

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2018.03.047

富含 γ -氨基丁酸豆芽乳发酵工艺优化

张金兰^{1,2} 代田田² 王丹婷^{1,2} 李平兰^{1,2}

(1. 中国农业大学北京食品营养与人类健康高精尖创新中心, 北京 100083;

2. 中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 为提高发酵豆芽乳中的 γ -氨基丁酸含量,以植物乳杆菌 S-35 为发酵剂,以发酵过程中 γ -氨基丁酸质量浓度为试验指标,在单因素试验基础上,利用中心组合试验设计和响应面分析法研究了植物乳杆菌 S-35 接种量、发酵温度、发酵时间对发酵豆乳中 γ -氨基丁酸质量浓度的影响,并建立了乳酸菌发酵模型。响应面优化试验结果表明豆芽乳发酵的最佳工艺条件为:接种量为 3.5%、发酵温度为 34.5℃、发酵时间为 27 h。在此条件下 γ -氨基丁酸质量浓度为 1.61 g/L,植物乳杆菌 S-35 活菌数可达 1.60×10^9 CFU/mL。在 4℃ 下进行 7 d 的储藏试验,结果表明发酵豆芽乳在保质期内凝乳状态、发酵参数保持在可接受的范围内。

关键词: 发芽大豆; γ -氨基丁酸; 工艺优化; 响应面法

中图分类号: TS214.2; TS201.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2018)03-0373-08

Optimization of Process Conditions of γ -Amino Butyric Acid-enriched Fermented Milk with Sprouted Soybeans

ZHANG Jinlan^{1,2} DAI Tiantian² WANG Danting^{1,2} LI Pinglan^{1,2}

(1. The Innovation Centre of Food Nutrition and Human Health, China Agricultural University, Beijing 100083, China

2. College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: The concentration of bioactive components was the key factor to functionality of fermented food. The object was to develop and characterize a sprouted soybeans-based fermented milk by using γ -amino butyric acid (GABA)-producing *Lactobacillus plantarum* S-35. Inoculation volume, fermentation time and fermentation temperature were studied as single factors affecting the yields of GABA in the fermented milk. The central composite design was used to optimize the fermentation technology. The results were analyzed with the software Design-Expert 8.0.6. Results indicated that the fermentation system model had an extremely significant effect on predicting the results of the test. Results of the response surface optimization test showed that the optimal fermentation condition was as follows: inoculation volume was 3.5%, fermentation time was 27 h, and fermentation temperature was 34.5℃. The verification tests demonstrated that the actual yields of GABA was 1.61 g/L, and the maximum number of viable probiotics count was 1.60×10^9 CFU/mL. When it was stored at 4℃ after 7 d, the product had good quality with sensory evaluation, viable cell numbers and pH value. The research results proposed specific processes and fermentation conditions for GABA enrichment in sprouted soybeans, which can provide a new, natural, and functional food resource.

Key words: sprouted soybeans; γ -amino butyric acid; process optimization; response surface method

0 引言

氨基丁酸(GABA)是一种非蛋白质、水溶性的氨基酸,主要是由谷氨酸脱羧酶(GAD,

EC 4.1.1.15)催化 L-谷氨酸脱羧而产生,通过线粒体 GABA 转氨酶(GABA-T, EC 2.6.1.19)转化为琥珀酸半醛来代谢。GABA 是主要的中枢神经系统抑制性神经递质,可以通过降低血压、预防慢性酒精

收稿日期: 2017-08-21 修回日期: 2017-09-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31671831)

作者简介: 张金兰(1984—),女,博士生,主要从事食品微生物研究,E-mail: yubawang@126.com

通信作者: 李平兰(1964—),女,教授,博士生导师,主要从事应用微生物研究,E-mail: lipinglan@cau.edu.cn

性疾病、抑制癌细胞增殖、改善脑功能、促进胰岛素释放为人类和其他动物的健康提供有益的影响^[1-2]。尽管GABA广泛存在于植物、动物和微生物中,但其含量很低,这激发了研究者开发富含 γ -氨基丁酸食品的兴趣。

乳酸菌在最近几年被应用于GABA生产。例如,短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)等应用于富含GABA的食品和药品合成^[3-5]。产GABA的乳酸菌大多在合成或半合成培养基中培养,发酵后GABA的纯化是必不可少的,这将增加生产的时间和成本。应用天然的培养基(如乳制品、谷物、水果、蔬菜等)来培养乳酸菌,获得富含GABA的食品可以避免上述问题,由此成为有价值的研究方向。

豆芽富含膳食纤维、多种营养成分和生物活性成分^[6]。大豆发芽并经适当处理后,不仅增加了人体必需的氨基酸和维生素,提高了大豆的营养价值,也减少了豆腥味。在大豆发芽过程中,随着蛋白质的降解,产生了多种的游离氨基酸,这为GABA的合成提供了天然的底物。

研究发现乳酸菌产生GABA的能力,受培养基质、培养条件和其他因素的影响^[7]。优化培养基对于提高发酵过程中GABA的产量非常重要。响应面法(Response surface optimization, RSM)是一个组合统计学和数学用于优化生物过程的技术。它可以用来评估几个影响因素的影响,通过同时改变几个因素,进行有限数量试验来实现拟合建模。依据对影响GABA生产的关键因素,选择一个独立的变量,RSM用于优化培养因素以提升GABA的产量。本研究在单因素试验的基础上,利用中心组合试验设计(CCD)和响应面分析法建立高产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌发酵的数学模型,通过优化发酵条件,提高植物乳杆菌发酵豆芽乳 γ -氨基丁酸质量浓度,为开发新型的高营养功能食品提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

菌种,植物乳杆菌S-35(*Lactobacillus plantarum* S-35),由中国农业大学食品科学与营养工程学院应用微生物研究室提供,分离自农家酸浆水^[8];大豆种子(2016年秋季收获),北大荒集团;MRS(de Man, Rogosa and Sharpe)合成培养基,北京奥博星生物技术有限公司;盐酸、氢氧化钠、四硼酸钠、次氯酸钠、氯化钠、苯酚、无水乙醇均为分析纯,由西陇化工股份有限公司提供。

1.2 仪器与设备

UV-1800型紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;YXQ-LS-SII型全自动立式电热压力蒸汽灭菌器,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;DNP-9102型恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;S23C型pH计,上海雷磁仪器厂;3K15型台式高速离心机,五洲东方科技发展有限公司;SCL-1300型超净工作台,北京赛伯乐仪器有限公司;SPX-250B-Z型电热恒温水浴锅,上海博讯实业有限公司医疗设备厂;101型鼓风干燥箱,天津泰斯特仪器有限公司;DYJ-S6365型芽苗菜种植机,广东小熊电器有限公司;JYL-C010型九阳料理机,九阳股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 豆芽乳的制备

精选大豆,清洗,0.25%次氯酸钠溶液浸泡30 min(除去大豆种子表面的微生物),用无菌水清洗后,放入发芽机发芽,观察每天的发芽状况,分别取出1、2、3、4、5 d的豆芽制备豆芽乳。

豆芽用清水漂洗,然后用95℃热水浸泡3 min,杀酶钝化,热磨(水温80℃),均质,加水过滤,调整豆芽乳干物质质量分数10%,添加6%蔗糖^[9],充分搅拌均匀后分装,90℃、30 min处理后待用。

1.3.2 豆芽乳发酵试验

将不同发芽时间的豆芽乳,分别接种3%发酵剂,于37℃培养,观察凝固状态,记录凝乳时间,计算乳酸菌活菌数及 γ -氨基丁酸质量浓度。

1.3.3 豆芽乳发酵的单因素试验

(1) 乳酸菌接种量

以植物乳杆菌S-35(5.8×10^9 CFU/mL)为试验对象,在发酵温度为37℃,发酵时间为24 h的条件下,研究不同的接种量(1%、2%、3%、4%、5%)对试验结果的影响,以不同接种量下的 γ -氨基丁酸质量浓度为试验指标。

(2) 发酵时间

发酵条件为上述单因素试验选出的最佳水平,研究不同的发酵时间(12、24、36、48、60 h)对试验结果的影响,以不同发酵时间的 γ -氨基丁酸质量浓度为试验指标。

(3) 发酵温度

发酵条件均为上述单因素试验选出的最佳水平,研究不同的发酵温度(25、28、31、34、37℃)对试验结果的影响,以不同发酵温度的 γ -氨基丁酸质量浓度为试验指标。

1.3.4 响应面法优化乳酸菌发酵工艺的试验

在单因素试验的基础上,采用中心组合设计

(CCD)方法,进行三因素三水平的响应面试验,以接种量、发酵时间、发酵温度为自变量, γ -氨基丁酸质量浓度为响应值,采用响应面统计分析软件 Design-Expert 8.0.6 确定最佳发酵工艺条件。

1.3.5 GABA 的提取方法

采用2倍体积的60%乙醇进行提取;提取条件为70℃恒温水浴回流2h;10 000 r/min 离心10 min,取上层清液测定^[10]。

1.3.6 GABA 的检测方法

采用 Berthelot 反应测定 GABA 的质量浓度^[10]。

取不同质量浓度的 GABA 标准液 0.4 mL,加 0.2 mol/L (pH 值 9.0) 硼酸盐缓冲液 0.6 mL,摇匀,加 5% 苯酚溶液 2 mL,摇匀,加质量分数 6% 次氯酸钠溶液 1 mL,摇匀,放入沸水浴加热 5 min,立即置冰浴中 5 min,待溶液出现蓝绿色后,加入 2.0 mL 60% 酒精,在 645 nm 处测定溶液的吸光度,以吸光度为纵坐标,GABA 的质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。把处理的样品按以上方法测吸光度,代入标准曲线求出样品中 GABA 的质量浓度。

以 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 g/L 质量浓度的 GABA 标准液制作标准曲线,如图 1 所示。由图 1 可知,吸光度与 γ -氨基丁酸质量浓度高度相关, $R^2 = 0.9988$,二者之间的关系满足回归方程

表 1 感官评价评分标准

Tab.1 Scoring criteria of sensory evaluation

品评项目	评分标准	分值
色泽	颜色均匀一致,呈乳白色或淡黄色,有色泽	15~20
	颜色较均匀,颜色偏深,略有光泽	6~14
	颜色不均匀,颜色太深,无光泽	0~5
组织状态	组织均匀、细腻,凝块结实,粘度适中,几乎无乳清析出	15~20
	组织较均匀、较细腻,凝块不结实,粘度稍大或稍稀,有乳清析出	6~14
	组织不良,凝块差,粘度太大或太稀,乳清析出明显	0~5
气味	发酵豆乳固有的香气,基本无豆腥味,基本无氨臭味,无不良风味	15~20
	发酵豆乳固有的香气平淡,略有豆腥味,或略有氨臭味	6~14
	有浓重的豆腥味或其他不良风味	0~5
滋味	具有发酵豆乳特有的滋味,味佳而纯正,无不良滋味,口感细腻爽滑,酸甜适中	15~20
	发酵豆乳特有的滋味平淡,酸味略重,有苦涩味,微有异味,口感较为粗糙	6~14
	苦味涩味明显,酸味过重,或其他不良滋味,口感粗糙,颗粒感明显	0~5
综合接受程度	整体感觉理想,易接受	15~20
	整体感觉一般,可以接受	6~14
	整体感觉差,很难接受	0~5

1.3.9 数据处理

所得数据均为平行测定 3 次以上取平均值,并计算出正负标准偏差,用误差线表示。采用 Design-Expert 8.0.6 数据处理软件对试验结果进行处理,应用中心点法对各组变量的计算结果进行方差分析和差异显著性分析, $P < 0.05$ 表明分析结果的差异性显著, $P < 0.01$ 表明分析结果的差异性极显著。

$$y = 0.124x + 0.0045$$

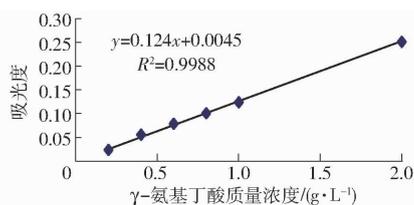


图 1 GABA 标准曲线

Fig.1 GABA standard curve

1.3.7 乳酸菌活菌数的测定

将不同条件发酵豆芽乳,分别用灭菌生理盐水制备 10 倍系列稀释样品匀液,选择适宜稀释度的样品匀液,分别吸取 1 mL 于 MRS 琼脂培养基中,于 37℃ 恒温箱中培养 48 h,计算每皿中的菌落数,求其平均值,乘以稀释倍数,乳酸菌活菌数以 CFU/mL 为单位。

1.3.8 产品感官评价

感官评价评分标准见表 1。

由 5 名男性和 5 名女性组成感官鉴评小组,并接受感官鉴定培训。小组成员对发酵豆乳的色泽、组织状态、气味和滋味以及综合接受程度指标进行评价。将 5 项的平均分作为感官评分。计算总分得出结论,60 分以上即为可接受,80 分以上为风味优良,60 分以下为不可接受。

2 结果与分析

2.1 黄豆发芽时间的确定

发芽时间为 0~5 d 的豆芽乳,分别接种 3% 发酵剂,于 37℃ 培养,在 20~24 h 凝乳较好。由表 2 可知,发酵豆芽乳的感官品质和 γ -氨基丁酸质量浓度与豆芽的发酵时间密切相关。与其他发芽时间的

大豆相比,发芽1 d的豆芽发酵乳明显地提高了 γ -氨基丁酸的质量浓度,并改善了感官品质。发芽0 d的豆芽发酵乳有明显的豆腥味,而豆腥味是豆乳消费量远低于牛奶的重要原因。当发芽时间过长时,随着大豆蛋白在萌发过程中被内源酶的进一步降解,导致发酵豆芽乳凝乳不完全、青芽味逐渐显现、口感差,不适用于制作发酵豆芽乳。因此,选择发芽1 d的大豆芽进行后续试验。

表2 不同的大豆发芽时间对发酵豆芽乳的影响

Tab.2 Effects of different germination time on fermented milk with sprouted soybeans

发芽时间/d	豆芽发酵乳感官评定	γ -氨基丁酸质量浓度/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
0	颜色均匀一致,凝乳良好,有豆腥味,酸甜适中,整体易接受	0.32
1	颜色均匀一致,凝乳良好,无不良风味,酸甜适中,整体易接受	0.70
2	颜色均匀一致,凝乳不佳,无不良风味,酸甜适中,整体可以接受	0.73
3	颜色均匀一致,凝乳不佳,有青芽味,酸甜适中,整体可以接受	0.50
4	颜色均匀一致,未凝乳,青芽味较重,酸甜适中,整体难以接受	0.65
5	颜色均匀一致,未凝乳,青芽味较重,酸甜适中,整体难以接受	0.65

2.2 酸豆芽乳发酵的单因素试验

2.2.1 植物乳杆菌 S-35 接种量

固定发酵温度 37°C 、发酵时间20 h,考察接种量对 γ -氨基丁酸质量浓度的影响。由图2可知,随着接种量的升高,GABA质量浓度呈现先上升后下降的趋势。在接种量为3%时,GABA质量浓度达到最大值,为 0.66 g/L 。中心组合试验选取的接种量范围为2%~4%。

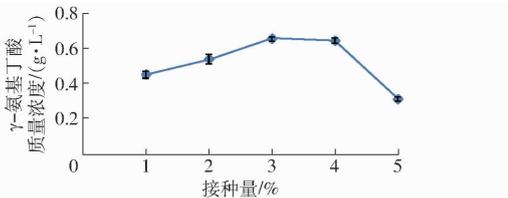


图2 接种量对GABA质量浓度的影响

Fig.2 Effects of various inoculation percentages on GABA yields

2.2.2 发酵时间

固定发酵温度 37°C 、接种量为3%,考察发酵时间对 γ -氨基丁酸质量浓度的影响。由图3可知,随着发酵时间的增加,GABA质量浓度呈先上升后缓慢下降的趋势。在发酵时间为24 h时,GABA质量浓度达到最大值,为 0.71 g/L 。中心组合试验选取的发酵时间范围为12~36 h。

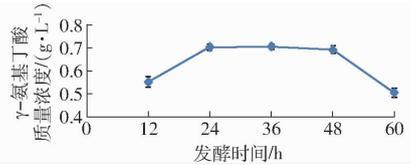


图3 发酵时间对GABA质量浓度的影响

Fig.3 Effects of time on GABA yields

2.2.3 发酵温度

固定发酵时间为24 h、接种量为3%,考察发酵温度对 γ -氨基丁酸质量浓度的影响。由图4可知,温度较低时,GABA的积累量较低,随着温度逐渐升高,GABA的产量也明显升高,当温度为 34°C 时,GABA质量浓度达到最大值,为 1.57 g/L ,温度继续升高后,GABA的产量有所减少。GABA的生物合成与谷氨酸脱羧酶的活性密切相关,而酶的生物活性会受到环境温度的影响。适宜的发 酵温度不仅有利于菌体细胞的生长繁殖,同时还会增加酶的生物活性,促进酶促反应的进行^[11]。温度调整到 34°C 进行发酵,谷氨酸脱羧酶的生物活性能够充分发挥,使GABA大量的积累。中心组合试验选取的发酵温度范围为 $31\sim 37^{\circ}\text{C}$ 。

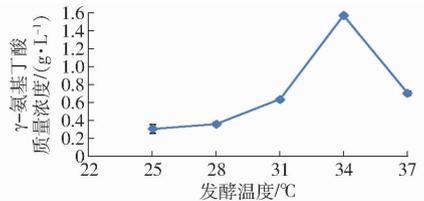


图4 发酵温度对GABA质量浓度的影响

Fig.4 Effects of various temperatures on GABA yields

2.3 响应面优化试验结果与分析

2.3.1 响应面模型试验方案及结果

根据CCD的中心组合试验设计原理,在单因素试验的基础上,选取植物乳杆菌S-35接种量、发酵时间、发酵温度3个因素为CCD的自变量进行响应面优化。由单因素试验优化出的接种量3%、发酵时间24 h、发酵温度 34°C 为中心点进行试验。以发酵产品中 γ -氨基丁酸质量浓度为响应值,试验因素与编码见表3。根据表3进行三因素三水平响应面试验,具体试验方案及结果见表4。表中A、B、C分别为接种量、发酵时间、发酵温度的编码值,Y为GABA质量浓度。

表3 旋转中心组合设计因素编码

Tab.3 Level of factors in central composite design

编码	因素		
	接种量/%	发酵时间/h	发酵温度/ $^{\circ}\text{C}$
-1.682	2.32	3.82	28.95
-1	3	12	31
0	4	24	34
1	5	36	37
1.682	5.68	44.18	39.05

表 4 响应面旋转中心组合 (CCD) 设计与试验结果

Tab. 4 Design and results of central composite design

试验序号	A	B	C	Y/(g·L ⁻¹)
1	-1	-1	-1	0.53
2	1	-1	-1	0.62
3	-1	1	-1	0.79
4	1	1	-1	0.98
5	-1	-1	1	0.53
6	1	-1	1	0.90
7	-1	1	1	0.70
8	1	1	1	1.12
9	-1.682	0	0	0.85
10	1.682	0	0	1.31
11	0	-1.682	0	0.47
12	0	1.682	0	0.95
13	0	0	-1.682	0.64
14	0	0	1.682	0.80
15	0	0	0	1.58
16	0	0	0	1.57
17	0	0	0	1.57
18	0	0	0	1.55
19	0	0	0	1.59
20	0	0	0	1.57

2.3.2 响应面模型的分析

以发酵产品中 γ -氨基丁酸质量浓度为响应值, 由软件 Design-Expert 8.0.6 进行分析, 得到的结果见表 5。

经回归拟合后, 根据各项的回归系数, 删除不显著项得到的模型方程为

$$Y = 1.57 + 0.13A + 0.13B + 0.044C + 0.019AB + 0.0064AC - 0.029BC - 0.18A^2 - 0.31B^2 - 0.31C^2$$

由表 5 的方差分析可得, 该模型达到极显著的水平 ($P < 0.0001$)。同时, 该模型的失拟度不显著 ($P > 0.1$), 可见此方程与实际数据拟合性良好, 试验设计可靠, 适用于发酵体系条件的优化。信噪比为 81.367, 远大于 4, 因此该模型可用于预测试验数据。决定系数 $R^2 = 0.9989$, 校正决定系数 $R^2 = 0.9979$, 说明该模型的变量与自变量之间关系显著, 模型合理可用。

图 5 为 Design-Expert 8.0.6 做出的两因素自变量对 γ -氨基丁酸质量浓度交互作用的 3D 响应曲面图, 可知植物乳杆菌接种量与发酵温度、发酵时间与发酵温度、植物乳杆菌接种量与发酵时间响应面三维图均有稳定点, 且为极大值。

表 5 响应面旋转中心组合设计 (CCD) 回归模型方差分析

Tab. 5 ANOVA of central composite design

方差来源	平方和	自由度	均方	F	P	显著性
模型	3.26	9	0.36	993.41	<0.0001	**
A	0.25	1	0.25	683.51	<0.0001	**
B	0.24	1	0.24	664.10	<0.0001	**
C	0.026	1	0.026	72.17	<0.0001	**
AB	2.813×10^{-3}	1	2.813×10^{-3}	7.72	0.0195	*
AC	0.033	1	0.033	89.29	<0.0001	**
BC	6.613×10^{-3}	1	6.613×10^{-3}	18.16	0.0017	**
A ²	0.46	1	0.46	1257.17	<0.0001	**
B ²	1.38	1	1.38	3779.93	<0.0001	**
C ²	1.35	1	1.35	3693.94	<0.0001	**
残差	3.641×10^{-3}	10	3.641×10^{-4}			
失拟项	2.758×10^{-3}	5	5.516×10^{-4}	3.12	0.1185	不显著
纯误差	8.833×10^{-4}	5	1.767×10^{-4}			
矫正综合	3.26	19				

注: **表示极显著水平 $P < 0.01$, *表示显著水平 $P < 0.05$ 。

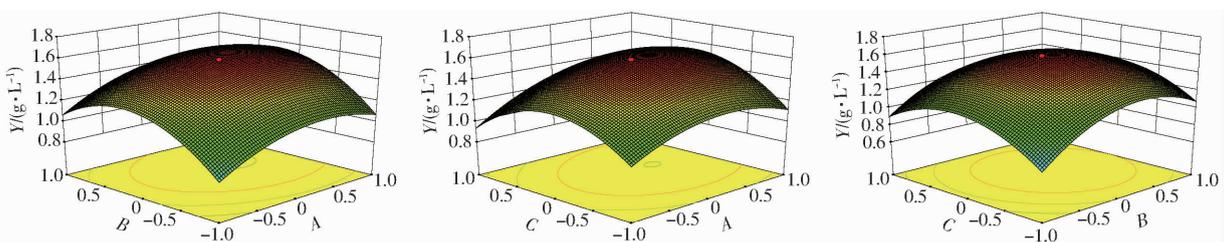


图 5 两因素对 γ -氨基丁酸质量浓度的响应曲面

Fig. 5 Response surface diagrams of two factors on GABA yields

通过响应面分析,得到植物乳杆菌发酵体系最佳工艺条件是接种量 3.41%、发酵时间 26.68 h、发酵温度 34.31℃,在此条件下 γ -氨基丁酸质量浓度的预测值为 1.62 g/L。为了便于实际操作,对优化条件的参数取整后,接种量为 3.5%,发酵时间为 27 h,发酵温度为 34.5℃。为检验响应面模型的可靠性,按上述最佳工艺条件重复 3 次试验,验证试验得到的 γ -氨基丁酸质量浓度为 1.61 g/L,与理论预测值相比,相对误差为 0.6%,可见通过响应面优化方法得到的发酵体系最佳工艺条件是可靠的。验证试验得到的发酵豆芽乳凝固状态均匀,乳清析出少,且有浓郁的发酵香味,风味纯正,无异味。经测定最大活菌数为 1.60×10^9 CFU/mL。

2.4 储藏稳定性试验

将发酵豆芽乳在 4℃ 下冷藏,评价了冷藏过程中豆芽乳品质的变化。由图 6 可知,乳酸菌的活菌数在储藏过程中逐渐下降。但在 1~7 d 时,活菌数均大于 10^8 CFU/mL,符合乳酸菌发酵饮料要求。由图 7 可知,pH 值整体呈下降趋势,但是变化较小。这与预期目标一致,筛选的菌种较为合适,后酸化现象较轻。

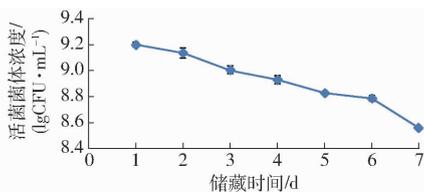


图 6 4℃ 储藏过程中发酵豆芽乳活菌数的变化

Fig. 6 Changes of viable bacterium in fermented sprouted soymilk during storage at 4℃

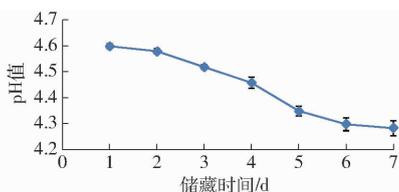


图 7 4℃ 储藏过程中发酵豆芽乳 pH 值的变化

Fig. 7 Changes of pH value in fermented sprouted soymilk during storage at 4℃

根据表 6,在发酵豆芽乳储藏期间,发酵豆乳的感官评分逐渐下降,4℃ 冷藏 1 d 时感官评分为 90,呈乳白色;组织均匀、细腻、凝块结实;无豆腥味、有发酵豆乳特有香气;酸甜适中;整体感觉较为理想。1~3 d 储存期内品质基本不变。冷藏 7 d 时感官评分为 60,有一定的乳清析出、颜色稍黄、滋味平淡,整体可接受。综上,认为在 4℃ 冷藏条件下,1~3 d 储存期内品质优良,1~7 d 内豆乳综合品质较为稳定。

表 6 感官评价分数

Tab. 6 Scoring of sensory evaluation

储存时间/d	色泽	组织状态	气味	滋味	综合接受程度	总分
1	19	18	18	17	18	90
2	17	16	18	17	17	85
3	16	16	18	17	16	82
4	15	13	17	16	16	77
5	14	12	16	15	16	73
6	14	10	15	15	12	67
7	13	10	14	14	8	60

3 讨论

许多国内外学者对乳酸菌产 GABA 的研究进行了报道,并认为乳酸菌是可食用型 GABA 的良好来源。大多数乳酸菌产 γ -氨基丁酸的报道为合成培养基水平的优化,如 *L. plantarum* ATCC14917,以化学限定培养基为基础,发酵初始 pH 值为 5.5,发酵温度为 37℃,L-谷氨酸钠浓度为 100 mmol/L,接种量为 3%,发酵 36 h 时,添加 L-谷氨酸钠发酵液中 GABA 浓度为 721.35 mmol/L^[12]; *L. plantarum* MJ0301,葡萄糖质量浓度为 16 g/L、氮源(胰蛋白胍、酵母膏质量比 1:1)质量浓度为 10 g/L、L-谷氨酸钠质量浓度为 30 g/L、柠檬酸三胺质量浓度为 2 g/L、K₂HPO₄ 质量浓度为 2 g/L、乙酸钠质量浓度为 5 g/L、硫酸镁质量浓度为 0.1 g/L、硫酸锰质量浓度为 0.05 g/L、吐温 80 体积比为 1 mL/L。此时, *L. plantarum* MJ0301 产 GABA 的质量浓度为 1.59 g/L^[13]。也有一些研究者对乳酸菌在天然培养基中的 γ -氨基丁酸的产量进行了报道。如 SONG 等^[14]研究了 *L. rhamnosus* GG 赤豆乳中产 γ -氨基丁酸的情况(干物质质量分数为 5%),添加了 1.44% 半乳糖,2.27% L-谷氨酸钠和 0.20% 维生素 B₆,以 1% 的接种量(种子液的菌数为 10^8 CFU/mL),37℃,培养 36 h 的条件下, γ -氨基丁酸的质量浓度为 1.12 mg/mL。*L. brevis* BJ20 海带提取物发酵液中, γ -氨基丁酸的质量浓度为 2.465 mg/L^[15]。高产 γ -氨基丁酸的乳酸菌不仅与它们的 GAD 活性有关,而且与食物基质中谷氨酸、GAD 辅酶(磷酸吡哆醛)的浓度有关^[15],高产 γ -氨基丁酸的乳酸菌有开发功能性食品的潜力。

目前,多数对乳酸菌 GABA 产量优化的研究主要从增强 GAD 活性入手,其中重要的影响因素有底物谷氨酸或谷氨酸盐的浓度、接种量、发酵时间、发酵温度、环境 pH 值和发酵基质等。在本研究预试验中,发现外源添加的 L-谷氨酸钠对发酵体系的 γ -氨基丁酸质量浓度没有影响,可能是由于

豆芽乳本身含有的谷氨酸对于植物乳杆菌来说已经足量。GABA常在乳酸菌发酵的稳定后期达到最大值,发酵终点的酸度和营养匮乏程度影响到GABA的产量^[16]。在特定发酵时间内,接种量的变化会影响稳定后期的发酵参数,从而影响GABA的产量。GAD酶的含量和活力会直接影响GABA的产量。在发酵时间单因素优化试验中,0~24 h范围内,随着菌体量的增多,GAD的质量浓度不断增加,发酵乳pH值逐渐偏酸性,而乳酸菌GAD的最适pH值是偏酸性的,因此,GABA质量浓度不断增加。在发酵24 h后,GABA质量浓度开始下降,这可能是由于发酵体系的pH值不再适合谷氨酸脱羧酶的活性范围,乳酸菌GABA-T活性增加了GABA分解代谢的作用;另一方面外界环境刺激时,GABA的产生是细菌的一种自我防护机制,用来缓解压力和提高细菌存活力^[17]。在延长发酵时间的情况下,乳酸菌代谢产生GABA可能作为能量来源被消耗^[18]。发酵温度不仅影响GAD的催化活性,同时影响菌体细胞的生长和繁殖,因此发酵温度也是影响乳酸菌发酵过程中GABA积累量的关键因素。由于不同乳酸菌中GAD的性质不同,所以GABA最大积累时发酵温度具有种属特异性。一般来说,乳酸菌GAD的最适pH值是偏酸性的,最适温度在30~37℃的范围内。CHOI等^[19]对一株乳酸短杆菌产GABA的发酵条件进行初步优化,结果发现发酵温度为32℃时,该乳酸短杆菌合成GABA的量最大^[19]。*L. brevis* GABA057能在高酸性的环境下(pH值约为4.2)将10%的底物转化成GABA^[20],然而此时的酸性环境已经不宜菌体的生长。

*L. plantarum*能够耐胃酸和胆汁消化,黏附并定植于宿主肠道上皮细胞内,发挥多种有助于宿主健康的益生功能,因此常作为益生菌应用于发酵食品和保健品中。利用植物乳杆菌发酵果蔬,改善果蔬中活性成分组成,开发功能性饮品的研究已十分广泛^[21]。*L. plantarum*能够利用谷氨酸或其盐类,在

发酵过程中产生GABA是其诸多生理功能中的重要一项。在大豆发芽过程中,蛋白质和氨基酸含量都有显著的变化,大豆的营养价值得以提高。发芽本身还可以去除部分“豆腥味”,发芽不仅会使豆乳变得更益于人类健康,而且可能会促进乳酸菌发酵和 γ -氨基丁酸的产生。胡东良等^[22]研究了乳酸菌豆芽乳发酵特性,结果表明,乳酸菌在豆芽乳中生长良好,使豆芽乳pH值下降,产生凝乳作用。崔蕊静等^[23]采用保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌发酵豆芽乳,制成的酸豆奶风味独特,富有清香味,营养丰富,色泽近似酸牛奶,是一种优良的功能性乳制品。这也证明了开发富含 γ -氨基丁酸的乳酸菌发酵豆芽乳,有一定的实际应用价值。

4 结论

(1)研究了接种量、发酵时间、发酵温度对豆芽乳发酵体系中 γ -氨基丁酸质量浓度的影响。在单因素试验的基础上,采用CCD设计,以 γ -氨基丁酸质量浓度为响应值,进行响应面优化试验,利用Design-Expert 8.0.6软件分析得出发酵体系模型,并对试验结果进行预测。在此模型中,各因素对发酵乳的 γ -氨基丁酸质量浓度均有显著的影响。且发酵时间与发酵温度之间的交互作用极显著($P < 0.01$),植物乳杆菌接种量与发酵温度、植物乳杆菌接种量与发酵时间之间的交互作用显著($P < 0.05$)。发酵体系的最佳工艺条件是接种量3.5%、发酵时间27 h、发酵温度34.5℃。在此条件下 γ -氨基丁酸质量浓度预测值为1.62 g/L,试验验证值为1.61 g/L。

(2)豆芽发酵乳凝固状态均匀,乳清析出少,且有浓郁的发酵豆乳味香,风味纯正,无异味,发酵乳的pH值为4.6,最大活菌数为 1.60×10^9 CFU/mL。在4℃条件下贮藏1~3 d内,品质基本无变化,各项指标优良。1~7 d内综合品质达标。可见通过响应面优化法与模型的建立得到的发酵体系最佳工艺条件对实际生产具有指导意义。

参 考 文 献

- 1 IMAM M U, MUSA S N, AZMI N H, et al. Effects of white rice, brown rice and germinated brown rice on antioxidant status of type 2 diabetic rats[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13(10): 12952 - 12969.
- 2 YOSHIMURA M, TOYOSHI T, SANO A, et al. Antihypertensive effect of a γ -aminobutyric acid rich tomato cultivar 'DG03-9' in spontaneously hypertensive rats[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(1): 615 - 619.
- 3 PARK K B, OH S H. Production and characterization of GABA rice yogurt[J]. Food Science & Biotechnology, 2005, 14(4): 518 - 522.
- 4 SIRAGUSA S, DE A M, DI C R, et al. Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(22): 7283 - 7290.
- 5 LACROIX N, ST-GELAIS D, CHAMPAGNE C P, et al. Gamma-aminobutyric acid-producing abilities of lactococcal strains isolated from old-style cheese starters[J]. Dairy Science & Technology, 2013, 93(3): 315 - 327.

- 6 MBITHI S, CAMP J V, RODRIGUEZ R, et al. Effects of sprouting on nutrient and antinutrient composition of kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Rose coco)[J]. *European Food Research & Technology*, 2001, 212(2):188 – 191.
- 7 许建军, 江波, 许时婴. 谷氨酸脱羧酶的分离纯化及部分酶学性质[J]. *无锡轻工大学学报*, 2004, 23(3): 79 – 83.
XU J J, JIANG B, XU S Y. Purification and partial characterization of glutamate decarboxylase from *Lactococcus lactis*[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2004, 23(3): 79 – 83. (in Chinese)
- 8 渠岩, 李平兰, 王夫杰, 等. 发酵食品中产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌 S35 的筛选鉴定[J]. *中国农业大学学报*, 2010, 15(5): 104 – 109.
QU Y, LI P L, WANG F J, et al. Screening and identification of γ -amino butyric acid-producing *Lactobacillus plantarum* S35 from fermented food[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2010, 15(5):104 – 109. (in Chinese)
- 9 陈璐. 酸豆奶稳定性研究及配方设计[D]. 长春:吉林大学, 2013.
CHEN L. Studies on stability and formula design of the fermented soy-milk[D]. Changchun: Jilin University, 2013. (in Chinese)
- 10 张莉力, 许贺贺. 培养条件对大豆芽中 γ -氨基丁酸含量的影响[J]. *食品科技*, 2008, 33(2):34 – 35.
ZHANG L L, XU Y H. Effect of cultivation on the production of γ -amino butyric acid in soybean sprouts[J]. *Food Science & Technology*, 2008, 33(2): 34 – 35. (in Chinese)
- 11 KOOK M C, SEO M J, CHEIGH C I, et al. Enhancement of γ -aminobutyric acid production by *Lactobacillus sakei* B2 – 16 expressing glutamate decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917[J]. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 2010, 53(6): 816 – 820.
- 12 李理. 植物乳杆菌 γ -氨基丁酸产量影响因素及代谢途径的研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2015.
LI L. Study on influence factors and metabolic pathways of gamma-aminobutyric acid in *Lactobacillus plantarum*[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- 13 黄桂东, 毛健, 姬中伟, 等. 一株产 γ -氨基丁酸植物乳杆菌 MJ0301 培养基的优化[J]. *食品科学*, 2013, 34(17): 165 – 170.
HUANG G D, MAO J, JI Z W, et al. Optimization of culture medium formulation for γ -aminobutyric acid-producing *Lactobacillus plantarum* MJ0301[J]. *Food Science*, 2013, 34(17): 165 – 170. (in Chinese)
- 14 SONG H Y, YU R C. Optimization of culture conditions for gamma-aminobutyric acid production in fermented adzuki bean milk [J]. *Journal of Food & Drug Analysis*, 2017, 26(1): 1 – 8.
- 15 BAEJIN L, JINSOO K, KANG Y M, et al. Antioxidant activity and γ -aminobutyric acid (GABA) content in sea tangle fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from traditional fermented foods[J]. *Food Chemistry*, 2010, 122(1): 271 – 276.
- 16 DI C R, MAZZACANE F, RIZZELLO C G, et al. Synthesis of gamma-aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 86(2): 731 – 741.
- 17 COTTER P D, HILL C. Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH[J]. *Microbiology & Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(3):429 – 453.
- 18 KO C Y, LIN H T V, TSAI G J. Gamma-aminobutyric acid production in black soybean milk by *Lactobacillus brevis* FPA 3709 and the antidepressant effect of the fermented product on a forced swimming rat model[J]. *Process Biochemistry*, 2013, 48(4): 559 – 568.
- 19 CHOI S I, LEE J W, PARK S M, et al. Improvement of γ -aminobutyric acid (GABA) production using cell entrapment of *Lactobacillus brevis* GABA 057[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 16(4):562 – 568.
- 20 PENG C, HUANG J, SHENG H U, et al. A two-stage pH and temperature control with substrate feeding strategy for production of gamma-aminobutyric acid by *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2013, 21(10): 1190 – 1194.
- 21 赖婷, 张名位, 刘磊, 等. 龙眼果浆复合乳酸菌发酵工艺优化[J]. *农业工程学报*, 2016, 32(增刊 2):390 – 397.
LAI T, ZHANG M W, LIU L, et al. Optimization of process conditions of dry longan pulp fermented by complex lactic acid bacteria[J]. *Transactions of the CSAE*, 2016, 32(Supp. 2): 390 – 397. (in Chinese)
- 22 胡东良, 马铁俊, 王立梅, 等. 乳酸菌豆芽乳发酵特性的研究[J]. *食品科学*, 1994, 15(12): 8 – 12.
HU D L, MA T J, WANG L M, et al. Fermentation characteristics of lactic acid bacteria for the production of a germinated soybean-based fermented milk [J]. *Food Science*, 1994, 15(12): 8 – 12. (in Chinese)
- 23 崔蕊静, 肖念新, 杜彬. 发酵豆芽乳饮料加工工艺条件优化[J]. *中国粮油学报*, 2009, 24(4):138 – 143.
CUI R J, XIAO N X, DU B. Preparation of fermented bean sprout milk drink [J]. *Journal of the Chinese Cereals & Oils Association*, 2009, 24(4):138 – 143. (in Chinese)