Microbiol. Biotechnol. Lett. (2021), 49(4), 559–565
http://dx.doi.org/10.48022/mbl.2107.07010
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

MBL
Microbiology and Biotechnology Letters

Lactic Acid Bacteria (LAB)와 5-L 발효기를 이용한 γ-Aminobutyric Acid 생산기술 개발

김나연†, 김지민†, 라채훈*
한경대학교 식품생명공학과

Received: July 23, 2021 / Revised: September 27, 2021 / Accepted: November 1, 2021

Evaluation of γ-Aminobutyric Acid (GABA) Production by Lactic Acid Bacteria Using 5-L Fermentor

Na Yeon Kim†, Ji Min Kim†, and Chae Hun Ra*
Department of Food Science and Biotechnology, College of Engineering, Global K-Food Research Center, Hankyong National University, Anseong 17579, Republic of Korea

This study aimed to optimize gamma-aminobutyric acid (GABA) production by employing five strains of lactic acid bacteria (LAB) that were capable of high cell growth and GABA production using a modified synthetic medium. GABA production in the strains was qualitatively confirmed via detection of colored spots using thin layer chromatography. *Lactobacillus plantarum* SGL058 and *Lactococcus lactis* SGL027 were selected as the suitable strains for GABA production. The conditions of the carbon and nitrogen sources were determined as 5 g/l glucose (*L. plantarum* SGL058), 5 g/l lactose (*L. lactis* SGL027), 10 g/l yeast extract (*L. plantarum* SGL058), and 20 g/l yeast extract (*L. lactis* SGL027) for GABA production. The cell growth, monitored by optical density at 600 nm, was 5.93 for *L. plantarum* SGL058. This value was higher than the 3.04 produced by *L. lactis* SGL027 at 36 h using a 5-L fermenter. The highest concentration of GABA produced was 546.7 μg/ml by *L. plantarum* SGL058 and 404.6 μg/ml by *L. lactis* SGL027, representing a GABA conversion efficiency of (%, w/w) of 4.0% and 3.4%, respectively. The fermentation profiles of *L. plantarum* SGL058 and *L. lactis* SGL027 provide a basis for the utilization of LAB in GABA production using a basal synthetic medium.

Keywords: Rice bran, pre-column derivatization, γ-aminobutyric acid, *Lactobacillus plantarum* SGL058, *Lactococcus lactis* SGL027

서 론

유산균은 자연계에 광범위하게 분포하며, 젖산을 포함한 다양한 대사산물을 생산하는 프로바이오틱스(probiotics)로서 김치, 요구르트 등의 발효식품의 종균(starter)으로 사용되고 있다[1]. 식품의 발효에서 유산균은 유기산과 젖산을 생성하는 중요한 역할을 하는데, 발효제품의 신맛과 저장성을 향상시켜 주며, 기능성물질인 γ-aminobutyric acid (GABA)를 생산하는 특징을 가지고 있다[2, 3].

***Corresponding author**
Tel.: +82-31-670-5157, Fax: +82-504-437-0217
E-mail: chra@hknu.ac.kr
†These authors contributed equally to this work.

여러 생리활성 물질 중에서도 GABA는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 4개의 탄소로 구성되어 있으며, 물에 잘 녹는 물질이다[4]. GABA는 L-glutamic acid로부터 glutamate decarboxylase의 촉매작용에 의해 탈탄산 및 생합성 되며, 혈압상승, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 증가 억제, 뇌의 혈류 개선, 항비만, 항불안 및 통증 완화 등의 다양한 생리활성을 가지고 있어 기능성 식품소재로 많이 이용되는 물질이다[2]. 따라서 많은 연구자들이 GABA 생성 유산균에 대한 연구를 수행하고 있고, 유산균에 monosodium glutamate (MSG)를 첨가하여 GABA 생성량을 증가시키는 연구 또한 활발히 이뤄지고 있다[5–7].

본 연구에서는 5종의 유산균을 이용한 GABA 생산능력 검토와 GABA 생산에 대한 배양 배지 조성으로 탄소원 및 질소원의 종류와 농도에 대한 실험을 진행하였다. 또한 곡류

© 2021, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

소재에 민감한 반응을 가지고 있는 2-hydroxynaphthaldehyde 시약으로 유도체화(pre-column derivatization) 진행한 후 GABA 농도를 분석하였다. 그리고 GABA 생산능력이 우수한 유산균을 이용하여 5-L 발효기에서 효율적인 GABA 발효에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 실험재료

실험에 사용된 유산균 *Lactobacillus plantarum* SGL058, *Lactococcus lactis* SGL027, *Lactobacillus rhamnosus* HWL201는 한국프로바이오틱스은행(Korean Culture Collection of Probiotics, Korea)에서 분양을 받아 사용하였다. 또한 *Lactobacillus casei* KCCM 12452, *Streptococcus thermophilus* KCCM 40430는 (사)한국종균협회 부설 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, Korea)에서 분양받아 사용하였다. 5종의 유산균을 이용하여 GABA 생산능력을 검토하였으며, GABA 생성을 확인하는 방법으로 Difco™ Lactobacilli MRS broth (Becton, Dicknson and Company, USA)를 이용하여 1% (w/v)의 monosodium glutamate (MSG)가 포함된 배지를 제조하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약들은 reagent grade로 Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구매하였다.

Thin-Layer chromatography(TLC) 분석방법

5종의 유산균에 대한 seed culture는 MRS broth를 100 ml flask (working volume 30 ml)에서 121℃에서 15분간 멸균한 배지를 사용하였으며, shaking incubator에서 30℃에서 150 rpm으로 24 h 배양하였다. 5종의 유산균을 이용하여 GABA 생산능력을 비교하기 위해 250 ml Erlenmeyer flask (working volume 100 ml)에서 10 g/l MSG가 함유된 MRS broth를 제조하였으며, 이에 seed culture에서 배양한 균주를 5% (v/v)의 양으로 접종하여 같은 배양 조건으로 72 h 동안 발효를 진행하였다.

MSG 및 GABA의 정성분석을 위해 실리카 젤로 코팅한 TLC plate (Merck, Germany)를 사용하였고, TLC 전개는 사각 chamber (30 cm wide × 10 cm deep × 27 cm high)에서 수행하였다. 전개용매는 n-butyl alcohol:acetic acid:water를 5:3:2 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 chamber안에 첨가하였고 실온에서 3 h 이상 포화시켰다. MSG와 GABA 표준 샘플(standard)은 0.1% (w/v) 농도로 TLC plate 아래 15 mm 되는 위치에서 2 μl를 점적하였고, 5종의 유산균 발효액은 원심분리 후 상등액을 2 μl를 점적하였다. 점적 후에 TLC plate를 건조한 다음 전개하였고, 전개가 끝난 TLC plate는 50℃ 건조기에서 건조시킨다. 건조된 TLC plate에 발색 시약인 0.2% (w/v) ninhydrin 용액을 처리하고, 5–10분동안 발색 시킨 후 발효 상등액의 MSG와 GABA spot을 확인하였다.

탄소원 및 질소원의 종류와 농도에 따른 GABA 생산 최적화

One-Factor-at-a-Time (OFAT) 방법[8]을 이용하여 다른 공정 변수들은 고정시켜 두고, 한 번에 한 개의 변수만 변화시키면서 GABA 생성의 영향을 확인하였다. GABA 발효는 250 ml Erlenmeyer flask에서 working volume 100 ml으로 30℃, 150 rpm, 72 h 동안 진행하였다. Sucrose, galactose, glucose, lactose, fructose를 각각 20 g/l로 synthetic medium에 첨가하는 탄소원으로 사용하였다. 이후 선택된 탄소원에 대해 2.5–30 g/l 농도로 synthetic medium에 첨가한 뒤, 적합한 탄소원 농도를 확립하였다. 또한 질소원은 soytone, yeast extract, tryptone, beef extract, NH_4NO_3, NH_4Cl를 각각 20 g/l로 synthetic medium에 첨가한 후 GABA 생산량이 높은 질소원을 선택하였다. 그리고 5–40 g/l의 질소원 농도를 각각 synthetic medium에 첨가하여 적합한 질소원 농도를 확립하였다. 첨가 배지조성으로 1 g/l ascorbic acid (vitamin C), 5 g/l K_2HPO_4, 0.25 g/l $MgSO_4$, 30 g/l MSG를 추가로 배지에 첨가하였다.

5-L 발효기를 이용한 GABA 생산

발효균주는 *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027를 사용하였다. Seed culture는 modified synthetic medium을 250 ml Erlenmeyer flask에서 working volume 150 ml로 24 h 동안 배양하였다. 유산균을 이용한 GABA발효는 5-L 발효기(BIOCANVAS LF-5, CENTRION Company Ltd., Korea)에서 working volume 3 L로 30℃, 150 rpm, 144 h 동안 발효를 수행하였다. 5-L 발효 배지 조성은 5 g/l glucose or lactose, 10–20 g/l yeast extract, 100 g/l rice bran extract, 1 g/l ascorbic acid (vitamin C)으로, 추가 배지성분으로 5 g/l K_2HPO_4, 0.25 g/l $MgSO_4$, 30 g/l MSG를 따로 멸균하여 배지에 첨가하였다. 일정 시간마다 시료를 채취하여 HPLC를 사용하여 생성된 GABA 농도를 분석하였다.

GABA 전환 수율(E_{GC}, %)은 다음 식 (1)로 나타낼 수 있다.

$$E_{GC}\ (\%,\ w/w) = [(GABA)_{inc}/(MSG)]_{cons} \times 100 \qquad (1)$$

여기서 $[GABA]_{inc}$은 유산균 발효로 인해 생성되는 최종 GABA의 농도(g/l)이며, $[MSG]_{cons}$는 유산균 발효 중 사용된 총 MSG의 농도(g/l)이다.

분석방법

세포의 성장은 UV-visible spectrophotometer (EMC-18PC-UV, EMCLAB®, Germany)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유도체(pre-column derivatization) 방

http://dx.doi.org/10.48022/mbl.2107.07010

법은 시료 1 ml에 2-hydroxynapthaldehyde (2.5% in methanol)를 1 ml 첨가한 후 borate-NaOH (pH 8.0) 0.5 ml을 첨가한 다음 85℃ 항온수조에서 15분간 반응시킨 후 상온에서 냉각하였다. 반응시료에 methanol 2.5 ml을 첨가하여 총 시료양을 5 ml로 조절한 이후 HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent. Inc., USA) 분석을 진행하였다. GABA와 MSG 측정은 HPLC와 UV 검출기(254 nm)를 이용하였다. 컬럼은 SUPERSIL ODS I-C18 column (250 × 4.6 mm)을 사용하여 온도 30℃, 이동상 acetonitrile(A)와 0.1% acetic acid (pH 4.8) (B)로 gradient 조건을 0 min, (B) 용액 75%; 2 min, (B) 용액 75%; 32 min, (B) 용액 40%; 45 min, (B) 용액 75%으로 적용하였다. 그리고 유속을 0.8 ml/min로 흘려 시료를 52 min 동안 분석하였다. 실험결과 값은 3반복 데이터를 사용하여 평균값과 표준편차(mean ± SD) 값으로 표현하였다.

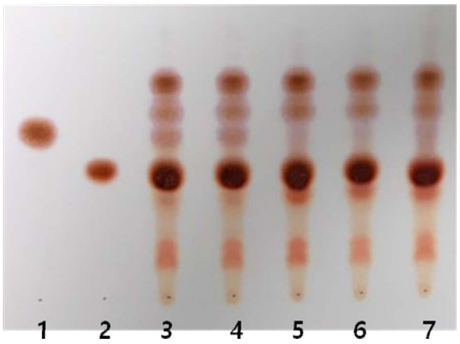

Fig. 1. TLC analysis of MSG and GABA contents from five LAB strains. Lane 1, GABA control; lane 2, MSG control; lane 3, *L. plantarum* SGL058; lane 4, *L. lactis* SGL027; lane 5, *L. rhamnosus* HWL201; lane 6, *L. casei* KCCM 12452; lane 7, *S. thermophilus* KCCM 40430.

결과 및 고찰

GABA 생성 균주 확인

L. plantarum SGL058, *L. lactis* SGL027, *L. rhamnosus* HWL201, *L. casei* KCCM 12452와 *S. thermophilus* KCCM 40430 등 5종의 유산균에 의한 발효물의 GABA 함량 변화를 측정하기 위해, 1% (w/v) MSG가 포함된 각각의 MRS broth 발효물(72 h)을 희석한 후 원심 분리하여 얻은 상등액을 TLC 분석방법을 이용하여 정성분석 하였다(Fig. 1). 그 결과 *L. plantarum* SGL058 (lane 3)과 *L. lactis* SGL027 (lane 4)에서 GABA가 생성되는 것을 볼 수 있었으며, 따라서 *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027를 GABA 생성능력이 우수한 균주로 최종 선택하였다.

Fig. 2(A)는 MSG와 GABA 성분의 HPLC standard peak 이며, Fig. 2(B)는 synthetic medium을 이용한 LAB 발효에서 샘플을 유도체화(pre-column derivatization) 한 뒤 MSG와 GABA 농도를 측정한 HPLC 분석결과이다. Fig. 2(A)에서 standard 용액의 MSG는 5.06 min에, GABA는 12.57 min에 peak를 확인하였다. 또한 Fig. 2(B)에서 synthetic medium 발효물의 MSG는 5.04 min에, GABA는 13.00 min에 peak를 확인하였다.

탄소원 및 질소원에 따른 배지 조성 최적화

탄소원에 따른 배지조성은 sucrose, galactose, glucose, lactose, fructose를 각각 20 g/l로 첨가한 synthetic medium을 250 ml Erlenmeyer flask에서 working volume 100 ml으로 30℃, 150 rpm, 72 h 동안 발효를 진행하였다. 그 결과 Fig. 3(A)에서 *L. plantarum* SGL058은 glucose에서 가장 높은 338.1 μg/ml의 GABA농도를 생산하였고, *L. lactis* SGL027은 lactose에서 가장 높은 111.4 μg/ml의 GABA를

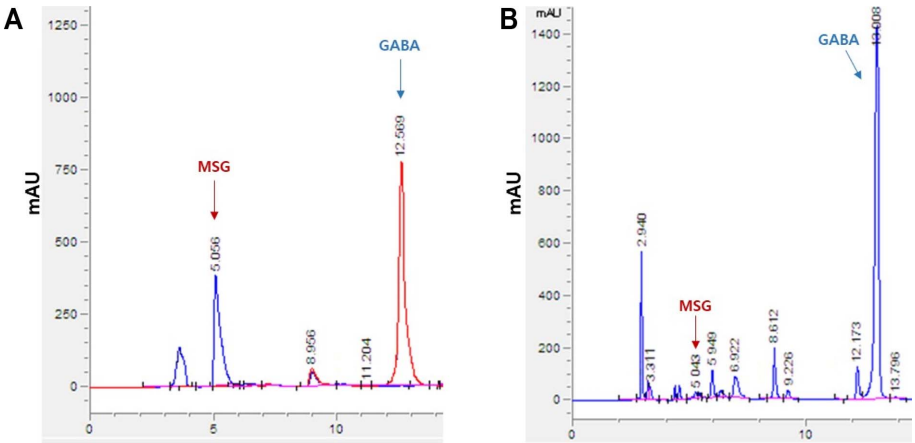

Fig. 2. HPLC chromatogram of 2-hydroxynaphthaldehyde derivatives with GABA and MSG. (A) MSG and GABA standard, (B) *L. plantarum* SGL058 fermentation broth (48 h).

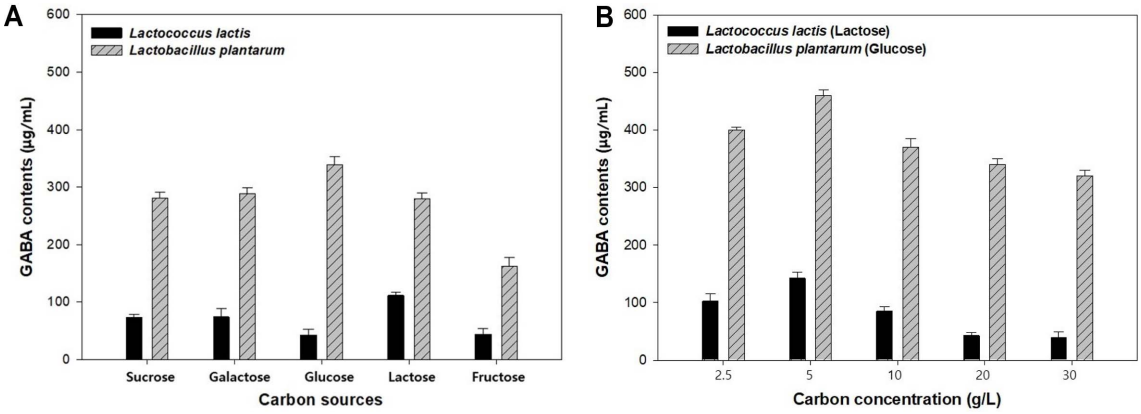

Fig. 3. Effects of the carbon sources (A) and concentrations on GABA production by *L. plantarum* SGL058 and *L. lactis* SGL027. The initial basal synthetic medium composition was 20 g/l carbon, 20 g/l yeast extract, 100 g/l rice bran extract, 1 g/l ascorbic acid, 30 g/l MSG, and nutrient supplements. The pH was 6.0, the temperature was 30℃, and fermentation was conducted for 72 h.

생산하였다. 따라서 *L. plantarum* SGL058은 탄소원을 glucose로, *L. lactis* SGL027은 탄소원을 lactose로 각각 선택하여 2.5, 5, 10, 20, 30 g/l 등의 탄소원 농도 실험을 진행하였다. 그 결과 Fig. 3(B)에서 *L. plantarum* SGL058은 5 g/l의 glucose에서 460.0 μg/ml의 GABA를 생산하였고, 또한 *L. lactis* SGL027도 5 g/l의 lactose에서 142.6 μg/ml의 GABA를 생산하였다. *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027 균주 모두 탄소원 농도가 증가할수록 GABA 농도가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 Wang [9]의 논문에서 *Lactobacillus brevis* NCL912가 낮은 농도의 탄소원을 사용하였을 때 GABA 농도가 증가한다는 실험결과와 일치한다. 따라서 고농도의 탄소원은 유산균 발효과정에서 많은 유기산을 생성시키기 때문에, 본 연구에서는 두 균주에 대한 탄소원 농도를 5 g/l로 선택하였다.

질소원 실험은 glucose (*L. plantarum* SGL058)와 lactose (*L. lactis* SGL027) 농도를 5 g/l로 고정한 뒤, soytone, yeast extract, tryptone, beef extract, NH_4NO_3, NH_4Cl 등의 질소원을 각각 20 g/l로 synthetic medium에 첨가한 후 GABA 생산량을 비교 분석하였다(Fig. 4). Fig. 4(A)에서 *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027의 발효 결과, 질소원 중 yeast extract에서 각각 457.4 μg/ml과 203.5 μg/ml으로 가장 높은 GABA 생산을 나타내었다. Fig. 4(B)는 질소원을 yeast extract로 고정한 뒤, 5–40 g/l의 yeast extract 농도를 synthetic medium에 각각 첨가하여 적합한 yeast extract 농도를 확립하였다. 그 결과 *L. plantarum* SGL058은 10 g/l의 yeast extract에서 500.8 μg/ml의 GABA를 생산

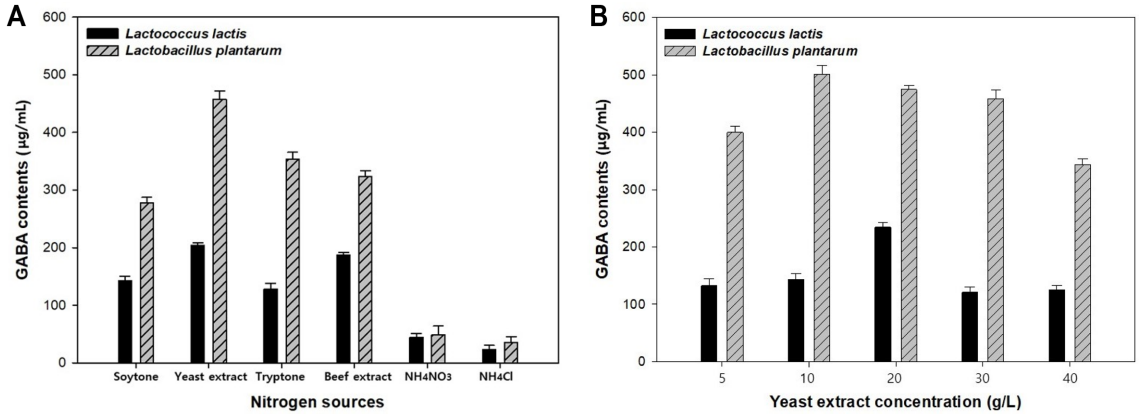

Fig. 4. Effects of the nitrogen sources (A) and concentrations on GABA production by *L. plantarum* SGL058 and *L. lactis* SGL027. The initial basal synthetic medium composition was 5 g/l carbon (glucose or lactose), 20 g/l nitrogen, 100 g/l rice bran extract, 1 g/l ascorbic acid, 30 g/l MSG, and nutrient supplements. The pH was 6.0, the temperature was 30℃, and fermentation was conducted for 72 h.

http://dx.doi.org/10.48022/mbl.2107.07010

하였고, 반면 *L. lactis* SGL027은 20 g/l의 yeast extract에서 234.3 μg/ml의 GABA를 생산하였다. 따라서 질소원인 yeast extract의 첨가량이 10–20 g/l 농도 이상 증가하면 GABA 생산량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 이는 Kook [10]의 논문에서 다양한 lactic acid bacteria를 이용한 GABA 생산 배지조성 중 yeast extract가 3–10 g/l에서 최적의 질소원 농도로 보고되고 있는 것과 유사한 경향을 나타내었다. 따라서 본 연구에서 *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027의 yeast extract 농도를 각각 10 g/l와 20 g/l로 선택하였다.

유산균을 이용한 GABA 발효

GABA 발효는 *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027을 30 g/l MSG가 포함된 modified synthetic medium으로 5-L fermentor를 이용하여 회분식 발효를 실시하였다. Fig. 5(A)는 *L. plantarum* SGL058를 30℃, 150 rpm으로 144 h 동안 발효한 결과이며, 36 h 동안 세포성장(optical density)과 pH의 변화는 각각 5.93 (OD_{600} nm)과 4.3으로 나타났으며, 이때 발효형태가 stationary phase로 진입하였다. 발효 36 h 이후 pH는 약간 증가하였지만, 세포 성장은 96 h에 5.93에서 4.92로 감소하였다. Wang [9]에서 유산균을 이용한 GABA발효 과정 중 pH가 점점 증가한다는 경향과 비슷하였으며, 이는 glutamic acid decarboxylase (GAD)에 의한 decarboxylation으로 MSG를 GABA로 전환하면서 이산화탄소(CO_2)의 생성과 수소(H^+)의 소비가 동시에 일어나 배양액 내의 pH가 증가한다고 보고된다. 그리고 발효 72 h동안 MSG가 13.6 g/l로 소비되었고 GABA를 546.7 μg/ml 생산하였으나 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 MSG 농도

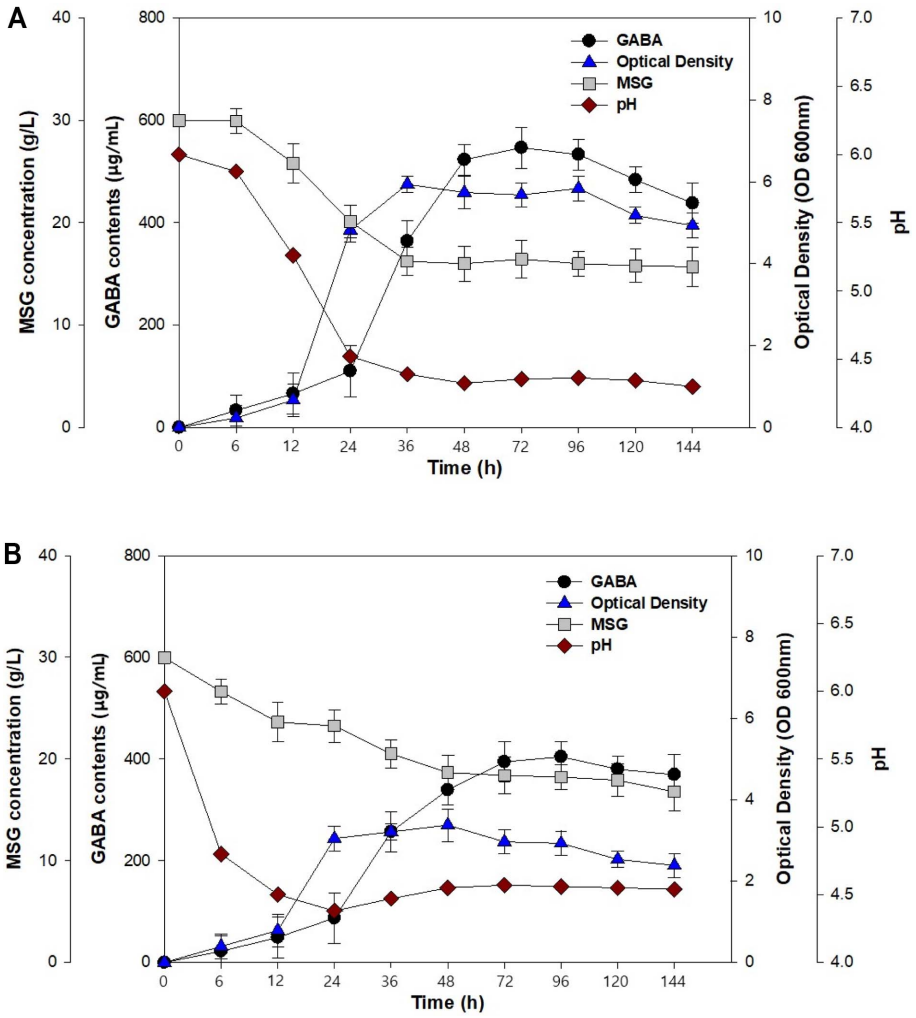

Fig. 5. Comparison of the fermentation profiles of the *L. plantarum* SGL058 (A) and *L. lactis* SGL027 (B) strains with modified synthetic medium in 5-L fermentor.

는 36 h 이후 전혀 감소되지 않았으며, 최종 GABA 전환 수율(E_{GC}, %)은 4.0% (w/w)로 확인되었다. 한편, 다양한 식품 소재인 Kimchi [11], cabbage pickle [12], honeybees [13], cheese [14], yogurt [15] 등으로부터 분리한 *L. plantarum* 균주들의 GABA 생산은 200–800 μg/ml의 농도에서 본 연구와 유사한 많은 연구결과들이 보고되고 있다. 한편, 다른 LAB (e.g., *Lactobacillus brevis* (RK03, CRL2013, GABA057; 23.4–62.5 g/l), *L. paracasei* NFRI7415 (31.1 g/l), *L. buchneri* MS (25.8 g/l), *L. rhamnosus* YS9 (19.3 g/l)) [16–21]의 높은 GABA 생산 농도에 비해 본 연구에서 사용된 *L. plantarum* 균주의 GABA 생산 농도 및 수율은 여전히 낮다는 것을 알 수 있었다. 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.

Fig. 5(B)는 *L. lactis* SGL027를 30℃, 150 rpm으로 144 h 동안 발효한 결과이다. 세포성장(optical density)과 pH의 변화는 24 h 동안 각각 3.04 (OD_{600} nm)와 4.4으로 나타났으며, 이때 stationary phase 로 진입한 이후 세포성장이 2.38 (OD_{600} nm)까지 점점 감소하였다. 배지 내의 pH 변화는 Fig. 5(A)와 유사한 경향을 보였으며, 발효과정 중 pH 변화는 영양분, 성장인자 등의 세포막 이동속도에 영향을 미치기 때문에 미생물의 증식과 GABA 대사과정에 영향을 끼쳤을 것으로 판단된다. 또한 유산균의 GAD는 대부분 pH 4.0–5.0에서 최적의 활성을 보인다는 연구결과와 일치하였다[22]. 그리고 발효 96 h동안 MSG가 11.8 g/l 소비되었고 GABA를 404.6 μg/ml 생산하였다. 이때 최종 GABA 전환 수율(E_{GC}, %)은 3.4% (w/w)를 나타내었다. 이는 Hwang 등 [23]에서 김치로부터 분리한 *Lactococcus lactis* (K339-K1006) 균주들을 이용해 MRS 배지 (5% MSG, 48 h)에서 GABA 발효를 수행한 결과, 0.08–9.60 mM (8.2–990 μg/ml)의 GABA를 생산하였으며, 이는 본 연구 결과와 유사한 결과를 보였다.

요 약

유산균 *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027로부터 OFAT 방법을 이용하여 탄소원 및 질소원의 종류와 농도에 대해 실험을 진행하였다. 또한 TLC 분석방법을 통해 GABA 생성능력이 우수한 균주 *L. plantarum* SGL058과 *L. lactis* SGL027를 선정하였다. 두 균주를 이용하여 각각 5-L 발효기에서 546.7 μg/ml (*L. plantarum* SGL058)과 404.6 μg/ml (*L. lactis* SGL027)의 GABA를 생산하였다. 이러한 연구결과는 유산균을 이용한 GABA 생산과정에 있어서 유용한 정보를 제공할 것으로 판단된다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea(NRF) grant funded by the Korea government(MSIT) (No.2019R1G1A1007247).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Leroy F, Vuyst LD. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* **15**: 67-78.
2. Diana M, Quílez J, Rafecas M. 2014. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive compound in foods: a review. *J. Funct. Foods.* **10**: 407-420.
3. Wang Q, Liu X, Fu J, Wang S, Chen Y, Chang K, *et al.* 2018. Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Microb. Cell Fact.* **17**: 80-88.
4. Oh SH, Kim SH, Moon YJ, Choi WG. 2002. Changes in the levels of γ-aminobutyric acid and some amino acids by application of a glutamic acid solution for the germination of brown rices. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 49-53.
5. Clark G, O'Mahony S, Malone G, Dinan TG. 2007. An isocratic high performance liquid chromatography method for the determination of GABA and glutamate in discrete regions of the rodent brain. *J. Neurosci. Methods* **160**: 223-230.
6. Barla F, Koyanagi T, Tokuda N, Matsui H, Katayama T, Kumagai H, *et al.* 2016. The γ-aminobutyric acid-producing ability under low pH conditions of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented foods of Ishikawa Prefecture, Japan, with a strong ability to produce ACE-inhibitory peptides. *Biotechnol. Rep.* **10**: 105-110.
7. Ohmori T, Tahara M, Ohshima T. 2018. Mechanism of gamma-aminobutyric acid (GABA) production by a lactic acid bacterium in yogurt-sake. *Process Biochem.* **74**: 21-27.
8. Irfan M, Nadeem M, Syed Q. 2014. One-factor-at-time (OFAT) optimization of xylanase production from *Trichoderma viride*-IR05 in solid-state fermentation. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* **7**: 317-326.
9. Wang Q, Liu X, Fu J, Wang S, Chen Y, Chang K, *et al.* 2018. Substrate sustained release-based high efficacy biosynthesis of GABA by *Lactobacillus brevis* NCL912. *Microb. Cell Fact.* **17**: 80-88.
10. Kook MC, Cho SC. 2013. Production of GABA (gamma aminobutyric acid) by lactic acid bacteria. *Korean J. Food Sci. An.* **33**:

377-389.
11. Park SY, Kim KS, Lee MK, Lim SD. 2013. Physiological characteristics and GABA production of *Lactobacillus plantarum* K255 isolated from Kimchi. *Korean J. Food Sci. An.* **33**: 592-602.
12. Shan Y, Man CX, Han X, Li L, Guo Y, Deng Y, *et al.* 2015. Evaluation of improved γ-aminobutyric acid production in yogurt using *Lactobacillus plantarum* NDC75017. *Int. J. Dairy Sci.* **98**: 2138-2149.
13. Tajabadi N, Ebrahimpour A, Baradaran A, Rahim RA, Mahyudin NA, Manap MYA, *et al.* 2015. Optimization of γ-aminobutyric acid production by *Lactobacillus plantarum* Taj-Apis362 from honeybees. *Molecules* **20**: 6654-6669.
14. Di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello CG, De Angelis M, Giuliani G, Meloni M, *et al.* 2010. Synthesis of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: Functional grape must beverage and dermatological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**: 731-741.
15. Zarei F, Nateghi I, Eshaghi MR, Abadi MET. 2018. Optimization of gamma-aminobutyric acid production in probiotics extracted from local dairy products in west region of Iran using MRS broth and whey protein media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 233-242.
16. Wu CH, Hsueh YH, Kuo JM, Liu SJ. 2018. Characterization of a potential probiotic *Lactobacillus brevis* RK03 and efficient production of γ-aminobutyric acid in batch fermentation. *Int. J. Mol. Sci.* **19**: 143.
17. Cataldo PG, Villegas JM, de Giori GS, Saavedra L, Hebert EM. 2020. Enhancement of γ-aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL2013 based on carbohydrate fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **333**: 108792.
18. Choi SI, Lee JW, Park SM, Lee MY, Ji GE, Park MS, *et al.* 2006. Improvement of γ-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 562-568.
19. Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, Momose H, Kimura T. 2005. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* **22**: 497-504.
20. Cho YR, Chang JY, Chang HC. 2007. Production of γ-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from Kimchi and its neuroprotective effect on neuronal cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17**: 104-109.
21. Lin Q. 2013. Submerged fermentation of *Lactobacillus rhamnosus* YS9 for γ-aminobutyric acid (GABA) production. *Braz. J. Microbiol.* **44**: 183-187.
22. Cui Y, Miao K, Niyaphorn S, Qu X. 2020. Production of gamma-aminobutyric acid from lactic acid bacteria: a systematic review. *Int. J. Mol. Sci.* **21**: 995-1114.
23. Hwang EY, Park JY. 2020. Isolation and characterization of gamma-aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Curr. Top. Lact. Acid Bact. Probiotics* **6**: 64-69.