The Korean Journal of Microbiology (2011) Vol. 47, No. 4, pp. 316-322
Copyright ⓒ 2011, The Microbiological Society of Korea

김치유래 *Lactobacillus sakei* OPK2-59의 γ-Aminobutyric Acid 생성 및 Glutamate Decarboxylase 활성

유진주 · 오석흥*
우석대학교 식품생명공학과

γ-Aminobutyric Acid Production and Glutamate Decarboxylase Activity of *Lactobacillus sakei* OPK2-59 Isolated from Kimchi

Jin-Ju Yu and Suk-Heung Oh*
Department of Food and Biotechnology, Woosuk University, Jeonju 565-701, Republic of Korea
(Received November 30, 2011 / Accepted December 20, 2011)

***Lactobacillus sakei* OPK2-59 isolated from kimchi was found to have γ-aminobutyric acid (GABA) producing ability and glutamate decarboxylase (GAD) activity. When the *Lactobacillus sakei* OPK2-59 was cultured in MRS broth with 59.13 mM and 177.40 mM monosodium glutamate (MSG), the optimum temperature range and pH for growth were 25-37°C and pH 6.5, respectively. GABA conversion rates in MRS broth with 59.13 mM and 177.40 mM MSG were 99.58% and 31.00%, respectively at 25°C and 48 h of cultivation. By using the cell free extract of *Lactobacillus sakei* OPK2-59, MSG was converted to GABA and the conversion rate was 78.51% at 30°C, pH 5. Conversion of MSG to GABA was enhanced by adding salts such as $CaCl_2$, $FeCl_3$, $MgCl_2$. These data suggest that the ability of *Lactobacillus sakei* OPK2-59 to produce GABA results from the activity of GAD in the cells and GABA conversion by the cell extract containing GAD can be enhanced by $CaCl_2$, $FeCl_3$, $MgCl_2$.**

***Keywords*: *Lactobacillus sakei*, GABA, GAD, kimchi**

김치는 한국의 대표적인 발효식품으로 비타민 A, B, C 등이 풍부하며 건강에 좋은 박테리아인 유산균을 많이 함유하고 있어 세계 5대 건강식품 중의 하나로 선정된 바 있다(12). 또한 2001년 7월에는 Codex 국제 식품규격을 획득하였다(10). 김치에는 주로 *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Weissella* 등의 genera가 있어 이들이 김치발효에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(6, 7, 16, 17). 이들 젖산균은 김치 발효과정 중 젖산을 포함하는 각종 유기산, γ-aminobutyric acid (GABA) 등의 생리 활성 물질을 분비하여 김치에 맛과 기능을 부여해 주는 역할을 하는 것으로 밝혀지고 있다(9, 11, 24). 또한 김치 내 풍부한 유산균은 장내의 유해 미생물의 생육을 억제하여 장내 균총을 개선하는 probiotic 효과와 항 avian influenza 효능을 갖는 것으로도 알려져 있다(16). 실제로 김치를 하루에 300 g 먹으면 안 먹은 사람에 비하여 대장에 유산균이 100배 가량 증가하는 것으로 알려져 있다(29).

* For correspondence. E-mail: shoh@woosuk.ac.kr; Tel.: +82-63-290-1433; Fax: +82-63-290-1429

GABA는 자연계에 널리 분포하는 비 단백태 아미노산으로 동물의 경우 주요 흥분 억제성 신경전달물질이다(13, 15). 또한 GABA는 혈압상승억제, 시력증진, 항 불안, 항 경련 등 인체의 많은 생리적인 메카니즘의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있고, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하며 통증완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 주목 받는 물질이다(15, 18). 이러한 GABA의 역할로 인해 최근에는 기능성 식품소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다(1, 2, 8, 19, 22, 32).

GABA는 뇌와 척수 등 중추신경계 전체 신경전달물질 중 약 30%를 차지하며 다른 신경전달물질에 비하여 약 200-1,000배의 고농도로 존재한다. 그 외 췌장, 심장, 담낭 등에서 발견되며, 식물의 경우 발아현미를 비롯한 발아곡류, 녹차, 배추 뿌리 등에서 많이 검출되고 있다(22, 23). GABA는 세균, 곰팡이, 효모 등과 같은 미생물에 의해서도 생산된다. 최근 많은 연구자들이 GABA를 생성할 수 있는 유산균에 대한 연구를 수행한 바 있으며, 이는 유산균이 생리적인 활성을 가지고 있어 유제품, 김치, 빵과 같은 발효식품에서 스타터로 사용될

수 있기 때문이다(6, 27, 28, 29). GABA를 생산하는 특성이 있는 유산균에는 *Lactobacillus* strains (6, 27, 28, 33), *Lactococcus* strains (20, 21) 등이 보고되어 있으며, 이들 중 김치유래의 GABA 생성 균주는 *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus sakei* 등의 균주가 보고된 바 있다(6, 28, 29, 31). 유산균의 GABA 생성능은 glutamate decarboxylase (GAD) 기질인 monosodium glutamate (MSG)를 배지에 첨가한 후 배양하여 MSG의 GABA로의 전환율에 따라 판단한다. 또한 유산균의 GABA 생성능은 균주가 보유하고 있는 GAD의 활성화 정도에 따라서도 크게 달라질 수 있는 것으로 예측되고 있다. 따라서 본 연구는 우리고유의 김치로부터 분리한 유산균의 GABA 생성과 GAD 활성화에 관한 것으로 김치 유산균 *Lactobacillus sakei* OPK2-59를 이용한 효율적인 GABA 생성을 위한 기초자료를 마련하고자 수행 하였다.

재료 및 방법

균주 및 시약

본 실험에서 사용한 *Lb. sakei* OPK2-59는 김치유래의 유산균으로 균주의 형태학적 및 생화학적 특성이 조사된 바 있다(3, 26). 본 실험에 사용한 배지 및 배지 첨가 시약은 MRS broth (Difco, USA), monosodium glutamate (MSG) (Daeyoung Chemicals, Korea), $CaCl_2$, $FeCl_3$, $MnCl_2$, $MgCl_2$ (Sigma Chemical Co., USA) 등이다.

균주 성장의 최적 pH 및 온도

균주 성장을 위한 최적 pH를 조사하기 위하여 100 mM sodium acetate/100 mM acetate 완충액(pH 3.0, 4.0, 5.0), 100 mM NaH_2PO_4/100 mM Na_2HPO_4 완충액(pH 6.5, 7.0), 100 mM Tris-HCl/200 mM HCl 완충액(pH 8.0), 100 mM glycine/200 mM NaOH 완충액(pH 9.0), 25 mM sodium bicarbonate/100 mM NaOH 완충액(pH 10.0)으로 modified MRS 배지를 조제하여 균주를 30°C에서 24시간 배양하였다. 최적온도를 조사하기 위하여 MRS 배지(Difco, pH 6.5)를 이용하여 4, 10, 25, 30, 37, 40°C 범위에서 균주를 배양하였다.

MSG 농도에 따른 균주 성장 및 pH 변화

MSG 농도에 따른 균주 성장 및 pH 변화를 조사하기 위하여 MSG가 0, 59.13, 177.40 mM 첨가된 MRS 배지(pH 6.5)에 균주를 접종한 후 25, 30, 37°C 조건에서 0, 6, 12, 24, 30, 36, 48 시간 배양하면서 600 nm에서 흡광도를 측정하여 균주의 성장과 pH변화를 모니터링 하였다.

조효소액의 조제

세포 추출액을 제조하기 위하여 MSG가 59.13 mM 첨가된 MRS 배지(pH 6.5, 37°C)에서 48시간 배양하여 600 nm에서 흡광도를 측정하고 원심분리(4°C, 13,000×g, 15 min)하여 세포를 수집한 후 멸균수로 2회 이상 세척하였다. 수집된 세포에 cell lysis 완충액[20 mM sodium phosphate buffer, 0.1 mM PLP (pyridoxal-5-phosphate), 1% triton X-100, 1 mM PMSF, pH 7.0]를 세포무게와 동일한 양 첨가하여 혼합 후 lysozyme (200 μg/ml)을 넣고 37°C에 30분간 lysis 하여 얼음에 5분간 정치 후 sonication (500 W, 1분, 5회)을 얼음에서 반복 실시하였다. 파괴된 세포에서 추출액을 회수하기 위하여 원심분리(4°C, 13,000×g, 15분)하여 상등액을 취한 뒤 세포추출액(조효소액)으로 사용하였으며, 얻어진 추출액은 Bradford 측정법(5)을 이용하여 단백질 양을 정량하였고, 각 분석에 사용하였다.

GAD 분석

GAD 분석을 위하여 기질 완충액[100 mM sodium acetate/100 mM acetate 완충액 (pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0), 59.13 mM glutamate, 0.01 mM PLP]를 조효소액과 2:1 (v/v)비율로 혼합하여 25, 30, 37, 40°C에서 각각 60분간 반응시킨 후 끓는 물에 2분간 넣어 효소반응을 정지 시켰다. 반응이 종료된 효소 반응액을 0.45 μm PVDF 막을 통과시켜 TLC와 GABase 분석 시료로 사용하였다(6). GAD 효소 활성에 미치는 pH, 온도의 영향을 조사하기 위하여 기질 완충액(100 mM sodium acetate/100 mM acetate 완충액)의 pH를 pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 온도를 25, 30, 37, 40°C 범위에서 MSG를 첨가하여 반응시킨 반응액을 TLC와 GABase로 GABA를 측정하여 비교하였다. 무기염이 효소활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 $MgCl_2$, NaCl, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $FeCl_3$을 각 반응액에 20 mM의 농도로 첨가하고 조효소액과 혼합 후 37°C, 60분간 반응하여 생성된 GABA를 GABase로 정량하였다(6, 13). GAD 효소활성은 효소추출액 중의 단백질 mg당 GABA 생성량 혹은 무기염 무첨가군에 대한 상대적인 GABA 생성량으로 표기하였다.

GABA 및 glutamic acid 분석

TLC를 이용한 분석을 위해 각 균주 배양액 혹은 효소 반응액 0.9 μl를 TLC 판에 분주하여 아래의 조건에서 분석을 실시하였다. 각 시료를 TLC 판에 분주한 후 butanol:acetic acid:water=4:1:1를 전개용매로 사용하여 전개하였다. 전개된 TLC 판을 0.2% ninhydrin을 이용하여 발색하여 생성물 GABA spot과 기질 glutamic acid spot을 확인하였다. GABase를 이용한 GABA의 정량은 반응액(총 1 ml)에 시료 20 μl, 1 unit GABase [*Pseudomonas fluorescens* (Sigma)] 40 μl, 10 mM β-$NADP^+$ (Sigma) 140 μl, 100 mM potassium pyrophosphate (pH 8.6) 780 μl, 100 mM α-ketoglutamate 20 μl를 96 well plate에 넣고 혼합하여 37°C에 60분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. GABase를 이용한 GABA 정량은 GABA 표준 곡선(Abs=0.0004×X mM+0.028, R^2=0.9878)을 이용하여 산출하였다(6). HPLC를 이용한 GABA 및 glutamate 정량은 Baum 등(4)이 사용한 아미노산 분석방법을 기초로 하여 약간 수정한 방법(27)을 사용하였다. 간략하게 methanol:chloroform:water가 12:5:3으로 혼합된 용매 800 μl를 효소반응액 혹은 배양액 시료 200 μl에 가하여 vortex로

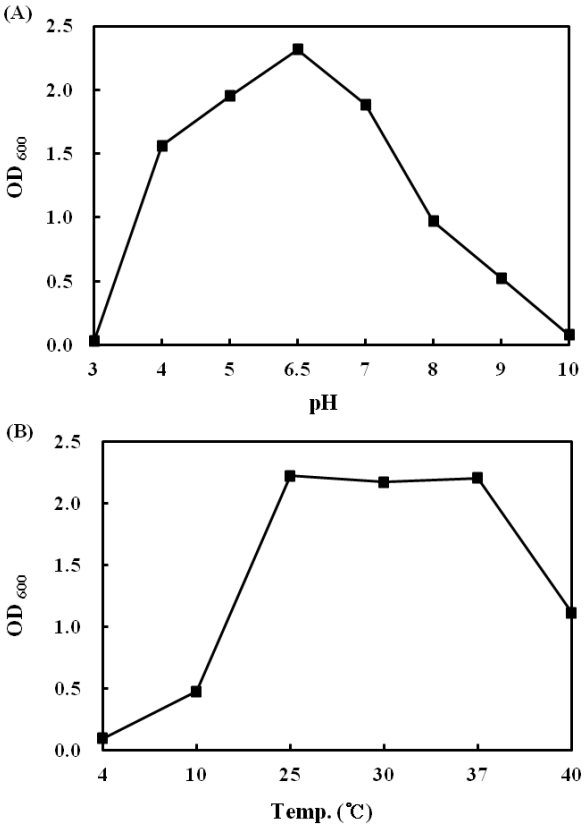

Fig. 1. Effects of pH (A) and temperature (B) on the growth of *Lactobacillus sakei* OPK2-59. Growth was estimated by monitoring the OD_{600} after 24 h.

혼합하였다. 혼합액을 원심분리(13,000×g, 4°C, 15분)하여 수용액 층인 상등액을 1차 회수 하였고, 유기용매 층에 클로로포름과 물(1:2) 혼합액 600 µl을 가하여 혼합한 후 원심분리하여 상등액을 2차 회수하였다. 1, 2차 회수한 상등액을 합하여 동결건조 하였고, 초 순수로 용해하여 0.45 µm PVDF 막을 통과시켜 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. HPLC (Waters, Milford, USA) 분석을 위해 시료는 6-aminoquioly-N-hydroxy-succinimidyl carbonate (AQC)로 유도체화 하였고, 3.9×150 mm AccQ·Tag™ (Nova-Pak™ C_{18}, Waters) 칼럼으로 유도체들을 분리하였다(31). GABA 및 glutamic acid 함량은 표준 GABA 및 glutamic acid (Sigma)의 HPLC 및 GABase 분석 결과를 토대로 작성한 표준곡선을 이용하여 산출하였다.

결과 및 고찰

균주 성장 및 GABA 생성을 위한 배양 조건

김치로부터 분리한 *Lb. sakei* OPK2-59 균주의 성장을 위한 pH 및 온도의 영향을 조사한 결과 pH 6.5와 25°C, 30°C, 37°C에서 24시간 배양으로 다른 pH와 온도에 비하여 최적의 성장율을 기록하였다(Fig. 1). *Lb. sakei* OPK2-59 균주에 의한 GABA 생성능을 조사하기 위해 MSG가 0, 59.13, 177.40

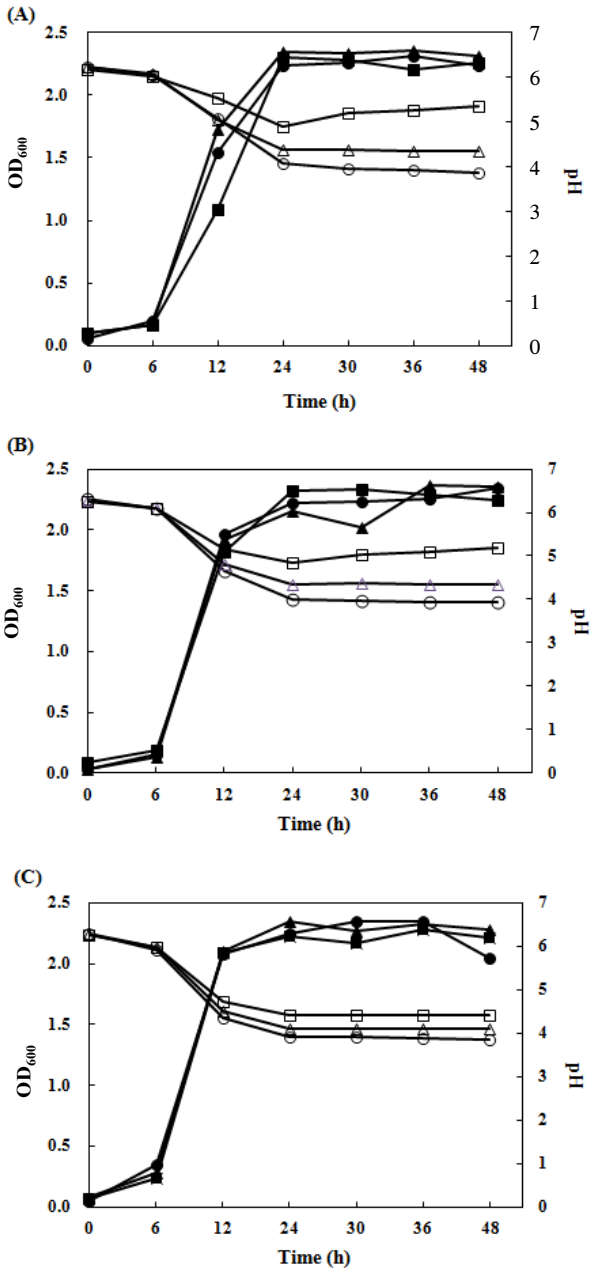

Fig. 2. Growth and pH changes of *Lactobacillus sakei* OPK2-59 in MRS broth at different temperatures and MSG concentrations. (A) 25°C; (B) 30°C; (C) 37°C. ●, cell growth of 0 mM MSG; ▲, cell growth of 59.13 mM MSG; ■, cell growth of 177.40 mM MSG; ○, pH of 0 mM MSG; △, pH of 59.13 mM MSG; □, pH of 177.40 mM MSG.

mM 첨가된 MRS 배지(Difco, pH 6.5)를 이용하여 25, 30, 37°C 조건에서 균주를 배양 후 TLC와 GABase를 이용하여 GABA 분석을 실시하였다. *Lb. sakei* OPK2-59 균주는 배양 온도 및 MSG 첨가와는 상관없이 배양 시작 6시간을 기점으로 대수 증식기가 시작되었으며, 24시간을 기점으로 정지기에 접어드는 것으로 나타났다(Fig. 2). pH의 변화의 경우 배양 6

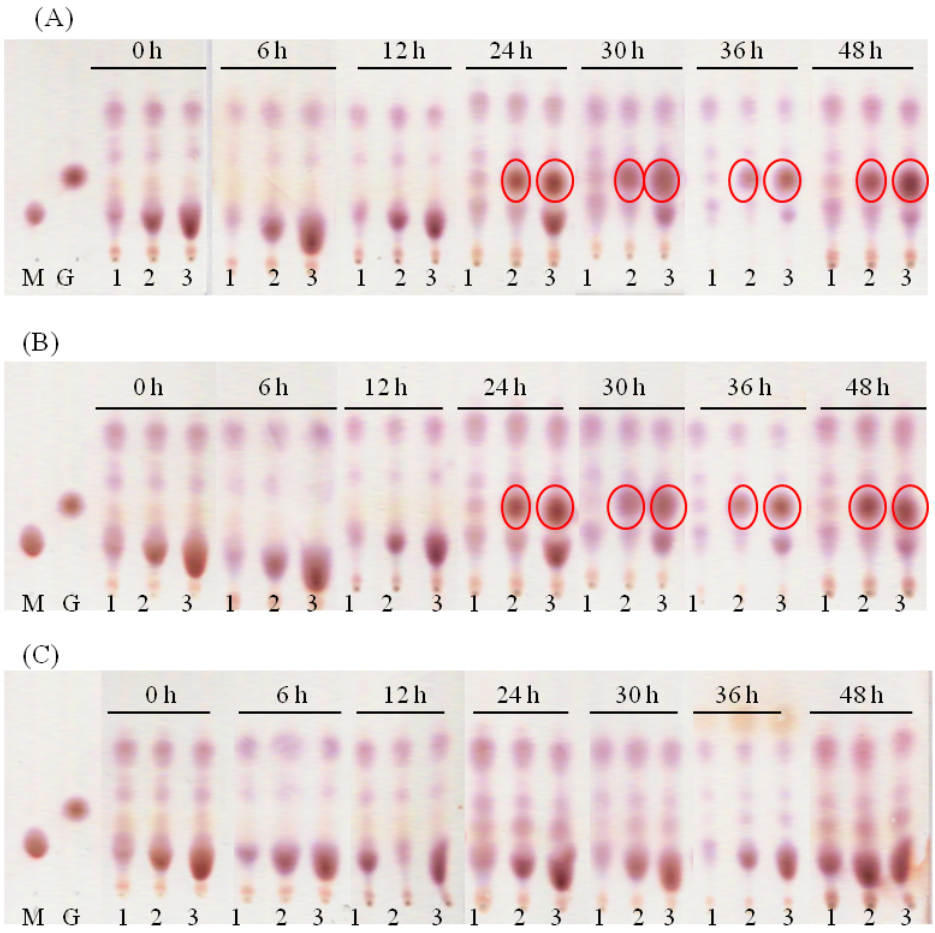

Fig. 3. GABA production by *Lb. sakei* OPK2-59 in MRS broth at different temperatures and MSG concentrations. (A), 25°C; (B), 30°C; (C), 37°C. Lane M, spot of standard MSG; G, spot of standard GABA; 1, 2, 3, spots of *Lb. sakei* OPK2-59 cultures at 0 mM MSG, 59.13 mM MSG, 177.40 mM MSG concentrations, respectively. The spots with circles are in the same locations as the standard GABA.

시간을 기점으로 감소하여 정지기에 접어드는 24시간까지 감소하다가 MSG의 존재 유무와 함량에 따라서 약간씩 다른 변화 패턴을 보였다. 즉, MSG가 첨가되지 않은 배지의 경우 24시간부터 48시간까지 약간의 감소가 관찰되었고, 59.13 mM MSG 첨가의 경우는 첨가하지 않은 경우에 비하여 pH 감소폭이 줄었으며, 177.40 mM MSG 첨가의 경우는 24시간 이후 약간씩 증가하는 경향을 보였다(Fig. 2). 이와 같은 경향은 37°C보다는 25°C와 30°C에서 뚜렷하게 나타나고 있음을 알 수 있었다. 배양에 따른 pH 감소는 수소이온 농도의 증가를 가져와 GAD에 의한 glutamate의 GABA 전환 시 필요한 proton을 제공해 주게 된다(6). 따라서 MSG 존재 하에서 필요한 proton이 공급되면 GAD는 glutamic acid를 이용하여 GABA를 생성하게 될 것이다. GABA 생성과 더불어 proton 공급이 감소하면 pH는 다시 증가하게 될 것이다(6, 14). 따라서, MSG가 첨가된 경우 25°C와 30°C에서 배양하는 동안 MSG의 소모 및 GABA 생성과 더불어 시간 경과에 따른 pH의 점진적 증가(Figs. 2 and 3)는 이를 설명하고 있다고 판단된다. TLC 분석을 통한 GABA 생성 패턴을 보면 59.13 mM MSG 첨가의 경우 25°C와 30°C 배양조건에서 24시간 동안 배양으로 MSG의 소모가 현저하고 GABA 생성이 뚜렷하게 관찰됨을 알 수 있었다. 37°C 배양의 경우는 상대적으로 MSG의 소모가 적고 생성된 GABA도 생성도 미미한 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 GABase를 이용한 분석에서도 확인할 수 있었다. 59.13 mM MSG 첨가의 경우 25°C와 30°C 배양조건에서 48시간 배양으로 각각 99.58%와 87.84% 전환율을 보임을 확인하였다. 또한 177.40 mM MSG 첨가의 경우 25°C와 30°C 배양조건에서 48시간 배양으로 31.00%와 31.52% 전환율을 보임을 확인하였다(Table 1). 이 결과를 통해 25°C와 30°C 배양조건에서는 59.13 mM과 177.40 mM MSG첨가의 경우 GABA로의 전환율이 큰 차이를 보이지 않고 있음을 알 수 있다. 그러나 37°C 배양의 경우는 MSG 농도에 상관없이 GABA 전환율이 매우 미미하였다(Table 1). 37°C 배양의 경우 25°C와 30°C 배양과 비교하여 균주 성장율에 있어서는 차이를 보이지 않는 것으로 조사되었기에(Fig.

Table 1. Conversion yields of MSG to GABA by *Lb. sakei* OPK2-59 in MRS broth at different temperatures and MSG concentrations

Temp (°C)	MSG (mM)	OD_{600}	GABA production (mM)	GABA conversion yield (%)
25	0	2.33	0.70	-
	59.13	2.37	58.88	99.58
	177.40	2.35	55.00	31.00
30	0	2.38	0.48	-
	59.13	2.37	51.94	87.84
	177.40	2.38	55.92	31.52
37	0	2.40	0.49	-
	59.13	2.37	0.76	1.29
	177.40	2.38	0.85	0.48

2), 온도에 따른 GABA 전환율의 차이는 GABA 전환을 담당하는 효소인 GAD의 활성화에 온도가 영향을 주었을 것으로 판단된다. 실제로 *Lb. sakei* OPK2-59로부터 얻은 GAD 조효소액은 온도에 따라 GABA 전환력이 크게 달라짐을 알 수 있었다(아래 GAD 활성화에 미치는 온도 및 pH의 영향). 또한 Cho 등(6)은 5% MSG가 첨가된 MRS 배지에 1% NaCl, 1% glucose를 첨가하고 배양초기 pH를 5.0, 온도를 30°C 조건으로 하여 48시간 배양하여 MSG의 GABA로의 전환율 94%를 얻을 수 있다고 보고하였다. Kook 등(14)은 *Lb. sakei* B2-16 균주와 4% sucrose, 1% yeast extract, 12% MSG를 함유하는 rice bran extract을 이용하여 최대 660 mM GABA를 얻을 수 있다고 보고하였다. 또한 4% sucrose, 1% yeast extract, 5% MSG를 함유하는 MRS 배지를 이용하여 최대 272 mM GABA를 얻을 수 있다고 보고하였다(14). 이와 같은 높은 전환율은 탄소원과 질소원의 보강, 배양조건 차이(예, slow agitation 등) 그리고 rice bran extract 유래의 인자 등에 기인된 것으로 판단된다. 예를 들면, rice bran extracts에는 GAD가 존재하여 GABA 전환율에 영향을 미칠 수 있는 것으로 알려져 있으며(25), 어떤 인자는 유산균 GAD 활성에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 MSG 고함유 배지에서 *Lb. sakei* OPK2-59 균주의 GABA 전환율 증진을 위한 연구가 탄소원과 질소원 조절 등 배양조건 조절에 따른 영향 및 GAD 효소 특성 등과 연계하여 수행 된다면 균주의 활용가치를 더 높일 수 있을 것이다. *Lb. sakei* OPK2-59 균주 배양을 통해 얻은 스타터는 동물실험을 통한 효능평가에서 만성적인 알코올에 의해 손상된 간기능을 개선하는 효과가 있었고(3), 김치 제조에 활용하면 발효 김치 중의 GABA 함량을 증진시키는 것으로 조사된 바 있다(31).

GAD 활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

기질용액과 조효소액을 혼합하여 각 온도 별로 pH를 달리하여 60분간 반응시킨 뒤 2분 끓여 반응 종료 후 GABA를 분석하였다. Fig. 4에서와 같이 30°C, pH 5.0 반응액의 조건에서 GABA 생성이 가장 많이 생성됨을 확인하였다(GABA 전환율 78.51%). 또한 기질용액에 첨가한 MSG는 30°C, pH 5.0 조건에서 상대적으로 적게 잔존하는 것으로 나타났다(자료 미제시). 유산균 유래의 GAD 활성에 미치는 최적 pH는 다양하게 나타나고 있다. 예를 들면, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis* 유래의 GAD는 각각 pH 5.0, 4.2, 4.7에서 최적의 활성을 보였다(13). 또한 *Lb. paracasei*와 *Lb. brevis* 유래 GAD의 최적 온도는 각각 50°C와 30°C로 차이를 보인 바 있다(13). 따라서, *Lb. sakei* OPK2-59 유래의 GAD 조효소액의 경우 최적 온도는 *Lb. brevis* GAD 특성을, 최적 pH는 *Lb. paracasei* 특성과 유사한 것으로 나타났다.

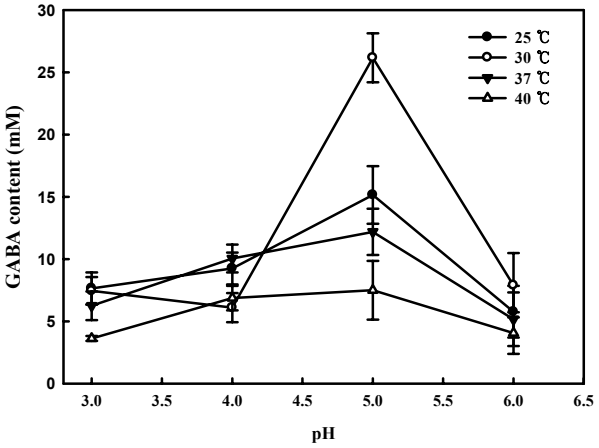

Fig. 4. Changes in the production of GABA by *Lb. sakei* OPK2-59 cell free extract at different pH and temperatures. GABA levels were assayed as described in 'Materials and Methods.' All values are expressed as means±SE of three assays.

GAD 활성에 미치는 무기염 이온의 영향

Lb. sakei OPK 2-59 유래의 GAD 조효소 활성에 미치는 무기염 이온의 영향을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. 20 mM 무기염 ($MgCl_2$, $FeCl_3$, $CaCl_2$)을 첨가한 효소 반응액에서는 무기염 무 첨가 반응액에서 보다 GABA 생성량을 기준으로 한 GAD 활성이 2-3배 가량 높은 것으로 조사되었다(Fig. 5). 또한 NaCl은 효소 활성을 약간 증진 시킨 반면 $MnCl_2$는 감소시키는 것으로 조사되었다. *Lb. paracasei* GAD의 경우 10 mM Ca^{2+}에 의해서 114%까지 효소활성화가 일어난 반면 10 mM NaCl에 의해서는 38.5%로 활성이 감소했음을 보고한 바 있다(13). 이와 같은 효소 활성화 양상은 유산균의 출처에 따른 차이라고 판단되며, 이들 무기염 이온들이 어떤 작용에 의해서 유산균 GAD 활성에 영향을 미치는지는 아직 알려지지 않고 있다. 다만 유산균의 배양을 통한 GABA 생성의 경우 Cl^-에 의해서 *Lactococcus lactis* GAD의 발현이 유도되어 GABA 생성량이 많아짐이 보고된 바 있다(30). 또한 *Lactobacillus buchneri*의 경우 1% NaCl의 첨가로 세포증식이 증가하고 MSG의 GABA로의 전환율도 NaCl 무첨가에 비하여 약간 증진되는 경향을 나타내는 것으로 보고 되었다(6). 식물

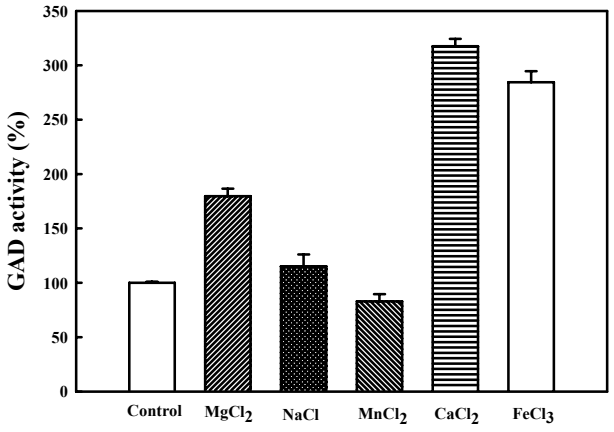

Fig. 5. Influences of salts on the activity of *Lb. sakei* OPK2-59 GAD. Control, no salt added; $MgCl_2$, NaCl, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $FeCl_3$, 20 mM of each salt added. The influences of salts on GAD activity were assayed at 37°C, pH 5 buffer condition and expressed as relative values on control activity. All values are means±SE of three assays.

유래 GAD는 칼슘결합 단백질인 calmodulin에 의해서 활성화 되기 때문에 보편적으로 칼슘에 의한 활성화가 관찰되고 있지만(4, 23), 아직 유산균 유래의 GAD가 또 다른 결합 단백질에 의해서 활성화 되는지, 칼슘 등의 결합 부위를 가지고 있는지 등에 대한 보고는 없어 이들을 포함한 활성화 메커니즘 연구가 진행되어야 할 것이다.

적요

김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus sakei* OPK2-59는 γ-aminobutyric acid (GABA) 생성능력과 glutamate decarboxylase (GAD) 활성을 보유하고 있음이 확인되었다. *Lactobacillus sakei* OPK2-59를 59.13 mM과 177.40 mM monosodium glutamate (MSG)가 함유된 MRS 배지에서 배양하면 균주의 성장을 위한 최적 온도범위와 pH는 각각 25-37°C와 6.5였다. 59.13 mM과 177.40 mM MSG 함유 MRS 배지에서 배양온도 25°C 조건에서, 48시간 배양하였을 경우 MSG의 GABA 전환율은 각각 99.58%와 31.00%였다. 또한 *Lactobacillus sakei* OPK2-59 세포추출액을 이용하여 MSG를 GABA로 전환할 수 있었으며, 추출물에 의한 GABA 전환율은 30°C, pH 5 조건에서 78.51%로 가장 높았다. 세포추출액에 의한 MSG의 GABA 전환에 미치는 무기염의 영향을 조사한 결과 $CaCl_2$, $FeCl_3$, $MgCl_2$를 첨가한 반응액에서 염을 넣지 않고 반응한 control보다 GABA 전환율이 2-3배 증진되는 것으로 조사되었다. 이러한 결과들은 김치 유산균 *Lactobacillus sakei* OPK2-59의 GABA 생성능은 유산균 세포 내에 존재하는 GAD에 의한 것이며, GAD에 의한 GABA 전환율은 무기염에 의하여 증진될 수 있음을 제안해 주는 것이다.

감사의 말

본 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2008-0061604) 연구비 및 2011학년도 우석대학교 교내학술연구비 지원에 의하여 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. Abe, Y., S. Umemura, K. Sugimotto, N. Hirawa, Y. Kato, T. Yokoyama, J. Iwai, and M. Ishii. 1995. Effect of green tea rich in γ-aminobutyric acid on blood pressure on dahl salt-sensitive rats. *Am. J. Hypertens.* 8, 74-79.
2. Aoki, H., Y. Furuya, Y. Endo, and K. Fujimoto. 2003. Effect of γ-aminobutyric tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 1806-1808.
3. Bae, M.O., H.J. Kim, Y.S. Cha, M.K, Lee, and S.H. Oh. 2009. Effects of kimchi lactic acid bacteria *Lactobacillus* sp. OPK2-59 with high GABA producing capacity on liver function improvement. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38, 1499-1505.
4. Baum, G., L.Y. Simcha, Y. Fridmann, T. Arazi, H. Katsnelson, and M. Zik. 1996. Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* 15, 2988-2996.
5. Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
6. Cho, Y.R., J.Y. Chang, and H.C. Chang. 2007. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from *kimchi* and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17, 104-109.
7. Han, H.L. 1991. The ecology of *kimchi* lactic acid bacteria. *Korean J. Microbiol.* 7, 68-75.
8. Hayakawa, K., M. Kimura, K. Kasaha, K. Matsumoto, H. Sansawa, and Y. Yamori. 2004. Effect of a gamma-aminobutyric acid-enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Br. J. Nutr.* 92, 411-417.
9. Hur, H.J., K.W. Lee, H.Y. Kim, D.K. Chung, and H.J. Lee. 2006. *In vitro* immunopotentiating activities of cellular fractions of lactic acid bacteria isolated from *kimchi* and bifidobacteria. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 661-666.
10. Kim, S., M.Y. Cho, J.H. Lee, and S.Y. Lee. 2006. Studies on the activities and prospects of the Codex alimentarius commission. *Food Sci. Indus.* 39, 25-40.
11. Kim, J.H., M.J. Kwon, S.Y. Lee, J.D. Ryu, G.S. Moon, H.S. Cheigh, and Y.O. Song. 2002. The effect of *kimchi* intake on production of free radicals and anti-oxidative enzyme actitivies in the liver of SAM. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31, 109-116.
12. Kim, S.H., J.Y. Yang, S.A. Kang, H.K. Chun, and K.Y. Park. 2007. Current state and improvement for Korean *kimchi* industry. *Food Indus. Nutr.* 12, 7-13.
13. Komatsuzaki, N., T. Nakamura, T. Kimura, and J. Shima. 2008. Characterization of glutamate decarboxylase from a high γ-aminobutyric acid (GABA)-producer, *Lactobacillus paracasei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 278-285.
14. Kook, M.C., M.J. Seo, C.I. Cheigh, Y.R. Pyun, S.C. Cho, and H. Park. 2010. Enhanced production of γ-aminobutyric acid

using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 763-766.
15. Krogsgaard-Larsen, P. 1989. GABA receptors. p. 349-383. *In* M. Williams, R.A. Glennon, and P.M.W.M. Timmermans (eds.), Receptor pharmacology funtion. Dekker, Inc., New York, USA.
16. Lee, J.H. 2007. Kimchi lactic acid bacteria. *e-Bioindustry News* 20, 1.
17. Lee, J.S., K.C. Lee, J.S. Ahn, T.I. Mheen, Y.R. Byun, and Y.H. Park. 2002. *Weissella. koreensis* sp. nov., isolated from kimchi. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 52, 1257-1261.
18. Leventhal, A.G., Y.C. Wang, M.L. Pu, Y.F. Zhou, and Y. Ma. 2003. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys. *Science* 300, 812-815.
19. Nakamura, T., T. Matsubaysahi, K. Kamachi, T. Hasegawa, Y. Ando, and M. Omori. 2000. γ-Aminobutyric (GABA)-rich chlorella depresses the elevation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Nippon Nogeikagaku Kaishi* (in Japanese) 74, 907-909.
20. Nomura, M., H. Kimoto, Y. Someya, S. Furukawa, and I. Suzuki. 1999. Novel characterization for distinguishing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from subsp. *cremoris. Int. J. System Bacteriol.* 49, 163-166.
21. Nomura, M., I. Nakajima, Y. Fujita, M. Kobayashi, H. Kimoto, I. Suzuki, and H. Aso. 1999. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene. *Microbiology* 145, 1375-1380.
22. Oh, S.H. 2006. GABA production and development of functional food products with enhanced levels of GABA using lactic acid bacteria from kimchi. *Food Industry* 24, 74-80.
23. Oh, S.H. 2007. Effects and applications of germinated brown rice with enhanced levels of GABA. *Food Sci. Indus.* 40, 41-46.
24. Oh, S.H., H.J. Kim, Y.H. Kim, J.J. Yu, K.B. Park, and J.I. Jeon. 2008. Changes in some physico-chemical properties and γ -aminobutyric acid content of *kimchi* during fermentation and storage. *J. Food Sci. Nutr.* 13, 219-224.
25. Ohtsubo, S., S. Asano, K. Sato, and I. Matsumoto. 2000. Enzymatic production of γ-aminobutyric acid using rice (*Oryza sativa*) germ. *Food Sci. Technol. Res.* 6, 208-211.
26. Park, K.Y. 2004. Well-being and Well-being food. *Health News* 28, 18-19.
27. Park, K.B. and S.H. Oh. 2006. Isolation and characterization of *Lactobacillus buchneri* strains with high γ-aminobutyric acid producing capacity from naturally aged cheese. *Food Sci. Biotechnol.* 15, 86-90.
28. Park, K.B. and S.H. Oh. 2007. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresource Technol.* 98, 312-319.
29. Park, K.B. and S.H. Oh. 2007. Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract. *Bioresource Technol.* 98, 1675-1679.
30. Sanders, J.W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, R.J. Brands, G. Venema, and L. Kok. 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. *Mol. Microbiol.* 27, 299-310.
31. Seok, J.H., K.B. Park, Y.H. Kim, M.O. Bae, M.K. Lee, and S.H. Oh. 2008. Production and characterization of Kimchi with enhanced levels of γ-aminobutyric acid. *Food Sci. Biotechnol.* 17, 940-946.
32. Tsuji, K., T. Ichikawa, N. Tanabe, S. Abe, S. Tarui, and Y. Nakagawa. 1992. Antihypertensive activities of beni-koji extracts and γ-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats. *Eiyogaku. Zasshi* (in Japanese) 50, 285-291.
33. Ueno, Y., K. Hayakawa, S. Takahashi, and K. Oda. 1997. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* IFO 12005. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61, 1168-1171.