

酵母产 γ -氨基丁酸发酵培养基的优化

胡超[△] 黄丽华 左斌 谢达平

(湖南农业大学生物科学技术学院 湖南 长沙 410128)

摘要 目的:提高酵母产 γ -氨基丁酸的能力。**方法:**采用单因素及正交设计实验对酵母产 γ -氨基丁酸(GABA)的培养基进行优化。**结果:**确定最适碳源为葡萄糖,最佳氮源为蛋白胨和硫酸铵复合氮源,合适的无机盐为 KH_2PO_4 ;最佳发酵培养基为 3%葡萄糖,3%蛋白胨,0.3%(NH_4) $_2\text{SO}_4$ 和 0.1% KH_2PO_4 。在此培养条件下,摇瓶发酵可以获得 1.690 g.L⁻¹ 的 GABA 产量。**结论:**发酵培养基的优化,提高了菌株产 γ -氨基丁酸的能力。

关键词: γ -氨基丁酸;酵母;培养基优化

中图分类号:Q815,TQ920.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)03-482-03

Optimization of Culture Medium for Gamma-aminobutyric Acid Produced by Saccharomyces Cerevisiae Strain

HU Chao, HUANG Li-hua, ZUO Bin, XIE Da-ping

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, 410128, Changsha, China)

ABSTRACT Objective: To improve Gamma-aminobutyric acid (GABA) production by Saccharomyces cerevisiae. **Methods:** The culture medium was researched by single factor and orthogonal experiment. **Results:** The optimum carbon and nitrogen sources were glucose and the mixture of peptone and (NH_4) $_2\text{SO}_4$, the optimal inorganic salt was KH_2PO_4 . The preferable medium was as follows: 3% glucose, 3% peptone, 0.3% (NH_4) $_2\text{SO}_4$, and 0.1% KH_2PO_4 . Under the optimum conditions, the content of GABA reached 1.690 g.L⁻¹. **Conclusion:** The production of GABA was increased under the optimal conditions.

Key words: Gamma-aminobutyric acid; Saccharomyces cerevisiae; Culture medium optimization

Chinese Library Classification: Q815, TQ920.6 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-482-03

γ -氨基丁酸(GABA)是人体和动植物生命活动中一种非常重要的非蛋白质氨基酸。植物抵御逆境胁迫反应及对病、虫害有保卫反应等过程都涉及 GABA 的参与^[1-2]。GABA 作为动物中枢的抑制性神经递质,不仅具有镇静、降血压、抗惊厥等生理作用,在非神经的组织中还能发挥激素或营养因子的功能,对动物机体正常的生理功能起着重要的调节作用^[3]。随着研究的深入,GABA 的生理功能不断得到阐明,现已成为一种新型功能性因子,逐渐被广泛应用于医药、功能性食品及农业等行业^[4-5]。目前,GABA 主要采用微生物发酵生产^[6]。发酵条件直接影响 GABA 的产量。本实验以高产 GABA 的酵母突变株为材料,采用单因素和正交设计实验对菌株产 γ -氨基丁酸的培养基进行了优化,以期提高 GABA 的产率。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

产 GABA 酵母菌株,由湖南农业大学发酵工程实验室提供。

1.2 培养基及培养条件

种子培养基:YEPD 培养基。发酵培养基:以 YEPD 培养基为基础培养基,保持其它成分不变,依次改变培养基的碳源、氮源及无机盐的种类,研究培养基成份对菌株发酵生产 GABA

的影响。将活化的菌株接种于种子培养基中,30℃、200 rpm 培养 2 d 后,以 3%(V/V)接种量接入发酵培养基,装液量 25 mL (250 mL 三角瓶),30℃、200 rpm 培养 3 d。

1.3 GABA 含量测定

发酵液 5000 rpm 离心后,取 3mL 上清液,于 640nm 下测定吸光值。以发酵培养基为空白对照^[7]。

2 结果与分析

2.1 碳源对发酵生产 GABA 的影响

分别以 2%麦芽糖、乳糖、蔗糖和果糖取代 YEPD 中的葡萄糖,考察不同碳源对菌株发酵生产 GABA 的影响,实验结果见表 1。结果表明,不同碳源对菌株发酵有一定的影响。其中葡萄糖作为碳源时,发酵液中 γ -氨基丁酸含量相对较高,所以采用葡萄糖作为发酵培养基的碳源。

表 1 碳源对菌体发酵生产 γ -氨基丁酸的影响
Table 1 Effect of carbon source on the GABA production in fermentation broth of strain

Carbon source	GABA production(g.L ⁻¹)
Glucose	1.011
Maltose	0.897
Sucrose	0.825
Lactose	0.851
Fructose	0.926

作者简介:胡超(1973-),男,硕士,实验师,主要研究方向:微生物发酵
[△]通讯作者:胡超,电话:0731-4617017,E-mail:huchao1281@163.com
(收稿日期:2010-09-18 接受日期:2010-10-13)

2.2 有机氮源对发酵生产 GABA 的影响

以 2%的葡萄糖为碳源，在培养基中分别添加 2%酵母粉、2%蛋白胨、2%尿素、2%牛肉膏，测定发酵液中 GABA 的产量，对培养基氮源进行优化。实验结果表明，有机氮源对菌株发酵生 γ -氨基丁酸有影响(见表 2)。以蛋白胨作为有机氮源时，发酵液中 γ -氨基丁酸含量最高。因此选择蛋白胨为有机氮源。

表 2 有机氮源对菌株产 γ -氨基丁酸的影响
Table 2 Effect of organic nitrogen source on the GABA production in fermentation broth of strain

Organic nitrogen source	GABA production(g.L ⁻¹)
Beef Extract	0.761
Yeast Powder	0.826
Peptone	1.199
Urea	0.534

2.3 无机氮源对发酵生产 GABA 的影响

除有机氮源外，在培养基中分别添加 0.1%硫酸铵、磷酸铵、氯化铵和硝酸铵，比较无机氮源对菌株发酵生产 GABA 的影响。结果显示，在培养中添加无机氮源，发酵液中 γ -氨基丁酸含量提高。其中硫酸铵的影响最大。因此发酵培养基中以蛋白胨和硫酸铵为复合氮源(表 3)。

2.4 无机盐对发酵生产 GABA 的影响

在培养基中分别加入 0.3%KH₂PO₄、MgSO₄、CaCl₂ 和 NaCl，考察无机盐对菌株发酵产 γ -氨基丁酸的影响。结果如表 4

所示。几种无机盐均能不同程度的提高发酵液中 γ -氨基丁酸的含量。其中 KH₂PO₄ 的效果最明显。

2.5 发酵培养基的正交实验

根据以上实验所确定的氮源、碳源和无机盐，采用 L₉(3⁴)正交实验对培养基的整体组成进行优化。因素和水平设计如表 5 所示，实验结果如表 6、7 所示。

表 3 无机氮源对菌株产 γ -氨基丁酸的影响
Table 3 Effect of inorganic nitrogen source on the GABA production in fermentation broth of strain

Inorganic nitrogen source	GABA production(g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.453
(NH ₄) ₃ PO ₄	1.403
NH ₄ Cl	1.386
NH ₄ NO ₃	1.398

表 4 无机盐对菌株产 γ -氨基丁酸的影响
Table 4 Effect of inorganic salt on the GABA production in fermentation broth of strain

inorganic salt	GABA production(g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄	1.601
MgSO ₄	1.543
CaCl ₂	1.501
NaCl	1.497

表 5 正交设计表
Table 5 orthogonal experimental design

factors levels	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
1	2	2	0.1	0.1
2	3	3	0.2	0.2
3	4	4	0.3	0.3

注:A 葡萄糖;B 蛋白胨;C 硫酸铵;D KH₂PO₄
Note: A glucose; B peptone ;C (NH₄)₂SO₄; D KH₂PO₄

表 6 正交实验结果
Table 6 result of orthogonal testing

No	A	B	C	D	GABA production(g.L ⁻¹)
1	1	1	1	1	1.058
2	1	2	2	2	1.166
3	1	3	3	3	1.059
4	2	1	2	3	1.263
5	2	2	3	1	1.687
6	2	3	1	2	1.143
7	3	1	3	2	0.901
8	3	2	1	3	1.077
9	3	3	2	1	0.842

表 7 极差分析表

Table 7 Analysis of range for factors

NO	A	B	C	D
k1	3.283	3.222	3.278	3.578
k2	4.093	3.930	3.271	3.21
k3	2.82	3.044	3.647	3.399
R	1.273	0.886	0.376	0.377

极差分析结果表明(表 7),四个因素对发酵液中 GABA 含量的影响是 A > B > C > D,即培养基中碳源量对 GABA 的生成影响最显著,蛋白胨次之,硫酸铵和 KH₂PO₄ 影响程度相差不大。由表可知四个因素的最佳组合为 A2B2C3D1。在最佳培养基配方条件下连续 3 次发酵,γ-氨基丁酸含量可达 1.690g.L⁻¹。

3 讨论

微生物细胞生长所需的能量、元素及特殊物质,均由培养基提供。同时微生物能把一些原料养分在合适的发酵条件下经特定的代谢途径转变成所需产物。因此培养基中营养物质的种类及其浓度直接影响微生物的生长和发酵。培养基中具有合适的营养物质及其浓度配比时微生物才能生长良好,反之则不能满足微生物正常生长所需,还有可能对微生物生长起抑制作用,例如高浓度糖类物质、无机盐、重金属离子等不仅不能维持和促进微生物的生长,反而起到抑制或杀菌作用^[8]。但由于微生物营养类型复杂,不同微生物对营养物质的需求不一样,因此需要根据不同微生物的营养需求筛选合适的培养基。发酵培养基的优化在微生物产业化生产中占重要地位,是从实验室到工业生产的必要环节。能否设计出一个好的发酵培养基,是一个发酵产品工业化成功中非常重要的一步^[9]。以工业微生物为例,选育或构建一株优良菌株仅仅是一个开始,要使优良菌株的潜力充分发挥出来,还必须优化其发酵过程,以获得较高的产物浓度。本实验采取单因素和正交设计实验优化了酵母发酵生产 GABA 的培养基成份。结果表明,培养基中碳源量对 GABA 的生成影响最显著,蛋白胨次之,硫酸铵和 KH₂PO₄ 影响程度相差不大。最适碳源为葡萄糖,最佳氮源为蛋白胨和硫酸铵复合氮源,合适的无机盐为 KH₂PO₄;最佳发酵培养基为 3%葡萄糖,3%蛋白胨,0.3%(NH₄)₂SO₄ 和 0.1%KH₂PO₄。

参考文献(References)

[1] 蒋振晖,顾振新. 高等植物体内 γ - 氨基丁酸合成、代谢及其生理作用[J]. 植物生理学通讯,2003,39(3): 249-254
Jiang Zhen-hui, Gui Zhen-xin. Biosynthesis, catabolism and physiological roles of γ-aminobutyric acid in higher plants [J]. Plant Physiology Communications, 2003,39(3): 249-254
[2] 田小磊,吴晓岚,张蜀秋,等. γ-氨基丁酸在高等植物逆境反应中的作用[J]. 生命科学,2002,14(4): 215-219

Tian Xiao-lei ,Wu Xiao-lan, Zhang Shu-qiu, et al. Functions of γ-aminobutyric acid in higher plant responses to stress [J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2002,14(4): 215-219
[3] 杨胜远,陆兆新,吕凤霞,等. γ-氨基丁酸的生理功能和研究开发进展[J].食品科学,2005,26(9): 541-546
Yang Sheng-yuan, Lu Zhao-xin, Lu Feng-xia, et al. Research progress on microbial glutamate decarboxylase [J]. Food Science, 2005,26(9): 541-546
[4] 张晖,姚惠源,姜元荣. 富含 γ-氨基丁酸保健食品的研究与开发[J]. 食品与发酵工业,2006,28(9): 69-70
Zhang Hui, Yao Hui-yuan, Jiang Yuan-rong. Development of the health food enriched with γ-aminobutyric acid (GABA) [J]. Food and Fermentation Industries, 2006,28(9): 69-70
[5] 许建军,江波,许时婴. γ-氨基丁酸 - 一种新型的功能食品因子[J]. 食品工业科技,2003,24(1): 109-111
Xu Jiang-jun, Jiang Bo, Xu Shi-ying. Gamma-aminobutyric acid-a novel functional factor for nutraceuticals[J]. Science and Technology of Food Industry, 2003,24(1): 109-111
[6] 白松,林向阳,阮榕生,等.γ-氨基丁酸的分布和制备[J].现代食品科技,2005,21(2): 202-205
Bai Song, Lin Xiang-yang, Ruan Rong-sheng, et al. Preparation to produce GABA [J]. Modern Food Science and Technology, 2005,21 (2): 202-205
[7] 黄丽华,胡超,左斌,等.高产 γ-氨基丁酸酵母菌株的亚硝基胍诱变选育[J].现代生物医学进展,2010,10(6): 1106-1109
Huang Li-hua, Hu Chao, Zuo Bin, et al. Breeding of high-yield GABA Saccharomyces cerevisiae strain by NTG mutagenesis [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2010,10(6): 1106-1109
[8] 石天虹,刘雪兰,刘辉,等.微生物发酵的影响因素及其控制[J].家禽科学,2005,2: 45-48
Shi Tian-hong, Liu Xue-lan, Liu Hui, et al. Influencing factors and their control of microbial fermentation [J]. Poultry Science, 2005,2: 45-48
[9] Kennedy M, Krouse D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999,23:456-475