

网络出版时间:2016-10-09 10:08 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2016.11.020  
网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20161009.1008.040.html

# 响应面法优化发芽苦荞富集 $\gamma$ -氨基丁酸的培养条件

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]** 【目的】研究发芽苦荞富集  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid,GABA)的最佳培养条件,为苦荞芽菜的开发利用提供支持。【方法】在谷氨酸钠(Monosodium glutamate,MSG)质量浓度、钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )浓度、发芽温度和发芽时间 4 个单因素试验基础上,采用响应面法对发芽苦荞的培养条件进行优化,建立 GABA 富集的二次多项式数学模型,并分析模型的有效性与因素间的交互作用。【结果】4 个因素对 GABA 富集的影响大小依次为 MSG 质量浓度>发芽温度>发芽时间> $\text{Ca}^{2+}$  浓度;发芽苦荞富集 GABA 的最佳培养条件为:MSG 浓度 6.90 mg/mL,发芽温度 32  $^{\circ}\text{C}$ ,发芽时间 3.5 d, $\text{Ca}^{2+}$  浓度 5.8 mmol/L,在此条件下发芽苦荞 GABA 含量为  $(258.77 \pm 3.95) \mu\text{g/g}$ ,与预测值 259.89  $\mu\text{g/g}$  相差较小。【结论】建立的回归模型能够较准确地预测发芽苦荞的 GABA 富集量。该培养方法稳定性好,GABA 富集量高。

**[关键词]** 发芽苦荞; $\gamma$ -氨基丁酸(GABA);培养条件;响应面法

**[中图分类号]** TS201.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1671-9387(2016)11-0141-08

## Optimizing culture conditions for GABA accumulation in germinated tartary buckwheat based on response surface methodology

ZHU Yunhui, GUO Yuanxin

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

**Abstract:** 【Objective】The optimal culture conditions for  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) accumulation in germinated tartary buckwheat were obtained to provide support for the development and utilization of tartary buckwheat sprouts. 【Method】On the basis of four single factor tests, response surface methodology was adopted to optimize the germinated conditions including monosodium glutamate (MSG) mass concentration, calcium ion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) concentration, temperature, and time. A second order quadratic equation was established and the applicability of the model and interactions between factors were analyzed. 【Result】The effects of the four factors on GABA accumulation were in a decreasing order of MSG mass concentration>temperature>time> $\text{Ca}^{2+}$  concentration. The optimal conditions for GABA accumulation were MSG concentration of 6.90 mg/mL, temperature of 32  $^{\circ}\text{C}$ , time of 3.5 d and  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of 5.8 mmol/L. The accumulation of GABA was  $(258.77 \pm 3.95) \mu\text{g/g}$  under the optimal conditions, which was similar to the predicted value of 259.89  $\mu\text{g/g}$ . 【Conclusion】The established model well predicted the accumulation of GABA and the optimal culture method was stable with high GABA accumulation.

**Key words:** germinated tartary buckwheat;  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA); culture condition; response surface methodology

〔收稿日期〕 2015-05-06

〔基金项目〕 安徽省自然科学基金项目(1308085MC32)

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

〔通信作者〕 郭元新(1970—),男,甘肃张掖人,教授,博士,主要从事农产品加工及品质控制研究。E-mail:guoyx@ahstu.edu.cn

苦荞学名鞑靼荞麦(*Fagopyrum tataricum*), 富含其他粮食作物中几乎没有的芦丁及硒元素, 同时还含有 18 种氨基酸、9 种脂肪酸及丰富的膳食纤维和叶绿素等, 是一种粮药兼用的蓼科荞麦属双子叶作物。研究表明, 苦荞发芽后营养成分更加合理, 荞麦蛋白酶抑制剂及植酸含量降低, 若能科学控制发芽条件, 还能富集  $\gamma$ -氨基丁酸( $\gamma$ -aminobutyric acid, GABA)等功能成分<sup>[1-4]</sup>。

GABA 是一种四碳非蛋白质氨基酸, 作为一种天然活性成分, 广泛存在于原核和真核生物体中, 是目前研究较为深入的一种重要的抑制性神经递质, 参与多种代谢活动, 具有降低血压、改善神经机能、助精神安定、促进生长激素分泌及酒精代谢等药理功能<sup>[5-6]</sup>。随着年龄的增长和精神压力的加大, 人脑中 GABA 的积累异常困难, 而通过日常饮食补充可有效改善这种状况<sup>[7]</sup>。但正常的植物组织中 GABA 含量很低, 为  $0.3 \sim 32.50 \mu\text{mol/g}$ <sup>[8]</sup>, 无法满足人体需求<sup>[9]</sup>。研究发现, 在低氧和涝灾、机械刺激、冷害、热激及盐胁迫等逆境下, 植物体内的 GABA 含量成倍增加<sup>[10-12]</sup>。植物中的 GABA 合成主要来自 GABA 支路中由谷氨酸脱羧酶(GAD, EC 4.1.1.15)催化的不可逆的  $\alpha$ -谷氨酸脱羧反应, GAD 是一种  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白依赖型酶, 具有一个钙调蛋白结合区<sup>[13]</sup>, 发芽温度、底物谷氨酸(Glu)及钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )浓度, 均与 GAD 的活性有关。通过胁迫、优化培养条件富集糙米<sup>[14]</sup>、大麦<sup>[15]</sup>、粟谷<sup>[16-17]</sup>、豆类<sup>[5, 18-20]</sup>等种子中 GABA 的研究已有报道, 但对发芽苦荞的研究主要集中在种子萌发过程中营养成分、黄酮等功能组分的变化上<sup>[2, 21]</sup>, 而对发芽苦荞富集 GABA 的研究较少。本研究在单因素试验基础上, 利用响应面法优化了发芽苦荞富集 GABA 的培养条件, 研究  $\text{Ca}^{2+}$  浓度、谷氨酸钠(MSG)质量浓度、发芽时间、发芽温度 4 个因素对 GABA 富集的影响, 建立了可靠的模型, 以期对苦荞芽菜的开发利用提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

苦荞(榆 6-21)种子, 2013 年秋采自中国内蒙古自治区乌兰察布市, 于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中贮藏备用。

GABA 标品(纯度  $\geq 99.9\%$ )和对二甲氨基苯磺酰氯(DABS-Cl,  $99\%$ ), 美国 Sigma 公司; 乙腈为色谱纯, 氯化钙和 MSG 等其他化学试剂, 均为国产分析纯。

### 1.2 仪器与设备

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; KDC-160HR 高速冷冻离心机, 合肥科大创新股份有限公司; 真空冷冻干燥系统, 美国 Labconce 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 苦荞发芽 取 30 g 苦荞种子用去离子水清洗后, 用质量分数 1% 的次氯酸钠消毒 15 min, 再用去离子水冲洗至 pH 中性,  $30^\circ\text{C}$  下浸泡 4 h。然后置于铺有两层滤纸的培养皿中暗培养, 培养箱湿度控制在  $85\% \sim 90\%$ , 期间每隔 8 h 左右喷洒设定浓度的  $\text{Ca}^{2+}$  (以  $\text{CaCl}_2$  溶液代替) 和 MSG 混合溶液, 保持滤纸湿润。

1.3.2 GABA 含量的测定 参考 Guo 等<sup>[5]</sup>的方法测定发芽苦荞中的 GABA 含量。样品预处理方法为: 将发芽苦荞冷冻干燥后, 粉碎得粒径  $180 \mu\text{m}$  的发芽苦荞粉, 称取 0.5 g 苦荞干粉溶于 5 mL 体积分数 7% 的乙酸中, 按照 Bai 等<sup>[17]</sup>的方法对样品进行纯化; 将纯化后的上清液于  $0.1 \text{ MPa}$ 、 $45^\circ\text{C}$  条件下进行真空干燥, 残余物溶于 2 mL 1 mol/L  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9) 缓冲溶液中,  $4\ 000 \times g$  离心 10 min。GABA 含量测定采用高压液相色谱 HPLC (Agilent 1200, USA), 色谱柱为 ZORBAX Eclipse AAA reversed-phase column ( $3.5 \mu\text{m}$ ),  $4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$ , 条件设置参照 Syu 等<sup>[22]</sup>的方法, 取 1 mL pH 为 9.0 的氨基酸溶液, 加入 2 mg/mL 含对二甲氨基苯磺酰氯的丙酮溶液 1 mL, 于  $67^\circ\text{C}$  保温 10 min 后冰浴终止反应; 然后使用 DAD 检测器于 425 nm 处进行紫外检测, 流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为 0.045 mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (pH=4) 缓冲液, 分离时间 30 min, 温度  $30^\circ\text{C}$ 。

1.3.3 单因素试验 按照 1.3.1 的方法, 保持其他条件不变, 分别考察  $\text{Ca}^{2+}$  浓度、MSG 质量浓度、发芽时间和发芽温度 4 个因素对发芽苦荞中 GABA 富集量的影响。

(1)  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响。分别用 0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液及 6.0 mg/mL 的 MSG 溶液处理发芽苦荞,  $30^\circ\text{C}$  下发芽 4 d。

(2) MSG 质量浓度的影响。分别用 0, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0 mg/mL 的 MSG 溶液及 6.0 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液处理发芽苦荞,  $30^\circ\text{C}$  下发芽 4 d。

(3) 发芽时间的影响。用 6.0 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液及 6.0 mg/mL 的 MSG 溶液处理发芽苦荞, 分

别 30 ℃下发芽 0,2,4,6,8 d。

(4)发芽温度的影响。用 6.0 mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$  溶液及 6.0 mg/mL 的 MSG 溶液处理发芽苦荞,分别在 15,20,25,30,35 ℃下发芽 4 d。

1.3.4 GABA 富集条件优化的响应面试验 在单因素试验基础上,采用 4 因素 3 水平的 Box-Behnken 设计方法,对影响发芽苦荞 GABA 富集的

$\text{Ca}^{2+}$  浓度、MSG 质量浓度、发芽时间和发芽温度 4 个因素进行响应面试验设计,试验因素水平见表 1。采用响应面分析方法(RSM)对苦荞发芽过程中 GABA 的富集条件进行优化。采用 Design Expert 8.0对试验数据进行回归分析,通过微分方法计算预测的最佳点。

表 1 发芽苦荞中 GABA 富集条件优化的响应面试验设计方案

Table 1 Design of RSM analysis for optimizing GABA accumulation conditions in germinated tartary buckwheat

| 试验水平<br>Code level | 试验因素 Experimental factor                      |                                   |                  |                         |
|--------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|------------------|-------------------------|
|                    | $\text{Ca}^{2+}$ 浓度/(mmol · L <sup>-1</sup> ) | MSG 质量浓度/(mg · mL <sup>-1</sup> ) | 发芽时间/d           | 发芽温度/℃                  |
|                    | $\text{Ca}^{2+}$ concentration                | MSG mass concentration            | Germination time | Germination temperature |
|                    | $X_1$                                         | $X_2$                             | $X_3$            | $X_4$                   |
| -1                 | 3.0                                           | 3.0                               | 2                | 25                      |
| 0                  | 6.0                                           | 6.0                               | 4                | 30                      |
| 1                  | 9.0                                           | 9.0                               | 6                | 35                      |

2 结果与分析

2.1 发芽苦荞富集 GABA 的单因素试验结果

2.1.1  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的影响 不同浓度  $\text{Ca}^{2+}$  对发芽苦荞 GABA 富集量的影响如图 1 所示。由图 1 可见,当  $\text{Ca}^{2+}$  浓度达到 6.0 mmol/L 时,发芽苦荞中 GABA 含量达到最大值,为 253.09  $\mu\text{g/g}$ ,此后随着  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增大,GABA 含量呈减小趋势。

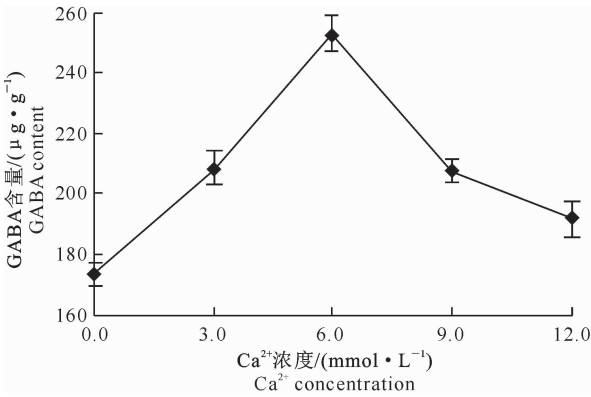


图 1  $\text{Ca}^{2+}$  浓度对发芽苦荞 GABA 富集量的影响

Fig.1 Effect of  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on GABA content in germinated tartary buckwheat

2.1.3 发芽时间的影响 如图 3 所示,随着发芽时间的延长,发芽苦荞 GABA 的富集量逐步增加,并在 4 d 达到最大值(236.94  $\mu\text{g/g}$ ),是发芽 0 d 的 1.80 倍,发芽 4 d 后,GABA 富集量缓慢下降。

2.1.4 发芽温度的影响 如图 4 所示,在  $\text{Ca}^{2+}$  浓度为 6.0 mmol/L,MSG 质量浓度为 6.0 mg/mL,发芽 4 d 的条件下,发芽温度为 15~30 ℃时,发芽苦荞 GABA 富集量逐渐上升,且速率较快,于 30 ℃达到最大值,为 249.63  $\mu\text{g/g}$ ,分别为 15,20,25,35

2.1.2 MSG 质量浓度的影响 在 6.0 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  处理下,不同质量浓度 MSG 对发芽苦荞 GABA 富集量的影响如图 2 所示。由图 2 可见,随着 MSG 质量浓度的增高,发芽苦荞中 GABA 含量逐渐增大,并在 6.0 mg/mL 时达到最大值,为 241.64  $\mu\text{g/g}$ ,分别是 0,3.0,9.0,12.0 mg/mL 的 1.49,1.19,1.07 和 1.16 倍。

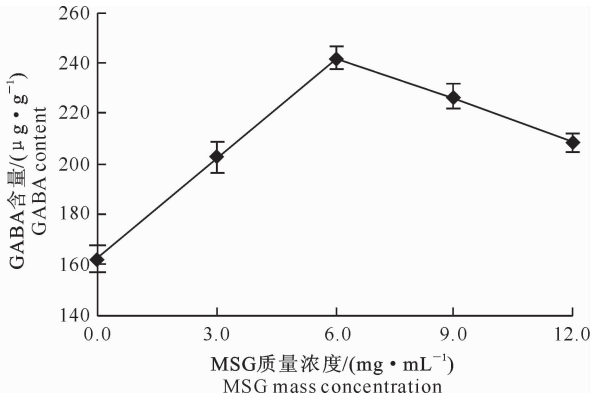


图 2 MSG 质量浓度对发芽苦荞 GABA 富集量的影响

Fig.2 Effect of MSG mass concentration on GABA content in germinated tartary buckwheat

℃的 1.49,1.30,1.15 及 1.09 倍。

2.2 发芽苦荞富集 GABA 最佳培养条件的确定

2.2.1 响应面回归方程的建立及方差分析 在单因素试验基础上,根据 Box-Behnken 的中心组合设计原理,以影响发芽苦荞 GABA 富集的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度( $X_1$ )、MSG 质量浓度( $X_2$ )、发芽时间( $X_3$ )、发芽温度( $X_4$ )与 GABA 含量( $Y$ )进行响应面试验,通过对结果(表 2 和图 5)进行回归分析及多元二次回归方程拟合发现, $X_1X_4$  与  $X_2X_3$  的  $F$  值分别为 0.036( $P>0.85$ )

和 0.030( $P>0.85$ ),对 GABA 富集量的影响微小,故将其归为误差项,重新拟合后得回归方程:  
 $Y=-456.450\ 67+47.735\ 33X_1+32.067\ 83X_2+26.510\ 92X_3+26.436\ 27X_4-1.087\ 50X_1X_2+0.215\ 83X_1X_3+0.366\ 67X_2X_4-$

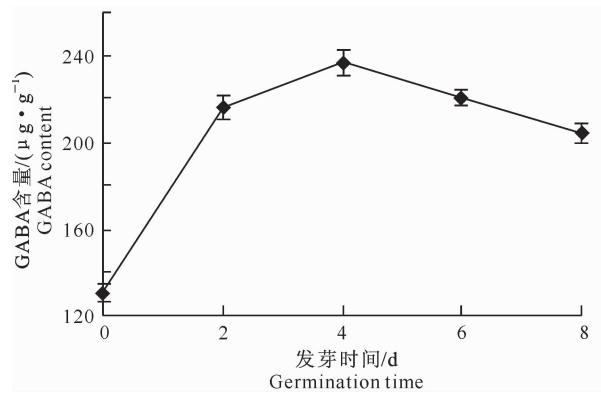


图 3 发芽时间对发芽苦荞 GABA 富集量的影响  
Fig. 3 Effect of germination time on GABA content in germinated tartary buckwheat

$$0.253\ 75X_3X_4-3.551\ 05X_1^2-2.709\ 80X_2^2-2.692\ 04X_3^2-0.441\ 98X_4^2.$$

响应面试验结果及根据回归方程得出的预测值见表 2。预测值与实测值的相关关系见图 5。

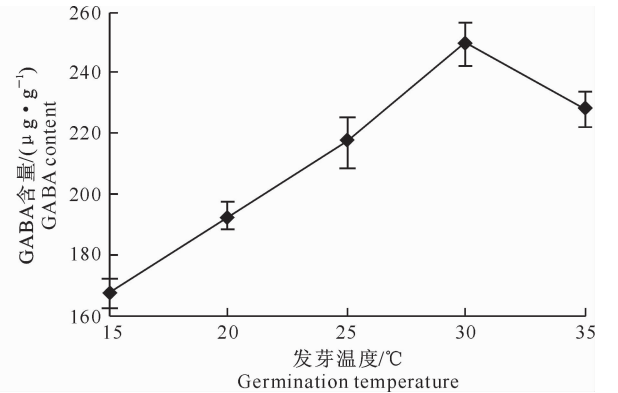


图 4 发芽温度对发芽苦荞 GABA 富集量的影响  
Fig. 4 Effect of germination temperature on GABA content in germinated tartary buckwheat

表 2 发芽苦荞 GABA 富集条件优化的 Box-Behnken 试验结果和预测值

Table 2 Box-Behnken design and predicted values of optimizing GABA accumulation conditions in germinated tartary buckwheat

| 试验编号<br>Trial | Ca <sup>2+</sup> 浓度<br>Ca <sup>2+</sup><br>concentration<br>X <sub>1</sub> | MSG 质量浓度<br>MSG mass<br>concentration<br>X <sub>2</sub> | 发芽时间<br>Germination<br>time<br>X <sub>3</sub> | 发芽温度<br>Germination<br>temperature<br>X <sub>4</sub> | GABA 含量/(μg·g <sup>-1</sup> ) GABA content |                           |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------|
|               |                                                                            |                                                         |                                               |                                                      | 实测值<br>Observed<br>value                   | 预测值<br>Predicted<br>value |
| 1             | -1                                                                         | -1                                                      | 0                                             | 0                                                    | 178.29±3.42                                | 180.24                    |
| 2             | 1                                                                          | -1                                                      | 0                                             | 0                                                    | 186.64±2.49                                | 196.59                    |
| 3             | -1                                                                         | 1                                                       | 0                                             | 0                                                    | 223.62±4.26                                | 223.97                    |
| 4             | 1                                                                          | 1                                                       | 0                                             | 0                                                    | 192.82±4.18                                | 201.16                    |
| 5             | 0                                                                          | 0                                                       | -1                                            | -1                                                   | 224.91±6.18                                | 229.66                    |
| 6             | 0                                                                          | 0                                                       | 1                                             | -1                                                   | 225.18±4.51                                | 229.36                    |
| 7             | 0                                                                          | 0                                                       | -1                                            | 1                                                    | 239.64±8.27                                | 245.76                    |
| 8             | 0                                                                          | 0                                                       | 1                                             | 1                                                    | 229.76±7.80                                | 235.31                    |
| 9             | -1                                                                         | 0                                                       | 0                                             | -1                                                   | 215.27±5.09                                | 209.93                    |
| 10            | 1                                                                          | 0                                                       | 0                                             | -1                                                   | 218.99±5.90                                | 206.70                    |
| 11            | -1                                                                         | 0                                                       | 0                                             | 1                                                    | 221.82±6.75                                | 220.96                    |
| 12            | 1                                                                          | 0                                                       | 0                                             | 1                                                    | 222.45±6.18                                | 217.73                    |
| 13            | 0                                                                          | -1                                                      | -1                                            | 0                                                    | 216.79±3.29                                | 212.29                    |
| 14            | 0                                                                          | 1                                                       | -1                                            | 0                                                    | 246.70±10.31                               | 236.44                    |
| 15            | 0                                                                          | -1                                                      | 1                                             | 0                                                    | 206.85±6.18                                | 206.92                    |
| 16            | 0                                                                          | 1                                                       | 1                                             | 0                                                    | 239.60±4.32                                | 231.07                    |
| 17            | -1                                                                         | 0                                                       | -1                                            | 0                                                    | 216.47±2.87                                | 219.71                    |
| 18            | 1                                                                          | 0                                                       | -1                                            | 0                                                    | 213.23±4.04                                | 213.88                    |
| 19            | -1                                                                         | 0                                                       | 1                                             | 0                                                    | 211.09±3.27                                | 211.75                    |
| 20            | 1                                                                          | 0                                                       | 1                                             | 0                                                    | 213.03±3.70                                | 211.10                    |
| 21            | 0                                                                          | -1                                                      | 0                                             | -1                                                   | 209.35±6.37                                | 209.31                    |
| 22            | 0                                                                          | 1                                                       | 0                                             | -1                                                   | 213.72±6.67                                | 222.46                    |
| 23            | 0                                                                          | -1                                                      | 0                                             | 1                                                    | 216.77±6.16                                | 209.34                    |
| 24            | 0                                                                          | 1                                                       | 0                                             | 1                                                    | 243.14±4.43                                | 244.49                    |
| 25            | 0                                                                          | 0                                                       | 0                                             | 0                                                    | 264.16±6.99                                | 256.84                    |
| 26            | 0                                                                          | 0                                                       | 0                                             | 0                                                    | 250.58±8.29                                | 256.84                    |
| 27            | 0                                                                          | 0                                                       | 0                                             | 0                                                    | 256.01±4.41                                | 256.84                    |
| 28            | 0                                                                          | 0                                                       | 0                                             | 0                                                    | 260.05±5.92                                | 256.84                    |
| 29            | 0                                                                          | 0                                                       | 0                                             | 0                                                    | 253.39±5.96                                | 256.84                    |

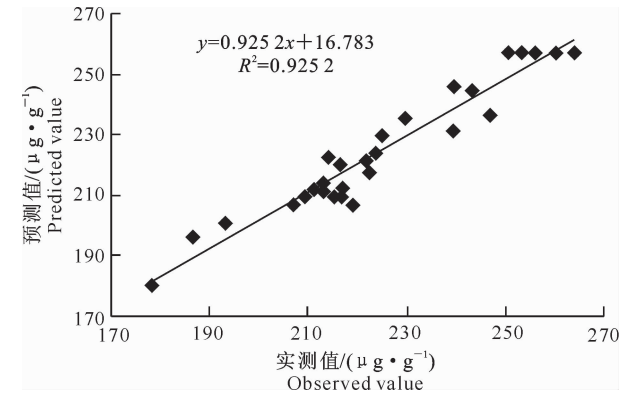


图 5 发芽苦荞中 GABA 含量实测值与预测值之间的关系  
Fig. 5 Correlation between predicted and observed values of GABA content in germinated tartary buckwheat

表 3 发芽苦荞 GABA 富集条件优化回归模型的方差分析

| Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the regression equation of optimal GABA accumulation conditions in germinated tartary buckwheat |                       |                          |                    |                |                |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------|--------------------|----------------|----------------|
| 方差来源<br>Source                                                                                                                           | 平方和<br>Sum of squares | 自由度<br>Degree of freedom | 均方<br>Mean squares | F 值<br>F-value | P 值<br>P-value |
| 模型 Model                                                                                                                                 | 11 703. 97            | 12                       | 975. 33            | 16. 50         | <0. 000 1      |
| $X_1$                                                                                                                                    | 31. 36                | 1                        | 31. 36             | 0. 53          | 0. 476 9       |
| $X_2$                                                                                                                                    | 1 749. 91             | 1                        | 1 749. 91          | 29. 61         | <0. 000 1      |
| $X_3$                                                                                                                                    | 86. 56                | 1                        | 86. 56             | 1. 46          | 0. 243 8       |
| $X_4$                                                                                                                                    | 364. 76               | 1                        | 364. 76            | 6. 17          | 0. 024 4       |
| $X_1X_2$                                                                                                                                 | 383. 18               | 1                        | 383. 18            | 6. 48          | 0. 021 6       |
| $X_1X_3$                                                                                                                                 | 6. 71                 | 1                        | 6. 71              | 0. 11          | 0. 740 6       |
| $X_2X_4$                                                                                                                                 | 121. 00               | 1                        | 121. 00            | 2. 05          | 0. 171 7       |
| $X_3X_4$                                                                                                                                 | 25. 76                | 1                        | 25. 76             | 0. 44          | 0. 518 6       |
| $X_1^2$                                                                                                                                  | 6 625. 33             | 1                        | 6 625. 33          | 112. 10        | <0. 000 1      |
| $X_2^2$                                                                                                                                  | 3 858. 05             | 1                        | 3 858. 05          | 65. 28         | <0. 000 1      |
| $X_3^2$                                                                                                                                  | 752. 13               | 1                        | 752. 13            | 12. 73         | 0. 002 6       |
| $X_4^2$                                                                                                                                  | 791. 93               | 1                        | 791. 93            | 13. 40         | 0. 002 1       |
| 残差 Residual                                                                                                                              | 945. 65               | 16                       | 59. 10             |                |                |
| 失拟项 Lack of fit                                                                                                                          | 829. 99               | 12                       | 69. 17             | 2. 39          | 0. 207 4       |
| 纯误差 Pure error                                                                                                                           | 115. 67               | 4                        | 28. 92             |                |                |
| 总变异 Total error                                                                                                                          | 12 649. 62            | 28                       |                    |                |                |

2.2.2 响应面模型交互项的解析 对表 2 数据进行二次多元回归拟合,得到二次回归方程的响应曲面及其等高线见图 6~图 9。从图 6 可见, $\text{Ca}^{2+}$ 浓度与 MSG 质量浓度对发芽苦荞中 GABA 富集量的交互作用显著 ( $P<0.05$ ), $\text{Ca}^{2+}$ 浓度固定时,随着 MSG 质量浓度的递增,GABA 富集量呈先上升后下降的趋势;MSG 质量浓度不变时,随着  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高,GABA 富集量也呈先上升后下降的趋势。当  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为 5.77 mmol/L,MSG 质量浓度为 6.90 mg/mL 时为响应面最高点,GABA 富集量最大达到 258.42  $\mu\text{g/g}$ 。

$\text{Ca}^{2+}$ 浓度与发芽时间对发芽苦荞中 GABA 富集量的交互作用不显著 ( $P>0.05$ )(图 7)。随着  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的递增和发芽时间的延长,发芽苦荞中

从方差分析结果(表 3)可以看出,回归模型的  $F=16.50,P<0.0001$ ,表明回归模型极显著;失拟项不显著( $P>0.05$ ),说明方程拟合较好。在各因素中,MSG 质量浓度对 GABA 富集的影响极显著 ( $P<0.0001$ ),发芽温度对 GABA 富集的影响显著 ( $P<0.05$ )。各因素的影响大小顺序为 MSG 质量浓度( $X_2$ )>发芽温度( $X_4$ )>发芽时间( $X_3$ )> $\text{Ca}^{2+}$ 浓度( $X_1$ )。在模型其他项中, $X_1X_2$ 的交互作用及  $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$ 、 $X_4^2$ 对苦荞 GABA 富集的影响均有显著性。比较模型的预测值和观察值可见,二者具有极显著的相关性(图 5)。综合所有统计分析特征值表明,模型具有实践指导意义。

GABA 富集量先升高后下降, $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为 5.77 mmol/L,发芽 3.66 d 时,GABA 富集量达到最高(256.93  $\mu\text{g/g}$ )。

由图 8 可以看出,MSG 质量浓度与发芽温度对发芽苦荞中 GABA 富集量的交互作用不显著 ( $P>0.05$ )。随着 MSG 质量浓度递增和发芽温度升高,发芽苦荞中 GABA 富集量先升高后下降,MSG 质量浓度为 6.90 mg/mL、发芽温度为 31.72  $^{\circ}\text{C}$  时,GABA 富集量最高(259.42  $\mu\text{g/g}$ )。

发芽时间和发芽温度对发芽苦荞中 GABA 富集量的交互作用不显著 ( $P>0.05$ )(图 9)。随着发芽时间延长和温度升高,发芽苦荞中 GABA 富集量先升高后下降,发芽时间为 3.66 d,发芽温度为 31.72  $^{\circ}\text{C}$  时,GABA 富集量达到最高(257.72

$\mu\text{g/g}$ )。

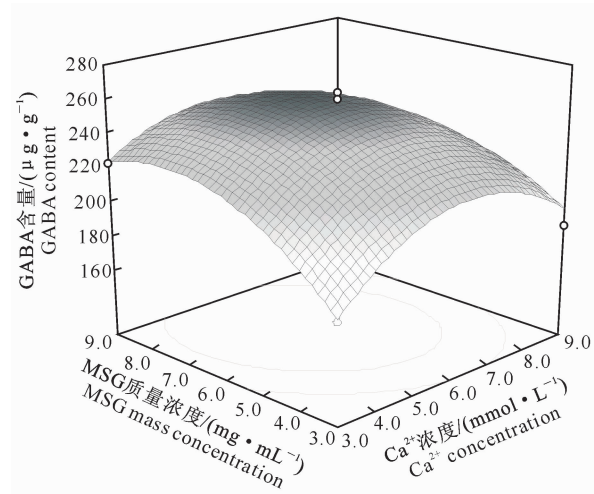


图 6  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和 MSG 质量浓度对发芽苦荞 GABA 富集量的交互影响  
Fig. 6 Effect of interaction between  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and MSG concentration on GABA content in germinated tartary buckwheat

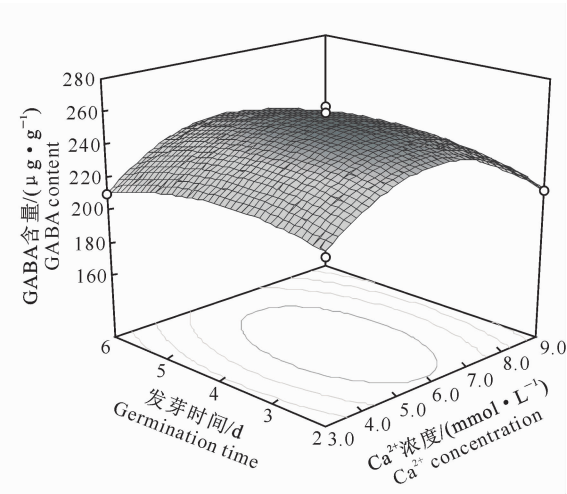


图 7  $\text{Ca}^{2+}$  浓度和发芽时间对发芽苦荞 GABA 富集量的交互影响  
Fig. 7 Effect of interaction between  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and germination time on GABA content in germinated tartary buckwheat

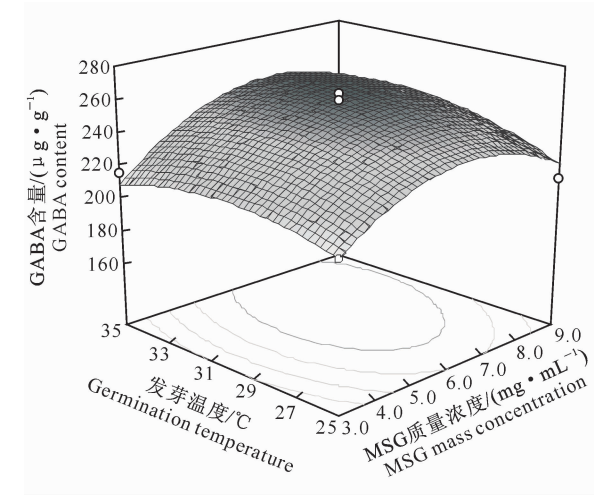


图 8 MSG 质量浓度和发芽温度对发芽苦荞 GABA 富集量的交互影响  
Fig. 8 Effect of interaction between MSG mass concentration and germination temperature on GABA content in germinated tartary buckwheat

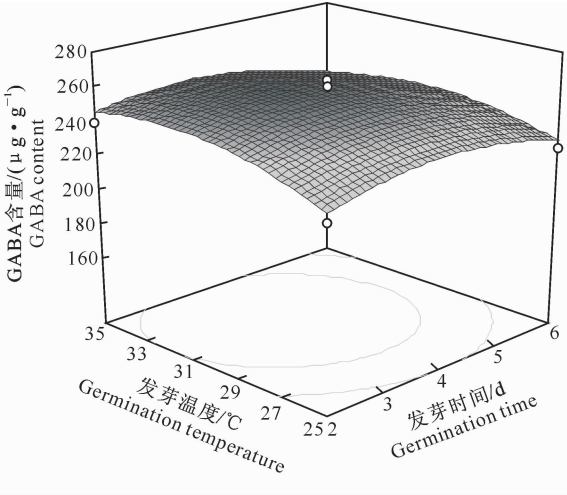


图 9 发芽时间和发芽温度对发芽苦荞 GABA 富集量的交互影响  
Fig. 9 Effect of interaction between germination time and temperature on GABA content in germinated tartary buckwheat

根据响应面试验结果,得出回归模型对发芽苦荞中 GABA 富集量的最大预测值为  $259.89 \mu\text{g/g}$ , 对应的发芽条件为: $\text{Ca}^{2+}$  浓度  $5.77 \text{ mmol/L}$ ,MSG 质量浓度  $6.90 \text{ mg/mL}$ ,发芽时间  $3.66 \text{ d}$ ,发芽温度  $31.72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,考虑到实际操作的可性,将培养条件改进为: $\text{Ca}^{2+}$  浓度  $5.8 \text{ mmol/L}$ ,MSG 质量浓度  $6.9 \text{ mg/mL}$ ,发芽时间  $3.5 \text{ d}$ ,发芽温度  $32 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。对此条件进行验证试验,得到 GABA 含量为  $(258.77 \pm 3.95) \mu\text{g/g}$ ,验证值与理论值的相对误差较小,说明

利用响应面法优化的条件对发芽苦荞富集 GABA 是可行的。

### 3 讨论

有研究表明,GAD 催化 Glu 在  $\alpha$ -位上不可逆的脱羧反应是合成 GABA 的主要途径<sup>[23]</sup>,提高 GAD 活力有助于 GABA 的积累<sup>[24]</sup>。GAD 是一种  $\text{Ca}^{2+}$ /钙调蛋白依赖型酶,具有一个钙调蛋白结合区<sup>[13]</sup>,因而通常认为植物细胞受到胁迫时,胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度

会快速提升,促使 GAD 活力升高,进而富集 GABA<sup>[10,25]</sup>。添加 Glu 可提高发芽粟谷 GAD 活性,进而促进 GABA 的富集,然而当 Glu 浓度过高时,并不利于 GABA 的大量生成<sup>[17]</sup>。本研究通过向发芽苦荞中添加一定量的  $\text{Ca}^{2+}$  和 MSG,提高了 GABA 的富集量,这与前人的研究结果<sup>[17,20]</sup>一致。种子萌发后,种子中的蛋白质等大分子物质逐渐降解,GAD 被激活,L-Glu 进行脱羧反应生成 GABA<sup>[2,4]</sup>。研究表明,苦荞在发芽 1~3 d 时,GABA 含量不断升高<sup>[26]</sup>。以质量浓度为 0.2 mg/L 的  $\text{Cu}^{2+}$  对苦荞进行胁迫处理,发现第 4 天时 GABA 含量达到最大值,随后不断下降<sup>[27]</sup>。本研究以一定量的  $\text{Ca}^{2+}$  和 MSG 胁迫发芽苦荞,发现发芽苦荞中的 GABA 含量随着发芽时间延长也呈现出先上升后下降的趋势。GAD 受温度影响很大,温度会影响酶蛋白的构象,酶与激活剂的亲和力及参与酶促反应功能团的解离等<sup>[28]</sup>。Satyanarayan 等<sup>[29]</sup>研究表明,多数植物中 GAD 酶活最适温度在 36~40 °C,因种间差异,粟谷 GABA 富集的最高温度为 33 °C<sup>[28]</sup>,大豆 GABA 富集的最适温度为 30.5~33.3 °C<sup>[25]</sup>,而米胚和米糠分别为 40 和 41.3 °C<sup>[30-31]</sup>;当温度高于 50 °C 时,GAD 酶活很不稳定,到 60 °C 时酶失活 87%<sup>[32]</sup>。温度过高或过低都会影响 GAD 的构象及其与底物的亲和力,从而引起 GAD 活性下降,导致 GABA 富集量过低或下降<sup>[31]</sup>。本研究结果表明,温度升高有助于发芽苦荞富集 GABA,并在 31.72 °C 达到最高值。

## 4 结 论

用响应面法对发芽苦荞中富集 GABA 的反应条件进行了优化,建立的二次多项数学模型具有显著性( $P < 0.000\ 1$ ),决定系数为 0.925 2,MSG 质量浓度对 GABA 富集量的影响极显著( $P < 0.000\ 1$ ),发芽温度对富集量的影响显著( $P < 0.05$ ), $\text{Ca}^{2+}$  浓度与 MSG 质量浓度对发芽苦荞中 GABA 富集量的交互作用显著( $P < 0.05$ )。由回归方程得出,在  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 5.77 mmol/L,MSG 质量浓度 6.90 mg/mL,发芽温度 31.72 °C,发芽时间 3.66 d 的条件下,发芽苦荞中 GABA 富集量最大,预测值为 259.89  $\mu\text{g/g}$ 。考虑到实际操作的可性,最后优选的培养条件为, $\text{Ca}^{2+}$  浓度 5.8 mmol/L,MSG 质量浓度 6.9 mg/mL,发芽时间 3.5 d,发芽温度 32 °C,在此条件下 GABA 的富集量为 (258.77  $\pm$  3.95)  $\mu\text{g/g}$ ,与理论值基本相符,说明所建模型能够较为

准确地预测发芽苦荞 GABA 的富集量。

## [参考文献]

- [1] 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.  
Zhu Y H,Guo Y X. Research progress in development and utilization of tartary buckwheat resource in China [J]. Science and Technology of Food Industry,2014,35(24):360-365.
- [2] 李晓丹.苦荞胁迫萌发及功能性成分的研究[D].江苏无锡:江南大学,2013.  
Li X D. Study on tartary buckwheat germination in stress and its functional components [D]. Wuxi, Jiangsu: Southern Yangtze University,2013.
- [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.  
Zhang M L,Zhang J Y,Hu X S. Studies on the change of trypsin inhibitor activity and relativity with digestibility rate of protein in germinated buckwheat [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2006,6(5):34-39.
- [4] Bouche N,Lacombe B,Fromm H. GABA signaling:a conserved and ubiquitous mechanism [J]. Trends in Cell Biology,2003,13(12):607-610.
- [5] Guo Y X,Yang R Q,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.
- [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.  
Guo Y X,Yang R Q,Gu Z X,et al. Progress on the application of biotransformation technology to accumulate  $\gamma$ -aminobutyric acid in soybean products [J]. Food and Fermentation Industries,2011,37(11):154-158.
- [7] 江波.GABA( $\gamma$ -氨基丁酸):一种新型的功能食品因子[J].中国食品学报,2008,8(2):1-4.  
Jiang B. Gamma-aminobutyric acid:a novel functional factor for nutraceuticals [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology,2008,8(2):1-4.
- [8] 蒋振晖,顾振新.高等植物体内  $\gamma$ -氨基丁酸合成、代谢及其生理作用[J].植物生理学通讯,2003,39(3):249-254.  
Jiang Z H,Gu Z X. Biosynthesis, catabolism and physiological roles of  $\gamma$ -aminobutyric acid in higher plants [J]. Plant Physiology Communications,2003,39(3):249-254.
- [9] 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(10):65-69.  
Gu Z X,Jiang Z H. Formation mechanism and accumulation technique of  $\gamma$ -aminobutyric acid of food raw materials [J]. Food and Fermentation Industries,2002(10):65-69.
- [10] Yang R Q,Guo Y X,Wang S F,et al.  $\text{Ca}^{2+}$  and aminoguanidine on  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in germinating soybean under hypoxia-NaCl stress [J]. Journal of Food and

- Drug Analysis, 2015, 23(2): 287-293.
- [11] 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, 33(10): 1-5.
- Guo Y X, Yang R Q, Chen H, et al. Optimization of GABA accumulation process of germinated soybean under salt stress [J]. Food Science, 2012, 33(10): 1-5.
- [12] 吴进贤. 玉米籽粒  $\gamma$ -氨基丁酸富集技术及其饮料开发研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2013.
- Wu J X. Accumulation technology of  $\gamma$ -aminobutyric acid in maize seed and development of maize beverage [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2013.
- [13] Baum G, Chen Y L, Arazi T, et al. A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain-cloning sequence, and functional analysis [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1993, 268(26): 19610-19617.
- [14] Komatsuzaki N, Tsukahara K, Toyoshima H, et al. Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice [J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(2): 556-560.
- [15] Chung H J, Jang S H, Cho H Y, et al. Effects of steeping and anaerobic treatment on GABA ( $\gamma$ -aminobutyric acid) content in germinated waxy hull-less barley [J]. LWT-Food Science and Technology, 2009, 42(10): 1712-1716.
- [16] Bai Q Y, Fan G J, Gu Z X, et al. Effects of culture conditions on  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation during germination of foxtail millet (*Setaria italica* L.) [J]. European Food Research and Technology, 2008, 228(2): 169-175.
- [17] Bai Q Y, Chai M Q, Gu Z X, 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.
- [18] Katagiri M, Shimizu S.  $\gamma$ -amino butyric acid accumulation in bean sprouts (soybean, black gram, green gram) treated with carbon dioxide [J]. Nippon Shokuhin Kagaku Kougaku Kaishi, 1989, 36(11): 916-919.
- [19] Li Y, Bai Q Y, Jin X J, et al. Effects of cultivar and culture conditions on  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation in germinated fava beans (*Vicia faba* L.) [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(1): 52-57.
- [20] 方嘉沁. 富  $\gamma$ -氨基丁酸胚芽大豆发芽工艺优化及其豆浆制品研究 [D]. 南昌: 江西农业大学, 2012.
- Fang J Q. Study on the enrichment conditions of  $\gamma$ -aminobutyric acid content in soybean germ and the study soybean milk products [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2012.
- [21] 李成磊. 苦荞黄酮合成相关酶基因的克隆、芽期逆境胁迫中的应答及重组 FtPAL 和 FtFLS 的酶学活性研究 [D]. 四川雅安: 四川农业大学, 2012.
- Li C L. Molecular cloning flavonoid-related genes from tartary buckwheat and their responses under UVB, cold, and drought stresses in sprouts, and enzymatic activity analysis of the recombinant FtPAL and FtFLS proteins [D]. Ya'an, Sichuan: Sichuan Agricultural University, 2012.
- [22] Syu K Y, Lin C L, Huang H C, et al. Determination of theanine, GABA, and other amino acids in green, oolong, black, and Pu-erh teas with dabsylation and high-performance liquid chromatography [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(17): 7637-7643.
- [23] Bouche N, Fromm H. GABA in plants: just a metabolite [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9(3): 110-115.
- [24] Shelp B J, Bown A W, Mclean M D. Metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutyric acid [J]. Trends in Plant Science, 1999, 4(11): 446-452.
- [25] 郭元新. 盐和低氧胁迫下发芽大豆  $\gamma$ -氨基丁酸富集与调控机理研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- Guo Y X. Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid and its regulation mechanisms under NaCl and hypoxia stress in germinated soybean [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [26] 刘本国, 陈永生, 高海燕, 等. 苦荞麦萌发过程中活性成分的变化 [J]. 粮油加工, 2010(3): 48-50.
- Liu B G, Chen Y S, Gao H Y, et al. Changes in active ingredient of tartary buckwheat during germination [J]. Cereals and Oils Processing, 2010(3): 48-50.
- [27] 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, 35(5): 201-204.
- Zhou Y M, Zhou X L, Cui L L, et al. Ecological effect of tartary buckwheat germination under  $\text{Cu}^{2+}$  stress [J]. Food Industry, 2014, 35(5): 201-204.
- [28] 白青云. 低氧胁迫和盐胁迫下发芽粟谷  $\gamma$ -氨基丁酸富集机理及抗氧化性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- Bai Q Y. Studies on mechanism of  $\gamma$ -aminobutyric acid accumulation and antioxidant activity in germinated foxtail millet under hypoxia stress and salt stress [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2009.
- [29] Satyanarayan V, Nair P M. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Solanum tuberosum* [J]. European Journal of Biochemistry/FEBS, 1985, 150(1): 53-60.
- [30] 张晖. 米胚谷氨酸脱羧酶性质及其富集  $\gamma$ -氨基丁酸研究 [D]. 江苏无锡: 江南大学, 2004.
- Zhang H. Study on the properties of glutamate decarboxylase and accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in rice germ [D]. Wuxi, Jiangsu: Southern Yangtze University, 2004.
- [31] 张磊. 米糠中  $\gamma$ -氨基丁酸富集技术及保健饮料制作研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- Zhang L. Studies on  $\gamma$ -aminobutyric acid enrichment technology in rice bran and development healthy soft drink [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.
- [32] Zhang H, Yao H Y, Chen F, et al. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from rice germ [J]. Food Chemistry, 2007, 101(4): 1702-1708.