

## 혼합영양 배양에서 *Chlorella protothecoides* 의 GABA를 포함한 아미노산 함량 분석

## The Content Analysis of Amino Acids Including GABA of *Chlorella protothecoides* under Mixtrophic Culture

정유정<sup>1,2</sup>, 김성학<sup>1</sup>, 민희경<sup>1</sup>, 김성천<sup>1,2\*</sup>

Yu Jeong Jeong<sup>1,2</sup>, Seong Hak Kim<sup>1</sup>, Hee Gyung Min<sup>1</sup>, Sung Chun Kim<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>주식회사 바이오이즈, 서울시 구로구, 08390, 대한민국

<sup>2</sup>주식회사 인바이오팜, 서울시 구로구, 08390, 대한민국

<sup>1</sup>Biois. Co., Ltd., Seoul, Guro-gu 08390, Republic of Korea

<sup>2</sup>Inbiofarm. Co., Ltd., Seoul, Guro-gu 08390, Republic of Korea

(Received 14 May 2018, Revised 5 June 2018, Accepted 7 June 2018)

**Abstract** *Chlorella* is quantitatively and qualitatively high in protein with balanced essential amino acid profiles, vitamins and minerals.  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABA) is broadly distributed in nature and fulfills multi-physiological functions including effect such as a health-promoting functional compound. To improve the GABA production, *Chlorella protothecoides* were grown through the modified mixtrophic culture medium containing 2L of sterilized bristol medium with 0.01% urea and 4.0% glucose in a 5L fermenter. The results showed that nineteen kinds of amino acid including GABA at *C. protothecoides* sample were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC). Glutamic acid in total concentration (%) of amino acid is the most abundant amino acid (33.10%), followed by alanine (20.48%) and GABA (17.48%). Three amino acids including GABA were responsible for more than 70% total concentration in *C. protothecoides* sample including eight essential and nine non-essential amino acids: aspartic acid, asparagine, serine, glutamine, histidine, glycine, threonine, arginine, tyrosine, valine, methionine, tryptophan, phenylalanine, isoleucine, leucine, lysine. As a result of this experiment, it is expected that *Chlorella* will be developed to a critical product having high value as, GABA, functional food materials.

**Keywords :** *Chlorella protothecoides*, Mixotrophic culture, GABA, Amino acid

### 서 론

미세조류는 미래 식량자원, 에너지원으로 매우 중요하며, 기초과학, 대체에너지, 식품·의약품 원료물

질, 사료 및 첨가제 등 이용성이 확대되고 있다 [4, 21]. 또한, 미세조류는 다양한 생리활성물질을 함유하고 있으며, 같은 종이라도 배양조건에 따라 유용 성분 함량과 생리활성에 차이를 보인다 [11, 24]. 간

\* Corresponding author

Phone: +82-2-6959-0361 Fax: +82-2-864-9954

E-mail: [kingp@biois.co.kr](mailto:kingp@biois.co.kr)

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

기능 개선, 항암, 항산화, 면역기능, 생체내의 중금속 배출, 혈압강화와 콜레스테롤 저하 등 다양한 생리활성 기능이 있어, 식·의약품, 건강식품, 화장품 원료 등으로 상용 범위가 확대되고 있다 [15, 17, 18, 22, 29]. 클로렐라는 영양학적으로 고함량 단백질 식품으로 필수아미노산 함량이 높고 식물성단백질, 필수아미노산, 필수지방산, 복합당질, 비타민, 미네랄, 식이섬유소, 엽록소, 핵산,  $\beta$ -카로테노이드, 플라보노이드, 류틴 등 항산화제, 식물성 영양성분, 스테롤,  $\gamma$ -리놀렌산 등 식물성 영양소를 고루 함유하고 있다 [28].

건강 물질로 알려진  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산으로 glutamic acid로부터 glutamate decarboxylase (GAD) 촉매로 탈탄산되어 생합성되는 중요한 생리활성물질이다. 또한, GABA는 포유동물의 뇌나 척수의 중추신경계에 내에 널리 분포되어있는 신경 전달 물질 억제제로, 뇌혈류 개선, 뇌세포 대사기능 촉진, 혈압 감소, 신경안정, 우울증 완화, 중풍·치매 완화, 암세포 억제, 진통 치료에 쓰이고 있어 차세대 의약품 및 건강식품 소재로 활용되고 있다 [1, 25, 26, 27]. GABA는 탄소/질소 비율 대사에 있어 신호전달 물질로 중요한 역할이 발견되었으며 기계적 자극, 저온·열 손상, 암 조건, 저산소증을 포함한 다양한 스트레스에 의해 식물 여러 조직에서 생성되는 것으로 보고되어 있다 [3, 5, 31]. 다수의 생리활성작용이 확인된 GABA는 의약품 개발뿐만 아니라 기능성 식품소재로도 주목을 받고 있으며 식물체에도 다수 함유되어 있어 곡류를 포함하여 작물을 대상으로 연구가 확대되고 있다. 이들은 경구 섭취가 가능하며 GABA 함량이 강화된 발아 현미 등을 포함한 곡류가 시판되고 있을 뿐만 아니라 대량생산 연구가 활발히 진행되고 있다. 클로렐라 등의 미세조류에서도 다양한 조건에 맞춰 GABA를 증강 시키기 위한 연구가 시도되고 있으나 아직 함량이 미미한 수준이다.

본 연구의 재료로 사용된 미세조류 *Chlorella protothecoides*는 주로 혼합배양에서 종속영양 배양으로 바이오디젤 생산에 관한 연구가 확대 진행되고 있다 [23, 33]. 주로 혼합영양배양에서 지질을 포함한 유용물질 원료가 많이 생산되는 것으로 보고되고 있다 [13]. 목적하는 기능성 소재를 생산하기 위해서

는 무엇보다 배양방식이 중요하다. 본 연구에서는 기능성 소재 개발을 목적으로 비교적 쉽게 배양이 가능한 *C. protothecoides*의 혼합영양 배양방식을 통하여 GABA 및 아미노산 조성과 함량을 분석하였다. 분석된 GABA 함량을 통해 고부가가치 기능성 미세조류로써 발전 가능성을 검토하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 미세조류 및 배양 조건

본 연구에 사용한 클로렐라는 *Chlorella protothecoides* ATCC30407 (=UTEX 25)는 1 g/L의 프로테오스 펩톤(proteose peptone)을 함유하는 Bristol사면 배지(pH 6.8) 상태로 계대 배양하였다. Bristol 배지 조성은 2.94 mM NaNO<sub>3</sub>, 0.17 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.3 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.43 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.29 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 및 0.43 mM NaCl이다.

*C. protothecoides* 혼합영양 배양 시스템은 Bristol 기본 배지에 질소원과 탄소원으로 각각 0.01% urea 및 4.0% glucose가 첨가된 Bristol 배지 2L가 기본으로 제조된 5L 배양장치 (LiFlus GX, Biotron Inc., Korea)를 이용하여 121°C에서 15분간 멸균, 냉각 후 사용하였다. 이 장치에 전 배양액을 접종 후 교반 속도 150 rpm으로, 광주기 14 h:10 h (light:dark), 배양 온도 20°C, 광도 3200 lux 가 공급되는 저온배양기에서 3일간 배양하였다.

### 클로렐라 수확

혼합영양 배양된 *C. protothecoides*를 수확하기 위해 783 x g에서 10분간 원심분리하여 배지와 클로렐라 분리 후 증류수를 사용하여 수확한 클로렐라에 남아있는 배지를 제거하였다. 클로렐라는 동결 건조 후 분석에 사용하였다.

### 아미노산과 당 분석

분쇄된 시료는 75% EtOH을 첨가하여 1시간 초음파추출 후 24시간 동안 상온에서 반응시켜 추출하였다. 추출한 시료는 0.2  $\mu$ m membrane filter로 여과한 다음 고형분을 모아서 75% EtOH로 반복 추출하여 최종 얻어진 추출액을 분석 시료로 이용하였다.

아미노산 분석을 위하여 추출된 분석 시료와 아미

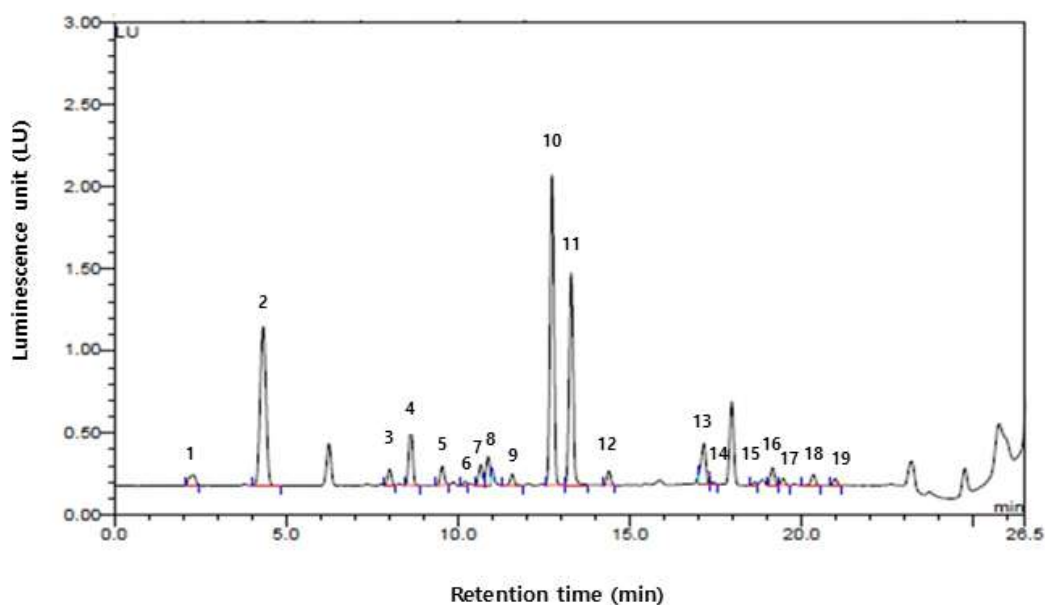
노산 표준품 aspartic acid, glutamic acid, serine, histidine, glycine, threonine, alanine, arginine, tyrosine, valine, methionine, phenylalanine, isoleucine, leucine, lysine, proline, cysteine (PN 5061-3330, Agilent Technologies, USA), glutamine, asparagine, tryptophan, hydroxy proline (PN 5062-2478, Agilent Technologies, USA), taurine, GABA (Sigma-Aldrich, USA)를 borate buffer (PN 5061-3339, Agilent Technologies, USA), o-phthaldialdehyde/2-mercaptopropionic acid (OPA/MPA) (PN 5061-3335, Agilent Technologies, USA), fluorenylmethoxycarbonyl chloride (FMOC) (PN 5061-3337, Agilent Technologies, USA)를 이용하여 단계적으로 혼합 후 Ultimate 3000 (Dionex, USA) HPLC과 VDSpher 100C18-E (4.6 X 150 mm, 3.5  $\mu$ m, Germany)을 이용하여 형광검출기 1차(Emission: 450 nm, Excitation: 340 nm; OPA)와 2차(Emission: 305 nm, Excitation: 266 nm; FMOC)로 분석하였다. 이동상으로 인산수소이 나트륨(20mM sodium phosphate dibasic, pH 7.8)과 물:아세트나이트릴:메탄올 (10:45:45, v/v%) 혼합액을 사용하였으며, 유속 1.5 ml/min, 시료 주입량 0.5  $\mu$ l, 컬럼 온도 40°C, 시료 온도 20°C에서 UV detector를 사용하여 338nm에서 분석하였다. 표준품과 시료의 아미노산 성분에 대한 retention time을 비교 확인하고 표준품 검량 곡선을 개별적으로 작성 후 peak 면적으로 각 아미노산 함량을 산출하였다.

당 분석은 HPLC (Ultimate 3000, Dionex, USA), Detector (Shodex RI-101, Japan), Sugar-pak column (300  $\times$  6.5 mm, USA)을 사용, 3차 증류수를 용매로 0.5 ml/min 속도로 당 시료 10  $\mu$ l 주입하여 실행하였다. 유리당 표준품으로 glucose, sucrose, fructose, xylose, maltose, lactose, mannose, (Sigma-Aldrich, USA)를 혼합하여 증류수에 녹인 다음 이를 적정 농도로 희석하여 표준 용액 조제 후 검량 곡선을 작성하여 당 함량을 산출하였다. 분석 시스템 (Chromeleon Ver. 6 Chromatography Data Software, Dionex, USA)을 이용하여 최종 분석하였다.

## 결과 및 고찰

본 실험의 *C. protothecoides* 혼합영양 배양을 통해 확보된 시료를 대상으로 GABA를 포함한 아미노산

조성과 함량 분석결과는 다음과 같다. 비교 표준품으로 사용한 23개 아미노산 중 proline, cysteine, hydro proline, taurine 을 제외한 19종의 아미노산이 최종 검출되었다. HPLC 시스템으로 아미노산 분석한 결과 retention time은 aspartic acid 2.3분, glutamic acid 4.33분, asparagine 8.02분, serine 8.63분, glutamine 9.55분, histidine 10.22분, glycine 10.67분, threonine 10.88분, arginine 11.58분, alanine 12.75분, GABA 13.30분, tyrosine 14.40분, valine 17.16분, methionine 17.43분, tryptophan 18.65분, phenylalanine 19.16분, isoleucine 19.46분, leucine 20.34분, lysine 20.94분으로, 21분 이내에 모두 분리되었다(Fig. 1). Glutamic acid, alanine, GABA 등 총 19종의 아미노산 중에서 glutamic acid는 건조중량 100g 당 161.910mg이 함유되어 있어 총 아미노산 함량 대비 33.10%로 가장 많이 함유되어 있었다(Table 1). Glutamic acid는 아미노산 생합성 기본 물질로 다른 아미노산 전환 시 aminotransferase 에 의해 아미노기를 전달하는 것으로 아미노산과 당 및 지방 대사에 중요하다 [10]. 두 번째로 alanine이 건조중량 100g 당 100.150mg 함유되어 전체 아미노산 중 20.48%, 세 번째로 GABA가 건조중량 100g 당 85.501mg으로 17.48%가 함유되어 있었다. 다음으로, serine, tyrosine, threonine 순으로 전체 아미노산 함량의 4.68%, 3.69%, 2.85%를 각각 차지하였다(Fig. 2). 이는 클로렐라 일반 배양에서 분석되는 아미노산 함량과 차별되는 결과이다 [6, 12]. Glutamic acid, alanine 및 GABA가 전체 아미노산의 71.06% 비율을 차지하고 있어 *C. protothecoides* 의 혼합영양 배양조건에서 주요 아미노산임을 알 수 있었다. 이는 옥외 배양장에서 빠른 생육속도를 가진 *Chlorella* sp. CMS-1 의 열수 추출물 조건에서 주요 구성 아미노산과 일치한다 [7]. 여러 보고에 의하면 GABA 생성기작을 이용하여 혐기 처리된 녹차잎의 대사과정에서도 GABA와 alanine이 대량 축적 될 뿐만 아니라, GABA가 축적되기 위해서는 GABA 전구체인 glutamic acid가 증가가 필요하고 이들 경로를 통해 alanine, GABA 등이 저장되는 등 본 결과를 뒷받침해주고 있다 [8, 9]. 식물에서 GABA는 다양한 스트레스 반응에 대하여 glutamic acid로부터 succinate에 이르는 GABA shunt 경로를 통해 빠르게 대사 작용을 하여 생성량을 증가시킨다 [31]. GABA는 박테리아에서부터 고등 생물에까지 폭넓게 존재할 뿐



**Figure 1.** HPLC chromatogram of amino acids including GABA identified in mixotrophic culture of *C. protothecoides* sample. Peak assignments: 1 Aspartic acid; 2 Glutamic acid; 3 Asparagine; 4 Serine; 5 Glutamine; 6 Histidine; 7 Glycine; 8 Threonine; 9 Arginine; 10 Alanine; 11 GABA; 12 Tyrosine; 13 Valine; 14 Methionine; 15 Tryptophan; 16 Phenylalanine; 17 Isoleucine; 18 Leucine; 19 Lysine.

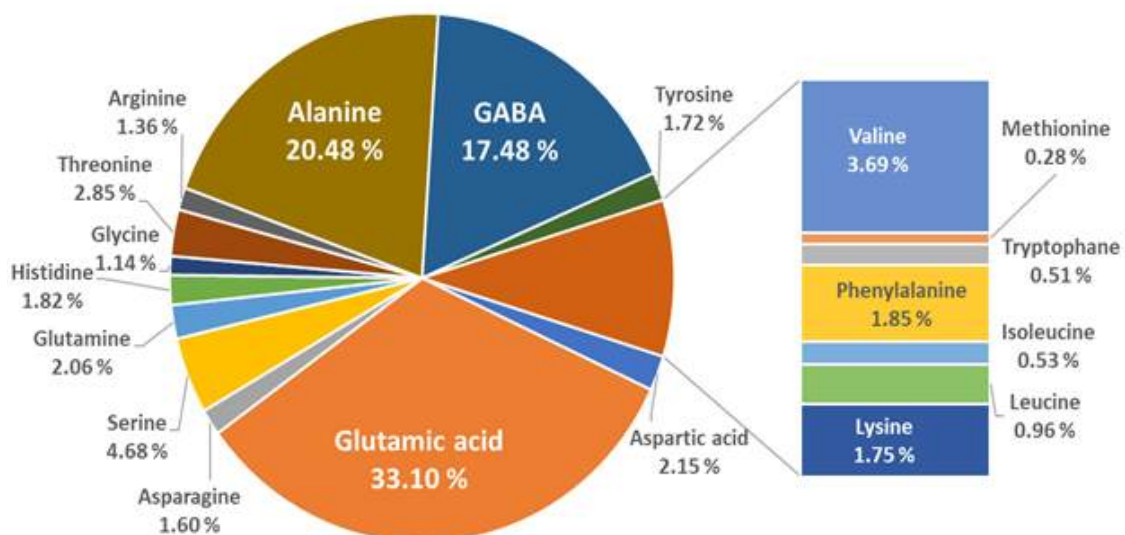
**Table 1.** Contents analysis of amino acids including GABA in mixotrophic culture of *C. protothecoides* sample.

No.	Retention Time (min)	Peak name	Height (LU)	Area (LU*min)	Contents (mg/100g of dry weight)
1	2.30	Aspartic acid	0.066	0.014	10.537
2	4.33	Glutamic acid	0.971	0.189	161.910
3	8.02	Asparagine	0.095	0.012	7.833
4	8.63	Serine	0.363	0.047	22.876
5	9.55	Glutamine	0.117	0.015	10.067
6	10.22	Histidine	0.027	0.004	8.890
7	10.67	Glycine	0.126	0.016	5.552
8	10.88	Threonine	0.174	0.025	13.959
9	11.58	Arginine	0.070	0.009	6.654
10	12.375	Alanine	1.891	0.244	100.150
11	13.30	GABA	1.291	0.175	85.501
12	14.40	Tyrosine	0.085	0.011	8.414
13	17.16	Valine	0.025	0.041	18.061
14	17.43	Methionine	0.018	0.002	1.353
15	18.65	Tryptophane	0.019	0.003	2.482
16	19.16	Phenylalanine	0.104	0.014	9.035
17	19.46	Isoleucine	0.041	0.005	2.588
18	20.34	Leucine	0.066	0.006	4.701
19	20.94	Lysine	0.041	0.009	8.570
<b>Total</b>			<b>5.815</b>	<b>0.811</b>	<b>489.133</b>

만 아니라 특히 식물계에도 널리 분포된 생리활성물질로서 쌀아 현미, 차, 빵잎 등에 고함량으로 존재하나, 약리작용을 하기에는 한계치가 있다. 그러나, GABA의 상업적 중요성으로 식물에서 혐기성, 열, 기계적 자극을 이용하여 GABA 함량을 증가시키는 등 생물학적인 방법으로 GABA를 생산을 증대시키고 제품에 적용하는 다양한 연구들이 진행되어왔다. GABA 추출물 및 GABA를 포함한 다양한 식품들이 동물을 포함한 인간의 콜레스테롤 강하효과, 혈압조절효능 등이 있으며, GABA 성분이 풍부한 클로렐라 섭취와 운동이 병행될 경우 고혈압 쥐의 혈압 감소에 효과가 있는 것으로 보고되고 있다 [27, 30]. 또한, 클로렐라를 포함한 미세조류 세포 내에 고농도 GABA를 증가시키는 방법들이 연구되고 있으며, 낮은 pH에서 활성이 촉진된 GAD가 고농도의 GABA를 생성시키는 보고를 바탕으로 배양 배지의 pH 조절을 통하여 GABA 생성을 증가시키는 등 여러 가지 방법이 적용되고 있다 [2, 19, 20]. GABA는 중추신경계를 비롯하여 말초신경세포 발생 조절에도 관련하는 인자로 내·외분비 기능 조절 및 면역반응 등의 생리기능조절 및 생체방어에 필수불가결한 요소이며, 근육 단백질 합성을 증가시키는 성장호르몬 분비 촉진 효과가 있어 스포츠 식품소재로, 뇌 대사촉진 작용 갖는 기능성 식품소재로 주목받고 있다 [14].

*C. protothecoides*는 valine > threonine > phenylalanine > lysine > leucine > isoleucine > tryptophan > methionine 순으로 8개 필수아미노산을 고루 포함

하고 있으며 총 아미노산 함량 대비 12.14% 비율을 구성하고 있으며 유아기와 성장기에 필요한 필수 아미노산인 arginine, histidine, tyrosine이 총 아미노산 함량 대비 4.9% 차지하고 있어 영양적 면이나 기능적 식품소재로서 중요하다(Fig. 2). 또한, Glutamic acid > Alanine > Serine > Aspartic acid > Glutamine > Tyrosine > Asparagine > Arginine > Glycine 순으로 불필수아미노산은 총 아미노산 함량 대비 68.29%를 차지하고 있었다. 유리당 조성 분석 결과 sucrose와 glucose 순으로 분리되었으며 retention time은 각각 7.66분과 9.62분으로 분리되었으며, glucose가 가장 높았고 fructose, xylose, maltose, lactose, mannose는 검출되지 않았다(Fig. 3). 현재 혼합영양 배양을 통하여 *C. protothecoides*의 아미노산 함량 등의 이화학적 분석이 거의 이루어지지 않고 있다. GABA 같은 활성 물질은 특히 뇌기능과 대사 질환에 깊은 관계가 있는 것으로 주목받고 있어 본 연구에서 분석된 *C. protothecoides* 혼합영양 배양 시스템을 바탕으로 이들 추출물에 함유된 고농도 GABA의 생리학적 기전 및 임상학적 연구가 필요할 것으로 사료 된다. 또한, 기능성 건강식품으로써 효용 가치에 의해 식용으로써 안전성과 함께 활성 물질을 보충하는 연구가 부가적으로 필요하다. 미세조류에서 GABA 기능성에 대한 인식이 확대될 경우 친환경적 배양을 통한 클로렐라 관련 기능성 건강보조식품 산업의 활성화에 크게 기여할 수 있을 것으로 기대된다.



**Figure 2.** Relative ratios (%) of total amino acids contents (mg/100g of dry weight) including GABA under mixotrophic culture of *C. protothecoides* sample.

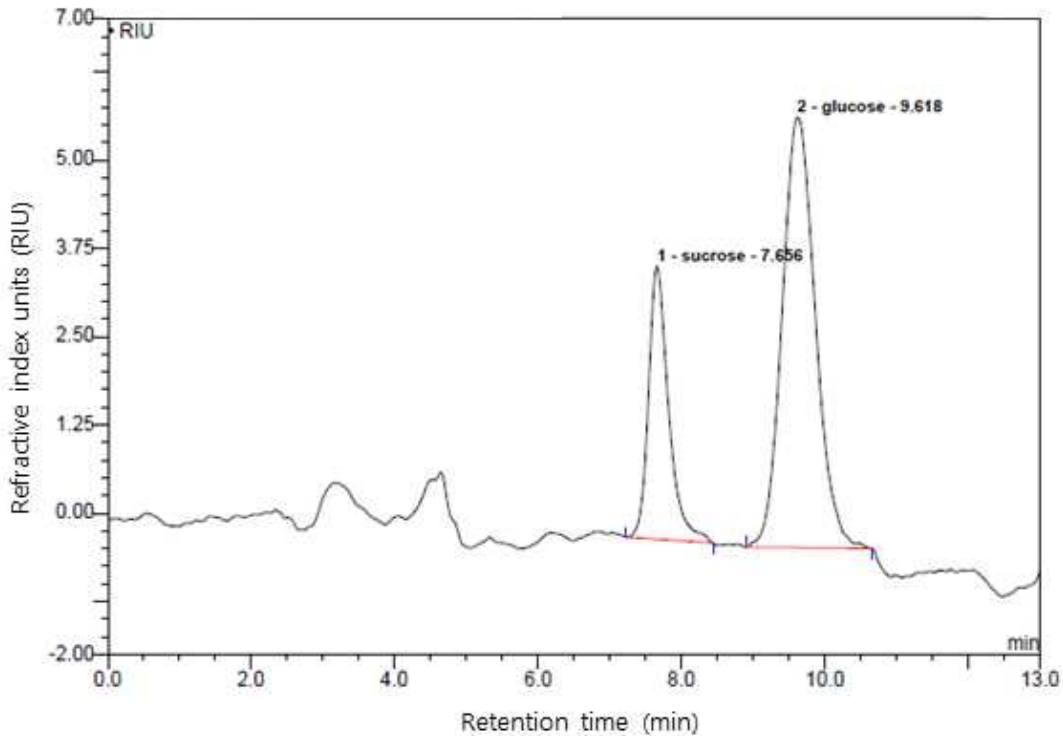


Figure 3. HPLC chromatogram of sugars in mixotrophic culture of *C. protothecoides* sample.

## 결론

클로렐라의 생리활성물질을 활용하여 기능성 식품소재 개발을 위하여 *C. protothecoides*의 혼합영양 배양 시스템에서 배양된 클로렐라를 수확하여 GABA 및 아미노산 조성과 함량을 분석하였다. 분석된 결과 *C. protothecoides*에서 glutamic acid, alanin 및 GABA가 혼합영양 배양조건에서 전체 아미노산의 각각 33.10%, 20.48%, 17.48% 비율 순으로, 총 71.06%을 함유하고 있어 이들 조건에서 주요 아미노산으로 분석되었다. 전체 아미노산 중 8대 필수아미노산이 12.14% 함유하고 있었으며 유아기와 성장기에 필요한 아미노산도 총 아미노산 함량 대비 4.9% 차지하였다. 이들 결과를 종합하면 *C. protothecoides*의 혼합영양 배양 시스템을 통하여 뇌기능과 대사질환 관련 GABA의 생성 양이 증가하는 최초의 보고이다. 이 결과를 바탕으로 단백질과 각종 비타민, 미네랄, 식이섬유, 엽록소가 고루 들어 있는 클로렐라에서 혼합영양 배양을 이용하여 효과적으로 GABA 생리활성물질을 포함한 영양학적 기능적 측면이 증가된 고부가가치 미세조류 산물을 얻을 수 있을 것으로 기대한다.

## 감사의 글

본 연구는 2013년도 중소기업 기술혁신개발사업 과제(Project No. S2083787) 지원으로 수행된 연구의 일부로, 이에 감사드리며 아미노산 및 당 분석을 도와주신 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM) 분석팀에 감사드립니다.

## References

1. Adeghate, E. and Ponery, A. S. 2002. GABA in the endocinepancreas: cellular localization and function in normal and diabetic rats, *Tissue Cell*. **34**, 1-6.
2. Boonburapong, B., Laloknam, S. and Incharoensakdi, A. 2016. Accumulation of gamma-aminobutyric acid in the halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* under salt and acid stress. *J. Appl. Phycol.* **228**(1), 141-148
3. Bouché, N and Fromm, H. 2004. GABA in plants: Just a metabolite? *Trends Plant Sci.* 9:110-115.
4. Borowitzka M. A. 2013. High-value products from microalgae-their development and commercialisation. *J. Appl. Phycol.* **25**, 743-756.
5. Bown, A. W. and Shelp, B. J. 1997. The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Plant Physiol.* **115**,

- 1-5.
6. Brown, M. R. and Jeffrey, S. W. 1992. Biochemical composition of microalgae from the green algal classes Chlorophyceae and Prasinophyceae. 1. Amino acids, sugars and pigments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **161(1)**, 91-113.
7. Cha, J. Y., Kim, J. W. Park, B. K. Jin, H. J. Kim, S. Y. and Cho. Y. S. 2008. Isolation and identification of *Chlorella* sp. CMS-1 and the chemical composition of its hot water extract. *J. Life Sci.* **18**, 1723-1727.
8. Chang, J. S., Lee, B. S. and Kim, Y. G. 1992. Changes in  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and the main constituents by a treatment conditions and of anaerobically treated green tea leaves. *Korean J. Food Sci. Technol.* **24**, 315-319
9. Chen, H., Zheng, Y., Zhan, J., He, C. and Wang, Q. 2017. Comparative metabolic profiling of the lipid-producing green microalga *Chlorella* reveals that nitrogen and carbon metabolic pathways contribute to lipid metabolism. *Biotechnol. Biofuels.* **10**, 153
10. Cho, S. H., Kwon, O. S., Kwon, H. B., Kim, S. Y., Kim, W. S., Kim, C. K., Park, S. S., Bae, J. H., Lee, C. J., Chang, S. H., Jeong, H. S. and Choi, J. W. 2007. Concepts in Biochemistry, pp. 597-600, third, ed. Worldsci. Korea.
11. Dhakal, R., Bajpai, V. K. and Baek, K. H. 2012. Production of GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.* **43**, 1230-1241.
12. Endo, H., Nakajima, K., Chino, R. and Shirota, M. 1974. Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growing strain. *Agr. Biol. Chem.* **38(1)**, 9-18.
13. Heredia-Arroyo, T., Wei, W. and Hu B. 2010. Oil accumulation via heterotrophic/mixotrophic *Chlorella protothecoides*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **162(7)**, 1978-1995.
14. Ge, S, Pradhan, D. A., Ming G. L. and Song, H. 2007. GABA sets the tempo for activity-dependent adult neurogenesis. *Trends Neurosci.* **30**, 1-8.
15. Guccione, A., Biondi, N., Sampietro, G., Rodolfi, L., Bassi, N. and Tredici, M. R. 2014. *Chlorella* for protein and biofuels: from strain selection to outdoor cultivation in a green wall panel photobioreactor. *Biotechnol. Biofuels.* **7(1)**, 84.
16. Guzman, S., Gato, A. and Calleja, J. M. 2001. Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytother. Res.* **15**, 224-230.
17. Guzman, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal M. and Calleja. J. M. 2003. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricorutum*. *Phytother. Res.* **17**, 665-670.
18. Hasegawa, T., Matsuguchi, T., Noda, K., Tanaka, K., Kumamoto, S., Shoyama, Y. and Yoshikai, Y. 2002. Toll-like receptor 2 is at least partly involved in the antitumor activity of glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 579-589.
19. Huo, S., Wang, Z., Zhu, S., Zhou, W., Dong, R. and Yuan, Z. 2012. Cultivation of *Chlorella zofingiensis* in bench-scale outdoor ponds by regulation of pH using dairy wastewater in winter, South China. *Bioresour. Technol.* **121**, 76-82.
20. Lane, T. R. and Stiller, M. 1970. Glutamic acid decarboxylation in *Chlorella*. *Plant Physiol.* **45**, 558-562
21. Leu, S. and Boussiba S. 2014. Advances in the production of high-value products by microalgae. *Ind. Biotechnol.* **10**, 169-183.
22. Merchant, R. E., Andre, C. A. and Sica, D. A. 2002. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* for mild to moderate hypertension. *J. Med. Food.* **5**, 141-152.
23. Miao, X. and Wu, Q. 2006. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. *Bioresour. Technol.* **97(6)**, 841-846.
24. Miranda, M. S., Sato, S. and Mancini-Filho, J. 2001. Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultured on special condition. *Boll. Chim. Farm.* **140**, 165-168.
25. Mody, I., De Koninck, Y., Otis, T. S. and Soltesz, I. 1994. Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci.* **17**, 517-525.
26. Oh, C. H. and Oh, S. H. 2004. Effect of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. *J. Med. Food.* **7**, 19-23.
27. Ohmori, M., Yano, T., Okamoto, J., Tsushida, T., Murai, T. and Higuchi, M. 1987. Effect of anaerobically treated tea (Gabaron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats, Nippon Nogei Kagaku Kaishi. **61**, 1449-1451.
28. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y. and Vaca-Garcia, C. 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Ren. Sustain. Energy Rev.* **35**, 265-278.
29. Shibata. S., Natori, Y., Nishihara, T., Tomisaka, K., Matsumoto, K., Sansawa, H. and Nguyen, V. C. 2003. Antioxidant and anti-cataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **49**, 334-339.
30. Shimada, M., Hasegawa, T., Nishimura, C., Kan, H., Kanno, T., Nakamura, T. and Matsubayashi, T. 2009. Anti-hypertensive effect of gamma-aminobutyric acid

- (GABA)-rich *Chlorella* on high-normal blood pressure and borderline hypertension in placebo-controlled double blind study. *Clin. Exp. Hypertens.* 31(4):342-54.
31. Snedden, W. A. and Fromm, H. 1998. Calmodulin, calmodulin related proteins and plant responses to the environment. *Trends. Plant Sci.* 3, 299-304.
32. Won, S. Y., Kim, J., Lee, M. and Oh, K. 2013. The effect of GABA-enriched *chlorella* intake and voluntary wheel running on blood pressure, running distance and antioxidant enzyme in spontaneously hypertensive rats. *Exerc. Sci.* 22(1), 34-42.
33. Xu, H., Miao, X. and Wu, Q. 2006. High quality biodiesel production from a microalga *Chlorella protothecoides* by heterotrophic growth in fermenters. *J. Biotechnol.* 126(4), 499-507.