



Research Article

Increased production of γ -aminobutyric acid using the extract of *Phellinus linteus* fruiting body by *Lactobacillus plantarum* KS2020

상황버섯 자실체 추출물의 젖산발효를 통한 고농도 γ -aminobutyric acid 생산

Jong-Soon Lim^{1†}, Yun-Ho Park^{2†}, Beom-Su Jo², Ji-Eun Kim¹, Sam-Pin Lee^{1,2*}

임종순^{1†} · 박윤호^{2†} · 조범수² · 김지은¹ · 이삼빈^{1,2*}

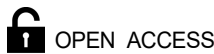
¹The Center for Traditional Microorganism Resources, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

²Department of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 42601, Korea

¹계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, ²계명대학교 식품가공학과

Abstract The optimal production of γ -aminobutylic acid (GABA) has been accomplished using the extract of *Phellinus linteus* fruiting body (PLF) and *Lactobacillus plantarum* KS2020. To optimize the production of GABA through lactic acid fermentation, the medium composition was optimized for the concentration of glucose, monosodium glutamate (MSG), and yeast extract. The solid content, pH, acidity of PLF extract was 1.37%, 5.85, and 0.03%, respectively. The content of the minerals Ca, Mg, K, Na, P, Fe, and Mn in the PLF extract were 3.65, 2.07, 1.95, 1.43, 0.88, 0.05, and 0.01 mg per 100 g, respectively. In case of single lactic acid fermentation with the PLF extract including 5% MSG as a precursor and 1.5% yeast extract, the pH and acidity of the fermented PLF extract were 5.96, and 0.25%, respectively, and the viable cell count was 8.56 log CFU/mL. After 9 days of stationary fermentation, MSG was converted to highly concentrated GABA. High performance liquid chromatography (HPLC) analysis revealed that, the initial content of GABA (21.18 mg/100 g) increased to 2,412.34 mg/100 g in the fermented PLF extract. In conclusion, the fermented PLF extract using *L. plantarum* KS2020 and MSG as a precursor can be used for the production of high-value functional food ingredients, such as GABA and probiotics.

Keywords *Phellinus linteus*, mushroom, *Lactobacillus plantarum*, monosodium L-glutamate, γ -aminobutyric acid



Citation: Lim JS, Park YH, Jo BS, Kim JE, Lee SP. Increased production of γ -aminobutyric acid using the extract of *Phellinus linteus* fruiting body by *Lactobacillus plantarum* KS2020. Korean J Food Preserv, 29(3), 472-481 (2022)

Received: January 12, 2022
Revised: March 16, 2022
Accepted: March 25, 2022

[†]These authors contributed equally to this study.

***Corresponding author**
 Sam-Pin Lee
 Tel: +82-53-580-5554
 E-mail: splee@kmu.ac.kr

Copyright © 2022 The Korean Society of Food Preservation. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

1. 서론

상황버섯(*Phellinus linteus*)은 목질진흠버섯이라고도 하며, 담자균류에 속하는 진균류로서 자실체를 형성하는 버섯이다. 상황버섯은 다당류와 무기질, 지질, 단백질 등으로 구성되어 있으며, 주로 다당류 성분이 상황버섯의 효능을 나타낸다고 보고되고 있다(Hong 등, 2012; Park 등, 2007; Shon 등, 2006). 상황버섯의 효능으로 항염증(Shin 등, 2021), 면역증진(Hong 등, 2019), 항산화 활성 및 항균(Kim 등, 2006), 항암활성(Rhee 등, 2000), 당뇨병 예방효과(Jo 등, 2015) 등의 효과가 보고되고 있다.

젖산균은 대표적인 probiotics로서 당류를 발효하여 젖산을 생성하는 통성혐기성 세균으로, 치즈, 발효유, 김치 등의 전통적인 발효식품의 제조에서 starter로 이용되고 있다. 특히 젖산균에 의한 발효를 통한 단백질 및 대사산물 생산, 지방분해 작용으로 발효식품의 저장성과 기능성을 높이며, 식품의 풍미를 향상시킨다(Carr 등, 2002). 또한, 젖산균은 혈중 콜레스테롤과 혈압 수치를 낮추며, 체내 대사 활성화에 긍정적인 영향을 주어 암 생성 억제, 위장염 억제, 간기능 개선(Bea 등, 2009) 등과 같은 효과가 보고되었다(Kim 등, 2017).

γ -Aminobutyric acid(GABA)는 자연계에 널리 분포하는 비단백태 아미노산으로, 동물의 경우 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질로 알려져 있다. 중추신경계 전체 신경전달물질 중 약 30%를 차지하며 다른 신경전달물질에 비하여 약 200배 이상의 고농도로 존재한다. 동물의 경우, 뇌·신장·심장·폐 등에서 발견되며, 식물의 경우 발아현미를 비롯한 발아곡류, 녹차, 배추 뿌리 등에서 많이 검출되고 있다(Oh, 2007). GABA는 혈압상승 억제, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방증가 억제, 뇌의 혈류 개선, 비만 방지, 시력 증진, 항불안, 항경련 등 인체의 많은 생리적인 조절에 관여하는 것으로 알려져 있고, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하며, 통증 완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 주목받는 물질이다(Kang과 Oh, 2007; Kook과 Cho, 2013).

GABA의 함량을 높이는 방법은 천연물 내에 존재하는 탈탄산 효소의 반응을 촉진시켜 글루탐산으로부터 생성되도록 하는 방법이 있다. 즉, 현미 배아를 물에 담가 탈탄산 효소의 작용을 통한 GABA 증가 방법(Saikusa 등, 1994), 현미의 발아를 통한 GABA 증가 방법(Miwako 등, 1999), 녹차의 혐기조건에 의한 GABA 증가 방법(Sawai 등, 2001) 등이 알려져 있다.

GABA는 주로 곡물이나 식물뿐만 아니라, 유산균을 이용한 GABA 생성 연구도 함께 진행되어 왔다. 최근 국내외에서 유산균을 이용한 GABA의 생산 균주는 *Lactobacillus plantarum* LAB459(Lee, 2021), *L. brevis* T118(Lee 등, 2020), *L. lactis* K991, *L. lactis* K998(Hwang과 Park, 2020) 등의 연구가 보고되어 있으며, 젖산균과 효모(Kang 등, 2021), 젖산균과 젖산균(Choe와 Lee, 2019)

등 여러 균주를 혼합발효함으로써 GABA의 생산을 증대시키는 연구가 보고되어 있다.

따라서 본 연구에서는 다양한 기능성을 함유하는 약용버섯인 상황버섯 자실체 추출물을 사용하여 김치에서 분리한 유용 젖산균의 발효 최적화를 통해서 GABA, probiotics 등의 기능성 물질을 강화하고, 고부가가치 기능성 소재를 개발하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료

본 연구에서 사용한 상황버섯 자실체 분말은 장현식품(Goryeong, Korea)에서 생산된 원료를 제공받아 사용하였다. 탄소원으로 사용된 포도당과 L-mono sodium glutamate(MSG)는 각각 대한제당(KS H-2003, Incheon, Korea)과 CJ 제일제당(Seoul, Korea)으로부터 구입하였다. Yeast extract(YE)는 (주)조흥(Ansan, Korea)으로부터 제품을 구입하여 사용하였다. 표준물질 GABA는 Sigma Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, glutamic acid는 Thermo Scientific사(Rockford, IL, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

2.2. 스타터 배양액 제조

Lactobacillus plantarum KS2020(KCCM 12782P)는 김치에서 GABA 생성능이 우수한 젖산균을 분리하여 기탁한 균주로서, MRS agar plate에서 계대 배양한 후, 멸균한 MRS broth에 순수 배양된 *L. plantarum* 한 백금이 접종한 뒤 30°C 항온배양기에서 24시간 동안 정치 배양하여 젖산균 발효 스타터로 사용하였다.

2.3. 상황버섯 자실체 추출물 제조

상황버섯 자실체 분말을 추출물로 제조하기 위하여 상황버섯 분말 40 g과 증류수 1,960 mL를 혼합한 뒤 핸드믹서(HR1673, Philips Korea, Hungary)를 이용하여 3,600 rpm에서 15분 동안 균질화시키고, 100°C에서 2시간 끓여 1차 열수 추출하였다. 열수 추출 중 증발된 물은 멸균수를 첨가하여 총 2,000 mL로 정용하여 2% 상황버섯 추출물을 제조하였다.

2.4. 상황버섯 젖산발효

2% 상황버섯 자실체 추출물 500 mL에 glucose 2% (w/v)와 MSG 5%(w/v), yeast extract 0-1.5%(w/v)를 혼합한 뒤 최종부피 1,000 mL가 되도록 멸균수를 첨가하였다. 그다음 *L. plantarum* KS2020 스타터 1%(w/v)를 접종하여 항온배양기에서 30°C에서 9일간 정치배양한 후 발효물의 이화학적 분석을 하였다.

2.5. 무기질 함량 측정

상황버섯 자실체 추출물의 무기질 분석은 식품공전 (MFDS, 2014)의 방법에 따라 수행하였으며, 무기질 중 Na, Ca, K, Mg, P, Fe, Mn 함량의 측정은 건식 분해법에 따라 시험용액을 조제하고, ICP-OES로 정량하였다. 시료를 균질화하여 일정량을 회화 용기에 취한 후 탄화시키고, 550-600°C의 온도에서 여러 시간 회백색이 될 때까지 회화하였다. 방냉 후 염산용액 10 mL를 가해 수욕상에서 완전 증발 건조시키고, 건조물에 염산 용액 8-10 mL를 가하여 수분 가열한 다음 50 mL 정용플라스크에 여과하였다. 불용물은 여지와 같이 사용했던 회화 용기에 옮겨 건조한 후 다시 회화하였다. 이 회분을 증류수로 적셔 염산 용액 약 2 mL를 가해 증류수 약 5 mL로 희석한 후 수욕상에서 가온하였다. 여과한 액을 앞의 100 mL 메스플라스크에 채워 증류수를 가하여 100 mL로 정용하고 시험용액으로 사용하였다. ICP-OES (Optima 7000DV, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 이용하여 무기질 함량을 측정하고, 이때 표준용액으로 얻은 각각의 검량선을 이용하여 정량하였다. ICP-OES를 이용한 기기분석 조건은 Table 1과 같다.

$$\text{무기질 함량(mg/100 g)} = (C \times D \times V) / (S) \times (1 / 10)$$

C: 흡광곡선에서 구한 결과값(mg/kg)

D: 시험용액의 희석배수

V: 시험용액의 전량(mL)

S: 검체의 채취량(g)

2.6. pH 및 적정 산도 측정

상황버섯 발효물의 적정 산도는 시료 1 mL에 증류수 9

Table 1. Condition of ICP-OES equipment analysis for inorganic content measurement

| Instrument | ICP-OES (Optima 7000 DV) | |
|-------------------------|--------------------------|--------------|
| Gas | Plasma gas | Liquid argon |
| | Shear gas | Air |
| Gas flows (L/min) | Plasma | 15 |
| | Auxiliary | 0.2 |
| | Nebulizer | 0.6 |
| RF power | 1,500 | |
| Pump flow rate (mL/min) | 1.5 | |
| Spray chamber type | Cyclonic type | |
| Plasma view | Radial / axial | |

mL를 가하여 희석 후 pH 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 사용된 소비량을 lactic acid 함량(% w/v)으로 환산하여 측정하였으며, pH는 pH meter(Digital pH meter 420A+, Thermo Orion, Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.7. 생균 수 측정

생균 수는 발효물을 멸균 생리식염수로 10⁶까지 단계별 희석한 것을 MRS agar 배지에 20 μ L 도말한 후, 30°C 항온배양기에서 48시간 배양한 다음 생균 수를 log CFU (colony forming unit)/mL로 나타내었다.

2.8. 상황버섯 발효물의 유리아미노산 정성 분석

MSG 및 GABA의 유리아미노산 정성 분석을 위해서 thin-layer chromatography(TLC) 분석을 수행하였으며, 표준물질로 0.5% MSG와 0.5% GABA 용액을 사용하였다. 전개 용매는 n-butyl alcohol:acetic acid glacial:distilled water를 3:1:1(v/v)의 비율로 혼합하여 사각 chamber(30×25×10 cm)에 넣고 실온에서 4시간 이상 포화시켰다. 발효물은 증류수로 3배 희석한 후 각각 시료와 standard 용액을 silica gel TLC plate(10×20 cm)의 아래에서 15 mm 되는 위치에 2 μ L를 점적하였고, 간격은 10-20 mm를 유지하였다. 점적 후 TLC plate의 sample을 건조시킨 다음 사각 chamber에서 전개한 후, TLC plate는 105°C 건조기에서 건조하였다. 건조한 TLC plate

에 발색시약인 0.2% ninhydrin 용액을 뿌리고, 100°C 건조기에서 5-10분 동안 발색시킨 후 발효물의 MSG와 GABA spot을 확인하여 정성 분석하였다.

2.9. 상황버섯 발효물의 유리아미노산 정량 분석

발효물의 유리아미노산 glutamic acid와 GABA 정량 분석을 위해서 HPLC 분석을 수행하였다. 발효물 1 g을 취하여 여과지로 여과한 후 유도체화를 위해 10 μ L를 취하여 Borate Buffer 70 μ L와 ACCQ-Fluor Reagent(Waters Co., Ltd., New York, NY, USA) 20 μ L를 넣어 10초간 잘 혼합한 후 1분 방치하고 55°C oven에서 10분간 가열 후 방냉하여 분석하였다. 이때 HPLC(Waters 2475)를 사용하여 측정하였으며, ACCQ·TaqTM(3.9×150 mm) column을 사용하였다. 또한, 검출기는 Fluorescence, 250 nm를 이용하고, mobile phase(A, Waters AccQ Taq Eluent A; B, Acetonitrile; C, Tertiary distilled water)로 유속 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었다. 표준물질은 증류수에 녹여 각 단계별로 희석하여 작성한 표준 검량선을 이용하여 함량을 계산하였다.

$$\text{함량 (\%)} = (S \times V \times D \times 100) / (W \times 1,000 \times 1,000)$$

이때 S는 시험용액의 농도(μ g/mL), V는 시험용액의 양 (mL), D는 희석배수, 그리고 W는 채취한 검체량(g)이다.

2.10. 통계처리

실험결과는 IBM SPSS Statistics, Version 25(IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 이용하여 시료 간의 차이 유무를 분산분석(ANOVA)을 시행한 후, Duncan's multiple range test($p < 0.05$)를 실시하여 각 시료 간의 유의성을 검증하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 상황버섯 자실체 추출물의 이화학적 분석

상황버섯 자실체 추출물 2%의 고형분 함량은 1.37%며, pH 5.85 ± 0.02 , 산도 $0.03 \pm 0.01\%$ 로 나타났다(not published).

Table 2에서 상황버섯 추출물의 무기질 함량 분석 결과로는 Ca 3.649 mg/100 g, Mg 2.066 mg/100 g, K 1.949 mg/100 g, Na 1.432 mg/100 g, P 0.883 mg/100 g 순으로 Ca의 함량이 가장 많은 것으로 나타났다. Lee 등(2017)의 연구에서 상황버섯 열수 가압추출물의 무기질 함량 K(185.57 mg/100 g), P(67.01 mg/100 g), Ca(11.60 mg/100 g), Na(5 mg/100 g) 순으로 나타났으며, Shon 등(2006)의 연구에서는 상황버섯 동결건조 분말에서 총무기질 함량은 534.3 mg%, K의 함량이 224 mg%로 가장 높게 나타났고, P(100.6 mg%), Mg(72.8 mg%), Ca(70.3 mg%), Na(43.0 mg%) 순으로 나타나 상황버섯 시료에 따라 무기질 함량의 차이가 있는 것으로 판단된다. 상황버섯 열수 추출물에 존재하는 Ca, Mg, K, Na, Fe, Mn, P 등 다양한 무기질들이 발효미생물의 생육에 도움을 줄 것으로 사료된다.

3.2. pH 및 산도 변화

상황버섯 자실체 분말을 이용하여 열수 추출물에 yeast extract 농도에 따른 젖산균 발효물의 pH와 산도의 변화를 각각 Fig. 1과 Fig. 2에 나타냈다. 발효 초기 yeast extract 첨가농도가 증가함에 따라 pH가 감소되어 0%에서 pH 6.51, 1.5%에서 pH 6.05로 나타났으며, yeast extract가 첨가되지 않은 경우 젖산균 발효 9일까지 소폭 감소하면서 pH 5.79를 나타내었다. Yeast extract 0.75% 첨가된 경우에 상황버섯 열수 추출물의 젖산균 발효물은 발효 3일째 가장 낮은 pH값을 보였으며, 이후 거의 일정 수준을 유지하면서 발효 9일째 pH 5.04로 가장 낮은 값을 보였다. Yeast extract 1.5% 첨가 경우에 초기 pH 5.96으로 발효

Table 2. Mineral content of *Phellinus linteus* extract

| Type of mineral | Content (mg/100 g) |
|-----------------|--------------------|
| Na | 1.432 |
| Ca | 3.649 |
| K | 1.949 |
| Mg | 2.066 |
| P | 0.883 |
| Fe | 0.047 |
| Mn | 0.010 |

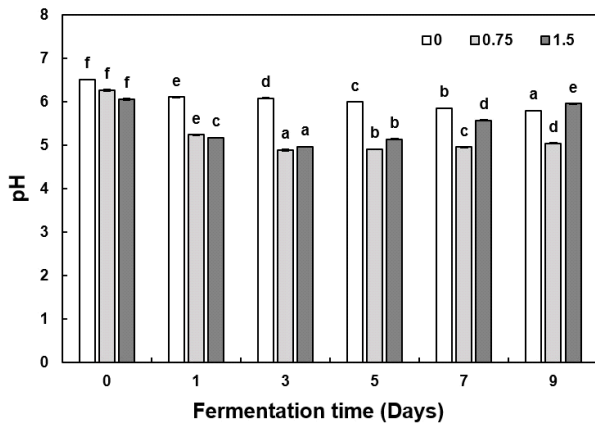


Fig. 1. Effect of yeast extract content on pH during lactic acid fermentation of *Phellinus linteus* extract. Values are mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference at p<0.05 by Duncan's multiple range test (the lowest value in the sample was expressed as a).

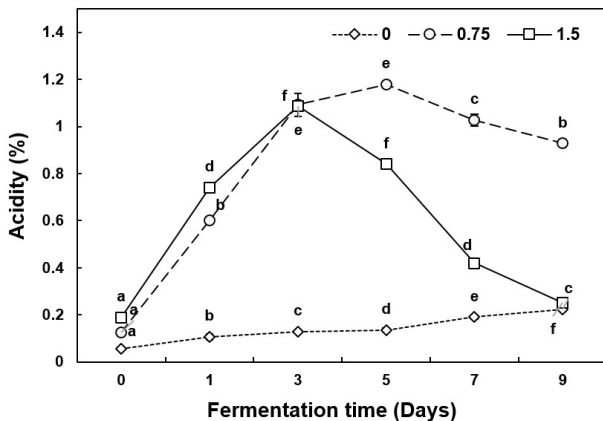


Fig. 2. Effect of yeast extract content (%) on acidity during lactic acid fermentation of *Phellinus linteus* extract. Values are mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference at p<0.05 by Duncan's multiple range test (the lowest value in the sample was expressed as a).

3일차에 가장 낮은 pH 5.3에 도달한 후 발효 시간이 증가하면서 발효물의 pH값이 증가하는 경향을 보였다. 이는 젖산균의 발효과정에서 유기산 생성에 의한 발효물의 pH가 감소하는 것이 일반적이며, 특히 homo-type 젖산균에 의한 젖산의 생성을 고려할 때 발효물의 pH가 증가하는 것은 이례적인 결과이다. 이는 젖산을 주로 생산하는 homo-type 젖산균이 배양액에 존재하는 glutamic acid의 전환에 따른 생화학적 변화에 기인한 것으로 사료된다. 일반적으로 젖산균에 의한 glutamic acid의 탈탄산과정을 촉매

하는 효소가 존재하는 경우에 glutamate에 의존적인 산 저항시스템을 통해서 glutamate/GABA 역수송체 역할을 하는 *GadC* 단백질의 작용으로 proton/GABA가 이동된다. 따라서 세포 내에서 생산된 아미노산 유도체인 GABA는 세포 외로 이동되며, 이때 세포 외 proton은 세포 내로 이동하여 소비되면서 발효물의 pH가 증가함을 보고하였다 (Yogeswara 등, 2020). 이는 젖산균이 산성 환경에서 자신의 생육환경을 조절하기 위한 수단으로 *GadC* 단백질을 이용한 세포 외 proton의 소비를 통한 산성 조건을 완화하는 것으로 판단된다. 또한, glutamate decarboxylase 효소에 의한 GABA 생산과정에서 생산되는 탄산가스는 homo-type 젖산균의 이례적인 대사산물로서 발효물의 탄산화에 기여한다.

산도는 발효 초기 0.06-0.19%로 낮게 나타났으며, 젖산균에 의한 발효과정에서 yeast extract가 첨가되지 않은 경우에 발효 9일 동안 완만하게 산도가 증가하여 최종 0.2%를 나타내었다. 반면에 yeast extract 0.75% 첨가된 시료에서 발효 5일째 산도 1.18%로 크게 증가한 후 완만하게 감소하면서 발효 9일에 산도 1.0% 정도를 보였다. Yeast extract 1.5% 첨가된 상황버섯 시료에서 발효 3일째 산도 1.09%로 크게 증가되었다가 이후 급격하게 감소하여 발효 9일째 발효물의 산도가 0.25%까지 감소되었다. 이는 상황버섯 추출물의 젖산균 발효과정에서 yeast extract 1.5% 첨가한 경우, 산도의 급격한 감소와 발효물의 pH 증가와 연관이 있는 것으로 판단된다. Lim과 Lee(2014)의 연구에 따르면 고초균과 젖산균을 이용한 우유발효에서 전구물질 MSG가 GABA로 전환될 때 pH를 증가시키는 것으로 보고하였다. 따라서 상황버섯 자실체 분말의 열수 추출물에 yeast extract 첨가는 젖산균의 발효에 도움을 주며, 특히 yeast extract 농도 의존적으로 기질인 glutamate의 효소적 전환에 의한 GABA 생산에 영향을 미치면서, 발효물의 pH가 증가하는 것으로 판단된다.

상황버섯 분말 열수 추출물에 전구물질 MSG가 존재할 때 젖산균에 의한 GABA 생산의 최적화 과정에서 복합영양 성분으로 yeast extract의 첨가에 따라 발효물의 산도를 감소시킬 수 있으며, yeast extract가 1.5% 첨가된 경우에 최종 발효물의 산도가 0.25%로 낮은 값을 보였다. 이는 젖산균 발효를 통한 발효성 당의 소진과 함께 산도가 낮은 젖

산균 발효물을 생산할 수 있는 방법으로 기대된다.

3.3. 생균 수의 변화

Yeast extract 농도에 따른 상황버섯 분말 열수 추출물의 젖산발효 과정에서 생균 수 변화를 확인한 결과, Fig. 3에서처럼 yeast extract 첨가농도의 증가에 따라 젖산균의 생균 수가 증가하는 경향을 보였다. Yeast extract가 첨가되지 않은 경우에 발효 초기 7.43 log CFU/mL에서 완만하게 증가한 후 발효 7일 이후 감소하는 경향을 보였다. 반면에 yeast extract 0.75%, 1.5% 첨가 경우에 발효 3일에 각각 9.03, 9.26 log CFU/mL까지 크게 증가한 후 완만하게 감소하면서 발효 9일째에 각각 8.44, 8.56 log CFU/mL의

생균 수를 나타내었다. Yeast extract 1.5% 첨가 조건이 젖산균 발효물의 가장 높은 생균 수를 보였다. 이는 젖산 발효 9일에도 생균 수가 매우 높은 것으로 사료되며, 젖산균에 의한 GABA 전환에 따른 발효물의 산도가 감소하는 것과 연관이 있다고 판단된다. 팽이버섯의 젖산발효를 통한 GABA 생산과정에서 초기 생균 수 2.8×10^7 CFU/mL에서 발효 5일째 3.6×10^8 CFU/mL로 증가하였으며, 이때 기질로서 MSG를 3.5% 첨가한 경우, 발효물의 생균 수는 1×10^9 CFU/mL 이상으로 높은 값을 유지한 것과 유사한 결과를 보였다(Park 등, 2017).

3.4. 상황버섯 발효물의 GABA 전환능 및 GABA 함량

상황버섯 분말 열수 추출액을 이용한 젖산균 발효물의 yeast extract 농도에 따른 GABA 생성 정도를 확인하기 위해 발효물을 3배 희석한 뒤 thin layer chromatography를 통해 확인하였다(Fig. 4). Yeast extract 0%에서는 발효 9일까지 MSG가 거의 소진되지 않고 GABA가 생성되지 않았으며, yeast extract 농도가 증가함에 따라 GABA 생성능이 높아지는 것을 확인하였다. Yeast extract 1.5% 첨가된 조건에서 전구물질로서 MSG가 대부분 소진되면서 고농도 GABA로 전환된 것을 확인할 수 있었다. 따라서 상황버섯 자실체 분말 열수 추출물을 이용한 젖산균 발효를 통해 GABA 생산의 최적화된 조건으로, 1% 상황버섯 자실체 열수 추출물에 glucose 2%, MSG 5%, yeast extract 1.5%를 첨가한 경우이며, 이때 젖산발효 9일에 고농도 GABA가 생성되었다.

GABA 정량 분석을 위해 HPLC를 이용하여 젖산균 발효

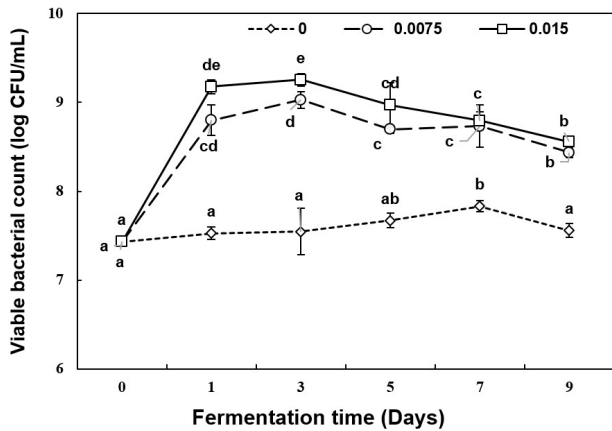


Fig. 3. Effect of yeast extract content (%) on viable bacterial count during lactic acid fermentation of *Phellinus linteus* extract. Values are mean±SD (n=3). Different letters indicate significant difference at p<0.05 by Duncan's multiple range test (the lowest value in the sample was expressed as a).

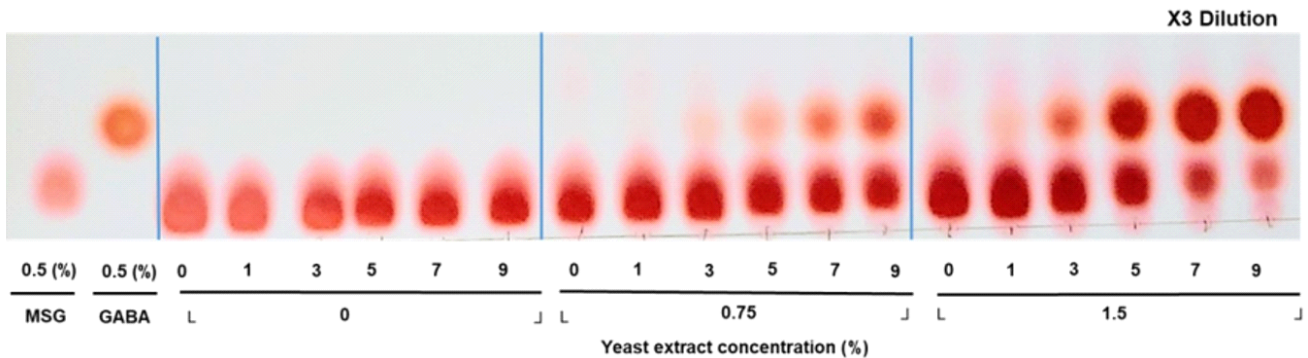


Fig. 4. Effect of yeast extract content on the GABA production during lactic acid fermentation of *Phellinus linteus* extract.

전, 후 glutamic acid와 GABA의 함량을 분석한 결과, 발효 전 glutamic acid 6,175 mg/100 mL, GABA 21 mg/100 mL에서 젖산발효 9일째에 glutamic acid는 1,266 mg/100 mL로 급격하게 감소하면서, GABA 함량은 2,412 mg/100 mL로 크게 증가하였다(Table 3). 젖산발효 9일 동안에 glutamic acid가 GABA로 전환되면서 잔존 glutamic acid는 미량 존재하였으며, GABA는 2.41%로 발효 전에 비해 약 100배 이상 증가되었다. 초기 첨가된 MSG 농도에 비해서 glutamic acid 함량이 높은 것은 영양성분으로 첨가된 yeast extract에 의한 것으로 판단된다.

Lee 등(2018)의 연구에 따르면 소비가 많이 되는 버섯의 영양성분을 분석한 결과, 동결건조한 느타리버섯 분말에서 3.5 mg/100 g, 새송이버섯 분말에서 5.0 mg/100 g, 양송이버섯 분말에서 8.3 mg/100 g으로, 버섯에도 GABA가 소량 함유되어 있으나 자연에서 얻을 수 있는 GABA 함량은 매우 제한적이다. Yoon 등(2010)의 연구에서는 새송이버섯 자실체 배양 시 글루탐산나트륨을 6 g/bottle 첨가하여 2배 이상 GABA의 함량을 증대시켰다. Jung 등(2017)의 연구에서는 느타리버섯 자실체 배양 시 농산물 부산물 유래 첨가용 배지로서 10% 오미자박, 1% 미강을 첨가하여 각각 GABA 함량이 263.9 mg%, 592.4 mg% 정도로 증가시키는 연구보고가 있었다.

최근 GABA 생산 젖산균을 이용한 천연물에 GABA를 강화시키는 연구로서, *Ceriporia lacerate* 버섯배양액에 전구물질로서 MSG 3%와 skim milk 5%를 첨가 조건에서 *L. plantarum* 균으로 7일 동안 정치 배양하여 996 mg/100 mL의 GABA 생산을 보고하였다(Lee와 Lee, 2015). 사과즙 제조과정에서 생산되는 부산물인 사과박을 이용한 GABA 생산을 위한 발효조건을 최적화하면서, 전구물질인 MSG 3%와 yeast extract 1%에 목이버섯 2%를 추가적으로 첨가하

여 *L. plantarum*에 의한 5일 발효 후에 GABA 생산이 증진하면서 1,344 mg/100 mL 함량을 나타내었다(Heo 등, 2017). 팽이버섯 분말을 이용하여 젖산발효 시 전구물질로 5% MSG 첨가조건에서 2.26%의 고농도 GABA 생산이 보고되었으며(Park 등, 2017), 이는 상황버섯 분말 추출물 1% 사용과 비교하여 팽이버섯 분말 10%에 yeast extract 0.5% 첨가조건에서 고농도 GABA를 생산할 수 있었다. 이는 팽이버섯 함량이 상황버섯에 비해서 높은 농도로 사용되어, 저농도 yeast extract가 존재함에도 불구하고, 젖산균 배양에 의한 고농도 GABA 생산이 가능한 것으로 판단된다. 녹각추출액의 젖산발효를 통한 고농도 GABA 생산 최적화 실험에서 5% 녹각 추출물에 1.5% glucose, 3.5% MSG 첨가 조건에서 yeast extract 농도 0.5%를 추가함으로써 더욱 효과적으로 GABA 생산하면서, 최종 1,400 mg/100 g GABA 함량을 보고하였다(Kwon과 Lee, 2018).

따라서 버섯 등 천연 원료에 젖산균에 의한 배양을 통한 GABA 생산에서 yeast extract는 중요한 영양 공급원이며, 특히 버섯 추출물의 농도에 의존적으로 GABA 생산에 차이가 있음을 알 수 있었다. 따라서 상황버섯 분말 1%에 MSG 5%, glucose 1%, yeast extract 1.5% 첨가조건에서, *L. plantarum* 젖산균의 단독 발효 9일에 최종 상황버섯 발효물은 2,412 mg/100 g의 GABA 함량을 보이면서 팽이버섯 분말에서 생산된 GABA보다 높은 수준을 나타내었다. 결론적으로 약용버섯인 상황버섯 원료에 젖산균에 의한 단독 발효를 통해서 기능성물질인 GABA를 강화시키기 위한 경우에 원료 버섯의 함량, yeast extract 농도가 중요한 조건인 것으로 판단된다.

4. 요약

상황버섯 자실체 추출물에 젖산균 *L. plantarum*을 단독 배양하여 GABA가 강화된 상황버섯 자실체 발효물의 생산을 최적화하였다. 미생물 배양을 통한 GABA 생산 최적화를 위해서 glucose, MSG, yeast extract 농도에 따른 배지조성을 최적화하였다. 상황버섯 자실체 추출물의 고형분 함량은 1.37%, pH 5.85, 산도 0.03%이며, 무기질 함량은 Ca, Mg, K, Na, P, Fe, Mn순으로 100 g당 3.65, 2.07, 1.95, 1.43, 0.88, 0.05, 0.01 mg으로 측정되었다. 상황

Table 3. Changes in GABA content during lactic acid fermentation of *Phellinus linteus* extract

| Free amino acid (mg/100 g) | Fermentation time (days) | |
|----------------------------|------------------------------|----------------|
| | 0 | 9 |
| Glutamic acid | 6,175.50±20.73 ¹⁾ | 1,266.46±15.68 |
| GABA | 21.18±0.99 | 2,412.34±16.17 |

¹⁾Values are mean±SD (n=3).

버섯 자실체에 전구물질로서 MSG 5%와 yeast extract 1.5%가 혼합된 경우, 젖산균 *L. plantarum*의 단독 발효를 통해서 최종 상황버섯 발효물은 pH 5.96, 산도 0.25%, 생균 수 8.56 log CFU/mL로 나타났다. 정치 발효 9일째에 MSG가 대부분 전환되면서 고농도 GABA를 생산하는 것으로 나타났으며, HPLC 분석결과 GABA 함량이 초기 21.18 mg/100 g에서 2,412.34 mg/100 g으로 GABA 함량이 약 100배 이상 증가하는 것으로 나타났다. 결론적으로 *L. plantarum* KS2020을 이용하여 전구물질 MSG를 포함한 상황버섯 자실체 추출물의 단독 발효물은, 기능성 물질인 GABA와 probiotics 등이 강화되어 고부가가치의 기능성 식품소재로서의 활용이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 “사회적경제 혁신성장지원사업” 지원을 받아 연구되었습니다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflicts of interest.

Author contributions

Conceptualization: Lee SP. Formal analysis: Park YH, Jo BS. Writing - original draft: Lim JS. Writing - review & editing: Kim JE, Lee SP.

Ethics approval

This article does not require IRB/IACUC approval because there are no human and animal participants.

ORCID

Jong-Soon Lim (First author)

<https://orcid.org/0000-0001-9688-563X>

Yun-Ho Park (First author)

<https://orcid.org/0000-0001-9541-8554>

Beom-Su Jo

<https://orcid.org/0000-0001-8900-3096>

Ji-Eun Kim

<https://orcid.org/0000-0002-5916-5518>

Sam-Pin Lee (Corresponding author)

<https://orcid.org/0000-0001-9413-2482>

References

- Bae MO, Kim HJ, Cha YS, Lee MK, Oh SH. Effects of Kimchi lactic acid bacteria *Lactobacillus* sp. OPK2-59 with high GABA producing capacity on liver function improvement. J Korean Soc Food Sci Nutr, 38, 1499-1505 (2009)
- Carr FJ, Chil D, Maida N. The lactic acid bacteria: A literature survey. Crit Rev Microbiol, 28, 281-370 (2002)
- Choe JY, Lee SP. High production of GABA in *Pyrus ussuriensis* Maximowicz fruit extract by mixed fermentation of lactic acid bacteria. Korean J Food Preserv, 26, 642-649 (2019)
- Heo KM, Park EJ, Park JH, Lee SP. Overproduction of GABA in apple pomace with *Auricularia auricula-judae* by lactic acid fermentation. Quantitative Bio-Science, 36, 151-160 (2017)
- Hong DH, Joo IH, Park JM, Han SH, Lee SB, Gwak SG, Kim DH. Immune-enhancing effects of *Phellinus linteus* fruit body and mycelium cultured in *Cudrania tricuspidata*. J Physiol Pathol Korean Med, 33, 275-281 (2019)
- Hong MH, Jin YJ, Pyo YH. Antioxidant properties and ubiquinone content in different parts of several commercial mushrooms. J Korean Soc Food Sci Nutr, 41, 1235-1241 (2012)
- Hwang EY, Park JY. Isolation and characterization of gamma-aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria from Kimchi. Curr Top Lact Acid Bact Probiotics, 6, 64-69 (2020)
- Jeoung YK, Kim JH, Baek IS, Kang YJ, Chi JH. Effect of schizandra berry dregs and rice bran treatment on γ -aminobutyric acid (GABA) content enhancement in *Pleurotus ostreatus*. J Mushrooms, 15, 88-93 (2017)
- Jo JH, Park HS, Han JG, Lee KH, Jhune CS. Anti-diabetic efficacy of the alcoholic extract in

- Ganoderma* sp. and *Phellinus baumi*. J Mushrooms, 13, 326-329 (2015)
- Kang HM, Lim JS, Lee SP. Higher production of γ -aminobutyric acid in *Toxicodendron vernicifluum* extract by co-fermentation using yeast and lactic acid bacteria. Korean J Food Preserv, 28, 129-140 (2021)
- Kang TJ, Oh SH. GABA production and use. BRIC BioWave, 9, 1-18 (2007)
- Kim DH, Jeong D, Kang IB, Kim H, Song KY, Seo KH. Dual function of *Lactobacillus kefir* DH5 in preventing high-fat-diet-induced obesity: Direct reduction of cholesterol and upregulation of PPAR- α in adipose tissue. Mol Nutr Food Res, 61, 170-252 (2017)
- Kim IH, Jin EJ, Lee JH. Antioxidant and antimicrobial activities of cambodian mushroom, *Phellinus linteus*. Environ Mutagens Carcinog, 26, 41-44 (2006)
- Kook MC, Cho SC. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by lactic acid bacteria. Korean J Food Sci An, 33, 377-389 (2013)
- Kwon SY, Lee SP. Enrichment of gamma-aminobutyric acid (GABA) in old antler extract fermented by *Lactobacillus plantarum*. Korea J Food Sci Technol, 50, 37-43 (2018)
- Lee EJ, Lee SP. Optimization of γ -aminobutyric acid (GABA) production using immobilized *Lactobacillus plantarum* K154 in submerged culture of *Ceriporia lacerata*. Korean J Food Sci Technol, 47, 438-445 (2015)
- Lee IN, Jeong HJ, Han YE, Park H, Jung J, Rhee JK. Effect of nutrition permeability from barley sprouts, *Curcuma longa* L., *Dendropanax morbifera* LEV., *Phellinus linteus* using cryogenic grinding technology. Food Eng Prog, 21, 391-402 (2017)
- Lee K, Sim U, Choi Y, Lee J. Nutritional compositions and antioxidant activities of frequently consumed mushrooms in Korea. J Korean Soc Food Sci Nutr, 47, 1178-1184 (2018)
- Lee SJ, Yao Z, Meng Y, Le HG, Jeon HS, Yoo YJ, Kim JH. Isolation of γ -aminobutyric acid producing *Lactobacillus brevis* T118 from Sun-Tae Jeotgal and its glutamate decarboxylase gene cloning. J Agri Life Sci, 54, 85-92 (2020)
- Lee YD. Fermented property and antioxidative effect of GABA producing *Lactobacillus plantarum* from Kimchi. J Food Hyg Saf, 36, 440-446 (2021)
- Lim JS, Lee SP. Production of set-type yogurt fortified with peptides and γ -amino butyric acid by mixed fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*. Korean J Food Sci Technol, 46, 165-172 (2014)
- MFDS. Ministry of Food and Drug Safety. Food Code II. Cheongju, Korea, p 78-92 (2014)
- Miwako K, Miyuki S, Akira Y, Koji Y. Accumulation of GABA in brown rice by high pressure treatment. J Japanese Soc Food Sci Technol, 46, 329-333 (1999)
- Oh SH. Effects and applications of germinated brown rice with enhanced levels of GABA. Food Sci Ind, 40, 41-46 (2007)
- Park EJ, Lee SO, Lee SP. Development of natural fermented seasoning with *Flammulina velutipes* powder fortified with γ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid fermentation. Korean J Food Preserv, 24, 237-245 (2017)
- Park M, Ahn MJ, Kim J, Ze KR, Lee HS. Composition of crude polysaccharides in some *Phellinus* species. J Korean Soc Food Sci Nutr, 36, 131-135 (2007)
- Rhee YK, Han MJ, Park SY, Kim DH. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of the fruit body of *Phellinus linteus*. Korean J Food Sci Technol, 32, 477-480 (2000)
- Saikusa T, Horino T, Mori Y. Accumulation of γ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking. Biosci Biotech Biochem, 58, 2291-2292 (1994)
- Sawai Y, Yamaguchi Y, Miyama D, Yoshitomi H. Cycling treatment of anaerobic and aerobic incubation increase the content of γ -aminobutyric acid in tea shoots. Amino Acids,

- 20, 331-334 (2001)
- Shin HY, Kim H, Jeong EJ, Kim HG, Son SU, Suh MG, Kim NR, Suh HJ, Yu KW. Anti-inflammatory activity of liquid fermentation by *Phellinus linteus* mycelium. Korean J Food Nutr, 34, 487-497 (2021)
- Shon MS, Kim GN. Anti-oxidant and anti-obese activities of turmeric (*Curcuma longa* L.) extract in 3T3-L1 cells. Kor J Aesthet Cosmetol, 12, 169-175 (2014)
- Shon MY, Seo KI, Choi SY, Sung NJ, Lee SW, Park SK. Chemical compounds and biological activity of *Phellinus baumii*. J Korean Soc Food Sci Nutr, 35, 524-529 (2006)
- Yogeswara IB, Maneerat S, Haltrich D. Glutamate decarboxylase from lactic acid bacteria-A key enzyme in GABA synthesis. Microorganisms, 8, 1-24 (2020)
- Yoon DY, Park KM, Lee JH. Characteristics and biological properties of *Pleurotus eryngii* grown on monosodium glutamate-enriched media. KSSB J, 25, 277-282 (2010)