

## *Lactobacillus brevis*의 고정화 균체에 의한 $\gamma$ -aminobutyric acid의 연속 생산

류병호\* · 전재호

경성대학교 식품공학과

Received November 18, 2003 / Accepted January 13, 2004

**Continuous Production of  $\gamma$ -aminobutyric Acid by Immobilization of *Lactobacillus brevis*.** Ryu Beung Ho\* and Jeon Jae Ho. *Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University* – The optimal conditions for the continuous production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by immobilization of *Lactobacillus brevis* BH-21 using column type reactor were investigated. The optimal conditions of operation were 2.2 mm diameter bead of 3.0% sodium alginate at 10 mL/h of substrate feeding rate. Continuous production by immobilized cells showed the highest productivity with replacement of fresh medium in every 48h for fourth fermentatoin cycle following the condition of  $\gamma$ -aminobutyric acid productivity. A productivity of  $\gamma$ -aminobutyric acid could be obtained for 25 days by continuous column type reactor under optimal conditions.

**Key words** – *Lactobacillus brevis*,  $\gamma$ -aminobutyric acid, immobilized cells.

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)가 1950년 Florey와 Robert 에 의해 포유류의 뇌 추출액 중에서  $\gamma$ -aminobutyric acid를 발견한 이래  $\gamma$ -aminobutyric acid에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[4,9]. GABA는 분자량이 103.12로 일명 피페리 인산으로 불리우며 비단백태 아미노산의 일종으로 뇌나 척추에 존재하는 신경전달물질로 뇌혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다[3,6]. 특히 GABA의 뇌기능 개선 작용의 메카니즘은 뇌의 흥분성과 억제성 등 2개의 시그널의 상호조절 작용을 하여 정보를 전달하며 신경전달물질 중 아미노산계 신경전달물질의 대표적 물질이다[9]. 또 GABA는 포유류의 소뇌(小腦) 및 해마(海馬) 등에 널리 분포되어 있으며 척추, 무척추동물 중에 GABA를 전달하는 뉴런(neuron)이 존재하는데 GABA의 충분한 공급으로 간질발작을 억제하기도 한다[1,11].

현재까지의 연구에 의하면 GABA는 흥분상태를 억제하는 중요한 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 뇌세포의 GABA 수용체에는 GABAa 및 GABAb 수용체가 있으며 GABAa 수용체는 세포막의 Cl<sup>-</sup> channel을 정상적으로 유지하도록 조절하는데 사람이 불안한 상태에 빠지면 대뇌 변로계를 중심으로 흥분이 증폭될 때 생체 방어반응에 따라 GABA 뉴런에서 GABA를 방출시켜 Cl<sup>-</sup> channel이 열려 Cl<sup>-</sup>이 세포막에 유입된다[23].

그리고 GABA 수용체는 GTP 결합 단백질과 공역으로 denylcyclase가 inositol 1, 4, 5, 3- phosphate의 대사회로를 억제하므로써 Ca<sup>2+</sup> channel의 억제와 K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> channel의 활성화를 나타내어 세포막내의 흥분이 억제되고 불안 상태가 완

화된다[6,7]. 그 외에도 GABA는 성장호르몬의 분비조절[11], 통증완화[16], 정신신경 안전작용[6], 혈압강하작용[9], ACE 저해활성[27]등이 있어 생리학적으로 매우 유익한 물질이다. GABA의 생성기작은 세포내막에서 glutamic acid가 glutamate decarboxylase (GAD)의 효소에 의하여 탈탄산이 이루어지면서 glutamate가 antiporter에 의하여 세포안으로 들어가며 결과적으로 GABA가 세포 밖으로 유출되어 나온다[3]. GABA는 아미노산의 전이반응에 의해 succinic semialdehyde로 전환된 다음 산화에 의하여 succinate가 된다.

이와 같이 GABA의 대사는 에너지를 생산하고 TCA회로에서 산화를 위한 탄소의 공급, 질소 저장화합물 및 아미노산 대사산물 등의 여러 가지 기능이 알려져 있다[24].

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. 그러므로 인위적으로 GABA의 함량을 높이려는 연구가 보고 되고 있다. 그 예로서 다원에서 생산된 생엽을 인위적으로 혐기적 처리를 하면 GABA의 함량이 증가한다는 보고가 있고[5,26], 현미를 발아시킬 때 glutamic acid를 첨가하면 GABA 함량이 2배로 증가한다는 보고도 있으며[18], 보리맥아 제조 시 발아된 보리를 혐기적으로 처리하여 GABA의 함량을 높였다고 하였다[24]. 그러나 식물을 원재료로 한 GABA의 생산에는 한계가 있으므로 대량생산하기 위해서는 미생물을 이용한 연구가 요구된다. 미생물을 이용한 연구로는 유산균을 starter로 하여 만들어진 cheese와 유산균 발효유에서 GABA가 생산된다는 보고가 있으며[20], 그 이후 유산균 중 *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*등에서 많은 양의 GABA를 생산할 수 있었다는 보고가 있다[13,27].

### \*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4712, Fax : +82-51-622-4986

E-mail : bhryu@star.ks.ac.kr

*Lactobacillus* 속은 포자를 형성하지 않고, 혐기성 또는 통성 혐기성으로 증식하는 그람 양성 세균으로, 자연계에 널리 분포되어 있을 뿐 아니라, 사람의 소화기관에서도 생육되고 있으며, 인체에 유익한 유산균으로서 발효 유제품의 starter로 널리 사용되고 있다. 또 *Lactobacillus*는 동물의 소화관내에서 세균의 증식을 억제하고 변비를 예방한다고 알려져 사람이나 동물의 프로바이오틱(probiotic)으로 그 이용가치가 매우 높다[14]. 최근에 유산균의 기능이 확대되면서 식품이나 의약품등에 상업적으로 발효 유제품 및 가공품, 의약품등에 널리 사용되고 있으나 *Lactobacillus*속에 대한 연구는 아직 미비한 실정이다.

한편, 발효기술의 발달로 균체 고정화 기술이 개발되어 bioreactor를 이용한 식품관련 산업인 간장[22], 알코올[12,21], 식초[18] 및 비타민[28] 등의 생산에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 발효기법은 고정화 균체를 장기간 사용할 수 있으며 연속 발효가 가능하고, 제조공정을 단축시키며 생산성을 높일 수 있고 오염을 방지할 수 있는 특징이 있다.

따라서 본 연구는 유산균으로부터 GABA를 대량 생산하기 위하여 젓갈로부터 *Lactobacillus*를 분리, 동정하였고, 이 균체를 고정화하여 column형 반응조로서 GABA의 생산을 시도하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 연구에 사용된 균주는 GABA를 분비하는 *Lactobacillus brevis* BH-21를 사용하였다[12].

### 균체의 고정화

*Lactobacillus brevis* BH-21을 MRS 배지로 5L, 30°C, 24시간 배양시킨 다음 원심분리하고 균체를 멸균 증류수로 2회 씻은 후 각종 담체와 균체를 1:1로 희석한 다음 23 gauze의 주사 바늘로서 이미 만들어 멸균된 0.1M 염화칼슘 용액에 떨어뜨려 생성된 bead를 멸균 증류수로 2회 씻은 다음 0.025M 염화칼슘 용액에 담근 후 4°C에서 24시간 방치한 다음 사용하였다[2].

### 담체내 균체 농도의 측정방법

담체내의 생균수의 측정은 인산완충용액(pH. 7.2)에 용해시킨 후 생균수를 측정하였다.

### GABA 함량의 측정

*Lactobacillus brevis* BH-21를 MRS 배지에서 배양한 후 원심분리(3,000×g, 15 min, 4°C)한 후 상등액을 원심분리(12,000×g, 15 min, 4°C)하였다. 침전물에 멸균증류수를 가하여 남아있을지도 모르는 GABA를 2차 추출하였고, 1,2차 원심분리로부터 얻은 상등액을 합하여 냉동·건조하였다. 이어

소량의 물로 용해한 후 0.45µm PVDF 필터(milipore)로 여과하여 분석에 사용하였다. GABA 및 아미노산의 형광 유도체화를 위해 3.9×150 AccQ·Tag<sup>TM</sup> (Nova-pak<sup>TM</sup> C<sub>18</sub>, Waters) column을 사용하였다. Column으로부터 유도체를 용출시키기 위해서는 AccQ·Tag Eluent A와 69% acetonitrile을 98:2의 비율로 분당 1 mL의 유속으로 흘려주었다. GABA 및 아미노산 함량은 표준 GABA 분석 결과와 비교하여 산출하였다[27].

### 균체의 glutamic acid decarboxylase 활성의 측정

*Lactobacillus brevis* BH-21를 MRS 배지에서 배양한 후 배양액은 30 mL를 10분간 원심분리한 후 그 균체를 20 mM 인산완충용액(pH 7.2) 30 mL로 2회 세정한 다음 최종액량을 10 mL로 하여 초음파 파쇄기로 균체를 분쇄한 후 원심분리하였다. 그 상등액을 5,000 rpm에서 다시 10분간 원심분리하여 측정용 효소액으로 하였다. 기질 용액으로는 20 mM (MSG), 0.4 M NaCl, 0.2M-pyridine HCL (pH 4.5)용액 1.3 ml와 4M 황산암모니움 0.1 ml 및 효소액 0.1 ml를 혼합한 후 37°C에서 60분간 반응시켰다.

5분간 끓인 후 반응을 정지시킨 다음 생성된 GABA를 측정하였다. 상기 조건하에서 1분간에 1 µmol의 GABA를 생성하는 효소량을 1단위(U)로 하였다[18].

### Column형 reactor의 장치

GABA를 연속적으로 생산하기 위하여 아크릴제로 만든 column형(높이 100 cm, 직경 6 cm, 3단식, 용량 0.8 l)의 column 반응조에 고정화된 균체를 총 용량의 50%되게 무균적으로 충전한 다음 peristaltic pump로 사용하여 밑에서 위로 배양액을 주입하면서 연속 발효하였다(Fig. 1).

## 결과 및 고찰

### 고정화 담체의 선택

미생물의 고정화 담체의 선택은 목적하는 발효 생산물의 수율을 높이는 데 큰 영향을 미친다[2]. 균체 고정화 발효 시스템의 고정화에 이용되는 담체로는 agar, sodium alginate, polyacryamide 및 κ-carrageenan등이 사용되고 있으므로 본 실험에서 고정화 담체의 종류에 따른 GABA생산의 활성을 검토하였다. *Lactobacillus brevis* BH-21를 배양한 후 얻은 균체를 각종 담체를 이용하여 고정화시킨 후 담체의 종류와 농도에 따른 GABA의 활성을 측정하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 3.0% sodium alginate에 의한 고정화 균체에 의한 GABA의 생성량은 100%로 가장 높았으며, 6.5% κ-carrageenan은 87.6%, 3.5% polyacrylamide은 66.3% 및 2.5% agar는 72.8%로 다소 낮았다. 담체중 κ-carrageenan은 gel의 상태가 sodium alginate에 비하여 쉽게 붕괴되기 쉽고 고온에서는

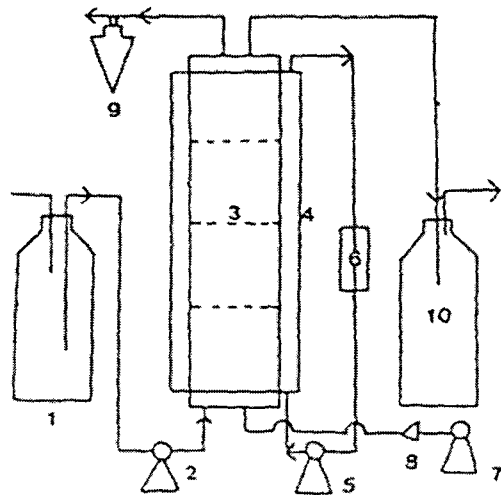


Fig. 1. Schematic diagram of the air bubble column reactor for production of GABA from *Lactobacillus brevis* BH-21. 1. Culture medium stock vessel, 2. Peristaltic pump, 3. Continuous column reactor, 4. Water jacket, 5. Water jacket pump, 6. Warm water pool, 7. Air pump, 8. Air filter, 9. Gas filter, 10. Harvest tank.

Table 1.  $\gamma$ -aminobutyric acid production of immobilized whole cells of *Lactobacillus brevis* BH-21 by various polymer matrices

Marices	Wet cells (g)	Concentration of matrices (%)	GABA production (%)
Agar	1.0	2.5	72.8
Sodium alginate	1.0	3.0	100.0
Polyacrylamide	1.0	3.5	66.3
$\kappa$ -Carrageenan	1.0	6.5	87.6

녹는 현상이 일어나므로 gel의 형성능이 약하였다[2]. Agar와 polyacrylamide의 고정화 gel은 형태와 크기가 고르지 못하여 일정한 활성을 갖지 못하며 장시간 발효 시는 gel이 붕괴되기 쉬운 단점이 있으나 ca-alginate는 산성 또는 알칼리성에서도 안정하고 장기간 고온에서 발효하여도 gel의 붕괴가 쉽게 일어나지 않고 일정한 압력에도 견디므로 본 실험에서는 균체 고정화 담체로 sodium alginate를 사용하기로 결정하였다[2,19,25].

**담체인 sodium alginate의 농도**

고정화 담체로서 균체를 고정화할 때 담체의 농도에 따라 gel의 형성이 달라지며 균체의 고정화 및 발효의 효율에도 영향을 미치게 된다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 sodium alginate를 2.5, 3.0, 3.5, 4.0%의 농도로 구분하여 GABA의 생산능을 조사한 결과 sodium alginate 농도가 3.0%로 했을 때 균체의 증식이 제일 좋았으며, GABA의 생성도 낮았으므로 본 실험에서는 3.0%의 sodium alginate로 균체를 고정화하여

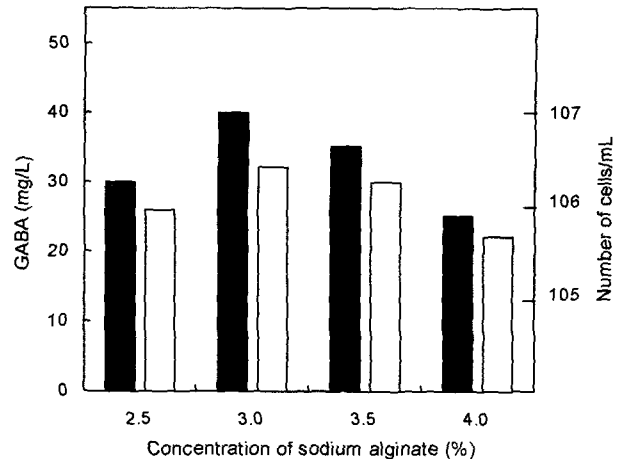


Fig. 2. Effects of various sodium alginate concentrations on  $\gamma$ -aminobutyric acid production in culture broth of *Lactobacillus brevis* BH-21.

■: GABA production, □: Viable cell per mL.

사용하였다. 이와 같이 목적하는 발효 생성물에 따라 다르지만 균체를 고정화할 때 담체의 농도가 발효 시 크게 작용하였다. Osaki [22]등은 간장의 균체고정화에 의한 장기간 발효 시에 3.0% sodium alginate로서 *Zygosaccharomyces rouxii*를 고정화하였고, Yongsmith와 Chutima [28]은 세균을 3.0% sodium alginate로 고정화하여 비타민 B<sub>12</sub>를 생산하였다고 보고하고 있다.

***Lactobacillus brevis* BH-21 균체의 유리 및 고정화에 의한 GABA생산의 활성비교**

*Lactobacillus brevis* BH-21 유리 균체와 고정화 담체에 의한 GABA 생산 등을 비교하기 위하여 각각의 균주를 일정조건으로 배양하면서 발효는 24시간 마다 새로 만든 배양액을 공급해주면서 조사하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 유리 균체에 의한 발효와 고정화 균체에 의한 발효를 비교 시 1차 발효시기인 24시간까지는 GABA생산능은 유리 균체를 이용하여 발효할 때 약간 높았다. 그러나 2차 발효에서는 고정화 균체의 활성은 초기 활성을 유지한 반면 유리 균체의 경우는 GABA의 생산능은 많이 떨어졌으며 3차 및 4차 발효 시 고정화 균체에 의한 GABA의 생산은 거의 변화가 없었으나 유리 균체에 의한 GABA의 생산능은 급격히 저하하였다. 이는 유리 균체를 4회 계속 사용함으로써 균주의 활성이 떨어지기 때문으로 사료된다. 따라서 고정화 균체에 의한 GABA의 생산은 4차 발효까지도 그대로 유지된 것으로 바아 고정화 균체에 의한 연속적 발효가 효율적이라고 생각된다. 그러나 4차 발효 이후 장기간의 발효 시 고정화 균체의 GABA 생산 활성이 조금씩 떨어지는 것은 고정화 담체인 sodium alginate에 균체 및 기질이 붙어 층을 이루어 생기는 발효억제 현상으로 사료되며[11] 연속 발효 시 이와 같은 단점은 고정화 균체의 세정작업으로 해결될 수 있을 것으로 생각된다.

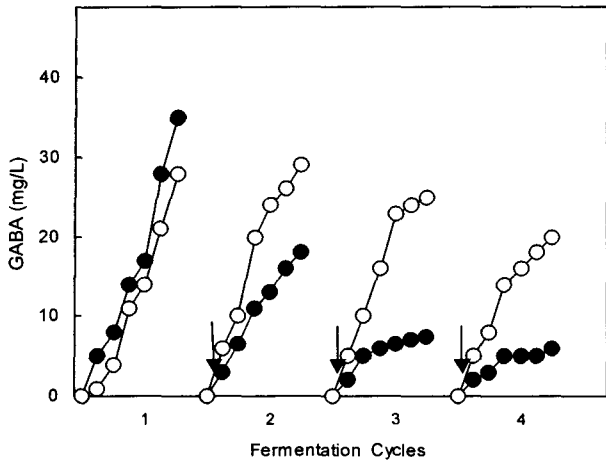


Fig. 3. Repeat fermentation of  $\gamma$ -aminobutyric acid production by free and immobilized cells of *Lactobacillus brevis* BH-21 in column reactor.

One fermentation cycle took on every 24hrs.  
 ●—●; Free cells, ○—○; Immobilized cells, ↓; Exchange of fresh production medium.

**기질의 주입속도에 따른 GABA의 생성**

3.0% Sodium alginate로 *Lactobacillus brevis* BH-21를 고정시켜 적정 기질 공급량을 산출하였다. Column형 reactor에서 기질의 주입 속도를 시간당 5, 10, 15 및 20 ml씩 각각 주입하면서 GABA의 생산능과 유출액의 균수를 측정하고 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 이러한 조건하에서 시간당 10 ml의 유속으로 기질을 주입했을 때 GABA의 생산능은 가장 높았고 시간당 5 ml에서는 약간 낮았다. 그러나 기질의 주입 유량이 시간당 15 ml에서는 GABA 생산능이 낮았고 시간당 20 ml에서는 제일 낮았다. 유출되는 생균수는 기질의 주입 유량에는 크게 영향을 받지 않으나 시간당 20 ml에서는 약간 감

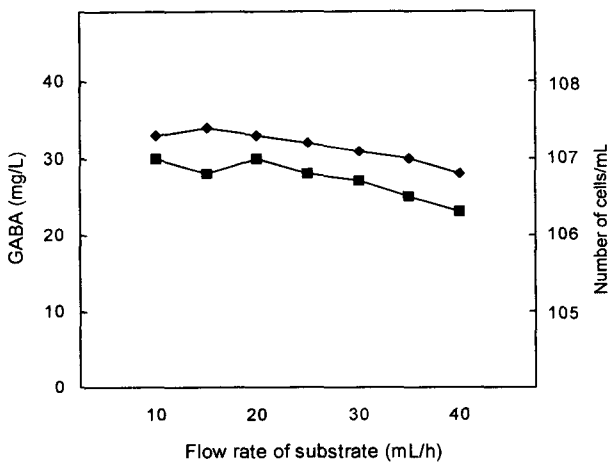


Fig. 4. Effects of flow rate of substrate on the production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by Ca-alginate immobilized cells of *Lactobacillus brevis* BH-21 in continuous culture broth.

■—■: GABA (mg/L), ◆—◆: Viable cell per mL.

소하였다.

**Column형 reactor에 의한 연속발효**

GABA를 생산하기 위하여 회분법에서 산출된 적정 발효 조건 및 발효속도를 기초로 하여 column형 reactor를 사용하여 연속발효를 실시하였다. *Lactobacillus brevis* BH-21을 3.0% sodium alginate로 고정화하여 column형 reactor에 고정화 균체를 250 g씩 충전한 후 하부에서 peristaltic pump로 기질을 시간당 10 ml씩, 체류시간은 10시간으로 하여 공급하면서 30일간 발효하였을 때 발효액 중의 GABA생산, pH의 변화 및 생균수를 측정하였다. Fig. 5에서 나타낸 바와 같이 발효를 시작하여 2~3일 경과 시 GABA의 생산능은 약 2.6 mg/100 mL로 생산되었으나, 5일째에는 2.8 mg/100 mL였으며 10일째에서는 GABA의 생산능이 3.0 mg/100 mL로 최고치에 달하였고, 발효 20일까지 GABA생산이 유지되다가 25일 경과 시에는 2.5 mg/100 mL로 떨어지기 시작하여 30일 경과 시에는 2.2 mg/100 mL의 GABA생성능을 나타내었다. 발효 시 gel의 생균수는 발효경과 5일부터는  $1.4 \times 10^7$  cells/mL 정도로 발효경과에 따라 약간 증가하였고, 25일까지 일정한 생균수를 유지하다가 30일 경과 시에는  $1.0 \times 10^7$  cells/100mL으로 약간 감소하였다. 그리고 유출액의 생균수는  $4.2 \times 10^6$  cells/mL에서  $1.0 \times 10^6$  cells/mL 정도로 발효경과 5일부터 발효 30일까지 일정량의 생균수를 유지하였으며 발효 시 pH는 4.0~5.0 정도로 큰 변화를 찾아볼 수 없었다.

GABA의 생산은 발효를 시작하여 20일까지는 일정 수준을 유지하다가 25일 이후부터 생산이 떨어지는 것은 column형 반응조에서 장기간 발효과정 중 gel내의 균체가 감소되고 장기간 공기의 공급으로 인하여 고정화균체가 붕괴되기 때문이다. 균체를 담체에 고정화하여 장기간 발효가 가능한 균주

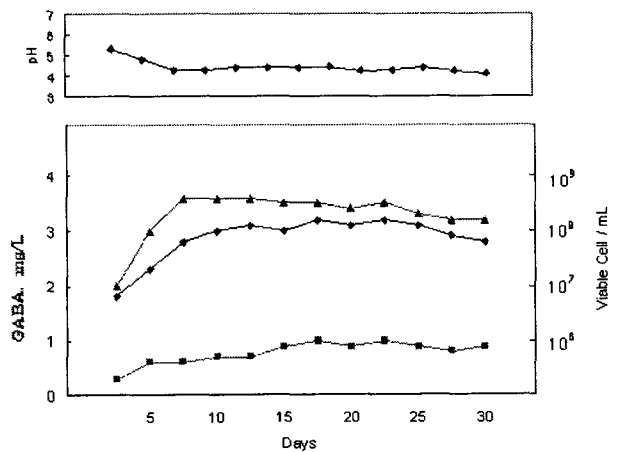


Fig. 5. Continuous fermentation for production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by immobilized cells of *Lactobacillus brevis* BH-21 in column type reactor.

▲—▲: GABA production (mg/L), ◆—◆: gel cells/mL, ■—■: Number of effluent cells/mL.

로는 *Zygosaccharomyces*가 30일[11,22] 이상 *Streptomyces aureofaciens*는 36일까지도 발효에 의하여 물질을 생산할 수 있다고 보고되고 있다[28]. 이와 같이 *Lactobacillus brevis* BH-21도 장기간 발효가 가능하여 GABA를 생산할 수 있었다.

***Lactobacillus brevis* BH-21의 균체 고정화에 대한 현미경 관찰**

*Lactobacillus brevis* BH-21을 액체배지에서 배양한 후 균체를 원심·분리한 다음 멸균 증류수로 2회 세정한 균체를 3.0% sodium alginate로 고정화시킨 다음 전자현미경(manification, ×10,000)으로 관찰하였다. Fig. 6. A에서 보는바와 같이 *Lactobacillus brevis* BH-21를 고정화시킨 후 현미경으로 관

찰한 결과 고정화 담체인 sodium alginate에 잘 결합되어 있는 것을 볼 수 있으며, Fig. 6. B는 sodium alginate에 고정화시킨 균체 bead 1개의 형태를 명확하게 관찰할 수 있었으며, 그리고 Fig. 6. C는 고정화 담체를 cross section 한 후 모양을 나타내었다.

그리고 *Lactobacillus brevis* BH-21 균체를 sodium alginate로 고정화시킨 다음 column reactor에서 24시간, 15일 및 30일간 발효시킨 후 현미경으로 관찰하였다. Column reactor에서 발효시작 24시간 후에는 *Lactobacillus brevis* BH-21는 담체에 붙어있는 균체의 상태가 매우 치밀하였고(Fig. 7, A), 발

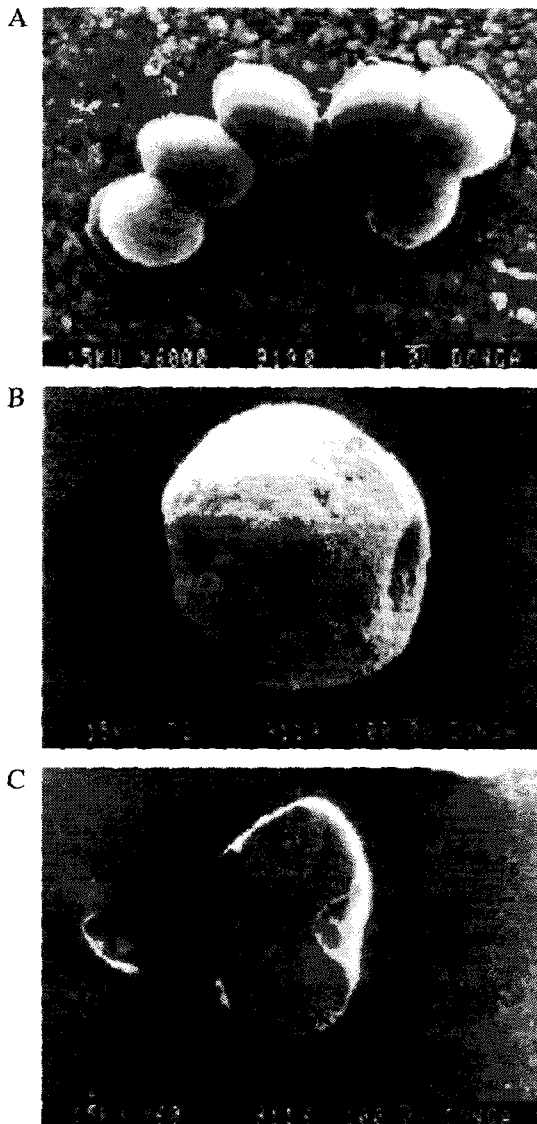


Fig. 6. SEM of an immobilized cells form spheres of outer surface.  
(A) Spheres attached on matrix, (B) Close up of bead, (C) Closed linked bead.

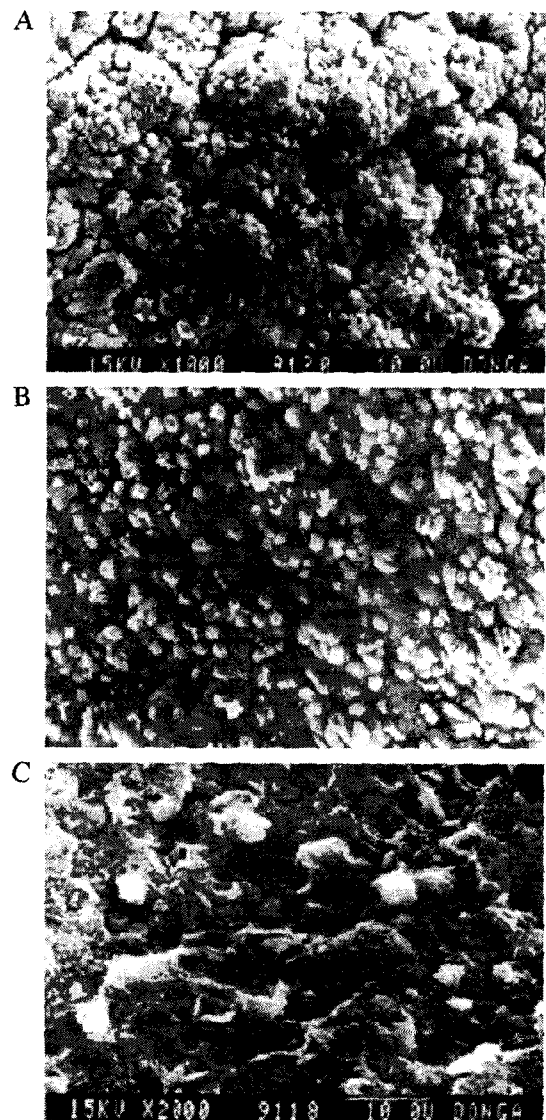


Fig. 7. Scanning electron micrographs of immobilized cell spheres in column reactor.  
A: Immobilized cells spheres before fermentation.  
B: Immobilized cells spheres after 15 days fermentation.  
C: Immobilized cells spheres after 30 days fermentation.

효 15일 경과 후에는 담체에 붙어있는 균체가 발효 24시간 보다는 약간 탈락되는 현상을 나타내고 있으며(Fig. 7, B), 그리고 30일 발효 후에는 *Lactobacillus brevis* BH-21 균체가 상당량이 탈락해 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 7, C).

## 요 약

*Lactobacillus brevis* BH-21의 균체를 고정화하여 column형 reactor를 이용하여  $\gamma$ -aminobutyric acid의 연속적 생산을 검토하였다. *Lactobacillus brevis* BH-21에 의한  $\gamma$ -aminobutyric acid 생산조건은 고정화 담체로는 3.0% sodium alginate가 좋았고 직경 2.2 mm의 bead를 사용하여 기질의 주입속도는 10 mL/h이 최적 조건이었다. *Lactobacillus brevis* BH-21의 고정화 균체와 유리 균체를 사용하여  $\gamma$ -aminobutyric acid의 생산을 최적 조건하에서 1, 2, 3, 및 4차 발효 동안 48시간마다 신선한 기질을 주입하면서 비교·조사한 결과 고정화 균체를 사용 시에 생산량이 더 많았다. Column형 reactor에 의한 연속 발효 시 발효 25일까지 생산이 우수하였고 발효 30일까지는  $\gamma$ -aminobutyric acid를 생산할 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. J. R. Almond, L. E. Westrum and M. A. Henry. 1996. Post-embedding immunogold labeling of Gamma-aminobutyric acid in lamina II of the spinal trigeminal subnucleus pars caudalis, I. A qualitative study. *Synapse* **24**, 39-47.
2. Birnbaum, S., R. Pendleton. P. O. Larsson. and K. Mosbach. 1981. Covalent stabilization of alginate gel for the entrapment of whole cells. *Biotechnol. lett.* **3**, 393-400.
3. Bown, A. W. and B. J. Shelp. 1997. The metabolism and function of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
4. Bown, A. W. and B. J. Shelp. 1997. The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* **115**, 1-5.
5. Chang, J. S., B. S. Lee and Y. C. Kim. 1992. Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid and the main constituents by a treating conditions and of anaerobically treated green tea Leaves. *Korean, J. Food technol.* **24**(4), 315-319.
6. Difiglia, M. 1990. Aronin, Synaptic interactions between GABAergic neurons and trigemiothalamic cells in the rat trigeminal nucleus caudalis. *Synapse* **6**, 358-363.
7. Fields, H.L. and A. I. Basaum. 1994. Central nervous system mechanisms of pain modulation, pp. 243-257 In P.D. and Wall, R. Melzak, (Eds.), *Textbook of Pain*, 3rd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
8. Hamada, T., T. Ishiyama. and H. Motai. 1989. Continuous fermentation of soy sauce by immobilized cells of *Zygosaccharomyces rouxii* in an air lift reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 346-352.
9. Hirusi, K. 2000. Recent studies on Biological function of GABA, On improvements of hypertension and brain function, *Food & Develop.*, **36**(6), 4-6.
10. Hayakawa, K., Y. Ueno, S. Kawamura, R. Tanisucchi and K. Oda 1997. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria, *J. Bioeng. & Biotechnol. Japan.* **75**(4), 239-244.
11. Horisu, M., Y. Maseda and K. Kawai. 1990. A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. *Agric. Biol. chem.* **54**, 295-324.
12. Jeun, J. H. 2003. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by immobilization of lactic acid bacteria isolated from salt fermented anchovy, pp. 1-81, Thesis of Ph. D., *Kyungshung University.*
13. Kitaka, A., T. Dosya and O. Dakenori. 2000. Development of a super GABA by lactic acid fermentation. *Food & Develop.* **36**(6), 12-14.
14. Lilly, D. M. and R. H. Stillwel. 1965. Probiots, Growth promoting factors produced by microorganism. *Science* **147**, 747-748.
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. Melzack, R. and P. D. Wall. 1965. Pain mechanisms: a new theory. *Science* **50**, 971-979.
17. Mori, A. 1985. Production of vinegar by immobilized cells. *Process Biochem.* **20**, 67.
18. Nakagawa, K. and A. Onoto. 1996. Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ. *Food Processing* **31**(9), 43-46.
19. Nam, K. D., M. H. Chio, W. S. Kim, H. S. Kim and B. H. Ryu. 1988. Simultaneous saccharification and alcohol fermentation of unheated starch by free immobilized and coimmobilized systems of glycoamylase and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Technol. (Japan)* **66**, 427-432.
20. Nomura, M., H. Kimofu, Y. Someya, S. Furukawa and I. Suzaki. 1998. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening, *J. Dairy Sci.* **81**, 1486-1491.
21. Onaka, K., Y. Okamoto, T. Inoue and S. Kubo. 1985. Beer brewing with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* **50**, 1289-1224.
22. Osaki, K., Y. Okamoto, T. Akao, S. Nagata. and H. Takamatsu. 1985. Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells. *J. Food Sci.* **50**, 1289-1292.
23. Phend, K. D., R. J. Weinberg and A. Rustioni. 1992. Techniques to optimize postembedding single and double staining for amino acid neurotransmitters, *J. Histochem.* **40**, 1011-1020.
24. Satya Narayan, V. and P. M. Nair. 1990. Metabolism enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants, *Phytochemistry* **29**, 367-375.
25. Tanaka, H., M. Matsumura and I. A. Veliky. 1984. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate beads. *Biotechnol. Boeng.* **26**, 53-58.
26. Toshinobu, M. and T. Tsushida. 1972. Conversion of Glutamic acid to  $\gamma$ -aminobutyric acid in tea leaves under anaerobic conditions, *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2865.
27. Yokoyama, S., J. I. Hiramatsu and K. Hayakawa. 2002.

Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *J. Biosci. Biotech.*, **93**, (1), 95-97.

28. Yongsmith, B. and K. Chutima. 1983. Production of vitamin B<sub>12</sub> by living bacterial cells immobilized in calcium alginate gels. *J. Ferment. Technol.* **64**, 593-602.