

制备富含 γ -氨基丁酸酸奶的乳酸菌筛选及相关特性分析

孙世鑫¹, 李科¹, 骆鹏飞², 俞兰秀², 莫小叶¹, 孙海燕¹, 张丽君¹, 刘冬¹

(1. 深圳职业技术学院, 深圳市发酵精制检测系统重点实验室, 广东深圳 518055)

(2. 绿雪生物工程(深圳)有限公司, 广东深圳 518055)

摘要: 为获得能够在乳基底物中生产富含 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 酸奶所需的食品安全级乳酸菌, 从国内市售发酵食品中分离出 171 株乳酸菌作为实验菌株。采用 16S rDNA 序列分析对实验菌株进行种属鉴定, 采用改进后的高效液相色谱法 (HPLC) 测定发酵后 GABA 产量。经肉汤培养基初筛和乳基底物培养基复筛, 得到一株在乳基底物中具备高产 GABA 潜力的乳酸乳球菌乳酸亚种 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), 编号 4043。将该菌以 3% (V/V) 接种于含 L-谷氨酸钠 (L-Glu-Na) 2 g/L 的 10% (m/V) 乳基底物培养基中, 在 30 °C 下单菌株发酵 48 h, GABA 产量约 0.39 g/L, 在目前属于较高水平。该菌能够代谢葡萄糖、半乳糖等 18 种糖分。将其于 30 °C 下接种于 M17 培养基中, 对数生长期为 2~8 h。该菌持续产酸能力较弱, 在 pH 值 3~5.5 的环境中具备良好的酸耐受性, 菌株自凝聚力良好, 但对胆盐的耐受性极差; 且属于表面弱疏水性菌株, 粘附特性较差, 难以在人体肠道内有效粘附与定植, 不适宜作为胃肠道内益生菌。该菌可作为多菌种混合发酵生产富含 GABA 的酸奶的发酵剂。

关键词: γ -氨基丁酸 (GABA); 乳酸菌; 筛选; 鉴定; 菌株特性

文章编号: 1673-9078(2021)03-106-114

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.3.0807

Screening and Characteristics of Lactic Acid Bacteria for Preparing γ -Aminobutyric Acid-rich Yogurt

SUN Shi-xin¹, LI Ke¹, LUO Peng-fei², YU Lan-xiu², MO Xiao-ye¹, SUN Hai-yan¹, ZHANG Li-Jun¹, LIU Dong¹

(1. Shenzhen Key Laboratory of Fermentation, Purification and Analysis, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen 518055, China)

(2. Green's Bioengineering (Shenzhen) Co. Ltd., Shenzhen 518055, China)

Abstract: In order to obtain lactic acid bacteria within food safety level, which is needed for preparing gamma-aminobutyric acid (GABA)-rich yogurt from dairy-based substrates, 171 lactic acid bacterial strains were isolated from fermented food in domestic market as tested strains. Species identification of these strains was conducted by 16S rDNA sequence analysis, and GABA yield after-fermentation was determined by improved HPLC. After primary screening in broth medium and rescreening in dairy-based medium, one strain of *Lactococcus Lactis* subsp. *lactis* (No.4043) was obtained, which had high-yield potential of GABA in dairy-based medium. Inoculated into 10% (W/V) skimmed reconstituted milk with sodium L-glutamate of 2 g/L, the yield of GABA was about 0.39 g/L after fermenting by single strain at 30 °C for 48 h, which ranked relatively high level at present. 18 kinds of sugars such as glucose, galactose, etc., could be metabolized by strain No.4043. Inoculated into M17 medium at 30 °C, the logarithmic growth period was 2~8 h. The strain No.4043 was weak in continuous acid-producing capacity, showed good acid tolerance in the environment with pH 3~5.5, good in auto-aggregation but poor in bile salt tolerance. Surface hydrophobicity and adhesion of the strain No.4043 were weak, leading to difficulties in adhering and colonizing in human

引文格式:

孙世鑫, 李科, 骆鹏飞, 等. 制备富含 γ -氨基丁酸酸奶的乳酸菌筛选及相关特性分析[J]. 现代食品科技, 2021, 37(3): 106-114

SUN Shi-xin, LI Ke, LUO Peng-fei, et al. Screening and characteristics of lactic acid bacteria for preparing γ -aminobutyric acid-rich yogurt [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(3): 106-114

收稿日期: 2020-08-28

基金项目: 深圳市科技计划基础研究项目 (JCYJ20170818115059178)

作者简介: 孙世鑫 (1984-), 男, 讲师, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 刘冬 (1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

intestinal effectively, which was not suitable to be probiotics in gastrointestinal tract. The strain No.4043 could be used as a starter for producing yoghurt rich in GABA by mixed fermentation of multiple strains.

Key words: gamma-aminobutyric acid (GABA); lactic acid bacteria; screening; identification; strain characteristics

γ -氨基丁酸, 又名 γ -氨基酪酸、4-氨基丁酸, 是一种在自然界广泛存在的小分子量非蛋白质氨基酸。GABA 是人体中枢神经系统中重要的抑制性神经递质^[1], 具有改善睡眠^[2]、降低血压^[3]、缓解焦虑^[4]和免疫调节^[5]等多种生理功能。研究表明, 健康人群体内产生的 GABA 能够满足自身需要, 但受到年龄增长或失眠、抑郁等亚健康状态的影响, 体内的 GABA 会因为过度消耗导致含量明显下降^[6]。2009 年, 我国将 GABA 纳入新资源食品目录。开发富含 GABA 的功能性食品, 能够有效缓解和预防因体内 GABA 减少而诱发的各种慢性疾病和亚健康症状, 因而具备良好的市场前景。

目前, GABA 可通过化学合成^[7]、天然植物提取^[8]和微生物发酵等方法制备。但化学合成法的产物在安全性上存在争议, 尚不能应用于食品领域。天然植物提取法受到原料、工艺等因素限制, 提取分离产率低, 不适用于工业化生产。相比之下, 利用微生物如乳酸菌发酵, 依靠其体内的谷氨酸脱羧酶 (Glutamate decarboxylase, GAD, EC4.1.1.15) 将 L-谷氨酸经 α -脱羧反应生成 GABA, 具有合成速度快、生产成本低、发酵产量高等优点^[9], 近年来被广泛应用于富含 GABA 的食品和药品的合成^[10]。

以酸奶为代表的发酵乳制品一直深受消费者欢迎, 乳酸菌作为益生菌也被广泛应用于酸奶生产中。但迄今为止, 利用乳基底物培养食品安全级的产 GABA 乳酸菌, 并直接用于发酵生产富含 GABA 的酸奶的研究报道鲜见, 也尚未见到国内外有富含 GABA 的酸奶上市的消息。因此, 筛选适宜在乳基底物中生长并具备高产 GABA 能力的乳酸菌具有巨大的市场应用前景。

本研究从国内市售发酵食品中分离筛选具备合成 GABA 能力的食品安全级乳酸菌, 得到 1 株在乳基底物中具备高产 GABA 潜力的菌株, 并对其菌株特性进行了初步研究, 以为富含 GABA 的酸奶开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

本实验选用国内市售奶酪、奶疙瘩和米糟等发酵食品作为菌种分离原料。

1.2 培养基

MRS 肉汤培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 牛肉粉 5, 酵母粉 5, 硫酸镁 0.1, 醋酸钠 5, 柠檬酸铵 2, 磷酸氢二钾 2, 硫酸锰 0.05, 吐温 80 1 mL, 调节 pH 值为 7.2 ± 0.1 , 121°C 灭菌 15 min。

M17 肉汤培养基 (g/L): 大豆胨 5, 肉胨 2.5, 酪胨 2.5, 酵母粉 2.5, 牛肉浸粉 5, 乳糖 5, 抗坏血酸 0.5, 甘油磷酸钠 19, 硫酸镁 0.25, 调节 pH 值为 7.2 ± 0.1 , 121°C 灭菌 15 min。

MRS 平板培养基: 在 MRS 肉汤培养基中添加琼脂 20 g/L。

M17 平板培养基: 在 M17 肉汤培养基中添加琼脂 20 g/L。

乳基底物培养基: 市售脱脂乳粉, 纯水溶解后配置成 10% (m/V) 的复原乳, 添加 L-谷氨酸钠 (L-Glu-Na) 2 g/L^[11]。

1.3 试剂

GABA (色谱纯), Sigma 公司; 四氢呋喃、甲醇、乙腈 (色谱纯), 天津大茂化学试剂厂; L-Glu-Na (生化试剂纯), 国药集团化学试剂有限公司; 革兰氏染色液试剂盒, 北京陆桥技术股份有限公司; API 试剂盒, 法国梅里埃公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器与设备

5810R 型高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; LC-20AT 型高效液相色谱, 日本 Shimadzu 公司; Spectra Max M2 型荧光酶标仪, 美国 Molecular Devices 公司; ECLIPSE TS100 型倒置显微镜, 日本 Nikon 公司; PHS-3C 型 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.5 方法

1.5.1 菌株的分离纯化与培养

对原料进行前处理后, 取样品 10 mL, 用无菌生理盐水梯度稀释后涂布于 MRS 平板培养基上, 静置于 37°C 和 30°C 培养箱中恒温培养 48 h, 随后挑选生长较快、肉眼可见的菌落在 MRS 平板培养基上进行划线培养, 重复操作直至分离出形态一致的单菌落。对上述单菌落进行镜检、革兰氏染色和过氧化氢酶实

验。将革兰氏染色呈阳性、过氧化氢酶反应呈阴性的菌落纯化后接种于适宜的肉汤培养基(乳杆菌-MRS培养基,乳球菌-M17培养基)中静置培养24 h。分别吸取等体积的菌悬液和40% (V/V) 灭菌甘油于2 mL冻存管,摇匀,-80 °C冻存。

1.5.2 分子生物学鉴定

16S rDNA 序列委托深圳华大基因科技有限公司测定。测序引物 27F 和 1492R 分别为: 27F AGAGTTTGATCMTGGCTCAG, 1492R TACGGYTA CCTGTACACTT。PCR 反应体系(总体积 30 μ L): 无菌超纯水 17.8 μ L, Buffer 3 μ L, dNTP 2 μ L, 正向引物 3 μ L, 反向引物 3 μ L, DNA 模板 1 μ L, 酶 0.2 μ L。

PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s; 55 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 1 min, 共循环 35 次; 最后 72 °C 延伸 10 min。将测序结果与 NCBI 中 Gene Bank 数据库进行 BLAST 对比, 采用 MEGA 7.0 构建系统发育树。

1.5.3 产 GABA 菌株的初筛和复筛

将菌株菌悬液以 3% (V/V) 体积分数接种于适宜的肉汤培养基(乳杆菌: MRS 肉汤培养基; 乳球菌: M17 肉汤培养基)中, 于该菌最适生长温度下恒温培养 12 h, 重复活化 3 次。取单菌株种子液以 3% (V/V) 体积分数接种于适宜的肉汤培养基(同上)中, 于最适生长温度下恒温培养 72 h。取菌悬液 1 mL 于 4 °C、12000 r/min 离心 3 min, 吸取适量上清液加入等体积 5% (m/V) 三氯乙酸溶液, 再次于 4 °C、12000 r/min 离心 15 min。测定上清液中 GABA 含量, 并以其为指标初筛出具备合成 GABA 能力的菌株。

从初筛的菌株中选择产量相对较高的菌株, 按初筛方法接种于乳基底物培养基, 于最适生长温度下恒温发酵 48 h, 按初筛方法测定发酵乳中 GABA 含量, 并以其为指标复筛出具备高产 GABA 能力的菌株。

1.5.4 GABA 的定量检测

表 1 梯度洗脱程序

Table 1 The gradient elution program

时间/min	A 相/%	B 相/%	流速/(mL/min)	柱温/°C
0	89	11	1	40
15.5	68	32	1	40
26.5	20	80	1	40
27	20	80	1	40
29	89	11	1	40
30	89	11	1	40

HPLC 法, 在 QB/T 4587-2013 检测方法基础上加以改进。精密吸取适量样品液与等体积的邻苯二甲醛衍生剂混合, 室温反应 2 min 后经 0.22 μ m 尼龙针头

过滤器转移至液相进样瓶。流动相 A 为 25 mmol/L 醋酸钠, 调节 pH 至 7.2; 流动相 B 为甲醇和乙腈, 混合比例为 50:50, 两相均经 0.45 μ m 有机系滤膜抽滤后超声脱气 20 min 后使用。色谱柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m), 柱温为 40 °C, 流速为 1 mL/min, 进样量为 20 μ L, 检测波长 334 nm, 梯度洗脱。

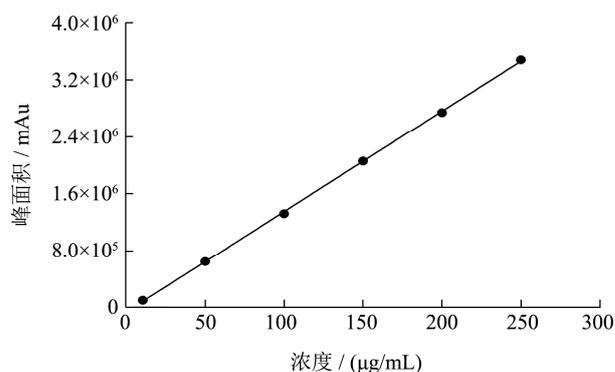


图 1 GABA 标准浓度曲线

Fig.1 The standard curve of GABA

用质量浓度为 10、50、100、150、250 μ g/mL 的 GABA 标准工作液并绘制标准曲线, 如图 1 所示。以峰面积(y)对 GABA 浓度(x)做线性回归, 得线性回归方程 $y=14179x-59007$, 线性相关系数 $R^2=0.9998$ 。

1.5.5 菌株特性测定

1.5.5.1 形态学观察

取菌液 0.1 mL 涂布于平板培养基, 在 30 °C 下恒温培养 48 h, 观察、记录菌落颜色、大小、边缘生长情况。取少量经革兰氏染色后用显微镜于 100 倍油镜观察并拍照, 记录其菌体形态特征。

1.5.5.2 糖代谢特性分析

将菌株于 30 °C 厌氧培养 48 h 后, 选取 API 50 CH 试验条, 按照试验条的使用说明进行操作, 对菌株的糖代谢特性进行分析。

1.5.5.3 生长曲线测定

比浊法^[12]。将菌株接种于 M17 肉汤培养基中, 在 30 °C 下恒温培养 48 h, 以空白培养基作为对照, 每隔 2 h 使用酶标仪测定发酵液在 600 nm 下的吸光度(即 OD₆₀₀ 值), 并以时间为横坐标, OD₆₀₀ 值为纵坐标, 绘制菌株生长曲线。

1.5.5.4 产酸曲线测定

pH 计法^[13]。将菌株接种于 M17 肉汤培养基中, 在 30 °C 下恒温培养 48 h, 每隔 4 h 测定发酵液 pH 值, 并以时间为横坐标, pH 值为纵坐标, 绘制菌株产酸曲线。

1.5.5.5 耐酸能力测定

将菌株分别接种于 pH 值为 2.0、3.0、4.0 的 M17 肉汤培养基中, 在 30 °C 下恒温培养 3 h, 而后对不同

pH 值培养基中的活性乳酸菌进行平板计数^[14], 按式 (1) 计算菌株在不同 pH 值下的存活率, 测定菌株的耐酸能力。

$$\text{存活率} / \% = \frac{\text{3h后某pH值下培养基中的活菌数}}{\text{0h时某pH值下培养基中的活菌数}} \times 100\% \quad (1)$$

1.5.5.6 耐胆盐能力测定

菌株分别接种于胆盐浓度为 1.0、2.0、3.0 g/L 的肉汤培养基中, 在 30 °C 下恒温培养 3 h, 而后对不同胆盐浓度培养基中的活性乳酸菌进行平板计数^[15], 按式 (2) 计算菌株在不同胆盐浓度下的存活率, 测定菌株的耐胆盐能力。

$$\text{存活率} / \% = \frac{\text{3h后某胆盐浓度下培养基中的活菌数}}{\text{0h时某胆盐浓度下培养基中的活菌数}} \times 100\% \quad (2)$$

1.5.5.7 自凝聚能力测定

取菌种菌悬液 1 mL, 在 4 °C 下以 4000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 收集菌体, 再用 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液重复洗涤菌体两次, 使菌体重悬于 1 mL 磷酸盐缓冲液中。分别测定在 30 °C 下静置 2、4、24 h 后上层悬液的 OD₆₀₀ 值, 按式 (3) 计算菌株的自凝聚能力^[16]。

$$\text{自凝聚力} / \% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (3)$$

式中: A₀ 为 t=0 时刻的 OD₆₀₀ 值; A_t 为 t 时刻的 OD₆₀₀ 值。

1.5.5.8 表面疏水性测定

取菌种菌悬液 3 mL, 在 4 °C 下以 4000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 收集菌体, 再用 pH 值 7.0 的磷酸盐缓冲液重复洗涤菌体两次, 使菌体重悬于 3 mL 磷酸盐缓冲液中。分别吸取 1 mL 的乙酸乙酯及 1 mL 的氯仿与上述磷酸盐缓冲液混合, 室温静置分层 15 min, 测定水相的 OD₆₀₀ 值, 按式 (4) 计算菌株的表面疏水性^[17]。

$$\text{表面疏水性} / \% = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100\% \quad (4)$$

式中: A₀ 为溶剂萃取前水相 t=0 时刻的 OD₆₀₀ 值; A_t 为溶剂萃取后水相 t=15 min 时刻的 OD₆₀₀ 值。

1.5.6 数据处理与分析

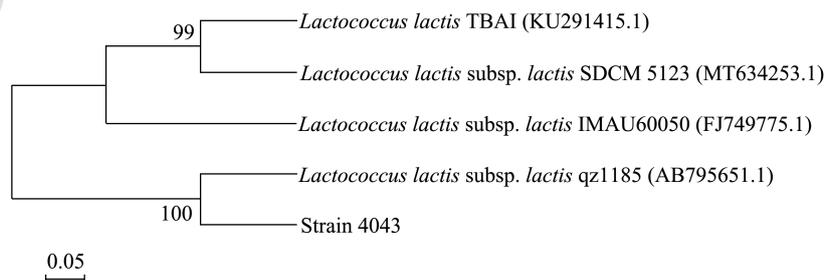


图 2 基于一株乳酸乳球菌乳酸亚种菌株构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree reconstructed based on strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

每次实验均做 3 次平行, 数据结果以 Mean±SD 表示。实验数据的差异显著性用 SPSS 22.0 软件中 one-way ANOVA 法检验, p<0.05 视为有显著差异, 并用 GraphPad Prism 8 软件作图。

2 结果与讨论

2.1 菌株的分离与鉴定

表 2 菌株的种属分类鉴定

Table 2 Classification and identification of strains

属	种	数量/株
乳杆菌属	植物乳杆菌	48
	短乳杆菌	34
	鼠李糖乳杆菌	6
	干酪乳杆菌	6
	副干酪乳杆菌	6
	瑞士乳杆菌	4
	酸乳杆菌	4
	保加利亚乳杆菌	3
	嗜热链球菌	26
乳球菌属	乳酸乳球菌	21
	乳酸乳球菌乳酸亚种	13

从原料中共分离纯化出菌株 171 株, 经深圳华大基因科技有限公司 16S rDNA 测序并构建系统发育树鉴定, 全部为乳酸菌, 鉴定结果见表 2。所有待测菌株与对照菌株的同源性均在 99% 以上, 其中基于一株乳酸乳球菌乳酸亚种菌株构建的系统发育树如图 2 所示。

2.2 具备高产 GABA 能力菌株的筛选

利用改进后的 HPLC 法测定 171 株菌株发酵液中 GABA 的质量浓度, 对菌株进行初筛。得到具备 GABA 合成能力的菌株 74 株, 其中乳杆菌 2 种共 41 株, 乳球菌 3 种共 33 株。经比较后发现, 不同种属的乳酸菌的 GABA 合成能力存在显著差异。初筛中 GABA 产量高于 0.01 g/L 的 17 株乳酸菌及其产量如表 3 所示。

表3 初筛中具备较高 GABA 合成能力的菌株

Table 3 Strains with relatively high yield of GABA in preliminary screening

菌株编号	乳酸菌种名 (中文+拉丁名)	GABA 产量/(g/L)	培养温度/°C
1024	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	0.12±0.01 ^c	37
1454	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	0.12±0.02 ^c	37
1455	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	0.12±0.03 ^c	37
1052	短乳杆菌 (<i>Lactobacillus brevis</i>)	0.16±0.04 ^c	30
1076	短乳杆菌 (<i>Lactobacillus brevis</i>)	0.25±0.10 ^b	30
1246	短乳杆菌 (<i>Lactobacillus brevis</i>)	0.14±0.09 ^c	30
1297	短乳杆菌 (<i>Lactobacillus brevis</i>)	0.11±0.02 ^c	30
1334	短乳杆菌 (<i>Lactobacillus brevis</i>)	0.34±0.10 ^a	30
3030	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	0.02±0.01 ^d	30
4024	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	0.01±0.01 ^d	30
4029	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	0.02±0.01 ^d	30
4007	乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	0.02±0.01 ^d	30
4025	乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	0.02±0.01 ^d	30
4043	乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	0.14±0.02 ^c	30
3019	嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	0.01±0.01 ^d	42
3021	嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	0.02±0.01 ^d	42
3022	嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	0.01±0.01 ^d	42

注: 同列数据中无共同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。表 4 同。

表4 复筛中菌株 GABA 产量情况

Table 4 GABA production of strains in rescreening

菌株编号	乳酸菌种名 (中文+拉丁名)	GABA 产量/(g/L)	培养温度/°C
1024	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	0.02±0.01 ^c	37
1454	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	0.03±0.01 ^c	37
1455	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	0.03±0.01 ^c	37
3030	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	0.02±0.01 ^c	30
4024	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	0.02±0.01 ^c	30
4029	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)	0.02±0.01 ^c	30
4007	乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	0.33±0.03 ^b	30
4025	乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	0.01±0.01 ^c	30
4043	乳酸乳球菌乳酸亚种 (<i>Lactococcus Lactis</i> subsp. <i>lactis</i>)	0.39±0.07 ^a	30
3019	嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	0.01±0.01 ^c	42
3021	嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	0.01±0.01 ^c	42
3022	嗜热链球菌 (<i>Streptococcus thermophilus</i>)	0.32±0.04 ^b	42

从上表可以发现,短乳杆菌的 GABA 合成能力相对突出。但目前短乳杆菌尚未列入我国《可用于食品的菌种名单》,不能满足食品安全要求,故将短乳杆菌剔除。将剩余的 12 株乳酸菌转接于乳基底物培养基中,于最适温度下恒温发酵 48 h,并以发酵乳中 GABA 含量为指标进行复筛,结果如表 4 所示。

由上表可见,编号为 4043 的乳酸乳球菌乳酸亚种菌株(以下简称 4043 号菌株)在乳基底物中合成 GABA 的能力最强,产量约为 0.39 g/L。贤乾隆等^[18]

从酸菜和酸奶中分离得到干酪乳杆菌 QL-20,按 3% (V/V) 接种至含 L-Glu-Na 0.2% (m/V) 的 12% (m/V) 的脱脂乳培养基中,37 °C 下静置发酵,凝乳时间为 6 h,发酵乳中 GABA 产量约 0.09 g/L。Nejati F 等^[19]用添加了 5 g/L 酵母膏和 20 mmol/L 谷氨酸钠的灭菌炼乳培养乳酸乳球菌 DIBCA1 (*Lactococcus lactis* DIBCA1) 和植物乳杆菌 PU11 (*L. plantarum* PU11),在 37 °C 下复配发酵 48 h, GABA 的产量超过了 0.14 g/L。

表5 4043号菌株API 50CH试验条代谢结果

Table 5 Metabolism results of strain No. 4043 with API 50CH

reagent strip			
底物糖名称	结果	底物糖名称	结果
对照	-	七叶灵	-
甘油	-	柳醇	+
赤藓醇	-	纤维二糖	+
D-阿拉伯糖	-	麦芽糖	+
L-阿拉伯糖	-	乳糖	+
核糖	+	蜜二糖	-
D-木糖	+	蔗糖	+
L-木糖	-	海藻糖	+
阿东醇	-	菊糖	-
β -甲基-D-木糖甙	-	松三糖	-
半乳糖	+	棉子糖	-
葡萄糖	+	淀粉	+
果糖	+	糖原	-
甘露糖	+	木糖醇	-
山梨糖	-	牻牛儿糖	+
鼠李糖乳杆菌	-	D-松二糖	-
卫矛醇	-	D-来苏糖	-
肌醇	-	D-塔塔糖	-
甘露醇	+	D-岩糖	-
山梨醇	-	L-岩糖	-
α -甲基-D-甘露糖甙	-	D-阿拉伯糖醇	-
α -甲基-D-葡萄糖甙	-	L-阿拉伯糖醇	-
N-乙酰-葡萄糖胺	+	葡萄糖酸盐	-
苦杏仁甙	+	2-酮基-葡萄糖酸盐	-
熊果甙	+	5-酮基-葡萄糖酸盐	-

注：“+”为阳性反应、“-”为阴性反应。

赵树平等^[20]从酸马奶中筛选的瑞士乳杆菌 ND01 (*L. helveticus* ND01), 按 3% (V/V) 接种于 11% (m/V) 的灭菌复原乳中, 于 37 °C 下静置发酵 30 h, GABA 产量最高近 0.17 g/L。Wu QL 等^[21]利用嗜热链球菌 YI-B1 (*Streptococcus thermophilus* YI-B1) 复配短乳杆菌 NPS-QW-145 (*Lactobacillus brevis* NPS-QW-145), 于 37 °C 下在添加 2 g/L L-Glu-Na 的 10% (m/V) 脱脂乳中发酵 24 h, GABA 的产量达到 0.31 g/L。此外, 闫天文等^[22]将分离自内蒙古传统发酵乳制品中的植物乳杆菌 NDC75017 (*L. plantarum* NDC75017) 与德氏乳杆菌保加利亚亚种、嗜热链球菌混合 (*L. P:L. b:S. t=0.5:0.5:1.5*) 作为发酵剂, 当接种量为 2% (V/V), L-Glu-Na 添加浓度为 75 mmol/L, 辅酶浓度为 20 μ mol/L, 发酵温度为 43 °C 时, GABA 产量最高可达 550 mg/kg。谢芳等^[23]利用从生水牛乳中分离出的乳酸

乳球菌乳酸亚种按照 1:0.5:1 的比例复配德氏乳杆菌保加利亚亚种 (1.2717 *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus*) 和嗜热链球菌 (1.2718 *Streptococcus thermophilus*), 当乳酸乳球菌接种量为 3% (V/V) 时, 在 L-Glu-Na 添加量为 6% (m/V) 的脱脂水牛乳中 37 °C 恒温发酵, GABA 产量最高可达 0.7 g/L。而薛玉清等^[24]将从内蒙古传统酸奶中筛选的植物乳杆菌与德氏乳杆菌保加利亚亚种和嗜热链球菌按照 0.5:0.5:1.5 的比例, 总接种量为 2% (V/V) 接种至灭菌乳中, 在 43 °C 恒温发酵 3.6 h, GABA 产量超过了 1.51 g/L。可见, 未经发酵条件优化的 4043 号菌株在乳基底物中单菌种发酵的 GABA 产量明显优于文献报道的产量, 但相较优化后的多菌种复配发酵的产量还有一定距离, 后期可通过多菌种混合发酵及条件优化进一步提升自身 GABA 产量。

2.3 4043号菌株的菌株特性

2.3.1 形态学特性

4043 号菌株的平板菌落及菌株的镜检结果如图 3 所示。由图可知, 菌落为半透明乳白色, 呈不规则圆形, 直径在 1 mm 左右, 中央略微隆起, 表面光滑湿润, 边缘整齐。菌体呈球形或卵圆形。

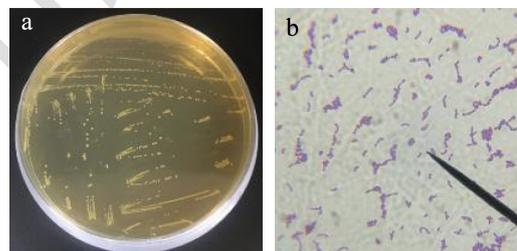


图3 4043号菌株的菌落及菌体形态

Fig.3 Colony and morphological characteristics of strain No.4043

注: a: 4043 号菌株的菌落形态; b: 4043 号菌株的菌体形态。

2.3.2 糖代谢特性

采用 API 50CH 试验条对 4043 号菌株的糖代谢特性进行测定, 各底物试验条代谢结果判别见表 5。

可见, 4043 号菌株可发酵葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、乳糖、淀粉、蔗糖和海藻糖等 18 种单糖、二糖及多糖, 不能代谢山梨糖、蜜二糖、山梨醇等 31 种底物, 后续在针对 4043 号菌株开展的产品配方和发酵工艺优化过程中, 应根据该菌种的糖代谢特征选择合适的糖类。

2.3.3 菌株的生长和产酸曲线

4043 号菌株在 30 °C 下恒温培养 48 h 的生长曲线和产酸曲线如图 4 所示。由图 4 OD₆₀₀ 曲线可知, 总

菌数在接种后 0~2 h 显著增加, 在 2~8 h 内呈指数增加, 8~12 h 缓慢增加并在 13 h 附近到达峰值, 随后缓慢波动, 自 32 h 后开始显著下降, 直至发酵终点。这表明 4043 号菌株适应期较短; 对数生长期为接种后 2~8 h, 菌株繁殖迅速; 8~32 h 为稳定期, 能够维持基本的生长能力; 自 32 h 后进入衰亡期。

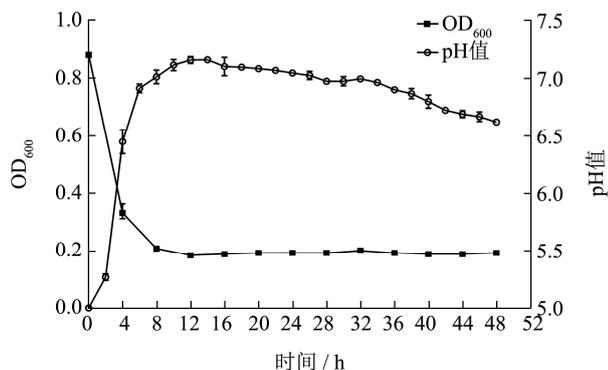


图4 4043号菌株的生长及产酸曲线

Fig.4 Growth and acid production curve of strain No.4043

由图4中pH值曲线可知, 4043号菌株在适应期和对数生长期产酸迅速, 导致发酵液pH值自7.2迅速降低至5.5左右, 但其后pH值便稳定于此, 直至发酵结束也未能进一步降低。这表明4043号菌株的持续产酸能力较弱, 容易导致发酵乳的凝乳形态不佳。此外有研究表明, 对于乳酸乳球菌乳酸亚种而言, 菌株GAD的最适pH值在4.7左右^[25]。较高的终点pH值也不利于自身GAD活性的充分发挥, 从而限制了GABA产量的进一步增长。因此在应用于富含GABA的酸奶生产时, 可复配具备较强持续产酸能力的菌种与4043号菌株进行混合发酵, 以进一步降低环境pH值, 改善终点凝乳形态, 提升GABA产量。

2.3.4 菌株对酸和胆盐的耐受性

能够顺利通过胃酸和胆盐所构成的生物屏障, 并稳定粘附于肠道上皮细胞从而实现定植, 是益生菌在人体内发挥益生功能的前提条件^[26]。因此, 能够在胃肠道中发挥作用的益生乳酸菌必须拥有较强的对酸和胆盐的耐受性。4043号菌株在不同pH值和胆盐浓度下的耐受情况如图5所示。由5a图可知, 4043号菌株对酸的耐受性随pH值变化差异显著。于30℃下在pH值为2.0的M17肉汤培养基中培养3h后, 菌株存活率几乎为零。随着pH值上升, 4043号菌株的存活率也显著上升。当pH值>3时, 存活率明显高于60%。结合其生长曲线和产酸曲线可知, 在pH值3~5.5的条件下, 4043号菌株对酸具备较强的耐受性。由5b图可知, 当培养基中胆盐浓度≥1g/L时, 在30℃下静置培养3h后, 菌株基本无法存活, 对胆盐的耐受性极差。

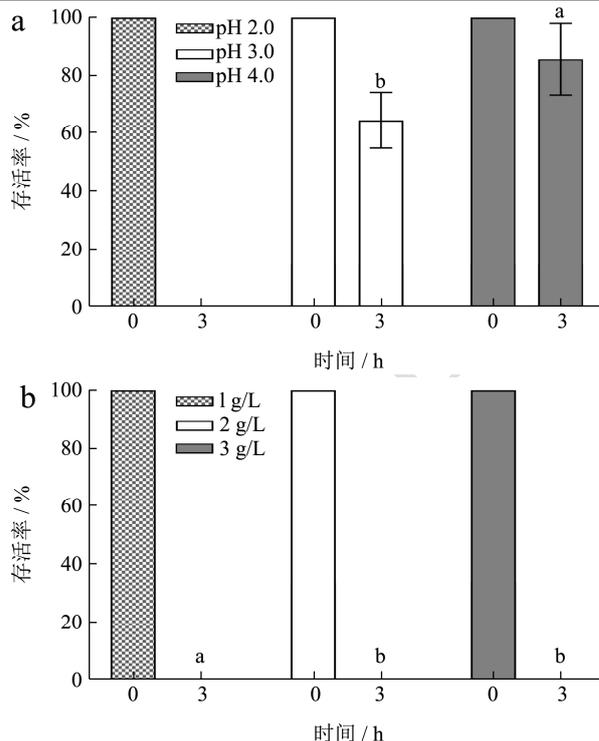


图5 4043号菌株的耐酸和耐胆盐特性

Fig.5 Acid and bile salt tolerance ability of strain No.4043

注: a: 4043号菌株的耐酸特性; b: 4043号菌株的耐胆盐特性; 柱状图上无共同字母表示差异显著($p < 0.05$)。

研究表明, 健康人群胃肠道中, 胃液pH值和肠液胆盐浓度都是动态变化的。在进食状态下, 胃部pH值在1.8~5.0之间波动, 通常情况下维持在2.0左右^[27], 而肠液胆盐浓度在3~5g/L之间变化^[28]。结合4043号菌株对酸和胆盐的耐受范围可知, 该菌无法在健康人群的胃肠道环境中存活, 不适宜在胃肠道内定植以发挥益生菌功能, 但仍可在发酵制备富含GABA酸奶的过程中充分发挥其高产GABA的潜力。

2.3.5 菌株的自凝聚能力和表面疏水性

研究显示, 自凝聚特性有助于乳酸菌形成生物膜, 表面疏水性是决定乳酸菌非特异性粘附的重要动力, 两者对于乳酸菌向肠道上皮细胞的顺利粘附和稳固定植至关重要^[29]。4043号菌株的自凝聚能力及表面疏水性如图6所示。从6a图可以发现, 4043号菌株的自凝聚能力随着时间延长呈非线性增加趋势。在静置2~4h期间, 4043号菌株自凝聚力有所增加但差异不大, 至24h后则迅速增加至72.77%, 略优于夏海燕等^[30]筛选的发酵乳杆菌18-2(70.50%)和17-1(70.67%)。

从6b图可以发现, 4043号菌株对乙酸乙酯的疏水性明显高于对氯仿的疏水性, 但两者数值均低于8%。参照表6可判定, 4043号菌株为弱疏水性菌株, 粘附特性较差。虽然具备良好的自凝聚能力, 但低疏水性的菌体表面决定了4043号菌株难以在人体肠道内

实现有效粘附与定植。这再次印证, 4043 号菌株不适宜在胃肠道内定植以发挥益生菌功能。

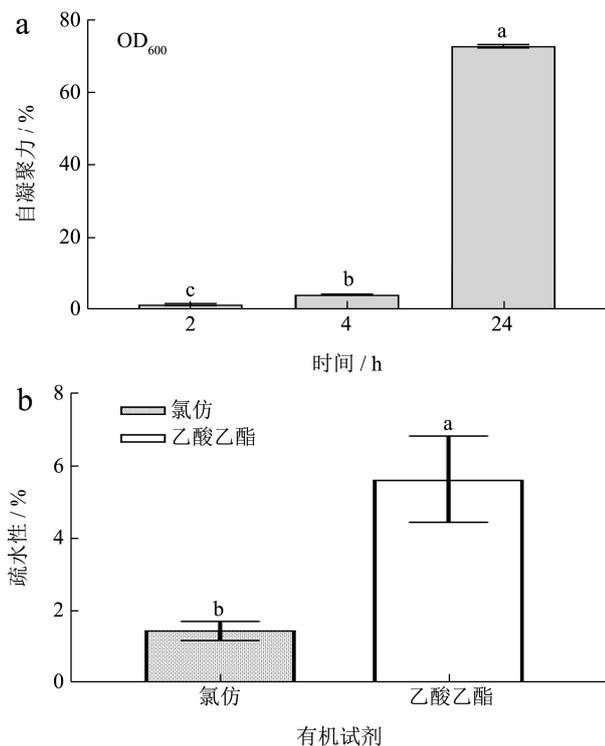


图 6 4043 号菌株的自凝聚能力和表面疏水性

Fig.6 Auto-aggregation and hydrophobicity of strain No.4043

注: a: 4043 号菌株的自凝聚率; b: 4043 号菌株的疏水性; 柱状图上无共同字母表示差异显著 ($p < 0.05$)。

表 6 菌株疏水性判定标准

Table 6 Judgement standard of hydrophobicity

亲水性	疏水率
高疏水性	>50%
中疏水性	20% ≤ x ≤ 50%
低疏水性	>20%

3 结论

3.1 本研究针对从市售发酵食品中分离出的 171 株乳酸菌, 经肉汤培养基初筛和脱脂复原乳培养基复筛, 最终得到一株在乳基底物中具有高产 GABA 潜力的食品安全级乳酸乳球菌乳酸亚种菌株。将该菌以 3% (V/V) 接种于含 L-Glu-Na 2 g/L 的 10% (m/V) 乳基底物培养基中, 在 30 °C 下单菌种发酵 48 h, GABA 产量约 0.39 g/L。

3.2 所筛的乳酸乳球菌乳酸亚种菌株能够代谢葡萄糖、半乳糖等 18 种糖分。于 30 °C 下接种于 M17 培养基中, 对数生长期为 2~8 h。该菌持续产酸能力较弱, 在 pH 值 3~5.5 的环境中具备良好的酸耐受性, 菌株自凝聚力良好, 但对胆盐的耐受性极差, 且属于弱疏水性菌株, 粘附特性较差, 难以在人体肠道内有效粘

附与定植, 不适宜在胃肠道内定植以发挥其益生菌功能。

3.3 该菌株具有较高的产 GABA 能力, 可作为研制富含 GABA 酸奶的潜力菌种应用于富含 GABA 功能性酸奶的生产中。

参考文献

- [1] 梁臣, 陈忠. γ -氨基丁酸及其受体功能的研究与应用现状[J]. 动物医学进展, 2015, 36(4): 108-112
LIANG Chen, CHEN Zhong. Research and application status on physiologic functions of γ -aminobutyric acid and its receptors [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2015, 36(4): 108-112
- [2] Yamatsu A, Yamashita Y, Pandharipande T, et al. Effect of oral γ -aminobutyric acid (GABA) administration on sleep and its absorption in humans [J]. Food Science & Biotechnology, 2016, 25(2): 547-551
- [3] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, et al. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods [J]. Food Microbiology, 2005, 22(6): 497-504
- [4] Abdou A M, Higashiguchi S, Horie K, et al. Relaxation and immunity enhancement effects of γ -aminobutyric acid (GABA) administration in humans [J]. BioFactors, 2010, 26(3): 201-208
- [5] Auteri M, Zizzo M G, Serio R. GABA and GABA receptors in the gastrointestinal tract: From motility to inflammation [J]. Pharmacological Research, 2015, 93: 11-21
- [6] Cho S Y, Park M J, Kim K M, et al. Production of high γ -aminobutyric acid (GABA) sour kimchi: using lactic acid bacteria isolated from mukeunjee kimchi [J]. Food Science & Biotechnology, 2011, 20(2): 403-408
- [7] 杨晶晶, 曲媛, 崔秀明. γ -氨基丁酸的制备方法与含量测定研究进展[J]. 食品工业科技, 2014, 35(3): 351-356
YANG Jing-jing, QU Yuan, CUI Xiu-ming. Research progress of extraction and determination methods of γ -aminobutyric acid [J]. Science and Technology of Food Industry, 2014, 35(3): 351-356
- [8] 蒋芮, 李雅婷, 欧阳鹏凌, 等. 谷物中 γ -氨基丁酸(GABA)富集工艺的研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 1: 347-352
JIANG Rui, LI Ya-ting, OUYANG Peng-ling, et al. Progress of γ -aminobutyric acid (GABA) enrichment process in cereals [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 1: 347-352
- [9] 穆琳, 阮晖, 唐彦捷, 等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的分离筛选及

- 其主要性能[J].中国食品学报,2009,9(3):20-25
- MU Lin, RUAN Hui, TANG Jie-yan, et al. Isolation and screening of lactic acid bacteria for γ -aminobutyric acid production [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(3): 20-25
- [10] Lacroix N, St-Gelais D, Champagne C P, et al. Gamma-aminobutyric acid-producing abilities of lactococcal strains isolated from old-style cheese starters [J]. Dairy Science & Technology, 2013, 93(3): 315-327
- [11] LI Hai-xing, CAO Yu-sheng. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid [J]. Amino Acids, 2010, 39(5): 1107-1116
- [12] Wu Q, Shah N P. Restoration of GABA production machinery in *Lactobacillus brevis* by accessible carbohydrates, anaerobiosis and early acidification [J]. Food Microbiology, 2018, 69: 151-158
- [13] 李利,孔丽,张宁,等.耐酸耐胆盐乳酸菌的鉴定及筛选[J].食品科学,2015,36(21):123-128
- LI Li, KONG Li, ZHANG Ning, et al. Identification and selection of lactic acid bacteria resistant to acid and bile salt [J]. Food Science, 2015, 36(21): 123-128
- [14] 蒙月月,陆婧婧,占萌,等.植物乳杆菌 KLDS 1.0318 产酸、耐酸、耐胆盐能力及其免疫特性研究[J].食品工业科技,2018,39(15):70-76
- MENG Yue-yue, LU Jing-jing, ZHAN Meng, et al. Study on the acid producing ability, acid and bile salt tolerance of *Lactobacillus plantarum* KLDS 1.0318 and its immunologic properties [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(15): 70-76
- [15] 崔美岩,张蓓,许宗为,等.青海湖裸鲤肠道中益生性乳酸菌的筛选[J].中国食品学报,2018,18(2):141-147
- CUI Mei-yan, ZHANG Bei, XU Zong-wei, et al. Screening of probiotic LAB from *G. przewalskii* intestinal [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(2): 141-147
- [16] Shekh S L, Dave J M, Vyas B R M. Characterization of *Lactobacillus plantarum* strains for functionality, safety and gamma-aminobutyric acid production [J]. Food Science and Technology, 2016, 74: 234-241
- [17] DING Wu-rong, SHI Chao, CHEN Ming, et al. Screening for lactic acid bacteria in traditional fermented Tibetan yak milk and evaluating their probiotic and cholesterol-lowering potentials in rats fed a high-cholesterol diet [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 32: 324-332
- [18] 贤乾隆.产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及其功能性发酵酸奶的研制[D].柳州:广西科技大学生物与化学工程学院,2013
- XIAN Qian-long. Selection of γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacteria and the development of functional yoghurt [D]. Liuzhou: College of Biological and Chemical Engineering at Guangxi University of Science and Technology, 2013
- [19] Nejati F, Rizzello C G, Cagno R D, et al. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I converting enzyme (ACE)-inhibitory peptides and γ -aminobutyric acid (GABA) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2013, 51(1): 183-189
- [20] 赵树平,陈永福,孙天松,等.瑞士乳杆菌 ND01(*L. helveticus* ND01)发酵乳中ACE抑制活性和 γ -氨基丁酸的研究[J].中国食品学报,2009,9(6):48-54
- ZHAO Shu-ping, CHEN Yong-fu, SUN Tian-song, et al. Studies on ACE inhibitory activity and γ -aminobutyric acid in fermented milk by *L. helveticus* ND01 [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2009, 9(6): 48-54
- [21] Wu Q L, Law Y S, Shah N P. Dairy streptococcus thermophilus improves cell viability of *Lactobacillus brevis* nps-qw-145 and its γ -aminobutyric acid biosynthesis ability in milk [J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12885
- [22] 闫天文,满朝新,任欢,等.富含 γ -氨基丁酸酸奶的制备及质构特性研究[J].中国食物与营养,2014,20(7):49-53
- YAN Tian-wen, MAN Chao-xin, REN Huan, et al. Production and texture analysis of high γ -aminobutyric acid-enriched fermented milk [J]. Food and Nutrition in China, 2014, 20(7): 49-53
- [23] 谢芳,杨承剑,唐艳,等.富含 γ -氨基丁酸水牛乳酸奶的研制[J].中国乳品工业,2015,43(9):44-47
- XIE Fang, YANG Cheng-jian, TANG Yan, et al. Development buffalo milk of the rich in gamma-aminobutyric acid yogurt [J]. China Dairy Industry, 2015, 43(9): 44-47
- [24] 薛玉清,单艺,满朝新,等. γ -氨基丁酸发酵乳的研制[J].食品与发酵工业,2013,39(11):85-90
- XUE Yu-qing, SHAN Yi, MAN Chao-xin, et al. Development of GABA-enriched yogurt [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(11): 85-90

(下转第 285 页)