

文章编号: 1673 1689(2010)05-0742-06

高效转化 L-谷氨酸为 γ -氨基丁酸菌株的 筛选、鉴定及初步优化

刘婷婷, 杨套伟, 张术聪, 夏海锋, 饶志明*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 从发酵食品及自然界中筛选出能利用 L-谷氨酸生产 γ -氨基 酸的菌株, 并对转化条件进行初步优化。采用乳酸菌分离纯化的方法分离出乳酸菌, 再通过初筛、复筛挑选出高产 γ -氨基 丁酸的菌株, 并对其进行形态学、常规生理生化鉴定及 16S rDNA 基因分析, 随后对菌株产 γ -氨基 丁酸的转化条件进行初步优化。根据常见细菌系统鉴定手册, 所筛菌株初步确定为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)。优化后的最佳转化条件为: 菌株菌龄为 36 h、缓冲液初始 pH 为 4.8、缓冲液浓度为 0.2 mol/L。在优化后的转化条件下, 添加 5 g/dL 底物转化 24 h, 转化率最高可达 97.81%, 转化液中 γ -氨基 酸的质量浓度达 34.26 g/L, 该菌种可作为 γ -氨基 酸产生菌, 具有较好的 γ -氨基 酸生产潜力。

关键词: γ -氨基 酸; L-谷氨酸; 乳酸菌; 分离筛选; 鉴定

中图分类号: TS 201.3

文献标识码: A

Screening, Identification and Primary Optimizing of a Strain Producing γ -Aminobutyric Acid from L- Glutamic Acid

LIU Ting-ting, YANG Tao-wei, ZHANG Shu-cong, XIA Hai-feng, RAO Zhi-ming*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: A strain with capability of producing γ -Aminobutyric acid from L-glutamic acid was isolated from variety of fermented food and different natural environment samples, and the conditions of transformation were optimized. Process and Method: Isolation and purification method of Lactic acid bacteria was used to screen the strain yielding γ -amino butyric acid, and its morphology analysis, physiological and biochemical properties and phylogenetic analysis based on the 16S rDNA sequence were identified. And then the conditions of transformation were optimized for the Lactic acid bacteria separately. Based on Systems Manual of Determinative Common Bacteriology, the bacteria was preliminarily identified *Lactobacillus plantarum*. The better transformation conditions as follows: cell age 36 h, buffer initial pH 4.8, buffer concentration 0.2 mol/L; The content of GABA was over 34.26 g/L and transformation efficient was up to 97.81% in the optimum transformation conditions. The strain can be used to produce γ -amino butyric acid and has a higher converting capability of GABA.

收稿日期: 2009-09-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(20676053, 30970056); 国家 863 计划项目(2006AA020103, 2007AA02Z207)。

* 通信作者: 饶志明(1975-), 男, 江西临川人, 农学博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物学和发酵工程方面的研究。Email: raozm@yahoo.com.cn

Key words: γ -aminobutyric acid, L-glutamic acid, lactic acid bacteria, screening, identification

γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric acid, 简称 GABA), 又称 4-氨基丁酸、氨酪酸, 广泛存在于自然界中, 是一种非蛋白质组成的天然氨基酸, 在生物体内由 L-谷氨酸经谷氨酸脱羧酶(GAD)催化而来^[1-2], 是哺乳动物中枢神经系统中重要的抑制性神经递质, 具有重要的生理功能。大量研究表明: GABA 具有降血压、增强记忆力、活化肾功能、改善肝功能、防治肥胖、营养神经细胞等作用^[3-5]。随着研究的深入, GABA 的生理功能不断得到阐明, 目前 GABA 不仅作为具有重要作用的药物被大量应用, 而且在食品工业中作为保健性的功能因子也受到了广泛关注。

GABA 制备主要有化学合成法和生物合成法(植物富集法和微生物发酵法)两大类。相比而言, 化学合成 GABA 安全性差、环境污染严重, 植物富集的 GABA 含量较低, 因而微生物发酵生产 GABA 非常具有商业化开发前景。2003 年, 日本学者堀江典子^[6]筛选出一株乳酸菌株最高能积累 GABA 达到 35 g/L 左右。与日本的研究相比, 国内的研究起步较晚, 我国江南大学傅元欣和江波等人^[7]筛选得到一株乳酸菌, 经发酵优化 GABA 积累量达到 19.1 g/L; 浙江大学黄俊、梅乐和等人^[8]经筛选诱变得到一株乳酸菌, GABA 产量为 17 g/L, 通过一系列优化, 该诱变菌株在三角瓶中 GABA 产量为 33.42 g/L, 3.7 L 发酵罐中 GABA 积累量达到 76.36 g/L。

作者从各种酸奶、酸菜、酱油、豆豉等发酵食品, 以及牛奶、土壤、植物残骸中筛选具有转化 L-谷氨酸为 γ -氨基丁酸的菌株, 并对其中一株高转化效率的菌株进行了鉴定, 对其转化条件进行了初步研究, 为微生物转化 L-谷氨酸为 γ -氨基丁酸工业化提供了基础。

1 材料与 方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品 各种酸奶、酸菜、酱油、豆豉等发酵食品, 牛奶、土壤、植物残骸等。

1.1.2 培养基

1) 乳酸菌选择培养基: 牛肉膏 10 g/L, 酵母膏 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 葡萄糖 5 g/L, 吐温 0.5 g/L, 番茄汁 200 g/L, 溴甲酚绿 0.1 g/L, 碳酸钙 20 g/L, 琼脂 20 g/L; pH 6.5, 0.08 MPa 灭菌 15

min^[9]。

2) 活化培养基: MRS 培养基。酪蛋白胨 10 g/L, 牛肉提取物 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 葡萄糖 5 g/L, 乙酸钠 5 g/L, 柠檬酸二胺 0.2 g/L, 吐温 0.1 g/L, 磷酸氢二钾 0.2 g/L, 硫酸镁 0.2 g/L, 硫酸锰 0.05 g/L, 碳酸钙 20 g/L, 琼脂 20 g/L; pH 6.5, 0.08 MPa 灭菌 15 min^[10-11]。

3) 种子培养基^[12]: TYG 液体培养基: 胰蛋白胨 5 g/L, 酵母膏 5 g/L, 葡萄糖 10 g/L, 丁二酸钠 5 g/L; pH 6.5, 0.08 MPa 灭菌 15 min。

1.1.3 试剂 γ -氨基丁酸(GABA) 标样: 购自上海生工生物科技有限公司(Sigma, 纯度 99.9% 以上); L-谷氨酸(L-Glu): 购自国药集团化学试剂有限公司(纯度 98.5% 以上); pMD18-T 载体: 购自 TaKaRa(Japan); 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种筛选 选用土壤、酸奶、自制酸菜等样品为材料^[13], 分别取稀释成不同浓度的稀释液 0.1 mL, 无菌涂布到乳酸菌选择培养基平板上, 30 °C 培养 1~2 d, 挑取能产生透明圈, 菌落周围培养基变为黄色的单菌落, 初步确定为乳酸菌。采用平板划线法在 MRS 平板上反复多次划线培养, 获得纯菌株。将分离纯化后的单菌落接入 MRS 固体斜面培养基于 4 °C 冰箱保存, 每 2 周转接 1 次。

筛选得到菌株分别接种于装有 100 mL 种子培养基(TYG 培养基)的 500 mL 三角瓶中, 静置培养 1 d。用 100 mL 离心管离心收集菌体, 用生理盐水洗涤菌体后, 用 30 mL 醋酸缓冲液(0.2 mol/L, pH 5.0)悬浮菌体, 加入装有 2% 的谷氨酸(0.6 g)及吐温-80(0.01 g)的 100 mL 的三角瓶中, 然后将三角瓶置于 30 °C、160 r/min 条件下振荡培养 24 h。收集转化液, 离心, 比色法检测上清液中 γ -氨基丁酸的质量浓度。

选取其中 4 株转化率明显较高的菌株, 添加 5% 底物来进行进一步产 GABA 能力筛选, 利用氨基酸自动分析仪测定 GABA 的浓度, 并计算摩尔转化率。

1.2.2 生长曲线的测定 按细菌生长曲线的测定方法, 以 600 nm 处的浊度表示^[14]。

1.2.3 γ -氨基 酸初步定性定量检测 初步定性定量分析采用 Berthlot 比色法^[15]。取不同浓度的 GABA 标准样品或者不同菌株转化液 300 μ L 在冰

浴中加 200 μL 硼酸缓冲液(0.2 mol/L , $\text{pH } 10.0$) 终止反应,依次加入体积分数 6% 重蒸苯酚 100 μL 和质量分数 10% 次氯酸钠 400 μL ,沸水浴加热 10 min,冰浴冷却 5 min,640 nm 测定吸光度值,以标准曲线法确定 γ -氨基丁酸的浓度。

1.2.4 γ -氨基 酸精确定量检测 精确定量分析采用氨基酸自动分析仪法,氨基酸自动分析仪日立 835-50 型,2619# 树脂(阳离子交换柱 $\Phi 2.6\text{ mm} \times 150\text{ mm}$),53 $^{\circ}\text{C}$ 分析。 γ -氨基丁酸标样配制 10 mg/dL 溶液^[10]。

转化液离心取上清液,加入 15% 的三氯乙酸终止反应,离心取上清液 1 mL,送样至江南大学测试中心,采用氨基酸自动分析仪来精确测定转化液中 GABA 的质量浓度。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态学、生理生化特征 根据《常见细菌系统鉴定手册》所列菌种鉴定方法进行菌种鉴定^[16]。

1.3.2 基因组 DNA 的提取 参见文献[16]。

1.3.3 16S rDNA 的扩增 使用细菌 16S rDNA 的通用引物进行扩增

正向引物为 f: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3'

反向引物为 r: 5'-CTACGGCTACCTTGT-TACGA-3'

1.3.4 PCR 扩增条件 反应体系为取 DNA 模板 1 μL ,10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μL ,引物 1 μL ,dNTPs 4 μL ,Taq DNA 聚合酶 1 μL ,总反应体积为 50 μL 。循环参数为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,60 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。取扩增产物 10 μL ,用 0.8 g/dL 琼脂糖凝胶电泳,Goldview 染色,紫外灯下观测结果。

1.3.5 PCR 产物的克隆与 16S rDNA 序列测定及同源性比较、系统分析 用胶回收试剂盒纯化 PCR 扩增产物,电泳验证。将纯化后的 PCR 扩增产物连接到 pMD18T 载体上,转化 *E. coli* JM109。经 Amp 抗性筛选,获得阳性克隆。16S rDNA 测序由上海 SBS 生物科技有限公司完成,将测序结果在 NCBI 中 Blast 后交送 GenBank 库,与数据库已有序列进行比较分析。

2 实验结果

2.1 菌株筛选

样品经处理后利用乳酸菌选择培养基分离出的 138 株菌,采用比色法检测得到了 56 株能够利用 L-谷氨酸转化生成 γ -氨基丁酸的菌株。由表 1 可

知,不同菌株产 γ -氨基丁酸的能力有很大的差别,大部分集中于中等及偏下水平,高水平较少。

表 1 菌株初筛结果

Tab.1 Results of primary bacterial strain screening			
GABA 质量浓度水平	GABA 质量浓度/(g/L)	菌株数	占总菌株数的百分比/%
高水平	> 12	2	3.6
较高水平	9~ 12	0	0
中等水平	6~ 9	1	1.8
中等偏下水平	3~ 6	1	1.8
低水平	0~ 3	52	92.8

通过筛选选取 4 株 γ -氨基丁酸产量相对较高的菌株,添加 5% 的底物进行复筛实验,利用氨基酸测定仪测定各菌株转化液中 GABA 的质量浓度,计算摩尔转化率,其中编号为 01 的菌株 γ -氨基丁酸产量最高达 31.1 g/L ,将其命名为 LP-GB 01,结果见表 2。

表 2 菌株复筛结果

Tab.2 Results of secondary bacterial strain screening		
菌株编号	GABA 产量/(g/L)	摩尔转化率/%
01	31.10	88.78
24	13.83	39.48
41	6.85	19.55
46	4.92	14.05

2.2 菌株 LP-GB 01 生长曲线的测定

按 1.2.2 细菌生长曲线的测定方法,测得菌株 LP-GB 01 生长曲线见图 1。由图 1 可以看出,在培养至 30 h 时,菌体生长开始进入稳定期,培养至 40 h 时,生物量基本达到最大值。

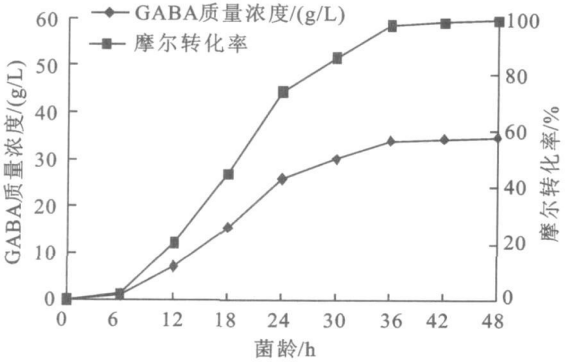


图 1 菌株 LP-GB 01 生长曲线

Fig.1 Growing curve of LP-GB 01

2.3 菌种鉴定

2.3.1 培养特征及形态学鉴定 菌株经筛选得到 1 株产 γ -氨基丁酸相对高的乳酸菌菌株 LP-GB

01, 将其在 MRS 平板培养基上 30 ℃ 培养 24~ 48 h 后的菌落为乳白色, 圆形, 隆起, 表面湿润光滑, 不透明, 边缘整齐。MRS 平板培养乳酸菌细胞经透射电镜(Hitachi H-7000, Honshu, Japan) 观察, 细胞形态呈杆状, 长短不一, 无芽孢, 细胞大小(5~ 7) $\mu\text{m} \times (10\sim 20) \mu\text{m}$, 电镜图片见图 2。

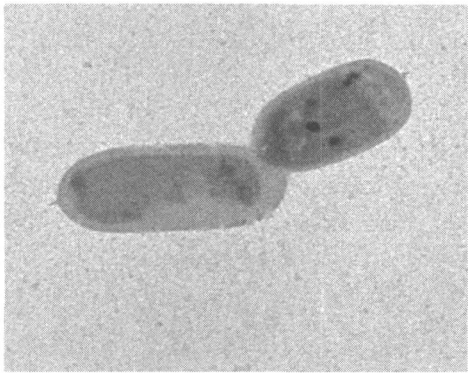


图 2 菌株 LP GB 01 在 MRS 培养基上的细胞电镜图 (5 000× 4 0)

Fig. 2 Microscopic shape of LP GB 01 on the MRS medium(5 000× 4 0)

2 3 2 生理生化特征 对该菌株进行常规生理生化特征鉴定, 结果见表 3。将菌株 LP-GB 01 的生化特征与《常见细菌系统鉴定手册》所列乳酸菌进行比较。结果表明: 菌株 LP-GB 01 与 *Lactobacillus plantarum* 的特征一致, 而与其他乳酸菌均有差异。

表 3 菌株 LP GB 01 的生理生化鉴定结果
Tab. 3 Physiological and biochemical characteristics of LP GB 01

项目	结果	项目	结果
革兰氏染色	+	海藻糖	+
阿拉伯糖	+	蔗糖	+
纤维二糖	+	接触酶	-
果糖	+	氧化酶	-
乳糖	+	硝酸盐还原	-
半乳糖	+	吲哚	-
葡萄糖	+	明胶液化	-
棉籽糖	+	硫化氢	-
山梨糖	+	运动性	-

+ : 阳性; - : 阴性

2 3 3 菌株 16S rDNA 序列分析及分子鉴定 提取菌株 LP-GB 01 细胞总 DNA, 以通用引物扩增菌株的 16S rDNA 部分基因片段约 1.5 kb, 产物片段经纯化, 测序。通过序列分析该片段的 DNA 序列, 将该序列与美国国家生物信息中心(NCBI) 收录的

DNA 序列进行比对, 结果表明其与 *Lactobacillus plantarum* strain EW-p 的 16S rDNA 序列相似性最高, 为 99%, 则其为 *Lactobacillus plantarum* 的一个亚种。

2 4 实验条件初步优化

2 4 1 菌种菌龄对 GABA 转化效率的影响 将菌株 LP-GB 01 接种于种子培养基中, 取不同培养时间得种子液, 经离心收集到的菌体按 1.2.1 中的方法, 添加 5% 底物进行三角瓶转化, 24 h 后取样测定转化液中 GABA 的含量, 结果见图 3。随着菌种培养时间延长, 转化液中的 GABA 质量浓度基本成增长趋势, 其中, 使用菌龄为 0~ 36 h 的时间段内的菌种做转化试验时, GABA 质量浓度的增长幅度较大; 使用菌龄为 36 h 以上的菌种做转化时, GABA 含量趋于平稳。结合图 1 和图 3, 说明菌体生长处于稳定期时, 菌种的转化能力达到最强, 菌龄为 48 h 的菌种的转化液中 GABA 的质量浓度可达到 34.66 g/L。但从生产成本等方面考虑, 培养时间在 36~ 48 h 内, GABA 转化率增长缓慢, 而培养时间越长, 生产成本也随之增加, 所以作者确定 36 h 为该菌种转化生成 GABA 的最适培养时间。

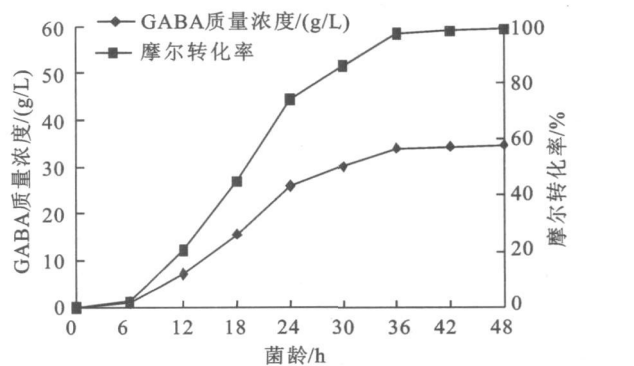


图 3 菌龄对 GABA 转化效率的影响
Fig. 3 GABA transformation efficient as the function of bacterial growth time

2 4 2 转化液 pH 对 GABA 转化效率的影响 将菌株 LP-GB 01 接种于种子培养基中培养至最适菌龄, 种子液经离心收集到的菌体加入到不同 pH 值的醋酸缓冲液中, 添加 5% 底物进行转化实验, 24 h 后取样测定转化液中 GABA 的质量浓度, 结果见图 4。由图 4 可以看出, 随着缓冲液的 pH 增高, GABA 质量浓度也成增长趋势, 但当 pH 超过 4.8 时, 转化率降低, GABA 的质量浓度减少。在缓冲液 pH 为 4.8 时, GABA 转化率达到 97.52%, GABA 质量浓度最高。这说明反应体系的 pH 值对该酶催化反应具有一定的影响作用, 菌株 LP-GB 01 在 pH 4.6~ 5.0 之间具有较高的转化能力, 其中在 pH

4.8 时转化能力最强。但是由于底物 L-谷氨酸为酸性氨基酸,大量的底物添加到醋酸缓冲液时,会使整个转化体系的 pH 值稍稍降低,因此醋酸缓冲液的 pH 值选择范围可以扩大至 4.8~5.0。

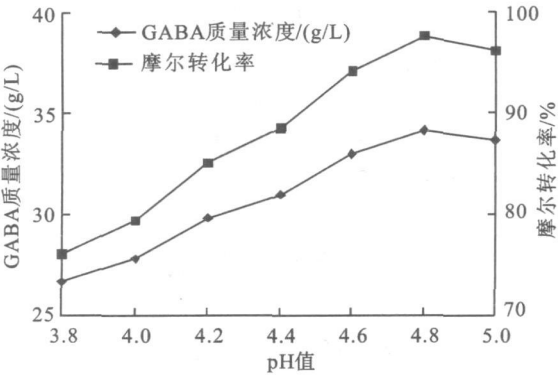


图 4 转化液 pH 值对 GABA 转化效率的影响

Fig. 4 GABA transformation efficient as the function of pH

2.4.3 缓冲液浓度对 GABA 转化效率的影响 将菌株 LP-GB 01 接种于种子培养基中培养至最适菌龄,种子液经离心收集到的菌体加入到不同浓度的 pH 4.8 的醋酸缓冲液中,添加 5% 底物进行转化实验,24 h 后取样测定转化液中 GABA 的质量浓度,结果见图 5。由图 5 可以看出,随着缓冲液的质量浓度的增高,GABA 质量浓度也随之增加,当缓冲液浓度为 0.2 mol/L 时,GABA 质量浓度最高,转化率达到 97.81%,这说明反应体系的盐离子浓度对转化有一定的影响。这种变化可能与溶液的缓冲能力及离子强度有关,高浓度的缓冲液有助于维持酶反应时所需的 pH 值;但过高的醋酸根离子可能会对酶活力有抑制作用,所以从提高转化效率的角度可以选择使用 0.2 mol/L 的缓冲液。但从分离纯化的角度来考虑,0.2 mol/L 的缓冲液中盐离子浓度较高,会给最后的除盐处理带来困难,增加成本,所以此时选择 0.1 mol/L 的缓冲液较为合适。

3 结 语

作者从多种样品中筛选到 56 株能以 L-谷氨酸

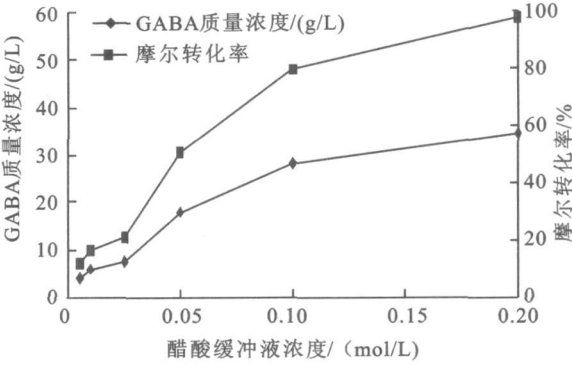


图 5 缓冲液浓度对 GABA 转化效率的影响

Fig. 5 GABA transformation efficient as the function of buffer concentration

为底物合成 γ -氨基丁酸(GABA)的菌株,经过 GABA 定性定量检测,最终得到一株 GABA 转化能力相对较高的菌株 LP-GB 01。将 50 mL 培养 24 h 以上的该菌株菌液离心收集到的菌体经生理盐水处理后,悬浮于 30 mL、0.2 mol/L 的醋酸缓冲液(pH 5.0)中,在底物(L-Glu)为 5% 时,产物 GABA 的转化率达到 88.78%,GABA 质量浓度为 31.1 g/L。经 16S rDNA 序列分析法鉴定发现,该菌株与乳杆菌属中 *Lactobacillus plantarum* strain EW-p 的 16S rDNA 基因序列同源性高达 99%。此结果与常规生理生化鉴定结果相吻合,说明菌株 LP-GB 01 是 *Lactobacillus plantarum* strain EW-p 的一个亚种。

同时,从菌株菌龄、缓冲液 pH、浓度等因素对转化条件进行了初步优化,在菌种培养时间为 36 h、缓冲液 pH 4.8、缓冲液浓度为 0.2 mol/L 的条件下,添加 5% 底物转化 24 h,转化率最高可达 97.81%,GABA 质量浓度为 34.26 g/L。

作者筛到的原始菌株 LP-GB 01 与国内文献报道的原始菌株相比,合成 GABA 能力有很大的优势,与经改良后的菌株合成 GABA 能力相比仍有一定的差距,但可以通过对菌株 LP-GB 01 进行菌种改良及生物转化条件优化等手段,使 GABA 的积累量进一步提高,相关工作正在进行之中。

参考文献(References):

[1] Kumar S, Puneekar N S, SatyaNarayan V, et al. Metabolic fate of glutamate and evaluation of flux through the 4 aminobutyrate (GABA) shunt in *Aspergillus niger*[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 67: 575- 584.
[2] Shelp B J, Bown A W, Mclean M D. Metabolism and functions of gamma aminobutyric acid[J]. *Trends Plant Sci*, 1999, 4: 446- 451.

- [3] 茅原紘, 杉浦友美. 近年の GABA 生理机能研究 脑机能改善作用、高血压作用を中心に [J]. 食品と 开发, 2001, 36(6): 9– 13.
- [4] 岡田忠司. GABA 富化コメ胚芽の生理機能[J]. 食品と 开发, 2001, 36(6): 7– 9.
- [5] Spoerri P E, Srivastava N, Vernadakis A. Ethanol neurotoxicity on neuroblast enriched cultures from three day old chick embryo is attenuated by the neuronotrophic action of GABA [J]. **Int J Devl Neuroscience**, 1995, 13(6): 539– 544.
- [6] 孙佰申. 红曲霉发酵及某些生理活性物质的研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2004.
- [7] 傅元欣, 张涛, 江波. 乳酸菌细胞转化法制备 γ -氨基丁酸的研究[J]. 食品工业科技, 2008, 29(9): 166– 168.
FU Yuan xin, ZHANG Tao, JIANG Bo. Enzymatic conversion for γ aminobutyric acid by *Lactococcus lactis* [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2008, 29(9): 166– 168. (in Chinese)
- [8] 黄俊, 梅乐和. γ -氨基丁酸液体发酵过程的条件优化及补料研究[J]. 高校化学工程学报, 2008, 22(4): 618– 623.
HUANG Jun, MEI Le he. Optimization of γ aminobutyric acid liquid fermentation conditions and its fed batch fermentation [J]. **Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities**, 2008, 22(4): 618– 623. (in Chinese)
- [9] 蒋冬花, 后加衡. 酸菜中高产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选 [J]. 微生物学杂志, 2007, 27(1): 35– 39.
JIANG Dong hua, HOU Jia heng. Screening of γ amino butyric acid high yielding lacto bacteria in pickled vegetable [J]. **Journal of Microbiology Jan**, 2007, 27(1): 35– 39. (in Chinese)
- [10] 刘清, 姚惠源. 生产 γ -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.
LIU Qing, YAO Hui yuan. Studies on screening for γ amino butyric acid producer and optimization of fermentation conditions [J]. **Amino Acids & Biotic Resources**, 2004, 26 (1): 40– 43. (in Chinese)
- [11] 钟环宇, 许建军, 江波. 利用响应面分析法优化 γ -氨基丁酸发酵培养基 [J]. 无锡轻工大学学报(食品与生物技术学报), 2004, 23(3): 19– 22.
ZHONG Huan yu, XU Jian jun, JIANG Bo. Culture medium optimization for γ aminobutyric acid production by response surface analysis [J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry(Journal of Food Science and Biotechnology)**, 2004, 23 (3): 19– 22. (in Chinese)
- [12] Masaru Nomura , Ikuyo Nakajima. *Lactococcus lactis* contains only one glutamate decarboxylase gene [J]. **Microbiology**, 1999 (145) , 1375– 1380.
- [13] 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.
LIU Su chun, HU Mao feng. On isolation and characteristics of lactic acid bacteria from natural fermented meat products [J]. **Food & Machinery**, 2006, 22(2): 62– 65. (in Chinese)
- [14] Hekmat D, Bauer R, Neff V. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi continuous repeated fed batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans* [J]. **Process Biochemistry**, 2006, 42(1): 71– 76.
- [15] 王芳权, 陈蔚青, 陈虹. 比色法快速测定酶转化反应中 γ -氨基丁酸质量分数 [J]. 氨基酸和生物资源, 2006, 28(2): 78– 81.
WANG Fang quan, CHEN Wei qing, CHEN Hong. Rapid determination of γ aminobutyric acid in enzymatic reaction by spectrometric method [J]. **Amino Acids & Biotic Resources**, 2006, 28(2): 78– 81. (in Chinese)
- [16] 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: 289– 292.

(责任编辑: 李春丽)