

低温胁迫对糙米发芽及 γ -氨基丁酸含量的影响

马 丽^{1,2},唐 坚²,王梦晗^{1,2},王凯晨²,乔勇进^{2,*},钟敏增³

(1.上海理工大学医疗器械与食品学院,上海 200093;

2.上海市农业科学院农产品保鲜加工研究中心,上海 201403;

3.上海塞翁福农业发展有限公司,上海 201403)

摘 要:为了解低温胁迫对糙米发芽率及发芽糙米中GABA含量的影响,选择优质“长粒香”糙米为实验材料,以不同低温胁迫温度、胁迫时间和发芽时间为影响因素,以发芽率及GABA含量为指标进行研究,并利用正交设计优化糙米发芽工艺。实验表明,低温胁迫能够促进发芽糙米中GABA的积累,其最佳工艺条件为:胁迫温度0℃,胁迫时间2h,发芽时间30h。该条件下制得的发芽糙米中GABA含量为35.16mg/100g,是原料糙米的2.58倍,是对照组发芽糙米的1.19倍。
关键词:低温胁迫,发芽糙米,发芽率, γ -氨基丁酸

Effect of low temperature stress on germination and content of GABA in germinated brown rice

MA Li^{1,2},TANG Jian²,WANG Meng-han^{1,2},WANG Kai-chen²,QIAO Yong-jin^{2,*},ZHONG Min-zeng³

(1.Department of Medical Instrument and Food Engineering, University of Shanghai for Science and Technology,
Shanghai 200093, China;

2.Agricultural Products Storage and Processing Research Center, Shanghai Academy of Agriculture Science,
Shanghai 201403, China;

3.Shanghai SaiWengFu Agricultural Development Co., Ltd., Shanghai 201403, China)

Abstract: Effects of low temperature stress on germinating rates of brown rice and the content of GABA in germinated brown rice was studied in this paper, with “Long grain fragrant” brown rice as material, different stress temperature, stress time, and germinating time as factors, germinating rates and the content of GABA as indicators. The processing technological parameter of the germination of brown rice was optimized by using orthogonal design. The results showed that GABA in germinated brown rice could be accumulated by low temperature stress, and the optimum formulation was stress temperature 0℃, stress time 2h, germinating time 30h. Under the condition, the content of GABA in germinated brown rice could reach to 35.16mg/100g, it was 2.58 times than brown rice, and 1.19 times than control germinated brown rice.

Key words: low temperature stress; germinated brown rice; germinating rates; GABA

中图分类号: TS210.1

文献标识码: B

文章编号: 1002-0306(2015)04-0278-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.04.052

发芽糙米是将糙米培养发芽后所得到的由幼芽和带糠层胚乳组成的糙米制品。作为一种新型功能性食品资源,糙米发芽后不仅解决了口感欠佳的问题,而且营养价值大幅提升^[1]。与普通糙米及精米相比,发芽糙米除含有丰富的维生素、膳食纤维和矿物质元素外,还含有以 γ -氨基丁酸(GABA)为代表的多种功能性成分。GABA是一种天然存在的非蛋白质氨基酸,具有活化脑血流、增强脑细胞代谢、降血压、抗

惊厥等功效,能改善肝肾功能、缓解动脉硬化、预防慢性酒精中毒,并对失眠、更年期障碍和老年期精神障碍有改善作用^[2-3]。

由于GABA具有多种生理、药理与保健功能,发芽糙米一经推出便引发了人们的极大关注。在日本,发芽糙米已进入产业化、商品化阶段,目前有多家公司进行生产和销售;在我国,虽然处于研究的起步阶段,但近十多年却对发芽糙米及相关制品的研究十

收稿日期:2014-07-15

作者简介:马丽(1988-),女,硕士研究生,研究方向:农产品加工与保鲜。

*通讯作者:乔勇进(1967-),男,博士,研究员,研究方向:农产品贮藏与加工。

基金项目:上海市科委国际合作项目(1073907003)。

分重视^[4]。如胡秀娟^[5]、韩涛等^[6]用响应面法对糙米发芽工艺进行了优化;王琛^[7]研究了浸泡液pH对发芽糙米中GABA含量的影响;邓宇^[8]、蒋静等^[9]通过添加Ca²⁺、磷酸吡哆醛、谷氨酸钠等外源物质来实现GABA的积累;张强^[10]则利用通气处理的方法提高了发芽糙米中GABA的含量,这些研究都对提高发芽糙米中GABA的含量具有积极意义。除上述方法外,研究表明^[11],干旱、低温胁迫、机械刺激、低氧等逆境条件均可引起植物体中GABA的积累,但目前利用逆境胁迫增加发芽糙米中GABA的研究却并不多,而通过低温处理来增加发芽糙米中GABA的研究更是鲜有报道。本实验以“长粒香”糙米为原料,通过低温胁迫后浸泡发芽,研究低温胁迫对发芽糙米中GABA含量的影响,为发芽糙米中GABA的积累提供相应的理论基础与应用依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

糙米 长粒香,上海塞翁福农业发展有限公司提供;GABA标品 含量≥98.0%,国药集团化学试剂有限公司;苯酚、次氯酸钠溶液(有效氯5.6%)、硼砂、硼酸、无水乙醇等 均为国产分析纯。

FORMA-725超低温冰箱 美国Thermo Fisher Scientific公司;KK29E-18T1型冰箱 德国SIEMENS公司;BC/BD-220GSA冷藏冷冻转换柜 青岛海尔特种电冰箱有限公司;HWS24型恒温水浴锅 上海益恒实验仪器有限公司;LHS-80HC恒温恒湿培养箱 上海捷呈实验仪器有限公司;BP301S型电子天平 德国赛多利斯公司;ZHWY-2102C双层恒温摇床 上海智成分析仪器制造有限公司;TDZ4-WS台式离心机 湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;DHG-9240A电热恒温鼓风干燥箱 上海益恒实验仪器有限公司;Ultrospec 3300 pro紫外分光光度计 美国安玛西亚公司。

1.2 实验方法

1.2.1 发芽糙米的制备 将原料“长粒香”糙米进行筛选,剔除不完整粒、无胚粒等不合格籽粒及杂质后,自来水清洗3次,除去麸皮、糠粉等,于1% NaClO溶液中浸泡10min消毒后,用蒸馏水清洗四次,沥干表面水分,平铺于塑料盘中置于不同温度下进行低温胁迫,处理后糙米转移至烧杯中,加入2倍体积蒸馏水于30℃下恒温浸泡8h;浸泡后的糙米均匀平铺在垫有4层湿纱布的培养皿中,并盖上湿纱布,放于30℃恒温恒湿培养箱中进行发芽培养。发芽结束后取样计算发芽率,50℃热风干燥1.5h,待发芽糙米冷却至室温后置于密封袋中4℃冰箱存放备用。

对照组糙米无需进行低温胁迫,清洗后直接浸泡、发芽,发芽时间与正交实验后得出的最佳发芽时间相同。

1.2.2 低温胁迫温度对糙米发芽及GABA含量影响实验 洗净沥干的原料糙米分别置于10、0、-5、-20、-70℃下处理2h后,30℃条件下浸泡8h、发芽24h后测定发芽率及GABA含量,并根据测定结果选择适当温度展开进一步研究。每个处理组3个平行。

1.2.3 低温胁迫时间对糙米发芽及GABA含量影响实验 将洗净沥干的原料糙米置于-5℃下低温胁迫0.5、1、2、4、6、8、10、12、24h,30℃条件下浸泡8h、发芽24h后测定发芽率及GABA含量,每个处理组3个平行。

1.2.4 发芽时间对糙米发芽及GABA含量影响实验 将洗净沥干的原料糙米置于-5℃下低温胁迫2h,30℃下浸泡8h后于30℃下培养发芽,分别于发芽12、18、24、30、36、42、48h时测定GABA含量,每个处理组3个平行。

1.2.5 低温胁迫积累GABA工艺条件优化实验 以糙米发芽率和发芽糙米中GABA含量为指标,根据单因素实验结果确定胁迫温度、胁迫时间及发芽时间等三因素水平,设计L₉(3⁴)正交实验。由于所选因素水平均能使糙米发芽率维持在90%以上,所以正交实验以GABA含量为指标,对其工艺条件进行优化,具体因素水平见表1。

表1 糙米发芽正交实验因素与水平L₉(3⁴)

Table 1 Orthogonal test factors and levels of brown rice sprout L₉(3⁴)

水平	因素		
	A 胁迫温度(℃)	B 胁迫时间(h)	C 发芽时间(h)
1	-5	2	24
2	0	3	30
3	5	4	36

1.2.6 发芽率测定 每组随机取100~150粒糙米,统计发芽粒数及总粒数,计算发芽粒数占总粒数的百分率,即为发芽率。每个处理组3个平行。

1.2.7 GABA含量测定 GABA含量以发芽糙米干基计。测定方法参考陈恩成^[12]和许建军^[13]的方法并加以改进,将发芽糙米样品粉碎后取1.0g于带盖离心管中,加5mL体积分数60%的乙醇溶液于摇床上振荡浸提2h,4000r/min离心10min后取上清液0.5mL,加入0.2mmol/L pH9.0的硼酸缓冲液0.2mL,质量分数为6%的苯酚溶液1mL,有效氯含量为5.6%的NaClO溶液0.2mL,充分振荡,沸水浴10min,再立即冰水浴20min并不断振荡,待溶液出现蓝绿色后,加体积分数60%的乙醇溶液2mL,再次振荡均匀,静置后于645nm处测定吸光度值。

2 结果与分析

2.1 GABA标准曲线

分别配制浓度为0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5mg/mL的GABA标准溶液,按照1.2.7的方法测定吸光度值。以标准溶液浓度为横坐标(x),单位mg/mL,吸光度值为纵坐标(y),绘制标准曲线,得回归方程为 $y=3.7652x+0.0209$, $R^2=0.9997$ 。

2.2 低温胁迫因素对糙米发芽及GABA含量的影响

2.2.1 低温胁迫温度对糙米发芽及GABA含量的影响 选择10、0、-5、-20、-70℃为胁迫温度进行研究发现,-5℃处理下糙米发芽率良好,而-20℃时发芽率明显下降,0℃时GABA含量高于10℃,于是增加5、-10、-15℃展开进一步研究。所有温度下糙米发芽率及GABA含量如图1所示。从图1中能够看出,胁迫温

度为 -5°C 以上时,糙米发芽率均在92%以上,且无显著性差异($p>0.05$), -10°C 时发芽率为87.35%,而 -15°C 、 -20°C 、 -70°C 时发芽率下降明显,分别为47.44%、29.03%和19.21%,这可能是糙米细胞被过低温度破坏造成的。 0°C 和 -5°C 处理组GABA含量高于其他处理组,分别为28.56、27.68mg/100g。 5°C 时GABA含量虽与 -10°C 无显著性差异($p>0.05$),但发芽率高于 -10°C ,因此正交实验选择 -5 、 0 、 5°C 三个水平进行优化。

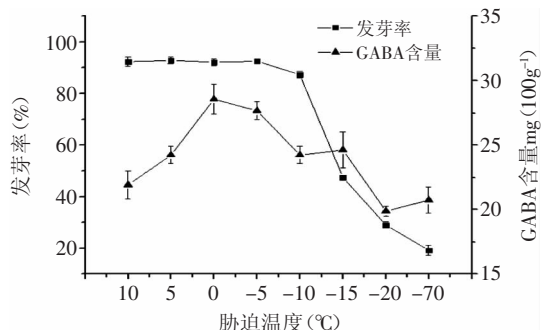


图1 胁迫温度对糙米发芽率和GABA含量的影响

Fig.1 Effect of stress temperature on germinating rates and the content of GABA

Wallace W等^[14]的研究表明,低温胁迫可以通过改变植物细胞内的隔室化来实现GABA的积累,因此细胞区域化作用是调节GABA积累的一种潜在机制。低温对植物细胞内部结构造成了破坏,细胞质pH降低,催化GABA合成的谷氨酸脱羧酶(GAD)被激活,有利于谷氨酸脱羧生成GABA,同时催化其转氨降解的酶活性受到抑制,GABA转氨作用减弱,使GABA得以大量积累。低温还可使植物细胞质中 Ca^{2+} 浓度上升, Ca^{2+} 增多有利于形成有活性的 Ca^{2+} 与CaM复合体,而 Ca^{2+} 与CaM复合体同样能够激活GAD^[15],提高其活性,进而诱导GABA的产生与积累。实验中 0°C 、 -5°C 胁迫条件下发芽糙米中GABA含量显著高于其他处理组的原因可能是由于胁迫温度较高时,糙米对外界逆境环境反应不强,GAD激活不彻底,导致其在发芽过程中对GABA积累的诱导效果不理想;而过低的胁迫温度又对糙米内部组织结构造成了严重破坏,进而使得GABA积累效果不佳。而 -10°C 以下低温处理时,糙米发芽率严重下降,这可能是由于过低温度破坏了糙米细胞结构导致的。

2.2.2 低温胁迫时间对糙米发芽及GABA含量影响

相同胁迫温度下,不同胁迫时间对糙米发芽率及发芽糙米GABA含量的影响如图2所示。从图2可得,胁迫时间在4h以内时,糙米发芽率均高于92%,但处理6h时发芽率降为87.14%,并随着处理时间的延长而不断降低,至24h仅为75.97%,这可能是由于长时间的低温状态抑制了糙米的发芽活力。低温胁迫2h和4h时,发芽糙米中GABA含量较其他处理组高,分别为27.68、27.02mg/100g,而胁迫时间过短或过长,GABA含量均低于2~4h时。引起这种差异的可能是因为相同的胁迫温度下,处理时间较短,GAD激活不彻底,致使糙米浸泡发芽过程中GABA生成效果不

佳,含量较低;处理时间过长,糙米长期处在逆境之中,自身需要大量合成GABA以抵抗逆境环境,这些GABA氧化降解形成琥珀酸,为TCA循环提供所需碳源,使逆境环境下TCA循环得以顺利进行^[16]。该过程造成了GABA及其合成原料的消耗,使得以该糙米为原料制备的发芽糙米中GABA含量与其他处理组相比有所下降。综合发芽率和GABA含量两项指标,选择2、3、4h为正交实验中胁迫时间的因素水平。

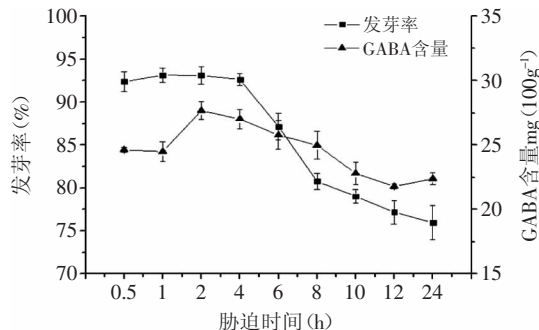


图2 胁迫时间对糙米发芽率和GABA含量的影响

Fig.2 Effect of stress time on germinating rates and the content of GABA

2.2.3 发芽时间对糙米发芽及GABA含量影响 将 -5°C 胁迫2h的原料糙米置于 30°C 下浸泡8h并于 30°C 进行发芽,自12h起每隔6h取样测定其发芽率及GABA含量,结果如图3所示。由图3可得,发芽12h时,糙米发芽率已可达90%以上,随着发芽时间的延长,发芽率虽然逐渐上升,但发芽24h后上升并不明显($p>0.05$),至48h时仅增长1.31%,因此发芽时间在12h以上即可。而发芽糙米中GABA含量呈30h前不断上升,30~36h降低,36h后再逐渐上升的变化规律,对此,郑向华等^[17]也得到了类似的变化规律。对于第一阶段的增长,可能是糙米发芽过程中GABA不断合成积累的结果;但随着发芽时间的延长,谷氨酸脱羧酶活力逐渐下降,用于合成GABA的底物不断减少,30h后,GABA合成率低于降解率,总含量开始降低;而36h后,发芽糙米中的一些物质成分开始分泌出来,随着分泌量的逐渐增多,GABA在发芽糙米中的相对含量不断增加,因此测得发芽36h后GABA含量再次增加。但实验中发现,36h后,随着发芽时间的延长,发芽糙

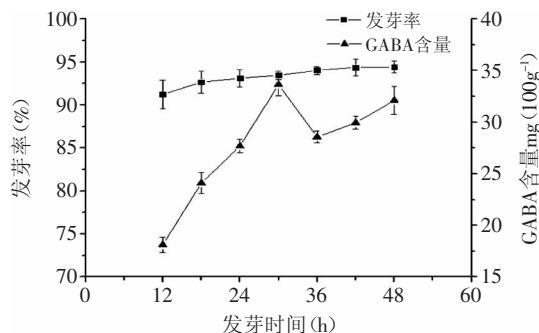


图3 发芽时间对糙米发芽率和GABA含量的影响

Fig.3 Effect of germinating time on germinating rates and the content of GABA

米不仅芽长不断增长,米身也开始出现起泡、变黄、发粘等现象,并伴有发酵的异味产生,严重影响发芽糙米的感官性状及营养品质,因此应将发芽时间控制在36h以内为宜,此时发芽率已达到90%以上,商品性良好。所以选定正交实验中发芽时间的水平条件分别为24、30、36h。

2.3 低温胁迫积累GABA工艺条件优化

单因素实验可以看出,低温胁迫对发芽糙米中GABA的积累具有促进作用,因此在单因素实验的基础上,设计 $L_9(3^4)$ 正交实验,对通过低温胁迫促进发芽糙米GABA积累技术的工艺条件进行优化。实验结果见表2。

表2 GABA含量正交实验结果

Table 2 Result of orthogonal test of GABA content

因素	A	B	C	GABA含量(mg·100g ⁻¹)
1	1	1	1	26.882
2	1	2	2	32.505
3	1	3	3	28.742
4	2	1	2	35.161
5	2	2	3	27.104
6	2	3	1	26.351
7	3	1	3	24.758
8	3	2	1	24.625
9	3	3	2	25.289
k_1	29.377	28.934	25.953	
k_2	29.539	28.078	30.985	
k_3	24.891	26.794	26.868	
极差	4.648	2.140	5.032	

表3 GABA含量方差分析表

Table 3 Anova of GABA content

因素	偏差平方和	自由度	F比	F临界值	显著性
A	41.751	2	2.923	19	
B	6.958	2	0.487	19	
C	43.102	2	3.018	19	
误差	14.280	2			

从正交实验结果可以看出,影响发芽糙米中GABA含量的主次关系为:发芽时间>胁迫温度>胁迫时间,最优组合为: $A_2B_1C_2$ 。在30℃下浸泡8h后于30℃进行发芽的条件下,进行验证实验,此时得到的发芽糙米中GABA含量为35.16mg/100g。即低温胁迫发芽糙米中积累GABA的最佳工艺为:胁迫温度0℃,胁迫时间2h,发芽时间30h。表3方差分析表明,3个因素对GABA含量的影响均不显著。

3 结论

实验表明,对糙米进行低温胁迫后发芽,可促进发芽糙米中GABA含量的增加,且以0~5℃处理2~4h效果为佳,温度较高,积累作用不明显,温度过低,不仅积累效果不佳,还会严重影响糙米发芽率;发芽时间以24~36h为宜,时间较短,积累作用同样不明显,时间过长,发芽糙米会出现变黄发粘、营养物质大量

溶出等现象,严重降低发芽糙米的商品性状及营养价值。在30℃浸泡8h后,于30℃发芽的条件下,通过低温胁迫积累GABA的最佳工艺条件为:0℃下低温胁迫2h,发芽30h,此时发芽糙米中GABA含量为35.16mg/100g。实验所用原料糙米中GABA含量为13.63mg/100g,对照组发芽糙米中GABA含量为29.54mg/100g。该工艺条件下制得的发芽糙米中,GABA含量为原料糙米的2.58倍,为对照发芽糙米的1.19倍,积累效果显著,这为发芽糙米生产新工艺提供了有力的参考依据。

通过低温胁迫促进发芽糙米中GABA的积累,操作方便,简单易行,可单独使用,亦可与其他方法结合使用,具有良好的研究价值与广阔的发展前景。

参考文献

- [1] P Saman, J A Vázquez, S S Pandiella. Controlled germination to enhance the functional properties of rice[J]. Process Bio-chemistry, 2008, 43: 1377-1382.
- [2] Bormann J. The ABC of GABA receptors[J]. Trends-Pharmacol-Sci, 2000, 21(1): 16-19.
- [3] 钟国才, 陈威, 陈嘉东. 发芽糙米产品开发与应用前景[J]. 粮食与油脂, 2014, 27(3): 7-9.
- [4] 唐淑芬, 刘香云. 发芽糙米研究进展[J]. 粮食加工, 2011, 36(6): 22-24.
- [5] 胡秀娟, 刘亚伟, 刘洁, 等. 富含 γ -氨基丁酸的发芽糙米制备工艺研究[J]. 粮食加工, 2012, 37(3): 18-22.
- [6] 韩涛, 陈野, 纪绪前, 等. Box-Behnken法优化发芽糙米富集 γ -氨基丁酸条件研究[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(2): 10-16.
- [7] 王琛, 马涛, 刘欣. 糙米发芽过程中GABA富集工艺的研究[J]. 农业科技与装备, 2010, 197(11): 25-29.
- [8] 邓宇. 发芽条件及营养液对发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 食品工业, 2010(2): 79-82.
- [9] 蒋静, 马涛. 营养液培养糙米发芽富集GABA工艺条件优化[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 195-199.
- [10] 张强. 浸泡和通气处理对发芽糙米GABA含量的影响[J]. 粮食加工, 2013, 38(2): 20-22.
- [11] Crawford LA, Bown AW, Breitreuz KE, et al. The synthesis of γ -aminobutyric acid in response to treatments reducing cytosolic pH[J]. Plant Physiol, 1994, 104: 865-871.
- [12] 陈恩成, 张名位, 彭超英, 等. 比色法快速测定糙米中 γ -氨基丁酸含量研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 2(1): 125-128.
- [13] 许建军, 江波, 许时婴. 比色法快速测定乳酸菌谷氨酸脱羧酶活力及其应用[J]. 微生物学通报, 2004, 31(2): 66-71.
- [14] Wallace W, Secor J, Schrader B J. Rapid accumulation of 4-aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation[J]. Plant physiol, 1984, 75: 170-175.
- [15] Shelp B J, Bown A W, Mclean M D. Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid[J]. Trends in Plant Science, 1999, 411: 446-452.
- [16] 王玉萍. 糙米发芽过程中 γ -氨基丁酸(GABA)转化积累技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- [17] 郑向华, 陈荣, 叶宁, 等. 温度和时间对发芽糙米中 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. 中国粮油学报, 2009, 24(9): 1-4.