

《乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术》编制说明

一、项目来源

根据浙江省食品学会关于 2025 年度第二批团体标准立项的通知，浙江工商大学组织金华银河生物科技有限公司、杭州新希望双峰乳业有限公司、杭州核力欣健生物医药（集团）股份有限公司起草工作组负责团体标准《乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术》草案稿的起草工作，并由浙江省食品学会归口。

二、标准制定工作的目的与意义

1、乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸背景

γ -氨基丁酸（GABA）是一种天然存在的功能性非蛋白质氨基酸，具有增进脑活力、降血压、抗焦虑、调节激素分泌、治疗癫痫和保肝护肾等生理功能，在食品、医药保健、饮料加工、化妆品等领域具有广泛的应用前景和市场需求。 γ -氨基丁酸的制备方法主要有化学合成法、植物富集法、微生物发酵法和生物转化法。化学合成法条件苛刻、能耗大、成本高、得率低且安全性差，不能用于食品、药品等领域。植物富集法 GABA 含量低，不适于规模化生产。微生物发酵法生产周期长、生产得率较低且后续分离提取较为困难，使其工业化应用受到限制。生物转化法即全细胞催化转化法，主要是利用谷氨酸脱羧酶催化 L-谷氨酸脱羧生成，由于具有操作简便、条件温和、原料利用率高、转化率高且分离纯化成本低等优势，越来越受到青睐。该法最早以大肠杆菌为生产菌株，得到 GABA 粗品经纯化后用于化工领域，若要进行食品开发，使用大肠杆菌就存在安全性问题。乳酸菌是国际公认的食品安全级细菌，2009 年 12 月国家卫生部已批准 GABA 用于食品生产加工。近年来发现了多株具有谷氨酸脱羧酶活性的乳酸菌，其合成 GABA 相较于其他菌种产量普遍较高，极具发展潜力。利用乳酸菌整细胞作为催化剂可将底物转化生成 GABA，其与固定化酶催化生成 GABA 相比，不需要进行纯酶的制备，同时转化液成分单一，产物容易分纯化。另外，全细胞催化反应体系简单、污染小，在大规模富集 GABA 方面有很大的发展潜力。

2、发展现状

全细胞催化法生产 γ -氨基丁酸是以微生物整体细胞作为催化剂，同时利用 PLP 的辅助，将底物转化为 γ -氨基丁酸。全细胞催化生产 γ -氨基丁酸区别于固定化酶技术，不需要添加酶做催化剂，且由于利用的是菌体细胞中的酶，其存在更加稳定。全细胞催化生产 γ -氨基丁酸后得到的转化液中的成分更为单一，一般只有底物和产物，因此便于后续产物的分离提纯，且该方法转化效率更高，反应时间更短，更加安全简单。但是由于乳酸菌细胞质膜的存在，影响底物和产物的透过性，因此常常需要添加表面活性剂或者通过其它方法改变细胞膜的通透性，如添加曲拉通 X-100、棕榈酸钠或对细胞进行超声处理。研究表明对短乳杆菌 CD0817 的发酵体系进行优化获得高浓度细胞，然后对影响 γ -氨基丁酸转化效率的相关条件进行优化，最终使底物的转化率达到了 91.1%，最后得到的 γ -氨基丁酸纯度达到了 97.1%。而通过对筛选后的戊糖乳杆菌进行诱变育种，能够得到了一株 γ -氨基丁酸产量高且遗传性状稳定的菌株，通过优化全细胞催化条件，得到底物的摩尔转化率达到 93.48%。

3、技术现状

目前常用的全细胞催化生产 γ -氨基丁酸工艺方法包括静息细胞法、固定化细胞法、高密度细胞催化法等。各实验室和企业采用的菌株、细胞预处理方式、催化反应条件（如 pH、温度、底物浓度、细胞浓度）差异巨大，导致 γ -氨基丁酸产率、转化率及过程稳定性迥异，数据可比性差。此外，对催化反应液或终产品中 γ -氨基丁酸的定性定量分析（如 HPLC、LC-MS、酶法）方法虽多，但样品前处理、仪器条件、方法验证等不统一，导致产品质量控制结果难以互认，影响技术交流与产品流通。

4、存在的问题

乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸在工艺参数（菌体制备与转化条件）、产品纯化路线（脱色、结晶、干燥）以及质量鉴定方法（理化、杂质、微生物与安全指标）方面，若缺乏统一的技术规

范，易导致不同单位间结果可比性不足、过程控制要点不一致、产品等级与用途边界不清晰等问题。标准化文件可为研发放大、质量控制、第三方检测及行业监管提供统一依据。

5、必要性

通过标准化引领，促进高效、稳定的乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸新工艺的研发与应用，提升行业整体技术水平，符合绿色可持续发展理念。同时，保障生产过程与产品质量，为该技术路线的 γ -氨基丁酸生产提供从菌株、催化工艺到产物鉴定的全链条技术规范，确保生产工艺的可靠性、经济性及产品质量的均一性与真实性。进一步为技术开发、工艺转让、生产管理与市场监管提供统一的方法学依据和评价标尺，加速乳酸菌全细胞催化法生产 γ -氨基丁酸这一特色产业的健康发展。

三、与我国法律法规和其他标准的关系

目前乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术主要执行的标准包括：QB/T 5633.7-2022 氨基酸、氨基酸盐及其类似物 第7部分： γ -氨基丁酸。QB/T 5633.7-2022 标准规定了经微生物发酵或生物酶转换、精制、干燥或加入配料制得的 γ -氨基丁酸的生产、检验及其感官、理化和安全等技术要求，但并非针对乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸，尤其不涉及催化工艺及产物分离纯化鉴定。

可参考的其他行业标准有 T/CGTA 03-2024 发芽糙米中 γ -氨基丁酸的测定 高效液相色谱-串联质谱法、NY/T 2890-2016 稻米中 γ -氨基丁酸的测定 高效液相色谱法等。

四、标准制定工作主要过程

- 1、2025年11月8日-11月10日，收集相关的国家标准、法律法规等信息。
- 2、2025年11月11日-11月23日，收集资料并完成了立项申请书。
- 3、2025年12月15日，浙江省食品学会印发了《浙江省食品学会发布2025年度第二批团体标准立项的通知》，并成立起草工作组。
- 4、2025年1月26日-3月15日，工作组讨论后形成了《乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术》工作组讨论稿。

五、标准制定原则

根据《中华人民共和国食品安全法》及其实施条例等有关法律法规，按GB/T 1.1-2020的编写原则进行编写。以加强乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术为原则，深入调查研究，保证起草工作的科学性、规范性和可操作性。

（一）可操作性原则

本文件制定过程中根据可操作性的原则，结合 γ -氨基丁酸生产企业的实际情况，对文件内容进行科学设定。为乳酸菌行业、 γ -氨基丁酸生产企业、检测单位、市场监督管理等部门提供科学管理的依据。

（二）与国内外标准协调一致原则

在制定过程中，起草组按照食品安全标准《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1-2020）中的原则要求进行编写。仔细查阅国内外的相关标准，根据实际情况，确定了团标的框架结构和各项技术内容要求。

（三）公开透明的原则

起草过程中坚持公开、透明的原则，除召开专家座谈会听取意见外，还将向社会公开广泛征求意见，如来自行业协会、检测机构、生产企业以及食品安全监督管理部门等各方意见，并吸收和采纳部分意见。

六、标准主要条款说明

1 标准名称和范围

根据关于浙江省食品学会2025年度第二批团体标准立项的通知，标准名称要求一致为“乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术”。

范围根据标准内容确定，本文件规定了利用乳酸菌全细胞催化法生产 γ -氨基丁酸的术语和定

义、试剂与耗材、测定步骤、技术要求、试验方法、产品检验规则、包装、标签和标志、贮存和运输和销售的要求。本文件适用于以乳酸菌全细胞为催化剂，以谷氨酸或富含谷氨酸的物质为底物，生产 γ -氨基丁酸的工艺研究、过程控制与产品质量鉴定。

2 规范性引用文件

在规范性引用文件中，根据乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术的技术要求中“试验方法、原辅料要求、感官及理化要求、微生物要求、包装、标签和标志、运输贮存、保质期”等条款引用了相关国家标准等文件。

3 术语和定义

乳酸菌：本文件规定乳酸菌的定义为“能利用可发酵碳水化合物产生大量乳酸的一类无芽孢、革兰氏染色阳性细菌的总称，其包含多种属，具体包括乳杆菌属、乳球菌属、链球菌属、片球菌属、明串珠菌属以及双歧杆菌属等。”

γ -氨基丁酸：是一种非蛋白质氨基酸，化学名称为4-氨基丁酸，分子式 $C_4H_9NO_2$ ，相对分子质量103.12，结构式如图1所示。

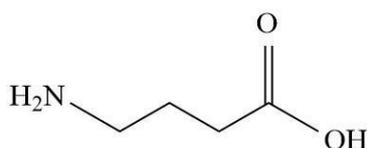


图1 GABA结构式

乳酸菌全细胞催化剂：以活体或非活体乳酸菌细胞作为生物催化剂，用于催化底物转化为 γ -氨基丁酸（GABA）的制剂。

4 材料、仪器和试剂

4.1 菌株材料

分离、保存并鉴定的乳酸菌菌株

4.2 仪器

高压蒸汽灭菌锅、高速冷冻离心机、高效液相色谱仪、涡旋振荡器、旋转蒸发仪、核磁共振仪、傅里叶变换红外光谱仪。

4.3 试剂与耗材

4.3.1 试剂

MRS固体及液体培养基、GM17固体及液体培养基、碳酸氢钠、2, 4-二硝基氟苯、柠檬酸钠、磷酸吡哆醛（5'-PLP）、曲拉通X-100、盐酸、乙酸-乙酸钠缓冲溶液、2, 4-二硝基氟苯、脱色活性炭、GABA标准品（99%）、L-谷氨酸标准品（99%）、乙腈（色谱级）、甲醇（色谱级）、磷酸（色谱级）、0.22 μ m滤膜、滤纸。

4.3.2 耗材

Sunfire® C18色谱柱

5 测定步骤

5.1 乳酸菌细胞催化剂的制备

MRS或GM17固体培养基活化乳酸菌，将活化后的乳酸菌接种到MRS或GM17种子培养基中培养24 h，并按照10%的接种量接种到发酵培养基（葡萄糖30 g/L，L-谷氨酸钠30 g/L，精氨酸1 g/L，大豆胨5 g/L，蛋白胨2.5 g/L，酪蛋白胨2.5 g/L，酵母浸粉2.5 g/L，牛肉浸粉5 g/L，乳糖5 g/L，抗坏血酸钠0.5 g/L， β -甘油磷酸钠19 g/L，硫酸镁0.25 g/L，pH为5.0）中以扩大培养，当发酵培养液的吸光度大于1时，停止发酵，将发酵液在4℃下，6000 rpm离心10 min获得沉淀，并使用生理盐水重悬洗涤菌体三次后，得到乳酸菌细胞催化剂。

5.2 乳酸菌菌体转化生产 γ -氨基丁酸

使用pH为4.2的0.2 M的乙酸-乙酸钠缓冲液重悬乳酸菌菌体，使其浓度为25 g/L，随后添加0.1%的5'-磷酸吡哆醛、0.1%的曲拉通X-100和7%的L-谷氨酸，并于37°C下150 rpm摇床转化48 h，即可得到 γ -氨基丁酸转化液。

5.3 转化液中 γ -氨基丁酸纯化

5.3.1 脱色

转化结束后离心获得转化液，并将转化液过滤后添加2%的活性炭于75°C下以150 rpm水浴震荡脱色30 min，得到脱色后的 γ -氨基丁酸转化液，脱色率可达到93.31%。

5.3.2 结晶

脱色结束后使用滤纸过滤并将其在55°C下旋转蒸发至体积不变，随后添加3-5倍相同温度的无水乙醇，震荡均匀后在室温下静置，温度恢复到室温后将其转移到4°C的冰箱中静置12 h。

5.3.3 干燥

通过滤纸过滤后得到 γ -氨基丁酸固体，并在60°C的烘箱中干燥12 h得到 γ -氨基丁酸产品。L-谷氨酸摩尔转化率是97.69%，成品 γ -氨基丁酸纯度为99.47%。

5.4 γ -氨基丁酸产量、纯度及结构鉴定

5.4.1 高效液相色谱HPLC法

该方法的原理是 γ -氨基丁酸没有紫外响应，但 γ -氨基丁酸的 α -氨基酸可以与2, 4-二硝基氟苯生成一种在紫外370 nm处有较强吸收的稳定黄色衍生物。将 γ -氨基丁酸标准品配成50、100、200、300、400、500、1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 几个不同浓度梯度的标准溶液。分别加入200 μL 的0.5 M碳酸氢钠、200 μL γ -氨基丁酸标准液或样品上清液和200 μL 的1%的2, 4-二硝基氟苯溶液，震荡均匀，在60 °C的水浴锅衍生化反应1 h，结束后等待其冷却至室温后加入1.4 mL 0.12% (v/v) 的磷酸溶液，震荡均匀且避光放置，使用0.22 μm 滤膜过滤至棕色进样瓶中进样。

色谱条件：Sunfire® C18色谱柱（5 μm 4.6 \times 250 mm），紫外检测波长为370 nm，流动相A：0.12% (v/v) 的磷酸溶液，流动相B：纯乙腈，等度洗脱的比例为43:57 (v/v)，流动相流速为1 mL/min，进样体积为10 μL ，色谱柱温度为35 °C。

5.4.2 傅里叶变换红外光谱（FTIR）法

检测分子中化学键对特定波长红外光的吸收，反映官能团（O-H、N-H 等）的振动特征，通过与标准谱图对比初步确认其结构组成。将烘干的样品和溴化钾 KBr 按照 1: 100 的比例进行混合快速研磨 20~30s，后置于压片模具中进行压片。扫描前先采集空白 KBr 压片的背景光谱，并进行背景扣除；将压片放入仪器样品光路中，用红外光谱仪在 4000~400 cm^{-1} 范围内扫描，分辨率 4 cm^{-1} ，按照 GB/T 32198 执行。

5.4.3 核磁共振NMR法

称量 50 mg 纯化后的 γ -氨基丁酸样品，漩涡震荡充分溶解在 0.6 mL 重水中（99.9%），加到核磁管中，使用 Bruker Avance 400 核磁共振仪进行一维 ^1H NMR 测定。

6 技术要求

6.1 感官要求

乳酸菌全细胞催化生产的 γ -氨基丁酸感官要求应符合表1的规定。

表1 感官要求

项目	要求
色泽	白色或淡黄色
气味	具有本品固有的气味、无异味
形态	结晶、结晶性粉末、颗粒
杂质	无正常视力可见外来杂质

6.2 理化要求

乳酸菌全细胞催化生产的 γ -氨基丁酸的理化指标应符合表2中食品加工用的规定。

表2 理化要求

项目	指标			
	食品加工用	日化用	农用	饲用
含量 (%)	一级≥99 二级≥98.5 三级≥20	98	95	98.5
pH	6.5-7.5	6.5-7.5	5.0-7.5	6.5-7.5
溶液透光率 (%)	98	98	-	-
干燥减量 (%)	1.0	1.0	2.0	1.0
灰分 (%)	0.1	0.5	1.0	0.5
氯化物 (以Cl ⁻ 计) (%)	0.02	-	-	0.02
硫酸盐 (以SO ₄ ²⁻ 计) (%)	0.04	-	-	-
铵盐 (以NH ₄ ⁺ 计) (%)	0.02	-	-	-
铁盐 (以Fe计) (mg/kg)	30	-	-	-
其他杂质 (%)	0.05	-	-	-

6.3 安全要求

乳酸菌全细胞催化生产的γ-氨基丁酸的安全指标应符合表3中食品加工用的规定。

表3 安全要求

项目	指标		
	食品加工用	日化用	饲用
铅 (Pb) (mg/kg)	0.3	2	0.5
砷 (Pb) (mg/kg)	0.2	1	0.5
菌落总数 (CFU/g)	1000	500	1000
大肠菌群 (CFU/g)	10	-	30
霉菌和酵母 (CFU/g)	50	50	50
致病菌	不应检出		

注：食品加工用及饲用γ-氨基丁酸致病菌包括：金黄色葡萄球菌、沙门氏菌；日化用γ-氨基丁酸致病菌包括：金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、耐热大肠杆菌

7 试验方法

7.1 一般规定

除另有说明，所用试剂均为分析纯试剂；所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液和其他试剂，应按照GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备；试验用水均为GB/T 6682中规定的三级水。

7.2 感官要求

称取适量试样，置于清洁、干燥的白瓷盘中，在自然光线下，目视观察其色泽与状态，嗅其气味。

7.3 pH

称取试样1.0 g（精确至0.01g），加水10 mL溶解后，按照GB/T 9724的方法测定。

7.4 溶液的透光率

称取试样1.0 g（精确至0.01g），加水溶解后定容至10 mL，摇匀。用1 cm比色皿，以水为空白对照，在波长430 nm下测定试样溶液的透光率。

7.5 干燥减量

按照GB 5009.3中的直接干燥法的方法测定。

7.6 灰分

按照GB 5009.4食品中总灰分的方法测定。

7.7 氯化物

称取试样0.25g（精确至0.01g），标准氯化钠溶液5.0 mL，按照GB 28306的方法测定。

7.8 硫酸盐

称取试样0.5 g（精确至0.01 g），标准硫酸钾溶液2.0 mL，按照GB 1886.75的方法测定。

7.9 铵盐

按照GB 1886.75的方法测定。

7.10 铁盐

称取试样0.5 g（精确至0.01 g），标准铁溶液1.5 mL，按照GB 1886.75的方法测定。

7.11 其他杂质

扣除空白组色谱图的杂峰，其他杂峰面积与主峰面积比较应低于0.05%。

7.12 铅、砷、菌落总数测定

铅含量按照GB 5009.12的方法测定。

砷含量按照GB 5009.11的方法测定。

菌落总数按照GB 4789.2的方法测定。

7.13 霉菌和酵母

按照GB 4789.15的方法测定。

7.14 致病菌

金黄色葡萄球菌按照GB 4789.10的方法测定。

沙门氏菌按照GB 4789.4的方法测定。

8 检验规则

8.1 组批

同菌种原料、同配方、同工艺生产的，符合质量要求的，且具有同样质量检验报告单的产品为一批。

8.2 抽样

均匀试样的抽取应随机抽样，使用清洁、干燥的取样工具，等量取样，一般取样量为全检量的3倍。

8.3 出厂检验

8.3.1 每批产品应经企业质检部门检验合格并附合格证后，方可出厂。

8.3.2 出厂检验项目为：感官要求、含量、pH、干燥减量、灰分、氯化物。

出厂检验项目全部符合本文件要求时，判定该批产品为合格或优级；检验结果不符合本文件要求时，可在抽样批次中加倍抽样复检，复检结果符合本文件要求时，判定该批产品为合格，如复检结果仍有一项不合格，则判定该批产品为不合格。

8.4 型式检验

8.4.1 正常生产时应每6个月进行一次型式检验。此外有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 前后两次抽样检验结果差异较大时；
- b) 因人为或自然因素使生产技术和生产环境发生较大变化时；
- c) 国家有关主管部门提出进行型式检验要求时。

8.4.2 项目

型式检验项目包括本文件6.1-6.3规定的项目。

8.4.3 判定

型式检验项目全部符合本文件要求时，判定该批产品为合格或优级；检验结果不符合本文件要求时，可在抽样批次中加倍抽样复检（微生物指标不合格时不得复检），复检结果符合本文件要求时，判定该批产品为合格，如复检结果仍有一项不合格，则判定该批产品为不合格。

9 包装、标签和标志

9.1 包装

包装材料应符合相应的国家标准或行业标准的规定。包装物和容器应整洁、卫生、无破损。

9.2 标签和标志

9.2.1 标签应符合 GB 7718 的规定，同时还应注明产品等级。

9.2.2 包装运输标志应符合 GB/T 191 的规定。

10 运输和贮存

10.1 运输

10.1.1 运输工具及车辆应符合卫生要求，不得与有毒、有污染的物品混装、混运。

10.1.2 运输过程中应防止曝晒、雨淋。

10.1.3 装卸时应轻搬、轻放，不得重压和挤压。

10.2 贮存

10.2.1 贮存场所应清洁、通风、干燥，并有防尘、防蝇、防虫、防鼠等设施，不得与有毒、有害物品混放。

10.2.2 应分类、分架存放，应离墙离地存放，堆放高度应以提取方便为宜。

11 销售

销售应符合 GB 31621 的规定。