

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2014.05.007

文章编号:2095-6002(2014)05-0035-06

引用格式:张园林,王昌禄,陈勉华,等.高产 γ -氨基丁酸的红曲霉菌株筛选及发酵条件优化.食品科学技术学报,2014,32(5):35-40.



ZHANG Yuanlin, WANG Changlu, CHEN Mianhua, et al. Screening of high GABA-production by *Monascus* and optimization of its fermentation conditions. Journal of Food Science and Technology, 2014,32(5):35-40.

高产 γ -氨基丁酸的红曲霉菌株筛选及发酵条件优化

张园林, 王昌禄*, 陈勉华, 李风娟, 李贞景, 王玉荣

(天津科技大学 食品工程与生物技术学院/食品营养与安全教育部重点实验室, 天津 300457)

摘要:从实验室保藏的11种红曲霉中,筛选出高产 γ -氨基丁酸的红曲霉CH-1菌株.研究了发酵温度、时间、接种量、谷氨酸钠添加量等发酵条件对红曲霉CH-1产GABA含量的影响.经单因素实验及正交试验后得出红曲霉CH-1发酵大米产 γ -氨基丁酸的较佳发酵条件为:发酵温度30℃,发酵时间9d,接种量17%,谷氨酸钠添加量0.10g,在此条件下,红曲霉CH-1发酵大米产GABA为1.93mg/g,经高效液相色谱检测,桔霉素含量为0.01 μ g/g,低于国家标准1 μ g/g,可利用该产品开发更多形式的红曲食品.

关键词:红曲霉; γ -氨基丁酸; 发酵

中图分类号: TS201.3

文献标志码: A

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质氨基酸,广泛存在于原核生物和真核生物中,在中枢神经系统中是重要的抑制性神经递质^[1-2],具有调节心血管活动、改善脑功能、改善肝肾功能、镇静、提高记忆力等多种生理功能^[3-10]. GABA作为一种新型的功能性因子,广泛用于食品、医药和饲料工业中^[11-14].

目前,GABA的生产方法主要有化学合成法和生物法.化学合成法由于价格昂贵、安全性较低,不适用于在食品、药品等工业中应用.生物法包括植物富集法和微生物发酵法,其中微生物发酵法因其成本低、含量高、安全性好等优点,受到了广泛关注^[2].红曲霉发酵可产生GABA,还能产生其他功能活性物质,如莫纳可林K(Monacolin K)、色素、麦角甾醇等,大多数红曲霉在代谢过程中还可能产生桔霉素,它是一种具有肾毒性的真菌毒素,对人体有害,其含量直接影响红曲产品的安全性^[15-16],因此

在红曲霉发酵过程中也应该注意桔霉素含量.

本研究从实验室现有的11种红曲霉菌株中,筛选出一株高产GABA的红曲霉CH-1,研究了温度、时间、接种量、谷氨酸钠添加量等发酵条件对红曲霉产GABA含量的影响.通过单因素实验和正交试验,优化了高产GABA的最佳发酵条件,为进一步开发红曲霉产品提供参考.

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

1.1.1 菌种

实验室保藏红曲霉菌株:M1, M2, M3, M4, M7, CH-1, CH-2, CH-3, CS-1, CS-2, CS-4.

1.1.2 试剂

乙腈、甲醇(色谱纯),德国CNW公司;GABA标准品(纯度 $\geq 99\%$),桔霉素标准品(纯度 $\geq 99\%$),均为美国Sigma公司生产.

收稿日期:2013-12-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171729).

作者简介:张园林,女,硕士研究生,研究方向为食品生物技术;

*王昌禄,男,教授,博士生导师,主要从事食品生物技术方面的研究.通讯作者.

1.2 培养基及溶液配制

斜面培养基(g/L): 麦芽浸粉 140 g, 琼脂粉 20 g, 121 °C 灭菌 20 min.

种子液培养基(g/L): 葡萄糖 60 g, 蛋白胨 20 g, NaNO₃ 10 g, MgSO₄·7H₂O 5 g, KH₂PO₄ 10 g, 自来水 1 000 mL, 121 °C 灭菌 20 min(试剂均为分析纯).

固体发酵培养基: 大米, 购于天津农贸市场; 将大米经自来水浸泡过夜, 分装入 250 mL 三角瓶中, 每瓶 28 g 原料, 自来水 12 mL, 121 °C 灭菌 20 min.

衍生剂: 邻苯二甲醛(OPA) 80 mg, β-巯基乙醇 80 μL, 甲醇 10 mL(OPA 及 β-巯基乙醇为生化试剂, 甲醇为色谱纯).

硼酸缓冲液: 硼酸 2.47 g, 水 100 mL, 用 NaOH 调 pH 值至 10.4(试剂均为分析纯).

1.3 主要仪器

8453 型紫外可见分光光度计, 美国安捷伦科技有限公司; 1200s 型高效液相色谱仪(配有紫外检测器、荧光检测器和 B.04.03. SPI87 色谱工作站) 美国安捷伦科技有限公司; LRH-250-G II 型微机电脑控制光照培养箱, 广东省医疗器械厂.

1.4 实验方法

1.4.1 红曲霉菌种活化

用接种环从不同红曲霉菌株的试管斜面上各挑取一环孢子, 接入 100 mL 种子液培养基中, 30 °C 180 r/min 培养 36 h 后备用.

1.4.2 菌种筛选

在无菌条件下, 分别将活化后的菌种培养液进行无菌过滤, 计数, 将其浓度调整至 2×10^6 个/mL. 各吸取 5 mL, 接入固体发酵培养基中, 25 °C 培养 5 d, 分别进行取样, 测定其中 GABA 含量, 筛选出产 GABA 含量较高的红曲霉菌株.

1.4.3 GABA 测定方法

1.4.3.1 标准曲线绘制

将浓度为 500 μg/mL 的 GABA 标准水溶液, 稀释成 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL 的标准溶液系列. 以不同 GABA 标准水溶液浓度为横坐标, 以 HPLC 法测定的峰面积数值为纵坐标, 绘图得到 GABA 标准曲线.

1.4.3.2 样品处理

取不同红曲霉发酵样品, 60 °C 烘干至恒重, 粉碎, 过 100 目筛. 准确称取 0.500 0 g 样品, 加入 4 mL 质量分数为 4% 的 TCA 溶液, 30 °C 水浴 2 h, 转至离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 用 TCA 定容

至 5 mL. 吸取 1 mL 经 0.45 μm 滤膜过滤, 经在线衍生(2 μL 样品溶液和 2 μL 衍生剂) 8 min, 立即进行 HPLC 检测.

1.4.3.3 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse AAA (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 采用梯度洗脱, 流动相 A 为纯净水, 1 L, 加 1.6% 醋酸钠(分析纯)调 pH 值为 7.2; 流动相 B 为甲醇: 乙腈: 纯净水 = 45: 45: 10(体积比), 1 L, 加 1.6% 的醋酸钠, 调 pH 值为 7.2; 0 ~ 2 min 流动相 B 为 20%, 2 ~ 18 min 流动相 B 由 20% 上升至 100%, 维持 4 min, 在 22 ~ 26 min 内, 流动相 B 由 100% 降至 20%. 检测器为紫外检测器, 检测波长为 338 nm, 柱温为 25 °C, 流速为 1 mL/min, 进样量为 2 μL.

1.4.4 桔霉素测定方法

1.4.4.1 标准曲线的绘制

将质量浓度为 500 μg/mL 的桔霉素乙腈标准溶液分别配制成质量浓度为 0, 0.05, 0.10, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 g/mL 的标准溶液. 以不同浓度的桔霉素标准水溶液浓度为横坐标, 以 HPLC 法测定的峰面积数值为纵坐标, 绘图得到桔霉素标准曲线.

1.4.4.2 样品处理

取不同红曲霉发酵样品, 60 °C 烘干至恒重, 粉碎, 过 100 目筛. 准确称取 0.500 0 g 样品, 置于 20 mL 离心管中, 加入 8 mL 体积分数 75% 的乙醇, 超声波处理 30 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 重复 3 次, 合并上清液, 定容至 25 mL, 静置 30 min, 经 0.45 μm 滤膜过滤后用 HPLC 法检测桔霉素含量.

1.4.4.3 色谱条件

色谱柱, Agilent TC-C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相为 V(乙腈): V(甲醇): V(水) = 70: 10: 20(用磷酸调 pH 值为 2.66 ~ 2.68); 荧光检测器, 检测波长 $\lambda_{ex} = 331$ nm, $\lambda_{em} = 500$ nm; 柱温 25 °C; 流速 1 mL/min; 进样量 20 μL.

2 结果与讨论

2.1 高产 GABA 的红曲霉菌株的筛选

不同的红曲霉菌株, GABA 的产量不同, 结果如图 1.

由图 1 可以看出不同的红曲霉菌株 GABA 产量多少排序为: CH-1 > CH-2 > CH-3 > M4 > CS-1 > M3 > CS-4 > M1 > CS-2 > M7 > M2, 其中红曲霉 CH-1 产量为

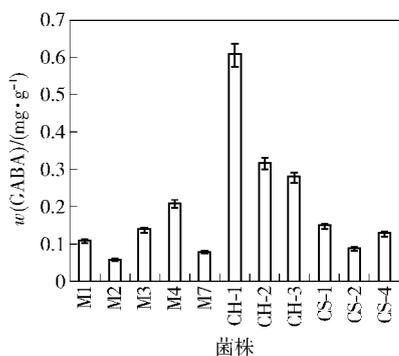


图1 不同红曲霉菌株 GABA 产量

Fig.1 GABA yield of different *monascus*

0.6 mg/g,因此,选择红曲霉 CH-1 菌株继续深入研究.

2.2 发酵条件对 γ -氨基丁酸产量的影响

2.2.1 发酵温度对 γ -氨基丁酸产量的影响

温度是影响红曲霉生长的一个重要因素,向固体发酵培养基中接入质量分数为 15% 已调浓度的红曲霉 CH-1 菌液,分别将其放入 21, 24, 27, 30, 33 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中,7 d 后取样检测,结果如图 2.

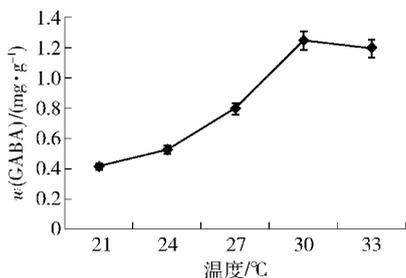


图2 发酵温度对 GABA 产量的影响

Fig.2 Effects of fermentation temperature on GABA yield

由图 2 可知,温度在 21 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$ 时,红曲霉 CH-1 发酵大米产 GABA 的含量随着温度的升高而增加,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 时达到最大,为 1.25 mg/g,即比 21 $^{\circ}\text{C}$ 培养时提高了 2 倍.但发酵温度继续提高,GABA 的产量下降,可能是由于温度过高时发酵过程中的谷氨酸脱羧酶的活性降低,而降低了 GABA 的产量.

2.2.2 发酵时间对 γ -氨基丁酸产量的影响

向固体发酵培养基中分别接入质量分数为 15% 已调浓度的红曲霉菌悬液,将其放入温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中,分别于 3, 6, 9, 12, 15 d 取样检测,研究发酵时间对 γ -氨基丁酸产量的影响,结果如图 3.

由图 3 可知,在红曲霉发酵过程中,从发酵第 3 天到第 9 天过程中,红曲霉 CH-1 发酵大米产 GABA 的含量随着时间的延长而增加,在第 9 天时达到最高,为 1.65 mg/g;随着时间的继续延长,其产量则随

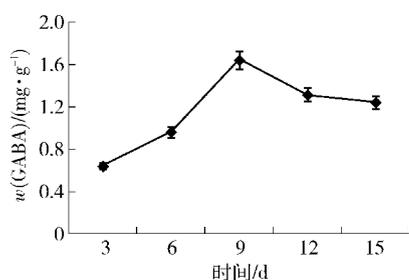


图3 发酵时间对 GABA 产量的影响

Fig.3 Effects of fermentation time on GABA yield

之降低.因此,控制适当的发酵时间,可获得较高的 GABA 产量.

2.2.3 红曲霉接种量对 γ -氨基丁酸产量的影响

向固体发酵培养基中分别接入质量分数为 8%, 11%, 14%, 17%, 20% 已调浓度的红曲霉菌悬液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养,9 d 后取样检测,结果如图 4.

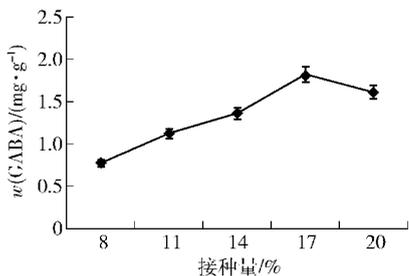


图4 红曲霉接种量对 GABA 产量的影响

Fig.4 Effects of *monascus* inoculum on GABA yield

由图 4 可知,红曲霉接种量对红曲霉 CH-1 产 GABA 影响较大.随着红曲霉接种量的增加,红曲霉 CH-1 发酵大米产 GABA 的含量也随之增加,当接种量为 17% 时,GABA 产量最高,为 1.83 mg/g.随着接种量的继续增大,GABA 的含量略有下降,这可能因为红曲霉接种量较小时,菌种的适应期和对数期会相对延长,处于生长繁殖阶段的菌体的发酵能力较差,导致 GABA 的产量较低;而红曲霉接种量过多时,会造成其发酵时间缩短,降低了 GABA 的含量.考虑到 GABA 的产量及经济成本,最适的红曲霉接种量确定为 17%.

2.2.4 谷氨酸钠添加量对 γ -氨基丁酸产量的影响

红曲霉发酵过程中能产生谷氨酸脱羧酶,可以促使谷氨酸钠转化为 GABA.因此,向固体发酵培养基中分别加入谷氨酸钠的质量为 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 g,接入质量分数为 17% 已调浓度的红曲霉菌悬液,将其放置于温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 的恒温培养箱中,培养 9 d 后取样检测,研究谷氨酸钠添加量对

γ -氨基丁酸产量的影响,结果如图5.

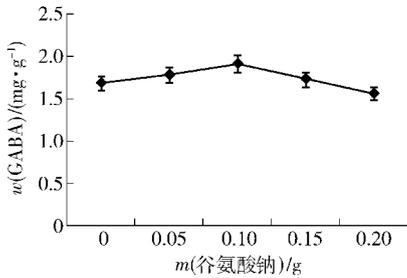


图5 谷氨酸钠添加量对 GABA 产量的影响

Fig. 5 Effects of sodium glutamate content on GABA yield

由图5可知,随着谷氨酸钠添加量的增加,红曲霉 CH-1 发酵大米产 GABA 的含量也随之增加. 在谷氨酸钠添加量为 0.10 g 时,GABA 的含量达到最高,为 1.92 mg/g. 随着谷氨酸钠添加量的继续增大,生成 GABA 量受到抑制,甚至产量下降.

2.3 正交试验结果与分析

根据单因素实验的结果,以发酵温度、时间、红曲霉接种量、谷氨酸钠添加量进行 $L_9(3^4)$ 正交试验,确定红曲霉发酵大米产 GABA 量的最佳发酵参数. 正交试验因素与水平设计见表1.

表1 正交试验设计表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonal design

水平	因素			
	A	B	C	D
	发酵温度/℃	发酵时间/d	红曲霉接种量/%	谷氨酸添加量/g
1	27	6	14	0.05
2	30	9	17	0.10
3	33	12	20	0.15

正交试验结果与分析见表2.

利用正交助手进行分析. 由极差 R 得出,4 个因素对红曲霉发酵大米产 GABA 的含量影响程度由高到低顺序为:发酵温度、发酵时间、红曲霉接种量、谷氨酸添加量,由正交试验 k 值分析可以得知,最优水平为 $A_2B_2C_2D_2$.

正交试验方差分析结果见表3. 从表3可以看出,发酵温度和发酵时间均为显著因素,其中发酵温度的显著性大于发酵时间的显著性. 综合 k 值和正交实验方差分析结果可得,红曲霉 CH-1 发酵大米产 GABA 含量的最佳发酵参数为:发酵温度为 30℃,发酵时间为 9 d,红曲霉接种量为 17%,谷氨酸添加量为 0.10 g

表2 $L_9(3^4)$ 正交试验设计与结果

Tab. 2 Orthogonal design and experimental results

实验号	因素				GABA 质量比/(mg·g ⁻¹)
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.75
2	1	2	2	2	1.45
3	1	3	3	3	0.81
4	2	1	2	3	1.53
5	2	2	3	1	1.84
6	2	3	1	2	1.23
7	3	1	3	2	1.09
8	3	2	1	3	1.12
9	3	3	2	1	0.9
k_1	1.003	1.123	1.033	1.163	
k_2	1.533	1.470	1.293	1.257	
k_3	1.037	0.980	1.247	1.153	
R	0.530	0.490	0.260	0.104	

表3 正交试验方差分析结果

Tab. 3 Anova of orthogonal test

因素	偏差平方和	自由度	F 比	F 临界值	显著性
发酵温度/℃	0.529	2	27.842	19.000	*
发酵时间/d	0.381	2	20.053	19.000	*
红曲霉接种量/%	0.115	2	6.053	19.000	
谷氨酸添加量/%	0.019	2	1.000	19.000	
误差	0.02	2			

* 表示在 0.05 水平上显著相关

2.4 优化后红曲米样品中 GABA 和桔霉素的含量检测

桔霉素作为一种真菌毒素,对人体有害,若其含量超过 0.2 $\mu\text{g/g}$,产品将不能达到国家标准,因此,应检测桔霉素的含量,以保证产品的安全性. 采用正交试验所得最佳条件进行验证实验,对所得样品中 GABA 和桔霉素的高效液相色谱分析结果见图6. 由图6(a)可知,红曲霉样品中 GABA 的保留时间为 16.246 min,含量为 1.93 mg;由图6(b)可知,桔霉素的保留时间为 4.856 min,含量为 0.01 $\mu\text{g/g}$,符合国家标准中规定的桔霉素含量必须低于 1 $\mu\text{g/g}$ 的要求.

3 结论

根据实验得知温度和时间对红曲发酵产 GABA

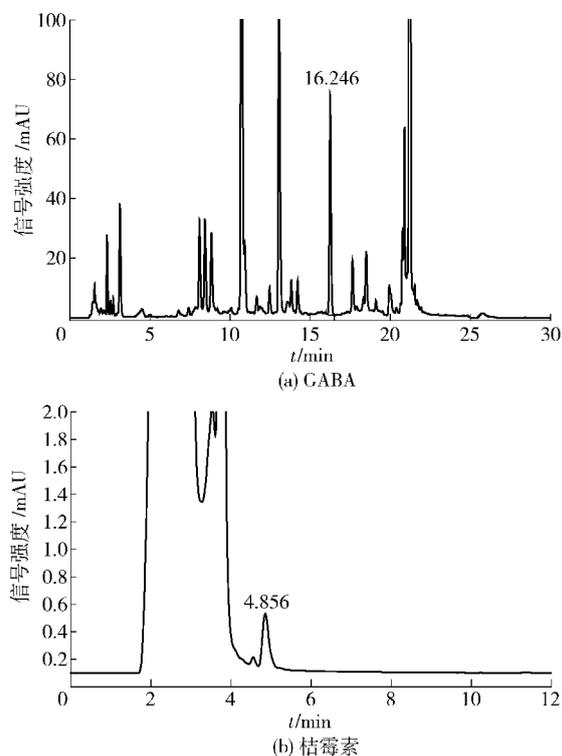


图6 红曲霉样品中 GABA 和桔霉素高效液相色谱图

Fig. 6 HPLC chromatograms of GABA and citrinin in samples

的含量有显著影响,其较佳发酵条件为:红曲霉接种量 17%、温度 30℃、时间 9 d、谷氨酸钠添加量 0.10 g。在此条件下,红曲霉 CH-1 产 GABA 的质量分数为 1.93 mg/g,比优化前提高了 3.22 倍,即可望利用红曲霉 CH-1 进行富含 GABA 功能因子的多种产品研发,也可通过实验选择合适的粗粮如玉米、小米、燕麦等作为发酵基质,进一步提高发酵物的营养价值;目前国内外常见的 GABA 类食品多以饮料为主,因此,在丰富 GABA 类食品种类方面,还需要做大量的研究。

参考文献:

[1] 刘清,姚惠源,张晖. 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.
 [2] 林亲录,王婧,陈海军. γ -氨基丁酸的研究进展[J]. 现代食品科技,2008,24(5):496-500.

[3] 贾红云,彭建中,蒋正尧,等. γ -氨基丁酸对心血管活动的调节[J]. 宁夏医学院学报,1998,20(1):87-89.
 [4] 王姣姣,白卫东,梁彬霞. γ -氨基丁酸的生理功能及富集的研究进展[J]. 农产品加工学刊,2012(1): 40-45.
 [5] 雷娜,鲁亚平. γ -氨基丁酸生理机理研究进展[J]. 清远职业技术学院学报[J]. 2011,4(3):9-11.
 [6] Watanabe M, Maemura K, Oki K, et al. Gamma-aminobutyric acid (GABA) and cell proliferation: focus on cancer cells[J]. Histology and Histopathology, 2006, 21(10):1135-1141.
 [7] Blein S, Hawrot E, Barlow P. The metabotropic GABA receptor: molecular insights and their functional consequences[J]. Cellular Molecular Life Sciences, 2000, 57: 635-650.
 [8] 周小理,赵琳. γ -氨基丁酸的生理功能及在食品中应用的研究进展[J]. 食品工业,2011(10):58-61.
 [9] Inoue K, Shirai T, Qchiai H, et al. Blood-pressure-lowering effect of a novel fermented milk containing γ -aminobutyric acid (GABA) in mild hypertensives [J]. European Journal of Clinical Nutrition, 2003, 57:490-495.
 [10] 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,2002,28(9):69-72.
 [11] Yii Lih Lin, Teng Hsu Wang, Min Hsiung Lee, et al. Biologically active components and nutraceuticals in the *monascus*-fermented rice: a review[J]. Applied Microbiol and Biotechnol, 2008, 77:965-973.
 [12] 逯慎杰,刘秀河. 功能性红曲中功能成分的研究进展[J]. 江苏调味副食品,2011,28(1):17-21.
 [13] 杨华,陈勉华,王婧,等. cAMP 在红曲霉蓝光诱导途径中的作用[J]. 食品科学技术学报,2013,31(1):51-54,59.
 [14] Li Yongguo, Liu Hong, Wang Zhengtao. A validated stability-indicating HPLC with photodiode array detector (PDA) method for the stress tests of *monascus purpureus* fermented rice, red yeast rice[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2005, 39:82-90.
 [15] 李利,陈福生. 红曲菌 GABA 高产菌株的筛选及培养基的研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(30):14956-14957,14960.
 [16] 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,江南大学. GB/T 5009.222—2008 红曲类产品中桔青霉素的测定[S]. 北京:中国标准出版社,2009.

Screening of High GABA-production by *Monascus* and Optimization of its Fermentation Conditions

ZHANG Yuanlin, WANG Changlu*, CHEN Mianhua, LI Fengjuan, LI Zhenjing, WANG Yurong
(College of Food Engineering and Biotechnology/Key Laboratory of Food Nutrition and Safety of Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: To screen high GABA-producing *Monascus* strains from the laboratory, effects of *Monascus* inoculum, temperature, time, and the sodium glutamate content on GABA production were studied. Taking the production of GABA as the index, single factors and the orthogonal experiment were implemented to attain the optimum fermentation conditions, the temperature of *Monascus* CH-1 30 °C, optimum fermentation time nine days, optimum inoculation 17%, and optimum dosage of sodium glutamate 0.10 g. The GABA yield by *Monascus* CH-1 was 1.93 mg/g and the citrinin content was 0.01 µg/g below the national standards. The more forms of red kojic rice food product can be developed.

Key words: *monascus*; γ -aminobutyric acid; fermentation

(责任编辑:叶红波)

(上接第20页)

Cryoprotective Effect of Degraded Konjac Glucomannan on Grass Carp Myofibrillar

WANG Jun¹, WANG Lan¹, CHENG Wei¹, WANG Yu², WU Wenjing¹,
FU Xiaoyan², WANG Shaohua¹, ZHANG Jinmu¹, XIONG Guangquan^{1,*}

(1. Institute of Agricultural Products Processing and Nuclear-agricultural Technology,
Hubei Academy of Agricultural Sciences/Farm Products

Processing Research Sub-center of Hubei Innovation Center of Agriculture Science and Technology,
Wuhan 430064, China;

2. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The cryoprotective effect of degraded konjac glucomannan (KGM) on the grass carp myofibrillar was studied and five degradation methods including acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis (dextranase, cellulase), γ -irradiation hydrolysis, and microwave assisted hydrolysis with hydrogen peroxide were used. The cryoprotective effects of KGM with different degradation products were compared and freezing points were also measured. The results showed that the degradation products of KGM had a cryoprotective effect on the grass carp myofibrillar during the frozen storage. When the amount of degraded KGM (enzymatic hydrolysis, γ -irradiation hydrolysis) was 0.5%, the cryoprotective effect was better than that of commercial cryoprotector. The degraded KGM could decrease the freezing point and enthalpy of water as a new cryoprotector.

Key words: konjac glucomannan; myofibrillar protein; degradation products; cryoprotector

(责任编辑:叶红波)