

# 高产 $\gamma$ -氨基丁酸的棉子糖肠球菌的筛选、 鉴定及其摇瓶发酵条件的优化

陈慧敏<sup>1</sup> 高强<sup>1\*</sup> 苏喆<sup>2</sup> 王梦晓<sup>1</sup> 段强<sup>1</sup> 张云泽<sup>1</sup> 司晓光<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学 生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室

工业酶国家工程实验室 天津 300457)

(2. 天津市药品检验所 天津 300070)

**摘要:** 【目的】在中国传统发酵泡菜中分离出高产  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -Aminobutyric acid, GABA)的乳酸菌。【方法】对分离自泡菜中的菌株 M1 进行形态观察、生理生化特性鉴定及其 16S rDNA 序列分析, 实验采用单因素和正交设计对以 MRS 培养基为基础的 GABA 发酵培养基与摇瓶发酵条件进行了优化。【结果】菌株 M1 的形态培养和生理生化特征均符合肠球菌属(*Enterococcus*)特征, 其 16S rDNA 序列与 *Enterococcus raffinosus* SS1278 16S rDNA 序列同源性达 99%, 鉴定为棉子糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*)。优化该菌株产 GABA 的发酵培养基的实验发现, 最佳摇瓶发酵条件为: 接种量 10%, 发酵温度 30 °C, 培养初始 pH 5.5, 发酵周期 60 h, 谷氨酸一钠底物浓度 10%, GABA 产量提高了 1.22 倍。【结论】棉子糖肠球菌(*E. raffinosus*) M1 菌株具有工业化发酵生产 GABA 的潜力。

**关键词:**  $\gamma$ -氨基丁酸, 棉子糖肠球菌, 泡菜, 分离鉴定, 培养基与发酵优化

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021302); 国家 973 计划项目(No. 2011CB707401, 2013CB734004); 天津市滨海新区自主创新重大项目(No. 2011-BK120014)

\*通讯作者: Tel: 86-22-60601599; 信箱: gaoqiang@tust.edu.cn

收稿日期: 2012-02-12; 接受日期: 2012-05-09

# Screening, identification and flask fermentation optimization of a high-yield $\gamma$ -aminobutyric acid *Enterococcus raffinosus* strain

CHEN Hui-Min<sup>1</sup> GAO Qiang<sup>1\*</sup> SU Zhe<sup>2</sup> WANG Meng-Xiao<sup>1</sup>  
DUAN Qiang<sup>1</sup> ZHANG Yun-Ze<sup>1</sup> SI Xiao-Guang<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Fermentation Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, National Engineering Laboratory for Industry Enzymes, Tianjin 300457, China)  
(2. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

**Abstract:** [Objective] A high-yield  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) producing lactic acid bacterium (LAB), strain M1 was isolated from pickled Chinese vegetables by our laboratory. [Methods] Its physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence were analyzed. GABA fermentation medium, based on MRS medium, was optimized using single factor test and orthogonal design, as well as the shake flask condition for GABA fermentation. [Results] The results indicated that the morphological, physiological and biochemical characteristics of strain M1 were accorded with *Enterococcus* family. The identity between the obtained 16S rDNA sequence of strain M1 and *Enterococcus raffinosus* SS1278 was up to 99%, strain M1 was accordingly identified as *Enterococcus raffinosus*. Moreover, its GABA fermentation medium was optimized, and the shake flask condition for GABA fermentation was: inoculum of 10%, growing temperature at 30 °C, initial pH at 5.5, fermentation period of 60 h and monosodium glutamate substrate concentration of 10%. Under these conditions, GABA yield by flask fermentation achieved a 1.22-fold increase. [Conclusion] The isolated *E. raffinosus* M1 strain reveals its potential for industrial fermentation of GABA.

**Keywords:**  $\gamma$ -Aminobutyric acid, *Enterococcus raffinosus*, Pickled Chinese vegetables, Isolation and identification, Medium and fermentation optimization

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -Aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质组成的天然氨基酸,广泛存在于动植物体内。作为中枢神经系统重要的抑制性神经递质<sup>[1]</sup>, GABA 在人脑能量代谢过程中也起到重要作用。它参与多种代谢活动,具有降血压、调节心律失常、改善睡眠、抗焦虑、改善脂质代谢、防止动脉硬化等功效,因此受到越来越多科学工

作者的关注<sup>[2-5]</sup>。在日本,这类富含 GABA 功能性食品的研究取得了较大进展。大久长范、津志田藤二郎等分别利用富集技术以糙米、米胚芽、茶叶、大豆等为食品原料,成功研制出了富含 GABA 大米<sup>[6]</sup>、GABA 茶<sup>[7]</sup>等产品。

GABA 的生产方法主要有化学合成、植物富集和生物合成 3 种。化学合成法副产物多,难以

纯化, 生产成本低, 安全性差。植物富集法虽然操作简便, 但是产量很低, 难以应用于工业化生产。生物合成一般使用大肠杆菌, 但其存在安全卫生方面的隐患<sup>[8]</sup>。在生物合成中, 谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD, EC 4.1.1.15)是催化谷氨酸或其一钠盐(味精)为底物脱羧生成 GABA 的唯一酶。谷氨酸尤其一钠盐已经通过发酵法获得大规模生产, 价格相对较便宜, 利用微生物体中的谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸脱羧生产 GABA 是一条有效策略。

已有文献报道乳球菌属(*Lactococcus*)<sup>[9-10]</sup>、链球菌属(*Streptococcus*)<sup>[11]</sup>和乳杆菌属(*Lactobacillus*)<sup>[12-15]</sup>等属的一些乳酸细菌具有合成 GABA 的能力, 但尚未见利用棉子糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*)发酵生产 GABA 的报道。本论文鉴定了本实验室从中国传统发酵食品泡菜中筛选出的一株具有自主知识产权的高产 GABA 的棉子糖肠球菌(*E. raffinosus*) M1 菌株, 并采用单因素和正交设计的方法, 对以 MRS 培养基为基础的 GABA 摇瓶发酵培养基与发酵条件进行了优化。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株与培养基

**1.1.1 菌种:** 棉子糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*) M1 菌株(中国普通微生物菌种保藏管理中心编号: *E. raffinosus* CGMCC No. 5584), 由本实验室分离自辽宁省丹东市的市售泡菜。

**1.1.2 培养基<sup>[16]</sup>:** 改良 MRS 固体培养基, 用于乳酸菌的分离和初筛; MRS 固体培养基, 用于乳酸菌的斜面培养和菌种保藏; MRS 种子培养基, 用于乳酸菌的种子培养; 改良 MRS 液体发酵培养基, 用于乳酸菌深层发酵(g/L): 蔗糖 40, 酵母粉 30, 乙酸钠 4, 磷酸氢二钾 2, 硫酸铝 0.03, 硫酸镁 0.02, 硫酸铵 0.06, 吐温-80 2, pH 5.5,

8×10<sup>4</sup> Pa 灭菌 20 min 备用。

### 1.2 方 法

**1.2.1 产 GABA 乳酸菌的分离和筛选:** 取泡菜水 5 mL 置于 95 mL 肉汤培养基中进行富集培养, 然后以 10%的接种量接于 MRS 液体培养基, 重复 2 轮后, 系列稀释样品, 取合适的稀释度涂布平板, 30 °C 培养 48 h 后从平板上挑取单个菌落接种于 MRS 液体培养基中活化 6 轮后, 于 30 °C 培养 1 d 后加入 10%的谷氨酸一钠, 静置 2 d, 取样用于纸层析检测, 取疑似高产 GABA 发酵液, 用高效液相色谱法准确定量 GABA 产量, 选取 GABA 产量最高的菌株, 三区划线纯化后, 将高产 GABA 菌株 4 °C 保存于 MRS 斜面, 并用于进一步研究。

**1.2.2 产 GABA 乳酸菌的鉴定:** 菌体菌落形态及生理特征实验参照文献[17-18], 生化特征采用法国梅里埃 VITEK 32 微生物自动鉴定系统鉴定; 16S rDNA 序列委托北京六合华大基因科技股份有限公司测定。

**1.2.3 发酵培养基的优化:** (1) 单因素实验: 固定 MRS 发酵培养基的其他成分不变, 分别替换其中的碳源、氮源、无机盐离子与吐温-80, 对 GABA 的摇瓶产量进行测定; 并在此基础上对不同温度、接种量及 pH 条件下 GABA 的摇瓶产量进行测定。

(2) 正交设计: 在单因素条件基础上, 对培养工艺进行 8 因素 3 水平的简化 L<sub>27</sub>(3<sup>13</sup>)正交实验优化。

**1.2.4 发酵条件的优化:** 对发酵过程中的发酵温度、初始 pH、底物浓度、振荡和静置培养对 GABA 产量的影响进行实验, 确定其最优发酵条件。

**1.2.5 GABA 测定方法:** 样品前处理: 取 1 mL 发酵液于 1.5 mL 离心管中, 8 000 r/min 离心 10 min 后, 稀释 10 倍, 取上清 10 μL 于 1.5 mL 离心管中,

然后依次分别加入衍生缓冲液 100  $\mu\text{L}$ 、衍生剂 2,4-二硝基氟苯(DNFB) 100  $\mu\text{L}$ , 定容缓冲液 790  $\mu\text{L}$ , 振荡混匀, 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h。用 0.45  $\mu\text{m}$  醋酸纤维素滤膜过滤后, 置于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用。梯度洗脱条件: Agilent ZORBAX StableBond C18 柱, 柱温 30  $^{\circ}\text{C}$ , 紫外检测波长 360 nm, 流速 0.8 mL/min, 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 流动相 A: 水; 流动相 B: 甲醇; 流动相 C: 乙腈; 流动相 D: 醋酸钠溶液。

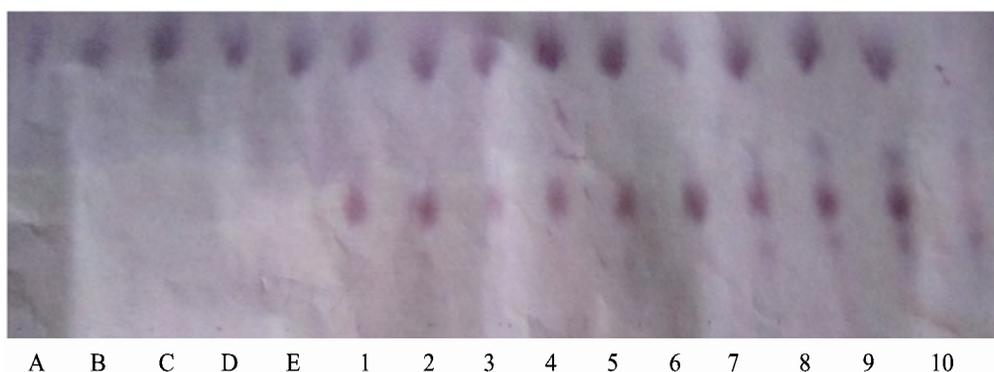


图 1 10 株乳酸菌菌株发酵液中 GABA 的纸层析结果

Fig. 1 The paper chromatography of GABA production in fermentation medium by 10 LAB strains

注: A-E: 浓度 1-5 g/L 的 GABA 标准水溶液; 1-10: 不同乳酸菌菌株发酵液。样品点样量 1  $\mu\text{L}$ , GABA 标品点样量 5  $\mu\text{L}$ 。

Note: A-E: 1-5 g/L standard GABA solution; 1-10: Different fermentation broths of LAB strains. The loading volume of each GABA standard is 5  $\mu\text{L}$ , and each specimen is 1  $\mu\text{L}$ .

对图 1 中所获产生 GABA 较多的乳酸菌发酵液进行第 2 次纸层析检测确认, 洗脱后用分光光度计初步定量, 以筛选 GABA 产量相对较高的菌株。经高效液相色谱分析, 样品 5 为含有 23.95 g/L GABA 的发酵液, 该菌株 M1 由本实验室分离自辽宁省丹东市售泡菜汁中, 而其他几个样品则均为 GABA 含量小于 10 g/L 的发酵液。

## 2.2 菌株 M1 的鉴定

**2.2.1 形态特征(图 2):** 菌株 M1 在 MRS 平板上生长 24 h 后, 菌落白色, 直径 1 mm-2 mm, 表面光滑隆起, 呈圆形, 菌落边缘整齐。革兰氏染色阳性, 细胞呈卵圆形, 大多数呈对排列或短链排列, 极少见呈长链, 无芽孢, 菌体直径约为 1  $\mu\text{m}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产 GABA 乳酸菌菌株的筛选

将本实验室分离的 10 株具有代表性的乳酸菌菌株接种于 MRS 液体发酵培养基, 30  $^{\circ}\text{C}$  静置发酵培养 72 h 检测 GABA 的含量。结果表明, 来自不同地区环境条件下的乳酸菌菌株在 MRS 发酵培养基中产生 GABA 的能力有较大差异, 这 10 株乳酸菌发酵液中 GABA 含量的纸层析结果见图 1。

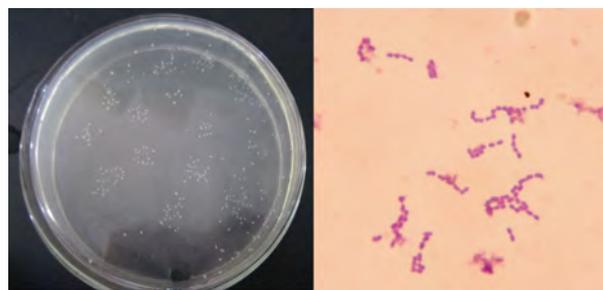


图 2 菌株 M1 的菌落和菌体细胞形态(1 000 $\times$ )

Fig. 2 Colony and cell morphology of strain M1 (1 000 $\times$ )

**2.2.2 菌株 16S rDNA 序列与 M1 培养及生理生化特征的测定:** 16S rDNA 序列的测序结果(GenBank 登录号: JQ347592)表明, 与棉子糖肠球菌 SS1278 菌株的 16S rDNA 序列(GenBank 登录

号: GQ337035)的同源性达 99%。参照文献[17-18]进行培养及生理特征实验,生化特征由 VITEK 32 鉴定系统鉴定,结果如表 1 所示,各项特征均符合文献[17-18]关于 *Enterococcus* 的描述,菌株 M1 鉴定为棉子糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*)。

## 2.3 发酵培养基的优化

### 2.3.1 碳源对发酵生产 GABA 的影响: 乳酸细

菌生物合成 GABA 的底物为谷氨酸或其一钠盐,所以在发酵过程中加入 100 g/L 的谷氨酸一钠。分别以葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、果糖、甘露醇、可溶性淀粉等为唯一碳源,添加量为 20 g/L,其他发酵培养基成分以 MRS 发酵培养基为基础进行发酵,30 °C 静置培养 3 d,检测发酵液中 GABA 的含量,结果见图 3。结果显示,蔗糖为此株棉子糖肠球菌发酵培养基的最佳碳源,其

表 1 菌株 M1 的培养及生理生化特征

Table 1 Identification results of cultivation and physiological characters for strain M1

实验项目 Experimental test	结果 Result	实验项目 Experimental test	结果 Result
运动性 Mobility	-	产吲哚实验 Idol test	-
10 °C 生长 Growth at 10 °C	+	七叶苷水解 Esculin hydrolysis	+
45 °C 生长 Growth at 45 °C	+	尿素酶 Urease	-
耐盐实验 6.5% NaCl 生长 Growth in 6.5% NaCl	+	蔗糖产酸 Acid from sucrose	+
耐碱实验 pH 9.6 生长 Growth at pH 9.6	+	菊糖产酸 Acid from inulin	-
抗 40% 胆汁 Growth in 40% bile	+	乳糖产酸 Acid from lactose	+
过氧化氢酶实验 Catalase	-	海藻糖产酸 Acid from trehalose	+
产乳酸 Lactate production	+	蜜二糖产酸 Acid from melibiose	+
0.1% 美兰牛乳 Methylene blue reduction test in milk	+	甘露醇产酸 Acid from mannitol	+
水解淀粉实验 Starch hydrolysis	-	阿拉伯糖产酸 Acid from arabinose	+
精氨酸产氨实验 Ammonia from arginine	+	纤维二糖产酸 Acid from cellobiose	+
葡萄糖产气实验 Gas from glucose	-	棉子糖产酸 Acid from raffinose	+
柠檬酸盐生长实验 Growth with citrate	-	水杨素产酸 Acid from salicin	+
V-P 反应 Voges-Proskauer test	+	木糖产酸 Acid from xylose	-
明胶液化实验 Gelatin liquefaction	-	山梨醇产酸 Acid from sorbitol	+
硫化氢产生实验 Hydrogen sulfide test	-		

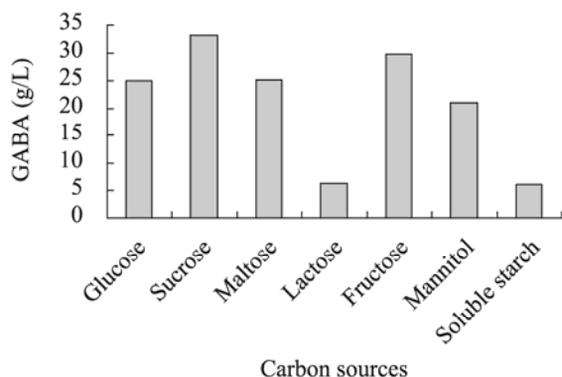


图3 碳源对发酵生产 GABA 的影响

Fig. 3 Effect of several carbon sources on yield of GABA in fermentation broth

GABA 产量为 33.27 g/L, 果糖次之为 29.67 g/L, 然后是葡萄糖为 24.95 g/L, 故选用蔗糖作为棉子糖肠球菌的生长和 GABA 生产的碳源。

**2.3.2 氮源对发酵生产 GABA 的影响:** 通过分别使用蛋白胨、酵母浸粉等有机氮源, 硫酸铵、硝酸钠和氯化铵等无机氮源, 对氮源进行优化。优化时蔗糖添加 20 g/L, 谷氨酸一钠添加 100 g/L。首先比较除蛋白胨的单一氮源对 GABA 产量的

影响, 然后比较不同种类蛋白胨和酵母粉混合氮源的发酵效果, 结果显示酵母粉的效果最好, 胰蛋白胨和酵母浸粉的结果次之。在进行单一氮源发酵时其添加量为 20 g/L, 在进行均匀混合发酵时, 同样以氮源添加量为 20 g/L 进行折算。单一氮源的实验结果见图 4。从图 4 可知, 在单一氮源的实验中, 酵母浸粉的效果最好, GABA 产量为 45.95 g/L, 以胰蛋白胨和酵母浸粉为复合氮源时的 GABA 产量为 42.17 g/L, 不如单一酵母粉的效果明显, 原因可能是酵母浸粉充足的营养成分有利于棉子糖肠球菌的生长和活力。

**2.3.3 金属离子对发酵生产 GABA 的影响:** 在发酵培养基中分别加入 5 mmol/L 和 50 mmol/L 不同种类金属离子, 考察金属离子对 GABA 产量的影响, 结果见图 5。当加入的金属离子浓度为 5 mmol/L 时,  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$  对 GABA 产量的提高有着不同程度的影响, 其中  $\text{Al}^{3+}$  的作用最明显, GABA 产量提高了 7.72%,  $\text{NH}_4^+$  和  $\text{Mg}^{2+}$  分别使 GABA 产量提高了 3.85% 和 3.09%,

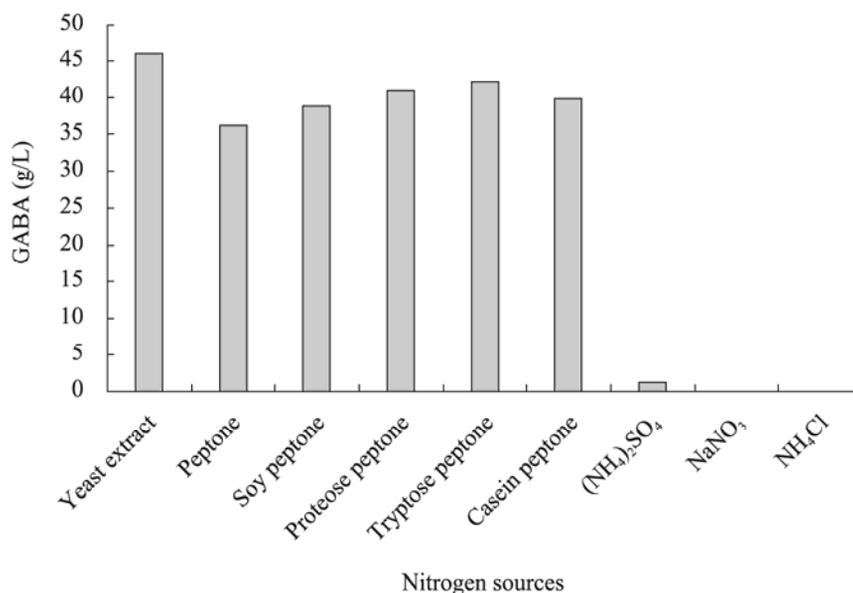


图4 氮源对发酵生产 GABA 影响

Fig. 4 Effect of several nitrogen sources on yield of GABA in fermentation broth

我们推测这 3 种金属离子很可能激活了 M1 菌体中 GAD 的活性; 其他金属离子对 GABA 产量有不同程度的抑制作用, 其中  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$  和  $\text{Mn}^{2+}$  的抑制作用最强, 分别使 GABA 产量下降了 41.42%、9.31% 和 7.17%。当金属离子浓度为

50 mmol/L 时, 除  $\text{Mg}^{2+}$  外, 所有的供试金属离子均使产量降低, 说明过高的金属离子浓度对 GAD 酶活产生了抑制作用。因此, 选择在 MRS 发酵培养基中分别添加 5 mmol/L 的  $\text{NH}_4^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  和  $\text{Al}^{3+}$ , 以促进 GABA 产量的提高。

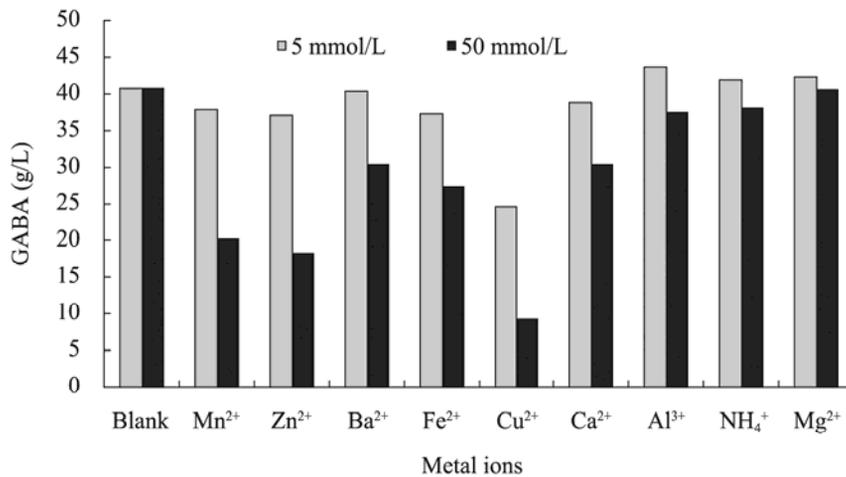


图 5 金属离子对 M1 菌株发酵生产 GABA 的影响

Fig. 5 Effect of metal ions on yield of GABA in fermentation broth

**2.3.4 吐温-80 对发酵生产 GABA 的影响:** 吐温-80 是一种亲水性的表面活性剂, 对于细胞分泌 GABA 有一定的促进作用, 将不同浓度的吐温-80 加入发酵培养基与不添加吐温-80 的对照进行对比, 结果见图 6。0.1%–0.3% 的吐温-80 对 GABA 产量的提高程度相差无几, 而 0.2% 的浓度相对更好一些, 产量为 42.08 g/L, 比不添加吐温-80 的对照组提高了 8.93%。

## 2.4 正交试验

以蔗糖为碳源, 酵母粉为氮源, 乙酸钠和磷酸二氢钠为缓冲盐, 硫酸铵、硫酸镁和硫酸铝为生长因子, 吐温-80 为表面活性剂, 以 MRS 发酵培养基为基础, 进行简化的  $L_{27}(3^{13})$  正交设计, 正交因素水平表和结果分别见表 2 和表 3, 其中第 27 组的 GABA 产量最高, 所以最佳发酵培养基的组成为 (g/L): 蔗糖 40, 酵母浸粉 30, 乙酸钠 4,

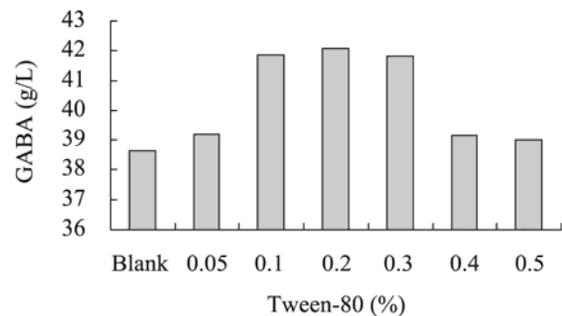


图 6 吐温-80 对发酵生产 GABA 的影响

Fig. 6 Effect of Tween-80 concentration on yield of GABA in fermentation broth

磷酸氢二钾 2, 硫酸铝 0.03, 硫酸镁 0.02, 硫酸铵 0.06, 吐温-80 2 mL。

## 2.5 发酵条件的优化

**2.5.1 温度对发酵生产 GABA 的影响:** 对棉子糖肠球菌 M1 菌株产 GABA 的最适发酵温度进行实验, 接种量为 10%, 30 °C 静置发酵 3 d, 结果见图 7。

表 2 因素与水平表单位  
Table 2 Factors and level sunits (%)

水平 Levels	蔗糖 Sucrose	酵母浸粉 Yeast extract	乙酸钠 NaAc	磷酸氢二钾 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	硫酸铝 Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	硫酸镁 MgSO <sub>4</sub>	硫酸铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	吐温-80 Tween-80
1	2	1	0.4	0.1	0.03	0.02	0.02	0.1
2	3	2	0.5	0.2	0.06	0.04	0.04	0.2
3	4	3	0.6	0.3	0.09	0.08	0.08	0.3

表 3 正交试验结果及极差分析结果  
Table 3 Analysis of the orthogonal experimental results

试验号 Test No.	蔗糖 Sucrose	酵母浸粉 Yeast extract	乙酸钠 NaAc	磷酸氢二钾 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	硫酸铝 Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	硫酸镁 MgSO <sub>4</sub>	硫酸铵 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	吐温-80 Tween-80	结果 Result
1	2	1	0.4	0.1	0.03	0.02	0.02	0.1	24.38
2	2	1	0.5	0.2	0.03	0.02	0.04	0.2	25.73
3	2	1	0.6	0.3	0.03	0.02	0.06	0.3	27.99
4	2	2	0.4	0.2	0.06	0.04	0.02	0.1	38.85
5	2	2	0.5	0.3	0.06	0.04	0.04	0.2	35.46
6	2	2	0.6	0.1	0.06	0.04	0.06	0.3	35.83
7	2	3	0.4	0.3	0.09	0.06	0.02	0.1	33.75
8	2	3	0.5	0.1	0.09	0.06	0.04	0.2	33.71
9	2	3	0.6	0.2	0.09	0.06	0.06	0.3	44.61
10	3	1	0.6	0.1	0.09	0.06	0.02	0.2	24.83
11	3	1	0.4	0.2	0.09	0.06	0.04	0.3	26.51
12	3	1	0.5	0.3	0.09	0.06	0.06	0.1	28.86
13	3	2	0.6	0.2	0.03	0.02	0.02	0.2	40.98
14	3	2	0.4	0.3	0.03	0.02	0.04	0.3	39.78
15	3	2	0.5	0.1	0.03	0.02	0.06	0.1	42.87
16	3	3	0.6	0.3	0.06	0.04	0.02	0.2	41.42
17	3	3	0.4	0.1	0.06	0.04	0.04	0.3	40.97
18	3	3	0.5	0.2	0.06	0.04	0.06	0.1	42.50
19	4	1	0.5	0.1	0.06	0.04	0.02	0.3	35.35
20	4	1	0.6	0.2	0.06	0.04	0.04	0.1	24.96
21	4	1	0.4	0.3	0.06	0.04	0.06	0.2	38.20
22	4	2	0.5	0.2	0.09	0.06	0.02	0.3	37.98
23	4	2	0.6	0.3	0.09	0.06	0.04	0.1	38.71
24	4	2	0.4	0.1	0.09	0.06	0.06	0.2	40.55
25	4	3	0.5	0.3	0.03	0.02	0.02	0.3	42.45
26	4	3	0.6	0.1	0.03	0.02	0.04	0.1	37.17
27	4	3	0.4	0.2	0.03	0.02	0.06	0.2	47.11
K1	33.4	28.5	36.7	35.1	35.60	36.50	35.60	34.7	
K2	36.5	39.0	36.1	36.6	35.20	37.10	33.70	36.4	
K3	38.1	40.4	35.2	36.3	37.10	34.30	38.70	36.8	
极差 Range	4.7	11.9	1.5	1.5	1.90	2.70	5.10	2.2	

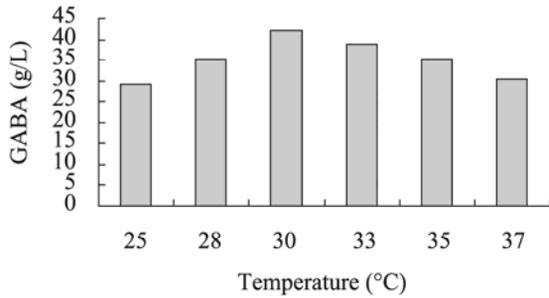


图7 温度对发酵生产 GABA 的影响

Fig. 7 Effect of temperature on yield of GABA in fermentation broth

由图 7 可知, 棉子糖肠球菌 M1 菌株在发酵温度为 30 °C 时, GABA 的产量最高, 为 42.08 g/L, 因此选择 30 °C 做为 M1 菌株 GABA 发酵温度。

**2.5.2 初始 pH 对发酵生产 GABA 的影响:** 对培养基最适初始 pH 进行研究, 接种量为 10%, 30 °C 静置发酵 3 d。实验发现(图 8), 当培养基初始 pH 为 5.5 时, GABA 产量最高, 为 45.54 g/L, 所以选其为培养基初始 pH。

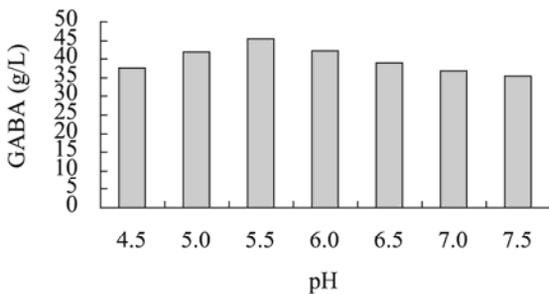


图8 初始 pH 对发酵生产 GABA 的影响

Fig. 8 Effect of initial pH on yield of GABA in fermentation broth

**2.5.3 底物添加量对发酵生产 GABA 的影响:** 由于谷氨酸一钠价格低廉, 溶解度相对于谷氨酸较高, 本实验采用谷氨酸一钠作为发酵生产 GABA 的底物, 并对不同底物浓度对 GABA 产量的影响做了相应的研究。研究显示当底物浓度为 10% 时, GABA 产量最高, 当继续增大底物浓度时, GABA 产量逐渐下降(图 9), 原因可能是过高

的底物浓度会抑制菌体生长, 并对 GAD 酶产生反馈抑制, 而且发酵液中的谷氨酸一钠浓度升高, 也不利于后续提取, 所以选择发酵生产 GABA 的底物浓度为 10%。

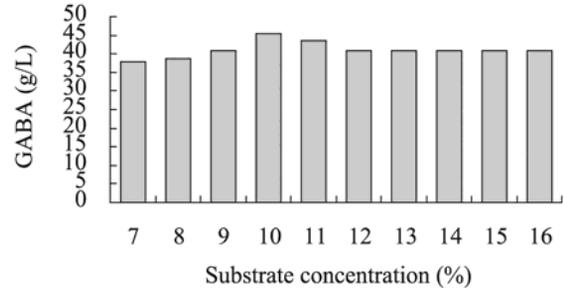


图9 底物浓度对发酵生产 GABA 的影响

Fig. 9 Effect of substrate concentration on yield of GABA in fermentation broth

**2.5.4 摇床与静置发酵对发酵生产 GABA 的影响:** 由于棉子糖肠球菌是兼性厌氧菌, 氧气可以使菌体大量繁殖, 有助于有氧代谢途径中产物的合成, 而氧气缺乏却能使无氧代谢支路上的产物大量积累, 所以本实验通过对比摇床和静置培养对 GABA 产量的影响, 确定其最佳的发酵方式。同样将发酵过程分为菌体繁殖和积累 GABA 两部分, 从图 10 中可以清楚地看出, 氧气对于 GABA 的积累具有很明显的抑制作用。其原因是: GABA 的合成是 TCA 循环上一条谷氨酸脱羧反应的支路, 先由谷氨酸脱羧生成 GABA, 这是一个产生 ATP 的过程, 合成的 GABA 可由琥珀酸半醛脱氢酶氧化成琥珀酸回到 TCA 循环。只有在缺氧的条件下, 还原电位升高, 琥珀酸半醛脱氢酶和  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶系的酶活受抑制, 才启动 GABA 合成支路, 以提供菌体足够的生长代谢能量, 所以菌体生长过程中采用振荡培养(摇床转速 160 r/min)能够使菌体繁殖速度更快, 而在积累 GABA 阶段, 静置发酵的效果明显要比振荡发酵好。所以采用的发酵方式是前期振荡、后期静置。

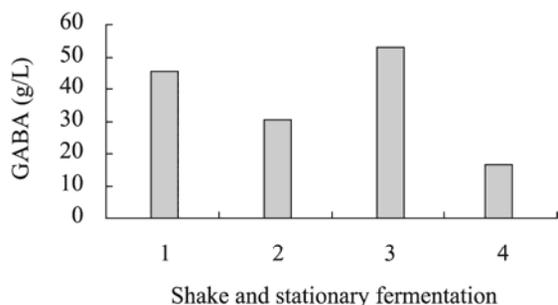


图 10 振荡和静置培养对发酵生产 GABA 的影响

Fig. 10 Effect between shake and stationary fermentation on yield of GABA in fermentation broth

注: 1: 静置发酵 72 h; 2: 先静置发酵 24 h, 添加底物后振荡发酵 48 h; 3: 先振荡发酵 24 h, 添加底物后静置发酵 48 h; 4: 振荡发酵 72 h.

Note: 1: Stationary fermentation for 72 h; 2: First stationary fermentation for 24 h, and then shake flask fermentation for 48 h; 3: First shake flask fermentation for 24 h, and then stationary for 48 h; 4: Shake flask fermentation for 72 h.

### 3 结论

GABA 的天然含量很低, 从动植物组织中大量提取非常困难, 目前生产 GABA 的方法主要有化学合成法和生物法两类。相对而言, 化学合成法安全性差且环境污染严重, 植物富集生产 GABA 的产量很低, 而微生物发酵法更具备开发前景。

棉子糖肠球菌是人和动物肠道中常见的正常菌种, 在肠黏膜具有较强的耐受和定殖能力, 以及具有较强的抗逆性, 可用于发酵食品或作为益生菌添加于动物饲料, 预防畜肠道疾病和改善动物生长。本研究报道了一株由本实验室分离自辽宁省丹东市售泡菜的具有自主知识产权的高产 GABA 乳酸菌 M1 菌株, 经鉴定为棉子糖肠球菌。通过单因素和正交设计, 对其 GABA 发酵培养基进行了优化; 已有研究证实, 乳酸菌通过 GAD 对谷氨酸脱羧生成 GABA, 而且乳酸菌 GAD 最适作用温度与最适生长温度较为接近, M1 菌株的最适生长温度为 30 °C, 也有利于 GABA 的积累。此外, 细菌 GAD 的最适 pH 一般在 3.5–5.5

之间<sup>[12–15,19]</sup>, 菌株 M1 的最适 pH 5.5 与上述文献报道一致; 底物谷氨酸—钠添加量为 10% 的 GABA 产量已达到最高, 再继续增加底物浓度对 GABA 产量没有提高, 反而会增大底物的残留浓度, 不利于后期提取; 在繁殖菌体阶段振荡培养, 在积累 GABA 阶段静置培养则更有利于 GABA 的积累。在以上最优发酵条件下, GABA 的摇瓶产量达到 53.34 g/L, 较 23.95 g/L 的初始产量提高了 122.71%。本研究首次报道了利用棉子糖肠球菌在实验室条件下发酵生产 GABA, 从而为今后 GABA 的生物合成和开发应用提供了新的菌种资源, 该棉子糖肠球菌还可用于开发富含 GABA 食品和动物饲料益生菌的菌种, 具有良好的应用前景。

### 参考文献

- [1] Bazemore AW, Elliott KAC, Florey E. Isolation of factor I[J]. *Journal of Neurochemistry*, 1957, 1(4): 334–339.
- [2] 张晖, 姚惠源, 姜元荣. 富含  $\gamma$ -氨基丁酸保健食品的研究与开发[J]. *食品与发酵工业*, 2002, 28(9): 69–72.
- [3] 徐冬云, 周立平, 童振宇, 等. 产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌的分离筛选[J]. *现代食品科技*, 2006, 22(3): 59–62.
- [4] Hayakawa K, Kimura M, Kasaha K, et al. Effect of a  $\gamma$ -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.
- [5] Okada T, Sugishita T, Murakami T, et al. Effect of the defatted rice germ enriched with GABA for sleeplessness, depression, autonomic disorder by oral administration[J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 2000, 47(8): 596–603.
- [6] 大久长范, 阿部雪子. 胚芽米と鸡ブによる  $\gamma$ -アミノ酪酸の生成[J]. *日本食品科学工学会志*, 2000, 47(6): 452–454.

- [7] 津志田藤二郎, 村井敏信, 大森正司, 等.  $\gamma$ -アミノ酪酸を蓄積させた茶の製造とその特徴[J]. 日本农芸化学会志, 1987, 61(7): 817-822.
- [8] 赵景联. 固定化大肠杆菌细胞生产  $\gamma$ -氨基丁酸的研究[J]. 生物工程学报, 1989, 5(2): 124-128.
- [9] Nomura M, Kabayashi M, Ohmomo S, et al. Inactivation of the glutamate decarboxylase gene in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(5): 2235-2237.
- [10] Lu XX, Chen ZG, Gu ZX, et al. Isolation of  $\gamma$ -aminobutyric acid-producing bacteria and optimization of fermentative medium[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(1): 48-52.
- [11] Yang SY, Lü FX, Lu ZX, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation[J]. Amino Acids, 2008, 34(3): 473-478.
- [12] Park KB, Oh SH. Cloning, sequencing and expression of a novel glutamate decarboxylase gene from a newly isolated lactic acid bacterium, *Lactobacillus brevis* OPK-3[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(2): 312-319.
- [13] Huang J, Mei L, Heng Q, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase of *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 isolated from fresh milk[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering, 2007, 15(2): 157-161.
- [14] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, et al. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods[J]. Food Microbiology, 2005, 22(6): 497-504.
- [15] Kim SH, Shin BH, Kim YH, et al. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus brevis* BH2[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2007, 12(6): 707-712.
- [16] 冯宇, 高年发, 张颖, 等. 短乳杆菌生产  $\gamma$ -氨基丁酸培养基的优化[J]. 现代食品科技, 2010, 26(1): 34-37.
- [17] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 256-258, 349-398.
- [18] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999: 38-45, 84-109, 117-129.
- [19] Ueno H. Enzymatic and structural aspects on glutamate decarboxylase[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2000, 10(1/3): 67-79.

## 稿件书写规范

### 论文中有关正、斜体的约定

物种的学名: 菌株的属名、种名(包括亚种、变种)用拉丁文斜体。属的首字母大写, 其余小写, 属以上用拉丁文正体。病毒一律用正体, 首字母大写。

限制性内切酶: 前 3 个字母用斜体, 后面的字母和编码正体平排, 例如: *Bam*H I、*Hind* III、*Sau*3A I 等。

氨基酸和碱基的缩写: 氨基酸缩写用 3 个字母表示时, 仅第一个字母大写, 其余小写, 正体。碱基缩写为大写正体。

基因符号用小写斜体, 蛋白质符号首字母大写, 用正体。