

Glutamate Decarboxylase (GAD)를 이용한 Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) 생산 및 최적화

김의진, 이중현*

Effects and Optimization of Gamma-Amino Butyric Acid (GABA) Production Process using Glutamate Decarboxylase (GAD)

Eui Jin Kim and Jung-Heon Lee*

Received: 14 October 2014 / Accepted: 10 November 2014

© 2014 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: pH controlled batch reactor and bubble column reactors have been developed in this research. They were used to produce high concentration of GABA and to determine optimal pH for GABA production. Glutamate decarboxylase (GAD) was isolated from recombinant *E. coli* and used for GABA production from monosodium glutamate (MSG). pH control was inevitable because the pH increased with MSG consumption. GAD showed highest activity at acidic conditions at pH 5.5 but the optimal pH for GABA production was pH 6.0. When 1.5 mole of MSG was used as reactant, the 1.05 mole of GABA was produced after 10 hrs batch reaction. Using bubble column reactors, 80 % of MSG was converted to GABA for 6 hrs reaction and 1.2 mole of GABA was produced.

Keywords: Gamma-amino butyric acid, Glutamate decarboxylase, Bubble column reactor

1. INTRODUCTION

4개의 탄소를 중심으로 구성되어 있는 비단백질 구성 아미노산인 GABA는 혈압강하 [1,2], 혈당강하 [3], 항암효과 [4] 등

의 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다. 최근의 연구에서는 Alzheimer's disease [5], 불안장애 [6], 우울증 [7] 등의 질병이 가바성 신경세포 (GABAergic neurons)의 GABA결핍에 원인이 있는 것으로 보고되고 있다. 최근의 연구는 이러한 질병의 치료에 사용하기 위한 기능성 식품에 관심이 집중되고 있다. 연구자들은 GABA가 풍부한 기능성 식품을 만들기 위하여 녹차 [8], 현미 [9], 보리 [10], 밀 [11], 홍국미 [12] 등 다양한 종류의 식물을 유산균 발효를 통하여 GABA생산에 관한 연구를 수행하였다. 그러나 이러한 유산균을 이용한 GABA의 생산증진 방법은 유산균의 대사과정을 이용하기 때문에 GABA의 생산성에 한계가 있다 [13].

유산균을 이용한 GABA의 생산성의 한계를 극복하기 위하여 GABA의 생산능력을 보유한 재조합 미생물의 개발에 관한 연구 또한 진행되고 있다 [14-16]. 일반적으로 GABA를 합성하는 공정은 glutamic acid decarboxylase (GAD)를 이용하여 glutamate를 탈 탄산화시켜 GABA로 만드는 과정이다. 이 전환반응은 보조인자인 pyridoxal-5'-phosphate (PLP)를 필요로 하며, GAD는 65 kDa (GAD 65), 67 kDa (GAD 67) 두 개의 isoform이 존재한다 [17-19].

Park 등 [15]은 재조합 *E. coli*를 이용하여 200 g/L의 MSG로부터 76.2 g/L의 GABA를 생산하였음을 보고하였다. 또한 Lee 등은 재조합 *E. coli*에 의해 생산된 GAD를 immobilized metal affinity chromatography (IMAC)에 고정화시켜 2 M의 GABA를 생산하였음을 보고하였다. 그러나, 고정화 효소를 사용하는 경우에 GABA 생성 도중에 생성되는 이산화탄소에 의해 반응속도가 느려지는 단점이 있다 [20-22].

본 연구에서는 재조합 *E. coli*에 의해 생산된 GAD를 활용

조선대학교 생명화학공학과
Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
Tel: +82-62-230-7159, Fax: +82-62-230-7259
e-mail: leejh@chosun.ac.kr

하여 glutamate를 GABA로 전환하는 pH가 제어되는 회분식 효소 반응공정을 개발하였다. 본 연구에서 개발된 GAD를 이용한 회분식 반응기의 pH, 온도, 교반 등의 운전조건을 각 기 비교하여 단위시간당 GABA의 생산을 비교하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기기

본 실험에서는 탄소원으로 glucose, 질소원으로 ammonium sulfate, 인산염으로는 KH_2PO_4 , K_2HPO_4 를 사용하였고 미량 원소로는 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하였으며, yeast extract와 ampicillin을 이용하였다. GAD를 이용한 GABA 생산반응은 monosodium glutamate (MSG)와 pyridoxal-5'-phosphate (PLP)를 이용하였다. pH 제어를 위하여 사용한 HCl 등의 시약은 Sigma 사로부터 구입하여 사용하였다. 본 배양액을 2 L 제조하여 121°C에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 발효조로는 5 L (Biotron Co.)를 사용하였다.

2.2. 균주 및 GAD(Glutamate decarboxylase)의 분리

본 연구에 사용된 균주는 GAD를 생성하는 *E. coli* BL-21 변이주를 사용하였다 [23]. 사용된 재조합 균은 300 mL 플라스크에 100 mL 배양액을 만든 후 37°C에서 6시간 배양 후 50% glycerol과 동일한 비로 잘 섞은 후 -70°C에 보관하여 실험에 사용하였다. 재조합 균주의 발효는 5 L 발효기를 사용하였으며 24시간의 배양이 끝난 후에 배양액을 모두 모아 원심분리기 (Mega 17R, Han-il Inc., England)를 이용해 10,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 균체를 20 mM sodium citrate buffer, 20 mM sodium acetate buffer, 20 mM sodium phosphate buffer와 증류수를 이용하여 균체를 분산 (효소 농도 20배 농축)시켰으며, 각각의 buffer는 효소의 초기반응과 동일한 pH를 유지하여 사용하였다. 균체로부터 GAD를 분리하기 위하여 초음파 파쇄기를 이용하였으며, 초음파 파쇄기 후 원심분리기를 이용해 10,000 g에서 10분간 원심분리하고 상등액을 취하여 효소 반응에 활용하였다.

2.3. Monosodium glutamate와 gamma-aminobutyric acid의 분석

GAD 반응을 한 후 생성된 GABA와 MSG를 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzen (DNFB)로 발색을 시킨 후 HPLC를 이용하여 각각의 농도를 측정하였다 [13,24,25]. 이동상은 0.05% TFA/DW과 0.05% TFA/ACN를 이용하였으며, 분석용 컬럼은 XTerra RP₁₈ (5 μL , 4.6×100 mm)을 사용하고 400 nm에서 0.7 mL/min의 flow rate 조건에서 분석하였다.

2.4. 연속식 pH 제어 GAD 반응기의 제작

반응조는 유리재질로 이루어진 이중 자켓구조를 가지고 있으며, 반응액의 pH는 pH센서를 이용하여 측정하였다. 측정된 pH는 pH 제어기로 결과를 입력하고 설정된 pH값보다 높

아지면 정량펌프의 전원이 작동하도록 설계하였으며, 정량 펌프는 HCl용액과 연결되어 전원이 들어오면 일정시간 동안 효소반응기에 주입 되도록 설계하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 연속식 pH 조절 반응기의 pH 반응조건

효소반응에서 buffer 용액을 사용하는 이유는 pH의 변화에 민감한 효소의 안정성을 유지하기 위함이며, GAD 반응처럼 pH의 조절이 필요한 반응의 경우 고농도의 GABA를 생산하는 경우 buffer용액의 농도는 더 높아진다. 이러한 buffer용액 농도의 상승은 자연히 염의 증가로 이어진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 buffer의 양을 줄이고 자동으로 일정농도의 pH를 유지해주는 자동화 장치를 도입하여 pH변화에 따른 GABA의 생산성을 확인하였다.

pH 4.5 이하에서는 용해된 MSG가 석출되는 현상 때문에 pH의 자동조절 범위는 석출이 일어나지 않는 범위에서 실험을 진행하였다. 이 반응에서 MSG의 초기 농도는 500 mM을 사용하였다. 효소 반응기의 pH는 pH 4.5, 5.5, 6.0, 6.5로 조절하여 실험하였으며, pH를 제어하기 위해서 1 N HCl을 사용하였다. 그 결과 pH 4.5, 5.5, 6.0로 제어한 반응기에서 10시간 이후부터는 GABA의 생산량이 현저하게 줄어들었으며, 각각의 10시간 동안 생성된 GABA의 농도는 95 mM, 126 mM, 386 mM, 55 mM로 분석되었다(Fig. 1). 각 pH별 실험결과를 비교해볼 때 pH 6.0에서의 생산량이 가장 뛰어났으며, pH 6.5로 제어하였을 때, 3시간 이후부터는 GABA가 생산되지 않았다. GAD반응의 pH별 시간당 생산속도를 비교해 보면, 초기 1시간 동안에는 pH 5.5에서 가장 높은 생산속도를 나타냈으며, 이 후 시간이 지나면서 pH 4.5, 5.5, 6.0 모두 생산속도가 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 반응시작 한 시간까지 pH 4.5에서 생산속도가 가장 높았으나 생산속도가 급격히 감소하고, pH 6.0으로 제어했을 때 가장 많은 GABA가 생산된 것을 확인하였다.

3.2. 교반속도와 HCl용액의 농도 변화에 따른 GABA 생산

교반 속도가 GABA생산에 미치는 영향을 연구하였다. MSG의 초기 주입량을 1.5 mole로 증가시켜 교반에 따른 영향을 조사 하였다. 저속 교반방법 고속 교반방법의 비교를 통하여 반응에 적합한 교반속도를 확인하기 위하여 간헐적으로 돌아가는 정도의 160 rpm과 표면에 소용돌이가 형성되기 시작하는 교반속도인 700 rpm을 비교하였다. 교반의 음성대조군으로 50 rpm을 사용하였다. 그 결과 반응초기 1시간 동안에는 700 rpm에서 GABA의 생산량이 265 mM로 160 rpm보다 21 mM이 더 많이 생성되었다. 그러나, 반응 1시간 이후부터는 160 rpm의 생산량이 더 많이 증가하였으며, 10시간 이후에서는 160 rpm이 260 mM 이상의 GABA가 더 생산된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과는 초기에는 격렬한 교

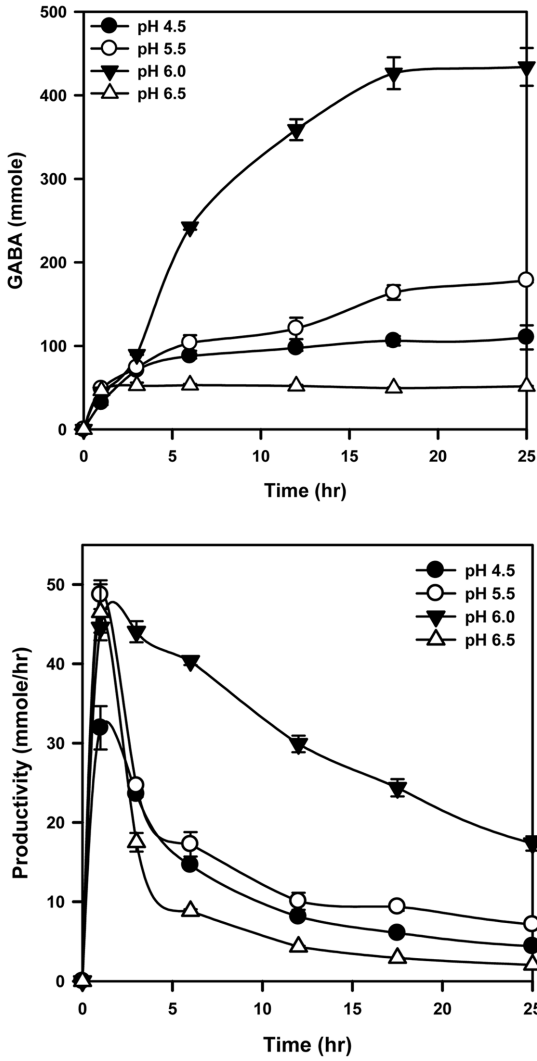


Fig. 1. Effect of pH on GABA production and productivity.

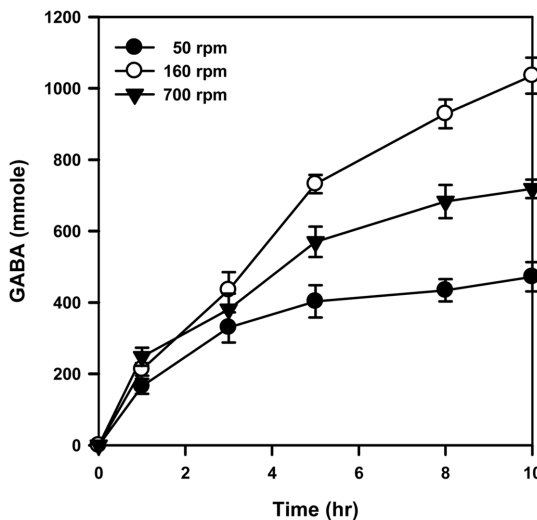


Fig. 2. Effect of agitation speed on GABA production.

반속도로 인하여 물질전달이 원활하게 이루어진 결과에 기인한 것이며, 1시간 이후 생산량이 감소한 것은 격렬한 교반에 의해 물리적인 stress로 인하여 GAD의 안정성이 떨어져서 나타난 결과이다. GABA의 생성에 적합한 교반속도는 낮은 속도로 교반이 수행되는 160 rpm 정도가 적합한 것을 확인하였다. pH 제어반응에서 염의 생성을 최소화하기 위하여 buffer의 사용을 줄이게 되면서 pH를 제어할 때 사용하는 HCl 용액의 농도가 중요하다. HCl용액의 농도가 높게 되면 pH 제어 시 반응기 내의 pH가 급격하게 변하게 되고 이러한 pH의 변화는 효소의 안정성을 낮추게 된다. 이와는 반대로 HCl용액의 농도가 낮게 되면 pH를 제어하기 위해 사용되는 HCl용액의 용량이 많아지게 되고 이렇게 많아지는 HCl용액의 부피는 반응기의 부피증가로 이어지게 된다. 반응기의 부피증가는 반응기 제작에 있어 고려되어야 하는 부분이며, 이렇게 증가되는 부분을 최소화하기 위해서는 HCl용액을 반응에 영향을 미치지 않는 범위 내에서 고농도로 사용하여야만 한다. 이러한 부분을 확인하기 위하여 HCl용액의 농도를 1.5 mole의 MSG를 전환하는 범위에서 고려하여 실험하였다. HCl용액의 농도는 1.5 mole의 MSG를 GABA로 전환시킨 농도에서 HCl의 농도를 3 M까지 증가시켜 실험하였다(Fig. 3). 고 농도의 HCl용액이 효소의 구조적 안정성을 붕괴시키는 영향을 최소화하기 위하여 주입구 및 주입량을 최소화 하여 실험을 수행하였다. 그 결과 HCl의 농도가 증가될수록 생성된 GABA의 양이 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 농도가 높은 HCl용액이 효소의 안정성을 낮추게 되어 점차 생성된 GABA의 양이 줄어드는 것으로 생각된다.

3.3. 초기 MSG농도 변화에 따른 GABA 생산

GAD반응의 교반속도, pH, HCl용액의 농도 등을 고려하여 1.5 mole의 MSG를 GABA로 전환하는 공정을 확립하였다. 이렇게 확립된 공정에서 생산되는 GABA 생산성을 향상 시

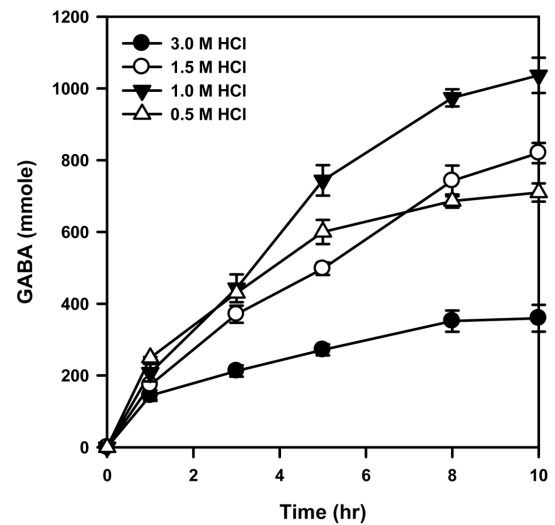


Fig. 3. Effects of the HCl concentration for pH control on GABA production.

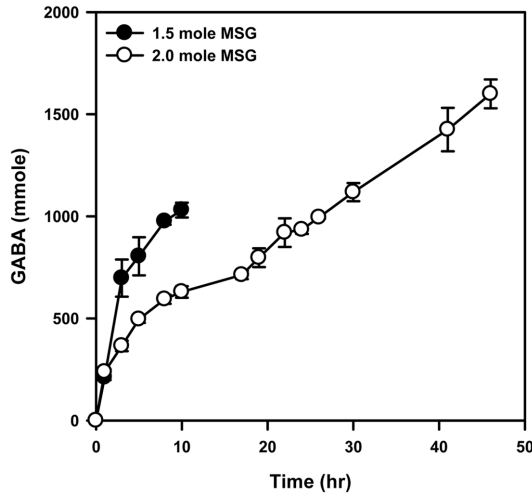


Fig. 4. Effect of initial MSG concentration on GABA production.

키기 위하여 초기 MSG의 주입량을 2.0 mole로 높여서 단위 시간당 생성된 GABA를 비교실험 하였다. 대량 생산공정의 도입을 고려하여 반응기 부피변화를 확인하였으며, 시간당 생성된 GABA를 측정하여 비교하였다. 그 결과 10시간의 반응이 진행된 이후 반응기의 부피는 초기 반응기 부피대비 3 배를 넘지 않는 범위에서 반응이 종결되었으며, 그 때 생성된 GABA는 1.05 mole로 65 % 이상이 전환됨을 확인하였다 (Fig. 4). 초기 MSG를 2.0 mole로 반응을 시작한 결과 46시간에 76%의 전환율을 나타냈으며 1.52 mole의 GABA를 생산하였다. 1.5 mole의 MSG를 사용하여 GABA를 생산한 경우에는 10시간 반응 후 1.05 mole의 GABA를 생산할 수 있었다. 단위시간당 생산성을 비교하였을 때 1.5 mole의 MSG를 사용하는 경우 생산성 측면에서 대량 생산공정에 더 적합하다. 동일한 효소를 사용한 경우 1.5 mole의 MSG보다 2.0 mole의 MSG를 이용할 경우 더 높은 농도의 GABA를 생산할 수 있으나 생산속도의 감소로 인하여 생산성은 떨어지게 된다.

3.4. Bubble column 반응기를 이용한 GABA 생산

Bubble column 반응기는 교반 반응기와 달리 기계적인 교반 장치가 없고 기포가 교반을 담당하고 있다. 공기는 분사기를 통하여 분사하게 되는데 단순히 공기만 불어넣는 정분사기 (static sparger)와 공기와 액체가 jet형태로 분사되는 동분사기 (dynamic sparger)의 두 가지로 나눌 수 있다. 공기의 겉보기속도 (superficial gas velocity)가 5 cm/s 이하일 때는 기포의 크기는 균일하고 상승속도도 서로 비슷하다. 이 때 유동특성을 bubbly flow라고 한다. 이 유동특성 범위 내에서 액체를 기포와 같은 방향으로 흘리면 기포 체류량도 줄고 bubbly flow도 안정화된다. 효소 반응기내의 혼합만을 고려할 때는 와류를 일으킬 수 있는 churn type의 flow pattern이 적합하지만, 이러한 와류와 큰 bubble은 bubble column의 최상층면에서 효소의 구조를 붕괴할 가능성이 크다. 따라서 본 연구에서는 bubbly flow가 가능하도록 bubble column reactor를 디자인

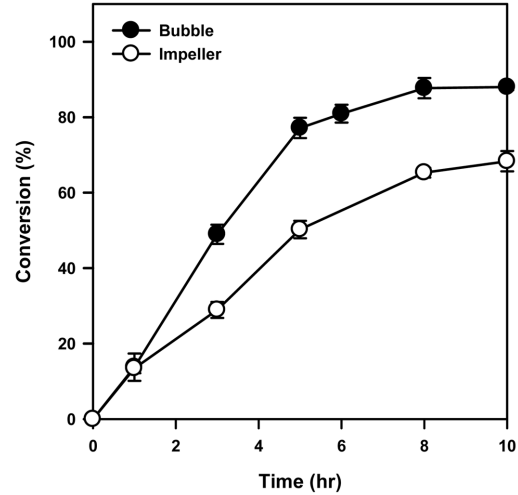


Fig. 5. Effect of reactor type on GABA production.

하였으며, 공기의 주입은 동분사기 (dynamic sparger)의 형태를 취하였다.

그 결과 bubble을 이용하여 교반하고 동분사기를 이용하여 산을 주입하는 bubble column reactor의 경우 반응시간 6시간 만에 GABA의 생산량은 1.2 mole이 되었으며, 이 농도는 전환율이 80%에 도달하는 결과이다. Bubble column reactor와 교반기를 이용한 반응기를 전환율로 비교하면, 1시간까지는 비슷한 전환율을 나타내지만 1시간 이후부터 6시간까지 bubble column reactor의 전환율이 교반반응기의 전환율 보다 30% 정도 향상됨을 보여 주고 있다. 이러한 결과는 bubble에 의한 교반이 impeller에 의한 교반보다 효소에 주는 stress가 적다는 것을 입증하는 결과이며, 또한, 동분사기 형태에 의한 pH의 제어가 우수하게 이루어졌음을 확인할 수 있는 결과이다. 1 L bubble column 반응기를 사용한 경우 1.5 mole의 MSG를 6시간에 80% 전환하여 1.2 mole GABA를 생산할 수 있었다 (Fig. 5).

4. CONCLUSION

본 연구에서는 pH 제어 효소반응기를 이용한 GABA의 생성 공정을 연구하였다. GABA의 생성을 위해서 GAD를 이용한 효소반응 공정을 이용하였으며, 효소반응 공정을 최적화 한 뒤 pH 제어를 이용하여 자동 pH제어 공정을 확립하였다. 확립된 자동 pH제어 공정을 반응기 부피 1L로 scale-up test를 수행하였다. 그 결과 GAD를 이용한 효소반응 공정은 초기 MSG 농도는 1.0 M, 반응온도는 37°C, 1 M의 HCl을 이용하여 pH 6으로 제어하면서 동분사기를 이용하여 HCl을 반응기에 주입하는 bubble column 반응기의 형태에서 가장 높은 전환율을 얻을 수 있었다. 본 연구에서 도입한 공정은 순도 높은 GABA를 생성하는 공정으로 반응기의 내부에 용액은 buffer의 사용을 최소화 하였으며, 위의 조건으로 반응을

진행하여 6시간에 1.2 mole의 GABA를 생성하였다.

GAD의 반응은 pH 4~5 범위에서 활성이 높은 것으로 알려져 있다 [26]. 결과에서도 pH 4.5에서 생산속도가 가장 높았으나, 반응 1시간 이후부터는 활성이 크게 떨어졌다. GAD의 활성을 측정하는 실험은 저 농도의 기질에서 이루어진 실험이지만, 생산성을 고려한 연구에서는 pH의 변화를 제어하기 위하여 HCl을 사용한다. 설정되어 있는 pH 값이 낮을수록 HCl의 주입의 빈도수가 증가하게 되고 HCl의 주입빈도수의 증가는 효소의 구조적인 stress를 유발하게 된다. 반응 1시간 이후부터 GAD의 활성이 저해되어 생산성이 줄어든 현상은 이러한 효소의 구조적인 stress로 인한 활성의 감소로 나타난 현상이다. 이러한 현상은 HCl의 농도를 다르게 한 실험에서 동일한 결과로 나타났다. 0.5 mole의 HCl을 이용한 실험에서 GABA의 생산성이 줄어든 원인도 HCl의 주입 빈도수의 증가에 따른 현상으로 예상된다. HCl에 대한 stress를 줄이기 위하여 pH값을 높게 설정하게 되면, GAD의 활성부위가 손상을 입게 되어 활성을 급격하게 잃게 된다 [17,27]. 이러한 이유로 pH 6.5에서 현저한 생산성의 저하가 나타나게 되었다. GABA의 생산성을 증대시키기 위해서는 추후 반응기와 HCl의 주입 빈도수 및 pH의 조절에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Aoki, H., Y. Furuya, Y. Endo, and K. Fujimoto (2003) Effect of γ -Aminobutyric Acid-enriched Tempeh-like Fermented Soybean (GABA-Tempeh) on the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67: 1806-1808.
- Chang, J. S., B. S. Lee, and Y. G. Kim (1992) Changes in γ -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.
- Nakagawa, T., T. Yokozawa, H.J. Kim, and N. Shibahara (2005) Protective Effects of γ -Aminobutyric Acid in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 51: 278-282.
- Watanabe, H., A. Suzuki, M. Goto, D. Lubahn, H. Handa, and T. Iguchi (2004) Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *J. Mol. Endocrinol.* 33: 243-252.
- Rissman, R. A., A. L. De Blas, and D. M. Armstrong (2007) GABA receptors in aging and Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 103: 1285-1292.
- Obata, K., M. Hirono, N. Kume, Y. Kawaguchi, S. Itohara, and Y. Yanagawa (2008) GABA and synaptic inhibition of mouse cerebellum lacking glutamate decarboxylase 67. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 370: 429-433.
- Hasler, G., J. van der Veen, T. Tumonis, N. Meyers, J. Shen, and W. C. Drevets (2007) REduced prefrontal glutamate/glutamine and -aminobutyric acid levels in major depression determined using proton magnetic resonance spectroscopy. *Archiv. General Psychiatry* 64: 193-200.
- Jeng, K. C., C. S. Chen, Y. P. Fang, R. C. W. Hou, and Y. S. Chen (2007) Effect of microbial fermentation on content of statin, GABA, and polyphenols in Pu-Erh tea. *J. Agric. Food Chem.* 55: 8787-8792.
- Komatsuzaki, N., K. Tsukahara, H. Toyoshima, T. Suzuki, N. Shimizu, and T. Kimura (2007) Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice. *J. Food Eng.* 78: 556-560.
- Chung, H. J., S. H. Jang, H. Y. Cho, and S. T. Lim (2009) Effects of steeping and anaerobic treatment on GABA (γ -aminobutyric acid) content in germinated waxy hull-less barley. *LWT- Food Sci. Technol.* 42: 1712-1716.
- Youn, Y. S., J. K. Park, H. D. Jang, and Y. W. Rhee (2011) Sequential hydration with anaerobic and heat treatment increases GABA (γ -aminobutyric acid) content in wheat. *Food Chem.* 129: 1631-1635.
- Chuang, C. Y., Y. C. Shi, H. P. You, Y. H. Lo, and T. M. Pan (2011) Antidepressant effect of GABA-rich monascus-fermented product on forced swimming rat model. *J. Agric. Food Chem.* 59: 3027-3034.
- Eckstein, J. A., G. M. Ammerman, J. M. Reveles, and B. L. Ackermann (2008) Analysis of glutamine, glutamate, pyroglutamate, and GABA in cerebrospinal fluid using ion pairing HPLC with positive electrospray LC/MS/MS. *J. Neurosci Methods* 171: 190-196.
- Hao, R. and J. C. Schmit (1993) Cloning of the gene for glutamate decarboxylase and its expression during conidiation in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 293: 735-738.
- Park, S., E. Kim, W. Noh, Y. Oh, H. Kim, B. Song, K. Cho, S. Hong, S. Lee, and J. Jegal, (2013) Synthesis of nylon 4 from γ -aminobutyrate (GABA) produced by recombinant *Escherichia coli*. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 36: 885-892.
- Le Vo, T., T. Kim, and S. Hong (2012) Effects of glutamate decarboxylase and γ -aminobutyric acid (GABA) transporter on the bioconversion of GABA in engineered *Escherichia coli*. *Bioproc. Biosyst. Eng.* 35: 645-650.
- Fenalti, G., R. H. P. Law, A. M. Buckle, C. Langendorf, K. Tuck, C. J. Rosado, N. G. Faux, K. Mahmood, C. S. Hampe, J. P. Banga, M. Wilce, J. Schmidberger, J. Rossjohn, O. El-Kabbani, R. N. Pike, A. I. Smith, I. R. Mackay, M. J. Rowley, and J. C. Whisstock, (2007) GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 280-286.
- Yuan, P. Q., C. Grns, L. Kllstrm, J. Yu, K. Huhman, D. Larhammar, H. E. Albers, and A. E. Johnson (1997) Differential distribution of glutamate decarboxylase-65 and glutamate decarboxylase-67 messenger RNAs in the entopeduncular nucleus of the rat. *Neurosci.* 78: 87-97.
- Dkhissi, O., J. F. Julien, M. Wasowicz, N. Dalil-Thiney, J. Nguyen-Legros, and C. Versaux-Botteri (2001) Differential expression of GAD65 and GAD67 during the development of the rat retina. *Brain Res.* 919: 242-249.
- Yao, W., X. Wu, J. Zhu, B. Sun, and C. Miller (2013) In vitro enzymatic conversion of γ -aminobutyric acid immobilization of glutamate decarboxylase with bacterial cellulose membrane (BCM) and non-linear model establishment. *Enzyme Microb. Technol.* 52: 258-264.

21. Ling, D., G. Wu, C. Wang, F. Wang, and G. Song (2000) The preparation and characterization of an immobilized l-glutamic decarboxylase and its application for determination of l-glutamic acid. *Enzyme Microb. Technol.* 27: 516-521.
22. Lambrecht, R. H. D., G. Slegers, G. Mannens, and A. Claeys (1987) Immobilization of glutamate decarboxylase and the preparation of an enzyme column for the synthesis of $^{-}[13N]$ aminobutyric acid. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 221-224.
23. Jun, C., J. C. Joo, J. H. Lee, and Y. H. Kim (2014) Thermostabilization of glutamate decarboxylase B from *Escherichia coli* by structure-guided design of its pH-responsive N-terminal interdomain. *J. Biotechnol.* 174: 22-28.
24. Gioia, M. G., P. Andreatta, S. Boschetti, and R. Gatti (2007) Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of branched-chain amino acids in new dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 45: 456-464.
25. Tavaría, F. K., I. Franco, F. Javier Carballo, and F. Xavier Malcata (2003) Amino acid and soluble nitrogen evolution throughout ripening of Serra da Estrela cheese. *Int. Dairy J.* 13: 537-545.
26. Komatsuzaki, N., J. Shima, S. Kawamoto, H. Momose, and T. Kimura (2005) Production of $^{-}$ aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods. *Food Microbiol.* 22: 497-504.
27. Kang, T. J., N. A. T. Ho, and S. P. Pack (2013) Buffer-free production of gamma-aminobutyric acid using an engineered glutamate decarboxylase from *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* 53: 200-205.