

豆粕固态发酵产活性肽的发酵条件优化

刘玲,王红,刘茜

(沈阳农业大学 食品学院,辽宁 沈阳 110866)

摘要:以豆粕粉为原料,采用固态发酵法,接入产酶能力较强的米曲霉、黑曲霉和混合细菌进行发酵,以多肽转化率为指标对发酵过程中的发酵条件进行优化,单因素试验优化的发酵条件为:发酵时间 102 h,发酵温度 32℃,接种量 4%。采用响应面分析法确定最适发酵工艺条件为:接种量 2.6%,发酵温度 32℃,发酵时间 96~98 h,得到的大豆肽转化率为 38.13%。层析柱分析得到分子量在 500~1 000 Da 之间的肽段是具有特殊生理活性的功能肽。

关键词:豆粕;固态发酵;大豆肽转化率;发酵条件优化

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)06-0997-04

Optimization for Solid State Fermenting Condition of Producing Soybean Peptides from Soybean Meal Powder

LIU Ling, WANG Hong, LIU Qian

(College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China)

Abstract: The technology of producing soybean peptides from soybean meal powder was researched with *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* and mixed bacteria as fermentation strains. Single factor experiments showed the suitable conditions were fermented at temperature 32℃ for 102 h with inoculation quantity of 4%. The response surface methodology results showed that the optimum parameters were inoculation quantity 2.6%, temperature 32℃, fermentation time 96-98 h. Under such conditions, maximum conversion ratio of soybean peptides were 38.13%. The molecular weight of functional soybean peptides ranged from 500 to 1 000 Da by column chromatography.

Key words: Soybean meal; Solid-state fermentation; Conversion of polypeptides; Optimization of fermentation condition

豆粕是大豆经浸提脱油后的碎片状或粗粉状副产品,目前主要用于动物饲料。豆粕含有丰富的蛋白质^[1],且氨基酸分布合理,如果采用先进的生物技术将蛋白和氨基酸充分利用,将大大提高再生资源的利用率并提高大豆生产的经济效益。

豆粕蛋白的利用可以借鉴大豆蛋白的生产方式。目前,大豆多肽的生产已经完全实现工业化。它是大豆蛋白经酸、碱或酶水解后得到的由不同氨基酸组成的多肽链,一般平均肽链长度为 3~10 个氨基酸残基,主要分子量范围为 300~3 000 Da 的低分子量短链肽^[2]。大豆肽的生产主要有酶解法和微生物发酵法。酶解法是利用蛋白酶在最适温度和 pH 条件下进行大豆蛋白的酶解反应,把大分子蛋白降解为小分子肽类,再经加工精制生产出大豆肽产品;微生物发酵法以大豆蛋白或豆粕为原料,应用产蛋白酶的细菌或霉菌,经过发酵作用,得到具有良好功能性与营养特性的大豆肽,而且生产成本低,已成为国内外的研究热点^[3,4]。

黑曲霉、米曲霉和枯草芽孢杆菌是实验室中固

态发酵豆粕常用的菌种,该试验在这 3 株菌的基础之上又添加了乳酸菌和地衣芽孢杆菌,乳酸菌可在发酵过程中产生乳酸并可减少苦味的产生^[5-6];芽孢杆菌可产生大量菌体蛋白以增加发酵产品的蛋白含量,消除豆粕中的抗营养因子。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 原料 豆粕(蛋白含量 40%),麦麸,均为市场购买。

菌种:乳酸菌、地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉、米曲霉,实验室自备。

1.1.2 培养基 斜面培养基:察氏固体培养基;豆粕培养基:豆粕 1 g、麸皮 9 g、水 100 mL、蔗糖 2 g。原料豆粕不灭菌,培养基的 pH 为自然;察氏液体培养基。

1.1.3 试剂 葡聚糖凝胶(Sephadex G-25)、蓝色葡聚糖 2 000、三氯乙酸、双缩脲试剂、甲醛、氢氧化钠,其它试剂均为分析纯。

收稿日期:2011-08-21

第一作者简介:刘玲(1973-),女,副教授,从事食品质量安全研究。E-mail:liuling4568@sina.com。

1.1.4 仪器 恒温培养箱;振荡培养箱;高压灭菌锅;FJG-0.03型发酵罐;恒温数显水浴锅 HH-6;TD25-WS 低速自动平衡离心机;精密 pH 计;TU-1810 型紫外分光光度计;层析系统。

1.2 试验方法

1.2.1 固态发酵工艺流程 首先将豆粕粉碎,配料计量后进行灭菌处理;将混合菌株分别划线接入 PDA 培养基,用于菌种的活化,然后将活化菌株接入液体培养基扩大培养;将扩大培养的菌种以不同组合方式接入到豆粕培养基中,其料水比按 1:1,用于制备大豆肽;发酵后于 60℃ 烘干制样。

1.2.2 水解度(DH)测定 采用 Ph-Stat 法^[7]。

1.2.3 平均肽链长度的估计 设定 1 PCL(1 PCL \approx 1/DH)为酶水解后可得到的多肽的平均链长^[7]。该试验拟制备 3~6 个氨基酸残基的低肽混合物,所以 DH 的控制是水解过程的关键。由于 1 PCL \approx 1/DH,因此,在该试验中,选定 DH = 25% 为所要达到的水解度,此时 1 PCL 的理论计算值为 4。根据大豆多肽分子质量分布与苦味的关系可确定大豆蛋白水解液分子质量大部分应分布在 500 ~ 1 000 Da 之间。

1.2.4 多肽的提取及其转化率的计算方法 称取 5 g 发酵产品(精确至 0.0001 g),加蒸馏水 20 mL,50℃ 下水浴 6 h,然后在 121℃ 下灭酶 10 min,冷却后加入 5 mL 10% 三氯乙酸溶液,混合均匀,再加入 10 mL 5% 三氯乙酸溶液,静置沉降 5 min 后转到离心管中,在 4 000 r \cdot min⁻¹ 下离心 10 min,取上清液并转到 25 mL 比色管中定容。用双缩脲法测定上清液中的多肽含量^[8]。

$$\text{大豆肽转化率}(\%) = \frac{\text{酸溶蛋白含量}}{\text{原豆粕蛋白含量}} \times 100$$

1.2.5 大豆多肽分子量分布的测定 调整大豆多肽液蛋白浓度为 5% (W/V),以 1 mL 上样体积进行凝胶层析。柱条件:Sephadex G-25 (2.6 \times 100 cm),流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 220 nm,洗脱液为去离子水,分子量标品为蓝色葡聚糖 2 000 (2 000 kDa)、胰蛋白酶(233 kDa)、钴胺酰胺(VB₁₂, 1 355 Da)、还原谷胱甘肽(GSH, 307 Da)、甘氨酸(75 Da)。

2 结果与分析

2.1 标准曲线的绘制

取 12 支试管,分别加入 0、0.20、0.40、0.60、0.80、1.00 mL 标准酪蛋白溶液(500 mg \cdot mL⁻¹),用水补足到 1.00 mL,然后分别加入 4 mL 双缩脲试剂,充分摇匀后,室温下放置 30 min,在 540 nm 下进

行比色测定,平行试验 2 次。以光密度(OD)为纵坐标,以酪蛋白溶液浓度为横坐标做出酪蛋白标准曲线。

2.2 单因素试验

2.2.1 发酵时间对大豆肽转化率的影响 固定发酵温度为 32℃,接种量为 2%,发酵时间选取 84、90、96 和 102 h。从图 1 可以看出,随着发酵时间延长,多肽转化率逐渐增大,当达到 102 h 时,转化率最高 27.81%,以后肽转化率趋于下降。这是由于开始阶段,菌种繁殖产蛋白酶活性增强,蛋白酶水解大豆蛋白使大豆多肽含量增大;当大豆肽达到一定浓度会产生反馈抑制,同时产生的游离氨基酸越来越多。

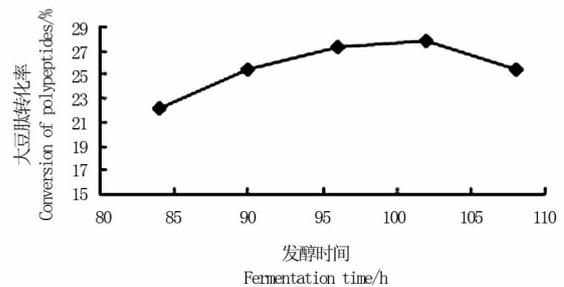


图 1 发酵时间对大豆肽转化率的影响

Fig. 1 Effect of fermentation time on conversion of soybean polypeptide

2.2.2 加水量对大豆肽转化率的影响 加水量分别为 55%、60%、65% 和 70%,从图 2 可以看出,加水量的不同对大豆肽的转化率影响不大,大豆肽的最大转化率和最小转化率相差只为 1%,所以加水量对豆粕的发酵来说不是最主要因素。

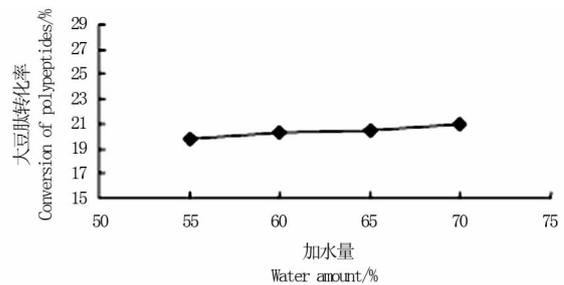


图 2 加水量对大豆肽转化率的影响

Fig. 2 Effect of water amount on conversion of soybean polypeptide

2.2.3 发酵温度对大豆肽转化率的影响 固定发酵时间为 96 h,接种量为 2%,选取发酵温度为 24、28、32 和 36℃。从图 3 可以看出,随着发酵温度的不断提高,大豆肽转化率增大。32℃ 和 36℃ 时大豆肽转化率相差不大,在 32℃ 时达到最大值 29.16%,然后趋于平缓,这是因为 30~32℃ 是这些混合菌种的最适生长温度,所以试验选取的温度应为 30℃ 左右。

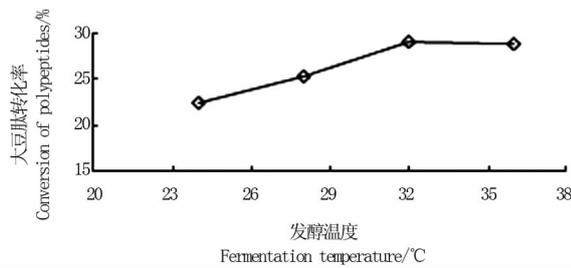


图3 发酵温度对大豆肽转化率的影响

Fig. 3 Effect of fermentation temperature on conversion of soybean polypeptide

2.2.4 接种量对大豆肽转化率的影响 固定发酵时间为 96 h, 发酵温度为 32℃, 试验选取 1%、2%、4% 和 8% 4 个不同接种量进行发酵。由图 4 可知, 接种量为 2% 和 4% 时大豆肽转化率相差不大, 当接种量在 4% 时大豆肽转化率达到最大, 最大值为 55%, 然后随着接种量的增大转化率呈降低趋势。由此可知, 4% 的接种量是此混合菌种的最佳接种量。

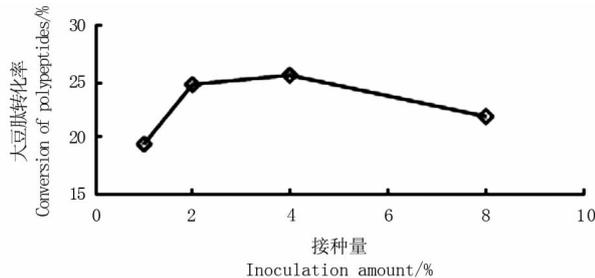


图4 接种量对大豆肽转化率的影响

Fig. 4 Effect of inoculation amount on conversion of soybean polypeptide

2.3 培养条件的优化

2.3.1 响应面分析法分析因素的选取及结果 综合单因素试验结果, 并根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计^[9]原则, 选择对混霉发酵大豆多肽影响较大的 3 个因素: 发酵时间 (X_1)、发酵温度 (X_2) 及接种量 (X_3), 每个自变量按低、中、高 3 个水平分别以 -1、0、1 进行编码, 并以多肽含量 ($Y/\%$) 为评判指标, 各因子及水平编码见表 1, 发酵后所得多肽含量见表 2。

表 1 试验因素水平编码表

Table 1 The factors and levels of encoding table

因素 Factors	代码 Codes	水平 Levels		
		-1	0	1
发酵时间 Fermentation period/h	X_1	90	96	102
发酵温度 Fermentation temperature/°C	X_2	28	32	36
接种量 Inoculation amount/%	X_3	1	2	4

表 2 RSA 试验设计及数据分析表

Table 2 RSA experimental program and result

试验号 No.	X_1	X_2	X_3	$Y/\%$
1	1	1	0	36.45
2	0	-1	1	35.84
3	1	-1	0	27.89
4	1	0	1	36.98
5	-1	0	-1	28.84
6	0	0	0	36.22
7	0	0	0	38.13
8	0	-1	-1	23.38
9	1	0	-1	25.35
10	0	0	0	36.27
11	-1	1	0	26.72
12	-1	0	1	27.69
13	0	1	1	32.11
14	0	1	-1	28.12
15	-1	-1	0	35.14

2.3.2 响应因素水平的优化 由回归方程所作的响应曲面图见图 5。通过该组图即可分析任何两因素间的交互作用, 并从中确定最佳因素水平范围。

由图 5 可以看出, 当发酵时间在 95~98 h、接种量在 2.6% 左右; 发酵温度在 30~32℃、接种量在 2%~2.9%; 发酵时间在 95~98 h、发酵温度在 31.5~33℃ 时大豆肽转化率均最高, 且最大值达 36.45% 以上。

2.3.3 回归与方差分析 由表 3 知以大豆肽转化率为响应值的回归方程如下:

$$Y = 36.8733 + 1.0350X_1 + 0.1438X_2 + 0.3663X_3 - 2.7354X_1^2 - 2.5879X_2^2 - 4.4229X_3^2 + 4.2450X_1X_2 + 3.1950X_1X_3 + 2.1175X_2X_3$$

表 3 C8 的估计回归系数

Table 3 Regression of C8

项 Item	系数 Coefficient	系数标准误 Standard	T 值 T Value	P
常量 Constant	36.8733	0.7438	49.577	0.000
X_1	1.0350	0.4555	2.272	0.072
X_2	0.1438	0.4555	0.316	0.765
X_3	3.3663	0.4555	7.391	0.001
X_1X_1	-2.7354	0.6704	-4.080	0.010
X_2X_2	-2.5879	0.6704	-3.860	0.012
X_3X_3	-4.4229	0.6704	-6.597	0.001
X_1X_2	4.2450	0.6441	-6.597	0.001
X_1X_3	3.1950	0.6441	4.960	0.004
X_2X_3	2.1175	0.6441	-3.287	0.022

由表 4 可知, 此模型的 R^2 为 0.9333, $P = 0.0030 < 0.0500$, 响应面回归模型达到显著水平, 模型失拟值 $P = 0.396 > 0.1000$, 即失拟性不显著, 说明该模型拟合程度好, 试验误差小, 可用此模型对固态发酵豆粕生产多肽的发酵条件进行分析。通过对以上响应面的分析得出: 混霉固态发酵豆粕生产多肽的最佳发酵条件为: 发酵时间为 96~98 h, 发酵温度为 32℃, 接种量为 2.6%, 得到的大豆肽转化率为 38.13%。

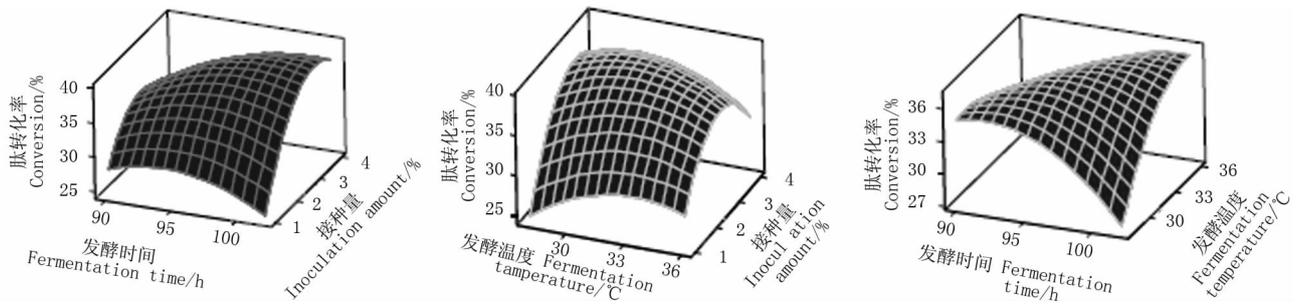


图5 大豆肽转化率与发酵时间、发酵温度及接种量间的曲面图

Fig.5 Response of conversion of soybean polypeptide among fermentation period, fermentation temperature and inoculation amount

表4 方差分析表

Table 4 Analysis of variance results

来源 Source	自由度 df	顺序 方差和 Seq SS	调整 方差和 Adj SS	调整 方差 Adj MS	F 值 F Value	P 值 P Value
回归 Regression	9	39.873	39.873	37.764	22.76	0.002
线性 Linear	3	99.388	99.388	33.129	19.96	0.003
平方 Square	3	109.638	109.638	36.546	22.02	0.003
交互作用 Interaction	3	130.847	130.847	43.616	26.28	0.002
残差误差 Residual error	5	8.298	8.298	1.660		
失拟 Lack of fit	3	5.928	5.928	1.976	1.67	0.396
纯误差 Pure error	2	2.370	2.370	1.185		
合计 Total	14	48.171				

2.4 水解度及平均链长测定结果

由以上混合霉菌固态发酵的大豆肽水解度为23.36%,由于平均链长为水解度的倒数,则其平均链长为1/23.36%,约为4~5,与理论预测值相符。

2.5 分子量的测定

标准物质洗脱体积的测定分别用质量浓度为 $1\text{mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蓝色葡聚糖凝胶(M 2 000 Da)、抑肽酶(M 6 512 Da)、VB₁₂(M 1 355 Da)、还原谷胱甘肽(M 307 Da)、甘氨酸(75 Da)溶液各1mL上Sephadex G-25层析柱,洗脱。根据颜色和吸光值判断,上述标准物质的保留时间分别为20、35、50和65 min。将水解后水解度为23.36%的大豆肽经过Sephadex G-25葡聚糖凝胶层析上样,将各个峰分段收集然后与标准物质的洗脱时间进行比对,得出保留时间在35~50 min的洗脱峰分子量为500~1 000 Da。

3 结论

试验通过响应曲面法优化得到固态发酵豆粕生产多肽的最佳发酵条件。利用乳酸菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、米曲霉及黑曲霉的混合菌种进行发酵,当接种量为2.6%,发酵温度为32℃,发

酵时间为96~98 h时,豆粕肽的转化率达到最高值38.13%。发酵菌种中添加的乳酸菌可使豆粕肽的苦味大大降低。由此可见,利用混合菌种发酵豆粕生产多肽是比较理想的方法。同时利用Sephadex G-25层析柱对此豆粕肽的分子量进行分析,确定分子量在500~1 000 Da之间的物质是具有特殊营养作用的活性肽。

参考文献

- [1] 胡梦红,王有基,熊邦喜,等.豆粕中水产饲料中的应用研究[J].饲料工业,2007,28(12):60-62. (Hu M H, Wang Y J, Xiong B X, et al. Research of soybean meal in aquatic feed[J]. Feed Industry, 2007, 28(12):60-62.)
- [2] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学(第三版)[M].北京:高等教育出版社,2002:163. (Wang J Y, Zhu S G, Xu C F. Biochemistry (The third edition) [M]. Beijing: Higher Education Press, 2002:163.)
- [3] 余勃,陆兆新.发酵豆粕生产大豆多肽研究[J].食品科学,2007,28(2):189-192. (Yu B, Lu Z X. Production of soybean peptide by defatted soy meal [J]. Food Science, 2007, 28(2):189-192.)
- [4] 李善仁,林新坚,蔡海松,等.混菌发酵豆粕制备大豆肽的研究[J].中国粮油学报,2009,24(12):53-57. (Li S R, Lin X J, Cai H S, et al. Study on soybean peptides from fermented soybean meal by mixed strains[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2009, 24(12):53-57.)
- [5] Gome Z M J, Gaya P, Nunez M, et al. Debittering activity of peptidases from selected lactobacilli strains in model cheeses [J]. Milchwissenschaft, 1996, 51:315-319.
- [6] 万琦,陆兆新,高宏.脱苦大豆多肽产生菌的筛选及其水解条件的优化[J].食品科学,2003,24(2):29-32. (Wan Q, Lu Z X, Gao H. Study on screening of a *Bacillus subtilis* strain to produce debittering soybean peptides and optimizing its liquid fermentation conditions [J]. Food Science, 2003, 24(2):29-32.)
- [7] Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins [M]. New York: Elsevier Applied Science Publishers, 1986:122-124.
- [8] Cotton F, Delobbe E, Gulbis B. Assessment of a biuret method without concentration step for total protein determination in cerebrospinal fluid [J]. Clinical Biochemistry, 1997, 30(4):313-314.
- [9] 刘晓艳,于纯森,国立东,等.固态发酵高温豆粕制备多肽饲料的最优发酵工艺条件研究[J].大豆科学,2011,30(2):285-289. (Liu X Y, Yu C M, Guo L D, et al. Optimization on solid state fermentation conditions of producing polypeptide feed from high-temperature soybean meal [J]. Soybean Science, 2011, 30(2):285-289.)