KFAS 한국수산과학회지
Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 46(6), 702-707, 2013

Original Article
Kor J Fish Aquat Sci 46(6),702-707,2013

굴(*Crassostrea gigas*) · 다시마(*Saccharina japonica*) 발효 분말의 스트레스 완화 및 수면 유도 효과

우남식 · 서용배*

(주) 마린바이오프로세스

Stress Relaxation and Sleep Induction Effect of Fermented Sea Tangle *Saccharina japonica* and Oyster *Crassostrea gigas* Powder

Nam-Sik Woo and Yong Bae Seo*

Marine Bioprocess Co. LTD., Busan 619-912, Korea

Sleep is an essential biological process of which the underlying regulatory mechanisms involve numerous anatomical structures and biochemical substances that can be compromised by stress and the immune system. Gamma aminobutyric acid (GABA) is the main inhibitory neurotransmitter of the central nervous system (CNS). It is well established that activation of $GABA_A$ receptors promotes sleep. *L. brevis* BJ20 fermentation of sea tangle and oysters resulted in stress reduction and sleep inducing effects. This is the first study to report that GABA has the ability to induce sleep related hormones in mice; therefore, it has potential use as a natural sleep aid. These results suggested that sea tangle and oysters fermented by *L. brevis* BJ20 can be used as potential agents for stress reduction and sleep promotion.

Key words: Sea tangle, Oyster, Gamma-amino butyric acid (GABA), Stress, Sleep

서 론

사람은 일생 중 1/3을 잠을 자는데 사용한다. 인간의 삶에 있어 수면은 매우 중요하며, 수면 동안 뇌는 일과 중 얻은 심신 피로의 해소 및 정보를 처리하여 기억 등 인지기능을 강화시킨다. 하지만 Ohayon (2002)과 Kupfer (1997) 등의 연구에 의하면 전체 인구의 30-35%에서 일시적 수면장애가 있으며, 특히 여성이나 노인에서는 그 비율이 더 높다는 보고를 하였다. 이처럼 현대인들의 다수는 수면장애를 앓고 있으며, 수면장애로 인해 많은 어려움을 겪고 있는 실정이다. 이러한 수면장애의 원인으로는 스트레스, 긴장, 공포, 불안 등 다양하며, 이 중에서 현대인들은 스트레스로 인한 수면장애를 겪는 빈도가 높은 편이다. 이는 미국의 정신질환분류편람인 Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV) 에서 "대부분의 불면증은 심리, 사회 및 의학적 스트레스를 받을 때 급성으로 생긴다"라고 설명하고 있으며, 실제 불면증 환자들 중 78%가 스트레스가 불면증을 유발하였다고 보고하고 있다(Bastien et al., 2004). 이와 같은 이유로 주요 선진국에서는 아데노신(Adenosine), 아세틸콜린(acetyl choline), 세로토닌(serotonin, 5-Hydroxytryptamine), 멜라토닌(melatonin, N-acetyl-5-methoxy-tryptamine), gamma amino butyric acid (GABA) 등과 같은 수면 촉진물질을 대상으로 수면유도 보조제를 개발하고자 하는 연구를 진행 중이다. 또한 수면장애 치료를 위하여 현재 사용되고 있는 약물로는 벤조디아핀제(benzodiazepine)계열의 약물, 비벤조디아핀제(non-benzodiazepine)계열의 약물과 항우울약 등이 사용되고 있다. 수면장애 치료에 사용되고 있는 약물의 약리학적 기전을 살펴보면 다음과 같다. 벤조디아핀제의 경우 염소이온의 세포막 투과성을 증가시켜 신경흥분 시에 gamma-amino butyric acid (GABA)의 억제효과를 촉진시키는 것으로, GABA 수용체에 작용하며 GABA에 의한 Cl^- 이온 통로 개방 횟수 증가시킨다. 낮은 용량에서 진정효과를 보이며, 높은 용량에서 수면효과 발현을 유도한다(Claude, 2002). 비벤조디아핀제계 수면제 중 최근에 개발된 zolpidem, zaleplon, eszopiclone은 GABA를 통하여 억제효과가 나타나고 수면효

Article history;
Received 26 September 2013; **Revised** 7 November 2013; **Accepted** 15 November 2013
***Corresponding author:** Tel: +82. 51. 722. 5453 Fax: +82. 51. 722. 0020
E-mail address: haehoo76@pknu.ac.kr

Kor J Fish Aquat Sci 46(6) 702-707, December 2013
http://dx.doi.org/10.5657/KFAS.2013.0702
pISSN:0374-8111, eISSN:2287-8815
ⓒ The Korean Society of Fishereis and Aquatic Science. All rights reserved

과가 나타난다(Roehrs et al., 1994; Sherin et al., 1998). 하지만 이와 같은 약물의 경우 이들을 장기간 사용하였을 때 내성 및 의존성 등의 많은 부작용을 나타낸다. 따라서 부작용이 적으면서 불면을 치료할 수 있는 대체 식·의약품을 개발 하는 것이 절실히 요구되고 있다(Krueger et al., 1999).

이처럼 수면장애에 대한 치료제는 대부분 GABA가 그 중심적 역할을 수행하고 있다. 이러한 GABA의 최근 연구를 살펴보면 GABA-receptors가 뇌조직에 주로 존재하여 리간드인 GABA가 작용 결합하여 중추신경계에서 억제성 신경전달물질로서 작용하며, GABA의 양이 증가함에 따라 정서적 안정, 항 정신불안증, 항 경련 효과를 나타낸다(Concas et al., 1994). 또한, GABA를 식이한 실험 쥐를 대상으로 한 연구에서 혈압상승 억제 효과가 있는 것으로 밝혀졌으며(Arnaud et al., 2001), 그 외에도 스트레스해소, 기억력 증진 효과가 있음이 밝혀졌다 (Declerck et. al., 1992).

다시마와 굴은 GABA의 전구물질인 글루탐산(glutamic acid)을 함유(다시마의 경우 5%/dry base 기준, 굴의 경우 4.8%/dry base; w/w) 하고 있는 것으로 알려져 있고, 이는 발효공법에 의하여 GABA를 생산할 수 있는 우수한 천연 소재 중의 하나이다 (Lee et al., 2010). 따라서, 이러한 해양생물을 원료로 하여 제조된 굴·다시마 발효분말 (fermented sea tangle and oyster; FSO)에는 다량의 GABA가 함유되어 있다. 따라서, GABA가 신경전달계통의 물질이며 다수의 연구에서 정신건강에 도움 줄 수 있는 것에 착안하여 많은 사람들이 겪고 있는 각종 스트레스와 수면장애 증세로 인해 불면증에 시달리고 있고, 이로 인해 일상생활에서의 만성피로를 호소하며, 작업효율이 떨어지는 등 다양한 문제를 일으키고 있는 것에 대해 천연 수면유도제로서 굴·다시마 발효분말의 적용 가능성에 대해 연구할 필요성이 있다.

본 연구에서는 GABA을 다량 함유하고 있는 굴·다시마 발효분말의 항스트레스 및 수면유도 기능성 식품소재로서 활용하기 위한 기초자료를 확보하고자 굴·다시마 발효분말의 항스트레스 및 수면유도 효과에 대하여 탐색하였다.

재료 및 방법

재료

다시마는 2012년 10월에 부산광역시 소재 서진기장영어조합법인에서 구입하여 사용하였고, 굴은 2012년 11월에 경상남도 통영에서 양식한 양식 산 굴을 구입하여 사용하였다. *Lactobacillus brevis* BJ20은 Marinebioprocess Co., Ltd (Busan, Korea)에서 분리 동정한 것을 사용하였다.

실험에 사용된 동물은 체중 220-250 g의 Sprague Dawley 계 암컷 흰쥐(샘타코, 경기도, 한국)로 일주일간 사육실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육실 온도는 22±2℃, 습도는 55-60%로 유지하였고, 사육실 내 환풍기와 공기정화기를 항시 가동시켰다. Light-dark cycle이 12시간 단위로 조절되게 한 후, 흰쥐용 고형사료와 물을 제한 없이 공급 하였다. 실험에 사용된 실험동물은 Naive Normal (n=5), Control (Saline, n=5), 5-200 [(5; FSO 200 mg/kg, n=5), 5-400 (후박; FSO 400 mg/kg, n=5) 의 4군으로 나누어 사용하였다.

굴 및 다시마 추출액의 제조

다시마 추출물은 수세, 탈염, 분쇄공정을 거쳐 적당한 크기로 분쇄한 다음 여기에 16배의 물(w/v)을 첨가하고, 80℃에서 30분간 열수 추출한 후 20 mesh 망으로 걸러 제조하였다. 굴 추출물은 상업용 가수분해효소 (Alcalase)로 40℃, 1시간 동안 효소분해한 이후 90℃, 1시간 동안 효소를 실활 시킨 이후 필터프레스(250 mesh, 여과포)를 이용하여 정밀여과 하여 제조하였다.

굴 · 다시마 발효분말의 제조

굴·다시마 발효분말(fermented sea tangle and oyster powder, FSO)은 다시마 추출액 45% (w/v), 굴 추출액 45% (w/v), yeast extracts 4% (w/v), glucose 4% (w/v)를 각각 혼합하고, 멸균(121℃, 30 min) 및 균주(2% *L. brevis* BJ20) 접종을 실시한 다음 발효(37℃, 24 hrs) 및 재멸균(121℃, 30 min)하고 건조하여 제조하였다. 제조 시 굴과 다시마의 비율을 각각 1:9에서 8:2 비율로 각각의 샘플을 제조하여 실험을 진행하였다

$GABA_A$ receptor affinity assay

$GABA_A$ receptor affinity assay은 Risa et al. (2004)의 방법을 참고하여 시행하였다. 적출한 SD-rat 의 대뇌 피질을 30 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, keep at 4℃) 20 mL에 넣어 균질화 시킨 후 10초 정도 초음파 처리하고, 4℃에서 원심분리(27,000×g, 15 min)하여 상층액을 버리고 다시 30 mM Tris-HCl buffer 20 mL을 취하여 원심분리(27,000×g, 15 min)하였다. 위 과정을 3번 반복하였다. 조직에서의 endogenous GABA를 제거하기 위하여 37℃ water bath (SWB-03 shaking water bath, JEIO TECH, Korea)에서 30분간 incubation 시키고 다시 원심분리(27,000×g, 15 min)한 후 pellet을 binding assay에 사용하기까지 -70℃에서 보관하였다. 동결된 membrane을 해동시킨 후 원심분리(4℃, 27,000×g, 10분간)하여 상층액을 버리고 50 mM Tris-citrate buffer (binding buffer, pH 7.1, keep at 4℃) 20 mL을 넣고 원심분리(4℃, 27,000×g, 10분간) 하였다. 이 과정을 3번 반복한 후 뇌 조직을 binding buffer에 현탁시켜 (500 mL buffer/original tissue g) binding assay를 위한 조직액을 제조하였다. Tube에 membrane suspension 500 μL, extract 25 μL 및 [^{3}H] flumazenil (1 nM, finalconcentration)을 넣고 혼합한 후 ice 에서 40분간 incubation 하였다. 이 후 binding buffer 5 mL을 넣고 glass fiber filter (GF/C, Whatman)을 이용하여 harvest 하였다(Brandel Inc., Gaithersburg, MD, USA). 샘플의 radioactivity (액체섬광계수, liquid scintillation count-

ing)는 Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzers (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)를 통해 측정 하였다. 비특이적 결합(non-specific binding)은 clonazepam (1 μM, final concentration)을 이용하여 그 값을 결정하였다. Binding값 (%)은 아래와 같은 식을 통해 계산 하였다.

$$\text{Binding (\%)} = \frac{\text{(Extract DPM - NSB DPM)}}{\text{(TB DPM - NSB DPM)}} \times 100$$

DPM : disintegrations per minute,

NSB : nonspecific binding,

TB : total binding

5-HT$_{2C}$ receptor affinity assay

동결된 membrane (Perkin-Elmer, USA)을 해동시킨 후 binding buffer에 현탁시켜 [500:1] binding assay를 위한 조직액을 제조하였다. Tube에 membrane suspension 500 μL, extract 25 μL 및 [^{3}H] Mesulergine (1.3nM, final concentration)을 넣고 혼합한 후 37℃에서 30분간 incubation 하였다. 이 후 binding buffer 5 mL을 넣고 glass fiber filter (GF/C, Whatman)을 이용하여 harvest 하였다(Brandel Inc., Gaithersburg, MD, USA). 샘플의 radioactivity (액체섬광계수, liquid scintillation counting)는 Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzers (Perkin-Elmer, Shelton, CT, USA)를 통해 측정하였다. 비특이적 결합(non-specific binding)은 Miaserine (25 μM, final concentration)을 이용하여 그 값을 결정하였다. Binding값 (%)은 위 GABA$_A$ receptor affinity assay와 동일하게 계산하였다.

Forced swimming test (FST; 강제 수영 시험)

절망행동검사(behavioral despair test)라고도 하는 강제수영시험은 약물개발시의 항 우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 본 테스트의 24시간 전에, 높이 50 cm, 지름 30 cm의 투명한 아크릴원통형 수조에 22℃의 물에 쥐의 꼬리가 바닥에 닿지 않을 정도의 물 높이에 강제로 빠뜨린 다음 15분간 있게 하였다. 처음 수분간은 이를 벗어나기 위해 쥐가 심한 저항을 보이나, 시간이 흐를수록 점점 부동자세를 보이는 시간이 늘어난다. 15분간의 강제 수영이 끝나면 첫 번째 약 투여를 하고, 테스트 5시간, 1시간 전에 약물을 투여 한다. 24시간 후에는 5분간 같은 환경에서 강제 수영을 시키고, 여기서 climbing, swimming, immobility 세 가지 행동을 측정한다. 전형적인 immobility란 쥐가 얼굴을 포함한 상체의 일부분만 수면 위로 드러낸 채 몸의 균형을 유지하면서 사지의 움직임이 전혀 없는 상태이다. 한편, swimming은 쥐가 수면 위를 돌면서 움직이고, 간혹 물밑으로 잠수하기도 하는 상태이다. Climbing은 가장 격렬한 운동 상태인데, 앞발을 적극적으로 사용하여 아크릴 원통 위로 올라가려고 사지를 다 쓰는 상태이다. 실수와 사람에 의한 오차를 줄이기 위해 비디오 카메라로 측정하여 자료를 확보하였다.

Tail suspension test (TST; 꼬리 현수법)

절망행동검사(behavioral despair test)라고도 하는 꼬리 현수법은 약물개발시의 항 우울 효과를 검색하는 기본적인 실험으로 알려져 있다. 테이프를 이용해 꼬리의 절반쯤 되는 곳으로부터 테이프를 감아 꼬리 끝부분을 30 cm의 box (H: 54 cm, W: 30 cm, D: 47 cm)에 고정시켜 거꾸로 매달아 놓는다. 총 6분간 매달아 놓으며, 2분간은 측정을 하지 않고, 4분 동안은 부동행동을 측정해서 우울행동을 평가하게 된다.

ELISA 분석

행동실험이 끝난 쥐를 sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.)로 마취 시킨 후, 심장에서 혈액을 채취해 원심분리(1000 × g, 10 min) 하여 -70℃에 보관한다. 우울행동과 관련이 있는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX)의 발현을 commercial ELISA kit (USCN life science, Huston, U.S.A)를 이용하여 분석하였다.

통계 처리

모든 측정값은 평균값±표준오차(mean±S.E)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석 window용 SPSS를 이용하였다. 조직분석법의 측정값은 one-way ANOVA test를 시행하였으며, 사후검증은 Tukey test를 이용하였다. 통계적 유의성은 신뢰구간 P<0.05에서 의미를 부여하였다.

결과 및 고찰

굴 · 다시마 발효분말의 GABAA receptor 및 5-HT2C receptor affinity assay

수면 촉진 물질로는 GABA, 아데노신, 아세틸콜린, 세로토닌 그리고 몇 가지 수면 유발 펩타이드가 알려져 있으며 아세틸콜린과 세로토닌은 수면 및 각성에 모두 참여한다. VLPO (Ventrolateral preoptic nucleus: VLPO)에서의 GABA성 세포의 활성화는 비렘 수면을 유도하는데 반해 VLPO 주변지역에 있는 GABA성 세포들은 뇌간의 렘중지 신경핵인 노르아드레날린 및 세로토닌성 신경원을 억제하여 렘수면을 촉진한다(Finnimore et al., 1995). 세로토닌은 각성의 활동성을 감소시켜 수면을 준비시키는 물질로서 5-HT$_{1A}$ 수용체 자극 시에는 전뇌 기저부의 콜린성 신경원들을 억제하여 서파수면을 유도하고 5-HT$_{2C}$, 5-HT$_3$ 수용체 활성화는 GABA 분비 중간신

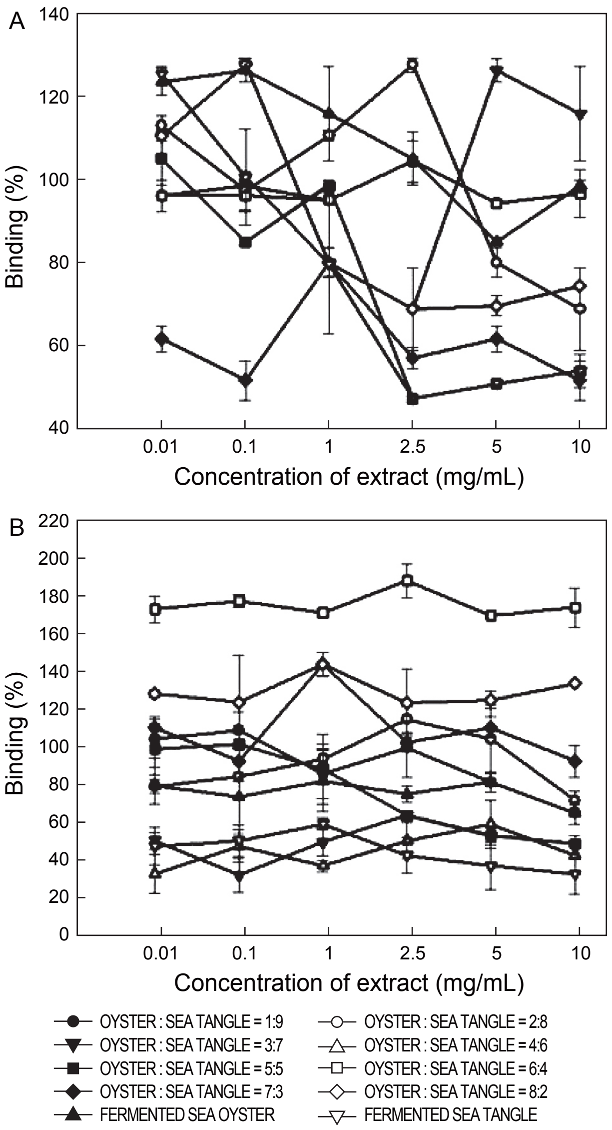

Fig. 1. Mental related receptor binding affinity effect. FSO displaced over 50% of [^{3}H] flumazenil binding at a concentration of 20mg/mL and showed an effective binding affinity to the GABAA-BZD receptor and 5-HT$_{2C}$ receptor. (A); Percent binding of [^{3}H] flumazenil to the GABA$_A$-BZD receptor in in fermentated marine organisms. (B); Percent binding of [^{3}H]-mesulergine to the 5-HT $_{2C}$ receptor in fermentated marine organisms.

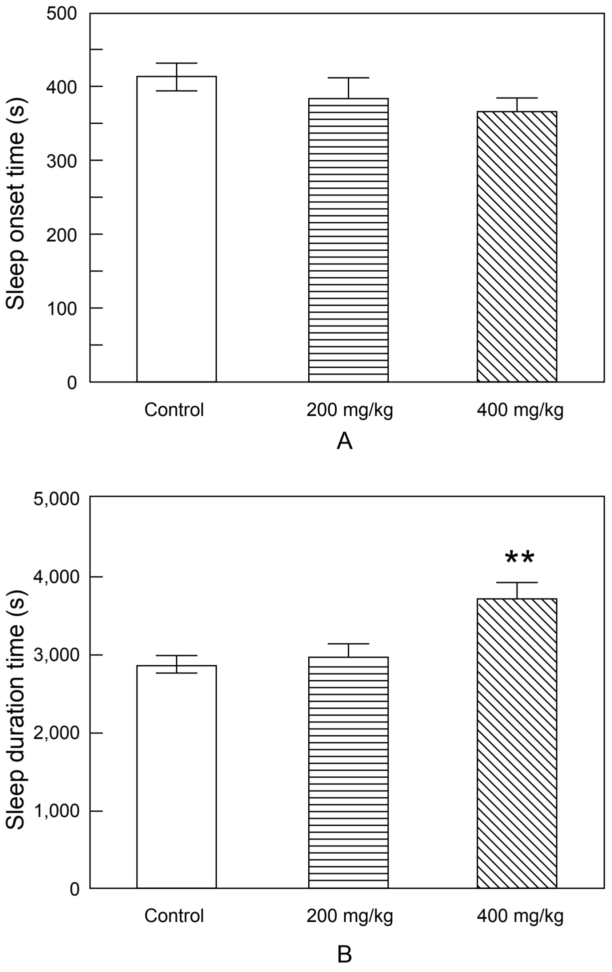

Fig. 2. Effect of the FSO on SLEEP ENEHNCEMENT in rats. Effects of FSO on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45min after oral administration (p.o.) of CON (0.5% CMC-saline 10 mL/kg) and FSO (200, 400 mg/kg). Each column represents mean ± SEM (n=10). * P<0.05, significant as compared to the control group (Dunnett's test).

경원을 자극하여 청색반점(locus coeruleus) 및 배쪽피개구역(ventral tegmental area: VTA)과 같은 각성계를 억제한다(Yun and Kwon, 1993). 이러한 연구 배경을 중심으로 본 연구에서는 GABA와 세라토닌 receptor를 중심으로 FSO의 수면증진에 관한 영향을 살펴 보았다.

굴과 다시마의 비율을 각각 1:9에서 8:2 비율로 제조한 FSO를 재료 및 방법에서 설명한 샘플과의 결합력 분석 결과 다시마와 굴의 비율이 5:5로 첨가되어 제조된 FSO에서 GABA$_A$ receptor 결합력이 가장 높은 것으로 밝혀졌다. 또한 세라토닌 receptor인 5-HT$_{2C}$ receptor와의 결합력 역시 5:5 비율에서 제조된 FSO가 가장 활성이 높았다. FSO의 GABA$_A$ receptor와 5-HT$_{2C}$ receptor에 대한 결합력 결과는 Fig. 1에 정리하여 나타내었다.

수면증진효능

FSO의 수면증진 효능을 알아보기 위해서 수면 박탈 동물 모델을 이용하여 실험을 진행하였다. 제조된 FSO는 굴과 다시마 비율이 1:1인 조건을 이용하여 제조하였으며, 이를 각각 200 mg/kg과 400 mg/kg을 섭취 시켰으며, 그 결과 수면 박탈 모델에 FSO를 투여시 입면시간은 감소하는 경향을 보였지만 그 결과는 미미 하였다. 다만 수면유지시간은 유의적으로 증가함

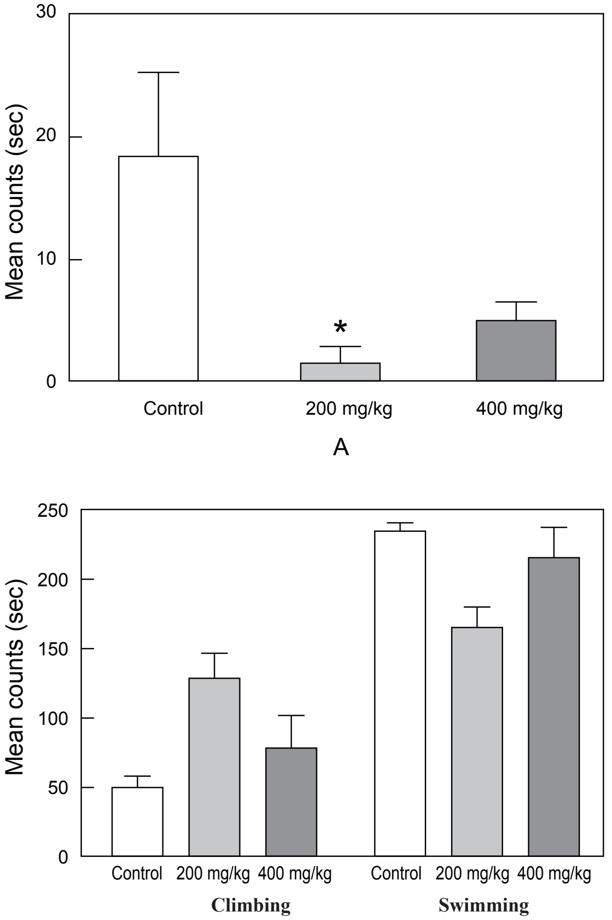

Fig. 3. Anti-stress effect by forced swimming test. FSO significantly decreased the immobility time at FSO 200 mg/kg (A) and enhanced behavioral mobility, shown as the swimming times, and climbing times, after FSO administration (B). Each value represents the mean±S.E.M. The result of FSO was analyzed by performing separate one-way ANOVA among the groups. Each value represents the mean ± S.E.M. **P*<0.05 compared to the control group.

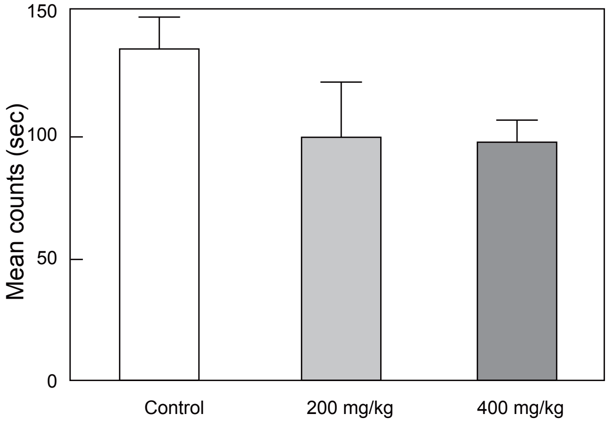

Fig. 4. Anti-stress effect by tail suspension test. FSO decreased the immobility time in dose-dependence manner. Each value represents the mean±S.E.M.

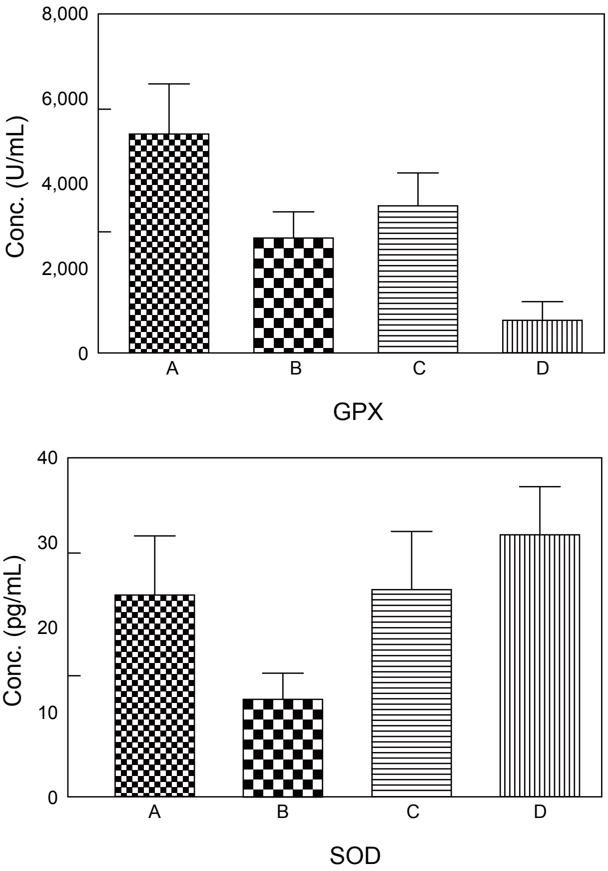

Fig. 5. Serum GPx and SOD level. Serum GPx, SOD were significantly increased in the TMT-treatment group than those in FSO treated group. Each value represents the mean ± S.E.M. The GPX and SOD level in the serum of normal group (A, saline), control (B, TMT 10 mg/kg, i.p.), FSO 200 mg/kg (C) and FSO 400 mg/kg (D).

을 확인하였다. 이는 FSO가 입면 후 수면을 유지하는 것에 도움을 줄 수 있음을 시사하는 것으로 이에 대한 결과를 Fig. 2에 정리하였다.

Forced swimming test (FST; 강제 수영 시험)

강제수영 시험에 대한 결과는 Fig. 3에 정리하였다(IMO: F2, 171.64, P=0.23, CLIM: F2, 17 = 5.27, *P*<0.05, SWIM: F2, 17 = 5.12, *P*<0.05). Saline을 투여한 control군에 비해 5-200 (200 mg/kg 섭취) 군에서 부동행동 시간이 약 70%이상 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한, active behavior인 climbing과 swimming 행동이 증가하는 경향이 나타났다. 이는 5-400 (후박; 200 mg/kg 섭취 후 200 mg/kg 재 섭취)을 투여한 군에서 “

절망행동”이 감소하는 것을 나타내는 것으로 FSO 섭취 시 스트레스 완화에 도움을 줄 수 있음을 시사하는 것이다.

Tail suspension test (TST; 꼬리 현수법)

꼬리 현수법에 대한 결과는 다음과 같다. Saline을 투여한 control군에 비해 5-400 군에서 부동행동 시간이 약 20%이상 감소하는 것을 알 수 있었다(F2, 17=1.83, P=0.20). 이는 고농도의 FSO를 투여한 군에서 “절망행동”이 감소하는 것을 나타내는 것으로 강제수영시험과 같은 결과를 얻은 것이다. 이에 대한 결과는 Fig. 4에 정리하였다.

SOD, GPX의 ELISA 분석

동물 모델의 행동실험이 모두 끝난 후 serum내에서 SOD와 GPX의 발현을 알아본 결과는 Fig. 5와 같다(SOD: F3,14=2.7, P=0.1; GPX: F3,14=4.6, P=0.5, CORT: F3, 14=28.2, *P*<0.001). 대조군에서는 정상군에 비해 혈액 내에 SOD, GPX의 발현이 약 50% 정도 감소하였다. 하지만, 5-400군에서는 대조군에 비해 항 산화 효소인 SOD와 GPX가 증가하는 경향을 나타내었다.

이상의 결과를 종합하면 FSO는 스트레스 완화와 수면 증진(또는 유지)에 도움을 줄 수 있는 천연물 소재로 현대인들이 다양한 스트레스로 인한 수면장애에 대한 치료 보조제로 사용 가능한 해양생물 유래 천연물 소재라 사료된다. 향후 본 연구 결과를 바탕으로 한 임상실험을 통해 FSO의 안정성에 대한 연구가 진행된다면 부작용이 없는 불면증 치료 보조제로의 건강기능식품을 개발 가능 할 것이다.

사 사

본 연구과제는 중소기업청에서 시행한 2011년도 중소기업기술혁신 개발 사업 연구비 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 이에 감사 드립니다(과제번호 : SA114084).

References

Arnaud C, Gauthier P and Gottesmann C. 2001. Study of a GABA$_C$ receptor antagonist on sleep-waking behavior in rats. Psychopharmacology 154, 415-419.

Bastien CH, Vallieres A and Morin CM. 2004. Precipitating factors of insomnia. Behav Sleep Med 2, 50-62.

Claude G. 2002. GABA Mechanisms and sleep. Neuroscience 111, 231-239.

Concas A, Serra M, Santoro G. Maciocco E, Cuccheddu T and Biggio G. 1994. The effect of cyclopyrrolones on GABA$_A$ receptor function is different from that of benzodiazepines. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 350, 294-300.

Declerck AC, Ruwe F, O'Hanlon JF and Wauquier A. 1992. Effects of Zolpidem and funitrazepam on nocturnal sleep of women subjectively complaining of insomnia. Psychopharmacology 106, 497-501.

Finnimore AJ, Roebuck M, Sajkow D and Mcevoy RD. 1995. The effect of the GABA agonist, baclofen, on sleep and breathing. Eur Resp 8, 230-234.

Krueger JM, Obal F Jr and Fang J. 1999. Humoral regulation of physiological sleep: Cytokines and GHRH. J Sleep Res 1, 53-59.

Lee B-J, Kim J-S, Kang YM, Lim J-H, Kim Y-M, Lee M-S, Jeong M-H, Ahn C-B and Je J-Y. 2010. Antioxidant activity and γ-aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by Lactobacillus brevis BJ20 isolated from tranditional fermented foods. Food Chemistry. 122, 271-276. http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.071.

Monk TH, Petrie SR, Hayes AJ and Kupfer DJ. 1994. Regularity of daily life in relation to personality, age, gender, sleep quality and circadian rhythms. J Sleep Res 3, 196-205.

Ohayon MM and Partinen M. 2002. Insomnia and global sleep dissatisfaction in Finland. J Sleep Res 11, 339–346

Risa J, Risa A, Adsersen A, Gauguin B, Stafford GI, vanStaden J and Jäer AK. 2004. Screening of plants used in southern Africa for epilepsy and convulsions in the GABA$_A$-benzodiazepine receptor assay. Journal of Ethno pharmacology 93, 177-182.

Roehrs T, Beare D, Zorick F and Roth T. 1994. Sleepiness and ethanol effects on simulated driving. Alcohol Clin Exp Res 18, 154-158.

Sherin JE, Elmquist JK, Torrealba F and Saper CB. 1998. Innervation of histaminergic tuberomammillary neurons by GABAergic and galaninergic neurons in the ventrolateral preoptic nucleus of the rat. Journal of Neuroscience **18**, 4705-721.

Yun JO and Kwon KI. 1993. Pharmacokinehcs of caffeine sensitive and non-senstive volunteers and in the obese rat and the lean rat. Korean Pharm Sci 37, 341-348.