

쌀겨우림물에서 γ -아미노버터산생성조건에 관한 연구

한경애, 최설향

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《의학과과학기술을 빨리 발전시키고 보건부문에 대한 물질적보장사업을 개선하여야 합니다.》

지금 세계적으로 뇌의 기능을 높이고 뇌대사기능부전에 의한 정신병치료에 효과가 높으며 뇌부활제로서뿐만아니라 당뇨병과 고혈압, 암과 관절염을 비롯한 질병치료에서 효과가 좋은 γ -아미노버터산(GABA)을 생산하기 위한 연구[3, 4]가 광범히 진행되고있다.

GABA생산은 일반적으로 젖산균을 비롯한 여러가지 미생물에 의한 발효에 의존하고 있다.[1, 2]

우리는 미생물배양에 의존하던 종전의 연구와는 달리 식료부산물인 쌀겨를 효소원으로 리용하여 GABA를 손쉽게 대량생산하기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

GABA생성의 기질로 쓰이는 L-글루타민산소다로서는 식용맛내기(순도 99%이상)를, 효소원으로서로는 갓 정미한 쌀겨(현미를 9분도 되게 깎은 쌀겨)를 구입하여 령동기에 보관하면서 리용하였다.

우리는 쌀겨대 물의 질량비, 글루타민산소다농도, 온도, 반응시간 등 GABA생성에 영향을 주는 여러가지 인자들을 변화시키면서 생성되는 GABA의 량을 측정하여 GABA생성조건을 검토하였다.

γ -아미노버터산정성분석은 크로마토그래프법으로 진행하였다. 전개용매로서 n -부타놀 : 초산 : 물=2 : 2 : 1 혼합용액을 리용하였으며 여기에 총 전개액의 0.2% 되는 닌히드린을 넣었다. 전개 및 발색은 먼저 시료반점과 표품반점을 크로마토그래프용종이의 밑부분으로부터 1.5cm 되는 곳에 찍고 전개용액을 종이가 1cm 잠기도록 부었다. 다음 미리 전개용매로 포화시킨 전개함에 넣고 전개거리가 8cm이상 될 때까지 전개(1.5h정도)시킨 후 100℃에서 건조시키면서 발색시켰다. 이때 나타난 반점들의 R_f 값을 구하고 γ -아미노버터산의 R_f 값과 일치되는 점을 찾았다.

γ -아미노버터산정량분석은 크게 크로마토그래프화상처리기술에 의한 상대분석과 아미노산분석기에 의한 절대분석의 두가지 방법으로 진행하였다. GABA생성에 영향을 주는 여러가지 인자들을 변화시킬 때 생성되는 GABA량의 상대적인 비교는 종이크로마토그래프 분석과 컴퓨터화상처리기술을 리용하여 진행하였다. 표품용액(2.5mg/mL, 《Sigma》)과 시료용액을 함께 크로마토그래프용종이에 찍고 전개를 8cm이상 진행한 다음 100℃에서 발색시키고 사진기로 찍어 고착시킨 후 MATLAB의 화상처리기능을 리용하여 농도를 계산하였다. 생성조건이 일정하게 확립된 다음 반응액의 정확한 GABA량은 자동아미노산분석장치(《HITACHI L-8900》)를 리용하여 정량하였다.

결과 및 논의

쌀겨대 물의 질량비의 영향 쌀겨대 물의 질량비를 합리적으로 정하는것은 쌀겨에서 글루타민산탄산폐기효소(GAD)를 충분히 추출할뿐아니라 반응에 필요한 효소농도를 보장하여 GABA생성률을 높이기 위한 중요한 조건으로 된다. 10g의 쌀겨를 각이한 량의 물에 현탁시키고 여기에 글루타민산과 소금을 1% 되게 첨가한 후 36℃에서 5일간 반응시킬 때 GABA생성률은 쌀겨대 물의 질량비 1:10에서 제일 높았다.(그림 1)

글루타민산소다농도의 영향 글루타민산소다의 농도를 0.5~2.5%로 변화시킬 때 GABA생성량은 1.0%에서 가장 높았고 더이상 증가하지 않았다.(그림 2)

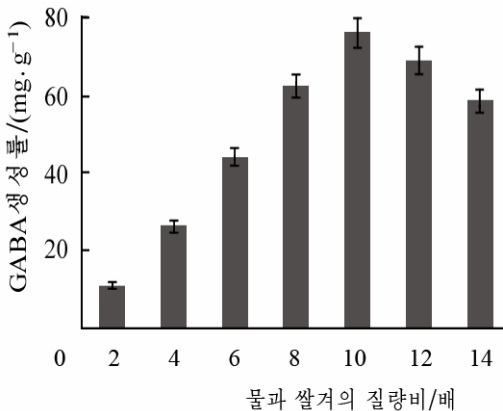


그림 1. 물과 쌀겨의 질량비에 따르는 GABA생성률의 변화

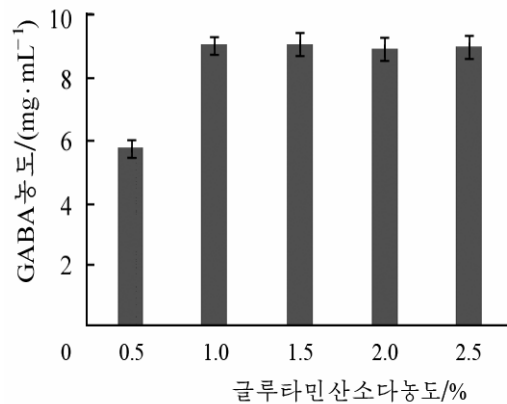


그림 2. 글루타민산소다농도에 따르는 GABA농도의 변화

이것은 일반적으로 글루타민산소다의 농도를 2.0%이상으로 첨가해주던 선행연구[1, 2]에 비해볼 때 경제적으로 실리있는것으로 된다.

GABA생성에 미치는 온도의 영향 효소반응이 최적화되는 온도조건을 검토하기 위하여 우리는 위의 결과에 기초하여 반응계를 구성하고 30℃에서 42℃까지 2℃간격으로 온도를 변화시키면서 5일간 방치한 후 매 반응액의 GABA농도를 측정하였다.(그림 3)

결과 36℃에서 GABA생성량이 제일 높았는데 이것은 글루타민산데카르복실라제의 최적온도가 36℃라고 한 선행연구자료[5]와 일치하였다.

GABA생성에 미치는 방치일수의 영향 반응계를 구성하고 방치일수에 따르는 GABA생성량을 검토한 결과 그림 4에서 보는바와 같이 5일째에 GABA농도가 제일 높았고 7일째부터는 감소하기 시작하였다.

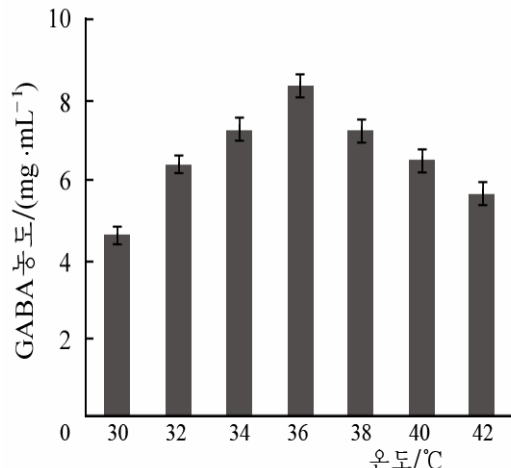


그림 3. 온도에 따르는 GABA농도의 변화

효소반응은 일반적으로 반응시간이 상당히 짧지만 우리의 연구에서는 충분히 반응하는데 5일이 걸렸다. 이것은 쌀겨에서 효소가 충분히 추출되어나오는 시간의 결과라고 보아진다. 즉 추출조건을 개선하면 시간을 훨씬 단축할수 있다고 본다.

소금농도의 영향 일반적으로 소금은 미생물배양때 배양액의 삼투압을 조절하고 미생물의 생육에 영향을 주는것으로 하여 미생물에 의한 GABA생성방법에서 중요하게 논의되었다. 우리의 연구에서는 미생물배양이 진행되지 않지만 GAD의 활성화에 Cl^- 이 관여한다는 선행연구[5]에 근거하여 GABA생성에 소금이 영향을 미칠수 있다고 보고 그 영향을 검토하였다.

소금의 농도를 0~2.5%까지 점차 증가시킬 때 GABA생성량은 변화가 없었다. 즉 Cl^- 이 GAD의 활성화에 관계되지 않는다는것을 알수 있다. GAD를 활성화하는 기본인자는 GAD의 도움효소인 피리독살린산인데 쌀겨에는 그것의 전구체인 피리독신(비타민 B_6)이 풍부히 들어있어 GAD가 충분히 활성화되었으며 이로부터 Cl^- 의 영향을 받지 않았다고 보아진다.

초기pH의 영향 GAD에 의해 글루타민산이 γ -아미노버터산으로 전환되는데 H^+ 이 필요하므로 GABA생성에는 반응계의 pH가 중요하다.

pH의 영향을 검토하기 위하여 반응계의 초기pH를 변화시키면서 GABA생성량을 측정한 결과 pH 5.0에서 제일 높았다.(그림 5)

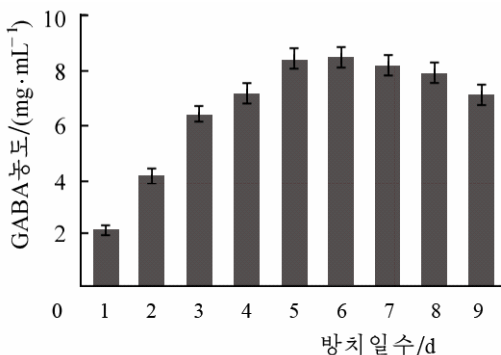


그림 4. 방치일수에 따르는 GABA농도의 변화

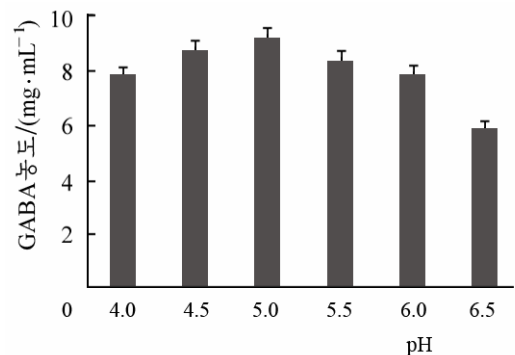


그림 5. 초기pH에 따르는 GABA농도의 변화

아미노산분석기에 의한 반응산물의 정량분석 GABA생성에 미치는 여러 인자들의 영향을 분석한데 기초하여 우리는 쌀겨와 물의 질량비를 1 : 10, 글루타민산소다농도를 1.0%, 반응액의 초기pH를 5.0으로 하고 36°C에서 5일간 반응시킨 후 얻어진 반응산물을 자동아미노산분석기를 리용하여 분석하였다.

분석결과 반응액에는 GABA(1.2mg/mL)뿐만아니라 로이신(0.14mg/mL), 이소로이신(0.10mg/mL), 페닐알라닌(0.12mg/mL)을 비롯한 필수아미노산들이 많이 들어있었다.(그림 6)

이때 GABA생성거둬물은 쌀겨 1g당 12mg으로서 이것은 *Asp. oryzae* 8041의 고체배양물 1g당 8.5~9mg의 GABA를 생산한다고 한 선행연구[1]와 그밖의 미생물을 리용한 생산방법에 비해볼 때 높은 량이다.

또한 쌀겨를 효소원으로 하여 Tris, 레몬산, 붕산완충액속에서 글루타민산으로부터 GABA를 생산한 선행연구[6]에서도 생성거둬물은 쌀겨 1g당 5.05mg밖에 되지 않았다. 이것은 쌀겨를 리용하여 GABA를 생산하는 우리의 방법이 원가와 로력이 적게 들면서도 생성거둬물이 높은 합리적인 방법이라는것을 보여준다.

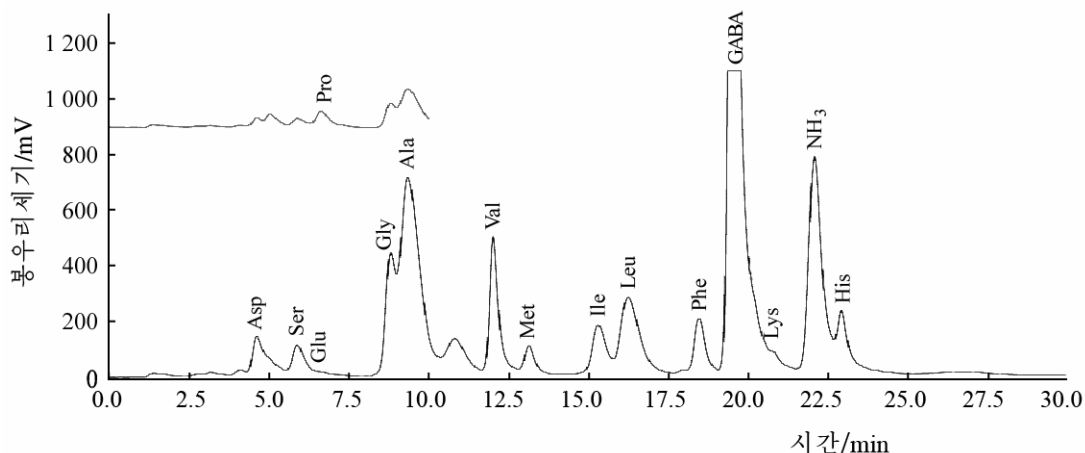


그림 6. 반응액의 L-8900이온교환크로마토그램

맺는 말

쌀겨와 물의 질량비를 1 : 10, 글루타민산소다농도를 1.0%, 반응액의 초기pH를 5.0으로 하고 36℃에서 5일간 반응시킬 때 생성되는 GABA량은 쌀겨 1g당 12mg이다.

참고 문헌

- [1] 공순혁 등; 조선약학, 1, 18, 주체97(2008).
- [2] 김명주 등; 기초의학, 3, 36, 주체92(2003).
- [3] K. Li et al.; Neuroscience Bulletin, 24, 195, 2012.
- [4] A. M. Abdou et al.; Biofactors, 26, 201, 2006.
- [5] S. Ryoyiti et al.; Journal of Biology and Chemistry, 235, 1649, 1960.
- [6] A. Eamarjarn et al.; Agriculture and Natural Resources, 50, 80, 2016.

주체108(2019)년 7월 5일 원고접수

Condition for Production of γ -Aminobutyric Acid in Rice Bran Extract

Han Kyong Ae, Choe Sol Hyang

The optimum condition for production of GABA by using rice bran is as follows: the mass ratio of water to rice bran is 10, the concentration of glutamate is 1%, initial pH is 5, temperature is 36℃ and the incubation time is 5days.

Under this condition, GABA content is 1.2mg/mL and productivity is 12mg/g(bran).

Key words: γ -aminobutyric acid(GABA), rice bran, glutamate decarboxylase(GAD)