



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2008년12월02일  
(11) 등록번호 10-0871398  
(24) 등록일자 2008년11월25일

(51) Int. Cl.  
C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-0046175  
(22) 출원일자 2007년05월11일  
심사청구일자 2007년05월11일  
(65) 공개번호 10-2008-0100068  
(43) 공개일자 2008년11월14일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR100661824 B1\*  
Food Sci. Biotechnol. Vol.15, No.1, pp.86-90 (2006)  
J. Microbiol. Biotechnol. (2007) 17(1), pp.104-109  
J. Dairy Sci. 85:1793-1800 (2002)  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
우석대학교 산학협력단  
전라북도 완주군 삼례읍 후정리 490 우석대학교내  
(72) 발명자  
오석홍  
전북 전주시 덕진구 호성동1가 진흥더블파크 107동 1003호  
박기범  
전북 군산시 나운2동 금호타운아파트 103동 407호  
석재환  
서울 동작구 상도4동 260-1 청운빌라 402호  
(74) 대리인  
황이남

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김준경

**(54) 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주 및 이를 함유하는발효유**

**(57) 요약**

본 발명은 GABA 생산능이 우수한 균주인 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주, 이를 함유하는 발효유에 관한 것으로, 본 발명은 감마-아미노부티르산 생산능이 우수한 균주인 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주를 감마-아미노부티르산 성분이 있는 발아현미 추출액이 함유된 배지에 접종하여 배양함으로써, 감마-아미노부티르산이 다량 함유된 발효유를 제조할 수 있다. 본 발명에 의한 발효유는 정신집중, 기억력강화 등의 효과가 있는 GABA를 고함유로 함유하고 있어 한창 공부할 시기의 어린이 및 청소년들이 정신집중, 기억력강화 등의 능력을 강화할 수 있도록 하여 학습에 도움을 줄 수 있다.

**대표도 - 도1**

```

NGEMNTCCAGETCDGGCCGCATGGDGGCCGGGAAATTCGATTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAAACGCTGGGGC
GTGCTAATACATGCAAGTGGAAACGGGTCTCGGTGATGATTTGAGGTGCTTGCACCTGAAAGATTTAACATTGAGACGA
GTGGDGAACCTGGTGAATAACACGTTGGTAACCTGCCCTTGAAGTAGGGGATAAACACTTGGAAAACAGGTGCTAATACGFTA
TAACAACCAAAAACCACTGGTTTTGGTTAAAAAGACGGCTTCGGCTGTCACTTTAGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTT
GTTGGTAAGGTAAADGGCTTACCAAAGCGATGATADFTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
GGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAADGCGCGTGAGTG
ATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAACAGGTGTCAAGAGTAACTGTTGACATCTTGACCGTATCC
AACGAGAAAACCAAGGCTAACTACGTGCCAGCAAGCGGGTAATACGTAAGTGGCAAAGGTTGTCCGGATTATTGGGCG
TAAAGCGAGCGCAGCGGTTTTTTAGTCTGATGTGAAAACGCTTGGCTTAAACGGAGAAAGTGCATCGAAAACCGGGAGA
CTTGAGTGCAGAAAGGACAGTGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAACACACAGTGGCGAAG
GCGGCTGTCTGGTCTGTAACTGACGCTGANGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAAGATACCCCTGGTAGTCCATGC
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGMTTGGAGGGTTTCCCGCCCTTCAGTGTGTCAGCTAAGGCATTAAAGCACTCCGCCNNGG
GGAGTACNANCCGCAAGGTTGAAC
    
```

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주(KFCC 11386P).

**청구항 2**

락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 α-아밀라아제로 처리한 발아현미 추출액이 함유된 배지, 또는 전지분유, 탈지분유, 수용성 칼슘의 혼합물에 접종하여 배양한 배양물을 함유한 발효유.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 균주를 α-아밀라아제로 처리한 발아현미 추출액이 함유된 배지, 또는 전지분유, 탈지분유, 수용성 칼슘의 혼합물에 추가로 접종하는 것을 특징으로 하는 발효유.

**청구항 4**

발효유 제조에 있어서,

락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 α-아밀라아제로 처리한 발아현미 추출액이 함유된 배지에 접종하여 배양한 배양물을 스타터로 사용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 스트렙토코커스 써모필러스, 락토바실러스 플란타럼 중에서 선택된 어느 하나 이상의 균주를 α-아밀라아제로 처리한 발아현미 추출액이 함유된 배지에 추가로 접종하는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

제4항에 있어서, 배지는 글루탐산나트륨(monosodium glutamate) 0.1~1중량%를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

- <3> 본 발명은 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주 및 이를 함유하는 발효유에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 GABA 생산능이 우수한 균주인 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주, 이를 함유하는 발효유에 관한 것이다.
- <4> 요구르트는 우유를 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속이나 비피도박테리움(*Bifidoabcterium*)과 같은 젖산균으로 발효시켜 산미와 향미를 강화시킨 것이다. 또한, 요구르트는 주원료인 우유 성분 외에 젖산균의 대사산물인 각종 유기산, 펩톤(peptone), 펩타이드(peptide) 및 기타 미량 활성물과 젖산균체 그리고 젖산균의 장내증식에 의한 정장작용 등으로 인해 식품 영양학적으로 매우 우수한 식품이다.
- <5> 우리나라 유가공 업체에서는 요구르트 제조에 3~4% 정도의 탈지분유를 첨가하거나, 전지분유나 탈지우유를 농축하여 유고형분 함량을 높이고 있다. 또한, 탈지분유 등 유제품의 첨가 이외에도 대두 단백질, 곡류, 고구마, 호박, 매실 등의 첨가와 펙틴이나 과육을 첨가하기도 하며, 발효기질로는 우유 이외에 썩, 다시마 등을 이용하

여 새로운 젓산 음료를 개발하려는 시도가 이루어지고 있다.

- <6> GABA는 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질로 작용하는 것으로 알려진 비단백태 아미노산이다. GABA는 동물의 경우 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 향진시키며, 프로락틴(prolactin)의 분비, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하며, 혈압강하 및 통증완화 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 관심이 높은 물질이다.
- <7> 미생물을 이용한 GABA 관련 연구에서 효모의 일종인 홍국을 이용한 GABA 생산 및 균주개량을 통한 활용연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 또한, *Lactobacillus* strain을 이용한 산업적 및 기능성 소재로서 GABA 생산을 목적으로 한 균주 분리 및 대량 생산의 시도가 이루어진 바 있다. 그러나 GABA 고생산 균주를 이용한 유제품 생산에 대한 시도는 아직 미미한 실정이다.
- <8> 따라서 본 발명에서는 GABA 고생산 균주를 이용하여 발효시킨 요구르트가 보통 유산균 음료보다 영양기능성이 증진되면서 GABA를 섭취할 수 있기에 이 요구르트 제조 방법을 개발하고자 하였으며, 그 일부 특성을 조사하였다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

- <9> 본 발명은 GABA 생산능이 우수한 균주인 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <10> 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 발아현미 추출액이 함유된 배지에 접종하여 배양한 배양물을 함유한 발효유 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**발명의 구성 및 작용**

- <11> 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 제공한다.
- <12> 본 발명은 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 발아현미 추출액이 함유된 배지 또는 원유에 접종하여 배양한 배양물을 함유한 발효유를 제공한다.
- <13> 본 발명은 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 발아현미 추출액이 함유된 배지에 접종하여 배양한 배양물을 스타터로 사용하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 발효유의 제조방법을 제공한다.
- <14> 이하 본 발명의 내용을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- <15> 본 발명은 영양기능성이 증진된 요구르트를 제조하기 위해 GABA 생성능이 좋은 유산균 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주(KFCC 11386P)를 제공한다.
- <16> 본 발명은 GABA 고 함유 요구르트를 만들기 위해 발효스타터용 균주를 원유로부터 분리하여 동정하고, GABA 생산량이 좋은 균주를 선별하였다.
- <17> 본 발명에서 기능성과 영양성이 증진된 요구르트 개발의 일환으로 감마-아미노부티르산( $\gamma$ -aminobutyric acid: GABA) 고 함유 요구르트를 제조하기 위하여 원유로부터 GABA 고 생산 균주를 분리하였다.
- <18> 본 발명에서 분리된 GABA 고 생산 균주는 16s rDNA 염기서열을 분석을 통해 동정하였으며, 최종 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2로 명명하였다. 상기 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주는 2007년 4월 24일자로, 한국미생물보존센터에 기탁번호 KFCC 11386P로 기탁하였다.
- <19> 본 발명은 상기 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주를 MRS 액체 배지(broth)에 접종하여 요구르트 제조시에 스타터로 사용할 수 있다.
- <20> 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주는 원유로부터 분리된 것으로서 MRS 액체 배지에 MSG 5% 처리 후, GABA 생산량이 5,008 nmol/ml로 나타나 공지 균주보다 GABA 생산능이 현저히 높은 것으로 나타난다. 따라서 고농도의 GABA를 함유한 발효유 제조를 위한 발효스타터 제조 시 사용할 수 있다.
- <21> 본 발명은 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주를 발아현미 추출액이 함유된 배지 또는 원유에 접종하여 배양한 배양물을 함유한 발효유를 제조할 수 있다.
- <22> 또한, 본 발명은 발효유의 제조시 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주를 발아현미 추출액이 함유된 배지에 접종

하여 배양한 배양물을 스타터로 사용할 수 있다.

- <23> 본 발명은 감마-아미노부티르산 생산능이 우수한 균주인 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주를 감마-아미노부티르산 성분이 있는 발아현미 추출액이 함유된 배지에 접종하여 배양함으로써, 고농도의 GABA를 함유한 발효유를 제조할 수 있다.
- <24> 발아현미 추출액은 현미를 발아시킨 뒤 물을 4~5부피로 가한 후 멸균한 후 여과(filtration)하여 발아현미 추출액을 제조할 수 있다. 상기 여과한 발아현미 추출액에  $\alpha$ -아밀라아제( $\alpha$ -amylase)를 처리농도  $2 \pm 0.5\%$ (V/V)로 처리하여 발효기질로 사용할 수 있다.
- <25> 상기  $\alpha$ -아밀라아제( $\alpha$ -amylase)는 발아 현미에 포함된 아밀로오스의  $\alpha$ -1,4 결합을 분해하여, 소화흡수를 용이하게 한다.
- <26> 또한, 상기 발아현미 추출액은 글루탐산 나트륨(monosodium glutamate: MSG) 0.1~5중량%를 포함하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 0.1~1중량%를 포함하는 것이 바람직하다.
- <27> 본 발명은 상기 발아현미 추출액에 전지분유, 탈지분유 및 수용성 칼슘을 첨가하여 블랜더로 균질화한 후 멸균하고, 상기 멸균한 기질을 37°C로 식힌 다음 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주를 접종하여 발효유를 제조할 수 있다.
- <28> 상기에서 발아현미 추출액 1ℓ 당 전지분유 10~20중량%, 탈지분유 1~5중량%, 수용성 칼슘 1~2중량%를 첨가하는 것이 바람직하다.
- <29> 상기에서, 발효유의 제조에 있어서, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 중에서 선택된 어느 하나 이상의 균주를 추가로 함유할 수 있다.
- <30> 본 발명의 락토바실러스 부크네리 OPY-2 균주를 이용한 농후발효유는 GABA 함유량이 일반 시중에 유통되는 농후발효유의 GABA 함량보다 현저하게 높은 것으로 나타났다. 또한, 관능성 평가에서도 본 발명의 GABA 고 함유 농후발효유도 모두 양호한 결과가 나왔으므로, 본 발명에 의한 발효유의 제조방법은 관능성과 영양기능성을 증진시킬 수 있는 것으로 평가된다.
- <31> 본 발명에 의한 발효유는 정신집중, 기억력강화 등의 효과가 있는 GABA를 고함유로 함유하고 있어 한창 공부할 시기의 어린이 및 청소년들이 정신집중, 기억력강화 등의 능력을 강화할 수 있도록 하여 학습에 도움을 줄 수 있다.
- <32> 이하 본 발명의 내용을 실시예에 의해 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 이들 실시예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 이들 실시예에 한정되는 것으로 해석되는 것은 아니다.
- <33> <실시예 1> 발효 스타터 균주 분리
- <34> 원유를 멸균수로 10배 희석하였다. 상기 희석액을 GABA 고생산 유산균의 분리 및 계수를 위해 1% 펩톤수를 사용하여  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-8}$  농도로 희석하고, 그 희석액 1mℓ를 취하여 평판계수용 아가(PCA)로 37°C에서 48시간 배양하여 나타난 콜로니를 총 균수로 하였다. 총균수의 측정과 동일한 방법으로 MRS 브로스에 0.002% 브롬페놀블루를 첨가한 배지에 25°C에서 72시간 상기 샘플 희석액을 배양하여 나타난 콜로니를 관찰하고, 환이 없고 짙은 청색을 띠는 것을 류코노스톡(*Leuconostoc*)으로 계수하였고 환이 있거나 청색 또는 흰색을 띠는 콜로니를 락토바실러스로 구분하여 계수하였다.
- <35> 상기 선별된 균주들은 1차적으로 TLC를 이용하여 균주의 GABA 생산성 유무를 측정하였다. TLC 전개 용매는 부탄올:아세트산:물 4:1:1로 하여 준비하였으며, 닌히드린 염색법을 이용하여 염색하여 확인하였다. 표준시약은 시그마 표준품을 사용하였으며, TLC의 전개시간은 대략 30분 정도로 하였다. TLC를 이용한 1차 선별실험결과 콜로니에서 GABA를 생성하는 것으로 확인된 샘플은 2차 선별용 샘플로서 준비하였다.
- <36> 상기 2차 선별용 샘플을 다시 MSG를 각각 1%, 3%, 5% 처리하여 아미노산 자동 분석기를 이용하여 GABA 함량을 측정하였다. GABA의 형광유도체화를 위해 AccQ Fluor 시약을 사용하였으며, 이들 유도체의 분리를 위해 AccQ Tag 칼럼을 사용하였다. GABA 분석에 있어서의 최종시료는 아미노산 자동분석에 필요한 시료의 순도를 감안하여 0.45 $\mu$ m PVDF 필터(Millipore)를 이용하여 여과한 후 분석에 사용하였다.
- <37> 그 결과 GABA 함량이 가장 높은 균주인 OPY-2를 선별하였다.

<38> <실시예 2> 균주의 동정

<39> 실시예 1에서 선발 균주로부터 PCR을 위한 주형(template) DNA로 게놈(genomic) DNA를 정제하여 사용하였으며, 이를 위해 프로메가(Promega, Madison, Wisconsin, USA)의 Wizard DNA 정제 키트를 사용하였고, DNA 정제 절차는 제조사의 매뉴얼에 따랐다. PCR 기기는 바이오메트라(Biometra, Tampa, Florida, USA)의 제품을 사용하였고, TA 클로닝 키트는 프로메가(Promega) 회사의 제품을 사용하였으며, DNA 폴리머라아제(polymerase)는 다카라의 제품(Takara Biochemicals, Japan)를 사용하였고, MRS 액체배지는 디프코의 제품(Difco, Detroit, MI, USA)을 이용하였다. 그 외에 시약들은 특급 제품을 사용하였다.

<40> 분리 균주의 16s rDNA를 클로닝하기 위하여 사용한 프라이머(primers)는 표 1과 같다. PCR 반응은 주형 DNA 100ng, 각 프라이머 200ng, dNTPs 0.2mM, MgCl<sub>2</sub> 2.0 mM, KCl 50mM, 0.1% Triton X-100를 포함하는 10mM Tris-HCl(pH 9.0) 반응액을 이용하여 95℃ 5분, 95℃ 30초, 43℃ 30초, 72℃ 1분 30초간 반응시키는 변성(denaturation), 어닐링(annealing), 신장(extension)의 30 사이클을 수행하였다. PCR 산물의 생성은 1% 아가로스 젤(agarose gel) 전기영동을 실시하여 확인하였고, 증폭된 DNA 단편을 TA 클로닝 벡터인 pGEM T-Easy 벡터(Takara)에 T4 연결효소(ligase)로 연결(ligation) 하였다.

<41> 상기 클로닝 되어진 16s rDNA 염기서열 분석은 합성 올리고뉴클레오타이드 프라이머(oligonucleotide primers)와 dsDNA Cycle System (Perkin Elmer, USA)을 이용한 디데옥시뉴클레오타이드 말단 처리(dideoxynucleotide termination procedures)에 의하여 실시하였다. 염기서열에 다른 아미노산 서열은 DNASIS 프로그램(Hitachi Software Engineering Co, USA) 및 Clustal W(1.81)를 이용하여 분석하였다.

<42> <표 1> 게놈 DNA(genomic DNA)로부터 16s rDNA의 PCR 증폭(amplification)을 위한 프라이머

Primer	Sequence	%GC
Forward(20mer)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	45.0
Reverse(15mer)	ACGGGCGGTGTGTRC	66.7

<44> 본 발명에서 분리된 유산균의 품종(strain) 및 특성을 알아보하고자 API 테스트를 통하여 생화학적 특성을 조사한 결과 *Lactobacillus* strain이라는 것을 알 수 있었으며, 특성은 표 2와 같다.

<45> 또한, 게놈 DNA를 분리하여 16S rDNA 서열분석을 실시하였으며, 그 결과는 도 1과 같다. 선발된 균주의 16s rDNA 염기서열은 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) 유전자의 16S ribosomal RNA gene, 단편 염기서열(partial sequence) (Access No. AB205055)과 99% 상동성을 보였으며, *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 16S ribosomal RNA gene, 단편 염기서열(partial sequence) (Access No. DQ987924)과 99% 상동성을 보여서 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2로 명명하였다.

<46> <표 2> *Lactobacillus buchneri* OPY-2(KFCC 11386P)의 특성

Characteristics	OPY-2
Gram staining	+
Form	Rod type
Spore production	-
Gas production ability in glucose broth	CO <sub>2</sub> production
Catalase production	-
glucose	+
Ribose	+
galactose	+
Fructose	+
Maltose	+
sucrose	+
Xylose	-
glycerol	+
Starch	-
Acetic acid	-

arabinose	+
melezitose	+
Melibiose	+
xylose	+
cellobiose	-
trehalose	-
Viability at 15℃	+
Viability at 45℃	-
Viability at 50℃	-
Size	1.0-1.5 $\mu$ m

<48> <실시예 3> 선발된 균주의 GABA 생성능

<49> 선발된 균주의 GABA 생성능을 검토하기 위하여 MRS 배지에 MSG 5중량%의 기질 농도에서 GABA 생성량을 공지 균주와 비교해본 결과 5008.17 (nmol/ml)의 생산량을 나타내어 공지 균주에 비하여 월등히 생성능이 높았다(표 3).

<50> <표 3> 락토바실러스 균주(*Lactobacillus* strains)의 GABA 생산량 비교.

Strain	GABA content(nmol/ml)
<i>Lactobacillus buchneri</i> OPY-2	5008.17
<i>Lactobacillus plantarum</i> kctc3103	30.09
<i>Lactobacillus brevis</i> kctc 41028	2.09
<i>Lactobacillus brevis</i> kctc 41029	5.15

<52> <실시예 4> 발효기질

<53> 전지우유와 탈지분유는 S사서 생산된 트리페닐 테트라졸리움 클로라이드(triphenyl tetrazolium chloride) 검사가 음성인 제품을, 발아현미 추출액은 본 실험자의 실험실에서 자체 제조한 추출액을 활용하였다. 즉 현미를 발아시킨 뒤 물을 4부피로 가한 후 고압멸균기(Autoclave)를 이용하여 121℃, 1.5기압으로 20분 동안 멸균하였다. 멸균된 샘플을 여과(filtration)한 후, 여과액에  $\alpha$ -아밀라아제( $\alpha$ -amylase)를 처리농도 2%(V/V)로 처리하여 발효기질로 사용하였다. 이렇게 준비된 발아현미 추출액에 글루탐산나트륨(monosodium glutamate: MSG) 0.1중량%를 첨가하여 사용하였다.

<54> <실시예 5> 스타터(starter) 제조

<55> 본 연구실에 보관중인 스트렙토코커스 썬모필러스(*Streptococcus thermophilus*)와 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) (KCTC 3105)과 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2(KFCC 11386P)를 MRS 액체 배지에 각각 접종(4%, v/v)하고 37℃에서 24시간 동안 3회 계대배양 하여 요구르트 제조 시에 스타터(starter)로 사용하였다.

<56> <실시예 6> 요구르트의 제조

<57> 실시예 4에서 준비한 발효기질 1ℓ에 전지분유 18중량%, 탈지분유 2중량%, 수용성 갈슘 2중량%를 첨가한 후, 블렌더(Waring blender)로 5분간 균질화 시킨 후, 멸균기(Autoclave)로 121℃로 20분간 살균하였다. 살균된 기질을 37℃로 방냉한 후, 젖산 균주를 스트렙토코커스 썬모필러스(*Streptococcus thermophilus*) + 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) + 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주(1:1:3, v/v/v)의 혼합 균주로 접종(4%, v/v)하고 37℃에서 발효시켰다.

<58> <시험예 1> 생균수 측정

<59> 생균수는 스타터(starter) 접종 후 4시간 간격으로 시료를 1ml씩 회수하여 멸균 생리식염수로 10배 희석법으로 희석하였다. 그리고 0.1ml를 마이크로파이펫(micropipette)으로 MRS 아가 평판 배지에 도말하고 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양하여 나타난 콜로니를 계수하여 단위를 CFU(colony forming unit)/ml로 나타내었다(표 4). 요구르트의 배양시간별 생균수를 측정한 결과 접종 초기에는 생균수가 낮았으나, 16시간에서부터 20시간 사이에 생균수 증가가 뚜렷하였다.

<60> <표 4> 생균수 측정

<61> (CFU/ml)

<62>

	fermentation time(hr)						
	0	4	8	12	16	20	24
GABA yogurt	-	-	$2.1 \times 10^8$	$3.7 \times 10^8$	$4.9 \times 10^9$	$4.5 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$

<63> <시험예 2> 요구르트의 GABA 함유량 측정

<64> GABA 함유량 측정은 Oh 등(2004)의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 시료 중의 GABA 함량을 측정하기 위해 저온보관된 샘플로부터 유기용매 혼합액을(메탄올:클로로포름:3차 증류수=12:5:3) 가하여 섞어준 다음 GABA를 포함하는 수용액 층은 원심분리하여 얻었고, 그 얻은 것을 다시 원심분리하여 불순물을 제거하였다. 상기에서 수득한 상등액을 동결건조 하여 소량의 물로 녹여준 후 0.45µm PVDF 필터로 여과하여 분석에 사용한다. GABA의 형광 유도체화를 위하여 AccQ·Tag Reagent를 사용하였으며, 이들 유도체 분리를 위해 3.9×150mm AccQ·Tag™ (Nova-Pak™ C18, Waters) 컬럼(column)을 사용하였다. GABA 함량은 표준 GABA의 결과와 비교하여 산출하였다.

<65> 본 발명에서 최종 제품인 GABA 요구르트의 GABA 함유량은 건조 분말당 함량을 조사해본 결과 526.5µg/g F.W의 (표 5) 결과를 볼 수 있었는데, 그 결과 기준에 시중에 유통되는 요구르트와 비교하였을 때 500배 이상 높은 함량으로서 비교되었다. 또한, 일반 시중요구르트에 비해서 유리 아미노산 함량이 여러 종류가 함유되어 있다(도 2).

<66> <표 5> GABA 함유량 비교

<67>

product name	GABA yogurt	M company	N company	B company
GABA함량(µg/g F.W)	526.5	1.29	1.33	0

<68> <시험예 3> 요구르트의 관능성 검사

<69> 제품의 관능성 검사는 37℃에서 20시간 배양한 요구르트의 커드를 깨고 4℃ 냉장고에서 5시간 보관 후 20명의 검사원으로 전체적인 기호도(overall acceptability), 맛(taste), 향기(order), 조직감(texture)을 각 항목별로 최저 1점, 최고 5점으로 5단계 평가하여 시험구간의 유의성 차를 T-test로 하였다. 통계 프로그램으로는 SAS software version 8(SAS Institute, Cary, NC, USA)을 사용하였다.

<70> 일반 요구르트와 발아현미 추출액이 함유된 GABA 고 함유 요구르트를 scoring test를 이용하여 관능검사를 실시하였다. 그 결과 대조군과 비교하여 유의적으로 색깔, 향미, 만족감에서 일반스타터를 이용하여 만든 플레인 요거트와 다른 점이 있음을 발견하지 못하였다. 이러한 결과를 얻은 것으로 보아 식품소재로서 및 유제품의 첨가물로서 가능성을 보여주는 결과로 보인다.

**발명의 효과**

<71> 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 GABA 생산능이 우수한 균주인 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*) OPY-2 균주를 감마-아미노부티르산 성분이 있는 발아현미 추출액이 함유된 배지에 접종하여 배양함으로써, 감마-아미노부티르산이 다량 함유된 발효유를 제조할 수 있다. 본 발명에 의한 발효유는 정신집중, 기억력강화 등의 효과가 있는 GABA를 고함유로 함유하고 있어 한창 공부할 시기의 어린이 및 청소년들이 정신집중, 기억력강화 등의 능력을 강화할 수 있도록 하여 학습에 도움을 줄 수 있다.

<72> 상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

**도면의 간단한 설명**

<1> 도 1은 *Lactobacillus buchneri* OPY-2(KFCC 11386P)의 16S rDNA 염기서열을 나타낸 것이다.

<2> 도 2는 GABA 요구르트 유리 아미노산 함량을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.

도면

도면1

```

NGCNNTCCAGCTCCGGCCGDCATGGGGCCGGGGAAATTCGATTAGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAAADGCTGGGGGC
GTGCCTAATACATGCAAGTGAACGGGTCTCCGTTGATGATTTCAAGTGCTTGCACCTGAAAGATTTAACATTGAGACGA
GTGGCGAACTGTTGAGTAACACGTGGTAACCTGDCCTTGAAGTAGGGGATAACACTTGGAAAACAGGTGCTAATACDGT
TAACAACCAAAAACCACTGGTTTTGGTTTAAAAAGACGGCTTCGGCTGTCACTTTAGGATGGACCCGGCGTATTAGCTT
GTTGGTAAGGTAAOGGCTTACCAGGCGATGATAOGTAGCCGACTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACAC
GGCCAAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAAADGCGCGTGAGTG
ATGAAGGGTTTCGGCTOFTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAAGAACAGGTGTCAAGTAACTGTTGACATCTTGACGGTATCC
AACCCAGAAAGCCADGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGGTAAATACGTAGGTGGCAAGDFTTGTCCGGATTTATTGGGCG
TAAAACGAGCGCAGCGGTTTTTTTAGTCTGATGTGAAAAGCCTTCGGCTTAAACGGAGAAAGTGCATCGGAAAACDGGGAGA
CTTGAGTGCAGAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAAGAACACCAGTGGCGAAG
GGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGANGCTCGAAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATADECTGGTAGCCATGC
CGTAAACGATGAGTGCTAAGTGMTTGGAGGGTTTCCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAADGCATTAAGCACTCCGCCMNGG
GGAGTACNANCCGCAAGTTGAAC
    
```

도면2

