

GABA 함량이 강화된 발효다시마 추출액 제조

허상선[†]

[†]충부대학교 바이오식품학전공, 교수
(2022년 7월 30일 접수: 2022년 8월 10일 수정: 2022년 8월 13일 채택)

Production of Fermented *Saccharina Japonica* Extract with Enhanced GABA Content

Sun-Sun Hur[†]

[†]Division of Health and Welfare, Depart of BioFood Science, Joongbu University,
Geumsan, Chungnam 32713, Korea
(Received July 30, 2022; Revised August 10, 2022; Accepted August 13, 2022)

요약 : 본 연구의 목적은 효소 가수분해 및 유산균 혼합발효기술을 이용하여 GABA 함량이 강화된 발효 다시마 추출물을 생산함에 있다. TLC 분석방법을 통해 GABA 생성능력이 우수한 균주 *L. plantarum* KCTC 21004, *L. acidophilus* KCTC 3164, *L. sakei* subsp. *sakei* KCTC 3598를 선정하였다. 선정된 균주를 이용한 유산균 발효의 특성은 배양 시간이 증가 할수록 적정 산도는 증가하였고 pH는 감소하는 경향을 나타내었다. GABA 생성능력이 우수한 3종의 균주 중 *L. plantarum* KCTC 21004이 GABA 함량이 136.4 mg/100g으로 우수하였다. 이러한 연구 결과는 유산균을 이용한 GABA 생산과정에 있어서 기초적인 자료로 제공될 것으로 판단된다.

주제어 : 효소가수분해, 유산균, GABA, 다시마 발효추출물, TLC

Abstract : The purpose of this study was to enhance the gamma-aminobutyric acid (GABA) production of sea tangle extracts, through techniques based on enzymatic hydrolysis and the addition of mixed fermentative lactic acid bacteria. GABA production in the strains was qualitatively confirmed via detection of colored spots using thin layer chromatography. *L. plantarum* KCTC 21004, *L. acidophilus* KCTC 3164 and *L. sakei* subsp. *sakei* KCTC 3598 were selected as the suitable strains for GABA production. As for the characteristics of fermentation of lactic acid bacteria using the selected strain, as the fermentation time increased, the titrated acidity increased and the pH showed a tendency to decrease. Among the three strains with excellent GABA production ability, *L. plantarum* KCTC 21004 showed excellent GABA production of 136.4

[†]Corresponding author
(E-mail: sshur@joongbu.ac.kr)

mg/100g. These research results are expected to be provided a basis for the utilization of lactic acid bacteria in GABA production using a sea tangle extract.

Keywords : Enzymatic hydrolysis, Lactic acid bacteria, GABA, Fermented sea tangle extract, Thin layer chromatography

1. 서론

해조류 중 다시마(*Saccharina Japonica*)는 다시마목 다시마과에 속하는 식용 갈조류로서 수용성 식이섬유 32.8%와 비수용성 식이섬유가 17.9%로 총 식이섬유 함량은 50% 이상으로 해조류와 식물 중에서 가장 높은 식이섬유 함량을 가지고 있으며 다양한 무기질이 함유되어 있어 건강에 좋은 공급원으로 알려져 있으며[1], 다양한 생리활성을 가진 물질들이 알려지면서 가장 친화적이지자 생산력이 우수한 바이오매스로 알려져 있다[2,3]. 특히, 다시마에 함유된 비단백질 아미노산인 γ -aminobutyric acid(GABA)는 주요 신경억제전달물질로 작용하여 신경안정, 혈압저하, 비만 예방, 이노 효과 및 뇌기능 촉진 등의 생리적 특성을 갖는 것으로 알려져 있다[4]. 이러한 GABA는 glutamate decarboxylase(GAD)의 탈 탄산 작용에 의해 전구물질인 glutamic acid로부터 전환되는데 다양한 식품에 자연적으로 존재하는 GABA의 함량은 미량으로, 국내의 경우 식품첨가물이 아닌 의약품 아미노산으로 분류가 되어 있어 L-Glutamic acid 유래 발효 GABA 함유 분말을 제외하면 인위적으로 첨가를 할 수 없기에 GABA 함유량을 높이기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다[5,6]. Probiotics로서 이용되고 있는 젖산균은 김치, 치즈 등 전통적인 발효식품의 제조에서 스타터로 이용되어 발효식품의 저장성과 기능성뿐만 아니라 식품의 풍미를 향상시키는데 이용되고 있다. 특히, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* 등과 같은 젖산균은 기능성물질인 γ -aminobutyric acid(GABA)를 생합성하는 특징을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다[7,8]. 한편 다시마는 대표적인 갈조류로서 알긴산과 후코이단 같은 다당류로 구성되어 있는데 알긴산 같은 해조 다당류를 기능성 올리고당으로 전환함으로써 Bifidobacteria의 활성촉진, 항콜레스테롤 같은

효과를 얻을 수 있는 것으로 보고되고 있다[9]. 하지만 알긴산의 경우 농도가 증가할수록 높은 점성을 갖게 되기 때문에 해조류 특유의 식이섬유를 연화시키고 점질성 다당류로 분해시키기 위해서는 무엇보다도 먼저 저분자화가 선행되어야 하며 이를 위해서 알긴산 분해효소를 분비하는 미생물을 탐색하거나 효소를 이용하여 분해하는 방법 등이 연구되었다[10,11]. 오래전부터 섭취되어 온 다시마와 유산균은 식용으로 안전성이 검증되었고 다시마의 올리고당은 유산균을 선택적으로 증식시켜 다양한 생리활성물질을 생산하는 것으로 보고되었다[12]. 하지만 다시마 올리고당의 prebiotics 효능과 유산균의 probiotics 효능을 혼합한 synbiotics을 통한 GABA 함량 강화 연구는 아직 알려져 있지 않고 있다.

국내·외적으로 천연물 유래의 GABA함유 제품의 경우 MSG 유래의 제품이며 GABA 함량이 매우 낮은 단점이 있다. 이에 본 연구에서는 인체에 무해한 천연 glutamic acid가 함유되어 있는 다시마를 이용하여 일차적으로 다시마를 가수분해하여 얻어진 추출물에 복합유산균을 활용한 혼합 발효기술을 최적화함으로써 천연물 유래의 GABA 함량이 강화된 다시마 발효추출물을 생산하여 해조류 유래의 생리 기능성이 강화된 고부가가치의 식품 소재 및 이를 이용한 제품을 생산하는 기초자료를 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1. 공시재료

다시마는 전남 완도금일수협(Wandosuhyp, Jeonnam, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 다시마 추출물의 제조는 수세, 탈염 및 건조공정을 거쳤다. 건조된 다시마는 분쇄공정을 거친 후 100 mesh의 망을 통과한 미세 분말을 사용하였다. 적당한 크기로 분쇄된 다시마 분말의 중량대비 15배의 물 (w/v)을 첨가하고, 70°C에서 30

min 열수 추출한 다음 20 mesh 망으로 여과하였다. 여과된 추출물은 120~125°C에서 15~30 min 고온 가압 멸균하였다.

2.2. 다시마 추출물의 효소가수분해

다시마 추출물의 가수분해를 위해 사용된 효소는 3종의 상업용 효소인 Viscozyme®L, Saczyme®, Celluclast®1.5L이며 Novo사 (Novozyme Nordisk, Bagsvaerd, Denmark)로부터 구입하였다. 다시마 추출물 30 mL을 삼각플라스크에 넣고 0.1 NaOH으로 pH 3~7까지 조정 후, 3종의 효소를 기질 무게의 1~10% (w/v)로 주입한 후 반응온도 30~70°C, 24 hr, 100 rpm 조건으로 배양하였다. 배양 이후 100°C에서 10분간 처리하여 효소 반응을 멈추었다. 각 시료는 실험에 사용하기 전까지 -80°C에서 보존하여 사용하였다. 가수분해된 다시마 추출물의 환원당 분석을 통해 가수분해 활성을 분석하였다. 본 실험에 사용된 3종의 효소 특징은 Table 1과 같다.

2.3. 사용균주 및 배양

연구에 사용한 유산균은 한국생명공학연구원 생물자원센터(Biological resource center)에서 분양받은 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237, *L. plantarum* KCTC 21004, *L. plantarum* subsp. *plantarum* KCTC 3103, *L. brevis* KCTC 3102, *L. acidophilus* KCTC 3164, *L. sakei* subsp. *sakei* KCTC 3598, *Lactococcus lacticus* subsp. *lacticus* KCTC 2013를 구입 사용하였다. 유산균의 배양은 MRS broth(Difco Co., MD, USA)을 사용하여 37°C에서 배양하였다.

2.4. 다시마 추출액의 유산균 발효

효소에 의해 가수분해된 추출액의 유산균 발효

실험을 위해서 각 추출액에 MRS 배지에서 하룻밤 배양한 유산균을 2%(v/w) 접종한 후 37°C에서 일정 기간 배양하여 발효하였다. 발효기간중 pH 측정은 pH meter(DocuMeter, Sartorius, USA)를 사용하여 실온에서 측정하였으며, 적정산도는 10배로 희석한 시료 10 mL를 pH 8.2가 될 때까지 0.1N-NaOH 표준용액으로 중화 적정 후 lactic acid로 환산하여 나타내었다. 유산균수는 표준한천배양법으로 측정하였으며, 유산균의 생균수를 측정하기 위하여 시료를 0.85% NaCl 용액을 이용하여 10⁹까지 단계적으로 희석하여 MRS agar 배지에 0.1 mL씩 분주 및 도말한 후 37°C에서 24~36시간 배양하였다. 배양 후 colony 수가 30~300개인 평판을 택하여 colony 수를 측정하고 희석배수를 곱하여 단위 부피당 생균수(CFU/mL)를 산출하였다.

2.5. 환원당 분석

환원당 분석은 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법을 이용하였다[13]. 시료 0.5 mL에 DNS 시약 0.5 mL을 혼합하여 100°C의 water bath(BS-21, Jeio tech., Korea)에서 5분간 반응시킨 후 냉각시켜 증류수 4 mL을 첨가한 다음, UV-spectrophotometer를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.6. γ -aminobutric acid(GABA) 함량 측정

발효다시마 추출액의 GABA 생성 여부를 확인하기 위하여 알루미늄 TLC plate를 사용하였다. 발효다시마 추출액은 5 μ L씩 분주하여 전개용매로는 n-Butanol:acetic acid:D.W = 3:2:1하여 전개시켰다. 발색용매는 0.4% ninhydrin-acetone 용액을 사용하였다. 전개시킨 TLC는 발색시킨 후 110°C 오븐에서 10분간 말려 시각화하였다.

GABA 분석을 위해 ACCQ-Tag법[14]을 사용

Table 1. The characteristics of enzyme used hydrolysis of *Saccharina Japonica* extracts

	Viscozyme® L	Saczyme®	Celluclast®1.5L
Origin	<i>Aspergillus aculeatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Trichoderma reesei</i>
Optimal pH	3.3~3.5	3.5~4.5	4.5~6.0
Optimal temperature (°C)	25~55	60~70	50~60
Characteristics	Complex carbohydrases	Glucoamylyase	Cellulase
Dosage(%)	8	10	11

하였으며 아미노산 유도체화를 위해 Waters ACCQ-Tag Fluor Reagent Kit를 사용하여 역상 컬럼(Waters, ACCQ-TAG ULTRA C18 1.7 μm , 2.1×1000 mm, USA)을 장착한 액체크로마토그래피 시스템(UltiMate 3000RS; UltiMate, USA)을 이용하여 분석하여 정량하였다. 분석 조건은 Table 2, gradient 조건은 Table 3과 같다.

2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 결과 통계처리는 SPSS10.0 (Evanston, IL, USA) software를 사용하여 일원 배치분산분석(one-way ANOVA)으로 실시하였다. 분석결과 검증을 위하여 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 다양한 효소처리에 의한 다시마 추출물의 가수분해

다시마 추출물의 GABA 강화를 증진시키기 위

한 전처리 공정으로 3종의 상업용 효소를 이용하여 환원당을 분석하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 무처리군인 다시마 추출물의 환원당 함량은 0.191 ± 0.005 mg/mL으로 나타났으며 Viscozyme® L이 0.500 ± 0.056 mg/mL로 가장 높은 함량을 나타내었다. Celluclast®1.5 L과 Sacczyme® 반응의 경우 환원당의 증가 효과가 나타나지 않았다. 한편 Viscozyme® L 효소 처리에 의한 가수분해 전후의 단백질량을 분석한 결과 가수분해전의 경우 다시마 추출물의 단백질 함량이 평균 16.28 ± 0.17 mg/mL이었으나 효소 처리 후의 단백질량은 평균 2.72 ± 0.18 mg/mL으로 약 84.38 \pm 1.39%의 단백질이 가수분해 되었음을 알 수 있었다. 이는 박 등의 연구에서 들깨에서 단백질 가수분해물을 얻기 위해 flavourzyme을 이용하여 가수분해한 결과 가수분해율이 70.50%로 가장 높았다고 보고 하였는데 본 연구 결과와 비슷한 경향을 보였다[15]. 따라서 본 실험에서는 가장 높은 가수분해효과를 나타내는 Viscozyme® L로 처리한 다시마 추출물을 이용하여 유산균 발효에 적용하였다.

Table 2. Operating conditions for the analysis of GABA content by HPLC

Apparatus	Conditions
HPLC system	Ultimate 3000RS
Column	Waters, ACCQ-TAG ULTRA C18 1.7 μm , 2.1×1000 mm
Mobile phase	A = 10% Waters ACCQ-tag Eluent A Concentrate B = 100% Waters ACCQ-tag Eluent B Concentrate
Flow rate	0.7 mL/min
Detector	UV 260 nm

Table 3. Elution profile for HPLC analysis of GABA

Time(min)	Flow	%A	%B
0.54		99.9	0.1
5.74		90.9	9.1
7.74		78.8	21.2
9.04		40.4	59.6
9.40	0.7 mL/min	10	90
10		10	90
10.2		99.9	0.1
13		99.9	0.1

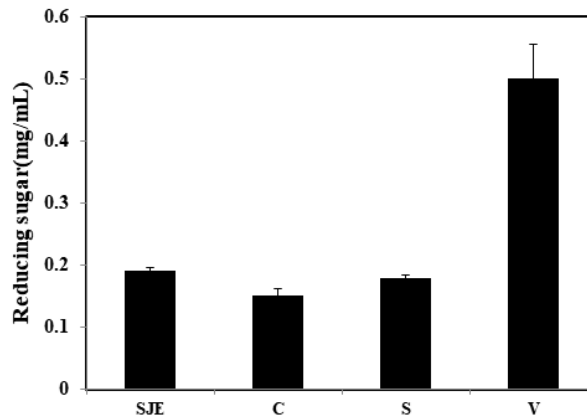


Fig. 1. The reducing sugar content of *Saccharina Japonica* extract hydrolyzed by various mixed enzyme(SJE, *Saccharina Japonica* extract; C, Celluclast; S, Saczyme; V, Viscozyme).

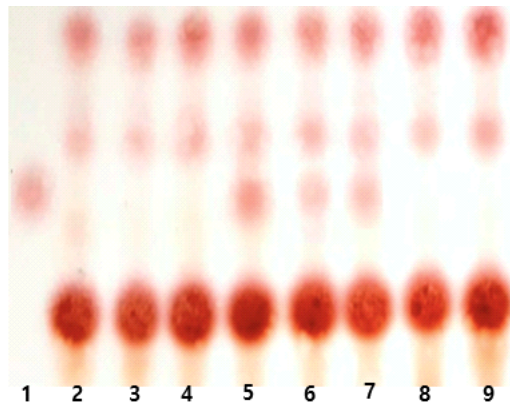


Fig. 2. TLC analysis of MSG and GABA contents from seven LAB strains. Lane 1, GABA control; lane 2, MSG control; lane 3-9, the strains KCTC 3237, KCTC 3103, KCTC 21004, KCTC 3164, KCTC 3598, KCTC 3102, KCTC 2013, respectively. All strains were cultivated in MRS broth and incubated at 37 °C for 48 hr.

3.2. GABA 생성 균주의 확인

Lactobacillus rhamnosus KCTC 3237, *L. plantarum* KCTC 21004, *L. plantarum subsp. plantarum* KCTC 3103 등 7종의 유산균에 의한 발효물의 GABA 함량 변화를 측정하고자 1%(w/v) MSG가 포함된 각각의 MRS broth 발효물을 희석한 후 원심분리하여 얻은 상등액을 TLC 분석방법을 이용하여 정성분석 하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 *L. plantarum* KCTC 21004, *L. acidophilus* KCTC 3164, *L. sakei subsp. sakei*

KCTC 3598,에서 GABA가 생성되는 것을 알 수 있었다. 이에 KCTC 21004, KCTC 3164 및 KCTC 3598를 GABA 생산능력이 우수한 균주로 최종 선택하였다.

3.3. 각 공정조건에 따른 다시마 추출액의 유산균 발효 특성

가수분해된 다시마 추출물의 농도에 따른 발효 특성을 분석하고자 다시마 추출물 농도를 10, 30, 50, 75, 100%로 제조하여 발효를 실시하였다. 발효과정 중 pH와 산도의 변화를 측정한 결

과는 Fig. 3과 같다. 다시마 추출액 농도 100%에서는 발효 8일차에서 젖산이 0.44% 생성되었으나 다시마 추출액 농도 10%는 0.29%로 이상의 젖산이 생성되지 못한 것으로 나타났다. 다시마 추출액의 농도가 높을수록 젖산 발효 속도가 빠르고 산도가 함량이 높았으며 다시마 추출액 농도가 낮을수록 발효 유도기간이 길어지면서 발효 속도가 느려지는 것으로 나타났다. 이는 다시마의 농도가 낮을수록 젖산 발효에 필요한 영양분 부족으로 인하여 젖산 생성이 저해되는 것으로 판단된다. 한편 본 연구에서는 열처리 조건에 따른 유산균 발효 특성을 검토하기 위하여 조건별로 열처리한 다시마 추출액을 제조하여 발효를 실시하였으며, 발효 과정 중 pH와 산도의 변화를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. 열처리를 하지 않은 대조군은 60°C에서 열처리한 다시마 추출액은 발효가 진행되지 않았고, 120°C에서 1시간 열처리 시에는 발효 9일차에서 총 젖산 0.43%로 정상적인 발효가 가능하였다. 열처리의 시간이 증가할수록 젖산생성이 증가하는 것으로 나타났다. Sawai 등[16]은 차나무 줄기와 잎을 헹기 처리한 후 아미노산의 함량 변화를 분석한 결과 헹기 처리에 의해 GABA의 함량이 증진되었다고 보고하였고, 홍국균을 이용한 콩의 발효가 GABA와 유리아미노산 함량을 각각 최대 2.5배와 5.6배 증가시킨다고 보고하였다[17]. 또한 한약재 추출물을 발아수로 이용하고 열처리를 줄으로써 현미 발아 후 GABA 함량을 약 2.5배 증가시킨다고 보고하였

다[18]. 이러한 결과는 다시마에 속하는 물질에 의해 젖산 발효가 저해되거나 열처리를 함으로써 저해물질이 분해되거나 감소하는 것으로 판단되어진다. 전반적으로 발효시간에 따라서 적정 산도는 시간이 지날수록 더 높아지고, 그에 비하여 pH는 점차 감소하는 것을 알 수 있었다[19]. 일반적으로 유산균 발효 중 pH의 급격한 감소 및 산도의 증가원인은 유산균 발효과정에서 유산균의 대사산물로서 다양한 유기산 및 아미노산이 생성되기 때문이다. 한편 이들 유산균의 대사산물로서 생성된 다양한 물질들은 최종 발효물의 향기, 맛 및 영양학적 측면뿐만 아니라 유산균 생육지표로서 이용할 수 있는 중요한 요인으로 작용하고 있기 때문에 유산균 종류 및 특성에 따른 발효 조건을 최적화 하는 것은 매우 중요한 공정이라 할 수 있다.

3.4. 유산균 종류에 따른 다시마 발효물의 GABA 함량 분석

다시마에 함유된 유리아미노산 함량은 채취시기, 수심, 채취 부위 등에 따라 다소 차이가 있지만 총 유리아미노산은 14210.26 mg%이며 그 중 glutamic acid가 1862.09 mg%라고 보고하였다 [20]. 따라서 본 실험에서 glutamic acid를 다량 함유한 다시마를 이용하여 유산균을 발효한 다시마 발효물의 GABA 함량을 검토하였다(Fig. 5). 다시마 함량 20%(w/w) 추출물 MRS 액체배지에서 24시간 배양한 3종의 유산균 2%(v/w)를 접종

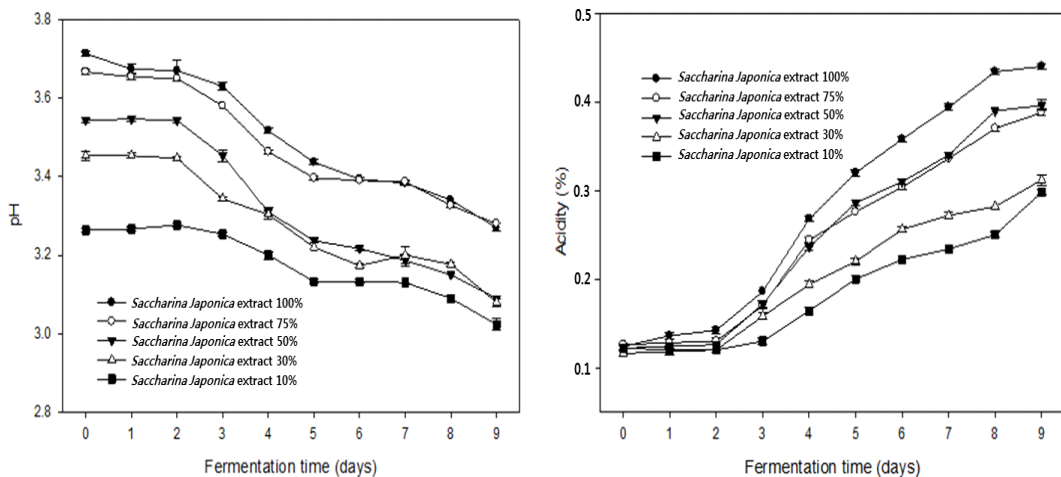


Fig. 3. Effect of initial sea tangle extract concentration on lactic acid fermentation of *Saccharina Japonica* extract.

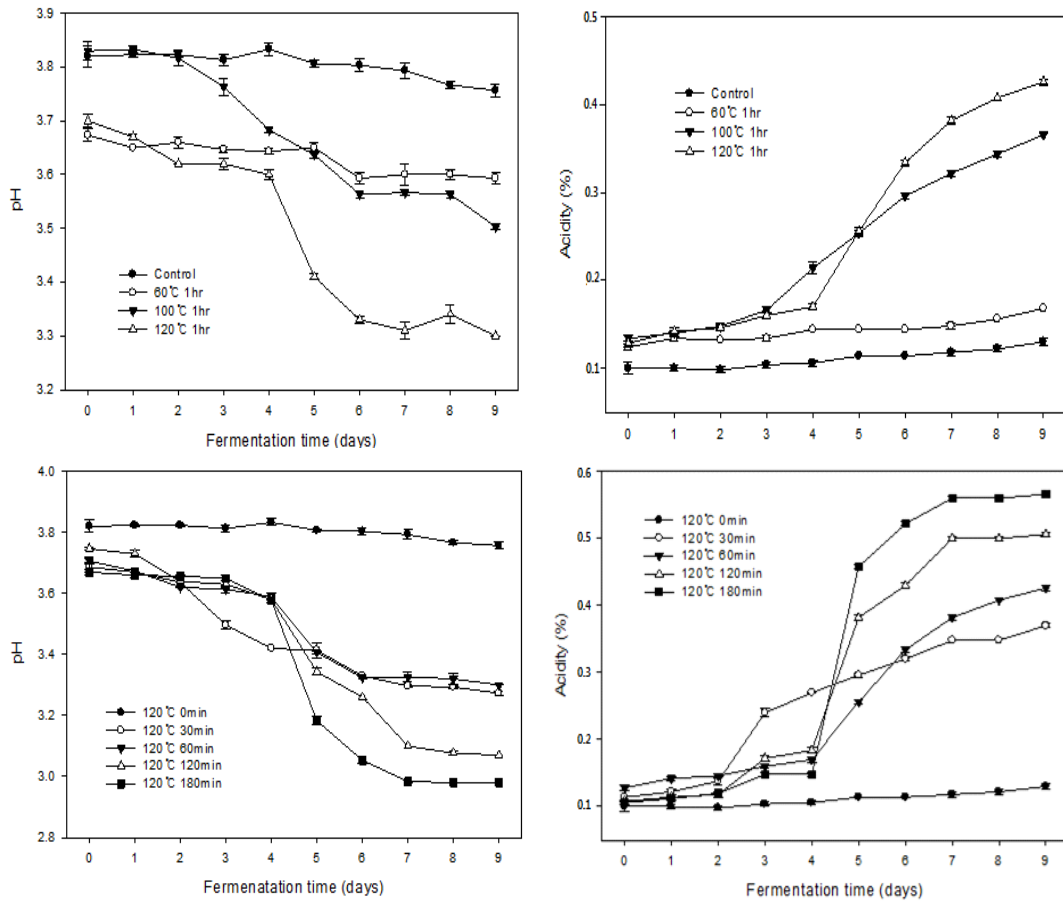


Fig. 4. Effect of heat treatment temperature on lactic acid fermentation of *Saccharina Japonica* extract.

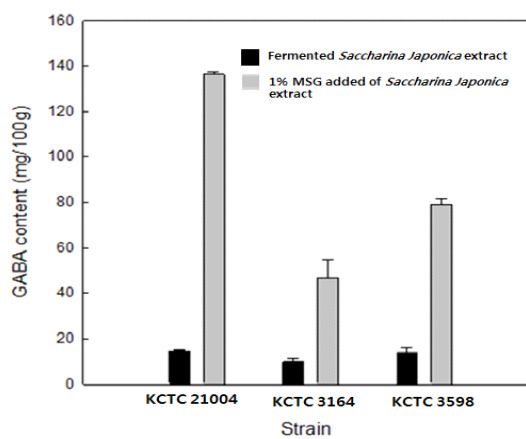


Fig. 5. Comparison of GABA production of different *Lactobacillus* strains in the fermented *Saccharina Japonica* extract.

하여 72시간 발효한 다시마 발효 추출물의 GABA 함량은 93.2~14.31 mg/100g로 검출되었다. 균주의 종류에 따른 GABA 전환을 정확히 확인하기 위하여 1%(v/w) 수준의 MSG(mono sodium glutamate)를 첨가한 다시마 추출물에 동일하게 발효한 결과 3종의 유산균이 1% MSG 첨가 시 GABA 생산량이 높아지는 것을 확인하였으며, *L. plantarum* KCTC 21004균이 GABA 함유량 136.4 mg/100g으로 다른 균보다 GABA 생산량이 높은 것으로 나타났다. 이 결과로 *L. plantarum* KCTC 21004를 이용하여 다시마 발효물을 제조할 경우 GABA 생성이 가장 우수한 균주로 판단했다. 이와 같이 미생물에 의하여 GABA가 생성이 될 때 GAD 효소에 의하여 glutamate가 decarboxylation이 되는 동시에 proton이 소비가 됨으로써 GABA 생성과 함께 pH를 높이므로, 이에 따라 2차 젖산균 발효가 진행이 되며, pH가 증가하는 현상은 기질인 MSG가 GABA로 전환이 되었음을 보여준다[21]. 이러한 GABA 농도의 차이는 각기 다른 유산균 특성, 기질 종류, 배지 조성, MSG 농도, pH 촉매제(pyridoxal phosphate, PLP), 발효공정, GABA 분석방법 등의 여러 요인들이 있으며, 향후 이러한 다양한 요인들에 대한 상호관계 및 메커니즘에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

4. 결론

본 연구의 목적은 인체에 무해한 천연 glutamic acid가 함유되어 있는 다시마를 이용하여 GABA 함량이 강화된 다시마 발효추출물을 생산하고자 하였다.

1. 다시마 추출물의 GABA 강화를 증진시키기 위한 전처리 공정으로 3종의 상업용 효소를 이용하여 환원당을 분석한 결과 Viscozyme® L이 0.500 ± 0.056 mg/mL로 가장 높은 함량을 나타내었다. 따라서 Viscozyme® L로 처리한 다시마 추출물을 이용하여 유산균 발효에 적용하였다.
2. *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 3237, *L. plantarum* KCTC 21004, *L. plantarum subsp. plantarum* KCTC 3103 등 7종의 유산균에 의한 발효물의 GABA 함량 변화

를 측정한 결과 *L. plantarum* KCTC 21004, *L. acidophilus* KCTC 3164, *L. sakei subsp. sakei* KCTC 3598,에서 GABA가 생성되는 것을 알 수 있었다. 이에 KCTC 21004, KCTC 3164 및 KCTC 3598를 GABA 생산능력이 우수한 균주로 최종 선택하였다.

3. 가수분해된 다시마 추출물의 농도, 추출물의 열처리 조건에 따른 발효특성을 측정한 결과 다시마 추출액의 농도가 높을수록 발효 속도가 빠르고 젖산의 생성량이 높았으며 다시마 추출액 농도가 낮을수록 발효 유도 시간이 길어지면서 발효속도가 느려지는 것으로 나타났다. 열처리 조건에 따른 유산균 발효속도는 열처리의 시간이 증가할수록 젖산 생성이 증가하는 것으로 나타났다. 전반적으로 배양 시간에 따라서 적정 산도는 시간이 지날수록 더 높아지고, 그에 비하여 pH는 점차 감소하는 것으로 나타났다.
4. Glutamic acid를 다량 함유한 다시마를 이용하여 유산균을 발효한 다시마 발효물의 GABA 생성은 *L. plantarum* KCTC 21004 균이 GABA 함유량이 136.4 mg/100g으로 다른 균보다 GABA 생산량이 높은 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 중부대학교 학술연구비 지원에 의하여 이루어진 것임

References

1. J. Reboleira, S. Silva, A. Chatzifragkou, K. Niranjana, M. F. L. Lemos, "Seaweed fermentation within the fields of food and natural products", *Trends in Food Science & Technology*, Vol.116, No.6, pp. 1056-1073, (2021).
2. B. M. Ryu, Y. J. Jeon, "Development of functional food products with natural materials derived marine resources", *Food*

- Science and Industry*, Vol.51, No.2, pp. 157-164, (2018).
3. J. I. Nie, X. Fu, L. Wang, J. C. Xu, X. Gao, "A systematic review of fermented *Saccharina japonica*: Fermentation conditions, metabolites, potential health benefits and mechanisms," *Trends in Food Science & Technology*, Vol.123, pp. 15-27, (2022).
 4. D. Rashmi, R. Zanan, S. John, K. Khandagale, A. Nadaf, "Chapter 13- γ -aminobutyric acid (GABA): biosynthesis, role, commercial production, and applications", *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol.57, pp. 413-452, (2018).
 5. B. J. Lee, J. S. Kim, Y. M. Kang, J. H. Lim, Y. M. Kim, M. S. Lee, M. H. Jeong, C. B. Ahn, J. Y. Je, "Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods", *Food Chemistry*, Vol.122, No.1, pp. 271-276, (2010).
 6. H. Luo, Z. Liu, F. Xie, M. Bilal, L. Liu, R. Yang, "Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives", *Critical Reviews in Biotechnology*, Vol.41, No.4, pp. 491-512, (2021).
 7. L. Zhang, Y. Yue, X. Wang, W. Dai, C. Piao, H. Yu, "Optimization of fermentation for γ -aminobutyric acid (GABA) production by yeast *Kluyveromyces marxianus* C₂₁ in okara (soybean residue)", *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol.45, No.7, pp. 1111-1123, (2022).
 8. P. G. Cataldo, J. M. Villegas, G. S. de Giori, L. Saavedra, E. M. Hebert, "Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation" *International Journal of Food Microbiology*, Vol.333, No.16, pp. 108792, (2020).
 9. G. Huang, S. Wen, S. Liao, Q. Wang, S. Pan, R. Zhang, F. Lei, W. Liao, J. Feng, S. Huang, "Characterization of a bifunctional alginate lyase as a new member of the polysaccharide lyase family 17 from a marine strain BP-2", *Biotechnology Letters*, Vol.41, No.10, pp. 1187-1200, (2019).
 10. H. S. Kim, "Homology modeling and characterization of oligoalginate lyase from the alginolytic marine bacterium *Sphingomonas* sp. strain MJ-3", *Journal of Life Science*, Vol.25, No.2, pp. 121-129, (2015).
 11. E. Y. Park, Y. J. Kim, S. M. Jeong, D. H. Lee, "Original paper : Optimal conditions of enzymatic hydrolysis of aginic acid in brown algal carbohydrate", *Journal of Korea Society of Waste Management*, Vol.30, No.4, pp. 304-318, (2013).
 12. N. R. M. Sahab, E. Subroto, R. L. Balia, G. L. Utama, " γ -Aminobutyric acid found in fermented foods and beverages : current trends", *Heliyon*, Vol.6, No.11, pp. e05526, (2020).
 13. G. L. Miller, "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Analytical Chemistry*, Vol.31, No.3, pp. 426-428, (1959).
 14. Y. X. Xu, L. Yang, Y. S. Lei, R. N. Ju, S. G. Miao, S. H. Jin, "Integrated transcriptome and amino acid profile analyses reveal novel insights into differential accumulation of theanine in green and yellow tea cultivars", *Tree Physiology*, Vol 42, No.7, pp. 1501-1516, (2022).
 15. B. Y. Park, K. Y. Yoon, "Conditions for hydrolysis of perilla seed meal protein for reducing hydrolysates and ultrafiltered peptides and their antioxidant activity", *Korean Journal of Food Preservation*, Vol.25, No.5, pp. 605-612, (2018).
 16. Y. Sawai, K. Konomi, Y. Odaka, H. Yoshitomi, Y. Yamaguchi, D. Miyama, "Contents of γ -aminobutyric acid in stem

- of anaerobic incubated tea shoot”, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, Vol.46, No.4, pp. 274-277, (1999).
17. Y. H. Pyo, “Effect of Monascus-fermentation on the content of GABA and free amino acids in soybean”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.37, No.9, pp. 1208-1213, (2008).
18. G. Jeon, M. Y. Lee, Y. Joon, S. Jang, M. Jung, H. S. Jung, J. Lee, “Effects of heat treatment and selected medicinal plant extracts on GABA content after germination”, *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, Vol.39, No.1, pp. 154-158, (2010).
19. D. C. Kim, J. W. Choi, M. J. In, “Utilization of *Leuconostoc mesenteroides* 310-12 strain in the fermentation of a traditional Korean rice-based beverage”, *Journal of Applied Biological Chemistry*, Vol.54, No.1, pp. 21-25, (2011).
20. T. S. Shin, Z. Xue, Y. W. Do, S. I. Jeong, H. C. Woo, N. G. Kim, “Chemical properties of sea tangle(*Saccharina japonica*)cultured in the different depths of seawater”, *Clean Technology*, Vol.17, No.4, pp. 395-405, (2011).
21. J. S. Lim, S. P. Lee, “Production of set-type yogurt fortified with peptides and γ -aminobutyric acid by mixed fermentation using *Bacillus subtilis* and *Lactococcus lactis*”, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.46, No.2, pp. 165-172, (2014).