

淡豆豉炮制中影响 γ -氨基丁酸富集的主次因素初步分析

陈青峰¹, 任佳秀^{2#}, 周姝含¹, 熊京京¹, 苏明声¹, 王立元¹, 翁美芝¹, 谢卫华^{1*}, 谢小梅^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 安徽医科大学附属巢湖医院, 安徽 巢湖 238000

摘要: 目的 对淡豆豉炮制中影响 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 富集的主次因素进行初步研究, 为揭示淡豆豉高含量 GABA 的形成机制奠定基础。方法 用常规方法测定淡豆豉炮制过程中 pH 值、温度、水分、蛋白酶和谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 等指标的动态变化, 用本实验室建立的柱前在线衍生法测定各样本 GABA 含量, 通过 SPSS 统计软件对各指标与 GABA 进行相关性分析。结果 相关性分析和多元回归分析结果表明, 淡豆豉炮制过程中水分和酸性蛋白酶与 GABA 相关性系数分别为 0.211 和 -0.340, P 值分别为 0.324 和 0.228, 相关性较小且无统计学差异; 比较回归系数绝对值的大小可知, 其他各指标在 GABA 形成中的主次地位为 pH 值 (-0.375) > 温度 (-0.284) > GAD (0.140) > 碱性蛋白酶 (0.047) > 中性蛋白酶 (-0.030), 其中 pH 值、温度和中性蛋白酶与 GABA 具有负相关性, GAD 活力和碱性蛋白酶与 GABA 存在正相关性。结论 淡豆豉炮制过程中温度、pH 值、GAD、中性及碱性蛋白酶是影响 GABA 形成的重要因素。

关键词: 淡豆豉; γ -氨基丁酸; 谷氨酸脱羧酶; 相关性分析; 炮制

中图分类号: R283.1 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)11-2583-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.11.012

Preliminary analysis of primary and secondary factors of γ -aminobutyric acid enrichment in fermentation process of *Sojae Semen Praeparatum*

CHEN Qing-feng¹, REN Jia-xiu², ZHOU Shu-han¹, XIONG Jing-jing¹, SU Ming-sheng¹, WANG Li-yuan¹, WENG Meng-zhi¹, XIE Wei-hua¹, XIE Xiao-mei¹

1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. Chaohu Hospital of Anhui Medical University, Chaohu 238000, China

Abstract: Objective To study the primary and secondary factors of γ -aminobutyric acid (GABA) enrichment in the processing of *Sojae Semen Praeparatum* (SSP), and lay the foundation for revealing the formation mechanism of high content of GABA in SSP. **Methods** The dynamic changes of pH value, temperature, moisture, protease and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the processing of SSP were determined by conventional methods. The GABA content of each sample was determined by pre-column on-line derivatization established by our laboratory. The correlation between each indicator and GABA was analyzed by SPSS software. **Results** Correlation analysis and multiple regression analysis showed that the correlation coefficient between water, acid protease and GABA was 0.211 and -0.340, respectively, and the P values were 0.324 and 0.228, respectively. The correlation was small and there was no statistical difference. The absolute value of the regression coefficient showed that the primary and secondary status of other indicators in the formation of GABA was pH value (-0.375) > temperature (-0.284) > GAD (0.140) > alkaline protease (0.047) > neu-protease (-0.030), in which pH value, temperature and neutral protease had a negative correlation with GABA, and GAD activity and alkaline protease had a positive correlation with GABA. **Conclusion** The temperature, pH value, GAD, neutral and alkaline protease are important factors affecting the formation of GABA in the fermentation process of SSP.

Key words: *Sojae Semen Praeparatum*; γ -aminobutyric acid; glutamic acid decarboxylase; correlation analysis; fermentation process

收稿日期: 2019-03-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81660664); 江西省教育厅科学技术研究项目 (GJJ170719)

作者简介: 陈青峰, 在读硕士, 从事药学研究。E-mail: 1397608735@qq.com

*通信作者 谢小梅, 教授, 硕士生导师, 主要从事微生物学研究。E-mail: 1563369070@sina.com

谢卫华, 副教授, 主要从事中药学研究。Tel: (0791)87118911 E-mail: 306194111@qq.com

#并列第一作者, 任佳秀, 药师, 主要从事药学研究。E-mail: 1914925684@qq.com

淡豆豉 *Sojae Semen Praeparatum* 是一味常用传统中药, 为豆科植物大豆 *Glycine max* (L.) Merr. 的成熟种子的发酵加工品, 以黑色种皮品系大豆为主要原料, 桑叶、青蒿为辅料配以其中经发酵炮制而成。具有解表除烦、宣发郁热之功效, 临床上主要用于治疗感冒、头痛、烦躁胸闷、虚烦不眠^[1-2]。历代本草和历版《中国药典》记载的淡豆豉制法中均包括“黄衣上遍”和“再闷”2个主要环节。

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是一种广泛分布于自然界的非蛋白质天然氨基酸, 是哺乳类动物中枢神经系统中首要的抑制性神经递质。研究表明 GABA 具有降血压、调节血脂、促进睡眠和增强记忆力及改善脑功能等多种生理机能^[3], 与淡豆豉功效谱相同或更优。本课题组前期首次发现淡豆豉炮制中的“再闷”环节产生高含量 GABA^[4]。目前大多数学者认为淡豆豉的主要活性成分是大豆异黄酮类, 以至于研究者在淡豆豉的质量评价、主要活性成分及炮制工艺等研究中仅以大豆异黄酮类含量为指标, 认为炮制工艺中可省去“再闷”环节。本课题组前期研究表明“再闷”环节极其重要^[5], “再闷”阶段出现高含量 GABA, 再次印证了“再闷”的重要性。有必要探讨淡豆豉炮制中 GABA 的形成机制。已报道 GABA 由谷氨酸脱羧酶 (glutamic acid decarboxylase, GAD) 催化谷氨酸 (glutamic acid, Glu) 形成^[6], 谷氨酸由蛋白酶水解大豆蛋白质生成, 其专一性催化酶 GAD 和蛋白酶的活性受环境 pH 值、温度、水分等的影响^[7]。推测淡豆豉炮制过程中高含量 GABA 的形成与这些因素有密切关联。基于此, 本实验对淡豆豉炮制中影响 GABA 富集的主次因素进行了初步研究, 为揭示淡豆豉中高含量 GABA 的形成机制奠定基础, 并对完善淡豆豉炮制工艺、质量控制、使淡豆豉成为摄取 GABA 的新资源等有重要意义。

1 仪器与材料

BS124S 电子天平, 北京赛多利斯科学仪器有限公司; MILLI-Q 超纯水仪, 美国 Millipore 公司; SIGM2-16K 高速低温离心机, Sigma 公司; PHS-25 型数显 pH 计, 上海仪电科学仪器股份有限公司; UV-2102C 紫外可见分光光度计, 优尼柯上海仪器有限公司; T10-standard 高速匀浆机, IKA 公司。

黑大豆、桑叶、青蒿均购自安国冷背药材有限公司, 由江西中医药大学附属医院杨安金主任中药师鉴定, 分别为豆科大豆属植物大豆 *Glycine max*

(L.) Merr. 的成熟种子, 桑科桑属植物桑 *Morus alba* L. 的干燥叶, 菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分。

GABA 对照品, 批号 11509001, 质量分数 99%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; L-谷氨酸, 批号 20150902, 上海山浦化工有限公司; 干酪素, 批号 20151102, 上海展云化工有限公司; L-酪氨酸, 批号 160811, 上海蓝季科技发展有限公司; 福林酚, 批号 HF201910327, 合肥博美生物科技有限责任公司; 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 批号 Y01S6K2926, 上海源叶生物科技有限公司。

2 方法

2.1 淡豆豉的炮制和取样

本课题组前期按《中国药典》2015 年版建立了规范的淡豆豉炮制工艺^[5]。炮制过程简述如下: 取桑叶 90 g、青蒿 100 g, 分次加入 10、8 倍生药量的水煎煮 1 h, 滤过, 合并滤液并浓缩至 1 000 mL, 煎液拌入净黑大豆 1 000 g 中, 待吸尽后, 隔水蒸 1.5 h (此时取样 1 次, 为发酵 0 d 样品, 记为 F0), 取出, 稍晾, 置容器内, 用煎过的桑叶、青蒿渣覆盖, 置温度 (30±2) °C、湿度 70% 的培养箱内发酵 6 d 至豆粒表面均匀布满黄衣 (称“黄衣上遍”, 此过程每 3 天取样 1 次, 为发酵 3、6 d 样品, 记为 F3、F6)。洗去黄衣, 装入陶瓷容器中, 置温度为 (30±2) °C 的培养箱再闷 15 d, 再闷期间每 3 天倒出, 翻动 (此过程在再闷第 3、6、9、12、15 天取样, 记为 Z3、Z6、Z9、Z12、Z15), 至充分发酵, 香气溢出时取出, 略蒸, 干燥, 即为淡豆豉成品。成品性状: 表面黑色, 皱缩不平, 质柔软, 断面棕黑色, 气浓郁, 味微甘。成品性状和各项理化指标均符合《中国药典》2015 年版要求。各样品置于 4 °C 保存。

2.2 GABA 含量测定

本课题组已建立淡豆豉中 GABA 定量检测的柱前在线衍生-高效液相色谱法^[4], 其衍生试剂为邻苯二甲醛 (OPA), GABA 的线性回归方程为 $Y=1\,664.2X+2.095$, $r^2=0.999\,9$, 在 12.5~400.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好, 精密度、稳定性、重复性、加样回收率等均符合要求^[4]。用该法对淡豆豉炮制过程中不同时间点样本的 GABA 含量进行了检测。

2.3 pH 值的测定

取淡豆豉炮制过程中不同时间点样品 5 g, 加入蒸馏水 10 mL 充分搅拌均匀, 用 pH 计测定悬浮液

的 pH 值。

2.4 温度的测定

将温度计置于发酵内部不同 3 处测定温度取平均值。

2.5 水分的测定

直接干燥法。精密称取各样品 5 g, 置 105 °C 烘箱烘至恒定质量计算水分。

2.6 蛋白酶活力的测定^[8]

2.6.1 酶液的制备 称取各样品粉末于 3 支试管中, 每管 1 g, 分别加入 5 mL pH 3.0 乳酸-乳酸钠缓冲液、pH 7.5 磷酸盐缓冲液及 pH 10.5 硼砂缓冲液用于提取酸性、中性及碱性蛋白酶。40 °C 水浴 1 h, 4 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为粗酶液。

2.6.2 酶活测定 取编号 1~6 的 6 支试管, 各管均加入粗酶液及相应缓冲液 1 mL 预热 1 min, 在 1~3 号试管中加入 1 mL 1% 干酪素溶液, 4~6 号试管中加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸溶液, 精确保温 10 min, 然后立即在 1~3 号试管中加入 2 mL 0.4 mol/L 三氯乙酸, 4~6 号试管中加入 1 mL 1% 干酪素溶液, 继续保温 20 min, 离心。取上清液 1 mL 加入 5 mL 0.4 mol/L 碳酸钠溶液和 1 mL 福林酚试剂, 混匀, 40 °C 保温发色 20 min, 测定 660 nm 处吸光度。以 1 g 或 1 mL 酶量在 40 °C 水解干酪素每 1 min 产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活力单位 (U)。

2.7 GAD 活力测定

2.7.1 GABA 含量测定 比色法测定^[9]。

2.7.2 酶液的提取^[10] 取适量各样品于研钵中, 加入少量石英砂研磨, 称取 1 g 样品于 10 mL 试管中, 加入 5 mL GAD 提取液 [pH 5.8 磷酸钾缓冲液, 内含 1 mmol/L PLP (磷酸吡哆醛), 1 mmol/L PMSF (苯甲磺酰氟), 2 mmol/L EDTA (乙二胺四乙酸), 0.2% β-巯基乙醇, 10% 丙三醇], 于高速分散器中以 20 000 r/min 匀浆 10 min, 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 上清液即粗酶液, 稀释相应倍数, 备用。

2.7.3 酶活测定 取“2.7.2”项下制备的粗酶液 100 μL, 加入 200 μL 10 mmol/L L-谷氨酸溶液, 于 37 °C 水浴 2 h, 然后沸水浴 5 min, 加入 200 μL 磷酸钾缓冲液, 4 °C 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液按“2.7.1”项方法测定 GABA 含量, 定义每小时反应生成 1 μmol GABA 为 1 个酶活力单位 (U)。

2.8 统计学分析^[11-12]

应用 SPSS 21 统计软件进行相关性分析, 并进行多元线性回归。用 Pearson 相关系数分别对各指

标与 GABA 含量的相关性进行评价, 用双尾检验法评价显著水平。用 r^2 对线性回归模型进行评价, F 检验法评价其回归方程的显著性。在此基础上建立多元回归方程, 通过比较各因素系数绝对值的大小, 明确各指标在 GABA 形成中的主次地位。

3 结果与分析

3.1 淡豆豉炮制中不同时间点样本的 GABA 含量动态变化

应用柱前在线衍生-高效液相色谱法测定了淡豆豉炮制过程中各样本的 GABA 含量, 结果黑大豆、F0、F3、F6、Z3、Z6、Z9、Z12、Z15、Z18、Z20 中 GABA 质量分数分别为 0.40、0.61、0、0、1.39、2.82、3.32、4.01、4.58、5.52、5.47 mg/g。在炮制前原料黑大豆中含有微量 GABA, 进入“黄衣上遍”阶段未检测出 GABA, 洗去黄衣进入“再闷”阶段后, GABA 含量逐渐增加, 至再闷 18 d 后含量稳定。基于《中国药典》2015 年版对淡豆豉制法和性状等要求并结合本课题组前期研究结果^[5], 故本课题组后续研究以炮制至再闷 15 d 为宜。

3.2 pH 值

淡豆豉炮制过程中环境 pH 值会发生变化, F0、F3、F6、Z3、Z6、Z9、Z12、Z15 对应的环境 pH 值分别为 6.42、6.72、7.31、6.48、6.27、6.01、6.08、5.85。在整个炮制过程中发酵环境偏弱酸性, 从发酵 3 d 到发酵 6 d 时 pH 值从弱酸性到中性及弱碱性, 在发酵 6 d 时 pH 值最高, 为 7.31; 进入“再闷”环节后 pH 值逐渐降低, 于再闷 15 d 时达最低值, pH 值约为 5.85。

3.3 温度

淡豆豉炮制过程中温度同样发生变化, F3、F6、Z3、Z6、Z9、Z12、Z15 对应的温度分别为 37、32、30、29、29、28、27 °C。总体呈现逐渐下降的趋势, 在发酵 3 d 时最高, 达 37 °C, 之后逐渐降低。表明“黄衣上遍”阶段的微生物更适合在温度较高的环境生长, 而“再闷”阶段的微生物适合在 29 °C 左右的环境中生长。

3.4 水分

淡豆豉炮制过程中水分会发生明显变化, F0、F3、F6、Z3、Z6、Z9、Z12、Z15 样品的水分分别为 57.22%、50.44%、29.60%、38.92%、43.44%、40.64%、43.02%、42.78%。炮制体系中水分先降低后增加最后趋于稳定。在“黄衣上遍”阶段水分逐渐降低, 在发酵 6 d 时最低, 进入“再闷”阶段体

系湿度又逐渐增加最后趋于稳定。

3.5 蛋白酶活力

3.5.1 L-酪氨酸标准曲线的建立 取 L-酪氨酸标准溶液按一定体积稀释至质量浓度为 10、20、30、40、50 $\mu\text{g/mL}$ ，采用福林酚法于 660 nm 波长处测定吸光度 (A) 值，其线性回归方程 $Y=0.009\ 8\ X+0.004\ 4$ ， $r^2=0.999\ 0$ ，表明 L-酪氨酸在 10~50 $\mu\text{g/mL}$ 线性关系良好。

3.5.2 蛋白酶活力 不同样品黑大豆、F0、F3、F6、Z3、Z6、Z9、Z12、Z15 中的酸性蛋白酶活力分别为 11.04、1.26、9.00、11.89、11.38、8.66、11.12、11.04、7.81 U/g；中性蛋白酶活力分别为 14.10、9.34、39.52、116.56、65.71、24.22、17.07、12.74、11.04 U/g；碱性蛋白酶活力分别为 5.17、2.79、48.28、69.20、32.81、26.51、25.24、24.30、9.51 U/g。酸性蛋白酶活力总体呈现先降低后增加的趋势，发酵前由于蒸煮过程使大部分酶活力丧失，“黄衣上遍”阶段酶活逐渐增加，进入“再闷”阶段酶活变化幅度较小，发酵 6 d 和再闷 12 d 时酶活相对较高；中性蛋白酶活力随炮制时间的延长呈先小幅降低后大幅增加再降低的趋势，在发酵 6 d 时达到最高，为 116.56 U/g；碱性蛋白酶活力随着炮制时间的延长亦呈现先减后增再减趋势，在发酵 6 d 时碱性蛋白酶活力达最高，为 69.20 U/g。

3.6 GAD 活力

3.6.1 GABA 标准曲线的制作 取 GABA 对照品溶液按一定体积稀释至溶液浓度为 0.4、0.8、1.2、1.6、2.0、3.0 $\mu\text{mol/mL}$ ，用显色剂显色后于 630 nm 波长处测定 A 值。以 GABA 浓度为横坐标 (X)， A 值为纵坐标 (Y) 制作标准曲线，标准曲线方程为 $Y=0.246\ 8\ X+0.000\ 3$ ， $r^2=0.999\ 5$ ，表明 GABA 在 0.4~3.0 $\mu\text{mol/mL}$ 线性关系良好。

3.6.2 GAD 酶活力 不同样品黑大豆、F0、F3、F6、Z3、Z6、Z9、Z12、Z15 中的 GAD 酶活力分别为 0.59、0.24、0.58、1.69、6.33、7.50、9.24、11.21、17.64 U/(g·h)。淡豆豉炮制过程中 GAD 酶活力总体呈现先减后增的趋势，“黄衣上遍”阶段 GAD 酶活力极低，发酵 0 d 时酶活力最低，约为 0.238 U/(g·h)；进入“再闷”后 GAD 酶活力逐渐增加，于再闷 15 d 时酶活力达最高值，为 17.64 U/(g·h)。

3.7 统计学分析

淡豆豉炮制过程中各指标的变化见表 1。以淡豆豉炮制过程中各个指标含量为横坐标 (pH: X_1 ，

温度: X_2 ，水分: X_3 ，酸性蛋白酶: X_4 ，中性蛋白酶: X_5 ，碱性蛋白酶: X_6 ，GAD: X_7)，以相应时间点样本的 GABA 含量 (Y) 为纵坐标作散点图 (图略)，并运用相关性分析和多元回归分析等统计学分析方法研究淡豆豉炮制过程中各个影响因素在 GABA 形成中的主次地位，结果见表 2~4。表 2 是各个因素与 GABA 的 Pearson 相关系数及其相应的显著性评价结果，表 2 结果表明在各个影响因素中水分 ($r=0.211$ ， $P=0.324$) 和酸性蛋白酶 ($r=-0.340$ ， $P=0.228$) 与 GABA 相关系数较小且无统计学差异 ($P>0.05$)，因此这两者不适合和其他因素一起进行多元回归分析；将其他因素与 GABA 进行多元回归分析，结果表明回归方程调整后的决定系数 (r^2) 为 0.999，剩余标准差为 0.064 9，该回归

表 1 淡豆豉炮制过程中各指标的变化

Table 1 Changes in various indicators during processing of fermented *Sojae Semen Praeparatum*

样品	变量							
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	Y
黑大豆				11.04	14.10	5.17	0.59	0.40
F0	6.42		2.861	1.26	9.34	2.79	0.24	0.61
F3	6.72	37	2.522	9.00	39.52	48.28	0.58	0
F6	7.31	32	1.480	11.89	116.56	69.20	1.69	0
Z3	6.48	30	1.946	11.38	65.71	32.81	6.33	1.39
Z6	6.27	29	2.172	8.66	24.22	26.51	7.50	2.82
Z9	6.01	29	2.032	11.12	17.07	25.24	9.24	3.32
Z12	6.08	28	2.151	11.04	12.74	24.30	11.21	4.01
Z15	5.85	27	2.139	7.81	11.04	9.51	17.64	4.58

表 2 Pearson 相关性系数

Table 2 Pearson correlation coefficient

参数	GABA	显著性	参数	GABA	显著性
GABA	1.000		酸性蛋白酶	-0.340	0.228
pH	-0.921	0.002	中性蛋白酶	-0.797	0.016
温度	-0.867	0.006	碱性蛋白酶	-0.910	0.002
水分	0.211	0.324	GAD	0.948	0.001

表 3 多元回归方程的方差分析

Table 3 Analysis of variance of multiple regression equations

模型	平方和	自由度	均方	F 值	显著性
回归	20.837	5	4.167	989.774	0.024
残差	0.004	1	0.004		
总计	20.841	6			

表 4 回归方程的参数估计

Table 4 Parameter estimation of regression equation

模型	非标准化系数		标准系数	<i>t</i> 值	显著性
	回归系数	标准误差			
常量	11.864	2.340		5.070	0.124
pH	-0.375	0.437	-0.101	-0.858	0.549
温度	-0.284	0.019	-0.510	-14.580	0.044
中性蛋白酶	-0.030	0.003	-0.620	-10.188	0.062
碱性蛋白酶	0.047	0.008	0.487	5.797	0.109
GAD	0.140	0.014	0.436	10.213	0.062

方程拟合度较好,表 3 是回归方程的方差分析, $F=989.77$, $P=0.024<0.05$, 结果表明该回归方程有统计学意义,表 4 是回归方程的参数估计,由表 4 可得回归方程为 $Y=11.864-0.375 X_1-0.284 X_2-0.030 X_3+0.047 X_4+0.140 X_5$, 比较各项回归系数绝对值的大小,结果表明淡豆豉炮制过程中各指标影响 GABA 形成的主次地位为 pH 值>温度>GAD>碱性蛋白酶>中性蛋白酶。

4 讨论

本实验初步分析了淡豆豉炮制过程中影响 GABA 富集的主次因素。研究结果表明:黑大豆和“黄衣上遍”阶段各样本 GABA 含量很低或未检出,进入“再闷”阶段 GABA 含量逐渐增加至再闷 18 d 含量最高并稳定,再次证明了“再闷”的重要性和再闷 15~20 d 的合理性;淡豆豉整个炮制过程中环境 pH 值处于中性偏弱酸性,其中“再闷”阶段炮制体系的 pH 值在 6.0 左右,可能由于再闷阶段兼性厌氧菌的大量生长产生乳酸、CO₂ 等使环境 pH 值降低;淡豆豉炮制过程中体系的温度逐渐降低,“黄衣上遍”阶段最高达 32~37 °C,可能由于“黄衣上遍”阶段微生物种类数量丰富且代谢活跃致炮制体系温度升高;水分是微生物生长繁殖必不可少的营养物质和主要组成成分,约占细胞质量的 70%~90%,在“黄衣上遍”阶段由于微生物的大量繁殖,炮制体系中的水分大部分被微生物吸收用于新陈代谢活动导致水分逐渐减少,进入“再闷”阶段后体系的湿度缓慢增加至再闷 6 d 后基本稳定,可能是由于再闷阶段体系处于相对密闭环境。蛋白酶和 GAD 均是影响 GABA 形成的关键因素,其中蛋白酶是催化生成 GABA 原料 Glu 的关键酶,按其不同的性质可分为酸、中、碱性 3 种蛋白酶,本研究表明在淡豆豉炮制过程中起主要作用的是中性蛋白

酶,这可能与炮制体系中 pH 值更为接近中性蛋白酶的最适 pH 值,酶活最高在发酵 6 d 时达最高值,为 116.56 U/g;碱性蛋白酶和酸性蛋白酶活力最高,分别为 69.20、11.88 U/g,与已报道^[13]中性蛋白酶最适作用 pH 值(6~9)相吻合,此时高活力的蛋白酶使得大豆蛋白质大量分解,为“再闷”阶段提供 GABA 形成的原料奠定基础;GAD 是催化 Glu 生成 GABA 最为关键的酶,研究表明偏弱酸性环境 pH 值为 4~6、温度为 30~50 °C 时更有利于 GAD 酶活的表达^[14],淡豆豉炮制过程中 GAD 酶活呈现先减后增的趋势,可能由于蒸煮过程致使大部分酶失活,进入“黄衣上遍”酶活逐渐增加,但增加幅度较小,发酵至第 6 天时体系含水量最少有利于“黄衣上遍”,此时微生物最为丰富,酶活较高,进入再闷阶段后,偏好于兼性厌氧环境的微生物大量繁殖,加之有利于 GAD 作用的弱酸性环境使得再闷阶段 GAD 酶活大幅增加,于再闷 15 d 时酶活达最高值,为 17.64 U/g,与淡豆豉炮制过程中 GABA 的变化趋势相一致。

相关性分析是指对 2 个或多个具备相关性的变量参数进行分析研究,进而用以衡量变量参数之间的关联程度。本研究结果表明,淡豆豉炮制过程中各指标对 GABA 的形成具有不同程度的影响,其主次顺序为 pH 值(-0.375)>温度(-0.284)>GAD(0.140)>碱性蛋白酶(0.047)>中性蛋白酶(-0.030)。其中 pH 值、温度、GAD、中性及碱性蛋白酶是其主要影响因素,pH 值、温度和中性蛋白酶与 GABA 存在负相关性,GAD 和碱性蛋白酶活力与 GABA 具有正相关性。

综上所述,本研究初步推测淡豆豉炮制过程中 pH、温度、GAD、中性及碱性蛋白酶等指标对 GABA 的形成有重要影响,后期本课题组将通过荧光定量 PCR 明确淡豆豉炮制过程中优势微生物的数量和比例来进一步阐明 GABA 的形成机制。

本实验首次研究了淡豆豉炮制过程中影响 GABA 形成的主次因素,研究结果为进一步明确淡豆豉炮制过程中 GABA 富集的影响因素和形成机制奠定了基础。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [2] 朱海针,谢卫华,龙凯,等. PCR-DGGE 技术研究淡豆豉炮制过程中微生物菌群的动态变化[J]. 中草药, 2017, 48(9): 1757-1765.

- [3] Wong C G, Bottiglieri T, Snead O C. GABA, gamma-hydroxybutyric acid, and neurological disease [J]. *Ann Neurol*, 2003, 54(Suppl 6): S3-S12.
- [4] 任佳秀, 黄越燕, 梁永红, 等. 应用柱前在线衍生-高效液相色谱技术测定淡豆豉中 γ -氨基丁酸含量 [J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(9): 3900-3904.
- [5] 李 刚, 梁永红, 龙 凯, 等. 再闷过程影响淡豆豉炮制工艺研究 [J]. *中草药*, 2014, 45(8): 1083-1088.
- [6] Shelp B J. The Metabolism and functions of γ -aminobutyric acid [J]. *Plant Physiol*, 1997, 115(1): 1-5.
- [7] 王志超, 杨平平, 王 燕, 等. 微生物发酵法生产 γ -氨基丁酸的研究进展 [J]. *中国调味品*, 2015, 40(11): 115-120.
- [8] 林榕姗. 细菌型豆豉发酵机理及功能性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [9] 杨胜远, 陆兆新, 吕凤霞, 等. 谷氨酸脱羧酶活力测定中 GABA 比色定量方法研究 [J]. *食品科学*, 2006, 27(7): 205-209.
- [10] 姚 琪, 张永忠. 大豆谷氨酸脱羧酶分离纯化及酶学性质研究 [J]. *中国油脂*, 2011, 36(11): 26-30.
- [11] 罗振敏, 康 凯. 基于 SPSS 的多元爆炸性气体相关性分析及回归模型研究 [J]. *煤炭技术*, 2016, 35(1): 157-160.
- [12] 葛长军, 徐丽荣, 闫 良. 西瓜产量相关性状的多元回归分析 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(2): 224-225.
- [13] 孙 倩. 三种不同来源 (植物、细菌和真菌) 蛋白酶的纯化、性质及应用研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- [14] 陈佳佳. 产谷氨酸脱羧酶茶叶相关真菌的筛选及产酶条件优化 [D]. 福州: 福建师范大学, 2016.