

## $\gamma$ -Aminobutyric acid를 생산하는 *Lactobacillus brevis* AML15의 분리 및 특성

신지원 · 김동걸 · 이용우 · 이형석 · 신기선<sup>1</sup> · 최충식<sup>2</sup> · 권기석\*

안동대학교 생명자원과학부, <sup>1</sup>한국생명공학연구원, <sup>2</sup>(주)한스바이오

Received June 4, 2007 / Accepted July 10, 2007

**Isolation and Characterization of *Lactobacillus brevis* AML15 Producing  $\gamma$ -Aminobutyric Acid.** Ji Won Shin, Dong Geol Kim, Yong Woo Lee, Hyoung Seok Lee, Kee Sun Shin<sup>1</sup>, Chung Sig Choi<sup>2</sup> and Gi Seok Kwon\*. School of Bioresources Science, Andong National University, Andong 760-749, Korea, <sup>1</sup>Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-600, Korea, <sup>2</sup>Hans Bio Co., B.I. center 303, Andong National University, Andong 760-749, Korea -- For the screening of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)-producing bacteria, 86 bacterial strains which produce GABA were isolated from Kimchi and Salted-fish. Among these, three strains designated AML15, AML45-1, AML72 with relatively high GABA productivity were selected by thin layer chromatography (TLC). To elucidate the relationship between isolated strains and the genus *Lactobacillus*, their 16S rDNA sequence were examined. The result of their DNA sequences showed 99% similarity with *Lactobacillus brevis* ATCC 367. On the basis of the these results, isolated strains were identified as *Lactobacillus brevis* and designated *L. brevis* AML15. In order to determine the optimum conditions for GABA production, the isolated strains were cultivated in pyridoxal phosphate (PLP) and monosodium glutamic acid (MSG). Results showed that *L. brevis* AML15 had the highest GABA productivity with 10,424 nM/ $\mu$ l concentration in MRS broth containing 5% (w/v) MSG and 10  $\mu$ M PLP at pH 5.0. The results imply that *L. brevis* AML15 has the potential to be developed as a strain for GABA hyper-production.

**Key words** –  $\gamma$ -Aminobutyric acid, Glutamate decarboxylase, *Lactobacillus brevis*

### 서론

$\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA)는 단백질에서 발견이 되지 않는 비단백질성 아미노산으로 뇌와 척추에 존재하는 신경전달물질로 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다. GABA의 뇌기능 개선작용은 뇌의 흥분성과 억제성의 2개의 시그널의 상호조절에 의한 원활한 정보전달에 기인하는 것인데, GABA는 신경전달물질 중 아미노산계 신경전달물질의 대표적 물질로서[7], 중풍, 치매예방, 기억력 증진, 불면 등에 효과가 있어 수험생관련 기능성 식품에 응용할 수 있으며, 식육과 포만감에 영향을 주어 체중을 감소시키는 효과가 있다[5,6,10,21]. 식품의 경우 식물체 내의 GABA는 glutamate에서 succinate에 이르는 GABA로의 전환을 통해 탄소골격의 제공 또는 아미노산 대사산물로서 작용하며, 해충의 공격 및 종자의 발아시 함량이 급격히 증진되는 등 식물세포의 활성화를 통한 성장과 자기보호기능에 중요한 역할을 한다[12,16,19,23]. 또한 식물에서 GABA의 합성은 여러 외부 환경적 요인에 의해 영향을 받고 있으며, 식물체가 여러 환경적 스트레스에 대항하기 위한 수단으로 GABA 생성체계를 가동시키는 것으로 추정된다.

이러한 기능성을 가진 GABA는 동·식물계에 널리 분포되어 있는데, 갑각류의 신경근 집합부, 포유동물의 소뇌등에 많이 존재하며, 식물에서는 차, 황기와 뽕 등에 널리 존재하며 홍국 (red yeast rice) 중에도 다량 존재하는 것으로 알려져 있다[8,9,16].

GABA의 생성기작은 세포내막에서 glutamic acid가 glutamate decarboxylase (GAD)의 효소에 의하여 탈탄산이 이루어지면서 glutamate가 antiporter에 의하여 세포안으로 쉽게 들어가게 되며 결과적으로 GABA가 세포 밖으로 유출되어 나온다[1,2,15,24]. GABA는 아미노산의 전이반응에 의해 succinic semialdehyde로 전환된 다음 산화에 의하여 succinate가 된다. 이와같이 GABA의 대사는 에너지를 생산하고 TCA회로에서 산화를 위한 탄소의 공급, 질소 저장화합물 및 아미노산 대사산물 등의 여러 가지 기능이 알려져 있다[18].

이러한 GABA의 기능성이 알려지면서 의약품으로서 뿐만 아니라 기능성 식품소재로서 관심이 높아지고 있다. 현재 GABA는 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 약간 함유되어 있으나 그 함량이 낮아 자연 식품으로 섭취하는 양으로는 생리활성을 기대하기 어렵다[20]. 이러한 식물들의 GABA 함유량을 높이기 위해서 차잎과 보리맥아 제조시 발아된 보리의 혐기적 처리와 현미 발아시 glutamic acid 첨가를 통하여 식물체내 GABA 함량을 증가시켰다[3,11,23,25]. 그러나 식물을 원재료로 한 GABA의 생산에는 한계가 있으므로 GABA 대량생산을 위해 미생물을 이용한 많은 연구가 수행

\*Corresponding author

Tel : +82-54-820-5909, Fax : +82-54-820-6252

E-mail : gskwon@andong.ac.kr

되고 있다. 미생물을 이용한 연구로는 유산균을 starter로 하여 만들어진 cheese와 유산균 발효유에서 GABA가 생산되고 있으며, GABA를 생산하는 유산균으로는 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* 등이 보고되고 있다[17,22].

따라서 본 연구에서는 MRS배지에 최대 전환 농도를 보인 5%(w/v)의 monosodium glutamic acid (MSG)를 첨가하여 고농도의 GABA생산을 위한 적정 배양조건을 확립하고 GAD의 보조요소로 탈탄산반응을 촉진시키는 Pyridoxal phosphate (PLP)를 첨가하여 GABA 생산의 증가효과를 조사하였다.

## 재료 및 방법

### GABA 생산균주 분리

균원시료는 2005년도 동해, 서해와 남해 수산시장에서 채취된 다른 180여종의 젓갈과 김치로부터 유산균을 분리하여 실험에 사용하였다. 유산균을 분리하기 위한 선택배지로 Bromocresol purple (BCP)을 함유한 BCP agar (Eiken Chemical Co., Japan) 배지를 사용하였으며, 준비된 시료를 마쇄한 후 평판희석 도말법을 이용하여 BCP agar배지에 도말하였다. 시료를 도말한 배지를 37°C에서 24~37시간 배양하면서 균체 주변에 형광색환을 형성하는 균주를 1차 선별하였다. 1차 선별된 균주들은 다시 MRS broth (Difco Co., U.S.A)에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양액을 TLC를 이용하여 GABA spot을 확인하였으며, 이들 균주중에서 GABA spot이 크고 진한 균주들을 GABA 생산균주로 최종 선별하였다.

### GABA 생산균주의 동정

GABA 생산균주 AML15의 분류학적 위치를 규명하기 위하여 16S ribosomal DNA 영역의 부분염기서열 분석을 실시하였다. 먼저 염기서열분석에 이용할 염색체 DNA를 분리하기 위하여 Malt extract broth (Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.)에 균주를 접종하고 25°C에서 3일간 배양하였다. 배양된 균체를 수집하여 Yoon 등[26]의 방법으로 DNA를 분리하고 small subunit rDNA 영역을 PCR로 증폭하였다[27,28]. PCR 증폭에 이용한 primer는 9F [5'-GAGTTTGATCCTGGC TCAG ; positions 9-27 (*Escherichia coli* 16S rRNA numbering)]와 1542R [5'-AFAAFFAFFTFATFATCCAGCC ; 1542-1525]이었다[28]. PCR로 증폭한 단편들은 QIAquick PCR purification kit (Qiagen Inc., Germany)를 사용하여 정제한 후 ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Biosystems, U.S.A.)를 사용하여 sequencing 반응을 수행하였고, sequencing 반응에 이용한 primer는 536R [5'-GWA TTACCGCGGCKGCTG ; 536-519]이었으며, 반응결과 생산된 DNA 단편들은 ABI 310 DNA sequencing (Perkin Elmer,

New Jersey, U.S.A.)를 이용하여 분석하였다.

### GABA 생산을 위한 최적 배양 조건 확립

분리균주의 배양에는 Lactobacilli MRS broth (Difco Co.) 배지를 사용하였으며, 분리균주의 GABA생산을 위한 배양에는 MRS broth에 monosodium glutamic acid (MSG)를 5% (w/v) 첨가하여 사용하였다. GABA 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 알아보기 위하여 MRS broth에 5% (w/v) MSG를 첨가 후 배지의 초기 pH를 4.0, 5.0과 6.0으로 조정하여 실험하였다. 균주의 배양은 배지에 균주를 1% 접종 후 37°C에서 48시간 동안 정치배양 하였으며, 균주의 생육도는 경시변화에 따라 spectrophotometer를 이용하여 600 nm에서 O.D.로 측정하였다. PLP 첨가 유무에 따른 GABA 생산증가 효과는 MRS broth에 MSG를 5% (w/v) 첨가한 후 초기 pH를 5.0으로 조정한 다음 PLP를 0, 10, 50과 100 µM 농도로 각각 첨가하여 spectrophotometer를 이용하여 균주의 생육도와 pH, GABA 함량을 조사하였다.

### γ-Aminobutyric acid의 분석

생성된 GABA 및 glutamic acid는 thin layer chromatography (TLC ; Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck co.) 검정과 아미노산 분석을 실시하여 확인하였다. GABA 및 glutamic acid의 함량 변화는 배양액을 12,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 0.45 µm membrane (Milipore Co.)로 여과한 후, 상등액을 분석용 시료로 하였다. 배양액에 함유된 GABA의 TLC 검정에 사용한 전개용매는 n-butanol : acetic acid : water (5:2:2, v/v/v)를 사용하였고, 발색시약으로 2% ninhydrin을 분무하여 105°C에서 5분간 발색시켜 확인하였다. 아미노산 분석은 아미노산 분석기를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### GABA 생산균주의 분리 및 선별

180여종의 젓갈과 김치 시료를 각각 1 ml을 취한 후 멸균 생리식염수를 이용하여 단계별로 희석한 다음 BCP배지에 도말하였다. BCP배지상에서 균체주변으로 형광색환을 나타내는 86종의 균주를 1차적으로 선별하였다. 선별된 균주들을 MRS agar배지에 2회 계대배양하여 순수분리된 균주들을 MRS broth에 접종하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 배양후 얻은 배양액을 silica gel TLC상에 점적하여 표준품인 GABA와 R<sub>f</sub> 치가 같은 균주들을 2차 선별하였다. 2차 선별된 균주들을 MRS broth에 1% MSG를 첨가하여 37°C에서 48시간 정치배양 후 배양 상등액을 TLC상에 점적하여 GABA spot이 크고 진한 3개의 균주를 GABA 고생산 균주로 최종 선별하였다 (Fig. 1). 선별된 3개의 균주를 아미노산 분석한 결과 AML15 균주가 GABA 생성능이 가장 우수한 것으로 조사되

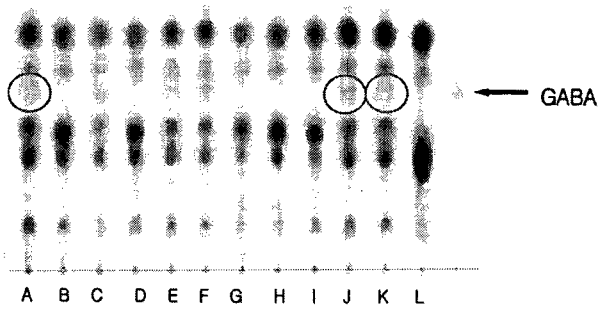


Fig. 1. Thin layer chromatography for selection of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) producing bacteria. Development solvent was consisted of n-butanol : acetic acid : water (5:2:2). Color development was done to spray 2% ninhydrin reagent and then heated at 105°C. (A) AML 15, (B) AML16, (C) AML18, (D) AML53, (E) AML54, (F) AML55, (G) AML58, (H) AML63, (I) AML64, (J) AML45-1, (K) AML72, (L) AML73.

이 실험균주로 사용하였다 (Table 1). 아미노산 분석에서 GABA와 glutamic acid의 retention time은 110.4분과 45.2분으로 각각 조사되었다 (Fig. 2).

**분리균주의 동정**

GABA 생산균주로 선별된 AML15의 16S rDNA 부분 염기서열을 분석하여 얻은 450 bp의 염기서열을 NCBI의 Genebank에 등록된 nucleotide data base와 비교하여 본 결과 *Lactobacillus brevis* ATCC 367의 동일 영역 염기서열과 99%의 유사도를 나타내었다. 이와 같은 결과를 토대로 AML15 strain을 *Lactobacillus brevis*로 동정하였고, *L. brevis* AML15로 명명하였다.

**Glutamic acid 첨가에 의한 GABA의 생산**

GABA는 glutamic acid가 glutamic acid decarboxylase에 의하여 탈탄산이 이루어지면서 생성된다[25]. 따라서 본 연구에서는 *L. brevis* AML15균주를 MRS broth배지에 5% (w/v) MSG 첨가 후 초기 pH를 4.0, 5.0과 6.0으로 조정하여 37°C에서 48시간 정치배양하였다. 그 결과 초기 pH를 4.0으로 조정한 배지에서는 균주의 생육이 나타나지 않았으며 pH의 변화도 나타나지 않는 것으로 조사되었다. 초기 pH를 5.0과 6.0으로 조정한 배지에서는 모두 균주의 생육이 나타났으

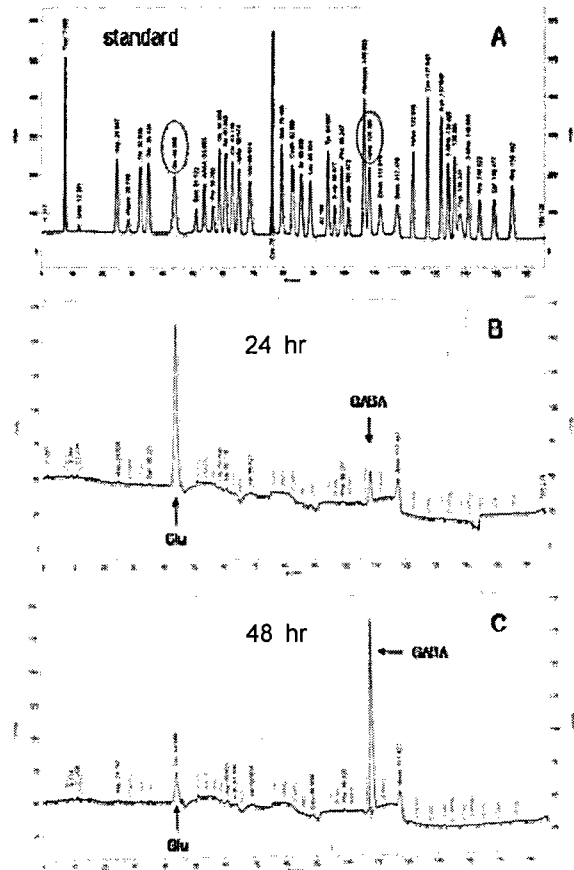


Fig. 2. Amino acid analyzer chromatograms of GABA and glutamic acid in *L. brevis* AML15. The culture condition was MRS medium containing 5% (w/v) monosodium glutamic acid at 37°C. (a) amino acid standard, (b) *L. brevis* AML15 were incubated at 37°C for 24hr., (c) *L. brevis* AML15 were incubated at 37°C for 48hr.

Table 1. Comparison of GABA productivity of isolated strains

Strain <sup>1)</sup>	GABA (nM/ $\mu$ l)
<i>Lactobacillus brevis</i> AML 15	2009.4
<i>Lactobacillus brevis</i> AML 45-1	1786.0
<i>Lactobacillus brevis</i> AML 72	1875.8

<sup>1)</sup>The culture condition was MRS medium containing 1% MSG at 37°C.

며 생육도와 pH의 변화는 큰 차이가 없는 것으로 조사되었다. 초기 pH 조정에 따른 GABA와 MSG의 함량변화를 조사한 결과 초기 pH를 4.0으로 조정한 배지에서는 균주의 생육이 나타나지 않았으므로 GABA의 생성 및 첨가한 MSG의 함량변화가 나타나지 않았다. 초기 pH를 5.0과 6.0으로 조정한 배지에서는 GABA의 생성과 MSG의 함량변화를 확인할 수 있었으며 특히, 초기 pH를 6.0으로 조정한 배지보다 초기 pH를 5.0으로 조정한 배지에서 GABA 함량이 3,604 nM/ $\mu$ l 더 높아졌으며, MSG 함량도 2,752 nM/ $\mu$ l 더 낮아지는 것으로 조사되었다 (Fig. 3). 초기 pH조절에 따른 GABA 생성능을 확인하였을때 초기 pH를 5.0으로 조정한 배지에서 가장 높은 GABA의 생성능이 나타남에 따라 GABA 고생성을 위한 배지의 초기 pH를 5.0으로 조정하여 실험하였다. 다음으로 MRS broth에 5% (w/v) MSG 첨가 후 초기 pH를 5.0으로 조정하여 72시간 정치배양하면서 경시적으로 GABA와 MSG의 함량변화를 조사하였다. 그 결과 GABA의 생성은 12시간

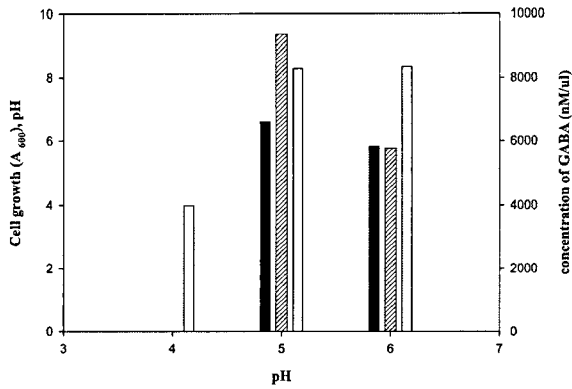


Fig. 3. Effect of initial pH on the GABA produced by *L. brevis* AML 15. The culture condition was MRS medium containing 5% MSG at 37°C. Symbols: (■) Cell growth, (□) pH, (▨) GABA

배양하였을 경우에는 큰 변화가 없었으나 24시간 배양이후 급격히 증가하여 48시간 배양하였을 때 가장 높은 GABA 생성이 나타났으며 48시간 이후에는 일정하게 유지되는 것으로 조사되었다. 반대로 MSG의 함량 변화는 GABA의 생성과 반대의 경향으로 나타났으며 12시간 배양하였을 경우에는 MSG의 함량변화가 나타나지 않았으며 24시간 배양이후 MSG의 함량이 급격히 감소하는 것으로 조사되었다 (Fig. 4). 상기의 결과는 MSG 농도 5% 이상에서는 균체 증식과 GABA 생산 모두 저해를 받았다는 강[14]의 결과와 상이함을 보였으며 최 등[4]의 결과와 일치하였다. 균주의 생육도는 48시간이 최대증식기인 것으로 보이며, GABA의 생성과 비교하였을 때 균주의 배양시간은 48시간이 가장 적당한 것으로 사료된다. 다음의 실험결과로 미루어보아 GABA 고생산 배양조건은 MSG broth 배지에 5% (w/v) MSG 첨가 후 배지의 초기 pH를 5.0으로 조정하여 48시간 배양하는 것이 가장 적합한 것으로 사료된다.

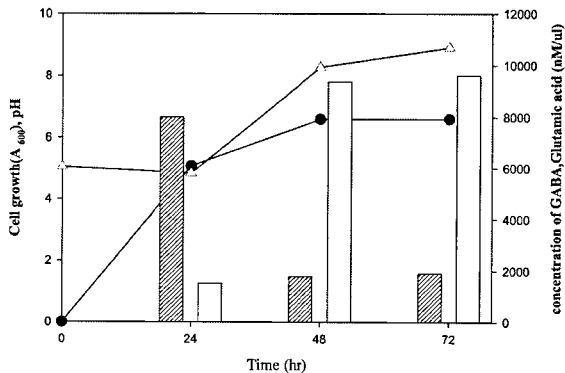


Fig. 4. Growth rate, pH change and change GABA content produced by *L. brevis* AML15. The culture condition was MRS medium containing 5% MSG at 37°C on pH 5.0 Symbols: (●) Cell growth, (Δ) pH, (□) GABA, (▨) Glutamic acid

### PLP첨가에 따른 GABA의 생산증가

Pyridoxal phosphate (PLP)는 비타민 B<sub>6</sub>의 보조효소이며 GAD 효소활성에 필요한 조효소로 작용한다[13]. GABA 생산 배지에 PLP를 0, 10, 50과 100 μM 첨가하여 37°C에서 48시간 정치배양하였다. 그 결과 PLP를 농도별로 첨가했을 때와 PLP를 첨가하지 않았을 때 균의 생육도는 비슷하게 나타난 것으로 조사되었으며 pH의 변화가 없는 것으로 조사되었으며, PLP의 첨가는 균주의 생육도와 pH의 변화에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

PLP 첨가유무에 따른 AML15변 균주의 GABA 함량은 PLP를 첨가하지 않았을 때 9,606 nM/μl 생산되었으며 PLP를 10 μM 첨가하였을 때 10,424 nM/μl로 GABA 함량이 1,169 nM/μl 더 증가되었다. MSG의 함량은 PLP를 첨가하지 않았을 때 10,207 nM/μl 감소되었으며 PLP를 10 μM 첨가하였을 때 384 nM/μl로 MSG 함량이 1,159 nM/μl 더 감소되어 MSG에서 GABA로의 전환력이 높아지는 것으로 조사되었다. PLP의 첨가농도가 증가되어도 GABA 생산량과 MSG의 함량에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 토대로 PLP의 첨가는 균주의 생육도와 pH에 큰 영향을 주지 않으며 PLP의 첨가농도는 10 μM이 가장 좋은 것으로 사료된다 (Fig. 5).

PLP를 10 μM 첨가하였을 때 GABA 생성량이 가장 좋았다는 실험 결과는 Komatsuzaki 등[13]의 결과와 일치하였다. 이상의 결과를 토대로 5% (w/v) 이상의 고농도 MSG로부터 GABA 생산에 관한 연구와 MSG에서 GABA로의 전환에 필요한 GAD 효소에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### 요 약

국내해안의 젓갈과 김치류로부터 86종의 GABA 생산균주

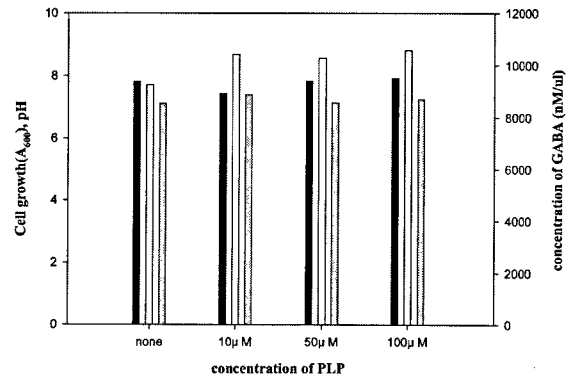


Fig. 5. Effect of pyridoxal phosphate concentration on the GABA produced by *L. brevis* AML 15. The culture condition was MRS medium containing 5% MSG at 37°C on pH 5.0. Symbols: (■) Cell growth, (□) pH, (▨) GABA

를 분리하였다. 분리된 균주들을 Thin layer chromatography를 이용하여 GABA 생성능이 우수한 AML15, AML45-1, AML72의 3종의 균주를 선발하였다. 선별된 3종의 균주의 아미노산 분석결과 GABA 생성능이 가장 우수한 AML15 균주를 본 실험에 사용하였다. AML15의 분류학적 위치를 규명하기 위하여 16S ribosomal DNA 영역의 부분염기서열 분석을 실시하였다. 16S rDNA 분석결과 *Lactobacillus brevis* ATCC 367과 99%의 유사도를 나타내어 *L. brevis* AML15로 명명하였다. MRS 배지에 최종 전환 농도로 설정된 5% (w/v) monosodium glutamic acid를 첨가하고 배지의 초기 pH를 4.0, 5.0과 6.0으로 조정하여 배양한 결과 배지의 초기 pH가 5.0일 때 GABA 생성능이 가장 높게 조사되었다. GABA 생산배지에 GAD 효소활성에 조효소로 작용하는 PLP를 0, 10, 50과 100  $\mu$ M의 농도로 첨가하여 아미노산 분석결과 PLP를 10 $\mu$ M 첨가하였을 때 10,424 nM/ $\mu$ l의 GABA가 생산되었다. PLP를 첨가하지 않았을 때보다 PLP 첨가 후 GABA 생성이 증가됨을 확인할 수 있었다.

### 감사의 글

이 논문은 안동대학교 2006년도 특성화추진지원 사업에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

- Alan, W. B and J. S. Barry. 1997. The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
- Barry, J. S., W. B. Alan and D. M. Michael. 1999. Metabolism and function of gamma-aminobutyric acid. *Trends in plant science* **4**, 446-452.
- Chang, J. S., B. S. Lee and Y. G. Kim. 1992. Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of anaerobically treated green leaves. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **24**, 315-319.
- Choi, S. I., J. W. Lee, S. M. Park, M. Y. Lee, G. E. Ji, M. S. Park and T. R. Heo. 2006. Improvement of  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**, 562-568.
- Choi, Y. S., J. H. Bahn, S. G. Jeon, Y. M. Chung, J. W. Hong, J. Y. Ahn, E. H. Lee, S. W. Cho, J. K. Park and N. I. Beak. 1998. Stimulatory effect of ginsenosides on bovin brain glutamate decarboxylase. *J. Biochemistry and Molecular biology* **31**, 233-239.
- Eam, J. I. 2004. Procudtion of  $\gamma$ -aminobutyric acid by *Lactobacillus* sp. isolated tradirional jeotgal. MS. Thesis. Kyungpook National University.
- Flora, J., C. Doreen, H. K. Lim, N. Tom and Lin. Stephen. 2004. Production of GABA by cultured hippocampal glial cells. *Neurochemistry International* **45**, 273-283.
- Hsueh, F. W., S. T. Yung, L. L. Mu and S. O. Andi. 2006. Comparison of bioactive components in GABA tea and green tea produced in Taiwan. *Food chemistry* **96**, 648-653.
- Isato, K and H. Kunio. 2000. Change in  $\gamma$ -Aminobutyric acid content during beni-koji making. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 617-619
- Jeon, J. H. 2004. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by immobilization of lactic acid bacteria isolated from salt fermented anchovy. MS. Thesis. Kyungsung University.
- Jeon, J. H., H. D. Kim, H. S. Lee and B. H. Ryu. 2004. Isolation and identification of *Lactobacillus* sp. produced  $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA) from traditional fermented anchovy. *Kor. J. Food & Nutr.* **17**, 72-19.
- Komastuzaki, N., K. Tsukahara, H. Toyoshima, T. Suzuki, N. Shimizu and T. Kimura. 2007. Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *J. Food Engineering* **78**, 226-560.
- Komatsuzaki, N., J. Shima, S. Kawamoto, H. Momose and T. Kimura. 2005. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiology* **22**, 497-504.
- Kang, M. S. 2002. A study on  $\gamma$ -Amino butyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2-16. MS. Thesis. Yonsei University.
- Nicolas, B. and F. Hillel. 2004. GABA in plante: just a metabolite? *Trends in plant science* **9**, 110-115.
- Nicoletta, A., B. Alcide and R. Remo. 1994. Anaerobic accumulation of 4-aminobutyrate in rice seedlings; Cause and significance. *Phytochemistry* **38**, 1147-1150.
- Oh, S. H. and K. B. Park. 2005. Production and characterization of GABA yogurt. *Food sci. Biotechnol.* **14**, 518-522.
- Oh, C. H. and S. H. Oh. 2004. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *J. Med. Food* **7**, 19-23.
- Oh, S. H., Y. J. Moon and C. H. Oh. 2003.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) content of selected uncooked foods. *Nutraceuticals & Food* **8**, 75-78.
- Oh, S. H. 2003. Stimulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid synthesis activity in brown rice by a chitosan/glutamic acid germination solution and calcium/calmodulin. *J. Biochemistry and Molecular Biology* **36**, 319-325.
- Oh, S. H and C. H. Oh. 2003. Brown rice extracts with enhanced levels of GABA stimulate immune cells. *Food sci. Biotechnol.* **12**, 248-252.
- Park, K. B and S. H. Oh. 2006. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3. *Bioresource Technology* **1-8**.
- Park, J. H and H. K. Choi. 2001. Effect of anaerobic condition after green leaves storage on the  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) and quality of green tea. *Kor. J. Tea Soc.* **7**, 163-171.
- Tsukatani, T., T. Higuchi and K. Matsumoto. 2005. Enzyme-based microtiter plate assay for  $\gamma$ -aminobutyric acid: Application to the screening of  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria. *Analytica chimica acta.* **540**,

- 293-297.
25. Yokoyama, S., J. Hiramatsu and K. Hayakawa. 2002. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO\_12005. *J. Bioscience and Bioengineering* **93**, 95-97.
  26. Yoon, J. H., S. B. Kim, H. J. Kim, W. Y. Kim, S. T. Lee, M. Goodfellow and Y. H. Park. 1996. Identification of *Saccharomonospora* strains by the use of genomic DNA fragments rRNA gene probes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **46**, 502-505.
  27. Yoon, J. H., S. T. Lee and Y. H. Park. 1998. Inter- and intraspecific phylogenetic analysis of the genus *Nocardioides* and related taxa based on 16S rDNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 187-194.
  28. Yoon, J. H., S. T. Lee, S. B. Kim, W. Y. Kim, M. Goodfellow and Y. H. Park. 1997. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S ribosomal DNA for rapid identification of *Saccharomonospora* strains. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 111-114.