

ICS 67.060

CCS X11

团 体 标 准

T/ZFS 0015—2020

乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法 与鉴定技术

Method and identification techniques for whole-cell catalytic production of gamma
aminobutyric acid by lactic acid bacteria

(征求意见稿)

XXXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

浙江省食品学会 发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 材料、仪器和试剂.....	2
5 测定步骤.....	2
6 技术要求.....	4
7 试验方法.....	5
8 检验规则.....	6
9 包装、标签和标志.....	7
10 运输和贮存.....	7
11 销售.....	8

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由浙江省食品学会提出并归口。

本文件起草单位：浙江工商大学、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。

本文件主要起草人：顾青、韩佳润、包维臣、赵广生、张文杰

乳酸菌全细胞催化生产 γ -氨基丁酸的方法与鉴定技术

1 范围

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

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 32198 红外光谱定量分析技术通则

GB/T 191 包装储运图示标志

GB/T 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备

GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备

GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备

GB 1886.75 食品安全国家标准食品添加剂-半胱氨酸盐酸盐

GB 4789.2 食品安全国家标准食品微生物学检验 菌落总数测定

GB 4789.4 食品安全国家标准食品微生物学检验 沙门氏菌检验

GB 4789.10 食品微生物学检验 金黄色葡萄球菌检验食品安全国家标准

GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验霉菌和酵母计数

GB 5009.3 食品安全国家标准 食品中水分的测定

GB 5009.4 食品安全国家标准 食品中灰分的测定

GB 5009.12 食品安全国家标准 食品中铅的测定

GB 5009.11 食品安全国家标准 食品中总砷及无机砷的测定

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 7718 食品安全国家标准预包装食品标签通则

GB/T9724 化学试剂 pH值测定通则

GB 28306 食品安全国家标准食品添加剂-精氨酸

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 乳酸菌 lactic acid bacteria (LAB)

是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。

3.2 γ -氨基丁酸 gamma aminobutyric acid (GABA)

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。

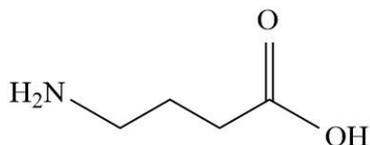


图1 GABA结构式

3.3 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 μm 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

醇，将发酵液在4°C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。
