



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102559552 B

(45) 授权公告日 2014.06.11

(21) 申请号 201210003931.8

(22) 申请日 2012.01.09

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 5584 2011.12.13

(73) 专利权人 天津科技大学

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区第13大街29号

(72) 发明人 高强 高年发 朱燕 陈慧敏

段强 王梦晓

(74) 专利代理机构 天津市杰盈专利代理有限公司 12207

代理人 朱红星

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101538594 A, 2009.09.23, 权利要求1-5.

CN 101333548 A, 2008.12.31, 全文.

CN 1683544 A, 2005.10.19, 全文.

CN 101302480 A, 2008.11.12, 全文.

KR 20110050987 A, 2011.05.17, 全文.

冯宇等. 产  $\gamma$ -氨基丁酸菌株的分离和选育. 《食品与发酵工业》. 2009, 第35卷(第10期), 56-59.

梁金钟等. 从酸菜液中筛选产  $\gamma$ -氨基丁酸的菌株. 《食品科学》. 2011, 第32卷(第23期), 摘要、材料与方法.

Takayoshi TAMURA 等. Establishment of an Efficient Fermentation System of Gamma-Aminobutyric Acid by a Lactic Acid Bacterium, *Enterococcus avium* G-15, Isolated from Carrot Leaves. 《Biol. Pharm. Bull.》. 2010, 第33卷(第10期), ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS, RESULTS.

蒋冬花等. 酸菜中高产  $\gamma$ -氨基丁酸乳酸菌的筛选. 《微生物学杂志》. 2007, 第27卷(第1期), 摘要、材料与方法、结果与分析.

李云等. 产  $\gamma$ -氨基丁酸屎肠球菌的鉴定及其谷氨酸脱羧酶学性质. 《生物技术》. 2010, 第20卷(第1期), 摘要、材料与方法、结果.

审查员 于娜

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种高产  $\gamma$ -氨基丁酸的生产方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种高产  $\gamma$ -氨基丁酸的生产方法及应用, 其中的高产  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA) 生长棉子糖肠球菌 M1, 保藏号为 CGMCC No. 5584。其生产方法包括菌种分离筛选获得一株高产  $\gamma$ -氨基丁酸的 *Enterococcus raffinosus* TCCC 11660 (CGMCC No. 5584) 菌株; 发酵培养基和发酵条件的优化以及 10L 发酵罐实验。此法具有原料低廉、生产能耗低、生产成本低, 产品安全性好、易实现工业化生产等优点。其菌株应用于谷氨酸发酵生产  $\gamma$ -氨基丁酸, 有良好的社会和经济效益潜力。

1. 一种高产  $\gamma$ -氨基丁酸的棉子糖肠球菌 (*Enterococcus raffinosus*) M1, 其在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏号为 :CGMCC No. 5584。

2. 一种采用权利要求 1 所述 CGMCC No. 5584 制备  $\gamma$ -氨基丁酸 GABA 的方法, 其特征在于: 在发酵过程中分为细胞生长和细胞转化两个阶段采取不同的 pH 和通氧控制步骤如下:

(1) 获得种子液: 以 10% 的接种量, 30℃ 静置培养 12h 为一轮活化, 然后将活化 6 轮棉子糖肠球菌以 10% 的接种量接入装有种子培养基的容器内, 30 ~ 40℃ 下在有氧环境下静置培养 10 ~ 20h, 得到种子液; 其中的种子培养基: 蔗糖 10 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母浸出粉 5 g/L, 柠檬酸铵 2 g/L, 硫酸镁 0.58 g/L, 硫酸锰 0.25 g/L, 乙酸钠 2 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L;

(2) 发酵培养: 在发酵罐中倒入培养基, 高压蒸汽灭菌后冷却至 30℃, 将种子液以重量百分比 5 ~ 15% 接种量接种到发酵罐中, 静置、间歇搅拌发酵 60h;

发酵培养基的成分为: 蔗糖 10 ~ 30g/L, 酵母浸出粉 10 ~ 30g/L, 乙酸钠 1 ~ 5g/L, 磷酸氢二钾 2 ~ 5g/L,  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$  0.1 ~ 0.5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 ~ 0.5g/L,  $(NH_4)_2SO_4 \cdot 12H_2O$  0.1 ~ 0.5g/L, 吐温 80 0.1 ~ 0.4mL/L, 初始 pH 5.5 ~ 6.5, 底物 8 ~ 15g/L, 单独灭菌;

(3) 调 pH: 发酵过程中, 初始 pH 为 5.5-6.5 不控制, 添加底物后当 pH 高于 5.5 时开始补酸, 通过补加盐酸保持 pH 在 4 ~ 6; 其中所述的底物为 9% 谷氨酸钠。

3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中添加底物方式为流加底物。

4. 权利要求 1 所述棉子糖肠球菌 M1 在制备生产  $\gamma$ -氨基丁酸方面的应用。

## 一种高产 $\gamma$ -氨基丁酸的生产方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于医药生物与食品工程技术领域,是现代生物和化学工程与传统发酵工程技术的有机结合,对目前采用生物技术生产  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)方法的改进。更具体的说是采用从我国东北酸菜中分离选育的棉子糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*)CGMCC No. 5584 菌株,通过生长细胞的生物转化,高效率地生产  $\gamma$ -氨基丁酸。

### 背景技术

[0002]  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质组成的天然氨基酸,广泛存在于动植物体内。作为中枢神经系统重要的抑制性神经递质,GABA在人脑能量代谢过程中也起到重要作用。它参与多种代谢活动,具有降血压、调节心律失常、改善睡眠、抗焦虑、改善脂质代谢、防止动脉硬化等功效,因此受到越来越多的科学工作者的关注。在日本,这类富含 GABA 的功能性食品的研究取得了较大的进展。大久长范,津志田藤二郎等人分别利用富集技术以糙米、米胚芽、茶叶、大豆等为食品原料成功研制出了 GABA 大米、GABA 茶等产品。

[0003] GABA 的生产方法主要有化学合成、植物富集和生物合成三种。其中化学合成法副产物多,难以纯化,生产成本低,安全性差。植物合成 GABA 虽然工艺简单,但植物富集的 GABA 含量太少,不易提取,不适合工业化生产。生物合成一般以大肠杆菌为菌株,但其存在安全卫生方面的隐患。谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase, GAD, EC4.1.1.15)在生物合成中,是催化谷氨酸脱羧生成 GABA 的唯一酶。谷氨酸已经通过发酵法获得大规模生产,价格相对较为便宜。利用微生物谷氨酸脱羧酶催化谷氨酸脱羧生产 GABA,是一条有效策略。

[0004] 目前已报道的采用乳酸菌生产 GABA 的方法有两种:一是:培养短乳杆菌的同时不断流加底物谷氨酸钠进行发酵,生成积累 GABA。目前国内报道采用此法发酵最高水平为 12g/L。二是:培养并获得大量富含谷氨酸脱羧酶的短乳杆菌细胞,收集此细胞并制成休止细胞,放入含有谷氨酸钠的缓冲液中,在最佳的谷氨酸脱羧酶酶促反应条件下,将谷氨酸转化为 GABA,目前国内外报道生成的 GABA 可达 345.83mM。

### 发明内容

[0005] /L 左右,使得菌体产生的谷氨酸脱羧酶充分发挥作用,达到高效率的生产国际上公认最安全的原料药和保健食品— $\gamma$ -氨基丁酸的目的。

[0006] 因此,本发明的一个目的是公开了高产  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的棉子糖肠球菌 M1,其保藏号为 CGMCC No. 5584。

[0007] 本发明的另一个目的是公开了 CGMCC No. 5584 菌株的制备方法。

[0008] 本发明的再一个目的是公开了采用 CGMCC No. 5584 制备 GABA 的方法。

[0009] 为实现上述目的,本发明提供如下的技术方案:

[0010] 一种高产  $\gamma$ -氨基丁酸的生长棉子糖肠球菌(*Enterococcus raffinosus*)M1,其在

中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏号为 :CGMCC No. 5584。

[0011] 本发明公开的棉子糖肠球菌 *Enterococcus raffinosus* 于 2011 年 12 月 13 号保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,其菌株保藏号为 CGMCC No. 5584。

[0012] 棉子糖肠球菌 *Enterococcus raffinosus* CGMCC No. 5584 所具有的生理、生化特征如下:

[0013] (1) 奥林巴斯双目显微镜观察菌株形态,菌株在梯度平板培养时因产酸而形成透明圈,菌落形态扁平湿润,边缘光滑呈白色不透明状态,镜检观察为链球状,不运动,无孢子,根据革兰氏染色法鉴定为革兰氏阳性细菌,兼性厌氧型。从众多高产菌株中得到一支产 GABA 较高的菌株,命名为菌株 M1,在纸层析实验中,M1 菌株对应的色斑颜色最深,产生的 GABA 的量最多。然后利用液相色谱仪进行定量分析。

[0014] (2) 诱变结果及稳定性试验:

[0015] 本发明的另一个目的是公开了棉子糖肠球菌 M1 CGMCC No. 5584 的制备方法,其特征在于按如下步骤进行:

[0016] (1) 菌株的初步筛选:从我国东北三省 12 个区域自然腌制的酸菜汤中,采用双层平板法,即含有 1% 的碳酸钙和谷氨酸钠,30℃ 培养 48h,挑选在高浓度谷氨酸钠平板上生长且具有透明圈的菌落进行静置发酵,发酵温度 30℃,发酵时间 3d,采用高效液相色谱检测 GABA 含量,筛选出一株产量为 16.95g/L 的棉子糖肠球菌,编号为 M3,转接在斜面上于 4℃ 冰箱保藏;

[0017] (2) 菌株的再次筛选:复筛同样采用双层平板法,将 M3 从斜面挑两环至种子培养基中,其中的种子培养基 (g/L):蔗糖 10,蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,柠檬酸铵 2,硫酸镁 0.58,硫酸锰 0.25,乙酸钠 2,磷酸二氢钾 2;30℃ 培养 24h,然后涂于含有 1% 的碳酸钙和  $\gamma$ -氨基丁酸复筛平板上,30℃ 培养 48h,挑选在高浓度  $\gamma$ -氨基丁酸平板上生长且具有透明圈的菌落进行静置发酵,发酵温度 30℃,发酵时间 3d,采用高效液相色谱检测 GABA 含量,筛选出一株产量为 24.68g/L 的棉子糖肠球菌,编号为 M2,转接在斜面上于 4℃ 冰箱保藏;

[0018] (3) 将种子培养基中的菌株培养液以 10%(v/v) 接种量转接于驯化培养基(I)中,在 30℃ 下,160r/min 摇床培养 12h,再转接于驯化培养基(II)中,最后经过分离纯化培养,获得单菌落,然后进行静置发酵,发酵温度 30℃,发酵时间 3d 选取高产菌株;

[0019] 其中的驯化培养基(I)(g/L):玉米糖化液 10,蛋白胨 10,酵母浸出粉 15,微量元素液 15mL,谷氨酸(Glu)60;其中微量元素液指的是含有氯化钠 1mg/mL,硫酸亚铁 1mg/mL,硫酸锰 1mg/mL 的溶液;

[0020] 驯化培养基(II)(g/L):葡萄糖 15,酵母粉 20,蛋白胨 10,谷氨酸 70;

[0021] (4) 高产  $\gamma$ -氨基丁酸菌株的获得:利用复筛平板纯化后的菌株中筛选得到一株  $\gamma$ -氨基丁酸菌株(GABA),记为 M1 菌株,转接在斜面上于 4℃ 冰箱保藏。

[0022] 其中步骤(4)中的分纯指的是:将高产菌株在种子培养基中进行液体静置培养,培养温度 30℃,培养时间 12h,并取 1mL 培养液将其稀释成  $10^{-7} \sim 10^{-9}$  后涂布于平板上,30℃ 培养 1~2d,观察菌落形态和革兰氏染色形态,结果,记录并拍照。

[0023] 本发明再一个目的是公开了采用 CGMCC No. 5584 制备  $\gamma$ -氨基丁酸 GABA 的方法,它是在发酵过程中分为细胞生长和细胞转化两个阶段,采取不同的 pH 和通氧控制步骤如下:

[0024] (1) 获得种子液:以 10% 的接种量,30℃ 静置培养 12h 为一轮活化,然后将活化 6 轮棉子糖肠球菌以 10% 的接种量接入装有种子培养基的容器内,30~40℃ 下在有氧环境下静置培养 10~20h,得到种子液;其中的种子培养基(g/L):蔗糖 10,蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,柠檬酸铵 2,硫酸镁 0.58,硫酸锰 0.25,乙酸钠 2,磷酸二氢钾 2;

[0025] (2) 发酵培养:在发酵罐中倒入培养基,高压蒸汽灭菌后冷却至 30℃,将种子液以重量百分比 5~15% 接种量接种到发酵罐中,静置、间歇搅拌发酵 60h;

[0026] 发酵培养基的成分为:蔗糖 10~30g/L,酵母浸出粉 10~30g/L,乙酸钠 1~5g/L,磷酸氢二钾 2~5g/L, $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$  0.1~0.5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1~0.5g/L, $(NH_4)_2SO_4 \cdot 12H_2O$  0.1~0.5g/L,吐温 80 0.1~0.4mL/L,初始 pH5.5~6.5,底物 8~15g/L,单独灭菌;所述添加底物方式为流加底物。

[0027] (3) 调 pH:发酵过程中,初始 pH 为 5.5~6.5 不控制,添加底物后当 pH 高于 5.5 时开始补酸,通过补加盐酸保持 pH 在 4~6;其中所述的底物为 9% 谷氨酸钠或 9% 谷氨酸钠和谷氨酸的混合物。其中所述的 9% 谷氨酸钠和谷氨酸的重量份数比为 L-MSG/L-Glu=4:1~6:1。

[0028] 本发明生产高产  $\gamma$ -氨基丁酸的特点:

[0029] (1) 采用代谢控制发酵理论并结合乳酸细菌的特性,设计筛选选育高产 GABA 的分离平板,高效率地选育出高效的 GABA 产生菌—棉子糖肠球菌 (*Enterococcus raffinosus*)。

[0030] 经天津市疾病预防控制中心检测(受理编号 2011WT-QT-0093):

[0031] 检验项目:小鼠急性经口毒性试验

[0032] 检测结果:动物染毒后,未见明显中毒表现,观察期内无死亡,尸检中各主要脏器未见明显异常。

[0033] 检测结论:本品的小鼠急性经口毒性  $LD_{50} > 20.0 / g / kg. BW$ 。按《食品安全性毒理学评价程序和方法》(GB15193.3-2003),本品属于无毒。

[0034] 稳定性试验:将此实验方案设重复 5 次,平均产量均稳定在 25g/L 以上。

[0035] M1 菌株经细菌生理生化试验和 16S rDNA 测序鉴定为 *Enterococcus raffinosus* CGMCC No. 5584。

[0036] (2) 采用现代发酵技术,充分利用和发挥 *Enterococcus raffinosus* CGMCC No. 5584 的活力,用生长细胞发酵的方法进行 GABA 生产。

[0037] 本发明采用棉子糖肠球菌 M1 (其保藏号为 CGMCC No. 5584) 生产高产  $\gamma$ -氨基丁酸的优点和有益效果在于:

[0038] 1、本发明是现代生物医药、保健食品和传统发酵工程技术的有机结合,大量、低成本地制备  $\gamma$ -氨基丁酸。GABA 是哺乳动物、甲壳类动物、昆虫和某些寄生蠕虫神经系统中重要的抑制性神经递质。它具有改善脑机能、延长记忆力、改善视觉功能、镇静神经、降血压、改善肝功能、活化肾功能等重要的生理功能。被开发为降血压、治疗癫痫、抗焦虑与抗惊厥、抗心律失常、调节激素的分泌及其生殖生理等药物中间体,GABA 也可以制成保健营养品以及食品及饲料添加剂。

[0039] 2、本发明选育出高产 GABA 的棉子糖肠球菌 *Enterococcus raffinosus* CGMCC No. 5584 采用微生物厌氧发酵 GABA。具有采用原料低廉、生产中能耗低,生产成本低、易实现工业化生产等优点,具有良好的社会和经济效益。

[0040] 附图说明：

[0041] 图 1 为 10 株乳酸菌菌株发酵液中 GABA 产生的层析结果；

[0042] 图 2 为菌株 M1 菌落和菌体细胞形态 ( $\times 1000$ )，菌株 M1 在 MRS 平板上生长 24h，菌落直径 1~2mm，菌落白色，表面光滑隆起、呈圆形、菌落边缘整齐；革兰氏染色观察，细胞呈卵圆形，大多数呈对排列或短链排列，极少见呈长链，革兰氏阳性，无芽孢，菌体直径约为  $1\ \mu\text{m}$ ；极少见呈长链，革兰氏阳性，无芽孢，菌体直径约为  $1\ \mu\text{m}$ 。

[0043] 具体实施方式：

[0044] 下面结合实施例说明本发明，这里所述实施例的方案，不限制本发明，本领域的专业人员按照本发明的精神可以对其进行改进和变化，所述的这些改进和变化都应视为在本发明的范围内，本发明的范围和实质由权利要求来限定。其中微量元素液指的是含有氯化钠 1mg/mL，硫酸亚铁 1mg/mL，硫酸锰 1mg/mL 的溶液；另外实施例中所用到的试剂除特别说明外，其它均有市售。

[0045] 实施例 1

[0046] 棉子糖肠球菌菌株 M1 (CGMCC No. 5584) 的获得

[0047] (1) 菌株的初步筛选：从我国东北三省 12 个区域自然腌制的酸菜汤中，采用双层平板法，即含有 1% 的碳酸钙和谷氨酸钠， $30^{\circ}\text{C}$  培养 48h，挑选在高浓度谷氨酸钠平板上生长且具有透明圈的菌落进行静置发酵，发酵温度  $30^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 3d，采用高效液相色谱检测 GABA 含量，筛选出一株产量为 16.95g/L 的棉子糖肠球菌，编号为 M3，转接在斜面上于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保藏；

[0048] (2) 菌株的再次筛选：复筛同样采用双层平板法，将 M3 从斜面挑两环至种子培养基中，其中的种子培养基 (g/L)：蔗糖 10，蛋白胨 10，酵母浸出粉 5，柠檬酸铵 2，硫酸镁 0.58，硫酸锰 0.25，乙酸钠 2，磷酸二氢钾 2； $30^{\circ}\text{C}$  培养 24h，然后涂于含有 1% 的碳酸钙和  $\gamma$ -氨基丁酸复筛平板上， $30^{\circ}\text{C}$  培养 48h，挑选在高浓度  $\gamma$ -氨基丁酸平板上生长且具有透明圈的菌落进行静置发酵，发酵温度  $30^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 3d，采用高效液相色谱检测 GABA 含量，筛选出一株产量为 24.68g/L 的棉子糖肠球菌，编号为 M2，转接在斜面上于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保藏；

[0049] (3) 将种子培养基中的菌株培养液以 10%(v/v) 接种量转接于驯化培养基 (I) 中，在  $30^{\circ}\text{C}$  下，160r/min 摇床培养 12h，再转接于驯化培养基 (II) 中，最后经过分离纯化培养，获得单菌落，然后进行静置发酵，发酵温度  $30^{\circ}\text{C}$ ，发酵时间 3d 选取高产菌株；

[0050] 其中的驯化培养基 (I) (g/L)：玉米糖化液 10，蛋白胨 10，酵母浸出粉 15，微量元素液 15mL，谷氨酸 (Glu) 60；其中微量元素液指的是含有氯化钠 1mg/mL，硫酸亚铁 1mg/mL，硫酸锰 1mg/mL 的溶液；

[0051] 驯化培养基 (II) (g/L)：葡萄糖 15，酵母粉 20，蛋白胨 10，谷氨酸 70；

[0052] (4) 高产  $\gamma$ -氨基丁酸菌株的获得：利用复筛平板纯化后的菌株中筛选得到一株  $\gamma$ -氨基丁酸菌株 (GABA)，记为 M1 菌株，转接在斜面上于  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱保藏。分纯指的是：将高产菌株在种子培养基中进行液体静置培养，培养温度  $30^{\circ}\text{C}$ ，培养时间 12h，并取 1mL 培养液将其稀释成  $10^{-7} \sim 10^{-9}$  后涂布于平板上， $30^{\circ}\text{C}$  培养 1d，观察菌落形态和革兰氏染色形态，结果，记录并拍照。

[0053] 实施例 2

[0054] 采用棉子糖肠球菌菌株 M1 (CGMCC No. 5584) 生产 GABA

[0055] 将活化后的 *Enterococcus raffinosus* CGMCC No. 5584 菌株接种于种子培养基中培养,活化步骤如下:将 M1 从斜面挑两环至种子培养基中,其中的种子培养基 (g/L):蔗糖 10,蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,柠檬酸铵 2,硫酸镁 0.58,硫酸锰 0.25,乙酸钠 2,磷酸二氢钾 2; ,30℃ 静置培养 24h,待菌体量达到发酵条件时转接入发酵培养基。

[0056] 种子培养基 (g/L) 及培养方法:蔗糖 10,蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,柠檬酸铵 2,硫酸镁 0.58,硫酸锰 0.25,乙酸钠 2,磷酸二氢钾 2。种子培养条件:30℃ 培养箱,静置培养 12h。按照 10 ~ 15% 的接种量接入到 10L 发酵罐中。

[0057] 发酵培养基 (g/L) 及培养方法:蔗糖 20,酵母浸出粉 15,乙酸钠 2,磷酸氢二钾 2,硫酸铝 0.3,硫酸镁 0.4,硫酸铵 0.2,吐温 80 0.2mL。控制发酵罐培养温度为 30℃,初始 pH 为 6.0。通风 12h,通风量为 0.5L/min,6h 左右的 pH 降为 5.0,此时控制 pH,不要继续下降,补加浓度为 9% 的底物谷氨酸钠 8g/L。发酵 58h 后底物全部转化为 GABA,产量为 47.83g/L。

[0058] 实施例 3

[0059] 采用棉子糖肠球菌菌株 M1 (CGMCC No. 5584) 生产 GABA

[0060] 将活化后的 *Enterococcus raffinosus* CGMCC No. 5584 菌株接种于种子培养基中培养,待菌体量达到发酵条件时转接入发酵培养基。

[0061] 种子培养基 (g/L) 及培养方法:蔗糖 10,蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,柠檬酸铵 2,硫酸镁 0.58,硫酸锰 0.25,乙酸钠 2,磷酸二氢钾 2。种子培养条件:30℃ 培养箱,静置培养 12h。按照 10 ~ 15% 的接种量接入到 10L 发酵罐中。

[0062] 发酵培养基 (g/L) 及培养方法:蔗糖 20,酵母浸出粉 15,乙酸钠 2,磷酸钾 2,硫酸铝 0.3,硫酸镁 0.4,硫酸铵 0.2,吐温 80 0.2mL。控制发酵罐培养温度为 30℃,初始 pH 为 6.0。通风 12h,通风量为 0.5L/min,6h 左右的 pH 降为 5.0,此时控制 pH,不要继续下降,9% 的底物按照 L-MSG/L-Glu=5 :1 (重量份数比)加入。发酵 58h 后底物全部转化为 GABA,产量为 54.98g/L。

[0063] 实施例 4

[0064] 采用棉子糖肠球菌菌株 M1 (CGMCC No. 5584) 生产 GABA

[0065] 将活化后的 *Enterococcus raffinosus* CGMCC No. 5584 菌株接种于种子培养基于 30℃ 下生长培养 10 ~ 12h。

[0066] 种子培养基为 (g/L):蔗糖 20,酵母浸出粉 15,乙酸钠 4,磷酸钾 5,硫酸铝 0.3,硫酸镁 0.4,硫酸铵 0.2,吐温 80 2mL。控制发酵罐培养温度为 30℃,初始 pH 为 6.0。以 10 ~ 15% 的接种量转接入发酵培养基 (g/L):蔗糖糖 20,酵母浸出粉 15,乙酸钠 2,磷酸钾 2,硫酸铝 0.3,硫酸镁 0.4,硫酸铵 0.2,吐温 80 0.3mL, pH6.0。培养 12h,菌体生长进入到对数期生长后,按照 L-MSG/L-Glu=5 :1 (重量份数比)加入 9% 的底物,调节 pH 为 4.6,并一直控制在 4.6,实时监测谷氨酸钠消耗程度,然后流加底物;发酵 53 ~ 58h 时,检测 L-谷氨酸含量为 5.34g/L, GABA 达到 130.23g/L,即停止发酵。

[0067] 实施例 5

[0068] 采用棉子糖肠球菌菌株 M1 (CGMCC No. 5584) 生产 GABA

[0069] (1) 获得种子液:以 10% 的接种量,30℃ 静置培养 12h 为一轮活化,然后将活化 6 轮棉子糖肠球菌以 10% 的接种量接入装有种子培养基的容器内,30℃ 下在有氧环境下静置培养 15h,得到种子液;其中的种子培养基 (g/L):蔗糖 10,蛋白胨 10,酵母浸出粉 5,柠檬酸铵

2, 硫酸镁 0.58, 硫酸锰 0.25, 乙酸钠 2, 磷酸二氢钾 2;

[0070] (2) 发酵培养: 在发酵罐中倒入培养基, 高压蒸汽灭菌后冷却至 30℃, 将种子液以重量百分比 515% 接种量接种到发酵罐中, 静置、间歇搅拌发酵 60h;

[0071] 发酵培养基的成分为: 蔗糖 20g/L, 酵母浸出粉 102g/L, 乙酸钠 3g/L, 磷酸氢二钾 35g/L,  $Al_2(SO_4)_3 \cdot 16H_2O$  0.5g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5g/L,  $(NH_4)_2SO_4 \cdot 12H_2O$  0.5g/L, 吐温 80 0.1mL/L, 初始 pH6.5, 加入 9% 的底物(按照重量份数比 L-MSG/L-Glu=4:1), 单独灭菌;

[0072] (3) 调 pH: 发酵过程中, 初始 pH 为 6.5 不控制, 添加底物后当 pH 高于 6.5 时开始补酸, 通过补加盐酸保持 pH 在 4~6; 其中所述的底物为谷氨酸和谷氨酸钠的混合物。

[0073] 虽然上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述, 但在本发明基础上, 可以对之作些修改或改进, 这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 再不偏离本发明精神的基础上所做的修改或改进均属本发明要求保护的范围。



图 1

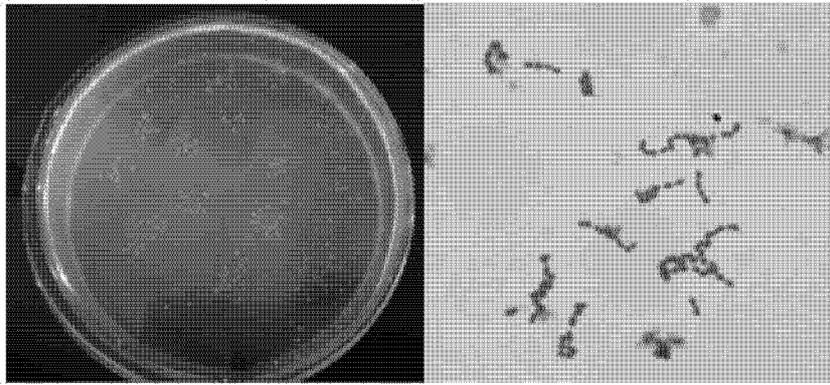


图 2