

# 产 $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌的分离鉴定及发酵条件优化

## Isolation and identification of lactic acid bacteria producing $\gamma$ -aminobutyric acid and optimization of fermentation conditions

王兴洁<sup>1</sup> 魏超<sup>1</sup> 廖光敏<sup>1</sup> 雷承延<sup>1</sup>

WANG Xing-jie<sup>1</sup> WEI Chao<sup>1</sup> LIAO Guang-min<sup>1</sup> LEI Cheng-yan<sup>1</sup>

李霜<sup>1</sup> 胡露<sup>1</sup> 刘书亮<sup>1,2</sup>

LI Shuang<sup>1</sup> HU Lu<sup>1</sup> LIU Shu-liang<sup>1,2</sup>

(1. 四川农业大学食品学院, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学食品加工与安全研究所, 四川 雅安 625014)

(1. College of Food Sichuan Agriculture University, Ya'an, Sichuan 625014, China;

2. Sichuan Agriculture University Research Centre of Food Processing and Safety, Ya'an, Sichuan 625014, China)

**摘要:**从四川泡菜水中分离筛选出一株产  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)能力较强的乳酸菌 W1-9, 根据菌落和个体形态、生理生化指标及 16S rDNA 序列的系统鉴定, 菌株 W1-9 为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。菌株 W1-9 在含 10 g/L 谷氨酸(Glu)的 MRS 培养基中培养 3 d, 可产生 2.18 g/L GABA。通过对菌株发酵培养基及发酵条件优化, 结果表明:以黄瓜汁为发酵培养基, 初始 pH 5.5, 底物谷氨酸钠(MSG)添加量 12 g/L, 菌液接种量 1.2%, 在该条件下 GABA 产量达到 7.62 g/L。

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

**Abstract:** A high  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) production strain lactobacillus (w1-9), which being isolated from Sichuan pickle has been identified as *Lactobacillus plantarum* in terms of morphology, physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence analysis. This strain can produce 2.18 g/L GABA within 3 days in the MRS medium that contain 10 g/L glutamate (Glu). The result of the optimization showed that using cucumber juice as medium, with initial pH 5.5, the monosodium glutamate (MSG) inputs is 12 g/L, and the lactobacillus input is 1.2%. Under the condition, the GABA production can reach to 7.62 g/L.

**Keywords:**  $\gamma$ -aminobutyric acid; lactic acid bacteria; identification; fermentation; optimization

$\gamma$ -氨基丁酸(GABA), 是一种非蛋白质组成的天然氨基酸。作为哺乳动物中枢神经系统的一种主要抑制性神经递质, 约 50% 的突触部位依赖 GABA<sup>[1]</sup>。同时研究表明, GABA 具有降低血压<sup>[2]</sup>、治疗癫痫<sup>[3]</sup>、改善脑功能、增强长期记忆<sup>[4]</sup>及提高肝肾机能<sup>[5]</sup>等生理功能, 已广泛应用于医药和保健食品行业。

GABA 的生产方法主要有生物合成法和化学法<sup>[6]</sup>, 其中微生物发酵法是指菌体利用其自身产生的谷氨酸脱羧酶(GAD)将谷氨酸(Glu)转化为 GABA, 不受资源、环境和空间的限制, 有较大发展潜力<sup>[7]</sup>。目前报道的产 GABA 微生物有大肠杆菌、曲霉和乳酸菌, 其中乳酸菌作为益生菌广泛用于生产发酵食品, 因此高产 GABA 乳酸菌的筛选及其应用于富含 GABA 功能性食品的开发是目前的研究热点。目前产 GABA 的乳酸菌菌株有希氏乳杆菌<sup>[8]</sup>、副干酪乳杆菌<sup>[9]</sup>、乳酸乳球菌<sup>[10]</sup>、植物乳杆菌<sup>[11-12]</sup>等, 筛菌来源多为酸奶、土壤等, 掘江典子等<sup>[8]</sup>从泡菜中筛选出一株希氏乳杆菌, 经分批添加 Glu 其 GABA 积累量达到 35 g/L 左右。四川泡菜因地域气候条件、蔬菜种类、工艺配方等差异决定了其中微生物的多样性。本试验拟从四川泡菜中筛选出高产 GABA 乳酸菌并进行鉴定; 同时将蔬菜汁作为发酵培养基, 优化发酵条件提高 GABA 产量。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 材料

家庭自制泡菜水: 采自四川宜宾、雅安、成都三地区, 共 15 份样品。

**基金项目:**四川省农业科技成果转化资金项目(编号:14NZ0012); 四川农业大学大学生创新性科研项目(编号:201410626043)

**作者简介:**王兴洁, 女, 四川农业大学在读本科生。

**通讯作者:**刘书亮(1968-), 男, 四川农业大学教授, 博士。

E-mail: lsliang999@163.com

**收稿日期:**2016-03-04

### 1.1.2 培养基

MRS培养基:蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, 葡萄糖 20.0 g,  $K_2HPO_4$  2.0 g,  $MgSO_4$  0.58 g, 柠檬酸氢二铵 2.0 g, 牛肉膏 10.0 g, 硫酸锰 0.25 g, 吐温 80 2.0 g, 乙酸钠 5.0 g, 水 1 000 mL, pH 6.2±0.2, 121 °C 灭菌 15 min。固体培养基添加  $CaCO_3$  1 g/100 g, 琼脂 2 g/100 g, 121 °C 灭菌 15 min。

### 1.1.3 主要试剂

GABA 标准品:99%, 上海源叶生物科技有限公司;

Bacterial DNAout 抽提试剂盒、2×Premix Taq™:大连宝生物工程有限公司;

甲醇:HPLC级, 瑞典 Oceanpak 公司;

其他试剂:均为分析纯, 市售。

### 1.1.4 主要仪器

液相色谱仪:LC-10A2010C HT型, 配 LC-solution 工作站, 日本 Shimadzu 公司;

冷冻离心机: Sorvall ST 16 型, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

超纯水仪: Milli-Q Gradient 型, 美国 Millipore 公司;

PCR 仪: C1000 型, 美国 Bio-Rad 公司;

水平电泳槽: Sub-Cell GT 型, 美国 Bio-Rad 公司;

基础型电源: PowerPac Basic 型, 美国 Bio-Rad 公司;

凝胶成像系统: Gel Doc XR+ 型, 美国 Bio-Rad 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 乳酸菌的分离 取泡菜水样品进行梯度稀释并倾注 MRS 平板, 37 °C 培养 48 h。挑选溶钙圈明显的菌落, 多次划线纯化, 对其进行接触酶试验与革兰氏染色, 将接触酶阴性且革兰氏阳性的菌株接种于斜面培养后于 4 °C 冰箱中保存。

1.2.2 高产 GABA 乳酸菌的筛选 于斜面上挑取 2 环菌体于 5 mL 液体 MRS 培养基中, 37 °C 培养 24 h 进行活化<sup>[13]</sup>。再按 2 mL/100 mL 接种于 100 mL MRS 培养基 (Glu 浓度为 10 g/L), 30 °C 发酵 3 d; 以添加等量无菌生理盐水为空白对照。取 2.0 mL 发酵液煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用甲醇定容至 2.0 mL, 经纸层析定性与高效液相色谱 (HPLC) 定量测定后选择高产 GABA 的菌株。

1.2.3 GABA 定性分析 展开剂组成: 冰醋酸: 水: 正丁醇体积比为 1:2:2, 并添加 0.4 g/100 mL 茚三酮。层析纸经点样后在展开剂中层析 1 h, 层析完成后将层析纸置于 90 °C 显色 10 min。以 GABA 和 Glu 标准品以及无菌 MRS 培养基作对照, 根据标准品 Rf 值来进行定性判断<sup>[14]</sup>。

1.2.4 GABA 定量分析 配制浓度分别为 1.00, 2.00, 4.00, 6.00, 8.00 g/L 的 GABA 标准品溶液, 按文献<sup>[15]</sup>的条件进行衍生和测定, 绘制标准曲线, 并测定样品 GABA 含量。

### 1.2.5 产 GABA 乳酸菌的鉴定

(1) 形态学指标: 供试菌株于 MRS 平板上划线, 37 °C 培养 48 h, 观察、记录其菌落形态特征; 同时采用革兰氏染色和镜检并成像。

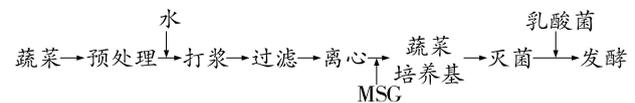
(2) 生理生化指标: 按照文献<sup>[16]<sup>10-11</sup></sup>和<sup>[17]<sup>292</sup></sup>进行测定。

(3) 16S rDNA 扩增和系统发育树的构建: ① 16S rDNA 基因的 PCR 扩增: 挑取斜面菌苔划线 MRS 平板, 37 °C 培养 24 h; 挑取单菌落接种于 10 mL MRS 液体培养基, 37 °C 静置培养 24 h, 12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体。提取 DNA 后根据文献<sup>[18]</sup>对菌株进行 16S rDNA 基因的 PCR 扩增。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 观察并成像; ② 扩增产物测序及分析: 菌株 16S rDNA 基因的 PCR 扩增产物送测序公司, 测得的序列在 NCBI 数据库中进行序列比对, 选择相似性高的序列以及有类似功能菌株的相关序列, 通过 Mega 5.1 软件构建系统进化树。

### 1.2.6 发酵条件优化

(1) 活化菌液: 挑取菌株 W1-9 划线于 MRS 平板, 37 °C 培养 24 h。挑取单菌落接种于 MRS 斜面 37 °C 培养 24 h。用无菌生理盐水洗下斜面菌体并调整细胞浓度为  $10^8$  CFU/mL, 作为种子液。

#### (2) 蔬菜汁培养基的制作与接种发酵:



其中蔬菜 (黄瓜、卷心菜、胡萝卜、白萝卜) 经清洗切块后, 按 1:1 (g:mL) 的料液比加水捣碎并调浆; 纱布过滤后, 4 000 r/min 离心 10 min 后取上清<sup>[19]</sup>。添加 10 g/L 的谷氨酸钠 (MSG), 调 pH 至 6.4, 灭菌后将种子液按 2% 接种量接种, 30 °C 发酵 3 d, 按 1.2.4 测定发酵液中 GABA 含量。

(3) 单因素试验: 参照 1.2.6(2) 选择最佳蔬菜汁发酵培养基, 并进行单因素试验。选择初始 pH, 底物 MSG 添加量, 接种量作为影响 GABA 产量的主要因素, 通过单因素试验选取正交试验的因素和水平。① 初始 pH 值对 GABA 产量的影响: 接种量 2%, 底物 MSG 添加量 10 g/L, 初始 pH 值分别设为 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 30 °C 发酵 3 d 结束后取样并按 1.2.4 测定发酵液中 GABA 含量。② 底物 MSG 添加量对 GABA 产量的影响: 接种量 2%, 底物 MSG 添加量分别设为 6, 10, 14, 18, 22 g/L, 初始 pH 值为 6.4, 30 °C 发酵 3 d 结束后取样并按 1.2.4 测定发酵液中 GABA 含量。③ 接种量对 GABA 产量的影响: 接种量分别设为 0.5%, 1%, 2%, 4%, 6%, 底物 MSG 添加量 10 g/L, 初始 pH 值为 6.4, 30 °C 发酵 3 d 结束后取样并按 1.2.4 测定发酵液中 GABA 含量。

(4) 正交试验。在单因素试验的基础上, 确定单因素最佳水平范围, 设计正交试验方案。

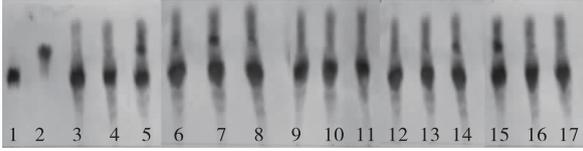
1.2.7 数据处理与分析方法 采用 SPSS 19.0 软件进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 高产 GABA 乳酸菌的筛选结果

2.1.1 纸层析定性分析结果 从 15 份四川泡菜水中分离纯化得到 14 株疑似乳酸菌, 经纸层析定性分析, 其结果见图 1。通过比较待测样品与 GABA 标准品的 Rf 值可看出其中有 4 株高产 GABA 较明显, 分别为菌株 W1-4, W1-9, B17, B23。

2.1.2 高效液相色谱法定量测定疑似乳酸菌发酵液中 GABA 根据 HPLC 测定结果, GABA 标准品 (1.6 g/L) 的保留时间为 14.351 min, 样品在相同时间有明显的色谱峰, 其附近无杂峰干扰, HPLC 谱图见图 2。



1. Glu 标品 2. GABA 标品 3. 未加菌的发酵液 4. W1-3 5. W1-4  
6. W1-7 7. W1-9 8. W2-1 9. C1-11 10. C1-12 11. C1-13 12. C1-14  
13. B14 14. B17 15. B23 16. B25 17. B31

图 1 乳酸菌发酵液中 GABA 的层析结果

Figure 1 Chromatography results of GABA in the broth of the lactic acid bacteria

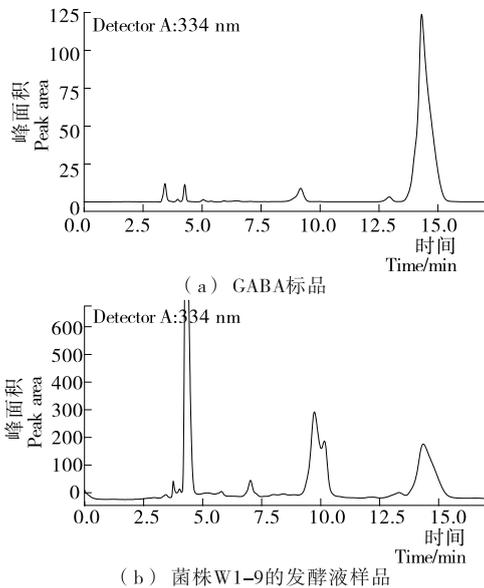


图 2 GABA 标品和乳酸菌发酵液色谱图

Figure 2 Chromatogram of GABA standard and lactic acid bacteria fermentation liquid

以 GABA 标准品的浓度 ( $x$ , g/L) 对峰面积 ( $y$ , mV · min) 单作图绘制标准曲线, 其线性方程  $y = 4\ 466\ 810x - 1\ 294\ 770$ ,  $R^2 = 0.998\ 34$ , 能用于 GABA 定量分析。4 株疑似乳酸菌发酵液中 GABA 分析结果见表 1。由表 1 可知, 菌株 W1-9 产量最高, 达 2.18 g/L, 具有一定的应用前景, 作为后续研究菌株。

## 2.2 高产 GABA 乳酸菌的鉴定

2.2.1 菌株 W1-9 形态学特征 菌株 W1-9 的菌落直径约

表 1 不同乳酸菌发酵液 GABA 产量

Table 1 The GABA productions of different lactic acid bacteria in fermentation liquid

菌株	W1-4	W1-9	B17	B23
GABA 产量/ (g · L <sup>-1</sup> )	1.78	2.18	1.54	1.54

1~2 mm, 形状呈圆形, 表面凸起且有光泽, 边缘整齐, 质地松软, 呈不透明的乳白色; 经革兰氏染色、镜检, 其细胞形态为革兰氏染色阳性, 呈短杆状, 两端钝圆, 成对状或成链状排列, 见图 3。



(a) 菌落 (b) 个体形态(10×100)

图 3 菌株 W1-9 的菌落和个体形态

Figure 3 Colony and cell morphology of strain W1-9

2.2.2 生理生化鉴定 由表 2 可知, 该菌株的生长温度为 10~45 °C; 具有较强的耐酸性、耐碱性与耐盐性; 麦芽糖、甘露醇等糖类发酵均呈阳性; 不能水解明胶和淀粉。根据 W1-9 菌株的形态学和生理生化鉴定结果, 参照文献 [16]<sup>10-11</sup> 和 [17]<sup>292</sup>, 可初步鉴定 W1-9 菌株为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。

2.2.3 16S rDNA 扩增和序列分析结果 菌株 W1-9 的 16S rDNA 基因 PCR 扩增产物经 1% 电泳检测, 结果见图 4。由图 4 可知, 在约 1.5 kb 处出现目的条带, 表明 PCR 扩增无误, 产物可用于测序分析。

将 PCR 产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司测序, 根据菌株 W1-9 的 16S rDNA 序列, 选取 Genbank 中和其相似性较高菌株的相应序列, 运用邻法构建系统发育树, 见图 5。

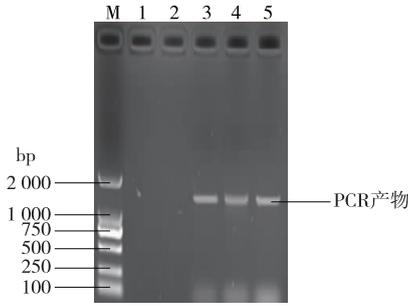
将菌株 W1-9 的 16S rDNA 基因序列与 NCBI 数据库中序列进行 Blast 相似性比较, 发现菌株与乳酸杆菌属

表 2 菌株 W1-9 的生理生化鉴定结果<sup>†</sup>

Table 2 Identification results of physiological characters for strain W1-9

特征	结果	特征	结果
接触酶	-	蔗糖	+
淀粉水解	-	棉籽糖	+
吲哚	-	菊糖	+
产硫化氢	-	乳糖	+
硝酸盐还原	-	生长温度 4 °C	-
精氨酸产氨	-	生长温度 10 °C	+
明胶液化	-	生长温度 15 °C	+
七叶苷	+	生长温度 37 °C	+
纤维二糖	+	生长温度 45 °C	+
麦芽糖	+	生长 pH 4.5	+
甘露醇	+	生长 pH 9.6	+
水杨苷	+	生长 NaCl 6.5%	+
山梨醇	+	生长 NaCl 18%	-

<sup>†</sup> “+”表示结果为阳性, “-”表示结果为阴性。



M. Marker 1. 有模板, 无引物 2. 有引物, 无模板 3~5. W1-9 的 PCR 产物

图4 菌株 W1-9 的 16S rDNA PCR 扩增产物电泳图  
Figure 4 Electrophoretogram of a 16S rDNA PCR amplification product of strain W1-9

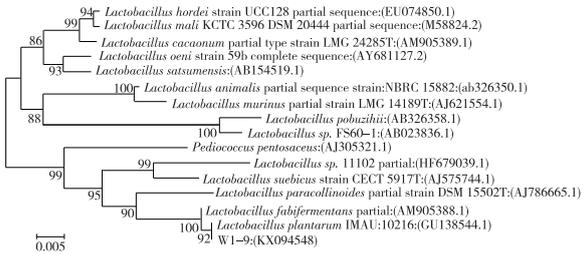


图5 基于 16S rDNA 基因序列的 W1-9 的菌株的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences of strain W1-9

(*Lactobacillus*) 内种的相似性较高, 与植物乳杆菌的相似性高达 100%, 结合形态学、生理生化特征, W1-9 被鉴定为植物乳杆菌。

2.3 菌株 W1-9 产 GABA 发酵条件的优化

2.3.1 不同蔬菜汁培养基对菌株合成 GABA 的影响 不同蔬菜汁对菌株 W1-9 产 GABA 影响的结果见图 6。由图 6 可知, 选用黄瓜汁培养基, 接种菌株 W1-9 发酵产 GABA 能力最强, 达 3.75 g/L。可能是黄瓜富含 Glu, 在菌株 GAD 作用下转化生成 GABA, 增加了其总量<sup>[20]</sup>。

2.3.2 正交试验结果 根据单因素试验结果, 选择正交试验的初始 pH、底物 MSG 添加量、接种量各自最佳的水平范围见表 3。以 GABA 产量为指标, 选用  $L_9(3^3)$  正交表进行正交

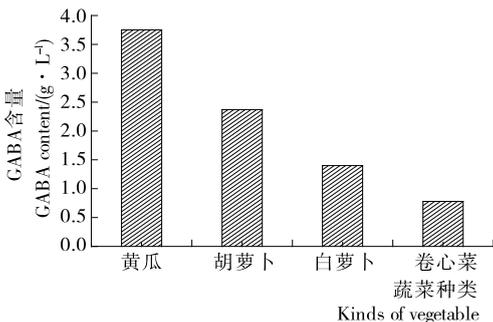


图6 4 种蔬菜汁培养基中 GABA 产量

Figure 6 The GABA productions of four vegetable juice medium

试验, 结果见表 4。

由表 4、5 可知: A 对 GABA 产量影响显著, B、C 不显著; 3 个因素对 GABA 产量的影响大小依次为  $A > C > B$ , 即培养基初始 pH 值对 GABA 产量的影响最显著, 菌液接种量次之, 底物 MSG 添加量在测试质量浓度 (12~16 g/L) 内对 GABA 产量影响较小, 其 R 值小于空列 R 值, 可能是其水平步长太小。根据 K 值, 3 个因素的最佳组合为  $A_3B_2C_3$ , 此组合不在正交设计表中, 因此对最终结果进行验证实验, 结果表明该条件下 GABA 产量为 7.17 g/L, 低于组合  $A_3B_1C_3$  的含量 7.62 g/L。可能是底物添加量的增加在多种因素的交互作用下反而抑制了 GABA 的产生, 同时考虑到成本等因素选择  $A_3B_1C_3$  作为最佳组合。

本试验从四川泡菜水中筛选出菌株 W1-9, 与国内外文

表 3 正交试验设计

Table 3 Orthogonal design of experiment

水平	A 培养基 初始 pH	B 底物 MSG 添加 量/(g · L <sup>-1</sup> )	C 菌液接 种量/%
1	4.5	12	0.8
2	5.0	14	1.0
3	5.5	16	1.2

表 4 发酵条件的正交试验结果

Table 4 The result of fermentation conditions by orthogonal experiment

处理号	A	B	C	D(空列)	GABA/(g · L <sup>-1</sup> )
1	1	1	1	1	3.45
2	1	2	2	2	3.49
3	1	3	3	3	4.00
4	2	1	2	3	4.33
5	2	2	3	1	5.16
6	2	3	1	2	5.69
7	3	1	3	2	7.62
8	3	2	1	3	6.86
9	3	3	2	1	5.20
-----					
$\bar{K}_{1j}$	3.65	5.13	5.33	4.60	
$\bar{K}_{2j}$	5.06	5.17	4.34	5.60	
$\bar{K}_{3j}$	6.56	4.96	5.59	5.06	
$R_j$	2.91	0.21	1.25	1.00	

表 5 方差分析结果<sup>†</sup>

Table 5 The results of variance analysis

变异来源	平方和	自由度	均方	方差之比	临界 F 值
A	12.735 0	2	6.367 5	16.265 4 *	$F_{0.05(2,4)} = 6.94$
B	0.073 0	2	0.036 5	0.048 9	$F_{0.01(2,4)} = 18.00$
C	2.625 1	2	1.312 6	3.352 9	
误差	1.493 0	2	0.746 5		
-----					
总和	16.926 1	8			

† “\*”表示差异显著。

献报道的菌株相比,其筛选来源较新颖,现有研究多从酸奶<sup>[21]</sup>、土壤<sup>[22-23]</sup>、奶酪<sup>[24-25]</sup>等筛选菌株。W1-9 合成 GABA 的能力也有较大优势,其在含 10 g/L Glu 的 MRS 培养基中培养 3 d,可产生 2.18 g/L GABA,高于葛松涛<sup>[21]</sup>、Siragusa<sup>[24]</sup>、Diana<sup>[25]</sup>等的报道。

采用不同种类蔬菜汁培养基的选择以及发酵条件的优化,植物乳杆菌 W1-9 产 GABA 含量提高了 249.5%(以优化前 GABA 产量为基础数据),优于王超凯<sup>[26]</sup>、葛菁萍<sup>[27]</sup>等的研究,优化效果良好,还可进一步对发酵条件如温度、培养方式等进行优化,以期得到更高的 GABA 产量。

### 3 结论

从四川泡菜水中分离筛选出一株产 GABA 能力较强的菌株 W1-9,通过系统鉴定,该菌株为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*),其 GABA 产量为 2.18 g/L。

相比于萝卜和卷心菜,菌株 W1-9 在黄瓜汁发酵培养基中 GABA 产量较高,为 3.75 g/L。对其发酵条件进行优化,最优条件为初始 pH 5.5,底物 MSG 添加量 12 g/L,接种量 1.2 mL/100 mL;在此条件下,GABA 产量最高达 7.62 g/L。不同于现有大多数研究仅对培养基组分以及发酵条件优化,本研究可以更好地应用于实际生产中,可为 GABA 功能性蔬菜汁饮料和 GABA 四川泡菜的生产提供数据参考。

#### 参考文献

[1] 王擒云,戴体俊,曾因明. GABA 受体对内源性痛觉下行抑制系统的调控作用[J]. 国外医学:麻醉学与复苏分册, 2004, 25(4): 209-212.

[2] 夏虹,彭茂民,周有祥. 发芽米中  $\gamma$ -氨基丁酸含量的测定[J]. 食品与机械, 2009, 25(4): 100-102.

[3] DOODIPALA S R. Neuroendocrine aspects of catamenial epilepsy[J]. Hormones and Behavior, 2013, 63(2): 254-266.

[4] 朱学芳,顾永健,陈芬.  $\gamma$ -氨基丁酸对慢性脑缺血致血管性痴呆大鼠认知功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010(22): 3 331-3 333.

[5] PAUL V. Inhibition of acute hyperammonemia-induced convulsions by systemically administered Gamma aminobutyric acid in rats[J]. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 2003, 74(3): 523-528.

[6] 王姣姣,白卫东,梁彬霞.  $\gamma$ -氨基丁酸的生理功能及富集的研究进展[J]. 农产品加工: 学刊, 2012(1): 1, 3-4.

[7] 金星星,田楠,成文玉,等. 微生物发酵合成  $\gamma$ -氨基丁酸的研究进展[J]. 安徽农业科技, 2012, 40(11): 6 385-6 386, 6 470.

[8] 掘江典子,官美奈子,金武祚. GABA ( $\gamma$ -氨基丁酸)的功能性[J]. 中国食品添加剂, 2010(6): 169-173.

[9] KOMATSUZAKI N, SHIMA J, KAWAMOTO S. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods[J]. Food Microbiology, 2005, 22: 497-504.

[10] 傅元欣,张涛,江波. 乳酸菌细胞转化法制备  $\gamma$ -氨基丁酸的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 166-168.

[11] 梁金钟,李雯,王风青. 产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及诱变育种[J]. 食品科学, 2013, 34(23): 228-232.

[12] 周青,魏春,应向贤,等. 产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及发酵过程研究[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(5): 26-31.

[13] 吴洁,刘蓉辉. 泡菜泡制盐水中乳酸菌分离与鉴定[J]. 中国调味品, 1995(8): 16-17.

[14] 姚汝华. 微生物工艺工程原理[M]. 2 版. 广州: 华南理工大学出版社, 2005: 16-18.

[15] 贤乾隆,黄翠姬,杨振媚,等. 高效液相色谱法测定乳酸菌发酵液中  $\gamma$ -氨基丁酸的含量[J]. 中国调味品, 2013, 38(3): 50-54.

[16] 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, 1999.

[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.

[18] 张洁,徐桂花,尤丽琴. 16S rDNA 序列分析法鉴定乳酸菌[J]. 农产品加工: 创新版, 2009(4): 47-49.

[19] 高爱同. 高产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌发酵条件优化及分离纯化工艺研究[D]. 杭州: 浙江师范大学, 2013: 30-33.

[20] 侯冬岩,回瑞华,李学成,等. 水黄瓜营养成分的研究[J]. 鞍山师范学院学报, 2006, 8(2): 28-30.

[21] 葛松涛,周立平,丁兴. 一株产 GABA 的植物乳酸菌的筛选及鉴定[J]. 现代食品科技, 2009, 25(8): 940-943.

[22] 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): 59-61.

[23] 卢彦梅,张伟国.  $\gamma$ -氨基丁酸产生菌的选育及发酵条件优化[J]. 食品与机械, 2008, 24(1): 36-40.

[24] SIRAGUSA S, De ANGELIS M, DI Cagno R, et al. Synthesis of  $\gamma$ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(22): 7 283-7 290.

[25] DIANA M, TRES A, QUILEZ J, et al. Spanish cheese screening and selection of lactic acid bacteria with high gamma-aminobutyric acid production[J]. LWT-Food Science and Technology, 2014, 56(2): 351-355.

[26] 王超凯,刘绪,张磊,等. 产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及发酵条件初步优化[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(1): 36-39.

[27] 葛菁萍,程明,宋明明,等. 产 GABA 的乳酸菌菌株的选育及最佳发酵条件研究[J]. 中国食品学报, 2013, 13(9): 48-55.