

朱云辉,段元锋,郭元新. 苦荞发芽过程中 γ -氨基丁酸的富集及其他生理指标的变化[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):332-335.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.097

苦荞发芽过程中 γ -氨基丁酸的富集及其他生理指标的变化

朱云辉,段元锋,郭元新

(安徽科技学院食品药品学院,安徽凤阳 233100)

摘要:研究苦荞在发芽期间 γ -氨基丁酸(GABA)的富集及相关生理指标的变化,并对各指标间的相关性进行了分析。结果表明:随着发芽时间的延长,苦荞生长加快,呼吸作用增强,可溶性糖、还原糖、游离氨基酸含量增加;可溶性蛋白、干物质含量下降,GABA 含量在发芽 4 d 时达到最高值,谷氨酸脱羧酶(GAD)活力呈现先增加后降低的趋势。相关性分析表明:发芽苦荞 GABA 的富集量与呼吸强度($r=0.794$)呈显著正相关($P<0.05$),与游离氨基酸含量($r=0.963$)、GAD 活力($r=0.879$)呈极显著正相关($P<0.01$),与可溶性蛋白含量($r=-0.769$)呈显著负相关($P<0.05$)。

关键词:发芽苦荞; γ -氨基丁酸(GABA);富集;生理指标;相关性

中图分类号:S517.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)05-0332-04

苦荞 [*Fagopyrum Tataricum* (L.) Gaertn] 是一种蓼科荞麦属双子叶植物,别称鞑靼荞麦、乌麦,是我国传统的优势小杂粮,在我国西北、西南等地区有广泛种植^[1]。研究表明,苦荞中的蛋白质、维生素、脂肪及矿物质含量高于大米、高粱、小麦、玉米等农作物,且含有其他禾谷类粮食所没有的芸香苷等黄酮类物质及叶绿素^[2]。由于苦荞还含有蛋白酶抑制剂^[3]、植酸^[4]和过敏蛋白^[5]等抗营养因子,其营养价值还有待改善。有研究报道:发芽处理可消解或显著降低苦荞中的抗营养成分^[3,6];通过控制发芽条件,还能够富集 γ -氨基丁酸

(γ -aminobutyric acid,简称 GABA)等功能性成分^[7-8]。

GABA 是 1 种 4 碳非蛋白质氨基酸,天然分布于真核、原核生物中,主要存在于哺乳动物的脑组织、脊髓中,是哺乳动物中枢系统中 1 种非常有效的神经递质,参与多种代谢活动,具有重要的生理功能^[9-10]。研究证实,GABA 具有降血压、调节心率失常、镇定安神、调节激素分泌、预防肥胖和改善脑机能等作用^[11-12],因此,开发富含 GABA 的食品倍受重视。植物中 GABA 的合成主要通过 GABA 支路,此途径的限速酶为谷氨酸脱羧酶(GAD,EC 4.1.1.15)^[9,13]。本研究分析了苦荞在正常发芽过程中 GABA 富集、谷氨酸脱羧酶(GAD)活力、呼吸强度、糖类和蛋白质等生理指标的变化,探讨其相互关系,以期期为生产富含 GABA 的苦荞功能性食品提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用苦荞品种:榆 6-21,千粒质量 22.4 g,2013 年秋产自中国内蒙古自治区,购买后于 -20℃ 冰箱贮存备用。

收稿日期:2015-05-02

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1308085MC32)。

作者简介:朱云辉(1991—),男,安徽宿州人,硕士研究生,主要从事食品功能性成分的富集及品质控制的研究。E-mail:zyh172926966@163.com。

通信作者:郭元新,博士,教授,主要从事农产品加工及品质控制的研究。E-mail:guoyx@ahstu.edu.cn。

(δ)组合快 12.60%,试验结果表明,“美吉 F_1 ”(η) \times 奥利亚(δ)的三元杂交罗非鱼组合具有明显的生长优势及较高的雄性率,具有应用推广的价值。杂交育种的关键是对杂交后代的选择,通过多个世代的杂交和选择,将优良性状聚合和稳定下来,最终成为新的品系。本试验没有对杂交后代进行多世代选择,但本试验研究成果取得一定的进展,对进一步发掘品种的种质资源,对提高罗非鱼养殖的产量、效益及可持续发展具有重要意义。

参考文献:

- [1] 罗永巨. 罗非鱼选育方法研究进展[J]. 水产科技情报,2010,37(2):53-55.
- [2] 莫振明,林东年. 吉富罗非鱼与奥尼罗非鱼养殖对比试验报告[J]. 现代渔业信息,2010,25(8):24-27.

- [3] 李家乐,李晨虹,李思发,等. 不同组合尼罗罗非鱼(η) \times 奥利亚罗非鱼(δ)养殖性能差异研究[J]. 上海水产大学学报,1997,6(2):96-101.
- [4] 楼允东. 鱼类育种学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [5] 楼允东,李小勤. 中国鱼类远缘杂交研究及其在水产养殖上的应用[J]. 中国水产科学,2006,13(1):151-158.
- [6] 杨 淦,卢迈新,黄樟翰,等. 5 种杂交 F_1 罗非鱼生长性能比较研究[J]. 淡水渔业,2006,36(4):41-44.
- [6] 李思发,颜 标,蔡完其,等. 尼罗罗非鱼与萨罗罗非鱼正反交鱼自繁后代 F_2 耐盐性、生长性能及亲本对杂种优势贡献力的评估[J]. 水产学报,2008,32(3):335-341.
- [7] 林克宏,杨永铨,张中英,等. YY 型莫桑比克罗非鱼与尼罗罗非鱼杂交产生全雄鱼实验报告[J]. 淡水渔业,1983(4):6-10.
- [8] 罗俊烈. 杂种优势在鱼类生产上的利用[J]. 动物学杂志,1990,25(3):54-57.

1.2 试验试剂

GABA 标准品(纯度 $\geq 99.9\%$)、对二甲氨基苯磺酰氯(DABS-Cl, 99%), 购自美国 Sigma 公司。乙腈为色谱纯, 其他化学试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器设备

LHP-160 型智能恒温恒湿培养箱, 上海三发科学仪器有限公司; Agilent 1200 液相色谱仪, 安捷伦公司; UV-1800 紫外分光光度计, 苏州岛津公司; KDC-160HR 高速冷冻离心机, 合肥科大创新股份有限公司; GX-9076MBE 型数显鼓风干燥箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; SGD-IV 全自动还原糖自动测定仪, 山东省科学院生物研究所。

1.4 发芽试验

取 30 g 苦荞种子用去离子水清洗后, 用 1% 次氯酸钠溶液消毒 15 min, 再用去离子水冲洗至 pH 值中性, 在去离子水中于 30 ℃ 浸泡 4 h 后, 放入铺有 2 层滤纸的直径为 9 cm 培养皿中, 在每个培养皿中放置约 100 粒种子, 然后放入生化培养箱中于 30 ℃ 暗发芽, 发芽湿度为 85%~90%, 其间每 8 h 喷去离子水 1 次, 保持种子湿润。分别培养 0、1、2、3、4、5、6 d 后取样, 清洗后用吸水纸吸干水分, 一部分用于测定芽长、GAD 活性等生理指标, 其余样品采用真空冷冻干燥后去壳粉碎、过 80 目筛测定 GABA、糖类、氨基酸等物质含量。

1.5 测定方法

干物质含量: 用烘干恒质量法测定; 芽长: 随机选取 30 粒发芽苦荞籽粒, 用游标卡尺测定其芽长; 呼吸强度: 用小篮子法测定^[14], 以鲜质量计算 CO_2 产生量; 还原糖含量: 用还原糖自动测定仪测定干质量含量; 可溶性糖含量: 用苯酚硫酸法测定干质量含量^[14]; 可溶性蛋白质含量: 用考马斯亮蓝 G-250 法测定干质量含量, 以牛血清白蛋白为标准^[14]; 游离氨基酸含量: 用茚三酮溶液显色法测定干质量含量^[14]; GAD 活力: 参照 Zhang 等方法^[15]测定鲜质量活力; GABA 含量: 参考 Guo 等的方法^[16]测定。

1.6 统计分析

试验设 3 次重复, 结果以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。方差分析、相关性分析采用 SPSS (version 16.0, Inc., Chicago, IL, USA) 软件, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 苦荞发芽过程中芽长的变化

如图 1 所示, 苦荞芽长随着发芽时间的延长而不断增加: 发芽 1 d 苦荞芽长增长缓慢, 仅为 3.32 mm; 发芽 2 d 后增长明显加快; 发芽 6 d 后, 芽长达到 97.36 mm。

2.2 苦荞发芽过程中干物质含量的变化

随着发芽时间的延长, 干物质含量呈极显著的下降趋势 ($P < 0.01$)。发芽 6 d 时, 干物质含量为 24.37%, 比 0 d 下降了 63.61% (图 2); 苦荞发芽时间过长, 会大量消耗干物质, 从而影响发芽苦荞的品质。

2.3 苦荞发芽过程中呼吸强度的变化

如图 3 可见, 在 30 ℃ 下, 苦荞的呼吸强度随着发芽时间的延长不断增强: 发芽 1 d 内, 苦荞呼吸强度增长缓慢, 为 0.25 mg/(g·h), 仅比 0 d 增加了 30.69%; 随后快速提升, 发芽 6 d 时达到 1.20 mg/(g·h), 是 0 d 的 6.35 倍。

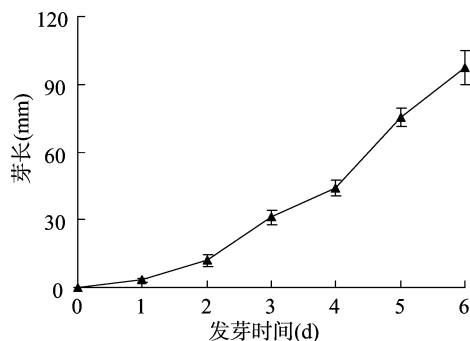
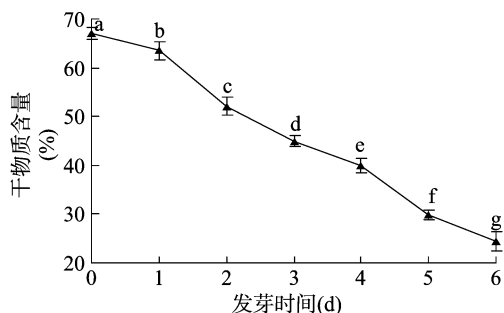


图1 苦荞发芽过程中芽长的变化



不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。图4、图6、图8、图9同

图2 苦荞发芽过程中干物质含量的变化

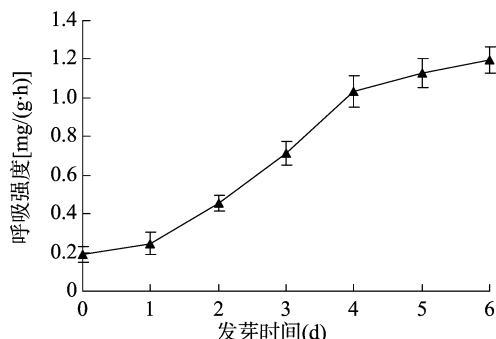


图3 苦荞发芽过程中呼吸强度的变化

2.4 苦荞发芽过程中还原糖含量的变化

图 4 显示, 在苦荞发芽的前 3 d, 还原糖含量增长缓慢, 发芽 3 d 仅为 7.74 mg/g, 是 0 d 的 3.75 倍; 之后显著提升 ($P < 0.01$), 在发芽 5 d 达到最大值, 为 19.88 mg/g, 是 0 d 的 9.65 倍; 随后缓慢下降。

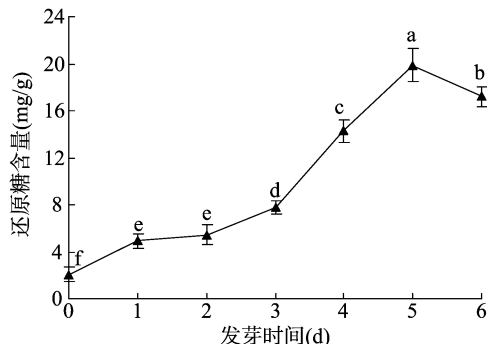


图4 苦荞发芽过程中还原糖含量的变化

2.5 苦荞发芽过程中可溶性糖含量的变化

如图 5 所示, 在苦荞发芽 0~2 d 内, 可溶性糖含量变化

不显著;2~4 d内可溶性糖含量急剧上升,发芽4 d时达到最大值,为46.89 mg/g,为0 d的2.51倍;4 d后呈现下降趋势。

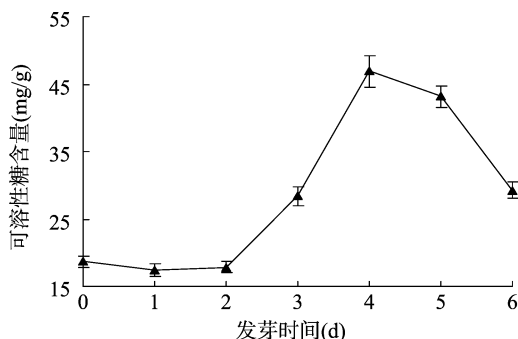


图5 苦荞发芽过程中可溶性糖含量的变化

2.6 苦荞发芽过程中可溶性蛋白含量的变化

由图6可知,发芽前2 d,苦荞中可溶性蛋白含量显著下降($P < 0.05$),在发芽2 d时达到3.67 mg/g,较0 d下降了10.73%。随后可溶性蛋白呈极显著下降的趋势($P < 0.01$);在6 d时含量为0.97 mg/g,较0 d降低了77.82%。

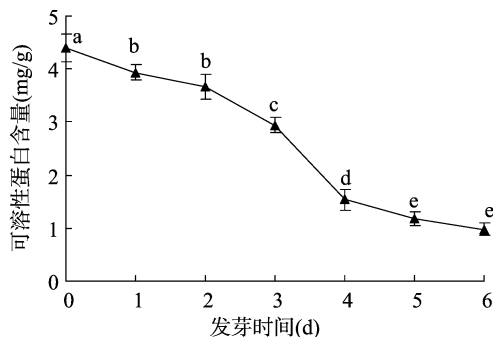


图6 苦荞发芽过程中可溶性蛋白含量的变化

2.7 苦荞发芽过程中游离氨基酸含量的变化

苦荞中游离氨基酸的含量随着发芽时间的延长呈现先增加后减少的趋势,在发芽4 d达到最高值,为578.85 $\mu\text{g/g}$,是0 d的3.74倍;随后缓慢下降(图7)。

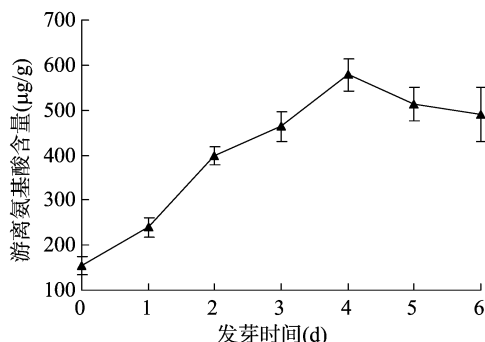


图7 苦荞发芽过程中游离氨基酸含量的变化

2.8 苦荞发芽过程中 GAD 活力的变化

如图8所示,GAD活力在发芽后急剧提升,在发芽3 d达到最高值,为40.79 U/g,是0 d的2.28倍;4 d后极显著下降($P < 0.01$),在发芽6 d酶活力降至26.36 U/g。GAD作为GABA合成途径的限速酶,其活力的提升有助于GABA的富集。

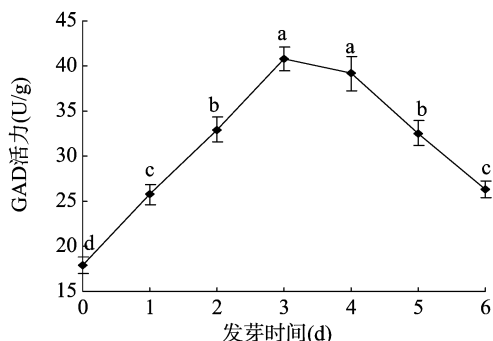


图8 苦荞发芽过程中GAD活力的变化

2.9 苦荞发芽过程中 GABA 含量的变化

如图9所示,GABA含量随着发芽时间的延长呈现极显著的增加趋势($P < 0.01$),并在发芽4 d达到最高值,为187.39 $\mu\text{g/g}$,比0 d增加85.35%;发芽4 d后GABA含量缓慢下降。由此可见,苦荞发芽4 d有利于GABA的富集。

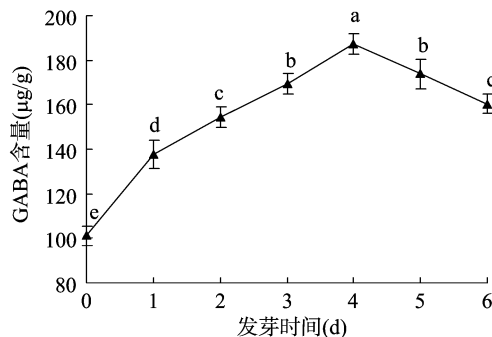


图9 苦荞发芽过程中GABA含量的变化

2.10 发芽苦荞 GABA 含量与生理生化指标的相关性分析

相关性分析(表1)表明,发芽苦荞GABA的富集量与呼吸强度($r = 0.794$)呈显著正相关($P < 0.05$);与游离氨基酸含量($r = 0.963$)、GAD活力($r = 0.879$)呈现极显著正相关($P < 0.01$);与可溶性蛋白含量($r = -0.769$)呈显著负相关($P < 0.05$)。

3 讨论

已有报道证明,植物中的GABA合成主要来自GABA支路中由GAD催化的不可逆的 α -谷氨酸脱羧反应^[9]。植物种子经浸泡发芽后,GAD大量合成,GABA量随之增加^[17]。本研究表明:GABA富集量与GAD活力呈极显著正相关($P < 0.01$),苦荞在发芽前4 d,GABA富集量、GAD活力均不断提升;发芽4 d后,GAD活力下降,GABA含量也呈下降趋势。

发芽过程实质上是一个酶促反应的过程,种子经浸泡发芽后,呼吸速率加快,淀粉酶和蛋白酶等水解酶被迅速激活,贮藏物质降解,干物质含量下降,为呼吸、GABA合成等生理活动提供了充足的底物^[18-20]。苦荞在发芽过程中,淀粉被分解为小分子糖类,还原糖和可溶性糖含量不断升高,但在发芽4~5 d后呈现下降趋势,这可能是由于淀粉被分解的速率低于还原糖、可溶性糖消耗的速率所致。可溶性蛋白含量与游离氨基酸含量呈显著负相关,且均与呼吸强度呈现极显著相关性,随着苦荞的生长,蛋白酶活性增强,呼吸强度提升,其氮代谢随之加剧,大分子的蛋白质分解为游离氨基酸,其组成更

表 1 苦荞发芽过程中生理活性和 GABA 等物质含量的相关性分析结果

指标	芽长	干物质含量	呼吸强度	可溶性糖含量	可溶性蛋白含量	游离氨基酸含量	GAD 活力
干物质含量	-0.969 **						
呼吸强度	0.945 **	-0.979 **					
可溶性糖含量	-0.642	-0.704	0.826 *				
还原糖含量	0.937 **	-0.937 **	0.960 **	0.824 *			
可溶性蛋白含量	-0.949 **	0.963 **	-0.992 **	—			
游离氨基酸含量	0.733	-0.867 *	0.902 **	—	-0.870 *		
GAD 活力	0.220	-0.434	0.482	—	-0.418	0.790 *	
GABA 活力	0.595	-0.750	0.794 *	—	-0.769 *	0.963 **	0.879 **

注：“*”表示在 0.05 水平上显著，“**”表示在 0.01 水平上显著，“—”表示不存在或无需关注其相关性。

加合理,提高了种子的营养价值。研究者们对发芽的大豆^[21]、糙米^[22]和蚕豆^[23]的研究均表明,GABA 的富集量与氨基酸含量呈显著正相关。在本研究中,苦荞的 GABA 含量与游离氨基酸呈现极显著的正相关;此外,大分子的可溶性蛋白不断下降,与 GABA 含量呈显著负相关,这些变化有利于 GABA 的富集。

4 结论

苦荞发芽过程中各生理指标均发生了显著的变化($P < 0.05$)。苦荞芽长不断生长,呼吸作用加快,干物质含量降低,还原糖含量在发芽 5 d 达到最高值,随后不断下降,可溶性糖含量先下降后上升再下降,可溶性蛋白含量不断下降,游离氨基酸含量不断增加并在发芽 4 d 达到最高值。GAD 活力呈现先增加后降低的趋势,GAD 活力的提升促进了 GABA 的富集,在发芽 4 d 时 GABA 含量达到最高值,为 187.39 μg/g,与发芽 0 d 相比增加了 85.35%。相关性分析表明:发芽苦荞 GABA 的富集量与呼吸强度($r = 0.794$)呈显著正相关($P < 0.05$),与游离氨基酸含量($r = 0.963$)、GAD 活力($r = 0.879$)呈极显著正相关($P < 0.01$),与可溶性蛋白含量($r = -0.769$)呈显著负相关($P < 0.05$)。

参考文献:

[1]秦培友. 我国主要荞麦品种资源品质评价及加工处理对荞麦成分和活性的影响[D]. 北京:中国农业科学院,2012.

[2]朱云辉,郭元新. 我国苦荞资源的开发利用研究进展[J]. 食品工业科技,2014,35(24):360-365.

[3]张美莉,张建艳,胡小松. 萌发荞麦蛋白酶抑制剂活性变化及与蛋白消化率相关性研究[J]. 中国食品学报,2006,6(5):34-39.

[4]宫凤秋. 加工方式对传统苦荞制品功能特性的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2007.

[5]赵小珍,张政,景巍,等. 苦荞麦主要过敏蛋白 N 端基因片段的克隆及序列分析[J]. 食品科学,2006,27(10):41-44.

[6]Wang L,Li X D,Niu M,et al. Effect of additives on flavonoids,D-chiro-inositol and trypsin inhibitor during the germination of tartary buckwheat seeds[J]. Journal of Cereal Science,2013,58(2):348-354.

[7]赵琳. 苦荞萌发期生理活性及其蛋白抗菌性的研究[D]. 上海:上海师范大学,2012.

[8]朱云辉,郭元新. 响应面法优化盐胁迫发芽苦荞富集 γ-氨基丁酸的培养条件[J]. 食品科学,2015,36(19):96-100.

[9]Bouche N,Lacombe B,Fromm H. GABA signaling:a conserved and

ubiquitous mechanism[J]. Trends in Cell Biology,2003,13(12):607-610.

[10]Nathan B,Bao J,Hsu C C,et al. A membrane form of brain L-glutamate decarboxylase: identification, isolation, and its relation to insulin-dependent mellitus [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,1994,91(1):242-246.

[11]Abdou A M,Higashiguchi S,Horie K,et al. Relaxation and immunity enhancement effects of γ-Aminobutyric acid (GABA) administration in humans[J]. Biofactors,2006,26(3):201-208.

[12]Park K B,Oh S H. Production of yogurt with enhanced levels of γ-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract[J]. Bioresource Technology,2007,98(8):1675-1679.

[13]Su G X,Yu B J,Zhang W H,et al. Higher accumulation of γ-aminobutyric acid induced by salt stress through stimulating the activity of diamine oxidases in *Glycine max* (L.) Merr. roots[J]. Plant Physiology and Biochemistry,2007,45(8):133-141.

[14]李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2000.

[15]Zhang H,Yao H Y,Chen F,et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ[J]. Food Chemistry,2007,101(4):1670-1676.

[16]Guo Y,Yang R,Chen H,et al. Accumulation of γ-aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia[J]. European Food Research & Technology,2012,234(4):679-687.

[17]朱云辉,郭元新. 发芽苦荞 GABA 的富集及氨基酸等含氮物的变化[J]. 食品与发酵工业,2015,41(2):85-88.

[18]王玉萍,韩永斌,蒋振辉,等. 通气处理对发芽糙米生理活性及主要物质含量影响[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版,2005,26(4):91-94.

[19]王庆莲,吴伟民,赵密珍,等. GA₃ 处理对欧亚种葡萄种子发芽的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):244-246.

[20]蒋春艳,郭达伟,曾军,等. 细梗香草种子发芽试验[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):246-247.

[21]郭元新,宋玉,杨润强,等. 发芽过程中大豆生理活性和 GABA 等物质含量变化及相关性研究[J]. 食品与发酵工业,2011,37(6):51-55.

[22]康彬彬,陈团伟,陈绍军,等. 高 γ-氨基丁酸稻米品种的筛选[J]. 山地农业生物学报,2007(6):471-475.

[23]李岩. 发芽蚕豆 γ-氨基丁酸富集途径及高效富集技术研究[D]. 南京:南京农业大学,2009.