

작물함유 GABA 정량분석

오석홍[†] · 박기범

우석대학교

I. 서 언

GABA(Gamma Amino Butyric Acid)는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 동물의 경우 뇌, 신장, 심장, 폐 등에서 발견되며 식물의 경우 발아현미를 비롯한 발아곡류, 녹차, 배추 뿌리 등에서 많이 검출되고 있다. GABA는 흥분 억제성 신경전달물질(Inhibitory Neurotransmitter)로서 중추신경계 전체 신경전달물질 중 약 30%를 차지하며 다른 신경전달물질에 비하여 약 200-1,000배의 고농도로 존재한다. GABA는 혈압상승억제, 시력증진, 항불안, 항경련 등 인체의 많은 생리적인 메카니즘의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있고, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하며 통증 완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 주목받는 물질이다.

식물의 경우 GABA의 존재가 이미 반세기 전에 확인된 바 있다. 그 동안의 식물 GABA 기능 및 생성 기작에 관한 연구를 종합해 보면 외부 환경적 요인들(산소부족, 저온 및 고온, 어둠, 기계적 자극 등)에 의해 식물체내 GABA의 생성이 증진된다. 따라서 식물에서 GABA의 합성은 여러 외부 환경적 스트레스에 대항하기 위한 수단 중 하나로 GABA 생성체계를 가동시키는 것으로 판단된다.

동물이나 미생물에서의 GABA 생성기작과는 달리 식물에서는 Ca^{2+} 과 결합한 calmodulin이 glutamate decarboxylase(GAD)를 활성화 시켜 GABA 생성을 주로 증진시키는 것으로 보고되어 있다. 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.

상기 결과들은 식물체내 GABA의 함량을 인위적인 방법(적절한 환경적 인자의 활용 및 관련 효소나 단백질의 유전자 도입 등)으로 증대시킬 수 있으며, 잎이나 종자(열매) 등의 형태로 수확된 식물체를 적절히 가공하면 GABA가 증진된 식물소재를 확보할 수 있어 가축이나 사람에게 제공할 경우 여러 가지 유익한 약리효과를 볼 수 있음을 시사하고 있다.

[†]Corresponding author: (Phone) +82-63-290-1433 (E-mail) shoh@core.woosuk.ac.kr

II. GABA 분석방법

1. 효소법

1) 장치 및 기구

- (1) Spectrophotometer
- (2) Centrifuge
- (3) Homogenizer
- (4) Water bath

2) 시약

- (1) 메탄올, 클로로포름, 인산칼륨
- (2) Bicine, α -ketoglutarate, NADP
- (3) Standard GABA, GABAse

3) 조작

- (1) 비이커에 시료분말 1.0 g을 정확히 달고 100% 메탄올 5 mL을 넣은 후 저어주면서 클로로포름 10 mL를 넣어준다.
- (2) 물 5 mL를 넣어 충분히 섞어준 후 50 mL 원심분리관으로 옮긴다.
- (3) 2,800 g에서 10분간 원심분리한 후 물층(상층액)을 취해서 50 mL 시험관에 옮긴다.
- (4) 냉동시킨 후 동결건조 하고, 소량의 0.1 M 인산칼륨 완충액(pH 8.6)에 용해하여 이를 GABA 분석용 시료로한다.
- (5) GABA 분석용 시료 100 μ l에 1.0M Bicine-NaOH(pH 8.6)100 μ l, 100 mM α -ketoglutarate 100 μ l, 1 mM NADP 100 μ l, 초순수 500 μ l를 가하고 1 mg/mL GABAse(100 mM Bicine 완충액에 용해) 100 μ l를 가하여 혼합한 후 25°C에서 20분간 반응시킨다.
- (6) 340 nm에서의 흡광도 증가를 측정한다. GABA 분석용시료가 들어가지 않은 것과 GABAse가 들어가지 않은 것으로 대조구를 삼아 흡광도 변화를 측정한다.

4) 계산

GABA 농도를 계산하기 위하여 standard GABA를 0.01-0.1 μ mol되게 조제한 후 상기의 조건에서 GABA 분석용 시료대신 사용하여 농도증가에 따른 흡광도 변화를 측정하여 standard curve를 작성하고 GABA 분석용시료의 흡광도에 따른 농도를 산출하여 μ mole/g으로 혹은 이를 환산하여 mg/g으로 GABA 농도를 표시한다.

2. HPLC 법

1) 장치 및 기구

- (1) HPLC(Waters제, AccQ Tag Amino Acid Analysis System)
- (2) 동결건조기(Ilshin사 제품, Korea)
- (3) 막자와 막자사발
- (4) 3.9 mm×150 mm AccQ Tag™(Nova-Pak™ C₁₈, Waters) 칼럼(column)

2) 시약

- (1) 6-aminoquinoly-N-hydroxysuccinimidyl carbonate(AccQ Flour Reagent)
- (2) Acetate-phosphate buffer(AccQ Tag Eluenta A)
- (3) Acetonitrile
- (4) 유리아미노산 표준품(Pierce제, USA)
- (5) 메탄올, 클로로포름
- (6) 액화질소

그 외의 시약들은 모두 특급제를 사용한다.

3) 조작

- (1) 준비된 작물을 막자사발에 준비된 액화질소를 이용하여 마쇄한다.
- (2) 마쇄된 샘플에 메탄올 : 클로로포름 : 물 = 12:5:3의 혼합액을 가하여 섞어준다.
- (3) 원심분리기(12,000×g, 15 min, 4°C)하여 상등액을 얻는다.
- (4) 침전물에 클로로포름 : 물(3:5)의 혼합액을 가한다.
- (5) 원심분리기(12,000×g, 15 min, 4°C)하여 상등액을 얻는다.
- (6) (3), (5)에서 얻어진 상등액을 다시 한번 원심분리기(12,000×g, 15 min, 4°C)하여 상등액을 얻어 동결건조기로 건조한다.
- (7) 건조한 것을 소량의 물로 용해한후 0.45 μm PVDF 필터(Millipore)를 이용하여 여과하여 분석에 사용한다.
- (8) 아미노산의 형광 유도체화를 위하여 AccQ Tag Reagent를 사용하며, 이들 유도체의 분리를 위해 3.9 mm×150 mm AccQ Tag™(Nova-Pak™ C₁₈, Waters) 칼럼(column)을 사용한다. 칼럼으로부터 유도체를 용출시키기 위해 AccQ Tag Eluent A와 60% 아세토니트릴(acetonitrile)을 98:2의 비율로 1 ml/min 유속으로 흘려준다.

4) 계산

GABA 함량은 표준 GABA를 100 nmol/ml과 200 nmol/ml로 흘려준 후 면적을 기준하여 계산한뒤 그 표준 GABA의 면적과 sample의 면적과 대비하여 분석결과를 비교 산출한다. 단위는 nmole/g으로 혹은 이를 환산하여 mg/g으로 GABA 농도를 표시한다.

참고문헌

1. Brown, A.W. and L.I. Crawford., K.E. Breikreuz., F.C. Guinel. 1994. The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH. *Plant Physiol.* 104 : 865-871
2. Brown, A.W. and B.J. Shelp. 1997. The metabolism and funtion of γ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* 115: 1-5
3. Baum, G. and L.Y. Simcha, Y. Fridmann, T. Arazi, H. Katsnelson, M. Zik, H. Fromm. 1996. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO Journal.*15(12): 2988-2996
4. Oh S.H., S.H. Kim., Y.J. Moon. and W.G. Choi. 2002. Change in the levels of γ -aminobutyric acid and some amino acids by application of glutamic acid solution for germination of brown rice. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 17(1) : 49-53
5. Oh, S.H. 2003 Stimulation of γ -aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/ glutamic acid germination solution and calcium/calmodulin. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 36(3) : 319-325
6. Oh, S.H., I.T. Lee., K.B. Park., and B.J. Kim. 2002. Change in the levels of water soluble protein and free amino acids in brown rice germinated in a chitosan/glutamic acid solution. *Korean J. Biotechnology. Bioeng.* 17(6) : 515-519
7. Satya Narayan, V. and P.M. Nair 1990. Metabolism enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29 : 367-375
8. Streeter, J.G. and J, F. Thompson 1972. Anaerobic accumulatin of γ -aminobutyric acid and alanine in radish leaves(*Raphanus sativus* L.), *Plant Physiol.* 49 : 872-578
9. Snedden, W.A. and H. Fromm 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant response to the enviroments. *Trends Plant Sci* 3 : 299-304

*Analysis of Plant GABA**Suk-Heung Oh[†] and Ki-Bum Park**Dept. of Medicinal Biotechnology, Woosuk University, Jeon-ju 565-701, Korea
+82-63-290-1433, shoh@core.woosuk.ac.kr*