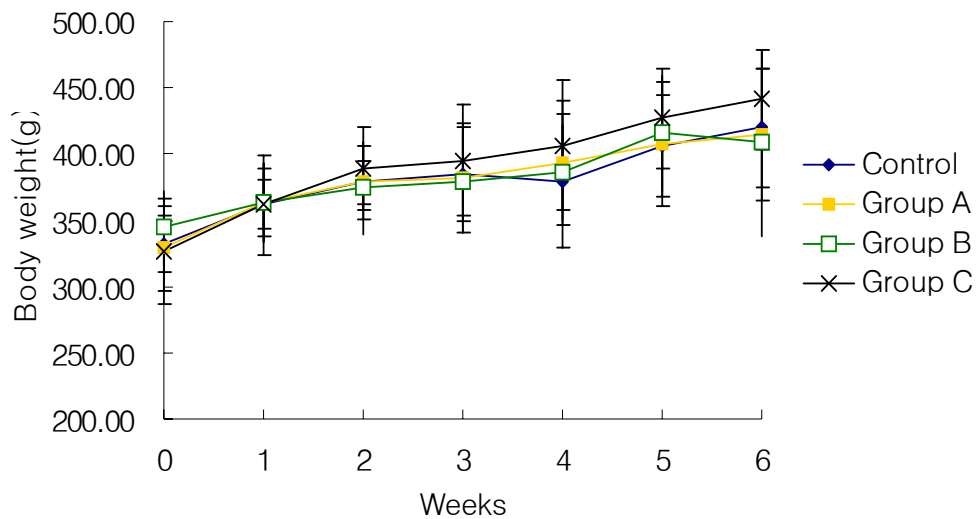


Figure 36. Body weight change of SD Rat fed experimental diets(g/mice)

식이군 간의 체중과 체중 변화량의 유의차가 인정되지 않은 것은 전체 열량 소비량에 차이가 없는 경우에는 체중에 영향을 미치지 않는다는 연구(Kent 등, 1989; Kim 등, 1989)와 유사한 것으로 처리군과 대조군 간의 식이 섭취량에서는 다소의 차이를 보였으나, 유의할 만한 변화가 나타나지 않아 *Lactobacillus crispatus* K567 젓산균 함유 발효유는 랫트의 증체와는 상관이 없는 것으로 나타났다. 그룹별로는 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유를 투입한 그룹 C가 다른 그룹에 비해서 다소 증가한 것으로 나타났다.

2) 장기무게 측정

젓산균 투여 후 6주령에 안락사 시킨 SD rat의 각 장기의 무게에서도 간, 신장, 고환의 무게의 차이에서 유의성을 확인할 수 없었다. 다만, 비장의 무게는

Lactobacillus crispatus K567 균주 이용 발효유와 *Enterococcus faecium* A275 균주 이용 발효유(90℃,30min 열처리)를 5 : 5 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 B가 가장 유의성 있는 변화를 보였다.

Table 42. Organ weight changes of SD rat fed experimental diets
(organ weight/100g)

	Liver	Spleen	Kidney	Testis
Control	16.95±1.58 ^a	2.01±0.29 ^{ab}	0.87±0.12 ^a	1.66±0.08 ^a
A	17.30±2.07 ^a	2.06±0.17 ^a	0.95±0.17 ^a	1.67±0.21 ^a
B	16.98±2.84 ^a	2.24±0.34 ^b	0.78±0.18 ^a	1.60±0.29 ^a
C	17.33±1.55 ^a	2.06±0.69 ^{ab}	0.82±0.09 ^a	1.62±0.49 ^a

3) 혈당 측정

실험 기간에 따른 혈당의 변화를 측정된 결과 3주까지는 유의성이 없었으나 4주후부터 유의성이 나타나기 시작하여 6주에서는 B군, A군, C군 순으로 뚜렷한 차이를 나타내었다. 이는 GABA 함량이 증가할수록 혈당과 관계가 깊은 것을 알 수 있으며, 茅原紘(2002)이 혈당치 상승을 억제한다는 보고와 일치한 결과를 얻었다.

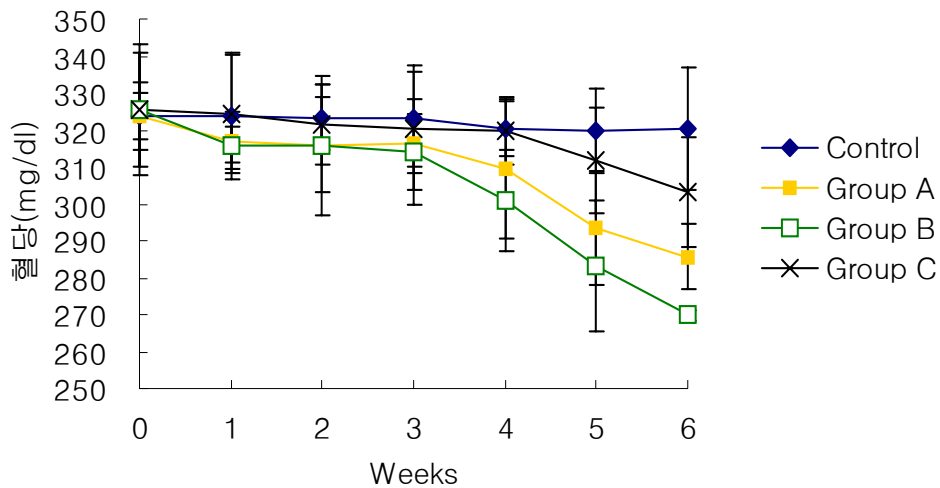


Figure 37. 당뇨를 유발시킨 랫트에게 6주간 GABA 발효유를 투여했을 때의 혈당 변화

나. 콜레스테롤 억제효과

1) 식이섭취량 및 체중변화

실험 기간에 따른 체중 변화를 보면 동일 기간 내에 실험군의 평균 체중은 처리군과 대조군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 *Lactobacillus crispatus* K567 젖산균 함유 발효유가 랫트의 체중 변화에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다.

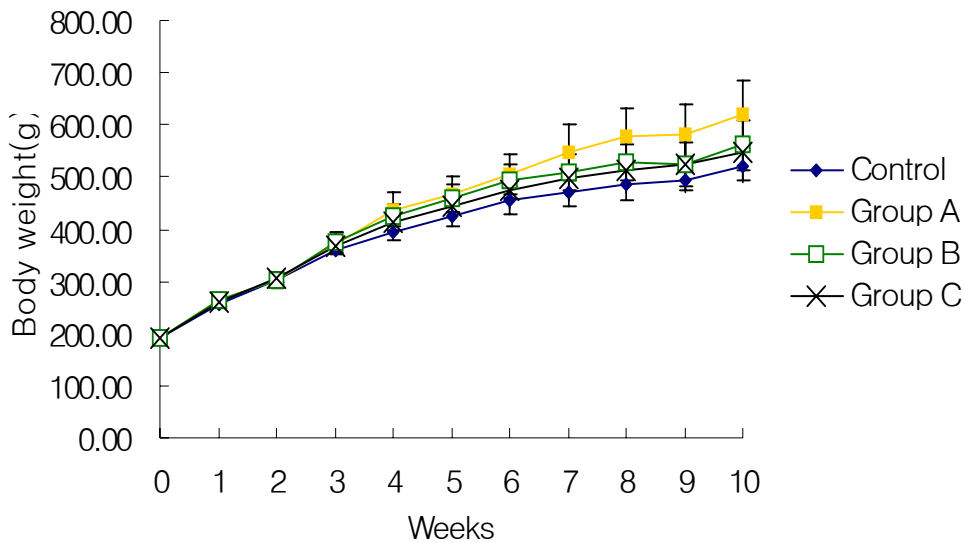


Figure 38. Body weight change of SD Rat fed experimental diets(g/mice)

처리군과 대조군 간의 식이 섭취량에서는 다소의 차이를 보였으나, 유의할 만한 변화가 나타나지 않아 *Lactobacillus crispatus* K567 젖산균 함유 발효유는 랫트의 증체와는 상관이 없는 것으로 나타났다. 그룹별로는 대조구가 가장 낮은 반면 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유와 *Enterococcus faecium* A275 균주이용 발효유(90°C,30min 열처리)를 7 : 3 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 A가 다른 그룹에 비해서 다소 증가한 것으로 나타났다.

2) 장기무게 측정

젖산균 투여 후 10주령에 안락사 시킨 SD rat의 각 장기의 무게에서도 간, 신장, 고환의 무게의 차이에서 유의성을 확인할 수 없었다. 다만, 비장의 무게는 *Lactobacillus crispatus* K567 균주 이용 발효유와 *Enterococcus faecium* A275 균주이용 발효유(90°C,30min 열처리)를 5 : 5 비율로 혼합한 발효유를 투입한 그룹 B가 가장 유의성 있는 변화를 보였다.

Table 44. Organ weight changes of SD rat fed experimental diets
(organ weight/100g)

	Liver	Spleen	Kidney	Testis
Control	20.94±2.62 ^a	0.79±0.11 ^b	3.36±0.25 ^a	3.60±0.28 ^a
A	24.22±3.99 ^a	0.87±0.14 ^b	3.59±0.39 ^a	3.31±0.48 ^a
B	23.48±5.12 ^a	1.03±0.21 ^{ab}	3.53±0.32 ^a	3.34±0.27 ^a
C	22.31±3.34 ^a	0.83±0.11 ^b	3.44±0.32 ^a	3.48±0.21 ^a

3) 지질농도 측정

흰쥐용 사료(commercial formulated feed)에 돼지기름(lard, 10%)과 콜레스테롤(Sigma Co., 시약급, 1%)을 각각 중량비(w/w)로 첨가한 식이(HFCD, high fat and cholesterol diet)를 기본 실험식으로 하고, 실험개시 후 5주 동안 모든 식이군에 HFCD를 급여하였으며, 각각 2주와 4주에 흰쥐의 안와정맥총(眼窩靜脈叢, orbital plexus)으로부터 혈액을 채취하여 콜레스테롤함량을 조사하였다. 실험개시 후 6주째부터 대조군을 제외한 실험군은 9주 까지 4주 동안 발효유 추출물을 매일 일정량 經口投與하면서 혈청 콜레스테롤함량에 미치는 영향을 검토한 결과 발효유 처리군 별 랫트의 지질농도에 미치는 영향은 Fig. 39~45와 같다.

가) 총콜레스테롤(Total Cholesterol)

콜레스테롤이란 몸에 있는 지질의 일종으로 지방산과 결합되어있는 에스터형 과 유리형의 두가지가 있는데 이들을 합한 것을 총콜레스테롤이라고 하는데, 정상적인 Rat의 총콜레스테롤 함량은 50~100mg/dl 이라고 보고되고 있다(이, 1994). 다음 Fig. 39는 처리군 별 고지방 사료를 급여한 Rat의 Total Cholesterol의 변화를 나타내었는데 B군만이 10주차에서 유의성이 있었다. 이는 茅原紘(2002)이 GABA가 혈액중의 콜레스테롤 증가를 억제한다는 보고와 일치한 결과를 얻었다.

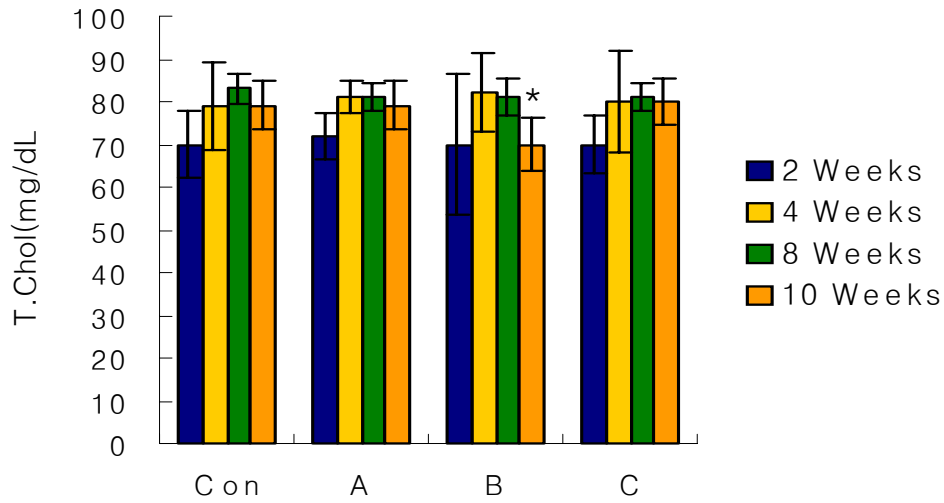


Figure 39. 처리군별 랫드의 Total Cholesterol의 변화

나) HDL(고밀도 지단백질)

간 및 소장에서 합성되어 혈액을 타고 온몸을 순환하며 세포내에 있는 여분의 콜레스테롤을 회수하여 간으로 이동시키는 역할을 한다. 다음 Fig. 40은 처리군

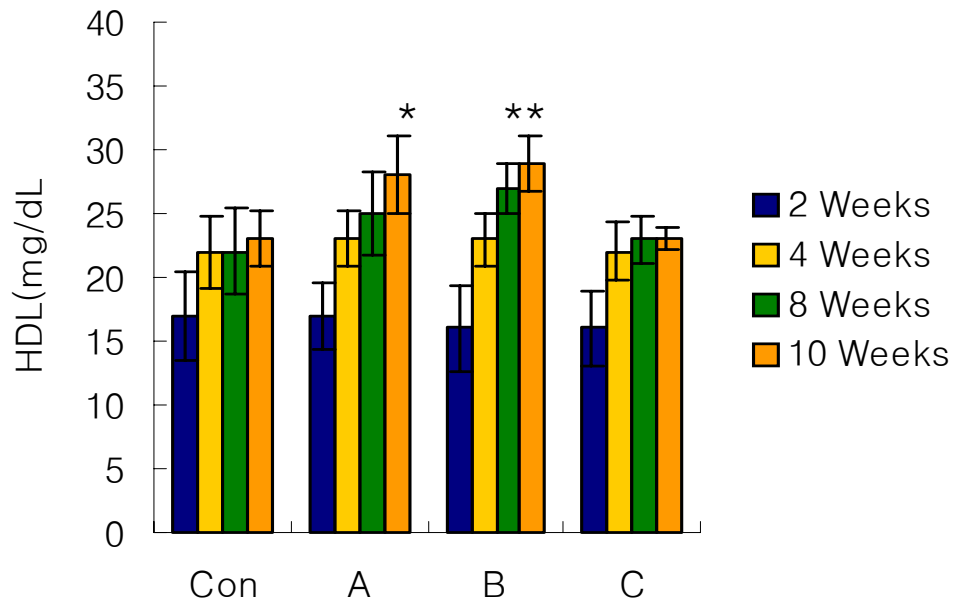


Figure 40. 처리군별 급여한 랫드의 HDL Cholesterol의 변화

별 고지방 사료를 급여한 랫드의 HDL Cholesterol의 변화를 나타낸 결과 8주령에서는 B군이, 10주령에서는 A 및 B군이 대조구에 비해 유의성이 있었다.

다) LDL(저밀도 지단백질)

LDL은 콜레스테롤의 가장 많은 양을 운반하며 말초 세포로 콜레스테롤을 공급하기도 하지만 관상동맥경화증을 일으키는 가장 위험한 지단백질이며, 비만자이다. 다음 Fig. 41은 처리군 별 고지방 사료를 급여한 랫드의 LDL Cholesterol의 변화를 나타낸 결과 8주령 및 10주령에서 A군과 B군이 유의성이 있었다.

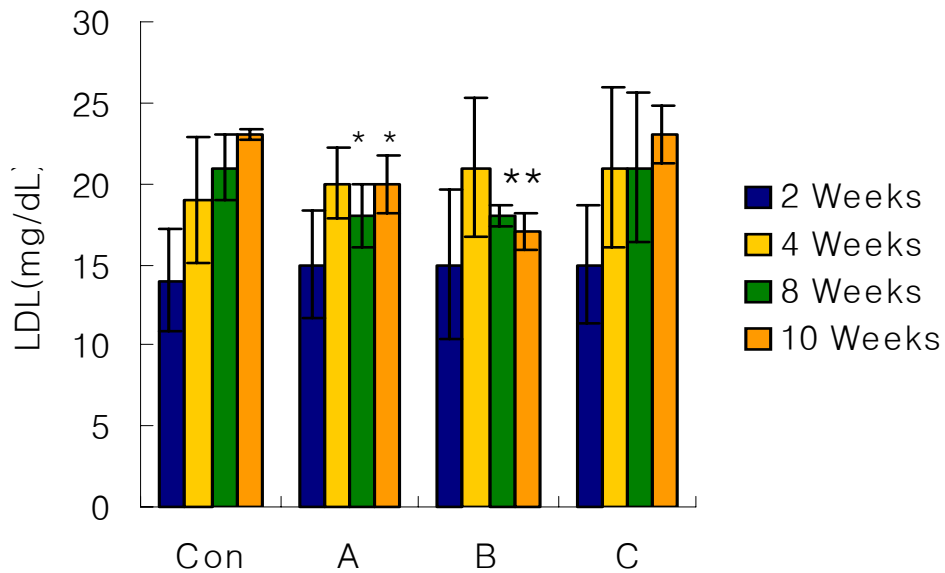


Figure 41. 처리군 별 급여한 랫드의 LDL Cholesterol의 변화

라) TG(중성지방)

체내에 있는 지방의 일종으로 체내의 에너지 중 사용되지 않는 것은 피하지방으로 축적되는데 그 대부분이 중성지방이다. 다음 Fig. 42는 처리군별 고지방 사료를 급여한 랫드의 Triglyceride의 변화를 나타낸 결과 B군이 8주령 및 10주령에서 유의성이 있었다. 이는 茅原紘(2002)이 GABA가 혈액중의 중성지방의 증가를 억제한다는 보고와 일치한 결과를 얻었다.

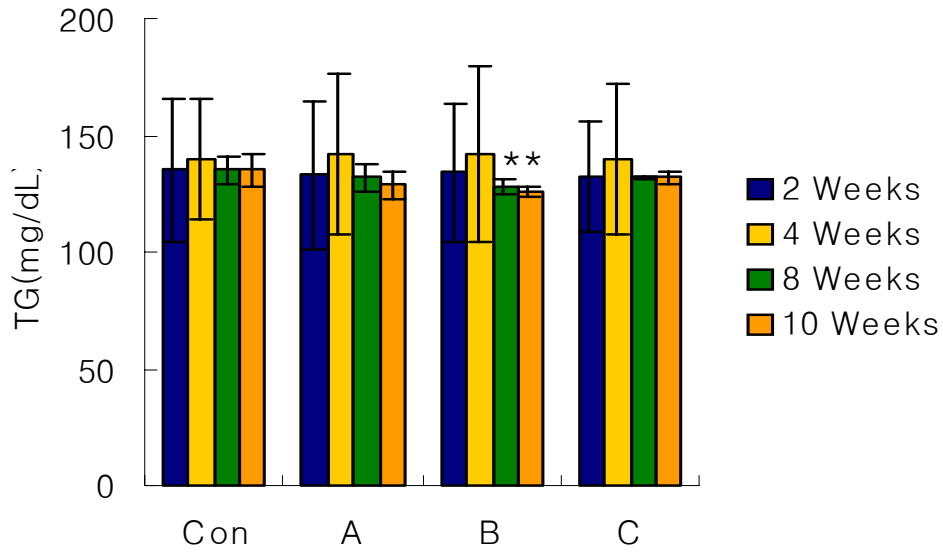


Figure 42. 처리군 별 급여한 랫드의 Triglyceride의 변화

마) GOT 및 GPT

간에서 만들어지는 대사에 필요한 정상 효소로 어떤 원인이든지 간이 손상 받으면 간세포가 깨지면서 이 효소가 혈액으로 유리되어 정상보다 많이 증가된다. 따라서 혈액의 GOT, GPT를 측정하면 간 손상이 있는 지를 간접적으로 알 수 있다. 다음 Fig. 43과 44는 처리군 별 고지방 사료를 급여한 랫드의 GOT 및 GPT의 변화를 나타낸 결과로서 GOT는 8주령에서는 대조군과의 유의성이 없었으나 10주령에서 B군이 유의성이 있었다. GPT는 8주령에서 대조군에 비해 A와 B군이 유의성이 있었고, 10주령 역시 비슷한 결과를 얻었으나 B군이 유의성을 있었다.

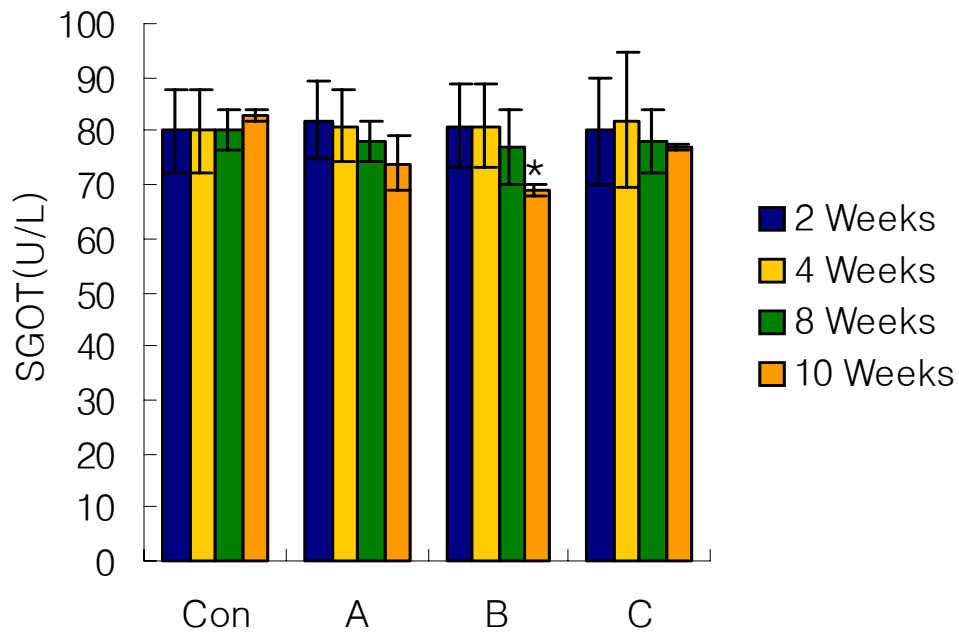


Figure 43. 처리군 별 급여한 랫드의 SGOT의 변화

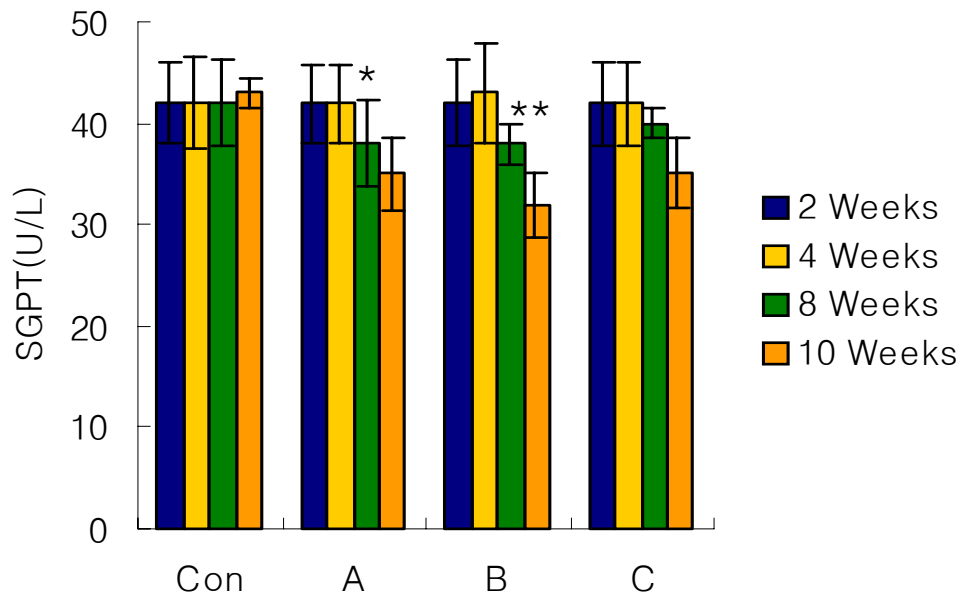


Figure 44. 처리군 별 급여한 랫드의 SGPT의 변화

바) LDH(Laetic dehydrogenase)

혈액에서 검사하는 효소로서, 심근경색증 외에도 용혈, 백혈병, 간질환, 신장질환, 폐색전증, 심근염, 근육질환, 속 등에서도 증가할 수 있는 것으로 알려지고 있다. 다음 Fig. 45는 처리군 별 고지방 사료를 급여한 랫드의 LDH의 변화를 나타낸 결과로서 8 및 10주령에서는 B군만이 유의성이 있었다.

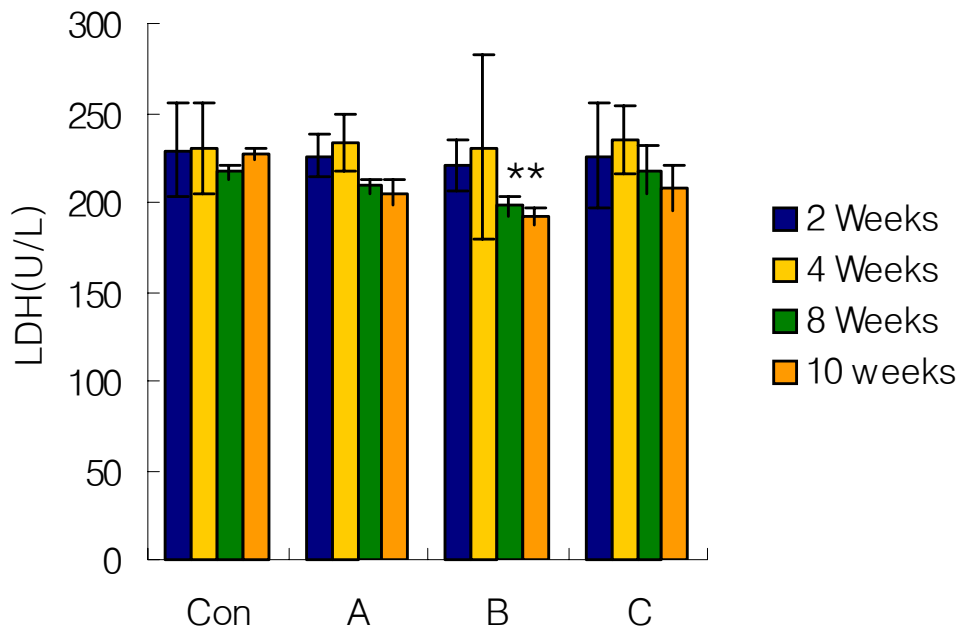


Figure 45. 처리군 별 급여한 랫드의 LDH의 변화

다. 학습능력 실험

1) 식이섭취량 및 체중변화

실험 기간에 따른 체중 변화를 보면 동일 기간 내에 실험군의 평균 체중은 처리군과 대조군에서 유의성 있는 차이를 보이지 않아 실험에 사용한 *Lactobacillus crispatus* K567 젖산균 함유 발효유가 마우스의 체중 변화에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 보여주었다.

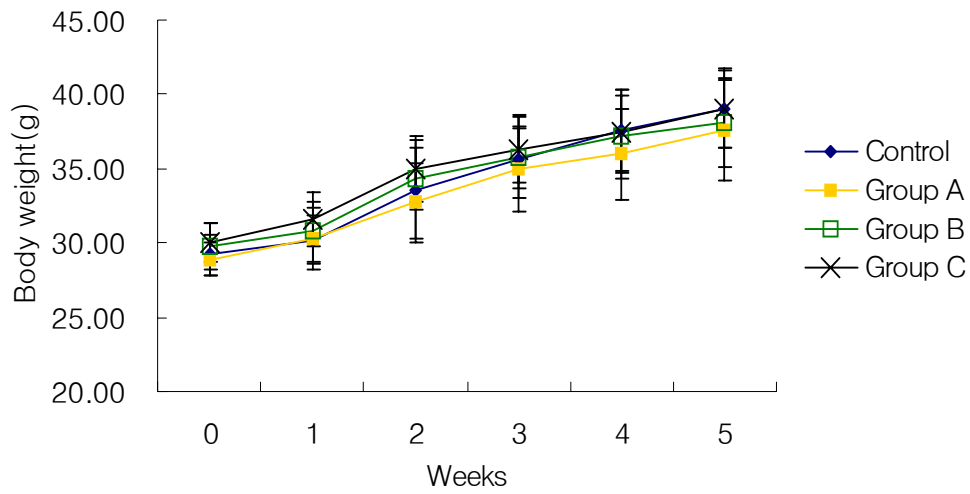


Figure 46. Body weight change of ICR mice fed experimental diets(g/mice)

처리군과 대조군 간의 식이 섭취량에서는 거의 차이가 없었으며, 유의할 만한 변화 나타나지 않아 *Lactobacillus crispatus* K567 젓산균 함유 발효유는 마우스의 증체와는 상관이 없는 것으로 나타났다.

2) 학습능력

Fig. 47은 5주 동안 발효유를 포함한 실험식이를 급여하여 수미로 찾기에 소요되는 시간을 나타낸 결과로서 급여 1주차 이후 대조군에 비해 유의성이 있었고,

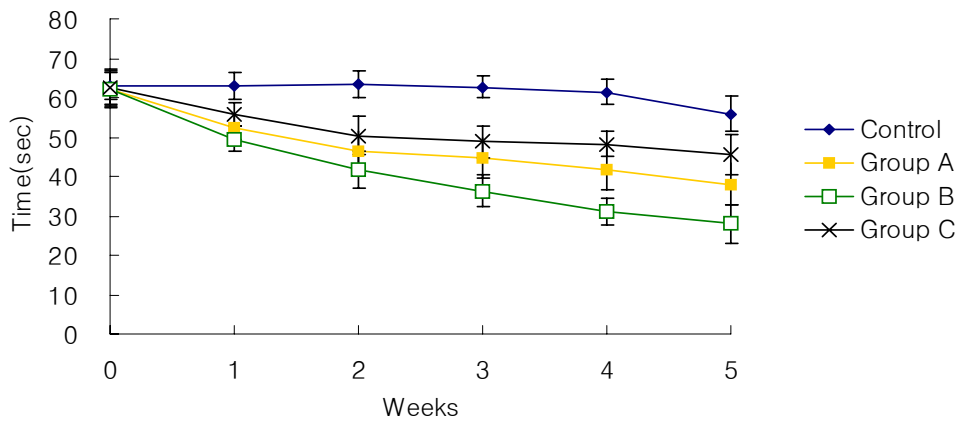


Figure 47. 5주 동안 GABA 발효유를 경구투여 한 랫드의 수미로찾기 소요시간

특히 2주차에서 5주차까지 대조군에 비해 B군>A군>C군 순으로 유의성이 뚜렷하였다. 이와 같은 결과는 GABA가 뇌의 혈류를 좋게 하여 뇌 세포의 대사를 활발하게 한다는 보고(茅原紘, 2002)와 관련이 있는 것으로 사료된다.

Fig. 48은 5주 동안 발효유를 포함한 실험식이를 급여하여 수미로 찾기에 소요되는 시행오차를 나타낸 결과로서 급여 1주차 이후 대조군에 비해 유의성이 있었고, 특히 2주차에서 5주차까지 대조군에 비해 B군>A군>C군 순으로 유의성이 뚜렷하였다.

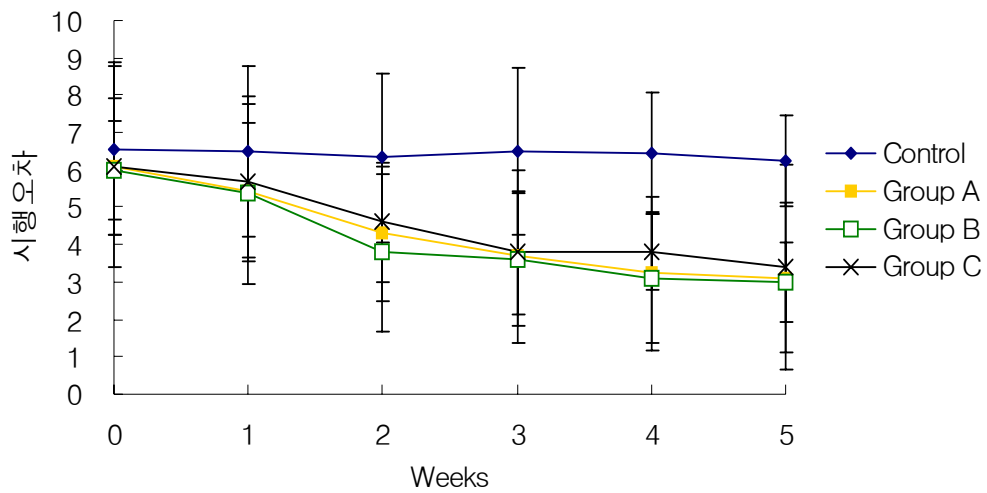


Fig 48. 5주 동안 GABA 발효유를 경구투여 한 랫드의 수미로찾기 시행오차

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

GABA를 생성하는 젖산균을 분리하고, 이를 이용하여 발효유를 개발하기 위하여 가급적 환경이 다른 여러 지역에서 많은 원유를 대상으로 다양한 젖산균의 분리가 필요됨에 따라 경기도, 경상도, 전라도, 제주도 등 전국 지역에서 목장 원유를 채취하였고, 발효유를 생산하기 위하여 젖산균이 우유를 응고시키고, 산 생성이 우수하여야 할 요건이 필수적임에 따라 젖산균 분리를 위해 MRS배지의 구성성분인 glucose 대신 lactose로 대체하였고, 젖산생성 유무를 확인하기 위하여 Bromcresol purple를, Gram 양성균 만을 선별하기 위하여 sodium azide를 추가로 첨가하여 Modified된 MRS배지를 제조하여 2082개의 젖산균을 분리하였다.

또한 발효유에 적합하기 위해서는 skim milk를 응고시킬 수 있는 산생성 능력이 있어야 하므로 10% 환원탈지분유에 분리균주를 접종한 후 37℃에서 24시간과 48시간 배양하여 응고된 균주가 각각 861개 균주와 1,619개 균주이었다.

GABA 생성 균주를 선별하기 위하여 monosodium glutamate 1%가 첨가된 10% 환원탈지분유에 24시간 내에 응고시킨 분리균주를 접종한 후 37℃에서 18시간 배양한 다음 GABA양을 측정하였고, 여기서 GABA양이 높은 젖산균을 대상으로 monosodium glutamate 1%, 3%, 5%가 각각 첨가된 10% 환원탈지분유에서 GABA 양을 측정한 다음 GABA 생산 균주 선별하였다. 선별된 젖산균을 현미경 관찰, Gram stain, 당 발효실험 등의 일련의 생화학적실험을 통하여 균을 동정하였다. GABA 생산량이 높은 젖산균 중 7종을 선별하여, 발효유의 종균으로서 적합한지의 여부를 검증하기 위하여 젖산균의 성장, 젖산균의 단백질분해, 항생제 15종에 대한 내성시험, API ZYM kit를 이용한 효소활성 시험, 0.3% oxgall 첨가 배지에서의 담즙내성 시험, pH 내성 시험, 식중독균에 대한 항균력 시험을 실시하였다. 한편, GABA 생산 최적배양조건을 설정하기 위하여 특성조사에서 선별된 균주를 이용하여 환원탈지유(8%, 10%, 12%) 및 Monosodium glutamate 함량(0.1%, 0.5%, 1%)별로 첨가된 환원탈지유에 *Enterococcus faecium* A56, *Enterococcus faecium* A275 및 *Lactobacillus crispatus* K567 젖산균을 1% 접종하고 37℃에서 18시간 배양한 후 GABA 함량을 측정하여 환원탈지유 농도 및 monosodium glutamate 농도를 선정하였고, 선정된 환원 탈지유 농도 12%에 MSG를 첨가하고, 젖산균 첨가량(0.1%, 0.5%, 1%) 및 배양온도(34℃, 37℃, 40℃)별로 18시간 배양했을 때의 GABA 함량을 측정하여 젖산균 첨가량 및 배양온도를 선정하였다. 또한, 앞의 결과에서 선정된 환원 탈지유 농도 12%에 MSG (*Enterococcus faecium*

A56의 경우 1.0%, *Enterococcus faecium* A275의 경우 0.5%, *Lactobacillus crispatus* K567의 경우 0.1%)를 첨가하고, 젖산균 첨가량 1.0% 및 배양온도 40℃로 했을 때 배양시간에 따른 pH와 GABA 함량을 측정하였다.

한편, 배합비 설정시 국산 원유의 함량을 높여서 실시하였는데, 원유 96.15%와 탈지분유 3.85%를 첨가하고 65℃에서 배합하여 완전히 녹인 후 90℃에서 30분간 살균하였으며, 40℃로 냉각시킨 다음 선택균주를 1%(v/v)로 접종하고, 최종 pH 4.4으로 감소할 때까지 배양하였다. 발효가 완료된 후 다양한 소재를 첨가하여 호상 발효유를 제조한 다음 관능검사를 실시하여 최적 배합조성물을 완성하였다. 또한 개발제품이 시중제품과 비교했을 때 GABA 함량과 이화학적 특성조사를 실시하였다. 이와 같은 결과를 근거로 하여 동물에서의 혈당억제 및 콜레스테롤 억제효과 및 학습능력 실험을 실시한 바 목표를 100% 달성하였다.

따라서 본 연구결과를 통해 관련분야에의 기여도를 보면

가. 기술적 측면

- GABA 생산 젖산균주 개발은 유제품 뿐만 아니라 식품전반에 이용 가능함으로 제품의 다양화를 유도하여 신기술 개발에 이용할 수 있음
- 외국에 비해 우유의 기능성 물질에 대한 연구가 미약함에 따라 이를 계기로 보다 활발한 연구 촉진
- GABA 생산 젖산균주를 이용한 발효유제품은 동물실험을 통한 입증기술은 국내외적으로 없음으로 대외 기술적 우위 확보

나. 경제 · 산업적 측면

- GABA 생산 발효유를 개발함으로써 소비기반 및 경쟁력 확보
원유생산에 비해 소비가 저하되어 분유재고가 2006년 5월말 현재 11,111톤으로 증가됨으로써 GABA가 함유된 발효유를 개발하여 분유 재고를 감소케 함으로써 낙농가 소득증대 및 유가공업체의 경쟁력 향상에 기여할 것으로 보임
- 본 제품 개발로 발효유 시장 확대
2005년말 현재 1.2조억원의 발효유 시장 중 예상시장을 10%로 예측할 때 1,200억원으로 예상됨
- 본 제품 개발로 유제품의 수입대체 효과

유제품의 예상 잠식율이 분유 20%, 치즈 70%, 버터 및 연유 20%로 예측되며, 이를 금액으로 환산하면, 101,110백만원의 피해가 예상됨에 따라 본 기술개발로 유제품의 예상 잠식율을 10%로 낮추더라도 100억원의 수입대체 효과가 있을 것으로 예상된다.

- 연간 100억원 규모의 젓산균 스타터 수입대체효과
- 질병 예방에 의한 의료비 부담 연간 100억원 절감 효과

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 분리된 GABA 생산 젖산균은 그동안 기능성 있는 외국의 수입종균에 의해 생산되는 발효유를 국내에서 생산함으로써 국제 경쟁력 향상과 동시에 수입대체효과가 있을 것으로 예상된다. 또한 본 연구결과는 참여업체에서 기술이전을 통하여 실용화할 것으로 예상되며, *Lactobacillus crispatus* K567 균주는 특허출원을 통하여 산업재산권을 확보하였으며, 추후 전문학술지에 발표 및 논문 게재를 실시할 계획으로 있다.

앞으로 참여업체에서 선발된 젖산균을 상업화하기 위해 동결조건된 분말로 제조하여야 하며, 또한 동결건조 후에도 활력이 유지되어야 실제로 활용할 것으로 보인다. 따라서 일련의 단계를 거쳐 만족스런 결과가 나올 경우 업체에서 바로 생산에 돌입할 것으로 예측되므로, 계속적으로 업체와 유기적인 협조하에 제품생산이 될 수 있도록 협조를 할 계획으로 있다.

현재의 유가공 및 낙농산업은 가격경쟁력이 외국에 비해 떨어지기 때문에 국내에서 생산되는 원유는 대부분이 시유, 가공유 및 발효유 등 액상유제품에 사용되고 유제품은 수입유제품으로 대체되는 현 상황에서 원유 소비를 확대시킬 수 있는 제품개발이 지속되어 가격보다는 품질 또는 기능성 제품으로 경쟁력을 키워나 가야 할 것으로 보인다.

제 6 장 참고문헌

1. Bernard, C., Cossart, R., Hirsch, J. C., Esclapes, M., and Ben-Ari, Y. 2000. What is GABAergic inhibition? How is it modified in epilepsy?. *Epilepsia*. 41(6) : S90~S95.
2. Blindermann, J. M., Maitre, M., Ossola, L., and Mandel, P. 1978. Purification and some properties of L-glutamate decarboxylase from human brain. *Eur. J. Biochem.* 86 : 143~ 152.
3. Clark, P. A., Cotton, L. N., and Martin, J. H. 1993. Selection of bifidobacteria for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods:II-Tolerance to simulated pH of Human Stomachs. *Cultured Dairy Products J.* 28(4) : 11~ 14.
4. Conway, P. L., Gorbach, S. L., and Goldin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* 70 : 1~12.
5. Crittenden, D., Jordan, M. J. T., and Collins, M. 2001. An ab initio theoretical investigation of solvent stabilizing effects on γ -amino butyric acid(GABA) and analogues, 9th Asian Chemical Congress in Australia.
6. Fibiger, H. C., and Lloyd, K. G. 1984. Neurobiological substances of tardive dyskinesia, the GABA hypothesis. *Trends Neurosci.* 7 : 462~464.
7. Fonda, M. L. 1985. L-Glutamate decarboxylase from bacteria. Pages 11~16 in *Methods in Enzymology*. Vol. 113. A. Meister, ed. Acad. Press, New York, NY.
8. Gale, E. F. 1946. The bacterial amino acid decarboxylase. *Adv. Enzymol.* 6 : 1~32.
9. Gilliland, S. E., and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative cultures. *J. Food Prot.* 40(12) : 820~823.
10. Gilliland, S. E., and Walker, D. K. 1990. Factors to consider when selecting

- a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. J. Dairy Sci. 73 : 905~911.
11. Hammes, W. P., Weiss, N., and Holzapfel, W. 1992. The Genera *Lactobacilli* and *Carnobacterium*. pp. 1563-1578. In *The prokaryotes*. 2nd Edition. Springer-Verlag. New York.
 12. Hanaoka, Y. 1967. Studies on preservation of soy sauce. (VI) Enzymatic decomposition of L-aspartic acid in soy sauce by *Lactobacilli*. *Hakkokogaku*. 45 : 312~319.
 13. Hayakawa, K., Ueno, Y., Kawamura, S., Taniguchi, R., and Oda, K. 1997. Production of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria. *Sebutsu Kogaku*. 75 : 239~244.
 14. Higuchi, T., Harashi, H., and Abe, K. 1997. Exchange of Glutamate and γ Aminobutyrate in a *Lactobacillus* Strain. *J. of Bacteriology*. 179(10): 3362~3364.
 15. Hull, M. E. 1947. Studies on milk proteins. II. Colorimetric determination of the partial hydrolysis of the proteins in milk. *J. Dairy Sci.* 30 : 881~884.
 16. Ishikawa, K. and Saito, S. 1978. *Psychopharmacology*. 56 : 127.
 17. Kent, L. E., and Leslie, A. S. 1989. Lack of an influence of dietary fat on murine natural killer cell activity. *J. Nutr.* 119 : 1311~1317.
 18. Kim, W. K., and Kim, S. H. 1989. The Effect of Sesame Oil , Perilla Oil and Beef Tallow on Body Lipid Metabolism and Immune Response. *Korean J Nutri.* 22 : 42~53.
 19. Kono, I., and Himeno, K. 2000. Change in γ -aminobutyric acid content during beni-koji making. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64 : 617~619.
 20. Law, B. A., and Wigmore, A. 1982. Accelerated cheese ripening with food grade proteinases and intracellular enzymes from starter *streptococci*. *J. Dairy Res.* 50 : 519~525.
 21. Manyam, B., Katz, L., Hara, T. A., Gerber, J. C., and Grossman, M. H. 1980. *Arch. Neurol.* 37 : 352.
 22. Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., Furukawa, S., and Suzuki, I. 1998.

- Production of γ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening. J. Dairy Sci. 81 : 1486~1491.
23. Nomura, M., Kimoto, H., Someya, Y., and Suzuki, I. 1999. Novel characteristic for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris*. International Journal of Systematic Bacteriology. 49 : 163~166.
 24. Okada, T., Sugishita, T., Murakami, T., Murai, H., Murai, H., Saikusa, T., Horino, T., Onoda, A., Kajimoto, O., Takahashi, R., and Takahashi, T. 2000. Effect of the Defatted Rice Germ Enriched with GABA for Sleeplessness, Depression, Autonomic Disorder by Oral Administration. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 47(8) : 596~603.
 25. Okunuki, K. 1937. Uber ein neues enzym glutaminocarboxylase. Bot. Mag. Tokyo. 51 : 270~278 .
 26. Omori, M., Yano, T., Okamoto, J., Tsushida, T., Murai, T., and Higuchi, M. 1987. Effect of anaerobically treated tea(gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats. Nippon Nogeikagaku Kaishi. 61 : 1449~1451.
 27. Onoda, A., Saikusa, T., Horino, T., Kajimoto, O., Miyamoto, A., Tanaka, Y., Murakami, T., Okada, T., and Murai, H. 1998. The first International Symposium on Disease Prevention by IP₆ & Other Rice Component. 97.
 28. Petty, F., Kramer, G. L., and Dunman, D. 1990. Psychopharmacol Bull. 26 : 157.
 29. Robert, E., and Frankel, S. 1951. Glutamic acid decarboxylase in brain. J. Bio. Chem. 188 : 789~795.
 30. Roy, A., Dejong, J., and Lampaiski, D. 1991. Arch Gen. Psychiatry. 48 : 428.
 31. Saikusa, T., Horino, T., and Mori, Y. 1994. J. Agric. Food Chem. 42 : 1122.
 32. Saikusa, T., Okada, T., Murai, H., Ohmori, M., Mori, Y., Horio, T., Ito, M., and Onoda, A. 2001. The effect of defatting with organic solvent on accumulation of 4-aminobutyric acid(GABA) in the rice germ. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi. 48 : 196~201.

33. Schales, O., Mims, V., and Schales, S. S. 1946. Glutamic acid decarboxylase of higher plants. Arch. Biochem. 10 : 455~465.
34. Stanton, H. C. 1963. Mode of action of gamma aminobutyric acid on the cardiovascular system. Arch. Int. Pharmacodyn. 143 : 195~200.
35. Tinuper, P., Montagna, P., Cortelli, P., Avoni, P., Lugaresi, A., Schoch, P., Bonetti, E.P., Gallassi, R., Sforza, E., and Lugaresi, E. 1992. A case with possible involvement of the gamma-aminobutyric acid(GABA) ergic system. Ann. Neurol. 31 : 503~506.
36. Tsushida, T., Murai, T., Omori, M., and Okamoto, J. 1987. Production of a new type of high level of γ -aminobutyric acid. Nippon Nogeikagaku kaishi. 61 : 817~822.
37. Urena-Guerrero, M. E., Lopez-Perez, S. J., and Beas-Zarate, C. 2003. Neonatal monosodium glutamate treatment modifies glutamic acid decarboxylase activity during rat brain postnatal development. Neurochemistry international. 42(4) : 269~276.
38. Xu Jianjun, Jiang Bo, and Xu Shiying. 2004. Purification and partial characterization of glutamate decarboxylase from *Lactococcus lactis*. Journal of Wuxi University of Light Industry. 23(3) : 79~84.
39. Yokoyama, S., Hiramatsu, J. I., and Hayakawa, K. 2002. Production of γ -Aminobutyric Acid from Alcohol Distillery Lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. J. of Bioscience and Bioengineering. 93(1) : 95~97.
40. Zhang, G., and Bown, A. W. 1997. The rapid determination of γ -aminobutyric acid. Phytochemistry. 44(6) : 1007~1009.
41. 農水省・畜産試験場. 日本化学工業日報. 1997. 6. 19日号.
42. 大森正司・矢野とし子・岡本順子・津志田藤二郎・村井敏信・樋口 満. 1987. 日本農藝化学會誌. 61: 1449.
43. 大態誠太郎・桂 昌司・廣内雅明. 1997. 神経精神薬理別冊「ニューロトランスミッター」19 : 167.
44. 茅原 紘. 2002. GABAの機能解明と新素材開発の可能性. Japan Food Science. 41(1) : 39~43.

45. 西川 徹. 1996. Clinical Neuroscience. 14 : 404.
46. 西村 健. 1988. 日本醫師會雜誌. 100 : 13.
47. 平野 誠. 1992. 臨床精神醫學. 21: 574.
48. 김남철. 1999. 한국낙농산업의 생존전략과 전망 : '99 낙농발전 대책. 한국낙농학회. p. 9~22.
49. 농림부. 2006. 한국유가공협회
50. 이영순. 1994. 실험동물의학. 서울대학교출판부. p268.
51. 임상동, 김희수, 김기성, 최인욱, 진여상, 김현욱. 1996. 김치에서 분리한 *Lactobacillus pentosus* LSDM의 생화학적 및 생리적 특성에 관한 연구. 한국낙농학회지. 18(1) : 41~52.
52. 차성관, 김왕준. 1994. 유용 젖산균의 산업적 생산 및 활용 기술 개발 연구(2차년도) 한국식품개발연구원 보고서
53. 축산물의 가공기준 및 성분규격. 2005. 국립수의과학검역원.