南瓜谷氨酸脱羧酶酶学特性及γ-氨基丁酸富集条件

舒成亮,王春茹,郭晓风,单胜艳,薛玉清,欧 凯,李言郡
(杭州娃哈哈集团有限公司,浙江省食品生物工程重点实验室,浙江杭州 310018)

摘 要:对生鲜南瓜(*Cucurbita moschata*)所含谷氨酸脱羧酶(Glutamate decarboxylase,GAD)的最适反应温度、最适pH、热稳定性和冷冻稳定性等酶学特性进行研究,并利用其富集γ-氨基丁酸(γ-Aminobutyric acid,GABA),探索了反应时间、南瓜品种、缓冲体系、南瓜及味精添加量、料水比对富集效果的影响。结果表明,南瓜GAD最适反应温度为30~35 ℃,最适pH为5.8。南瓜GAD对热比较敏感,50 ℃保温30 min,酶活力损失20%,70 ℃以上保温30 min可导致酶活力完全丧失。冷冻对GAD影响较小,但长期冷冻仍会导致酶活力损失,冷冻8周酶活力损失36%。GABA最适富集条件为:以pH5.8,0.2 mol/L磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液作为反应溶液,南瓜与缓冲液比例为1∶3,南瓜添加量25%,味精添加量1.5%,30 ℃反应18 h,反应液中GABA浓度可达7633.2 mg/L,转化率为93.3%,单位质量南瓜GABA富集量为30.5 mg/g,与未富集时相比提高了132倍。

关键词:南瓜,谷氨酸脱羧酶,酶学特性,γ-氨基丁酸,富集

Enzymatic Characteristics of Pumpkin Glutamate Decarboxylase and Accumulation Conditions of γ-Aminobutyric Acid

SHU Cheng-liang, WANG Chun-ru, GUO Xiao-feng, SHAN Sheng-yan, XUE Yu-qing, OU Kai, LI Yan-jun

(Hangzhou Wahaha Group Co., Ltd., Key Laboratory of Food And Biological Engineering of Zhejiang Province, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Several enzymatic characteristics of pumpkin glutamate decarboxylase (GAD) including optimal reaction temperature, optimal reaction pH, heat stability, freezing stability were investigated. γ-Aminobutyric acid (GABA) accumulation was carried out utilizing glutamate decarboxylase in fresh pumpkin (*Cucurbita moschata*) and the effects of conditions (reaction time, variety of pumpkin, buffer system, pumpkin and MSG concentrations, the ratio of material to water) on GABA accumulation were investigated. The results showed that, the optimal temperature and pH of pumpkin GAD were 30~35 ℃ and pH5.8 respectively. Pumpkin GAD was sensitive to heat, after incubation for 30 minutes at 50 ℃, 20% loss of GAD activity, while incubation for 30 minutes at a temperature higher than 70 ℃, totally inactivation of GAD activity occurred. Freezing had little effect on GAD activity, while long-term freezing could still cause a loss of GAD activity, for example, 36% GAD activity lost after eight weeks freezing. GABA concentration and conversion rate were 7633.2 mg/L and 93.3% respectively under the optimum conditions of pumpkin: disodium hydrogen phosphate-citric acid buffer (pH5.8, 0.2 mol/L) ratio 1∶3, pumpkin concentration 25% (w/w), MSG concentration 1.5% (w/w), temperature 30 ℃ and reaction time 18 h. Besides, under the optimum conditions, GABA yield reached 30.5 mg/g, 132 times higher than before.

Key words: pumpkin; glutamate decarboxylase; enzymatic characteristics; γ-aminobutyric acid; accumulation

中图分类号:TS201.1 **文献标识码**:B **文 章 编 号**:1002-0306(2018)16-0191-05

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.16.034

引文格式:舒成亮,王春茹,郭晓风,等.南瓜谷氨酸脱羧酶酶学特性及γ-氨基丁酸富集条件[J].食品工业科技,2018,39(16):191-194,219.

γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid,GABA)是一种广泛存在于动植物和微生物体内的非蛋白质氨基酸,作为高等动物中枢神经系统重要的抑制性神经递质,参与多种代谢活动,具有重要的生理活性。大量研究表明,GABA具有降低血压,治疗癫痫,镇静安神,调节激素分泌,增强记忆,控制哮喘等多种生理功能[1-3]。目前,GABA的制备方法主要有化学合成和生物制备两类方法,前者由于强腐蚀性试剂的使用,反应条件剧烈,得率低等因素难以用于食品加工领域,而生物法包含植物富集法和微生物发酵法,是

收稿日期:2017-11-27

作者简介:舒成亮(1987-),男,硕士研究生,工程师,研究方向:食品与生物技术,E-mail:shuchliang@163.com。

目前 GABA 制备的主要方法[4]。微生物发酵法不受资源环境限制,十分契合现代工业集约化生产的需求,但也存在高产菌株难筛选易退化,生产周期长,发酵微生物在食品领域受限的问题。植物富集法简单易行,资源可再生,产物可直接作为食品原料,具备天然优势。鉴于此,植物富集 GABA 的方法受到国内外学者的广泛关注和深入研究。茶叶[5]、桑叶[6]、谷物胚芽[7-9]、辣椒、茄子等植物是 GABA 富集研究的主要素材,通过厌氧[9]、浸泡[10]、酶解[8]、低温胁迫[9]、超声波[10]等处理方式,达到富集 GABA 的目的。但由于 GABA 在植物体内含量较低,且需要较强的外界刺激,通常 GABA 富集浓度不高,且工艺复杂,规模化生产可行性不高。南瓜作为价廉易得的大宗农产品,已有研究报道其含有较高 GAD 活力[11],然而,利用南瓜进行 GABA 富集在国内外几乎处于空白状态。中国市售食用南瓜从生物学角度划分主要有两类,中国南瓜(*Cucurbita moschata*)和日本南瓜(*Cucurbita maxima*),针对两类南瓜的 GAD 活力和 GABA 富集能力尚未见文献报道。为此,本研究以两类南瓜为原料,通过研究南瓜 GAD 活性、GABA 富集适宜条件及工艺,为探索 GABA 高效生产方法提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

生鲜南瓜　中国南瓜 A 产自浙江,中国南瓜 B 产自湖北,日本南瓜 C 产自浙江,日本南瓜 D 产自山东;味精　含一水谷氨酸钠 99%,市售;磷酸氢二钠、柠檬酸等　均为分析纯;GABA 标准品　AN 型(P/N G370380)和 B 型生理体液氨基酸标准溶液(P/N G370381),日本和光试剂公司。

Beckman Coulter Avanti J-26 XP 台式高速冷冻离心机　美国贝克曼库尔特公司;全自动氨基酸分析仪 L-8900　日本日立公司。

1.2 实验方法

1.2.1　南瓜中 GAD 酶活力测定　将中国南瓜 A(下文中未标明南瓜类别均为中国南瓜 A)与 0.2 mol/L,pH5.8 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(下文所述缓冲液同上)按 1∶1 的比例混匀后打浆,制成粗酶液,取 10 g 粗酶液加入味精 0.5 g,加入缓冲液定容至 50 mL,充分混匀,40 ℃反应 1 h 后于 95 ℃ 10 min 灭酶,10000 r/min,25 ℃离心 10 min,取上清液,测定 GABA 含量并计算 GAD 活力。GAD 活力定义:每分钟催化反应产生 1 μmol GABA 所需的酶量定义为 1 个单位活力 U。计算公式如下:

$$\text{GAD 活力} = \frac{c \times V}{M \times t} \times 10^6$$

式中,c 为 GABA 的质量浓度(g/mL),V 为反应液体积(mL),M 为 GABA 的摩尔质量(g/mol),t 为反应时间(min),10^6 为 mol 转化为 μmol 的系数。

1.2.2　南瓜 GAD 酶学特性研究　为明确 GABA 富集过程中最关键的因素-南瓜 GAD 的特性,同时探明实际生产中南瓜原料的储运和加工条件对南瓜 GAD 活力的影响,开展以下南瓜 GAD 酶学特性研究。实验均重复三次,取平均值。

1.2.2.1　南瓜 GAD 最适反应温度　按 1.2.1 中所述的方法分别在 20、30、35、40、55、70 ℃下测定南瓜 GAD 活力,确定南瓜 GAD 最适温度。

1.2.2.2　南瓜 GAD 最适反应 pH　分别配制 0.2 mol/L,pH 为 4.0、4.6、5.0、5.4、5.8、6.4 和 7.0 的缓冲液构建反应体系,按 1.2.1 中所述的方法测定南瓜浆中 GAD 在各自 pH 下的活力,确定最适 pH。

1.2.2.3　南瓜 GAD 的热稳定性　考察不同温度下热处理 30 min 后南瓜 GAD 活力的损失情况。以料水比为 1∶1 制备的南瓜浆作为粗酶液,分别于 40、50、60、70、80、90 ℃下水浴保温 30 min,保温结束后立即冷却至 25 ℃,测定 GAD 活力及活力损失率。以不经水浴保温的南瓜浆为对照,比较在南瓜 GAD 活力在热处理后的损失情况。

1.2.2.4　南瓜 GAD 的冷冻稳定性　考察冷冻数周时间后南瓜 GAD 酶活力的损失情况。以料水比为 1∶1 制备的南瓜浆作为粗酶液,将其于零下 20 ℃冷冻保存,分别于第 0、1、2、3、4、6、8 周取出,于 25 ℃解冻 3 h,25 ℃测定 GAD 活力并计算 GAD 活力损失率。以不经冷冻的南瓜浆为对照,考察南瓜 GAD 经不同时间冷冻后的酶活力稳定性。活力损失率计算公式如下:

$$\text{活力损失率}(\%) = \frac{A_2}{A_1} \times 100$$

式中,A_1 为未经热处理(或冷冻)的南瓜 GAD 活力,A_2 为经热处理(或冷冻)后的南瓜 GAD 活力。

1.2.3　南瓜预处理及 GABA 富集　选择外观无损伤无腐败的南瓜,洗净并使用 50 mg/L 次氯酸钠溶液消毒 30 min,纯净水冲洗干净,切成 1~3 cm 的小块,将无菌水或经灭菌处理的与南瓜按一定比例混合,采用胶体磨打浆 3 次,确保南瓜被充分破碎。打浆后将味精加入至反应体系中,在合适的温度、pH 等条件下静置反应一段时间进行 GABA 富集,反应结束后,将反应液于 10000 r/min,25 ℃离心 10 min,收集上清液,测定 GABA 及 L-谷氨酸(L-Glu)含量。

1.2.4　南瓜富集 GABA 最佳反应条件实验设计　考察反应时间、南瓜品种、反应体系、南瓜添加量、味精添加量、料水比等参数对 GABA 富集的影响,每个实验方案均重复三次,取平均值。

1.2.4.1　反应时间对南瓜富集 GABA 的影响　将南瓜与 0.2 mol/L,pH5.8 的缓冲液按质量比 1∶1 的比例混匀打浆,制得 50% 南瓜浆,实验反应体系中南瓜浆 40%(w/w),味精 1.5%(w/w),30 ℃静置反应,选择 0、1、2、4、6、8、18、24 h 8 个时间点取样测定 GABA 及谷氨酸含量。

1.2.4.2　南瓜品种及反应体系对 GABA 富集的影响　比较中国南瓜 A、中国南瓜 B、日本南瓜 C 和日本南瓜 D 富集 GABA 能力的差异;同时,为考察缓冲体系在南瓜富集 GABA 中的实际效果,分别在纯水体系及缓冲液体系中进行 GABA 富集实验。选取四种南瓜为原料,分别与 0.2 mol/L,pH5.8 缓冲液和纯水按 1∶1 的比例混合打浆,反应体系中南瓜浆 40%(w/w),味精 1.5%(w/w),30 ℃静置反应 18 h。

比较缓冲液体系与纯水体系下 GABA 富集量,同时比较四种南瓜在两种体系下的 GABA 富集能力。

1.2.4.3 南瓜及味精添加量对 GABA 富集的影响 将南瓜与缓冲液按 1∶1打浆后制成南瓜浆,分别按 40%,60% 和 80%(w/w)的比例添加至反应体系中,底物味精添加量分别为 1.0% 和 1.5%(w/w),于 30 ℃静置反应 18 h,考察南瓜及味精添加量对 GABA 富集的影响。

1.2.4.4 打浆料水比对南瓜富集 GABA 的影响 将南瓜与 0.2 mol/L,pH5.8 的缓冲液分别按 1∶1、1∶1.5、1∶2、1∶2.5 及 1∶3的比例打浆,添加量均为 25%(w/w,以南瓜重量计),味精添加量为 1.5%(w/w),温度 30 ℃,静置反应 18 h,考察打浆料水比对 GABA 富集的影响。

1.2.5 GABA 及 L-Glu 含量测定 取 1.2.1 或 1.2.3 所述上清液,经 0.22 μm 滤膜过滤,采用氨基酸分析仪进行 GABA 和 L-Glu 含量测定。

1.2.6 GABA 转化率及 GABA 富集量计算 GABA 转化率定义为 GABA 实际生成量与理论上谷氨酸钠全部转化为 GABA 的生成量的比值。GABA 富集量定义为单位质量(g)南瓜生成 GABA 的量(mg)。

1.3 数据分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 19.0 软件,以 Duncan 多重比较对实验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 南瓜 GAD 酶学特性研究

2.1.1 南瓜 GAD 最适温度 由图 1 可知,南瓜 GAD 在 30~35 ℃酶活力最高,在温度 20 和 40 ℃时,GAD 活力亦比较高,与最高活力(30 ℃)相比无显著性差异($p>0.05$),当温度超过 55 ℃时,酶活力有明显的降低($p<0.05$)。后续实验选择 30 ℃为反应温度。

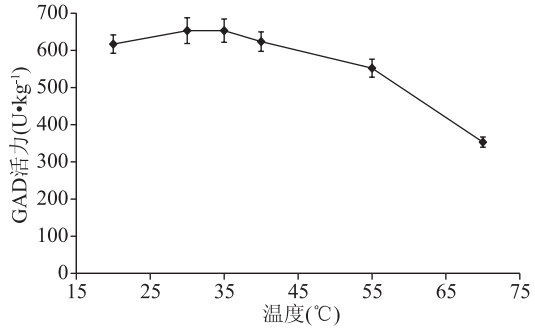

图 1 温度对南瓜 GAD 活力的影响

Fig.1 Effects of temperature on pumpkin GAD activity

2.1.2 南瓜 GAD 最适 pH 考察 由图 2 可知,在所选 pH 范围内,5.8 是南瓜 GAD 最适 pH,在该 pH 下,酶活力最高,同时,酶活力随 pH 升高呈先增加后降低的趋势,相比于 pH 在 5.0 ~6.4 时,当 pH 低于 5.0 或高于 6.4 时,酶活力显著降低($p<0.05$)。本实验得出的结论与 Matsumoto 等[11]对南瓜的研究结果一致,Brandon 等[12]和吕莹果等[13]分别对豇豆和米胚芽 GAD 酶学性质进行研究,两种植物 GAD 的最适 pH 分别为 5.5~6.0 和 5.6,与南瓜 GAD 最适 pH 近似,而刘清等[14]的研究结果表明,乳酸菌 GAD 最适 pH 为 4.5,与本文结果差别较大。后续实验选择的 pH 为 5.8。

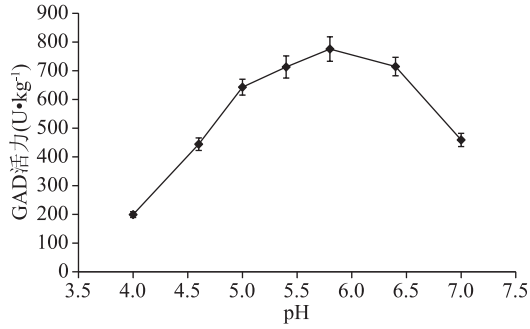

图 2 pH 对南瓜 GAD 活力的影响

Fig.2 Effects of pH on pumpkin GAD activity

2.1.3 南瓜 GAD 热稳定性 由图 3 可知,南瓜 GAD 活力随保温温度的升高而逐渐下降,损失率逐渐增加,40 ℃保温 30 min 后南瓜 GAD 酶活力几乎没有损失,当超过 70 ℃进行保温时,南瓜 GAD 酶活力几乎完全丧失。吕莹果等[13]研究发现米胚 GAD 的热稳定较差,80 ℃时酶几乎完全失,结果与本实验相符。

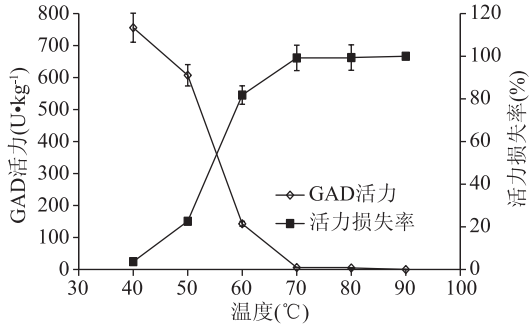

图 3 热处理对南瓜 GAD 活力的影响

Fig.3 Effects of thermal treatments on pumpkin GAD activity

2.1.4 南瓜 GAD 冷冻稳定性 由图 4 可知,冷冻时间在 4 周以内时,南瓜 GAD 活力损失率很低(≤10%),冷冻 6 周以上酶活力损失率逐渐增加,当冷冻时间为 8 周时,酶活力损失率为 36%。

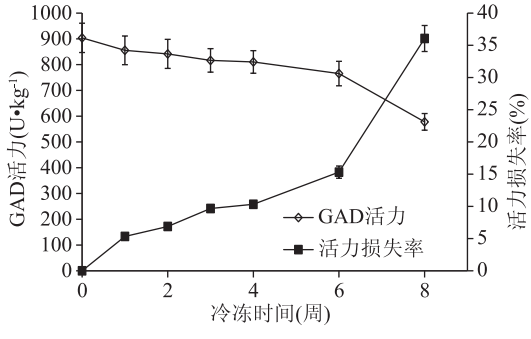

图 4 冷冻对南瓜 GAD 活力的影响

Fig.4 Effects of freezing on pumpkin GAD activity

2.2 南瓜富集 GABA 最佳反应条件的探索

2.2.1 反应时间对南瓜富集 GABA 的影响 由图 5 可知,在最初的 1 h 内,谷氨酸含量急剧下降,同时 GABA 含量急剧上升,随着时间延长,GABA 生成的速率逐渐减缓,反应前 4 h 生成的 GABA 含量远高于后 20 h,由此可见,在反应前期如何促进 GABA 含量

提高是整个反应的关键环节。经过 18 h 反应后，反应液中 GABA 浓度为 5267.4 mg/L，换算为单位质量南瓜的 GABA 富集量为 26 mg/g，继续延长反应时间，GABA 富集量无显著性增加。与文献中利用玉米胚[7]、米糠[15]、茶叶[5]等作为原料进行 GABA 富集相比，本研究利用生鲜南瓜可富集更高含量的 GABA。后续实验反应时间控制在 18 h。

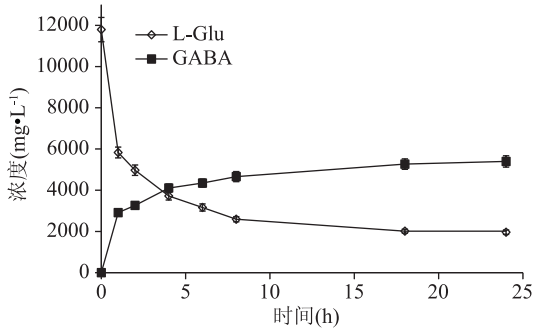

图 5　反应时间对 GABA 浓度的影响

Fig.5　Effects of reaction time on GABA concentration

2.2.2　南瓜品种及反应体系对 GABA 富集的影响　由图 6 可知，无论在纯水体系还是缓冲液体系下，中国南瓜富集 GABA 的能力均强于日本南瓜，且产自两个区域的中国南瓜富集 GABA 能力十分接近，对于日本南瓜亦是如此，可以推断，南瓜的品种对所含 GAD 酶活力影响比较大，从而影响 GABA 富集能力。而对于同种南瓜，产地的影响并不大。考虑到后续放大生产中南瓜原料的筛选是核心环节，本实验为南瓜的筛选提供重要参考。后续实验均采用中国南瓜 A 作为实验原料。

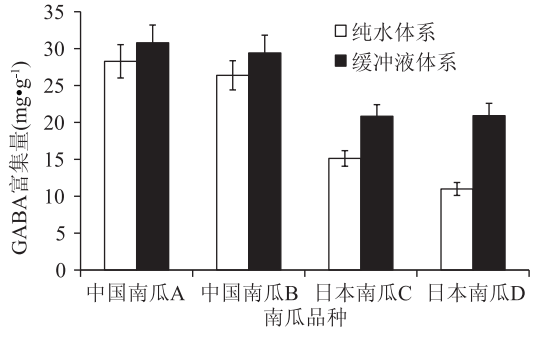

图 6　南瓜品种及反应体系对 GABA 富集的影响

Fig.6　Effects of pumpkin varieties and reaction solutions on GABA accumulation

缓冲液体系下进行反应 GABA 富集量显著高于纯水体系（$p<0.05$），主要原因在于 GABA 由谷氨酸分子脱去一个羧基后形成，此过程需要消耗 H^+，在纯水体系中，随着反应进行，反应液 pH 会逐渐升高，较高的 pH 偏离了 GAD 最佳反应 pH，同时带来微生物污染的风险；而在缓冲液体系中，pH 的升高得到有效抑制，从而确保反应在合适的环境中继续进行，提高 GABA 浓度。从更广义的角度说，GABA 富集的过程是一个酶反应，包括 GAD 在内的所有生物酶，在缓冲液中更有利于酶蛋白分子天然构象的保持和活性的发挥。后续实验均选择在缓冲液中开展。

2.2.3　南瓜及味精添加量对 GABA 富集的影响　由表 1 结果可知，当味精添加量为 1.0% 时，不同南瓜浆比例方案 GABA 浓度、富集量和转化率均有显著性差异（$p<0.05$），其中南瓜浆比例为 40% 时，虽 GABA 富集量较高，但反应液中 GABA 浓度较低，转化率为 90.6%，当南瓜浆比例为 60% 时，GABA 浓度可达 5384 mg/L，转化率达到 98.7%，由于南瓜浆添加量高，单位质量的南瓜 GABA 富集量相对减少。当味精添加量为 1.5% 时，南瓜浆添加比例越高，GABA 浓度和转化率越高，添加南瓜浆比例为 80% 时，GABA 浓度可达 7647 mg/L，转化率达到 93.5%，相比 40% 和 60% 具有显著性差异，南瓜浆添加量为 40% 时，单位质量南瓜 GABA 富集量最高，但与 60% 相比并不显著。总之，味精添加量较低时，可选择相对较低的南瓜浆比例，味精添加量较高时，南瓜浆添加比例应适当提高。味精的有效成分谷氨酸钠是 GABA 前体物质谷氨酸的钠盐，是 GAD 的底物，对 GABA 富集量有重大影响，有研究人员进行 GABA 富集时不额外添加谷氨酸或其钠盐，富集后 GABA 含量一般仅提高数倍[10]，而添加底物则可将 GABA 含量提高数十倍乃至上百倍[7]。综合考虑，选择南瓜浆 40%，味精 1.5% 作为后续实验条件。

2.2.4　打浆料水比对南瓜富集 GABA 的影响　由表 2 结果可知，打浆所用缓冲液比例越高，反应最终获得的 GABA 浓度越高，相应的，GABA 富集量和转化率越高，不同料水比之间，1∶1 和 1∶3 与其他比例之间具有显著性差异，而 1∶1.5，1∶2 和 1∶2.5 之间差异不显著。主要原因在于缓冲液比例越高，采用胶体磨打浆时越易将南瓜细胞破碎，促进酶的溶出，进而促进谷氨酸转化为 GABA。当料水比为 1∶3，且其他参数均选择最佳条件时，GABA 富集量达到 30.5 mg/g，与未富集时相比（0.23 mg/g）提高了 132 倍。研究表明，GAD 和 GABA 参与植物应激反应[16]，机械压力刺

表 1　南瓜浆及味精添加量对 GABA 富集的影响

Table 1　Effects of pumpkin syrup and MSG concentration on GABA accumulation

南瓜浆比例（%）	味精 1.0%			味精 1.5%		
	GABA 浓度（mg•L⁻¹）	GABA 富集量（mg•g⁻¹）	转化率（%）	GABA 浓度（mg•L⁻¹）	GABA 富集量（mg•g⁻¹）	转化率（%）
40	4944 ± 69^{a}	24.7 ± 0.3^{c}	90.6 ± 1.3^{c}	5183 ± 103^{b}	25.9 ± 0.5^{c}	63.3 ± 1.3^{a}
60	5384 ± 44^{c}	17.9 ± 0.2^{b}	98.7 ± 0.8^{e}	6904 ± 122^{d}	23.0 ± 0.4^{c}	84.4 ± 1.5^{b}
80	5153 ± 87^{b}	12.9 ± 0.4^{a}	94.5 ± 1.6^{d}	7647 ± 131^{e}	19.1 ± 0.3^{b}	93.5 ± 1.6^{d}

注：同一指标的不同字母表示显著性差异（$p<0.05$）；表 2 同。

（下转第 219 页）

[25]何登菊,杨兴,姚俊杰,等.低温保活运输对鲟鱼肌肉主要营养成分的影响[J].贵州农业科学,2010,38(6):157-158.
[26]尹洪滨,孙中武,孙大江,等.6种养殖鲟鳇鱼肌肉营养成分的比较分析[J].大连海洋大学学报,2004,19(2):92-96.
[27]陈洁,李大鹏,张志敏,等.草鱼不同部位肌肉营养成分、肌纤维特性以及脂肪代谢相关基因的表达[J].淡水渔业,2017,47(2):107-112.
[28]雷思佳,叶世洲,李德尚,等.台湾红罗非鱼幼鱼水分含量与脂肪、蛋白质含量及比能值之间关系的研究[J].华中农业大学学报,1999,18(4):367-370.
[29]吴云发,方春林,王庆萍.鱼类矿物质营养研究进展[J].江西水产科技,2007(4):19-22.
[30]王强.酱鸭与香辛料风味物质及其在加工过程中的变化[D].南昌:南昌大学,2011:67-68.
[31]翁丽萍.养殖大黄鱼和野生大黄鱼风味的研究[D].杭州:浙江工商大学,2012:65-66.
[32]吴薇,陶宁萍,顾赛麒.鱼肉特征性气味物质研究进展[J].食品科学,2013,34(11):381-385.

(上接第页)

激有助于GABA的富集,因此本实验中胶体磨提供的机械压力是GABA富集的动力。此外,本实验室还对底物味精添加顺序进行了初步研究,预先加入至缓冲液中再与南瓜混合打浆比打浆后加入更有利于GABA富集(数据未显示),验证了底物在应激反应发生后尽快与GAD接触有助于GABA富集。

表2 料水比对南瓜富集GABA的影响

Table 2 Effects of pumpkin buffer ratio on GABA accumulation

打浆料水比(南瓜:缓冲液)	GABA浓度($mg\cdot L^{-1}$)	GABA富集量($mg\cdot g^{-1}$)	转化率(%)
1:1	7037.0 ± 48^{a}	28.1 ± 0.1^{a}	86.0 ± 0.4^{a}
1:1.5	7215.1 ± 83^{b}	28.9 ± 0.2^{b}	88.2 ± 0.5^{b}
1:2	7248.8 ± 89^{b}	29.0 ± 0.2^{b}	88.6 ± 0.7^{b}
1:2.5	7373.3 ± 102^{b}	29.5 ± 0.3^{b}	90.1 ± 0.8^{b}
1:3	7633.2 ± 79^{c}	30.5 ± 0.2^{c}	93.3 ± 0.8^{c}

3 结论

对南瓜GAD最适反应温度、最适pH、热稳定性和冷冻稳定性等酶学特性进行研究,南瓜GAD最适反应温度为30~35 ℃,最适pH为5.8;南瓜GAD对热比较敏感,超过50 ℃短时间保温即可导致酶活力快速丧失。冷冻对GAD影响相对较小,但长期冷冻仍会导致酶活力损失。利用南瓜GAD进行GABA富集,探索了反应时间、南瓜品种、缓冲体系、南瓜及味精添加量、料水比对富集效果的影响。选择pH5.8,0.2 mol/L磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液作为反应溶液,南瓜与缓冲液的打浆比例为1:3,南瓜添加量为25%,底物味精添加量为1.5%,30 ℃静置反应18 h,反应液中GABA浓度可达7633.2 mg/L,转化率为93.3%,单位质量南瓜GABA富集量为30.5 mg/g,与未富集时相比提高了132倍。通过减少南瓜或味精添加量可达到提高单位GABA富集量(最高为33.5 mg/g)或转化率(最高为98.7%)的目的,但要以牺牲总GABA浓度为前提,并不是最经济的方案。本研究对南瓜富集GABA的相关工艺条件及南瓜GAD酶学特性进行了初探,为植物富集GABA提供了一条新的路径,然而,该项工作仍面临一些尚未解决的难题,如何确保工业化生产时南瓜内源酶活力的一致性、如何防止反应过程中微生物污染、如何确保GABA浓度的同时减少味精残留、提升口感都需要进一步的深入研究。

参考文献

[1]堀江典子,管美奈子,金武祚.GABA(γ-氨基丁酸)的功能性[J].中国食品添加剂,2010(6):169-173.
[2]林智,大森正司.γ-氨基丁酸茶(Gabaron Tea)降血压机理的研究[J].茶叶科学,2001,21(2):153-156.
[3]谢晨,刘臻,赵娜,等.γ-氨基丁酸与睡眠觉醒[J].医药导报,2014,33(5):641-644.
[4]王姣姣,白卫东,梁彬霞.γ-氨基丁酸的生理功能及富集的研究进展[J].农产品加工·学刊,2012(1):40-42,45.
[5]毛清黎,代小梅,杨新河,等.真空及外源谷氨酸钠处理对茶叶中γ-氨基丁酸富集作用研究[J].食品与机械,2009,25(4):49-51.
[6]陈恒文,林健荣.桑叶中γ-氨基丁酸的研究概述[J].食品工业科技,2008,29(8):298-300,304.
[7]王玲玲,李楠,王文蒙,等.利用玉米胚内源酶富集γ-氨基丁酸工艺条件的研究[J].食品与发酵工业,2009,35(4):87-91.
[8]张晖,姚惠源.胰蛋白酶水解富集米胚芽中γ-氨基丁酸的研究[J].食品科学,2005,26(2):127-130.
[9]马丽,唐坚,王梦晗,等.低温胁迫对糙米发芽及γ-氨基丁酸含量的影响[J].食品工业科技,2015,36(4):278-281.
[10]张祎,赵婷婷,申娟利,等.超声波处理对发芽糙米GABA积累及抗氧化能力影响的研究[J].食品工业科技,2016,37(2):130-133,137.
[11]Toshihiko Matsumoto, Izumi Yamaura, Masaru Funatsu. Physical properties of glutamate decarboxylase from squash[J]. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry, 1990,54(11):3001-3003.
[12]Brandon S. Johnson, Narendra K. Singh, Joe H. Cherry. Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea[J].Phytochemistry,1997,46(1):39-44.
[13]吕莹果,张晖,马晓博,等.米胚芽谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分酶学性质的研究[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(8):190-196.
[14]刘清,姚惠源,张晖.乳酸菌谷氨酸脱羧酶的酶学性质研究[J].食品科学,2005,26(4):100-104.
[15]张磊,白青云,曹晓虹,等.米糠富集γ-氨基丁酸的培养液组分优化[J].食品与发酵工业,2008,34(7):77-81.
[16]许建军,江波,许时婴.谷氨酸脱羧酶(GAD)的研究进展[J].食品工业科技,2004,25(7):131-133.