

基于植物乳植杆菌产谷氨酸脱羧酶 条件发酵生产 γ -氨基丁酸

杨胜远 范根俊 刘奕盈

(岭南师范学院食品科学与工程学院, 广东 湛江 524048)

摘要: [目的] 改善 *Lactiplantibacillus plantarum* 深层发酵合成 γ -氨基丁酸 (GABA) 的效率。[方法] 以全细胞谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力为评价指标, 通过对发酵条件和培养基进行系统考察, 优化产 GAD 条件, 并以产 GAD 条件为基础确立 GABA 发酵工艺。[结果] *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的最适发酵条件为 30 °C 静置培养 48 h; 适宜培养基为改良 MRS (MMRS) 培养基, 其组成为蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 5 g/L、蔗糖 10 g/L、吐温 80 1.0 g/L、CH₃COONa 4.8 g/L、MnSO₄ 0.03 g/L、L-谷氨酸钠 8 g/L, pH 6.5。在该条件下, 每升发酵液的全细胞 GAD 活力为 (83.42±4.37) U, 较 MRS 培养基提高了 (88.48±9.87)%。以 MMRS 发酵合成 GABA 的产量为 (2.27±0.12) g/L, 较 MRS 的 GABA 产量提高了 (118.27±11.09)%。[结论] 通过优化产 GAD 条件改进 GABA 发酵工艺可以提高 GABA 产量。

关键词: 植物乳植杆菌; 谷氨酸脱羧酶; 发酵条件; γ -氨基丁酸

Gamma-aminobutyric acid biosynthesis via fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* with optimized glutamate decarboxylase expression conditions

YANG Shengyuan FAN Genjun LIU Yiyi

(College of Food Science and Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China)

Abstract: [Objective] To enhance the biosynthesis efficiency of gamma-aminobutyric acid (GABA) via submerged fermentation by *Lactiplantibacillus plantarum*. [Methods] With the activity of whole-cell glutamate decarboxylase (GAD) as an evaluation indicator, the GAD production conditions are optimized through systematic investigation of both fermentation conditions and culture media, and the fermentation process for GABA production is subsequently established based on these optimized conditions. [Results] The optimal fermentation conditions for GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2 are static culture at 30 °C for 48 h in a modified MRS (MMRS) medium containing 10 g/L peptone, 10 g/L beef extract, 5 g/L yeast extract, 10 g/L sucrose, 1.0 g/L Tween 80, 4.8 g/L CH₃COONa, 0.03 g/L MnSO₄, and 8 g/L L-monosodium glutamate at pH 6.5. Under these conditions, the activity of whole-cell GAD in per liter of fermentation broth is (83.42±4.37) U, which increases by (88.48±9.87)% compared with that in the MRS medium. The yield of GABA synthesized via fermentation in the MMRS medium reaches (2.27±0.12) g/L, representing a (118.27±11.09)% increase compared with that of fermentation in the MRS medium. [Conclusion] Optimizing the production conditions of GAD to enhance the GABA fermentation process serves as an effective strategy to boost the GABA yield.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum*; glutamate decarboxylase; fermentation conditions; gamma-aminobutyric acid

基金项目: 广东省重点建设学科科研能力提升项目 (编号: 2022ZDJS079); 广东省普通高校特色创新项目 (编号: 2022KTSCX073)

通信作者: 杨胜远 (1972—), 男, 岭南师范学院教授, 博士。E-mail: yangsy1972@163.com

收稿日期: 2025-03-13 **改回日期:** 2025-08-10

引用格式: 杨胜远, 范根俊, 刘奕盈. 基于植物乳植杆菌产谷氨酸脱羧酶条件发酵生产 γ -氨基丁酸[J]. 食品与机械, 2025, 41(8): 164-171.

Citation: YANG Shengyuan, FAN Genjun, LIU Yiyi. Gamma-aminobutyric acid biosynthesis via fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* with optimized glutamate decarboxylase expression conditions[J]. Food & Machinery, 2025, 41(8): 164-171.

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)作为哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质,已被证实具有抗抑郁^[1]、降血压^[2]、促进睡眠^[3]及增强免疫调节^[4]等多重生理功能。随着消费者对天然保健成分需求的增长, GABA因其安全性高、功能明确的特点,在功能性食品与膳食补充剂领域展现出巨大应用潜力^[5]。然而,天然来源的GABA含量较低,化学合成法存在高能耗、产物纯化复杂及潜在副产物残留等问题,导致其在食品和医药领域中的应用受限^[6]。在此背景下,生物合成凭借其反应条件温和、底物专一性强的优势,逐渐成为食品与医药级GABA规模化生产的核心途径。

微生物因其生长繁殖快、代谢调控便捷等特性,被视为GABA生物合成的理想体系,而其中谷氨酸脱羧酶(glutamate decarboxylase, GAD, EC4.1.1.15)作为催化L-谷氨酸(L-glutamic acid, L-Glu)及其盐不可逆脱羧生成GABA的关键限速酶,其表达水平与酶活力直接影响最终产物转化效率^[6]。因此,建立GAD高效表达的发酵调控策略是提升GABA产量的关键突破口。

植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*)作为一类广泛应用于发酵食品与益生菌制剂的乳酸菌,兼具食品安全性与功能性优势。其不仅获得欧洲食品安全局QPS(qualified presumption of safety)资格认定及美国食品药品监督管理局GRAS(generally recognized as safe)认证^[7],更依托其耐酸性强、肠道定植能力优异及代谢活性多样的特点,展现了突出的益生潜力^[8-11]。研究^[12-14]表明,通过益生菌GAD依赖的L-Glu脱羧途径能够在食品级发酵体系中直接积累GABA,无需复杂提取工艺,为开发富GABA功能性食品(如植物性饮品、酸奶)及益生菌制剂提供了绿色技术路径,利用植物乳植杆菌开发富含GABA的功能性食品的发酵工艺条件也得到优化。此外,利用植物乳植杆菌深层发酵生产GABA也深受关注,研究人员^[15-17]已对不同基质发酵生产GABA的条件展开了研究。然而,无论是何种发酵形式,GABA合成效率始终受限于GAD的表达量及其催化活性,而后者与菌株的发酵条件(温度、pH、时间以及培养介质等)密切相关。然而目前针对植物乳植杆菌GAD活力的特异性提升的系统性调控策略仍鲜见报道。

研究拟以植物乳植杆菌全细胞GAD活力为评价指标,通过系统优化菌株发酵体系,解析多重环境因子耦合效应对GAD表达的影响规律,对植物乳植杆菌产GAD的发酵条件进行研究,并在此基础上对其在GABA发酵生产的应用效益进行评价,以期建立一套高产、稳定且经济适用的发酵方案,为后续开发高活性GAD酶制剂及规模化生产食品级GABA提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

植物乳植杆菌(*Lactiplantibacillus plantarum*) Y-2:岭南师范学院绿色生物制造研究室;

L-谷氨酸钠(L-monosodium glutamate, MSG;质量分数99.0%):分析纯,广东方信生物科技有限公司;

GABA(质量分数 $\geq 99\%$)、异硫氰酸苯酯(phenylisothiocyanate, PITC):分析纯,美国Sigma公司;

乙腈、乙酸和三乙胺:色谱纯,美国TEDIA公司;

其余试剂为分析纯试剂或生化试剂;

MRS培养基:蛋白胨10 g/L、牛肉膏10 g/L、酵母膏5 g/L、葡萄糖20 g/L、吐温80 1 g/L、 K_2HPO_4 1.2 g/L、 CH_3COONa 3 g/L、柠檬酸铵2 g/L、 $MgSO_4$ 0.1 g/L、 $MnSO_4$ 0.03 g/L,参照文献[18]配制;

PSB培养基:蛋白胨15 g/L、牛肉膏12.5 g/L、蔗糖12.5 g/L、柠檬酸铵2 g/L、 CH_3COONa 3 g/L、 K_2HPO_4 0.6 g/L、 $CaCl_2$ 2.12 g/L、吐温80 1 g/L,参照文献[19]配制;

TYG培养基:胰蛋白胨5 g/L、酵母膏5 g/L、葡萄糖10 g/L,参照文献[20]配制;

除特别说明外,各培养基pH均为6.5,分装98 mL于250 mL三角瓶,121 °C灭菌20 min。

1.2 仪器与设备

pH计:FE28型,梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司;

高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)仪:P1201型,配可变波长紫外检测器,大连依利特分析仪器有限公司;

电子分析天平:AUX120型,日本Shimadzu公司;

台式高速冷冻离心机:TGL16M型,盐城市凯特实验仪器有限公司;

涡旋混合仪:VX-200型,美国Labnet公司;

数显恒温水浴锅:HH-2型,常州荣华仪器制造有限公司;

生化培养箱:LRH-250F型,深圳市联翔电机有限公司。

1.3 方法

1.3.1 GABA定量分析 将待测样品进行适当稀释,然后参照文献[21]采用HPLC测定样品GABA含量。

1.3.2 GAD活力测定 不同发酵条件对菌株产GAD的影响可能体现在生长量和GAD表达量两个方面,因此采用测定单位体积发酵液的全细胞GAD活力综合评价发酵条件对*Lpb. plantarum*产GAD的影响。将100 mL发酵液于4 °C、8 500 r/min离心20 min,弃上清液,加入20~30 mL生理盐水洗涤菌体,相同条件离心收集菌体。加入pH 5.2、0.2 mol/L MSG溶液(溶剂为0.2 mol/L乙酸盐缓冲

液) 5 mL, 漩涡快速混匀, 立即于 45 °C 水浴恒温反应 7 h, 取 1.0 mL 于 4 °C、8 500 r/min 离心 20 min, 收集上清液采用 HPLC 分析 GABA 含量。以不含 MSG 的 pH 5.2、0.2 mol/L 乙酸盐缓冲液替代 0.2 mol/L MSG 溶液按同样操作作为空白。GAD 活力单位定义: 在上述测定条件下 1 h 生成 1 μ mol GABA 所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。以每升发酵液的全细胞 GAD 活力表示 GAD 表达量。

1.3.3 种子液的制备 吸取 1 mL 4 °C 脱脂乳培养基保藏的 *Lpb. plantarum* Y-2 接入 100 mL MRS 培养基, 30 °C 静置培养 24 h, 作为种子液。

1.3.4 植物乳植杆菌产 GAD 发酵条件优化 在 98 mL MRS 培养基中接入 2 mL 种子液, 经不同条件培养后测定 GAD 活力。

(1) 温度对产 GAD 的影响: 培养基初始 pH 为 6.5, 分别于 20, 25, 30, 35, 40 °C 静置培养 48 h。

(2) 初始 pH 对产 GAD 的影响: 培养基初始 pH 分别为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 于 30 °C 静置培养 48 h。

(3) 培养时间对产 GAD 的影响: 培养基初始 pH 为 6.5, 分别于 30 °C 静置培养 24, 36, 48, 60, 72 h。

(4) 氧对产 GAD 的影响: 培养基初始 pH 为 6.5, 培养温度为 30 °C, 分别于 0, 120 r/min 摇床培养 48 h。

1.3.5 植物乳植杆菌产 GAD 培养基优化 在 98 mL 初始 pH 6.5 的培养基中接入 2 mL 种子液, 30 °C 静置培养 48 h, 测定 GAD 活力。试验均以 MRS 原配方为对照。

(1) 培养基对产 GAD 的影响: 分别考察 MRS、PSB 和 TYG 培养基。

(2) 氮源对产 GAD 的影响: 分别以大豆蛋白胨、胰蛋白胨等量替代 MRS 培养基中的蛋白胨, 其他成分与 MRS 培养基配方一致。

(3) 碳源对产 GAD 的影响: 以蔗糖等量 (20 g/L) 替代 MRS 培养基中的葡萄糖, 其他成分与 MRS 培养基配方一致。

(4) 生长因子对产 GAD 的影响: 分别或同时去除 MRS 培养基中的牛肉膏、酵母膏, 其他成分与 MRS 培养基配方一致。

(5) 缓冲盐对产 GAD 的影响: 分别或同时去除 MRS 培养基中的 K_2HPO_4 、 CH_3COONa 、柠檬酸铵, 其他成分与 MRS 培养基配方一致。

(6) 无机盐对产 GAD 的影响: 分别或同时去除 MRS 培养基中的 $MgSO_4$ 、 $MnSO_4$, 其他成分与 MRS 培养基配方一致。

(7) 吐温 80 对产 GAD 的影响: 去除 MRS 培养基中的吐温 80, 其他成分与 MRS 培养基配方一致。

(8) MSG 对产 GAD 的影响: 在 MRS 培养基中添加 5 g/L MSG, 其他成分与 MRS 培养基配方一致。

1.3.6 正交试验与验证实验 根据单因素试验结果设计

正交试验进一步优化蔗糖、MSG 和 CH_3COONa 的添加量。将经正交试验优化的适宜 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的培养基称为改良 MRS(modified de man, rogosa and sharp, MMRS) 培养基, 配方为: 蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 5 g/L、蔗糖 10 g/L、吐温 80 1.0 g/L、 CH_3COONa 4.8 g/L、 $MnSO_4$ 0.03 g/L、MSG 8 g/L, pH 6.5。分别将 2 mL 种子液接入 98 mL MMRS 培养基和 MRS 培养基, 于 30 °C 静置培养 48 h, 测定全细胞 GAD 活力。

1.3.7 二步发酵合成 GABA 分别将 2 mL 种子液接入 98 mL MRS 和 MMRS 培养基, 于 30 °C 静置发酵 48 h, 然后再分别加入 20 g/L MSG, 将发酵温度调整至 42 °C, 继续发酵 48 h, 测定 GABA 产量。

1.4 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件的单因素方差分析(ANOVA)的 Duncan(D) 和独立样本 *t* 检验进行统计分析。数据显著性分析结果采用字母标注于图表数据点处, 字母不同表示两组间差异显著($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 植物乳植杆菌产 GAD 发酵条件优化

2.1.1 温度对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 图 1 显示, 在 20~40 °C 范围内, *Lpb. plantarum* Y-2 均可产 GAD, 但 GAD 活力受培养温度影响较大。在 20~40 °C 范围内, 随着培养温度的升高, 全细胞 GAD 活力增加($P < 0.05$), 当培养温度超过 30 °C, 全细胞 GAD 活力则快速下降($P < 0.05$); 培养温度为 30 °C 时, 全细胞 GAD 活力最高。因此, 选择 30 °C 为 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的培养温度。

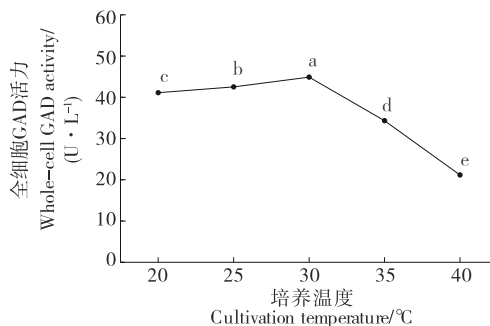


图 1 温度对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响
Figure 1 Effect of temperature on GAD production by *Lactiplantibacillus plantarum* Y-2

曾林等^[15]研究表明, 分离自四川泡菜的 *Lpb. plantarum* BC114 发酵生产 GABA 的最适发酵温度为 37 °C; Wang 等^[22]研究表明, *Lpb. plantarum* Lp3 发酵生产 GABA 的最适发酵温度为 35 °C。发酵生产 GABA 的实质是利用胞内 GAD 转化 *L*-Glu 或其盐生成 GABA, 该过程涉及 GAD 的表达和转化反应, GAD 表达温度与反应温度

并不一定一致。例如, *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* 的产 GAD 表达温度为 37 °C^[23], 最适反应温度为 55 °C^[24], 二者不一致。发酵生产 GABA 的最适发酵温度是以 GABA 产量为评价指标而获得的 GAD 表达温度与反应温度达到平衡时的温度, 并非产 GAD 的适宜发酵温度。试验中最适发酵温度(30 °C)是发酵产 GAD 的最适温度, 因此与文献[15]和[22]发酵生产 GABA 的最适温度(37 °C或 35 °C)存在区别。

2.1.2 初始 pH 对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 由图 2 可知, 全细胞 GAD 活力受培养基初始 pH 影响较大, 当培养基初始 pH 为 6.5 时, 全细胞 GAD 活力最高, 最有利于 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD。培养基初始 pH 高于或低于 6.5, 全细胞 GAD 活力均显著下降($P < 0.05$)。因此, 选择培养基初始 pH 为 6.5。

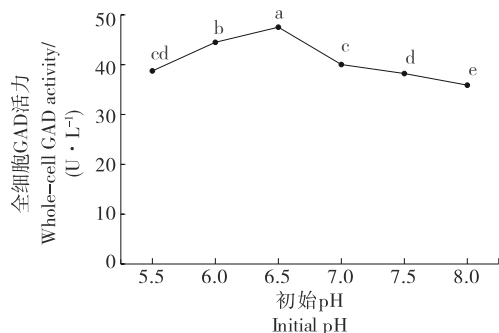


图 2 初始 pH 对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响
Figure 2 Effect of initial pH on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

2.1.3 培养时间对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

图 3 显示, 在 24~72 h 范围内, 随着培养时间延长, 全细胞 GAD 活力呈先增后降的趋势($P < 0.05$)。试验是通过测定全细胞 GAD 活力反映 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 情况, 细胞数是影响全细胞 GAD 活力的重要因素, 随着培养时间延长, 部分老龄细胞会发生自溶, 造成离心收集的细胞数减少, 从而导致测定的 GAD 活力下降, 这可能是全细胞 GAD 活力呈先增后降的主要原因。当培养 48 h 时, 全细胞 GAD 活力最高。因此, 选择 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的培养时间为 48 h。

2.1.4 氧对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 摇床转速会影响培养基中的溶氧量, 通常转速越高则溶氧量越大。因此, 采用控制摇床转速考察氧对 *Lpb. plantarum* 产 GAD 的影响。由图 4 可知, 静置培养(0 r/min)和 120 r/min 摇床培养对 *Lpb. plantarum* 产 GAD 影响不大, 差异不显著($P > 0.05$)。结果提示该菌株 GAD 表达可不依赖厌氧环境, 这一特性有利于简化发酵工艺。综合考虑能耗和工艺便捷性, 选择静置培养较为适宜。

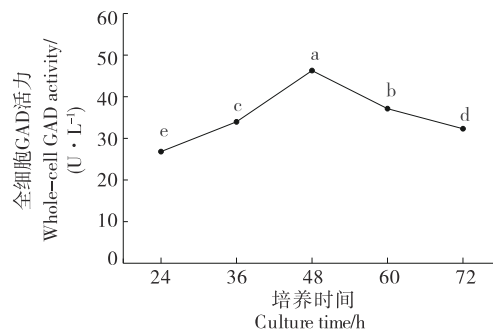


图 3 培养时间对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响
Figure 3 Effect of culture time on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

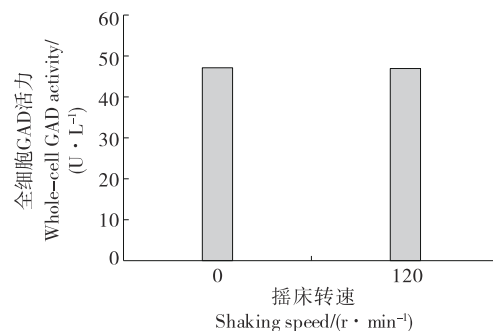


图 4 氧对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响
Figure 4 Effect of oxygen on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

2.2 植物乳植杆菌产 GAD 培养基优化

2.2.1 培养基对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 由图 5 可知, 培养基对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 影响很大, MRS 培养基最有利于产 GAD, TYG 和 PSB 培养基培养的全细胞 GAD 活力仅分别为 MRS 培养基组的 (37.42 ± 1.32)% 和 (39.26 ± 0.57)%, 差异显著($P < 0.05$)。因此, 选择 MRS 培养基作为初始培养基进行优化。

2.2.2 氮源对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 图 6 显示, 蛋白胨和胰蛋白胨均有利于 *Lpb. plantarum* Y-2 产

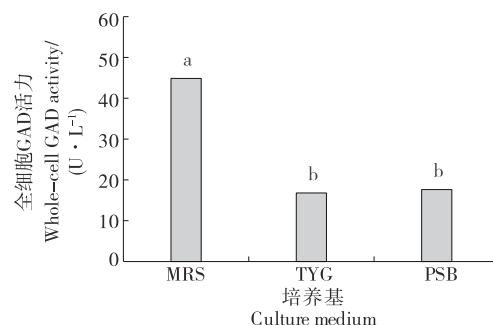


图 5 培养基对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响
Figure 5 Effect of culture medium on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

GAD, 二者差异不显著($P>0.05$), 均显著优于大豆蛋白胨($P<0.05$)。因此, 选择保留 MRS 培养基的蛋白胨成分。

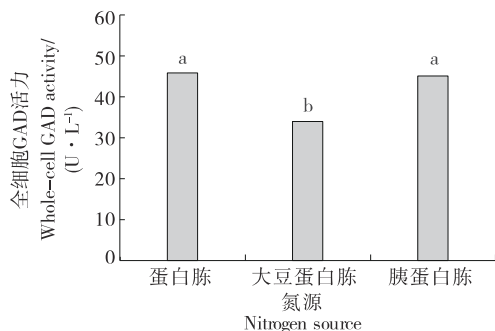


图6 氮源对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

Figure 6 Effect of nitrogen source on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

2.2.3 碳源对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 图7显示, 以蔗糖作为碳源更有利于 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD, 全细胞 GAD 活力较葡萄糖组显著提高($P<0.05$)。葡萄糖是速效碳源, 然而蔗糖较葡萄糖更利于 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD。研究表明, 蔗糖较葡萄糖也更利于 *Enterococcus faecium*^[25] 和 *S. salivarius* ssp. *thermophilus*^[23] 产 GAD, 说明蔗糖更适宜乳酸菌的菌体生长与 GAD 表达, 是否与蔗糖分解会产生果糖有关尚有待研究。因此, 选择将 MRS 培养基中的葡萄糖替换为蔗糖, 参考 MRS 培养基中的葡萄糖用量, 以 20 g/L 蔗糖作为中间水平通过正交试验进行优化。

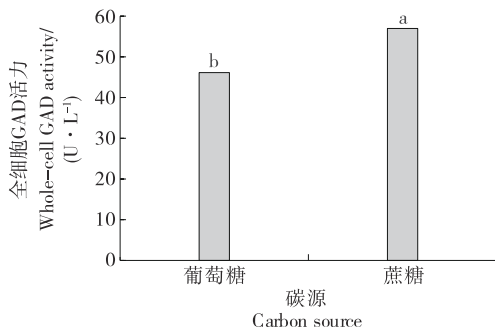


图7 碳源对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

Figure 7 Effect of carbon source on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

2.2.4 生长因子对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

图8显示, 酵母膏和牛肉膏对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 影响显著, 单一或同时去除 MRS 培养基中的酵母膏和牛肉膏, 全细胞 GAD 活力均显著下降($P<0.05$), 而且酵母膏和牛肉膏对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响呈

现协同效应。完全不添加酵母膏和牛肉膏时, 全细胞 GAD 活力仅为原 MRS 培养基的 $(65.18 \pm 0.24)\%$ 。因此, 选择保留 MRS 培养基中的酵母膏和牛肉膏。

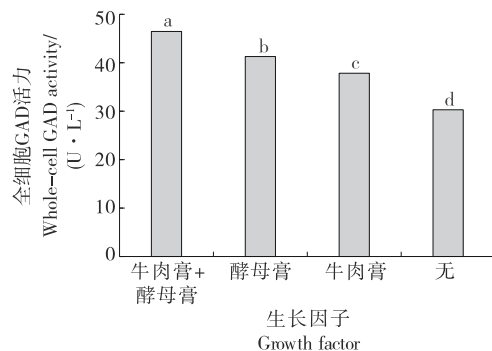
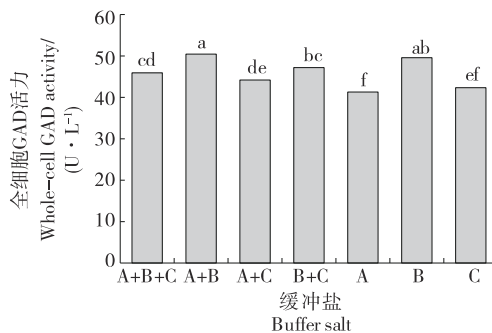


图8 生长因子对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

Figure 8 Effect of growth factor on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

2.2.5 缓冲盐对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 磷酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液和柠檬酸盐缓冲液的缓冲范围分别为 pH 5.8~8.0, 3.6~5.8, 3.0~6.6。为了缓解乳酸菌代谢产生的乳酸对其生长的影响, MRS 培养基使用了 K_2HPO_4 、 CH_3COONa 和柠檬酸铵 3 种缓冲盐。由图9可知, 单一添加 CH_3COONa 试验组全细胞 GAD 活力显著高于单一添加 K_2HPO_4 或柠檬酸铵的试验组($P<0.05$), 也显著高于添加 K_2HPO_4 、 CH_3COONa 和柠檬酸铵 3 种缓冲盐的对照组, 而与添加 CH_3COONa 和 K_2HPO_4 的试验组或者添加 CH_3COONa 和柠檬酸铵的试验组差异不显著($P>0.05$)。由此可见, K_2HPO_4 和柠檬酸铵对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 无有益贡献, 仅添加 CH_3COONa 即可实现 GAD 高效表达。杨胜远等^[25] 研究也表明, 培养基中仅添加 CH_3COONa 一种缓冲盐即可实现 *E. faecium* 高效表达 GAD。因此, 选择去除 MRS 培养基的 K_2HPO_4 和柠檬酸铵, 只添加 CH_3COONa , 并以 MRS 培养基的 CH_3COONa



A. K_2HPO_4 B. CH_3COONa C. 柠檬酸铵

图9 缓冲盐对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

Figure 9 Effect of buffer salt on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

添加量(即3 g/L)为中间水平通过正交试验进行优化。

2.2.6 无机盐对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 由图 10 可知,添加 MnSO_4 试验组的全细胞 GAD 活力与添加 MgSO_4 和 MnSO_4 试验组的差异不显著($P>0.05$),而不添加 MnSO_4 则全细胞 GAD 活力显著下降($P<0.05$);添加 MgSO_4 的试验组与未添加 MgSO_4 和 MnSO_4 的试验组的全细胞 GAD 活力差异不显著($P>0.05$)。结果表明, MgSO_4 对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响不大,而 MnSO_4 则有利于产 GAD。因此,选择去除 MRS 培养基中的 MgSO_4 ,仅添加 MnSO_4 。

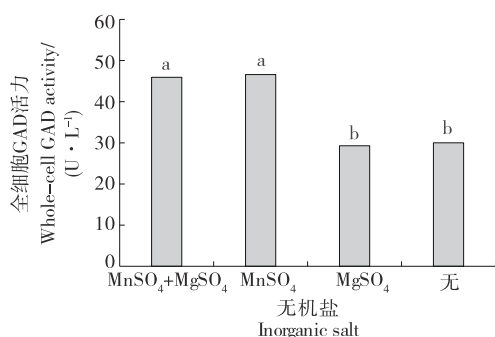


图 10 无机盐对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

Figure 10 Effect of inorganic salt on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

2.2.7 吐温 80 对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 吐温 80 是一种非离子型表面活性剂,能够乳化营养成分,降低培养基的表面张力,使微生物细胞与培养基的接触更加充分,有利于微生物对营养物质的吸收和利用。由图 11 可知,添加 1 g/L 吐温 80 可显著促进 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD,较不添加吐温 80 试验组提高了 21.6%。因此,保留 MRS 培养基的吐温 80 组分。

2.2.8 MSG 对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响 图 12 显示,在 MRS 培养基中添加 5 g/L 的 MSG,全细胞 GAD 活力较不添加 MSG 的对照组提高了 17.29%。由此可见,

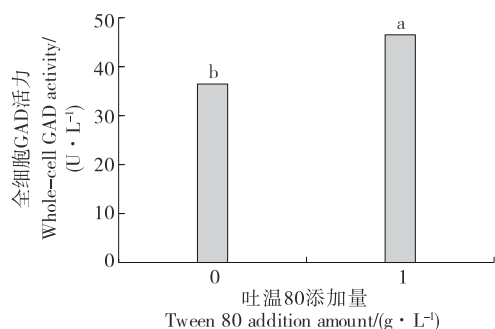


图 11 吐温 80 对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

Figure 11 Effect of Tween 80 on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

MSG 可显著提高 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD。 L -Glu 及其盐是 GAD 的底物,GAD 催化 L -Glu 脱羧而消耗 H^+ ,可以减小酸对细胞的不利影响,这是微生物的一种耐酸机制^[6,26]。基于这一耐酸机制和底物诱导作用, L -Glu 可能对乳酸菌的生长和 GAD 表达具有促进作用。MSG 是 L -Glu 的一钠盐,也是 GAD 催化底物。MSG 对 *Lpb. plantarum* 产 GAD 有促进作用,验证了上述 L -Glu 可通过依赖 GAD 的耐酸机制和底物诱导作用而促进乳酸菌生长和 GAD 表达的推断。因此,选择在 MRS 培养基中增加 MSG 组分,以 5 g/L 为中间水平通过正交试验对 MSG 添加量进行优化。

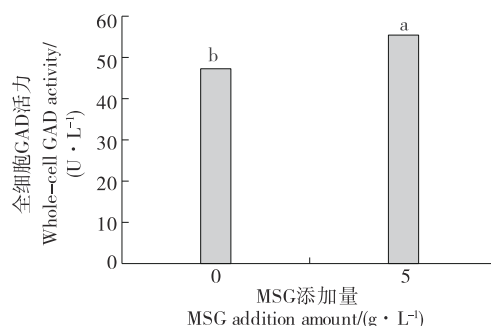


图 12 MSG 对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响

Figure 12 Effect of MSG on GAD production by *Lpb. plantarum* Y-2

2.2.9 正交试验 根据单因素试验结果(蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 5 g/L、蔗糖 20 g/L、吐温 80 1.0 g/L、 CH_3COONa 3 g/L、 MnSO_4 0.03 g/L、MSG 5 g/L, pH 6.5),选择蔗糖、MSG 和 CH_3COONa 进行正交试验,试验因素水平见表 1,试验设计及结果见表 2。

表 1 试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	A 蔗糖添加量/ (g · L ⁻¹)	B 空列	C MSG 添加量/ (g · L ⁻¹)	D CH ₃ COONa 添加量/(g · L ⁻¹)
1	10	/	2	1.2
2	20	/	5	3.0
3	30	/	8	4.8

由表 2 可知,MSG 添加量影响最大, CH_3COONa 添加量次之,蔗糖添加量影响最小。蔗糖添加量的极差小于空列的,说明在试验剂量范围内,蔗糖添加量对 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的影响小于试验系统误差造成的影响,选择试验的最低水平添加量即可。最优水平组合为蔗糖添加量 10 g/L、MSG 添加量 8 g/L、 CH_3COONa 添加量 4.8 g/L,该最优水平组合与试验号 3 的水平一致,试验号 3 的全细胞 GAD 活力为 (76.80 ± 2.64) U/L,显著高于其他

表 2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计及结果
Table 2 Design and results of $L_9(3^4)$ orthogonal test

试验号	A	B	C	D	GAD 活力/ (U·L ⁻¹)
1	1	1	1	1	31.35±3.30 ^c
2	1	2	2	2	48.33±2.67 ^c
3	1	3	3	3	76.80±2.64 ^a
4	2	1	2	3	48.27±3.65 ^c
5	2	2	3	1	53.58±1.67 ^b
6	2	3	1	2	38.78±2.84 ^d
7	3	1	3	2	47.25±2.63 ^c
8	3	2	1	3	45.68±0.83 ^c
9	3	3	2	1	46.33±1.72 ^c
k_1	52.22	42.35	38.66	43.81	
k_2	46.88	49.20	47.64	44.79	
k_3	46.42	53.97	59.21	56.92	
R_j	5.80	11.62	20.55	13.10	

试验组($P<0.05$)。

经单因素试验和正交试验优化的适宜 *Lpb. plantarum* Y-2 产 GAD 的培养基(改良 MRS 培养基)的配方为:蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 5 g/L、蔗糖 10 g/L、吐温 80 1.0 g/L、CH₃COONa 4.8 g/L、MnSO₄ 0.03 g/L、MSG 8 g/L,pH 6.5。

2.2.10 验证实验 分别以 MMRS 培养基和 MRS 培养基作为培养基进行验证实验,结果以 MMRS 培养基培养的 *Lpb. plantarum* Y-2 全细胞 GAD 活力为(83.42±4.37) U/L,较优化前的 MRS 培养基[(44.26±2.41) U/L]提高了(88.48±9.87)%,GAD 产率显著提升($P<0.05$)。

由此可见,MMRS 去除了原 MRS 培养基中的 K₂HPO₄、柠檬酸铵和 MgSO₄,新增了 MSG,总体成分较 MRS 培养基显著减少,但产 GAD 效果更好。无论是从经济性和制作简便性,还是从 GAD 表达效价而言,MMRS 培养基均显著优于 MRS 培养基。

2.3 二步发酵合成 GABA

MSG 作为 L-Glu 的一钠盐,水溶性好,应用于发酵培养基更为方便。为了保证有充足的 GAD 转化底物,分别采用添加 20 g/L MSG 的 MMRS 培养基和 MRS 培养基进行变温二步发酵合成 GABA。结果表明,MMRS 培养基组的 GABA 产量为(2.27±0.12) g/L,较 MRS 培养基组的提高了(118.27±11.09)%。

3 结论

植物乳植杆菌具有优良的安全性及益生特性,是谷氨酸脱羧酶依赖型 γ -氨基丁酸合成的理想微生物载体,但其谷氨酸脱羧酶表达调控体系尚需系统优化,该研

究对植物乳植杆菌 Y-2 产谷氨酸脱羧酶的发酵条件进行了研究,并以产谷氨酸脱羧酶条件为基础对二步发酵合成 γ -氨基丁酸的效果进行评价。结果表明,植物乳植杆菌 Y-2 产谷氨酸脱羧酶的最适发酵条件为 30℃静置培养 48 h,改良 MRS 培养基配方为蛋白胨 10 g/L、牛肉膏 10 g/L、酵母膏 5 g/L、蔗糖 10 g/L、吐温 80 1.0 g/L、CH₃COONa 4.8 g/L、MnSO₄ 0.03 g/L、L-谷氨酸钠 8 g/L,pH 6.5。在该条件下,每升发酵液的全细胞谷氨酸脱羧酶活力为(83.42±4.37) U,较优化前的 MRS 培养基提高了(88.48±9.87)%。改良 MRS 培养基发酵合成 γ -氨基丁酸的产量为(2.27±0.12) g/L,较 MRS 培养基组的提高了(118.27±11.09)%。由此可见,通过优化生物合成关键酶的产酶条件改进 γ -氨基丁酸发酵工艺是一条有效策略。

参考文献

[1] PRÉVOT T, SIBILLE E. Altered GABA-mediated information processing and cognitive dysfunctions in depression and other brain disorders[J]. Molecular Psychiatry, 2021, 26(1): 151-167.

[2] WANG W H, YAMAGUCHI S, KOYAMA M, et al. Evaluation of the antihypertensive activity of eggplant acetylcholine and γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats[J]. Molecules, 2023, 28(6): 2 835.

[3] YAMTSU 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 and Biotechnology, 2016, 25(2): 547-551.

[4] ABDOU A M, HIGASHIGUCHI S, HORIE K, et al. Relaxation and immunity enhancement effects of gamma-aminobutyric acid (GABA) administration in humans[J]. Biofactors, 2006, 26: 201-208.

[5] LEE X Y, TAN J S, CHENG L H. Gamma aminobutyric acid (GABA) enrichment in plant-based food-a mini review[J]. Food Reviews International, 2023, 39(8): 5 864.

[6] SARASA S B, MAHENDRAN R, MUTHUSAMY G, et al. A brief review on the non-protein amino acid, gamma-amino butyric acid (GABA): its production and role in microbes[J]. Current Microbiology, 2020, 77: 534-544.

[7] RICCI A, ALLENDE A, BOLTON D, et al. Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 5: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2016[J]. EFSA Journal, 2017, 15(3): 24-26.

[8] 陈颖,杨炫康,王陈晨,等.高产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选及益生特性研究[J/OL]. 食品与发酵工业. (2024-12-27) [2025-01-24]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.040963>.

CHEN Y, YANG X K, WANG C C, et al. Research on screening and probiotic characteristics of lactic acid bacteria with high yield of γ -aminobutyric acid[J/OL]. Food and Fermentation

- Industries. (2024-12-27) [2025-01-24]. <https://doi.org/10.13995/j.cnki.11-1802/ts.040963>.
- [9] LEE M H, KIM J, KIM G H, et al. Effects of *Lactiplantibacillus plantarum* FBT215 and prebiotics on the gut microbiota structure of mice[J]. Food Science and Biotechnology, 2023, 32 (4): 481-488.
- [10] HUANG J, WANG L, LI X, et al. Fermentation of asparagus juice using selected probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* JGS49 isolated from pickled asparagus: microbiological, physicochemical and flavour characteristics[J]. International Journal of Food Science and Technology, 2024, 59(10): 7 113-7 124.
- [11] MA Y F, LIN Y A, HUANG C L, et al. *Lactiplantibacillus plantarum* PS128 alleviates exaggerated cortical beta oscillations and motor deficits in the 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2023, 15(2): 312-325.
- [12] BUATONG A, MEIDONG R, TRONGPANICH Y, et al. Production of plant-based fermented beverages possessing functional ingredients antioxidant, γ -aminobutyric acid and antimicrobials using a probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* strain L42g as an efficient starter culture[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 134(3): 226-232.
- [13] YOGESWARA I B A, KUSUMAWATI I G A W, NURSINI N W, et al. Health-promoting role of fermented pigeon pea (*Cajanus cajan* L (Mill)) milk enriched with γ -aminobutyric acid (GABA) using probiotic *Lactiplantibacillus plantarum* Dad-13[J]. Fermentation, 2023, 9(7): 587.
- [14] NAKATANI Y, FUKAYA T, KISHINO S, et al. Production of GABA-enriched tomato juice by *Lactiplantibacillus plantarum* KB1253[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2022, 134(5): 424-431.
- [15] 曾林, 谭霄, 张庆, 等. 四川泡菜中产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌 BC114 发酵条件优化[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(3): 116-122.
- ZENG L, TAN X, ZHANG Q, et al. Optimization of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus plantarum* BC114 from Sichuan pickle[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(3): 116-122.
- [16] TUNG Y T, LEE B H, LIU C F, et al. Optimization of culture condition for ACEI and GABA production by lactic acid bacteria[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(9): M585-M591.
- [17] KIM N Y, KIM S K, RA C H. Evaluation of gamma-aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus plantarum* using two-step fermentation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2021, 44(10): 2 099-2 108.
- [18] DIVYASHRI G, PRAPULLA S G. An insight into kinetics and thermodynamics of gamma-aminobutyric acid production by *Enterococcus faecium* CFR 3003 in batch fermentation[J]. Annals of Microbiology, 2015, 65: 1 109-1 118.
- [19] YANG S Y, LÜ F X, LU Z X, et al. Production of γ -aminobutyric acid by *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* Y2 under submerged fermentation[J]. Amino Acids, 2008, 34(3): 473-478.
- [20] NOMURA M, NAKAJIMA I, FUJITA Y, et al. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene[J]. Microbiology, 1999, 145(6): 1 375-1 380.
- [21] 杨胜远, 林谦, 赖丽萍, 等. 屎肠球菌纤维素结合域谷氨酸脱羧酶构建及其酶学性质[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(21): 22-30.
- YANG S Y, LIN Q, LAI L P, et al. Construction and characteristics of recombinant cellulose-binding domain-glutamate decarboxylase of *Enterococcus faecium*[J]. Food and Fermentation Industries, 2019, 45(21): 22-30.
- [22] WANG X J, WANG Y, NAN B, et al. Optimization of fermentation for gamma-aminobutyric acid (GABA) production by *Lactiplantibacillus plantarum* Lp3 and the development of fermented soymilk[J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 195: 115841.
- [23] YANG S Y, YU B, LU Z X, et al. Optimization of the culture conditions for production of glutamate decarboxylase by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2008, 83(3): 389-392.
- [24] YANG S Y, LIN Q, LU Z X, et al. Characterization of a novel glutamate decarboxylase from *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* Y2[J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2008, 83(6): 855-861.
- [25] 杨胜远, 李云. 双向单因素与田口法优化屎肠球菌产谷氨酸脱羧酶培养基[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 90-98.
- YANG S Y, LI Y. Optimization of fermentation medium for glutamate decarboxylase production by *Enterococcus faecium* by bidirectional one-factor-at-a-time and Taguchi methods[J]. Food Science, 2018, 39(4): 90-98.
- [26] YU K, LIN L, HU S, et al. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2012, 50(4/5): 263-269.