

文章编号: 1003-8701(2015)01-0095-05

一株高产 γ -氨基丁酸短乳杆菌的筛选、鉴定及发酵优化

赵玉娟, 牛春华, 张健, 段翠翠, 李盛钰*

(吉林省农业科学院农产品加工研究所/国家乳品加工技术研发分中心 长春 130033)

摘要:为了筛选高转化 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)乳酸菌新菌株,本研究以谷氨酸钠为底物,以110株分离自传统发酵食品和鸡肠道中的乳杆菌为研究对象,利用薄层层析和Berthlot比色法进行筛选,结果表明菌株S6-4为GABA高产菌株,产量为1.98 g/L。该菌株经API CHL 50生化系统和16S rDNA序列分析鉴定为短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)。同时对影响菌株S6-4转化GABA能力的各因素进行初步优化,最终确定:MRS培养基中以牛肉膏和酵母浸粉作为氮源,按1 mg/L(w/v)添加VitB₆和VitC作为促生长因子,培养基初始pH为6.5,27℃条件下培养36 h,菌株S6-4转化GABA的产量达到4.05g/L,提高了105%。

关键词:短乳杆菌; γ -氨基丁酸;筛选;转化

中图分类号:TS201.3

文献标识码:A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.01.022

Screening and Identification of a High γ -Aminobutyric Acid-Producing *Lactobacillus brevis* Strain and Optimization of Fermentation Conditions

ZHAO Yu-juan, NIU Chun-hua, ZHANG Jian, DUAN Cui-cui, LI Sheng-yu*

(Institute of Agricultural Products Processing, Jilin Academy of Agricultural Sciences

/ National R&D Center for Milk Processing, Changchun 130033, China)

Abstract: To find a high γ -aminobutyric acid-producing lactic acid bacterium, more than 110 strains of lactobacilli isolated from Chinese fermented foods and gastrointestinal tract of chickens were screened using thin-layer chromatography and colorimetric methods with glutamic sodium as substrate. The results showed that strain S6-4 exhibited high GABA-producing ability with 1.98g/L, which was identified as *L. brevis* by API 50 CHL kit and 16S rDNA sequencing analysis. The factors on transformation of GABA ability of strain S6-4 were analyzed and finally determined as follows: MRS medium with beef extract and yeast extract as nitrogen source, subsequently added 1mg/L (w/v) VitB₆ and VitC as growth factor, initial pH was 6.5, cultured for 36h under the condition of 27℃, the GABA yield reached 4.05g/L and increased by 105%.

Keywords: *Lactobacillus brevis*; γ -Aminobutyric acid; Screening; Transformation

γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)是一种非蛋白质组成的天然氨基酸,具有许多重要的生理功能,如降压、镇静、增强记忆、抗焦虑等,尤其对更年期的失眠、压抑和自身失调疗效良

好^[1-2]。我国卫生部于2009年9月正式批准 γ -氨基丁酸为新资源食品。随着 γ -氨基丁酸生理功能的不断研究和阐明,目前已经发展成为一种新型的功能因子,正逐渐应用于医药、食品等行业。

虽然 γ -氨基丁酸在自然界分布广泛,但天然存在的含量很低。目前, γ -氨基丁酸的制备方法主要有化学合成和生物转化法。化学合成法安全性较差、环境污染严重。乳酸菌是能转化谷氨酸为 γ -氨基丁酸的一类食品级微生物。一些乳酸菌如短乳杆菌^[3-6]、植物乳杆菌^[7-8]、副干酪乳杆菌^[9]、瑞士乳杆菌^[10]等利用自身合成的谷氨酸脱羧酶

收稿日期:2014-07-23

基金项目:现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-37);国家自然科学基金青年科研基金(31201394);吉林省农业科技创新工程项目(C42070302)

作者简介:赵玉娟(1980-),女,助理研究员,硕士,从事乳品微生物与功能性研究。

通讯作者:李盛钰,男,博士,副研究员,E-mail: lisy720@126.com

(Glutamate decarboxylase, GAD), 可将谷氨酸钠脱羧生成 γ -氨基丁酸^[11]。另外乳酸菌的食用安全性已经充分得到证实, 因此利用乳酸菌细胞转化法制备 γ -氨基丁酸是目前的研究热点, 因此本课题拟以自主分离的多株乳杆菌为研究对象, 从中筛选得到高产的 γ -氨基丁酸菌株, 并优化其发酵条件, 提高 γ -氨基丁酸的产量。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

110株试验菌株均为吉林省农业科学院农产品加工研究所自主分离保藏的菌株, 分别从传统的发酵食品酸菜以及鸡肠道中分离获得, 经菌落形态、革兰氏染色、过氧化氢酶触试验等初步鉴定为乳杆菌(*Lactobacillus*)。菌株在含30%(v/v)甘油的MRS培养基中-80℃冻存。使用前接种于MRS液体培养基, 37℃活化2次。

MRS培养基^[12], 用于乳酸菌的培养。L-MRS培养基: 向MRS基础培养基中按1%(w/v)添加L-谷氨酸钠。

1.2 主要试剂

γ -氨基丁酸标准品(美国Aladdin化学试剂公司); L-谷氨酸钠(中国惠世生化试剂有限公司); 溶菌酶(北京鼎国); 蛋白酶K、EX taq酶(日本TaKaRa公司); API 50CH试纸条(法国bioMérieux公司)等。引物合成与序列测定由北京华大基因公司完成。其他试剂均为分析纯。

1.3 方法

1.3.1 转化 γ -氨基丁酸菌株的初筛

将活化的乳杆菌按3%(v/v)接种于L-MRS培养基中, 37℃培养60 h后, 离心(8000 r/min、4℃、2 min), 取发酵液上清薄层层析(TLC)。吸取上清发酵液2 μ L, 点样于薄层层析硅胶G板上, 以正丁醇: 冰醋酸: 水=4: 1: 3(v: v: v)为展开剂, 其中含有质量浓度为4 g/L的茚三酮作为显色剂。将层析板下沿平稳放入展开剂中, 当展开剂扩展至距离层析板前沿1 cm处时, 取出层析板, 105℃, 5 min显色。以1 g/L(w/v)的GABA与L-谷氨酸钠作为阳性对照, 初步筛选可将L-谷氨酸钠转化为GABA的菌株。

1.3.2 Berthlot比色法复筛

参照何秋云等^[13]方法, 以不同浓度的GABA标准样品绘制标准曲线($y=1.3589x+0.0232$, $R^2=0.9987$)。将粗筛得到转化 γ -氨基丁酸能力较高的菌株按3%(v/v)接种于L-MRS培养基中, 37℃

培养60 h, 离心(8000 r/min、4℃、2 min), 收集上清液在645 nm处测定吸光度值, 依据标准曲线计算 γ -氨基丁酸的含量。

1.3.3 菌株S6-4生长曲线的测定

将乳杆菌S6-4按3%(v/v)接种于L-MRS液体培养基中, 37℃培养, 分别于0、12、24、36、48、60 h取样, 测定发酵液OD₆₀₀、活菌数、pH以及GABA的含量, 来检测菌株S6-4在发酵过程中对谷氨酸钠的转化利用情况。

1.3.4 菌株鉴定

采用API 50 CHL测定分析乳杆菌S6-4碳水化合物发酵特性, 按说明书提供的方法操作。发酵结果提交到生物梅里埃公司, 根据API数据库现存的数据来判定试验结果。

参照Bouazzaoui等^[14]方法进行基因组提取。根据GenBank中已报道多株乳杆菌16S rDNA序列信息设计引物, 16sF: 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3', 16sR: 5'-AGAAAGGAGGTGATC-CAGC-3'。PCR反应体系和PCR扩增条件参照赵玉娟等^[15]方法进行。PCR产物经DNA胶回收试剂盒回收纯化, 北京华大基因公司测序。将测得的16S rDNA序列信息通过BLAST程序与GenBank库中已知菌株的序列信息进行同源性比对, 以鉴定待测菌株。

2 结果与分析

2.1 转化 γ -氨基丁酸菌株的筛选

利用薄层层析对110株(鸡肠道中分离70株, 酸菜中分离40株)乳杆菌转化 γ -氨基丁酸的能力进行检测, 结果表明所分离的大部分乳杆菌转化GABA能力较弱, 从酸菜中分离得到的乳杆菌仅有5株(表1)具有转化能力, 而从鸡肠道中分离的乳杆菌也只有17株(表1)具有转化能力, 说明要筛选得到高产GABA的乳酸菌需要在大量的分离菌株中进行。冀林立^[16]同样采用薄层层析的方法从180株乳酸菌中筛选出20株能转换 γ -氨基丁酸的菌株, 与本试验结果相似。

利用比色法对22株具有转化 γ -氨基丁酸能力的菌株进行复筛, 结果如表1所示。不同菌株产 γ -氨基丁酸的能力有很大的差别, 大部分集中在中等及偏下水平, 高水平较少, 与薄层层析的试验结果相一致。试验数据表明菌株S6-4转化GABA能力最强, 为1.98 g/L, 因此确定后续试验以S6-4为研究对象。

表1 各菌株转化L-谷氨酸钠为 γ -氨基丁酸的能力

菌株	薄层层析	GABA (g/L)	菌株	薄层层析	GABA (g/L)
S5-2	+	0.54	CH5-3	+	0.51
S5-4	++	1.19	CH5-9	++	1.09
S6-4	++++	1.98	CH5-10	+	0.37
S6-5	++	1.08	CH6-1	+	0.48
S72	+	0.48	CH6-8	++	1.21
CH2-6	+	0.35	CH6-9	+	0.61
CH2-11	++	1.14	CH6-12	++	1.05
CH3-6	+	0.45	CH6-15	+	0.43
CH3-8	+++	1.56	CH6-17	+	0.52
CH4-7	+	0.39	CH7-2	+	0.38
CH4-10	+	0.64	CH7-3	+	0.68

注:“+”号的个数表明 GABA 在硅胶板上显色的颜色深浅,即“+”号越多,颜色越深表明转化率越高

2.2 菌株 S6-4 生长曲线的测定

通过检测不同生长时段发酵液的 pH、活菌数及 γ -氨基丁酸的含量,来探讨短乳杆菌 S6-4 在不同生长时段转化 γ -氨基丁酸的能力,具体结果见图 1。从图中可以看出,随着乳酸菌培养时间的延长,发酵液的 pH 值在不断下降,当培养至 24 h 时,发酵液的 pH 最低达到 5.2,而此时乳酸菌的活菌数和 OD₆₀₀ 值均达到最大值,说明此时短乳杆菌 S6-4 的生长达到稳定期的末期,随后发酵液的 pH 缓慢升高,分析原因是转化生成的 γ -氨基丁酸是碱性物质,一定程度上中和了发酵液的酸度。而 γ -氨基丁酸的浓度随着培养时间的延长不断积累,但培养至 36 h 后上升的速度减缓;培养至 60 h 时测得发酵液中 γ -氨基丁酸的浓度达到 1.98 g/L,这说明短乳杆菌 S6-4 在生长的全过程均能将 L-谷氨酸钠转化为 γ -氨基丁酸,但后期的转化速率明显下降,因此选择 36 h 作为菌株 S6-4 的培养时间。

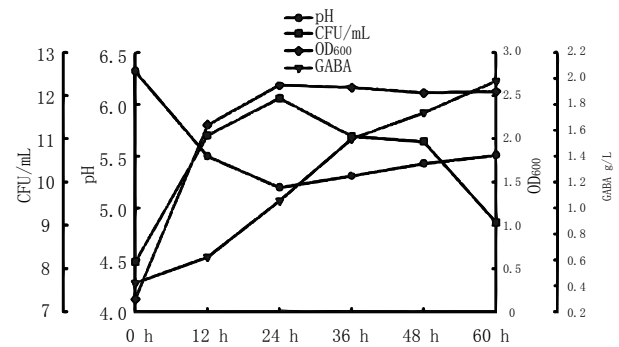


图1 乳杆菌 S6-4 的发酵曲线

2.3 菌株 S6-4 的鉴定

2.3.1 菌株 S6-4 的 API 鉴定

观察菌株 S6-4 API 50 CHL 测定结果发现,该菌株能利用核糖、葡萄糖、果糖、七叶灵、L-阿拉伯糖、D-木糖、麦芽糖等产酸,而不能利用松三糖、鼠李糖、糖原等产酸,生化反应谱与短乳杆菌最为接近,因此将菌株 S6-4 初步确定为短乳杆菌 (*L. Brevis*)。

2.3.2 菌株 S6-4 的 16S rDNA 序列分析

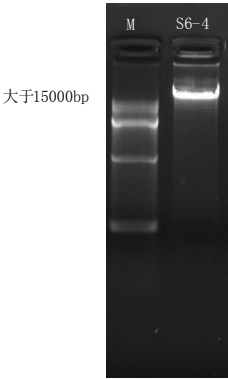


图2 乳杆菌 S6-4 基因组 DNA 电泳图谱
注:M: DL15000 marker;S6-4: 乳杆菌 S6-4 基因组 DNA

采用改良的 CTAB 法能够较好地裂解乳杆菌 S6-4 的细胞壁及细胞膜,提取的基因组 DNA 较为完整且纯度较高,琼脂糖电泳呈清晰单一条带(图 2),适合于分子鉴定研究。利用设计的 16s rDNA 引物对乳杆菌 S6-4 基因组进行克隆,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后在 1500 bp 处出现荧光条带,与目标片段长度一致,结果见图 3。将测序得到

的 16s rDNA 序列信息经 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)BLAST 软件在线分析进行相似性比对, 结果发现该菌株与短乳杆菌的同源性达到 99%。结合 API CHL 的判定结果将菌株 S6-4 鉴定为短乳杆菌。

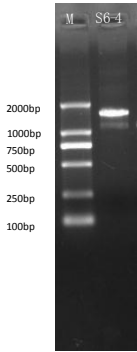


图3 乳杆菌 PCR 扩增结果电泳图
注: M: DL2000 marker; S6-4: 16 S rDNA 序列 PCR 扩增结果

2.4 发酵条件的初步优化

2.4.1 碳源和氮源的优化

试验选择葡萄糖、乳糖、麦芽糖、果糖、蔗糖及可溶性淀粉等作为唯一碳源进行碳源对菌株转化能力影响的试验, 结果(表 2)表明, 葡萄糖作为碳源时菌株 S6-4 转化 GABA 的能力最强, 因此仍选择以葡萄糖作为唯一碳源。

试验检测不同的无机氮和有机氮作为唯一氮源对于菌株转化 GABA 能力的影响, 结果如图 4 所示。由结果可知: GABA 的生成量呈牛肉膏>酵母浸粉>大豆蛋白胨>酪蛋白胨>胰蛋白胨>硫酸铵>柠檬酸铵。同时将牛肉膏、酵母浸粉和大豆蛋白胨进行不同的组合, 发现以酵母浸粉和牛肉膏作为复合氮源对菌株 S6-4 转化 GABA 的能力最为有利, 因此选择酵母浸粉和牛肉膏作为培养菌株 S6-4 的氮源。

表2 碳源对菌株转化 GABA 能力的影响

	乳糖	D-麦芽糖	D-果糖	葡萄糖	蔗糖	可溶性淀粉
OD ₆₀₀	0.207	0.316	0.422	0.524	0.125	0.345
GABA(g/L)	0.147	0.256	0.215	0.358	0.102	0.097

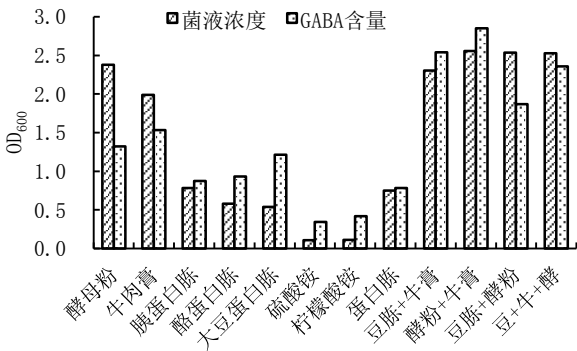


图4 氮源种类对 S6-4 转化 GABA 能力的影响

2.4.2 生长因子的优化

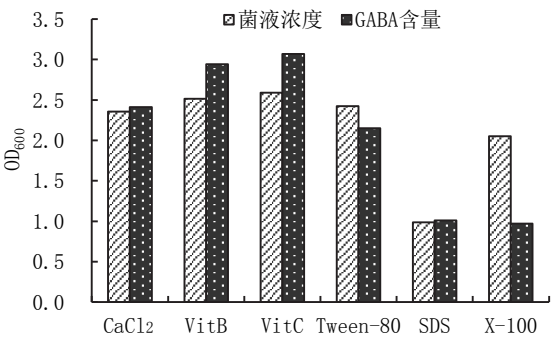


图5 生长因子对 S6-4 转化 GABA 能力的影响

有资料表明, 向培养基中添加生长因子可以

促进乳酸菌将谷氨酸钠转化为 γ -氨基丁酸。本试验选择氯化钙、VitB₆、VitC、Tween-80、十二烷基磺酸钠、曲拉通 X-100 作为生长因子进行试验, 结果发现大部分生长因子对乳酸菌转化能力的促进作用很小, 有些甚至抑制了菌株的转化能力, 因此仅向培养基中按 1 mg/L(w/v) 添加 VitB₆ 和 VitC。

2.4.3 培养基初始 pH 的优化

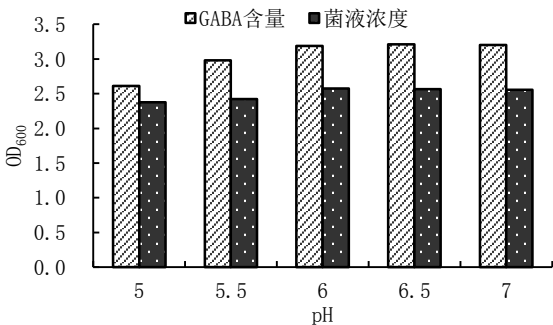


图6 培养基初始 pH 对 S6-4 转化 GABA 能力的影响

将 L-MRS 培养基的初始 pH 调整为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0, 将短乳杆菌 S6-4 分别接种于各 pH 的 L-MRS 培养基中, 37℃ 培养 36 h, 菌株的生长情况和 GABA 的生成量情况见图 6 所示。培养基 pH 在 6.0~7.0 之间, 菌株的菌液浓度和 GABA 的生成量均较大, 因此选择 pH 为 6.5 作为培养基的初始 pH。

2.4.4 培养温度的优化

培养温度对短乳杆菌 S6-4 转化 GABA 能力的影响较大,具体见图 7 所示。随着培养温度的升高,菌液浓度逐渐升高,在 33℃ 条件下培养菌液浓度最大,达到 2.605,随后菌液浓度呈下降趋势。但是 GABA 生成量则以 27℃ 条件下培养时生成量最大,为 4.05 g/L,因此确定 27℃ 作为培养温度。优化后短乳杆菌 S6-4 将 L-谷氨酸钠转化为 γ -氨基丁酸的能力提高了 105%。

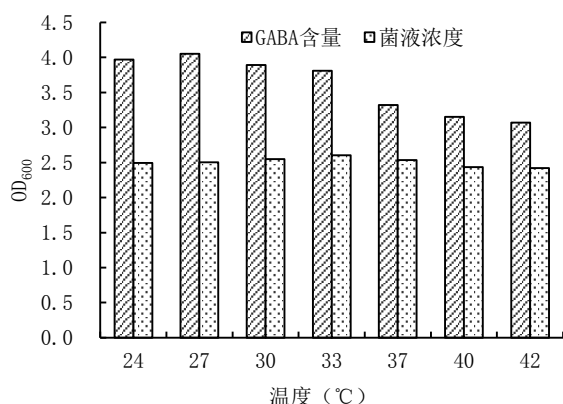


图 7 培养温度对 S6-4 转化 GABA 能力的影响

3 讨论

国内外多位学者研究发现,短乳杆菌具有高效转换 γ -氨基丁酸的能力,如短乳杆菌 HDBR-02^[2]、短乳杆菌 NCL912^[3]、短乳杆菌 GABA100^[4]、短乳杆菌 BJ20^[5]等。本文利用薄层层析和比色法筛选到一株高产 GABA 的短乳杆菌 S6-4,且对其转化 GABA 的能力进行初步优化,使其转化率提高了 105%,下一步要继续优化短乳杆菌 S6-4 转化 GABA 的产量,如采用基因重组、优化发酵条件^[21]等。

乳酸菌作为目前发酵食品生产中普遍使用的菌种,其众多的保健功能、良好的风味和可靠的安全性已被广大消费者认可,且有些乳酸菌同时具有转化生成 γ -氨基丁酸的能力,因此利用高产 GABA 的乳酸菌开发富含 GABA 活性的乳酸菌功能食品,如 Park^[18]、Nejati^[19]等研制的酸奶, Siragusa^[11]、Nomura^[20]、Wang^[21]等研制的干酪等发酵乳制品,不但具有乳酸菌的益生特性,同时具有降压、镇静等 GABA 所赋予的功能特性,使其集功能性和益生特性于一体而更具市场竞争力。因此在后续的工作中,一方面要开发短乳杆菌 S6-4 的发酵乳制品,另一方面将其制备成直投式发酵剂,使其不但可作为乳品工业的菌种发酵剂,亦可作为保健品中的功能因子,使其具有更大的应用潜力,为

研制和开发富含 GABA 的相关功能性食品提供一定的理论基础和科学根据。

参考文献:

- [1] Li H, Gao D, Cao Y, et al. A high γ -aminobutyric acid-producing *Lactobacillus brevis* isolated from Chinese traditional paocai [J]. *Annals of Microbiology*, 2008, 58(4): 649-653.
- [2] 宋明明. 产 GABA 的乳酸菌菌株的选育及最佳发酵条件研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2008.
- [3] Li Haixing, Qiu Ting, Huang Guidong, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* NCL912 using fed-batch fermentation[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010(9): 85-92.
- [4] Kim J Y, Lee M Y, Ji G E, et al. Production of γ -aminobutyric acid in black raspberry juice during fermentation by *Lactobacillus brevis* GABA100[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 130(1): 12-16.
- [5] Lee B J, Kim J S, Kang Y M, et al. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 271-276.
- [6] Yokoyama S, Hiramatsu J, Hayakawa K. Production of γ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(1): 95-97.
- [7] Ratanaburee A, Kantachote D, Charernjiratrakul W, et al. Enhancement of γ -aminobutyric acid in a fermented red seaweed beverage by starter culture *Lactobacillus plantarum* DW12[J]. *Electronic Journal of Biotechnology* [online], 2011, 14(3): 1-14.
- [8] Di Cagno R, Mazzacane F, Rizzello C G, et al. Synthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(2): 731-741.
- [9] Komatsuzaki N, Shima J, Kawamoto S, et al. Production of γ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus paracasei* isolated from traditional fermented foods[J]. *Food Microbiology*, 2005, 22(6): 497-504.
- [10] Sun T, Zhao S, Wang H, et al. ACE-inhibitory activity and gamma-aminobutyric acid content of fermented skim milk by *Lactobacillus helveticus* isolated from Xinjiang koumiss in China[J]. *European Food Research and Technology*, 2009, 228(4): 607-612.
- [11] Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, et al. Synthesis of γ -Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(22): 7283-7290.
- [12] 凌代文. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999.
- [13] 何秋云, 杨志. 马铃薯中 γ -氨基丁酸快速测定方法的研究[J]. *食品科技*, 2010, 35(10): 262-266.

(下转第 103 页)

始:计时、称重、测定温度、湿度,每隔 10 min 测量 1 次。在称重时,需关闭风扇、保持在静态下对人参进行称重,这样可以避免因气流浮力造成的误差。当人参重量不再降低时,即达到平衡水平,结束实验。

在此实验中,具体运用两种不同算法分别对人参进行烘干实验。通过实验可以得到具体实验结果如表 1。

表 1 实验结果

实验组	含水量(%)	时间(min)
1	100	0
	80	30
	60	60
	20	600
	15	900
2	98	0
	75	30
	61	60
	18	600
	14	900
3	99	0
	85	30
	78	60
	25	600
	17	900
4	98	0
	84	30
	70	60
	30	600
	19	900

表中 1、2 组实验采用了多因素混合模型,3、4

组实验采用了单因素三次方程模型。从实际烘干实验中可以看出,实验 1、2 水分蒸发更快可以防止霉变,中间过程较平稳,可以防止碳化,烘干结束后含水量在 14%~15%,烘干效果更优。通过计算,人参的优质品率提高 2%~3%。

4 结 论

本文通过对单因素三次方程模型进行改进,得到了可以对人参进行更好地烘干的多因素混合模型。通过模型的比较,可以得到在相同的时间下,采用多因素混合模型,水分蒸发量更大,烘干效率较高,并且多因素混合模型能有效地防止水分蒸发不均匀造成的人参碳化和霉变问题的出现。根据具体实验结果,进一步说明该模型比之前处理人参烘干问题的算法效果更优。

参考文献:

[1] 王惠广. 回归分析与相关分析[J]. 经济管理学报, 1997 (3):31-32 .

[2] 姜海波,李艳茹. 通用回归分析模型[J]. 数学的实践与认识, 2006, 36(1): 174-180 .

[3] 杨文泉. 模糊回归分析研究综述[D]. 长春: 吉林大学, 2009 .

[4] 李排昌. 矩阵的子矩阵与线性模型的假设检验[J]. 吉林大学学报(理学版), 2002, 40(3): 252-254 .

[5] 李云飞. 西洋参烘干速率的数学模型[J]. 吉林农业大学学报, 1988, 10(1): 73-78 .

[6] 王修兰,徐师华. 人参、西洋参干燥特性的研究[J]. 农业工程学报, 1991, 7(1): 62-69 .

[7] 纪庆晓. 西洋参快速干燥技术研究[D]. 长春: 吉林大学, 2006 .

[8] 王茂学,陈侍良,王绍林. 人参微波干燥试验[J]. 北京农业工程大学学报, 1993, 13(1): 44-51 .



(上接第 99 页)

[14] Bouazzaoui K, LaPointe G. Use of antisense RNA to modulate glycosyltransferase gene expression and exopolysaccharide molecular mass in *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(2): 216-225 .

[15] 赵玉娟,李盛钰,牛春华,等. 鼠李糖乳杆菌 JAAS8 胞外多糖聚合和转运相关基因的克隆及生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(3): 447-452 .

[16] 冀林立. 传统乳制品中产 γ -氨基丁酸乳酸菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2008 .

[17] Mazur R, Kovalovská K, Hudec J. Changes In Selectivity Of Gamma-Aminobutyric Acid Formation Effected By Fermentation Conditions And Microorganisms Resources[J]. Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science, 2011, 1(2): 164-171 .

[18] Park K B, Oh S H. Production of yogurt with enhanced levels of

gamma- aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(8): 1675-1679 .

[19] Nejati F, Rizzello C G, Di Cagno R, et al. Manufacture of a functional fermented milk enriched of Angiotensin-I Converting Enzyme(ACE)-inhibitory peptides and γ -amino butyric acid (GABA)[J]. LWT - Food Science and Technology, 2013, 51(1): 183-189 .

[20] Nomura M, Kimoto H, Someya Y, et al. Production of gamma-aminobutyric acid by cheese starters during cheese ripening[J]. Journal of Dairy Science, 1998, 81(6): 1486-1491 .

[21] Wang H, Dong C, Chen Y, et al. A new probiotic cheddar cheese with high ACE-inhibitory activity and γ -aminobutyric acid content produced with koumiss- derived *Lactobacillus casei* Zhang [J]. Food Technology and Biotechnology, 2010, 48(1): 62-70 .