식품공학 학사학위논문

GABA 함량이 증진된 쌀겨 젖산균 발효 소재 개발 및 특성 연구

국립목포대학교 공과대학

식품공학과

김 규 리

김 희 우

송 보 경

지도교수: 이 현 준

2026년 2월

GABA 함량이 증진된 쌀겨 젖산균 발효 소재 개발 및 특성 연구

이 논문을 식품공학 학사학위 논문으로 제출함

국립목포대학교 공과대학

식품공학과

김 규 리

김 희 우

송 보 경

지도교수 이 현 준

상기자의 식품공학 학사학위 논문을 인준함

심사위원장 허 재 영 (인)

심사위원 이 현 준 (인)

2026년 2월

목 차

국문초록

제1장 서 론 ····· 1

제2장 재료 및 방법 ····· 3

1. GABA 전환 젖산균 분리 및 특성 분석 ····· 3

1) 발효식품으로부터 균주 분리 ····· 3

2) 분리 균주의 특성 분석 ····· 3

3) TLC를 이용한 GABA 전환능 우수 균주 선별 ····· 4

4) 16S rRNA 염기 서열 분석을 통한 GABA 전환 젖산균 동정 · 4

5) GABA 전환 우수 젖산균 유전자 분석 ····· 5

2. GABA 전환 우수 젖산균 성장곡선 측정 ····· 6

3. 쌀겨 현탁액의 젖산균 발효 ····· 7

1) 시료 준비 및 전처리 ····· 7

2) 효소 처리 및 발효조건 ····· 7

3) LPBC 쌀겨 발효액의 생균수 및 pH의 분석 ····· 7

4) LPBC 쌀겨 발효액의 환원당 분석 ····· 8

4. LPBC 쌀겨 발효액의 GABA 분석 ····· 10

1) TLC를 이용한 GABA 정성 분석 ····· 10

2) HPLC를 이용한 GABA 정량 분석 ····· 10

제3장 결과 및 고찰 ····· 11

1. GABA 전환능 우수 젖산균 분리 및 특성 확인 ····· 11

1) 균주 분리 및 특성 분석 결과 ····· 11

2) GABA 생성 능력 우수 젖산균 최종 선별 결과 ····· 13
3) GABA 전환 우수 젖산균 동정 결과 ····· 15
4) LPBC의 GABA 합성 유전자 분석 결과 ····· 17
2. LPBC의 성장곡선 확인 ····· 19
3. LPBC 쌀겨 발효액의 생균수 및 pH 분석 결과 ····· 22
4. LPBC 쌀겨 발효액의 환원당 분석 결과 ····· 24
5. LPBC 쌀겨 발효액의 GABA 생성 확인 ····· 26
1) TLC를 이용한 GABA 정성 분석 결과 ····· 26
2) HPLC를 이용한 GABA 정량 분석 결과 ····· 28

제4장 결 론 ····· 30

참고문헌 ····· 32

GABA 함량이 증진된 쌀겨 젖산균 발효 소재 개발 및 특성 연구

김 규 리, 김 희 우, 송 보 경

국립목포대학교 공과대학 식품공학과

(지도교수 : 이 현 준)

(초록)

전 세계적으로 인구 고령화가 가속화됨에 따라 인지 기능 저하와 기억력 저하 발생 위험이 증가하고 있으며, 이를 예방하고 개선하기 위한 기능성 식품에 대한 관심이 높아지고 있다. ɣ-아미노부티르산(GABA)은 신경계 흥분 억제 및 뇌 건강 증진에 중요한 역할을 하는 생리활성 아미노산으로, 기능성 소재로서 주목받고 있다. 쌀겨는 도정 과정에서 발생하는 농업부산물로, 글루탐산을 비롯한 다양한 영양성분을 함유하고 있으며, 특히 젖산균에 의해 GABA로 전환될 수 있어 발효 기반 기능성 소재로 활용 가능성이 크다. 그러나 쌀겨를 직접 발효 기질로 활용한 연구와 후처리 공정 개발은 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 전라남도 전통 발효주인 무화과 동동주에서 분리한 *Lactiplantibacillus plantarum* BC(LPBC) 균주를 활용하여 10% 쌀겨 용액에서 발효 조건(37°C, 48시간, 50 rpm)을 확립하였다. 발효 중 pH는 5.99에서 4.18으로 감소하였으며, 환원당 함량은 19.19 mg/mL에서 6.24 mg/mL로 감소하여 젖산균의 활발한 생육과 기질 소비가 관찰되었다. GABA 생성 분석 결과, 기본 쌀겨의 초기 GABA 함량은 0.30%였으며, LPBC 발효 후 0.59%로 증가하였다. 특히 효소 전처리를 병행한 경우 발효 후 GABA 함량이 1.40%까지 증가하여 효소 처리-발효 공정의 GABA 생성 향상을 확인하였다. TLC 및 HPLC 분석 역시 GABA 증가 경향을 명확하게 보여주었다.

본 연구를 통해 전라남도 전통 발효식품으로부터 GABA 전환능이 우수한 젖산균을 확보하였으며, 농업부산물인 쌀겨를 활용한 발효 기반 고함량 GABA 소재 개발 가능성을 제시하였다. 더 나아가, Bioconversion 기술을 활용한 천연 GABA 생산 기반 기술 확보 가능성을 확인하였으며, 개발된 발효·분말화 소재는 향후 건강기능식품 원료로 확장될 수 있는 잠재력을 지니고 있음을 시사한다.

제1장 서 론

전 세계적으로 인구 고령화가 가속화됨에 따라 인지 기능 및 기억력 저하와 같은 퇴행성 신경질환 및 뇌혈관 질환의 발생 위험이 증가하고 있다(1). 이에 따라 예방·치료뿐만 아니라 일상적으로 섭취할 수 있는 기능성 식품에 대한 사회적 수요가 확대되고 있다(2). 이러한 흐름 속에서 γ-아미노부티르산(gamma-aminobutyric acid, GABA)은 신경계 안정과 뇌 건강 유지에 기여하는 대표적인 생리활성 아미노산으로 주목받고 있다(3). GABA는 단백질을 구성하지 않는 비단백질성 아미노산으로, 체내에서는 글루탐산이 글루탐산 탈탄산효소(glutamate decarboxylase, GAD)에 의해 합성된다(4). 억제성 신경전달물질인 GABA는 과도한 신경 흥분을 억제하여 뇌의 항상성을 유지하며, 수면 질 개선, 스트레스 완화, 혈압 조절 등 다양한 생리적 효과를 가진 것으로 보고되고 있다(5, 6, 7).

쌀겨(rice bran)는 현미를 백미로 도정하는 과정에서 발생하는 주요 부산물이다(8). 2020년 기준 전 세계 쌀 생산량은 연간 약 7억 5,800만 톤이며, 이 중 약 8-10%가 쌀겨로 발생한다(9). 쌀겨에는 단백질, 식이섬유, 지질뿐만 아니라 비타민 B군, 비타민 E, 무기질이 풍부하게 함유되어 있으며, 토코페롤, 토코트리에놀, γ-오리자놀과 같은 지용성 성분과 피틴산, 세라마이드, 레시틴, 이노시톨 등 다양한 수용성 생리활성 물질도 포함되어 있다(8, 9). 특히 지질의 약 70% 이상이 올레산, 리놀레산, 리놀렌산과 같은 불포화지방산으로 구성되어 있어 항산화, 항암, 혈당 조절, 콜레스테롤 저해 등 다양한 기능성이 보고되었다(10). 그러나 쌀겨는 도정 직후 Lipase의 작용으로 산패가 빠르게 진행되어 저장성이 낮으며, 현재까지는 주로 사료, 비료, 미강유 및 오리자놀 생산 등에 국한되어 활용되고 있다. 최근에는 이러한 한계를 극복하고 쌀겨의 영양 가치를 고부가가치 식품 소재로 확장하기 위한 발효 및 가공 기술 적용이 활발히 연구되고 있다(11).

쌀겨 단백질의 주요 아미노산인 글루탐산은 발효 과정에서 젖산균이 생성하는 GAD에 의해 GABA로 전환된다(12). 이러한 GABA 전환은 미생물 발효에서 흔히 적용되는 Bioconversion 기술이며, 젖산균이 기질 내 글루탐산을 GABA로

변환하는 과정에 해당한다. 이는 쌀겨가 단순 부산물에 그치지 않고 기능성 발효 기질로 활용될 수 있음을 시사한다(13). 그러나 기존의 GABA 생산 연구는 주로 곡류, 채소, 유제품 등 특정 기질에 집중되어 있으며, 농업부산물인 쌀겨를 직접 발효 기질로 활용한 사례는 상대적으로 부족하다(14).

GABA 생성과 관련된 기존 연구는 주로 식물성 기질에 존재하는 글루탐산 또는 글루탐산염을 전구물질로 활용하는 방향에서 활발히 진행되어왔다. 글루탐산은 특히 콩류에 풍부하게 존재하며, 이를 기반으로 한 식물 유래 GABA 생합성 연구가 다수 보고된 바 있다(15, 16). 그러나 과일 및 채소에 자연적으로 축적되는 GABA의 농도는 상대적으로 낮기 때문에, 식물 자체 대사만으로는 고농도의 GABA를 확보하는 데 한계가 존재한다(17). 이러한 한계를 극복하기 위해 최근에는 발효 기반 GABA 생산 전략이 식품 산업에서 중요한 접근법으로 부상하고 있다. 발효 공정은 공정 제어가 용이하고 비교적 짧은 시간 내에 높은 수준의 GABA 축적이 가능하다는 장점이 있어 산업적 활용성이 높다. 특히 일부 젖산균은 GABA 생합성의 핵심 효소인 GAD를 보유하고 있어 글루탐산을 GABA로 효율적으로 전환하는 주요 미생물로 널리 활용되고 있다(18). 현재까지 보고된 GABA 생산 연구는 사용되는 기질과 균주의 범위가 제한적이며, 특히 농업부산물인 쌀겨를 직접 GABA 전환 기질로 활용한 사례는 매우 드물다. 그 결과, 대량 생산되는 대표적 곡류 부산물임에도 불구하고 쌀겨의 기능성 소재로서의 활용 잠재력은 충분히 발현되지 못한 실정이다(19). 따라서 쌀겨를 기반으로 한 발효 연구는 저활용 농식품 부산물의 가치를 제고하고, GABA 증진을 통한 기능성 식품 소재 개발로 이어질 수 있는 중요한 연구 방향이다.

이에 따라 본 연구는 쌀겨를 GABA 전환 기질로 활용하고, GABA 생성능이 우수한 *Lactiplantibacillus plantarum*을 적용한 발효 기반 Bioconversion 공정을 구축하고자 하였다. 본 연구에 사용된 *L. plantarum* 균주는 한국 전통 발효주인 무화과 동동주에서 분리·동정된 균주로, 지역 발효 자원을 기반으로 한 기능성 식품 소재 개발 연구의 확장 가능성을 제시한다.

제2장 재료 및 방법

1. GABA 전환 젖산균 분리 및 특성 분석

1) 발효식품으로부터 균주 분리

GABA 생산능이 우수한 젖산균을 분리하기 위하여, 전라남도 지역의 전통 발효식품인 여수 갓김치(농협 더싱싱, Yeosu, Korea), 영암 무화과 동동주(도갓집, Yeongam, Korea), 신안 멸치젓갈(신안 젓갈타운, Sinan, Korea)을 시료원으로 사용하였다. 각 시료 1 g을 멸균된 증류수 9 mL에 현탁한 후, 10진 희석법으로 희석액을 제조하였다. 이 희석액 1 mL를 Lactobacilli MRS Agar(Difco™, BD, Sparks, MD, USA)에 pour plating 하였다. 젖산균을 선택적으로 분리하기 위해 Cycloheximide(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 0.5-1%(w/v) 첨가하여 진균류의 생장을 억제하였다. 또한, 산 생성능을 시각적으로 확인하기 위해 $CaCO_3$ 0.5%(w/v)를 함께 첨가하였으며, 37°C에서 48시간 배양하였다.

2) 분리 균주의 특성 분석

1차 선별된 균주의 산 생성능을 알아보기 위해 Bromocresol Purple(BCP) plate count agar(Eiken Chemical, Tokyo, Japan)에 멸균된 백금이를 사용하여 점적한 후 37°C에서 48시간 배양하였다.

선별된 균주의 형태학적 및 생화학적 특성을 확인하기 위하여 MRS agar에 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양된 단일 집락은 멸균된 백금이를 사용하여 슬라이드 글라스에 도말하고 열 고정한 뒤, crystal violet을 이용하여 Gram 염색을 수행하였다. 염색된 시료는 광학 현미경(Optical microscope, Olympus BX43, Tokyo, Japan)을 사용하여 세포의 형태와 Gram 염색 결과를 관찰하였다.

또한 분리 균주의 호기성 또는 혐기성 특성을 판별하기 위해 catalase test를 수행하였다. 이를 위해 MRS agar에서 획선 배양한 단일 집락을 슬라이드 글라스에 도말한 후, 3%(v/v) hydrogen peroxide(Daejung, Seoul, Korea)를 1-2방울 첨가하였다. 이후 기포 형성 여부를 관찰하여 균주의 catalase 반응을 통해 양성 또는 음성 여부를 판정하였다.

3) TLC를 이용한 GABA 전환능 우수 균주 선별

GABA 전환능 평가를 위한 박층 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC) 조건은 Hur(2022)의 방법을 참고하여 설정하였다(20). 후보 젖산균 균주는 Lactobacilli MRS broth에서 37°C로 48시간 배양하였다. 배양 상등액은 50 μL 취하여 TLC판(Silica gel 60 F254, Supelco, Canada)에 분리 균주의 발효 배양액과 GABA 표준물질(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 0.5%를 동일 조건에서 함께 점적하였다. 전개는 n-butanol:acetic acid:water = 3:2:1(v/v/v)의 조성으로 수행하였으며, 전개 후 TLC 판은 0.4%(w/v) ninhydrin 분말(Daejung, Seoul, Korea)을 acetone에 용해하여 분무한 뒤 80°C에서 5분간 건조하여 발색하였다. 발색된 spot은 표준물질과 비교하여 GABA 존재 여부를 정성적으로 확인하였다.

4) 16S rRNA 염기 서열 분석을 통한 GABA 전환 젖산균 동정

무화과 동동주에서 분리된 GABA 전환 우수 젖산균의 최종 동정을 위해 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였다. 염기서열 정보는 Macrogen(Seoul, Korea)을 통해 확보하였으며, 이후 BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) 검색을 통해 최종 동정하였다.

5) GABA 전환 우수 젖산균 유전자 분석

DNA 추출을 위해 식품에서 분리한 젖산균을 MRS broth에서 37℃로 24시간 배양하여 사용하였다. GENOMIC DNA는 제조사의 프로토콜에 따라 AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 추출하였으며, 추출된 DNA는 −20℃에서 보관하여 사용하였다. 젖산균의 GABA 전환 유전자 존재 여부를 확인하기 위해 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 수행하였다. PCR에 사용된 primer 서열은 Yunes 등(2016)을 참고하였으며, 다음과 같다. *gad B* Forward(AACCAGTCTTTGGTGCGCCT), *gad B* Reverse (AACGGCTTCGGGTTCCATAT), *gad C* Forward (TAATTGCATTCGTGGCGGTC), *gad C* Reverse (CCCAGTTGACCCACAATCAA) (21). PCR mixture는 제조사 프로토콜에 따라 Zamper Power S Taq DNA Polymerase Kit(Rapigen, Korea)를 사용하여 조성하였다. 최종 반응액은 25 μL로 준비하였으며, 구성 성분은 Taq polymerase, 10× buffer, dNTP mix, 각각의 primer, template DNA로 이루어졌다.

PCR 조건은 initial denaturation 94℃에서 5분, 30회 사이클로 denaturation 94℃에서 30초, annealing 57℃에서 30초, extension 72℃에서 1분, final extension 72℃에서 5분으로 진행하였다. 2.0% Agarose Gel에 NEOgreen을 넣어 사용하였고 PCR mixture 염색은 6X loading dye를 첨가하여 사용하였다. 전기영동은 100V에서 30분간 진행하였고 겔 이미지는 UV-Transilluminators(NeoScience, Seoul, Korea)를 사용하여 확인하였다.

2. GABA 전환 우수 젖산균 성장곡선 측정

GABA 전환 우수 젖산균의 생육 특성을 파악하기 위해 성장곡선을 측정하였다. 분리한 균주는 MRS broth에서 37°C, 16시간 계대 배양하여 사용하였다. MRS broth 9.9 mL에 활성화된 균주 0.1 mL를 접종하여 37°C에서 배양하였으며, 배양 시작 후 5시간 간격으로 25시간까지(5, 10, 15, 20, 25시간), 최종 25시간에 각각 시료를 1 mL씩 채취하였다.

젖산균의 생육 변화는 흡광도(Optical Density, OD) 측정과 평판 계수법(Plate Counting Method)을 병행하여 평가하였다. 먼저 분광광도계(UV-3600, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)를 이용하여 600 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 생육 변화를 확인하였다. 또한, 배양액을 멸균된 증류수로 10진 희석법에 따라 단계별로 희석하였다. 각 희석액 100 µL를 MRS agar에 도말하고 37°C에서 48시간 배양한 뒤 형성된 집락 수를 세어 생균수(Colony Forming Unit, log CFU/mL)를 측정하였다.

3. 쌀겨 현탁액의 젖산균 발효

1) 시료 준비 및 전처리

본 실험에 사용한 쌀겨는 유기농 쌀겨가루(유기지기, Sunchang, Korea)를 사용하였다. 시료는 쌀겨와 증류수를 1:10(w/v) 혼합한 후, 90℃에서 15분간 열처리하여 살균하였다. 살균 처리된 시료는 실온에서 냉각시킨 후 분리 균주를 활용하였다. 효소 처리한 시료와 처리하지 않은 시료를 동일한 발효조건으로 비교하였다.

2) 효소 처리 및 발효조건

본 실험에서는 단백질 분해를 통한 글루탐산 증가를 유도하기 위하여 효소 처리 단계를 진행하였다. 전처리된 시료에 ProteAX(AMANO-ENZYME, Nagoya Japan)효소를 기질 대비 3% 수준으로 첨가한 후 60℃에서 8시간 동안 100 rpm으로 교반하며 효소 가수분해를 수행하였다. 효소 처리가 완료된 시료는 열처리를 통해 효소 실활을 시킨 뒤, GABA 생성을 촉진하기 위하여 글루탐산의 전구체 역할을 하는 MSG(Monosodium glutamate) (Daejung, Siheung, Korea)를 기질로 첨가하였다.

젖산균 접종량은 9.34 log CFU/mL인 균 배양액을 시료 대비 3%(v/v) 비율로 접종되도록 하였다. 발효는 37℃에서 48시간 동안 50 rpm으로 교반하며 진행하였다. 접종에 사용된 균주는 MRS broth에서 37℃, 16시간 계대 배양하여 사용하였다.

3) LPBC 쌀겨 발효액의 생균수 및 pH의 분석

생균수 변화는 발효 경과에 따른 변화를 확인하기 위해 발효 시작 후 일정한 시간 간격으로 평판 계수법을 사용하였다. 본 연구에서는 발효 진행 중 젖산균

수의 시간대별 변화를 연속적으로 기록하기 위해 6시간 간격으로 시료를 채취하였다. 멸균증류수 9 mL에 시료 1 mL을 혼합하여 10진 희석법으로 10^8시료까지 제조하였다. 각 희석배수의 시료를 100 μL를 취하여 MRS agar에 도말하였다. 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양하였다. 배양 후 형성된 colony를 측정하고 희석배수를 곱하여 시료 mL당 log CFU/mL로 측정하였다.

pH는 pH meter(Orion Star A211, Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용하여 측정하기 전 pH 4.01, pH 7.00, pH 10.01 (Thermo Fisher Scientific)의 표준 완충용액으로 보정하여 사용하였다. 시료를 별도의 희석이나 적정 과정 없이 그대로 채취하여 6시간마다 측정하였다.

4) LPBC 쌀겨 발효액의 환원당 분석

발효 중 환원당 함량의 변화는 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 방법을 변형하여 측정하였다(22). DNS시약은 3,5-dinitrosalicylic acid(Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA) 1.58 g, NaOH(Daejung, Siheung, Korea) 5.35 g을 증류수 200 mL에 녹인 후, potassium sodium tartrate tetrahydrate(KANTO Chemical, Tokyo, Japan) 45.5 g, phenol(Daejung, Siheung, Korea) 1.34 g, sodium metabisulfite(Sigma, St. Louis, USA) 1.25 g을 순차적으로 첨가하여 완전히 용해시켰다. 이후 증류수로 최종 부피를 250 mL로 정용하여 제조하였다. 표준곡선은 Glucose(Sigma, St. Louis, USA)를 이용하여 작성하였다. Glucose 0.01 g을 100 mL 용량플라스크에 넣고 증류수로 정용하여 표준용액을 제조하였으며, 농도별로 0, 20, 40, 60, 80, 100 μg/mL의 표준용액을 조제하였다. 시료 1 mL에 DNS 시약 3 mL를 혼합한 뒤 충분히 혼합하고, 95℃ 수욕상에서 5분간 가열하여 반응시켰다. 반응 완료 후 시료를 상온에서 냉각시켜 550 nm에서 흡광마이크로플레이트 리더(Agilent technologies, Santa Clara, USA)로 흡광도를 측정하였다. Glucose 표준곡선을 기준으로 환원당 함량을 정량하였다(Figure 1).

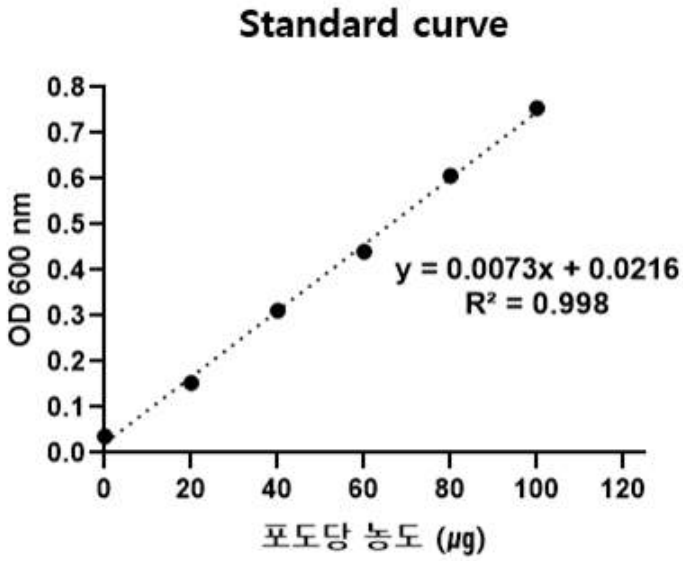


Figure 1. Standard curve used for the quantification of reducing sugars.

4. LPBC 쌀겨 발효액의 GABA 분석

1) TLC를 이용한 GABA 정성 분석

LPBC 쌀겨 발효액 내 GABA의 존재 유무를 확인하기 위하여 TLC를 이용한 정성 분석을 수행하였다. TLC 실험 조건은 위에서 기술한 방법과 동일하게 수행하였다. 발색 후 GABA 표준물질과의 spot 위치를 비교하여 GABA의 생성 유무를 확인하였다.

2) HPLC를 이용한 GABA 정량 분석

LPBC 쌀겨 발효액 내 GABA 함량은 「식품의 기준 및 규격」 제8장 일반시험법 2.1.3.3 아미노산(나. 액체크로마토그래프에 의한 정량시험)에 따라 고성능 액체크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 이용하여 정량하였다. 시료 약 1 g을 취하여 6 N 염산 10 mL를 가한 후 110℃에서 22시간 가수분해하였다. 가수분해액을 여과지로 여과한 뒤, 유도체화를 위해 여과액 10 μL를 취하여 borate buffer 70 μL와 AccQ-Fluor reagent 20 μL를 첨가한 후 10초간 잘 혼합하였다. 이어서 실온에서 1분간 방치한 다음 55℃ oven에서 10분간 가열한 후 방냉하였으며, 이를 최종 시험용액으로 사용하였다. 유도체화된 시험용액은 HPLC 시스템(Alliance 2695, Waters, USA)을 사용하여 분석하였다. 분석 조건은 다음과 같다. 검출기는 형광 검출기(fluorescence detector)로 250 nm, 395 nm에서 측정하였으며, 컬럼은 Waters AccQ Tag column을 사용하였다. 이동상은 A 용매 Waters AccQ Tag Eluent A, B 용매 acetonitrile, C 용매 3차 증류수로 조정하여 사용하였고, 유속은 1.0 mL/min으로 설정하였다. 표준용액은 GABA를 증류수에 녹여 단계적으로 희석하여 조제하였으며, 이들 표준용액으로부터 작성한 표준 검량선을 이용하여 시료 중 GABA 함량(mg/100g)을 산출하였다.

제3장 결과 및 고찰

1. GABA 전환능 우수 젖산균 분리 및 특성 확인

1) 균주 분리 및 특성 분석 결과

전라남도 지역의 전통 발효식품 시료에서 분리된 젖산균 중 $CaCO_3$ 0.5%(w/v)가 첨가된 MRS agar에서 투명환을 형성하는 100개의 균주가 1차 선별되었다(Figure 2). 이후 BCP 배지에서 노란색 환 형성을 통해 산 생성능을 재확인하였다.

형태학적 분석 결과, 모든 선별 균주는 Figure 2와 같이 Gram 양성인 간균(rod-shaped)이며 catalase 음성을 보여 혐기성(anaerobic) 특성을 가진 전형적인 젖산균의 형태적 특성과 일치하였다. 이러한 형태학적 특징은 *Lactiplantibacillus*을 포함한 여러 젖산균에서 공통적으로 관찰된다. 특히 *Lactiplantibacillus*는 GABA 생성능이 높은 균주로 알려져 있다(25, 26, 27). 실제로 여러 연구에서 젖산균의 GABA 생성능이 종 및 균주에 따라 크게 달라지는 것으로 나타났으며(26, 27, 28), 특히 *Lactiplantibacillus* 속의 *L. brevis, L. buchneri, L. bulgaricus, L. fermentum, L. helveticus, L. paracasei, L. plantarum* 등은 높은 GABA 생산능을 가진 것으로 알려져 있다(26, 29, 30). 따라서 본 연구에서 분리된 균주 역시 GABA 전환능을 가진 젖산균일 가능성이 있으며, 향후 기능성 발효식품 개발 및 GABA 생합성 균주 활용에 기초 자료로 활용될 것으로 기대된다.

(A) (B)

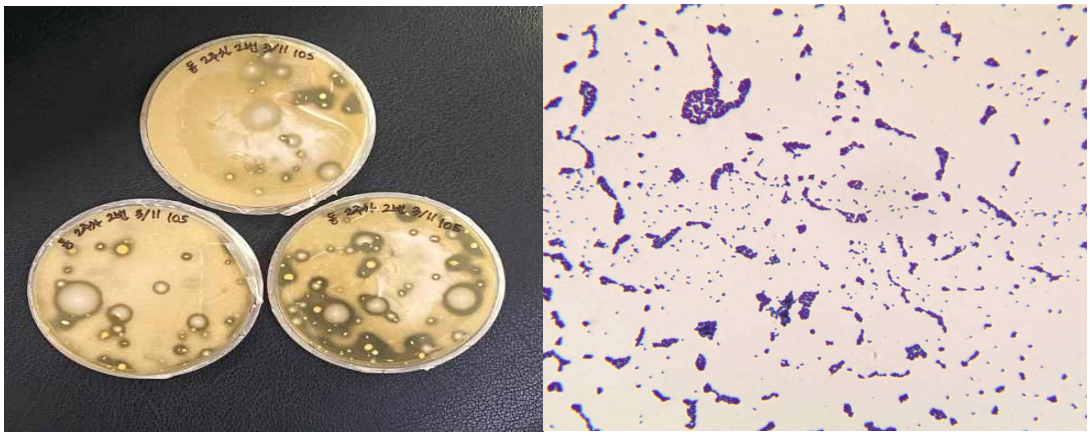


Figure 2. (A) Transparent halos formed on MRS agar supplemented with $CaCO_3$, indicating acid production by lactic acid bacteria. (B) Rod-shaped cells observed under a light microscope.

2) GABA 생성 능력 우수 젖산균 최종 선별 결과

1차 및 2차 스크리닝을 통과한 후보 균주의 GABA 전환능을 비교하기 위해 TLC 기반 정성 분석을 수행한 결과, 무화과 동동주 유래 균주에서만 GABA 표준물질과 동일한 Rf 값에서 선명한 밴드가 확인되었다(Figure 3). 특히 무화과 동동주 유래 균주 중 3-7번 균주는 표준물질과 유사한 농도와 형태의 spot을 나타내어 상대적으로 높은 GABA 생성능을 보였다. 반면, 갓김치 및 멸치젓갈 유래 균주에서는 GABA에 해당하는 밴드가 관찰되지 않아 본 실험 조건에서 GABA 생성 반응이 유의하게 일어나지 않은 것으로 판단된다. 이러한 결과는 무화과 동동주 유래 균주가 글루탐산을 GABA로 전환하는 GAD 효소가 보다 높은 활성 상태를 나타내고 있음을 시사한다.

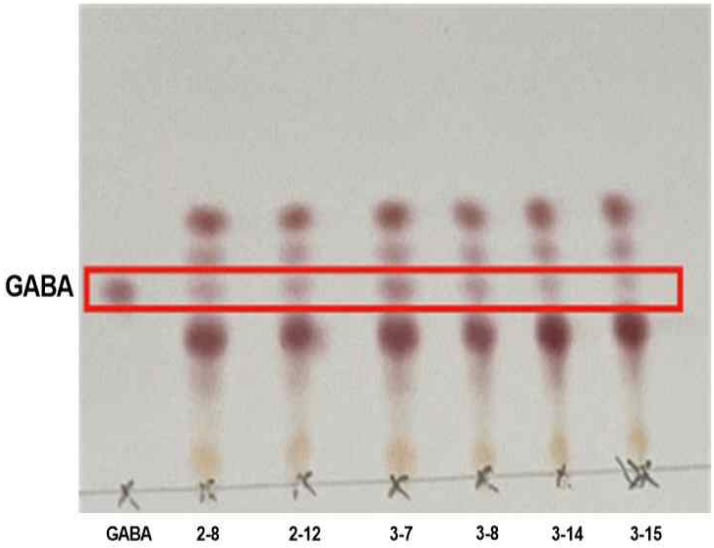


Figure 3. Comparison of GABA conversion capabilities through TLC is for the final candidate strains obtained after primary and secondary screening.

3) GABA 전환 우수 젖산균 동정 결과

무화과 동동주에서 분리한 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과는 Figure 4에서 보이는 바와 같다. 총 1,527 base의 염기서열이 확인되었으며, 이 결과를 바탕으로 BLAST program을 이용하여 Genbank에 등록되어 있는 다른 균주들과의 염기서열 비교한 결과 *L. plantarum* (Accession No. NR_104573.1)과 99.15%의 유사성을 나타내는 것을 확인하였다. 염기서열의 상동성을 비교하여 Phylogenetic tree를 나타내었다(Figure 4). 따라서 본 균주를 *Lactiplantibacillus plantarum* BC(LPBC)로 명명하였으며, 이후 쌀겨 발효를 통한 GABA 생산 균주로 사용하였다. *L. plantarum*은 김치 및 다양한 발효식품에서 주로 분리되는 젖산균이며(31, 32, 33), GAD 활성을 통해 글루탐산을 GABA로 전환하는 능력이 여러 연구에서 보고되어왔다(34, 35).

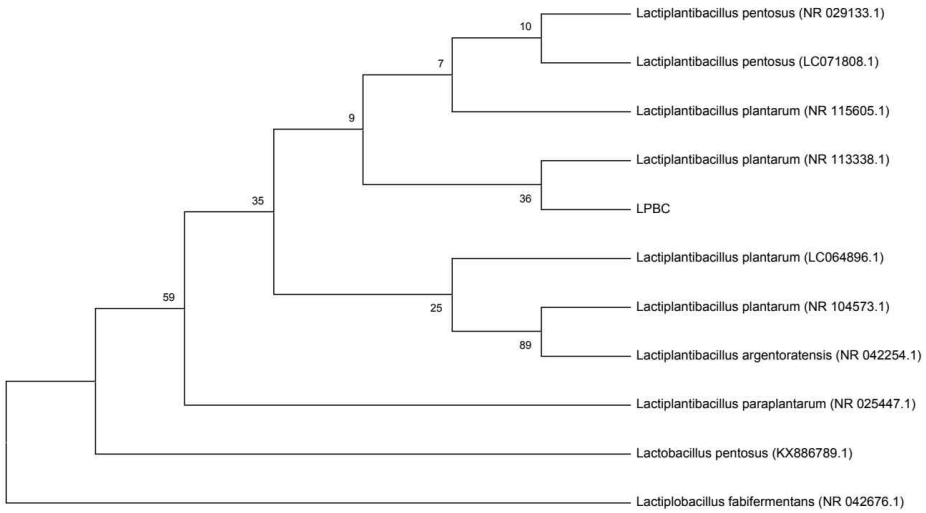


Figure 4. Phylogenetic tree of strain LPBC and related *Lactiplantibacillus* species based on 16S rRNA gene sequences.

4) LPBC의 GABA 합성 유전자 분석 결과

식품으로부터 분리한 LPBC 균주가 GABA 생합성에 관여하는 *gadB* 및 *gadC* 유전자를 보유하고 있는지를 확인하기 위해 PCR 스크리닝을 수행하였다. 분리 균주는 MRS broth에서 24시간 배양한 후 Genomic DNA를 추출하였으며, Yunes 등(2016)을 참고하여 설계된 primer를 이용해 PCR을 진행하였다(21). PCR 증폭산물은 2% agarose gel에서 전기영동을 진행하여 밴드 형성을 확인하였다(Figure 5). 분석한 결과, 두 유전자 모두에서 선명한 밴드가 확인되었으며, 이는 본 균주가 GABA 생산과 관련된 GAD 시스템을 유전적으로 갖추고 있음을 의미한다.

*gadB*는 GAD 효소를 암호화하는 유전자로, 글루탐산을 GABA로 전환하는 GABA 생합성 경로의 핵심 촉매 역할을 한다. 즉, *gadB*가 존재한다는 것은 해당 젖산균이 GAD를 통해 GABA를 생산할 수 있음을 시사한다. *gadC*는 GABA/glutamate antiporter를 암호화하는 유전자로, 세포막을 통해 글루탐산을 유입시키고 생성된 GABA를 외부로 방출하는 과정을 담당한다. 본 연구에서 두 유전자가 동시에 검출된 것은, 분리된 LPBC 균주가 GABA 생합성에 필요한 효소(GAD)와 운반체(antiporter)를 모두 갖춘 완전한 GAD 시스템을 보유하고 있음을 시사한다.



Figure 5. PCR amplification results confirming the presence of *gadB* and *gadC* genes associated with GABA biosynthesis in strain LPBC.

2. LPBC의 성장곡선 확인

본 연구에서는 LPBC 균주의 생육 특성을 분석하기 위해 흡광도(600 nm)와 생균수를 이용하여 25시간 동안 성장곡선을 측정하였다(Figure 6). 측정 결과, 배양 5-10시간 구간에서 흡광도가 0.319에서 0.898로 급격히 증가하였다. 생균수 또한 같은 시간대에 급격히 증가하여 5-10시간 구간에서 LPBC의 활발한 증식이 이루어지는 대수기(Exponential phase)임을 두 지표에서 확인할 수 있었다. 이후 10-20시간 동안 흡광도 증가 폭은 완만해졌으며, 20시간 시점에서 1.08로 최대치에 도달하였다. 20-25시간 구간에서는 큰 변동 없이 정체기(Stationary phase)를 유지하였다.

특히, 본 연구에서 관찰된 5-10시간 구간의 활발한 증식은 Rojas-Rejón 등(2024)이 보고한 *L. plantarum* BG112의 결과와 유사하였다(36). 해당 연구에서도 *Camellia sinensis*를 프리바이오틱으로 사용한 배치 및 연속 배양에서 동일한 시간대에 대수증식기 진입이 관찰되었으며, 이는 본 연구에서 확인된 LPBC의 성장 패턴이 선행 연구와 일치함을 보여준다.

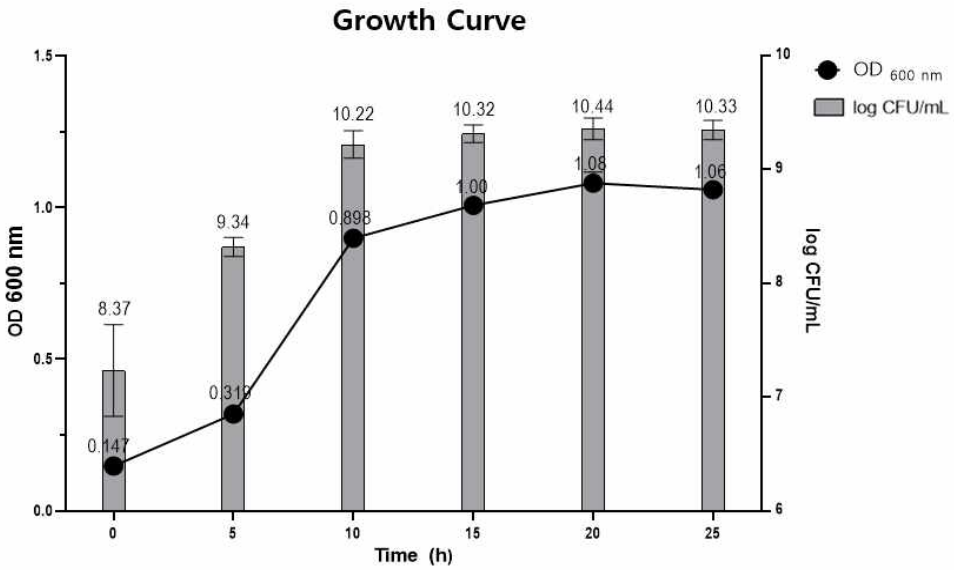


Figure 6. Growth curve of strain LPBC during 25 hours of incubation.

3. LPBC 쌀겨 발효액의 생균수 및 pH 분석 결과

LPBC 쌀겨 발효액의 발효 시간에 따른 생균수 변화를 Figure 7에 나타내었다. 발효 시작 시점인 0시간에는 약 7.16 log CFU/mL였으며, 6시간에는 7.75 log CFU/mL로 소폭 증가하였다. 이후 12시간부터 48시간까지 젖산균은 꾸준히 증식하여 48시간에는 9.34 log CFU/mL에 이르렀다. 특히 6시간부터 18시간 사이에 생균수가 빠르게 증가하였고, 24시간 이후부터는 증가폭이 다소 완만해지는 경향을 보였다. 이는 발효 초기에 젖산균이 충분한 기질을 이용해 활발히 증식한 반면, 시간이 지나면서 기질 부족과 대사산물 축적으로 성장 속도가 둔화된 것으로 판단된다. 따라서 본 발효 조건에서 젖산균이 48시간까지 안정적으로 증식하는 것을 확인할 수 있다.

LPBC 쌀겨 발효액의 발효 시간에 따른 pH 변화를 분석한 그래프는 Figure 8과 같다. 발효 초기인 0시간에서 6시간에는 pH 5.99와 pH 5.69로 비교적 높은 값을 보였으나 6시간 이후 12시간에는 pH가 4.81로 약 pH 0.88 감소하였다. 이후 시간이 지날수록 pH가 점차 감소하였다. 36시간, 42시간 및 48시간에서는 각각 pH 4.2, pH 4.18, pH 4.18으로 pH 감소 속도가 완만해지는 경향을 나타냈다. 이러한 패턴은 발효가 진행됨에 따라 젖산균이 기질을 소비하며 유기산을 생성하는 초기 단계가 지나면 균의 성장 속도가 떨어져 산 생성량이 제한되기 때문으로 판단된다. 또한, 젖산균의 생육이 정체기에 진입하면서 pH 감소 속도도 완만해지는 경향을 보였다. 젖산균 발효에서 일반적으로 관찰되는 후반부 안정화 단계의 특성과도 일치한다.

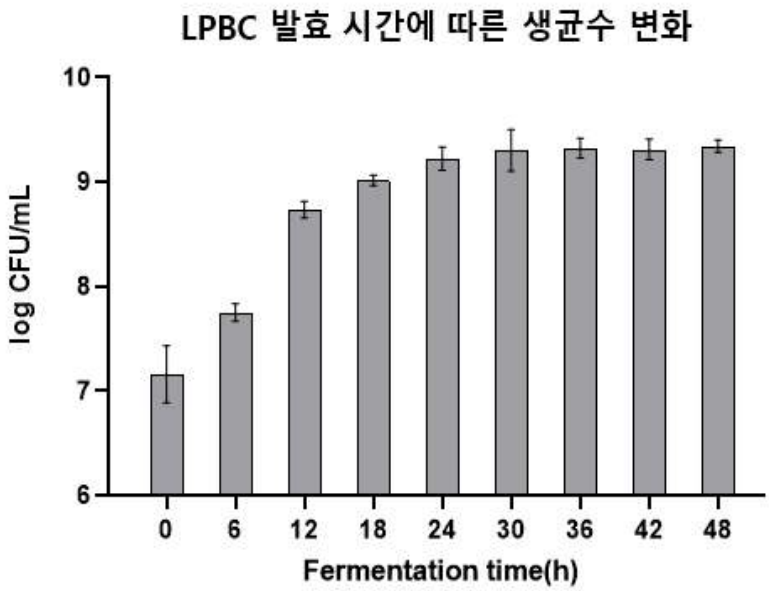


Figure 7. Viable cell counts in rice bran extract fermented by LPBC over the fermentation period.

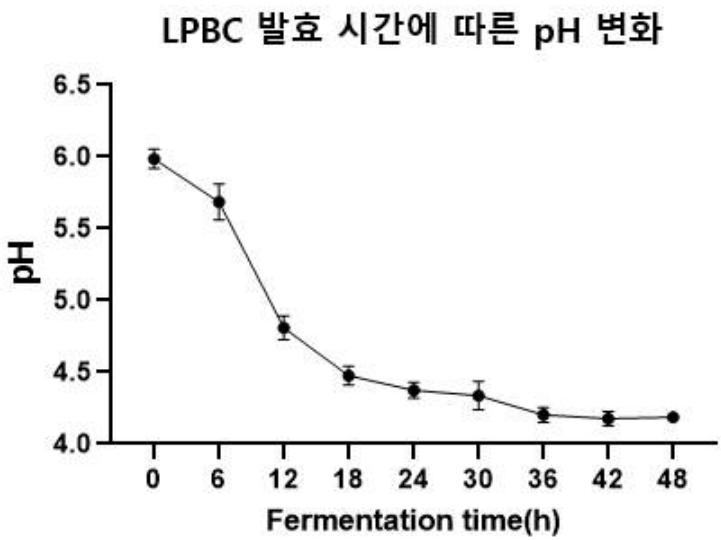


Figure 8. pH changes during LPBC fermentation.

4. LPBC 쌀겨 발효액의 환원당 분석 결과

발효 과정에서 LPBC 쌀겨 발효액의 환원당 함량 변화를 DNS 방법으로 분석한 결과는 Figure 9에 제시하였다. 발효 시작 시점인 0시간의 환원당 농도는 19.19 mg/mL로 관찰되었다. 6시간에서는 19.07 mg/mL로 0시간과 유사한 수준을 유지하여 발효 초기 환원당의 즉각적으로 크게 소모되지 않음을 보여주었다. 이는 발효 초기 쌀겨 내 당 성분이 충분히 존재함을 의미한다. 발효가 진행됨에 따라 젖산균이 기질로 당을 활용하면서, 환원당 함량은 전반적으로 감소하는 경향을 보였다. 12시간에 16.10 mg/mL로 감소하였고, 18시간에는 10.86 mg/mL로 당 소비가 빠르게 진행되고 있음을 확인할 수 있었다. 이후 24시간에는 9.58 mg/mL로 더 감소했으며 전반적으로 발효 시작 후 약 12–20시간 구간에서 환원당이 활발히 소비된 것으로 판단된다. 30시간에 8.86 mg/mL로 추가적인 감소를 보였으나, 감소폭이 줄어들었다. 특히 발효 후반부로 갈수록 환원당 농도가 8.86–8.00 mg/mL로 거의 일정하게 유지되었다. 최종적으로 48시간에서는 환원당 농도가 6.24 mg/mL로 나타났다. 발효 후반부에 도달하면서 기질 감소에 따른 환원당 감소가 크게 일어나지 않는 단계에 도달한 것으로 보인다. 종합적으로 본 발효 조건에서는 약 20시간까지 환원당이 활발히 소비되며, 이후에는 기질 감소에 따라 발효가 비교적 안정된 단계로 전환되는 양상을 나타냈다.

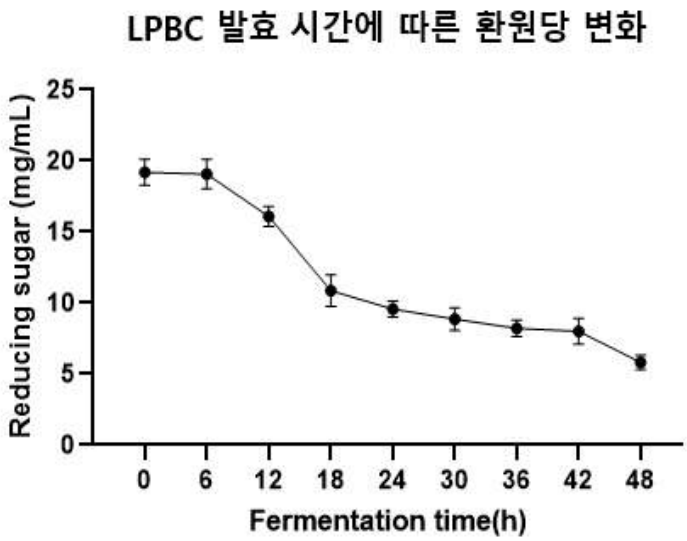


Figure 9. Reducing sugar levels in rice bran extract during LPBC fermentation.

5. LPBC 쌀겨 발효액의 GABA 생성 확인

1) TLC를 이용한 GABA 정성 분석 결과

TLC 정성 분석 결과, LPBC 쌀겨 발효액은 GABA 표준용액과 동일한 위치에서 spot을 나타내어, LPBC 발효 과정에서 쌀겨 내 글루탐산이 GABA로 전환되었음을 확인하였다(Figure 10). 또한 효소 전처리를 적용한 시료에서는 효소 처리를 하지 않은 시료에 비해 GABA band의 발색이 더욱 뚜렷하게 나타났으며, 이는 ProteAX 효소 가수분해가 쌀겨 기질 내 글루탐산의 이용 가능성을 증가시켜 GABA 생성이 강화되었음을 시사한다. Ninhydrin을 이용한 TLC 분석은 아미노산 및 GABA 검출에 널리 사용되는 방법으로(29), 본 연구에서 관찰된 효소 처리 전·후의 spot 강도 차이는 GABA 생산 젖산균 및 곡류 기반 기질에서 GABA 생성을 확인한 선행 연구와도 일관된 경향을 보였다(37).

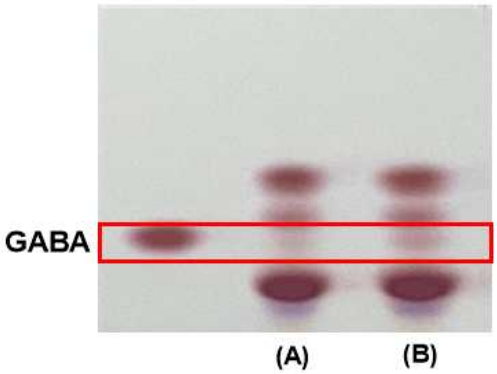
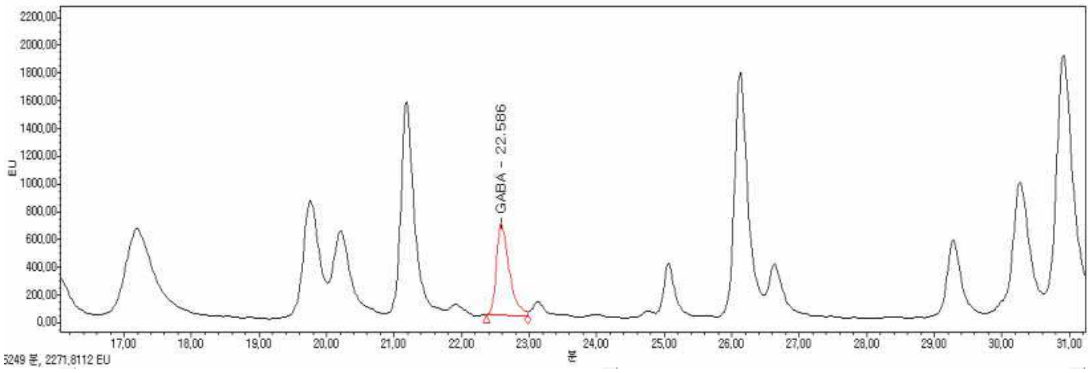


Figure 10. TLC profiles of rice bran samples fermentation by LPBC: (A) without enzyme treatment and (B) with ProteAX enzyme pretreatment.

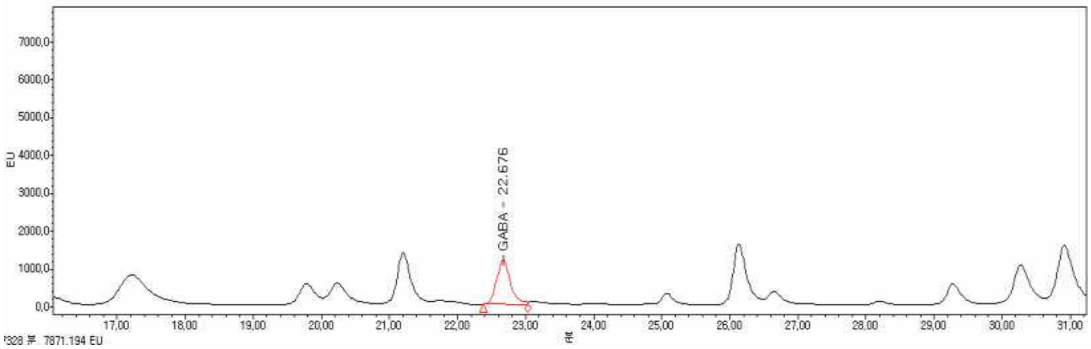
2) HPLC를 이용한 GABA 정량 분석 결과

LPBC 쌀겨 발효액의 GABA 함량은 HPLC를 이용하여 정량하였다. GABA 표준물질은 약 22.67 min에서 단일 피크로 검출되었으며, 발효 전·후 시료에서도 동일한 retention time에서 피크가 확인되었다. 효소 처리를 적용하지 않은 발효액의 GABA 함량은 593.17 mg/100 g으로 나타났으며, 이는 발효 전 쌀겨분말의 300.42 mg/100 g 대비 증가한 수치였다. 한편, ProteAX 효소 처리를 적용한 후 LPBC로 발효한 시료에서는 1,408.49 mg/100 g으로 GABA 함량이 증가하여, 효소 가수분해가 쌀겨 내 글루탐산의 이용 가능성을 높여 GABA 전환 효율을 향상시킨 것으로 판단된다(Figure 11). 쌀겨 또는 발아 쌀겨를 이용한 기존 연구들에서도 젖산균 발효에 따른 GABA 증가가 보고된 바 있으며(38, 39), 본 연구에서 확인된 LPBC 쌀겨 발효액의 GABA 생성 경향 역시 이러한 선행 연구와 일관성을 보였다. 따라서 LPBC는 쌀겨 기반 발효 공정에서 GABA 생성을 유도할 수 있는 균주로서 기능성 소재 개발에 활용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

(A)



(B)



(C)

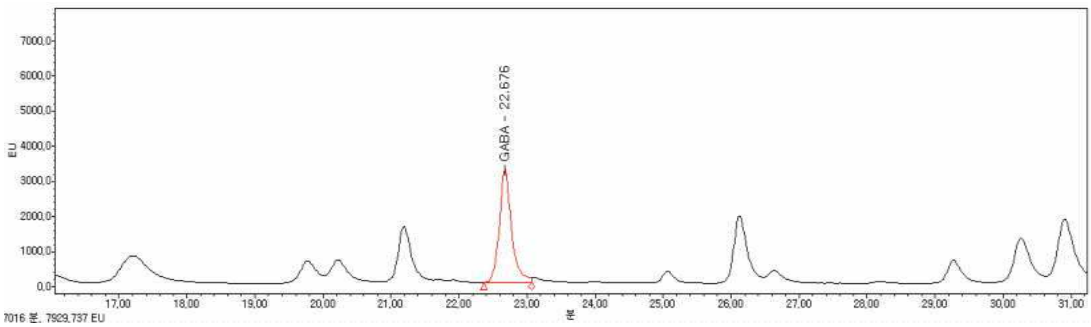


Figure 11. HPLC chromatograms of rice bran samples: (A) non-fermented control, (B) LPBC-fermented extract without enzyme pretreatment, and (C) LPBC-fermented extract with ProteAX enzyme pretreatment.

제4장 결 론

본 연구는 농업부산물인 쌀겨를 GABA 전환 기질로 활용하여 젖산균 발효 기반 기능성 소재로의 개발 가능성을 평가하고자 수행되었다. 전라남도 지역 전통 발효식품으로부터 젖산균을 분리·선별한 결과, 무화과 동동주 유래 균주가 TLC 분석에서 우수한 GABA 전환능을 나타내었으며, 16S rRNA 염기서열 및 계통수 분석을 통해 해당 균주를 *Lactiplantibacillus plantarum* BC(LPBC)로 동정 및 명명하였다. 또한 *gadB*와 *gadC* 유전자 보유가 확인되어, LPBC가 GAD 시스템을 기반으로 글루탐산을 GABA로 전환할 수 있는 균주임을 확인하였다. 성장곡선 분석에서는 LPBC가 배양 5–10시간 구간에서 뚜렷한 대수기를 나타내어, 발효 공정 설계 시 활발한 대사 활동이 이루어지는 시간대로 생성하였다. 효소 처리한 10% 쌀겨 현탁액에 LPBC를 접종하여 37℃, 48시간, 50 rpm 조건으로 발효한 결과, 생균수는 초기 7.16 log CFU/mL에서 48시간 후 9.34 log CFU/mL까지 증가하여 발효 전 과정에서 안정적인 증식이 유지되었다. 발효 기간 동안 pH는 5.99에서 4.18까지 감소하였고, 환원당 농도는 19.19 mg/mL에서 6.24 mg/mL까지 감소하여 젖산균이 기질 내 탄수화물을 활용해 유기산을 생성하고 있음을 보여주었다. 이러한 발효 특성은 쌀겨가 젖산균 성장과 대사 활동을 원활히 이루어질 수 있는 기질임을 시사한다. GABA 생성 측면에서, TLC 정성 분석 결과 LPBC 쌀겨 발효액은 GABA 표준용액과 동일한 위치에서 spot을 나타내어 쌀겨 내 글루탐산이 GABA로 전환되었음을 확인하였다. 특히 ProteAX 효소 전처리를 적용한 시료에서는 효소 미처리 시료에 비해 GABA band의 발색이 더 진하게 관찰되어, 단백질 가수분해가 GABA 생성에 기여함을 시사하였다. HPLC 정량 분석 결과, 발효 전 쌀겨 분말의 GABA 함량은 300.42 mg/100 g이었으나, 효소 처리를 하지 않고 LPBC만으로 발효한 경우 593.17 mg/100 g으로 약 2배 증가하였다. ProteAX 효소 가수분해 후 LPBC로 발효한 시료에서는 GABA 함량이 1,408.49 mg/100 g까지 증가하여, 효소–발효 복합 공정이 쌀겨 유래 글루탐산의 이용 가능성을 높이고 GABA 전환 효율을 극대화할 수 있음을 보여주었다.

종합하면, LPBC는 *gadB·gadC* 기반 GAD 시스템과 우수한 생육 특성을 겸비한 GABA 생성 젖산균으로서, 쌀겨 발효 공정에서 GABA 함량을 실질적으로 증진시킬 수 있는 균주임을 확인하였다. 또한 ProteAX 효소 전처리와 LPBC 발효를 결합한 Bioconversion 공정은 저활용 농업부산물인 쌀겨의 기능성 가치를 높이고, GABA 증진을 통한 고부가가치 기능성 식품 소재로의 전환 가능성을 제시한다.

참고문헌

1. Li X, Feng X, Sun X, Hou N, Han F, Liu Y. Global, regional, and national burden of Alzheimer's disease and other dementias, 1990–2019. Frontiers in Aging Neuroscience 14, 937486 (2022)

2. Heo HJ. Cognitive Function in Brain and Phytochemicals as Functional Food Resources. Food Science and Industry 46(2), 23-32 (2013)

3. Kihara AH. GABA Signaling in Health and Disease in the Nervous System. International Journal of Molecular Sciences 25(20), 11193 (2024)

4. Lim SD, Kim KS. Effects and utilization of GABA. Korean Journal of Dairy Science and Technology 27(1), 45-51 (2009)

5. Yang JC. Anxiety and GABA System. Anxiety and Mood 2(2), 79-85 (2021)

6. Shin YY, Byun JI, Chung SE, Seong MJ, Cho HA, Cha HG, Shin WC. Effect of Low and High-Dose GABA from Unpolished Rice-Germ on Timing and Quality of Sleep: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial. Journal of Sleep Medicine 13(2), 60-66 (2016)

7. Xu J, Ge Z, Wang H, Zhang C, Xu J, Li Y, Yang X, Zhang L, Li Z, Liu Z, Wang G, Du J. Long-term GABA supplementation mitigates anxiety by modulating complement and neuroinflammatory pathways. NPJ

Science of Food 9(1), 60 (2025)

8. Sapwarobol S, Saphyakhajorn W, Astina J. Biological Functions and Activities of Rice Bran as a Functional Ingredient: A Review. Nutrition and Metabolic Insights 14, 11786388211058559 (2021)

9. Tan BL, Norhaizan ME, Chan LC. Rice Bran: From Waste to Nutritious Food Ingredients. Nutrients 15(11), 2503 (2023)

10. Ahn HY, Choe DJ, Kim BK, Lee JH, Cho YS. Bioactive Materials and Antioxidant Properties of Fermented Rice-bran Extract. Journal of Life Science 25(9), 1014-1020 (2015)

11. Tuncel NY. Stabilization of Rice Bran: A Review. Foods 12(9), 1924 (2023)

12. Icer MA, Sarikaya B, Kocyigit E, Atabilen B, Celik MN, Capasso R, Ağagündüz D, Budán F. Contributions of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) Produced by Lactic Acid Bacteria on Food Quality and Human Health: Current Applications and Future Prospects. Foods 13(15), 2437 (2024)

13. Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. Food Microbiology 22(6), 497-504 (2005).

14. Ahmad R, Pandit C, Yu YH, Chen WJ, Cheng YC, Ali I, Cheng YH. The Impact of Fermented Gamma-Aminobutyric Acid on Poultry Growth Performance Through Insulin-like Growth Factor-1 Activation.

Fermentation 11(2), 84 (2025)

15. Jin WJ, Kim MJ, Kim KS. Utilization of barley or wheat bran to bioconvert glutamate to ɣ-aminobutyric acid (GABA). Journal of Food Science 78(9), C1376-C1382 (2013)

16. Lee MJ, Kim SH, Kim HS, Kim HY, Seo WD, Choi SW, Lee KS, Jang KC. Production of ɣ-aminobutyric Acid Using the Korean Hull-less Barley Bran with Glutamate. Korean Journal of Crop Science 63(1), 35-40 (2018)

17. Rizzello CG, Hernández-Ledesma B, Fernández-Tomé S, Curiel JA, Pinto D, Marzani B, Coda R, Gobbetti M. Italian legumes: effect of sourdough fermentation on lunasin-like polypeptides. Microbial Cell Factories 14, 168 (2015)

18. Kook MC, Cho SC. Production of GABA (gamma amino butyric acid) by Lactic Acid Bacteria. Korean Journal for Food Science of Animal Resources 33(3), 377-389 (2013)

19. Park YH, Kwon MJ, Shin DM, Lee SP. Production of Functional Vinegar Enriched with ɣ-Aminobutyric Acid through Serial Co-Fermentation of Lactic Acid and Acetic Acid Bacteria Using Rice Wine Lees. Applied Microbiology 4(3), 1203-1214 (2024)

20. Hur SS. Production of Fermented *Saccharina japonica Extract* with Enhanced GABA Content. Journal of the Korean Applied Science and Technology 39(4), 517-526 (2022)

21. Yunes RA, Poluektova EU, Dyachkova MS, Klimina KM, Kovtun AS, Averina OV, Orlova VS, Danilenko VN. GABA production and structure of *gadB*/*gadC* genes in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from human microbiota. Anaerobe, 42, 197-204 (2016)

22. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. Analytical Chemistry 31(3), 426-428 (1959)

23. Oh SJ. A Chronological Review of *Lactobacillus acidophilus.* Food Science and Industry 47(4), 8-13 (2014)

24. Oh SJ. *Lactobacillus acidophilus* as a Probiotics. Journal of Milk Science and Biotechnology 37(3), 155-166 (2019)

25. Thongruck K, Maneerat S. Enhanced Production of Gamma-Aminobutyric Acid (GABA) from *Lactobacillus futsaii* CS3 Using Agri-Food Industries By-Products Under Batch and Fed-Batch Fermentation. Indian Journal of Microbiology 63(4), 467-482 (2023)

26. Cui Y, Miao K, Niyaphorn S, Qu X. Production of Gamma-Aminobutyric Acid from Lactic Acid Bacteria: A Systematic Review. International Journal of Molecular Sciences 21(3), 995 (2020)

27. Park SJ, Kim DH, Kang HJ, Shin MH, Yang SY, Yang JW, Jung YH. Enhanced production of ɣ-aminobutyric acid (GABA) using *Lactobacillus plantarum* EJ2014 with simple medium composition. LWT - Food Science and Technology 137, 110443 (2021)

28. Thuy DTB, Nguyen A, Khoo KS, Chew KW, Cnockaert M, Vandamme

P, Ho YC, Huy ND, Cocoletzi HH, Show PL. Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production by newly identified Pediococcus pentosaceus MN12 isolated from 'mam nem', a fermented fish sauce. Bioengineered 12(1), 54-62 (2021)

29. Wang Q, Liu X, Fu J, Wang S, Chen Y, Chang K, Li H. Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912. Microbial Cell Factories 17(1), 80 (2018)

30. Lyte M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. Bioessays 33(8), 574-581 (2011)

31. Lee YD. Fermented property and antioxidative effect of GABA producing *Lactobacillus plantarum* from kimchi. Journal of Food Hygiene and Safety 36(5), 440-446 (2021)

32. Bai X, Shi P, Chu W. Probiotic attributes, antioxidant and neuromodulatory effects of GABA-producing *Lactiplantibacillus plantarum* SY1 and optimization of GABA production. BMC Microbiology 25(1), 341 (2025)

33. Lee HJ, Son JY, Lee SJ, Lee HS, Lee BJ, Choi IS, Sohn JH. Production of gamma-Aminobutyric Acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* subsp. plantarum B-134 Isolated from Makgeolli, Traditional Korean Rice Wine. Journal of Life Science 27(5), 567-574 (2017)

34. Yang L, Zhang X, Chen J, Zhang Y, Feng Z. Expanding the pH range of glutamate decarboxylase from *L. pltarum* LC84 by site-directed

mutagenesis. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 11, 1160818 (2023)

35. Tajabadi N, Baradaran A, Ebrahimpour A, Rahim RA, Bakar FA, Manap MYA, Mohammed AS, Saari N. Overexpression and optimization of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 for high gamma-aminobutyric acid production. Microbial Biotechnology 8(4), 623-632 (2015)

36. Rojas-Rejón OA, Gonzalez-Figueredo C, Quintero-Covarrubias AR, Saldaña-Jáuregui A. Growth of *Lactiplantibacillus plantarum* BG112 in Batch and Continuous Culture with *Camellia sinensis* as Prebiotic. Fermentation 10(9), 487 (2024)

37. Han MH, Yang JM, Joo YC, Moon GS. Production of Functional Fermented Soymilk by ɣ-Aminobutyric Acid Producing Lactic Acid Bacteria. Current Topics in Lactic Acid Bacteria and Probiotics 5(2), 59-64 (2019)

38. Choi ML. Changes in Biological activity of GABA rice bran fermented by Lactic acid bacteria. Master's thesis, Graduate School of Yeungnam University, Gyeongsangbuk-do, Korea (2013)

39. Lai QD, Doan NTT, Nguyen TH. Enhancing gamma aminobutyric acid synthesis from defatted rice bran extract by *Lactobacillus brevis* VTCC-B397: technical parameters analysis. International Journal of Food Science and Technology 60(1), vvaf015 (2025)