

响应面分析法优化豆粕固态发酵工艺生产大豆抗氧化肽的研究

陈洁梅* 徐聪聪 常磊 刘永萍 缪冰旋

(暨南大学生命科学技术学院生物工程学系 广州 510632)

摘要 分别以总抗氧化活性(T-AOC)和多肽含量为评价指标,通过单因素实验分析和 Box-Behnken 响应面分析法对豆粕固态发酵工艺条件进行优化,得到最佳发酵工艺条件为:接种量 9.6%,料水比 1:0.9,发酵温度 35℃。豆粕在此条件下发酵 48h,其总抗氧化活性与多肽含量分别由发酵前的 207.2U/g 和 21.0mg/g 提高到 1091.1U/g 和 347.7mg/g,分别提高了 4.3 倍和 15.6 倍,与预测值相比,结果吻合性良好。总抗氧化活性与多肽含量的相关性良好($R^2 = 0.8604$),表明得到的多肽为抗氧化肽。

关键词 抗氧化肽 响应面分析法 总抗氧化活性 固态发酵

中图分类号 TQ920.1

豆粕(SBM)是大豆提油后的副产品,其蛋白含量高,必需氨基酸分布合理,是一种优质的植物性蛋白资源^[1]。为了提高豆粕附加值,利用豆粕来生产大豆抗氧化肽的研究已经开始引起人们的注意^[2-3]。

大豆抗氧化肽(soybean antioxidative peptide)即大豆蛋白酶解产物,是由一些小分子肽段组成的具有抗氧化活性的大豆低聚肽^[4],具有抗疲劳^[5],延缓机体衰老,调节机体免疫^[6]以及降低胆固醇^[7]等生理功能,是一种重要的功能性多肽。目前国内外大多采用商品酶水解大豆蛋白的方法生产大豆抗氧化肽,此方法反应条件温和、操作简单,但是由于商品酶制剂成本高昂、生产过程中易产生苦味、臭味等原因,从而限制了它的广泛应用^[8-9]。而微生物固态发酵的方法不但可以克服酶解法产品的苦味、臭味等口感差的缺点,而且生产成本较低,易于规模化生产,具有重要的理论价值和应用价值,前景广阔^[10-11]。

本研究以豆粕为原料,以芽孢杆菌 JM3 为菌种,在豆粕固态发酵单因素实验分析的基础上,选择料水比、接种量和发酵温度为自变量,以总抗氧化活性和多肽含量为响应值,采用 Box-Behnken 响应面分析的方法优化豆粕固态发酵工艺,从而获得最佳发酵条件,缩短生

产周期,降低生产成本,提高豆粕利用率,为大豆多肽的生产开发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与培养基

豆粕:经粉碎机粉碎,由肇庆市益信农业发展有限公司提供;

营养琼脂斜面培养基:牛肉膏 3g/L、蛋白胨 10g/L、NaCl 5g/L、琼脂粉 20g/L、pH 值(7.4 ± 0.2)。

液体种子培养基:牛肉膏 3g/L、蛋白胨 10g/L、NaCl 5g/L、pH 值(7.3 ± 0.2)。

发酵培养基:将 50g 豆粕装入 250ml 锥形瓶中,加适量的水混匀,121℃ 条件下灭菌 20 min。料水比根据具体实验设计而定。

菌种:芽孢杆菌 JM3 为暨南大学生物工程学系微生物实验室保存菌种。

1.2 方法

1.2.1 豆粕固态发酵单因素实验 在 250ml 锥形瓶中加入 50g 豆粕,根据实验设计加入一定比例的自来水混合均匀,在 121℃ 条件下灭菌 20min。冷却后接种菌液分别对接种量、料水比和初始发酵温度进行单因素发酵实验。发酵过程中每隔 10h 振摇培养基一次,以使豆粕和菌体充分混匀,发酵时间为 48h。发酵结束后取

收稿日期:2012-09-24 修回日期:2012-10-08

* 电子信箱:54675565@qq.com

适量样品 60℃ 烘干并粉碎,测定总抗氧化活性和多肽含量。

1.2.2 总抗氧化活性的测定^[12] 根据 NY/T1205-2006 中的方法提取豆粕水溶性蛋白,测定水溶性蛋白的总抗氧化活性。测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所,每个样品测定 3 次。

1.2.3 多肽含量的测定 多肽含量以酸溶性蛋白含量计,取 10ml 水溶性蛋白提取液加入 10ml 15% 的三氯乙酸(TCA)溶液,振荡片刻后静置 10min,4000 r/min 离心 5 min,上清液即为酸溶性蛋白提取液。酸溶性蛋白含量的测定采用凯氏定氮法,参照 GB/T5009. 5-2003。

1.2.4 Box-Behnken 响应面分析法^[13] 通过豆粕固态发酵单因素实验所确立的因素水平表,以总抗氧化活性和多肽含量为响应值,建立多元二次回归方程。利用 Design-Expert. 8.0 软件对回归方程进行模型回归和方差分析,确定豆粕固态发酵最佳工艺条件。

2 结果与分析

2.1 接种量、料水比和发酵温度对豆粕总抗氧化活性及多肽含量的影响

接种量、料水比和发酵温度对豆粕总抗氧化活性及多肽含量的影响如图 1、图 2、图 3 所示。根据图中结果所示,并结合实际生产条件,本研究选择接种量 8%、10%、12%,料水比 1:0.8、1:0.9、1:1,发酵温度 31℃、33℃、35℃作为响应面分析的 3 个水平点。

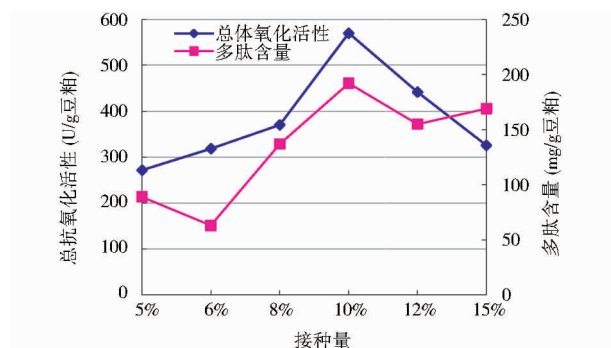


图 1 接种量对豆粕固态发酵总抗氧化活性和多肽含量的影响

Fig. 1 Effect of inoculative amount on T-AOC and polypeptide content of soybean meal by solid-state fermentation

2.2 响应面分析法对豆粕固态发酵工艺条件的优化

2.2.1 中心组合设计实验 根据 Box-Behnken 响应面

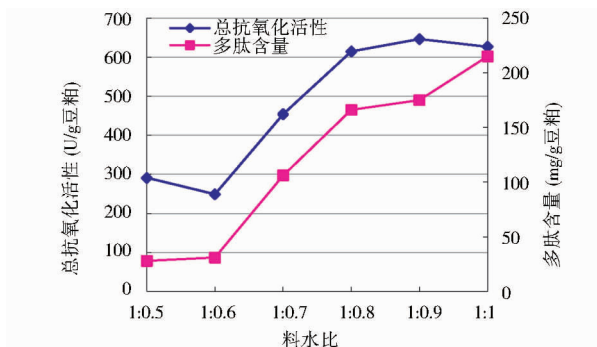


图 2 料水比对豆粕固态发酵总抗氧化活性和多肽含量的影响

Fig. 2 Effect of ratio of material to water on T-AOC and polypeptide content of soybean meal by solid-state fermentation

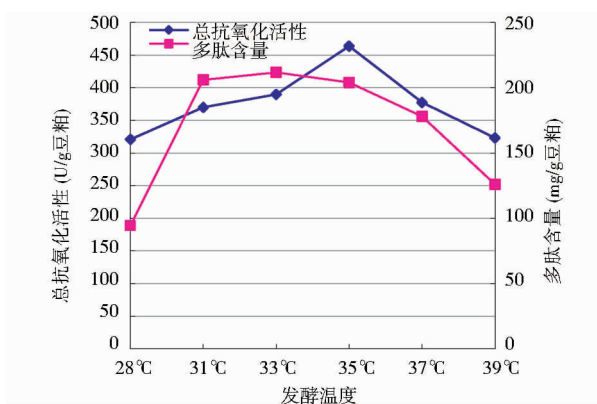


图 3 发酵温度对豆粕固态发酵总抗氧化活性和多肽含量的影响

Fig. 3 Effect of fermentation temperature on T-AOC and polypeptide content of soybean meal by solid-state fermentation

分析法的中心组合设计原理,综合单因素实验结果,以接种量、料水比和发酵温度为自变量,以总抗氧化活性和多肽含量为响应值,设计三因素三水平实验,因素水平表如表 1 所示。实验共 17 个实验组,其中 12 个为分析实验,5 个为中心实验,实验结果见表 2。

表 1 因素水平表

Table 1 List of levels and factors

因素	名称	水平		
		-1	0	1
A	接种量 (%)	8	10	12
B	料水比	1:0.8	1:0.9	1:1
C	发酵温度 (℃)	31	33	35

表 2 响应面分析法实验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of response surface analysis

实验号	A (接种量)	B (料水比)	C (发酵温度)	总抗氧化活性 (U/g 豆粕)	多肽含量 (mg/g 豆粕)
1	0	-1	1	884.13	303.70
2	0	1	1	968.00	313.97
3	0	0	0	1083.93	283.59
4	0	0	0	1083.91	283.59
5	0	0	0	1083.00	273.59
6	0	-1	-1	469.73	253.20
7	1	1	0	676.93	273.72
8	-1	-1	0	622.67	253.59
9	0	1	-1	773.13	293.72
10	0	0	0	1013.00	283.00
11	-1	1	0	800.27	293.72
12	-1	0	1	997.60	334.23
13	1	-1	0	908.80	283.59
14	1	0	1	906.33	344.36
15	-1	0	-1	580.73	293.72
16	0	0	0	1080.00	283.58
17	1	0	-1	943.33	303.84

2.2.2 响应面方差分析方案及结果 通过统计分析软件 Design-Expert. 8.0 对表 2 中实验数据进行二次多项式回归拟合,建立二次多元回归方程。总抗氧化活性与多肽含量的二次回归方程分别为:

$$Y_{\text{总抗氧化活性值}} = 1068.77 + 54.26A + 41.62B + 123.64C - 102.37AB - 113.47AC - 54.88BC - 116.68A^2 - 199.93B^2 - 95.10C^2 \quad (R^2 = 0.9386, R^2_{\text{Adj}} = 0.8597)$$

$$Y_{\text{多肽含量}} = 327.99 + 7.53A + 11.38B + 18.97C - 15.00AB - 10.00AC - 7.56BC - 20.72A^2 - 38.61B^2 + 1.77C^2 \quad (R^2 = 0.9871, R^2_{\text{Adj}} = 0.9705)$$

总抗氧化活性和多肽含量回归方程的回归分析与方差分析结果分别如表 3 和表 4 所示。由表 3 可知,模型回归 P 为 0.0018,说明方程因变量与自变量之间的线性关系明显,该模型回归显著可靠。该模型 $R^2 = 0.9386, R^2_{\text{Adj}} = 0.8597$,说明该模型与实验拟合良好,自变量与响应值(总抗氧化活性)之间线性关系显著,可以用于该反应的理论推测。由 F 检测各因素对总抗氧化活性影响的顺序为:发酵温度(C) > 接种量(B) > 料水比(A)。C、B² 项达到了极显著水平($P < 0.01$),AB、

AC、A²、C² 项达到了显著水平($P < 0.05$),接种量与料水比、接种量与发酵温度、发酵温度与料水比之间存在着交互作用,具体交互作用如图 4 所示。由表 4 可知,模型回归 $P < 0.0001$,说明方程因变量与自变量之间的线性关系明显,该模型回归显著可靠。该模型 $R^2 = 0.9871, R^2_{\text{Adj}} = 0.9705$,说明该模型与实验拟合良好,自变量与响应值(多肽含量)之间线性关系显著,可以用于该反应的理论推测。由 F 检测各因素对多肽含量影响顺序为:发酵温度(C) > 料水比(A) > 接种量(B)。A、B、C、AB、A²、B² 项达到了极显著水平($P < 0.01$),BC 项达到了显著水平($P < 0.05$)。其中接种量与料水比、接种量与发酵温度、发酵温度与料水比之间存在着交互作用,具体交互作用如图 5 所示。

2.2.3 响应面优化和预测 以总抗氧化活性和多肽含量为响应值,应用 RSM 法最终确定豆粕发酵最优化工艺条件为:接种量 9.6%,料水比 1:0.9,发酵温度 35℃。总抗氧化活性和多肽含量理论预测值分别可达 1103.9U/g 豆粕和 348.7mg/g 豆粕。在此最优发酵条件下进行 3 次平行实验,结果由表 5 所示。

表 3 总抗氧化活性模型回归与方差分析结果

Table 3 Regression model and results of variance analysis for total antioxidant activity

方差来源	SS	df	MS	F	Prob > F
A-接种量	23557.52	1	23557.52	4.54	0.0706
B-料水比	13861.13	1	13861.13	2.67	0.1462
C-发酵温度	122300	1	122300	23.57	0.0018
AB	41916.42	1	41916.42	8.08	0.025
AC	51499.49	1	51499.49	9.93	0.0161
BC	12048.36	1	12048.36	2.32	0.1714
A ²	57318.37	1	57318.37	11.05	0.0127
B ²	168300	1	168300	32.44	0.0007
C ²	38076.24	1	38076.24	7.34	0.0302
回归	555600	9	61729.86	11.9	0.0018
残差	36318.3	7	5188.33		
失拟性	32420.36	3	10806.79	11.09	0.0208
纯误差	3897.94	4	974.49		
总差	591900	16			

注: Prob > F 的值小于 0.05 为影响显著; Prob > F 的值小于 0.01 为影响极显著

表 4 多肽含量模型回归与方差分析结果

Table 4 Regression model and results of variance analysis for polypeptide content

方差来源	SS	df	MS	F	Prob > F
A-接种量	453.76	1	453.76	16.88	0.0045
B-料水比	1036.26	1	1036.26	38.55	0.0004
C-发酵温度	2879.65	1	2879.65	107.13	< 0.0001
AB	900	1	900	33.48	0.0007
AC	399.8	1	399.8	14.87	0.0062
BC	228.77	1	228.77	8.51	0.0224
A ²	1808.27	1	1808.27	67.27	< 0.0001
B ²	6277.9	1	6277.9	233.55	< 0.0001
C ²	13.18	1	13.18	0.49	0.5064
回归	14372.4	9	1596.93	59.41	< 0.0001
残差	188.16	7	26.88		
失拟性	75.83	3	25.28	0.9	0.5151
纯误差	112.33	4	28.08		
总差	14560.56	16			

注: Prob > F 的值小于 0.05 为影响显著; Prob > F 的值小于 0.01 为影响极显著

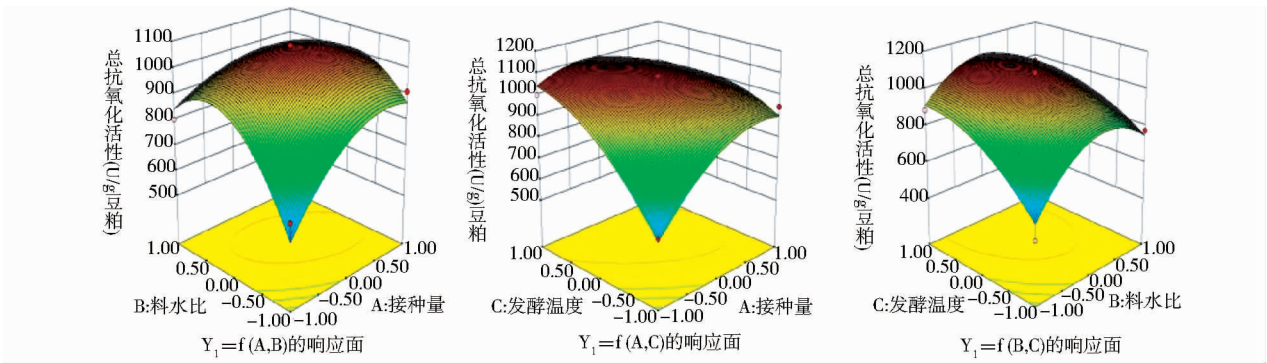


图 4 各因素交互作用对总抗氧化活性影响的响应面图和等高线图

Fig. 4 Response surface map and contour map of factor interaction effecting on T-AOC

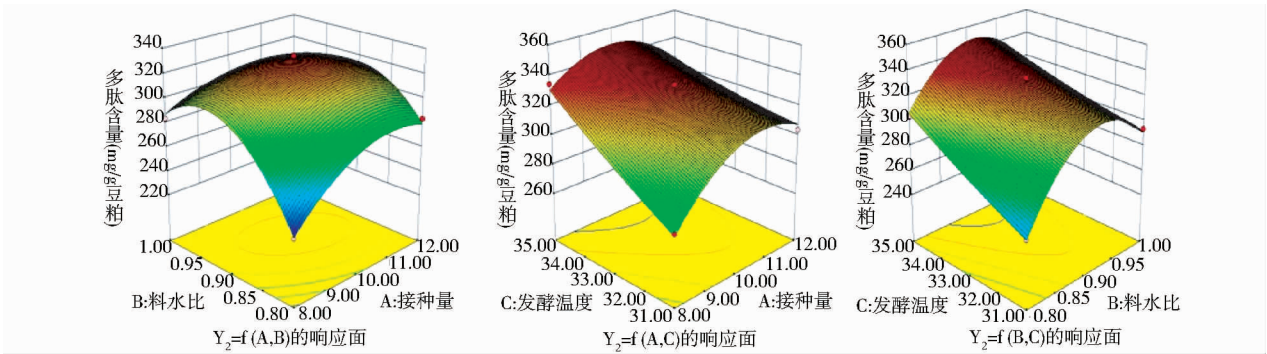


图 5 各因素交互作用对多肽含量影响的响应面图和等高线图

Fig. 5 Response surface map and contour map of factor interaction effecting on polypeptide content

表 5 最优化发酵条件验证实验结果

Table 5 Validate experiment result of optimum fermentation conditions

实验号	1	2	3	平均值	预测值
总抗氧化活性 (U/g 豆粕)	1095.2	1095.2	1082.9	1091.1	1103.9
多肽含量 (mg/g 豆粕)	354.5	364.6	324.1	347.7	348.7

由表 5 可知,总抗氧化活性和多肽含量实测值分别为 1091.09U/g 豆粕和 347.73mg/g 豆粕,与预测值相比,相对误差分别为 1.16% 和 0.29%。实测值与预测值非常接近,说明响应值的实验值与回归方程的预测值吻合良好。

2.3 发酵时间的选择

为了更好地监测发酵时间对豆粕总抗氧化活性和多肽含量的影响,同时也为了减少实验次数,保证实验的精确性和准确性,本研究将发酵时间进行了单独分析。在上述最优条件下进行发酵实验,每隔 8h 取样一次,测定总抗氧化活性与多肽含量,得到发酵时间对豆

粕固态发酵总抗氧化活性和多肽含量的影响曲线如图 6 所示。由图 6 可知,总抗氧化活性和多肽含量均在发酵时间为 48h 达到最大值,分别为 1073.0U/g 豆粕和 314.0mg/g 豆粕,随后基本趋于稳定。因此选择 48h 作为最佳发酵时间。通过相关性分析知道总抗氧化活性与多肽含量相关性方程为: $y = 4.288x - 348.18$, $R^2 = 0.8604$,两者的相关性良好。

3 结 论

以总抗氧化活性和多肽含量为指标,采用单因素实验分析和 Box-Behnken 响应面分析法对豆粕固态发酵工艺条件进行优化研究,并利用 RSM 法确立了豆粕最佳发酵工艺条件:接种量 9.6%,料水比 1:0.9,发酵温度 35℃。豆粕在该条件下发酵 48h,其总抗氧化活性与多肽含量分别由发酵前的 207.2U/g 和 21.0mg/g 提高到 1091.1 U/g 和 347.7mg/g,分别提高了 4.3 倍和 15.6 倍,该结果与预测值相比,相对误差分别为 1.16% 和 0.29%,说明此响应值的实验值与回归方程的预测值吻合良好。

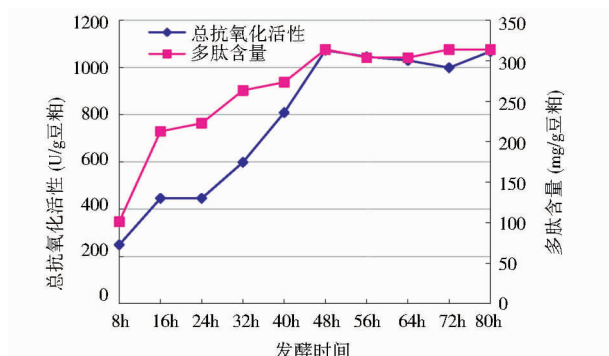


图6 发酵时间对豆粕固态发酵总抗氧化活性和多肽含量的影响

Fig. 6 Effect of fermentation time on T-AOC and polypeptide content of soybean meal by solid-state fermentation

本研究将发酵时间进行了单独分析。在上述最优条件下进行发酵实验,通过相关性分析知道总抗氧化活性与多肽含量相关性方程为: $y = 4.288x - 348.18$, $R^2 = 0.8604$,两者的相关性良好,表明得到的多肽大部分具有抗氧化活性,为抗氧化肽。

参考文献

- [1] Ståle R, Stefan S, Erland B, et al. Lactic acid fermentation eliminates indigestible carbohydrates and antinutritional factors in soybean meal for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 2005, 246, 331-345.
- [2] Kiers J L, Van Laeken A E, Rombeuts F M, et al. *In vitro* digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 60(2):163-169.
- [3] Ellen M H, Stephan M, Klaus B. The fermentation of soybean meal by rumen microbes *in vitro* reveals different kinetic features for the inactivation and the degradation of trypsin inhibitor protein. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, 106:189-197.
- [4] 邱旺. 高效蛋白酶基因工程菌株的构建及大豆抗氧化肽提纯工艺的优化. 黑龙江八一农垦大学, 2010.
Qiu W. Efficient protease gene engineering strains and soybean peptide purification process of antioxidant optimization. Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2010.
- [5] 王莉娟. 大豆肽的制备及其体内外抗氧化活性研究. 江南大学, 2008.

Wang L J. The preparation of soybean peptides and study on its antioxidant effect *in vitro* and *in vivo*. Jiangnan University, 2008.

- [6] 安毅, 张君文. 大豆蛋白活性肽在功能性食品中的应用及发展前景. *大豆通报*, 2004, (4):27-29.
An Y, Zhang J W. The development prospect of soybean protein active peptide with application in functional food. *Soybean Bulletin*, 2004, (4):27-29.
- [7] 王玲琴, 王志耕, 方玉明, 等. 双酶法制备大豆降胆固醇活性肽的研究. *大豆科学*, 2010, (1):109-112.
Wang L Q, Wang Z G, Fang Y M, et al. Preparation of soybean hypocholesterolemic peptides by double - protease method. *Soybean Science*, 2010, (1):109-112.
- [8] 刘秀红, 张东杰. 响应面分析法优化大豆抗氧化肽水解条件的研究. *黑龙江八一农垦大学学报*, 2009, (5):44-49, 55.
Liu X H, Zhang D J. Study on enzymatic hydrolysis of soybean antioxidant peptide by using response surface method. *Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University*, 2009, (5):44-49, 55.
- [9] 曾婷, 吴非. 制备大豆抗氧化肽用酶的筛选. *东北农业大学学报*, 2009, (4):95-98.
Zeng T, Wu F. Enzyme selection for preparing soybean anti - oxidant peptide. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2009, (4):95-98.
- [10] 迟晓星, 张涛, 王楠. 微生物发酵法制备大豆多肽的研究. *食品科技*, 2012, (2):69-72.
Chi X X, Zhang T, Wang N. The fermentation condition of soybean polypeptide by microbial fermentation method. *Food Science and Technology*, 2012, (2):69-72.
- [11] Smits J P, Rinzema A, Tramper J, et al. The influence of temperature on kinetics in solid-state fermentation. *Enzyme and Microbia Technology*, 1998, 22(1):50-57.
- [12] 吴永沛, 刘明, 倪辉. 大豆抗氧化活性肽固态发酵工艺优化. *中国食品学报*, 2007, (6):52-57.
Wu Y P, Liu M, Ni H. Optimization of condition for solid state fermenting soybean antioxidative peptide. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2007, (6):52-57.
- [13] 刘建峰, 葛向阳, 梁运祥. 响应面法优化豆粕固态发酵工艺的研究. *中国生物工程杂志*, 2007, (6):87-91.
Liu J F, Ge X Y, Liang Y X. Study on optimization of soybean meal solid fermentation process by response surface analysis. *China Biotechnology*, 2007, (6):87-91.

Study on Optimization of Soybean Meal Solid-state Fermentation Process for Producing Soybean Antioxidative Peptide by Response Surface Methodology

CHEN Jie-mei XU Cong-cong CHANG Lei LIU Yong-ping MIAO Bing-xuan

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract With the single factor experiment analysis and Box-Behnken response surface analysis, conditions of soybean meal solid-state fermentation were carried out using the total antioxidant activity (T-AOC) and the content of polypeptide as evaluating indicators. The result showed that the best fermentation conditions were as follows: inoculation amount 9.6%, ratio of material to water 1:0.9, fermentation temperature 35°C. Soybean meal was fermented for 48h under the optimum conditions, T-AOC was from 207.2U/g to 1091.1U/g and the content of polypeptide was from 21.0mg/g and 347.7mg/g, respectively increased by 4.3 times and 15.6 times. The experimental value was basically agreed with the predictive value. T-AOC and the content of polypeptide were highly correlated ($R^2 = 0.8604$), it indicated the polypeptide was antioxidative peptide.

Key words Antioxidative peptide Response Surface Methodology (RSM) Total antioxidant activity (T-AOC) Solid-state fermentation

Eppendorf 培训中心在上海成立

Eppendorf 培训中心近日在上海成立。作为全球领先的生物技术公司, Eppendorf 先后于 2007 年和 2012 年收购了美国 New Brunswick Scientific (NBS) 公司和德国 DSGIP 公司, 从而丰富了生物工艺专业领域的产品线, 拓展了在生物制药、疫苗、重组蛋白等领域的广泛应用。此次上海培训中心的成立, 作为 Eppendorf 重要的市场战略布局, 旨在为生物工艺的专业客户提供相关技术服务和应用培训, 提升 Eppendorf 整体技术与服务水平, 特别是在生物工艺方面的技术支持。该培训中心分为公共培训区、发酵罐室、生物反应器室和细胞培养室等 4 个独立区域, 配备了 Eppendorf 与旗下 New Brunswick、DSGIP 品牌的经典产品, 并拥有经验丰富的培训团队。2013 年起, 随着培训中心的全面投入使用, 将正式开展对外培训业务, 并针对生物工艺潜在市场与客户开办专业性的研讨会与应用培训课程。