

高产 γ -氨基丁酸酵母菌的筛选、鉴定及优化

肖婧¹, 徐亚男², 李琦², 张彦位², 刘研², 史学伟^{*2}

(1. 石河子大学 信息科学与技术学院, 新疆 石河子 832000; 2. 石河子大学 食品学院, 新疆 石河子 832000)

摘要: 从新疆特色食品中筛选出能产 γ -氨基丁酸的酵母菌菌株, 并对其发酵条件进行优化。采用非酿酒酵母菌分离纯化的方法分离出非酿酒酵母菌, 再通过初筛、复筛及诱变挑选出高产 γ -氨基丁酸的菌株, 并对其进行形态学及 26S rRNA 基因分析, 最后对菌株产 γ -氨基丁酸的发酵条件进行优化。经 26S rRNA 基因序列分析鉴定为葡萄汁有孢汉生酵母 XYN019 (*H. uvarum* XYN019); 通过紫外诱变产量提高了 2.3 倍, 最佳诱变时间为 30 s, 诱变浓度为 10^{-5} ; 优化后的理论发酵条件为培养温度 33.95 $^{\circ}\text{C}$, pH 值 5.01, 培养时间 49.17 h, 接种量为体积分数 3.17%, 其 γ -氨基丁酸质量浓度达到 4.926 g/L。以上结果表明, 该菌株可作为 γ -氨基丁酸产生菌, 具有较好的 γ -氨基丁酸生产潜力。

关键词: γ -氨基丁酸; 分离筛选; 鉴定; 非酿酒酵母菌

中图分类号: TQ 925.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)10—1093—07

Screening, Identification and Optimizing of γ -Aminobutyric Acid Production in Yeast

XIAO Jing¹, XU Yanan², LI Qi², ZHANG Yanwei², LIU Yan², SHI Xuewei^{*2}

(1. College of Information Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832000, China; 2. College of Food Science, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

Abstract: A strain with capability of producing γ -aminobutyric acid was isolated from the traditional food in Xinjiang and the fermentation conditions were optimized. Non-*Saccharomyce* yeast were isolated and further used to screen the strain with high yield of γ -aminobutyric acid. The isolated strain was identified as *Hanseniaspora uvarum* XYN019 by morphology and phylogenetic analysis based on the 26S rRNA sequence. The activity of amino acid production was 2.3 times higher as compared with the original one by UV mutagenesis. The optimum mutagenesis conditions are with 30s irradiation and 10^{-5} concentration. The better transformation conditions as follows: initial pH 5.01, culture temperature 33.95 $^{\circ}\text{C}$, inoculum size 3.17% and culture time 49.17 h. In this condition, the yielding capacity of GABA by the mutant was 4.926 g/L. These results suggested that the strain can be used to produce γ -aminobutyric acid and has a higher converting capability of GABA.

Keywords: γ -aminobutyric acid, screening, identification, non-*Saccharomyce*

收稿日期: 2015-03-03

基金项目: 新疆生产建设兵团科技攻关项目(P20136500002-1146, 2015AB016, 2016AB009); 新疆生产建设兵团青年科技创新资金项目(DEC_PGUEIK_893341); 新疆生产建设兵团科技攻关与成果转化计划项目(2016AD024)。

作者简介: 肖婧(1982—), 女, 甘肃会宁人, 工学硕士, 讲师, 主要从事生物信息学研究。E-mail: 463091503@qq.com

* 通信作者: 史学伟(1980—), 男, 甘肃会宁人, 工学博士, 副教授, 主要从事酵母菌种遗传研究。E-mail: 1549730027@qq.com

γ -氨基丁酸(γ -Aminobutyric acid, GABA)又称氨酪酸,是一种天然存在的非蛋白质功能性氨基酸^[1],是哺乳动物中枢神经系统中一种重要的抑制性神经递质^[2]。GABA具有多种生理功能,如参与抗心律失常、降血压^[3-4]、改善脑机能、抑制神经递质^[5]、调节心血管^[6-7]、增强记忆、镇静安神^[8]、活化肝肾。自然界中,GABA广泛存在于动植物和微生物中,但在动物和植物中含量较低,不容易被提取,因此微生物发酵是目前生产GABA的主要方式。其中产GABA的菌株主要有乳酸菌、大肠杆菌和酵母菌等。

虽然发酵 γ -氨基丁酸所用菌种中最为常见的是大肠杆菌,但大肠杆菌在安全卫生方面存在极大隐患,制约了 γ -氨基丁酸的生产 and 开发。已有研究发现,一些高安全的微生物,如乳酸菌、酵母菌、曲霉等也具有GAD(谷氨酸脱羧酶)活性,可以进行GAD的提取和GABA的生产,但均存在 γ -氨基丁酸的产量不高等问题。酵母菌因其安全性较高,并且具有较高的营养价值而被广泛应用于食品等工业。酵母菌与食品工艺的关系密切,因此筛选高产GABA的酵母菌株具有较高的经济效益^[9]。通过诱变的方法选育出高产 γ -氨基丁酸的酵母菌株,进行 γ -氨基丁酸的发酵生产,具有重要的意义^[10]。

本试验中通过紫外诱变的方法辅助筛选高产 γ -氨基丁酸酵母菌产生菌株,确定其最优化发酵条件。以便作为食品添加剂原料或直接应用于生产当中,为工业化生产 γ -氨基丁酸提供了基础条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 新疆石河子张裕苹果园腐烂苹果,新疆维吾尔族人自制奶酪,新疆石河子张裕葡萄园葡萄表皮及葡萄园土壤。

1.1.2 培养基

赖氨酸培养基(g/L):赖氨酸 5.6,葡萄糖 10.0, KH_2PO_4 1.0, MgSO_4 0.5, 琼脂 20.0, 121 °C 灭菌 20 min。

酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(g/L):酵母浸粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0。

γ -氨基丁酸筛选培养基(g/L):酵母浸粉 10.0, 蛋白胨 20.0, 琼脂 20.0, 葡萄糖 20.0, 溴甲酚绿 0.001, 乙醛酸 0.02, 琥珀酸 0.02。

1.1.3 仪器 Seven Excellence S400 型 pH 计,梅特

勒托利仪器(上海)有限公司制造;SYQ-DSX-280B 手提式不锈钢电热蒸汽灭菌器,上海申安医疗器械厂制造;Mini-14K 高速离心机,上海昨非实验室设备有限公司制造;数显气浴恒温振荡器,金坛市精达仪器制造厂制造;Power Cycler Gradient SL PCR 仪,德国耶拿分析仪器股份公司制造;IEF-SYS 琼脂糖凝胶电泳仪,英国 Biochrom 有限公司制造;LC98I-3A 氨基酸分析仪,苏州华美辰仪器设备有限公司制造。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离纯化 样品经破碎后进行自然发酵,发酵启动后在整个发酵过程中定期取样,以不同浓度梯度涂布于赖氨酸培养基,28 °C 培养 48 h,划线分离;重复多次直至得到单菌落后,接种于酵母浸出粉胨葡萄糖培养基,28 °C 培养 48 h 后,保存于-80 °C 冰箱。

1.2.2 菌株筛选 活化菌株按体积分数 5% 接种量接种于酵母浸出粉胨葡萄糖培养基中,28 °C, 200 r/min 摇床培养 48 h 后涂布于筛选培养基,28 °C 培养 3 d,观察菌落颜色,能产生 GABA 菌株的菌落显绿色,挑选绿色单菌落保存,备用。

1.2.3 菌株诱变 先开启紫外灯,预热 20 min 以稳定光源。取 5 mL 不同稀释度的菌悬液置于 6 cm 无菌空培养皿中。将培养皿放置于磁力搅拌器上,在 18 W 的紫外灯下,距离 25 cm 处,打开皿盖,在搅拌状态下分别照射不同时间。各取 0.1 mL 菌液于试管中,且试管立即放置在冰浴上 1~2 h,低温条件下细胞内参与突变的各种酶活性受到抑制,使修复难以进行。取 0.1 mL 涂布于酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基平板上,每个稀释度做 3 个重复,28 °C 避光培养,3 d 后统计菌落总数,取平均值,以未经诱变的平板上的菌落数作为参照,计算致死率。

$$D = ((T_n - T_a) / T_n) \times 100\% \quad (1)$$

式(1)中: D 为致死率, T_a 为被处理后的活菌数, T_n 是未被处理的活菌数。

1) 诱变时间的确定:稀释后的菌液分别紫外照射 0.5、10、15、20、25、30 s,取 0.1 mL 涂布于酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基平板上,计算致死率。

2) 诱变浓度的确定:取 0.1 mL 照射后的菌液梯度稀释,将 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 浓度的菌液 0.1 mL 用三角玻璃棒涂布于酵母膏胨葡萄糖琼脂培养基上,然后置于 28 °C 培养箱中保存 3 d,计

算致死率。

以最佳诱变时间和浓度对产 GABA 菌株进行诱变,测定诱变前后 γ -氨基丁酸质量浓度的变化。

1.2.4 定量定性分析

1) γ -氨基丁酸纸层析定性分析:小烧杯盛有约 20 mL 展开剂,置于倒置的层析缸中,用塑料薄膜密封,平衡 30 min;取层析滤纸一张,在纸的下端距边缘 2 cm 处用铅笔划一条直线,在此直线上每隔 2 cm 作一记号;用微量注射器分别取 2 μ L 菌悬液和 γ -氨基丁酸标液,分别点在标记位置上,吹干后再点 2 次,用线将滤纸缝成筒状。将盛有约 20 mL 展开剂的培养皿迅速置于密闭的层析缸中,将滤纸点样端朝下直立于培养皿中。待溶剂上升 15~20 cm 时即取出滤纸,喷茚三酮显色;用电吹风吹干滤纸,使各层析斑点显色,观察试验结果。

2)定量分析:将筛选出的菌株发酵液离心后去上清液,加三氯乙酸终止反应后,离心取上清液 1 mL,用氨基酸自动分析仪精确测定 γ -氨基丁酸质量浓度。

1.2.5 菌株的分子生物学鉴定 采用酵母基因组 DNA 提取试剂盒提取试验菌株 DNA,以所得 DNA 基因组为模板,利用 ITS1 和 ITS4 为引物扩增 ITS 区的基因,PCR 反应体系参照文献[11],将扩增产物送到北京三博远志生物技术有限责任公司测序;将 ITS 序列输入 NCBI (美国国家生物信息中心)的 GenBank 数据库进行比对,分析序列同源性,确定该菌株的分类地位。

1.2.6 高产 γ -氨基丁酸酵母菌株发酵条件的优化

1)温度对酵母菌产 GABA 的影响:分别在培养温度为 20、25、30、35、40、45 $^{\circ}$ C 下培养 72 h,测定发酵液中 GABA 含量,确定最佳培养温度。

2)pH 对酵母菌产 GABA 的影响:分别在 pH 为 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 下培养 72 h,测定发酵液中 GABA 含量,确定最佳 pH 值。

3)接种量对酵母产 GABA 的影响:分别在接种量为体积分数 1%、2%、3%、4%、5%,测定发酵液中 GABA 含量,确定最佳接种量。

4)培养时间对酵母菌产 GABA 的影响:分别在培养时间为 12、24、36、48、60、72 h,测定发酵液中 GABA 质量浓度,确定最佳培育时间。

5)响应面法优化发酵条件:在单因素试验结果的基础上,采用四因素三水平的 Box-Behnken 响应

面试验设计方法,以 pH、温度、培养时间和接种量为考察因素,以酵母菌产 GABA 质量浓度为指标进行优化,确定最适培养条件。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

样品经处理后利用非酿酒酵母菌筛选培养基(赖氨酸培养基),分离出 78 株非酿酒酵母菌,经筛选培养基及纸层析定性分析,得到 4 株产 γ -氨基丁酸酵母菌株。结果见图 1、图 2。

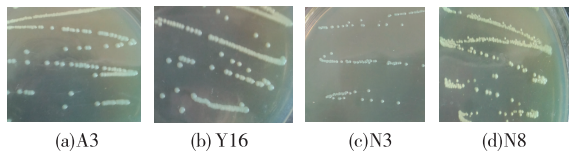


图 1 产 γ -氨基丁酸菌株诱变筛选结果(菌落颜色)

Fig. 1 Screening results γ -aminobutyric acid producing strain mutation

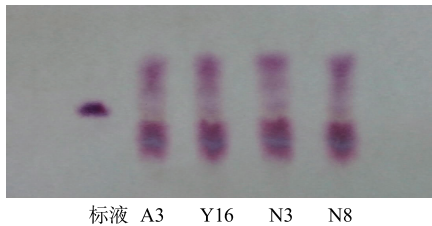


图 2 γ -氨基丁酸纸层析分析结果

Fig. 2 Chromatography paper of GABA

2.2 菌株诱变选育

表 1 菌株诱变选育对 GABA 产量的影响

Table 1 Effect of mutation on GABA

菌株编号	诱变前质量浓度/(g/L)	诱变后质量浓度/(g/L)
A3	1.137	3.456
Y16	1.147	1.918
N3	1.183	3.924
N8	2.354	5.450

经紫外诱变处理后 A3、Y16、N3、N8 四株菌株的 GABA 含量明显升高,其中 N8 菌株含量升高最明显,由此可见,紫外诱变对于菌株 GABA 产量的增加有明显促进作用。

2.3 单因素试验

2.3.1 温度对酵母菌产 γ -氨基丁酸的影响 发酵条件为:250 mL 的摇瓶装液量 25 mL,接种量体积

分数 3%, 摇床转速 200 r/min, pH 7.0。在此条件下将摇瓶分别放在 20、25、30、35、40、45℃ 5 个温度梯度下培养 72 h。测定发酵液中 γ -氨基丁酸质量浓度, 结果见图 3。

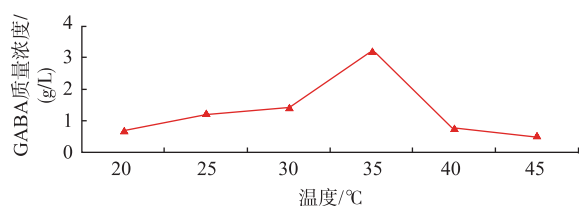


图 3 温度对 GABA 产量的影响

Fig. 3 Influence of temperature in GABA

由图 3 可知, 随着培养温度的增加, GABA 质量浓度先增加后降低, 培养温度为 35℃ 时, GABA 质量浓度达到最高值 3.17 g/L, 菌株最佳发酵温度为 35℃。

2.3.2 pH 值对酵母产 γ -氨基丁酸的影响 发酵条件为: 250 mL 的摇瓶装液量 25 mL, 接种体积分数 3%, 温度 30℃, 摇床转速 200 r/min, 调节摇瓶中的起始 pH 值, 分别在 pH 值 4、4.5、5、5.5、6、6.5 环境下培养 72 h。测定发酵液中 γ -氨基丁酸含量, 结果见图 4。

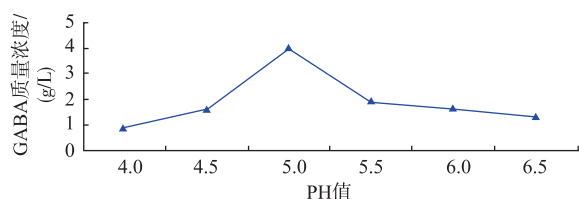


图 4 pH 值对 GABA 产量的影响

Fig. 4 Effect of pH on GABA

由图 4 可知, 随着 pH 的升高, GABA 质量浓度先升高后降低^[11], 说明 pH 值的高低对于菌株产 GABA 有一定影响。在 pH 为 5 时, GABA 质量浓度达到最高值, 菌株最适 pH 值为 5.0。

2.3.3 接种量对酵母产 γ -氨基丁酸的影响 在温度为 30℃, 250 mL 的摇瓶装液量 25 mL, 摇床转速 200 r/min, pH 7.0 条件下, 在摇瓶中加入接种量分别为体积分数 1%、2%、3%、4%、5% 的菌液, 培养 72 h 后, 测定发酵液中 γ -氨基丁酸质量浓度。由图 5 可知, 随着接种量的增加, GABA 质量浓度先增加后降低, 接种量达到 4% 和 5% 时, GABA 质量浓度变化不大, 说明接种量超过体积分数 4% 之后, 对于

GABA 产量影响不大, 菌株最适接种量均为体积分数 3%。

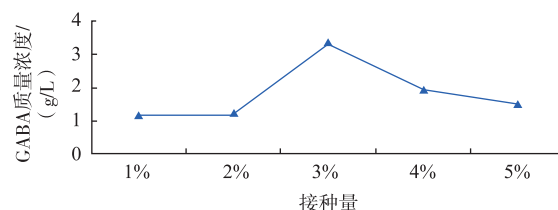


图 5 接种量对 GABA 产量的影响

Fig. 5 Influence of medium volume in GABA

2.3.4 培养时间对酵母产 γ -氨基丁酸的影响 在温度为 30℃, 250 mL 的摇瓶装液量 25 mL、接种量体积分数 3%、摇床转速 200 r/min、pH 7.0 条件下, 分别培养 12、24、36、48、60、72 h, 测定发酵液中 γ -氨基丁酸质量浓度。由图 6 可知, 随着发酵时间的延长, 发酵液中 GABA 的产量不断增加, 在 48 h 前产量增加幅度较大, 但 48 h 后继续培养则 GABA 的产量小幅下降。考虑到发酵时间延长, 生产的周期也相应延长, 势必增加生产成本, 因此实验确定 48 h 作为生产 GABA 的最佳发酵周期^[12]。

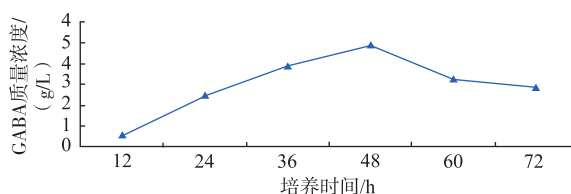


图 6 培养时间对 GABA 产量的影响

Fig. 6 Influence of Incubation time on GABA

2.4 响应面法优化发酵条件

通过测定 GABA 含量, 确定了 GABA 产量较高的菌株 N8, 通过单因素试验确定了试验菌株的最适温度为 35℃, 最适 pH 值为 5, 最适接种量为体积分数 3%, 最适培养时间为 48 h。由此确定四因素三水平试验表, 对高产 GABA 菌株进行四因素三水平响应面试验, 确定最适培养条件。

2.4.1 实验设计模型方差分析 设计的因素水平编码见表 2。按照试验设计每个组合重复试验 3 次, GABA 产量结果取其平均值, 采用 Design-Expert 8.0.0 软件分析试验结果。由表 3 回归模型方差分析结果可以看出, 实验设计模型 $P < 0.0001$, 极度显著, 表明试验设计可靠; 失拟项 $P = 0.5441 > 0.05$, 不显著, 表明所建立的二次回归模型成立, 试验点均能用模型描述。

表 2 GABA 产量 Box-Behnken 设计因素及水平编码

Table 2 Coding and the level of GABA content in Box-Behnken design factors

编码	因素			
	A 温度/℃	B pH	C 培养时间/h	D 接种量/%
-1	33	4.5	43	2
0	34	5	48	3
1	35	5.5	53	4

表 3 回归模型的方差分析和回归系数的显著性检验

Table 3 Analysis of variance for the established regression model and significance test of each regression coefficient

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	17.47	14	1.25	31.52	< 0.000 1	**
A	0.57	1	0.57	14.45	0.002 5	**
B	0.11	1	0.11	2.88	0.115 4	
C	0.99	1	0.99	24.91	0.000 3	**
D	1.17	1	1.17	29.60	0.000 1	**
AB	0.37	1	0.37	9.25	0.010 3	*
AC	0.034	1	0.034	0.86	0.370 8	
AD	0.3	1	0.3	7.64	0.017 1	*
BC	1.60E-003	1	1.60E-003	0.04	0.844 0	
BD	0.22	1	0.22	5.58	0.035 9	*
CD	0.027	1	0.027	0.69	0.423 1	
A ²	8.93	1	8.93	225.49	< 0.000 1	**
B ²	8.98	1	8.98	226.80	< 0.000 1	**
C ²	1.73	1	1.73	43.58	< 0.000 1	**
D ²	3.48	1	3.480	87.85	< 0.000 1	**
残差	0.48	12	0.040			
失拟项	0.41	10	0.041	1.18	0.544 1	
纯误差	0.069	2	0.035			
总误差	17.95	26				

注:* 为显著($P < 0.05$), ** 为极显著($P < 0.01$)

根据表 3 回归模型系数显著性检验结果可知, A、C、D、A²、B²、C²、D² 对 GABA 产量的影响极显著, AB、AD、BD 对 GABA 产量的影响显著, B、AC、BC、CD 对 GABA 产量的影响不显著。GABA 产量影响因素依次为 $D > C > A > B$, 即接种量 > 培养时间 > 温度 > pH。

2.4.2 响应面图形分析 由图 7 温度与 pH 值的交互作用可以看出, 温度为 34 ℃ 时, 随着 pH 的升高 GABA 的含量先增加后降低, 温度为 34 ℃, pH 为 5.0 时 GABA 产量达到最高点, 此时 GABA 质量浓度达到 4.25 g/L。

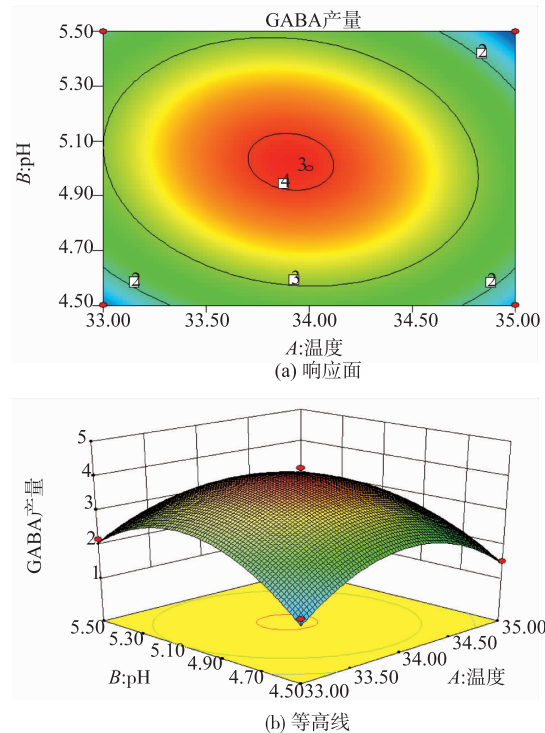
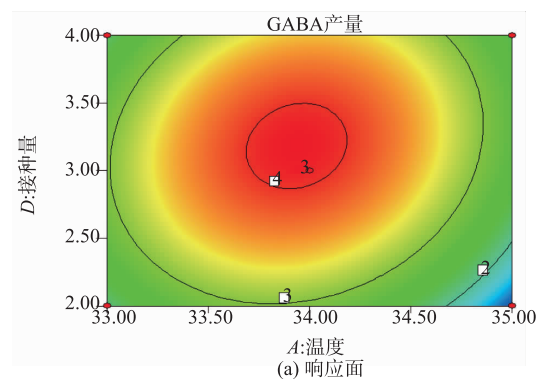


图 7 温度和 pH 两因素及其交互作用响应面和等高线

Fig. 7 Response surface and contour plots showing the effects of three process parameters on the extraction rate of safflower seed meal protein

由图 8 温度与接种量的交互作用可以看出, 温度为 34 ℃ 时, 随着接种量的增加 GABA 的产量先增加后降低, 但是下降幅度不大; 温度为 34 ℃, 接种量为体积分数 3% 时 GABA 产量达到最高点, 此时 GABA 质量浓度达到 4.25 g/L。

由图 9 pH 与接种量的交互作用可以看出, pH 为 5.0 时, 随着接种量的增加 GABA 的产量先增加后降低, 接种量从体积分数 2% 到 3% 上升幅度较大, pH 为 5.0, 接种量为体积分数 3% 时 GABA 产量达到最高点, 此时 GABA 质量浓度达到 4.25 g/L。



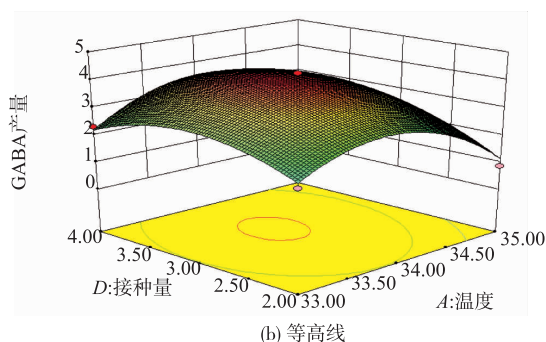


图 8 温度和接种量两因素及其交互作用响应面和等高线
Fig. 8 Response surface and contour plots showing the effects of three process parameters on the extraction rate of safflower seed meal protein

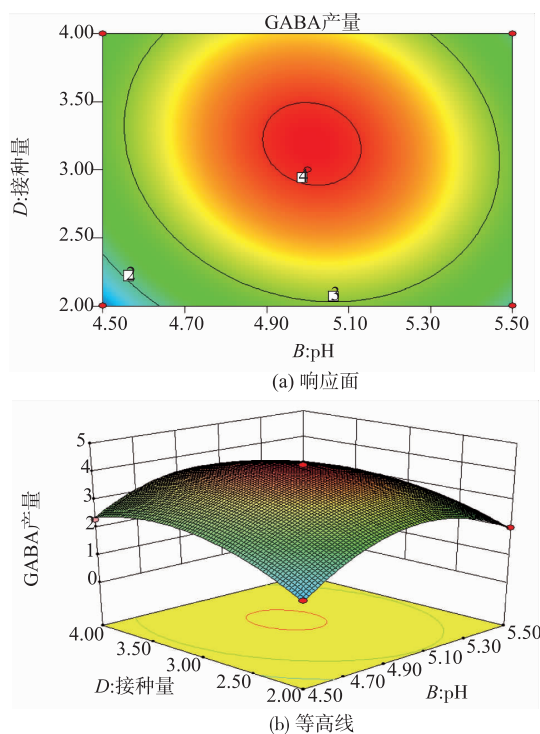


图 9 pH 值与接种量两因素及其交互作用响应面和等高线
Fig. 9 Response surface and contour plots showing the effects of three process parameters on the extraction rate of safflower seed meal protein

2.4.3 模型验证试验 根据模型的响应面图和等高线图可以直观地分析出各自变量之间的关系及显著性,模型分析最佳条件为培养温度 33.95℃,

pH 值 5.01,培养时间 49.17 h,接种量为体积分数 3.17%。将 N8 菌株分别接入经过优化后的最佳条件培养基中,采用比色法测定 GABA 产量。优化后的 GABA 产量为 4.926 g/L,试验值与模型计算值相差+2%,模型对实际发酵的情况可以较好地预测,证明响应面分析法对发酵条件的优化是可行有效的。

3 讨论

目前国内外对于乳酸菌产 γ -氨基丁酸的研究较多,但对于酵母菌的研究较少,诱变选育研究则更是少。通过初筛、复筛及诱变挑选出高产 γ -氨基丁酸的菌株,其中最佳诱变剂量为:最佳诱变时间为 30 s,诱变浓度为 10^{-5} 。经过多次筛选测定菌株 γ -氨基丁酸含量,筛选出高产 γ -氨基丁酸菌株 N8 (*Hanseniaspora.sp*),其 γ -氨基丁酸质量浓度高达 4.55 g/L,比诱变前产量提高了 2.3 倍,说明本次试验方法有效。通过单因素和四因素三水平响应面试验优化菌株最适发酵条件,利用 Design-Expert 软件对 Box-Behnken 设计的实验结果进行回归拟合,得到理论结果:培养温度 33.95℃,pH 值 5.01,培养时间 49.17 h,接种量为体积分数 3.17%,优化后的 γ -氨基丁酸质量浓度也达到了 4.926 g/L,与预测值相差不大,表明优化条件符合要求。比胡超^[10]等报道的酵母产 GABA 量 2.588 g/L 提高很多。

4 结语

酵母菌是重要的微生物资源^[11],在酿造、食品、医药等工业占有重要的地位。各种以酵母为原料或载体的食品和添加剂都得到了很好的推广,其中既有酵母本身的有利条件,也说明了社会对酵母菌这种微生物的认可^[12]。随着 GABA 的生理功能研究不断深入,对 GABA 的研究开发已经成为新的热点。利用微生物自然资源,分离筛选新功能的酵母菌,生产 GABA 功能性食品配料,是一种新的尝试,也有利于微生物资源的开发和利用^[13]。在现今社会,人们对日常的保健和饮食的要求越来越高,必将导致保健食品消费的热潮,因此高产 GABA 的酵母菌株的开发应用将有良好的前景^[14]。

参考文献:

- [1] Barren G C, Elmore D T. Amino acid and peptide[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1998: 165-167.
- [2] 孙晓宇. γ -氨基丁酸高产菌株的选育[D]. 哈尔滨:黑龙江大学, 2011.

- [3] Serraj R, Shelp B J, Sinclair T R. Accumulation of γ -aminobutyric acid in nodulated soybean in response to drought stress[J]. **Physiol Plant**, 199, 102: 79-86.
- [4] Tsuji K, Ichikawa T, Tanabe N, et al. Antihypertensive activities of Beni-Koji extracts and γ -aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats[J]. **Jpn J Nutr**, 1992, 50: 285-291.
- [5] LI Haixing, CAO Yusheng. Lactic acid bacterial cell factories for gamma-aminobutyric acid [J]. **Amino Acids**, 2010, 39(5): 1107-1116.
- [6] Yuan, Zhong, Shi. Znitiation of acrosome reaction in Chinese Hamster sperm by cumulus phorusandmatric [J]. **ActaAnatSin**, 1998, 29: 404-409.
- [7] Tadashi, Tomoko. Effect of the defatted rice geml enriched with GABA for sleepness, depression, autonomic disorddr by oral administration[J]. **Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi**, 2000, 47(8): 596-603.
- [8] Christensen, Greene, Kakuda. Special transport and neurological significance of two amino acids in a configuration conventionally designated as D[J]. **The Journal of Experimental Biology**, 1994, 196: 297-305.
- [9] 徐晓波, 蒋冬花, 李杰. 5株生物合成 GABA 酵母菌株的分离、筛选和鉴定[J]. 微生物学杂志, 2009(1): 55-59.
XU Xiaobo, JIANG Donghua, LI Jie. Isolation, screening and identification of five GABA producing yeast strains [J]. **Journal of Microbiology**, 2009(1): 55-59. (in Chinese)
- [10] 胡超. 高产 γ -氨基丁酸酵母菌株的诱变选育及发酵条件优化[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2008.
- [11] 邱文军, 张涛, 江波, 等. 菌体转化生成 GABA 菌株筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 食品与生物技术学报, 2014(5): 472-479.
QIU Wenjun, ZHANG Tao, JIANG Bo, et al. Screening and identify of a strain producing GABA by enzymatic conversion and optimization of fermentation conditions[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014(5): 472-479. (in Chinese)
- [12] 李亚莉, 秘鸣, 魏珍珍, 等. 1株酵母菌产 GABA 发酵条件的优化[J]. 中国农学通报, 2013, 33: 389-393.
LI Yali, MI Ming, WEI Zhenzhen, et al. GABA production optimization yeast fermentation conditions [J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, 2013, 33: 389-393. (in Chinese)
- [13] LI H X, QIU T, CAO Y S, et al. Pre-staining paper chromatography method for quantification of γ -aminobutyric acid[J]. **Journal of Chromatography A**, 2009, 1216: 5057-5060.
- [14] 乌云达来, 王肇悦, 郭雪娜, 等. 产 γ -氨基丁酸酵母菌的筛选及菌种鉴定[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2013(6): 110-114.
Wuyundalai, WANG Zhaoyue, GUO Xuena, et al. Screening and identification yield γ -aminobutyric acid yeast [J]. **Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Eedition)**, 2013(6): 110-114. (in Chinese)

科技信息

美国规定 2016 年 6 月起婴儿奶粉须含硒

美国食品及药物管理局(FDA)于 2015 年 6 月通过一项最终规则,修订关于婴儿配方奶粉营养规格及标签的规例,要求必须把硒加入所需营养清单,并订立婴儿配方奶粉最低及最高的硒含量。该项最终规则的生效日期已确定为 2016 年 6 月 22 日。《美国食品、药品及化妆品法》规定婴儿配方奶粉必须含有 29 种指定营养,并为各种营养订立最低含量水平,也为其中 9 种营养订立最高含量水平。FDA 最初为婴儿配方奶粉订立营养规格时,未有把硒列为必要营养。其后,硒被认定为一种必要营养,遂于今年 6 月决定把硒列入所需营养清单,并规定婴儿配方奶粉须标明每 100 千卡的硒含量。同时要求婴儿配方奶粉的最低及最高硒含量分别为 2.0 微克/100 千卡和 7.0 微克/100 千卡。

[信息来源]国家质量监督检验检疫总局. 美国规定 2016 年 6 月起婴儿奶粉须含硒 [EB/OL]. (2016-6-22). http://www.aqsig.gov.cn/xxgk_13386/tzdt/gzdt/201606/t20160622_468802.htm