

小米糙米发芽富集 γ -氨基丁酸

宁亚维^{1,3}, 刘祥贵¹, 王志新¹, 贾英民^{*2}

(1. 河北科技大学 生物科学与工程学院 / 河北省发酵工程技术研究中心, 河北 石家庄 050018; 2. 北京工商大学 食品学院, 北京 102488; 3. 河北省杂粮研究重点实验室/河北省农林科学院, 河北 石家庄 050035)

摘要: 通过发芽法富集小米糙米中的 γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid, GABA)。以 GABA 为响应值, 采用响应面法优化小米糙米发芽富集 GABA 的条件。结果表明: 在浸泡温度 34 $^{\circ}\text{C}$ 、浸泡时间 12 h、发芽温度 34 $^{\circ}\text{C}$ 、发芽时间 60 h 条件下, 小米发芽糙米中 GABA 质量分数可达 184.75 mg/hg, 较优化前提高了 2.76 倍, 为未发芽小米糙米的 8.44 倍。发芽处理可以高效富集 GABA, 为小米的开发利用提供了技术参考。

关键词: γ -氨基丁酸; 小米; 浸泡; 发芽

中图分类号: TS 21 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.01.008

Improve γ -Aminobutyric Acid Content by the Germination of Brown Foxtail Millet

NING Yawei^{1,2}, LIU Xianggui¹, WANG Zhixin¹, JIA Yingmin^{*2}

(1. College of Bioscience and Bioengineering / Research Center for Fermentation Engineering of Hebei, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 102488, China; 3. Hebei Key Laboratory of Grains / Research Institute of Agriculture and Forestry, Shijiazhuang 050035, China)

Abstract: Gamma-amino butyric acid (GABA) in brown foxtail millet was improved by germination treatment using response surface methodology. The maximum GABA content of 184.75 mg/hg was obtained at the conditions: soaking temperature 34 $^{\circ}\text{C}$, soaking time 12 h, germination temperature 34 $^{\circ}\text{C}$, germination time 60 h. The GABA content was 2.76-fold high as that before optimization, and 8.44-fold as that without the treatment of germination. This investigation suggested that the treatment of germination could effectively improve the content of GABA in brown foxtail millet, which provided new insights into the exploitation of foxtail millet.

Keywords: γ -aminobutyric, foxtail millet, soaking, germination

γ -氨基丁酸(γ -amino butyric acid, GABA)是一种非蛋白质氨基酸, 由谷氨酸经谷氨酸脱羧酶催化

而来, 是哺乳动物大脑抑制性神经递质, 参与机体多重代谢活动^[1-7]。GABA 天然存在于粮食原料中(如

收稿日期: 2016-10-08

基金项目: 河北省杰出青年基金项目(C2016208142); 河北省杂粮研究室开放课题。

* 通信作者: 贾英民(1961—), 男, 博士, 教授, 主要从事食品生物技术相关研究。E-mail: jiayingmin@btbu.edu.cn

引用本文: 宁亚维, 刘祥贵, 王志新, 等. 小米糙米发芽富集 γ -氨基丁酸[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(01): 53-57.

豆类、荞麦、大麦、大米等),但含量均较低,然而可以通过环境条件胁迫、微生物发酵、蛋白质水解结合酶催化等手段富集^[8-12],因此目前粮食作物中GABA的富集成为研究的热点。

小米糙米在发芽过程中内源酶(如蛋白酶、谷氨酸脱羧酶等)被激活,可以催化谷氨酸进行脱羧反应生成GABA;相反,GABA也会在GABA转氨酶的作用下分解生成琥珀酸半醛,因此只有谷氨酸脱羧酶的活性超过 γ -氨基丁酸、丙酮酸转氨酶时, γ -氨基丁酸的含量才会增加^[13-14]。不同的温度、发芽时间等发芽条件会影响GABA的生成与降解平衡,只有适宜的条件才会使得小米糙米中的GABA得到有效富集^[15]。因此,作者拟以GABA生成量为指标,通过单因素试验结合响应面优化法探寻小米糙米发芽的最佳条件,以期获得富集GABA的最佳工艺,为小米产品的开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

冀谷:河北省农林科学院谷物研究所提供;GABA标准品:购自Sigma-Aldrich公司;无水乙醇、苯酚、次氯酸钠、四硼酸钠、硼酸等均为分析纯;购自天津市永大化学试剂有限公司。

1.2 主要仪器与设备

Evolution 220 紫外分光光度计:美国 Thermo 公司产品;SIGMA3-18K 高速冷冻离心机:德国 SIGMA 公司产品;Lab dancer 漩涡振荡器:德国 IKA 产品;SPX-150B-Z 型生化培养箱:上海博讯实业有限公司医疗设备厂产品。GZX-9140MBE 砻谷机:上海博讯实业有限公司医疗设备厂产品。

1.3 试验方法

1.3.1 小米糙米发芽工艺 首先挑选颗粒饱满的冀谷 19 号谷子进行砻谷,人工去除杂质及颗粒不完整的糙米,制备得到实验可用的小米糙米。然后采用蒸馏水清洗去除杂质,质量分数 0.5% 的次氯酸钠溶液浸泡 30 min,再用无菌水清洗残余次氯酸钠对小米糙米进行消毒处理。之后于试验设定条件下进行浸泡与发芽,其中发芽阶段每隔 12 h 采用无菌水淋洗一次。最后于 80 °C 条件下干燥 2 h,粉碎待用。

1.3.2 GABA 的提取与测定 准确称取 5.0 g 小米糙米粉置于三角瓶中,首先加入 15 mL 无水乙醇提取糙米中的黄色素,于 60 °C 水浴保温 2 h,然后于

8 000 r/min 离心 20 min,上清液即为黄色素提取液,将其弃去留取沉淀物。向沉淀物中加入 20 mL 去离子水并置于震荡水浴中提取 GABA,在 40 °C 的温度下震荡(150 r/min)提取 1 h。然后将粗提取液于 10 000 r/min 条件下离心 15 min,取上清液并定容至 25 mL,所得溶液即为 GABA 提取液。

采用比色法测定 GABA 质量分数。首先,量取 0.4 mL 提取液,向其中加入 0.6 mL 浓度为 0.2 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 9.0)、2 mL 苯酚溶液(体积分数 6%)和 1 mL 有效氯为质量分数 9% 的次氯酸钠,震荡均匀。然后于沸水浴加热 5 min,取出后立即置于冰浴中冷却 5 min,待出现蓝绿色后加 2 mL 无水乙醇(体积分数 60%),震荡均匀并测定 645 nm 处的吸光值。

1.3.3 发芽条件优化与设计

1) 单因素试验 小米糙米发芽试验中设定浸泡温度、浸泡时间、发芽温度和发芽时间 4 个因素,以发芽小米糙米中 GABA 质量分数为考察指标进行单因素试验。

2) 优化试验 在单因素试验基础上,选取浸泡温度、浸泡时间和发芽温度 3 个主要影响为自变量,以 GABA 含量为响应值,设计 3 因素 3 水平响应面分析实验。其中 3 个自变量的范围及水平编码如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 响应面设计试验因素水平及编码

Table 1 Factor level and code of Box-Behnken design

水平	浸泡温度/°C	浸泡时间/h	发芽温度/°C
-1	30	8	30
0	35	12	35
1	40	16	40

1.3.4 统计分析 采用 origin 8.5 进行数据处理及图表绘制,采用 Design-Expert 7.0 统计软件做方差分析与响应面分析。

2 结果与分析

2.1 浸泡温度对 GABA 质量分数的影响

分别设定小米糙米的浸泡温度为:25、30、35、40 °C,浸泡时间 8 h,每隔 2 h 更换浸泡液一次,发芽温度为 30 °C,发芽时间为 48 h。小米发芽糙米的 GABA 含量如图 1 所示。可以看出,浸泡液温度在 25 到 35 °C 之间,小米发芽糙米中的 GABA 含量随

着浸泡温度的升高而增加,浸泡温为在 35 ℃时小米发芽糙米中的 GABA 质量分数达到最大值 78.60 mg/hg; 当浸泡温度增加为 40℃时,GABA 小米发芽糙米中的含量不但没有增加反而还有所降低。因此,实验将小米糙米发芽的最佳浸泡温度选定为 30~40 ℃。此外,未发芽的糙米 GABA 质量分数为 21.90 mg/hg,此研究表明浸泡能够显著提高糙小米中 GABA 质量分数。

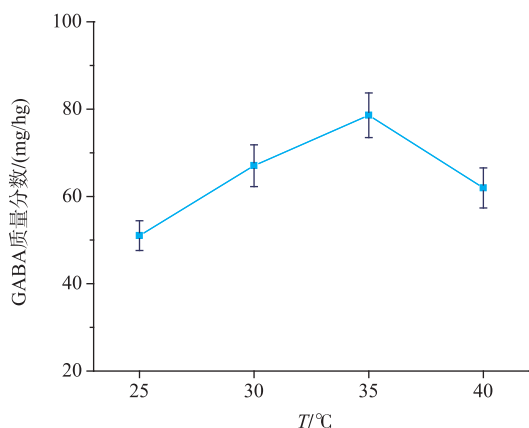


图 1 浸泡温度对 GABA 质量分数的影响

Fig. 1 Effect of soaking temperature on the content of GABA

2.2 浸泡时间对 GABA 质量分数的影响

分别设定浸泡时间为:0、4、8、12、16、20 h,浸泡液温度为 35 ℃,其他条件为发芽温度 30℃,发芽时间 48 h。小米发芽糙米中 GABA 质量分数如图 2 所示。由图 2 可知,随着小米糙米浸泡时间的延长,小米发芽糙米中 GABA 质量分数呈现先增加后减少的变化趋势,当浸泡时间为 12 h 时,GABA 质量分数最高可达 101.15 mg/hg。因此,将小米糙米的最佳浸泡时间选定为 8~16 h。

2.3 发芽温度对 GABA 质量分数的影响

分别设定发芽温度为:25、30、35、40 ℃,浸泡液温度为 35 ℃,浸泡时间 12 h,发芽时间为 48 h。小米发芽糙米中 GABA 质量分数如图 3 所示。由图 3 可知,在 35 ℃之前,小米发芽糙米中 GABA 质量分数随温度的升高而增加,在 35 ℃时,小米发芽糙米中的 GABA 质量分数最高为 118.82 mg/hg,但温度在超过 35 ℃后,GABA 质量分数随温度的升高而降低。因此,选取最佳发芽温度为 30~40 ℃。

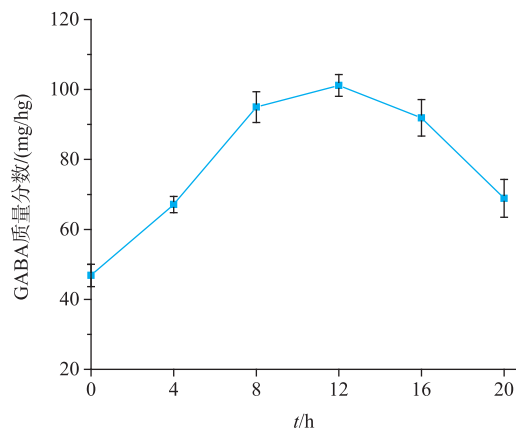


图 2 浸泡时间对 GABA 质量分数的影响

Fig. 2 Effect of soaking time on the content of GABA

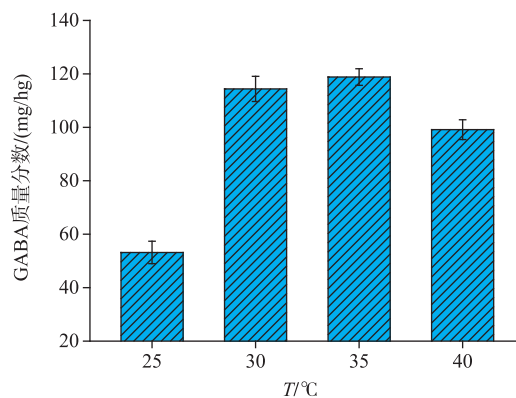


图 3 发芽温度对 GABA 质量分数的影响

Fig. 3 Effect of germination temperature on the content of GABA

2.4 发芽时间对 GABA 质量分数的影响

分别设定发芽时间为:12、24、36、48、60、72、84、96、108、120 h,浸泡液温度为 35 ℃,浸泡时间为 12 h,发芽温度为 35 ℃。小米发芽糙米中 GABA 含量如图 4 所示。由图 4 可知,随着小米糙米发芽时间的延长,GABA 富集量逐渐增加,且在 24 h 到 60 h 之间 GABA 质量分数增长迅速,当发芽时间达到 60 h 时,GABA 质量分数达到峰值 181.34 mg/hg。因此,选取最佳发芽时间为 48~72 h。

2.5 响应面分析

根据单因素试验结果,响应面优化试验设定浸泡温度 30~40 ℃,浸泡时间 8~16 h,发芽温度 30~40 ℃,发芽时间 60 h,采用 Box-Behnken 响应面设计法,优化影响小米糙米富集 GABA 的关键工艺条件。试验设计及结果见表 2,回归模型方差分析见表 3。

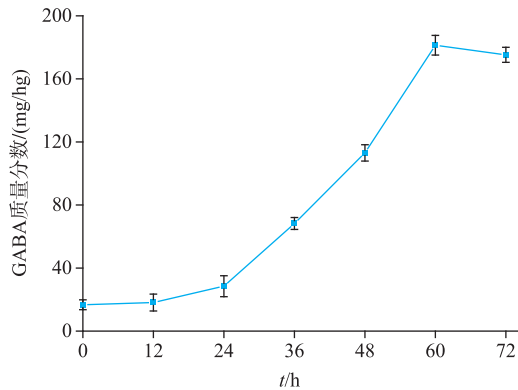


图 4 发芽时间对 GABA 质量分数的影响

Fig. 4 Effect of germination time on the content of GABA

经分析得到的小米糙米发芽条件与小米发芽糙米中 GABA 含量间的二次多项式回归模型为: $Y=178.74-17.20A+9.18B-21.27C+9.92AB-8.56AC-2.61BC-43.91A^2-49.56B^2-67.20C^2$,其中 A 为浸泡温度, B 为浸泡时间, C 为发芽温度。

由上述表 3 的方差分析结果可知,模型水平显著,失拟项水平不显著,表明本试验建立的回归模型能真实地描述小米糙米在发芽过程的 GABA 含量与发芽条件之间的规律。其中 C^2 对发芽小米糙米中 GABA 质量分数影响极显著, A^2 、 B^2 对发芽小米糙米中 GABA 质量分数影响显著, AB 、 AC 、 BC 发芽小米糙米中 GABA 质量分数影响不显著。因此,该模型可用于预测小米糙米在发芽中 GABA 质量分数。

通过优化分析得到小米糙米发芽的最佳的工

表 2 响应面试验设计及结果

Table 2 Response surface design experiments and the corresponding GABA contents

试验	浸泡温度/℃	浸泡时间/h	发芽温度/℃	GABA 质量分数/(mg/hg)
1	-1	1	0	117.08
2	0	-1	-1	99.39
3	0	-1	1	26.19
4	1	0	-1	67.69
5	-1	0	-1	74.25
6	1	1	0	91.82
7	0	0	0	167.95
8	-1	-1	0	98.58
9	0	1	1	19.36
10	0	0	0	198.52
11	1	-1	0	33.63
12	0	0	0	169.76
13	0	1	-1	103.01
14	1	0	1	43.89
15	-1	0	1	84.71

艺条件为浸泡温度设定在 34.14 ℃、浸泡时间设定 12.32 h、发芽温度设定为 34.26 ℃,在上述条件下发芽 60 h,小米发芽糙米中 GABA 质量分数模型预测值为 182.17 mg/hg。依据模型优化结果与实际情况,浸泡温度选定为 34 ℃、浸泡时间选定为 12 h、发芽温度选定为 34 ℃,发芽 60 h 对模型进行验证,结果

表 3 回归模型的方差分析

Table 3 Analysis of variance(ANOVA) for response surface quadratic model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	36 091.32	9	4 010.15	4.79	0.048
浸泡温度 A	2 366.38	1	2 366.38	2.82	0.154
浸泡时间 B	674.91	1	674.91	0.81	0.411
发芽温度 C	3 620.58	1	3 620.58	4.32	0.092
AB	393.82	1	393.82	0.47	0.524
AC	293.44	1	293.44	0.35	0.580
BC	27.30	1	27.30	0.033	0.863
A ²	7 118.82	1	7 118.82	8.50	0.033
B ²	9 067.80	1	9 067.80	10.82	0.022
C ²	16 673.46	1	16 673.46	19.90	0.007
残差	4 190.01	5	383.00	-	-
失拟	3 601.69	3	1 200.56	4.08	0.203
纯误差	588.31	2	294.16	-	-
总和	40 281.33	14	-	-	-

小米发芽糙米中 GABA 质量分数为 184.75 mg/hg,与预测值拟合度为 101.42%,说明模型验证良好。该优化工艺较优化前提高了 2.76 倍,较未发芽前提高了 8.44 倍。因此,该研究表明优化后的发芽工艺能够有效地提高小米糙米中 GABA 的富集量。

3 结 语

通过单因素试验和响应面优化试验,确立了小米糙米富集 GABA 的发芽工艺条件:浸泡温度 34 ℃、浸泡时间 12 h、发芽温度 34 ℃和发芽时间 60 h,在此优化条件下小米发芽糙米中 GABA 质量分数达到 184.75 mg/hg,较未发芽前提高了 8.44 倍。

参考文献:

- [1] ZHAGN Chao,ZHANG Hui,LI Jixin. Advances of millet research on nutrition and application [J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**,2007,22(1):51-55.(in Chinese)
- [2] XUE Yueyuan,LI Peng,LIN Qinbao. Research evolution on chemical component and physical character of foxtail millet[J]. **Journal of the Chinese Cereals and Oils Association**,2008,23(3):199-203.(in Chinese)
- [3] ZHANG Zhuqing,YANG Yajun,LI Wanhong. Comparative study on nutritional value and eating quality of coarse millet and millet[J]. **Cereal and food industry**,2014,21(2):22-26.(in Chinese)
- [4] ANNE M,DANIEL G. Changes in whole tissue biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) in basal ganglia of the dystonia (dtA1b) mouse[J]. **Life Sciences**,1979:2217-2221.
- [5] TIAN Yingjie,SUN Jin,XIE Zhenxing,et al. Effect of γ -aminobutyric acid on bone performance in High-fat-diet-fed mice γ -amino butyric acid[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2015,34(3):267-273.(in Chinese)
- [6] YANG Shengyuan,LU Zhaoxin,LV Fengxia,et al. Research progress on microbial glutamate decarboxylase [J]. **Food Science**,2005,9:528-533.(in Chinese)
- [7] YANG Naecherng,JHOU Kunyan,Tseng Chinyin. Antihypertensive effect of mulberry leaf aqueous extract containing gamma-aminobutyric acid in spontaneously hypertensive rats[J]. **Food Chemistry**,2012,132(4):1796-1801.
- [8] SEEMA S,DHARMESH C S,CHARANJIT S R. Analysing the effect of germination on phenolics,dietary fibres,minerals and γ -aminobutyric acid contents of barnyard millet(*Echinochloa frumentacea*)[J]. **Food Bioscience**,2016,13:60-68.
- [9] 白青云. 低氧胁迫和盐胁迫下发芽粟谷 γ -氨基丁酸富集机理及抗氧化性质研究[D]. 南京:南京农业大学,2009.
- [10] ZHANG Lan,ZHOU Juan,SHEN Tingyu. The effect of the different cultivation condition on the γ -aminobutyric acid in mung bean[J]. **Journal of Jilin Medical University**,2016(5):327-330.(in Chinese)
- [11] KIM N Y,JI G E. Characterization of the production of biogenic amines and gamma-aminobutyric acid in the soybean pastes fermented by *Aspergillus oryzae* and *Lactobacillus brevis* [J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**,2015,25(4):464-468.
- [12] XIAO Jing,XU Yanan,LI Qi,et al. Screening,Identification and optimizing of γ -aminobutyric acid production in yeast[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2016,35(8):1093-1099.(in Chinese)
- [13] MA Yan,DUAN Shuangmei,ZHAO Ming. Research progress of foods rich in gama-aminobutyric acid [J]. **Amino Acids and Biotic Resource**,2016(3):1-6.(in Chinese)
- [14] WANG Wengao,Chen Zhengxing,WANG Li. Rice germ:a potential γ -amino butyric acid source [J]. **Cereals and Oils**,2002(2):32-33.(in Chinese)
- [15] ZHANG Qian,XIANG Jun,et al. Optimizing soaking and germination conditions to improve gamma-aminobutyric acid content in japonica and india germinated brown rice[J]. **Journal of Functional Food**,2014,10(10):283-291.