

产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及诱变育种

梁金钟, 李 雯, 王凤青

(哈尔滨商业大学食品工程学院, 黑龙江省高等学校食品科学与工程重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘 要: 利用乳酸菌分离培养基从酸菜汁中分离菌株。经过初筛、复筛后得到的菌株Lp-Lw-131有较好的产 γ -氨基丁酸(GABA)能力。对菌株进行形态学鉴定和生理生化实验确定该菌为植物乳杆菌, 编号为Lp-Lw-131。利用菌株体内的谷氨酸脱羧酶(GAD)将L-谷氨酸钠脱羧转化成GABA, 用比色法测定GABA的产量为0.917g/L。以Lp-Lw-131为出发菌株进行紫外线和硫酸二乙酯(DES)诱变, 以致死率为标准确定最佳诱变条件为: 紫外照射距离30cm, 照射时间90s; DES体积分数为25%醇溶液, 处理时间20min, 诱变后获得一株突变株Lp-Lw-131-34。连续传代10次后遗传性状稳定, 平均GABA产量为1.815g/L, 是出发菌株的1.979倍。

关键词: 乳酸菌; γ -氨基丁酸; 发酵; 诱变

Screening and Mutation Breeding of Lactic Acid Bacteria with Enhanced Ability for γ -Aminobutyric Acid Production

LIANG Jin-zhong, LI Wen, WANG Feng-qing

(Key Laboratory of Food Science and Engineering, School of Food Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Lactic acid bacteria were isolated from pickled Chinese cabbage using BCP medium. After two rounds of screening, strain Lp-Lw-131 having a higher ability to produce γ -amino butyric acid (GABA) was obtained. The strain was identified as *Lactobacillus plantarum* by morphological observation and physiological and biochemical tests. The yield of GABA generated from the decarboxylation of L-monosodium glutamate catalyzed by glutamate decarboxylase (GAD) from Lp-Lw-131 was determined by colorimetrically to be 0.917 g/L. This strain was irradiated with ultraviolet light and then mutagenized with diethyl sulfate (DES) to improve its ability for GABA production. Based on its lethality, the optimal conditions for mutagenesis in strain Lp-Lw-131 were UV irradiation for 90 s at a distance of 30 cm from the light source followed by treatment with a 25% ethanol solution of DES for 20 min. A mutant strain named Lp-Lw-131-34 was obtained, which maintained its genetic stability after 10 successive passages, providing an average yield of GABA of 1.815 g/L, showing an 1.979-fold increase over the initial strain Lp-Lw-131.

Key words: lactic acid bacteria; γ -amino butyric acid (GABA); fermentation; mutagenesis

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)23-0228-05

doi:10.7506/spkx1002-6630-201323047

γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid, GABA), 又名氨酪酸, 是一种非蛋白质氨基酸, 在哺乳动物中枢神经系统中是重要的抑制性神经传递质^[1]。富含GABA的物料有谷物类、根茎叶类^[2]。GABA的制备方法主要有3种: 提取法, 即从植物中提取GABA; 微生物发酵法^[3], 即利用酵母菌、乳酸菌、克曲霉菌等食品安全级微生物发酵制得^[4]; 化学合成法^[5]: 以邻苯二甲酰亚氨钾和 γ -氯丁氨为原料在强烈条件下反应, 所得产物与浓硫酸作用后再经过水解制得产品GABA。在哺乳动物中GABA的主要代谢途径是L-谷氨酸脱羧而成, 该反应由谷氨酸脱羧酶(GAD)催化。GABA含量的平衡是GABA的合成与降解的调控结果^[6-7]。GABA有抗压、镇定、抗焦虑、改善神经

功能、改善脑机能、抗癌^[8-11]、降低血氨、治疗神经疾病^[12]、抗心律失常、健肝利肾、预防肥胖、促进乙醇代谢、改善更年期综合征等多种功效^[13], 已成为一种新型活性因子, 广泛应用于医药与食品领域并成为研究热点^[14-15]。谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD; EC4.1.1.15)是能催化L-谷氨酸的 α -羧基脱羧反应生成GABA的唯一酶, 广泛分布于从单细胞生物到哺乳动物的各种有机体活细胞中, 其机理研究仍在不断进展^[16-17]。乳酸菌作为一类安全的微生物广泛地应用于食品工业中, 具有多种耐酸机制, 天然乳酸菌的耐酸生长机制可能与它们含有的GAD活力有关, 可以利用它们生物合成GABA。

收稿日期: 2013-06-25

基金项目: 黑龙江省高校科技创新团队建设计划项目(2010td04)

作者简介: 梁金钟(1957—), 男, 教授, 本科, 研究方向为微生物学与发酵工程。E-mail: Ljz2050@126.com

本实验从酸菜汁中分离菌株,对菌株进行形态学和生理生化鉴定,采用直接转化谷氨酸钠的方法生产GABA,并对菌株进行紫外和硫酸二乙酯(DES)诱变,进一步提高GABA的产量,为今后实现工业化生产GABA打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

酸菜汁取自农贸市场。

γ -氨基丁酸(分析纯) 上海阿拉丁公司;正丁醇(分析纯) 天津市永大化学试剂有限公司;冰乙酸(分析纯) 沈阳市新西试剂厂;硅胶板 青岛海洋化工厂分厂;*L*-谷氨酸(*L*-Glu) 中国惠世生化试剂有限公司;磷酸吡哆醛(PLP) 北京金鑫天佑生物科技有限公司;硫酸二乙酯 上海凌峰化学试剂有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

DHP-916恒温培养箱 上海一恒科技有限公司;SY-2-4水浴锅、HYZ-恒温培养振荡器 天津市欧诺仪器仪表有限公司;SW-CJ-1FD超净工作台 苏州净化设备有限公司;LDXZ-50KB灭菌锅 上海申安医疗器械厂;721可见分光光度计 天津市普瑞斯仪器有限公司;BS 224S电子天平 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司;LG10-2.4A离心机 北京京立离心机有限公司;HJ-1磁力搅拌器 金坛科析仪器有限公司;XSZ-480AT显微镜 上海光学仪器厂;ZW20S19W紫外灯 江苏巨光光电科技有限公司。

1.3 培养基

乳酸菌分离培养基(BCP培养基):乳糖5g/L、酵母粉5g/L、溴甲酚紫水溶液(5g/100mL) 2.5mL/L, pH值6.8~7.0。
固体培养基:液体培养基中加入琼脂15~20g/L。

发酵培养基(TYG培养基, g/L):胰蛋白胨5、葡萄糖10、酵母粉5、丁二酸钠5、*L*-谷氨酸钠10, 自然pH值。

1.4 方法

1.4.1 菌种的分离筛选

取酸菜汁,稀释适当倍数后,取稀释液0.2mL涂布于固体BCP培养基中,37℃培养48h。挑取周围变黄的菌落转接到固体BCP平板中,反复3~4次,至菌落性状稳定转接到MRS试管斜面中保存。

1.4.2 GABA的测定

1.4.2.1 GABA的定性测定

将分离得到的菌株接种到液体BCP中,37℃培养48h,再以3mL/100mL培养基的接种量接到TYG培养基,37℃培养48h。菌液7000r/min离心10min,取上清液点样,采用薄层层析法进行定性测定^[18]。选用硅胶G

制板(20cm×10cm×2mm),薄层层析展开剂为:*V*(正丁醇):*V*(冰醋酸):*V*(水)=5:3:2,以5g/L GABA做对照,比较Rf值,展开完毕后自然干燥,0.25g/100mL水溶液茚三酮喷雾,80℃、15min显色。

1.4.2.2 GABA的定量测定

Berthelot比色法标准曲线的绘制:配制质量浓度为0.00、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50、0.60g/L的GABA溶液,向溶液中加入1mol/L的Na₂CO₃溶液0.1mL,后加入0.2mol/L的四硼酸钠缓冲溶液0.5mL,再加入6g/100mL水溶液的苯酚溶液1mL,再加入10g/100mL水溶液的次氯酸钠溶液1mL,放置10min,沸水浴10min,冰浴20min,待溶液出现蓝绿色后加入60g/100mL水溶液的乙醇溶液2mL,20℃水浴30min。以GABA的质量浓度为横坐标,OD_{640nm}为纵坐标绘制标准曲线^[19]。将初筛后的菌株进行发酵实验,从液体BCP培养基中以3mL/100mL培养基的接种量接到TYG培养基中,37℃培养48h,7000r/min离心15min,收集0.5g菌体,加入10mL pH4.7的醋酸缓冲溶液,再加入0.0049g PLP和0.05g谷氨酸钠,37℃、200r/min摇床20h取出,7000r/min离心5min,取上清液0.4mL,根据标准曲线测定GABA含量。

1.4.3 菌种的形态学及生理生化鉴定

挑取BCP平板中的单菌落进行革兰氏染色,在显微镜下观察菌体形态,再对菌株进行生理生化实验^[20],包括过氧化氢酶实验、吡唑实验、硫化氢实验、石蕊牛奶实验、糖发酵实验^[21-22]。

1.4.4 菌株的诱变

1.4.4.1 紫外诱变

将筛选的菌株接种到MRS培养基中37℃活化13h,取菌液15mL于离心管中,7000r/min离心5min,弃上清液,灭菌生理盐水洗涤一次,再加入15mL生理盐水,倒入空培养皿中。用磁力搅拌器在距离20W紫外灯30cm下照射30、40、50、60、70、80、90s。分别吸取未诱变的和诱变后的菌液稀释到适当倍数,取稀释液0.2mL涂布于固体BCP培养基中,37℃培养48h。计算致死率。

1.4.4.2 硫酸二乙酯诱变

取菌悬液15mL,离心,弃去上清液,用灭菌生理盐水洗涤一次,再加入0.1mol/L pH7.0磷酸缓冲溶液10mL,取4mL菌液放到装有15mL缓冲溶液的三角瓶中,加入1mL 体积分数为25%DES乙醇溶液。分别振荡处理10、15、20、25、30min。加入0.5mL质量浓度为25g/100mL的硫代硫酸钠终止反应^[23]。稀释菌液方法同物理诱变,37℃培养48h。计算致死率。

在确定了DES处理时间后,再取菌悬液0.5mL,分别用体积分数为5%、15%、25%、35%的DES乙醇溶液37℃下振荡,计算致死率,确定DES的最佳浓度。

1.4.4.3 致死率测定

采用平板活菌计数法。按下式计算致死率^[24]:

致死率/% = $\frac{\text{未经诱变菌落数} - \text{经诱变菌落数}}{\text{未经诱变菌落数}} \times 100$

1.4.5 高产菌株遗传稳定性的研究

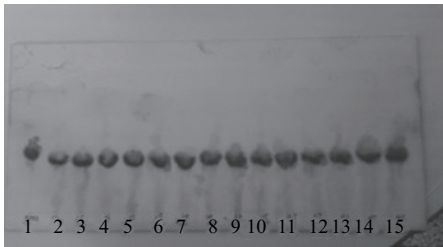
诱变后的菌株在液体BCP中连续转接10代, 每传代1次进行GABA产量的测定。观察诱变菌落的稳定性。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离筛选及鉴定

2.1.1 薄层层析结果

经分离得到14株菌株, 在37℃培养48h后取上清液点样, 进行薄层层析测定, 与GABA标准品比较Rf值。如图1所示, 分离出的14株菌株均有产GABA的能力, 将14株菌株进行GABA定量测定。



1. GABA标准品; 2~15. 菌株发酵液。

图1 分离菌株发酵上清液薄层层析结果

Fig.1 Thin layer chromatography of fermentation supernatants of 14 LAB isolates

2.1.2 细胞反应液中GABA的测定

以GABA标准溶液质量浓度为横坐标, OD_{640nm}值为纵坐标, 绘制标准曲线, 统计分析得回归方程 $y=1.0757x-0.0053$, 相关系数 $R^2=0.9943$ 。证明GABA质量浓度在0~0.6g/L的范围内与吸光度相关性较好。复筛结果如表1所示, 得到样3为最终实验菌株, GABA产量0.917g/L, 编号为Lp-Lw-131。

表1 各菌株γ-氨基丁酸产量

Table 1 Yield of γ-aminobutyric acid from the first 7 strains

菌株编号	GABA产量/(g/L)	菌株编号	GABA产量/(g/L)
1	0.431	8	0.106
2	0.108	9	0.067
3	0.917	10	0.095
4	0.125	11	0.537
5	0.451	12	0.289
6	0.876	13	0.336
7	0.074	14	0.187

2.2 菌种的形态学及生理生化鉴定

2.2.1 形态学鉴定

菌株 Lp-Lw-131经革兰氏染色确定为革兰氏阳性菌, 短杆状, 单个或成对排列(图2)。



图2 菌株形态特征

Fig.2 Microscopic observation of strain Lp-Lw-131

2.2.2 生理生化鉴定

该菌株 Lp-Lw-131的生理生化实验结果见表2, 接触酶实验未产生气泡, 呈阴性; 吲哚实验中蛋白胨水培养基未出现红色环状物, 呈阴性; 石蕊牛奶凝固, 乳清析出, 呈阳性; 硫化氢实验乙酸铅试纸条未变黑, 呈阴性。将培养好的发酵液分别接入糖发酵管中, 37℃培养48h, 观察实验现象(表3)。菌株 Lp-Lw-131对于阿拉伯糖、松三糖、木糖、鼠李糖呈阴性, 其他呈阳性。

根据上述生理生化实验结果, 对照伯杰细菌学鉴定手册(9版), 初步确定该菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。

表2 菌株生理生化实验

Table 2 Physiological and biochemical properties of strain Lp-Lw-131

项目	接触酶	吲哚	石蕊牛奶	硫化氢
结果	-	-	+	-

注: +. 阳性; -. 阴性。下同。

表3 糖发酵实验

Table 3 Sugar fermentation performance of strain Lp-Lw-131

糖	阿拉伯糖	纤维二糖	果糖	半乳糖	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	甘露糖	松三糖	蜜二糖	棉子糖	蔗糖	木糖	鼠李糖
结果	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

2.3 菌株的诱变

2.3.1 紫外线诱变剂量的确定

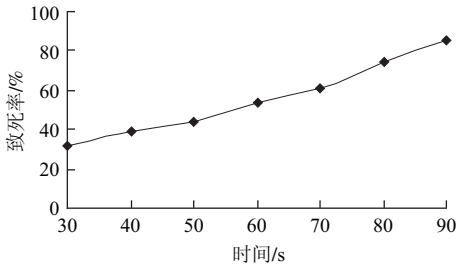


图3 紫外诱变致死率曲线

Fig.3 Lethality curve of strain Lp-Lw-131 under UV mutagenesis

紫外线照射时间与植物乳杆菌的致死率关系如图3所示。平板上生长出的菌落, 与Lp-Lw-131相比较, 产量提

高的为正突变株,把致死率在80%~90%的范围作为最佳诱变剂量^[25]。由图3可知,在紫外线处理90s时致死率为85.6%,选取90s为最佳诱变时间。

2.3.2 硫酸二乙酯诱变剂量的确定

随着DES处理时间的增加,致死率上升,当处理时间为20min时致死率为85.19%(图4),但致死率还与DES体积分数密切相关。因此,在处理时间20min的基础上进一步确定DES的体积分数,不同体积分数的DES处理20min菌株的致死率见图5。DES体积分数25%时,致死率为87.45%。本实验采用DES体积分数为25%乙醇溶液,处理时间20min。

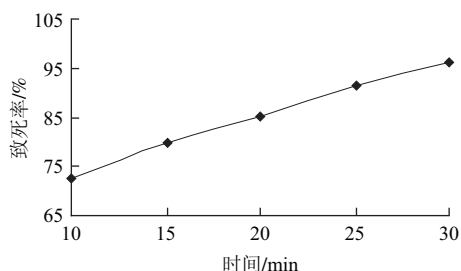


图4 DES处理时间对菌株致死率的影响

Fig.4 Effect of DES treatment time on the lethality of strain Lp-Lw-131

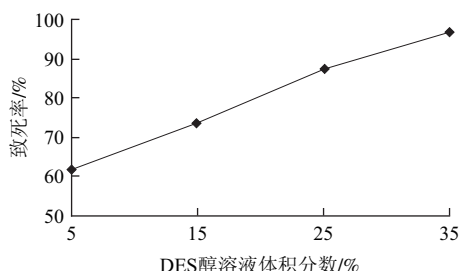


图5 DES体积分数对菌株致死率的影响

Fig.5 Effect of DES concentration on the lethality of strain Lp-Lw-131

2.3.3 诱变结果

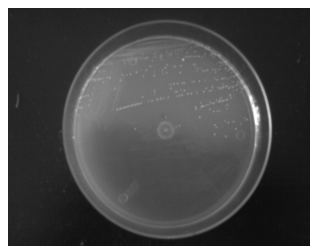


图6 突变后的菌落形态

Fig.6 Colonies of the mutant strain

以植物乳杆菌Lp-Lw-131为出发菌株进行诱变,在距离20W紫外灯30cm处诱变90s进行5轮物理诱变,再以体积分数25%的DES诱变20min进行4轮化学诱变。诱变菌的菌落形态呈圆形,乳白色,直径在1mm左右,边缘整

齐,表面微微隆起(图6),菌落形态同未诱变的无差别,但可在24h之内产酸使BCP培养基由紫色变为黄色,在TYG培养基中生长更加旺盛,凝聚性更强;GABA产量测定同1.4.2.2节的方法进行。最终确定得到一株高产突变株标记为Lp-Lw-131-34, GABA产量由原来的0.917g/L提高到了1.815g/L。

2.4 Lp-Lw-131-34的遗传稳定性

将出发菌株Lp-Lw-131以及突变株Lp-Lw-131-34进行传代遗传稳定性比较,共转接10代,测定结果如表4所示。突变株Lp-Lw-131-34的GABA产量稳定,未出现回复突变情况。

表4 突变株Lp-Lw-131-34传代实验

传代数	GABA产量/(g/L)	传代数	GABA产量/(g/L)
1	1.794	6	1.812
2	1.803	7	1.799
3	1.796	8	1.817
4	1.815	9	1.809
5	1.821	10	1.818

3 结论

本实验从酸菜汁中筛选出14株菌株,经初筛和复筛得到1株高产GABA的植物乳杆菌编号为Lp-Lw-131,产量为0.917g/L,并以Lp-Lw-131为出发菌株进行紫外和硫酸二乙酯诱变,发现紫外诱变的最佳条件为20W紫外线下,距离30cm处诱变90s;DES诱变的最佳条件为体积分数25%DES乙醇溶液诱变20min,经多轮诱变和筛选,得到一株高产菌株,编号为Lp-Lw-131-34, GABA产量提高到1.815g/L,连续传代10次, GABA产量稳定。

参考文献:

- [1] 王芳,郑德勇,杨江帆. γ -氨基丁酸的研究进展[J]. 武夷学报, 2009, 28(9): 39-43.
- [2] 白松,林向阳,阮榕生,等. γ -氨基丁酸的分布与制备[J]. 现代食品科技, 2005, 21(2): 202-205.
- [3] WANG J J, LEE C L, PAN T M. Improvement of monacolin K, γ -aminobutyric acid and citrinin production ratio as a function of environmental conditions of *Monascus purpureus* NTU 601[M]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2003, 30(1): 669-676.
- [4] 王金玲,袁军,刘登才. γ -氨基丁酸的合成[J]. 化学与生物合成, 2010, 27(3): 40-41.
- [5] 杨东元,陈开勋,王亚红. γ -氨基丁酸的合成研究[J]. 中国饲料, 2010, 1: 27-28.
- [6] 林亲录,王婧,陈海军. γ -氨基丁酸的研究进展[J]. 现代食品科技, 2008, 24(5): 496-498.
- [7] 林谦. γ -氨基丁酸的生理功能概述[J]. 玉林师范学院学报, 2010, 31(2): 62-64.

- [8] 嵯江典子, 菅美奈子, 金武祚. γ -氨基丁酸的生理功能[J]. 中国食品添加剂, 2010, 6(5): 169-171.
- [9] 操家璇, 李玉萍, 熊向源, 等. γ -氨基丁酸在开发功能性食品中的应用[J]. 河北农业科学, 2008, 12(11): 52-54.
- [10] 何熙璞, 张敏, 李俊芳, 等. γ -氨基丁酸的生理学功能及研究现状[J]. 广西大学学报, 2007, 32(9): 464-466.
- [11] 宋伟, 马霞, 张柏林. γ -氨基丁酸的生理功效及其在乳制品中的强化途径[J]. 乳业科学与技术, 2008(6): 297-299.
- [12] SATYA NARAYAN V, NAIR P M. Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyric acid[J]. Biochemistry, 1989, 8: 21-25.
- [13] PARK K B, OH S H. Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract[J]. Bioresource Technology, 2007, 98: 1675-1679.
- [14] PARK K B, OH S H. Production and characterization of GAB rice yogurt[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2005, 14: 518.
- [15] PARK K B, OH S H. Cloning and expression of a full-length glutamate decarboxylase gene from *Lactobacillus plantarum*[J]. Journal of Food Science and Nutrition, 2004, 9: 324-329.
- [16] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞. 微生物谷氨酸脱羧酶研究进展[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 354-356.
- [17] 许建军, 江波, 许时婴. 谷氨酸脱羧酶的研究进展[J]. 食品工业科技, 2004, 25(7): 132-133.
- [18] 江英英. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及其发酵条件优化研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2007.
- [19] 陆小雪. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌分离与发酵条件优化及饮料开发[D]. 南京: 南京农业大学, 2008: 18-20.
- [20] 凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1993.
- [21] 邹鹏. 产细菌素乳酸菌的分离鉴定及培养条件研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2006.
- [22] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 谷氨酸脱羧酶活力测定中GABA比色定量方法研究[J]. 食品科学, 2006, 27(7): 205-206.
- [23] 杨汝德, 吴虹, 林晓珊. 现代微生物实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 205-212.
- [24] 马春丽, 张兰威. 高产酸性能乳酸菌的诱变选育[J]. 中国乳品工业, 2010, 38(7): 15-17.
- [25] 诸葛健, 沈微. 工业微生物育种学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 85-94.