

亚精胺和柠檬酸联合处理促进荞麦芽中 γ -氨基丁酸的富集

张钰^{1,2}, 李静媛¹, 雷琦^{1,2}, 孙鹏东^{1,2}, 邓阳^{1,2*}

(1. 青岛农业大学食品科学与工程学院, 山东青岛 266109) (2. 青岛特种食品研究院, 山东青岛 266109)

摘要: γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric Acid, GABA) 是一种具有众多生理功能的活性物质, 在谷物中含量普遍较低, 但通过胁迫处理可以得到有效富集。本研究以荞麦为原料, 重点研究了柠檬酸和亚精胺联合处理对荞麦芽 GABA 含量的影响, 并初步解析了其作用机制。响应面优化试验发现, 2 mmol/L 柠檬酸和 0.1 mmol/L 亚精胺联合处理更有助于荞麦发芽过程中 GABA 的积累, 含量可达 12.23 mg/g, 比单独处理分别提高了 1.11 和 1.27 倍。同时, 分别考察联合处理下谷氨酸脱羧酶 (GAD)、二胺氧化酶 (DAO) 和多胺氧化酶 (PAO) 的活力以解析 GABA 含量变化的原因。结果表明处理后三种关键酶的活力分别为 1 204 nmol/(min·g)、18.92 U/g 和 3.58 U/g, 较未处理和单独处理的组别有显著提高, 研究结果说明柠檬酸和亚精胺联合处理可显著提高荞麦芽 GABA 含量, 这与 GABA 合成途径中关键酶 GAD、DAO 和 PAO 的酶活力提高有关, 而且联合处理具有一定的协同作用。本研究为富集谷物 GABA 提供了思路和理论依据。

关键词: 荞麦芽; 亚精胺; 柠檬酸; γ -氨基丁酸

文章编号: 1673-9078(2024)03-200-208

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2024.3.0163

Improving the Enrichment of γ -Aminobutyric Acid in Buckwheat Sprouts by Combined Treatments Using Spermidine and Citric Acid

ZHANG Yu^{1,2}, LI Jingyuan¹, LEI Qi^{1,2}, SUN Pengdong^{1,2}, DENG Yang^{1,2*}

(1. College of Food Science and Engineering, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

(2. Qingdao Special Food Research Institute, Qingdao 266109, China)

Abstract: γ -Aminobutyric acid (GABA) is an active substance with several physiological functions. Its content is generally low in grains, but GABA can be effectively enriched by stress treatments. In this study, the effects of combined treatments using citric acid and spermidine on the GABA content in buckwheat sprouts were studied, and the mechanism was preliminarily analyzed. Response surface optimization experiments showed that the combination of 2 mmol/L citric acid and 0.1 mmol/L spermidine was more conducive to the accumulation of GABA during buckwheat germination, and the GABA content could reach 12.23 mg/g, which was 1.11 and 1.27 times higher than that of single treatments with citric acid and spermidine, respectively. Simultaneously, the activities of glutamate decarboxylase (GAD), diamine oxidase (DAO) and polyamine oxidase (PAO) were measured to analyze the reasons for the change in GABA content. The results showed that after treatment, the activities of the three key enzymes were 1 204 nmol/(min·g), 18.92 U/g and 3.58 U/g, respectively, which were significantly higher than those of the control and single treatment groups. The results indicate that the combined treatment of citric acid and spermidine can significantly increase the GABA content in buckwheat sprouts, which is related to the increase in the activity of key enzymes GAD, DAO and PAO in the GABA synthesis pathway. This study provides ideas and theoretical basis for the enrichment of GABA in grains.

引文格式:

张钰,李静媛,雷琦,等.亚精胺和柠檬酸联合处理促进荞麦芽中 γ -氨基丁酸的富集[J].现代食品科技,2024,40(3):200-208.

ZHANG Yu, LI Jingyuan, LEI Qi, et al. Improving the enrichment of γ -aminobutyric acid in buckwheat sprouts by combined treatments using spermidine and citric acid [J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 40(3): 200-208.

收稿日期: 2023-02-16

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32272279); 青岛市科技计划重点研发专项 (22-3-3-hygg-29-hy)

作者简介: 张钰 (1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: 2678448206@qq.com

通讯作者: 邓阳 (1986-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品微生物与生物技术, E-mail: dengyang719@hotmail.com

and polyamine oxidase (PAO) under combined treatments were investigated to analyze the reasons for the GABA content variations. The results indicated that the activities of the three key enzymes after treatments were 1204 nmol/(min·g), 18.92 U/g and 3.58 U/g, respectively, which were significantly higher than those of groups with no or single treatments. The results suggest that the combined treatment with citric acid and spermidine significantly increases the GABA content of buckwheat sprouts. This is related to the increase in the enzyme activities of GAD, DAO and PAO, which are the key enzymes in the GABA synthesis pathway, and the combined treatment exhibits a certain synergistic effect. This study provides ideas and theoretical basis for enriching GABA in grains.

Key words: buckwheat sprouts; spermidine; citric acid; γ -aminobutyric acid

荞麦是一种营养丰富的杂粮，在世界范围内广泛种植。荞麦除了含有淀粉、蛋白质、脂肪、糖类常规营养物质，还富含黄酮类、甾醇、 γ -氨基丁酸 (γ -Aminobutyric Acid, GABA) 等功能性物质^[1]。荞麦种子虽然营养丰富，但含有单宁等抗营养因子，影响消化吸收，发芽之后的荞麦中黄酮、酚酸、GABA、多糖等功能活性物质含量会显著提高，抗营养因子会减少甚至消失^[2,3]，因此发芽是提高荞麦营养品质的有效手段。

GABA 作为一种非蛋白氨基酸，普遍存在于动植物以及微生物体内，是人体内一种重要的抑制性神经递质。GABA 具有众多生理功能，例如降低血压^[4]、调节血糖^[5]、抗抑郁^[6]、改善睡眠^[7]等。但随着年龄和压力的增加，人体内 GABA 的自主形成和积累变得困难^[8]，需要通过食物等来源进行补充。一般而言，植物中 GABA 的含量大约在 0.3~32.5 $\mu\text{mol/g}$ ，仍无法满足人体的正常需求^[9]。研究发现，植物在受到低温^[10]、高温^[11]、低氧^[12]、机械损伤^[13]、酸^[14]等非生物胁迫时，GABA 会大量富集。

GABA 在植物体内主要有两条合成途径：一是 GABA 支路，即 L-谷氨酸在谷氨酸脱羧酶 (GAD) 催化下脱羧形成 GABA^[15]。研究表明 GAD 的活力受 H^+ 浓度的影响，酸处理可以使细胞内 H^+ 浓度升高，激活 GAD 的活性，降低 GABA 转氨酶的活性，从而促进 GABA 的富集^[16]。二是多胺降解途径，即二胺或多胺经过二胺氧化酶 (DAO) 或多胺氧化酶 (PAO) 催化形成氨基丁醛，再经氨基醛脱氢酶 (AMADH) 脱氢形成 GABA^[17]。多胺可以促进种子萌发，增加内源多胺水平，清除活性氧，保护酶系统，对植物的众多生理活动起重要作用^[18]。研究发现外源亚精胺处理绿豆可以提高内源多胺和植物激素的浓度^[19]。在高等植物中，多胺可以作为 GABA 的底物^[20]，在合成 GABA 过程中至关重要。目前，尚未有关于从上述两种途径联合处理以富集

荞麦中 GABA 的报道。

本文以荞麦为原料，探究荞麦发芽过程中柠檬酸和亚精胺联合处理对其富集 GABA 的影响，并通过测定该过程中 GABA 合成关键酶 GAD、DAO、PAO 活力以分析 GABA 富集的原因，为实现荞麦芽中 GABA 的有效富集提供了思路和理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

市售荞麦，四川大凉山； γ -氨基丁酸标品 (GABA 含量 >99% 质量分数)，苯酚，二胺氧化酶 (DAO) 活性检测试剂盒，多胺氧化酶 (PAO) 活性检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；亚精胺、柠檬酸、次氯酸钠，上海麦克林生化科技有限公司；谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性检测试剂盒，苏州格锐思生物科技有限公司，其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器与设备

Alpha-1-2LDplus 冻干机，德国 Christ 公司；5430R、5810R 离心机，德国 Eppendorf 公司；Spectra Max i3X 酶标仪，美谷分子仪器有限公司；TU-1810 紫外可见分光光度计，北京普析通用仪器有限责任公司；Climacell 恒温恒湿培养箱，艾力特生物科技 (上海) 有限公司；PURA 22 水浴锅，德国优莱博公司；AX423ZH 电子分析天平，奥豪斯仪器有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 荞麦芽培养工艺

预处理：荞麦种子在发芽前用自来水清洗，剔除虫蛀、干瘪的种子，然后用体积分数 1% 的次氯酸钠溶液浸泡消毒 15 min，用去离子水冲洗三次，洗去种子表面残留的次氯酸钠溶液，洗备用。

发芽：将预处理过的种子用去离子水浸泡 12 h，将浸泡好的荞麦种子均匀地平铺在铺有一层纱布的

育苗盘上,放入温度 25 ℃,湿度 85% 的恒温恒湿培养箱中,每天早晚喷洒去离子水,每隔 2 d 取一次样,选取 30 根荞麦芽,测量其 GABA 含量、芽长、鲜重、发芽率、腐烂率,以此确定荞麦芽最佳培养时间。

1.3.2 GABA富集试验

在预实验的基础上,将预处理过的荞麦种子分别用柠檬酸(0、1、2、3、4 mmol/L)和亚精胺(0、0.05、0.10、0.15、0.20 mmol/L)溶液浸泡 12 h,将浸泡好的荞麦种子均匀地平铺在铺有一层纱布的育苗盘上,放入温度 25 ℃,湿度 85% 的恒温恒湿培养箱中,每天早晚喷洒不同浓度的柠檬酸或亚精胺溶液,培养 7 d,筛选出荞麦富集 GABA 最适的柠檬酸和亚精胺浓度。

生长指标:在荞麦正常发芽期间,测定其发芽率、腐烂率。从发芽的 2 d 开始每隔 24 h 取 30 根荞麦芽,测定其芽长。

1.3.3 GABA含量测定

将发芽 7 d 的荞麦芽去壳去根,用蒸馏水洗净,自然晾干表面水分后冷冻干燥,把冻干的荞麦芽打磨成粉,备用。准确称取 0.25 g 样品,以 1:30 (g/mL) 的料液比将蒸馏水与荞麦粉置于离心管中,涡旋混合均匀,于 35 ℃ 水浴提取 2 h,1 200 r/min 离心 15 min,上清液备用。参照 Chen 等^[4]做出修改,取 0.50 mL 样品,依次加入 0.20 mol/L 的硼酸缓冲液(pH 值 9) 0.20 mL,体积分数 6% 的苯酚溶液 1 mL,体积分数 7.50% 的次氯酸钠溶液 0.10 mL,涡旋混合后,沸水浴 10 min,立即冰浴,待出现蓝绿色后,加入体积分数 60% 的乙醇溶液 2 mL,于 645 nm 处测定吸光度。

1.3.4 响应曲面实验

根据 CCD 的中心组合试验原理,在单因素试验基础上选择柠檬酸和亚精胺浓度 2 个因素按照中心组合法设计试验方案,以 GABA 含量为响应值进行两因素三水平的响应面试验,通过 Design Expert

8.06 软件对实验数据进行分析,并预测富集 GABA 的最佳工艺条件。试验因素及水平如表 1 所示。

表 1 试验因素水平表

水平	因素	
	柠檬酸浓度/(mmol/L)	亚精胺浓度/(mmol/L)
-1	1	0.05
0	2	0.10
1	3	0.15

1.3.5 酶活力测定

参照试剂盒说明书测定荞麦芽的 GAD、DAO 和 PAO 活力。

1.3.6 谷氨酸和亚精胺含量测定

采用全自动氨基酸测定仪测定谷氨酸含量。

样品提取:称取 0.2 g 荞麦芽冻干粉于离心管中,加入 0.6 mol/L 高氯酸 7.5 mL,超声提取 30 min,10 000 r/min,离心 10 min,取上清待测。亚精胺含量测定参考臧金红^[21]方法。

1.3.7 数据分析

每组做 3 次重复试验,结果以平均值 ± 标准差表示,利用 Design Expert 8.06 软件和 SPSS 处理数据,进行统计学分析。采用单因素方差分析、Duncan 多重比较和相关性作为分析方法, $P < 0.05$ 时具有显著差异。

2 结果与讨论

2.1 培养时间对荞麦芽生长和 GABA 含量的影响

由表 2 可知,荞麦芽长、鲜重、发芽率、GABA 含量均随着发芽时间不断增加,在发芽 7 d 与 9 d 时荞麦芽各项指标均无显著差异($P > 0.05$)。同时,腐烂率也显著高于其他培养时间,但由于前 5 d 芽长较短,且 GABA 含量低。综合考虑荞麦芽各项指标,选择 7 d 作为荞麦芽生长最佳培养时间。

表 2 培养时间对荞麦芽 GABA 含量和生长的影响

培养时间/d	GABA 含量/(mg/g)	芽长/cm	鲜重/g	发芽率/%	腐烂率/%
3	1.84 ± 0.20 ^c	1.27 ± 0.15 ^c	1.19 ± 0.13 ^c	56.44 ± 4.56 ^c	6.89 ± 2.26 ^c
5	3.83 ± 0.50 ^b	4.17 ± 0.37 ^b	3.08 ± 0.42 ^b	77.56 ± 4.88 ^b	9.33 ± 2.00 ^b
7	5.60 ± 0.65 ^a	11.40 ± 0.21 ^a	5.08 ± 0.37 ^a	86.67 ± 3.00 ^a	11.33 ± 2.23 ^a
9	5.00 ± 0.23 ^a	11.50 ± 0.29 ^a	5.13 ± 0.31 ^a	87.00 ± 1.73 ^a	11.56 ± 1.67 ^a

注:同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异($P < 0.05$),下表同。

2.2 荞麦芽菜形态

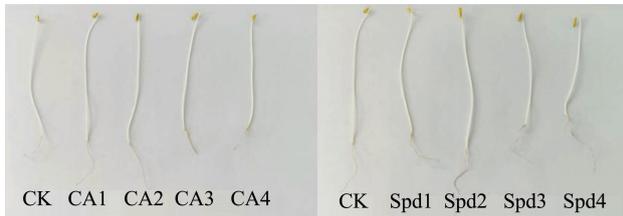


图 1 不同浓度柠檬酸和亚精胺处理后荞麦芽菜形态

Fig.1 Morphology of buckwheat sprouts treated with different concentrations of citric acid and spermidine

注: CK 为对照; CA 为柠檬酸溶液, 浓度依次为 (1、2、3、4 mmol/L); Spd 为亚精胺溶液, 浓度依次为 (0.05、0.10、0.15、0.20 mmol/L)。

由图 1 可知, 经过不同浓度柠檬酸和亚精胺分别处理 7 d 后, 荞麦芽长势均较好, 子叶呈现黄色, 茎为白色。但不同浓度的柠檬酸和亚精胺处理时荞麦芽发芽程度不同, 较高浓度处理对荞麦芽生长有抑制作用。

2.3 柠檬酸对荞麦芽长和 GABA 含量的影响

(1) 柠檬酸浓度对荞麦芽长的影响

由图 2a 可知, 随着培养时间的延长, 荞麦芽长逐渐升高, 在发芽的前 4 d 各组之间的芽长没有明显差异, 从第五天开始对照、1、2、3 mmol/L 柠檬酸处理下的荞麦芽长未见明显不同, 但对照和 2 mmol/L 与 4 mmol/L 处理下有显著差异 ($P < 0.05$), 这表明较低浓度的柠檬酸胁迫处理不会抑制荞麦芽的生长, 但随着浓度的升高荞麦芽生长开始受到抑制, 其芽长显著低于其他组。

(2) 柠檬酸浓度对荞麦芽中 GABA 含量的影响

由图 2b 可知, 随着柠檬酸浓度的升高, 培养 7 d 荞麦芽中 GABA 含量呈现先升高后降低的趋势, 不同酸处理下 GABA 含量都显著 ($P < 0.05$) 高于对照组。当柠檬酸浓度为 2 mmol/L 时, GABA 含量达到峰值, 为 10.75 mg/g, 是对照组的 2.11 倍。在柠檬酸浓度为 3 mmol/L 时, GABA 含量显著降低, 这表明柠檬酸对荞麦芽中 GABA 的积累与浓

度有关。

种子通过浸泡和发芽处理, 可以解除其休眠状态, 激活其内源酶, 使大分子物质被分解转化成其他小分子物质, 促进大量生物活性物质的积累^[22]。植物在受到非生物胁迫时, 体内会积累大量 GABA。先前的研究已经证明酸处理能够迅速引起细胞内 pH 值降低, 促进 GABA 积累^[23]。Baek 等^[24]用 0.5 mmol/L 水杨酸处理后的番茄 GABA 的含量提高到了 4.89 g/kg 时。Yen 等^[22]在对绿豆进行酸处理也发现, 当浸泡水 pH 值 5.5 时, 绿豆芽中 GABA 含量达到 1 699 mg/kg, 与未处理相比, 绿豆芽 GABA 含量得到了显著提高。本研究还发现荞麦芽中 GABA 含量并不会随着柠檬酸浓度的升高不断增加, 可能较高浓度柠檬酸处理藜麦会抑制 GABA 富集^[25]。

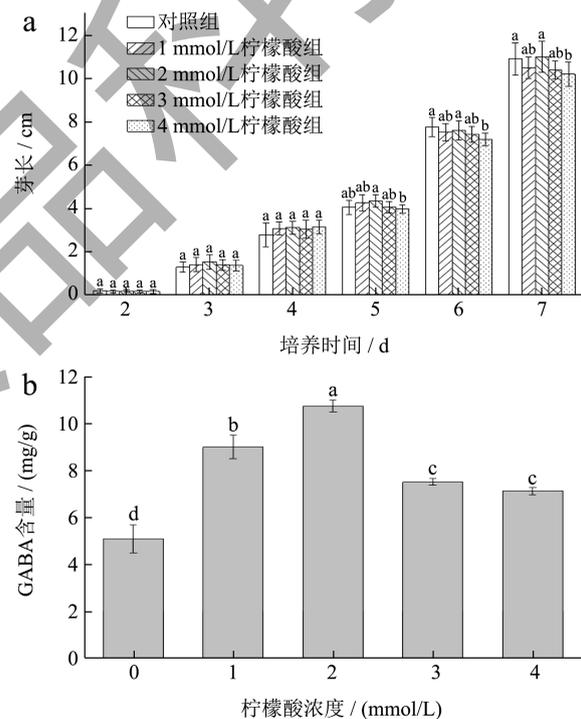


图 2 不同浓度柠檬酸对荞麦芽长和 GABA 含量的影响
Fig.2 Effects of different concentrations of citric acid on buckwheat sprout length and GABA content

注: 同列右肩不同的小写字母表示具有显著差异 ($P < 0.05$), 下同。

表 3 不同浓度柠檬酸对荞麦发芽率和腐烂率的影响

Table 3 Effects of different concentrations of citric acid on germination rate and decay rate of buckwheat

项目	对照组	1 mmol/L 组	2 mmol/L 组	3 mmol/L 组	4 mmol/L 组
发芽率	87.0 ± 4.30 ^a	87.0 ± 2.40 ^a	84.1 ± 3.82 ^a	86.3 ± 2.45 ^a	84.7 ± 4.21 ^a
腐烂率	11.7 ± 3.16 ^a	11.3 ± 3.08 ^a	12.0 ± 4.64 ^a	12.0 ± 3.32 ^a	12.8 ± 3.90 ^a

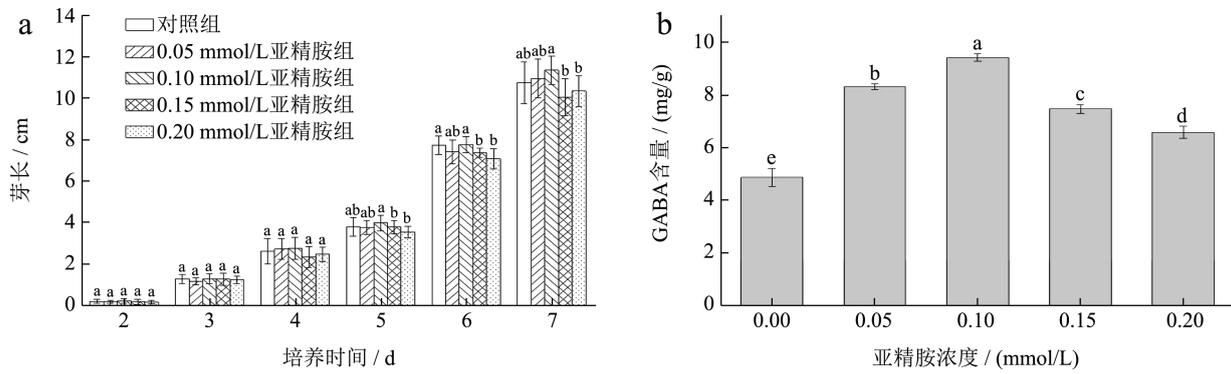


图 3 不同浓度亚精胺对荞麦芽长和 GABA 含量的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of spermidine on buckwheat sprout length and GABA content

表 4 不同浓度亚精胺对荞麦发芽率和腐烂率的影响

Table 4 Effects of different concentrations of spermidine on germination rate and decay rate of buckwheat

项目	对照组	0.05 mmol/L	0.10 mmol/L	0.15 mmol/L	0.20 mmol/L
发芽率	85.6 ± 3.36 ^a	85.7 ± 4.12 ^a	86.0 ± 3.54 ^a	85.7 ± 3.35 ^a	86.0 ± 3.93 ^a
腐烂率	10.8 ± 2.39 ^a	13.2 ± 3.23 ^a	13.3 ± 2.74 ^a	13.2 ± 2.82 ^a	12.8 ± 2.96 ^a

2.4 柠檬酸浓度对荞麦发芽率和腐烂率的影响

由表 3 可知，随着柠檬酸浓度的升高，荞麦的发芽率和腐烂率没有发生明显的变化，而且各组与对照组相比也没有显著性差异，这说明在该浓度范围内柠檬酸对荞麦芽的发芽率和腐烂率没有显著影响。

2.5 亚精胺浓度对荞麦芽生长和 GABA 含量的影响

(1) 亚精胺浓度对荞麦芽芽长的影响

由图 3a 可知，在培养过程中，荞麦芽长随着时间的延长而增长。在发芽的前 4 d 各组之间的芽长没有明显差异，从第 5 天开始荞麦芽生长迅速，各组之间开始出现差异。0.05 和 0.10 mmol/L 亚精胺处理的荞麦芽长与对照组相比没有显著差异，但随着亚精胺浓度的升高（0.15、0.20 mmol/L），荞麦芽的芽长显著（ $P < 0.05$ ）低于 0.10 mmol/L 组。

(2) 亚精胺浓度对荞麦芽中 GABA 含量的影响

由图 3b 可知，与对照相比，亚精胺处理 7 d 后 GABA 含量与对照组相比都显著（ $P < 0.05$ ）升高。随着亚精胺浓度的升高，荞麦芽中 GABA 含量呈现先上升后下降的趋势，当亚精胺浓度为 0.10 mmol/L 时，GABA 的富集效果最好，可达 9.44 mg/g，是对照组的 1.93 倍。这说明亚精胺在适宜浓度下可显著促进 GABA 积累。

多胺降解途径作为植物体内合成 GABA 的另一条重要途径，对 GABA 的合成至关重要^[26]。亚精胺是这条合成途径的前体物质之一，本研究发现随着

外源亚精胺的加入，GABA 的含量得到显著提高。这可能是由于外源亚精胺的加入，导致细胞内亚精胺的浓度升高，刺激了相关酶的活力，从而促进了 GABA 的积累。Fang 等^[26]还发现外源施用 0.10 mmol/L 亚精胺和 50 mmol/L 氯化钠处理，使大豆中 GABA 含量较对照提高了 116%，并且显著提高了 GABA 合成酶活性和 GABA 合成酶基因的表达。

2.6 亚精胺浓度对荞麦发芽率和腐烂率的影响

由表 4 可知，当亚精胺处理浓度低于 0.20 mmol/L 时，荞麦的发芽率和腐烂率与对照组没有显著差异，这表明在实验设置的浓度范围内亚精胺不会影响荞麦种子的萌发和腐烂。

2.7 响应面优化实验

2.7.1 响应面模型试验方案及结果

在单因素试验的基础上，根据 CCD 的中心组合设计原理，以柠檬酸浓度（A）、亚精胺浓度（B）和 GABA 含量进行响应面试验（表 5），通过对结果分析和二次回归多元拟合，得到 GABA 含量对编码自变量 A 和 B 的二次多项回归方程：

$$Y=12.08-0.43A-0.50B-0.15AB-1.53A^2-1.14B^2$$

由表 6 的方差分析可知，该模型 $F=43.19$ ， $P < 0.0001$ ，表明回归模型达到极显著水平，模型决定系数 $R^2=0.9679$ ，表明实验模型与真实值之间有良好的拟合度。同时，该模型失拟项不显著

($P > 0.05$), 说明该模型对本试验拟合良好。在各因素中柠檬酸浓度和亚精胺浓度对 GABA 含量影响显著 ($P < 0.05$)。在模型其他项中, 柠檬酸的二次项对荞麦芽中富集 GABA 有极显著 ($P < 0.0001$) 影响。

表 5 响应面试验方案及实验结果

Table 5 Response surface test scheme and experimental results

编号	因素		结果 GABA/(mg/g)
	柠檬酸/(mmol/L)	亚精胺/(mmol/L)	
1	2.00	0.10	12.07 ± 0.17
2	1.00	0.10	10.89 ± 0.19
3	3.00	0.10	10.23 ± 0.13
4	1.00	0.15	9.36 ± 0.13
5	2.00	0.10	11.88 ± 0.19
6	2.00	0.05	11.07 ± 0.18
7	2.00	0.15	10.83 ± 0.20
8	3.00	0.05	9.78 ± 0.20
9	2.00	0.10	11.92 ± 0.19
10	3.00	0.15	8.10 ± 0.22
11	2.00	0.10	12.36 ± 0.11
12	1.00	0.05	10.43 ± 0.21
13	2.00	0.10	12.14 ± 0.21

表 6 回归模型显著性结果

Table 6 Significant results of regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	18.62	5	3.72	42.19	<0.0001**
A	1.10	1	1.10	12.47	0.0096*
B	1.49	1	1.49	16.88	0.0045*
AB	0.093	1	0.093	1.05	0.3388
A ²	6.42	1	6.42	72.77	<0.0001**
B ²	3.56	1	3.56	40.31	0.0004*
残差	0.62	7	0.088		
失拟项	0.46	3	0.15	3.84	0.1133
误差	0.16	4	0.04		
总变异	19.24	12			

$R^2=0.9679$ $R_{adj}^2=0.9449$

2.7.2 最优条件的确定

根据响应面优化试验, 得出回归模型对荞麦芽中富集 GABA 最大预测值为 12.16 mg/g, 对应条件为柠檬酸浓度 1.87 mmol/L, 亚精胺浓度为 0.09 mmol/L。因中心组合结果略高于响应面最优结果, 故选择 2 mmol/L 柠檬酸和 0.1 mmol/L 亚精胺为最终条件,

并且对此条件进行验证实验, 得到 GABA 含量为 12.23 mg/g, 验证值与理论值相对误差较少, 说明利用响应面法优化的条件对柠檬酸和亚精胺联合处理荞麦芽中富集 GABA 是可行的。

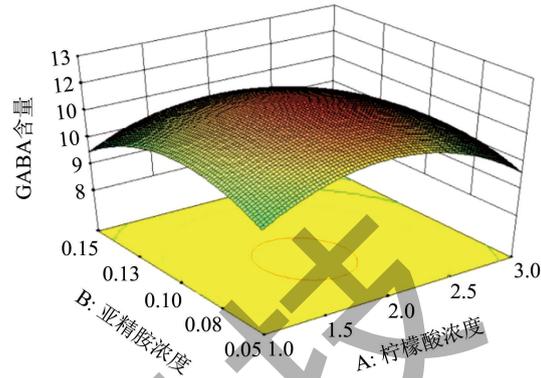


图 4 柠檬酸和亚精胺交互作用对富集 GABA 的影响

Fig.4 Effect of interaction between citric acid and spermidine on the enrichment of GABA

2.8 不同处理方式对酶活力的影响

2.8.1 不同处理方式对GAD活力的影响

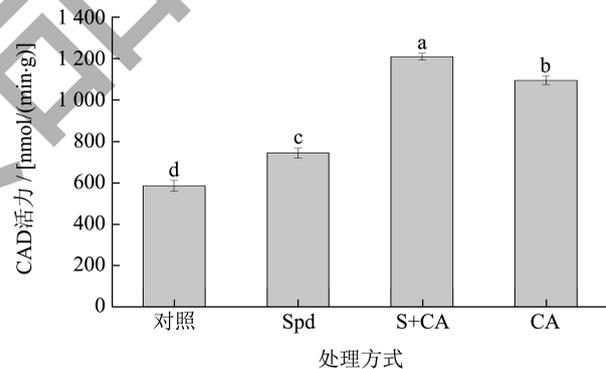


图 5 不同处理方式对 GAD 活力的影响

Fig.5 Effects of different treatments on GAD activity

注: Spd: 0.10 mmol/L 亚精胺; S+CA: 0.1 mmol/L 亚精胺 + 2 mmol/L 柠檬; CA: 2 mmol/L 柠檬酸。下图同。

由图 5 可知, 柠檬酸联合亚精胺处理后荞麦芽的 GAD 的活力得到了显著 ($P < 0.05$) 提高, 高于对照 [586 nmol/(min·g)]、亚精胺 [745 nmol/(min·g)] 和柠檬酸 [1 095 nmol/(min·g)] 单独处理, 达到了 1 204 nmol/(min·g), 分别比对照组、亚精胺处理和柠檬酸处理增加了 105%、62% 和 10% (质量分数)。这说明相比柠檬酸和亚精胺单独处理, 联合处理对荞麦芽中 GAD 活力的提高有协同影响。GABA 支路是植物体内合成 GABA 的途径之一, GABA 生成量受合成途径中关键酶的调控^[27]。研究发现当溶液

pH降低时, GABA 含量与之呈现负相关^[28], 外源施加柠檬酸后细胞内 H^+ 的浓度增加, 刺激了 GAD 的活力, 从而促进了 GABA 的积累。由上图还可以发现外源亚精胺对 GAD 活力也有增强作用, 多胺可以通过激活膜上钙泵和质子泵来调节 Ca^{2+} 的流入^[29], 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高能够激活 GAD 活力^[30]。这也与周新勇等^[31]发现喷洒亚精胺后大豆芽 GAD 活力显著高于对照组是一致的。

2.8.2 不同处理方式对DAO和PAO活力的影响

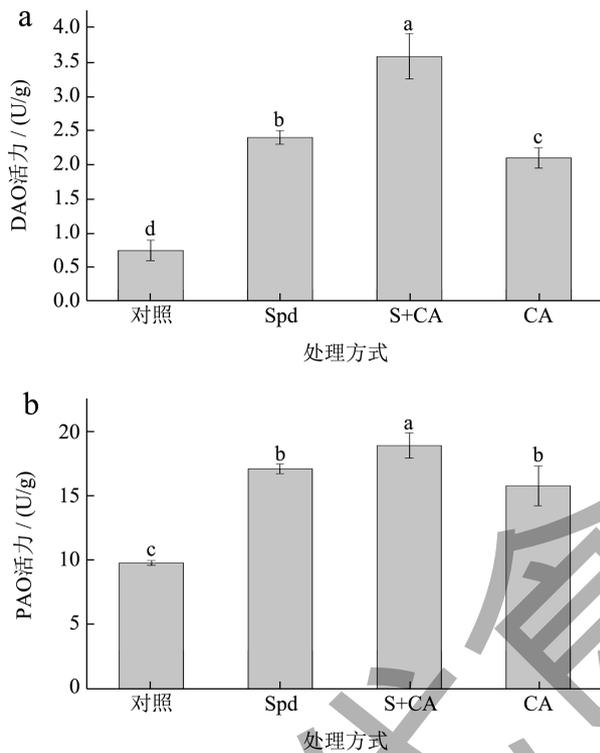


图6 不同处理方式对DAO和PAO活力的影响

Fig.6 Effects of different treatments on DAO and PAO activities

由图6a可知, 荞麦芽经过柠檬酸和亚精胺联合处理后, DAO活力显著 ($P < 0.05$) 高于对照组和单独处理组, 达到了3.58 U/g, 分别是对照组、亚精胺处理和柠檬酸处理的4.77、1.49和1.70倍。同样, 在PAO试验中, 得到了与DAO一致的结果, 联合处理下荞麦芽中PAO的活力为18.92 U/g, 对比其他组得到了显著提高 ($P < 0.05$) (图6b)。这说明比起单独处理, 联合处理对荞麦芽中DAO和PAO活力的提高同样有协同作用。从多胺降解途径看外源亚精胺的加入刺激了DAO和PAO的活力, 为GABA的积累提供了条件, 这也与齐菲^[32]发现外源亚精胺通过提高DAO、PAO以及AMADH活力来促进GABA积累的结果是一致的。此外, 本研究还发现柠檬酸处理时DAO和PAO的活力也显著升

高, 因为DAO和PAO的活力也会受pH的影响^[33]

2.9 不同处理方式对谷氨酸和亚精胺含量的影响

2.9.1 不同处理方式对谷氨酸含量的影响

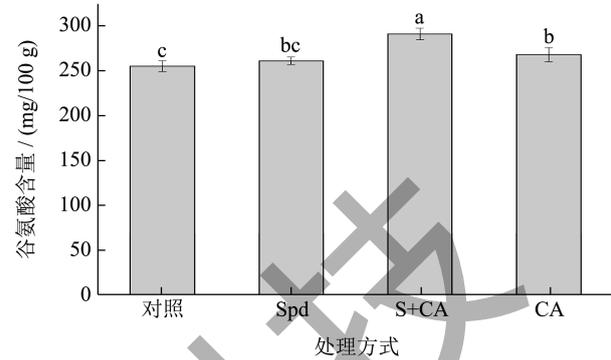


图7 不同处理方式对谷氨酸含量的影响

Fig.7 Effects of different treatments on glutamic acid content

图7为荞麦在发芽7d后不同处理组之间谷氨酸含量, 柠檬酸联合亚精胺处理后荞麦芽谷氨酸含量显著高于其他组 ($P < 0.05$), 是对照组的1.14倍。研究发现, 酸处理或酸联合亚精胺处理均能够提高植物体内蛋白的含量^[34,35], 蛋白水解后谷氨酸含量增加, 这可能是本实验中柠檬酸联合亚精胺组谷氨酸含量高于其他组的原因。曹晶晶等^[36]发现GAD受谷氨酸调控, 结合图5可知, 与对照相比, 其他各组酶活力都有显著提高, 这可能与底物浓度升高刺激GAD活力有关。

2.9.2 不同处理方式对亚精胺含量的影响

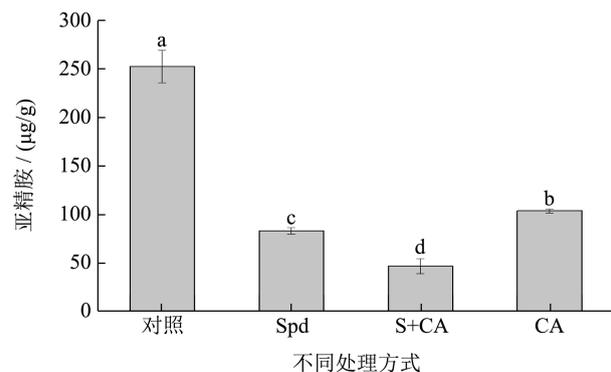


图8 不同处理方式对亚精胺含量的影响

Fig.8 Effects of different treatments on spermidine content

由图8可知, 亚精胺含量在柠檬酸组、亚精胺组以及联合处理组中都显著低于对照组 ($P < 0.05$), 其中联合处理后含量最低为46.89 µg/mg, 比对照组降低了5.38倍。研究发现, Zhou等^[19]用亚精胺喷洒绿豆芽后发现, 亚精胺含量要高于对照组, 并且呈

现先下降后上升的趋势。而本研究中用亚精胺处理的芽苗中亚精胺含量较低,这可能与亚精胺在荞麦芽体内参与多个代谢途径有关。首先亚精胺可以转化成 GABA,结合图 6 结果推测 DAO 和 PAO 活力升高可能会进一步促进亚精胺向 GABA 的转化。其次,亚精胺在植物体内会与精胺和腐胺之间相互转化,还会参与蛋白合成、清除活性氧等生理代谢活动^[32]。

2.10 相关性分析

表 7 柠檬酸联合亚精胺处理荞麦芽中 GABA 含量与关键酶活力之间的相关性分析

Table 7 Correlation analysis between GABA content and key enzyme activity in buckwheat sprouts treated with citric acid combined with spermidine

项目	GAD 活力		DAO 活力		PAO 活力	
	相关系数	P 值	相关系数	P 值	相关系数	P 值
GABA 含量	0.986	0.014	0.845	0.155	0.969	0.031

本研究进一步探究了柠檬酸联合亚精胺处理荞麦芽中 GABA 含量和关键酶活力之间的相关性。由表 7 可知, GABA 含量与 GAD 活力和 PAO 活力均呈正相关 ($P < 0.05$), 与 DAO 活力相关性不显著 ($P > 0.05$)。研究表明 GAD 活力对 GABA 的积累有积极影响^[27], 相关结论也与 Xu 等^[37]的实验结果相一致, 这说明 GABA 积累可能源于 GAD 活力升高。植物中 GABA 的积累还会受多胺降解途径的影响, 研究发现随着时间的延长 GABA 含量与 PAO 活力均呈上升趋势^[32], 这也符合本实验的研究结果。因此, 通过相关性分析的结果说明, 联合处理后 GABA 含量的升高与其合成途径中关键酶 GAD 和 PAO 活力的提高有关。

3 结论

本文利用柠檬酸和亚精胺处理荞麦种子, 以期促进荞麦芽中 GABA 的积累。通过单因素试验发现, 当柠檬酸和亚精胺的施用浓度分别为 2 mmol/L 和 0.10 mmol/L 时荞麦芽中 GABA 的含量最高, 分别比对照组提高了 2.11 倍和 1.93 倍。在此基础上, 通过响应面试验对柠檬酸和亚精胺浓度进行优化, 2 mmol/L 柠檬酸和 0.1 mmol/L 亚精胺对荞麦芽富集 GABA 效果最好, 含量达到 12.23 mg/g。同时, 用柠檬酸和亚精胺处理的荞麦种子发芽后, GAD、DAO 和 PAO 的活力有所提高, 这可能是荞麦芽中

GABA 含量上升的原因。通过对柠檬酸和亚精胺处理的荞麦发芽过程中 GABA 和关键酶进行相关性分析, 确定柠檬酸联合亚精胺处理发芽荞麦 GABA 含量的提高, 与相关途径关键酶变化有关。但二者对荞麦芽分子水平的调控还有待深入研究。荞麦作为一种营养丰富具有众多生物活性物质的杂粮, 具有较大的开发利用价值, 本实验所得富含 GABA 的荞麦芽可以作为食物材料用于各种 GABA 功能性产品开发, 为荞麦开发利用提供新的思路。

参考文献

- [1] CHEN T, PIAO M, EHSANUR RAHMAN S M, et al. Influence of fermentation on antioxidant and hypolipidemic properties of maifanite mineral water-cultured common buckwheat sprouts [J]. Food Chemistry, 2020, 321: 126741.
- [2] 周小理, 宋鑫莉. 萌动对植物籽粒营养成分的影响及荞麦萌动食品的研究 [J]. 上海应用技术学院学报(自然科学版), 2009, 9(3): 171-174, 192.
- [3] WANG Y, NIE Z, MA T. The effects of plasma-activated water treatment on the growth of tartary buckwheat sprouts [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 849615.
- [4] CHEN G Y, WANG Y S, ZHANG M Y, et al. Cold atmospheric plasma treatment improves the gamma-aminobutyric acid content of buckwheat seeds providing a new anti-hypertensive functional ingredient [J]. Food Chemistry, 2022, 388: 133064.
- [5] ZHANG A, JIANG X, GE Y, et al. The effects of GABA-rich adzuki beans on glycolipid metabolism, as well as intestinal flora, in type 2 diabetic mice [J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 849529.
- [6] WU Z, WANG P, PAN D, et al. Effect of adzuki bean sprout fermented milk enriched in gamma-aminobutyric acid on mild depression in a mouse model [J]. Journal of Dairy Science, 2021, 104(1): 78-91.
- [7] SUN S, LU Z, SHI Y, et al. Study on elevating sleep efficacy of γ -aminobutyric acid [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 440: 022010.
- [8] 许建军, 江波, 许时婴. γ -氨基丁酸(GABA)——一种新型的功能食品因子 [J]. 食品工业科技, 2003, 1: 109-110, 42.
- [9] MARTÍNEZ-VILLALUENGA C, KUO Y H, LAMBEIN F, et al. Kinetics of free protein amino acids, free non-protein amino acids and trigonelline in soybean (*Glycine max* L.) and lupin (*Lupinus angustifolius* L.) sprouts [J]. European Food Research and Technology, 2006, 224(2): 177-186.
- [10] 夏兴莉, 廖界仁, 任太钰, 等. 低温处理对茶叶叶片中 γ -氨基丁酸和其他活性成分含量的影响 [J]. 植物资源与环境学报, 2020, 29(5): 75-77.
- [11] TOYOIZUMI T, KOSUGI T, TOYAMA Y, et al. Effects of

- high-temperature cooking on the gamma-aminobutyric acid content and antioxidant capacity of germinated brown rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *CyTA-Journal of Food*, 2021, 19(1): 360-369.
- [12] YANG R, FENG L, WANG S, et al. Accumulation of gamma-aminobutyric acid in soybean by hypoxia germination and freeze-thawing incubation [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, 96(6): 2090-2096.
- [13] 侯莹, 祁雪鹤, 任慧, 等. 鲜切处理对猕猴桃中 γ -氨基丁酸富集的影响[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(20): 58-63, 84.
- [14] 周新勇, 陆燕婷, 尹永祺. 低氧联合酸胁迫富集大麦芽中 γ -氨基丁酸工艺优化[J]. *中国粮油学报*, 2020, 35(6): 144-150, 158.
- [15] CLAGUE M J, URBE S. Hrs function: viruses provide the clue [J]. *Trends in Cell Biology*, 2003, 13(12): 603-610.
- [16] 尹永祺, 吴进贤, 刘春泉, 等. 玉米籽粒低氧胁迫发芽期间主要生理生化及 γ -氨基丁酸含量变化[J]. *食品科学*, 2014, 35(17): 104-108.
- [17] 王姗姗, 刘小娇, 胡赞, 等. 植物中 γ -氨基丁酸的代谢及富集机制[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(24): 9-12.
- [18] ZHANG M, LI B, WAN Z, et al. Exogenous spermidine promotes germination of aged sorghum seeds by mediating sugar metabolism [J]. *Plants (Basel)*, 2022, 11(21): 2853.
- [19] ZHOU T, WANG P, GU Z, et al. Spermidine improves antioxidant activity and energy metabolism in mung bean sprouts [J]. *Food Chemistry*, 2020, 309: 125759.
- [20] YANG R, YIN Y, GU Z. Polyamine degradation pathway regulating growth and GABA accumulation in germinating fava bean under hypoxia-NaCl stress [J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(2): 311-320.
- [21] 臧金红. 酸鱼发酵过程中特征风味形成与微生物的关系研究[D]. 无锡: 江南大学, 2020.
- [22] NGUYEN THI HOANG YEN, PHAN NGOC HOA, PHAM VAN HUNG. Optimal soaking conditions and addition of exogenous substances improve accumulation of c-aminobutyric acid (GABA) in germinated mung bean (*Vigna radiata*) [J]. *International Journal of Food Science and Technology*, 2022, 57: 3924-3933.
- [23] 顾振新, 蒋廷晖. 高等植物体内 γ -氨基丁酸合成、代谢及其生理作用[J]. *植物生理通讯*, 2003(3): 249-254.
- [24] BAEK M W, CHOI H R, YUN JAE L, et al. Preharvest treatment of methyl jasmonate and salicylic acid increase the yield, antioxidant activity and GABA content of tomato [J]. *Agronomy*, 2021, 11(11): 2293.
- [25] 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.
- [26] FANG W, QI F, YIN Y, et al. Exogenous spermidine promotes gamma-aminobutyric acid accumulation and alleviates the negative effect of NaCl stress in germinating soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Foods*, 2020, 9(3): 267.
- [27] JIANG X, XU Q, ZHANG A, et al. Optimization of gamma-aminobutyric acid (GABA) accumulation in germinating adzuki beans (*Vigna angularis*) by vacuum treatment and monosodium glutamate, and the molecular mechanisms [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2021, 8: 693862.
- [28] 廖明星, 朱定和. 鲜茶叶 γ -氨基丁酸富集的机理与关键技术[J]. *现代食品科技*, 2007, 7: 75-77, 93.
- [29] 周婷. 多胺和 Ca^{2+} 对绿豆芽菜植酸降解的作用机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [30] 王凯凯, 孙滕, 宋佳敏, 等. γ -氨基丁酸(GABA)形成机理及富集方法的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(14): 323-329.
- [31] 周新勇, 齐菲, 尹永祺, 等. NaCl胁迫下外源亚精胺对发芽大豆生理生化及 γ -氨基丁酸代谢的影响[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2020, 41(2): 107-112, 119.
- [32] 齐菲. 外源Spd调控NaCl胁迫下发芽大豆生理代谢及GABA富集研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [33] CONA A, REA G, BOTTA M, et al. Flavin-containing polyamine oxidase is a hydrogen peroxide source in the oxidative response to the protein phosphatase inhibitor cantharidin in *Zea mays* L. [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(10): 2277-2289.
- [34] SRITONGTAE B, SANGSUKIAM T, MORGAN M R, et al. Effect of acid pretreatment and the germination period on the composition and antioxidant activity of rice bean (*Vigna umbellata*) [J]. *Food Chemistry*, 2017, 227: 280-288.
- [35] NAZ R, SARFRAZ A, ANWAR Z, et al. Combined ability of salicylic acid and spermidine to mitigate the individual and interactive effects of drought and chromium stress in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2021, 159: 285-300.
- [36] 曹晶晶, 顾丰颖, 罗其琪, 等. 发芽糙米 γ -氨基丁酸形成的谷氨酸脱羧酶活性与底物变化的相关性分析[J]. *食品科学*, 2018, 39(16): 47-52.
- [37] XU J G, HU Q P. Changes in γ -aminobutyric acid content and related enzyme activities in Jindou 25 soybean (*Glycine max* L.) seeds during germination [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2014, 55(1): 341-346.