

## Electrostatic Spray 기술을 이용한 GABA 생성 유산균 함유 곡류 제품 개발

정지희 · 안도균 · 김동균 · 김광엽

충북대학교 식품생명·축산과학부

### Development of Cereal Product Containing $\gamma$ -Aminobutyric Acid Producing Lactic Acid Bacteria Using Electrostatic Spray Technology

Ji-Hee Jeong, Do-Kyun An, Dong-Kyun Kim, and Kwang-Yup Kim

Division of Food and Animal Science, Chungbuk National University

**ABSTRACT** This study was carried out to investigate the production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by lactic acid bacteria and to manufacture GABA using rice bran extract-based optimum medium. Electrostatic spraying technology was used to add GABA into the cereals. The isolated *Lactobacillus brevis* CFM11 produced the highest GABA production up to a concentration of 2,002.93  $\mu\text{g/mL}$  when cultivated in MRS broth containing 0.8% monosodium glutamate (MSG). The production level of GABA was 585.80  $\mu\text{g/mL}$  in rice bran extract containing 0.4% MSG, 2% sucrose, 1% skim milk, and 0.2% magnesium sulfate. After electrostatic spraying of the cultured suspension onto rice, GABA concentration reached 228.10  $\mu\text{g/g}$  while untreated rice reached 32.23  $\mu\text{g/g}$ . These results demonstrate that rice bran extract can be an economic commercial medium for GABA production as a substitute for MRS broth. This study demonstrates the novel application of electrostatic spraying of GABA into cereal products for the first time.

**Key words:** electrostatic spray, cereal product,  $\gamma$ -aminobutyric acid, *Lactobacillus brevis* CFM11

## 서 론

Gamma aminobutyric acid(GABA)는 동물의 체내에 존재하는 신경전달 물질로서 뇌의 대사기능 향상, 신경안정작용(1)과 혈압강화작용 등의 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 최근 대장암 세포의 전이 및 증식 억제도 있는 것으로 보고되고 있다(2). GABA는 다양한 식품 속에 포함되어 있으나 함량이 적어 일반적인 식품섭취로 효능을 기대하기 어려우므로(3) 유산균의 발효를 통하여 GABA 함량을 증가시켜 대량생산하는 연구가 진행되고 있고(4), 식물에서는 특정한 외부자극에 의하여 함량이 급격히 증가하는 것으로 보고되고 있다(5).

유산균은 발효식품의 주된 미생물로 정장 작용, 면역 조절, 항암 효과, 콜레스테롤 저하, 항알레르기 효과 등의 기능이 있고 오랫동안 발효 유제품의 스타터로 이용되어 왔다(6). 유산균은 일반적으로 안전한 것으로 간주되며, 오랜 시간 동안 식품 산업에서 널리 사용되어서 유산균에 의한 GABA 생산이 안전하다는 것을 알 수 있고 유산균에 의해 생성된 GABA 및 유산균 자체의 건강 증진 특성을 충분히

활용할 수 있을 것으로 보인다.

미강은 벼의 도정과정 중 발생하는 부산물로 주성분은 조단백질, 조지방질, 탄수화물을 함유하고 있으며, 식이섬유, 비타민류, 무기질 성분들과 피트산, 감마오리자놀 등과 같은 항산화 물질 등 다양한 생리활성 물질들이 존재하고 혈중 콜레스테롤 저하, 혈압 상승 억제(7-9) 등 다양한 기능성이 보고되었다. 미강은 도정 과정으로 인해 15~20%만이 미강유 제조에 사용되고 나머지는 사료, 비료, 폐기물로 처리되고 있어 산업적인 가치가 낮게 이용되고 있다(10,11). 가격이 저렴한 곡류의 부산물이면서 쌀에 코팅해도 이취감을 적게 줄 수 있는 현미를 이용한 미강 단백질 코팅제를 만들며 저장성 향상에 대한 연구가 진행되었다. 현미를 탈지강 단백질 코팅제로 이용하여 코팅쌀을 가공하고 품질 변화를 조사하여 전반적인 품질 항목에서 기존의 쌀보다 점수가 높은 것으로 나타나 이화학적 특성뿐 아니라 관능적 특성까지 향상시킬 수 있을 것으로 생각된다(12). 이와 같이 산업적인 가치가 낮지만 기능성 성분을 함유한 야콘 뿌리 추출액으로 코팅쌀을 가공하여 기능성을 보완한 식품제조 연구가 수행되어 그 기능성을 보여주었다(13).

Electrostatic spray는 공기와 액체가 노즐로 분리되어 들어가고, 공기가 압력을 통해 노즐 끝으로 이동하게 되면 노즐 끝에서 액체와 결합해 전극을 띤 정전기적인 전하가 적용된 물방울을 분무하는 원리이다. 이 정전기적인 전하는 스프레이 물방울과 목표 물체 표면 사이에 발생하는 자연적

Received 17 May 2017; Accepted 4 August 2017

Corresponding author: Kwang-Yup Kim, Division of Food and Animal Science, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 28644, Korea

E-mail: kimky@chungbuk.ac.kr, Phone: +82-43-261-2568

인 힘이며, 의류 건조기에 의해 만들어진 의류 사이의 정전기력과 비슷한 것이다(14). Electrostatic spray는 농업에서 살충제와 비료를 곡식에 분주하기 위해서 사용되고 있으며, 식품산업에서는 식품첨가제를 식품에 코팅할 때 사용되는 기술이다(15,16).

GABA는 매우 다양한 생리기능을 가지고 있어 기능성 소재 개발을 위한 연구가 활발히 추진 중이다. 영양분이 풍부한 미강을 배지로 이용하여 유산균을 증식시킨다면 부산물의 부가가치 증진을 위한 산업용 소재로 활용할 수 있을 것이고 식품첨가제에 사용되는 electrostatic spray를 이용하여 GABA를 더 효과적으로 식품에 적용할 수 있을 것이다. 따라서 본 연구에서는 고농도 GABA를 생성하는 균주를 탐색하여 분리·동정하고 성장조건에 따른 GABA 함량을 측정하였으며, 미강 추출물로 최적화된 배지를 제조한 후 일반배지와 GABA 생성량을 비교하였다. 또한, 최적화된 미강 추출물의 배양액을 electrostatic spray를 이용하여 각종 곡류에 분주하여 기존 곡류가 가진 GABA 함량과 electrostatic spray로 처리하였을 때의 GABA 함량을 비교하여 제품으로 활용 가능성이 있는지 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

본 연구에서 사용된 미강, 쌀, 노란차좁쌀, 현미, 찰현미는 (주)천보내츄럴푸드(Icheon, Korea)에서 제공받아 사용하였다. 곡류에 미강 추출물로 배양된 균주를 접종하기 위해 electrostatic spray(SE-EB, ESS, Maxcharge, Watkinsville, GA, USA)를 사용하였다.

### 사용균주 및 배지

본 연구에서는 충북대학교 식품생명공학과 식품미생물학 실험실에서 자체 보유하고 있는 *Lactobacillus brevis* CFM11을 실험에 사용하였다. 상업용 유산균은 한국생물지원센터(Korean Collection for Type Cultures, Wanju, Korea)에서 분양받은 것을 사용하였다. 전배양 및 본배양을 위한 생육배지로 Lactobacilli MRS broth를 사용하였고 균주는 50%의 glycerol이 함유된 배지에 접종하여 -85°C의 deep freezer(Ulter-low temperature freezer, MDF-192, Sanyo Electric Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan)에 보관하여 사용하였으며, 실험에 사용하기 전 3회 이상 계대 배양하여 활성화한 후 사용하였다.

### Electrostatic spray를 이용한 균주 분주

Electrostatic spray를 이용해 쌀, 노란차좁쌀, 현미, 찰현미에 미강 추출물로 배양된 균주를 분주하였다. Electrostatic spray를 비교하기 위해 conventional spray(Tree, STD, Incheon, Korea)를 사용하였다.

### GABA 정량법

먼저 *Lactobacillus brevis* CFM11을 Eppendorf tube에 배양액 100 µL와 메탄올 400 µL를 넣고 잘 섞은 다음 70°C로 예열된 water bath에서 30분 동안 완전 건조시킨다. 여기에 70 mM LaCl<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 잘 섞고 10,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 후 상등액 700 µL와 0.1 M KOH 160 µL를 Eppendorf tube에 가한 다음 5분간 교반하였다. 이를 다시 10,000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 한 후 상등액 550 µL를 cuvette에 넣는 방법(17)을 참고하여 1/5로 buffer로 희석한 다음 96-well에 상등액 110 µL를 넣었다.

GABA 검량선을 얻기 위해 효소 Gabase 분석법을 바탕으로 1 mM GABA(A5835, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 0.5 M K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 4 mM NADP(Sigma-Aldrich Co.), 2.0 units Gabase/mL(G7509, Sigma-Aldrich Co.), 20 mM α-ketoglutarate(KG)(K1750, Sigma-Aldrich Co.)를 제조하였다. 그리고 1 mM GABA, 0.5 M K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 4 mM NADP, 2.0 units Gabase/mL를 혼합하여 340 nm에서 흡광도를 측정(initial A)하고, α-KG를 가하여 1시간 동안 실온에서 방치한 후 ELISA reader(PowerWave HT, Bio Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 340 nm에서 흡광도를 측정(finial A)한 다음 검량선을 작성한 후 GABA량을 µg/mL로 나타내었다. 모든 실험은 3회 반복 실험하였다.

### GABA 검량선을 이용한 GABA량 측정

MRS broth에 monosodium glutamate(MSG)를 첨가하여 121°C에서 15분간 습열 멸균시킨 후 이에 분리균주를 5%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 미리 구한 검량선을 이용하여 GABA량을 측정하였다.

### 배지 제조 및 최적화에 따른 GABA 생성량

(주)천보내츄럴푸드에서 제공받은 미강에 10배의 증류수를 가한 후 55°C에서 24시간 온수 추출하였다. 이를 No.3 여과지(Whatman, Aylesbury, UK)를 이용하여 감압여과하고, pH 6.5로 조정하고 autoclave(121°C, 15분)로 멸균하여 배지로 사용하였다.

유산균 배양배지인 MRS broth의 구성성분을 바탕으로 미강 추출물에 첨가할 탄소원(dextrose, sucrose, lactose, galactose), 질소원(beef extract, peptone, tryptone, skim milk), 무기염류(sodium acetate, dipotassium sulfate, magnesium sulfate, ammonium citrate)를 선정하고 이를 탄소원, 질소원은 2%(w/v)씩, 무기염류는 0.2%(w/v)씩 첨가 후, 121°C에서 15분 멸균하여 배지로 사용하였다.

멸균배지에 분리균주를 5%(v/v) 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 배양하면서 optical density, pH 변화, GABA 생성량을 측정하였다. GABA 생성량 측정 결과 탄소원, 질소원, 무기염류에서 GABA량이 가장 높은 배지를 선정하고 배지 조성에 대한 최적 조건을 설정할 때 하나의 요인을 여러 수준으로 놓고 나머지 요인들을 고정시켜 실험하는 “one

factor at a time method(OFAT)법(18)에 기초하여 한 요인을 다양한 수준으로 첨가하면서 다른 요인들을 고정시킨 값을 첨가한 미강 추출물 배지를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 배양 후 GABA량을 측정하였다.

### Electrostatic spray

Electrostatic spray의 도포성을 확인하기 위해 농축된 *Lactobacillus brevis* CFM11 균체를 pyronin Y(P9172, Sigma-Aldrich Co.)로 10분간 염색한 후 여러 차례 원심분리를 통하여 세척하고 싼에 1 m 떨어진 거리에서 conventional spray와 electrostatic spray를 이용하여 분주한 후 염색된 싼알을 광학적 절편(optical sectioning)으로 연속적 영상을 재구성하여 관찰하였다.

최적화된 미강 추출물에 배양된 균주를 5%(v/v) 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후, 5 mL 배양액을 곡류로부터 1 m 떨어진 거리에서 electrostatic spray를 이용하여 분주하고 37°C에서 24시간 동안 건조시킨 후 GABA량을 측정하고 50°C, 70°C 및 100°C에서 1시간, 2시간 및 3시간 동안 열처리를 하고 GABA량을 측정하였다. 그리고 electrostatic spray 처리한 곡류의 취반이 GABA 생성량에 끼치는 영향을 알아보기 위하여 최적화된 미강 추출물에 배양한 *L. brevis* CFM11을 electrostatic spray를 이용해 곡류 100 g에 분주하여 24시간 건조한 후 시료 무게의 5배의 증류수를 가하여 1분간 10회 저어주며 세척한 다음 GABA량 측정 실험에 사용하였다.

취반은 세척한 곡류 50 g에 1.3배의 증류수를 가하여 전기밥솥(CW-8500P, MediHeim, Seoul, Korea)에서 약 40분간 가열 취반하였으며 취반 후 GABA량 측정 실험에 사용하여 GABA량을 측정하였다.

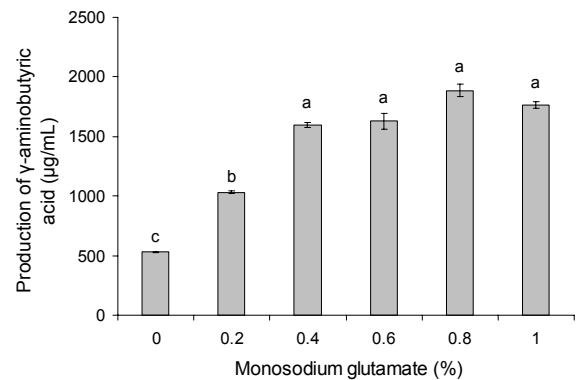
### 통계분석

실험 결과에 대한 통계분석은 SPSS(Statistical Package for the Social Science, Ver 12.0, SPP Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균값으로 나타냈으며 one-way ANOVA로 처리한 후 Duncan's multiple range test에 의해 실험군 간의 차이를  $P < 0.05$ 에서 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

### MSG 농도별 첨가에 따른 *L. brevis* CFM11의 GABA 생성량

뇌에서는 glutamic acid를 연료로 사용하는데, 뇌-혈관장벽을 통과하지 못하는 glutamic acid는 대사를 통해 glutamine이 되어 뇌-혈관장벽을 통과한 후 glutamic acid로 재합성되어 GABA의 전구물질로 활용된다고 한다(19). 따라서 MSG 첨가는 GABA 전환율을 증가시킬 것으로 예상되고 이에 대한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. MSG의 함량이



**Fig. 1.** The effect of monosodium glutamate in MRS broth to produce  $\gamma$ -aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* CFM11. Means with different letters above the bars are significantly different at  $P < 0.05$ .

증가할수록 GABA량이 증가했으며, 0.8%(v/v)에서 2,002.93  $\mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 GABA량이 측정되었다. 그러나 통계분석 결과 0.4~1.0% MSG 첨가 후 GABA 생성량이 실험적으로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났고, *L. brevis* CFM11의 GABA 생성량을 증가시키기 위해서는 0.4%의 MSG로도 충분할 것으로 보인다.

### 탄소원, 질소원, 무기질 첨가에 따른 흡광도, pH 변화, GABA 생성량

미강 추출물에 탄소원, 질소원, 무기질을 첨가하여 *L. brevis* CFM11의 배지로 사용하여 37°C에서 24시간 배양하여 나타난 흡광도, pH, GABA 생성량은 Table 1과 같다.

MRS 배지와 미강 추출물 배지에서 배양한 *L. brevis* CFM11이 생성한 GABA량은 각각 600.12  $\mu\text{g/mL}$ , 61.04  $\mu\text{g/mL}$ 로 약 10배 정도 차이가 보였지만 미강 추출물에서도 GABA를 생성하는 것을 알 수 있었고 이는 미강의 성분인 조단백질 15%, 조지방질 20%, 탄수화물 52%와 비타민류와 미네랄 성분들이 균 성장에 기여한 것으로 보인다(20).

균이 고농도의 GABA 생성을 위해 다양한 곡류 추출물에 탄소원과 질소원을 첨가한다고 보고하여, Kook 등(21)은 *L. brevis* CFM11의 GABA 생성을 강화하기 위해 미강 추출물에 2%(w/v) 탄소원과 2%(w/v) 질소원, 0.02%(w/v) 무기질을 첨가하여 GABA량을 비교하였다.

탄소원은 lactose, 질소원은 tryptone, 무기질에서는 dipotassium sulfate에서 흡광도 값이 1.42, 1.59, 1.59로 균의 생장이 가장 높았으나, GABA 생성량은 탄소원인 sucrose에서 124.68  $\mu\text{g/mL}$ , 질소원인 skim milk에서 216.47  $\mu\text{g/mL}$ , 무기질인 magnesium sulfate에서 105.19  $\mu\text{g/mL}$ 로 높게 나타났다. 이 결과로 보아 균의 성장과 GABA 생성량은 큰 상관관계가 없는 것으로 예상된다. 그리고 탄소원과 무기질은 종류에 따라 GABA 생성량의 차이가 크게 나타났지만, 이에 반해 질소원은 종류에 큰 영향을 받지 않고 GABA량이 비슷하게 측정되었다. 따라서 미강 추출물 배지

**Table 1.** The effect of the added carbon, nitrogen, and mineral source on *Lactobacillus brevis* CFM11 growth, pH, and  $\gamma$ -aminobutyric acid content

		Optical density (660 nm)	pH	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )
MRS control (pH 6.50)		2.09±0.10 <sup>ad</sup>	4.70±0.01 <sup>b</sup>	600.12±15.24 <sup>a</sup>
MRS (pH 4.20)		1.05±0.17 <sup>b</sup>	4.14±0.02 <sup>d</sup>	310.23±3.10 <sup>b</sup>
Rice bran extract control (pH 4.18)		0.17±0.01 <sup>c</sup>	4.19±0.01 <sup>c</sup>	40.65±2.11 <sup>d</sup>
Rice bran extract (pH 6.40)		1.13±0.03 <sup>b</sup>	4.99±0.01 <sup>a</sup>	61.04±1.77 <sup>c</sup>
Carbon source <sup>1)</sup>	Dextrose	1.04±0.03 <sup>c</sup>	4.58±0.02 <sup>c</sup>	90.47±7.07 <sup>b</sup>
	Sucrose	1.37±0.02 <sup>a</sup>	4.91±0.01 <sup>a</sup>	124.68±1.41 <sup>a</sup>
	Lactose	1.42±0.09 <sup>a</sup>	4.93±0.02 <sup>a</sup>	85.71±7.07 <sup>bc</sup>
	Galactose	1.16±0.06 <sup>b</sup>	4.74±0.02 <sup>b</sup>	56.49±3.54 <sup>c</sup>
Nitrogen source <sup>2)</sup>	Beef extract	1.41±0.02 <sup>b</sup>	5.18±0.01 <sup>c</sup>	144.16±2.83 <sup>b</sup>
	Peptone	1.34±0.08 <sup>b</sup>	5.41±0.00 <sup>b</sup>	139.29±1.41 <sup>b</sup>
	Tryptone	1.59±0.07 <sup>a</sup>	5.43±0.01 <sup>a</sup>	95.46±3.53 <sup>c</sup>
	Skim milk	1.43±0.07 <sup>b</sup>	5.19±0.01 <sup>c</sup>	216.48±11.31 <sup>a</sup>
Mineral source <sup>3)</sup>	Sodium acetate	1.42±0.04 <sup>b</sup>	5.07±0.01 <sup>b</sup>	66.23±4.24 <sup>b</sup>
	Dipotassium sulfate	1.59±0.09 <sup>a</sup>	5.33±0.02 <sup>a</sup>	37.01±1.41 <sup>c</sup>
	Magnesium sulfate	0.98±0.03 <sup>d</sup>	4.93±0.00 <sup>d</sup>	105.19±3.53 <sup>a</sup>
	Ammonium citrate	1.09±0.02 <sup>c</sup>	4.98±0.01 <sup>c</sup>	71.26±4.25 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Addition of 2% (w/v) carbon source into rice bran extract.

<sup>2)</sup>Addition of 2% (w/v) nitrogen source into rice bran extract.

<sup>3)</sup>Addition of 0.2% (w/v) mineral source into rice bran extract.

<sup>4)</sup>Values are the mean±standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters within a same column are significantly different at  $P<0.05$ .

를 최적화하는 데 탄소원은 sucrose, 질소원은 skim milk, 무기질은 magnesium sulfate를 첨가하는 것이 *L. brevis* CFM11의 GABA 생성 능력을 높이는 것으로 생각된다.

#### 첨가 물질에 따른 GABA 생성량

*L. brevis* CFM11 균주는 미강 추출물 배지에 첨가되는 탄소원, 무기질, 질소원의 종류에 따라 GABA량이 다르게 나타났고 GABA 생산량이 가장 높은 sucrose, magnesium sulfate, skim milk를 선정하였다.

배지에 sucrose, magnesium sulfate, skim milk를 같은 양을 첨가하여 고정시킨 후 OFAT법에 기초하여 sucrose, magnesium sulfate, skim milk를 다양한 수준(0~2 g/20 mL)으로 첨가하여 배양한 결과, sucrose 0.4 g에서 195.17  $\mu\text{g/mL}$ , magnesium sulfate 0.04 g에서 103.39  $\mu\text{g/mL}$ ,

skim milk 0.2 g에서 267.61  $\mu\text{g/mL}$ 로 높은 GABA 생성량이 확인되었다(Table 2). 즉 2% sucrose, 0.02% magnesium sulfate, 1% skim milk를 첨가했을 때 GABA량이 가장 높게 나타났다.

#### 배지 최적화와 MSG 첨가 여부에 따른 GABA 생성량

앞서 진행한 실험 결과를 토대로 탄소원은 2% sucrose, 질소원은 1% skim milk, 무기질은 0.2%를 첨가하여 미강 추출물 배지를 최적화하였고 최적화 전 미강 추출물 배지에서 배양한 *L. brevis* CFM11은 61.04  $\mu\text{g/mL}$ 의 GABA를 생성한 반면, 최적화 후 미강 추출물 배지에서 284.66  $\mu\text{g/mL}$ 의 GABA를 생성하여 4배 이상 GABA 생성량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. MRS broth에서 배양한 *L. brevis* CFM11의 GABA 생성량인 600.12  $\mu\text{g/mL}$ 와 비교했을 때

**Table 2.** The effect of the addition of sucrose, magnesium sulfate, and skim milk on  $\gamma$ -aminobutyric acid content

Sucrose (g/20 mL)	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )	Magnesium sulfate (g/20 mL)	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )	Skim milk (g/20 mL)	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/mL}$ )
0	32.08±2.83 <sup>fl)</sup>	0	46.20±1.56 <sup>fl)</sup>	0	49.67±1.41 <sup>f</sup>
0.1	62.07±1.41 <sup>d</sup>	0.01	64.46±5.66 <sup>de</sup>	0.1	158.98±11.31 <sup>e</sup>
0.2	131.57±9.90 <sup>b</sup>	0.02	76.86±3.96 <sup>b</sup>	0.2	267.61±2.83 <sup>a</sup>
0.4	195.17±5.66 <sup>a</sup>	0.04	103.39±4.24 <sup>a</sup>	0.4	216.48±14.57 <sup>c</sup>
0.6	82.72±2.83 <sup>c</sup>	0.06	75.33±3.25 <sup>bc</sup>	0.6	240.25±7.07 <sup>b</sup>
0.8	85.12±1.41 <sup>c</sup>	0.08	68.60±2.12 <sup>d</sup>	0.8	233.52±3.53 <sup>bc</sup>
1.0	66.20±9.90 <sup>d</sup>	0.10	60.20±1.41 <sup>e</sup>	1.0	190.34±14.57 <sup>d</sup>
1.4	53.80±1.42 <sup>de</sup>	0.14	60.33±0.42 <sup>e</sup>	1.4	176.70±9.48 <sup>de</sup>
2.0	45.54±2.88 <sup>c</sup>	0.20	56.80±0.39 <sup>e</sup>	2.0	165.34±7.07 <sup>e</sup>

<sup>1)</sup>Values are the mean±standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters within a column are significantly different at  $P<0.05$ .

미강 추출물 배지에서 배양한 것은 이에 약 1/2 수준인 것으로 나타났다.

MSG 첨가에 따른 GABA 생성량을 알아보기 위해 최적화된 미강 추출물 배지에 MSG를 첨가시켰다. 고농도 GABA 생성을 위해 배지에 MSG를 첨가한 결과는 최적화된 미강 추출물 배지에 0.4%(w/v) MSG를 첨가했을 때 585.80 µg/mL로 GABA량이 가장 높게 측정되었고 이는 MSG가 첨가되지 않은 미강 추출물 배지의 284.66 µg/mL보다 약 2배 정도 GABA 생성량이 증가한 것으로 나타났다 Kook 등(21)은 4% sucrose와 1% yeast extract가 첨가된 미강 추출물 배지에 3~15% MSG를 첨가하였고, 이때 MSG 12%에서 GABA량이 가장 우수하게 측정되었다고 보고하였다. 이는 균주의 glutamate decarboxylase(GAD)가 GABA 생성의 중요한 원인이고 미강에서 유래된 GAD가 미량이지만 MSG로부터 GABA로 전환하는 데 영향을 주고 MSG 농도가 GAD 활성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 고농도의 MSG는 GABA 전환을 감소시키는 것으로 보인다고 보고한 바 있다. 또한, MRS broth 배지에서는 0.8%일 때 GABA 생성이 가장 우수했으나 미강 추출물 배지에서는 0.4%일 때 GABA 생성이 가장 우수했다. 단 0.2~0.6%일 때 GABA 생성량이 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 0.6% 이상 첨가하면 GABA 전환이 더디어지는 것을 알 수 있었다. 따라서 최적화된 미강 추출물 배지에 MSG를 0.4% 첨가하면 *L. brevis* CFM11이 생성하는 GABA량이 더 증가할 것이다(Table 3).

#### Electrostatic spray 처리된 곡류의 GABA 특성

Electrostatic spray의 분포 정도는 Fig. 2와 같다. 쌀알을 confocal laser scanning을 이용해 X position: 257, Y position: 257, Z position: 10~24층으로 왼쪽에서 오른쪽으로 갈수록 바깥층엔 연속 광학적 절편으로 나타났다. Conventional spray에 비해 electrostatic spray가 더 넓게 분주되었고, 흡수된 정도도 큰 것으로 나타났다.

곡류가 함유하고 있는 GABA량은 쌀 32.23 µg/g, 현미

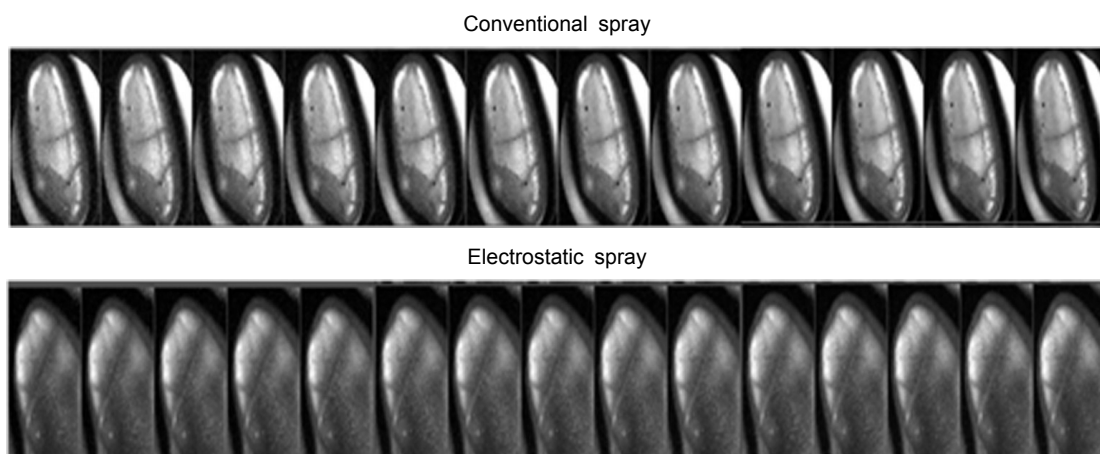
**Table 3.** Comparison of the effect of the addition of MSG in rice bran extract medium and MRS broth

MSG (%)	GABA (µg/mL)	
	Rice bran extract	MRS broth
0	284.66±20.08 <sup>b1)</sup>	611.98±8.13 <sup>c</sup>
0.2	540.34±48.38 <sup>a</sup>	1,080.35±10.54 <sup>b</sup>
0.4	585.80±36.16 <sup>a</sup>	1,651.02±20.47 <sup>a</sup>
0.6	506.25±40.17 <sup>a</sup>	1,739.00±55.21 <sup>a</sup>
0.8	432.39±13.28 <sup>ab</sup>	2,002.93±46.71 <sup>a</sup>
1.0	392.61±12.05 <sup>ab</sup>	1,900.29±36.63 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Values are the mean±standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters within a same column are significantly different at  $P<0.05$ .

17.53 µg/g, 찰현미 7.79 µg/g, 노란차좁쌀 46.75 µg/g으로 노란차좁쌀이 가장 많이 함유하고 있었다. Conventional spray로 분주했을 때 찰현미가 7.79 µg/g의 GABA 함유량에서 42.15 µg/g으로 GABA량이 약 6배 증가하여 다른 곡류에 비해 증가량이 가장 높았다. 그리고 electrostatic spray로 분주했을 때는 쌀의 GABA량이 32.23 µg/g에서 228.10 µg/g으로 약 7배 증가했고, conventional spray로 분주했을 때 87.60 µg/g보다도 약 3배 증가한 것으로 나타났다. 쌀 이외에도 다른 곡류에서도 마찬가지로 conventional spray로 분주했을 때보다 electrostatic spray로 분주했을 때 GABA 생성량이 증가하였다. 따라서 electrostatic spray의 정전기력으로 인해 목표 물체에 미강 발효물이 잘 부착하여 분포성이나 흡수성이 conventional spray보다 우수하고 GABA량을 향상시키는 데 효과적인 것을 알 수 있었다(Table 4).

Electrostatic spray 처리 후 GABA의 온도 저항성을 알아보기 위해 최적화된 미강 추출물 배지에 배양된 *L. brevis* CFM11을 electrostatic spray로 곡류에 분주한 후 24시간 건조시킨 다음 온도별(50°C, 70°C 및 100°C), 시간별(1시간, 2시간 및 3시간)에 따른 GABA량의 변화를 비교 분석하여 Table 5에 나타났다. 쌀은 electrostatic spray로 처리 후 50°C에서는 GABA량이 비슷하게 유지되었고, 70°C에서



**Fig. 2.** Confocal laser scanning microscopy images of the rice particles sprayed with different methods.

**Table 4.** Comparison of  $\gamma$ -aminobutyric acid production using conventional spray and electrostatic spray

	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/g}$ )		
	Before treatment	Conventional spray	Electrostatic spray
Rice	32.23 $\pm$ 16.23 <sup>cl)</sup>	87.60 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	228.10 $\pm$ 10.78 <sup>a</sup>
Brown rice	17.53 $\pm$ 2.78 <sup>c</sup>	71.07 $\pm$ 11.69 <sup>b</sup>	161.98 $\pm$ 23.38 <sup>a</sup>
Yellow-glutinous foxtail millet rice	46.75 $\pm$ 1.71 <sup>b</sup>	58.68 $\pm$ 11.69 <sup>b</sup>	79.34 $\pm$ 5.84 <sup>a</sup>
Glutinous brown rice	7.79 $\pm$ 0.64 <sup>b</sup>	42.15 $\pm$ 5.84 <sup>a</sup>	46.28 $\pm$ 17.53 <sup>a</sup>

<sup>l)</sup>Values are the mean $\pm$ standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters within a row are significantly different at  $P<0.05$ .

**Table 5.**  $\gamma$ -Aminobutyric acid remained in cereal after heat treatment

	Control	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/g}$ )		
			1 h	2 h	3 h
Rice	228.10 $\pm$ 10.78	50	236.36 $\pm$ 11.67 <sup>e1)</sup>	211.57 $\pm$ 11.68 <sup>f</sup>	203.31 $\pm$ 3.74 <sup>f</sup>
		70	261.16 $\pm$ 35.06 <sup>d</sup>	281.82 $\pm$ 17.53 <sup>e</sup>	233.23 $\pm$ 17.53 <sup>e</sup>
		100	356.20 $\pm$ 20.91 <sup>a</sup>	285.95 $\pm$ 4.67 <sup>c</sup>	310.75 $\pm$ 15.43 <sup>b</sup>
Brown rice	161.98 $\pm$ 23.38	50	104.13 $\pm$ 11.67 <sup>e</sup>	112.40 $\pm$ 6.87 <sup>e</sup>	106.74 $\pm$ 5.84 <sup>e</sup>
		70	100.00 $\pm$ 17.53 <sup>e</sup>	95.87 $\pm$ 7.72 <sup>e</sup>	156.12 $\pm$ 5.84 <sup>d</sup>
		100	356.20 $\pm$ 5.84 <sup>a</sup>	285.95 $\pm$ 6.31 <sup>c</sup>	310.75 $\pm$ 11.68 <sup>b</sup>
Yellow-glutinous foxtail millet rice	79.34 $\pm$ 5.84	50	62.81 $\pm$ 5.84 <sup>de</sup>	71.07 $\pm$ 8.43 <sup>cd</sup>	84.32 $\pm$ 0.00 <sup>ab</sup>
		70	62.81 $\pm$ 3.57 <sup>de</sup>	79.34 $\pm$ 23.37 <sup>abc</sup>	58.67 $\pm$ 2.91 <sup>e</sup>
		100	87.61 $\pm$ 1.66 <sup>a</sup>	75.21 $\pm$ 17.53 <sup>bc</sup>	54.55 $\pm$ 4.67 <sup>e</sup>
Glutinous brown rice	46.28 $\pm$ 17.53	50	62.81 $\pm$ 11.03 <sup>ab</sup>	50.41 $\pm$ 5.84 <sup>cd</sup>	38.02 $\pm$ 5.84 <sup>c</sup>
		70	54.45 $\pm$ 0.00 <sup>bc</sup>	46.28 $\pm$ 5.84 <sup>cde</sup>	54.55 $\pm$ 1.74 <sup>bc</sup>
		100	66.94 $\pm$ 5.84 <sup>a</sup>	54.55 $\pm$ 2.37 <sup>bc</sup>	42.15 $\pm$ 4.09 <sup>de</sup>

<sup>l)</sup>Values are the mean $\pm$ standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters within a same rice are significantly different at  $P<0.05$ .

는 2시간까지 증가하다 3시간 후 조금 감소하였고, 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서는 228.10  $\mu\text{g/g}$ 에서 3시간 후 310.75  $\mu\text{g/g}$  정도로 증가한 것을 볼 수 있었다. 현미는 다른 온도에 비해 100 $^{\circ}\text{C}$ 에서 GABA량이 2배 이상 증가하였고, 쌀과는 다르게 50 $^{\circ}\text{C}$ , 70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3시간 후 GABA량이 증가한 것을 볼 수 있었다. 노란찰좁쌀은 온도에 관계없이 GABA량이 비슷하게 유지되거나 감소하는 경향을 나타냈다. 찰현미는 온도에 관계없이 GABA량이 약 10~20  $\mu\text{g/g}$  정도 증가하다가 시간이 지남에 따라 감소하는 것으로 나타났다.

Electrostatic spray 처리된 곡류를 취반한 결과 모두 GABA량이 감소했다. 쌀은 228.10  $\mu\text{g/g}$ 에서 취반 후 57.61

$\mu\text{g/g}$ 으로 감소하여 네 가지 곡류 중 감소량이 가장 크게 나타났다. 현미, 노란찰좁쌀, 찰현미는 각각 161.98  $\mu\text{g/g}$ 에서 80.53  $\mu\text{g/g}$ , 79.34  $\mu\text{g/g}$ 에서 49.67  $\mu\text{g/g}$ , 46.28  $\mu\text{g/g}$ 에서 25.26  $\mu\text{g/g}$ 으로 약 1/2배씩 감소한 GABA량이 측정되었다. Electrostatic spray로 인해 취반 과정 중 수세과정에서 곡류에 부착된 GABA가 씻겨나가 GABA량에 영향을 미치는 것으로 보인다. 따라서 electrostatic spray가 처리된 곡류를 취반한 후에는 GABA량이 감소한 것을 알 수 있었다 (Table 6).

## 요 약

**Table 6.** Comparison of  $\gamma$ -aminobutyric acid amount before cooking and after cooking

	$\gamma$ -Aminobutyric acid ( $\mu\text{g/g}$ )	
	Before cooking	After cooking
Rice	228.10 $\pm$ 10.78 <sup>a1)</sup>	57.61 $\pm$ 1.10 <sup>b</sup>
Brown rice	161.98 $\pm$ 23.38 <sup>a</sup>	80.53 $\pm$ 0.44 <sup>b</sup>
Yellow-glutinous foxtail millet rice	79.34 $\pm$ 5.84 <sup>a</sup>	49.67 $\pm$ 0.49 <sup>b</sup>
Glutinous brown rice	46.28 $\pm$ 17.53 <sup>a</sup>	25.26 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>

<sup>l)</sup>Values are the mean $\pm$ standard deviation of triplicate experiments. Means with different letters within a row are significantly different at  $P<0.05$ .

본 연구는 유산균에 의한 gamma aminobutyric acid (GABA)의 생산 및 쌀겨 추출물을 이용한 최적 배지의 제조를 목표로 하고 electrostatic spray는 곡물에 GABA 함량을 증진시키기 위해 사용하였다. 분리한 *Lactobacillus brevis* CFM11을 MRS 배지를 이용하여 최적 조건(37 $^{\circ}\text{C}$ , 24시간, pH 6.5)에서 배양시킨 결과, 600.12  $\mu\text{g/mL}$ 의 GABA 생성량을 나타냈고 0.8% MSG를 함유한 MRS 배지에서 배양시켰을 때 2,002.93  $\mu\text{g/mL}$ 의 GABA 생성량을 나타냈다. 미강 추출물 배지에 MSG 0.4%, sucrose 2%, skim milk 1%, magnesium sulfate 0.2%를 첨가했을 때 GABA 생산량은 585.80  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 최적화 배지에 *L. brevis*

CFM11을 배양시켜 얻은 GABA를 쌀 표면에 electrostatic spray 처리 후 GABA량은 228.10 µg/g으로 나타난 반면, 아무것도 처리하지 않은 곡류에서의 GABA량은 32.23 µg/g이었다. 이러한 결과로 보아 미강 추출물은 GABA 생산을 위한 MRS 배지의 대체물로서 산업적인 가치를 증가시킬 수 있을 것으로 판단된다.

### 감사의 글

이 논문은 2014년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

### REFERENCES

- Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I. 1994. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 17: 517-525.
- Oh SH, Oh CH. 2003. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food Sci Biotechnol* 12: 248-252.
- Lim SD, Kim KS. 2009. Effects and utilization of GABA. *Korean J Dairy Sci Technol* 27: 45-51.
- Park KB, Oh SH. 2007. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresour Technol* 98: 312-319.
- Kinnersley AM, Turano FJ. 2000. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Crit Rev Plant Sci* 19: 479-509.
- Daeschel MA. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol* 43: 164-167.
- Bae SM, Kim JH, Cho CW, Jeong TJ, Yook HS, Byun MW, Lee SC. 2002. Effect of  $\gamma$ -irradiation on the antioxidant activity of rice hull, rice bran and barley bran. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 246-250.
- Ha TY, Han S, Kim SR, Kim IH, Lee HY, Kim HK. 2005. Bioactive components in rice bran oil improve lipid profiles in rats fed a high-cholesterol diet. *Nutr Res* 25: 597-606.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. 2005. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr* 81: 215S-217S.
- Kim YH, Kang CS, Lee YS. 2004. Quantification of tocopherol and tocotrienol content in rice bran by near infrared reflectance spectroscopy. *Korean J Crop Sci* 43: 211-215.
- Dassanayake LSK, Kodali DR, Ueno S, Sato K. 2009. Physical properties of rice bran wax in bulk and organogels. *J Am Oil Chem Soc* 86: 1163-1173.
- Kim KM, Jang IS, Ha SD, Bae DH. 2004. Improved storage stability of brown rice by coating with rice bran protein. *Korean J Food Sci Technol* 36: 490-500.
- Lee AR. 2010. A study on the development of cooked rice according to different coating ratio of Yacon (*Polymia sonchifolia*) root and its antioxidant and sensory properties. *Korean J Food Nutr* 23: 600-606.
- Kim JS, Kim DS. 2013. Development of spray thin film coating method using an air pressure and electrostatic force. *J Korean Soc Precis Eng* 30: 567-572.
- Clark G. 1995. Processing: electrostatic coating technology for savoury snacks. *Food Technol Eur* 2(3): 90-96.
- Barringer SA, Abu-Ali J, Chung HJ. 2005. Electrostatic powder coating of sodium erythorbate and GDL to improve color and decrease microbial counts on meat. *Innov Food Sci Emerg Technol* 6: 189-193.
- Zhang G, Bown AW. 1997. The rapid determination of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Phytochem* 44: 1007-1009.
- Czitrom V. 1999. One factor at a time versus designed experiments. *American Statistician* 53: 126-131.
- Huang J, Mei LH, Wu H, Lin D. 2007. Biosynthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) using immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis*. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 865-871.
- Lee JH, Oh SK, Kim DJ, Yoon MR, Chun A, Choim IS, Lee JS, Kim YG. 2013. Comparison of antioxidant activities by different extraction temperatures of some commercially available cultivars of rice bran in Korea. *Korean J Food Nutr* 26: 1-7.
- Kook MC, Seo MJ, Cheigh CI, Pyun YR, Cho SC, Park H. 2010. Enhanced production of  $\gamma$ -aminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16. *J Microbiol Biotechnol* 20: 763-766.