

# 生物转化法重组谷氨酸脱羧酶合成 $\gamma$ -氨基丁酸

王 期, 抗晶晶, 忻寅强, 李桂兰, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 成功构建了一个高效表达大肠杆菌谷氨酸脱羧酶 GAD 来源的重组质粒 pET28a-gadA, 并转化 *E. coli* BL21(DE3), 工程菌株经 0.4 mmol/L IPTG 或 1 g/L 的乳糖, 37℃ 诱导表达 8 h, 粗酶液的酶活达到 12 U/mL, 大约是出发菌株 *E. coli* K-12 的 60 倍. 工程菌 1.15 U 粗酶液以 31 g/L L-谷氨酸钠为底物, 37℃、pH 4.0 条件下反应 4 h  $\gamma$ -氨基丁酸的生成量达到 19.57 g/L, L-谷氨酸钠的转化率为 93%, 从而为  $\gamma$ -氨基丁酸的生产提供了很好的前景.

[关键词] 谷氨酸脱氢酶(GAD), 工程菌, 酶法合成,  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)

[中图分类号] TS201.2<sup>+</sup>5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)03-0085-06

## Production of $\gamma$ -aminobutyric Acid( $\gamma$ -GABA) by Bioconversion With Recombinant Glutamate Decarboxylase

Wang Qi, Kang Jingjing, Xing Yinqiang, Li Guilan, Yin Zhimin

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract** A recombinant plasmid named pET28a-gadA which could highly produce glutamate decarboxylase was constructed. The recombinant plasmid was transformed to *E. coli* BL21 (DE3). Glutamate decarboxylase was produced at 37℃, which was incubated with 0.4 mmol/L IPTG or 1 g/L lactose for 8 h. The activity of 1 mL crude extract of recombinant strain was usually 12 U/mL, which was about 60 times higher than the activity of *E. coli* K-12. In 1 mL reaction system, when 31 g/L L-Gln was used, 1.15 U crude extract, pH 4.0 and incubation at 37℃ for 4 h were the optimum condition. The yield of  $\gamma$ -GABA was 19.57 g/L. Finally, the rate of conversion from L-Gln to the  $\gamma$ -GABA was up to 93%, which eventually can be provided a good prospect for the production of  $\gamma$ -aminobutyric acid.

**Key words** Glutamate decarboxylase, engineered strain, enzymatic synthesis,  $\gamma$ -GABA

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是一种天然存在的非蛋白组成氨基酸,以自由态形式广泛存在于原核生物和真核生物中,是哺乳动物中枢神经系统的抑制性传递物质,介导了 40% 以上的抑制性神经信号<sup>[1]</sup>. GABA 具有多种生理功能,如降血压<sup>[2]</sup>、抗惊厥、预防癫痫<sup>[3]</sup>、改善睡眠、抗抑郁<sup>[4]</sup>、改善脑细胞<sup>[5]</sup>、促进激素分泌和保肝利肾<sup>[4]</sup>等,因而 GABA 在功能食品中具有广泛的应用前景.目前,国内外主要采用化学合成法<sup>[6]</sup>和微生物发酵法<sup>[7]</sup>制备  $\gamma$ -氨基丁酸.化学合成法反应条件剧烈,很难在食品企业实现;微生物发酵法条件温和、安全、成本较低,但后处理过程复杂且生产周期长.生物转化酶法合成 GABA 可提高底物转化率和产品纯度,具有节约后处理工序、缩短生产周期及降低环境污染等优点.谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD, EC 4.1.1.15)催化 L-谷氨酸脱羧生成  $\gamma$ -氨基丁酸和  $\text{CO}_2$ ,是原核和真核生物细胞中广泛存在的一种酶<sup>[8]</sup>.许多国外研究者利用不同微生物中的 GAD 来生产 GABA,但从复杂的发酵液中回收 GABA 相对困难且价格昂贵,低活性的细胞制备物一直是制约酶法合成 GABA 的重要因素<sup>[9-10]</sup>.尽管大肠杆菌 GAD 和 GABA 合成已经进行了广泛的研究,但如何获取高活性的重组 GAD 以及高效率、低成本、酶法生产具有多种应用价值的 GABA 方法很少见报道.本研究将克隆 *Escherichia coli* K-12

收稿日期: 2010-05-31

通讯联系人: 殷志敏, 博士, 教授, 研究方向: 生物化学及细胞生物学. E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

(*E. coli* K-12) 中的 *gadA* 基因, 转入到原核表达载体 pET28a 中, 构建了重组质粒 pET28a-*gadA*, 将重组质粒转化到 *E. coli* BL21 中, 获得工程菌, 并对由该工程菌制得的粗酶液催化 L-谷氨酸钠反应生成  $\gamma$ -氨基丁酸的能力进行了分析, 为今后利用重组谷氨酸脱羧酶生产  $\gamma$ -氨基丁酸奠定基础。

# 1 材料与方 法

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 菌种和质粒

*E. coli* K-12, *E. coli* DH5 $\alpha$ , 表达载体 pET28a, *E. coli* BL21(DE3) 均由本实验室保存。

### 1.1.2 试剂

限制性内切酶 NdeI, BamHI 为 TaKaRa 公司产品; T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、核酸标准相对分子质量购自 TaKaRa 公司; 蛋白质分子量标准购自 MBI 公司; 蛋白胨和酵母粉购自英国 OXOID 公司; 卡那霉素购于 Amresco 公司; 乳糖购自广东西陇化工厂; IPTG 购自 Merck 公司; 丙烯酰胺 (Ac) 及甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 购自 Pirmega 公司; 四甲基乙二胺 (TEMED) 购自 BioRad 公司; 考马斯亮蓝 R-250 购自 sanland 公司; 其余试剂均为国产分析纯。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 pET28a-*gadA* 重组质粒的构建

根据 *E. coli* K-12 的 *gadA* 基因序列设计引物, 5' 和 3' 端分别加入 NdeI 和 BamHI 酶切位点。5' 引物: 5'-TCAGGA CATATG ATG GAC CAG AAG CTG TTA ACG-3'; 3' 引物: 5'-ACTGAG GGATCC TCA GGT GTG TTT AAA GCT GTT-3'。以 *E. coli* K-12 的基因组 DNA 为模板做 PCR: 95℃ 5 min, 30  $\times$  (94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 2 min), 72℃ 10 min。PCR 产物和 pET28a 载体分别经 NdeI 和 BamHI 双酶切, 并用 T4DNA 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。重组质粒 NdeI 和 BamHI 双酶切和重组质粒 PCR 筛选阳性克隆, 并进行 DNA 测序。该重组质粒命名为 pET28a-*gadA* (具体操作参考 Novagen 公司 pET System Manual)。

### 1.2.2 重组蛋白的诱导表达、鉴定

重组质粒 pET28a-*gadA* 转化宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 工程菌 37℃ 培养至  $A_{600}$  值为 0.5 左右, 加入终浓度 0.4 mmol/L IPTG, 37℃ 诱导 8 h。诱导产物以 12% SDS-PAGE 电泳鉴定, 用江苏捷达科技发展有限公司捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统 Band scan 分析。

### 1.2.3 粗酶液的制备

取 40  $\mu$ L 冻存菌, 接入 4 mL 含卡那霉素 (30  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 取 5 mL 接入 500 mL 含卡那霉素 (30  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养至  $A_{600}$  值为 0.5 左右, 加入终浓度 1 g/L 的乳糖 37℃ 诱导 8 h, 12 000 r/min 离心收集菌体, 用灭菌水洗涤菌体, 再次离心收集菌体, 用 25 mL PBS 重悬菌体。冰浴超声破碎菌体, 12 000 r/min 离心 20 min 取上清, 制得谷氨酸脱羧酶粗酶液 GAD。

### 1.2.4 GAD 脱羧酶活的测定

利用 Berthelot 反应<sup>[11]</sup> 的原理进行酶活测定, 200  $\mu$ L 底物溶液和 100  $\mu$ L 酶液在 30℃ 反应一定时间 (根据活力大小确定 0.5~20 h), 然后置于冰浴中, 加入 200  $\mu$ L 0.2 mol/L 硼酸缓冲液 (pH 9.0) 终止反应, 再加入 1.0 mL 6% 苯酚和 400  $\mu$ L 次氯酸钠溶液, 充分振荡后, 在沸水浴中反应 10 min, 迅速在冰浴中冷却 20 min, 在 630 nm 测定吸光值, 酶反应产物 GABA 的定量以标准曲线确定, 相对酶活力以单位时间内  $A_{630}$  值的变化表示, 每组测定同时做 3 个重复, 求平均值。一个酶活力单位 (U) 定义为在测定条件下, 每分钟产生 1  $\mu$ mol GABA 所需的酶量。

### 1.2.5 $\gamma$ -氨基 酸的合成

取 10 g/L 的 L-谷氨酸钠, 0.6 U 的粗酶液, 醋酸缓冲液调节 pH 至 4.0 作为标准反应体系, 于 180 r/min 37℃ 的恒温摇床反应 2 h, 沸水浴 5 min 终止反应, 高速离心后取上清分析。

### 1.2.6 $\gamma$ -氨基 酸的测定

DNFB 法 HPLC 分析检测, 具体操作参照文献<sup>[12]</sup>。

### 1.2.7 $\gamma$ -氨基 酸产物的提纯和鉴定

将 1.2.5 的上清在 60℃ 下真空浓缩干燥, 得到 GABA 粗品, 再向此粗品加入 3 倍量 (质量比) 的无水乙醇, 在 70~75℃ 下搅拌溶解, 趁热过滤, 收集滤液, 将温度降至室温, 再降至 0~4℃, 静置 12 h 过滤收集晶体, 将所得晶体加入适量蒸馏水溶解, 用透析袋进行脱盐 (脱盐除去无机小分子和离子), 透析液进行真空冷冻干燥, 得到白色针状晶体. 取 5 mg  $\gamma$ -氨基丁酸溶于 0.5 mL D<sub>2</sub>O 中, 用 Bruker 400 MHz spectrometer 进行 <sup>1</sup>H NMR 分析, 并同  $\gamma$ -氨基丁酸标准品的图谱作比较.

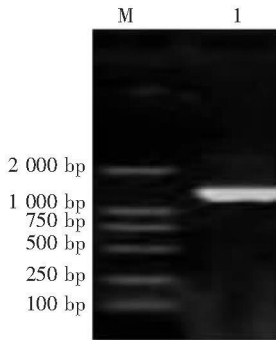
## 2 结果与分析

### 2.1 gadA 基因的 PCR 扩增

利用上述设计的引物对 *E. coli* K-12 进行 PCR 扩增, PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳结果 (图 1) 显示, 扩增出一个特异性的 DNA 条带, 相对分子质量大小介于 1 000 bp 与 2 000 bp 之间, 与理论值 1 413 bp 相符.

### 2.2 pET28a-gadA 重组质粒的鉴定

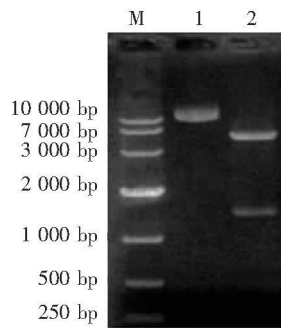
对重组质粒用 NdeI, BamHI 双酶切, 获得大小约为 5 000 bp 与 1 400 bp 的 2 个条带 (图 2), 与理论值 5 329 bp 1 407 bp 一致, 初步说明重组成功. 重组质粒经上海英俊生物技术有限公司测序, 结果表明, 克隆的基因片段全长 1 401 bp 在 NCBI 上 BLAST 检索显示, 克隆的基因片段与 *E. coli* K-12 的 gadA 基因编码序列同源性达 100%. 因此, 可以确定 gadA 基因已经克隆到 pET28a 载体中, 且方向正确.



M:DL2000 DNA Marker;1:gadA PCR 产物

图 1 gadA 基因 PCR 扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.1 1% Agarose gel electrophoresis analysis the PCR amplification product of gadA



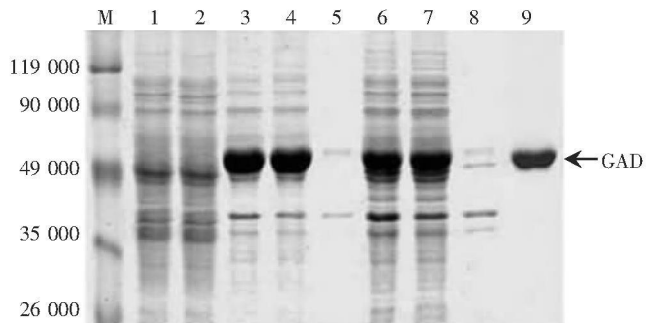
M:DL10000 DNA Marker;1:pET28a-gadA;2:pET28a-gadA (Nde I 和 BamH I 双酶切)

图 2 重组质粒双酶切 1% 琼脂糖凝胶电泳分析

Fig.2 1% Agarose Gel Electrophoresis analysis recombinant plasmid after digested with restriction enzymes(Nde I and BamH I)

### 2.3 表达产物 SDS-PAGE 分析

*E. coli* K-12 的 gadA 基因编码 466 个氨基酸, 由于克隆的 gadA 基因插入位置在 pET28a 载体的 His-tag 上游, 使用 gadA 基因自带的终止密码子, 所以重组菌表达的 GAD 实际包含 484 个氨基酸, 相对分子质量约 53 000. 取经 0.4 mmol/L IPTG 和 1 g/L 的乳糖, 37℃ 诱导 8 h 后的菌液离心收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析, 结果 (图 3) 显示, 在 53 000 位置有较浓的特征蛋白条带出现, 与预期相对分子质量相一致, 而对照组均无此条带, 说明工程菌能表达出 GAD 蛋白. 经江苏捷达科技发展有限公司捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统 Band scan 分析, GAD 蛋白表达量占细胞总蛋白的 70% 左右, 表达产物的可溶性好, 未见包涵体.



M: 蛋白相对分子质量标准;1:BL21-pET28a 全菌蛋白;2: 未诱导 BL21-pET28a-gadA 全菌蛋白;3:0.4 mmol/L IPTG 诱导的 BL21-pET28a-gadA 全菌蛋白;6:1 g/L 乳糖诱导的 BL21-pET28a-gadA 全菌蛋白;4 和 7: 对应的 3 和 6 的上清蛋白;5 和 8: 对应的 3 和 6 的沉淀蛋白;9: 纯化的 GAD 蛋白;箭头所示为目的蛋白

图 3 工程菌表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis the expression of the recombinant GAD from LB (induced by 0.1% lactose and 0.4 mM IPTG)

利用位于重组蛋白氨基端的 His-Tag 进行亲和层析纯化, 每升重组菌可得 GAD 蛋白 43 mg

2.4 工程菌 GAD 活性检测

Berthebt 反应测定 GAD 粗酶液的酶活, 用乳糖诱导的工程菌粗酶液的酶活达到 12 U /mL 左右, 出发菌株 *E. coli* K- 12 粗酶液的酶活仅为 0. 2U /mL, 每毫升工程菌粗酶液的酶活大约是每毫升出发菌 *E. coli* K- 12 粗酶液的 60 倍.

2.5 反应条件的优化

2.5.1 最适反应温度

在 1mL 反应体系中, 以 10 g/L L-谷氨酸钠为底物, 0. 6U 粗酶液作酶源, 醋酸缓冲液将 pH 调至 4. 0 在不同的温度下反应 2 h 结果表明 (图 4), 酶活随着反应温度升高而升高, 在 37℃ 时达到最高,  $\gamma$ -氨基丁酸生成量最大. 40℃ 以后  $\gamma$ -氨基丁酸浓度急剧下降, 可能是因为温度过高使酶蛋白变性.

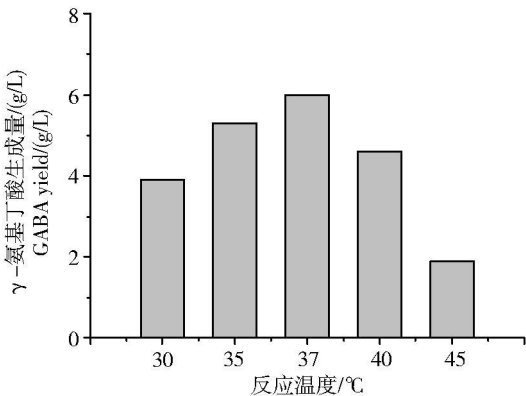


图 4 反应温度对  $\gamma$ -氨基丁酸生成量的影响 (所有试验数据均经过 3 次以上重复得到平均值, 下同)

Fig.4 The effect of temperature to the yield of  $\gamma$ -aminobutyric acid

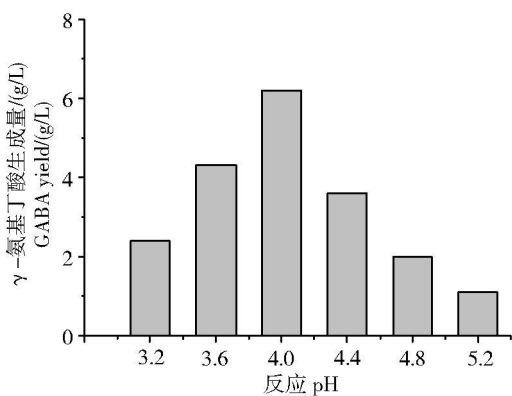


图 5 pH 对  $\gamma$ -氨基丁酸生成量的影响

Fig.5 The effect of pH to the yield of  $\gamma$ -aminobutyric acid

2.5.2 反应的最适 pH

在 1mL 反应体系中, 以 10 g/L 的 L-谷氨酸钠作底物, 0. 6 U 粗酶液作酶源, 醋酸缓冲液调节不同的 pH, 37℃ 反应 2 h 各 pH 对应的  $\gamma$ -氨基丁酸生成量参见图 5 pH 在 4. 0 左右大肠杆菌谷氨酸脱羧酶活性最高,  $\gamma$ -氨基丁酸生成量最大, 与文献报道相符<sup>[ 13 ]</sup>.

2.5.3 最适底物浓度的确定

在 1mL 反应体系中, 以不同浓度的 L-谷氨酸钠为底物, 0. 6U 粗酶液作酶源, pH 4. 0, 温度 37℃ 反应 2 h 不同浓度的 L-谷氨酸钠对应的  $\gamma$ -氨基丁酸生成量如图 6 L-谷氨酸钠浓度为 18 g/L 时,  $\gamma$ -氨基丁酸生成量最高. 之后继续增加 L-谷氨酸钠浓度不利于反应分子的碰撞,  $\gamma$ -氨基丁酸生成量反而有略微的下降.

2.5.4 酶量

在 1mL 反应体系中, 以 18 g/L 的 L-谷氨酸钠为底物, 分别加入不同酶量做酶源, 37℃, pH 4. 0 条件

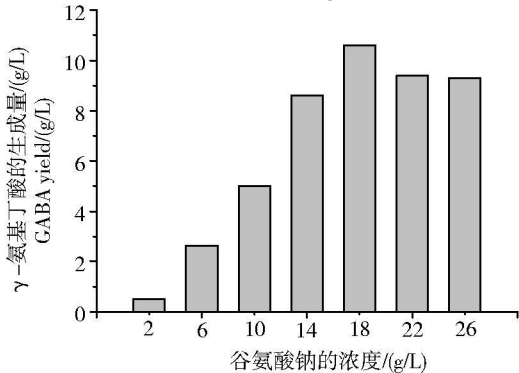


图 6 L-谷氨酸钠浓度对  $\gamma$ -氨基丁酸生成量的影响

Fig.6 The effect of sodium glutamate concentration to the yield of  $\gamma$ -aminobutyric acid

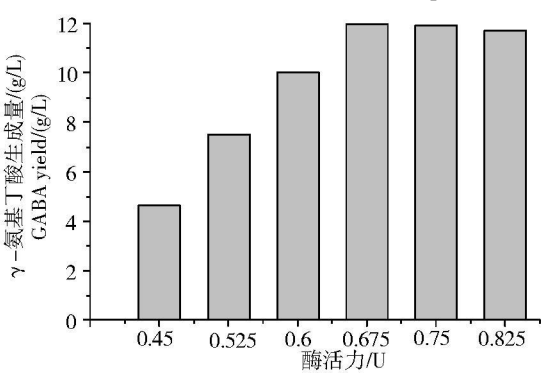


图 7 酶量对  $\gamma$ -氨基丁酸生成量的影响

Fig.7 The effect of enzyme activity to the yield of  $\gamma$ -aminobutyric acid

下反应 2 h 结果(图 7)表明,在添加酶量较小的情况下, $\gamma$ -氨基丁酸生成量随着酶量的增加而提高,在酶量为 0.675 U 时增加趋势趋于平缓,这时酶的催化能力基本达到饱和.继续增加粗酶量对  $\gamma$ -氨基丁酸生成量影响不大.出于成本考虑,本研究选定酶活为 0.675 U 的粗酶液作为标准反应体系.

#### 2.5.5 反应体系的浓缩

在 1 mL 反应体系中,参照 2.5.4 中 L-谷氨酸钠和 GAD 酶活力的比例,将底物浓度和酶量浓缩至不同倍数,37℃ pH 4.0 条件下反应 2 h 结果(图 8)表明, $\gamma$ -氨基丁酸生成量在底物和酶量浓缩至 1.7 倍时最高,浓缩倍数更高时  $\gamma$ -氨基丁酸生成量反而降低,可能是因为底物和粗酶液的增加使反应液粘稠,不利于反应中的分子碰撞.

#### 2.5.6 反应时间

1 mL 反应体系中,以 31 g/L 的 L-谷氨酸钠为底物,1.15 U 粗酶液作酶源,37℃ pH 4.0 条件下持续反应 6 h 每隔 1 h 取样分析.实验(图 9)表明,反应时间 4 h 时  $\gamma$ -氨基丁酸生成量最高,为 19.57 g/L,此时 L-谷氨酸钠的转化率为 93%.4 h 后  $\gamma$ -氨基丁酸生成量有所降低,可能是由于  $\gamma$ -氨基丁酸的积累以及底物和  $\gamma$ -氨基丁酸被粗酶液中某些物质消耗所致.

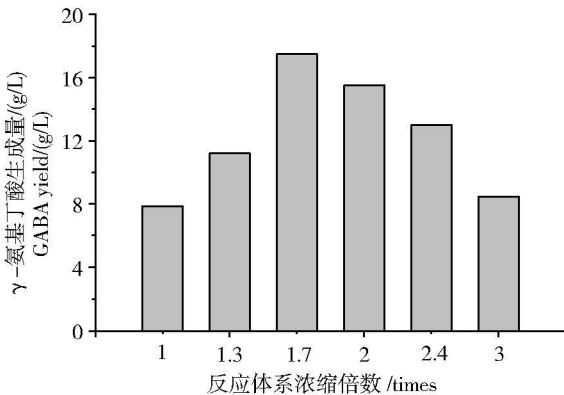


图 8 反应体系浓缩倍数对  $\gamma$ -氨基丁酸生成量的影响

Fig.8 The effect of weight concentrations to the yield of  $\gamma$ -aminobutyric acid

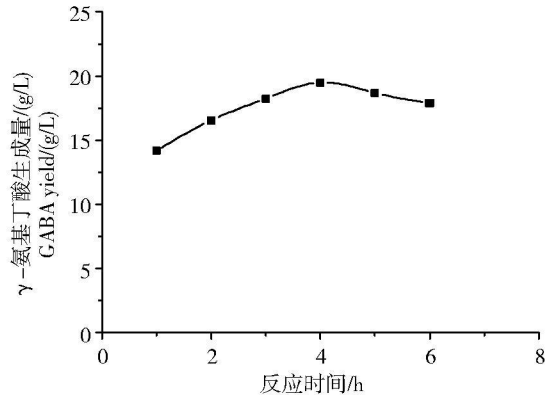


图 9  $\gamma$ -氨基丁酸生成量随反应时间的变化

Fig.9 The effect of reaction time to the yield of  $\gamma$ -aminobutyric acid

#### 2.5.7 NMR 鉴定

结晶得到的  $\gamma$ -氨基丁酸无色透明,晶体粗大,宏观形态呈柱状平行六面体,通过  $^1\text{H}$  NMR 分析,合成的  $\gamma$ -氨基丁酸样品与标品  $^1\text{H}$  图谱一致(结果未显示).

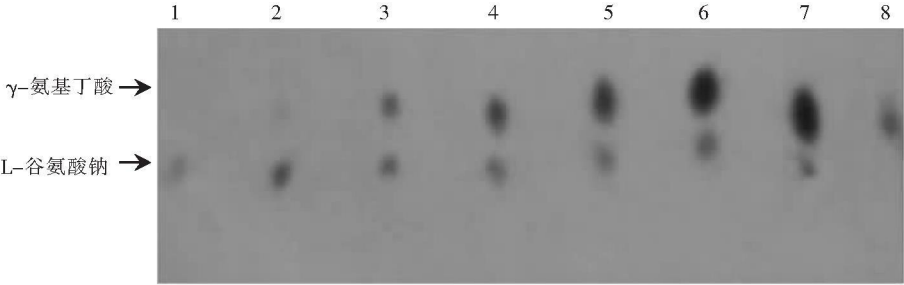
### 3 讨论

构建了高效表达 GAD 的基因工程菌,37℃ 诱导得到的重组 GAD 活力达到出发菌株 *E. coli* K-12 的 60 倍.利用工程菌粗酶液以 L-谷氨酸钠为底物催化合成  $\gamma$ -氨基丁酸,实验得到的最佳反应条件为:底物 L-谷氨酸钠 31 g/L,添加酶活力为 1.15 U 的粗酶液, pH 4.0 温度 37℃ 持续反应 4 h  $\gamma$ -氨基丁酸生成量达到 19.57 g/L, L-谷氨酸钠的转化率为 93%,有较好的应用前景.本实验室在上述优化反应条件下进行的放大体系反应中,底物采取少量多次的添加方式, GAD 粗酶液具有较好的酶活(图 10),每次添加底物都具有较高的转化率,加入 100 g 的 L-谷氨酸钠底物使得反应体系中的 GABA 不断积累,最终达 60 g/L,保证了高的转化率,产物纯度也较高.

由于 IPTG 的高成本及其对细菌的毒害作用,对获得大量 GAD 重组蛋白及后续药用生产将产生诸多不利影响.本实验中用乳糖诱导,整体诱导效果较 IPTG 好,诱导的目的蛋白约占总菌蛋白的 70% 左右,实现了高表达和低成本,同时表达的重组 GAD 具有良好的可溶性和较高活性,这些为利用酶法工业化生产  $\gamma$ -氨基丁酸奠定了很好的基础.本实验构建的重组菌使 GAD 高效表达,粗酶液具有较好的催化 L-谷氨酸钠合成  $\gamma$ -氨基丁酸的能力.用粗酶液催化合成  $\gamma$ -氨基丁酸步骤简单,成本低廉, L-谷氨酸钠转化率仅比纯酶稍低,具有较好的应用前景.

由于谷氨酸脱羧酶是一种吡醛类裂解酶,磷酸吡哆醛以及部份二价金属阳离子能够明显影响大肠杆

菌谷氨酸脱羧酶的酶活性, 从而可以提高生物转化  $\gamma$ -氨基丁酸的转化效率, 有关酶学特性在进一步的研究当中. 本实验为利用重组大肠杆菌谷氨酸脱羧酶生产  $\gamma$ -氨基丁酸提供了一定的参考数据.



L-谷氨酸钠标准品 (0.2 mol/L); 2,3,4,5,6,7: 重组菌 GAD 粗酶液分别催化反应 0 h, 1 h, 3 h, 5 h, 7 h 和 9 h; 8:  $\gamma$ -氨基丁酸标准品 (0.2 mol/L)

图 10 纸层析分析 GAD 粗酶液合成  $\gamma$ -GABA  
Fig.10 Paper chromatography analysis of  $\gamma$ -GABA synthesis by crude GAD

[参考文献]

[ 1 ] Roberts E, Frankel S.  $\gamma$ -Aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic acid[ J]. Journal of Biological Chemistry, 1950, 187: 55-63.

[ 2 ] Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, et al. Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid enriched dairy product on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats[ J]. British Journal of Nutrition, 2004, 92( 3): 411-417.

[ 3 ] Cossart R, Bernard C, Ben-Ari Y. Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signalling in epilepsies[ J]. Trends in Neurosciences, 2005, 28( 28): 108-115.

[ 4 ] Tadashi O, Tomoko S. Effect of defatted rice germ with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[ J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kagaku Kaishi, 2000, 47( 8): 596-603.

[ 5 ] 郭晓娜, 朱永义, 朱科学. 生物体内 GABA 的研究[ J]. 氨基酸和生物资源, 2003, 25( 2): 70-72.

[ 6 ] Abbasova L E, Tuzov D G. Method of Synthesis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid RU, 2202538[ P]. 2003-04-20.

[ 7 ] Nomura M, Kimoto H, Someya Y, et al. Production of  $\gamma$ -Aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening[ J]. Dairy Foods, 1998, 81: 1486-1491.

[ 8 ] 赵艳, 梁新乐, 张虹. 大肠杆菌谷氨酸脱羧酶的结构、功能及其基因表达调控[ J]. 食品与发酵工业, 2006, 32( 7): 75-78.

[ 9 ] Choi S I, Lee J W, Park S M, et al. Improvement of gamma-aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of Lactobacillus brevis GABA 057[ J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2006, 16: 562-568.

[ 10 ] Komatsuzaki N, Shimizu J, Kawamoto S, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by Lactobacillus paracasei isolated from traditional fermented foods[ J]. Food Microbiology, 2005, 22: 497-504.

[ 11 ] 许建军, 江波, 许时婴. 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及其应用[ J]. 微生物学通报, 2004, 31( 2): 66-71.

[ 12 ] 陈海军, 林亲录, 王婧, 等.  $\gamma$ -氨基丁酸测定方法的研究[ J]. 食品工业科技, 2007, 28( 5): 235-247.

[ 13 ] Capitanio G, De Biasi D, Aurizi C, et al. Crystal structure and functional analysis of Escherichia coli glutamate decarboxylase[ J]. The EMBO Journal, 2003, 22( 16): 4027-4037.

[责任编辑: 孙德泉]