

高产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌的筛选、鉴定及益生特性

吴剑¹, 南博^{2,3}, 李侠^{2,3}, 曹勇^{2,3}, 王玉华^{2,3,4,5*}, 王秀娟^{2,3*}

(1. 吉林国际旅行卫生保健中心(长春海关口岸门诊部), 吉林长春 130062; 2. 吉林农业大学 食品科学与工程学院, 吉林长春 130118; 3. 吉林农业大学 食品生物制造创新中心, 吉林长春 130118; 4. 吉林农业大学 大豆工业与技术国家加工实验室, 吉林长春 130118; 5. 吉林农业大学 国家小麦和玉米深加工工程研究中心, 吉林长春 130118)

摘要: 从东北酸菜和韩国泡菜中筛选高产 γ -氨基丁酸的植物乳杆菌菌株, 对其测序鉴定乳酸菌种类, 并深入研究该菌株的益生特性。结果表明: 通过 16S rDNA 测序鉴定该菌株为植物乳杆菌, 命名为 *Lactobacillus plantarum* Lp3。该菌株有良好的生长和产酸能力, 接种 2~12 h 生长较快进入对数期, 接种 0~6 h 快速产酸。益生特性表明: *L. plantarum* Lp3 菌株对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌均有较好的抑制效果, 对沙门氏菌抑菌圈直径达 32.27 mm。当胆盐浓度为 0.5% 和 pH 值为 2.0 时, *L. plantarum* Lp3 菌株活菌数分别为 7.12 lg (CFU/mL) 和 7.29 lg (CFU/mL), 说明其具有良好的耐胆盐及耐酸能力。同时, *L. plantarum* Lp3 菌株在胃肠道中表现出很好的生存能力, 对常用的红霉素、氯霉素和四环素等抗生素具有一定的敏感性。

关键词: γ -氨基丁酸; 植物乳杆菌; 筛选; 鉴定; 益生特性

Screening, Identification, and Probiotic Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Strain with a High Yield of γ -Aminobutyric Acid

WU Jian¹, NAN Bo^{2,3}, LI Xia^{2,3}, CAO Yong^{2,3}, WANG Yuhua^{2,3,4,5*}, WANG Xiujuan^{2,3*}

(1. Jilin International Travel Health Care Center (Changchun Customs Port Outpatient Department), Changchun 130062, Jilin, China; 2. College of Food Science and Engineering, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China; 3. Jilin Province Innovation Center for Food Biological Manufacture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China; 4. National Processing Laboratory for Soybean Industry and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China; 5. National Engineering Research Center for Wheat and Cord Deep Processing, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: A *Lactobacillus plantarum* strain with a high yield of gamma-aminobutyric acid (GABA) was isolated and screened from pickled Chinese cabbage and Korean kimchi and identified by 16S rDNA sequencing. Furthermore, the probiotic properties of the strain were characterized. The results showed that the strain was identified as *L. plantarum* and named as *L. plantarum* Lp3. The strain grew rapidly into the logarithmic phase 2~12 h after inoculation and rapidly produced acids during 0~6 h after inoculation, which indicated good growth and acid-producing ability. Furthermore, *L. plantarum* Lp3 had strong inhibitory effects on *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Staphylococcus aureus*, and the diameter of the inhibition zone against *Salmonella* reached 32.27 mm. The viable counts of *L. plantarum* Lp3 were 7.12 lg (CFU/mL) and 7.29 lg (CFU/mL) at the bile salt concentration of 0.5% and pH 2.0, respectively, indicating that the strain had strong bile salt and acid tolerance. Meanwhile, *L. plantarum* Lp3 showed high viability in the gastrointestinal tract and exhibited sensitivity to antibiotics such as erythromycin, chloramphenicol, and tetracycline.

基金项目:吉林省科技发展计划项目(20220508115RC, 20220202086NC)

作者简介:吴剑(1968—),女(汉),高级工程师,本科,研究方向:食品安全检测工作。

*通信作者:王玉华(1972—),女(汉),教授,博士,研究方向:生物反应器与功能性食品;王秀娟(1982—),女(汉),实验师,硕士,研究方向:生物反应器与功能性食品。

Key words: γ -aminobutyric acid; *Lactobacillus plantarum*; screening; identification; probiotic properties

引文格式：

吴剑, 南博, 李侠, 等. 高产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌的筛选、鉴定及益生特性[J]. 食品研究与开发, 2024, 45(6): 190-196.

WU Jian, NAN Bo, LI Xia, et al. Screening, Identification, and Probiotic Characterization of a *Lactobacillus plantarum* Strain with a High Yield of γ -Aminobutyric Acid[J]. Food Research and Development, 2024, 45(6): 190-196.

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种天然的、自身不能合成蛋白的氨基酸, 由于其独特的生理功能, 如改善睡眠、抗抑郁症^[1]、医治癫痫、降血压^[2-4]、降血糖、激活和增强记忆力、缓解和治疗孕妇自主神经障碍等^[5], 还可作为治疗尿毒症的辅助药物^[6], 并具有间接促进受孕等功能^[7], 近年来 GABA 的发展和使用受到越来越多的关注^[8-9]。

获取 GABA 的传统生产途径一般分为化学法和生物合成法, 化学法由于对环境的污染较大, 生产的 GABA 难以完全提纯, 副产物对人体的危害大不能应用于食品医药行业中。生物合成法更常用^[10], 主要包括植物富集法和微生物发酵法。植物富集法比化学法的反应条件温和且基本不会对环境造成危害。植物富集法的主要原理是高等植物组织中的内源酶催化谷氨酸钠的脱羧和多胺的降解^[11], 这两条合成和转化途径生成 GABA, 具有反应慢、不稳定及产率低等缺点, 因此不常用于 GABA 的生产。微生物发酵法具有反应迅速、产率较高的优点, 大量微生物都能通过发酵生产 GABA^[12]。GABA 在生物体中一般以谷氨酸通过谷氨酰胺酶脱羧反应产生, 选择合适的产 GABA 的生物载体是大量获得 GABA 的前提条件^[13]。在早期的研究中, 微生物以大肠杆菌为主, 通过谷氨酸钠的脱羧反应生产 GABA, 虽然大肠杆菌有很强的谷氨酸脱羧酶的能力, 但是将所得产物应用于食品中存在许多局限性。乳酸菌是一种国际公认的食品级食用细菌, 可以提高食品的品质和营养, 并赋予食品特殊的风味^[14], 具有重要生物学功能(如提高免疫力、调节肠道菌群及降低胆固醇等^[15])。目前由乳酸菌发酵的 GABA, 发酵条件简单, 可以直接用作食品添加剂^[16]或开发乳酸菌发酵酸奶。有研究^[17]从传统的发酵泡菜中分离出 67 种乳酸菌, 通过高效液相色谱分析有 27 株菌株产 GABA, 在 37 °C 培养 48 h 后, 其中一株 GABA 产量达到 3.92 g/L。利用乳酸菌发酵产 GABA 安全快捷且产量相对较高, 可以直接应用到食品中。由此可见利用乳酸菌生产 GABA 技术日渐成熟。筛选出合适的乳酸菌菌株和发酵条件以大量获取 GABA 是利用生物法获取 GABA 领域的研究热点之一。

植物乳杆菌作为乳酸菌系统的一个分支, 具有益

生特性, 适应环境能力较强, 能够定植于人体肠道中, 发挥作用。本研究从东北酸菜和韩国泡菜中筛选获得高产 GABA 的植物乳杆菌菌株, 通过 16S rDNA 对其进行测序鉴定乳酸菌种类, 并对该菌株的益生特性进行深入研究, 旨在为其后续功能性食品的研究开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

自然发酵东北酸菜、韩国泡菜:市售;人工胃肠液、GABA 标准品:北京奥博星生物技术有限公司;冰醋酸:江苏奥福生物科技有限公司;DNA 提取试剂盒、蛋白胨、酵母提取物、葡萄糖:北京鼎国生物技术有限责任公司。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

PCR 仪(7500fast):美国 Applied Biosystems 公司;酶标仪(TECAN - F50):瑞士 TECAN 公司;电泳仪(DYY-6C):北京六一仪器厂;高速冷冻离心机(JXN-30/26):上海 BBI 公司;-80 °C 冰箱(MDF-U3386S):日本 SANYO 电器集团。

1.3 方法

1.3.1 试剂的配制

纸层析展开剂:正丁醇:冰醋酸:水(体积比)=2:1:1, 加入 0.8% 显色剂茚三酮。层析洗脱剂:75% 乙醇:0.1% 硫酸铜(体积比)=38:2。硼酸缓冲溶液:称取 1.236 8 g 硼酸和 0.292 5 g NaCl, 溶解定容至 100 mL 制成 A 液, 溶解 1.907 0 g 硼酸钠并定容至 100 mL 制成 B 液;将 A 液与 B 液混合(体积比 1:9)配制成 pH9.0 的硼酸缓冲液, 4 °C 避光保存, 现用现配。5 mg/mL GABA 标准浓储液溶液:适量去离子水溶解 500 mg GABA 粉末并定容至 100 mL, 4 °C 保存。

MRS 培养基:蛋白胨 10 g, 牛肉膏 10 g, 酵母提取物 5 g, 磷酸氢二钾 2 g, 柠檬酸二铵 2 g, 乙酸钠 5 g, 葡萄糖 20 g, 吐温 80 1 mL, 硫酸镁(7H₂O)0.58 g, 硫酸锰(4H₂O)0.25 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH6.2, 121 °C 灭菌 15 min。固体培养基加入琼脂粉 15 g。

胰蛋白胨酵母膏葡萄糖培养基(trypotone yeast extract and glucose medium, TYG):胰蛋白胨 10 g, 酵母提

取物 5 g, 葡萄糖 20 g, 丁二酸钠 5 g, 1 000 mL 蒸馏水, 加入 L-谷氨酸(1 mg/mL)20 mL, pH6.5, 115 °C 灭菌 25 min。

溶菌肉汤培养基(lysogeny broth medium, LB): 胨蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, NaCl 10 g, 琼脂粉 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH6.5, 121 °C 灭菌 20 min。

1.3.2 产 GABA 乳酸菌菌株的筛选

菌株初筛: 取自然发酵的东北酸菜及韩国泡菜汁水稀释 10 倍, 将稀释液涂布于固体 MRS 培养基上, 37 °C 恒温培养 24 h, 选取成型单菌落于固体平板上划线分离, 反复进行纯化培养, 最终选取革兰氏阳性菌株接种于 MRS 液体培养基中培养 24 h(2%, 体积分数), 3 代连续培养, 得到有活力的菌株备用。

菌株复筛: 将初筛得到的菌株接种于 TYG 选择培养基中(2%, 体积分数), 37 °C 恒温培养 24 h, 连续培养 2 代, 备用。

1.3.3 发酵液中 GABA 的定性分析

发酵液中 GABA 的定性分析参照熊京京等^[18]方法稍作改动, 取 1 μL 发酵上清液, 在薄层层析硅胶板底部 1 cm 处间隔 0.7 cm 点样, GABA 标准液作为对照。层析缸中放入 0.8 cm 的展开剂, 将硅胶板平稳放入, 密封, 直至展开剂扩展至距离硅胶板上沿 1 cm 处时, 取出晾干, 放入烘箱 85 °C 显色 20 min, 初筛产 GABA 的菌株。

1.3.4 发酵液中 GABA 的定量分析

将 GABA 标准浓储液依次稀释配制成 0.25、0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 mg/mL 的 GABA 标准溶液。具塞试管中分别加入 0.2 mL 不同浓度的标准液和处理后的发酵上清液, 加入重蒸苯酚 1.0 mL(60%) 和硼酸盐缓冲液 0.4 mL(pH9.0), 混匀后再加入 NaClO 溶液 1.0 mL(10%), 充分振荡混匀。静置 5 min 后, 沸水中加热 10 min, 冰浴 10 min, 溶液变为蓝绿色后, 加入 2.0 mL 60% 乙醇溶液, 于 645 nm 波长处测定吸光值。以 GABA 浓度为横坐标, 吸光值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算发酵液中 GABA 的含量。

1.3.5 产 GABA 菌株的鉴定及形态观察

菌株的鉴定: GABA 菌株 DNA 的提取参照 DNA 提取试剂盒说明进行, 利用基因通用引物 27f 和 1492r 扩增, 通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)体系标准化操作后, 产物经 0.75% 琼脂糖凝胶电泳并通过凝胶成像装置观察, 进行 16S rRNA 基因序列测序。使用美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)的 Gen-Bank 数据库对各菌株序列分析比对, 对同源性较高的模式菌株的 16S rDNA 基因序列采用 MEGA7.0 构建系统发育树。

菌株的形态观察: 取分离纯化后的菌液 1 mL 涂于 MRS 培养基上, 37 °C 培养 48 h 后记录菌落形态, 取菌

液革兰氏染色, 在显微镜下观察并拍照。

1.3.6 菌株的生长曲线及产酸曲线绘制

在 MRS 液体培养基中接种 2% 活化好的菌株, 37 °C 培养, 每 2 h 测定 OD_{600 nm} 值和 pH 值, 绘制生长曲线及产酸曲线。

1.3.7 菌株发酵上清液对常见病原菌的抑菌试验

将实验室保藏的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和大肠杆菌分别活化, 再稀释至 10⁵ CFU/mL, 取 0.1 mL 涂布于 LB 培养基上, 将无菌的滤纸片放于平板中, 做 3 个平行组。分别吸取 0.3 mL 活化好的菌株发酵上清液放入滤纸片上, 于 37 °C 培养 24 h, 观察并测量抑菌圈直径大小, 进行 3 次平行试验。

1.3.8 菌株对胆盐的耐受性

向 MRS 培养基中加入牛胆盐, 配制成 0.2%、0.3% 及 0.5% 的胆盐培养基, 取 2% 活化后的菌株接种于上述胆盐培养基中, 于 37 °C 培养 24 h 后, 进行稀释涂布, 做 3 组平行试验, 计算活菌数。

1.3.9 菌株对酸度的耐受性

菌株对酸度的耐受性参照 Wang 等^[17]的方法稍作修改, 于 MRS 液体培养基中分别加入盐酸, 配制成酸性培养基(pH2.0、3.0、4.0), 取 2% 活化后的菌株接种于酸性培养基中, 于 37 °C 培养 24 h 后, 进行稀释涂布, 做 3 组平行试验, 计算活菌数。

1.3.10 菌株对人工胃液和人工肠液的耐受性

参照赵芳等^[19]的方法稍作修改, 于 MRS 液体培养基中接种 2% 菌株, 37 °C 培养 24 h 后取 10 mL 菌液, 5 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用无菌磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次, 收集菌体沉淀加入 10 mL PBS 混匀。取 1 mL 菌液加入 9 mL 模拟人工胃液, 37 °C 培养 4 h 后, 再从模拟人工胃液中取 1 mL 菌液加入 9 mL 模拟人工肠液, 37 °C 培养 4 h。每 2 h 分别取样进行平板涂布计数, 做 3 组平行试验。

1.3.11 菌株对常用抗生素的敏感性

在 MRS 固体培养基上均匀涂布 2% 菌株, 用无菌镊子放置不同的药敏片, 于 37 °C 培养 24 h, 观察药敏片周围是否形成抑菌圈, 并测量直径, 进行 3 组平行试验。药敏片为红霉素 30 μg、卡那霉素 30 μg、氯霉素 30 μg、链霉素 30 μg、四环素 30 μg。用游标卡尺测量抑菌圈大小。

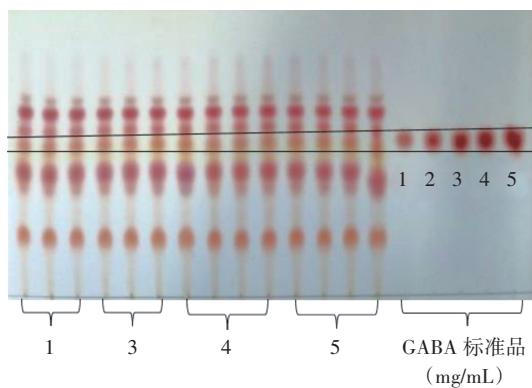
1.4 统计分析

通过 Excel、GraphPad Prism 6.0 和 Design-Expert 12 对数据进行统计分析。试验数据以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 高产 GABA 乳酸菌菌株的筛选

薄层层析定性分析结果如图 1 所示。



1~5 为菌株编号。

图 1 菌株发酵液 GABA 薄层层析色谱

Fig.1 Thin-layer chromatogram of gamma-aminobutyric acid (GABA) in the strain fermentation broth

由图 1 可以看出,除了菌株 2,菌株 1、菌株 3、菌株 4、菌株 5 均有与 GABA 标准品相同的比移值(化合物在薄层层析板上移动的距离与溶剂前端移动的距离之比),初步认为 4 株菌株均产生 GABA。

比色法定量分析结果如图 2 所示。

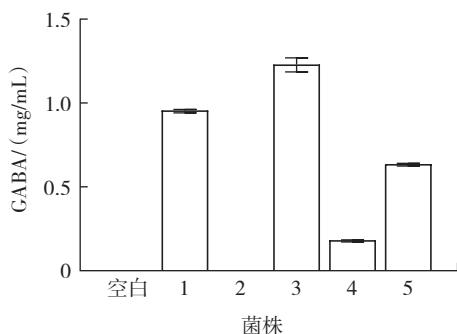


图 2 5 株菌株 GABA 产量对比

Fig.2 Comparison of GABA production among 5 strains

由图 2 可以看出,菌株 2 没有产生 GABA,菌株 1、3、4、5 均有 GABA 产生,且菌株 3 的 GABA 产量最高。Cataldo 等^[20]从藜麦和苋菜中分离出 17 株乳酸菌,30 °C 培养 72 h 后,GABA 产量为 16~258 mmol/L,从同一来源中筛选出来的乳酸菌的 GABA 产量不同。综上,选用产 GABA 能力较强的菌株 3 作为后续试验的主要研究菌株。

2.2 筛选菌株 16S rRNA 序列分析鉴定及形态学观察

高产 GABA 的菌株 3 的琼脂糖凝胶电泳如图 3 所示。

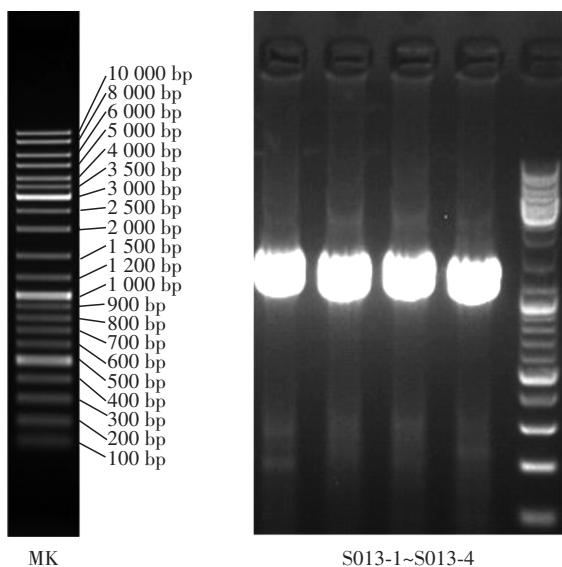


图 3 筛选菌株的 DNA 电泳图

Fig.3 DNA electropherogram of the screened strains

由图 3 可以看出,在 1 400 bp 左右有明显的条带出现。进行 16S rRNA 测序构建系统发育树如图 4 所示。



图 4 植物乳杆菌 Lp3 的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of *Lactobacillus plantarum* Lp3

由图 4 可以看出,该菌株的 16S rRNA 与 *L. plantarum* strain UFLA WFC331 的同源性达到 99.6%,命名

为植物乳杆菌 Lp3,拉丁文学名 *L. plantarum* Lp3。其菌落形态及镜检结果如图 5 所示。



图 5 植物乳杆菌 Lp3 的菌落及菌体形态

Fig.5 Colony and cell morphology of *L. plantarum* Lp3

由图 5 可以看出,该菌株的菌落凸起,呈乳白色,圆形光滑,半透明,边缘整齐;菌体呈杆状,革兰氏阳性。

2.3 *L. plantarum* Lp3 菌株的生长曲线和产酸曲线

L. plantarum Lp3 菌株的生长曲线和产酸曲线如图 6 所示。

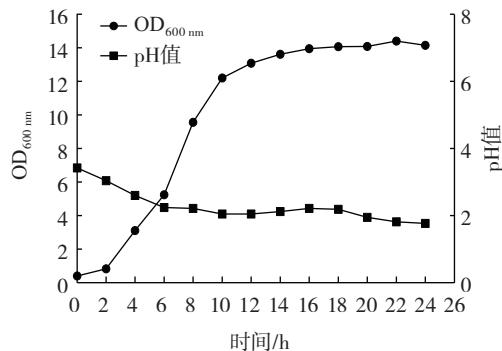


图 6 植物乳杆菌 Lp3 生长曲线和产酸曲线

Fig.6 Growth and acid production curves of *L. plantarum* Lp3

由图 6 可以看出,该菌株在 0~2 h 生长缓慢,2~12 h 生长速率快速上升,进入对数期,因该菌株是从活化二代后的菌液中分离出来的,所以菌种活力较强,代谢快;12 h 后生长逐渐放缓进入平稳期,在 22 h 时,菌株活力最高。由产酸曲线可知 *L. plantarum* Lp3 菌株在接种 0~6 h 发酵液 pH 值下降迅速,快速产酸,6 h 后 pH 值缓慢降低。说明该菌株有良好的生长和产酸能力。马莉等^[21]研究结果与本研究 *L. plantarum* Lp3 菌株的生长曲线和产酸曲线的趋势一致。

2.4 *L. plantarum* Lp3 菌株对常见病原菌的抑制

分别取 *L. plantarum* Lp3 菌株发酵上清液及 pH 值调至 7.0 的上清液进行抑菌试验,对 3 种常见病原菌的抑制作用如表 1 所示。

表 1 植物乳杆菌 Lp3 的抑菌效果

Table 1 Antibacterial effects of *L. plantarum* Lp3

组别	抑菌直径/mm		
	大肠杆菌	沙门氏菌	金黄葡萄球菌
Lp3	15.69±1.79	32.27±3.18	23.44±1.39
Lp3(pH7.0)	13.27±3.06	14.36±2.10	11.15±1.70

由表 1 可知,该菌株对 3 种致病菌均有比较好的抑制效果,对大肠杆菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 15.69、32.27、23.44 mm,对沙门氏菌的抑制作用最强。当发酵上清液的 pH 值调至 7.0 时, *L. plantarum* Lp3 抑菌能力均降低,尤其是沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。Halimi 等^[22]研究发现,发酵乳杆菌的低 pH 值培养上清液对金葡菌及铜绿假单胞菌均有较强的抑菌能力。综上, *L. plantarum* Lp3 菌株具有较强的抑菌能力。

2.5 *L. plantarum* Lp3 菌株的耐受性

益生菌的重要特性之一是耐受能力,肠道环境胆盐浓度较高,因此 *L. plantarum* 菌株的耐胆盐能力显得尤为重要。植物乳杆菌 Lp3 体外耐胆盐能力如图 7 所示。

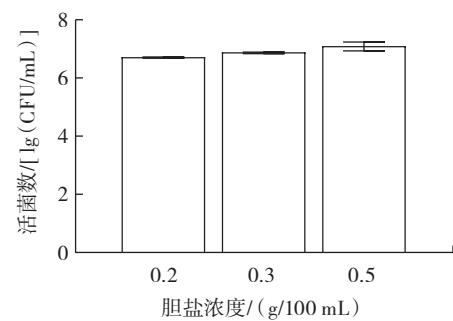


图 7 植物乳杆菌 Lp3 体外耐胆盐能力

Fig.7 Bile salt tolerance of *L. plantarum* Lp3 in vitro

由图 7 可以看出,当胆盐浓度为 0.2、0.3 g/100 mL 和 0.5 g/100 mL 时,培养 24 h 后 *L. plantarum* Lp3 菌株的活菌数可达 6.84、6.96、7.12 lg (CFU/mL),且活菌数符合乳酸菌发挥作用的最低值,表明 *L. plantarum* Lp3 菌株耐胆盐能力较强。作为革兰氏阳性菌,植物乳杆菌具有较厚的细胞壁,可能是该菌株对胆盐环境耐受的原因之一。王祎然等^[23]从酸汤中筛选出的 6 株乳酸菌在相同胆盐浓度下培养 3 h 后存活率均超过 88%。肠道由于胃酸的存在酸性较高,因此 *L. plantarum* 菌株的耐酸能力也很重要。*L. plantarum* Lp3 菌株的耐酸能力如图 8 所示。

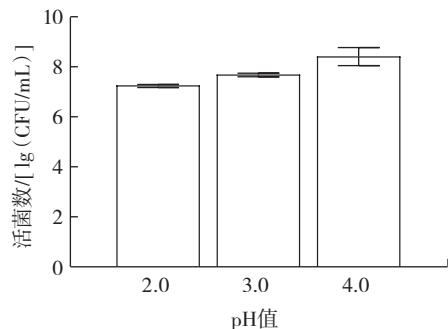


图 8 植物乳杆菌 Lp3 体外耐酸能力

Fig.8 Acid tolerance of *L. plantarum* Lp3 in vitro

由图8可以看出,在pH值2.0、3.0和4.0的条件下,*L. plantarum* Lp3菌株在24 h后的活菌数分别为7.29、7.72、8.28 lg (CFU/mL),存活率仍能达到90%以上,表明*L. plantarum* Lp3菌株具有良好的耐酸能力。王帅静等^[24]对7株菌株在pH2.0和pH3.0时培养几乎不生长。

2.6 *L. plantarum* Lp3菌株对模拟人工胃肠液的耐受性

益生菌菌株的重要标准是在人体胃肠道中存活的能力^[25]。*L. plantarum* Lp3菌株先后暴露在模拟人工胃肠液的环境中,活菌数如图9所示。

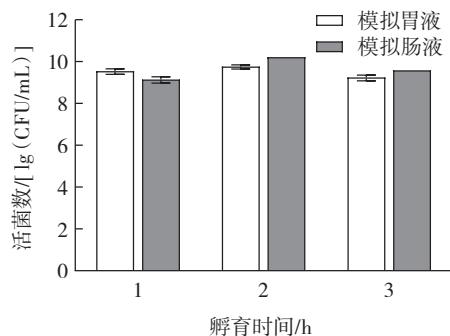


图9 植物乳杆菌Lp3在模拟胃肠液中的存活情况

Fig.9 Survival of *L. plantarum* Lp3 in simulated gastrointestinal fluid

如图9所示,随着在人工胃肠液中处理时间的延长,*L. plantarum* Lp3菌株的活菌数降低。这说明*L. plantarum* Lp3菌株对人工胃肠液具有较好的耐受性,能显著抵抗胃肠道环境,具备一定的益生特性。Wang等^[17]将*L. plantarum* HU-C2W先暴露于模拟胃液环境培养3 h,然后接种到模拟肠液环境培养12 h,乳杆菌的存活率从67.75%降至43.82%。

2.7 *L. plantarum* Lp3菌株对常用抗生素的敏感性

细菌会产生临床耐药性,耐药基因可以遗传,从而威胁宿主,因此有必要对乳酸菌进行抗生素敏感性试验^[26]。*L. plantarum* Lp3菌株对常用抗生素的敏感性如表2所示。

表2 植物乳杆菌Lp3的抗药性比较
Table 2 Antibiotic resistance of *L. plantarum* Lp3

抗生素	抑菌圈直径/mm
红霉素	28.87±0.39
卡那霉素	-
氯霉素	36.47±1.01
链霉素	-
四环素	26.07±0.45

注:-表示未产生抑菌圈。

如表2所示,*L. plantarum* Lp3菌株对卡那霉素和链霉素不敏感,对红霉素、氯霉素和四环素较为敏感,但仍在安全浓度的范围内。结果表明*L. plantarum*

Lp3菌株对胃肠中常用的抗生素具有一定的敏感性。

3 结论

GABA是一种自然界含量较少的氨基酸,提取困难,微生物发酵法作为一种安全且高产GABA的方式,越来越受到人们的重视。本研究从东北酸菜和韩国泡菜中筛选出高产GABA的菌株3,通过16Sr DNA序列分析鉴定其为植物乳杆菌,命名为*L. plantarum* Lp3。该菌株生长性能良好,对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌均有比较好的抑制效果,具有良好的耐胆盐及耐酸能力。*L. plantarum* Lp3菌株在体外模拟胃肠液环境中表现出良好的生存能力,对常用的红霉素、氯霉素和四环素等抗生素具有一定的敏感性。*L. plantarum* Lp3益生性能适合作为食用菌种应用于食品开发。

参考文献:

- ZHAO A Q, HU X Q, WANG X Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce gamma-aminobutyric acid using xylose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(9): 3587-3603.
- LIN Q, LI D N, QIN H Z. Molecular cloning, expression, and immobilization of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus fermentum* YS2[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2017, 27: 8-13.
- AOKI H, FURUYA Y, ENDO Y, et al. Effect of γ -aminobutyric acid-enriched tempeh-like fermented soybean (GABA-tempeh) on the blood pressure of spontaneously hypertensive rats[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2003, 67(8): 1806-1808.
- YOSHIMURA M, TOYOSHI T, SANO A, et al. Antihypertensive effect of a γ -aminobutyric acid rich tomato cultivar 'DG03-9' in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 615-619.
- OH C H, OH S H. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis [J]. Journal of Medicinal Food, 2004, 7(1): 19-23.
- SUWANMANON K, HSIEH P C. Effect of γ -aminobutyric acid and nattokinase-enriched fermented beans on the blood pressure of spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats[J]. Journal of Food and Drug Analysis, 2014, 22(4): 485-491.
- KIM H Y, YOKOZAWA T, NAKAGAWA T, et al. Protective effect of γ -aminobutyric acid against glycerol-induced acute renal failure in rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42(12): 2009-2014.
- YU P, REN Q, WANG X X, et al. Enhanced biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) in *Escherichia coli* by pathway engineering [J]. Biochemical Engineering Journal, 2019, 141: 252-258.
- LIU Q D, CHENG H J, MA X Q, et al. Expression, characterization and mutagenesis of a novel glutamate decarboxylase from *Bacillus megaterium*[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(7): 1107-1113.
- 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(4): 534-544.
- 吕常江.生理工程策略提升乳酸菌 γ -氨基丁酸合成效率的研究[D].杭州:浙江大学,2017.
- LV Changjiang. Physiology engineering strategy to improve gamma-aminobutyrate production in lactic acid bacteria[D]. Hangzhou:

Zhejiang University, 2017.

- [12] KIM D H, DASAGRANDHI C, PARK S K, et al. Optimization of gamma-aminobutyric acid production using sea tangle extract by lactic acid bacterial fermentation[J]. LWT-Food Science and Technology, 2018, 90: 636-642.
- [13] 罗秀针, 林燕燕, 陈雅静, 等. 谷氨酸脱羧酶和谷氨酸脱氢酶基因的串联表达及其对GABA产量影响[J]. 福建农业学报, 2018, 33(7): 744-749.
- LUO Xiuzhen, LIN Yanyan, CHEN Yajing, et al. Effect of gadB and gdh co-expression on bacterial γ -aminobutyric acid production [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2018, 33(7): 744-749.
- [14] YOUN Y S, PARK J K, JANG H D, et al. Sequential hydration with anaerobic and heat treatment increases GABA (γ -aminobutyric acid) content in wheat[J]. Food Chemistry, 2011, 129(4): 1631-1635.
- [15] 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 Yueyue, LU Jingjing, 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.
- [16] 赵安琪. 微生物发酵法高效生产 γ -氨基丁酸的研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- ZHAO Anqi. Production of gamma-aminobutyric acid by microbial fermentation[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [17] WANG D W, WANG Y, LAN H B, et al. Enhanced production of γ -aminobutyric acid in litchi juice fermented by *Lactobacillus plantarum* HU-C2W[J]. Food Bioscience, 2021, 42: 101155.
- [18] 熊京京, 任佳秀, 周姝含, 等. 淡豆豉炮制过程中产 γ -氨基丁酸微生物的筛选和鉴定[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(11): 2266-2273.
- XIONG Jingjing, REN Jiaxiu, ZHOU Shuhuan, et al. Screening and identification of GABA-producing microbes in fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(11): 2266-2273.
- [19] 赵芳, 李艳琴, 李彬春. 模拟人体胃肠道环境筛选益生乳杆菌[J]. 微生物学通报, 2016, 43(6): 1396-1403.
- ZHAO Fang, LI Yanqin, LI Binchun. Screening of probiotic *Lactobacillus* in simulated gastrointestinal environment[J]. Microbiology China, 2016, 43(6): 1396-1403.
- [20] CATALDO P G, VILLEGAS J M, SAVOY DE GIORI G, et al. Enhancement of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus brevis* CRL 2013 based on carbohydrate fermentation[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 333: 108792.
- [21] 马莉, 刘慧燕, 方海田, 等. 产 γ -氨基丁酸乳酸菌的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2022, 41(7): 94-100.
- MA Li, LIU Huiyan, FANG Haitian, et al. Isolation and identification of lactic acid bacteria with γ -aminobutyric yield and optimization of fermentation conditions[J]. China Brewing, 2022, 41(7): 94-100.
- [22] HALIMI S, MIRSALEHIAN A. Assessment and comparison of probiotic potential of four *Lactobacillus* species isolated from feces samples of Iranian infants[J]. Microbiology and Immunology, 2016, 60(2): 73-81.
- [23] 王祎然, 韦明明, 张涵, 等. 酸汤中乳酸菌的鉴定及其耐酸、耐胆盐和抗氧化活性[J]. 食品工业科技, 2020, 41(16): 121-126, 139.
- WANG Yiran, WEI Mingming, ZHANG Han, et al. Identification, acid and bile salt tolerance, and antioxidant ability of lactic acid bacteria isolated from sour soup[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(16): 121-126, 139.
- [24] 王帅静, 李啸, 刘玲彦, 等. 西藏牦牛粪和乳源中益生菌的筛选与鉴定[J]. 中国酿造, 2021, 40(7): 43-48.
- WANG Shuaijing, LI Xiao, LIU Lingyan, et al. Screening and identification of probiotics from yak dung and milk in Tibet[J]. China Brewing, 2021, 40(7): 43-48.
- [25] BORICHA A A, SHEKH S L, PITHVA S P, et al. *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus* species of food and human origin[J]. LWT-Food Science and Technology, 2019, 106: 201-208.
- [26] 张灼阳, 刘畅, 郭晓奎. 乳酸菌耐药性的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(5): 478-480.
- ZHANG Zhuoyang, LIU Chang, GUO Xiaokui. Research progress on drug resistance of lactic acid bacteria[J]. Chinese Journal of Microecology, 2007, 19(5): 478-480.

责任编辑:冯娜

收稿日期:2023-03-13