

## *Lactobacillus sakei* B2-16에 의한 $\gamma$ -amino butyric acid(GABA)의 생산에 관한 연구

국무창<sup>1</sup> · 조석철<sup>2</sup> · 최찬익<sup>3</sup> · 박훈<sup>4</sup> · 김승섭<sup>5</sup> · 정명훈<sup>5</sup> · 변유량<sup>1</sup> · 이현용<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>(주)바이오벤 연구개발팀, <sup>2</sup>경희대학교 피부생명공학센터, <sup>3</sup>이화여자대학교 식품공학과,  
<sup>4</sup>선문대학교 식품과학과, <sup>5</sup>강원대학교 BT 특성화대학 생물소재공학전공 · 생명공학연구소

### Study of $\gamma$ -Amino Butyric Acid (GABA) Production by *Lactobacillus sakei* B2-16

Moo Chang Kook<sup>1</sup>, Seok Cheol Cho<sup>2</sup>, Chan Ick Cheigh<sup>3</sup>, Hoon Park<sup>4</sup>,  
Seung Seop Kim<sup>5</sup>, Myoung Hoon Jeong<sup>5</sup>, Yu Ryang Pyun<sup>1</sup>, and Hyeon Yong Lee<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>R&D Division, Biovan Co., Ltd.

<sup>2</sup>Skin Biotechnology Center, Kyung Hee University

<sup>3</sup>Department of Food Science and Technology, Ewha Womans University

<sup>4</sup>Department of Food Science, Sun Moon University

<sup>5</sup>Department of Biomaterials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology,  
Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University

#### Abstract

*Lactobacillus sakei* B2-16 producing high level of  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA) was previously isolated from Korean traditional fermented food, *Kimchi*. *L. sakei* B2-16 converted 99.3% of mono sodium glutamate (MSG) to GABA in *Lactobacilli* MRS broth supplemented with 1% MSG. In order to enhance the production of GABA by *L. sakei* B2-16, growth parameters such as media components and concentrations of major components were evaluated. The maximum GABA concentration was obtained by a modified rice germ extract broth containing 4%(w/v) sucrose and 1%(w/v) yeast extract. *L. sakei* B2-16 converted 100% of MSG to GABA in modified rice germ extract broth supplemented with 7% MSG.

**Key words:**  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA), *Lactobacillus sakei*, rice germ extract

$\gamma$ -Aminobutyric acid(GABA)는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 구성 아미노산으로서 사람에게 있어서는 신경계, 혈액에 함유되어 있으나 대부분은 뇌의 골수에 존재하여 acetylcholine이라 불리는 신경전달 물질을 증가시키고, 뇌기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 한다(Chang et al., 1992; Park et al., 2002; Shelp et al., 1999). GABA는 glutamic acid decarboxylase(GAD)에 의해 glutamate가 비가역적으로 탈탄산화되어 생성되는데, GAD와 GABA는 미생물에서부터 고등생물까지 널리 발견되고 있다. 고등생물의 중추신경계에서 GABA는 억제성 neurotransmitter로 잘 알려져 있는데, GAD에 의해 흥분성 neurotransmitter인

glutamate와 GABA의 농도가 조절되고 있다(Ueno, 2000). 중추신경계 전체 신경전달물질 중 약 30%를 차지하며 다른 전달물질에 비하여 약 200-1,000배의 고농도로 존재한다. 인간의 GAD는 pyridoxal-5'-phosphate(PLP)를 필요로 하며, 65 kDa(GAD65), 67 kDa(GAD67) 두 개의 isoform이 존재한다(Namchuk et al., 1997). 특히, GAD65는 당뇨병 발병 전에 자가 항원으로 작용하여 자가 항체의 목표물이 되는데, 이는 당뇨병의 초기 발견에 대한 가능성과 당뇨병에 대한 이해의 목적으로 많은 연구가 이루어지고 있다(Yoon et al., 1999).

GABA는 신경전달물질, 뇌기능 촉진 뿐 아니라, 혈압저하작용, 이노작용, 항우울증작용, 항산화작용 등의 효과와 더불어 성장 호르몬의 분비 조절에도 관여하며, 통증 완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 특히 뇌졸중 치료로 의약품으로 등록되어 있다(Krgsgaard-Larsen, 1989; Leventhal et al., 2003; 석, 2002). 이러한 GABA의 역할로 최근에는 기능성 식품 소재로서의 관심이 고조되고 있으며

Corresponding author: Hyeon Yong Lee. Department of Biomaterials Engineering, College of Bioscience and Biotechnology, Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon-si, Gangwon-do 200-701, Republic of Korea

Tel: +82-33-250-6455; Fax:

E-mail: HYEONL@kangwon.ac.kr

Received March 27, 2009; revised July 28, 2009; accepted July 29, 2009

GABA가 보강된 우유, 콩, 차, 홍국, 클로렐라 등은 본태성 고혈압 쥐의 혈압을 낮추는 것으로 보고되었다(Abe et al., 1995; Aoki et al., 2003; Hayakawa et al., 2004; Nakamura et al., 2000; Tsuji et al., 1992).

GABA는 각종 야채, 과일, 쌀, 콩 등에 널리 분포되어 있는 것으로 알려져 있으나 그 함량이 낮아 생리작용을 나타내는 농도를 얻기는 힘들며, 전술된 GABA의 기능성에 기인하여, GABA 함량을 증강시킨 차에 대한 연구 외에 다양한 미생물에 의한 GABA의 생산이 보고되었다(Hao & Schmit, 1993; Kono & Himeno, 2000; Maras et al., 1992; Sailusa et al., 1994; Tsushida et al., 1987). 최근에는 쌀 및 콩 발효 식품, 김치 및 젓갈 등에서 분리한 다양한 유산균들이 GABA를 고농도로 생산하는 것으로 보고되었다(Cross, 2004; Han & Kim, 2006; Jeun et al., 2004; Ueno et al., 1997). 일본에서는 김치에서 분리한 유산균을 이용하여 생산된 GABA가 식품에 실제로 응용되고 있으며 소주에서 분리한 *Lactobacillus brevis* IFO 12005를 이용하여 2 mM의 GABA를 생산하였다고 보고하였고(Yokoyama et al., 2002), 일본 전통 발효 식품인 funa-sushi로부터 *L. paracasei* NFRI 7415를 분리하여 302 mM의 GABA를 생산하였다고 보고하였다(Komastuzaki et al., 2005). 중국에서도 *Streptococcus salivarius*를 이용하여 78 mM의 GABA 생산하였다고 보고하였다(Yang et al., 2008). 최근에는 국내 연구진들도 GABA와 관련된 활발한 연구를 진행하고 있으며 *L. brevis* OPK 3, *L. buchneri* 등의 GABA 생산 균주를 김치 등의 전통 발효 식품으로부터 분리하여 각각 19 mM, 251 mM의 GABA를 생산한다고 보고하였다(Cho et al., 2007; Park & Oh, 2006).

본 연구자들은 GABA를 고농도로 생산하는 미생물을 김치로부터 탐색하여, 배지성분으로 첨가되어진 1%의 monosodium glutamate(MSG)를 99% 이상 GABA로 전환시키는 유산균 *L. sakei* B2-16을 분리·동정한 바 있으며(kang et al., 2006), 따라서 본 연구에서는 유산균 발효에 의한 고농도 GABA의 산업적 생산을 위하여 미배아 추출물을 이용한 배지에서 *L. sakei* B2-16의 발효공정을 이용하여 GABA의 최적 생산 조건을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### GABA 생산 균주 및 배양

우리나라 전통 발효식품인 김치로부터 분리한 GABA 생산 젓산균인 *Lactobacillus sakei* B2-16을 1% monosodium glutamate(MSG)를 첨가한 *Lactobacilli* MRS 배지(Difco)에 접종하여 30°C에서 약 10시간 동안 정치 배양하여 전배양액으로 사용하였다.

*L. sakei* B2-16를 이용한 GABA 생산 최적 배지 조성을 확인하기 위하여 MRS를 기본 배지로 하여, 탄소원과 질소

원의 영향을 검토하였다. *L. sakei* B2-16의 GABA 생산을 위한 최적 탄소원을 선정하기 위하여 glucose를 제거한 *Lactobacilli* MRS 배지에 sucrose, fructose, glucose, lactose, xylose, maltose, galactose, arabinose 등 총 8가지 탄소원을 각각 2% 수준으로 첨가하여 검토하였다. 여러 질소원의 영향을 알아보고 최적 질소원을 결정하기 위해서 *Lactobacilli* MRS 배지에 첨가되어 있는 기존의 질소원들을 모두 제거한 후, beef extract, tryptone, soytone, yeast extract, peptone, casitone, casamino acid, proteose peptone No. 3 등 총 8개의 질소원을 *Lactobacilli* MRS 배지에 각각 2.5% 수준의 농도로 첨가하여, *L. sakei* B2-16의 GABA 생산에 미치는 유기 질소원의 영향을 검토하였다.

미배아 추출물을 이용한 배지는 미배아를 온수 추출하여 제조하였다. 먼저 미배아(경기도, 대한민국)를 10배수의 증류수에 현탁한 후, 55°C shaking water bath에서 24시간 동안 추출하였다. 이 추출물을 8000 rpm에서 15분간 원심 분리 한 후 상등액을 회수하였다. 탄소원을 회수된 상등액에 4% sucrose, 1% yeast extract를 첨가하여 GABA 생산 배지를 제조한 후, monosodium glutamate(MSG)의 농도를 달리하여 첨가하여 그 효과를 검토하였으며, 실험의 대조군은 *Lactobacilli* MRS 배지를 사용하였다.

### 균의 생육 및 pH

균체 농도는 2-3시간 간격으로 채취된 시료를 8000 rpm에서 10분간 원심 분리 한 후, 침전된 균체를 생리 식염수로 세척하고 일정한 배수로 생리 식염수에 희석하여 UV/VIS spectrophotometer DU<sup>®</sup>530(Beckman Instruments, Inc., U.S.A)를 이용해서 600 nm에서 흡광도로 측정하였다. 또 배지의 pH는 MP 220 pH meter(Mettler Toledo, Switzerland)를 이용하여 측정하였다.

### GABA의 분석

*L. sakei* B2-16으로부터 생산된 GABA를 정량 분석하기 위하여 RP-HPLC(Waters 2487 Dual  $\lambda$  Absorbance detector, Waters 1525 Binary HPLC pump, Waters 717 plus Autosampler, U.S.A)를 이용하였다. RP-HPLC를 이용한 분석 조건은 Ibolya & Vasanits(1999), Tcherkas et al.(2001)이 보고한 것을 참조로 확립하였다. 우선 시료를 8000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 0.45  $\mu$ m cellulose acetate membrane filter(Advantec. MFS. Inc., Japen)로 여과하여 적정 농도로 희석하였다. 이렇게 준비된 시료는 *o*-phthalaldehyde(OPA)를 이용한 유도체화 과정 후 RP-HPLC에 적용하였다. HPLC column으로는 XTerra column(Waters: RP18 5 mm $\times$ 4.6 mm $\times$ 150 mm, U.S.A)을 사용하였으며, 이동상으로는 0.05 M sodium acetate(pH 7.2)를 용매 A로, 그리고 0.1 M sodium acetate, acetonitrile (HPLC grade), methanol(HPLC grade)이 각각 46:44:10(v/v)으로 섞

인 것(pH 7.2)을 용매 B로 사용하였다. 이동상의 농도 구배는 용매 A를 100%로 하여 분석을 시작해서 30분 경과 후에는 용매 B가 100%가 되고, 40분 경과 후까지 용매 B가 100%, 45분 경과 후까지는 다시 용매 A가 100%가 되게 하였으며, 60분 후까지 용매 A가 100%가 되도록 조절하였다. 이동상의 유속은 1 mL/min로 고정하였고, 358 nm의 U.V. detector로 GABA를 검출하였다.

**결과 및 고찰**

**생육 배지의 선정**

GABA 생산을 위한 생육 배지를 선정하기 위하여 총 8가지의 배지를 조사하였다. *L. sakei* B2-16의 생육에 가장 효과적인 배지는 *Lactobacilli* MRS 배지였으며, 다음으로 APT broth, 그리고 0.5% glucose가 첨가된 M17 broth 순서였다(Table 1). *L. sakei* B2-16에 의한 GABA 생산은 *Lactobacilli* MRS broth에서 다른 배지들에 비하여 월등히 높았다(Table 1). 균체 생육이나 GABA의 생산에 있어서 MRS 배지가 뛰어난 효과를 가진 것은 상대적으로 다른 상용 배지들보다 탄소원(2% glucose)과 질소원, 특히 yeast extract(1%)를 높은 농도로 함유하고 다른 무기물의 함유량도 높은 복합 배지이기 때문인 것으로 추측되며, *Lactobacilli* MRS 배지는 유산균 배양에 알맞은 조성적 특성으로 인해 유산균 배양 최적 배지로서 사용되어 왔다(Aasen et al., 2000; Guyot & Morlon-Guyot, 2001).

**플라스크 배양에서 GABA 생산**

전술한 실험을 통해 결정된 GABA 생산 최적 배지인 MRS broth에 1% MSG를 넣고 30°C에서 *L. sakei* B2-16을 회분 배양하면서 측정된 균체의 증식, pH, GABA의 생산경향을 Fig. 1에 나타내었다. *L. sakei* B2-16은 배양 2시간부터 12시간까지 대수적으로 증식하였으며, 균체량은 16-18시간에서 최대가 되었고, 그 이후 정지기로 들어가는 것을 관

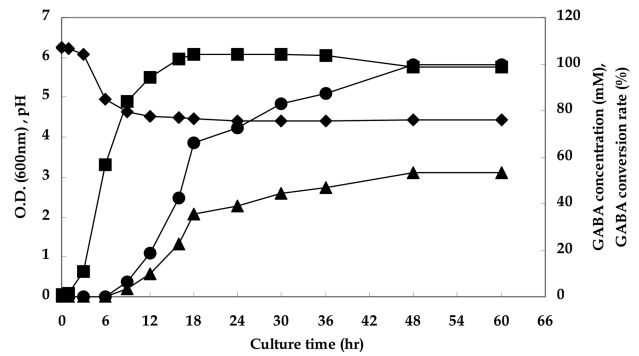


Fig. 1. Batch fermentation profile of *L. sakei* B2-16 in static culture on MRS broth (1% MSG supplement) at 30°C under uncontrolled pH conditions. ■ : cell density (OD at 600 nm), ◆ : pH, ▲ : GABA concentration (mM), ● : GABA conversion rate (%) Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5.0% of the means.

찰할 수 있었으며, 이는 Aasen et al.(2000)과 Champomier-Verges et al.(2002) 등이 보고한 *L. sakei*의 생육 곡선과 유사하였다. GABA의 생산은 배양 시작 후 6시간부터 생산되기 시작해서 18시간까지 급격히 증가였으며, 그 후 48시간까지 완만한 증가하여 최고 농도 53.3 mM에 도달하였다. 첨가해준 MSG 농도에 대한 GABA 전환율을 계산하면 48시간에서 약 99.3%로 MSG는 거의 완전히 GABA로 전환되었다. 이와 같이 대수증식 말기와 정지기 초기에 GABA의 생산량이 급격히 증가하는 것은 glutamate를 GABA로 전환시키는데 핵심이 되는 효소인 GAD의 활성이 정지기에 서 최고가 된다는 Hayakawa et al.(1997)의 보고와 일치하며, 이런 GABA의 생산 증가곡선은 GAD의 활성과 pH의 감소에 기인한 것으로 추정된다.

**생산 배지의 최적화**

전술한 배지 실험에서 *L. sakei* B2-16의 생육배지로 MRS 배지가 가장 우수하였으므로 MRS를 기본 배지로 하

Table 1. Effect of culture media (1% monosodium glutamate supplement) on GABA production by *L. sakei* B2-16 in static flask culture at 30°C.

Culture Media <sup>(a)</sup>	Incubation time (h)							
	16h		48h		16h		48h	
	pH		Growth <sup>(b)</sup>		GABA (mM)			
MRS	4.48	4.36	6.16	6.04	22.6	53.1		
APT	5.43	5.39	3.52	3.48	9.8	15.4		
BHI	6.18	6.13	1.86	1.72	0.9	4.1		
TSB	5.60	5.56	1.41	1.30	0	0.8		
L	4.98	4.97	0.69	0.62	0	0		
NB	6.33	6.31	0.25	0.24	0	0		
M17 + 0.5% glucose	5.51	5.47	2.48	2.35	0.6	1.6		
M17 + 0.5% lactose	6.47	6.47	1.18	1.21	0	0		

<sup>(a)</sup> Monosodium glutamate (MSG) was added at 1% level.

<sup>(b)</sup> O.D. at 600 nm

Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5.0% of the means.

**Table 2. Effects of carbon sources on GABA production by *L. sakei* B2-16 after 48 hours static culture in MRS broth (5% MSG supplement)**

Carbon source <sup>(a)</sup>	Final pH	Growth <sup>(b)</sup>	GABA (mM)	GABA conversion rate (%) <sup>(c)</sup>
Control <sup>(d)</sup>	6.34	0.87	0	0
Glucose	6.27	5.64	149.13	55.9
Lactose	5.64	3.63	46.7	17.5
Sucrose	6.37	6.47	216.89	81.2
Xylose	6.18	0.83	0	0
Fructose	6.17	5.94	155.96	58.4
Maltose	6.08	1.02	0	0
Galactose	6.26	4.01	136.12	51
Arabinose	5.92	4.12	122.4	45.8

<sup>(a)</sup> Carbon sources were added at 2% level.

<sup>(b)</sup> O.D. at 600 nm

<sup>(c)</sup> GABA conversion rate (%) calculated by the age of the produced GABA concentration (mM) over the supplied MSG concentration.

<sup>(d)</sup> Carbon sources in MRS broth were eliminated.

Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5.0% of the means.

여, 탄소원과 질소원의 영향을 검토하였다. *L. sakei* B2-16의 GABA 생산을 위한 최적 탄소원을 선정하기 위하여 총 8가지 탄소원에 대하여 검토하였다. 유산균의 GABA 생산에서 탄소원의 영향에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았으나, Table 2에 나타난 것과 같이, *L. sakei* B2-16의 균체 증식에 가장 큰 효과가 있었던 탄소원은 sucrose, fructose, glucose의 순서였으며, GABA 생산량 또한 sucrose, fructose, glucose의 순서였다. 특히 sucrose의 경우 2% 농도에서 MSG를 GABA로 81.2% 전환시키는데, 이는 MRS 배지 탄소원인 2% glucose가 55.9% 전환시키는 것에 비해 월등한 효과를 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 발효 중 pH에 의한 영향으로 보여진다. 이는 탄소원으로 sucrose를 이용하여 발효를 수행하였을 때, *L. sakei* B2-16의 균체 생육이 가장 우수하였으며, 발효 중 대수 증식기 후반부의 pH는 4.3내외로 다른 탄소원에 비하여 낮은 pH를 보였다(결과 미제시). 이러한 낮은 pH는 glutamic acid decarboxylase(GAD)의 발현에 관계가 있을 것이라 판단된다. GAD의 발현은 대수 증식기 후반부터 활발히 이루어지고, pH의 감소, Cl<sup>-</sup> 등의 이온농도에 따른 pH 변화와 glutamic acid의 농도에 영향을 받는 것으로 보고되었다(Sanders et al., 1998; Biase et al., 1999). Ueno et al.

(1997)과 Nomura et al. (1999) 등은 *L. bevis* 와 *L. lactis*의 GAD의 최적 pH를 4.2와 4.5로 각각 보고하였다. 유산균 유래 GAD의 활성은 낮은 pH에서 우수하며, 이러한 특성이 sucrose를 이용하여 배양 하였을 때 가장 우수한 결과를 보인 것으로 판단되어진다. GABA 생산을 위한 sucrose의 최적농도를 검토한 결과, Table 3에 나타난 것과 같이 4% sucrose 농도에서 GABA 생산량이 최대를 나타냈고 균체량도 증가하는 것을 확인하였다. 또한 4% sucrose 농도에서는 MSG를 GABA로 99.3% 전환시켜 대부분의 MSG가 GABA로 전환되는 현상을 확인할 수 있었다.

*L. sakei* B2-16의 GABA 생산에 미치는 유기 질소원의 영향은 Table 4에 나타내었다. *Lactobacilli* MRS broth의 질소원(beef extract 1%, proteose peptone No.3 1%, yeast extract 0.5%)을 대조군으로 사용하였다. 여러 질소원의 영향을 알아보고 최적 질소원을 결정하기 위해서 MRS 배지에 첨가되어 있는 기존의 질소원들을 모두 제거한 후, 실험에 사용된 각 질소원을 MRS 배지에 2.5% 농도로 첨가하였다. *L. sakei* B2-16 균주의 균체 증식 및 GABA 생산에 가장 효과가 있었던 질소원은 yeast extract, proteose peptone No.3, 그리고 peptone 순서였으며(Table 4), yeast extract의 농도가 1%에서 최대 GABA 생산량을 나타내었

**Table 3. Effects of sucrose concentration on GABA production by *L. sakei* B2-16 after 48 hours static culture in MRS broth (5% MSG supplement)**

Sucrose concentration (%)	Final pH	Growth <sup>(a)</sup>	GABA (mM)	GABA conversion rate (%) <sup>(b)</sup>
1%	6.33	4.87	156.48	58.6
2%	6.27	6.67	222.49	83.3
3%	5.59	6.75	247.93	92.9
4%	5.15	7.33	265.01	99.3
5%	5.14	7.17	261.76	98.1
10%	5.01	6.63	225.91	84.6

<sup>(a)</sup> O.D. at 600 nm

<sup>(b)</sup> GABA conversion rate (%) calculated by the age of the produced GABA concentration (mM) over the supplied MSG concentration.

Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5.0% of the means.

**Table 4. Effects of nitrogen sources on GABA production by *L. sakei* B2-16 after 48 hours static culture in MRS broth (5% MSG supplement)**

Nitrogen source <sup>(a)</sup>	Final pH	Growth <sup>(b)</sup>	GABA (mM)	GABA conversion rate (%) <sup>(c)</sup>
Control <sup>(d)</sup>	5.03	7.53	265.86	99.6
Beef extract	4.78	1.61	4.38	1.6
Tryptone	4.50	3.23	12.67	4.7
Soytone	4.51	3.08	11.95	4.5
Yeast extract	4.98	8.16	255.11	95.5
Peptone	4.51	4.27	34.18	12.8
Casitone	4.52	2.92	9.31	3.5
Casamino acid	5.43	0.17	0	0
Proteose peptone No.3	5.03	6.97	161.53	60.5

<sup>(a)</sup> Carbon source (sucrose) was added at 4% level and nitrogen sources were added at 2.5% level.

<sup>(b)</sup> O.D. at 600 nm

<sup>(c)</sup> GABA conversion rate (%) calculated by the age of the produced GABA concentration (mM) over the supplied MSG concentration.

<sup>(d)</sup> Nitrogen sources in MRS broth (beef extract 1%, proteose peptone and yeast extract 0.5%) were added.

Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5.0% of the means.

다(결과 미제시). 질소원으로서 yeast extract가 비교적 다른 질소원에 비해 효과적인 이유는 다른 질소원들이 효소에 의해 가수 분해된 단백질들로 이루어진 반면, yeast extract는 보다 많은 양의 growth factors와 유리 아미노산, 작은 펩타이드 등이 함유되어 있기 때문이라 생각된다(Aasen et al, 2000).

**미배아 추출물 배지를 이용한 GABA 생산**

최근 일본에서는 쌀겨 등을 온수 추출하여 얻은 추출물을 배지에 첨가할 경우, MSG에서 GABA로의 전환률이 상승되며, 배지로 사용하였을 때 GABA 생산량이 현저히 향상된다고 보고하였다(世高 (2001)). 쌀겨에는 쌀 영양소의 약 95%가 집중되어 있어 단백질, 지방, 비타민, 무기물 등 영양 성분이 풍부하게 함유되어 있을 뿐 아니라 최근의 연구에 의하면 비타민 E, oryzaol, coenzyme Q-10(CoQ-10), glutathione peroxidase(GPx), superoxide dismutase(SOD), proanthocyanidins, inositol hexaphosphate(IP6)를 비롯하여 여러 가지 영양소가 함유되어 있다. 이러한 쌀겨 중의 미

배아에는 필수 아미노산과 토크페롤, 비타민 B1, B2, B6 이외에도 현대인의 식생활에서 결핍되기 쉬운 미량원소인 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 철분 등이 다량 함유되어 있어, 쌀 영양분의 66%를 함유하고 있으나, 미량의 미배아가 생식이나 전식 원료로 사용될 뿐 가공에 의한 식품 소재로의 활용이 거의 없다고 할 수 있다. 따라서 본 연구자들은 미배아 추출물을 이용한 GABA 생산 배지 조성에 대하여 검토하였다.

GABA의 산업적 생산을 위하여 미배아 추출액 배지를 제조하여 MSG의 농도의 영향을 검토하였다. 미배아 추출액 배지는 미배아 추출액에 선행된 실험에서 결정된 GABA 생산에 적합한 탄소원과 질소원으로 sucrose와 yeast extract를 각각 4%, 1% 첨가한 후 여러 농도(5~10%)의 MSG를 첨가하여 그 영향을 살펴보았다. Table 5에서와 같이 5-7% MSG를 첨가한 미배아 추출액 배지에서 *L. sakei* B2-16을 배양하였을 때, 첨가된 MSG가 100% GABA로 전환된 반면, 8% MSG부터는 전환율이 감소하였다. 7% MSG 농도일 때 GABA 생산량은 최대였으며, 이

**Table 5. Effects of MSG concentration on GABA production by *L. sakei* B2-16 after 48 hours static culture in rice germ extract medium containing 4% sucrose and 1% yeast extract**

MSG concentration (%)	Final pH	Growth <sup>(a)</sup>	GABA (mM)	GABA conversion rate (%) <sup>(b)</sup>
Control <sup>(c)</sup>	-	-	0.20	-
5%	5.08	1.9×10 <sup>9</sup>	267.10	100.0
6%	5.44	3.3×10 <sup>9</sup>	330.20	100.0
7%	5.69	2.3×10 <sup>9</sup>	385.00	100.0
8%	5.80	3.0×10 <sup>9</sup>	312.54	73.2
9%	5.53	1.4×10 <sup>9</sup>	284.26	59.1
10%	5.01	2.0×10 <sup>9</sup>	258.52	48.4

<sup>(a)</sup> Viable cell count (cfu/mL)

<sup>(b)</sup> GABA conversion rate (%) calculated by the age of the produced GABA concentration (mM) over the supplied MSG concentration.

<sup>(c)</sup> Control was GABA concentration of rice germ extracts

Data are means of triplicates. Standard errors were less than 5.0% of the means.

때 생산된 GABA의 양은 약 385 mM이었다. 미배아는 벼 도정 시 발생하는 농업 부산물로 매년 수십만 톤이 폐기되고 있다. 국내에서는 미배아가 포함된 미강의 활용에 대한 연구는 계속되어 왔으나, 미배아에 관한 연구는 매우 미흡하다. 미배아의 일부가 배아유의 생산에 사용되고 있을 뿐 대부분이 사료로 사용되거나 미강과 함께 농산 폐기물로 처리되는 실정이다. 이러한 미배아에는 글루탐산, 아스파르트산 알라틴 등의 아미노산 다량 함유되어 있으며, 칼륨, 인, 망간, 나트륨 등의 무기질이 다량 함유하고 있다. 따라서 이러한 미배아의 다양한 성분은 우수한 GABA 생산배지로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

## 요 약

혈압저하작용, 이노기능 등의 다양한 생리활성을 나타내는  $\gamma$ -amino butyric acid(GABA)를 고농도로 생산하는 유산균인 *Lactobacillus sakei* B2-16을 이용하여 GABA의 산업적 생산 배지를 연구하였다.

*L. sakei* B2-16의 최적 상용 배지는 *Lactobacilli* MRS 배지였으며, *Lactobacilli* MRS 배지에 1% mono sodium glutamate(MSG)를 첨가하고, *L. sakei* B2-16을 배양했을 때 MSG의 99.3%는 GABA로 전환되었다. MRS 배지를 기본으로 최적 배지조성을 검토한 결과, 탄소원으로 4% sucrose와 질소원으로 1% yeast extract를 첨가하였을 때 균체 증식과 GABA 생산량이 가장 우수하였다. 산업적 배지를 확립하기 위하여 미배아를 온수 추출하여 얻은 추출액 배지에 *L. sakei* B2-16을 배양한 결과, 7%의 MSG를 100% GABA로 전환시켰으며, 미배아 추출액을 이용한 배지는 산업적 생산용 배지로의 응용이 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 2008년도 중소기업청 산학협력실 지원사업(과제번호: 120080620)에 의해 수행되었음을 감사드립니다.

## 참고문헌

Aasen IM, Moretro T, Katla T, Axelsson L, Storro I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 159-166.

Abe Y, Umemura S, Sugimoto K, Hirawa N, Kato Y, Yokoyama T, Iwai J, Ishii M. 1995 Effect of green tea rich in  $\gamma$ -aminobutyric acid on blood pressure on dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 8: 74-79.

Aoki H, Furuya Y, Endo Y, Fujimoto K. 2003. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid tempeh-like soybean (GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1806-1808.

Biase DD, Tramonti A, Bossa F, Visca P. 1999. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol. Microbiol.* 32: 1198-1211.

Champomier-Verges MC, Chaillou S, Cornet M, Zagorec M. 2002. Erratum to *Lactobacillus sakei*: recent development and future prospects. *Res. Microbiol.* 153: 115-123.

Chang JS, Lee BS, Kim YG. 1992. Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves, *Korean J. Food Sci. Technol.* 24: 315-319.

Cho YR, Ji YC, Hae CC. 2007. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from *Kimchi* and its Neuroprotective effect on Neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 104-109.

Cross ML. 2004. Immune-signaling by orally-delivered probiotic bacteria: Effects on common mucosal immunoresponses and protection at distal mucosal sites. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 17: 127-134.

Guyot JP, Morlon-Guyot J. 2001. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32<sup>T</sup>, an amylolytic lactobacillus isolated from sour starch cassava fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 217-225.

Han SB, Kim YH. 2006. Production method of  $\gamma$ -aminobutyric acid-enforced fermentative products by lactic acid bacteria,  $\gamma$ -aminobutyric acid-enforced fermentative products produced by the method and their utilization. *Korea. Patent.* 10-0547018.

Hao R, Schmit JC. 1993. Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during condiation in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 15: 887-890.

Hayakawa K, Ueno Y, Kawamura S, Taniguchi R, Oda K. 1997. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria. *Seibutsu Kogaku.* 75: 239-244.

Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, Matsumoto K, Sansawa H, Yamori Y. 2004. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br. J. Nutr.* 92: 411-417.

Ibolya MP, Vasanits A. 1999. Stability and characteristics of the o-phthalaldehyde/ 3-mercaptopyruvic acid and o-phthalaldehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 835: 73-91.

Jeun JH, Kim HD, Lee HS, Ryu BH. 2004. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) from traditional slat fermented anchovy. *Kor. J. Food. Nutr.* 1: 72-79.

Kang MS, Cho SC, Kook MC, Cheigh CI, Pyun YR. 2006. Novel strains of *Lactobacillus* spp. and method for preparing  $\gamma$ -aminobutyric acid using the same. *Korea. Patent.* 10-0549094.

Komatsuzaki N, Shima, J, Kawamoto S, Momose H, Timura T. 2005. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 22: 497-504.

Kono I, Himeno K. 2000. Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid content during beni-koji making. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 617-619.

Krogsgaard-Larsen P. 1989. GABA receptors. In *Receptor pharmacology function.* Williams M, Glennon RA, Timmermans

- PMWM (eds). Dekker, Inc., New York, USA, pp. 349-383.
- Leventhal AG, Wang YC, Pu ML, Zhou YF, Ma Y. 2003. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* 300: 812-815.
- Maras B, Sweeney G, Barra D, Bossa F, Jhon RA. 1992. The amino acid sequence of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 206: 93-98.
- Nakamura T, Matsubaysahi T, Kamachi K, Hasegawa T, Ando Y, Omori M. 2000.  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-rich chorella depresses the elevation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Nippon Nogeikagaku Kaishi in Japanese.* 74: 907-909.
- Namchuk M, Lindsay L, Turck CW, Kanaani J, Baekkeskov S. 1997. Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase a6. *J. Biol. Chem.* 272: 1548-1557.
- Nomura M, Nakajima I, Fujita Y, Kobayashi M, Kimoto H, Suzuki I, Aso H. 1999. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology.* 145: 1375-1380.
- Park JH, Han SH, Shin MK, Park KH, Lim KC. 2002. Effect of hypertention falling of functional GABA green tea. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 10: 37-40.
- Park KB, Oh SH. 2006. Isolation and characterization of *Lactobacillus buchneri* Strains with high  $\gamma$ -aminobutyric acid producing capacity from naturally aged cheese. *Food. Sci. Biotechnol.* 15: 86-90.
- Sanders JW, Leenhouts K, Burghoorn J, Brands RJ, Venema G, Kok J. 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.* 27: 299-310.
- Saikusa T, Horino T, Moki Y. 1994. Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the germ during water soaking. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 2291-2292.
- Shelp BJ, Bown AW, McLean MD. 1999. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* 4: 446-452.
- Tcherkas YV, Kartsova LA, Krasnova IN. 2001. Analysis of amino acids in human serum by isocratic reversed phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr. A.* 913: 303-308.
- Tsuji K, Ichikawa T, Tanabe N, Abe S, Tarui S, Nakagawa Y. 1992. Antihypertensive activities of beni-koji extracts and  $\gamma$ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Eiyogaku Zasshi in Japanese.* 50: 285-291.
- Tsushida T, Murai T. 1987. Conversion of glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea reaves under anaerobic conditions. *Agric. Biol. Chem.* 51: 2856-2871.
- Ueno Y, Hayakawa K, Takahashi S, Oda K. 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 1168-1171.
- Ueno H. 2000. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase. *J. Mol. Catal., B Enzym.* 10: 67-69.
- Yang SY, Lu FX, Lu ZX, Bie XM, Jiao Y, Sun LJ, Yu B. 2008. Producton of  $\gamma$ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation. *Amino Acids.* 34: 473-478.
- Yokoyama S, Hiramatsu J, Hayakawa, K. 2002. Production of  $\gamma$ -amminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *J. Biosci. Bioeng.* 93: 95-97.
- Yoon JW, Yoon CS, Lim TW, Huang QQ, Kwang YK, Pyun KH, Hirasawa K, Sherwin RS, Jun HS. 1999. Control of autoimmune diabetes in NOD mice by GAD expression or suppression in  $\beta$  cells. *Science.* 284: 1183-1187.
- 석호문. 2002. GABA의 기능해명과 신소재 개발의 가능성. *식품기술* 15: 81-85.
- 愛世高, 戸田登志, 興平武則. 2001. Development of a super-GABA by lactic acid fermentation. *食品と開発.* 36: 12-14.