

胰蛋白酶水解富集米胚芽中 γ -氨基丁酸的研究

张 晖, 姚惠源

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘 要: 研究了胰蛋白酶水解米胚芽蛋白富集 γ -氨基丁酸(GABA)的工艺, 通过单因素实验和正交实验等确定了最佳的米胚芽水解并富集 GABA 的工艺条件, 即料水比为 1/14, 温度为 40℃, 加酶量为 4080U/100g 米胚芽, 反应 7h 后, 加入 1.5g/100ml 的米胚芽, 40℃继续反应 6h, GABA 产量可达 2.26g/100g, 比未富集前的 0.028g/100g 提高了 80 倍。

关键词: 大米胚芽; 氨基丁酸; 胰蛋白酶; 富集

Study on Accumulation of γ -Aminobutyric Acid in Rice Germ by Hydrolysis of Trypsinase

ZHANG Hui, YAO Hui-yuan

(College of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The accumulation condition of γ -aminobutyric acid in rice germ by hydrolysis of trypsinase were studied. The optimum conditions were: temperature 45℃, pH8.0, and the ratio of rice germ to water 1/14. After 7h of hydrolyzing, 1.5g/100ml of rice germ were added to the solution and reacted continually for 6h. The content of γ -GABA in rice germ could reach as high as 2.26g/100g from the original 0.028g/100g.

Key words: γ -aminobutyric acid; rice germ; trypsinase; accumulation

中图分类号: O629.71

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)02-0127-04

γ -氨基丁酸(GABA)是广泛分布于动植物中的一种非蛋白质氨基酸, 由谷氨酸(Glu)经谷氨酸脱羧酶催化转化而来, 是存在哺乳动物脑、脊髓中的抑制性神经传递物质。从 1963 年 H C Stanton^[1]发现 γ -氨基丁酸(GABA)能够降低狗、兔、猪及猫的血压开始, GABA 越来越多的生理功能被发现, 并逐渐应用在健康食品中。如经厌氧处理后富含 GABA 的绿茶(Gabaron 茶), 可使自发性高血压大鼠维持正常的血压^[2], 在日本, GABA-富集茶已作为高血压患者食品而商品化。T Saikusa^[3]在改善稻米食用品质的试验中首先发现, 稻米粒用水浸泡后, 游离氨基酸的组成和含量发生了显著的变化, 其中 GABA 的变化最突出, 出现了大幅度提高, 而且 GABA 的变化主要是在胚芽部分发生的, 这是由于米胚芽蛋白中谷氨酸含量丰富, 在内源性的蛋白酶和谷氨酸脱羧酶的作用下, 可产生 GABA, 因此米胚芽是 GABA 良好的来源。1994 年, 日本农林水产省中国农业试验场开发成功富含 GABA 的米胚芽^[4], 动物实验表

明富含 GABA 的米胚芽具有降血压、改善肝、肾功能、促进乙醇代谢等功效^[5]。

关于米胚芽用水浸泡富集 GABA 的工艺已有报道, 但是这种富集方法米胚芽中谷氨酸的利用率(仅为 17% 左右)很有限, 而且富集后米胚芽中的 GABA 含量也不高。利用蛋白酶水解米胚芽蛋白可以获得更多的谷氨酸来转化为 GABA, 提高米胚芽中谷氨酸的利用率和米胚芽中的 GABA 含量, 本文即在这方面进行了研究。

1 材料与方法

1.1 实验材料

大米胚芽(纯度 66%) 上海粮食储运公司提供; 胰蛋白酶 无锡酶制剂厂; 碱性蛋白酶 无锡酶制剂厂; 835 型氨基酸自动分析仪 日立公司; PSHZ-300 多用途恒温水浴振荡器 江苏太仓市实验设备厂; 离心沉淀机 上海医用分析仪器厂。

1.2 实验方法

收稿日期: 2004-01-08

作者简介: 张晖(1966-), 女, 副教授, 博士, 研究方向为谷物资源开发利用和谷物深加工。

1.2.1 γ -氨基丁酸和谷氨酸等氨基酸的测定

采用氨基酸自动分析仪测定。

1.2.2 游离氨基酸测定 茚三酮比色法^[6]。1.2.3 蛋白质含量测定 凯氏定氮法^[6]。

1.2.4 总固形物测定

取液体样品 10ml 于恒重的铝盒内, 105℃ 烘箱烘至恒重称重, 计算总固形物含量。

1.2.5 总糖的测定 苯酚-硫酸法^[6]。

1.2.6 蛋白酶水解米胚蛋白的研究

由于米胚芽中内源性蛋白酶对蛋白质水解有限, 产生的游离谷氨酸不多, 因此 GABA 富集量有限。通过添加外源性蛋白酶水解米胚蛋白, 可以得到更多的谷氨酸转化为 GABA。蛋白酶中胰蛋白酶、碱性蛋白酶是内切酶, 可以将蛋白质较多地水解成游离氨基酸, 因此选择胰蛋白酶、碱性蛋白酶作为外源性蛋白酶用于米胚芽中 GABA 地富集。具体方法是在米胚芽溶液中加入胰蛋白酶、碱性蛋白酶, 在一定温度下水解数小时, 测定其中的游离谷氨酸和 GABA 的含量。

1.2.7 米胚蛋白水解液富集 GABA 的研究

在米胚蛋白水解液中加入一定量的米胚芽, 调节 pH5.6, 在 40℃ 反应数小时, 过滤后测定 GABA 含量。

2 结果与讨论

2.1 米胚芽蛋白氨基酸组成

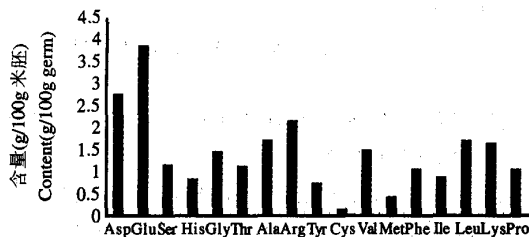


图1 米胚芽蛋白的氨基酸组成

Fig.1 Amino acids composition of rice germ protein

通过对米胚芽蛋白的氨基酸分析, 从图1可以看出, 米胚芽蛋白的氨基酸组成中谷氨酸含量非常高, 很适合用来制备 GABA。

2.2 胰蛋白酶和碱性蛋白酶对米胚蛋白的水解

由图2和3可以看出胰蛋白酶和碱性蛋白酶水解米胚芽蛋白过程中, 伴随着谷氨酸的产生, 都会有一定量的 GABA 生成, 但由于反应条件是蛋白酶的最适条件, 而不是米胚谷氨酸脱羧酶生成 GABA 的最佳条件, 因此生成的 GABA 有限。相比较而言, 胰蛋白酶对米胚芽蛋白的水解能力要比碱性蛋白酶强得多, 这是由于

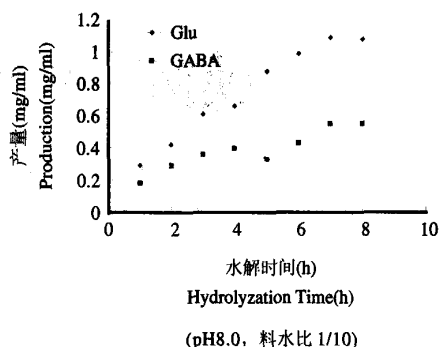


图2 胰蛋白酶水解米胚芽蛋白产 GABA 和 Glu 量

Fig.2 GABA and Glu production during hydrolyzing by trypsin

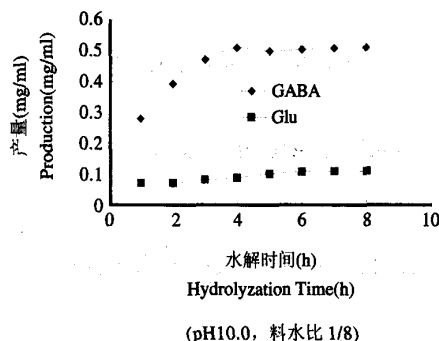


图3 碱性蛋白酶水解米胚芽蛋白产 GABA 和 Glu 量

Fig.3 GABA and Glu production during hydrolyzing by alkaline proteinase

米胚芽蛋白中的精氨酸含量较高(见图2), 而胰蛋白酶是专一性水解以精氨酸连接的肽键, 因此可以水解较多的肽键, 产生的谷氨酸较多, 而且在蛋白质水解过程中, 米胚芽中的谷氨酸脱羧酶已将部分谷氨酸转化为 GABA。因此胰蛋白酶是米胚芽富集 GABA 较合适的蛋白酶。但是在米胚蛋白水解过程中, 米胚谷氨酸脱羧酶会因为胰蛋白酶的水解作用而被破坏, 米胚蛋白水解只起到提供谷氨酸的目的, 要转化为 GABA 还需要进一步提供米胚谷氨酸脱羧酶的活性。

2.3 胰蛋白酶水解米胚蛋白工艺的优化

通过对水解工艺的温度、时间、加酶量和料水比等工艺参数的单因素实验, 进一步采用正交实验确定水解的最佳工艺参数。正交实验的因素和水平以及实验结果见表1和图4。

由图4可见, 胰蛋白酶水解产生谷氨酸的最佳工艺是 A₁B₂C₂D₂, 即料水比为 1/14, 温度为 40℃, 时间为 7h, 加酶量为 4080U/100g 米胚芽。各因素影响谷氨酸产量的主次是: 料水比 > 温度 > 加酶量 > 时间。

在此最佳工艺条件下, 米胚蛋白水解液中谷氨酸的产量可达 2.35mg/ml, 谷氨酸的水解率(水解后游离谷氨

表1 胰蛋白酶水解米胚蛋白工艺正交实验
Table 1 Orthogonal tests of hydrolyzation by trypsin

编号 No.	温度 Temperature (℃)	料水比 Ratio	时间 Time (h)	加酶量 Amounts of enzyme (U/100g米胚)	Glu 产量 Glu production (mg/ml)
1	40	1/12	6	3400	1.568
2	40	1/14	7	4080	2.007
3	40	1/16	8	4760	1.798
4	45	1/14	6	4760	1.757
5	45	1/16	7	3400	1.667
6	45	1/12	8	4080	1.707
7	50	1/16	6	4080	1.551
8	50	1/12	7	4760	1.574
9	50	1/14	8	3400	1.689
k ₁	1.791	1.616	1.625	1.641	
k ₂	1.710	1.818	1.749	1.755	
k ₃	1.605	1.672	1.731	1.710	
R	0.186	0.202	0.106	0.114	

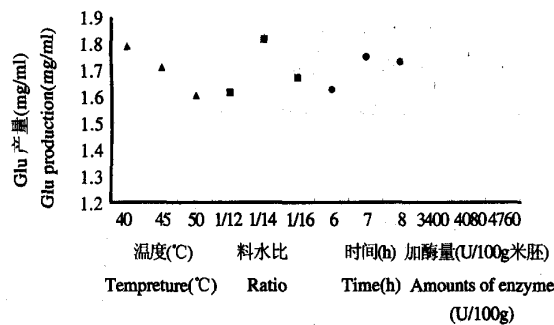


图4 正交实验直观分析图
Fig.4 Results of orthogonal tests

酸占原料谷氨酸的百分数)达到85%,为富集GABA提供了更多的谷氨酸,也大大提高了原料的利用率。

2.4 米胚蛋白的水解液制备GABA的工艺

为了确定水解液制备GABA的工艺,首先考察了米胚蛋白水解过程中的pH变化,结果如图5所示。

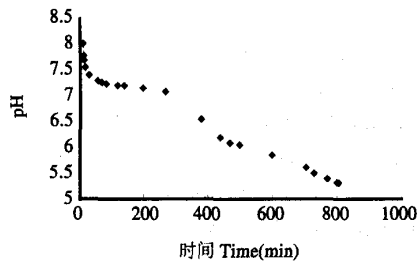


图5 胰蛋白酶水解米胚芽过程中pH的变化
Fig.5 The change of pH during hydrolyzing by trypsin

由图5可见,胰蛋白酶水解米胚芽过程中pH逐步下降,由胰蛋白酶的最适反应pH值8.0最终降至5.6左右,正好适合米胚谷氨酸脱羧酶的作用^[4]。因此取最佳米胚蛋白水解条件下获得的水解液,于80℃,15min灭酶活,冷却后,加入一定量的米胚芽,于40℃反应6h,利用未经蛋白酶水解的米胚芽中含有的谷氨酸脱羧酶分解谷氨酸为GABA。

2.5 不同米胚芽加入量对GABA产量的影响

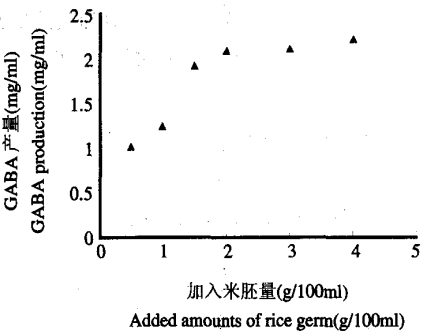


图6 不同米胚芽加入量对GABA产量的影响
Fig.6 Effect of rice germ quantity on GABA production

由图6可见,水解液中米胚芽加入量越多,产GABA越高,这是因为一方面,米胚GAD将水解液中的谷氨酸转化为GABA;另一方面新加入的米胚芽自身的也在内源酶的作用下产生GABA。但是当米胚加入量达到1.5g/100ml时,GABA产量的上升趋于平缓,胰蛋白酶水解产生的谷氨酸大部分转化为了GABA,为了获得较高的单位米胚芽GABA的产量,选择米胚加入量1.5g/100ml。

2.6 胰蛋白酶水解米胚芽富集GABA液的组成成分

表2 胰蛋白酶水解米胚芽富集GABA液的成分
Table 2 Component of hydrolyzing supernate enriched with GABA

成分 Component	含量(g/100ml) Content
GABA	0.191
固形物	8.041
蛋白质	0.115
游离氨基酸	1.306
总糖	6.341

由图7可见,在胰蛋白酶水解米胚蛋白富集GABA的最佳条件下,加入1.5g/100ml的米胚芽,40℃继续反应6h,GABA产量可达1.9mg/ml,相当于2.26g/100g米胚芽,比内源性酶富集GABA提高了3.7倍,米胚谷氨酸的利用率为41%,比内源性酶富集GABA提高了2倍。因此利用外加胰蛋白酶水解米胚蛋白富集GABA,既保持了整个工艺的天然安全性,而且提高了原料的利用率;还大幅度地提高GABA的产量和浓度,使之更加

长根菇液体深层发酵条件的研究

邹祥, 胡昌华*

(西南师范大学生命科学学院, 重庆 400715)

摘要: 研究了各种营养因子对长根菇深层发酵的影响, 确定了合适的碳源、氮源、C/N 比、无机盐、生长因子的浓度, 在初始 pH5.5、250ml 摇瓶装液量 50ml、接种量 10%、温度 26℃ 的培养条件下, 长根菇深层发酵结果最佳, 在此基础上进行摇瓶发酵曲线测定, 确定了长根菇适宜发酵周期为 96h, 发酵液胞外多糖最高可达 2.85g/L。

关键词: 长根菇; 深层发酵; 胞外多糖

Studies on Submerged Fermentation Conditions of *Oudemanciella radicata*

ZOU Xiang, HU Chang-hua*

(School of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The nutrient factors of *Oudemanciella radicata* were studied in the submerged fermentation. It showed that the suitable of single factors were chosen as: carbon source, nitrogen source, C/N ratio, growth factors and inorganic salts. The optimum conditions of fermentations were as follows: initial pH5.5, temperature 26℃, the cultivations performed in 250ml shake

收稿日期: 2003-12-18

* 通讯作者

作者简介: 邹祥(1976-), 男, 硕士, 主要从事微生物制药和保健食品的研究和教学工作。

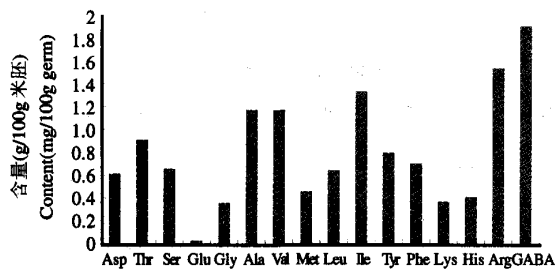


图7 胰蛋白酶富集 GABA 液的氨基酸组成

Fig.7 Amino acids composition of hydrolyzing supernate enriched with GABA

适合于富含 GABA 米胚芽健康食品的制备。

3 结论

米胚芽是富集 GABA 的理想原料, 通过胰蛋白酶水解米胚蛋白富集 GABA, 米胚芽中的 GABA 可提高 80 倍, 这种富含 GABA 的米胚芽可作为具有调节血压、改善肝肾功能及促进乙醇代谢等功能的保健食品配料。有

关富含 GABA 的米胚芽的功能性, 笔者正在做进一步的研究。

参考文献:

- [1] H C Stanton. Mode of Action of Gamma aminobutyric acid or the cardiovascular system[J]. Arch Int Pharmacodyn, 1963, 143: 195-204.
- [2] M Ohmori, et al. Effect of Anaerobically Treated Tea (Gaboron tea) on blood pressure of spontaneously hypertensive rats[J]. Nippon Noyeikagaku Kaishi, 1987, 61: 1449-1451.
- [3] T Saikusa. Distribution of free amino acid in the rice kernal and kernal fraction and the effect of water soaking on the distribution[J]. J Agric Food Chem, 1994, 42: 1122-1125.
- [4] T Saikusa. Accumulation of Gamma aminobutyric acid (GABA) in the rice germ during water soaking[J]. Biosci Biotech Biochem, 1994, 58(12): 2291-2292.
- [5] 冈田忠司. Physiological function of rice germ enriched with GABA[J]. 食品与开发(日刊), 2001, 36(6): 7-8.
- [6] 宁正祥. 食品成分分析手册[M]. 中国轻工业出版社, 2001.