

菌体转化生成 GABA 菌株筛选、鉴定及发酵条件优化

邱文军, 张涛, 江波*, 缪铭, 沐万孟

(江南大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江苏 无锡, 214122)

摘要: 从酸牛奶和泡菜等 5 个样品中分离到了 23 株菌。通过薄层色谱初筛之后, 再经过 HPLC 复筛, 得到 6 株具有转化谷氨酸钠生成 γ -氨基丁酸(GABA)菌株。对转化量最高的菌株进行生理生化和分子生物学鉴定, 鉴定该菌株为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)。对该菌种的发酵培养基做了部分优化, 得出了以下最佳条件: 碳源为蔗糖(15 g/L), 氮源为复合氮源(25 g/L), 初始 pH 6.2, 添加 1 mmol/L 的 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} , 谷氨酸钠的添加量为 10 g/L。在已优化培养基培养, 最佳菌龄为 20 h。最终 GABA 转化量达到 3.9 g/L。

关键词: γ -氨基丁酸; 菌株; 筛选

中图分类号: TQ 920.1 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)05—0472—08

Screening and Identify of a Strain Producing GABA by Enzymatic Conversion and Optimization of Fermentation Conditions

QIU Wenjun, ZHANG Tao, JIANG Bo*, MIAO Ming, MU Wanmeng

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: 23 strains are isolated from five kinds of yoghurt and pickles. Six strains were obtained by screening comprised approach of TLC and HPLC. The high-yield GABA producing strain S9 was identified as *Lactobacillus plantarum* based on individual form, colony characteristics, physiological and biochemical characteristics and molecular biology features. Optimized fermentation medium is just as below: carbon source is sucrose (15 g/L), nitrogen source is compound nitrogen source (25 g/L), initial pH 6.2, 1 mmol/L Zn^{2+} and Mn^{2+} , monosodium glutamate (10 g/L). Under the condition of the medium before, the best cell age is 20 h. The final GABA conversion is 3.9 g/L.

Keywords: GABA, strain, screening

γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid)作为一种天然的非蛋白组成氨基酸, 在哺乳动物中枢神经系统

中作为抑制性传递物质, 介导了 40% 以上的抑制性神经信号^[1]。GABA 具有很多生理功能, 如降血压、

收稿日期: 2013-10-18

基金项目: 国家 863 计划项目(2013AA102102)。

* 通信作者: 江波(1962—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品化学及应用酶技术方面的研究。

E-mail: bjiang@jiangnan.edu.cn

利尿、预防癫痫、改善睡眠、抗抑郁、改善脑细胞^[2-5]等,因此 GABA 在功能食品中具有广泛的应用前景。

目前生产 GABA 的方法主要有化学合成法、植物富集法和微生物发酵法。研究比较热门的是植物富集法和微生物发酵法。植物富集法主要从糙米、荞麦、精米等^[6-9]谷物中提取,成本高、产率低、具有较大局限性,而微生物具有生长速度快、周期短、生长条件温和和代谢简单等优点,所以微生物发酵法具有成本低、无化学残留、产量高等显著优点,是生产医药以及食品级 GABA 的一条理想途径。目前微生物法主要有乳酸菌^[10]和酵母菌发酵法^[11],主要以乳酸菌为主,乳酸菌作为食品安全菌株,生产的 GABA 具有良好的应用前景和 market 价值。

目前,大部分 GABA 的生产方式以直接发酵法为主,然后从发酵液中分离纯化 GABA。这种生产方法会导致分离纯化难度大,处理步骤复杂。而采用菌体转化法,由于反应体系简单,可以大幅度提高 GABA 纯度,同时后处理简单,生产成本低。

作者从酸奶和泡菜中筛选能够菌体转化生成 GABA 的菌株,并对该菌株进行鉴定,并且对发酵条件进行优化,期望提高 GABA 转化量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪:美国安捷伦公司;pH 计:梅特勒-托利多(上海)有限公司;Eppendorf 5840R 高速离心机:艾本德中国有限公司;ALP 高压灭菌器:日本 ALP 株式会社;所用药品和试剂:均购自中国医药(集团)上海化学试剂公司。

1.2 培养基制备

MRS 液体培养基(g/L):葡萄糖 20,酵母膏 5,牛肉膏 10,蛋白胨 10, K_2HPO_4 2,乙酸钠 5,柠檬酸氢二铵 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.58, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.25;吐温 80 1 mL,pH 6.2。

MRS 固体培养基是在 MRS 液体培养基基础上添加 20 g/L 琼脂。

发酵培养基是在 MRS 液体培养基基础上添加 10 g/L 的诱导物(谷氨酸钠)。

1.3 菌株分离纯化

选择三种市售酸奶和两种酸菜作为菌种来源,放在 30 ℃培养箱内静止 24 h,然后取 20 μ L 适宜

稀释度的培养液涂布于 MRS 琼脂平板,30 ℃ 静置培养 48~72 h。挑取平板上单菌落,并两次划线培养,使菌种纯化。

1.4 菌株的发酵与转化

菌种经两次 MRS 液体培养基活化后,接种发酵培养基中,30 ℃静置培养 24 h,4 000 r/min 离心 10 min,取菌体加入 0.1 倍发酵液体积的 10 g/L 谷氨酸钠溶液(缓冲液为 pH 4.2,0.2 mol/L 乙酸盐缓冲溶液),45 ℃、180 r/min 转化 24 h。转化液 8 000 r/min 离心 10 min,上清液 4 ℃保存备用。

1.5 菌株初筛

薄层层析法,将转化后上清液点样,展开相采用正丁醇:冰醋酸:水(60:15:25),内含 0.4%的显色剂茚三酮,展开结束后自然晾干溶剂,85 ℃显色 10 min,显色结果与标样比较。

1.6 菌株复筛

HPLC 法,上清液加入等体积 10%的三氯乙酸(TCA),振荡均匀,稀释 2~10 倍后,10 000 r/min 离心 10 min,液相检测 GABA 和 Glu 含量。

HPLC 的色谱条件:Agilent ODS 柱,5 μ m,4.0 mm $\times$ 250 mm;流动相 A:称取 15 g 三水合醋酸钠,加水 2 000 mL,再加入 200 μ L 三乙胺,溶解后用冰醋酸调 pH 至 6.2,最后加入 10 mL 四氢呋喃,混匀。流动相 B:称取 30 g 三水合醋酸钠,加水 800 mL,溶解后用冰醋酸调 pH 至 6.2,再加入 1 600 mL 甲醇和 1 600 mL 乙腈溶液,混匀;安捷伦 1200 紫外检测器,检测波长 380 nm。

1.7 目标菌株鉴定

1.7.1 目标菌株的菌落形态和菌体体形态观察 将目标菌株活化后,涂布 MRS 固体培养基平板,30 ℃培养 24 h 后观察菌落形态。将目标菌株革兰氏染色,油镜下观察个体形态。

1.7.2 生理生化特性鉴定 按文献[12]进行细菌生理生化特性的鉴定。

1.7.3 目标菌株 16S rRNA 基因分析 煮沸法提取目标菌株总 DNA^[13],采用 16S rRNA 基因的通用引物进行 16S rRNA-PCR 序列扩增,扩增产物交由中国典型培养物保藏中心进行测序。然后将序列在 www.ncbi.nlm.nih.gov 网站中进行 Blast 比对分析。

1.8 发酵培养基成分优化

1.8.1 碳源和氮源的筛选及质量浓度浓度确定 在发酵培养基的基础上,保持其它成分不变,分别

用不同的碳、氮源取代发酵培养基中的碳、氮源,根据 GABA 的转化量,选取最优的碳源和氮源,同时对碳源和氮源的质量浓度进行优化,并且考察生物量与 GABA 转化量之间的关系。

1.8.2 金属离子, 初始 pH 和诱导物添加量的优化
在已优化的碳源和氮源的发酵培养基的基础上,保持其它成分不变,分别对金属离子,初始 pH 和诱导物添加量进行优化,根据 GABA 的转化量,选取最优的金属离子,初始 pH 和诱导物添加量,并且考察生物量与 GABA 转化量之间的关系。

1.9 最佳菌龄的确定

采用已优化过的发酵培养基进行发酵,选取不同时间点的发酵液,进行菌体转化实验和生物量的测定,根据 GABA 转化量选取最优菌龄。

1.10 生物量的测定

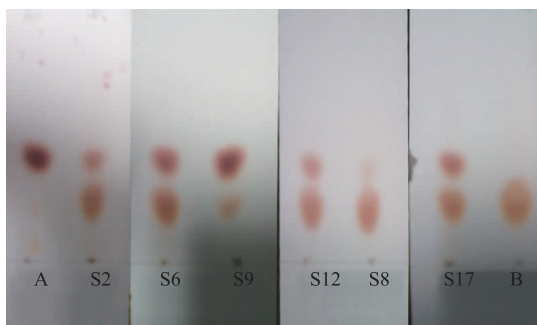
菌体干重: 取发酵液于 1 0000 r/min 离心 10 min 后收集菌体,经蒸馏水洗涤两次后重新离心,去上清液,105 °C 烘箱干燥至恒质量后测定。

2 结果与讨论

2.1 菌株的初筛

从市售三种品牌的酸乳和两种品牌的泡菜中分离纯化出 23 种菌株,经过薄层色谱初筛得到 6 种具有 GABA 转化能力的菌株,其中部分菌株转化液中薄层色谱展开图及质量浓度检测结果见图 1 和表 1。

由图 1 和表 1 可知,S2,S6,S8,S9,S12 和 S17 菌株的转化液中均含有 GABA,其中 S6,S9 和 S17 这三株菌的转化液中 GABA 质量浓度较高,另外 S2,S8 和 S17 这三株菌中的 GABA 质量浓度相对较少。根据薄层色谱结果,需要进一步的定量测量判定各转化液中 GABA 质量浓度。



A:GABA 标样 B:Glu 标样 其他为菌株编号

图 1 部分菌株转化液薄层色谱结果

Fig. 1 TLC result of some strain enzyme conversion

表 1 部分菌株转化液薄层色谱结果

Table 1 TLC result of some strain enzyme conversion

菌株编号	R _f 值		薄层色谱结果
	GABA	Glu	
S2	0.44	0.28	GABA 层析斑点可见,Glu 层析斑点明显
S6	0.45	0.26	GABA 层析斑点明显,Glu 层析斑点明显
S8	0.42	0.28	GABA 层析斑点很轻,Glu 层析斑点明显
S9	0.47	0.26	GABA 层析斑点明显,Glu 层析斑点较轻
S12	0.42	0.24	GABA 层析斑点可见,Glu 层析斑点明显
S17	0.48	0.27	GABA 层析斑点明显,Glu 层析斑点明显
GABA 标样	0.45		GABA 标品层析斑点明显
Glu 标样		0.25	Glu 标品层析斑点明显

2.2 菌株的复筛

将 S2,S6,S8,S9,S12 和 S17 菌株的转化液经过 HPLC 法测量其中的 GABA 和 Glu 质量浓度,结果见图 2。

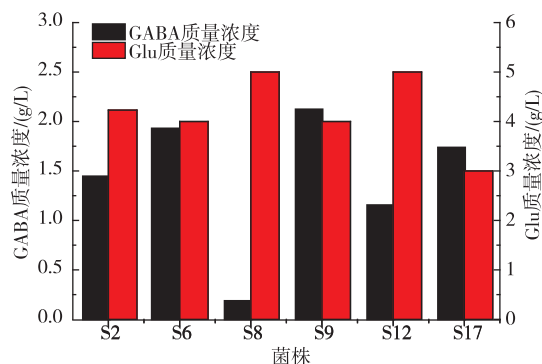


图 2 6 株菌的 HPLC 结果

Fig. 2 HPLC result of the six strains

由图 2 可知,S2,S6,S8,S9,S12 和 S17 菌株转化液均含有 GABA,其中 S9 菌株的转化液中 GABA 的质量浓度最高,达到了 2.2 g/L。各菌株转化液中也含有不同质量浓度的 Glu,并且 GABA 质量浓度和 Glu 的质量浓度并不完全成反比,说明不同菌株利用 Glu 的能力和转化 Glu 生成 GABA 的能力各不相同。最终,根据转化液中 GABA 的质量浓度,选取 S9 为目标菌株。

2.3 目标菌株的鉴定

2.3.1 目标菌株的菌落形态 图 3 为目标菌株的菌落形态,由图 3 可知,该菌株形成的菌落圆形,中等大小,凸起,微白色,湿润,边缘整齐。

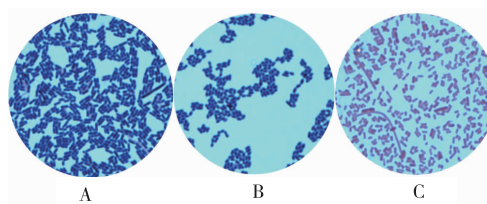


图 3 目标菌株的菌落形态

Fig. 3 Colony characteristics of the target strain

2.3.2 目标菌株的个体形态及革兰氏染色结果

图 4 为目标菌株革兰氏染色之后,在油镜下观察的结果。通过与阳性对照和阴性结果比较可知,目标菌株为革兰氏阳性菌。菌体形态为杆状,不生芽孢。



A:目标菌株;B:阳性对照(乳酸乳球菌);C:阴性对照(大肠杆菌)

图 4 目标菌株革兰氏染色结果

Fig. 4 Result of the target strain's Gram stain

2.3.3 目标菌株的生理生化特性 目标菌株的生理生化特性见表 2。

表 2 目标菌株的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the target strain

	检测项目	结果		检测项目	结果		检测项目	结果		检测项目	结果
A1	水	-	B3	熊果苷	-	C5	D-甘露醇	-	D7	D-核糖	-
A2	α -环糊精	-	B4	D-纤维二糖	-	C6	D-甘露糖	-	D8	水杨苷	-
A3	α -环糊精	-	B5	D-果糖	-	C7	D-松三糖	-	D9	景天庚酮聚糖	-
A4	糊精	-	B6	L-墨角藻糖	-	C8	D-蜜二糖	-	D10	D-山梨醇	-
A5	糖原	-	B7	D-半乳糖	-	C9	α -甲基-D-半乳糖苷	-	D11	水苏糖	-
A6	菊粉	-	B8	D-半乳糖醛酸	-	C10	β -甲基-D-半乳糖苷	-	D12	蔗糖	-
A7	甘露聚糖	-	B9	龙胆二糖 (B16 葡二糖)	-	C11	3-甲基-D-葡萄糖	-	E1	D-塔格糖	-
A8	吐温 40	-	B10	D-葡萄糖酸	-	C12	α -甲基-D-葡萄糖苷	-	E2	D-海藻糖	-
A9	吐温 80	-	B11	α -D-葡萄糖	-	D1	β -甲基-D-葡萄糖苷	-	E3	松二糖	-
A10	N-乙酰基-D 半乳糖胺	-	B12	m-肌醇	-	D2	α -甲基-D-甘露糖苷	-	E4	木糖醇	-
A11	N-乙酰基-D-葡萄糖胺	-	C1	α -D-乳糖	-	D3	6-O-D-吡喃葡萄糖酰-D-呋喃果糖	-	E5	D-木糖	-
A12	苦杏仁苷	-	C2	乳果糖	-	D4	D-阿洛酮糖	-	E6	醋酸	-
B1	L-阿拉伯糖	-	C3	麦芽糖	-	D5	D-蜜三糖(棉子糖)	-	E7	α -羟基丁酸	-
B2	D-阿拉伯糖	-	C4	麦芽三糖	-	D6	L-鼠李糖	-	E8	β -羟基丁酸	-

续表 2

	检测项目	结果		检测项目	结果		检测项目	结果		检测项目	结果
E9	γ - 羟基丁酸	-	F7	琥珀酸单甲酯	-	G5	L-天冬酰胺酸	-	H3	肌苷	-
E10	p-羟基苯乙酸	-	F8	丙酸	-	G6	L-谷氨酸	-	H4	胸苷	-
E11	α-酮戊二酸	-	F9	丙酮酸	-	G7	甘氨酸-L-谷氨酸	-	H5	尿苷	-
E12	α-酮戊酸	-	F10	琥珀酰胺酸	-	G8	L-焦谷氨酸	-	H6	5'-单磷酸腺苷	-
F1	乳酰胺	-	F11	琥珀酸	-	G9	L-丝氨酸	-	H7	5'-单磷酸胸苷	-
F2	D-乳酸甲酯	-	F12	N-乙酰基-L-谷氨酸	-	G10	丁二胺	-	H8	5'-单磷酸尿苷	-
F3	L-乳酸	-	G1	L-丙氨酸胺	-	G11	2,3-丁二醇	-	H9	6-磷酸-D-果糖	-
F4	D-苹果酸	-	G2	D-丙氨酸	-	G12	丙三醇	-	H10	1-磷酸-α-D-葡萄糖	-
F5	L-苹果酸	-	G3	L-丙氨酸	-	H1	腺苷	-	H11	6-磷酸-D-葡萄糖	-
F6	丙酮酸甲酯	-	G4	L-丙氨酰甘氨酸	-	H2	2'-脱氧腺苷	-	H12	D-L-α-磷酸甘油	-

+: 阳性反应; -: 阴性反应

2.3.4 目标菌株 16S rRNA 基因分析 图 5 显示目标菌株与 *Lactobacillus plantarum* 聚在一个分支上, 相似性为 99.86%, 结合细菌形态学观察, 生理生化特性鉴定, 初步可将其定为植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*), 命名为 *Lactobacillus plantarum* SK-30.

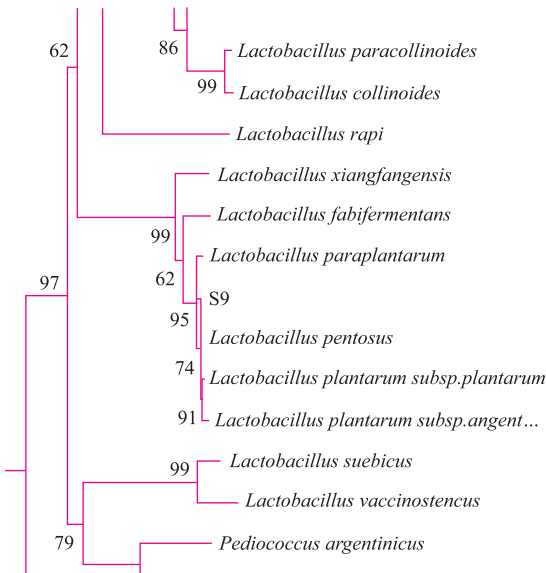


图 5 目标菌株 S9 的系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree of the target strain

2.4 发酵培养基成分的优化

2.4.1 碳源和氮源的优化 不同的碳源和氮源对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生长和转化液中 GABA 质量浓度的影响参见图 6~7 所示。由图 6 可以看出, 蔗糖作为碳源时, 转化液中 GABA 的质量浓度最高, 但是其菌体干重略低于葡萄糖为碳源时的发酵结果, 说明菌体的生物量与转化生成 GABA 的能力并不是完全同步的。这一点从不同蔗糖质量浓度的曲线图中也可以看出, 随着蔗糖的增加, 菌体干重逐渐增加, 但是转化液中 GABA 的质量浓度是先升高后降低的, 最高转化量出现在蔗糖的添加量为 15 g/L, 最终确认最优的碳源为蔗糖, 添加量为 15 g/L。

从图 6 可以看出, 不同的氮源对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生物量和转化液中 GABA 的质量浓度影响较大。其中, 复合氮源为氮源时, 转化液中 GABA 质量浓度最高, 同时菌体干重也较高。单一氮源时, 牛肉膏能有效提高 GABA 的质量浓度但是不能有效增加菌体的生物量; 酵母膏为单一碳源时恰好相反, 能有效增加菌体干重, 但是 GABA 的质量浓度较低。这也能从侧面说明复合氮源的转化液中 GABA 质量浓度较高的原因, 因为复合氮源中既

含有牛肉膏又含有酵母膏,酵母膏有效促进菌体量的增加,牛肉膏促进菌体合成具有 GABA 转化能力的 GAD。最终确定最优氮源为复合氮源,氮源质量浓度为 25 g/L。

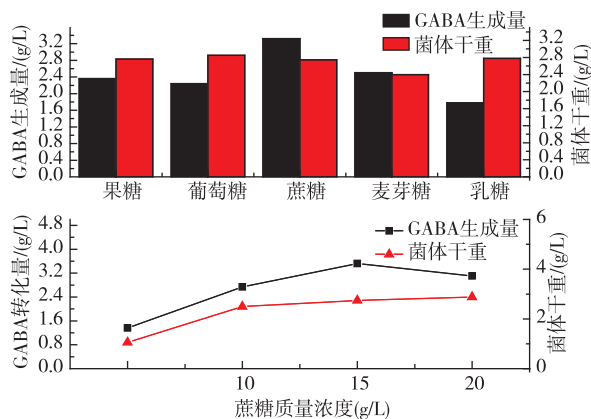


图 6 碳源对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生长和转化液中 GABA 质量浓度的影响

Fig. 6 Effect of carbon source on GABA production and cell growth

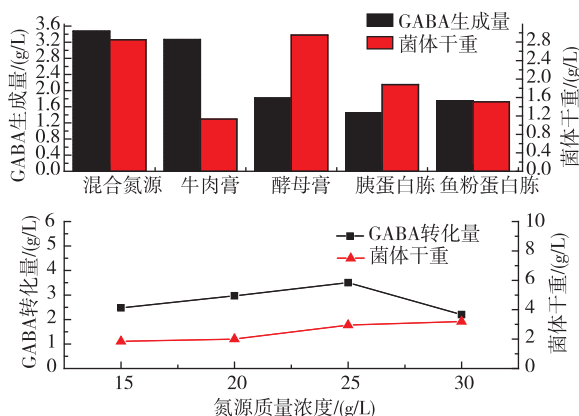


图 7 氮源对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生长和转化液中 GABA 质量浓度的影响

Fig. 7 Effect of nitrogen source on GABA production and cell growth

复合氮源是指 MRS 培养基中的复合氮源,不同的氮源质量浓度是指等比例缩小或扩大复合氮源各组分质量浓度。

2.4.2 金属离子, 初始 pH 和诱导物添加量的优化
金属离子,初始 pH 和诱导物添加量对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生长和转化液中 GABA 质量浓度的影响,见图 8~10。

由图 8 可知,与阴性对照相比 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 能够提高转化液中 GABA 的质量浓度。其中 Zn^{2+} 的加入

对菌体的干重没有影响,但可以提高 GABA 的转化量,可能是由于 Zn^{2+} 能刺激 *Lactobacillus plantarum* SK-30 合成具有转化生成 GABA 的 GAD。 Mn^{2+} 加入后,菌体干重和 GABA 转化量均提高,至少可以说 Mn^{2+} 能够刺激菌体生长,而 GABA 质量浓度的增加有可能是菌体生长导致 GAD 合成量的增加,也有可能是由于 Mn^{2+} 对 GAD 合成分泌具有刺激作用。

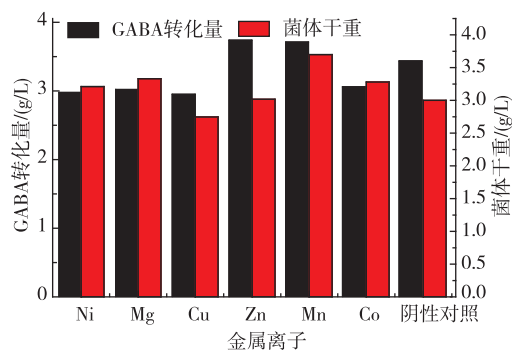


图 8 不同金属离子对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生长和转化液中 GABA 质量浓度的影响

Fig. 8 Effect of metal ions on GABA production and cell growth

由图 9 可知,GABA 的质量浓度随着 pH 的升高,先升高后降低,而菌体干重则是一直升高。在一定范围内,pH 越高,则菌体有足够的 pH 范围生长,因为当 pH 太低时会抑制菌体的生长。而 GABA 的质量浓度则是跟菌体的 GAD 的质量浓度正相关,由于 GAD 是细胞的合成酶,菌体的增加一般会使 GAD 合成增加。另一方面,GAD 的合成可以帮助细胞在在酸性生长环境下维持细胞内的生理 pH,低 pH 会促进 GAD 分泌。所以综合两方面的原因,GABA 的质量浓度随着 pH 的升高,先升高后降低。根据 GABA 的转化量,最终选择初始 pH 6.2。

由图 10 可知,随着诱导物(谷氨酸钠)添加量的增加,GABA 的质量浓度逐渐增加,当诱导物的添加量达到 10 g/L 之后,诱导物的增加不会导致 GABA 转化量的增加,并且诱导物的增加对菌体的干重基本没有影响。是因为谷氨酸钠作为 GAD 的底物,会诱导 GAD 的合成,导致 GABA 质量浓度的增加,到达一定程度后,GAD 不会继续增加,而谷氨酸钠对菌体的生长情况没有任何影响。因此,得到最优的谷氨酸钠添加量为 10 g/L。

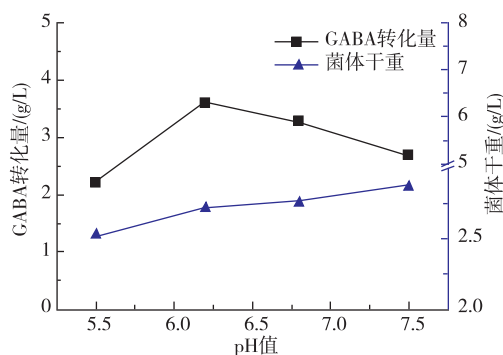


图 9 初始 pH 对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生长和转化液中 GABA 质量浓度的影响

Fig. 9 Effect of initial pH on GABA production and cell growth

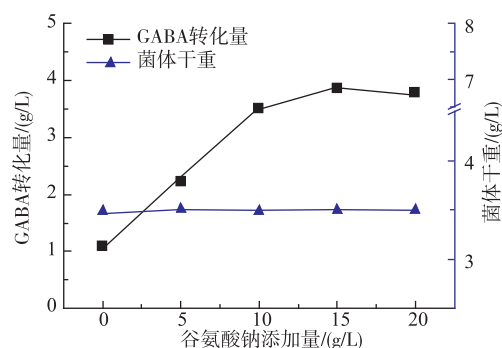


图 10 谷氨酸钠添加量对 *Lactobacillus plantarum* SK-30 的生长和转化液中 GABA 质量浓度的影响

Fig. 10 Effect of monosodium glutamate on GABA production and cell growth

2.5 最佳菌龄的确定

经过对培养基成分优化之后,对不同发酵时间点取样,菌体干重、pH 和 GABA 转化量见图 11。可以看出,在 0~8 h 范围内,菌体干重、pH 和 GABA 转化量基本无变化,菌体处于延滞期;8~18 h,菌体干重迅速增加,pH 迅速降低,同时 GABA 的转化量也迅速增加,菌体处于对数生长期;18 h 之后菌体进入稳定期。GABA 转化量的峰值在 20 h。GABA 转化量处在稳定期的开始,这是由于菌体在稳定期数量达到最大,并且随着 pH 的降低,进一步的诱导 GAD 的合成,促使此时的 GABA 转化量最高。因此

最佳菌龄选为 20 h。

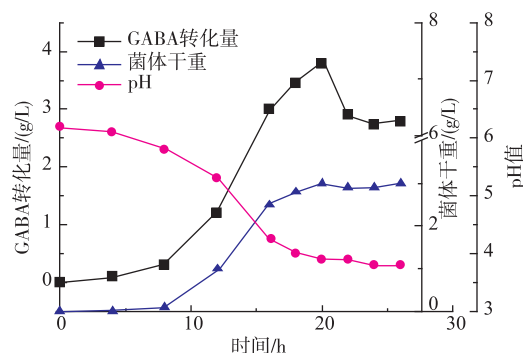


图 11 菌体干重、pH 和 GABA 转化量随时间的变化

Fig. 11 Cell growth, pH and GABA production changes over time

3 结语

从酸奶和泡菜中,经过初筛和复筛,筛选出一株具有高效转化谷氨酸钠生成 GABA 能力的菌株,该菌株为革兰氏阳性无芽孢杆菌,经生理生化特性研究和分子生物学鉴定,该菌株初步鉴定为植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*),命名为 *Lactobacillus plantarum* SK-30。

对该菌株的发酵培养基进行优化,分别对碳源 and 氮源的种类和浓度,金属离子,初始 pH 和谷氨酸钠添加量进行了优化,得到优化过的培养基配方。另外在优化过的培养基的基础上,对培养时间进行了优化,获得了最佳的培养时间。经过这两步优化后,转化液中 GABA 的质量浓度从开始的 2.2 g/L 提高到 3.9 g/L。下一步需要对转化条件和转化时间进行优化,争取进一步提高转化液中 GABA 质量浓度。

在对发酵培养基优化的过程中发现,转化谷氨酸钠生成 GABA 的关键酶 GAD 的质量浓度,受生物量和诱导剂的影响。如做为碳源的蔗糖,除了提供碳源外,对 GAD 也有某种促进作用;氮源中牛肉膏则明显提高 GAD 的活性, Zn^{2+} 也有类似作用。这其中的具体机制还需要进一步的探讨。

参考文献:

- [1] Roberts E, Frankel S. γ -Aminobutyric acid in brain; its formation from glutamic acid [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1950, 187: 55-63.
- [2] Horie H, Rechnitz G A. Enzymatic flow injection determination of gamma-aminobutyric acid [J]. *Analytical letters*, 1995, 28(2): 259-266.

- [3] Leventhal A G. GABA and its agonists improved visual cortical function in senescent monkeys [J]. **Science**,2003,300(5620): 812-815.
- [4] Kazami D,Ogura N,Fukuchi T,et al. Antihypertensive effect of Japanese taste seasoning containing gamma-amino butyric acid on mildly hypertensive and high-normal blood pressure subjects and normal subjects [J]. **Journal-Japanese Society of Food Science and Technology**,2002,49(6):409-415.
- [5] Emrich H M,Zerssen D,Kissling W,et al. Effect of sodium valproate on mania [J]. **Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten**,1980,229(1):1-16.
- [6] 华泽田,刘胜斌,王芳,等. 响应面法优化留胚糯米中积累 γ -氨基丁酸的发芽条件[J]. 食品工业科技,2013,1:216-220.
HUA Zetian,LIU Shengbin,WANG Fang,et al. Research on optimization of GABA content accumulation during the germ-remaining milled rice germination by response surface methodology [J]. **Science and Technology of Food Industry**,2013,1: 216-220.(in Chinese)
- [7] 韩涛,陈野,纪绪前,等. Box-Behnken 法优化发芽糙米富集 γ -氨基丁酸条件研究[J]. 食品研究与开发,2013(2):10-16.
HAN Tao,CHEN Ye,JI Xuqian,et al. Optimization for GABA accumulation in germinated brown rice via box-behnken method [J]. **Food Research and Development**,2013(2):10-16. (in Chinese)
- [8] 蒋静,马涛. 营养液培养糙米发芽富集 GABA 工艺条件优化[J]. 食品工业科技,2013,5:195-199.
JIANG Jing,MA Tao. Technological conditions optimization of GABA enrichment of brown rice germination using nutrient water culture method[J]. **Science and Technology of Food Industry**,2013,5:195-199. (in Chinese)
- [9] 李云龙,胡俊君. 响应面法优化萌发荞麦 γ -氨基丁酸含量的工艺[J]. 中国食品学报,2013,6:123-128.
LI Yunlong,HU Junjun. Optimization of the γ -aminobutyric acid (GABA) increasing technology in buckwheat seed by response surface methodology[J]. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**,2013,6:123-128. (in Chinese)
- [10] 钟环宇,许建军,江波,等. 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,2004,23(3):19-22,50.
ZHONG Huanyu,XU Jianjun,JIANG Bo,et al. Culture medium optimization for γ -aminobutyric acid production by response surface analysis[J]. **Journal of Wuxi University of Light Industry**,2004,23(3):19-22,50.(in Chinese)
- [11] 李亚莉,秘鸣,魏珍珍,等. 一株产 GABA 酵母菌的筛选及鉴定[J]. 食品科技,2013,6:17-21.
LI Yali,MI Ming,WEI Zhenzhen,et al. Screening and identify of a strain producing GABA [J]. **Food Science and Technology**, 2013,6:17-21. (in Chinese)
- [12] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:349-370.
- [13] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,2002:663-667.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第六届国际农业蛋白质组研究前沿论坛

所属学科: 生物物理学、生物化学及分子生物学,细胞生物学

开始日期: 2014-06-23

结束日期: 2014-06-27

所在城市: 黑龙江省 哈尔滨市

具体地点: 翰林天悦大酒店

主办单位: 中国细胞生物学会染色体基因组蛋白质组分会、黑龙江省蛋白质组学学会

承办单位: 黑龙江大学与东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室

摘要截稿日期: 2014-05-20

联系人: 于冰 18249021657

联系电话: 0451-86608243-(分机号码)8318

E-MAIL: 745988718@qq.com

会议网站: <http://210.46.108.117/isapr/>