

# 黑豆发芽过程中蛋白质及 $\gamma$ -氨基丁酸的变化及发芽条件的优化

翟玮玮, 焦宇知

(江苏食品职业技术学院, 江苏 淮安 223003)

**摘 要:** 对黑豆发芽过程中蛋白质及  $\gamma$ -氨基丁酸(GABA)的变化进行探讨, 并以  $\gamma$ -氨基丁酸含量和内源蛋白酶活力为指标优化黑豆发芽条件。结果表明: 黑豆发芽过程中, 蛋白质、必需氨基酸和非必需氨基酸的含量增加显著, 尤其是天冬氨酸(Asp)和蛋氨酸(Met)含量增加显著, 但赖氨酸(Lys)含量显著下降; 内源蛋白酶活力先增加后降低; 蛋白质平均相对分子质量显著下降;  $\gamma$ -氨基丁酸含量显著增加。最佳发芽条件为浸泡温度 38℃, 浸泡时间 5h, 发芽温度 28℃, 发芽时间 6d。该条件下  $\gamma$ -氨基丁酸含量为 94.4mg/100g, 内源蛋白酶活力为 134.68U/ml。

**关键词:** 黑豆; 氨基酸; 相对分子质量; 内源蛋白酶;  $\gamma$ -氨基丁酸

## Sprouting Condition Optimization Based on Protease Activity and GABA of Black Soybean

ZHAI Wei-wei, JIAO Yu-zhi

(Jiangsu Food Science College, Huai'an 223003, China)

**Abstract:** During sprouting process, a significant change in protease activity and gamma-aminobutyric acid (GABA) was observed in black soybean. In order to optimize the sprouting conditions of black soybean, GABA and endogenous proteases were investigated as indicators. Total protein amount, essential amino acid (EAA) and non-essential amino acid (NEAA) exhibited a significant increase, especially Asp, Met and GABA; in contrast, an obvious decrease of Lys was detected in the sprouting process of black soybean. In addition, an initial increase and a final decrease in the activity of endogenous proteases were also detected. Moreover, relative average molecular mass of proteins and GABA exhibited a significant decrease and increase, respectively. Therefore, the optimal conditions for sprouting of black soybean were soaking at 38℃ for 5 h followed by sprouting at 28℃ for 6 days. GABA and endogenous protease activity under these conditions were 94.4 mg/100g and 134.68 U/ml, respectively.

**Key words:** black soybean; amino acid; relative molecular mass; endogenous protease; GABA

中图分类号: TS214.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)19-0051-04

黑豆富含蛋白质、脂肪、氨基酸等营养物质, 并富含多种生物活性物质, 具有抗氧化性、抗肿瘤活性和保护心血管的作用, 是我国传统的药食两用食品<sup>[1-3]</sup>。

黑豆皮质厚, 不易消化吸收和利用, 通过发芽技术改善黑豆的质构、营养、生物活性以及人体实际利用率已成为研究热点。本实验对黑豆发芽过程中蛋白质、氨基酸组成及  $\gamma$ -氨基丁酸的变化进行研究, 并对黑豆发芽条件进行优化, 以期对黑豆食品的深度开发提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

黑豆 江苏省沛县湖西农场 2008 年收, 原料干燥后 4℃条件下储藏。

$\gamma$ -氨基丁酸标样、染料木素 Sigma 公司; Sephacryl S-200 凝胶、相对分子质量标准样品 Pharmacia 公司; 酪氨酸标准品等其他试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器与设备

TU-1900 紫外分光光度计 北京普析通用有限公司; ATN-300 全自动蛋白质测定仪 上海洪纪仪器设备有限公司; LGJ-18C 压盖型冷冻干燥机 北京四环科学仪器厂有限公司; L-8800 型氨基酸分析仪(阳离子交换树脂柱, 紫外检测器) 日立公司。

收稿日期: 2009-06-21

作者简介: 翟玮玮(1968—), 女, 副教授, 硕士, 主要从事食品加工技术及发酵与保健食品的开发与研究。

E-mail: zaiww6810@126.com

### 1.3 方法

#### 1.3.1 发芽黑豆粉制备

黑豆→筛选→精选→消毒→清洗→浸泡→发芽→清洗→终止活性→磨浆→抽滤→冷冻干燥→发芽黑豆粉

将精选后的黑豆用0.5%的次氯酸钠溶液浸泡5min, 自来水冲洗, 置于已恒温的烧杯中浸泡一定时间, 然后从烧杯中取出沥干, 转移到培养皿中, 用培养液在一定温度的恒定湿热试验箱中培养发芽。发芽结束后, 清洗, 终止活性, 加入4倍体积水磨浆, 抽滤后迅速冷冻干燥, 得到发芽黑豆粉。

#### 1.3.2 指标测定方法

##### 1.3.2.1 蛋白质含量的测定

取不同发芽时间(1~7d)的黑豆粉样品, 采用全自动蛋白质测定仪测定<sup>[4]</sup>。

##### 1.3.2.2 游离氨基酸、总氨基酸及含量的测定

采用氨基酸自动分析仪测定, 样品为发芽3、7d的黑豆粉。

##### 1.3.2.3 内源蛋白酶活力的测定

采用比色法。取不同发芽时间(1~7d)的黑豆粉样品各0.05g于5ml 0.2mol/L pH7.5的磷酸盐缓冲液中溶解。取1ml溶液加入0.5%酪蛋白溶液2ml, 37℃下摇匀, 反应20min, 加入10%三氯乙酸2ml终止反应。3000r/min离心10min, 取上清液, 在275nm波长处比色。先加三氯乙酸而后加底物酪蛋白溶液, 作空白实验。用标准曲线法测定上清液中酪氨酸含量, 定义在37℃下每分钟水解酪蛋白产生1μg的酪氨酸为一个酶活力单位。

##### 1.3.2.4 发芽黑豆蛋白相对平均分子量分布测定

Sephacryl S-20凝胶色谱法。称取发芽7d后的黑豆粉50g, 加入0.02mol/L的NaOH 250ml, 调pH11.0振荡浸泡2h, 10000r/min离心5min, 去渣, 调节上清液pH4.5, 10000r/min离心5min, 冷冻干燥得到发芽黑豆蛋白质。取蛋白质样品200mg, 用0.1 mol/L NaOH溶解, 定容至5ml, 微孔过滤后上样。

色谱条件为: Sephacryl S-20凝胶柱(1.6cm × 150cm); 洗脱液: 0.001mol/L的NaOH(pH11.0); 流速: 20.2ml/min; 检测波长: 220nm; 所使用的标准相对分子量分别为: A: 二磷酸果糖酶,  $M_w$  158000; B: 牛血清蛋白,  $M_w$  68000; C: 鸡蛋蛋白,  $M_w$  45000; D: 胰凝乳蛋白酶原,  $M_w$  25000; E: 细胞色素C,  $M_w$  12500。

##### 1.3.2.5 $\gamma$ -氨基丁酸含量的测定<sup>[5-8]</sup>

氨基酸自动分析仪测定。准确称取一定量不同发芽时间(1~7d)的黑豆粉于试管中, 加0.15ml 2%苯酚溶液, 0.25ml 过甲酸(将30%过氧化氢与88%甲酸以1:9(V/V)混

合, 室温放置1h, 置冰水浴中冷却30min, 临用前配制), 20℃下氧化4h, 加0.1ml 16.8%偏重亚硫酸钠, 摇匀后拉管, 待冷却后, 加7mol/L的盐酸4ml后封管, 110℃条件下水解24h。取出水解管, 冷却后开管, 将水解液转移至25ml容量瓶中, 加4ml 6 mol/L的NaOH溶液中和水解液后用0.02mol/L盐酸缓冲液定容至25ml。溶液经0.22μm微孔过滤后即可上色谱柱测定。洗脱液流速为0.5ml/min, 茚三酮溶液(按说明书要求配制)流速为0.35ml/min, 分析柱温为58℃, 反应器温度为138℃, 进样体积20μl。

## 2 结果与分析

### 2.1 黑豆发芽过程中蛋白质含量的变化

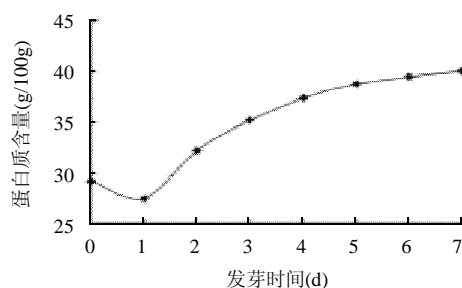


图1 黑豆发芽过程中蛋白质含量随发芽时间的变化

Fig.1 Change of total protein amount during sprouting of black soybean

从图1可以看出, 发芽1d后, 蛋白质含量有所降低, 原因可能是黑豆浸泡导致了部分可溶性蛋白质的流失, 另外发芽之初也需要消耗部分蛋白质。发芽7d后, 蛋白质含量由发芽之初的29.2g/100g增加至40.1g/100g, 增幅达到37.3%。这是由于发芽过程消耗了大量的碳水化合物和脂肪, 从而表现为总氮含量明显增加。

### 2.2 黑豆发芽过程中氨基酸组成的变化

从表1可以看出, 发芽过程中, 黑豆中的必需氨基酸和非必需氨基酸的比例和含量都发生了较大的变化, 发芽3d和7d后黑豆中的必需氨基酸增加比例分别为9.0%和28.0%。非必需氨基酸增加比例分别为12.5%和11.9%。其中, 发芽7d后天冬氨酸含量增加51.6%, 而赖氨酸含量明显下降, 发芽7d后其含量下降62.9%。黑豆中的第一限制性氨基酸蛋氨酸增加超过一倍, 说明与未发芽黑豆相比, 发芽黑豆能明显提高其中的第一限制性氨基酸含量, 从而达到改善黑豆营养价值的目的。

### 2.3 黑豆发芽过程中内源蛋白酶活力的变化

该实验选择发芽温度为35℃, 培养液的pH值选择6.5。从图2可以看出, 发芽6d之前, 发芽黑豆中的内源蛋白酶活力一直在增加, 到发芽6d时, 酶活力达

到最大,为122.65U/ml,黑豆中的蛋白质在高活性的内源蛋白酶作用下发生水解,产生大量的可溶性肽和氨基酸。随后,酶活力开始下降,此时,黑豆中蛋白质的水解速度下降,可溶性蛋白氮含量的上升速度减慢。因此,从水解黑豆蛋白产生更多可溶性氮和改善蛋白质的人体实际利用率角度考虑,黑豆发芽的最佳时间为6d。

表1 黑豆发芽前后氨基酸组成的变化

Table 1 Amino acid compositions of black soybean before and after sprouting

| 项目     | 氨基酸名称        | 发芽前黑豆<br>(mg/100g) | 发芽3d后黑豆<br>(mg/100g) | 发芽7d后黑豆<br>(mg/100g) |
|--------|--------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| 必需氨基酸  | 蛋氨酸          | 368                | 422                  | 789                  |
|        | 亮氨酸          | 2582               | 2824                 | 3248                 |
|        | 异亮氨酸         | 1427               | 1684                 | 1986                 |
|        | 缬氨酸          | 1699               | 1924                 | 2235                 |
|        | 苯丙氨酸         | 1674               | 1889                 | 2308                 |
|        | 色氨酸          | 388                | 568                  | 742                  |
|        | 赖氨酸          | 1977               | 1622                 | 1244                 |
|        | 苏氨酸          | 1361               | 1576                 | 2140                 |
|        | 总含量(mg/100g) | 11476              | 12509                | 14692                |
|        | 谷氨酸          | 6026               | 5988                 | 5666                 |
| 非必需氨基酸 | 甘氨酸          | 1472               | 1499                 | 1424                 |
|        | 酪氨酸          | 1131               | 1397                 | 1382                 |
|        | 丝氨酸          | 1792               | 1867                 | 1858                 |
|        | 天冬氨酸         | 4205               | 5961                 | 6376                 |
|        | 半胱氨酸         | 0                  | 0                    | 0                    |
|        | 组氨酸          | 836                | 956                  | 1046                 |
|        | 精氨酸          | 2658               | 2864                 | 2899                 |
|        | 丙氨酸          | 1382               | 1469                 | 1382                 |
|        | 脯氨酸          | 2598               | 2863                 | 2689                 |
|        | 总含量(mg/100g) | 22100              | 24864                | 24722                |

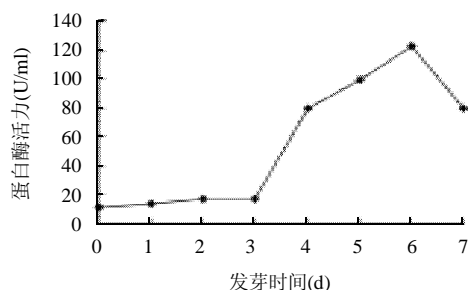


图2 发芽过程中黑豆内源蛋白酶活力随发芽时间的变化

Fig.2 Change of endogenous protease activity during sprouting black soybean

#### 2.4 黑豆发芽过程中蛋白质相对平均分子质量分布的变化

从图3可以看出,发芽前黑豆蛋白质大多分布在68000(B)以上,其中很大一部分相对分子质量大于158000(A),少量分布在 $M_w$  45000(C)和25000(D)之间,而分布在 $M_w$  12500(E)的小分子蛋白质、肽和氨基酸很少。发芽7d后,相对分子质量大于A的蛋白质明显减少,分布于A和B相对分子质量之间的蛋白质也有较大

程度的下降,而分布在D和E之间的小分子质量的蛋白质和肽类明显增加。说明内源蛋白酶在黑豆发芽后活性急剧增强,在短时间内将大分子蛋白质水解为相对分子质量较小的小分子物质,从而使得可溶性蛋白氮的含量增加。

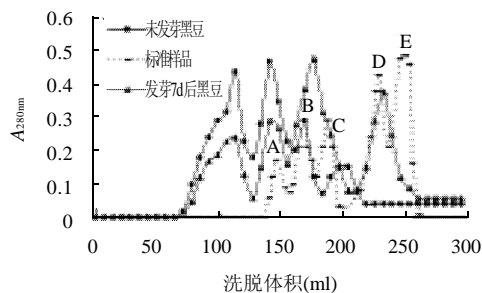


图3 发芽前后黑豆蛋白质相对分子质量分布

Fig.3 Relative molecular mass of protein in black soybean before and after sprouting

#### 2.5 黑豆发芽过程中 $\gamma$ -氨基丁酸含量的变化

由 $\gamma$ -氨基丁酸标样的保留时间为18.78min,即为 $\gamma$ -氨基丁酸。本实验采用混合标样法测定 $\gamma$ -氨基丁酸的含量,采用外标法定量,得到发芽7d后的 $\gamma$ -氨基丁酸的含量为85.4mg/100g。发芽后黑豆的色谱图(图5)与图4基本相同,但 $\gamma$ -氨基丁酸的含量几乎为零。可见发芽能够显著提高 $\gamma$ -氨基丁酸的含量,从而赋予发芽黑豆以新的生理功能。

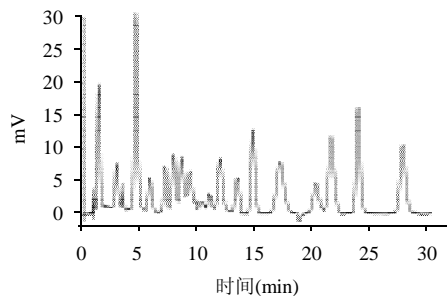


图4 发芽前黑豆样品色谱图

Fig.4 Chromatogram of black soybean sample before sprouting

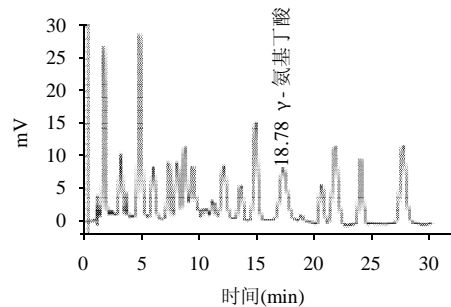


图5 发芽7d后黑豆样品色谱图

Fig.5 Chromatogram of black soybean sample after sprouting for 7 days

$\gamma$ -氨基丁酸具有改善脑机能、调整血压、镇静神经, 促进长期记忆、促进生长激素分泌、调节肾功能以及肝功能等多种生理功能, 是一种新型食品活性因子, 并具有很好的医药应用前景。

## 2.6 黑豆发芽条件的优化

在单因素试验的基础上确定对黑豆发芽的4个主要因素, 以 $\gamma$ -氨基丁酸和内源性蛋白酶活力为指标, 正交试验因素水平表如表2所示, 结果如表3所示。

表2 因素水平表

Table 2 Factors and levels in the orthogonal array design for optimizing sprouting conditions of black soybean

| 水平 | 因素        |           |           |           |
|----|-----------|-----------|-----------|-----------|
|    | A 浸泡温度(℃) | B 浸泡时间(h) | C 发芽温度(℃) | D 发芽时间(d) |
| 1  | 35        | 3         | 22        | 4         |
| 2  | 38        | 5         | 25        | 6         |
| 3  | 41        | 7         | 28        | 8         |

表3 正交试验结果

Table 3 Arrangement and results of the orthogonal array design for optimizing sprouting conditions of black soybean

| 试验号      | A      | B     | C      | D      | $\gamma$ -氨基丁酸<br>含量(mg/100g) | 内源蛋白酶<br>活力(U/ml) |
|----------|--------|-------|--------|--------|-------------------------------|-------------------|
| 1        | 1      | 1     | 1      | 1      | 42.5                          | 63.92             |
| 2        | 1      | 2     | 2      | 2      | 79.8                          | 109.72            |
| 3        | 1      | 3     | 3      | 3      | 69.7                          | 84.44             |
| 4        | 2      | 1     | 2      | 3      | 63.3                          | 94.83             |
| 5        | 2      | 2     | 3      | 1      | 88.2                          | 102.25            |
| 6        | 2      | 3     | 1      | 2      | 79.9                          | 104.32            |
| 7        | 3      | 1     | 3      | 2      | 89.9                          | 129.33            |
| 8        | 3      | 2     | 1      | 3      | 64.3                          | 80.83             |
| 9        | 3      | 3     | 2      | 1      | 55.8                          | 78.66             |
| $K_{11}$ | 64.00  | 65.23 | 62.23  | 62.17  |                               |                   |
| $K_{12}$ | 77.13  | 77.43 | 66.30  | 83.20  |                               |                   |
| $K_{13}$ | 70.00  | 68.47 | 82.60  | 65.77  |                               |                   |
| $K_{21}$ | 86.03  | 96.03 | 83.02  | 81.61  |                               |                   |
| $K_{22}$ | 100.47 | 97.60 | 94.40  | 114.46 |                               |                   |
| $K_{23}$ | 96.27  | 89.14 | 105.34 | 86.70  |                               |                   |
| $R_1$    | 13.13  | 12.20 | 20.37  | 21.03  |                               |                   |
| $R_2$    | 14.44  | 8.46  | 22.32  | 32.85  |                               |                   |

注:  $R_1$  为以 $\gamma$ -氨基丁酸含量为指标;  $R_2$  为以内源蛋白酶活力为指标。

从表3可以看出, 影响黑豆发芽过程中 $\gamma$ -氨基丁酸含量和内源蛋白酶活力的因素的主次关系是一致的, 均为 $D > C > A > B$ 。

发芽时间影响最为显著, 合适的发芽时间有利于谷氨酸在谷氨酸脱羧酶的作用下形成 $\gamma$ -氨基丁酸, 但是时间的延长会导致 $\gamma$ -氨基丁酸在丙酮酸转氨酶的作用下消耗而形成琥珀酸半醛。合适的发芽时间会使内源酶活性大增, 但是时间继续延长会使酶活力增加速度减缓甚

至由于环境原因而导致下降。

发芽温度影响程度次之, 合适的温度有利于酶活性的增加, 也能更多的提供 $\gamma$ -氨基丁酸的生物合成原料谷氨酸。

浸泡温度和浸泡时间对指标的影响程度虽然最低, 但较高的 $R$ 值说明两者对指标依然有较大影响。原因可能是黑豆吸水后, 胚内干物质由凝胶状态转变为溶胶状态, 使得胚乳中的干物质转化为可溶性物质, 导致黑豆的生命活动旺盛, 物质代谢速率加快, 谷氨酸脱羧酶和蛋白酶的活性也增强, 有利于谷氨酸脱羧酶生成。但浸泡温度过高, 浸泡时间过长会使得黑豆中可溶性蛋白质流失, 导致谷氨酸脱羧酶底物的浓度降低, 从而使得 $\gamma$ -氨基丁酸含量下降。温度过高和浸泡时间过长也会使得内源蛋白酶活力由于环境因素而下降。综上所述及由表3极差 $R$ 分析可知, 最佳发芽条件是 $A_2B_2C_3D_2$ 。即浸泡温度为38℃, 浸泡时间为5h, 发芽温度为28℃, 发芽时间为6h。在最优条件下的验证实验结果为,  $\gamma$ -氨基丁酸含量为94.4mg/100g, 内源蛋白酶活力为134.68U/ml。

## 3 结论

黑豆发芽过程中, 蛋白质含量明显增加, 必需氨基酸和非必需氨基酸比例和含量变化显著; 内源蛋白酶活力呈先显著增加后下降的趋势; 蛋白质平均相对分子质量显著下降;  $\gamma$ -氨基丁酸的含量急剧增加; 以 $\gamma$ -氨基丁酸含量和内源蛋白酶活力为指标优化黑豆发芽过程。最佳发芽条件为: 浸泡温度38℃, 浸泡时间5h, 发芽温度28℃, 发芽时间6d, 该条件下 $\gamma$ -氨基丁酸含量为94.4mg/100g, 内源蛋白酶活力为134.68U/ml。

## 参考文献:

- [1] TAKAJASHI R, OHMORI R, KIYOSE C, et al. Antioxidant activities of black and yellow soybeans against low density lipoprotein oxidation [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(11): 4578-4582.
- [2] MARCHLAND S, MARCHLAND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biochem, 1974, 47(3): 469-474.
- [3] LIAO H F, CHOU C J, WU S H, et al. Isolation and characterization of an active compound from black soybean and its effect on proliferation and differentiation of human leukemic U937 cells[J]. Anticancer Drugs, 2001, 12(10): 841-846.
- [4] 靳敏, 夏玉宇. 食品检验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003.
- [5] 杨柳, 叶蕴华, 袁洪生, 等. 人参中 $\gamma$ -氨基丁酸的分离、鉴定及氨基酸的定量分析[J]. 科学通报, 1991(7): 513-515.
- [6] TAKAYO S, TOSHIROH H, YUTATA M. Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12): 2291-2292.
- [7] 杉下朋子. コメ胚芽由来 GABA 素材の開発[J]. 食品と開発, 2001, 36(6): 35-37.
- [8] 翟玮玮. 发芽黑豆及异黄酮提取物特性研究[J]. 食品科学, 2008, 29(9): 186-189.