



# Increased production of GABA in non-alcoholic *Makgeolli* by optimization of lactic acid fermentation using *Lactobacillus plantarum*

Ji-Yeon Choe<sup>1</sup>, Jong-Soon Lim<sup>2</sup>, Sam-Pin Lee<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea  
<sup>2</sup>The Center for Traditional Microorganism Resource, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

## 비알콜 쌀막걸리의 젖산 발효 최적화를 통한 고농도 GABA 생산

최지연<sup>1</sup> · 임종순<sup>2</sup> · 이삼빈<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>계명대학교 식품가공학과, <sup>2</sup>계명대학교 TMR센터

### Abstract

Lactic acid fermentation of non-alcoholic *Makgeolli* a traditional Korean rice wine was optimized for increased production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA). The *Makgeolli* was concentrated by vacuum evaporation at 85°C for 30 min to yield non-alcoholic *Makgeolli* and sterilize the indigenous microorganisms. As a result, yeast and lactic acid bacteria were not observed in the non-alcoholic *Makgeolli*. The non-alcoholic *Makgeolli* had an unpleasant odor in the absence of glucose in lactic acid fermentation. Therefore, the non-alcoholic *Makgeolli* was mixed with 3% mono sodium-L-glutamate (MSG) and 1% glucose followed by fermentation with *Lactobacillus plantarum* EJ2014 at 30°C for 7 days in stationary culture. During this period, the pH increased from 5.1 to 5.5 and acidity decreased from 0.41% to 0.2%. The viable cell count increased to  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL by the end of the 7 day period. The production was determined using TLC; results showed that Most of the MSG was bio-converted on within 5 days. of lactic acid fermentation. HPLC analysis confirmed GABA production 1.59%. In conclusion, non-alcoholic *Makgeolli* with 1% glucose and 3% MSG could produce functional rice ingredients including GABA and probiotics as well as wholesome rice products through lactic acid fermentation.

Key words : *Lactobacillus plantarum*, lactic acid fermentation, *Makgolli*, GABA

### 서 론

막걸리 또는 탁주는 찹쌀, 멥쌀, 밀 및 국을 주원료로 혼합한 후 병행 복발효하여 만든 대표적인 전통주이다. 전통 누룩을 이용한 전통 막걸리는 고유한 품질특성을 가지고 있으며, 곰팡이 배양물을 효소원으로 사용하는 코지를 이용하여 제조한 막걸리와 맛과 품질관리에서 차이가 있다. 막걸리는 다른 알코올성 음료들과는 달리 효모와 젖산균 등의 probiotic과 유기산이 함유되어 있을 뿐만 아니라 단백질과 당, 식이섬유, 비타민을 비롯하여 다양한 영양성분과 발효에 의한 대사산물을 함유하고 있다(1).

고령화시대에 건강장수에 대한 관심이 높아지고 국내외적으로 우리나라 전통 발효식품에 대한 관심이 증대됨에 따라 막걸리에 관한 다양한 연구가 진행되어왔다. 막걸리는 혈전 용해 활성과 타이로시네이즈 저해 활성, 혈압 강하 효과와 혈당 저하 효과(2,3), 항비만, 항염증, 항암 효과(4,5) 등이 있다고 보고되었다. 최근 막걸리에서 항암 작용이 있는 farnesol성분이 발견되었고(6), 피부 재생과 미백, 피로회복, 콜레스테롤 저하 효과 등에 관한 연구(7)가 보고되었다.

건강 바이오소재의 개발을 위한 방법으로 천연물에 발효 기술을 적용하는 시도가 증가하고 있으며, 발효 미생물은 원료에 작용하여 풍미와 기능성을 향상시키고, 동시에 저장성을 높이는 역할을 한다(8). 특히 젖산균 *Lactobacillus* spp.는 대표적인 probiotic으로서 당질을 이용하여 그 대사

\*Corresponding author. E-mail : spllee@kmu.ac.kr  
 Phone : 82-53-580-5554, Fax: 82-53-580-6447  
 Received 20 November 2018; Revised 31 December 2018;  
 Accepted 10 January 2019.  
 Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

산물로 유기산 등을 생성하고, 정장 작용 및 면역 증진 효과가 있다고 밝혀지면서 건강 기능성 소재로서 관심이 높아지고 있다(9).

상업적으로 생산되는 막걸리는 쌀 코지에서 배양된 곰팡이 유래 효소작용 및 효모의 대사산물을 함유하고 있어서 유용 미생물의 배양을 위해 필요한 탄소원을 비롯하여 다양한 영양성분 등이 다량 함유된 것으로 보고되었다(10). 코지를 이용하여 제조된 막걸리는 젖산균이 미미하게 존재하며, probiotic을 포함한 기능성 성분의 강화를 통해 막걸리의 영양적 및 기능성을 부여하는 것이 필요하다. 또한 1인당 쌀 소비량이 지속적으로 감소하고 있는 가운데 쌀을 이용한 기능성 강화소재의 개발은 쌀 소비 촉진과 동시에 고부가가치 발효소재를 개발하는 의미가 있다.

*Lactobacillus plantarum* 균주가 생성하는  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)는 고등동물의 뇌나 척수 등의 중추 신경계에 존재하는 흥분 억제성 신경 전달 물질로, 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종이다(11,12). GABA는 뇌의 혈류를 활발하게 하고 뇌세포의 대사기능을 촉진시키는 기능이 있으며, 혈압강하 효과, 이노 효과, 진정 효과, 암세포 억제 효과, 정신 분열증을 비롯한 신경질환과 우울증 및 자율 신경 장애에 효과가 있는 등의 생리 기능이 있다(13,14). 천연물 중에서는 주로 발아 현미, 빵잎, 녹차 등에 자연적으로 약간 함유되어 있다(15). 발효를 통해 GABA의 함량을 높이는 방법으로 양송이에서 분리된 젖산균을 이용하여 MSG 존재 하에서 GABA의 함량을 높이는 방법(16), 카카오 추출물에 dextrose를 첨가한 후 젖산 발효 하여 GABA를 생산하는 방법(15), 차잎에 혐기적 배양과 호기적 배양을 번갈아 처리하여 GABA 함량을 높이는 방법(17) 등이 보고되었다. 최근 다양한 생리 활성 기능을 갖는 GABA의 생산을 높이기 위해서 유용 발효 미생물의 활용한 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 특히 젖산균을 이용한 GABA 생산의 최적화를 통해서 기능성을 강화시킨 기능성 소재를 개발하려는 연구가 진행되고 있다.

본 연구에서는 쌀 소비 촉진 및 쌀의 부가가치를 높이는 방안으로 쌀 막걸리 제품을 이용하여 기능성을 강화시키고자 하였으며, 이를 위해 알코올이 제거된 쌀 막걸리 발효물의 젖산균 발효 최적화를 통해서 기능성 물질 GABA와 probiotic이 강화된 기능성 쌀 발효물을 생산하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구의 원료로는 대구 탁주(Daegu, Korea)의 생막걸리를 구입하여 85°C에서 진공 농축하여 사용하였다. 젖산 발효 시 영양 성분으로 사용된 포도당은 삼양식품(Seongnam, Korea)에서 구입하였고,  $\gamma$ -aminobutyric acid

(GABA) 생성을 위한 전구물질로 사용된 monosodium L-glutamate(MSG)는 CJ 제일제당(Incheon, Korea)의 제품을 사용하였다. MRS broth는 Difco™ Lactobacilli MRS(Becton Dickson and Company, Sparks, MD, USA)사의 제품을 사용하였다.

### 균주 및 스타터 배양액 제조

*Lactobacillus plantarum* EJ2014는 미강(Uljin, Korea)으로부터 분리한 균주를 한국미생물보존센터에 기탁(KCCM 11545P)한 후 분양받아 사용하였다. *L. plantarum* EJ2014를 MRS agar plate에서 계대배양한 후 121°C에서 15분간 살균한 MRS broth에 순수 배양된 *L. plantarum* EJ2014 한 백금을 접종하고 30°C에서 24시간 동안 정치 배양하여 starter로 사용하였다(18).

### 비알코올 막걸리의 젖산 발효물 제조

젖산균의 생육을 저해하는 효모의 활성을 낮추고, 알코올을 제거하기 위하여 쌀 막걸리를 85°C에서 30분간 진공 농축하고, 실험의 일관성을 위해서 증발된 막걸리의 양만큼 멸균수를 첨가하여 비알코올 막걸리(non-alcohol *Makgeolli*, NAM)를 제조하였다. 비알코올 막걸리는 멸균수와 MSG, 포도당 0.5%를 혼합하여 총 부피를 100 mL로 맞추어 250 mL 삼각 플라스크에 채웠다. GABA 생산의 기질인 MSG와 탄소원으로 포도당은 첨가 농도를 달리하여 발효 최적화를 수행하였다. *L. plantarum* EJ2014 배양액을 1% 수준으로 접종한 후 항온배양기에서 30°C에서 7일간 정치 배양하였다.

### 고형분 함량 분석

막걸리의 고형분 함량은 상압 가열 건조법(19)을 이용하여 수분 함량을 5회 반복 측정한 후 그 평균값을 100에서 제외한 값으로 산출하였다. 수분 함량은 시료 3 mL을 항량된 칭량 접시에 담은 후 105°C 건조기(HB-502n, Hanbaek Scientific Co., Bucheon, Korea)에서 건조하여 항량된 무게를 측정하였다.

### pH 및 적정 산도 측정

생막걸리 및 비알코올 막걸리 젖산 발효물의 pH는 시료 1 mL에 증류수 9 mL을 가하여 희석한 후 pH meter (SevenEasy, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Switzerland)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도 pH 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 소비량을 lactic acid 함량(% (v/v))으로 환산하여 산출하였다(20).

### 생균수 측정

생균수는 10배 희석법을 이용하여 비알코올 막걸리 젖산 발효물 100  $\mu$ L에 멸균수 900  $\mu$ L을 첨가해서 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>배

로 희석한 것을 MRS agar plate에 20  $\mu$ L 도말하였다. 그 후 30°C 항온배양기에서 24시간 배양한 다음 측정하여 colony forming unit(CFU)/mL로 나타내었다.

#### 환원당 함량 측정

환원당의 함량은 dinitrosalicylic acid(DNS)법(21)을 통해 분석하였다. 일정한 농도로 희석한 시료 1 mL에 DNS시약 3 mL를 가하여 끓는 물에서 5분간 반응시키고 40분 동안 방냉한 후 UV spectrophotometer(Ultrospec<sup>®</sup>2100 pro, Amersham Biosciences, Waltham, MA, USA)를 이용하여 550 nm에서 측정하였다. 표준시료로는 glucose(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다

#### TLC를 이용한 GABA 및 glutamic acid 정성 분석

MSG 분해 정도와 GABA 생성능 비교를 위한 standard로는 glutamic acid와 GABA를 Sigma-Aldrich에서 구입하여 0.5% 농도로 사용하였다. TLC 전개는 사각 chamber (30×25×10 cm<sup>3</sup>)에서 수행하고, silica gel TLC plate는 10×20 cm의 크기로 잘라서 사용하였다. 전개용매는 n-butyl alcohol:acetic acid glacial:distilled water를 각각 3:1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 실온에서 4시간 이상 포화시켰다. 각 sample은 TLC plate의 끝에서 15 mm되는 위치에 2  $\mu$ L를 점적, sample 간격은 10 mm를 유지하였다. 점적 후 TLC plate의 sample을 건조 시키고, 전개가 끝난 TLC plate는 실온에서 건조시켰다. 건조 된 TLC plate에 발색시약 0.2% ninhydrin을 뿌리고, 90°C dry oven에서 5-10분 동안 발색 시킨 후 각각의 spot을 확인하였다.

#### HPLC를 이용한 GABA 정량분석

GABA 전환율을 확인하기 위한 유리 아미노산 함량 측정 은 건조시킨 시료를 phenylisothiocyanate(PITC)용액 20  $\mu$  L(MeOH:H<sub>2</sub>O:TEA:PITC=7:1:1:1)를 유도체화 시킨 뒤 상온에서 30분간 반응 시켰다. 시료를 완전히 건조시킨 후 200  $\mu$ L의 A solvent로 녹이고 원심분리한 후 상등액을 0.45  $\mu$ m syringe filter로 여과하고 C<sub>18</sub> 컬럼(Nova-Pak, 4  $\mu$ m, 3.9×300 mm)이 장착된 HPLC(Agilent 1260, Waters)로 분석하였다. 분석 용매 A(140 mM NaHAc, 0.15% TEA, 0.03% EDTA, 6% CH<sub>3</sub>CN), 용매 B(60% CH<sub>3</sub>CN, 0.015% EDTA)를 농도구배(A 100%, A 0%, 23 min) 조건에서 1.0 mL/min 속도로 흘리면서 245 nm에서 detector(HP 1100 series)로 측정하였다.

#### 총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 AOAC법(22)에 의하여 측정하였다. 원심 분리하여 상등액을 취한 시료 60  $\mu$ L를 취하여 2배 희석한 Folin reagent 시약을 60  $\mu$ L를 가하여 3분간 방치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 60  $\mu$ L를 가하여 1시간 동안 반응시켜

반응액의 흡광도를 700 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid(Sigma-Aldrich)를 0, 20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ g/mL 용액이 되도록 조제하고, 이를 일정량 취하여 위와 같은 방법으로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

#### 알코올 함량 측정

알코올 농도는 국제청주류분석법(23)의 증류법에 따라 측정하였다. 시료 100 mL을 증류액 70 mL이 되도록 증류한 후 증류수를 가하여 100 mL로 정용하였다. 이후 15°C로 조절하여 주정계를 넣어 알코올을 정량하였다.

#### 통계처리

실험 결과는 Statistical Package for the Social Science (SPSS, Version 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균과 표준편차(mean±SD)를 구하였으며, 각 집단 간 평균치 차이를 검증하기 위하여 one way-ANOVA 및 Duncan's test를 적용하였다. 결과에 대한 검증은 p<0.05 수준에서 검증하였다.

## 결과 및 고찰

#### pH, 산도 및 생균수 변화

쌀 막걸리의 고형분 함량은 2.77%, 초기 알코올 함량은 6.0%(v/v), pH 및 산도는 각각 4.10, 0.12%이었으며, 효모 등 미생물의 생균수는 9.0×10<sup>7</sup> CFU/mL로 나타났다.

막걸리의 발효 과정 중 이취의 생성을 최소화시키면서, 젖산 발효를 효과적으로 수행하기 위해 85°C에서 30분간 진공 농축하였다. 선행 실험에서 막걸리를 열처리 없이 젖산 발효 할 경우 발효물에서 효모 발효에 의한 이취가 발생 하였으며, 이는 Choi 등(24)이 유청의 효모, 젖산 혼합발효에서 효모 발효 시 decanoic acid, tetradecanoic acid 등의 이취 유발 성분이 젖산 발효가 진행됨에 따라 더 증가한다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 막걸리를 진공 농축하여 효모 살균 및 알코올 제거를 수행하고, 실험의 일관성을 위해서 증발된 막걸리만큼의 멸균수를 첨가하여 젖산 발효 하였다. 고온 진공 농축하여 알코올을 제거한 NAM의 초기 pH 및 산도는 각각 4.2, 0.50%이었으며, 알코올은 검출되지 않았다(not detected). 생균수 측정 결과 고초균 등의 미생물은 1.3×10<sup>3</sup> CFU/mL로 나타났으며, 이때 젖산균과 효모는 관찰되지 않았다. 내열성 포자를 형성하는 고초균은 동일한 열처리 조건에서 젖산균 등에 비해 열 저항성을 보이며, 발효의 최적화를 통해서 고초균의 생육을 제어하는 것이 필요하다고 사료되었다.

NAM의 발효성 당과 GABA 생산의 전구물질인 MSG 첨가에 따른 발효 효과를 검토하기 위해서 MSG 3%, 포도당 0.5% 수준으로 혼합한 후 *L. plantarum* EJ2014 스타터균

주를 1% 첨가하여 7일 동안 젖산 발효를 수행하였다. 그 결과 포도당 0%와 1% 조건의 경우 발효 1일 차에 pH 4.15로 감소한 이후 지속적으로 증가하면서 발효 7일 차에 pH 5.5를 나타내었다. 반면에 포도당 3%와 5% 조건의 경우 발효 전 pH 5.1에서 완만하게 감소하면서 발효 7일 차에 pH 4.2로 낮은 값을 나타내었다(Fig. 1). 산도는 포도당 1%의 경우 젖산균 발효 1일 차에 1.50%로 급격하게 증가한 이후 발효 3일 차에 감소하면서 발효 초기 산도 값과 유사한 0.50%를 나타내었으며, 포도당 3%와 5% 조건의 경우 발효 전 0.41%에서 발효 1일 차에 1.35%로 급격하게 증가한 후 지속적으로 증가하였으며, 발효 7일 차에 소폭 감소하여 1.60%를 나타내었다(Fig. 2). 포도당 0%와 1% 조건의 경우 젖산 발효가 진행되는 동안 발효물의 pH가 낮아진 후 다시 높아지며 동시에 산도가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 젖산균 발효에 의해 유기산이 생성된 후 전구물질 MSG로부터

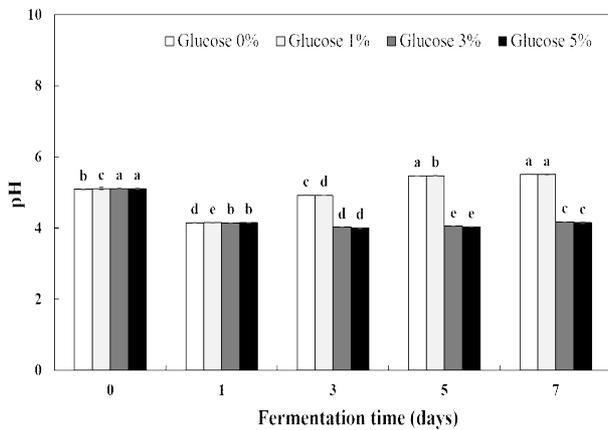


Fig. 1. Effect of glucose on the pH of non-alcoholic *Makgeolli* fermented by *L. plantarum*.

Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same condition mean significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05).

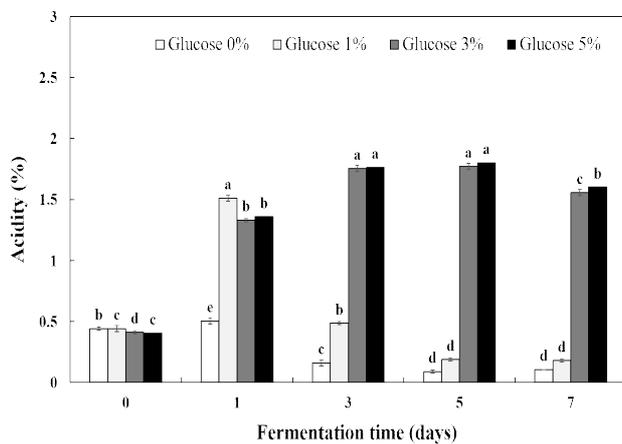


Fig. 2. Effect of glucose on the titratable acidity of non-alcoholic *Makgeolli* fermented by *L. plantarum*.

Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same condition mean significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05).

GABA가 생성되는 과정에서 proton이 소비되는 것과 관련이 있는 것으로 판단되며, 젖산균에 의한 GABA 생산은 산성조건에서 적응과정으로 proton을 소비하면서 산도가 감소를 초래한다고 보고(25)한 연구와 유사한 경향을 보였다.

생균수는 발효 1일째 모든 조건에서 크게 증가하면서 포도당 5% 조건에서  $3.0 \times 10^9$  CFU/mL로 가장 높게 나타났다. 발효 7일 차까지 약간 감소하면서 포도당 3%와 5% 조건에서  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL로 나타났으며, 포도당 0% 조건은 초기 균수  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL까지 감소하였다. NAM의 젖산 발효 과정 중 MSG존재 하에서 포도당이 3% 이상으로 첨가된 경우 발효 중에 필요한 탄소원의 충분한 공급으로 발효물의 생균수가 비교적 높은 값을 나타내었으며, 이는 포도당의 존재가 젖산균의 생균수를 높여주기 때문인 것으로 사료되었다. 따라서 젖산균 발효 7일 차에도 높은 생균수 값의 probiotic을 함유하는 비알코올 막걸리의 젖산 발효물을 제조할 수 있었다(Fig. 3). 이때 발효 과정 중 측정된 모든 생균수는 젖산균 발효의 전형적인 형태를 보였으며, 발효되지 않은 NAM에서는 젖산균이 관찰되지 않았으므로 생육된 모든 젖산균은 집종균인 *L. plantarum* EJ2014로 사료된다.

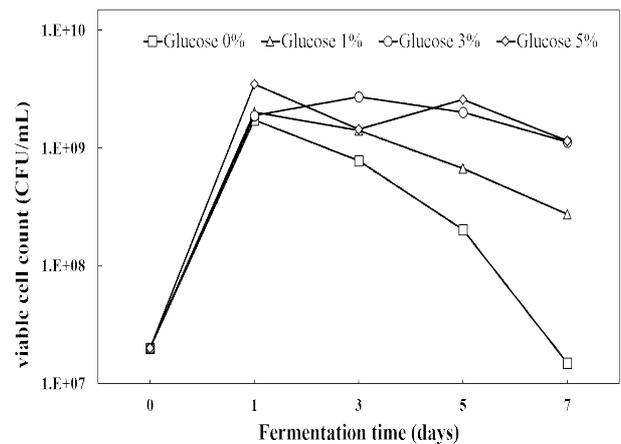
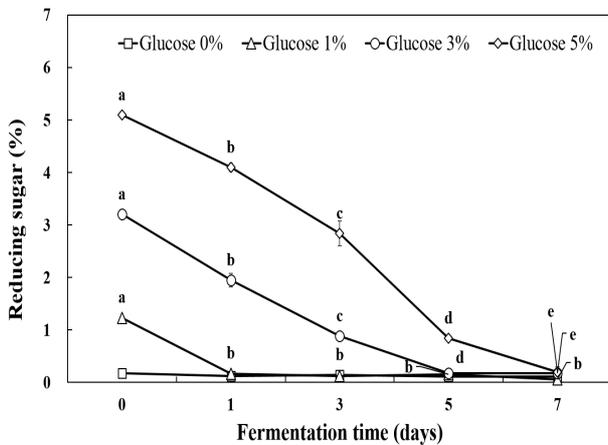


Fig. 3. Effect of glucose on the viable cell counts of non-alcoholic *Makgeolli* fermented by *L. plantarum*.

환원당 함량 변화

DNS법으로 NAM의 발효성 당 소진을 확인하였다. NAM의 환원당 함량을 측정한 결과 포도당 1% 조건의 경우 발효 1일 차에 0.17%로 거의 모든 환원당이 소진되었고, 포도당 3% 조건은 발효 5일 차에, 포도당 5% 조건은 발효 7일 차에 거의 모든 환원당이 소진되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이는 Lee와 Kwon(26)의 연구결과에서와 같이 발효 과정 중에 환원당이 감소하는 이유로는 젖산균 수가 증가됨에 따라 lactic acid 등의 물질을 생성하는데 이용되기 때문인 것으로 사료된다.



**Fig. 4. Effect of glucose on the reducing sugar content of non-alcoholic *Makgeolli* fermented by *L. plantarum*.**

Each value is a mean±SD (n=3). Different letters in the same condition mean significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05).

**총 폴리페놀함량 비교**

GABA 생성에 가장 최적화되었던 포도당 1% 조건을 비알코올 막걸리의 젖산 발효 최적조건으로 판단하여, 발효시간에 따른 총 폴리페놀 함량을 비교 분석하였다(Table 1). 발효 전 1,031.19±42.67 µg/mL에서 발효 5일 차부터 총 폴리페놀함량이 소폭 증가하여 1,192±44.90 µg/mL로 나타났으며, 발효 7일째에 1,478.98±56.50 µg/mL으로 유의적으로 높아진 값을 나타내었다. 이는 유산균 균주에 의한 톱 추출액의 폴리페놀함량이 평균 815.71 mg/g 증가했다고 보고한 연구 결과(27)와 유사한 경향을 나타내었다.

**Table 1. Changes in polyphenol content of non-alcoholic *Makgeolli* fermented by *L. plantarum* EJ2014**

	Fermentation time (days)				
	0	1	3	5	7
Polyphenol content (µg/mL)	1,031.19 ±42.67 <sup>1)(2)</sup>	1,004.77 ±38.89 <sup>c</sup>	1,000.77 ±67.75 <sup>c</sup>	1,192.56 ±44.90 <sup>b</sup>	1,478.98 ±56.50 <sup>a</sup>

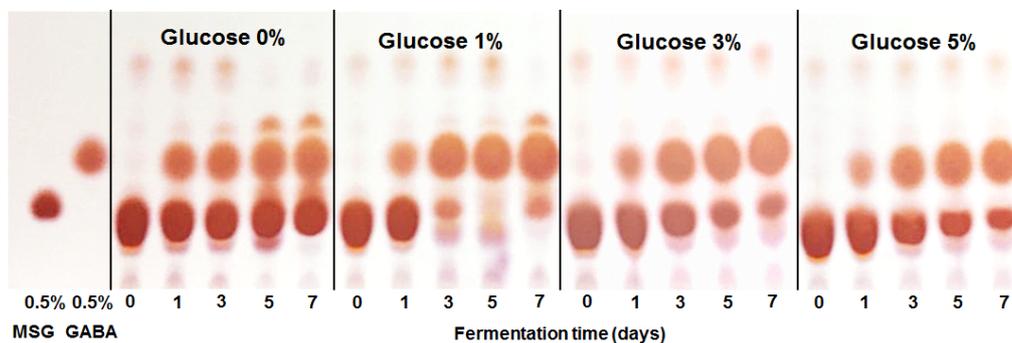
<sup>1)</sup>Each value is a mean±SD (n=3).

<sup>2)</sup>Different letters in the same condition mean significant difference by Duncan's multiple range test (p<0.05).

**GABA 생성능 및 MSG 소진능**

포도당 농도에 따른 젖산균 발효물의 MSG 소진과 GABA 생성을 비교하기 위해서 TLC plate를 이용하여 확인한 결과 포도당 1% 조건에서 발효 5일 차에 대부분의 MSG가 소진되어 GABA로 전환된 것으로 나타났다. 포도당 0% 조건의 경우 MSG의 잔존량이 가장 많은 것으로 나타났으며, 포도당 3%와 5% 조건의 경우 0% 조건보다 MSG가 조금 더 소진되었으나, 발효 7일 차에 여전히 MSG가 잔존하는 것으로 나타났다(Fig. 5). 이는 GABA 생성에서 초기 당 농도가 주요 인자로 작용한 것으로 사료되었다. 환원당 결과에서 포도당 1% 조건의 경우 발효 1일 차에 대부분의 환원당이 소진된 반면, 포도당 3%와 5% 조건의 경우 발효 5일 차 이후에 환원당이 소진되는 것으로 나타났다. 이를 통해 젖산균 발효에서 기질인 MSG로부터 GABA를 생성할 때 발효성 당의 농도가 매우 중요한 변수로 작용하는 것을 확인하였으며, 이는 Lee등(28)의 보고와 유사한 경향을 나타내었다. MSG가 첨가된 천연물을 배지로 이용하여 젖산균에 의한 GABA 생산에서 초기 포도당 농도가 비교적 낮은 조건이 높은 경우보다 GABA 생산이 효율적으로 진행되었다. 이는 발효성 당이 너무 많을 경우 젖산균이 MSG가 아닌 포도당을 먼저 이용함으로써 MSG의 소진이 효율적이지 않았기 때문으로 판단되었다. 녹각 추출액을 원료로 하여 *L. plantarum*에 의한 GABA 생산에서 초기 포도당 농도가 중요한 인자임을 보고하였다(29). 따라서 NAM에 기능성 물질인 GABA와 probiotic을 강화시키는 젖산균 발효 최적화 연구에서 열처리에 의해서 알코올을 제거시킨 비알코올 막걸리에 발효성 당으로 포도당 1%와 전구물질 MSG 3% 수준으로 첨가하여 젖산 발효시키는 것이 GABA 생산에 최적 조건이라고 판단하였다.

또한 선행연구에서 쌀 막걸리와 쌀 분말 희석액의 가수분해 유무에 따른 GABA 생성능 비교 실험을 진행한 결과 가수분해 유무에 관계없이 쌀 분말 희석액에서는 젖산 발효 15일 이상 진행하여도 첨가한 MSG 3%가 대부분 잔존함을 확인하였다(data not shown). 반면에 NAM에 젖산 발효를 진행할 경우 발효 5일 차에 대부분의 MSG가 GABA로 전환되는 것으로 나타났으며, 이는 발효 기간을 10일 이상 단축



**Fig. 5. Effect of glucose on the GABA production of non-alcoholic *Makgeolli* fermented by *L. plantarum* (TLC analysis).**

시키는 매우 의미있는 결과이다. 이에 효모와 코지 등의 대사산물이 쌀 발효에 있어서 GABA 생산과 MSG 소진에 중요한 인자라고 판단하였다.

HPLC를 이용하여 포도당 1% 조건의 발효 전, 후의 기질인 glutamic acid와 GABA 함량을 정량 분석하였다(Table 2). 발효 전 glutamic acid는 2.54%에서 발효 7일 후 0.06%로 100%에 가까운 소진율을 보였으며, GABA는 발효 전 0.00%에서 발효 7일 후 1.59% 함유하고 있는 것을 확인하였다.

**Table 2. Changes in glutamic acid and GABA contents of non-alcoholic *Makgeolli***

	Before fermentation	After fermentation
Glutamic acid	2.54%	0.06 %
GABA	0.00	1.59%

NAM의 젖산 발효 과정에서 탄소원의 농도가 GABA 생산에 크게 영향을 미치는 것으로 사료되며, 발효성 당으로 탄소원이 너무 많으면 젖산균의 대사산물인 유기산 생성의 증가로 pH가 크게 감소하고 산도가 높아지면서 glutamate decarboxylase(GAD) 효소 활성이 억제되는 것으로 사료되었다. 콩과 해조류 추출액의 *Aspergillus oryzae*와 *Lactobacillus brevis* 혼합발효를 통한 GABA 생산에서 발효성 당의 무첨가 및 pH 5.0 조건이 최적 발효조건인 것으로 보고한 Jang 등(30)의 연구 결과와 비교했을 때, 젖산 발효를 통한 GABA 생산에서 배지의 영양성분이 중요하며, 특히 질소원과 탄소원의 농도가 중요한 인자로서 작용하기 때문인 것으로 사료되었다. 또한 천연물을 배지로 이용한 GABA 생산에서 필수 영양성분으로 yeast extract(YE)가 첨가되는 경우와는 대조적으로 NAM에서 YE첨가 없이도 젖산균에 의해서 효과적으로 GABA를 생산한 연구결과와는 다른 연구결과와 차이가 있다.

천연물 추출물의 젖산균 발효를 통한 GABA 생산에서 배지의 성분조성이 GABA 생산에 영향을 미치며, 특히 YE의 존재가 GABA전환에 절대적으로 영향을 주는 것으로 보고(29)되었지만, D'Mello(31)의 연구와 Kim 등(25)의 연구를 바탕으로 보아 YE첨가 없이도 막걸리 제조시에 효모 발효로부터 생성된 대사산물과 glutamate decarboxylase의 조효소인 pyridoxal-5-phosphate(PLP) 등이 존재하여 젖산균 발효시에 GABA생성에 기여하는 것으로 사료되었다. 또한 젖산 발효 1일 차 이후로 생균수가 완만하게 감소하였지만 GABA 생성에 큰 영향을 미치지 않은 결과는 Kim 등(14)의 연구와 유사한 경향을 나타내었다.

결론적으로 쌀 코지 및 효모발효에 의해서 생산되는 쌀 막걸리는 효소작용에 의한 가수분해물과 다양한 대사산물을 함유하며, 특히 효모발효는 알코올 이외에 다양한 영양성분을 제공함으로써 젖산균 발효를 위한 환경을 만드는

것으로 판단되었다. 따라서 NAM에 기질인 MSG를 추가적으로 첨가하여 젖산균 발효를 통해서 효과적으로 기능성물질인 GABA로 전환시킬 수 있었으며, 고농도 GABA 및 probiotic가 강화된 비알코올 막걸리는 건강소재 및 다양한 음료의 기능성 원료로 활용이 가능할 것으로 판단되었다.

## 요 약

본 연구에서는 전통주인 막걸리로부터 비알코올 막걸리를 제조한 후 젖산균 발효 최적화를 통해서 기능성물질 GABA 및 probiotic가 강화된 기능성 쌀 발효물 소재를 개발하였다.

젖산균의 생육을 저해하는 효모의 활성을 저해하기 위하여 쌀 막걸리를 85°C에서 30분간 열처리하여 비알코올 막걸리를 제조하였다. 이에 MSG 3%와 포도당 1%를 첨가한 후 *L. plantarum* EJ2014 스타터를 1% 접종하여 30°C에서 7일간 젖산균 발효를 진행하였다. 젖산균 발효 시 pH가 5.12에서 5.49로 증가하였으며 산도는 발효 전 0.41%에서 발효 1일 차에 1.5%로 증가한 이후 감소하여 발효 7일 차에 0.2%를 나타내었다. *L. plantarum* EJ2014 생균수는 발효 초기  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL에서 발효 1일 차에  $2.0 \times 10^9$  CFU/mL로 증가하였다가 이후  $3.0 \times 10^8$  CFU/mL로 지속적으로 감소하였다. TLC 분석을 통해서 젖산 발효 5일 차 이후에 MSG가 모두 소진되어 GABA로 전환되는 것을 확인할 수 있었으며, HPLC를 이용한 정량분석에서 초기 MSG 2.54%에서, 발효 7일에 GABA 1.59%로 모두 전환되는 것을 확인하였다. 포도당 1% 조건에서 비알코올 막걸리의 젖산 발효 7일까지 총폴리페놀 함량이 증가하는 경향을 보여  $1,478.98 \pm 56.50$  µg/mL로 나타났다.

결론적으로 곰팡이 코지 및 효모의 대사산물을 함유한 비알코올 쌀 막걸리에 젖산균 발효 최적화를 통해서 기능성물질인 GABA와 젖산균 probiotic을  $10^8$  CFU/mL이상 함유한 쌀 발효물을 제조할 수 있었으며, 이를 통해 다양한 음료 및 기능성 식품에서 원료 베이스로의 활용이 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 농림축산식품부의 재원으로 농림수산식품기술기획평가원이 기술사업화지원사업(No. 314082-3)지원과 중소벤처기업부 지원 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터에 의해 연구되었음.

## Reference

1. Min JH, Baek SY, Lee JS, Kim HK (2011) Changes

- of yeasts and bacterial flora during the storage of Korean traditional *Makgeolli*. Kor J Mycol, 39, 151-153
2. Lee DH, Kim JH, Lee JS (2009) Effect of pears on the quality and physiological functionality of *Makgeolli*. Korean J Food Nutr, 22, 606-611
  3. Kim SM, Cho WK (2006) Effect of *Takju* (Korean turbid rice wine) lees on the serum glucose levels in streptozotocin-induced diabetic rats. Korean J Food Culture, 21, 638-643
  4. Lee SJ, Kim JH, Jung YW, Park SY, Shin WC, Pakr CS, Hong SY, Kim GW (2011) Composition of organic acids and physiological functionality of commercial *Makgeolli*. Korean J Food Sci Technol, 43, 206-212
  5. Shin MO, Kang DY, Kim MH, Bae SJ (2008) Effect of growth inhibition and quinone reductase activity stimulation of *Makgeolli* fractions in various cancer cells. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 288-293
  6. Ha JH, Shim YS, Cho YS, Seo DW, Jang HW, Jang HJ (2014) Analysis of E,E-farnesol and squalene in *Makgeolli* using stir bar sorptive extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. Anal Sci Technol, 27, 60-65
  7. Shin SJ, Kim SW, Chung HC, Han GD (2015) Characteristics of GABA rice *Makgeolli* made by Korean traditional rice wine method of *Geupchungju*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 44, 573-578
  8. Jo SJ, Oh SM, Jang EK, Hwang K, Lee SP (2008) Physicochemical properties of carrot juice fermented by *Leuconostoc mesenteroides* SM. J Korean Soc Food Sci Nutr, 37, 210-216
  9. Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T (2005) Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. Food Microbiol, 22, 497-504
  10. Ha GJ, Kim NK, Je HJ, Choi SY, Seol HK, Hong GP, Lee SD (2015) Quality characteristics of *Makgeolli* produced in Gyeongnam province. J Agric Life Sci, 49, 247-257
  11. Diana M, Quilez J, Rafecas M (2014) Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. J Funct Foods, 10, 407-420
  12. Cho SC, Kim DH, Park CS, Koh JH, Pyun YR, Kook MC (2012) Production of GABA-rich tomato paste by *Lactobacillus* sp. fermentation. Korean J Food Nutr, 25, 26-3
  13. Li H, Cao Y (2010) Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid. Amino Acids, 39, 1107-1116
  14. Kim JY, Lee MY, Ji GE, Lee YS, Hwang KT (2009) Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA 100. Int J Food Microbiol, 130, 12-16
  15. Park YJ (2014) Study of anti-inflammatory efficacy of GABA enriched cacao fermentation by lactic acid bacteria. MS Thesis, Kyunghee University, Korea, p 27-37
  16. Lee YS, Song TY, Kong WS, Yoon MH (2013) Characterization of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) produced by a lactic acid bacterium from button mushroom bed. J Mushroom Sci Prod, 11, 181-186
  17. Sawai Y, Yamaguchi Y, Miyama D, Yoshitomi H (2001) Cycling treatment of anaerobic and aerobic incubation increases the content of  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea shoots. Amino Acids, 20, 331-334
  18. Park EJ, Lee SO, Lee SP (2017) Development of natural fermented seasoning with *Flammulina velutipes* powder fortified with  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid fermentation. Korean J Food Preserv, 24, 237-245
  19. AOAC (1990) Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> ed, Association of official analytical chemists. Washington DC, USA, p 13
  20. AOAC (1990) Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> ed, Association of official analytical chemists. Washington DC, USA, p 777-784
  21. Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 31, 426-428
  22. AOAC (1990) Official methods of analysis. 15<sup>th</sup> ed, Association of official analytical chemists. Washington DC, USA, p 1077-1918
  23. Kim SH, Park JM, Yoon HS, Song DN, Song IG, Eom HY (2013) Physiological and sensory characteristics of *Makgeolli* with added paprika (*Capsicum annum* L.). Korean J Food Sci Technol, 45, 578-582
  24. Choi SI, Kang SA, Cheong C (2013) Yeast selection for quality optimization of distilled spirits. Journal of Korea Academia-Industrial Cooperation Society, 14, 3887-3896
  25. Kim JA, Park MS, Kang SA, Ji GE (2014) Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid during fermentation of *Gastrodia elata* Bl. by co-culture of *Lactobacillus brevis* GABA 100 with *Bifidobacterium bifidum* BGN<sub>4</sub>. Food Sci Biotechnol, 23, 459-466
  26. Lee SS, Kwon DJ (2015) Quality characteristics of kimchi

- with *Artemisia annua* extracts. Korean J Food Preserv, 22, 666-673
27. Song HS, Kim HK, Min HO, Choi JD, Kim YM (2011) Changes in physicochemical and sensory properties of *Hizikia fusiforme* water extract by fermentation of lactic acid bacteria. Kor J Fish Aquat Sci, 44, 104-110
28. Lee HS, Kwon SY, Lee SO, Lee SP (2016) Production of fermented *Omija* (*Schizandra chinensis*) beverage fortified with high content of gamma-amino butyric acid using *Lactobacillus plantarum*. Korean J Food Preserv, 23, 326-334
29. Kwon SY (2017) Production of  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) in old antler fermented by *Lactobacillus plantarum* and evaluation of bioactive property. MS Thesis, Keimyung University, Korea, p 33-37
30. Jang EK, Kim NY, Ahn HJ, Ji GE (2015)  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) production and angiotensin - I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of fermented soybean containing sea tangle by the co-culture of *Lactobacillus brevis* with *Aspergillus oryzae*. J Microbiol Biotechnol, 25, 1315-1320
31. D'Mello JPF (2017) The yeast  $\gamma$ -aminobutyrate GABA shnt, The handbook of microbial metabolism of amino acids. CABI, Edinburgh, UK, p 29-48