

盐胁迫协同抗坏血酸对芸豆萌发富集 γ -氨基丁酸的影响

于海燕, 廖晗雪, 陈臣, 田怀香*

(上海应用技术大学香料香精技术与工程学院, 上海 201418)

摘要: 为优化外源因子胁迫芸豆富集 γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric Acid, GABA) 的工艺条件, 在单因素试验的基础上, 利用响应面法探究外源因子添加对萌发芸豆中 GABA 含量的影响, 同时初步对芸豆中 GABA 积累的机理进行探讨。结果表明, 除氯化钠外, 谷氨酸钠、氯化钙、抗坏血酸和磷酸吡哆醛均对芸豆萌发富集 GABA 有显著促进作用; 在盐胁迫 (3.00 g/L 谷氨酸钠、5.37 mmol/L 氯化钙) 协同 0.17 g/L 抗坏血酸处理下, 萌发 24 h 的芸豆 GABA 含量最高为 303.60 mg/100 g, 是芸豆籽粒和去离子水萌发芸豆的 4.39 倍和 2.12 倍; 萌发过程中, 芸豆 GABA 积累量与谷氨酸脱羧酶 (Glutamic Acid Decarboxylase, GAD) 活性呈正相关, 底物水平以及 Ca^{2+} 和 H^{+} 浓度的提高对胁迫处理促进芸豆积累 GABA 有积极作用。该研究利用盐胁迫协同抗坏血酸处理有效提高了萌发芸豆中 GABA 含量, 可为开发富含 GABA 的芸豆食品提供理论参考。

关键词: 萌发; 芸豆; γ -氨基丁酸; 外源因子

文章编号: 1673-9078(2023)08-213-220

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2023.8.1037

Effects of Salt Stress and Ascorbic Acid on the Accumulation of γ -Aminobutyric Acid during Kidney Bean Germination

YU Haiyan, LIAO Hanxue, CHEN Chen, TIAN Huaixiang*

(School of Perfume and Aroma Technology, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

Abstract: To optimize the process conditions for enriching γ -aminobutyric acid (GABA) in kidney bean under the stress of exogenous factors, the effects of the addition of exogenous factors on the GABA content in germinated kidney bean were investigated by response surface methodology on basis of the single factor experiments. Meanwhile, the mechanism of GABA accumulation in kidney bean was also discussed. The results showed that except for sodium chloride, sodium glutamate, calcium chloride, ascorbic acid and pyridoxal phosphate all significantly promoted GABA enrichment in kidney bean during germination. Under salt stress (3.00 g/L sodium glutamate, 5.37 mmol/L calcium chloride) combined with the treatment with 0.17 g/L ascorbic acid, the GABA content after germination for 24 h was the highest (303.60 mg/100 g), which was 4.39 times and 2.12 times the GABA contents in the kidney bean seeds and in the control kidney bean treated by deionized water, respectively. During germination, the amount of accumulated GABA in kidney bean was positively correlated with the activity of glutamic acid decarboxylase (GAD), and the increase of substrate level and the concentrations of Ca^{2+} and H^{+} had positive effects on GABA accumulation in kidney bean under stress treatment. In this research, salt stress combined with ascorbic acid treatment increased effectively the GABA content in germinated kidney bean, which could provide theoretical support for the development of GABA-rich kidney bean products.

Key words: germination; kidney bean; γ -aminobutyric acid; exogenous factor

引文格式:

于海燕, 廖晗雪, 陈臣, 等. 盐胁迫协同抗坏血酸对芸豆萌发富集 γ -氨基丁酸的影响[J]. 现代食品科技, 2023, 39(8): 213-220

YU Haiyan, LIAO Hanxue, CHEN Chen, et al. Effects of salt stress and ascorbic acid on the accumulation of γ -aminobutyric acid during kidney bean germination [J]. Modern Food Science and Technology, 2023, 39(8): 213-220

收稿日期: 2022-08-19

基金项目: 企业横向项目 (J2020-227)

作者简介: 于海燕 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味分析, E-mail: hyyu@sit.edu.cn

通讯作者: 田怀香 (1976-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品风味化学, E-mail: tianhx@sit.edu.cn

芸豆 (Kidney Bean), 生物学名菜豆 (*Phaseolus vulgaris* L.), 又称四季豆、腰豆等。2019 年 12 月, 据联合国粮农组织统计, 全球芸豆年种植面积约有 $3.7 \times 10^7 \text{ hm}^2$, 总产量约为 $3.1 \times 10^7 \text{ t}$, 其中我国每年种植面积在 $8.1 \times 10^5 \text{ hm}^2$ 左右, 平均年产量为 $1.3 \times 10^6 \text{ t}$, 居世界第五^[1]。芸豆具有很高的食用和药用价值, 富含膳食纤维、蛋白质和多种矿物质元素^[2]。目前芸豆主要作为日常菜品和煮粥、煲汤等方面的食材, 深加工食品类少, 开发利用率较低。萌发可以增加谷物和豆类蛋白质的生物利用度以及减少有害物质、抗营养因子, 同时产生 GABA 等生物活性物质, 使其营养组成和感官品质都得以改善^[3,4]。因此发芽芸豆及其制品在国内外主食行业前景广阔, 如生产富 GABA 营养粉、功能饮料等^[5]。

GABA 是一种非蛋白质氨基酸, 能够通过降低神经元的活性避免神经细胞过度兴奋, 并能避免产生焦虑的电信号传达到大脑的相关位点, 因而具有缓解焦虑、安神助眠的作用^[6]。随着年龄以及外界环境压力的增加, 人体内 GABA 含量日益减少, 特别是上班族、学生、运动员等长时间处于高压环境的人群更容易缺乏 GABA, 产生焦虑、疲倦、忧虑等情绪, 因此从食品中补充 GABA 对人体健康具有重要意义^[7]。GABA 广泛分布于糙米、大豆、藜麦等多种植物中, 但是含量较低 ($0.03 \sim 3.35 \text{ mg/g FW}$ ^[8]), 不能满足每人每天 $30 \sim 100 \text{ mg}$ 的摄入量, 由此 GABA 的富集方法受到广泛关注^[9]。

植物实现 GABA 富集的主要途径为 GABA 支路, 即谷氨酸在 GAD 催化下脱去 α -羧基生成 GABA, 再经 GABA 转氨酶催化为琥珀酸半醛, 最后通过脱氢以琥珀酸形式进入三羧酸循环, 其中 GAD 是 GABA 合成的限速酶^[10,11]。在盐胁迫、高 H^+ 浓度、低氧低温和机械损伤等逆境条件下, 植物体内 GABA 含量明显升高^[12], 并且植物在不同胁迫条件下 GABA 积累程度和相应时间的差异表明不同胁迫诱导的 GABA 积累机制不同, 因此植物体中 GABA 在逆境胁迫下的动态变化机制有待具体研究。目前, 通过控制籽粒发芽的条件从而激活水解酶类富集 GABA 已经成为当前发芽谷物的研究热点, 如张文刚等^[13]利用谷氨酸钠和抗坏血酸协同处理藜麦, GABA 积累量达到对照组的 2.26 倍; 华艳^[14]优化了糙米发芽富集 GABA 的培养液组分 (谷氨酸、氯化钙、磷酸吡哆醛、赤霉素), GABA 积累量可达 158.94 mg/100 g 。目前已有报道主要对湿热加工^[15]和发酵^[16]富集芸豆 GABA 以及芸豆萌发期间营养物质变化^[17]做了初步探讨, 但是有关芸豆在外源因子协同处理下萌发富集 GABA 的研究较少。

本研究以芸豆为原料, 通过单因素和 Box-Behnken 试验优化得到芸豆富集 GABA 的最佳工艺参数, 并初步探究不同外源因子胁迫芸豆萌发富集 GABA 机理, 为芸豆富集 GABA 研究提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

芸豆: 小白芸豆, 购自云南省, 参考 GB 5009.124-2016《食品安全国家标准食品中氨基酸的测定》测得芸豆谷氨酸含量为 $(3.35 \pm 0.02) \text{ g/100 g}$, 实验前储存于室温通风处; GABA 标准品、无水乙醇、苯酚、次氯酸钠、氯化钙、抗坏血酸、氯化钠、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾, 上海泰坦科技股份有限公司; 2-巯基乙醇, 赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; 磷酸吡哆醛, 西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司; L-谷氨酸 (BR), 国药集团化学试剂有限公司; 乙二胺四乙酸, 生工生物工程 (上海) 股份有限公司; L-谷氨酸钠, 上海阿达玛斯试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

MEMMERT 培养箱, 赛微生物技术有限公司; DHG-9145 恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科技有限公司; UV-200 紫外分光光度计, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; ME104E 电子天平、FiveEasy Plus 台式 pH 计, 梅特勒-托利多仪器有限公司; TGL-16M 台式高速冷冻离心机, 湘仪 (湖南) 离心机仪器有限公司; 小型磨粉机, GIANXI 山点水公司; FD-2 冷冻干燥机, 上海比朗仪器制造有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 芸豆萌发工艺流程

芸豆 → 消毒 → 清洗 → 浸泡 → 加入外源因子 → 萌发 → 清洗 → 发芽芸豆

操作要点: 挑选成熟饱满、大小一致且无损坏的芸豆, 用 75% (V/V) 乙醇浸泡 1 min 消毒后清洗干净, 加入 3~5 倍的去离子水 25°C (避光) 浸泡 12 h^[17]。浸泡后的芸豆种子用无菌纱布包裹放入培养皿, 加入含不同浓度外源因子的培养液, 用量以浸没纱布为宜, 于培养箱中 25°C 进行培养, 每隔 6 h 取一次样, 选择样品中 GABA 含量最高时的萌发时间作为后续处理时间。培养期间保持充足的氧气和纱布的湿润, 芸豆萌发完成后洗净并冷冻干燥 24 h, 打粉过 60 目筛后置入 -16°C 条件下待测。

1.3.2 萌发培养液中外源因子的确定

每组萌发实验用 30 g 左右芸豆, 分别加入五种外源因子谷氨酸钠 (Monosodium Glutamate, MSG)、氯化钠 (Sodium Chloride, NaCl)、氯化钙 (Calcium Chloride, CaCl₂)、抗坏血酸 (Ascorbic Acid, AsA) 和磷酸吡哆醛 (Pyridoxal 5-Phosphate, PLP), 同时进行芸豆去离子水萌发的对照试验。所有培养液现用现配, 每个萌发试验进行 3 个重复。以 GABA 质量分数为指标, 考察 MSG 溶液质量浓度 (1、2、3、4、5 g/L); NaCl 溶液浓度 (50、100、150、200、250 mmol/L); CaCl₂ 溶液浓度 (2、4、6、8、10 mmol/L); AsA 溶液质量浓度 (1、2、3、4、5 g/L); PLP (0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L) 对萌发芸豆中 GABA 含量的影响, 确定显著影响芸豆 GABA 含量的主要外源因子, 并得到 Box-Behnken 试验范围。

1.3.3 Box-Behnken 试验优化萌发条件

在单因素实验结果基础上, 利用 3 因素 3 水平 Box-Behnken 试验优化芸豆的萌发条件: MSG 浓度 (A)、CaCl₂ 浓度 (B) 和 AsA 浓度 (C), 具体参数见表 1。

表 1 响应面设计因素与水平

Table 1 Factors and levels of response surface analysis

水平	因素		
	MSG 质量浓度 A/(g/L)	CaCl ₂ 浓度 B/(mmol/L)	AsA 质量浓度 C/(g/L)
-1	1	2	0
0	2	4	1
1	3	6	2

1.3.4 GABA 含量的测定

GABA 含量的测定参考张珺等^[18]。GABA 标准曲线的绘制: 将 GABA 标准品用 60% (V/V) 乙醇溶解, 配制 0.04、0.06、0.08、0.10、0.12 mg/mL 标准品溶液, 分别取 3 mL 标准品, 每组添加 6 mL 7.5% (V/V) 次氯酸钠 (有效氯≥10% (V/V)), 2 mL 6% (V/V) 苯酚溶液, 并用 0.10 mol/L 四硼酸钠调 pH 值 9.0, 避光放置 30 min 后于 635 nm 处测定吸光度。得到 GABA 的标准曲线为 $y=6.95x-0.0147$, $R^2=0.9928$, y 为吸光度, x 为标准品浓度。样品中 GABA 含量测定: 取干燥芸豆样品粉末与 60% (V/V) 乙醇以 1:10 的比例混合, 150 r/min、60 °C 下振荡 2 h 后在 5 000 r/min 条件下离心 5 min, 上清液为样品 GABA 待测提取液。取 3 mL 提取液按以上标准曲线测定的方法测定吸光度。

1.3.5 GAD 活性测定

GAD 的提取与活性测定参考 Bai 等^[19]。GAD 粗酶提取: 芸豆粉和预冷磷酸钾缓冲溶液 (pH 值 5.8、0.066 7 mol/L, 含 2 mmol/L 2-巯基乙醇, 2 mmol/L 乙二胺四乙酸、0.2 mmol/L PLP) 以 1:5 比例混合, 涡旋

振荡后置于冰水浴中提取 1.5 h, 最后 10 000 g 冷冻离心 20 min, 取出上清液待测。GAD 酶测定: 反应体系含 GAD 粗酶液 0.2 mL, 1% (m/V) L-谷氨酸溶液 (pH 值 4.7) 0.1 mL。混合液置于 40 °C 水浴 2 h, 90 °C 水浴 5 min 终止反应后测定 GABA 含量。1 个酶活力单位定义为每克芸豆在 40 °C 下每小时生成 1 mg GABA (由添加的 L-谷氨酸生成)。

1.3.6 数据分析

每个实验重复 3 次, 取平均值, 结果以干基表示。采用 SPSS 21.0 进行单因素方差分析与显著性差异分析, 运用 Origin 9.0 软件进行作图, Design-Expert 8.0.6 进行 Box-Behnken 试验设计。

2 结果与讨论

2.1 萌发时间对芸豆 GABA 含量和 GAD 活性的影响

萌发是高等植物生命活动最强烈的时期之一, 该过程中种子营养成分首先被分解, 为生长和合成提供能量, 同时伴随不同途径进行新物质的合成。已有研究证实: 萌发时间对藜麦、苦荞等植物富集 GABA 影响达到显著水平^[13,20], 所以探究了不同时间所得萌发芸豆中 GABA 含量和 GAD 活性变化, 结果如图 1 所示。

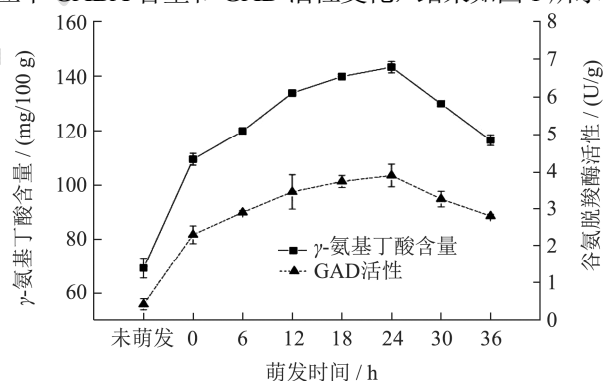


图 1 萌发时间对芸豆 GABA 含量和 GAD 活性的影响

Fig.1 Individual effect of incubation time on GABA content and GAD activity in germinated kidney bean

芸豆原料 GABA 含量为 69.16 mg/100 g, 在浸泡 12 h 后即萌发 0 h 时 GABA 质量分数达到 109.48 mg/100 g。这是因为在芸豆逐渐吸水的过程中, 酶作用下胚乳中的干物质转化为可溶性物质, 从而为胚乳呼吸和发芽供给营养, 奠定了 GABA 合成的物质基础^[21]。萌发 0~24 h 过程中 GABA 含量逐渐增加, 在 24 h 时达到一个峰值 (143.44 mg/100 g) 后又逐渐降低。GAD 活性与 GABA 含量变化趋势相似, 验证了王中磊等^[15]的结论: 芸豆 GABA 积累量与 GAD 活

性呈正相关。当萌发时间为 24 h 时, GAD 活性最高, 为对照的 9.26 倍。GAD 的活性在萌发处理过程中被激活, 可促使芸豆中原有的谷氨酸脱羧生成 GABA, 从而使 GABA 含量升高。在 24~36 h 内 GABA 含量逐渐降低, 原因可能是底物谷氨酸的含量逐渐降低或者丙酮酸转氨酶的活性大于 GAD 活性, 丙酮酸转氨酶将生成的 GABA 又转化成琥珀酸半醛, 导致 GABA 合成量低于 GABA 消耗量, 从而使总含量降低^[22]。

胚芽随着萌发时间增加而生长过长, 在干燥后容易脱落, 给后期加工带来困难。而且有报道表明, 过长的发芽时间会造成营养成分有较大损失^[23]。综合考虑不同萌发时间下芸豆的 GABA 含量和 GAD 活性测定结果, 确定芸豆萌发以 24 h 为宜, 后续试验在此基础上进行。

2.2 外源因子胁迫对萌发芸豆 GABA 含量的影响

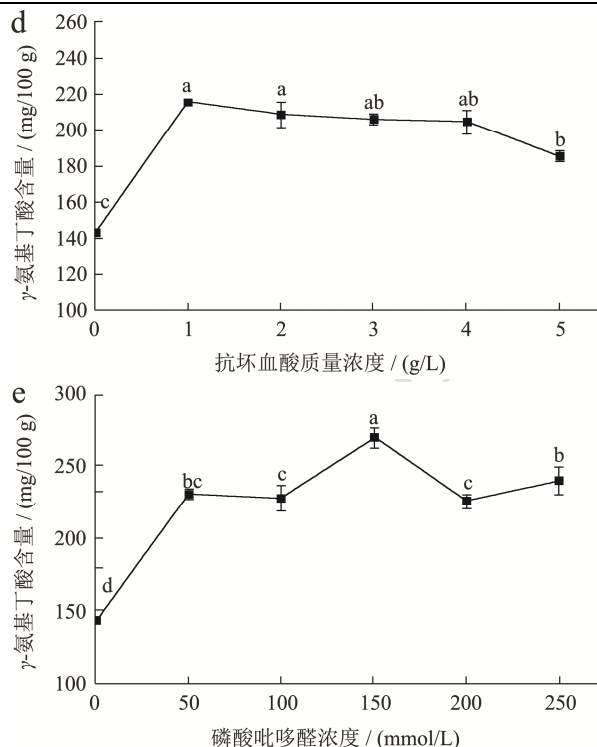
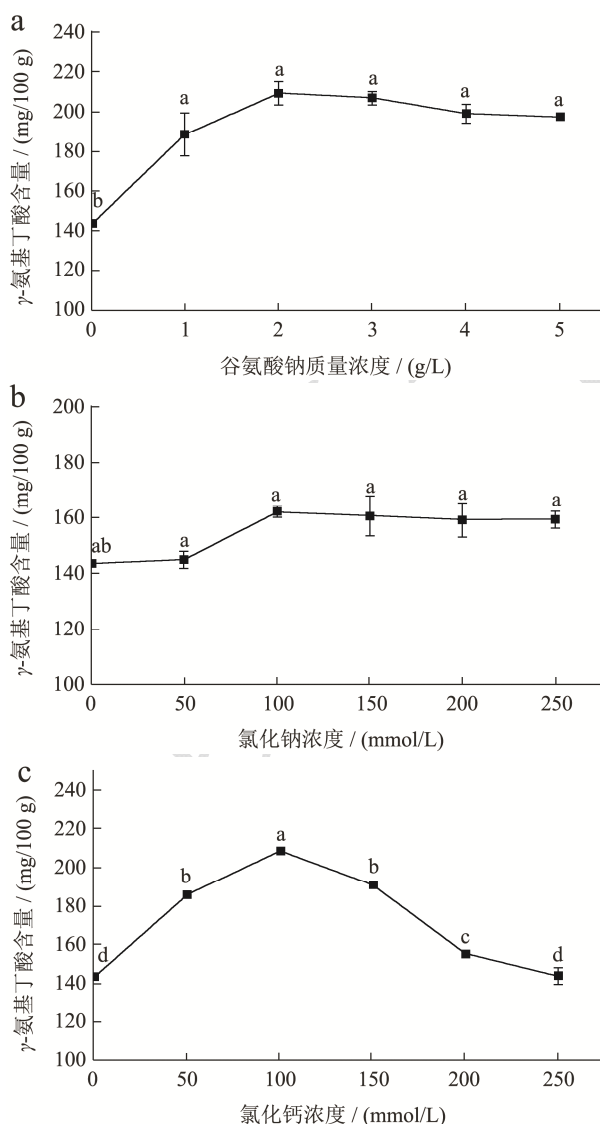


图2 外源因子胁迫对萌发芸豆 GABA 含量的影响

Fig.2 Effects of exogenous factors stress on GABA content in germinated kidney bean

注: 不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

2.2.1 MSG 质量浓度对萌发芸豆 GABA 含量的影响

作为 L-谷氨酸的衍生物, MSG 溶解性更好, 在水中解离后也可以被 GAD 利用, 因此综合成本等角度选择 MSG 来富集 GABA^[24]。不同浓度 MSG 对萌发芸豆中 GABA 含量的影响如图 2a 所示。相比去离子水对照, 外源 MSG 添加对 GABA 生成有显著促进作用($P < 0.05$)。MSG 质量浓度在 2 g/L 以下时, GABA 含量与 MSG 质量浓度呈现相同的增长趋势, 而当质量浓度达到 2 g/L 以后, GABA 含量几乎不再增加, 原因应为底物分子与酶分子的结合已达到饱和状态, 随后底物质量浓度的增加造成培养液中离子质量浓度的增加, 从而给细胞壁较大压力, 堵塞营养物质的运输通道, 使其进出细胞的活动受到限制, 不利于 GABA 的合成与运送, 所以继续增加底物的质量浓度不会导致 GABA 含量的增加^[25,26]。MSG 质量浓度在 1~5 g/L 时, GABA 含量差异不显著 ($P > 0.05$), 最终选择 MSG 最佳添加量为 1 g/L。

2.2.2 NaCl 浓度对萌发芸豆 GABA 含量的影响

有报道^[27,28]表明, NaCl 胁迫对植物的萌发、生长发育和渗透调节的影响可能与植物的抗逆机制有关, 植物在盐逆境下会促进 GABA 的产生。不同浓度 NaCl 对萌发芸豆中 GABA 的影响如图 2b 所示。相比去离子

水对照, 外源 NaCl 添加对 GABA 生成无显著促进作用 ($P>0.05$); NaCl 浓度在 50~250 mmol/L 时, GABA 含量差异不显著 ($P>0.05$)。由此可见, 采用不同浓度的 NaCl 培养液不能达到富集芸豆 GABA 的目的, 验证了申迎宾等^[29]在豇豆萌发工艺研究中得出的结论。

2.2.3 CaCl_2 对萌发芸豆 GABA 含量的影响

植物中的 GAD 区别于其他物种来源的主要特征在于它的碳末端部分存在一个钙调素 (GAM) 结合区域, Ca^{2+} 或 CaM 可激活多种植物的 GAD 表明 GAD 受 Ca^{2+} /CaM 信号转导途径调节^[30,31]。不同浓度 CaCl_2 对萌发芸豆中 GABA 含量的影响如图 2c 所示。随着 CaCl_2 浓度的增加, 芸豆中 GABA 含量先升高后降低, CaCl_2 浓度为 4 mmol/L 时 GABA 含量有最高值为 208.55 mg/100 g, 比对照组 (143.44 mg/100 g) 提高了 45.4%。究其原因, 可能是当 Ca^{2+} 浓度低于 4 mmol/L 时, 随着 Ca^{2+} 浓度的增加, 细胞质中 Ca^{2+} 浓度增加, 从而增强了激活 GAD 的能力, 导致 GABA 的积累; 但 Ca^{2+} 浓度继续增加会使细胞质中 Ca^{2+} 达到饱和, GAD 活力不再增强, 同时 CaCl_2 溶液中 Ca^{2+} 浓度的升高使水解程度加剧, 溶液 pH 值降低, 进一步降低了细胞质 pH 值, 使 GAD 无法被激活, 萌发芸豆中 GABA 水平降低^[32]。萌发芸豆培养液中适量添加 CaCl_2 显著提高了 GABA 含量, 证明了 Ca^{2+} 对芸豆 GAD 的激活作用, 由此可推测芸豆 GAD 也是一种钙调素结合蛋白, 可以利用 Ca^{2+} 对芸豆 GAD 的激活作用来提高 GABA 的产量。

2.2.4 AsA 质量浓度对萌发芸豆 GABA 含量的影响

pH 值是影响 GAD 活性的因素之一, GAD 最适 pH 值为 4.0~5.0, 因此在发酵过程中需维持酸性环境^[33]。不同质量浓度 AsA 对萌发芸豆中 GABA 的影响如图 2d 所示。GABA 含量随着 AsA 浓度的增大先升高后趋于稳定。AsA 质量浓度在 0~1 g/L 之间 GABA 含量有一定增加, AsA 质量浓度在 1.0~4.0 g/L 时, 萌发芸豆中 GABA 含量无显著性差异 ($P>0.05$), AsA 质量浓度为 1 g/L 时, GABA 积累的水平最高 (215.05 mg/100 g), 是去离子水对照组的 1.50 倍。加入适量酸形成的逆境胁迫可促进 GABA 积累, 但是 H^+ 浓度过高可能会使芸豆种子 pH 值偏低, GAD 等酶的活性受到抑制, 从而抑制了 GABA 的生成。GABA 生成和转化在芸豆发芽过程中是一系列可逆的反应, 所述发芽培养液成分若用量过少, 将无法达到实现转化 GABA 的最佳量, 若使用量过多, 又会抑制 GABA 的生成和积累。

2.2.5 PLP 浓度对萌发芸豆 GABA 含量的影响

GAD 是一种吡醛类裂解酶, 由 PLP 与脱辅基蛋白构成, 二者的解离和聚合可以极大影响 GAD 的活

性^[34]。不同浓度 PLP 对萌发芸豆中 GABA 含量的影响如图 2e 所示。PLP 浓度在 1.5 mmol/L 时, GABA 含量达到峰值为 269.46 mg/100 g, 表明 PLP 可刺激 GAD 的活性进而促进 GABA 积累, 与 Bai 等^[19]的结论相符。但在 0.5~1.0 和 1.5~2.0 mmol/L 之间, GABA 含量随着 PLP 浓度的升高呈下降趋势, 因为 PLP 浓度的增加也有利于增强 GABA 转氨酶的活性, 但这取决于 PLP 浓度和转换的 GABA 的浓度^[14]。综上所述, 结合 PLP 成本较高的因素, 不考虑将其作为富集 GABA 的条件。而维生素 B_6 作为磷酸吡哆醛的前体, 也可有效提高 GABA 含量。申迎宾等^[35]发现用 1.0 mmol/L 维生素 B_6 浸泡豇豆可使其 GABA 含量达到萌芽前的 1.5 倍左右。证实了维生素 B_6 可有效提高 GABA 含量。邓宇等^[36]在研究浸泡液对发芽糙米 GABA 富集的影响时, 比较了不同浓度 PLP 和维生素 B_6 的效果, 发现二者具有可替代性。

2.3 Box-Behnken 试验结果

为了进一步提高萌发芸豆中 GABA 含量, 以 MSG 质量浓度 (A)、 CaCl_2 浓度 (B)、AsA 质量浓度 (C) 为自变量, 以 GABA 质量分数为响应值, Box-Behnken 试验优化芸豆萌发富集 GABA 工艺的结果见表 2。采用包括 5 个中心点重复在内的 17 个组合, 研究各因素对 GABA 含量的联合效应。通过二次逐步回归分析实验结果, 得到各因素与 GABA 含量之间函数关系的回归方程; 生成方差分析 (ANOVA) 以确定单个线性、二次和交互回归系数; 通过 F 检验法检验多项式关系的显著性; 通过对回归系数的统计分析生成回归模型的等高线图。

2.3.1 二次多项式回归模型的建立

通过对表 2 中数据进行二次多元逐步回归拟合, 可以得到 MSG 质量浓度 (A)、 CaCl_2 浓度 (B) 和 AsA 质量浓度 (C) 与 GABA 含量之间的二次回归方程:

$$Y = -135.93100 + 187.18825A + 80.93350B + 84.96725C + 6.20000AB - 19.43250AC - 9.5750BC - 43.24175A^2 - 9.20231B^2 - 16.27175C^2$$

上述回归模型的方差分析 (表 3) 显示 $P<0.001$ 即该模型极显著, 失拟项在 0.05 水平上不显著 ($P>0.05$), 说明建立的模型对本实验拟合程度良好, 符合芸豆萌发过程中的 GABA 含量随萌发条件的变化规律。因此该模型可以用于预测萌发芸豆 GABA 变化情况。一次项 A、B 对响应值的影响较大, 达到极显著水平 ($P<0.001$), 而 C 影响则不显著 ($P>0.05$); 二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 达到显著水平; 交互项 AB、AC 交互作用显著, BC 交互作用不显著。

表 2 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 2 Box-Behnken design and test results

试验组	MSG 质量浓度 A (g/L)	CaCl ₂ 浓度 B (mmol/L)	AsA 质量浓度 C (g/L)	GABA 含量 (mg/100 g)
1	3	4	0	290.12±3.05
2	2	4	1	308.45±3.57
3	1	4	2	240.87±13.12
4	2	4	1	310.42±2.16
5	2	2	0	209.87±14.35
6	1	6	1	222.35±2.47
7	3	6	1	285.91±3.05
8	2	4	1	312.46±4.89
9	1	2	1	189.94±8.55
10	2	6	2	279.29±4.27
11	3	2	1	203.90±3.36
12	2	2	2	226.27±11.90
13	2	4	1	300.89±1.10
14	3	4	2	241.60±8.55
15	2	6	0	294.55±3.66
16	2	4	1	295.66±8.70
17	1	4	0	211.66±5.80

表 3 回归模型方差分析

Table 3 Regression analysis of variance

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	29 573.94	9	3 285.99	71.93	<0.000 1	**
A	3 069.75	1	3 069.75	67.20	<0.000 1	**
B	7 945.56	1	7 945.56	17.94	<0.000 1	**
C	41.27	1	41.27	0.90	0.373 5	
AB	615.04	1	615.04	13.46	0.008 0	*
AC	1 510.49	1	1 510.49	33.07	0.000 7	**
BC	250.59	1	250.59	5.49	0.051 7	
A ²	7 873.05	1	7 873.05	172.35	<0.000 1	**
B ²	5 704.93	1	5 704.93	124.89	<0.000 1	**
C ²	1 114.82	1	1 114.82	24.40	0.001 7	*
残差	319.77	7	45.68			
失拟项	120.37	3	40.12	0.80	0.553 0	
纯误差	199.40	4	49.85			
总和	29 893.7	16				

注: *表示差异显著, $P<0.05$, **表示差异极显著, $P<0.001$ 。

2.3.2 Box-Behnken 试验交互作用分析

对二次回归方程中对响应值有显著影响的任意两因素之间的交互作用进行分析后,得到三维响应面图。等高线是响应面在水平方向的投影,两因素交互作用显著则等高线呈椭圆形或马鞍形,反之等高线则为圆形^[37]。由图 3 可以看出,各因素交互作用大小依次为:

MSG 与 AsA>MSG 与 CaCl₂>CaCl₂ 与 AsA,这与表 3 中回归分析结果相符。

由图 3a 可知,响应面的坡度较陡峭,表示在 AsA 质量浓度为 1 g/L 条件下,MSG 质量浓度和 CaCl₂ 浓度交互作用显著,在 CaCl₂ 浓度较低时,GABA 含量随着 MSG 质量浓度的增加而增加,随着 CaCl₂ 浓度的

升高, GABA 含量增长幅度则减小甚至变成负数, 说明在不同浓度 CaCl_2 下, MSG 质量浓度对 GABA 含量的影响也不同; 图 3b 显示在 CaCl_2 浓度为 4 mmol/L 条件下, AsA 质量浓度和 MSG 质量浓度交互作用显著, 在 AsA 质量浓度较低时, GABA 含量随着 MSG 浓度的增加而增加, 随着 AsA 质量浓度的升高, 增加幅度逐渐减低; 图 3c 显示在 MSG 质量浓度为 2 g/L 的条件下, CaCl_2 浓度和 AsA 质量浓度的交互作用不显著, 说明 AsA 质量浓度对 GABA 含量产生的影响与 CaCl_2 浓度无关。

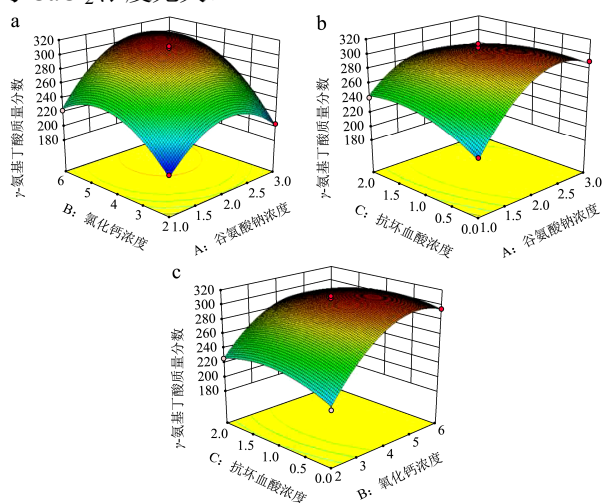


图 3 各因素交互作用对 GABA 含量影响的响应面图

Fig.3 Response surface map of the interaction of various factors on GABA content

2.3.3 回归模型的验证结果

根据 Box-Behnken 试验结果, 芸豆富集 GABA 的最佳工艺为 MSG 质量浓度 3.00 g/L、 CaCl_2 浓度 5.37 mmol/L、AsA 质量浓度 0.17 g/L, 通过回归模型预测得到萌发芸豆 GABA 含量为 306.04 mg/100 g, 验证试验得出实际测定数值为 303.60 mg/100 g, 即在盐胁迫 (3.00 g/L MSG, 5.37 mmol/L CaCl_2) 协同 0.17 g/L AsA 处理下, 萌发 24 h 的芸豆 GABA 积累量相比芸豆籽粒 (69.16 mg/100 g) 和去离子水萌发芸豆 (143.44 mg/100 g) 分别提高了 338.98% 和 111.66%。预测值和实测值相近说明二者之间存在较高的拟合度, 所建立的模型可以很好地预测芸豆萌发条件和 GABA 含量之间的关系。

3 结论

本研究在单因素实验基础上, 运用 Box-Behnken 实验设计得出: 四种外源因子 MSG、 CaCl_2 、AsA 和 PLP 可激发芸豆富集 GABA, 当 MSG 质量浓度为 2 g/L, AsA 质量浓度为 1 g/L, CaCl_2 为 4 mmol/L, PLP 为 1.5 mmol/L 时其激发作用最强, 所得萌发芸豆中

GABA 的含量分别为芸豆籽粒的 3.02、3.11、3.02 和 3.98 倍; 芸豆富集 GABA 的最优工艺为 MSG 质量浓度 3.00 g/L、 CaCl_2 浓度 5.37 mmol/L、AsA 质量浓度 0.17 g/L, 芸豆在该条件处理下萌发 24 h 可达到 GABA 含量为 303.60 mg/100 g, 分别为芸豆籽粒和去离子水处理萌发芸豆 GABA 含量的 4.39 和 2.12 倍。同时本研究表明: 芸豆在盐协同抗坏血酸胁迫条件下 GAD 被激活, GABA 大量积累, 其中底物水平以及 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度的提高对该过程起重要作用。本研究为芸豆富集活性 GABA 组分及开发高 GABA 保健芸豆芽浆、芸豆芽粉等芸豆深加工产品提供了理论依据。

参考文献

- [1] 朱文斌, 李育军. 华南地区普通菜豆栽培模式、品种与绿色生产应用[J]. 长江蔬菜, 2021, 10: 41-44.
- [2] Kan L, Nie S, Hu J, et al. Nutrients, phytochemicals and antioxidant activities of 26 kidney bean cultivars [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 108(Pt. B): 467-477.
- [3] Sangronis E, Rodriguez M, Cava R, et al. Protein quality of germinated Phaseolus vulgaris [J]. European Food Research and Technology, 2006, 222(1): 144-148.
- [4] Ohanenye I C, Tsopmo A, Ejike C E C, et al. Germination as a bioprocess for enhancing the quality and nutritional prospects of legume proteins [J]. Trends in Food Science & Technology, 2020, 101: 213-222.
- [5] Ziarno M, Zareba D, Maciejak A M, et al. The impact of dairy starter cultures on selected qualitative properties of functional fermented beverage prepared from germinated white kidney beans [J]. Journal of Food and Nutrition Research, 2019, 58(2): 167-176.
- [6] 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.
- [7] Hepsomali P, Groeger J A, Nishihira J, et al. Effects of oral gamma-aminobutyric acid (GABA) administration on stress and sleep in humans: A systematic review [J]. Frontiers in Neuroscience, 2020, 14: 923.
- [8] 王淑芳, 杨润强, 顾振新. 低氧胁迫下大豆发芽富集 γ -氨基丁酸品种筛选及培养条件优化[J]. 食品科学, 2014, 35(21): 159-163.
- [9] Hongzhen Luo, Zheng Liu, Fang Xie, et al. Microbial production of gamma-aminobutyric acid: applications, state-of-the-art achievements, and future perspectives [J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2021, 41(4): 491-512.

- [10] Bouche N, Fromm H. GABA in plants: just a metabolite? [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(3): 110-115.
- [11] Bouché N, Lacombe B, Fromm H. GABA signaling: A conserved and ubiquitous mechanism [J]. Trends in Cell Biology, 2003, 13(12): 607-610.
- [12] Podlešáková K, Ugena L, Spichal L, et al. Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway [J]. New Biotechnology, 2019, 48: 53-65.
- [13] 张文刚,兰永丽,赵萌萌,等.谷氨酸钠和抗坏血酸协同处理藜麦萌发富集 γ -氨基丁酸工艺优化及胆酸盐吸附能力研究[J].食品工业科技,2020,41(9):144-149,154.
- [14] 华艳.糙米发芽工艺优化及应用研究[D].泰安:山东农业大学,2021.
- [15] 王中磊,马玉玲,王丽丽,等.湿热处理下富含 γ -氨基丁酸芸豆品种的选择及筛选方法的建立[J].中国粮油学报,2021, 36(6):36-44.
- [16] Saraphanchotiwithaya A, Sripalakit P. Production of γ -aminobutyric acid from red kidney bean and barley grain fermentation by *Lactobacillus brevis* TISTR 860 [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2018, 16: 49-53.
- [17] 王倩雯,张贺,曹龙奎.芸豆萌发处理各时期营养成分变化[J].粮食与油脂,2015,28(6):35-39.
- [18] 张珏,何义雁,朱香燕,等.富含 γ -氨基丁酸的发酵糙米米粉工艺研究[J].食品工业科技,2015,36(9):239-242,250.
- [19] Ba I Q, Chai M, Gu Z, et al. Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and γ -aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination [J]. Food Chemistry, 2009, 116(1): 152-157.
- [20] 童晓萌,柴春祥,王永强.萌发对苦荞籽粒品质的影响及工艺优化[J].食品与机械,2021,37(4):176-183.
- [21] 程建军,徐丽,欧才智,等.优化催芽温度及 CaCl_2 溶液浓度提高发芽小米中 γ -氨基丁酸含量[J].农业工程学报,2019,35(3):301-308.
- [22] 吴凤凤.发芽对糙米主要营养成分、生理功效和加工特性的影响[D].无锡:江南大学,2013.
- [23] Blaszcak W, Doblado R, Frias J, et al. Microstructural and biochemical changes in raw and germinated cowpea seeds upon high-pressure treatment [J]. Food Research International, 2007, 40(3): 415-423.
- [24] Park J Y, Park Y L, Choi T R, et al. Production of γ -aminobutyric acid from monosodium glutamate using *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis with glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* KCTC 3498 [J]. Korean Journal of Chemical Engineering, 2020, 37(12): 2225-2231.
- [25] 郝文静,张晓鸣,黄汉荣.发芽绿豆生物转化法富集 γ -氨基丁酸[J].食品与机械,2012,28(5):34-38.
- [26] 蒋静,马涛.营养液培养糙米发芽富集 GABA 工艺条件优化[J].食品工业科技,2013,34(5):195-199.
- [27] Xing S G, Jun Y B, Hau Z W, 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): 560-566.
- [28] 岳霞,白雨禾,王昭懿,等.盐胁迫下玉米种子萌发过程低场核磁共振研究[J].农业工程学报,2020,36(24):292-300.
- [29] 申迎宾,范子剑,王显生,等.萌芽时间、温度以及不同浸泡液对萌芽豇豆 γ -氨基丁酸含量的影响[J].食品与发酵工业, 2009,35(4):10-15.
- [30] Yap K L, Yuan T, Mal T K, et al. Structural basis for simultaneous binding of two carboxy-terminal peptides of plant glutamate decarboxylase to calmodulin [J]. Journal of Molecular Biology, 2003, 328(1): 193-204.
- [31] Trobacher C P, Zarei A, Liu J, et al. Calmodulin-dependent and calmodulin-independent glutamate decarboxylases in apple fruit [J]. BMC Plant Biology, 2013, 13(1): 1-10.
- [32] 张名位,陈恩成,张雁,等.粳型黑米萌芽积累 γ -氨基丁酸的工艺条件研究[J].农业工程学报,2007,23(3):213-218.
- [33] 陈静.高产 GABA 乳酸菌的筛选鉴定、发酵优化及谷氨酸脱羧酶基因的分子改造[D].自贡:四川轻化工大学,2019.
- [34] Elbaloula M F, Hassan A B. Effect of different salt concentrations on the gamma-aminobutyric-acid content and glutamate decarboxylase activity in germinated sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) grain [J]. Food Science & Nutrition, 2022, 10(6): 2050-2056.
- [35] 申迎宾.萌芽豇豆富集 γ -氨基丁酸的特性,工艺及其合成酶酶学性质研究[D].南京:南京农业大学,2009.
- [36] 邓宇.发芽条件及营养液对发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量的影响[J].食品工业,2010,31(2):79-82.
- [37] 郭晓蒙,赵富士,冶晓惠,等.响应面法优化柠檬酸胁迫藜麦富集 γ -氨基丁酸的培养条件及体外降血压活性研究[J].食品科学,2017,38(14):221-226.