

# 发芽苦荞 GABA 的富集及氨基酸等含氮物的变化\*

朱云辉, 郭元新

(安徽科技学院 食品药品学院, 安徽 凤阳, 233100)

**摘 要** 研究了苦荞发芽过程中  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)、谷氨酸脱羧酶(GAD)活力及可溶性蛋白、氨基酸等含氮物含量的变化。结果表明:随着发芽时间的延长,GABA 含量在发芽 4d 时达到最高,子叶和胚中 GAD 活力均呈先升后降趋势。可溶性蛋白呈下降趋势,游离氨基酸含量先升高后降低,总氨基酸含量不断升高。除蛋氨酸外,异亮氨酸及缬氨酸等几种人体必需氨基酸均呈现上升趋势,谷氨酸(Glu)含量升高,这些变化均有利于发芽苦荞中 GABA 的富集。

**关键词** 发芽苦荞; $\gamma$ -氨基丁酸(GABA);氨基酸;含氮物

苦荞(又称鞑靼荞麦, *Fagopyrum tataricum*)富含蛋白质、碳水化合物、生物类黄酮、维生素和矿物质等物质,是我国重要的小宗粮食作物,是人体良好的营养来源,但因苦荞含有蛋白酶抑制剂、植酸等抗营养因子,其营养价值还有待改善,种子发芽过程中发生了复杂的生理生化变化,一些大分子物质如淀粉和蛋白质被分解,抗营养因子消解或降低,使蛋白质及氨基酸组成更加合理<sup>[1-3]</sup>。近年的研究表明,发芽还可富集  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)等植物中原来含量低或不具有的功能性成分<sup>[4]</sup>。

GABA 具有降血压、改善脑机能、调节心率失常和缓解疼痛、焦虑等作用<sup>[5-6]</sup>,因此开发富含 GABA 的食品已引起广大学者的青睐。植物中 GABA 的合成受 GABA 支路的影响,其中谷氨酸脱羧酶(GAD, EC 4.1.1.15)是该途径的限速酶<sup>[4,7]</sup>。目前,在胁迫环境下苦荞发芽富集 GABA 已有相关研究<sup>[8-9]</sup>,但正常发芽过程中分别研究苦荞子叶和胚 GABA 的富集、GAD 活力及发芽苦荞中含氮物的变化还未见报道,本研究探讨了其相互间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

苦荞,2013 年秋产自中国内蒙古自治区乌兰察布市,装于聚乙烯塑料袋,于  $-20^{\circ}\text{C}$  贮藏于冰箱直至使用。GABA 标品和对二甲氨基苯磺酰氯(DABS-

CI,99%)购自美国 Sigma 公司。乙睛为色谱纯,其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

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;Hitachi L8900 氨基酸自动分析仪,日本 Hitachi 公司。BILON-2000C7 型多用途恒温超声波提取机,上海比朗仪器有限公司。

### 1.3 预处理

苦荞种子用去离子水清洗后,用质量分数 1% 的 NaClO 消毒 15 min 后冲洗至 pH 中性,于去离子水中  $30^{\circ}\text{C}$  浸泡 4 h。置于铺有 2 层滤纸的培养皿中,样品置于  $30^{\circ}\text{C}$  的培养箱内黑暗发芽,湿度控制在 85% ~ 90%,每 8 h 喷去离子水 1 次,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,部分用于发芽苦荞子叶与胚中 GAD 活力等生理指标的测定,其他冷冻干燥后去壳粉碎,过 80 目筛,用于测定 GABA、氨基酸等含氮物质。

### 1.4 测定指标与方法

干物质含量采用烘干恒重法测定;GABA 测定采用高压液相色谱 HPLC,条件参照 Guo 等<sup>[10]</sup>的方法;GAD 活力测定参照 Bai 等<sup>[11]</sup>的方法;氨基酸组成分析:将原料粉碎后用酸水解,采用氨基酸自动分析仪测定,检测条件为温度  $20^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 60%;可溶性蛋白质含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定<sup>[12]</sup>,以牛血清白蛋白为标准;游离氨基酸含量使用茚三酮比色法测定<sup>[12]</sup>。

第一作者:硕士研究生(郭元新教授为通讯作者, E-mail: guoyuanxiner@163.com)。

\* 安徽省自然科学基金项目(No. 1308085MC32)

收稿日期:2014-10-20,改回日期:2014-11-18

## 2 结果与分析

### 2.1 苦荞发芽过程中干物质含量变化

由图1可知,随着发芽时间的增加,发芽苦荞干物质含量呈极显著的下降趋势( $P < 0.01$ )。发芽6d后,干物质含量为24.37%,比0d下降了63.61%。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。

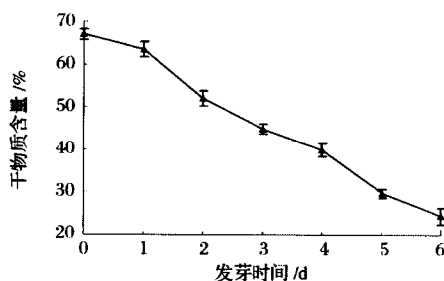


图1 苦荞发芽过程中干物质含量的变化

Fig. 1 Changes in dry matter of tartary buckwheat during germination

### 2.2 苦荞发芽过程中GABA的富集

由图2可知,苦荞发芽过程子叶和胚中GABA含量均呈现先升高后降低的趋势。发芽前4d,苦荞子叶和胚中GABA持续增长。发芽至第4天时,苦荞子叶和胚中GABA富集量达到最大值,分别为0.230 5 mg/g(干重)(DW)与0.154 9 mg/g(DW),是第1天的1.54和1.32倍,之后出现平缓的下降趋势。

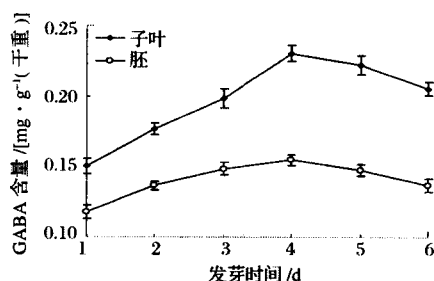


图2 苦荞发芽过程中GABA含量的变化

Fig. 2 Changes in GABA of tartary buckwheat during germination

### 2.3 苦荞发芽过程中GAD活性的变化

由图3可知,在苦荞发芽过程中,胚中GAD活力显著高于子叶,发芽3d时二者的活力比为4.58,同时发芽苦荞子叶和胚中GAD活力达到最大值,分别为39.92 U/g(FW)和182.9 U/g(FW),是发芽第1天的1.54和1.49倍。发芽过程中,胚部GAD活力变化较大,而子叶中GAD活力变化平缓且远低于胚部。

### 2.4 苦荞发芽过程中可溶性蛋白含量的变化

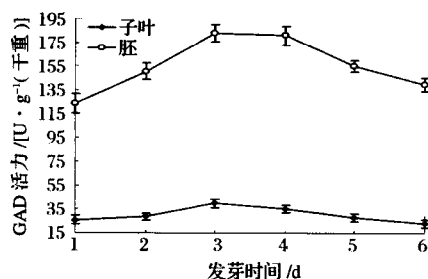


图3 苦荞发芽过程中GAD活力的变化

Fig. 3 Changes in GAD activity of tartary buckwheat during germination

由图4可知,随着发芽时间的延长,发芽苦荞胚中可溶性蛋白含量变化不显著( $P < 0.05$ )。在发芽过程中,发芽苦荞子叶中可溶性蛋白含量显著高于胚部,其含量为胚部的2.24~8.54倍。发芽前2d,苦荞子叶中可溶性蛋白含量显著下降( $P < 0.05$ ),随后可溶性蛋白呈极显著下降的趋势( $P < 0.01$ )。发芽6d时子叶中可溶性蛋白含量为0.987 8 mg/g(DW),比第1天降低了75.35%,而胚中可溶性蛋白含量变化不显著( $P < 0.05$ )。

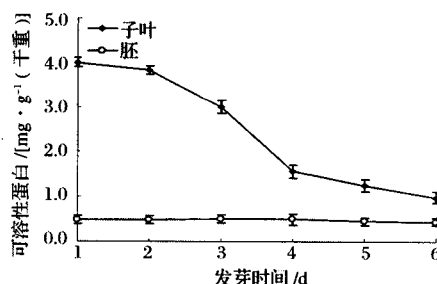


图4 苦荞发芽过程中可溶性蛋白含量的变化

Fig. 4 Changes in soluble protein of tartary buckwheat during germination

### 2.5 苦荞发芽过程中游离氨基酸含量的变化

由图5可知,苦荞发芽过程中子叶和胚中游离氨基酸含量的变化与GABA的变化相似,均为先增加后减少。发芽过程中,苦荞胚部游离氨基酸含量变化较子叶平稳,而子叶中含量则急剧上升,第4天时达到最大值,为0.580 3 mg/g(DW),是发芽第1天的2.41倍,4d后子叶和胚中游离氨基酸含量均呈现下降的趋势。

### 2.6 苦荞发芽过程中氨基酸种类及其含量的变化

苦荞发芽过程中氨基酸种类及其含量的变化见表1。发芽过程中,苦荞中的氨基酸组成比例发生剧烈变化。在几种必需氨基酸中,异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、赖氨酸和组氨酸含量均随着发芽时间的增加而升高,发芽6d后分别比0h升高

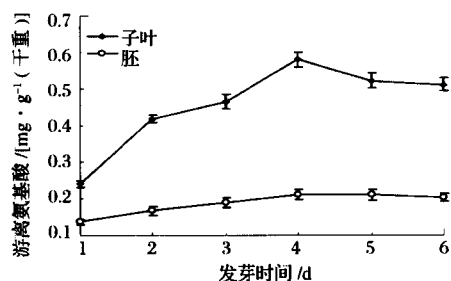


图5 苦荞发芽过程中游离氨基酸含量的变化  
Fig. 5 Changes in free amino acids of tartary buckwheat during germination

了 29.6%、28.69%、32.11%、36.35%、35.85%、27.67 和 40.43%。只有蛋氨酸和胱氨酸呈现下降趋势。此外,发芽过程中谷氨酸(Glu)含量不断升高,发芽 4 d 后比发芽 0 d 时升高了 18.4%,GABA 富集量与 Glu( $r=0.934\ 3$ )之间存在极显著的正相关( $P<0.01$ ),发芽过程中 GABA 富集的关键酶-GAD 被激活或大量合成,同时随着蛋白质的水解,其底物 Glu 的含量显著增加,二者共同促进了 GABA 的富集。

表 1 苦荞发芽过程中氨基酸种类及其含量的变化 mg/g (干重)  
Table 1 Changes of the kinds of amino acids and their contents in tartary buckwheat during germination

测定指标	发芽时间/d			
	0	2	4	6
天门冬氨酸(Asp)	10.31	10.64	12.22	13.00
苏氨酸(Thr)	4.24	4.43	5.22	5.76
丝氨酸(Ser)	5.44	5.82	6.49	6.88
谷氨酸(Glu)	18.48	19.78	21.88	22.78
甘氨酸(Gly)	6.50	6.69	7.03	7.39
丙氨酸(Ala)	3.41	3.70	4.63	5.35
胱氨酸(Cys)	2.99	2.59	1.96	1.69
缬氨酸(Val)	6.17	6.15	7.18	7.94
蛋氨酸(Met)	1.81	1.60	1.68	1.57
异亮氨酸(Ile)	4.73	4.88	5.69	6.13
亮氨酸(Leu)	7.66	7.89	9.31	10.12
酪氨酸(Tyr)	3.37	3.58	4.00	4.30
苯丙氨酸(Phe)	5.09	5.52	6.26	6.94
赖氨酸(Lys)	6.18	6.40	7.30	7.89
组氨酸(His)	2.82	2.99	3.59	3.96
精氨酸(Arg)	9.91	10.51	10.91	11.06
脯氨酸(Pro)	2.42	3.09	4.34	5.02
氨基酸总量	104.91	109.79	123.20	132.58

### 3 讨论

已有的研究表明,植物中的 GABA 合成主要来自 GABA 支路中由 GAD 催化的不可逆的  $\alpha$ -谷氨酸脱羧反应<sup>[11, 13-14]</sup>,苦荞发芽前 4d,GABA 含量随着

Glu 量和 GAD 活力的升高而提升,发芽 4 d 后,Glu 含量虽然仍然有所增加,但 GAD 活力呈下降趋势,GABA 含量则随之缓慢下降。苦荞发芽过程实质上是一个酶促反应的启动过程,随着发芽时间的延长,种子的呼吸作用增强,淀粉酶、蛋白酶等水解酶类活性增强,贮藏物质降解,干物质含量降低,为呼吸等生理活动提供了充足的底物<sup>[1, 15-16]</sup>。康彬彬<sup>[17]</sup>研究表明,发芽糙米 GABA 含量与原料中氨基酸、必需氨基酸和 Glu 含量呈正相关。苦荞发芽过程中,蛋白酶的活性增强,大分子的贮藏蛋白分解为游离氨基酸,其组成更加合理,提高了发芽种子的营养价值。本研究表明,除蛋氨酸外,异亮氨酸及缬氨酸等几种人体必需氨基酸均呈现上升趋势。苦荞发芽过程中可溶性蛋白含量下降,与 GABA 变化呈负相关;小分子的游离氨基酸的总量上升,其变化与 GABA 的变化呈正相关,同时发芽苦荞中 Glu 含量及 GAD 活力显著升高,这种变化有利于发芽苦荞 GABA 的富集。

### 4 结论

苦荞发芽过程中子叶和胚中 GAD 活力均呈先升后降趋势,胚中 GAD 活力显著高于子叶。GAD 升高促进了发芽苦荞 GABA 的富集,发芽 4d 时,苦荞子叶和胚中 GABA 富集量达到最大值,分别为 0.230 5 mg/g (DW) 与 0.154 9 mg/g (DW)。苦荞发芽过程中可溶性蛋白不断下降,游离氨基酸含量上升,Glu 含量和 GAD 活力升高,这些变化均有利于发芽苦荞中 GABA 的富集。

### 参 考 文 献

- [1] 李晓丹. 苦荞胁迫萌发及功能性成分的研究[D]. 无锡:江南大学,2013.
- [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(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(5):34-39.
- [4] Bouché N, Lacombe B, Fromm H. GABA signaling: a conserved and ubiquitous mechanism[J]. Trends in Cell Biology, 2003, 13(12):607-610.
- [5] 顾振新,蒋振晖. 食品原料中  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)形成机理及富集技术[J]. 食品与发酵工业, 2002, 28(10):65-69.
- [6] 郭元新,杨润强,顾振新,等. 采用生物转化技术富集大豆制品  $\gamma$ -氨基丁酸研究进展[J]. 食品与发酵工业,

- 2011, 37(11):154-158.
- [7] XING S G, JUN Y B, HAU Z W, et al. Higher accumulation of  $\gamma$ -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.
- [8] 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.
- [9] 周一鸣, 周小理, 崔琳琳, 等. 铜离子胁迫对苦荞萌发物生态效应的影响[J]. 食品工业, 2014(5):201-204.
- [10] GUO Y, YANG R, CHEN H, et al. Accumulation of  $\gamma$ -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.
- [11] BAI Q, CHAI M, GU Z, et al. Effects of components in culture medium on glutamate decarboxylase activity and  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in foxtail millet (*Setaria italica* L.) during germination[J]. Food Chemistry, 2009, 116(1):152-157.
- [12] 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.
- [13] 郭元新, 杨润强, 陈惠, 等. 盐胁迫富集发芽大豆  $\gamma$ -氨基丁酸的工艺优化[J]. 食品科学, 2012(10):1-5.
- [14] GUO Y, CHEN H, SONG Y, et al. Effects of soaking and aeration treatment on  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in germinated soybean (*Glycine max* L.) [J]. European Food Research & Technology, 2011, 232(5):787-795.
- [15] 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.
- [16] 杨润强, 王淑芳, 顾振新. 低氧胁迫下大豆发芽富集 GABA 品种筛选及培养条件优化[J/OL]. 食品科学, <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20140929.1340.023.html>.
- [17] 康彬彬, 陈团伟, 陈绍军, 等. 高  $\gamma$ -氨基丁酸稻米品种的筛选[J]. 山地农业生物学报, 2007(6):471-475.

## Study on the accumulation and changes of $\gamma$ -aminobutyric acid, amino acid and other nitrogen compounds in germinating tartary buckwheat

ZHU Yun-hui, GUO Yuan-xin

(College of Food and Drug, Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

**ABSTRACT** The changes of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA), GAD activity, the soluble protein and other nitrogen compounds in germinating process of tartary buckwheat were investigated. The result indicated that with the increase of germinating time, the GABA content of germinating tartary buckwheat reach maximum at the fourth day, and the GAD activity of cotyledon and embryo of germinated tartary buckwheat increased first and then decreased. The content of soluble protein decreased, the free amino acids content increased first and then decreased, and the content of whole amino acid increased. Besides methionine, several essential amino acids are increased such as isoleucine and valine. The glutamic acid increased, and all this changes could be used to improve GABA accumulation in germinated tartary buckwheat.

**Key words** germinating tartary buckwheat;  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA); amino acid; nitrogen compounds