

γ -氨基丁酸的生理作用及应用

张宿 (四川师范大学生命科学学院, 四川成都 610101)

摘要 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是生物应激反应体系的重要氨基酸,广泛分布于自然界中。长久的进化使得生物可以通过 GABA 的 H^+ 和 Ca^{2+} 依赖方式响应于内外界应激。可以通过腐胺途径和 GABA 分流途径干涉生物内能量代谢、碳氮代谢的方式缓解生物体内压力。GABA 在生物体内组织发育和形成、生物内和生物间的信号交流中扮演着重要角色。作为癫痫等疾病的特效药,可降解尼龙的前体物质 GABA 有着长足的发展空间。分析了 GABA 的生理机制,综述了谷氨酸脱羧酶及其基因定点突变的研究,最后对 GABA 的制备方法与应用进行了介绍。

关键词 γ -氨基丁酸;谷氨酸脱羧酶;应激调节

中图分类号 Q517 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)18-0001-09

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.18.001



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

The Physiological Mechanism and Application of γ -aminobutyric Acid

ZHANG Xiu (College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu, Sichuan 610101)

Abstract γ -aminobutyric acid(GABA) is important amino acid of biological stress reaction, widely distributed in nature. In long-term evolution, biological GABA levels can be regulated by H^+ and Ca^{2+} ions levels are altered by intra- and inter-biostimulation. It can be used to relieve stress of biological by the way of putrescine metabolism and GABA shunt pathway interfered with energy metabolism and C/N metabolism. GABA plays an important role in the tissue development and formation intra- and inter-biosignal communicate. As a special medicine of epilepsy, etc. diseases, the precursor of degradable nylon, GABA has a long-term development space. The physiological mechanism of GABA was analyzed, the research of glutamate decarboxylase and its site-directed mutation were reviewed, and the preparation and application of GABA were introduced.

Key words GABA; GAD; Stress regulation

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid)是一种四碳非蛋白氨基酸,简称 GABA,广泛存在于自然界中。GABA 最早于 1910 年在腐生菌中发现^[1]。在随后的 100 年中,研究者相继在不同生物中检测到。GABA 由谷氨酸脱羧酶(GAD, glutamic acid decarboxylase)催化 L-谷氨酸(L-Glu, L-glutamic acid)脱羧而成^[2-3]。其分子量为 103.1,分子式为 $C_4H_9NO_2$ 。GABA 高度溶于水,在生理 pH 条件下为两性分子^[4]。GABA 在气态时呈高度折叠态,固态时为舒展状态,液态具有包括环状结构在内的多种分子形态^[5-6]。至今为止,GABA 已被确定与多种代谢应激有关,同时也作为一种信号分子存在于自然界中^[7-11]。作为动物中主要的抑制性神经递质^[12],GABA 具有多种功能^[13]。在微生物细胞中受到酸的调控^[14-15]。因此,GABA 作为一种常见的响应外部应激的代谢物质发挥重要的调控作用。在生物体中有 2 个途径可以合成 GABA。一种是通过精氨酸(Arg, arginine)和精胺(spermine)代谢过程合成 GABA。其具体过程:精氨酸通过精氨酸脱羧酶(ADC, arginase decarboxylase)催化得到瓜丁酸(agmatine),瓜丁酸经瓜丁酰胺脱羧酶(AGIH, agmatine imidohydrolase)以及氨甲酰腐胺酰胺水解酶(CPAH, carbamylputrescine amidohydrolase)生成腐胺(putrescine)。也可以通过精氨酸酶催化生成鸟氨酸(ornithine),再经鸟氨酸脱羧酶(ODC, ornithine decarboxylase)生成腐胺。同样精胺(spermine)也可以经由反转多氨氧化酶(BCPAO, back-conversion polyamine oxidase)2 次催化得到一分子腐胺和两分子 3-氨基丙醛(APAL, 3-aminopropionaldehyde)。腐胺经二胺氧化酶(dam-

ine oxidase)催化脱去一分子 NH_3^+ 得到 γ -氨基丁醛(γ -Aminobutyraldehyde)。后者再经过 4-氨基丁醛脱氢酶(AB-ALDH, γ -aminobutyraldehyde dehydrogenase),以及吡咯烷脱氢酶(PDH, pyrroline dehydrogenase)生成 γ -氨基丁酸^[16-17]。

途径二是三羧酸循环的一个分支,该过程起始于三羧酸循环中的 α -酮戊二酸(α -ketoglutarate), α -酮戊二酸经由谷氨酸脱氢酶(GDH, glutamate dehydrogenase)催化得到谷氨酸,再经过 GAD 催化脱去 α 羧基得到 GABA^[2-3]。GABA 经由 GABA 转氨酶(γ -aminobutyric acid transaminase)催化生成琥珀酸半醛(succinic semialdehyde),琥珀酸半醛再经琥珀酸半醛脱氢酶(SSADH, succinic semialdehyde dehydrogenase)转化为琥珀酸(succinic)再次进入三羧酸循环。而琥珀酸半醛可被琥珀酸半醛还原酶(SSAR, succinic semialdehyde reductase)和乙醛酸还原酶(GLYR, glyoxylate reductase)可逆转化为 γ -羟基丁酸(GHB, γ -hydroxybutyrate)^[4,9-10](图 1)。

1 GABA 的生理机制

在生物体内 GABA 作为信号分子发挥重要作用^[11,18-20]。在高等生物中 GABA 受体体系的研究较为深入,GABA 在动物体内作为动物的主要抑制性神经递质和通过 GABA 受体发挥作用^[21]。同时 GABA 可以兼作营养因子为生物体内提供能量^[22-25]。此外还能调节细胞内多种生理信息^[4,7,21-23,26]。

1.1 GABA 受体 GABA 在昆虫中的受体为离子型受体,也是大部分杀虫剂的靶标。外部药物可以通过 GABA 离子型受体抑制或杀死昆虫^[19,27]。

动物中的 GABA 受体分为 GABAA 和 GABAB 两大类受体。这两类受体均可以被 GABA 激活。GABAA 受体为多聚配体的门控(Cl^-)通道离子型或离子渗透型受体。GABAB

GABA 具有特殊的药用价值,其对癫痫的治疗是近年来的热点之一。在几年来的抗神经性疼痛研究中发现大部分合成的 GABA 三唑衍生物具有抗癫痫、阵痛和抗痛觉过敏的作用^[56]。通过对癫痫发病患者和非癫痫患者的 GAD 比对,发现癫痫患者 GAD 活性比非癫痫患者低^[57]。后来也有研

究发现 GABA 的释放和 GABA 存储机制与癫痫存在密切关系^[58-59]。且 GABA 抑制作用减弱会导致癫痫发作^[60]。通过增加 GABA 代谢的药物对癫痫治疗已初见成效^[61]。目前癫痫发病原因被认为是神经自兴奋和抑制之间的平衡被破坏,而 GABA 在这其中起着重要的平衡作用^[62-63]。癫痫患者 GAD 神经元亚群易在发病中受损,导致 GABA 能神经元减少,而其他神经元则会上调 GAD 的表达以维持这种平衡^[64]。

作为一个作用广泛的氨基酸,GABA 还能影响癌细胞的增殖和凋亡^[65]、集落形成和侵袭^[66-67],导致癌细胞有丝分裂活性变化^[68],可作为治疗癌症的辅助药物^[69]。同样 GABA 可以提高自发性压力感受器反射功能(baroreceptor reflex function, BRS),调节心率降低血压^[70]。它还可以拮抗由咖啡因引起的睡眠障碍,且不影响自主活动^[71]。另外,也有研究发现 GABA 具有治疗糖尿病^[72]等作用。

GABA 有上述积极的作用同时,有时也不总是那么尽人意,甚至在动物体内还有许多不明确的生理和药理作用^[73],需要更加谨慎的处理 GABA 和动物之间的关系。

1.3 GABA 的生物抗逆生理及调控作用 GABA 长久以来被认为与植物多种应激和防御系统有关。GABA 会随着植物受到刺激而升高,被认为是植物中响应于各种外界变化、内部刺激和离子环境等因素如 pH、温度、外部天敌刺激的一种有效机制。GABA 还可以调节植物内环境如抗氧化、催熟、保鲜植物等作用。近年来 GABA 在植物中也被发现作为信号分子在植物中传递扩大信息^[11,18-19,42,74]。GABA 曾在大豆^[75]、拟南芥^[76]、茉莉^[74]、草莓^[77]等植物中相继发现。低浓度的 GABA 有助于植物生长发育,高浓度下又会起相反的作用^[11]。

1.3.1 GABA 对外部酸化的响应。低 pH 下 GABA 会在细胞内快速增加^[78],这种 GABA 的积累在微生物^[79]和动物^[80]中也存在。植物在酸性 pH 下细胞内 H^+ 随之升高,诱导细胞内 GABA 含量增加^[78]。该 GABA 的合成过程消耗 H^+ ,使得细胞内酸化得到缓解^[81]。在微生物中也存在这种快速的反应机制,在产生 GABA 的同时,会增加质子呼吸链复合物的表达,促进 ATP 合成。并且上调 F1F0-ATP 水解酶活性,促使酸性条件下 ATP 依赖的 H^+ 排出过程^[79]。在动物中,也会向外排出 GABA 和谷氨酸以此来改变细胞外环境的 pH^[82]。更重要的是,GABA 在生理环境下为两性离子,因此在酸碱调节中发挥一定作用^[4]。

1.3.2 GABA 对昆虫的防御作用。GABA 有助于植物对外界天敌的防御。当昆虫取食时由于植物受伤导致细胞破裂和组织受伤,这种机械切割会刺激植物中 Ca^{2+} 的增加,植物在 Ca^{2+} 刺激下分泌 GABA 作为一种抵御昆虫取食的措施。且在此过程中不存在茉莉酸类信号参与 GABA 的积累^[74]。昆虫存在离子型 GABA 受体,其中果蝇的 GABA 门控氯离子通道亚基 RDL(resistant to dieldrin)是许多杀虫剂药物的作用靶标^[27]。GABA 诱导使得 GABA 受体的单电流降低^[83]。具体为 GABA 在无脊椎动物中通过 GABA 受体门控的氯离子通道起作用,与大多数杀虫剂相同,通过 GABA 受体氯离子通道,使 Cl^- 在电化学梯度的驱使下流向下游,导致质膜超极

化,并抑制昆虫取食^[4,19]。而在过量表达 GABA 的烟草植物中,接种北方线虫,发现其雌性成年线虫的繁殖能力整体下降,这种方式可以使植物达到防御天敌的效果^[18]。在对女贞子被草食女蛾幼虫取食过程中,发现女贞子会降低自身赖氨酸活性使得蛋白质无营养,而女蛾幼虫在此期间会分泌甘氨酸、 β -丙氨酸、胺等分子抑制植物赖氨酸的减少,这种植物与草食昆虫的交流过程也证明了 GABA 作为信号分子的功能^[20]。

1.3.3 GABA 对高等生物在高温和冷冻下的保护作用。在小麦开花期间喷洒 GABA(200 mg/L),可以调节膜稳定性,增加抗氧化能力等,减少了小麦高温下的损失^[84];外源 GABA 的施用对黄瓜幼苗生长也有明显的作用^[85]。高温会抑制中枢 GABA 能神经元活性,激活胆碱类神经系统并引起体温升高^[86]。长期处于高温下,下丘脑的 GABA 能神经元活性会增加以适应环境和调节体温^[87]。GABA 会在血浆中升高进而抑制冷敏神经核血浆中儿茶酚胺的浓度,达到降低食道温度的目的^[88]。

低温会降低植物的生物合成能力,对重要功能造成干扰,并产生永久性伤害^[89]。动物在低温下也会导致损伤甚至造成更严重的伤害^[90]。低温下生物 GABA 表达会上调,这与低温的耐受性存在关联^[91-92]。在低温下,75%的代谢物会增加,包括氨基酸、糖类、抗坏血酸盐、腐胺和一些三羧酸循环中间体^[93]。能量代谢涉及的氨基酸代谢,酶类的转录丰度均会增加^[94]。可以通过增强 GABA 分流途径产生 ATP 以及积累 GHB^[95]。另外低温下利用褪黑霉素可以使精胺、亚精胺和脯氨酸积累,促使二胺氧化酶表达升高。通过腐胺途径合成 GABA,使得 H_2O_2 积累和苯丙烷途径通量下降以达到防腐和抗寒的效果^[77]。

1.3.4 GABA 在抗氧化和氧化过程中的作用。GABA 分流作为三羧酸循环分支途径的中间产物,与能量循环关系密切^[4]。同时 GABA 作为氧化代谢物的调控者发挥作用。拟南芥 SSADH 突变体暴露于高温下生长,发现其活性氧中间体(reactive oxygen intermediate, ROI)积累,使得植株死亡^[96]。证明 ROI 与 GABA 存在关系。同样 SSADH 和 GABA-T 基因的突变株在高温下存在大量的 ROI,利用 ROI 消除剂 N-叔丁基- α -苯基硝酮(PBN)可使 GABA 大量积累,从而提高酵母的存活率^[97]。因此,认为 GABA 分流途径在抑制高温下 ROI 具有作用。在 GABA 分流过程中,SSA 可以经由 GLYR/SSAR 转化为 GHB,而 GHB 与 ROI 存在密切关系。在 SSADH 缺失突变株中的 GHB 与 ROI 存在大量积累,而瓜巴特林可以抑制这种 GHB 与 ROI 的积累,并抑制了过氧化死亡^[98]。GABA 分流过程可以减少 ROI 的积累使得生物免于高温带来的氧化损伤以及过氧化衰老。

1.3.5 GABA 维持碳氮平衡。碳氮代谢平衡涉及许多生理过程,包括能量代谢、氨基酸代谢等。由于 GABA 合成和分流途径涉及氮代谢,GABA 也是能量循环中三羧酸循环的重要组成部分,GABA 分流途径与呼吸链竞争 SSADH,因此长时间以来 GABA 被认为是碳氮代谢的重要一环^[4,42]。三羧

酸循环分支的谷氨酸合成 GABA 途径是植物快速响应外部刺激的关键因素之一^[16-17]。绝大部分 NH_3^+ 是通过谷氨酰胺合成酶/谷氨酸合成酶途径合成 (glutamine synthetase/glutamate synthetase, GS/GOGAT), 被认为是氨基酸的主要合成途径^[25]。游离的氨基分子大部分通过谷氨酰胺固定, 谷氨酸被认为是植物老根中氮主要的积累形式, 氮存储于精氨酸等氨基酸中, 同时精氨酸也可用于运输, 满足生物体的氮需求^[25, 99]。同样氨基酸也通过转化为三羧酸循环的前体或中间体参与能量代谢过程^[25]。在对菠菜的研究中发现脯氨酸占总游离氨基酸的 8.1%~36.1%, GABA 占 12.8%~22.2%, 谷氨酸占 5.6%~21.5%。谷氨酸是 GABA 和脯氨酸的前体物质, 低温下植物会使谷氨酸的氮分流进入 GABA 和脯氨酸调控氮的代谢途径^[8]。另外在 50 mmol/L GABA 下培养的拟南芥中除 NADP+依赖性柠檬酸脱氢酶、根和芽中谷氨酰胺合成酶、芽中磷酸烯醇丙酮酸羧化酶外, 几乎所有的初级氮代谢和硝酸盐吸收有关的酶活性均受到影响^[100]。而在 NaCl 条件下培养的拟南芥中, 发现 GABA 积累的同时带动拟南芥整体氨基酸的增加^[10]。在分别利用不同氮化合物 (10 mmol/L NH_4Cl , 5 mmol/L NH_4NO_3 , 5 mmol/L 谷氨酸和 5 mmol/L 的谷氨酰胺) 作为唯一氮源培养的拟南芥叶片中, 其 GAD 活性和蛋白质水平不同, 说明 GAD 在氮代谢中发挥作用^[101]。

在 NO 胁迫下的香蕉中也发现了 GAD 活性上升、GABA 和香蕉多巴胺增加的现象^[102]。盐胁迫下谷氨酸脱氢酶活性与 GAD 的表达瞬时上升, 进而提高 GABA 分流等相关途径的通量以调节碳氮平衡。应激下 NADH:NAD⁺ 和 ADP:ATP 的比值也能影响 GABA-T, 从而使 GABA 积累。盐胁迫下植物更多地利用 C/N 平衡途径缓解压力^[9]。

1.3.6 GABA 在干旱和水涝中的作用。20 世纪末, 人们就发现干旱可以降低根的固氮和 O_2 的扩散, 使得植物缺氧而导致 GABA 的积累^[103]。低氧条件下谷氨酸和天冬氨酸含量增加^[24]。干旱下 GAD 活性提高, GABA-T 快速积累^[104]。干旱条件下, 根系、茎的生长和叶面积伸展被抑制, 活性氧增加, 低分子渗透调节物质如 GABA 等氨基酸、多元醇、有机酸产量增加, 以及抗氧化损伤的酶表达均上调^[105]。研究表明, 干旱条件下, 与细胞内稳态、活性氧的清除、结构蛋白稳定保护、渗透调节剂、转运蛋白等有关的基因表达上调^[106]。外源 GABA 使得植物保持较高的相对含水量, 降低电解质渗漏、脂质、过氧化物、碳代谢并能提高膜稳定性^[107-108]。此外外源 GABA 也可以诱导 GABA-T 和 α -戊酸脱氢酶活性上升, 抑制 GAD 活性使得 GABA 和谷氨酸增加。同时 GABA 加速多胺合成, 抑制多胺分解, 并进一步激活 δ -1-吡咯林-5-羧酸合成酶和脯氨酸脱氢酶以及鸟氨酸- δ -氨基转移酶活性, 致使 GABA 预富集物的高度积累和代谢^[109]。GABA 还可以通过促进叶绿素表达, 进而使得过氧化氢酶 (catalase, CAT)、过氧化物酶 (peroxidase, POX) 活性增加, 提高脯氨酸和糖含量, 调节渗透和降低氧化^[110]。

植物在水涝下 pH 会下降^[111]。长时间水涝会使土壤缺氧且短时间内水涝使得 GABA 升高^[112-113]。而水涝下气孔

关闭与脱落酸存在直接关系^[114]。由于 H^+ 上升和缺氧会导致 GABA 增加^[4, 42]。同时丙氨酸的积累可提高缺氧条件下植物的生存能力^[115]。在缺氧条件下 GABA 可以通过间接调节使得光合作用增强, 降低气孔限制值^[116], 使得通氧量加大。缺氧条件下 GAD 活性上升, 而 GABA 可以缓解缺氧对植物幼苗的伤害, 而且外源 GABA 可以使低氧条件下根生长抑制得以缓解^[117], 快速生长出不定根。不定根生长也可以缓解植物的缺氧情况^[118]。

另外, 水涝缺氧条件下除 GABA、谷氨酸以及丙氨酸外其他与三羧酸循环有关的氨基酸水平均下降。GABA 与谷氨酸可作为丙氨酸的直接合成底物, 通过这种厌氧途径生成 2 倍于糖酵解产生的 ATP, 保证供能^[115, 119]。GABA 还具有消除活性氧中间体以及为植物解毒和间接通过 H_2O_2 信号作用防止细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD)^[120-121], 以及发挥其他作用。

1.3.7 GABA 的其他生理作用。50 mmol/L GABA 和不同盐浓度会对植物幼苗产生不同的影响, 当 NO_3^- 离子低于 40 mmol/L 时, GABA 会刺激根伸长, 当 NO_3^- 离子大于 40 mmol/L 时 GABA 会抑制根伸长。并且 GABA 刺激低浓度的 NO_3^- 吸收, 抑制高浓度 NO_3^- 的摄取, 而 GS 等酶被氮调控, 以上研究认为氮对调控植物生长有一定作用^[100]。NaCl 胁迫下, 拟南芥 POP2-1 突变体对 NaCl 敏感, 使得 GABA 代谢总体发生上调^[10]。在 NaCl (50 mmol/L) 刺激下, 植物的糖基化代谢会发起变化, 并影响包括三羧酸循环、GABA 代谢、氨基酸合成和莽草酸介导的次级代谢等发生变化^[122]。较高的盐离子会导致大豆的多胺氧化降解为 GABA^[123]。植物 GABA 受体具有调节 pH 和 Al^{3+} 的根耐受性^[7]。

细菌侵染过程中的植物 GAD 表达量和 γ -羟基丁酸转录丰度会上升, 致使 GABA 升高^[124]。高 GABA 合成水平的烟草对根癌土壤杆菌 C58 感染敏感性有所下降。GABA 可诱导农杆菌 ATTKLM 操纵子表达, 使得 N-(3-氧代辛酰基) 高丝氨酸内酯 (OC8HSL) 的浓度减少, 群体感应信号 (或激素) 下调, 影响其对植物的毒性^[125]。GABA 在植物与细菌的信号交流中也发挥作用, GABA 可以抑制细菌内 *HrpI* 基因表达 (*HrpI* 基因编码蛋白使得植物致敏或引起其组织疾病^[126]), 同时抑制植物体内 *hrp* 基因表达, 使得植物免于过敏反应 (*hrp*: 控制植物病原体致病能力, 并引起过敏反应^[127])^[11]。

此外, GABA 还具有催熟作用。GABA 可以通过刺激 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 合成酶转录丰度刺激乙烯生物合成^[128]。而水涝下乙烯可以通过促进不定根的生长为植物提供氧气^[129]。

高浓度 GABA 可抑制植物和细菌 GABA 转氨酶 (GABA-T, GABT) 突变体的生长, 高浓度下可抑制细菌在植物内的繁殖^[11]。番茄中的 GABA-T 被抑制会导致 GABA 的积累, 使番茄出现矮小症^[130]。

在动物中, GABA 在线粒体中以浓度依赖方式氧化丙酮酸和脂肪提供 ATP。GABA 也可以通过抑制肿瘤坏死因子

介导的活性 H_2O_2 增加,从而抑制炎症的发生^[22]。

2 谷氨酸脱羧酶及其基因定点突变的研究

谷氨酸脱羧酶(GAD, glutamic acid decarboxylase)催化谷氨酸生成 GABA 和二氧化碳,GAD 在维生素 B_6 等吡哆醇化化合物的辅助下发挥作用,为一种吡哆醛-5-磷酸(Pyridoxal-5-phosphatemonohydrate, PLP)依赖性酶^[131]。其在生物应激反应下大量表达,为生物提供 GABA,满足应激下植物的生存需要^[4,42,132]。同时 GAD 也在生物中存在常态表达^[22],以满足生物对碳氮平衡、氨基酸支路和氧化物等的调控需求。GAD 在植物不同组织中的表达水平不同,便于灵活调控^[41]。而在动物中存在一个生物体总 GABA 浓度循环^[22]。植物受精过程中存在 GAD 表达浓度梯度依赖的受精方式^[133]。

2.1 GAD 的结构 GAD 在微生物和高等生物基因组中通常存在多个 GAD 编码基因^[134-135]。细菌 GAD 蛋白一般由 460~475 个氨基酸残基组成^[136]。GABA 在中性条件下仅存于细胞质中,而酸性条件下分布于膜上^[131]。GAD 由 3 个二聚体组成,分为 2 层,每层含有 3 个亚基^[137]。以大肠杆菌为例(图 2),其 N 端的 1~57 个残基对二聚体形成和稳定起作用,58~346 残基组成大结构域,由 8 个 α 螺旋包围 7 个 β 片层的结构域组成,347~466 残基形成小结构域,由 4 个反向平行的 β 片层和 3 个 α 螺旋组成^[137],其活性位点 300~313 的残基在酸性环境下向活性中心移动,在 PLP 的帮助下使得活性中心收紧。而 C 末端 16 个残基 452~466 在中性条件下插入活性中心,而酸性条件下使得活性中心暴露出来提高表达^[131,138]。动物 GAD 结构与微生物类似,而植物 GAD 其碳末端含有一个 Ca^{2+} 钙调结构域,用于 Ca^{2+} 调控^[4,41-42,139]。

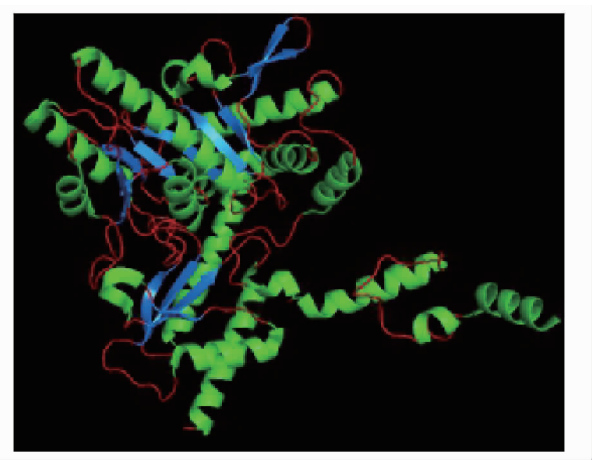


图 2 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶 3D 图
Fig.2 The 3D map of glutamate decarboxylase from *E.coli*

拟南芥与大肠杆菌 GAD 晶体结构相比,在 4 个暴露的区域 112~117、160~163、267~273、381~385 以及 β 发夹结构存在差异(图 3)。大肠杆菌 GAD 酶 β 发夹结构允许底物在低 pH 进入活性位点,中性条件下 β 发夹结构会延伸至活性位点附近^[140]。在短乳杆菌(CGMCC1306)中,GAD 的 Y308-E312 在入口处呈柔性状态^[141]。郁凯^[142]也发现由 Phe65 和 Thr215 构成的底物入口是一个疏水区域,其形状和大小决定了底物分子进入活性中心时的正确取向。辅酶 PLP 对活性

位点很重要,PLP 具有诱导活性中心构像变化、稳定蛋白结构以及促进亚基组装成大分子的功能^[138]。而短乳杆菌(CGMCC1306) Ser126、Ser127、Cys168、Ile211、Ser276、His278、Ser321 和 PLP 辅因子在酶的活性中起作用^[141]。PLP 可以与 Lys276 形成亚胺键,结合后其吡啶环位于 Gln63 和 Ala246 之间。Lys276 与 PLP 醛基的 N 形成盐桥即希夫碱起作用^[136,143-144]。GAD 存在高度保守的 PLP 结合位点($-\text{RxxxxxxPHKMMxVxLxC}-$)^[139]。PLP 吡啶环通常与 Tyr、Trp、Phe、Gln 残基相互作用,PLP 磷酸基团与酶的色氨酸和丙氨酸作用^[131,136]。Thr64、Phe65、Asn85、Gln166、Phe320、Arg42 对催化至关重要^[141]。Arg422 对 Phe63 侧链吸引使得 α -脱羧不受干扰^[136]。而 *gadB* Asn83、Asp86、Thr62、Phe63 参与底物与远端羧基的结合^[140]。*gadB* 活性位点包括 Phe63、Ser128、Thr212、Asp243、Ala245、Asp86、His275、Lys276、Arg422,而 Cys64、Thr63、Asp86、Asn83 等残基形成的氢链有助于底物的识别^[131,137]。



注:红色.112~117 氨基酸残基,蓝色.160~163 氨基酸残基,黄色.267~273 氨基酸残基,紫色.381~385 氨基酸残基,彩虹色. β 发夹结构
Note;Red.112~117 amino acid residues, blue.160~163 amino acid residues, yellow.267~273 amino acid residues, purple.381~385 amino acid residues, rainbow color.beta hairpin structure

图 3 拟南芥 GAD 的 3D 结构
Fig.3 3D structure diagram of *Arabidopsis* GAD

2.2 GAD 表达的影响因素及其定点突变的研究 在微生物中,GAD 表达主要受 pH 的影响^[4,42,131]。而植物中 GAD 表达同时受 Ca^{2+} 调控和 pH 调控的影响^[4,42,74]。动物中则通过受体和 pH 调控^[4,22,42,52]。GAD 表达也受多种因素制约如氮压力、过氧化物中间体、底物水平、GABA 的反馈抑制调节等。同时其活性也受乙酸等化合物抑制^[131]。

近年来,为了解析 GAD 结构和功能,研究者在 GAD 的定点突变、酶学特性改善研究方面取得了突破。研究表明,GAD His465 对于限定酶的酸性 pH 适应范围发挥重要作用,提高 pH 时,酶会解聚。基于这个原理,毕金丽等^[145]设计了包含 His465 在内的 6 个氨基酸缺失突变,在中性条件下,GAD 的表达量上升,且防止了酶的解聚。也有研究者认为其 pH 范围的限制与酶在 C 和 N 端的协同性有关,基于此设计

了 E89Q/ Δ His465 和 C 末端 14 氨基酸残基的突变体,使 GAD 在中性条件下活性得到了提高^[146]。而林玲^[147]研究表明,D88 突变体降低了酶活性,推测 Asp88 是质子供体。利用定点突变设计的 S307N 突变体,成功地改变了 β 发夹结构和酶 pH 适应性,使得酶活性在中性条件下得到了大幅提高。郁凯^[142]利用计算机辅助设计的突变筛选出 20 个候选位点,经过复筛后得到的 C379N 突变体明显提高了酶的热稳定性,酶的半失活温度提高了 5℃。田健^[148]也以此法筛选出了 G194P 在内的 6 个提高稳定性的突变体。

3 GABA 的制备方法与应用

3.1 GABA 的制备 可通过生物和化学 2 种方法制备 GABA。化学合成是通过邻苯二甲酰亚氨钾在 180℃ 下与 γ -氯丁氰反应,得到的产物经过浓硫酸回流,提纯结晶而得;另一种方法经由吡咯烷酮在氢氧化钙和碳酸氢铵下水解开环等方法得到。化学合成法由于存在使用危险溶剂和有毒物残留的不足,不适宜在食品应用领域使用^[149-150]。生物合成又分为植物富集和微生物发酵 2 种方法。植物富集可以通过植物具有的 2 种 GABA 生产途径完成生产,而微生物发酵则使用谷氨酸脱氨酶途径发酵生产 GABA。戴凤燕等^[151]、杨晶晶等^[152]利用两步酶法合成 GABA,该方法包括发芽及均相反应 2 个阶段,其中发芽阶段是将原料浸泡发芽;均相反应阶段即在发芽后一定条件下碾碎原料,在水相中利用释放的酶生产 GABA 最高达 3.7 mg/g。

3.2 GABA 的应用 目前 GABA 作为癫痫、帕金森以及神经类等药物广泛应用于医药领域。在农作物种植中,GABA 喷洒在植物表面可增强植物耐寒、耐旱、耐碱、耐涝、耐热能力,还可进行果实催熟。GABA 产品 AvxGro 很早就用在农业中^[4]。而作为食品添加剂在东亚地区是广泛关注的课题。日本和我国也相继在 2001 和 2009 年分别将其作为食品级添加剂^[152]。Hayisamae 等^[153]认为植物乳杆菌 DW12 发酵的红海藻培养液是一种潜在的饮品,其 GABA 达 1 284 mg/L。日本是最早使用 GABA 作为食品添加剂的国家,以高 GABA 含量的茶类、发芽糙米作为健康食品素材^[154]。Kim 等^[155]也发现短乳杆菌 BH2 GABA 产量达 194 mmol/L。Seo 等^[156]通过短乳杆菌 877G 的 *gad* 基因在大肠杆菌中异源表达,测得较高酶活,在 29.57 mmol/L L-谷氨酸钠中利用短乳杆菌 877G 和萨克氏乳杆菌 795 共发酵得到 22.51 mmol/L GABA,这种方法可作为 GABA 功能性发酵食品和乳制品强化的促进剂^[157]。我国近年来同样有许多微生物发酵生产 GABA 的尝试。短乳杆菌 NCL912 是近年来的一株高产菌株,其 GABA 浓度达 (1005.81 $\pm$ 47.88) mmol/L^[158]。Huang 等^[159]从牛奶中分离获得短乳杆菌 CGMCC1306,优化培养得到最大酶活性。其后也生产出 526.33 mmol/L GABA,以及利用酶定向进化的方法提高 GABA 产量^[160-161]。龚福明等^[162]利用植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) YM-4-3 优化,其产量为 15.09 mmol/L。啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MJ2 的 GABA 产量最高可达 7.539 g/L^[163]。赵安琪^[164]尝试利用布氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*) WPZ001 *gadB* 基因重组菌

将原本摇瓶中 GABA 的 75.5 g/L 提升到 313.1 g/L。相对于高等生物中极低的 GABA 生理含量,微生物中发酵所得远远超出这个数字。微生物中 GAD 较窄的 pH 适用范围,仍限制了 GABA 在工农业生产中的应用范围。因此,有必要从多角度开展工作,发掘更多的基因资源,以克服不足。而利用代谢工程生产 GABA 具有更大的生产潜力和更低的成本,因而具有较高的经济价值。

4 展望

GABA 作为生物体常驻的氨基酸一直广泛并深远地影响着生物体。作为生物体应激响应中关键的中间体和生物体内重要的信号传递者。从低等到高等生物中呈现从简单到复杂的有序过程。作为植物以及人体中重要的信号分子,起着承上启下的作用。尤其是对于高等生物中受体调节机制,是多种病理发病和治疗的重要因素。随着科技的进步,GABA 作为一个媒介可以帮助了解更多的应激以及神经的生理调节过程,更加理性和精准地利用 GABA。

参考文献

- ACKERMANN D, KUTSCHER F. Über die aporphogenen[J]. Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1910, 69(3/4): 265-272.
- AWAPARA J. Occurrence of free γ -aminobutyric acid in brain and its formation from L-glutamic acid[J]. Tex Rep Biol Med, 1950, 8(4): 443-447.
- ROBERTS E, FRANKEL S. γ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid[J]. J Biol Chem, 1950, 187: 55-63.
- SHELP B J, BOWN A W, MCLEAN M D. Metabolism and functions of γ -aminobutyric acid[J]. Trends Plant Sci, 1999, 4(11): 446-452.
- MAJUMDAR D, GUHA S. Conformation, electrostatic potential and pharmacophoric pattern of GABA (γ -aminobutyric acid) and several GABA inhibitors[J]. J Mol Struct-theochem, 1988, 180: 125-140.
- CHRISTENSEN H N, GREENE A A, KAKUDA D K, et al. Special transport and neurological significance of two amino acids in a configuration conventionally designated as D[J]. J Exp Biol, 1994, 196(1): 297-305.
- RAMESH S A, TYERMAN S D, XU B, et al. GABA signalling modulates plant growth by directly regulating the activity of plant-specific anion transporters[J]. Nat Commun, 2015, 6: 1-9.
- YOON Y E, KUPPUSAMY S, CHO K M, et al. Influence of cold stress on contents of soluble sugars, vitamin C and free amino acids including γ -aminobutyric acid (GABA) in spinach (*Spinacia oleracea*) [J]. Food Chem, 2017, 215: 185-192.
- AKCAY N, BOR M, KARABUDAK T, et al. Contribution of γ amino butyric acid (GABA) to salt stress responses of *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant and wild type plants[J]. J Plant Physiol, 2012, 169(5): 452-458.
- RENAULT H, ROUSSEL V, EL AMRANI A, et al. The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance[J]. BMC Plant Biol, 2010, 10(1): 1-16.
- PARK D H, MIRABELLA R, BRONSTEIN P A, et al. Mutations in γ -aminobutyric acid (GABA) transaminase genes in plants or *Pseudomonas syringae* reduce bacterial virulence[J]. Plant J, 2010, 64(2): 318-330.
- ROBERTS E. γ -aminobutyric acid and nervous system function-A perspective[J]. Biochem Pharmacol, 1974, 23(19): 2637-2649.
- DAVIES W E. The distribution of GABA transaminase-containing neurones in the cat cochlear nucleus[J]. Brain Res, 1975, 83(1): 27-33.
- CASTANIE-CORNET M P, PENFOUND T A, SMITH D, et al. Control of acid resistance in *Escherichia coli* [J]. J Bacteriol, 1999, 181(11): 3525-3535.
- SANDERS J W, LEENHOUTS K, BURGHOOORN J, et al. A chloride - inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation [J]. Mol Microbiol, 1998, 27(2): 299-310.
- SHELP B J, BOZZO G G, TROBACHER C P, et al. Hypothesis/review: Contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress[J]. Plant Sci, 2012, 193/194: 130-135.
- ZAREI A, TROBACHER C P, SHELP B J. Arabidopsis aldehyde dehydrogenase 10 family members confer salt tolerance through putrescine-derived 4-aminobutyrate (GABA) production[J]. Sci Rep, 2016, 6: 1-11.

- [18] MACGREGOR K B, SHELPE B J, PEIRIS S, et al. Overexpression of glutamate decarboxylase in transgenic tobacco plants deters feeding by phytophagous insect larvae[J]. *J Chem Ecol*, 2003, 29(9): 2177–2182.
- [19] BOWN A W, MACGREGOR K B, SHELPE B J. Gamma-aminobutyrate: Defense against invertebrate pests? [J]. *Trends Plant Sci*, 2006, 11(9): 424–427.
- [20] KONNO K, HIRAYAMA C, YASUI H, et al. GABA, β -alanine and glycine in the digestive juice of privet-specialist insects: Convergent adaptive traits against plant iridoids[J]. *J Chem Ecol*, 2010, 36(9): 983–991.
- [21] XU Y, XU M Y, LI X. Modulation of γ -aminobutyric acid on painful sense in central nervous system of morphine-dependent rats[J]. *Neurosci Bull*, 2008, 24(5): 278–282.
- [22] SEN S, ROY S, BANDYOPADHYAY G, et al. γ -Aminobutyric acid is synthesized and released by the endothelium: Potential implications[J]. *Circ Res*, 2016, 119(5): 621–634.
- [23] BOUCHÉ N, FROMM H. GABA in plants: Just a metabolite? [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(3): 110–115.
- [24] MAPELLI S, BRAMBILLA I, BELLONI V, et al. Changes of free amino acids in leaf sap of trees subjected to flooding and drought stresses[J]. *Acta Hortic*, 2001, 544(544): 233–238.
- [25] HILDEBRANDT T M, NUNES NESI A, ARA UJO W L, et al. Amino acid catabolism in plants[J]. *Mol Plant*, 2015, 8(11): 1563–1579.
- [26] BOULLAND J L, CHAUDHRY F A. Ontogenetic changes in the distribution of the vesicular GABA transporter VGAT correlate with the excitation/inhibition shift of GABA action[J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(4): 506–516.
- [27] BUCKINGHAM S D, BIGGIN P C, SATTELLE B M, et al. Insect GABA receptors: Splicing, editing and targeting by antiparasitics and insecticides [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(4): 942–951.
- [28] DURKIN M M, GUNWALDSEN C A, BOROWSKY B, et al. An in situ hybridization study of the distribution of the GABAB2 protein mRNA in the rat CNS[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, 71(2): 185–200.
- [29] BARNARD E A, SKOLNICK P, OLSEN R W, et al. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid A receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function[J]. *Pharmacol Rev*, 1998, 50(2): 291–313.
- [30] LUSCHER B, FUCHS T, KILPATRICK C L. GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses[J]. *Neuron*, 2011, 70(3): 385–409.
- [31] SIEGHART W, SPERK G. Subunit composition, distribution and function of GABA-A receptor subtypes[J]. *Curr Top Med Chem*, 2002, 2(8): 795–816.
- [32] OLSEN R W, SIEGHART W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of γ -aminobutyric acid A receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function [J]. *Update Pharmacol Rev*, 2008, 60(3): 243–260.
- [33] SIEGHART W. Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites[J]. *Adv Pharmacol*, 2015, 72: 53–96.
- [34] OLSEN R W. GABAA receptor: positive and negative allosteric modulators [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 136(Pt A): 10–22.
- [35] RAJAGOPAL L, SONI D, MELTZER H Y. Neurosteroid pregnenolone sulfate, alone, and as augmentation of lurasidone or tandospirone, rescues phencyclidine-induced deficits in cognitive function and social interaction [J]. *Behav Brain Res*, 2018, 350: 31–43.
- [36] KqLLER K S. Structure/activity relationship of alpha-conotoxins targeting GABAB receptor[D]. Tromsø, Norway: Universitetet i Tromsø, 2011.
- [37] EMSON P C. GABAB receptors: Structure and function [J]. *Prog Brain Res*, 2007, 160: 43–57.
- [38] BOLTON M. Alterations of NMDA and GABAB receptor function in development: A potential animal model of schizophrenia [D]. Nevada: University of Nevada, 2013.
- [39] FILIP M, FRANKOWSKA M. GABA (B) receptors in drug addiction[J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60(6): 755–770.
- [40] STRAESSLE A, LOUP F, ARABADZIS D, et al. Rapid and long-term alterations of hippocampal GABAB receptors in a mouse model of temporal lobe epilepsy[J]. *European J Neurosci*, 2003, 18(8): 2213–2226.
- [41] LEE J H, KIM Y J, JEONG D Y, et al. Isolation and characterization of a *Glutamate decarboxylase* (GAD) gene and their differential expression in response to abiotic stresses from *Panax ginseng* C.A. Meyer[J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37(7): 3455–3463.
- [42] KINNERSLEY A M, TURANO F J. Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2000, 19(6): 479–509.
- [43] GILLIHAM M, TYERMAN S D. Linking metabolism to membrane signaling: The GABA-malate connection[J]. *Trends Plant Sci*, 2016, 21(4): 295–301.
- [44] SHARMA T, DREYER I, KOCHIAN L, et al. The ALMT family of organic acid transporters in plants and their involvement in detoxification and nutrient security[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1–12.
- [45] LIU J, ZHOU M X. The ALMT gene family performs multiple functions in plants[J]. *Agronomy*, 2018, 8(2): 1–18.
- [46] AWAPARA J, LANDUA A J, FUERST R, et al. Free γ -aminobutyric acid in brain[J]. *J Biol Chem* 1950, 187: 35–39.
- [47] KRANTIS A, HARDING R K. The distribution of GABA-transaminase-dehydrogenase activity in the myenteric plexus of rat small intestine: A histochemical analysis[J]. *Neurosci Lett*, 1986, 64(1): 85–90.
- [48] ERDÖ S L, WOLF J R. Releasable, non-neuronal GABA pool in rat stomach[J]. *Eur J Pharmacol*, 1988, 156(1): 165–168.
- [49] TRANDABURU I, KUMMER W, TRANDABURU T. The immunocytochemical detection of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the pancreas of amphibian *Rana esculenta*; light- and electron-microscopic observations [J]. *Studia Universitatis Vasile Goldis Seria Stiintele Vietii (Life Sciences Series)*, 2010, 20(1): 5–11.
- [50] CHEN G, TROMBLEY P Q, VAN DEN POL A N. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones [J]. *J Physiol*, 1996, 494(2): 451–464.
- [51] IORIO L C, BARNETT A, LEITZ F H, et al. SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic systems [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983, 226(2): 462–468.
- [52] LUPINSKY D, MOQUIN L, GRATTON A. Interhemispheric regulation of the rat medial prefrontal cortical glutamate stress response: Role of local GABA- and dopamine-sensitive mechanisms [J]. *Psychopharmacology*, 2017, 234(3): 353–363.
- [53] BEHAR T N, LI Y X, TRAN H T, et al. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms[J]. *J Neurosci*, 1996, 16(5): 1808–1818.
- [54] LOTURCO J J, OWENS D F, HEATH M J S, et al. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis[J]. *Neuron*, 1995, 15(6): 1287–1298.
- [55] HAYDAR T F, WANG F, SCHWARTZ M L, et al. Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(15): 5764–5774.
- [56] YOGESHWARI P, PATEL S K, REDDY I V, et al. GABA derivatives for the treatment of epilepsy and neuropathic pain: A synthetic integration of GABA in 1,2,4-Triazolo-2H-one nucleus[J]. *Biomedicine and Aging Pathology*, 2012, 2(2): 31–40.
- [57] LLOYD K G, BOSSI L, MORSELLI P L, et al. Alterations of GABA-mediated synaptic transmission in human epilepsy[J]. *Adv Neurol*, 1986, 44: 1033–1044.
- [58] KOKAIA M, AEBISCHER P, ELMÉR E, et al. Seizure suppression in kindling epilepsy by intracerebral implants of GABA-but not by noradrenaline-releasing polymer matrices[J]. *Exp Brain Res*, 1994, 79(2): 385–394.
- [59] HIRSCH J C, AGASSANDIAN C, MERCHAN-PEREZ A, et al. Deficit of quantal release of GABA in experimental models of temporal lobe epilepsy [J]. *Nat Neurosci*, 1999, 2(6): 499–500.
- [60] BUHL E H, OTIS T S, MODY I Z. Zinc-induced collapse of augmented inhibition by GABA in a temporal lobe epilepsy model[J]. *Science*, 1996, 271(5247): 369–373.
- [61] CZUCZWAR S J, PATSALOS P N. The new generation of GABA enhancers. Potential in the treatment of epilepsy[J]. *CNS Drugs*, 2001, 15(5): 339–350.
- [62] TASKER J G, DUDEK F E. Electrophysiology of GABA-mediated synaptic transmission and possible roles in epilepsy[J]. *Neurochem Res*, 1991, 16(3): 251–262.
- [63] PEARL P L, SHUKLA L, THEODORE W H, et al. Epilepsy in succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency, a disorder of GABA metabolism [J]. *Brain Dev*, 2011, 33(9): 796–805.
- [64] ESCLAPEZ M, HOUSER C R. Up-regulation of GAD65 and GAD67 in remaining hippocampal GABA neurons in a model of temporal lobe epilepsy [J]. *J Comp Neurol*, 1999, 412(3): 488–505.
- [65] OH C H, OH S H. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis [J]. *J Med*

- Food, 2004, 7(1): 19–23.
- [66] LIN C C, CHUNG Y C, HSU C P. GABA tea extract inhibit the colony formation and invasion of colorectal cancer cells [J]. *MOJ Food Process Technol*, 2017, 5(4): 349–351.
 - [67] SOLORZANO S R, IMAZ-ROSSHANDLER I, CAMACHO-ARROYO I, et al. GABA promotes gastrin-releasing peptide secretion in NE/NE-like cells: Contribution to prostate cancer progression [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1–13.
 - [68] YOUNG S Z, BORDEY A. GABA'S control of stem and cancer cell proliferation in adult neural and peripheral niches [J]. *Physiology*, 2009, 24(3): 171–185.
 - [69] AL-WADEI H A N, AL-WADEI M H, ULLAH M F, et al. Celecoxib and GABA cooperatively prevent the progression of pancreatic cancer in vitro and in xenograft models of stress-free and stress-exposed Mice [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): 1–11.
 - [70] MA P J, LI T, JI F C, et al. Effect of GABA on blood pressure and blood dynamics of anesthetic rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 14296–14302.
 - [71] MABUNGA D F N, GONZALES E L T, KIM H J, et al. Treatment of GABA from fermented rice germ ameliorates caffeine-induced sleep disturbance in mice [J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2015, 23(3): 268–274.
 - [72] TIAN J, DANG H, KAUFMAN D L. Combining antigen-based therapy with GABA treatment synergistically prolongs survival of transplanted β -cells in diabetic NOD mice [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): 1–5.
 - [73] ISRAEL M. Inadequate pancreatic GABA controls that explain cancer metabolism [J]. *Acta scientific cancer biology*, 2018, 2: 23–26.
 - [74] SCHOLZ S S, REICHELT M, MEKONNEN D W, et al. Insect herbivory-elicited GABA accumulation in plants is a wound-induced, direct, systemic, and jasmonate-independent defense response [J]. *Front Plant Sci*, 2015, 6: 1–11.
 - [75] XU L, CAI W X, XU B J. A systematic assessment on vitamins (B_2 , B_{12}) and GABA profiles in fermented soy products marketed in China [J]. *J Food Process Pres*, 2017, 41(5): e13126.
 - [76] MIYASHITA Y, GOOD A G. Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(1): 92–102.
 - [77] AGHDAM M S, FARD J R. Melatonin treatment attenuates postharvest decay and maintains nutritional quality of strawberry fruits (*Fragaria $\times$ ananassa* cv. Selva) by enhancing GABA shunt activity [J]. *Food Chem*, 2017, 221: 1650–1657.
 - [78] CARROLL A D, FOX G G, LAURIE S, et al. Ammonium assimilation and the role of γ -aminobutyric acid in pH homeostasis in carrot cell suspensions [J]. *Plant Physiol*, 1994, 106(2): 513–520.
 - [79] KRULWICH T A, SACHS G, PADAN E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(5): 330–343.
 - [80] KAILA K, SAARIKOSKI J, VOIPOJO J. Mechanism of action of GABA on intracellular pH and on surface pH in crayfish muscle fibres [J]. *J Physiol*, 1990, 427(1): 241–260.
 - [81] CRAWFORD L A, BOWN A W, BREITKREUZ K E, et al. The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104(3): 865–871.
 - [82] CHEN J C, CHESLER M. Modulation of extracellular pH by glutamate and GABA in rat hippocampal slices [J]. *J Neurophysiol*, 1992, 67(1): 29–36.
 - [83] KOLLEND M C, SCARBOROUGH R M, GERBES A L. Discrimination and quantification of glomerular receptor subtypes for atrial natriuretic factor (ANF) [J]. *J Recept Res*, 1991, 11(1/2/3/4): 259–273.
 - [84] 王晓冬, 解备涛, 谭伟明, 等. γ 氨基丁酸对冬小麦籽粒灌浆期耐旱性及产量和品质的影响 [J]. *麦类作物学报*, 2009, 29(4): 623–626.
 - [85] 黄娟, 高温胁迫下外源 GABA 对黄瓜幼苗生长的影响 [J]. *长江蔬菜*, 2016(8): 73–78.
 - [86] BISWAS S, PODDAR M K. Does GABA act through dopaminergic/cholinergic interaction in the regulation of higher environmental temperature-induced change in body temperature? [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1990, 12(5): 303–307.
 - [87] BISWAS S, PODDAR M K. Repeated exposure to high environmental temperature changes brain regional GABA metabolism [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 1990, 12(6): 395–400.
 - [88] YOSHIKAWA T, MIYAGAWA T. Effect of oral administration of GABA on temperature regulation in humans during rest and exercise at high ambient temperature [J]. *Osaka City Med J*, 2009, 55: 99–108.
 - [89] LARCHER W, BAUER H. Ecological significance of resistance to low temperature [M] // LANGE O L, NOBEL P S, OSMOND C B, et al. *Physiological plant ecology I: Responses to the physical environment*. New York: Springer, 1981: 403–437.
 - [90] FUJISAKI T, WAKATSUKI H, KUDOH M, et al. Irreversible impairment of inhibitory neurons and nitric oxide release in the neocortex produced by low temperature and hypoxia in vitro [J]. *Neurosci Res*, 1999, 33(4): 307–316.
 - [91] BISWAS S, PODDAR M K. Effect of short-and long-term exposure to low environmental temperature on brain regional GABA metabolism [J]. *Neurochem Res*, 1990, 15(8): 815–820.
 - [92] BUSTAMANTE C A, MONTI L L, GABILONDO J, et al. Differential metabolic rearrangements after cold storage are correlated with chilling injury resistance of peach fruits [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7: 1478.
 - [93] OBATA T, FERNIE A R. The use of metabolomics to dissect plant responses to abiotic stresses [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(19): 3225–3243.
 - [94] KAPLAN F, KOPKA J, SUNG D Y, et al. Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of *Arabidopsis* reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content [J]. *Plant J*, 2007, 50(6): 967–981.
 - [95] AGHDAM M S, NADERI R, JANNATIZADEH A, et al. Impact of exogenous GABA treatments on endogenous GABA metabolism in anthurium cut flowers in response to postharvest chilling temperature [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 106: 11–15.
 - [96] BOUCHÉ N, FAIT A, BOUCHEZ D, et al. Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(11): 6843–6848.
 - [97] CAO J, BARBOSA J M, SINGH N K, et al. GABA shunt mediates thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen production [J]. *Yeast*, 2013, 30(4): 129–144.
 - [98] FAIT A, YELLIN A, FROMM H. GABA shunt deficiencies and accumulation of reactive oxygen intermediates: Insight from *Arabidopsis* mutants [J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(2): 415–420.
 - [99] INKHAM C, SUEYOSHI K, OHTAKE N, et al. Effects of temperature and nitrogen sources on growth and nitrogen assimilation of *Curcuma alismatifolia* Gagnep [J]. *Thai journal of agricultural science*, 2011, 44(3): 145–153.
 - [100] BARBOSA J M, SINGH N K, CHERRY J H, et al. Nitrate uptake and utilization is modulated by exogenous γ -aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48(6): 443–450.
 - [101] TURANO F J, FANG T K. Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117(4): 1411–1421.
 - [102] WANG Y S, LUO Z S, MAO L C, et al. Contribution of polyamines metabolism and GABA shunt to chilling tolerance induced by nitric oxide in cold-stored banana fruit [J]. *Food Chem*, 2016, 197: 333–339.
 - [103] SERRAJ R, SHELPI B J, SINCLAIR T R. Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress [J]. *Physiol Plantarum*, 1998, 102(1): 79–86.
 - [104] FAES P, NIOGRET M F, MONTES E, et al. Transcriptional profiling of genes encoding GABA-transaminases in *Brassica napus* reveals their regulation by water deficit [J]. *Environ Exp Bot*, 2015, 116: 20–31.
 - [105] FAROOQ M, WAHID A, KOBAYASHI N, et al. Plant drought stress: Effects, mechanisms and management [J]. *Agron Sustain Dev*, 2009, 29(1): 185–212.
 - [106] GUO P, BAUM M, GRANDO S, et al. Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(12): 3531–3544.
 - [107] KRISHNAN S, LASKOWSKI K, SHUKLA V, et al. Mitigation of drought stress damage by exogenous application of a non-protein amino acid γ -aminobutyric acid on perennial ryegrass [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2013, 138(5): 358–366.
 - [108] TEMPLER S E, AMMON A, PSCHIEDT D, et al. Metabolite profiling of barley flag leaves under drought and combined heat and drought stress reveals metabolic QTLs for metabolites associated with antioxidant defense [J]. *J Exp Bot*, 2017, 68(7): 1697–1713.
 - [109] YONG B, XIE H, LI Z, et al. Exogenous Application of GABA improves PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, polyamines, and proline metabolism in white clover [J]. *Front Physiol*, 2017, 8: 1107.

- [110] REZAEI-CHIYANEH E, SEYYEDI S M, EBRAHIMIAN E, et al. Exogenous application of γ -aminobutyric acid (GABA) alleviates the effect of water deficit stress in black cumin (*Nigella sativa* L.) [J]. Ind Crop Prod, 2018, 112: 741–748.
- [111] SH H S, ABOU ZEID S T, SIAM H S, et al. Effect of waterlogging and organic matter addition on water soluble Si, pH and Eh values [J]. Int J Chem Tech Res, 2015, 8(4): 1557–1562.
- [112] KULKARNI S S, CHAVAN P D. Study of some aspects of anaerobic metabolism in roots of finger millet and rice plants subjected to waterlogging stress [J]. Int J Bot, 2013, 9(2): 80–85.
- [113] SCHMIDT S, STEWART G R. Waterlogging and fire impacts on nitrogen availability and utilization in a subtropical wet heathland (wallum) [J]. Plant Cell Envi, 1997, 20(10): 1231–1241.
- [114] JACKSON M B, HALL K C. Early stomatal closure in waterlogged pea plants is mediated by abscisic acid in the absence of foliar water deficits [J]. Plant Cell Envi, 1987, 10(2): 121–130.
- [115] SUBBARAYAN K, ROLLETSCHKE H, SENULA A, et al. Influence of oxygen deficiency and the role of specific amino acids in cryopreservation of garlic shoot tips [J]. BMC Biotechnol, 2015, 15(1): 1–9.
- [116] 夏庆平, 高洪波, 李敬蕊. γ -氨基丁酸(GABA)对低氧胁迫下甜瓜幼苗光合作用和叶绿素荧光参数的影响[J]. 应用生态学报, 2011, 22(4): 999–1006.
- [117] 王春燕, 李敬蕊, 夏庆平, 等. 外源 γ -氨基丁酸(GABA)对低氧胁迫下甜瓜幼苗根系 GABA 代谢及氨基酸含量的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(7): 2011–2018.
- [118] ZHANG X C, SHABALA S, KOUTOULIS A, et al. Waterlogging tolerance in barley is associated with faster aerenchyma formation in adventitious roots [J]. Plant soil, 2015, 394(1/2): 355–372.
- [119] ROCHA M, LICAUSI F, ARAUJO W L, et al. Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus* [J]. Plant Physiol, 2010, 152(3): 1501–1513.
- [120] JAEGER C, GESSLER A, BILLER S, et al. Differences in C metabolism of ash species and provenances as a consequence of root oxygen deprivation by waterlogging [J]. J Exp Bot, 2009, 60(15): 4335–4345.
- [121] SHABALA S, SHABALA L, BARCELO J, et al. Membrane transporters mediating root signalling and adaptive responses to oxygen deprivation and soil flooding [J]. Plant Cell Environ, 2014, 37(10): 2216–2233.
- [122] ZHANG J T, ZHANG Y, DU Y, et al. Dynamic metabolomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants to salt stress [J]. J Proteome Res, 2011, 10(4): 1904–1914.
- [123] XING S G, JUN Y B, HAU Z W, et al. Higher accumulation of γ -aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots [J]. Plant Physiol Biochem, 2007, 45(8): 560–566.
- [124] DIMLIO GLU G, DA Ş Z A, BOR M, et al. The impact of GABA in harpin-elicited biotic stress responses in *Nicotiana tabacum* [J]. J Plant Physiol, 2015, 188: 51–57.
- [125] CHEVROT R, ROSEN R, HAUDECOEUR E, et al. GABA controls the level of quorum-sensing signal in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(19): 7460–7464.
- [126] WEI Z M, BEER S V. *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors [J]. J Bacteriol, 1995, 177(21): 6201–6210.
- [127] LINDGREN P B. The role of hrp genes during plant-bacterial interactions [J]. Annu Rev Phytopathol, 1997, 35(1): 129–152.
- [128] KATHIRESAN A, TUNG P, CHINNAPPA C C, et al. γ -aminobutyric acid stimulates ethylene biosynthesis in sunflower [J]. Plant Physiol, 1997, 115(1): 129–135.
- [129] VOESENEK L A C J, VAN DER VEEN R. The role of phytohormones in plant stress: Too much or too little water [J]. Acta Bot Neerl, 1994, 43(2): 91–127.
- [130] KOIKE S, MATSUKURA C, TAKAYAMA M, et al. Suppression of γ -aminobutyric acid (GABA) transaminases induces prominent GABA accumulation, dwarfism and infertility in the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) [J]. Plant Cell Physiol, 2013, 54(5): 793–807.
- [131] CAPITANI G, DE BIASI D, AURIZI C, et al. Crystal structure and functional analysis of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase [J]. EMBO J, 2003, 22(16): 4027–4037.
- [132] ROOHINEJA S, MIRHOSSEINI H, SAARI N, et al. Evaluation of GABA, crude protein and amino acid composition from different varieties of Malaysian's brown rice [J]. Aust J Crop Sci, 2009, 3(4): 184–190.
- [133] YU G H, ZOU J, FENG J, et al. Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via modulating putative Ca^{2+} -permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase [J]. J Exp Bot, 2014, 65(12): 3235–3248.
- [134] BU D F, ERLANDER M G, HITZ B C, et al. Two human glutamate decarboxylases, 65-kDa GAD and 67-kDa GAD, are each encoded by a single gene [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(6): 2115–2119.
- [135] SMITH D K, KASSAM T, SINGH B, et al. *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci [J]. J Bacteriol, 1992, 174(18): 5820–5826.
- [136] SUKHAREVA B S, MAMAEVA O K. Glutamate decarboxylase: Computer studies of enzyme evolution [J]. Biochemistry (Mosc), 2002, 67(10): 1180–1188.
- [137] DUTYSHEV D I, DARI E L, FOMENKOVA N P, et al. Structure of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase (gadAlpha) in complex with glutarate at 2.05 angstroms resolution [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2005, 61(3): 230–235.
- [138] BAZHULINA N P, DARI E L, LOBACHEV V M, et al. Structure of glutamate decarboxylase from *E. coli*: Spectral studies [J]. J Biomol Struct Dyn, 2002, 19(6): 999–1006.
- [139] UENO H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase [J]. J Mol Catal B: Enzym, 2000, 10(1/2/3): 67–79.
- [140] GUT H, DOMINICI P, PILATI S, et al. A common structural basis for pH- and calmodulin-mediated regulation in plant glutamate decarboxylase [J]. J Mol Biol, 2009, 392(2): 334–351.
- [141] HUANG J, FANG H, GAI Z C, et al. *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 glutamate decarboxylase: Crystal structure and functional analysis [J]. Biochem Bioph Res Co, 2018, 503(3): 1703–1709.
- [142] 郁凯. 以计算机辅助分子设计方法改造谷氨酸脱羧酶的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [143] TRAMONTI A, JOHN R A, BOSSA F, et al. Contribution of Lys276 to the conformational flexibility of the active site of glutamate decarboxylase from *Escherichia coli* [J]. Eur J Biochem, 2002, 269(20): 4913–4920.
- [144] MARTIN D L, WU S J, MARTIN S B. Glutamate-dependent active site labeling of brain glutamate decarboxylase [J]. J Neurochem, 1990, 55(2): 524–532.
- [145] 毕金丽, 刘娅, 王建平, 等. 大肠杆菌 L-谷氨酸脱羧酶定点突变及其酶学性质初步研究 [J]. 食品工业科技, 2014, 35(19): 162–167.
- [146] 高翠娟. 定向突变谷氨酸脱羧酶及其生物合成 γ -氨基丁酸的研究 [J]. 中国农业科技导报, 2016, 18(2): 59–64.
- [147] 林玲. 利用定向进化及半理性设计提高谷氨酸脱羧酶催化活性的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
- [148] 田健. 计算机辅助分子设计提高蛋白质热稳定性的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [149] 梁恒宇, 邓立康, 林海龙, 等. 新资源食品—— γ -氨基丁酸(GABA)的研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2013, 34(15): 119–123.
- [150] γ -氨基丁酸(GABA)在食品工业中的应用研究 [J]. 饮料工业, 2012, 15(1): 11–14.
- [151] 戴凤燕, 缪治炼, 陈介余, 等. 两步酶法生产 γ -氨基丁酸的研究 [J]. 中国食品学报, 2012, 12(2): 46–52.
- [152] 杨晶晶, 刘英, 崔秀明, 等. 高效液相色谱法测定三七地上部分 γ -氨基丁酸的含量 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 606–609.
- [153] HAYISAMAAE W, KANTACHOTE D, BHONGSUWAN D, et al. A potential synbiotic beverage from fermented red seaweed (*Gracilaria fisheri*) using *Lactobacillus plantarum* DW12 [J]. Int Food Res J, 2014, 21(5): 1789–1796.
- [154] 宋伟, 马霞, 张柏林. γ -氨基丁酸的生理功效及其在乳品中的强化途径 [J]. 乳业科学与技术, 2008, 31(6): 297–302.
- [155] KIM S H, SHIN B H, KIM Y H, et al. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2 [J]. Biotechnol Bioproc E, 2007, 12(6): 707–712.
- [156] SEO M J, NAM Y D, LEE S Y, et al. Expression and characterization of a glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* 877g producing γ -aminobutyric acid [J]. B Chem Soc Jpn, 2013, 77(4): 853–856.
- [157] SEO MJ, NAM YD, PARK SL, et al. γ -aminobutyric acid production in skim milk co-fermented with *Lactobacillus brevis* 877G and *Lactobacillus sakei* 795 [J]. Food Sci Bio Technol, 2013, 22(3): 751–755.

- 麦田杂草种子库物种多样性变化[J].生物多样性,2014,22(3):366-374.
- [3] 王文博.稻鸭共作及沼液施用对水稻产量和稻田系统养分平衡的影响[D].南京:南京农业大学,2014.
- [4] 沈晓昆.日本稻鸭共作人物记[J].农业装备技术,2015,41(1):63-64.
- [5] 沈晓昆,王志强,戴网成,等.国内外稻鸭共作动态[J].中国禽业导刊,2006(3):11.
- [6] 章家恩.近 10 多年来我国鸭稻共作生态农业技术的研究进展与展望[J].中国生态农业学报,2013,21(1):70-79.
- [7] 高旺盛,陈源泉,梁龙.论发展循环农业的基本原理与技术体系[J].农业现代化研究,2007(6):731-734.
- [8] 张银贵,李莲,黄奇,等.稻鸭共作药剂减控技术的研究与应用[J].中国稻米,2013,19(2):56-57,59.
- [9] 张孝安.稻鸭共作技术在中国的应用与普及现状[J].世界农业,2007(4):51-54.
- [10] 张帆,隋鹏,陈源泉,等.“稻鸭共生”生态系统稻季 N、P 循环[J].生态学报,2011,31(4):1093-1100.
- [11] 郑建初,谭淑豪,刘华周,等.中国稻鸭共作系统的理论与技术现状及其发展策略[J].江苏农业科学,2005(5):1-5.
- [12] HOSSAIN S T, SUGIMOTO H, AHMED G J U, et al. Effect of integrated rice-duck farming on rice yield, farm productivity and rice-provisioning ability of farmers[J]. Asian journal of agriculture and development, 2005, 23(1):79-86.
- [13] 章家恩,许荣宝,全国明,等.稻鸭共作对水稻植株生长性状与产量性状的影响[J].资源科学,2011,33(6):1053-1059.
- [14] 章家恩,许荣宝,全国明,等.稻鸭共作对水稻生理特性的影响[J].应用生态学报,2007,18(9):1959-1964.
- [15] 梁玉刚,黄璜,李静怡,等.规模化稻鸭共育对水稻株型结构及产量形成的影响[J].生态学报,2016,35(10):2752-2758.
- [16] 黄兆祥,章家恩,梁开明,等.模拟稻鸭共作系统中鸭子机械刺激对水稻形态建成的影响[J].中国生态农业学报,2012,20(6):717-722.
- [17] 全国明,章家恩,杨军,等.稻鸭共作对稻米品质的影响[J].生态学报,2008,28(7):3475-3483.
- [18] 王建林,李婕,曹元元.稻鸭共生有机栽培模式对黄河三角洲稻米品质的影响[J].应用生态学报,2016,27(7):2315-2320.
- [19] 王伟,张建军,陈恩会,等.稻鸭共作对水稻病虫害草害的控制效果评价[J].金陵科技学院学报,2017,33(4):48-52.
- [20] 王岳钧,怀燕,许剑锋.稻田综合种养模式对水稻病虫害草害的控制作用及机理[J].浙江农业学报,2018,30(6):1016-1021.
- [21] 沈建凯,黄璜,傅志强,等.规模化稻鸭生产对早稻病虫害变化规律及经济效益的影响[J].作物研究,2009,23(3):161-166.
- [22] 戴志明,杨华松,张曦,等.云南稻-鸭共生模式效益的研究及综合评价(三)[J].中国农学通报,2004,20(4):265-267,273.
- [23] 孙国俊,蒋林忠,蒋小春,等.稻鸭共作对水稻条纹叶枯病的控制效果[J].江苏农业科学,2007(6):93-94.
- [24] 杨治平,刘小燕,黄璜,等.稻田养鸭对稻鸭复合系统中病、虫、草害及蜘蛛的影响[J].生态学报,2004,24(12):2756-2760.
- [25] LONG P, HUANG H, LIAO X L, et al. Mechanism and capacities of reducing ecological cost through rice-duck cultivation[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2013, 93(12):2881-2891.
- [26] 秦钟,章家恩,骆世明,等.稻鸭共作系统中稻纵卷叶螟种群控制的模拟[J].农业工程学报,2010,26(11):283-289.
- [27] 甄若宏,王强盛,张卫建,等.稻鸭共作对稻田主要病、虫、草的生态控制效应[J].南京农业大学学报,2007,30(2):60-64.
- [28] 秦钟,章家恩,张锦,等.稻鸭共作系统中主要捕食性天敌的结构及多样性[J].生态学杂志,2011,30(7):1354-1360.
- [29] 张志东,李春,柳光富,等.稻鸭共育对稻田主要有害生物和水稻产量影响的研究[J].中国植保导刊,2012,32(3):21-23.
- [30] 王献志.“稻鸭共育”对稻田病虫害草害的控制效果分析[J].安徽农学通报,2016,22(1):37-39.
- [31] 魏守辉,强胜,马波,等.长期稻鸭共作对稻田杂草群落组成及物种多样性的影响[J].植物生态学报,2006,30(1):9-16.
- [32] 章家恩,许荣宝,全国明,等.稻鸭共作对土壤微生物数量及其功能多样性的影响[J].资源科学,2009,31(1):56-62.
- [33] 梁开明,章家恩,林田安,等.一稻两鸭共作对稻田土壤养分动态的影响[J].生态环境学报,2014,23(5):769-776.
- [34] 李妹娟,周念,章家恩,等.不同水稻品种混作养鸭对土壤养分动态的影响[J].中国生态农业学报,2017,25(2):211-220.
- [35] 禹盛苗,朱绪峰,欧阳由男,等.稻鸭种养模式对稻田土壤理化性状、肥力因素及水稻产量的影响[J].土壤通报,2014,45(1):151-156.
- [36] 张帆.“稻鸭共生”养分归还特征及水稻植株对氮、磷的吸收[J].中国生态农业学报,2012,20(3):265-269.
- [37] 张帆,陈源泉,高旺盛.“双季稻·鸭”共生生态系统稻季磷循环[J].生态学杂志,2012,31(6):1383-1389.
- [38] XI Y G, QIN P. Emergy evaluation of organic rice-duck mutualism system[J]. Ecological engineering, 2009, 35(11):1677-1683.
- [39] 赵学敏,徐云连,吴蔚君,等.稻鸭共育对稻田培肥及氮磷流失的影响[J].中国稻米,2018,24(2):10-13.
- [40] 李成芳,曹凑贵,徐拥华,等.稻鸭与稻鱼生态系统土壤微生物量 N 和土壤酶活性动态[J].生态学报,2008,28(8):3905-3912.
- [41] 甄若宏,王强盛,周建涛,等.稻鸭萍共作复合生态系统的物能特征分析[J].中国生态农业学报,2009,17(3):574-579.
- [42] 全国明,章家恩,陈瑞,等.稻鸭共作对稻田水体环境的影响[J].应用生态学报,2008,19(9):2023-2028.
- [43] 曹凑贵,汪金平,金晖,等.稻鸭共育对稻田水体藻类群落的影响[J].水生生物学报,2007,31(1):146-148.
- [44] 李成芳,曹凑贵,汪金平,等.不同耕作方式下稻田土壤 CH₄ 和 CO₂ 的排放及碳收支估算[J].农业环境科学学报,2009,28(12):2482-2488.
- [45] XU G C, LIU X, WANG Q S, et al. Integrated rice-duck farming mitigates the global warming potential in rice season[J]. Science of the total environment, 2017, 575:58-66.
- [46] ZHAN M, CAO C G, WANG J P, et al. Dynamics of methane emission, active soil organic carbon and their relationships in wetland integrated rice-duck systems in Southern China[J]. Nutrient cycling in agroecosystems, 2011, 89(1):1-13.
- [47] 刘欣,王强盛,许国春,等.稻鸭共作农作系统的生态效应与技术模式[J].中国农学通报,2015,31(29):90-96.
- [48] SUH J. Theory and reality of integrated rice-duck farming in Asian developing countries: A systematic review and SWOT analysis[J]. Agricultural systems, 2014, 125:74-81.
- [49] 章家恩,陆敬雄,张光辉,等.稻鸭共作生态农业模式的功效及存在的技术问题探讨[J].农业系统科学与综合研究,2006,22(2):94-97.

(上接第 9 页)

- [158] LI H X, QIU T, HUANG G D, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation[J]. Microb Cell Fact, 2010, 9(1):1-9.
- [159] HUANG J, MEI L H, SHENG Q, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk[J]. Chinese J Chem Eng, 2007, 15(2):157-161.
- [160] PENG C L, HUANG J, HU S, et al. A two-stage pH and temperature control with substrate feeding strategy for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306[J]. Chinese J Chem Eng, 2013, 1190-1194.
- [161] LIN L, HU S, YU K, et al. Enhancing the activity of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* by directed evolution[J]. Chinese J Chem Eng, 2014, 22(11/12):1322-1327.
- [162] 龚福明,柳晓坚,李瑞然.植物乳杆菌 ym-4-3 发酵合成 γ -氨基丁酸的条件优化[J].昆明理工大学学报(自然科学版),2017,42(4):63-72.
- [163] 李杰.生物合成 γ -氨基丁酸酵母菌谷氨酸脱羧酶基因的克隆及表达[D].金华:浙江师范大学,2009.
- [164] 赵安琪.微生物发酵法高效生产 γ -氨基丁酸的研究[D].无锡:江南大学,2017.