Electrostatic Spray를 이용한 Synbiotic 소재 함유 곡류 팽화 제품 개발

정민수¹ · 오정현¹ · 임청하¹ · 안준배² · 이춘미³ · 정준영³ · 김광엽¹

¹충북대학교 식품생명공학과
²서원대학교 호텔외식조리학부
³지디앤와이(주)

Development of Puffed Grain Products Containing Synbiotic Materials Using Electrostatic Spray

Min Su Jeong¹, Jeong Hyeon Oh¹, Chung Ha Lim¹, Jun Bae Ahn²,
Chun mi Lee³, Jun Young Jeong³, and Kwang Yup Kim¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University

²School of Food Service and Culinary Arts, Seowon University

³GD&Y Co., Ltd.

ABSTRACT This study aimed to develop synbiotic materials and apply them to puffed grain products using electrostatic spraying technology. Lactic acid bacteria were isolated from kimchi and selected through tests of acid resistance, bile-salt resistance, and γ -aminobutyric acid (GABA) content. The isolated *Lactobacillus brevis* CFM21 produced the highest GABA production up to a concentration of 926.42 $\mu\text{g/mL}$ when grown in MRS broth containing 0.8% MSG. The possibility of coated grains as a prebiotic material was evaluated using confocal laser scanning microscopy (CLSM). Rice bran extract containing 2% dextrose, 2% soytone, 0.2% potassium chloride, and 0.6% MSG produced 524.77 $\mu\text{g/mL}$ of GABA. *Citrus sinensis* oil showed the highest antibacterial activity against *Clostridium perfringens*. Electrostatic spray showed much higher effectiveness than conventional spray in coating the puffed grain product through CLSM. Applying a rice bran culture and *Citrus sinensis* oil to puffed grain product using an electrostatic spray can help promote the intestinal health of consumers.

Key words: synbiotics, GABA, essential oil, electrostatic spray, confocal laser scanning microscopy

서 론

인체의 피부 및 점막 표면에는 외부 환경에서 유래하는 다양한 미생물이 서식하고 있다. 특히 소화관에는 다양하고 많은 미생물이 거주하고 있다. 장내 미생물들은 유익균과 유해균들이 함께 공생이나 길항작용을 통해 인체의 장내에서 일정한 균총을 지니게 되고 이들의 균형에 의해 건강상태가 조절되게 된다(Kinoshita와 Gelboin, 1978). 장내 미생물 분포는 유전적 요인, 식습관, 건강상태에 따라 달라지는데, 특히 질병 상태에 따라 이들 장내 미생물 군총이 급격히 바뀌기도 한다. 최근 연구에 의하면 프로바이오틱스는 불균형 상태의 장내 미생물 군집의 구조를 섭취 시 복원할 수

있는 것으로 알려졌다(Choi, 2019).

전 세계에서 가장 많이 사용되는 프로바이오틱스인 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium*은 발효식품이나 유제품에서 오랜 기간 동안 안전성을 보여 일반적으로 Generally Recognized As Safe(GRAS)로 분류되어 있다(Butel, 2014). 프리바이오틱스는 *Lactobacillus* spp.와 *Bifidobacterium* spp.의 생육을 선택적으로 증진시킬 수 있다고 보고되어 있으며(de Vrese와 Schreinemakers, 2008), 장내 미생물을 이용하여 lactic acid, butyric acid, propionic acid와 같은 short chain fatty acids로 대사되고 분자량이 적어 장관세포를 통과한 후 혈관을 통해 이동하며 다른 기관 및 조직에도 영향을 미칠 수 있다(den Besten 등, 2013). 프리바이오틱스와 이를 이용하는 프로바이오틱스를 모두 포함하는 신바이오틱스라는 용어가 사용되고 있으며, 신바이오틱스는 제품의 유익한 미생물의 생존력을 향상시키며 장내에 서식하는 특정 미생물의 증식도 도울 수 있다(Gourbeyre 등, 2011).

γ -Aminobutyric acid(GABA)는 동물이나 식물, 미생물 등 자연계에 널리 분포하는 비단백질 아미노산으로 포유동물의 중추신경계에 존재하는 신경전달물질이다(Manyam

Received 25 Nov 2020; Revised 8 Jan 2021; Accepted 8 Jan 2021
Corresponding author: Kwang Yup Kim, Department of Food Science and Biotechnology, Chungbuk National University, 1, Chungdae-ro, Seowon-gu, Cheongju-si, Chungbuk 28644, Korea, kimky@chungbuk.ac.kr

Author information: Min Su Jeong (Graduate student), Jeong Hyeon Oh (Graduate student), Chung Ha Lim (Graduate student), Jun Bae Ahn (Professor), Kwang Yup Kim (Professor)

등, 1981). GABA는 혈압감소(Inoue 등, 2003), 이노작용(Jakons 등, 1993), 신경안정작용(Okada 등, 2000) 같은 다양한 생리학적 기능을 지니고 있으며, 일반적으로 작용을 억제하면 불안과 경련이 일어날 수 있고 증가시키면 항우울, 항경련, 진정작용을 유발한다고 보고되어 있다(Choi 등, 1998). 발효를 통해 GABA를 생산하기 위한 연구들이 진행되고 있으며 쌀, 콩, 김치의 발효 식품에서 분리한 유산균이 매우 높은 GABA 생산 능력을 가지는 것이 밝혀졌다. 특히 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* 등의 유산균이 고농도의 GABA를 생산한다고 알려져 있다(Oh 등, 2003; Park과 Oh, 2007).

미강은 현미를 백미로 도정하는 과정에서 생산되며 연간 60만 톤 정도 생산되는 것으로 추정된다. 미강에는 단백질이 12~16%, 식이섬유가 20~25%이며, 지방이 16~22% 함유되어 있어 영양학적으로 매우 가치가 높다(Kahlon 등, 1992a). 그러나 곡류의 도정 과정으로 인해 미강 발생량의 15~20% 정도만이 미강유 제조에 사용되고 있으며, 나머지는 사료나 비료로 사용되거나 폐기물로 처리되고 있어 산업적인 가치가 매우 낮게 치부되고 있는 실정이다(Dassanayake 등, 2009). 미강의 풍부한 영양성분과 *Lactobacillus* sp.의 필수 생장인자인 비타민 B가 함유(Kalhon 등, 1992b)되어 있어 배지 성분으로서 활용 가능성이 높은 것으로 보인다.

에센셜 오일은 식물의 꽃, 잎, 씨앗, 나무껍질, 과일 및 뿌리와 같은 부분에서 얻어지는 식물의 2차 대사산물로써 향기를 지니는 휘발성 액체이다. 에센셜 오일과 그 성분들은 항균 활성(Oussalah 등, 2007), 살충작용(Kim 등, 2003), 항바이러스(Schnitzler 등, 2007), 항진균(Fitzgerald 등, 2003)을 포함한 다양한 생물학적 활성들이 연구되고 있다.

광학 및 전자현미경은 세포의 구조, 기능, 생리학적 특성 등을 분석하는 데 사용되고 있는데, 전자현미경은 시료의 미세구조 관찰이 가능하지만 전처리를 위한 고정 등의 과정에 의해 시료에 손상이 발생하게 된다. 광학현미경은 살아있는 세포 및 고정된 시료의 관찰이 가능하지만 해상도가 낮아 미세구조 관찰이 힘들며, 초점 이외의 부분에서 오는 빛의 산란 현상으로 인해 두꺼운 시료를 관찰하는 데 어려움이 있다(Alvarez-roman 등, 2004). 이러한 단점을 보완한 것이 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscopy, CLSM)으로, 레이저를 광원으로 하며 초점에서 벗어난 영상이 제거되어 선명한 영상을 얻을 수 있고 시료의 손상 없이 광학적인 절편 영상의 확보 및 분할된 광학적 절편 이미지를 모아 3차원 이미지화가 가능하다는 장점이 있다(Kim 등, 2006).

정전분무(electrostatic spray) 기술은 노즐 끝의 고전압 전극에 의하여 물방울이 음전하로 대전이 되고 음전하를 띠는 물방울이 정전작용 때문에 표적물체의 표면이 양전하를 띄게 된다. 이렇게 대전된 입자와 표적물체 사이에 인력이 작용하여 분무 입자가 부착하게 된다. 정전분무 기술은 대기

오염 연구, 작물에 대한 농약 분무, 페인트 도포 등의 다양한 분야에 사용되고 있으며, 농업 분야에서는 연구를 통해 살충제 분무 시 일반분무 방식에 비하여 더 적은 양으로 해충을 방역하는 데 효율적인 방식임을 확인하였고(Bailey, 1974), 식품산업에서는 소금, 당, 유지류를 식품에 코팅하기 위하여 연구가 진행되고 있다(Barringer과 Sumonsiri, 2015).

김치로부터 분리한 유산균의 생육 및 GABA 생산을 위한 미강배지를 개발하고 이를 프리바이오틱스 소재인 곡물을 이용한 팽화 제품에 코팅하였다. 코팅에 있어서 일반분무 방식과 정전분무 방식을 비교하기 위해 CLSM을 통하여 시각적으로 제시하였으며 에센셜 오일의 장내 유해균에 대한 항균 활성을 판별하고 장내 미생물 군총에 도움이 되는 소재를 확보하여 이를 electrostatic spray 처리한 신바이오틱스 소재를 함유하는 곡류 팽화 제품의 개발 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

본 연구에서 시료로 사용된 재료는 가정용 김치에서 분리한 균주를 사용하였다. 유산균의 배지는 *Lactobacilli* MRS broth(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였으며, 미강 추출물 배지에 사용된 미강분말은 (주)천보네추럴푸드(Icheon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 장내 미생물의 항균 활성에 사용된 혐기성 균주의 생육배지로는 reinforced clostridial broth(MBcell, Los Angeles, CA, USA)를 사용하였고, 혐기 가스 팩(Anaeropack-Anaero, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan)을 넣은 각형 케이스(rectangular jar, Mitsubishi Gas Chemical Co., Inc.)에서 배양하였다. 호기성 균주의 생육배지는 tryptic soy broth(Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였다.

곡류 및 에센셜 오일

본 연구에 사용된 곡류는 (주)지디앤와이(Goesan, Korea)에서 제공받아 사용하였으며 곡류의 혼합비율은 Table 1에 나타내었다. 에센셜 오일은 doTERRA, LLC(Pleasant Grove, UT, USA)에서 구매한 4종(*Citrus limon*, *Citrus sinensis*, *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum zeyancium*)을 사용하였다.

시약 및 기기

본 연구에서 미강 배양액의 코팅을 위한 정전분무기는 electrostatic spray gun(SE-EB, ESS, Maxcharge, Watkinsville, GA, USA)을 사용하였으며 분무 방식 비교를 위해 conventional spray(Apollo Industrial Co., Ltd., Siheung, Korea)를 이용하였다. 균체의 염색에 사용한 형광염색 시약으로는 0.1% rhodamine B(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.01% FITC(fluorescein isothiocyanate, Sigma-

Table 1. Ingredients of mixed grain powder

Source	(%)
Brown rice	65.44
Rice	16.2
Corn flour	10
Black soybean	1.285
Glutinous rice	1.285
Malt	1.285
Millet	0.128
Sorghum	0.128
Glutinous millet	0.129
Adlay	0.129
Red bean	0.129
White corvania	1.286
Black rice	0.258
Rye	0.129
Whole wheat	0.129
Oats	0.129
Mung bean	0.129
Black sesame	0.129
Barley	0.129
Lentil	0.129
Sesame	0.129
Buckwheat	1.286

Aldrich)를 사용하였고, 유산균과 곡물의 부착성 확인 및 electrostatic spray의 분무 효율을 확인하기 위해 실험에 이용된 형광현미경은 confocal laser scanning microscope (LSM 710, Kr/Ar Ion Laser, Zeiss, Jena, Germany)을 사용하였다.

유산균 분리 및 동정

본 연구에서 시료로 사용된 김치는 청주 지역의 가정용 김치를 수거하여 사용하였다. 이를 0.85% NaCl 용액을 이용해 균질화하고 십진법으로 희석한 후 MRS 배지에 평판 도말법으로 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 미색으로 변한 콜로니를 잠정적 유산균으로 선별하였으며, 이를 MRS 배지를 이용하여 순수 분리하였다. 분리한 균주는 API 50 CHL kit(bioMerieux, Marcy-l'Étoile, France)과 16s rRNA analysis를 통해 확인하여 동정하였다. 유산균으로 확인된 균주는 70%의 glycerol이 함유된 배지에 접종하여 deep freezer(ultra-low temperature freezer, MDF-192, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에 보관하여 사용하였다.

유산균의 생장 및 특성

유산균의 생장은 MRS broth에 유산균을 접종한 후 온도 별(25, 32, 37°C)로 72시간 동안 배양하면서 4시간 간격으로 spectrophotometer(Spectro Art200, Wealtec Corp., Sparks, NV, USA)를 이용해 650 nm에서 optical density를 측정하고 pH meter(720p, Istek, Inc., Seoul, Korea)를 이용해 pH를 측정하였다.

내산성 실험은 MRS broth에서 37°C, 24시간 계대 배양한 분리 유산균 1 mL를 Eppendorf tube에 넣고 원심분리기(1580R, LABOGENE Co., Ltd., Seoul, Korea)로 1,970×g에서 5분간 원심분리하였고 유산균을 회수하여 PBS buffer를 이용하여 세척한 후 pH 2, 3, 4, 6의 PBS buffer에 1 mL 접종하여 37°C에서 3시간 배양하였다. 배양 후 십진법으로 희석한 균 배양액을 MRS agar에 배양하여 콜로니 수를 측정하였다.

내담즙산 실험은 MRS broth에서 37°C, 24시간 계대 배양한 분리 유산균 1 mL를 Eppendorf tube에 넣고 원심분리기로 1,970×g에서 5분간 원심분리하였고 PBS buffer를 이용하여 세척한 후 bile salt가 0.3%, 0.6%, 1%(w/v) 함유된 PBS buffer에 접종하여 37°C에서 3시간 배양하였다. 배양 후 MRS agar에 배양하여 콜로니 수를 측정하였다.

Lactobacillus brevis CFM21의 GABA 생성량

GABA 정량법은 Zhang과 Bown(1997)의 방법을 변형하여 사용하였다. 시료의 전처리에는 Eppendorf tube에 시료 100 µL와 메탄올 400 µL를 넣고 잘 섞은 뒤 70°C로 예열된 water bath에서 1시간 이상 완전히 건조시킨다. 여기에 70 mM LaCl₃ 1 mL를 가하여 15분간 교반한 후 12,290×g에서 5분간 원심분리한 후 상등액 800 µL와 0.1 M KOH 160 µL를 혼합하여 5분간 교반한다. 이를 다시 12,290×g에서 5분간 원심분리한 후 상등액 220 µL를 0.5 M K₄P₂O₇ 220 µL와 혼합하였다.

GABA 정량 및 표준곡선 작성을 위해 Enzymatic GABase assay 법(Zhang과 Bown, 1997)을 이용하였다. 1 mM GABA, 0.5 M K₄P₂O₇, 4 mM NADP, 2.0 units Gabase/mL를 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정(initial A)하고, α-ketoglutarate를 가하여 1시간 동안 실온에서 방치한 후 흡광도를 측정(finial A)한 다음 표준곡선을 작성한 후 GABA양은 µg/mL로 나타내었다.

온도, pH, MSG 첨가에 따른 GABA 정량은 MRS broth에 10%(v/v)의 분리 균주를 접종 후 27, 32, 37°C에서 24시간 배양한 것과 1 N HCl을 첨가하여 pH가 2, 3, 4, 6인 MRS broth에 37°C에서 24시간 배양 그리고 MSG를 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0%(w/v) 첨가 후 분리 균주를 접종하여 37°C 24시간 배양한 뒤 standard curve를 이용해 GABA양을 측정하였다.

생장곡선을 통한 혼합곡물 추출물의 유산균 생육 증진 효과 검증

팽화 식품을 제조할 혼합곡물 분말이 유산균의 생육 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 혼합곡물 분말에 10배의 증류수를 가하여 55°C에서 24시간 추출한 뒤 MRS broth와 1:1로 혼합하여 사용하였다. 대조군은 MRS broth와 멸균증류수를 1:1로 혼합하여 사용하였다. 멸균식염수로 균 농도를 650 nm에서 흡광도 0.3~0.4가 되게 한 시험균액 1 mL

를 접종하여 호기 조건에서 배양을 실시하며 spectrophotometer(UV-1650PC, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)을 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

CLSM을 통한 곡물과 *Lactobacillus brevis* CFM21의 부착능 검사

Lactobacillus brevis CFM21과 혼합곡물 간의 부착성을 확인하기 위해 MRS broth에서 37°C, 24시간 배양한 후 1 mL를 Eppendorf tube에 넣고 원심분리기로 1,970×g에서 10분간 원심분리하였다. 그리고 균체를 회수하여 PBS buffer로 세척한 후 원심분리한 균체에 0.01% FITC 용액을 가하여 균질화한 후 30분간 암실에서 염색하였다. 염색이 끝나고 PBS buffer로 수세하고 원심분리하는 과정을 3회 반복하여 염색약을 제거하였다. 그 후 곡물 분말과 염색된 균체를 1분간 혼합하였다. 혼합용액에 mount 용액을 넣고 슬라이드 글라스와 커버글라스 사이에 분주하여 CLSM의 Z-stack 기능을 이용하여 표면에서부터 내부를 나누어 관찰하였다.

에센셜 오일의 항균 활성

Paper agar diffusion method를 이용한 스크리닝에는 *Clostridium perfringens*, *L. brevis* CFM21을 이용하였으며 각각 RCM broth와 MRS broth에서 3회 계대하여 균수를 10^{6-7} CFU/mL 농도로 조정된 뒤, 멸균한 RCM 및 MRS 평판배지를 60°C까지 식힌 후 각각의 균주를 부피의 2%가 되도록 접종하여 Petri dish에 15 mL씩 분주하였다. Paper disk에 20%(v/v) 농도로 희석된 에센셜 오일을 20 µL 흡수시켜 배지에 떨어지지 않게 부착시킨 다음 37°C에서 48시간 배양하였으며, 혐기균은 혐기 가스 팩을 사용하여 배양하였다.

미생물의 최소저해농도(MIC)는 broth micro-dilution method(Lee 등, 2015)를 응용하여 다음과 같이 측정하였다. 균주의 활성을 높인 배양액의 균수를 10^{5-6} CFU/mL 농도가 되도록 0.85% NaCl 용액으로 희석해 96-well plate에 100 µL씩 분주하고, 에센셜 오일을 각각 RCM broth, MRS broth와 10%(v/v)로 혼합한 후 2배씩 희석하여 최저농도까지 조정하고 96-well plate에 각각 100 µL씩 처리하여 24시간 배양한 후 에센셜 오일이 세균 증식에 미치는 영향을 650 nm에서 흡광도를 측정하여 비교 분석하였다.

미강 추출물 배지의 최적화

미강에 10배의 증류수를 가한 뒤 55°C에서 24시간 온수 추출하였다. 이를 여과지(Whatman No. 3, Whatman, Buckinghamshire, UK)를 이용하여 감압 여과하고, 고압증기 멸균하여 사용하였다.

미강 추출물에 탄소원(dextrose, fructose, sucrose, galactose) 2%(w/v), 질소원(peptone, soytone, beef extract, skim milk) 2.5%(w/v), 무기염류(potassium chlo-

ride, magnesium sulfate) 0.2%(w/v)씩 첨가한 후 고압증기 멸균하여 배지로 사용하였다. 이에 10%(v/v) 분리 균주를 접종 후 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 CFU/mL, pH 변화, GABA 생성량을 측정하였다. GABA 생성량 측정 결과 탄소원, 질소원, 무기염류에서 GABA 생성량이 가장 높은 배지를 선정하고 농도별로 첨가한 미강 추출물 배지를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 배양 후 GABA양을 측정하였다. 최적농도로 만들어진 배지에 MSG를 0~1.0%(w/v) 첨가하여 GABA양을 측정하였다.

혼합곡물 팽화 식품의 제조와 electrostatic spray 처리 후 GABA 함량 측정

혼합곡물 분말을 반죽, 성형한 뒤, 40~50°C의 건조기에서 수분함량이 18%의 중량이 될 때까지 건조시킨 후 팽화하였다. 팽화성형기는 즉석팽화기(DDP-1, Delice Co., Ltd., Seongnam, Korea)를 사용하였으며, 직경이 2 cm인 팽화판에서 가열온도 220~230°C로 제조하였다.

CLSM을 이용한 electrostatic spray 도포도 분석은 *L. brevis* CFM21 균체를 rhodamin B(Sigma-Aldrich)로 30분간 염색한 후 원심분리와 PBS buffer를 통해 3회 세척하고 팽화과자에 1 m 떨어진 거리에서 conventional spray와 electrostatic spray를 이용하여 분주한 후 CLSM을 통해 관찰하였다.

Electrostatic spray 처리에 따른 GABA 함량 측정을 위해 최적화된 배지에 균주를 10%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 5 mL 배양액을 과자로부터 1 m 떨어진 거리에서 electrostatic spray 처리하여 37°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 GABA양을 측정하였다.

에센셜 오일 혼합에 따른 GABA 함량 측정은 최소저해농도를 통해 결정한 적정농도의 에센셜 오일을 배양액에 첨가하여 electrostatic spray를 이용하여 분주한 후 37°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 측정하였다.

통계처리

실험 결과는 3회 반복 측정한 후 평균±표준편차로 나타내었으며, 통계 분석은 SPSS/Windows 18.0(IBM, Chicago, IL, USA)을 이용하여 분석하였다. 각 항목은 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)을 시행하여 Duncan's multiple range test로 신뢰수준 $P<0.05$ 에서 평균값들에 대한 그룹 간의 유의성 차이를 검증하였다.

결과 및 고찰

유산균 분리 및 동정

잠정적 유산균으로 선발된 분리 유산균의 genus와 species를 결정하기 위해 그람양성이며 간균인 균주를 API 50 CHL kit과 16s rRNA sequencing으로 동정한 결과, *L. brevis*(I.D. 99%)로 동정되었고 *L. brevis* CFM21로 명명

Fig. 1. Growth of *L. brevis* CFM21 at various temperature.

하였다.

유산균의 생장 및 특성

Lactobacillus brevis CFM21의 최적 생장도는 Fig. 1에 나타내었다. 온도별(25, 32, 37°C)로 72시간 동안 4시간 간격으로 optical density를 측정한 결과, 37°C에서 24시간까지는 optical density value가 계속 증가하다 1.574로 나타났고 25°C, 32°C는 36시간까지 증가하여 25°C에서 1.483, 32°C에서 1.547로 나타나는 것을 볼 수 있었으며 37°C에서 생장이 가장 빨랐다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 *L. brevis* CFM21의 온도별(25, 32, 37°C) pH는 5.92, 5.93, 5.95에서 72시간 이후 각각 4.47, 4.46, 4.45까지 떨어지는 것을 확인할 수 있었고, 온도별 유기산 생산 총량이 비슷한 것을 추측할 수 있었다. *L. brevis* CFM21의 내산성 및 담즙산 내성을 측정한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 대조구에서는 평균 9.29 log(CFU/mL)의 값을 나타내었고 pH가 낮아질수록 생균수가 감소하였으며, pH 3에서는 평균 6.99 log(CFU/mL) 정도의 생균수를 유지하였고 pH 2에서는 내산성을 나타내지 않은 것으로 확인되었다. 담즙산 내성은 1%에서 평균 7.26 log(CFU/mL)의 값을 나타내었으며 모든 처리구에서 대조군 대비 78%의 생존율을 나타내었다. 이는

Fig. 2. pH change of *L. brevis* CFM21 at various temperature.

Fig. 3. Acid tolerance and bile salt tolerance of *L. brevis* CFM21. Different letters above the bars are significantly different $P < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Park 등(2019)이 내담즙성에 대해 74%의 생존율을 가진 균주를 내담즙성이 우수하다고 보고한 것으로 보아 *L. brevis* CFM21도 우수한 담즙산 내성을 가지고 있는 것으로 판단하였다.

Lactobacillus brevis CFM21의 GABA 생성량

한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, Cheongwon, Korea)에서 분양받은 상업용 유산균과 분리한 유산균의 GABA양을 측정한 결과는 Table 2와 같다. 상업용 유산균 및 김치에서 분리한 GABA 생성량을 비교한 결과 *L. brevis* CFM21 균주의 GABA 생성량이 311.03 $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높아 실험에 사용하였다.

L. brevis CFM21을 pH에 따라 37°C에서 24시간 배양했을 때의 GABA 생성량은 Table 3과 같으며, GABA 생성량이 pH 3에서 44.45 $\mu\text{g/mL}$, pH 4에서 86.65 $\mu\text{g/mL}$, pH 5에서 286.51 $\mu\text{g/mL}$, pH 6에서 303.25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 나타내었다. pH가 낮아짐에 따라 GABA 생성량이 감소하는 것으로 보아 유산균의 내산성이 약해져 균의 생육이 지연되면서 GABA 생성량에도 영향을 미치는 것으로 보인다.

MSG 첨가에 따른 GABA 생성량은 Fig. 4에 나타내었다.

Table 2. GABA production of commercial lactic acid bacteria (LAB) and LAB isolated from Kimchi

Strains	Source	GABA ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCTC3164	14.48 $\pm$ 0.80 ^c
<i>Streptococcus thermophilus</i>	KCTC3658	9.97 $\pm$ 0.04 ^{cd}
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	KCTC8293	7.62 $\pm$ 1.62 ^d
<i>Lactococcus lactis</i>	KCTC3926	8.78 $\pm$ 0.73 ^{cd}
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Kimchi	6.06 $\pm$ 1.05 ^d
<i>Lactobacillus salivarius</i>	Kimchi	7.28 $\pm$ 1.82 ^d
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Kimchi	9.70 $\pm$ 1.05 ^{cd}
<i>Lactobacillus brevis</i> CFM20	Kimchi	289.75 $\pm$ 2.89 ^b
<i>Lactobacillus brevis</i> CFM21	Kimchi	311.03 $\pm$ 8.67 ^a

Data are mean $\pm$ SD from triplicate determinations. Means with different letters within a same column are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of pH on GABA content on *L. brevis* CFM21

pH	GABA ($\mu\text{g/mL}$)
3	44.55 $\pm$ 1.39 ^d
4	86.65 $\pm$ 2.89 ^c
5	286.51 $\pm$ 9.24 ^b
6	303.25 $\pm$ 2.19 ^a

Data are mean $\pm$ SD from triplicate determinations. Means with different letters within a same column are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

Fig. 4. Effect of adding MSG in *L. brevis* CFM21 on GABA content. Different letters above the bars are significantly different $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

L. brevis CFM21은 Kim 등(2013)의 연구 결과와 같이 MSG를 기질로 GABA를 생산했으며, MRS broth에 MSG를 농도별로 첨가하여 배양했을 때의 GABA 생성량은 0.8%의 MSG를 첨가했을 때 926.42 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타나 가장 높은 GABA 생성량을 확인할 수 있었다. 그리고 1%의 MSG 첨가가 0.8% 첨가보다 낮은 GABA 생성량을 보였는데, 이는 MSG의 과다 첨가가 균의 생육과 GABA 생성을 저해한다는 Binh 등(2014)의 결과와 유사한 경향을 보였다.

생장곡선을 통한 혼합곡물 추출물의 유산균 생육 증진 효과 검증

혼합곡물의 추출물에서 생장한 유산균의 생장곡선은 Fig. 5에 나타내었다. 혼합곡물 추출물에서의 배양한 3 균주 모두 control 군인 증류수와 혼합한 MRS broth보다 혼합곡물 추출물에서 더 높은 optical density 값을 나타내었다. 이를 통해 혼합곡물 분말이 유산균의 생육에 도움이 되는 것을 확인하였다. 결론적으로 혼합곡물 분말은 본 연구에서 사용 되는 *L. brevis* CFM21의 프리바이오틱스 소재로 이용될 수 있다고 사료된다.

CLSM을 통한 곡물과 *Lactobacillus brevis* CFM21의 부착능 검사

곡물 분말과 *L. brevis* CFM21의 부착성 확인 결과는

Fig. 5. Growth of lactic acid bacteria on extract of mixed grain at 37°C for 48 hours. (A) *L. brevis* CFM21, (B) *L. plantarum*, (C) *L. salivarius*.

Fig. 6. CLSM images with different focal lengths of *Lactobacillus brevis* CFM21 adhering to mixed grain powder. Scale bar=10 μ m.

Fig. 6과 같다. CLSM의 Z-stack 기능을 이용하여 균주와 곡물 분말의 혼합액을 초점거리에 따라 촬영하였다. 관찰 결과 균주는 주변 유동액 층보다 대부분 곡물 분말 주변에 부착된 것을 관찰할 수 있었으며, 커버글라스 표면부터 초점 거리에 따라 균주가 발현하는 형광의 intensity와 위치가 변하는 것을 관찰하였다. 이는 Thomas와 McMeekin(1984)의 조직이 수분을 흡수하는 과정에서 균이 부착된다는 연구 결과와 Dickson과 Koohmaraie(1989)의 미생물 세포벽의 음전하와 상대적 소수성에 의해 부착된다는 결과와 같이 곡물 분말에 유산균이 잘 부착되었다는 것을 확인할 수 있었으며, Jang 등(2006)은 균주가 담체의 표면보다는 주름진 틈 사이로 부착하거나 수분에 의해 포집되어 존재한다고 보고하였는데 곡물 표면상에만 부착된 것이 아닌 곡물의 틈 사이에도 존재하는 것을 영상으로 확인하였다.

에센셜 오일의 항균 활성

Paper disk agar diffusion assay를 통한 항균 활성 측정 결과는 Table 4, Fig. 7과 같다. 에센셜 오일의 20%(v/v) 농도에서 레몬, 바질오일은 두 균주 모두 저해 효과가 나타나지 않았으며, 시나몬오일은 *L. brevis* CFM21에서만 저해 효과가 나타났다. 그리고 오렌지는 *C. perfringens*와 *L. brevis* CFM21 모두에서 저해 효과를 나타내었으며 *C. perfringens* 생육저해환의 크기가 큰 것으로 보아 균주에 대한 항균 활성이 *C. perfringens*에서 상대적으로 더 높은 것을 확인하였다.

스크리닝을 통해 *C. perfringens*에 대한 항균 활성이 더 높은 오렌지오일의 장내 미생물에 대한 생육을 저해시키는

Table 4. Antimicrobial effect of essential oils against *L. brevis* CFM21 and *C. perfringens*

Sample	Antimicrobial effect ¹⁾	
	<i>L. brevis</i> CFM21	<i>C. perfringens</i>
<i>Citrus limon</i>	—	—
<i>Ocimum basilicum</i>	—	—
<i>Cinnamomum zeylancium</i>	++	—
<i>Citrus sinensis</i>	+++	++++

¹⁾Growth inhibition size of clear zone: —, not detected; +, smaller than 10; ++, 10~20 mm; +++, 20~30 mm; +++, more than 30 mm.

Fig. 7. Antimicrobial effect of essential oils on *L. brevis* CFM21 and *C. perfringens*. (A) *L. brevis* CFM21, (B) *C. perfringens*. 1, *Citrus limon*; 2, *Ocimum basilicum*; 3, *Cinnamomum zeylancium*; 4, *Citrus sinensis*.

Table 5. Minimum inhibitory concentration (MIC) of *Citrus sinensis* essential oil

Strains	Growth of various concentration (%)										
	10	5	2.50	1.25	0.63	0.31	0.16	0.08	0.04	0.02	0.01
<i>L. brevis</i> CFM21	— ¹⁾	—	—	+ ²⁾	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. bifidum</i> KCTC3357	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. perfringens</i> KCTC3269	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+
<i>C. difficile</i> KCTC5009	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+
<i>S. aureus</i> KCTC1916	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+

¹⁾No growth. ²⁾Growth.

최소저해농도를 측정한 결과는 Table 5에 나타내었다. 최소저해농도는 균주별로 *L. brevis* CFM21과 *B. bifidum* KCTC 3357이 2.5%, *C. perfringens* KCTC3269는 0.08%, *C. difficile* KCTC5009는 0.16%, *S. aureus* KCTC1916은 1.25%의 농도로 저해 효과가 나타나는 것을 확인하였다. Hawrelak 등(2009)의 연구 결과에서 균주에 따라 에센셜 오일에 대한 최소저해농도가 다르고 일부 에센셜 오일은 장내 유해균에 대한 최소저해농도가 유익균의 농도보다 낮은 것으로 보고되었으며, 결과를 통해 *L. brevis* CFM21과 *B. bifidum* KCTC3357을 저해하지 않고 장내 유해균을 저해할 수 있는 오렌지오일의 최소농도로 1.25%가 적합할 것으로 보인다.

미강 추출물 배지의 최적화

미강 추출물에 탄소원, 질소원, 무기염류 첨가에 따른 GABA 함량을 Table 6에 나타내었다. 탄소원은 dextrose 첨가 시 158.44 µg/mL로 GABA 생성량이 가장 높은 것을 확인하였다. 이는 Wang 등(2003)이 glucose 첨가가 GABA 생성량을 증가시킨다고 보고한 결과와 일치하였다. 질소원은 soytone을 첨가했을 때 GABA 함량이 206.48 µg/mL로 가장 높은 GABA 생성량을 보였다. Lim 등(2017)은 GABA 생산을 위해 2.5%의 beef extract, tryptone, soytone, yeast extract, peptone 등을 질소원으로 첨가하였고 tryptone을 첨가했을 때 가장 높은 GABA 함량을 나타낸다고

보고하였으나, Jeong 등(2016)은 GABA 생산 최적화를 위해 질소원으로 soytone을 첨가하였고 3%의 농도로 첨가했을 때 최대 GABA 함량을 나타낸다고 보고하였다.

무기염류는 potassium chloride를 첨가했을 때가 높은 GABA 함량을 나타내었으며, Song과 Yu(2018)는 무기염류의 첨가로 GABA 생성량이 증가한다고 보고하였다. 미강 추출물 배지를 최적화하기 위해서 dextrose, soytone, potassium chloride를 첨가하는 것이 *L. brevis* CFM21의 GABA 생성량을 증가시킬 것으로 보인다.

탄소원, 질소원, 무기염류가 첨가된 미강 추출물 배지의 GABA 생성량을 높이기 위해 MSG를 첨가한 후 배양한 결과는 Fig. 8과 같다. MSG를 첨가하지 않았을 때의 GABA 함량은 194.45 µg/mL였으며 0.6%의 MSG를 첨가했을 때 GABA 생성량이 524.77 µg/mL로 가장 높은 GABA 생성량을 확인하였다. MSG의 첨가는 GABA 생성량을 증가시킬 수 있기 때문에 최적화된 미강 추출물 배지에 0.6%의 MSG를 첨가하는 것이 고농도 GABA 생산에 필요할 것으로 보인다.

혼합곡물 팽화 식품의 제조와 electrostatic spray 처리 후 GABA 함량 측정

곡물 소재로 제조된 팽화 식품에서 *L. brevis* CFM21 배양액을 처리했을 때의 결과는 Fig. 9와 같다. Rhodamine B로 *L. brevis* CFM21을 염색한 후 (A)는 electrostatic spray, (B)는 일반분무 방식을 이용하여 팽화 식품에 처리

Table 6. Effect of additives to rice bran extract in *L. brevis* CFM21 on growth, pH, GABA content

		log CFU/mL	pH	GABA (µg/mL)
Rice bran extract pH 6.50		8.58±0.03 ^F	4.18±0.02 ^E	95.91±4.16 ^F
Carbon source	Dextrose	9.07±0.01 ^{BCb}	3.92±0.03 ^{Fb}	158.44±4.46 ^{Ca}
	Fructose	9.34±0.01 ^{Aa}	4.06±0.07 ^{Eb}	134.30±2.12 ^{Ec}
	Sucrose	8.97±0.01 ^{DEd}	4.45±0.14 ^{Da}	147.72±1.60 ^{Db}
	Galactose	9.02±0.01 ^{Cdc}	4.06±0.08 ^{Eb}	129.22±6.05 ^{Efc}
Nitrogen source	Peptone	8.98±0.06 ^{DEb}	5.34±0.13 ^{Aa}	164.45±4.46 ^{Cc}
	Soytone	8.97±0.01 ^{DEb}	5.10±0.9 ^{Bb}	206.48±2.12 ^{Aa}
	Beef extract	9.12±0.01 ^{Ba}	4.85±0.08 ^{Cc}	176.41±3.67 ^{Bb}
	Skim milk	8.96±0.07 ^{Eb}	4.99±0.03 ^{BCbc}	172.24±6.05 ^{Bb}
Mineral source	Magnesium sulfate	9.07±0.03 ^{BC}	4.49±0.08 ^D	125.98±2.89 ^{E***}
	Potassium chloride	8.97±0.01 ^{DE}	4.57±0.04 ^D	174.55±4.46 ^{B***}

Data are mean±SD from triplicate determinations.

Different capital letters in the same items indicate a significant difference ($P<0.05$).

Different small letters in the same items indicate a significant difference ($P<0.05$) among source.

Asterisk letters in the same items indicate a significant difference ($***P<0.001$).

Fig. 8. Effect of adding MSG on GABA content in rice bran extract medium. Different letters above the bars are significantly different $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Fig. 10. GABA contents of puffed grain snack after conventional spray and electrostatic spray treatments. Different letters above the bars are significantly different $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Fig. 9. CLSM images showing the spilt image of *Lactobacillus brevis* CFM21 adhering to puffed grain snack. (A) Electrostatic spray, (B) Conventional spray. Scale bar=10 µm.

했을 때의 결과이다. (A)와 (B)의 결과를 비교했을 때 electrostatic spray 처리가 일반분무 방식보다 균주의 부착량이 많고 고르게 분포하고 있는 것을 확인하였다. Gorty와 Barringer(2010)는 액체 표면이 정전기적으로 대전되어 매우 작은 액체 방울을 형성하며 액체 방울 사이의 반발력에 의해 응집되는 것을 방지하여 분산이 균일하게 이루어진다고 보고하였는데, 실험 결과를 볼 때 일반적인 분무 방식으로 처리했을 때 물방울이 응집하여 균주들이 고르게 분포되지 못한 것으로 보인다.

분무 방식에 따른 GABA 함량은 Fig. 10에 나타내었다. 일반분무 방식으로 최적화 미강 발효액을 처리 시에는 GABA 함량이 61.21 µg/g이었으며 electrostatic spray로 처리 시에는 115.34 µg/g으로 증가하였다. 최적화 미강 발효액에 오렌지 에센셜 오일을 첨가했을 때의 GABA 함량은 Table 7과 같다. 실험 결과 GABA 함량이 3.24 µg/g 감소했지만

Table 7. Effect of adding *Citrus sinensis* oil in optimized culture on GABA content of puffed grain snack

	GABA content (µg/g)
Before addition	115.34±2.78
After addition	112.10±2.12

유의적인 차이가 없었다. 따라서 electrostatic spray 처리가 팽화 제품에 대한 에센셜 오일의 분무에 대해 효과적이며, GABA 함량에 큰 영향 없이 에센셜 오일의 첨가가 가능할 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 다양한 생리활성을 가진 GABA를 함유하며 장내 미생물에 유익한 영향을 줄 수 있는 synbiotic 소재를 함유하는 곡류 팽화 제품을 개발하고자 하였다. 김치에서 분리한 유산균 동정을 위해 API 50 CHL kit에서 당 발효 실험을 진행하여 API web program에 입력한 결과 *L. brevis*로 판명되었으며, 정확한 species 확인을 위해 16s rRNA sequencing을 진행한 결과 *L. brevis*(I.D. 99%)로 동정되어 *L. brevis* CFM21로 명명하였다. 최적 성장조건을 확인하기 위해 *L. brevis* CFM21을 MRS broth에서 배양한 결과 37°C, 24시간이었다. 균주의 GABA 생산량은 311.03 µg/mL였으며 전구체인 MSG를 0.8%(w/v) 첨가했을 때 926.42 µg/mL의 최대 생산량을 보였다. 프로바이오틱스 특성 실험 결과 pH 2에서 내산성을 나타내지 않았으며, 담즙산 내성은 확인되었다. 팽화 제품의 제조에 이용되는 곡물 소재를 열수 추출한 후 분리 균주와 배양하여 생육증진 효과를 확인하였으며, CLSM의 Z-stack 기능을 이용하여 곡물 소재에 균주가 부착한다는 것을 시각화하여 곡물 소재의 프리바이오틱스 특성을 확인하였다. 4종의 에센셜 오일을 10%(v/v)의 농도에서 paper agar diffusion method로 항균 활성을 나

타내는 *Citrus sinensis* oil을 선별하였으며, 5종의 균주에 대해 최소저해농도를 측정했을 때 *C. perfringens* 균에 대해 가장 높은 항균 활성을 확인하였고 1.25%(v/v)를 장내 유해균을 선택적으로 억제할 수 있는 농도로 선정하였다. 미강 추출물에 탄소원으로 dextrose 2%(w/v), 질소원으로 soytone 2.5%(w/v), 무기염류로 potassium chloride 0.2%(w/v)를 첨가하여 배지로 사용하였으며, 고농도 GABA 생산을 위해 MSG를 첨가한 결과 0.6%(w/v)의 농도로 첨가했을 때 524.77 µg/mL로 가장 높은 GABA 생성량을 확인하여 최적화 배지로 사용하였다. 최적화 미강 배지에 *L. brevis* CFM21을 배양시켜 고농도의 GABA를 생산하였으며, 장내 유해균 억제를 위해 선별한 *Citrus sinensis* oil을 첨가하여 곡물 소재 팽화 제품에 적용하였다. Electrostatic spray 처리를 통해 팽화 제품에 적용한 결과 GABA 함량이 10.78 µg/g에서 112.10 µg/g으로 증가하였다. 결론적으로 본 실험에서는 유익균 증진 활성을 지니는 곡물 소재를 이용한 팽화 제품에 electrostatic spray 처리로 *L. brevis* CFM21과 미강 배지를 통해 생산한 GABA 및 *Citrus sinensis* oil을 코팅함으로써, 장내 미생물 군총의 균형 유지에 도움이 되는 synbiotic 기능성을 지닌 제품의 제조 가능성을 확인하였다.

감사의 글

이 논문은 중소벤처기업부에서 지원하는 2020년도 창업성장 기술 개발사업(S2800917)의 연구수행으로 인한 결과물임을 밝힙니다.

REFERENCES

- Alvarez-Román R, Naik A, Kalia YN, Fessi H, Guy RH. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004. 58:301-316.
- Bailey AG. Electrostatic atomization of liquids. *Sci Prog.* 1974. 61:555-581.
- Barringer SA, Sumonsiri N. Electrostatic coating technologies for food processing. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2015. 6: 157-169.
- Binh TTT, Ju WT, Jung WJ, Park RD. Optimization of γ -aminobutyric acid production in a newly isolated *Lactobacillus brevis*. *Biotechnol Lett.* 2014. 36:93-98.
- Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect.* 2014. 44:1-8.
- Choi HJ. Recent advances on next-generation probiotics linked to the gut microbiome. *Food Sci Ind.* 2019. 52:261-271.
- Choi YS, Bahn JH, Jeon SG, Chung YM, Hong JW, Ahn JY, et al. Stimulatory effect of ginsenosides on bovine brain glutamate decarboxylase. *J Biochem Mol Biol.* 1998. 31:233-239.
- Dassanayake LSK, Kodali DR, Ueno S, Sato K. Physical properties of rice bean wax in bulk and organogels. *J Am Oil Chem Soc.* 2009. 86:1163-1173.
- de Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008. 111:1-66.
- den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 2013. 54:2325-2340.
- Dickson JS, Koohmaraie M. Cell surface charge characteristics and their relationship to bacterial attachment to meat surfaces. *Appl Environ Microbiol.* 1989. 55:832-836.
- Fitzgerald DJ, Stratford M, Nisbaid A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *Int J Food Microbiol.* 2003. 86:113-122.
- Gorty V, Barringer SA. Electrohydrodynamic spraying of chocolate. *J Food Process Preserv.* 2010. 35:542-549.
- Gourbeyre P, Denery S, Bodinier M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol.* 2011. 89:685-695.
- Hawrelak JA, Cattley T, Myers SP. Essential oils in the treatment of intestinal dysbiosis: a preliminary *in vitro* study. *Altern Med Rev.* 2009. 14:380-384.
- Inoue K, Shirai T, Ochiai H, Kasao M, Hayakawa K, Kimura M, et al. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives. *Eur J Clin Nutr.* 2003. 57:490-495.
- Jakobs C, Jaeken J, Gibson KM. Inherited disorders of GABA metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 1993. 16:704-715.
- Jang KI, Chung DH, Ha SD, Kim KS, Lee KH, Kim MG, et al. Assessment of inactivation for *Salmonella* spp. on chicken meat using confocal laser microscopy and flow cytometry. *Korean J Food Sci Technol.* 2006. 38:290-294.
- Jeong MK, Jeong JH, Kim KY. Optimization of γ -aminobutyric acid production using *Lactobacillus brevis* spp. in *Darae* sap. *Korean J Food Sci Technol.* 2016. 48:214-222.
- Kahlon TS, Chow FI, Sayre RN, Betschart AA. Cholesterol-lowering in hamsters fed rice bran at various levels, defatted rice bran and rice bran oil. *J Nutr.* 1992a. 122:513-519.
- Kahlon TS, Saunders RM, Sayre RN, Chow FI, Chiu MM, Betschart AA. Cholesterol-lowering effects of rice bran and rice bran oil fractions in hypercholesterolemic hamsters. *Cereal Chem.* 1992b. 69:485-489.
- Kim JB, Bae HS, Kim KH, Moon SW, Nam GJ, Kwon NI. Analysis of a processed sample surface using SCM and AFM. *J Kor Soc Prec Eng.* 2006. 23:52-58.
- Kim OJ, Lee JK, Woo YM, Choi ST, Park MY, Kim A, et al. Sleep-induction effects of GABA coated rice from fermentation of mono sodium glutamate. *Appl Chem Eng.* 2013. 24: 605-610.
- Kim SI, Park C, Ohh MH, Cho HC, Ahn YJ. Contact and fumigant activities of aromatic plants extracts and essential oils against *Lasioderma serricornis* (Coleoptera: Anobiidae). *J Stored Prod Res.* 2003. 39:11-19.
- Kinoshita N, Gelboin HV. Beta-glucuronidase catalyzed hydrolysis of benzo(a)pyrene-3-glucuronide and binding to DNA. *Science.* 1978. 199:307-309.
- Lee S, Lee SH, Park EJ. Antimicrobial and antioxidant activities of ethanol leaf extract of *Dendropanax moribiferus* Lev.. *Korean J Food Cook Sci.* 2015. 31:515-523.
- Lim HS, Cha IT, Roh SW, Shin HH, Seo MJ. Enhanced production of gamma-aminobutyric acid by optimizing culture conditions of *Lactobacillus brevis* HYE1 isolated from Kimchi, a Korean fermented food. *J Microbiol Biotechnol.* 2017. 27:450-459.
- Manyam BV, Katz L, Hare TA, Kaniefski K, Tremblay RD. Isoniazid-induced elevation of CSF GABA levels and effects on chorea in Huntington's disease. *Ann Neurol.* 1981. 10:35-37.
- Oh SH, Moon YJ, Oh CH. γ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2003. 8:75-78.

- Okada T, Sugishita T, Murakami T, Murai H, Saikusa T, Horino T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration. *J Jpn Soc Food Sci Technol*. 2000. 47:596-603.
- Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2007. 18:414-420.
- Park HJ, Oh HH, Jeong DY, Kim YS. Probiotic characteristics of *Bacillus tequilensis* JBC17126 isolated from Korean traditional soybean paste. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2019. 48: 710-717.
- Park KB, Oh SH. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresour Technol*. 2007. 98:312-319.
- Schnitzler P, Koch C, Reichling J. Susceptibility of drug-resistant clinical herpes simplex virus type 1 strains to essential oils of ginger, thyme, hyssop, and sandalwood. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007. 51:1859-1862.
- Song HY, Yu RC. Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk. *J Food Drug Anal*. 2018. 26:74-81.
- Thomas CJ, McMeekin TA. Effect of water uptake by poultry tissues on contamination by bacteria during immersion in bacterial suspensions. *J Food Prot*. 1984. 47:398-402.
- Wang JJ, Lee CL, Pan TM. Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2003. 30:669-676.
- Zhang G, Bown AW. The rapid determination of γ -aminobutyric acid. *Phytochem*. 1997. 44:1007-1009.