

# 从酸菜液中筛选产 $\gamma$ -氨基丁酸的菌株

梁金钟, 田 宇, 王凤青

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

**摘 要:** 从腌制的酸菜液中, 采用乳酸菌分离纯化法, 经初筛、复筛得到一株产 $\gamma$ -氨基丁酸的菌株, 编号为 LpL-0212, 对菌株进行形态学观察和生理生化实验及 16S rDNA、*atpA* 基因序列分析鉴定, 鉴定该菌株为 *Enterococcus faecium*。在含 2% 谷氨酸钠的 TYG 发酵培养基中静置培养 24h, 经薄层层析定性、高效液相色谱法测定, 发酵液中的 $\gamma$ -氨基丁酸含量可达到 102.37  $\mu\text{mol/L}$ 。

**关键词:**  $\gamma$ -氨基丁酸; 乳酸菌分离; 鉴定; 发酵液

## Screening of a Gamma-Amino Butyric Acid-Producing Strain of Lactic Acid Bacteria from Pickled Vegetable

LIANG Jin-zhong, TIAN Yu, WANG Feng-qing

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

**Abstract:** A strain capable of producing  $\gamma$ -amino butyric acid (GABA), named as LpL-0212, was screened from pickled cabbage by a previously reported method for isolating and screening lactic acid bacteria. The strain was identified as *Enterococcus faecium* according to morphological observations, physiological and biochemical experiments, 16S rRNA sequence analysis, and *atpA* gene sequence analysis. Using quantitative thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography, the content of GABA was determined to be 102.37  $\mu\text{mol/L}$  in the fermentation broth obtained after 24 h culture of the strain in TYG medium containing 2% monosodium glutamate.

**Key words:**  $\gamma$ -amino butyric acid; lactic acid bacteria isolation; identification; fermentation broth

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0244-06

$\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -amino butyric acid, GABA)又名氨基酪酸, 是一种非蛋白质氨基酸, 微量的广泛存在于动植物中<sup>[1]</sup>。研究证明, GABA 是中枢神经系统的抑制性神经递质<sup>[2]</sup>, 具有重要的生理功能, 例如降血压功能<sup>[3]</sup>、抗心律失常作用<sup>[4]</sup>、治疗癫痫<sup>[5]</sup>、增进脑活力<sup>[6]</sup>等。因其具有重要的生理功能, 已得到国内外食品行业研究者们广泛的关注。

近年来, 日本在富含 GABA 食品开发方面发展较快, 广泛应用在饮料、饼干、调味料等制品中<sup>[7]</sup>。在美国 $\gamma$ -氨基丁酸作为药物并被 FDA 批准为公认安全食品<sup>[8]</sup>。然而我国已经发展成熟的含 GABA 的制品还很少, 主要还是以富含 GABA 的植物为原料, 采用富集的方法制成配料添加到食品中<sup>[1]</sup>。

利用乳酸菌发酵法生产安全的食品级 GABA, 具有

相对成本低, 安全性高的优点。本实验拟从酸菜液中筛选高产 $\gamma$ -氨基丁酸的乳酸菌株, 为工业化生产 $\gamma$ -氨基丁酸提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂与仪器

酸菜液, 取自农贸市场出售的酸菜样品。

$\gamma$ -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; 苯并戊三酮(分析纯) 上海灵锦精细化工有限公司; 硅胶板 青岛海洋化工厂分厂。

Ultimate3000 高效液相色谱仪(C<sub>18</sub> 色谱柱: 150mm × 4.6mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 戴安中国有限公司; 3200 Q TRAP 质谱仪 美国 Allen-Bradley 公司。

收稿日期: 2011-06-27

基金项目: 黑龙江省高校科技创新团队建设计划基金项目(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

## 1.2 培养基

BCP 乳酸菌分离培养基(g/100mL): 乳糖 0.5、酵母浸粉 0.5、琼脂 1.5~2.0, 溴甲酚紫(5g/100mL)1.0mL, 自来水 100mL, pH6.8~7.0; MRS 种子培养基<sup>[9]</sup>(g/100mL): 蛋白胨 1.0、酵母浸粉 0.5、牛肉膏 1.0、无水乙酸钠 0.5、柠檬酸二铵 0.2、葡萄糖 2.0、硫酸镁 0.058、硫酸锰 0.025、磷酸氢二钾 0.2, 吐温-80 1mL, 水 100mL, pH6.2~6.4; TYG 发酵培养基<sup>[9]</sup>(g/100mL): 胰蛋白胨 0.5、葡萄糖 1.0、酵母膏 0.5、丁二酸钠 0.5、谷氨酸钠 2.0, pH6.5。

## 1.3 方法

### 1.3.1 产 GABA 乳酸菌株的筛选

将保存在冰箱中的菌株转接在液体 MRS 培养基上, 35℃活化培养 24h, 以 1% 的接种量接种于 TYG 发酵培养基上, 35℃发酵培养 48h。发酵液离心, 取上清液进行薄层层析分析。

### 1.3.2 GABA 薄层层析定性测定

用薄层层析进行定性分析, 展开剂组成为: 正丁醇、冰乙酸、水(体积比 4:3:1)<sup>[10]</sup>。将 1.3.1 节分离得到的菌株接种到 TYG 培养基, 37℃培养后取发酵液进行点样。发酵液点样之前的预处理为 4℃、10000r/min 离心 15min, 取上清液点样。标准品 GABA 配成 0.8g/L, 作为参比。展开晾干后, 喷洒 0.4% 的茚三酮, 80℃显色 15min<sup>[11]</sup>。

### 1.3.3 GABA 的定量测定

准确定量分析委托北京爱米诺医学有限公司利用液相色谱串联质谱(LC-MS-MS)分析仪完成。具体方法步骤如下:

样本衍生化处理: 移取 40μL 样品置于一试管内, 加入 10μL 碘基水杨酸, 漩涡混匀 30s, 10000 × g 离心 2min 沉淀蛋白。移取 10μL 上层液体置于另一试管。加入 40μL 标记缓冲液, 漩涡混匀, 旋转离心。移取 10μL 上层液体置于另一试管。每个样品管中加入 5μL 稀释的 iTRAQ 试剂, 漩涡混匀, 旋转离心。于室温条件下孵化至少 30min。管中加入 5μL 羟胺, 漩涡混匀, 旋转离心。每支管中加入 32μL 内标, 漩涡混匀, 旋转离心。使用液相色谱-质谱联用仪检测样本。

液相色谱条件: 柱温 50℃, 进样量 2μL, 流动相 A: 水+0.1% 甲酸, 流动相 B: 乙腈+0.1% 甲酸。质谱参数: 气帘气 20.00psi、碰撞室射出电压 5.00V、喷雾电压 5500.00V、雾化气 55.00psi、温度 580.00℃、加热气 60.00psi。梯度洗脱时间依次为 0、10.0、10.1、16.0、16.1、25.0min, 相应流动相 A 与 B 的体积比依次为: 98:2、72:28、0:100、0:100、98:2、98:2, 流速为 800mL/min。

## 1.3.4 乳酸菌的分离纯化

将采集到的酸菜液梯度稀释, 采用涂布分离法涂布在 BCP 培养基上, 37℃培养 48h, 在分离培养基上挑取黄色的菌落, 然后用划线分离法获得均一的单个菌落<sup>[12]</sup>。从分离出的 20 株菌落中挑取单个菌落进行结晶紫染色和触酶实验, 初步鉴定为乳酸菌。将上述分离得到的菌种在 MRS 种子培养基上连续传代培养 4~5 代, 待性状稳定后在 4℃冰箱中保存备用。

## 1.3.5 乳酸菌的形态和生理生化鉴定

形态学鉴定: 观察 1.3.1 节得到的菌株接种在 BCP 培养基平板上的单个菌落的形态。用显微镜在油镜下观察经结晶紫染色的细胞, 同时对菌落的形态和细胞形态观察记录。生理生化鉴定实验: 根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[13]</sup>的革兰氏阳性球菌鉴定实验, 依次进行科、属、种的生理生化实验。

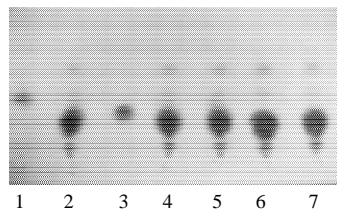
## 1.3.6 乳酸菌分子生物学鉴定

委托中国科学院微生物研究所进行 16S rRNA、*atpA* 基因测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 产 GABA 菌株的初选

通过 BCP 乳酸菌分离培养基筛选得到 1 株乳酸菌, 编号为 LpL-0212。在 MRS 种子培养基上培养 24h 后, 转接到 TYG 发酵培养基上培养 48h, 发酵液按照 1.3.2 节预处理的方法处理后, 进行薄层层析。采用传统的茚三酮显色法, 层析显色效果较好。与标准品 GABA 的样点比较 R<sub>f</sub> 值, 发现发酵液中可能含有 GABA。由于发酵液中 GABA 含量较低, 显色时与 GABA 标准品的样点相同 R<sub>f</sub> 值的样点颜色较轻。重复实验, 重现性好, 结果如图 1 所示。



样点 1. 标准品 GABA; 2、4、5、6、7. 发酵液; 3. 谷氨酸。

图 1 薄层层析实验结果

Fig.1 Thin layer chromatographic patterns of GABA standard, fermentation broth and monosodium glutamate

### 2.2 菌株的鉴定

#### 2.2.1 菌落形态特征

从乳酸菌分离培养基上观察菌落形态呈乳白色、圆

形、规则、中央凸起，直径约1.2~1.5mm，表面光滑，质地均匀，而且在挑取菌体时有一定的黏性，结果见图2。

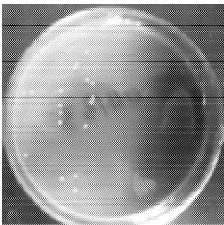


图2 乳酸菌的菌落形态特征  
Fig.2 Colonies of strain LpL-0212

2.2.2 细胞形态特征

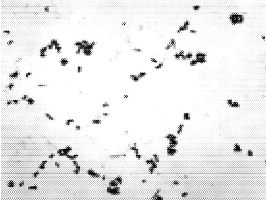


图3 细胞的形态特征  
Fig.3 Microscopic observation of strain LpL-0212

通过革兰氏染色和显微镜油镜观察(图3)，得出菌株LpL-0212为革兰氏阳性、球状菌，形成不规则的堆团或是成串相连或是单个圆球状。

2.2.3 生理生化实验结果

表2 菌株的生理生化特性  
Table 2 Biochemical properties of strain LpL-0212

测定项目	糖发酵实验	吡啉实验	石蕊牛乳实验	产氨实验	过氧化氢酶实验
结果	+	-	+	-	-

注：+，阳性反应；-，阴性反应。表3同。

通过对菌株LpL-0212菌落形态和细胞个体形态观察，根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[13]</sup>又进行了氧气对菌株的生长影响、运动性实验、糖发酵实验、过氧化氢酶

实验、石蕊牛乳实验、产氨实验、吡啉实验及其他糖发酵实验。结果表明：菌株LpL-0212为兼性厌氧菌，不运动，葡萄糖发酵产酸不产气，触酶实验没有气泡产生，石蕊牛乳实验牛乳酪化，吡啉实验为阴性，产氨实验为阳性等，结果见表2、3，根据《伯杰细菌鉴定手册》<sup>[13]</sup>中的第十四部分可以初步将菌株LpL-0212鉴定为链球菌属。

2.2.4 分子生物学鉴定结果

菌株LpL-0212与dbj|AB362603.1|*Enterococcus faecium* gene for 16S rRNA，对比结果如下：

Query 4  
CATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACC  
GGAAAAAGAAGAGTGG 63 |||  
Sbjct 48  
CATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTCCACCGGAGCTTGCTCCACC  
GGAAAAAGAAGAGTGG 107  
Query 64  
CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAGGGGAT  
AACACTTGGAACA 123 |||  
Sbjct 108  
CGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCATCAGAAG  
GGGATAACACTTGGAACA 167  
Query 124  
GGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTT  
GATTTGAAAGGCGCTTTTCGGG 183 |||  
Sbjct 168  
GGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATT  
TGAAAGGCGCTTTTCGGG 227  
Query 184  
TGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTG  
AGGTAAACGGCTCACCAAG 243 |||  
Sbjct 228  
TGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAG  
GTAACGGCTCACCAAG 287  
Query 244  
GCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATT  
GGGACTGAGACACGGCCC 303 |||  
Sbjct 288  
GCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACA  
TTGGGACTGAGACACGGCCC 347

表3 各种糖发酵实验结果  
Table 3 Carbohydrate fermentation properties of strain LpL-0212

发酵糖类	苦杏仁苷	阿拉伯糖	纤维二糖	七叶灵	果糖	半乳糖	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	海藻糖	松三糖	蜜二糖	棉子糖	鼠李糖	核糖	水杨苷	蔗糖	木糖	甘露糖	菊糖
结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-

Query 304

AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG  
GACGAAAGTCTGACCGAGC 363 |||

Sbjct 348

AAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATG  
ACGAAAGTCTGACCGAGC 407

Query 364

AACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTCT  
GTTGTTAGAGAAGAACAA 423 |||

Sbjct 408

AACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACTC  
TGTTGTTAGAGAAGAACAA 467

Query 424

GGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAG  
AAAGCCACGGCTAACTACG 483 |||

Sbjct 468

GGATGAGAGTAACTGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAG  
AGCCACGGCTAACTACG 527

Query 484

TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAG 543 |||

Sbjct 528

TGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GATTTATTGGGCGTAAAG 587

Query 544

CGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG  
CTCAACCGGGGAGGGTCA 603 |||

Sbjct 588

CGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCG  
CTCAACCGGGGAGGGTCA 647

Query 604

TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  
TTCCATGTGTAGCGGTGAA 663 |||

Sbjct 648

TTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAA  
TCCATGTGTAGCGGTGAA 707

Query 664

ATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGC  
TCTCTGGTCTGTAAGTACG 723 |||

Sbjct 708

ATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTC  
TCTGGTCTGTAAGTACG 767

Query 724

CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACC  
TGGTAGTCCACGCCGTAA 783 |||

Sbjct 768

CTGAGGCTCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCTG  
GTAGTCCACGCCGTAA 827

Query 784

ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAG  
TGCTGCAGCTAACGCATTAAG 843 |||

Sbjct 828

ACGATGAGTGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTCTG  
CAGCTAACGCATTAAG 887

Query 844

CACCTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTGAAACTCAAAGG  
AATTGACGGGGGCCCGC 903 |||

Sbjct 888

CACCTCCGCTGGGAGTACGACCGCAAGGTGAAACTCAAAGG  
AATTGACGGGGGCCCGC 947

Query 904

ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAG  
AACCTTACCAGGTCTTGA 963 |||

Sbjct 948

ACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAA  
GAACCTTACCAGGTCTTGA 1007

Query 964

CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCCTCGGGGGC  
AAAGTGACAGGTGGTGC 1023 |||

Sbjct 1008

CATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCCTCGGGGG  
CAAAGTGACAGGTGGTGC 1067

Query 1024

ATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTTAAGTCCG  
CAACGAGCGCAACCC 1083 |||

Sbjct 1068

ATGGTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTGGGTTAAGTCCG  
CAACGAGCGCAACCC 1127

Query 1084

TTATGTGTAGTGGCATCATTCAGTGGGCACTCTAGCAAGACTG  
CCGGTGACAAACCGG 1143 |||

Sbjct 1128

TTATGTGTAGTGGCATCATTCAGTGGGCACTCTAGCAAGACT  
GCCGGTGACAAACCGG 1187

Query 1144

AGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCT  
GGGCTACACACGTGCT 1203 |||

Sbjct 1188

AGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTG  
GGCTACACACGTGCT 1247

## Query 1204

ACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAG  
CTAATCTCTTAAAGCTTCT 1263 |||

## Sbjct 1248

ACAATGGGAAGTACAACGAGTTGCGAAGTCGCGAGGCTAAGCTA  
ATCTCTTAAAGCTTCT 1307

## Query 1264

CTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGG  
AATCGCTAGTAATCGCG 1323 |||

## Sbjct 1308

CTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCCGG  
GAATCGCTAGTAATCGCG 1367

## Query 1324

GATCAGCACGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC  
CGCCCGTCACACCACG 1383 |||

## Sbjct 1368

GATCAGCACGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACAC  
CGCCCGTCACACCACG 1427

## Query 1384

AGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGC  
CAGCCGCCTAAGGTGG 1443 |||

## Sbjct 1428

AGAGTTTGTAAACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTTGGAGC  
CAGCCGCCTAAGGTGG 1487

## Query 1444

GATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCG  
GAAGGTGCGGCTGGC-CA 1502 |||

## Sbjct 1488

GATAGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGG  
AAGGTGCGGTTGGATCA 1547

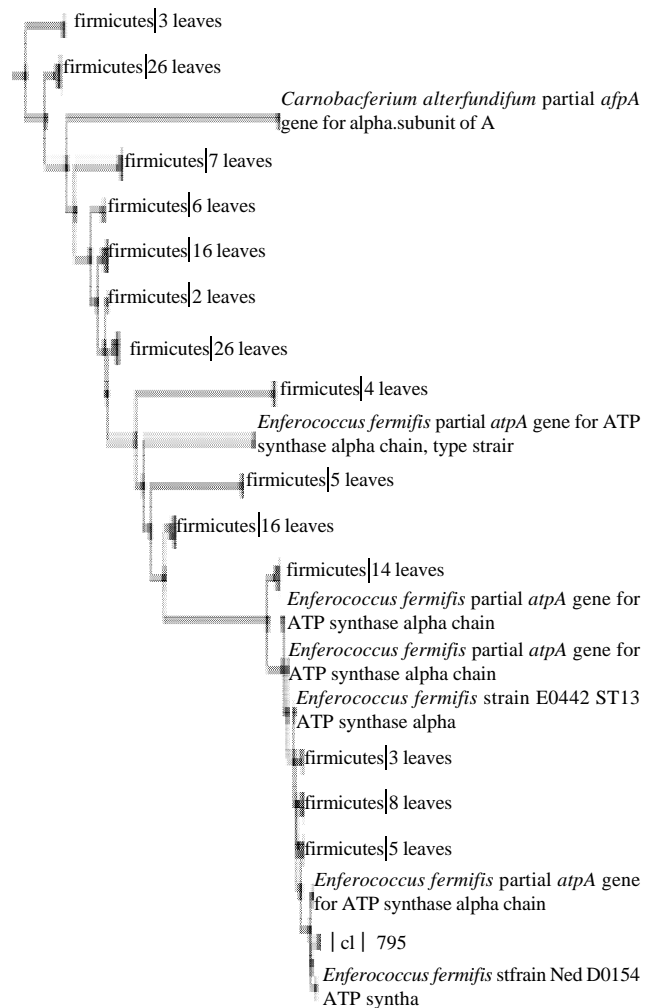
## Query 1503 CC-CTT 1508

|||

## Sbjct 1548 CCTCCTT 1554

通过对比得出  $E$  值(expect)=0.0, 相似性(identities)=  
1503/1507(99%), 缺失(gaps)=2/1507(0%)。

由于屎肠球菌种群中的6个种类(*E.faecium*、*E.hirae*、*E.durans*、*E.villorum*、*E.mundtii*、*E.ratti*)之间的16S rRNA基因的相似程度可达99%以上, 而 $atpA$ 基因相似程度最高仅有89.9%<sup>[14]</sup>, 为更准确鉴定, 做出LpL-0212菌株的 $atpA$ 基因系统发育树。从图4可以看出, 在系统发育关系上, LpL-0212的亲缘关系更接近于*Enterococcus faecium*, 结合前面研究的细菌形态特征、生理生化性质, 综合鉴定LpL-0212菌株为链球菌科肠菌属屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)。



图中 lcl/795 即为菌株 LpL-0212。

图4 LpL-0212(lcl/795)  $atpA$  基因序列同源性分析的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on the  $atpA$  gene sequence of strain LpL-0212 (lcl/795)

### 2.3 发酵液中 GABA 的定量分析

利用液相色谱串联质谱仪, 采用同位素内标法对发酵液中 GABA 进行定量测定, 同时对比标准品的峰值对发酵液中的 GABA 进行定性分析。结果如图5所示, 测得发酵液中 GABA 浓度为  $102.37 \mu\text{mol/L}$ 。

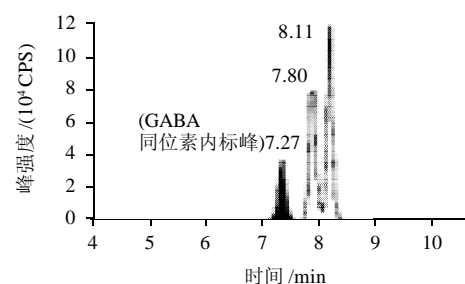


图5 发酵液中 GABA 的液相色谱串联质谱图

Fig.5 LC/MS-MS analysis of GABA produced by strain LpL-0212

### 3 结 论

本实验从酸菜液中成功筛选到了一株产 GABA 的乳酸菌, 经生理生化和 16S rRNA 分子生物学鉴定为 *Enterococcus faecium*, 菌株编号为 LpL-0212。由于野生菌株代谢生产目的产物的量较低, 在进行薄层层析定性分析时, 不能十分准确地判断发酵液中是否含有 GABA。液相色谱串联质谱法作为直接精确定量 GABA 的方法, 精确度高, 重现性好, 可以对 GABA 精确定性、定量。初步发酵实验表明该菌株产 GABA 的能力可达  $102.37 \mu\text{mol/L}$ 。在今后的研究工作中, 可以通过物理化学诱变及基因工程技术继续提高 GABA 产量。

### 参考文献:

- [1] 陈恩成, 张名位, 池建伟, 等.  $\gamma$ -氨基丁酸的功能特性及其在食品原料中的富集技术研究进展[J]. 湖北农学院学报, 2004, 24(4): 316-320.
- [2] 叶惟冷.  $\gamma$ -氨基丁酸的发现史[J]. 生理科学进展, 1986, 17(2): 187-189.
- [3] ANTONACCIO M J, TALOY D G. Involvement of central GABA reception. The regulation of blood pressure and heart of anestizes cats[J]. Eur Pharmacol, 1977, 46: 283-285.
- [4] 岡田忠司.GABA 富化 コメ 胚芽の生理機能[J]. 食品工業, 2001, 36(6): 7-8.
- [5] 张晖, 姚惠源.  $\gamma$ -氨基丁酸的功能性及其在稻米制品中的富集利用[J]. 粮食与饲料工业, 2002(8): 41-42.
- [6] 茅原. 近年の GABA 生理機能研究—脳機改善作用、高血圧作用を中心に[J]. 食品と開発, 2001, 36(6): 4-6.
- [7] MAO Y, SHAN P. Research on physiological function of  $\gamma$ -amino butyric acid in recent years, the center of brain improvement and hypertension function[J]. Food and Exploiture(Japan), 2001, 36(6): 4-6.
- [8] 尤新. 功能性配料  $\gamma$ -氨基丁酸生产应用及发展动向[J]. 中国食品添加剂, 2008(4): 45-47.
- [9] 刘清, 姚惠源, 张晖. 生产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌的选育及发酵条件优化[J]. 氨基酸与生物资源, 2004, 26(1): 40-43.
- [10] YOKOYAMA S, HIRAMATSU J, HAYAKAWA K. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005[J]. J Biosci Bioeng, 2002, 93(1): 95-97.
- [11] 朱婉华. 氨基酸纸层析中茚三酮显色改良法[J]. 氨基酸和生物资源, 1984(2): 16-17.
- [12] 刘素纯, 胡茂丰. 自然发酵肉制品中乳酸菌的分离及特性研究[J]. 食品与机械, 2006, 22(2): 62-65.
- [13] 布坎南 R E, 吉布斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》, 翻译组, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 660-766.
- [14] NASER S, THOMPSON F L, HOSTE B, et al. Phylogeny and identification of enterococci by *atpA* gene sequence analysis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(5): 2224-2230.