

刘明¹, 谭斌¹, 吴永沛², 谭红卓¹, 田晓红¹

(¹国家粮食局科学研究院, 北京 100037; ²集美大学生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 筛选和优化液态发酵法生产大豆抗氧化活性肽的条件。以总抗氧化活性的强弱为指标, 通过对发酵温度、种龄、pH 值、接种量、料液比、发酵时间等条件作单因素、析因试验确定主要影响因素, 并采用最速上升试验和中心组合二次旋转回归响应面法优化 pH 值、接种量。优化获得液态发酵大豆抗氧化活性肽的最佳工艺参数为发酵温度 37℃, 种龄 36 h, pH 值为 7.39, 接种量为 5.19%, 料液比 4%, 发酵时间 36 h。在此条件下发酵产物总抗氧化活性 795.75 U·g⁻¹ (豆粕), 试验值与预测值基本相符。

关键词: 液态发酵; 大豆抗氧化肽; 总抗氧化性; 响应面分析法

中图分类号: Q815, S529, TQ936.1+6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2008)03-0509-06

Optimization of Condition for Liquid State Fermenting Soybean Antioxidative Peptide

LIU Ming¹, TAN Bin¹, WU Yong-pei², TAN Hong-zhuo¹, TIAN Xiao-hong¹

(¹Academy of State Administration of Grain, Beijing, 100037; ²College of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, Fujian, China)

Abstract: In order to optimize the liquid state fermenting conditions of soybean antioxidative peptide, the single factor experiments and factorial experiment design for medium rate, fermentation temperature, inoculative rate, primary pH value and water addition were carried out using total antioxidant activity as index. Then the reactive temperature and pH were optimized by steepest ascent design and secondary regression common rotary combination design. Results showed that suitable technological conditions of liquid state fermentation for soybean antioxidative peptide were: the medium rate 4%, inoculative rate 5.19%, age of inoculum 36 h, fermentation temperature 37.0℃, primary pH value 7.39, and fermentation time 36 h. Under the optimal conditions, the total antioxidant activity of fermentative product reaches 795.75 U·g⁻¹ bean residue. The experimental result is basically agreed with the predicted value.

Key words: Liquid state fermentation; Soybean antioxidative peptide; Antioxidant activity; Response surface methodology

大豆抗氧化活性肽(Soybean antioxidative peptide)是大豆蛋白水解产物中具有清除羟基自由基^[1]、终止单线态氧的生成^[2]、螯合重金属离子捕捉体内自由基^[3]等抗氧化功效的部分。它具有抗氧化、延缓机体衰老、调节机体免疫等生理功能,可开发成为多种功能的保健食品,在食品行业存在巨大的应用潜力^[4]。利用大豆及其加工副产物(豆粕、豆饼)生产抗氧化肽显示出了良好的市场前景,相关研究迅速成为大豆深加工领域的热点。

目前国内外多是采用商品蛋白酶水解大豆蛋白制备抗氧化肽,大部分研究集中在酶解工艺优化方面,而对于如何降低成本、革新工艺方面所进行的研究不够深入。用商品蛋白酶水解大豆蛋白虽然操作简单、水解条件温和,但存在得率低、成本高的技术缺陷。因此亟需一种成本低、产量大的抗氧化肽制备技术。

液态发酵是以液相为连续相的发酵过程,具有营养物质浓度和微生物分布均匀混合有效,接种量小,

技术成熟自动化程度高可实现发酵过程控制,产物纯化相对简单等优点^[5]。以此为出发点,采用液态发酵方法,以总抗氧化活性指标为依据,使用二次回归通用旋转组合设计方法优化发酵大豆抗氧化肽的最佳工艺条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

Jb009 为集美大学生物工程学院微生物实验室保存菌株。

1.2 培养基

斜面种子培养基:牛肉膏 0.3 g,蛋白胨 1.0 g, NaCl 0.5 g, 自来水 100 mL;琼脂 20 g, pH7.4~7.6, 121℃ 灭菌 20 min;摇瓶种子扩大培养基:KH₂PO₄ 0.03 g, 豆饼粉 4.0 g, Na₂CO₃ 0.1 g, Na₂HPO₄ 0.4 g, 自来水 100 mL, pH9.0(灭菌前)。

1.3 试验药品

市售豆粕粉碎过 30 目筛;Na₂HPO₄·10H₂O、KH₂PO₄、Na₂CO₃等所有试剂均为分析纯;T-AOC 试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.4 试验仪器

Cary 50 Probe 紫外可见分光光度计(美国, Varian), PHS-2C 型精密酸度计(上海雷磁)、HQ45B 恒温摇床(中科院武汉科学仪器厂)、Avanti J-25 高速冷冻离心机(美国, Beckman)、灭菌涂布培养基全套设备、SP-DJ 垂直净化工作台(上海浦东伟普)、固体样品粉碎机(荣华仪器公司)、HZS-H 型水浴振荡器(哈尔滨东联)、超纯水制作装置 RiOs(美国, Millipore)。

1.5 试验方法

1.5.1 种子培养 将菌种活化,取 1~3 环接入已灭菌的装有 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中,在 37℃、160 r·min⁻¹摇床中培养 48 h。

1.5.2 液态发酵培养 在 250 mL 三角瓶中加入 4 g 豆粕,并加入自来水定容 100 mL,调节 pH 值,121℃ 下灭菌 30 min,冷却至 40℃ 接入种子液,于 37℃、160 r·min⁻¹摇床中培养。发酵结束后将发酵产物在沸水浴中灭酶 5 min,5 000 r·min⁻¹离心 20 min 取上清液待测。

1.5.3 总抗氧化性的测定 抗氧化物质能将 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺,而 Fe²⁺ 能使菲啉类物质形成稳固的络合物,在 520 nm 下通过比色测出其抗氧化能力的高低。定义为每分钟每毫升抗氧化物质使反应体系得吸光度(OD)值每增加 0.01 时,为一个总抗氧化活性单位(U)。操作方法根据南京建成公司总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒说明书,3 次重复。

公式:

$$X = \frac{A_1 - A_0}{0.01} \div 30 \times \frac{V}{V_0} \times m$$

式中:X 为总抗氧化活性(U·mL⁻¹);A₁为测定管 OD 值;A₀为对照管 OD 值;V 为反应液总体积(mL);V₀为取样量(mL);m 为稀释倍数。

1.5.4 优化试验方法 采用响应面分析法对提取条件进行优化研究,整个试验分 4 个阶段进行。首先是用单因子试验确定各因素值得范围;其次,通过析因试验确定主要影响因素;再次,用最速上升试验找出稳定区域;最后,用中心组合试验拟合稳定点附近的响应模型,并分析优化得到最佳工艺条件。每个处理进行 3 个重复试验取其平均值进行分析^[6]。

1.5.5 数据处理 数据采用统计均数(平均数)±标准差来表示,用 t 检验进行显著性分析。试验数据用 SAS8.2 统计软件进行方差与回归分析拟合出模型^[7],并采用 Mathematica5.2 软件作图。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 发酵温度对液态发酵大豆抗氧化肽总抗氧化活性的影响 温度对微生物生长的影响不仅表现在对细胞表面的作用上,而且因热平衡的关系热传递至细胞内部,对胞内所有的结构物质都会产生作用。由于生命体的生命活动可以看做是相互连续进行的酶反应的表现,任何酶反应都与温度有关,温度会直接影响细胞内部酶反应的速率。为了摸索发酵温度对液态发酵大豆抗氧化肽总抗氧化活性的影响,在固定种龄为 36 h, pH 值为 7.0,接种量为 5%,料液比为 1:25,发酵时间为 48 h 条件下,研究随着发酵温度不同对液态发酵大豆抗氧化肽总抗氧化活性的影响,其结果如图 1 所示。

从图 1 可以发现采用液态方式发酵大豆抗氧化活性肽的总抗氧化活性随温度的增高而增高,说明了随着温度的提高 Jb009 的活力也不断增强。当温度提高到 37℃ 时达到最高,达到了发酵菌株的最适发酵温度,当温度继续升高达到 42℃ 后活力有所下降。因此选择 37℃ 为发酵温度。

2.1.2 发酵时间对大豆发酵产物抗氧化活性的影响 发酵时间也是产物抗氧化活性的重要影响因素,过短的发酵时间导致豆粕不能充分的被微生物利用,水解成具有抗氧化作用的小肽,而过长的发酵时间不仅会造成能源的浪费,也会使抗氧化作用较强的小肽被进一步水解为氨基酸从而使产物中抗氧

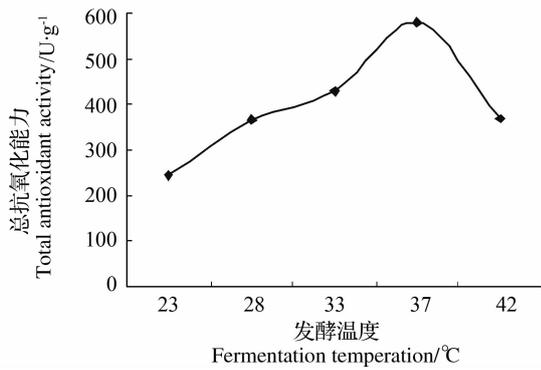


图1 发酵温度对产物总抗氧化活性的影响

Fig. 1 Effect of fermentation temperature on total antioxidant activity of product

化活性降低,因此控制适当的发酵时间对试验的成败至关重要。在固定发酵温度为 37℃、种龄为 36 h、pH 值为 7.0、接种量为 5%、料液比为 1:25 条件下仅改变液态发酵的反应时间,研究随着发酵时间不同对液态发酵大豆抗氧化肽总抗氧化活性的影响,其结果如图 2 所示。

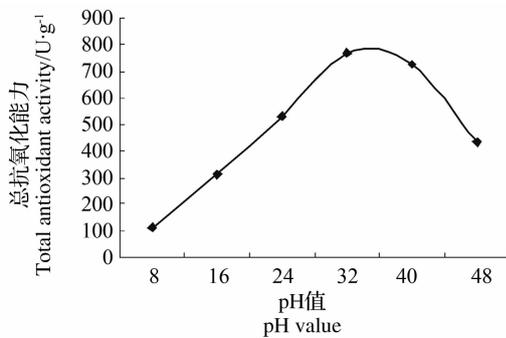


图2 发酵时间产物总抗氧化活性的影响

Fig. 2 Effect of fermentation time on total antioxidant activity of product

根据图 2,液态发酵大豆抗氧化肽的抗氧化活性随发酵时间的增加而有所提高,当发酵时间达到 32 h 时,达到一个较高的水平。因此可选用 32 h 为析因试验的零水平点。

2.1.3 培养基初始 pH 值 培养基的氢离子浓度对微生物的生命活动有显著的影响。各种微生物都有自己生长和合成酶的最适 pH。培养基 pH 在发酵过程中能被菌体代谢所改变,阴离子被吸收或氮源被利用后产生 NH_3 导致 pH 上升,阳离子被吸收或有机酸积累引起 pH 下降。发酵中起关键作用的各种酶需要在一定 pH 值条件下才能起到最佳的发酵效果,而且有可能各个酶所需要的 pH 并不一样,因此选择适当的 pH 直接关系到发酵的速度^[8]。试

验固定在发酵温度为 37℃、种龄为 36 h、接种量为 5%、料液比为 1:25,发酵时间 32 h 条件下,改变反应前体系 pH 从 5.5~9.0,研究 pH 值的变化对总抗氧化活性的改变情况,结果如图 3 所示。

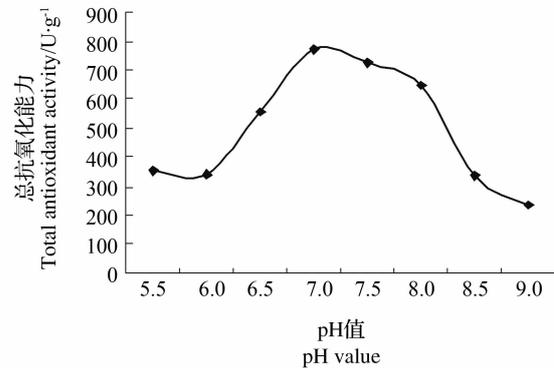


图3 培养基初始 pH 值对产物总抗氧化活性的影响

Fig. 3 Effect of medium primary pH on total antioxidant activity of product

从图 3 中得到,产物中抗氧化活性在初始 pH 值小于 7.0 时随 pH 的提高而有所上升,当超过 7.0 以后逐渐下降。在 7.0 左右时抗氧化肽体系中总抗氧化活性达到一个较高的水平,因此选择 pH7.0 作为 pH 值析因试验的零水平点。

2.1.4 接种量对大豆发酵产物抗氧化活性的影响

接种量的大小会直接影响发酵周期,大量地接入成熟的菌种,可以缩短生长过程的延滞期,缩短发酵周期,节约发酵培养的动力消耗,提高设备利用率,并且有利于减少染菌的机会。因此在发酵过程中经常将菌种扩大培养,但如果培养基内的营养物对细胞生长适宜,则接种量的影响就较小。一般说来接种量和细胞生长的延滞期长短呈反比,但接种量过大也会增加发酵成本,并过多的移入代谢废物影响发酵的正常进行^[9]。因此为了优化接种量固定发酵温度为 37℃、种龄为 36 h、料液比为 1:25,发酵时间 32 h,初始 pH 值为 7.0 的条件下,加入不同量的种子液,随着种子液加入量的不断提高,产物总抗氧化活性的改变,结果如图 4。

从图 4 看出,当接入种子液在 4% 左右时,体系中总抗氧化活性达到较高水平,因此选择 4% 为零水平点作析因试验。

2.2 析因试验

从单因素试验得到几组条件的范围,另外菌种培养的好坏也影响着发酵阶段,而对菌种的培养时

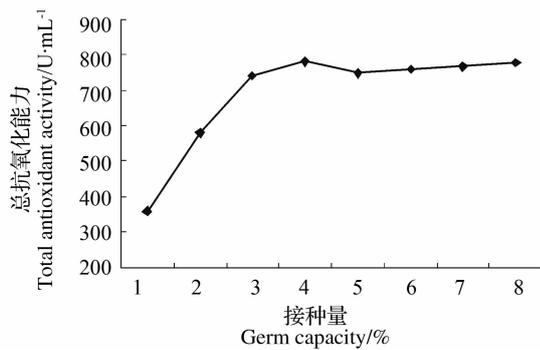


图4 接种量对产物总抗氧化活性的影响

Fig. 4 Effect of inoculative amount on antioxidant activity of product

间的掌握至关重要,培养时间过短,有可能会延长整个的发酵周期,培养时间过长,则会使菌种过于老化,使转化率和产酸率都下降,所以必须选择适当的培养时间。因此选取对液态发酵大豆抗氧化活性肽的5个影响因素种龄、pH值、接种量、料液比、发酵时间作析因试验。综合考察5个因素对抗氧化体系中总抗氧化活性的影响。试验设计与结果如表1所示。当 $x_1x_2x_3x_4x_5$ 均处于高水平时,体系中具有最高抗氧化性,此时达到 $786.18 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (豆粕)。当 $x_1x_2x_3x_4$ 均为低水平,而 x_5 为高水平时系统中具有最小的总抗氧化活性,此时仅为 $541.68 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (豆粕)。

表1 液态发酵析因试验设计与结果

Table 1 Experimental matrix and results of liquid state fermentive fractional factorial experiment design

编号 No.	X_1 种龄 Inoculum age	X_2 pH值 pH value	X_3 接种量 Inoculative amount	X_4 加料量 Medium capacity	X_5 发酵时间 Fermentation time	Y 总抗氧化活性 Antioxidant activity
1	1(48)	-1(6)	-1(2%)	1(6%)	1(48)	561.86
2	1	1(8)	1(6%)	1	1	786.18
3	-1(24)	1	-1	1	-1(24)	699.62
4	1	1	-1	-1(2%)	-1	723.72
5	1	-1	1	-1	-1	637.79
6	-1	-1	1	1	-1	635.22
7	-1	1	1	-1	1	779.59
8	-1	-1	-1	-1	1	551.68
9	0(36)	0(7)	0(4%)	0(4%)	0(36)	671.19
10	0	0	0	0	0	680.09
11	0	0	0	0	0	670.42
12	0	0	0	0	0	684.51

表2 液态发酵析因试验回归分析

Table 2 Anova and parameter estimations of liquid fermentation

因素 Source	自由度 DF	离均差平方和 Anova SS	均方 MS	均方比 F value	显著程度 Pr > F
X_1	2	292.18327	146.09163	4.05	0.3316
X_2	2	45441.12327	22720.56163	629.54	0.0282
X_3	2	11449.25532	5724.62766	158.62	0.0561
X_4	2	68.55532	34.27766	0.95	0.5873
X_5	2	92.59927	46.29963	1.28	0.5296

表1数据采用SAS软件分析, F 值为158.89, $Pr > F = 0.0617$,接近0.05水平因此回归方程较显著。从表2看到, x_2 因素中 $Pr > F = 0.0282 < 0.05$,在0.05水平上极显著差异; x_3 因素中 $Pr > F = 0.0561$,接近0.05水平,也具有较显著的显著性, $x_1x_4x_5$ 显著性较差。因此选择 x_2x_3 两项作最速上升试验。

2.3 最速上升试验

固定 $x_1x_4x_5$ 3个因素为零水平(即种龄36h,料液比4%,发酵时间36h),针对 x_2x_3 作最速上升试验见表3。随着 x_2x_3 两个因素的迅速上升,Y值总抗氧化活性也随之提高,到达试验号2时达到最高点,即pH7.6,接种量为5%时系统总抗氧化活性达到 $766.622 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (豆粕)。

表3 最速上升试验结果

Table 3 Experimental matrix and results of steepest ascent design

编号 No.	0	1	2	3	4	5	6
X ₂	7.0	7.3	7.6	7.9	8.2	8.5	8.8
X ₃	4%	4.5%	5%	5.5%	6%	6.5%	7%
Y	592.924	625.574	766.622	577.252	532.848	525.012	522.4

2.4 采用响应面分析法对固体发酵大豆抗氧化肽工艺的优化

根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理^[10],综合单因素影响试验结果,选取变化对发酵结果影响最为显著的 pH 值和酶液比两个因素采用二因素的响应面分析方法。由 p = 2 查表得^[6] m₀ = 5, n = 13, r = 1.414。确定 pH 值 x₂ 的零水平为 x₀₂ = 7.6, Δ2 = 1.6; 接种量 x₃ 的零水平为 x₀₃ = 5%, Δ3 = 2%。共有 13 个试验点,其中 8 个为析

因子,5 个为零点。零点试验进行 3 次以估计误差。设计二因素二次回归通用旋转组合试验,测定总抗氧化活性如表 4。查表得 K = 0.2, E = -0.1, F = 0.14375, G = 0.01875, e⁻¹ = 0.125 和 m_{c-1} = 0.25, 试验以随机次序进行,重复 3 次,获得的总抗氧化活性和水解度的平均值方程、响应面分析图和方差分析表。采用回归方程: Y = b₀ + b₁x₁ + b₂x₂ + b₃x₁x₂ + b₄x₁² + b₅x₂² 由表 4 的数据,计算出回归方程中各系数。

表4 产品总抗氧化性二因素二次回归通用旋转组合设计及试验结果

Table 4 Two factors secondary regression common rotary combination design and experimental results for product's total antioxidant activity

编号 No.	x ₀	x ₂ pH 值 pH value	x ₃ 接种量 Inoculative amount	x ₂ x ₃	x ₂ ²	x ₃ ²	Y 总抗氧化活性 Antioxidant activity
1	1	1(9.2)	1(7%)	1	1	1	718.08
2	1	1	-1(3%)	-1	1	1	737.02
3	1	-1(6.0)	1	-1	1	1	741.45
4	1	-1	-1	1	1	1	746.65
5	1	1.414(9.86)	0(5%)	0	2	0	740.27
6	1	-1.414(5.34)	0	0	2	0	751.47
7	1	0(7.6)	1.414(9.86)	0	0	2	746.96
8	1	0	-1.414(2.17%)	0	0	2	693.66
9	1	0	0	0	0	0	800.34
10	1	0	0	0	0	0	805.53
11	1	0	0	0	0	0	764.44
12	1	0	0	0	0	0	805.66
13	1	0	0	0	0	0	799.25
b _{j(Y)}	985 0.78	-48.8503	51.2262	-13.74 5	5926.68	5824.44 5	9850.78

表5 回归系数取值

Table 5 Assigned concentrations of regression equation coefficient

回归系数(j) Regression coefficient	总抗氧化活 性方程(b _j) Antioxidant activity equation	回归系数检验(F _j) Regression coefficient inspection	显著性 Significance
0	795.043	8038.857	**
1	-6.10629	78.2858	**
2	6.403275	82.09327	**
3	-3.43625	31.2386	**
4	-23.9092	284.633	**
5	-36.6885	436.768	**

由表 5 各系数在不同程度上显著,所以得到总

抗氧化活性二次回归公式为: Y = 795.043 - 6.106x₂ + 6.403x₃ - 3.436x₂x₃ - 23.909x₂² - 36.689x₃²; 响应面见图 5。

采用 SAS 软件分析得到 F_{1f} = 1.427 < F_{0.1(3,4)} = 4.19, 说明回归方程的拟合不足是不显著的, 试验无其他因素的显著影响, 模型是适合的。而 F = 7.857 > F_{0.01(5,7)} = 7.46, 说明回归显著, 因此说明二次回归模型是合适的。

对模型方程 Y = 795.043 - 6.106x₂ + 6.403x₃ - 3.436x₂x₃ - 23.909x₂² - 36.689x₃² 求 x₂, x₃ 一阶偏导