한국생물공학회지 제15권 제6호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 6, 615-620(2000)

키토산처리에 의한 γ-Aminobutyric acid 고함유 우량 발아현미 생산

†오 석 흥 · [1]최 원 규
우석대학교 생물공학과, [1]대학원 생명공학과
(접수 : 2000. 10. 4., 게재승인 : 2000. 12. 9.)

Production of the Quality Germinated Brown Rices Containing High γ-Aminobutyric Acid by Chitosan Application

Suk-Heung Oh† and Won-Gyu Choi[1]
Department of Biotechnology and [1]Department of Life Science and Technology, Graduate School, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea
(Received : 2000. 10. 4., Accepted : 2000. 12. 9.)

To obtain quality germinated brown rices containing high levels of γ-aminobutyric acid (GABA), chitosan was applied during the brown rice germination. The GABA contents in germinated brown rices (1,035 nmole/g fresh weight) treated by 100 ppm chitosan solution for 72 hr were higher than those of ungerminated brown rices (136 nmole/g fresh weight) and brown rices germinated by water (771 nmole/g fresh weight) or by lactic acid (728 nmole/g fresh weight). In addition to the enhancement of GABA, germination in the chitosan solution increased alanine concentration and decreased glutamic acid, aspartic acid and serine concentrations in the brown rices. The activity of glutamate decarboxylase was also enhanced by the chitosan treatment. Furthermore, germination by chitosan reduced fungal contamination markedly, compared with germination by water or germination by lactic acid. These results suggest that quality germinated brown rices containing high levels of GABA can be obtained by chitosan application.

Key Words : γ-aminobutyric acid, chitosan, brown rice, glutamate decarboxylase

서 론

우리가 주식으로 하는 쌀은 보통 현미와 백미로 나뉜다. 현미는 과피 (종피), 씨껍질, 백분층, 배아 등을 가지고 있어 백미와 비교하여 식이섬유와 비타민, 지질, 인, 철 등을 많이 함유하고 있는 것으로 알려져 있다(1). 최근 들어 현미는 각종 쌀음료에 첨가되기도 하고 싹을 틔워 '발아현미'로 만들어 시판하기도 한다. 현미는 싹이날 때 각종 비타민, 칼슘, 무기질, 아미노산, 효소, 아라비녹실란, 감마아미노낙산 (γ-aminobutyric acid, GABA) 등의 영양소가 증가하는 것으로 알려지고 있다(2,3). 이렇듯 현미의 우수성이 알려지면서 현미를 이용한 음료, 의약품, 차, 기능성 식품의 개발을 너도나도 서두르고 있는 실정이기 때문에 자칫 불량한 제품이 유통될 가능성 또한 높다고 볼 수 있다. 예를들면, 현미는 발아시 적절한 온도와 습도가 필요한데 발아에 적절한 조건은 각종 곰팡이들의 생육에도 적당하기 때문에 발아현미의 부패의 원인을 제공해 주기도 한다.

†Corresponding Author : Department of Biotechnology, Woosuk University, Chonju 565-701, Korea
Tel : +82-63-290-1433, Fax : +82-63-291-9312
E-mail : shoh@core.woosuk.ac.kr

GABA는 비단백태 아미노산으로 동물의 경우 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질 (Inhibitory Neurotransmitter)로서 잘 알려져 있다(4,5). GABA는 많은 생리적인 메카니즘의 조절에 관여하여 동물의 경우 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 항진시키는 것으로 알려져 있다(3). 또한 GABA는 prolactin의 분비, 성장호르몬의 분비 조절에도 관여 하며 혈압강하 및 통증완화 등에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 관심이 높은 물질이다(4).

최근 GABA 생성에 관련된 유전자 도입에 의한 식물체내 GABA 생성조절에 관한 본 연구진의 연구에서 모델 식물인 담배 식물체내 glutamate decarboxylase(GAD)나 calmodulin 유전자의 도입으로 GABA의 함량을 증진 시킬 수 있음이 확인된바 있다(6,7). 그러나 유전자 변형 식품이 많은 논란을 불러일으키고 있는 시점이기 때문에 대안을 모색하던 중 어떤 유용물질과 식물생리현상을 적절히 이용하여 식물체내 GABA 생성체계를 활성화 시키면 GABA의 함량을 획기적으로 증진시킬 수 있음을 발견하였다. 예를들면, 배추 재배시 주기적으로 키토산 희석액을 살포해 주면 배추 식물체내 GABA의 함량을 약 2배 가량 높일 수 있음을 확인하였다(8,9). 키토산은 인체에 무해한 생분해성 천연고분자 물질로서 그 자체가 항균력을 갖고 있으며(10,11) 식

물에 사용할 경우 chitinase의 생성유도작용 등 식물체의 자기보호기능 향상효과가 있는 것으로 알려져 있다(12,13)

따라서 본 연구에서는 우량 발아현미를 생산하고, 기능성을 갖는 GABA 함량이 더욱 증진된 발아현미 생산을 위해 키토산액을 현미 발아에 적용해 항균력을 높임과 동시에 GABA의 함량을 높일 수 있는지에 대하여 조사하였다. 또한 키토산이 식물세포에는 일리시터로 작용하기 때문에 GABA 생성체계도 활성화시킬 수 있을 것으로 판단하여 GABA 생성 효소인 GAD의 활성 변화도 측정하였다.

재료 및 방법

시약 및 기구

γ-aminobutyric acid는 Sigma제(USA)를 사용하였고, amino acid analyzer는 Waters제(USA)를, 동결건조기는 Ilshin사 제품(Korea)을 이용하였다. ^{14}C-isotope의 분석을 위해 Beckman사의 LS 3801 liquid scintillation counter(USA)를 사용하였다. GAD 활성 측정시 사용한 side arm flask는 Kontes사(USA) 제품을 사용하였다. 키토산액은 게 껍질로부터 얻은 키틴으로 조제한 탈아세틸화도 90% 이상인 평균 분자량 2만의 키토산을 5%의 젖산에 녹여 사용하였다. 그 외 시약은 특급제품을 사용하였다.

현미 발아

시판 현미 150 g을 플라스틱 용기에서 적정수분(550 ml)과 25~26 ℃의 온도조건으로 Incubator에서 발아시켰다. 대조구에는 물을, 키토산구에는 5% 키토산액을 500배 물로 희석하여 100 ppm 키토산액으로 만들어 사용하였고, 젖산구는 5% 젖산을 500배 물로 희석하여 100ppm으로 만들어 사용하였다. 발아에 사용한 각 용액들은 12시간 마다 새로이 조제한 각각의 용액으로 교환해 주었다.

GABA 및 아미노산 측정

키토산처리로 인한 발아현미 중의 GABA의 함량 변화를 측정하기 위해 액체질소로 마쇄된 시료 파우더에 메탄올:클로로포름:물(12:5:3)의 혼합액을 가하여 섞어 주었다. GABA를 포함하는 수용액 층은 원심분리(12,000 x g, 15 min, 4 ℃)를 통하여 얻었다. 침전물에 클로로포름:물(3:5)의 혼합액을 가하여 남아있을지도 모르는 GABA를 2차 추출하였고, 1, 2차 원심분리로부터 얻은 상등액을 합하여 냉동건조하였다. 이어 소량의 물로 용해한 후 0.45 ㎛ PVDF 필터 (Millipore)로 여과하여 아미노산자동분석기(AccQ · Tag Amino Acid Analysis System, Waters)로 분석하였고, 표준 GABA(Sigma)의 분석결과와 비교하여 GABA의 함량을 산출하였다(8,9).

GAD 활성 측정

현미 GAD 조 효소액을 얻기위하여 시료를 유발에 옮기고 액체질소를 가하여 마쇄한후 50 mM bis-Tris, pH 7.0, 10% (v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM pyridoxal-5'-phosphate, 1 mM PMSF의 완충액을 가하여 추출한후 원심분리(23,000 x g, 20 min, 4 ℃)하여 얻은 상등액을 조 추출액으로 사용하였다(14). GAD의 활성은 Ling 등과 Snedden 등의 방법(15,16)에 준하여 L-[1-^{14}C]Glu에 의존하는 $^{14}CO_2$ 생성량을 측정

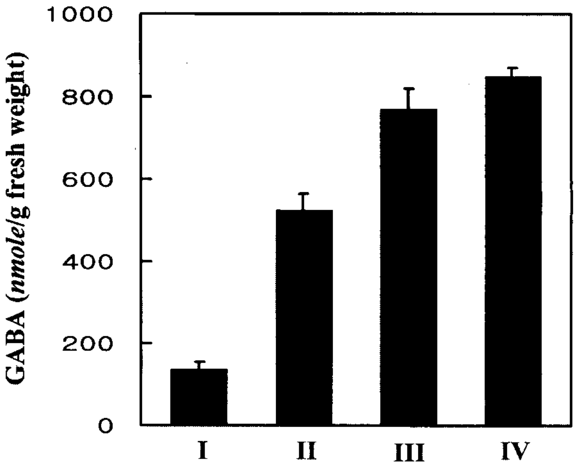

Figure 1. Changes in the levels of GABA during the germination of brown rices.
GABA was extracted from the samples (I, ungerminated brown rices; II, brown rices germinated by water for 48 hr; III, brown rices germinated by water for 72 hr; IV, brown rices germinated by water for 96 hr) and analyzed as described in Materials and Methods. The data represents the mean of three determinations with standard deviation of the mean.

함으로써 실시하였다. 즉, 100 mM bis-Tris, pH 7.0, 0.5 mM pyridoxal-5'-phosphate, 1 mM DTT, 10% (v/v) glycerol, 2.5 mM $CaCl_2$, 200 nM calmodulin(CaM), 10 mM L-glutamate (2.5 μCi $mmol^{-1}$)의 반응액에 조 효소액 일정량을 가한후 30 ℃ 에서 30분간 Shaking Water Bath에서 반응시켰다. 반응은 CO_2 trap을 위해 고안된 flask (Kontes사 제품, USA)를 사용하여 실시하였고 30분 경과후 반응액에 18 N H_2SO_4 0.1 ml을 가하여 반응을 종료시키고 CO_2 trap(0.1 N NaOH 0.4 ml 함유)에 포획된 $^{14}CO_2$의 량을 액체방사능 계측기로 측정하여 효소의 활성을 계산하였다. Calmodulin은 대장균발현 시스템(17)으로부터 얻은 것(7)을 사용하였고, 단백질 함량은 Bradford 법(18)에 의하여 측정하였다.

통계처리

모든 실험결과는 평균±표준편차로 표시하였으며, 각 군간의 통계적 유의성 검정은 GraphPad InStat Software (San Diego, CA, USA)를 이용하여 $p<0.05$ 수준에서 Tukey test를 통하여 검증하였다.

결 과

발아단계별 GABA 함량 변화

현미를 물침종하여 시간대별로 균일한 크기의 발아현미를 선발하였다. 물침종 후 48시간 경과 시점에서는 약 1 mm 크기의 싹이난 현미를, 72시간 경과 시점에는 2.5 mm 크기의 발아현미를, 96시간 경과 시점에는 5 mm 크기의 발아현미를 수확하였다. 현미의 발아단계별 GABA 함량 변화를 조사해본 결과는 Figure 1과 같다. Figure 1에서 보는 바와 같이 물침종 48시간 후 약 1 mm 크기의 발아가 일어났을 때 부터 GABA 함량에 있어 현저한 증진이 일어나 72시간 후 2.5 mm 크기에 이르기까지 급속한 증진이 이루어 졌고 72시간 이후에 변화는 완만하였다.

Table 1. Changes in the levels of GABA and free amino acids in germinated brown rices.

	None$^{1)}$	Water	Chitosan	Lactic acid
Asp	399(±13)$^{2)a}$	38(±2)$^{3)c}$	50(±2)^{b}	40(±2)^{c}
Ser	356(±27)^{a}	86(±8)^{b}	110(±9)^{b}	101(±10)^{b}
Glu	493(±21)^{a}	160(±5)^{c}	176(±3)^{b}	134(±8)^{d}
Gly	29(±3)^{c}	41(±5)^{b}	56(±6)^{a}	45(±5)^{b}
His	112(±8)^{a}	56(±4)^{d}	79(±7)^{c}	96(±6)^{b}
Arg	75(±6)^{b}	75(±6)^{b}	96(±13)^{a}	77(±8)^{b}
Thr	40(±2)^{a}	29(±3)^{b}	42(±5)^{a}	34(±3)^{b}
Ala	167(±15)^{c}	617(±48)^{b}	873(±72)^{a}	601(±59)^{b}
GABA	136(±18)^{c}	771(±50)^{b}	1035(±80)^{a}	728(±58)^{b}
Pro	67(±10)^{b}	57(±11)^{b}	145(±27)^{a}	64(±12)^{b}
Tyr	19(±2)^{ab}	18(±1)^{b}	23(±2)^{a}	23(±2)^{a}
Val	42(±3)^{c}	62(±3)^{b}	87(±7)^{a}	65(±2)^{b}
Met	8(±2)^{b}	11(±2)^{ab}	13(±2)^{a}	12(±2)^{a}
Lys	17(±3)^{c}	26(±3)^{b}	34(±3)^{a}	28(±4)^{ab}
Ile	14(±2)^{c}	19(±1)^{bc}	27(±3)^{a}	21(±2)^{b}
Leu	17(±4)^{c}	36(±4)^{b}	57(±6)^{a}	38(±4)^{b}
Phe	10(±1)^{c}	18(±2)^{b}	29(±5)^{a}	19(±3)^{b}
Total	2001(±140)^{b}	2120(±158)^{b}	2932(±252)^{a}	2126(±190)^{b}

1)Free amino acids containing GABA were extracted from the samples (None, ungerminated brown rices; Water, brown rices germinated with water; Chitosan, brown rices germinated with chitosan; Lactic acid, brown rices germinated with lactic acid) and analyzed as described in Materials and Methods.
2)The values represent the nmole of amino acid per gram fresh weight. The data represents the mean of three determinations with standard deviation of the mean.
3)Different alphabetical superscripts in the same row indicate significant differences ($p<0.05$) among groups by Tukey test.

Table 2. Reduction of fungi contamination in brown rices germinated with chitosan.

Imbibition(hr)	Water	Chitosan	Lactic acid
0	nd	nd	nd
12	nd	nd	nd
24	nd	nd	nd
36	45(±5)$^{1)a}$	9(±2)$^{2)b}$	40(±3)^{a}
48	52(±5)^{a}	3(±1)^{c}	24(±2)^{b}
60	45(±6)^{a}	2^{c}	9(±1)^{b}
72	31(±5)^{a}	0^{c}	3(±1)^{b}
Total	173(±21)^{a}	14(±3)^{c}	76(±7)^{b}

1)The values represent the numbers of contaminated brown rices detected from the germination tray containing 150 gram of brown rices. The contaminated brown rices were removed and the remained rices were imbibed continuously during the given time. The data represents the mean of three determinations with standard deviation of the mean. nd, not detected.
2)Different alphabetical superscripts in the same row indicate significant differences ($p<0.05$) among groups by Tukey test.

키토산처리에 의한 GABA 함량 증진

키토산 처리에 의한 GABA 함량 변화를 조사하기 위해 키토산액(100 ppm)에 현미를 침종하고 72시간 동안 발아시켰다. GABA 및 기타 유리아미노산의 함량변화는 Table 1과 같다. Table 1에서와 같이 발아에 의한 GABA 함량 변화는 매우 뚜렷함을 쉽게 알 수 있었고 키토산 처리구의 GABA 함량은 물침종구에 비하여 더욱 증진됨을 알 수 있었다. 키토산 원액을 녹인 용매인 젖산구는 물침종구와 유사하였다. 또한 GABA 생성효소인 글루탐산 탈탄산효소의 기질이되는 글루탐산(Glu)은 현저하게 감소되는 경향을 보였다. 기타 알라닌(Ala)의 함량은 현저하게 증진되었고 아스파틱산(Asp)과 세린(Ser)의 함량은 감소되었다(Table 1).

키토산처리에 의한 GAD 활성 변화

키토산 처리에 의한 GAD의 활성 변화를 알아보기 위하여 키토산액(100 ppm)에서 72시간 동안 발아시킨 현미와 물침종구 및 발아하지 않은 현미구와 비교 조사하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이 GAD의 활성은 물침종구가 발아하지 않은 현미구에 비하여 약 2배 증진되는 것으로 조사되었으며, 키토산처리구가 약 2.5배 증가하는 경향을 보여 현미 발아에 의한 GABA 함량증진에 GAD가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있었다.

키토산처리에 의한 곰팡이 발생 억제

발아과정에서 발생하는 곰팡이 발생에 대한 키토산처리의 효과를 조사해본 결과 Table 2에서와 같이 키토산처리구에서의 발생빈도는 물침종구나 젖산처리구에 비하여 현저히 낮은 것으로 조사되었다. 또한 젖산침종구의 경우 곰팡이 발생빈도가 물침종구에 비하여 낮은 것으로 나타났으며 이는 곰팡이의 생육이 산 조건하에서 일부 억제된 것으로 생각된다.

고 찰

키토산은 그 자체로서 항균력을 지니고 있는 천연물질이며 식물세포내에 일리시터로 작용하여 키토산에이스, 키틴에이스

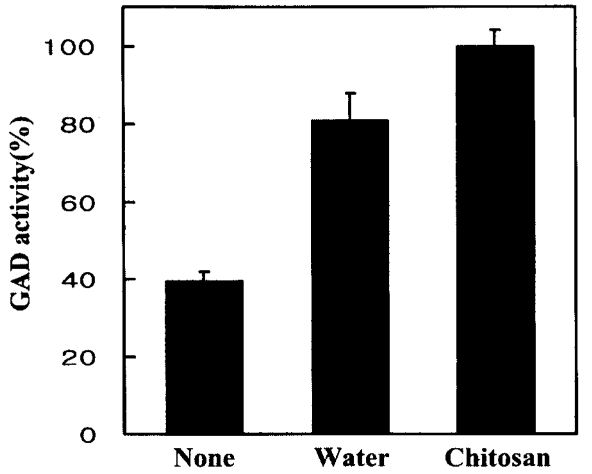

Figure 2. Analysis of GAD activity changes in germinated brown rices.
GAD assays were performed using a radiometric method based upon L-[1-^{14}C]Glu-dependent $^{14}CO_2$ production as described in Materials and Methods. The GAD activities were expressed as percent of control cpm values (no enzyme added). None, ungerminated brown rices; Water, brown rices germinated by water; Chitosan, brown rices germinated by chitosan.

등의 활성을 증진시켜 면역력을 증진 시키는 것으로도 알려져 있다(10-13). 키토산처리가 GABA의 함량을 증진 시킬 수 있음을 보여준 최초의 연구는 본 연구진 의해 수행된 배추실험이다(8,9). 배추 재배시 키토산 희석액을 주기적으로 처리해 주면 육묘단계의 배추와 수확시 배추 중의 GABA 함량이 약 2배 가량 증진됨이 밝혀진 바 있다(8,9). 본 연구에서는 키토산의 처리가 발아현미 중의 GABA의 함량을 현저하게 증진시킴을 알 수 있었고, 발아시 곰팡이의 발생을 억제 하였음을 알 수 있었다. 또한 GABA의 생성증진이 GABA 생성효소인 GAD의 활성 증진에 기인되어 일어나는 것을 알 수 있었다. 그러나 식물의 경우 glutamic acid 등이 putricine 등의 중간 물질을 경유하여 GABA로 전환되는 또 다른 GABA 생성경로를 가지고 있는 것으로도 알려져 있기 때문에(19) 앞으로 이에 대한 조사도 이루어져야 할 것이다. 현미 발아시 발생한 곰팡이 오염은 현미의 유통 및 보관 중에 이미 곰팡이가 오염되어 일어날 수도 있기 때문에 곰팡이 오염원인 및 발아현미에 서식하기 쉬운 곰팡이 종류 등에 대한 조사도 이루어져야 할 것이다. 그러나 본 연구에서는 동일 현미를 사용하였고 현미발아시의 침종조건만을 달리하였기 때문에 키토산액에 현미를 침종하면 곰팡이 오염을 뚜렷이 억제하는 것으로 결론내릴 수 있었다.

식물에서 GABA의 합성은 여러 외부 환경적 요인(예, 기계적인 자극, 온도, 산소결핍, 수분 스트레스)에 의해 유도되는 것으로 보고되고 있어(20,21), 식물체가 환경적 스트레스에 대항하기 위한 수단의 하나로 GABA 생성체계를 가동 시키고 있다고도 생각된다. 이외에도 식물체내에서 GABA는 glutamate에서 succinate에 이르는 GABA shunt를 통해 TCA 회로에서 산화를 위한 탄소골격의 제공 및 식물이 해충의 공격중에 있을 때 합성되어 내충성을 보이게 하는 것 등이 제안 되었다(16,20). 본 연구결과에서도 발아현미 중의 GABA 함량은 키토산처리구 뿐아니라 물침종구에서도 뚜렷하게 증

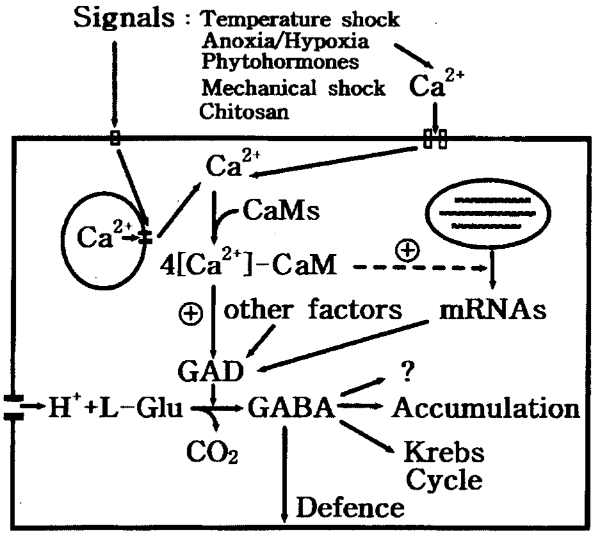

Figure 3. Model of GABA production in relation to chitosan treatment in plants.
Chitosan treatment can aid in the production of GABA through Ca^{2+}-bound-calmodulin mediated signal transduction. Calmodulin binds the incoming Ca^{2+} and activates GAD (16,19,22,23) (solid arrow with +). Ca^{2+}-saturated calmodulins could induce expression of genes including GAD (7,27) (dashed arrow with +). This model was generated with reference to the models of Snedden et al. (16) and Snedden and Fromm (27). CaM, calmodulin; Question mark represents unknown physiological roles of GABA.

진되는 것으로 나타나 발아현미의 성장 및 발달에 GABA가 GABA shunt를 통한 탄소골격의 제공 등의 역할을 하고 있는 것으로 여겨진다.

식물세포내 GABA 생성체계에는 glutamic acid, GAD, 칼슘, 칼모듈린 등의 여러 인자가 관련되어 있는 것으로 확인된 바 있다(7,16,22,23) (Figure 3). 예를들면 식물에서 얻어진 GAD는 동물이나 미생물에서 얻어진 GAD와 달리 카르복시 말단에 칼모듈린과 결합할 수 있는 도메인을 가지고 있어 칼슘과 결합한 칼모듈린이 이 결합 부위에 결합한 후 활성을 보이는 칼슘/칼모듈린-의존형인 것으로 밝혀진 바 있다(22,23). 또한 벼를 산소결핍 상태에서 싹을 틔울 경우 단백질 및 아미노산 대사, GABA 생성대사에 칼슘과 칼모듈린이 관련되어 있음도 확인되었다(24). 따라서 향후 이들 인자에 대한 연구를 계속하면 GABA의 함량이 더욱 증진된 현미를 생산 할 수 있을 것으로 예상된다.

GABA가 고혈압의 예방, 통증의 완화 등의 중요한 역할을 하는 것으로 알려지면서 의약품으로서의 GABA 뿐 아니라 최근에는 기능성 식품소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다. 이와같은 관심은 GABA 고함유 식품과 식물 탐색 및 이들의 기능성 연구에 대한 동기를 부여하였고 이에 대한 몇몇 연구결과도 발표된 바 있다. 예를들면, Chang 등(25)은 제주도 다원에서 생산된 녹차 생엽을 적채 시기별로 혐기적으로 처리하여 GABA 및 기타 주요성분의 함량변화를 측정한 결과 GABA의 함량이 증진되는 것을 확인하였다. Yun 등(26)도 보리 맥아제조시 발아된 보리에 혐기적인 처리를 가하므로써 맥아중의 GABA 함량을 약 2배 증진 시킬 수

있다고 보고 하였다. 또한 키토산처리에 의해 GABA 함량이 증진된 배추첨가 식이는 만성적인 알콜섭취로 인해 증가된 쥐간 중의 triglyceride 및 총지질 함량을 유의적으로 낮추어 줌을 보고하였다(9).

따라서 본 연구를 통해 GABA 함량이 증진된 우량현미 생산을 위한 기초가 마련되었기 때문에 앞으로 GABA, 키토산 등의 유용물질이 보강된 발아현미의 혈압강하효과, 알콜대사 촉진 및 간기능 개선효과, 비만방지효과 등의 임상적인 효과 확인 및 그 작용기전 규명에 대한 연구가 계속 이루어질 전망이다.

요 약

본 연구에서 현미의 발아에 키토산을 활용함으로써 곰팡이 발생을 억제하고 기능성 생리활성 물질인 GABA의 생성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다. 100 ppm 키토산액에서 72시간 발아는 현미파우더 그램당 1,035 nmole의 GABA를 보유하게 되어, 발아되지 않은 현미의 136 nmole, 물침종 발아 현미의 771 nmole, 100 ppm 젖산침종 발아 현미의 728 nmole GABA에 비하여 높은 것으로 조사었다. 발아에 의한 GABA 생성증진과 더불어 알라닌의 생성증진 및 글루탐산, 아스파틱산, 세린의 함량 감소가 뚜렸하였다. 키토산처리에 의한 GABA의 생성 증진은 GABA 생성에 관여하는 글루탐산 탈탄산효소의 활성증진이 기여한 것으로 조사되었다. 키토산액에서의 침종 발아는 물침종 발아나 젖산침종 발아에 비하여 곰팡의 발생빈도를 현저하게 낮추었다. 이들결과를 종합할 때 발아현미 제조시 키토산액을 사용하면 기능성 물질인 GABA 함량이 증진되고 곰팡이등의 잡균의 오염을 줄일 수 있어 양질의 발아현미를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

감 사

본 연구는 2000년도 우석대학교 학술연구비 지원으로 수행되었으며 연구비 지원에 감사드립니다. 또한 본 연구를 수행하는데 필요한 radioactive material의 사용에 도움을 준 전북대학교 유전공학연구소와 키토산액을 제공해준 (주)한국키토산에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cho, S.-H. (1998), Brown Rcie, In *Miraclulous Diets*, S.-C. Baek, Ed., p281-290, Ilyo-Shinmoon Publishing Co.
2. Lee, M.-H. and J.-C. Shin (1996), New Techniques for the Cultivation of Quality Rice, In *Rediscovering Korea Rice and Development Direction*, L.-K. Park and J.-C. Shin Eds.; Proc. Korean Society of Rcie Research Conference 1996, Seoul, pp239-263.
3. Nakagawa, K. and A. Onota (1996), Accumulation of γ-aminobutyric acid(GABA) in the rice germ, *Food Processing* **31**, 43-46.
4. Krogsgaard-Larsen, P. (1989), GABA receptors, In *Receptor Pharmacology and Function,* M. Williams, R. A. Glennon and P.M.W.M. Timmermans Eds., p349-383, Marcel Dekker, Inc., New York.
5. Mody, I., Y. Dekoninck, T. S. Otis and I. Soltesz (1994), Bringing the cleft at GABA synapses in the brain, *Trends Neurosci.* **17**, 517-525.
6. Oh, S.-H., D. M. Roberts and H. Fromm (1999), Strategy for increasing gamma-aminobutyric acid in plants, *FASEB J.* **13**, A83.
7. Oh, S.-H and Y.-S. Cha (2000), Regulation of γ-aminobutyric acid production in tobacco plants by expressing a mutant calmodulin gene, *Agric. Chem. Biotechnol.* **42**, 69-73.
8. Oh, S.-H., K.-W. Seo, D.-S. Choi and K.-S. Han (2000), Application effects of chitosan fertilizer on the growth of cabbage and GABA contents in the cabbage, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **43**, 34-38.
9. Cha, Y.-S. and S.-H. Oh (2000), Investigation of γ-aminobutyric acid in Chinese cabbages and effects of the cabbage diets on lipid metabolism and liver function of rats administered with ethanol, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **29**, 500-505.
10. Kim, S.-K. (1997), What is Chitin · Chitosan? In *Chitin · Chitosan: Basic and Pharmacology*, H.-Y. Lee Ed., p17-20, Ihwa Culture Publishing Co.
11. Lee, S.-J., J.-Y. Uhm and Y.-H. Lee (1996), Effect of chitosan on the growth of *Botryosphaeria dothidea*, the casual fungus of apple white rot, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotechnol.* **24**, 261-267.
12. Hirano, S., T. Yamamoto, M. Hayashi, T. Nishida and H. Inui (1990), Chitinase activity in seeds coated with chitosan derivatives, *Agri. Biol. Chem.* **54**, 2719-2720.
13. Roby, D., A. Gadelle and A. Toppan (1987), Chitin oligosaccharides as elicitors of chitinase activity in melon plants, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 885-892.
14. Oh, S.-H. and S. J. Yun (1999), Effects of various calmodulins on the activation of glutamate decarboxylase and nicotinamide adenine dinucleotide kinase isolated from tobacco plants, *Agric. Chem. Biotechnol,* **42**, 19-24.
15. Ling, V., W. A. Snedden, B. J. Shelp and S. M. Assmann (1994), Analysis of a soluble calmodulin binding protein from fava bean roots: Identification of glutamate decarboxylase as a calmodulin-activated enzyme, *Plant Cell* **6**, 1135-1143.
16. Snedden, W. A., T. Arazi, H. Fromm and B. J. Shelp (1995), Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase, *Plant Physiol.* **108**, 543-549.
17. Roberts, D. M., R. Crea, M. Malecha, G. Alvarado-Urbina, R. H. Chiarello and D. M. Watterson (1985), Chemical synthesis and expression of a calmodulin gene designed for site-directed mutagenesis, *Biochemistry* **24**, 5090-5098.
18. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
19. Marty, D., F. Mesnard, F. Gillet-Manceau, M. A. Fliniaux and J. P. Monti (1997), Changes in primary metabolism in connection with alkaloid biosynthesis in solanaceous cell suspension, *Plant Sci.* **122**, 11-22.
20. Bown, A. W. and B. J. Shelp (1997), The metabolism and functions of γ-aminobutyric acid, *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
21. Crawford, L. A., A. W. Bown, K. E. Breitkreuz and F. C. Guinel (1994), The synthesis of γ-aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH, *Plant Physiol.* **104**, 865-871.
22. Yun, S. J. and S.-H. Oh (1998), Cloning and characterization of a tobacco cDNA encoding calcium/calmodulin-dependent

glutamate decarboxylase, *Mol. Cells* **8**, 125-129.
23. Snedden, W. A., N. Koutsia, G. Baum and H. Fromm (1996), Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain, *J. Biol. Chem.* **271**, 4148-4153.
24. Aurisano, N., A. Bertani and R. Reggiani (1995), Involvement of calcium and calmodulin in protein and amino acids metabolism in rice roots under anoxia, *Plant Cell Physiol.* **36**, 1525-1529.
25. Chang, J. S., B. S. Lee and Y. G. Kim (1992), Changes in γ-aminobutyric acid(GABA) and the main constituents by treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves, *Korean J. Food. Sci. Technol.* **24**, 315-319.
26. Yun, S. J., K. G. Choi and J. K. Kim (1998), Effect of anaerobic treatment on carbohydrate-hydrolytic enzyme activities and free amino acid contents in barly malt, *Korean Soci. Crop Sci.* **43**, 19-22.
27. Snedden, W. A. and H. Fromm (1998), Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment, *Trends Plant Sci.* **3**, 299-304.