

글루탐산 용액 처리에 따른 발아현미 중의 감마-아미노낙산 및 일부 아미노산 함량변화

†오 석 흥 · 김 수 화 · 문 연 정 · 최 원 규
우석대학교 생물공학과
(접수 : 2001. 12. 12., 게재승인 : 2002. 2. 20.)

Changes in the Levels of γ -Aminobutyric Acid and Some Amino Acids by Application of a Glutamic Acid Solution for the Germination of Brown Rices

Suk-Heung Oh†, Su-Hwa Kim, Yeon-Jong Moon, and Won-Gyu Choi
Department of Biotechnology, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea
(Received : 2001. 12. 12., Accepted : 2002. 2. 20.)

The changes in the levels of γ -aminobutyric acid (GABA) and some free amino acids were investigated in germinating brown rices. Ungerminated brown rices were germinated for 72 hrs by application of the following solutions: 1) distilled water, 2) 50 ppm lactic acid, 3) 5 mM glutamic acid. The GABA levels were enhanced in all germinated states of brown rices compared with ungerminated ones, highest in the germinated brown rices by 5 mM glutamic acid solution. Alanine levels were also enhanced significantly in the germinated brown rices. The levels of aspartic acid and glutamic acid were decreased significantly in all the germinated states. The levels of serine decreased during germination in the solutions of water and lactic acid were increased by the germination in the glutamic acid solution. The data show that germination of brown rices by the application of the glutamic acid solution can significantly increase the levels of GABA and can restore the serine level.

Key Words : γ -aminobutyric acid (GABA), amino acids, brown rices, germination

서 론

γ -aminobutyric acid (GABA)는 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질로 작용하는 것으로 알려진 비단백태 아미노산이다 (1,2). GABA는 동물의 경우 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 향진시키며 (3), prolactin의 분비, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하며 혈압강하 및 통증완화 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 관심이 높은 물질이다(1).

식물의 경우 GABA의 존재가 이미 반세기 전에 확인된 바 있다(4). 그 동안의 식물 GABA 기능 및 생성 메커니즘에 관한 연구를 종합해 보면 외부 환경적 요인들(산소부족, 저온 및 고온, 어둠, 기계적 자극 등)에 의해 식물체내 GABA의 생성이 증진되며(5-8), 동물이나 미생물에서의 GABA 생성기

작과는 달리 식물에서는 Ca^{2+} 과 결합한 calmodulin이 glutamate decarboxylase (GAD)를 활성화 시켜 GABA 생성을 주로 증진시키는 것으로 보고되어 있다(9-11). 식물세포내 GABA는 각종 자극에 의해 증가되는 H^+ 을 소비하여 pH를 조절하기 위한 대사기구의 한 부분, glutamate에서 succinate에 이르는 GABA-shunt를 통해 TCA 회로에서 산화를 위한 탄소골격의 제공, 질소저장 화합물 및 아미노산 대사산물, 식물이 해충의 공격중에 있을 때 내충성 기능을 보일 수 있는 물질 등의 여러 가지의 기능이 제안되고 있다(5,6).

전술한 바와 같이 GABA가 고혈압의 예방, 통증의 완화 등의 중요한 역할을 하는 것으로 알려지면서 의약품으로서의 GABA 뿐 아니라 최근에는 기능성 식품소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다. 예를들면, Chang 등(12)은 제주도 다원에서 생산된 녹차 생엽을 적체 시기별로 혐기적으로 처리하여 GABA 및 기타 주요성분의 함량변화를 측정 한 결과 GABA의 함량이 증진되는 것을 확인하였다. Yun 등(13)도 보리 맥아제조시 발아된 보리에 혐기적인 처리를 가하므로써 맥아 중의 GABA 함량을 약 2배 증진시킬 수 있다고 보고하였다. 또한 본 연구진은 키토산처리에 의해

†Corresponding Author : Department of Biotechnology, Woosuk University, Jeonju 565-701, Korea
Tel : +82-63-290-1433, Fax : +82-63-291-9312
E-mail : shoh@core.woosuk.ac.kr

배추 중의 GABA 함량을 증진시킬 수 있었으며(14), GABA 함량이 증진된 배추첨가 식이는 만성적인 알콜섭취로 인해 증가된 쥐간 중의 triglyceride 및 총지질 함량을 유의적으로 낮추는 것으로 보고하였다(15).

본 연구진은 최근 현미발아와 GABA 생성에 관한 논문에서(16) 키토산용액을 현미발아시 사용하면 현미 중의 GAD가 더욱 활성화되어 GABA 함량이 증진됨을 보고한 바 있고, 특히 키토산용액의 사용은 현미 발아시 잡균의 오염도 방지할 수 있어 양질의 발아현미를 생산할 수 있음을 제안한 바 있다(16). 이번 연구에서는 발아현미 중의 GABA 생성을 증진시킬 수 있는 다각적인 방안을 모색하던 중 글루탐산 용액을 현미발아시 사용했을 경우 GABA, alanine 및 serine 함량이 현저히 증진되는 등 몇가지 흥미있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약 및 기구

GABA 및 유리아미노산 분석을 위한 HPLC는 Waters제 (AccQ·Tag Amino Acid Analysis System) (USA)를 사용하였고, 동결건조기는 Ilshin사 제품(Korea)을 이용하였다. GABA 표준품은 Sigma제(USA)를, 다른 유리아미노산 표준품은 Pierce제(USA)를 사용하였다. 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbonate (AccQ·Fluor Reagent), acetate-phosphate buffer (AccQ·Tag Eluent A)는 Waters제를 사용하였으며 그 외 시약들은 특급제품을 사용하였다.

현미 발아

시판 현미 50 g을 플라스틱 용기에서 적정수분(500ml)과 25°C의 온도조건으로 Incubator에서 발아시켰다. 물발아구에는 증류수를, lactic acid구에는 5% lactic acid를 1000배 물로 희석하여 50 ppm으로 만들어 사용하였다. Glutamic acid구에는 glutamic acid (Sigma제)를 5 mM 되게 증류수로 녹여 사용하였다. 발아에 사용한 각 용액들은 12시간 마다 새로이 조제한 각각의 용액으로 교환해 주면서 72시간 동안 발아시켰다. 각 용액에서 발아된 현미를 건져내어 건조한 여과지에서 자연건조 시킨 후 액체질소를 가하여 유발에서 마쇄하였고 파우더는 -80°C에 보관하였다.

GABA 및 아미노산 측정

발아현미 중의 GABA 및 유리아미노산 함량 변화를 측정하기 위해 액체질소로 마쇄된 시료 파우더에 메탄올:클로로포름:물(12:5:3)의 혼합액을 가하여 섞어 주었다. GABA를 포함하는 수용액 층은 원심분리(12,000 x g, 15 min, 4°C)를 통하여 얻었다. 침전물에 클로로포름:물(3:5)의 혼합액을 가하여 남아있을지도 모르는 GABA를 2차 추출하였고, 1, 2차 원심분리로부터 얻은 상등액을 합하여 냉동건조하였다. 이어 소량의 물로 용해한 후 0.45 µm PVDF 필터 (Millipore)로 여과하여 분석에 사용하였다. GABA 및 아미노산의 형광 유도체화를 위해 AccQ·Fluor Reagent를 사용하였으며, 이들 유도체의 분리를 위해 3.9 x 150 mm AccQ·Tag™ (Nova-Pak™ C₁₈, Waters) column을 사용하였다. Column으로

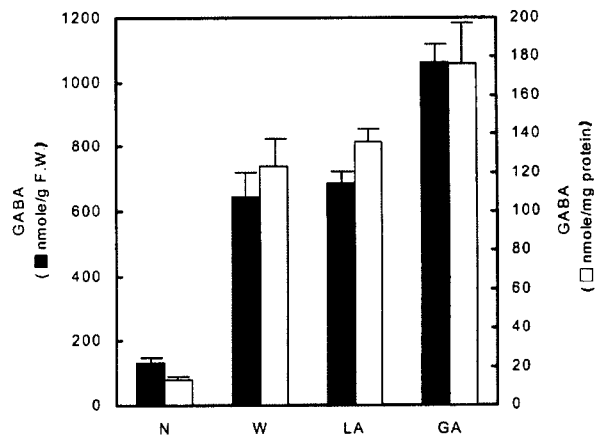


Figure 1. Increase in the levels of GABA by the germination of brown rices in glutamic acid solution. N, ungerminated brown rices; W, brown rices germinated in water; LA, brown rices germinated in 50 ppm lactic acid; GA, brown rices germinated in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight (■), and standardized to total soluble protein (□). The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

부터 유도체를 용출시키기 위해서는 AccQ·Tag Eluent A와 60% acetonitrile을 98:2의 비율로 분당 1 mL의 유속으로 흘려 주었다. GABA 및 아미노산 함량은 표준 GABA 및 표준 아미노산의 분석결과와 비교하여 산출하였다(8,9).

기타분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 현미중의 총단백질 함량은 감마-글로블린을 표준단백질로 사용하여 Bradford법(17)으로 측정하였다.

결 과

발아처리 조건별 GABA 함량변화

현미를 여러 조건에서 72시간 침종하여 발아 시킨 후 분석한 결과 발아하지 않은 현미에 비하여 GABA 함량이 모두 유의적으로 증가하였다 (Figure 1). 가장 두드러진 증가현상을 보인 구는 5 mM glutamic acid구로 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 증가 정도는 발아하지 않은 현미에 비해 각각 8배와 12배의 증가를 보였다. 물발아구와 lactic acid구는 glutamic acid구 보다는 상대적으로 증가 정도가 낮았지만 발아하지 않은 현미구에 비하여는 시료 g당 약 5배, 시료 추출물 중의 단백질 mg당 약 8배 정도의 증가를 보였다.

발아처리 조건별 Glutamic acid 함량 변화

각 처리조건에서의 glutamic acid (Glu) 함량 변화는 Figure 2와 같다. Figure 2에서와 같이 Glu는 현미 발아와 함께 물발아구에서 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 각각 약 3배와 2배의 감소를 보였고, lactic acid구에서는 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 약 4배와 2배의 감소를 보였다. 또한 glutamic acid처리구에서도 그 감소가 뚜렷하여 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 약 4배와

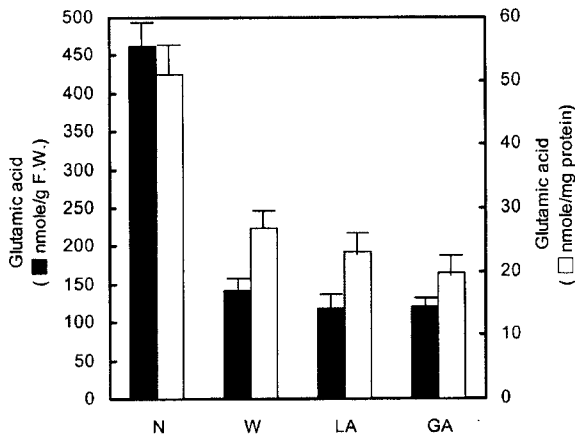


Figure 2. Decrease in the levels of Glu by the germination of brown rices in several solutions. N, ungerminated brown rices; W, brown rices germinated in water; LA, brown rices germinated in 50 ppm lactic acid; GA, brown rices germinated in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight (■), and standardized to total soluble protein (□). The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

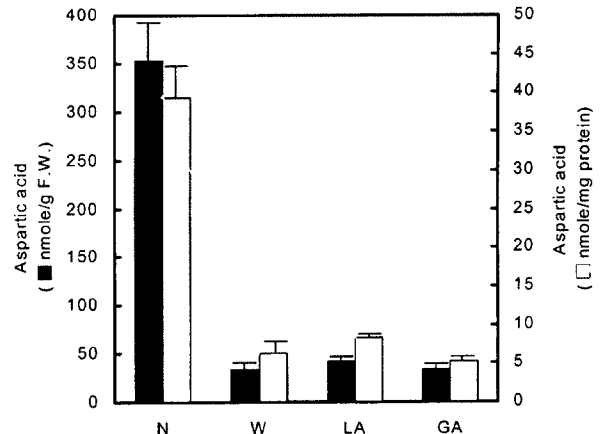


Figure 4. Decrease in the levels of Asp by the germination of brown rices in several solutions. N, ungerminated brown rices; W, brown rices germinated in water; LA, brown rices germinated in 50 ppm lactic acid; GA, brown rices germinated in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight (■), and standardized to total soluble protein (□). The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

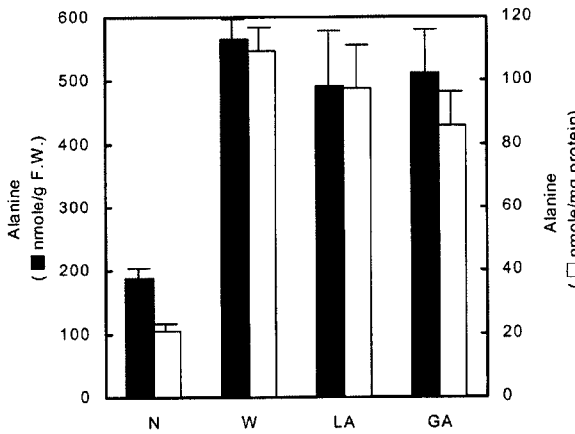


Figure 3. Increase in the levels of Ala by the germination of brown rices in several solutions. N, ungerminated brown rices; W, brown rices germinated in water; LA, brown rices germinated in 50 ppm lactic acid; GA, brown rices germinated in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight (■), and standardized to total soluble protein (□). The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

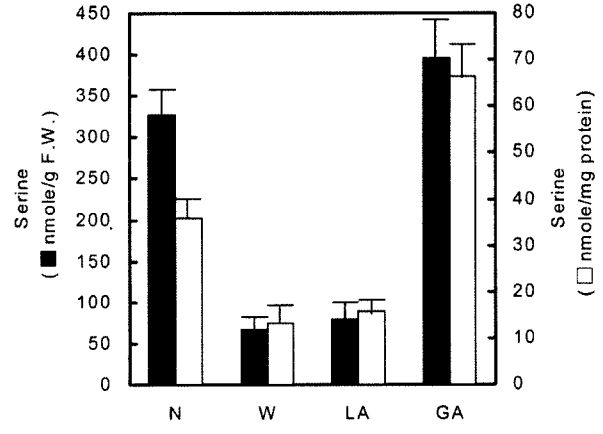


Figure 5. Changes in the levels of Ser by the germination of brown rices in several solutions. N, ungerminated brown rices; W, brown rices germinated in water; LA, brown rices germinated in 50 ppm lactic acid; GA, brown rices germinated in 5 mM glutamic acid. Values are standardized to fresh weight (■), and standardized to total soluble protein (□). The data represent the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

2.5배의 감소를 보였다.

발아처리 조건별 Alanine 함량 변화

각 처리조건에서의 alanine (Ala) 함량 변화는 Figure 3과 같다. Ala은 발아와 함께 물발아구에서 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 각각 약 3배와 5배의 증가를 보였고, lactic acid구와 glutamic acid처리구에서도 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 각각 2.5배와 4배 이상이 증가한 것으로 조사되었다.

발아처리 조건별 Aspartic acid 함량 변화

각 처리조건에서의 aspartic acid (Asp) 함량변화는 Figure 4

와 같다. Figure 4에서 보는 바와 같이 Asp는 현미 발아와 함께 물발아구에서 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 각각 약 10.5배와 6배의 감소를 보였고, lactic acid구에서는 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 약 8.5배와 5배의 감소를 보였다. 또한 glutamic acid처리구에서도 그 감소가 뚜렷하여 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 약 11배와 7배의 감소를 보였다.

발아처리 조건별 Serine 함량 변화

각 처리조건에서의 serine (Ser) 함량변화는 Figure 5와 같다. 발아하지 않은 현미에 비해서 물발아구와 lactic acid구에서는 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 각각

약 4배와 2배 이상의 감소를 보였다. 그러나 glutamic acid 처리구에서는 Ser의 함량이 발아 이전의 수준 보다 오히려 증진된 것으로 나타났다 (Figure 5).

고 찰

발아현미 중의 GABA 함량을 획기적으로 증진시킬 수 있는 방법을 모색하기 위해서 glutamic acid를 발아용액으로 사용함으로써 물이나 lactic acid 용액을 사용한 경우보다 GABA 함량을 더욱 증진시킬 수 있음을 발견하였다. 뿐만 아니라 glutamic acid처리구는 다른 처리구에 비하여 Ser 함량도 증진시켰다.

현미발아시 GABA 생성증진은 주로 glutamic acid를 GABA로 전환시키는 GAD 작용의 결과라 여겨진다. 실제로 발아와 더불어 현미중의 GAD 특이활성이 증진되는 것으로 조사된 바 있다(16). 따라서 내재해 있는 GAD의 작용으로 glutamic acid의 함량은 현저히 낮아지고 GABA 함량은 증진 되는 것으로 판단된다. 그러나 식물의 경우 glutamic acid 등이 putricine 등의 중간 물질을 경유하여 GABA로 전환되는 또 다른 GABA 생성경로를 가지고 있는 것으로도 알려져 있기 때문에(18) 앞으로 이에 대한 조사도 이루어져야 할 것이다.

식물에서 GABA의 합성은 여러 외부 환경적 요인(예, 기계적인 자극, 온도, 산소결핍, 수분 스트레스)에 의해 유도되는 것으로 보고되고 있어(5-8), 식물체가 환경적 스트레스에 대항하기 위한 수단으로 하나로 GABA 생성체계를 가동시키고 있다고도 생각된다. 식물세포내 GABA 생성체계에는 glutamic acid, GAD, 칼슘, calmodulin 등의 여러 인자가 관련되어 있는 것으로 확인된 바 있다(9-11). 예를들면, 식물에서 얻어진 GAD는 동물이나 미생물에서 얻어진 GAD와는 달리 카르복시말단에 calmodulin과 결합할 수 있는 부위를 가지고 있어 칼슘과 결합한 calmodulin이 이 결합 부위에 결합하면 GAD가 활성화되는 칼슘/칼모듈린-의존형인 것으로 밝혀진 바 있다(10,11). 또한 벼를 산소결핍 상태에서 싹을 틔울 경우 단백질 및 아미노산 대사, GABA 생성대사에 변화가 생기는데 여기에는 칼슘과 calmodulin이 관련되어 있음이 확인되었다(19).

다른 아미노산 중 현저한 함량변화를 보인 것은 Asp, Ala 그리고 Ser이다. 상추잎을 헹기처리한 후 아미노산의 전환 경로를 조사한 연구에 의하면 대부분의 Asp가 oxalacetate와 pyruvate를 경유하여 Ala로 전환되는 것으로 보고된 바(7) 있어 현미발아시 Ala의 증가와 Asp의 감소도 같은 전환 경로를 거칠 것으로 예상된다. 그러나 물발아, 젖산발아에서 감소하던 Ser이 glutamic acid처리구에서 발아이전의 수준 이상으로 회복된 점은 매우 흥미롭다. 첨가된 Glu를 포함하여 현미중의 일부 Glu의 아미노기가 3-phosphohydroxypyruvate에 전달되어 3-phosphoserine이 된 후 Ser으로 전환되는 경로에 따라 Ser 함량이 증진될 수 있으며, 이의 경우 phosphoaminoserine transferase 및 phosphoserine phosphatase가 역할을 했을 것으로 판단된다(20). 물발아와 젖산발아에 의해 감소하던 Ser이 Glu의 보강에 의해 GABA 함량의 증진과 더불어 증진된 것은 GABA 생성에 Glu 뿐 아니라 Ser도 관련되어 있음을 암

시해 주고 있다. 현미의 glutamic acid처리에 의해 증진되는 Ser의 대사적 출발과 운명물질에 대한 체계적인 연구는 매우 흥미로울 것이라 여겨진다.

발아현미 중의 GABA 및 아미노산 함량변화는 원료 현미의 종류, 도정율, 보관상태 뿐 아니라 발아과정 중의 처리조건 등에 따라서 달라질 수 있는 있는 것으로 판단되는 바 GABA 고함유 쌀 및 발아현미 생산을 위해서는 보다 체계적이고 다각적인 연구가 이루어져야 할 것이다. 또한 GABA 및 유용 아미노산 등이 적절히 함유된 기능성 식품 및 음료 생산, 이들 제품의 임상적인 효과 확인 및 그 작용기전 규명에 대한 연구도 계속되어야 할 것이다.

요 약

GABA가 고함유된 발아현미를 생산할 수 있는 전략을 마련하고자 현미발아시 통상적인 물발아구 외에 젖산발아구, glutamic acid발아구로 나누어 발아 이전의 현미와 GABA 및 일부 유리아미노산 함량을 비교분석하였다. 5 mM glutamic acid 용액을 발아에 사용한 경우 가장 높은 GABA 함량 증진을 보여 시료 g당 및 시료 추출물 중의 단백질 mg당 증가정도가 발아하지 않은 현미에 비해 각각 8배와 12배로 나타났다. 또한 glutamic acid 발아구는 물발아나 젖산발아시 현저히 감소되던 serine의 함량을 오히려 증진시켰다. 모든 발아구에서 GABA 및 alanine 함량이 증진된 것과는 반대로 glutamic acid와 aspartic acid 함량은 현저히 감소하였다. 이는 발아 과정에 의해 glutamic acid는 GABA로 aspartic acid는 alanine으로 전환된 것에 기인된 것이라 여겨진다. 이상의 결과를 종합하면 현미발아시 glutamic acid액을 사용하면 기능성 물질인 GABA 함량을 현저히 증진시키며, serine의 감소를 막을 수 있어 기능성이 보강된 발아현미를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

이 논문은 과학기술부·한국과학재단 지정·전라북도 지원 우수 지역협력연구센터인 전북대학교 바이오식품 소재 개발 및 산업화 연구센터의 연구비 지원에 의해 연구되었으며 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Krogsgaard-Larsen, P. (1989), GABA receptors, In *Receptor Pharmacology and Function*, M. Williams, R. A. Glennon and P.M.W.M. Timmermans Eds., p349-383, Marcel Dekker, Inc., New York.
2. Mody, I., Y. DeKoninck, T. S. Otis, and I. Soltesz (1994), Bringing the cleft at GABA synapses in the brain, *Trends Neurosci.* 17, 517-525.
3. Nakagawa, K. and A. Onoto (1996), Accumulation of γ -aminobutyric acid(GABA) in the rice germ, *Food Processing* 31(9), 43-46.
4. Satya Narayan, V. and Nair, P.M. (1990) Metabolism enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants, *Phytochemistry* 29, 367-375.

5. Bown, A. W. and B. J. Shelp (1997), The metabolism and functions of γ -aminobutyric acid, *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
6. Crawford, L. A., A. W. Bown, K. E. Breitzkreuz, and F. C. Guinel (1994), The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH, *Plant Physiol.* **104**, 865-871.
7. Streeter, J. G. and Thompson, J. F. (1972) Anaerobic accumulation of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves (*Raphanus sativus* L.), *Plant Physiol.* **49**, 572-578.
8. Snedden, W. A. and H. Fromm (1998), Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment, *Trends Plant Sci.* **3**, 299-304.
9. Ling, V., W. A. Snedden, B. J. Shelp, and S. M. Assmann (1994), Analysis of a soluble calmodulin binding protein from fava bean roots: Identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin-activated enzyme, *Plant Cell* **6**, 1135-1143.
10. Snedden, W. A., T. Arazi, H. Fromm, and B. J. Shelp (1995), Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase, *Plant Physiol.* **108**, 543-549.
11. Yun, S. J. and S. H. Oh (1998), Cloning and characterization of a tobacco cDNA encoding calcium/calmodulin-dependent glutamate decarboxylase, *Mol. Cells* **8**, 125-129.
12. Chang, J. S., B. S. Lee, and Y. G. Kim (1992), Changes in γ -aminobutyric acid(GABA) and the main constituents by treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves, *Korean J. Food. Sci. Technol.* **24**, 315-319.
13. Yun, S. J., K. G. Choi, and J. K. Kim (1998), Effect of anaerobic treatment on carbohydrate-hydrolytic enzyme activities and free amino acid contents in barley malt, *Korean Soci. Crop Sci.* **43**, 19-22.
14. Oh, S. H., K. W. Seo, D. S. Choi, and K. S. Han (2000), Application effects of chitosan fertilizer on the growth of cabbage and GABA contents in the cabbage, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43(1)**, 34-38.
15. Cha, Y. S. and S. H. Oh (2000), Investigation of γ -aminobutyric acid in Chinese cabbages and effects of the cabbage diets on lipid metabolism and liver function of rats administered with ethanol, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29(3)**, 500-505.
16. Oh, S. H. and Y. G. Choi (2000), Production of the quality germinated brown rices containing high γ -aminobutyric acid by chitosan application, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 615-620.
17. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
18. Marty, D., F. Mesnard, F. Gillet-Manceau, M. A. Fliniaux, and J. P. Monti (1997), Changes in primary metabolism in connection with alkaloid biosynthesis in solanaceous cell suspension, *Plant Sci.* **122**, 11-22.
19. Aurisano, N., A. Bertani, and R. Reggiani (1995), Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acids metabolism in rice roots under anoxia, *Plant Cell Physiol.* **36(8)**, 1525-1529.
20. Lehninger, A. L., L. N. David, and M. C. Michael (1993), Principles of Biochemistry, 2nd ed., p746, Worth Publishers, New York.