

大豆发芽过程中多肽富集条件优化

饶青青¹, 余晓红^{1,2}, 唐军涛¹, 韩永斌¹, 顾振新^{1,*}

(1.南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095; 2.盐城工学院化学与生物工程学院, 江苏 盐城 224003)

摘要:目的: 研究培养液 pH 值、培养时间及培养温度对大豆发芽过程中多肽富集的影响。方法: 通过响应面试验法对培养条件进行优化, 确定发芽大豆多肽最优富集工艺。结果: 培养液 pH 值、培养时间及培养温度对发芽大豆中的多肽含量变化影响显著。结论: 大豆最适培养条件为: 以 pH5.2 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(5mmol/L)作为培养液、培养温度 29.0℃、培养时间 6d, 在此条件下, 发芽大豆多肽含量为 159.38mg/g, 是原料大豆中的 3.83 倍。

关键词: 大豆; 发芽; 多肽; 富集

Optimization of Polypeptide Accumulation Conditions during Soybean Germination

RAO Qing-qing¹, YU Xiao-hong^{1,2}, TANG Jun-tao¹, HAN Yong-bin¹, GU Zhen-xin^{1,*}

(1. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. College of Chemistry and Biological Engineering, Yancheng Institute of Technology, Yancheng 224003, China)

Abstract: Objective: To explore the effect of pH, culture time and culture temperature on polypeptide accumulation in soybean during germination. Methods: Culture conditions optimization for maximizing polypeptide accumulation was performed using response surface methodology based on Box-Behnken experimental design. Results: All the investigated conditions were found to significantly affect the content of polypeptides during the germination process of soybean. Conclusion: The optimal conditions for the accumulation of polypeptides in germinated soybean were achieved after 6 days of culture at 29.0 °C in 5 mmol/L, pH 5.2 CBS buffer. The optimized culture resulted in a polypeptide content of 159.38 mg/g soybean, revealing a 3.83-fold increase in compared with non-germinated soybeans.

Key words: soybean; germination; polypeptide; accumulation

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0172-04

大豆蛋白氨基酸组成合理, 营养价值高, 但是大豆中存在一些抗营养因子如植酸、胰蛋白酶抑制剂等, 限制了人体对大豆营养成分的充分吸收利用^[1-2]。种子生理学研究表明, 发芽不仅能降低抗营养因子, 而且尤为突出的是能改变种子内功能成分的含量, 如糙米发芽后 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)等功能成分明显提高^[3]。目前关于大豆在发芽过程中的脂肪、游离氨基酸等的变化已有较多研究^[4], 而对发芽过程中多肽类物质的动态变化规律则鲜有报道。多肽作为生物体内蛋白质降解的中间产物, 对人体具有许多重要的生理活性功能, 如抗菌、降血压、降胆固醇、抗血栓形成和抗氧化活性、提高矿物质吸收利用和免疫调节活性等^[5]。因此, 对大豆多肽富集工艺的研究具有重要

意义。本研究通过响应面法对培养液 pH 值、培养时间及培养温度进行优化, 确定发芽大豆中多肽富集的工艺条件, 有利于大豆多肽作为一种新型的大豆深加工产品进一步的开发利用。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试大豆(*Glycine max*(L.)Merr.): 品种为小金豆, 由常州五星禾绿蔬菜有限公司提供, 于 4℃条件下避光贮藏。

除谷胱甘肽为生化试剂外, 其他试剂均为分析纯。

PYX-DHS 隔水式电热恒温培养箱 江苏太仓市实验设备厂; TDL-40B 型冷冻离心机 上海安亭仪器厂;

收稿日期: 2011-01-18

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(BE2010386)

作者简介: 饶青青(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品中功能成分的富集技术。E-mail: 2010108068@njau.edu.cn

* 通信作者: 顾振新(1956—), 男, 教授, 博士, 研究方向为生物技术与功能食品。E-mail: guzx@njau.edu.cn

UV-2802型紫外-可见分光光度计 尤尼柯上海仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大豆发芽工艺

挑选成熟饱满未破损的大豆20g,以质量浓度1g/100mL的次氯酸钠溶液浸泡消毒30min,去离子水清洗,加100mL缓冲液,在一定的温度下浸泡6h;然后转入培养皿中加20mL培养液于一定温度的恒温培养箱中发芽一定时间,每隔12h向培养皿中喷洒适量缓冲液,以保持培养环境的湿润。

1.2.2 单因素试验

培养液pH值的选择:发芽温度25℃,以pH3.0、4.0、5.0、6.0、7.0的柠檬酸-柠檬酸钠培养液培养大豆4d,另以纯水培养为对照,pH值为6.8;培养时间的选择:设置柠檬酸-柠檬酸钠培养液的pH值为5.0,25℃培养,测定发芽1、2、3、4、5、6d的大豆多肽含量;培养温度的选择:设置培养温度为15、20、25、30、35℃,在培养液的pH值为5.0的条件下避光发芽4d后,测定大豆多肽含量。

1.2.3 响应面试验

在单因素试验结果基础上,以培养液pH值(X_1)、培养时间(X_2)与培养温度(X_3)为考察因素,以多肽含量作为响应值,进行响应面优化试验,因素及水平见表1。

表1 发芽大豆多肽富集条件优化的响应面设计因素和水平

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the optimization parameters used in responses surface analysis

因素	编码及水平		
	-1	0	+1
X_1 pH	4.0	5.0	6.0
X_2 培养时间/d	4	5	6
X_3 培养温度/℃	25	30	35

1.2.4 模型优化与验证

采用响应面试验所拟合的二次多项式模型预测大豆发芽富集多肽的最佳培养条件(培养液pH值、培养时间和培养温度)和最大富集量,并进行验证性实验。比较实验实测值和预测值之间的差异,评估模型的可靠性。

1.3 多肽含量测定^[6]

准确称取5.0g样品,以0.2mol/L磷酸缓冲液(pH7.0)研磨并定容至50mL,静置2h后,10000r/min离心15min,取3mL无脂上清液,加入3mL 10g/100mL三氯乙酸(TCA),沉淀上清液中的蛋白质;涡旋混匀并静置10min后,于10000r/min离心15min;取3mL上清液,加2mL双缩脲试剂,涡旋混匀后静置10min,于10000r/min离心15min,以还原性谷胱甘肽为标准品,测定上清液的

A_{540nm} ,计算多肽含量。实验重复3次,所得结果均以干基质量表示。

$$\text{多肽含量}/(\text{mg/g}) = \frac{\rho \times 2 \times V}{m \times (1 - C_1)}$$

式中: ρ 为标准品质量浓度/(mg/mL); V 为提取液体积/mL; m 为样品质量/g; C_1 为含水量/%。

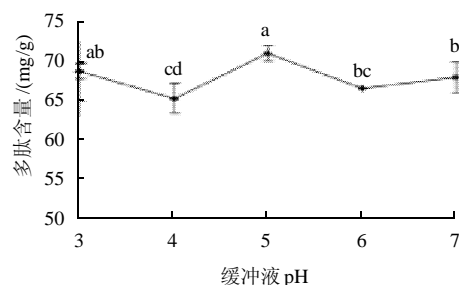
1.4 数据处理与统计分析

采用统计分析软件Design-Expert 7.0对结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 发芽大豆中多肽富集的单因素试验研究

2.1.1 pH值对发芽大豆中多肽含量的影响



不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。下同。

图1 pH值对发芽大豆中多肽含量的影响

Fig.1 Effect of pH on the content of polypeptides in germinated soybean

由图1可见,随着培养液pH值升高,发芽大豆中多肽含量变化显著($P < 0.05$),在pH5.0时达到了最大值,是纯水发芽大豆中的1.12倍。因此,pH5.0的培养液较适合大豆发芽富集多肽。

2.1.2 培养时间对发芽大豆中多肽含量的影响

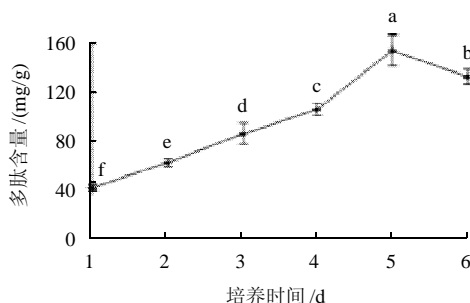


图2 培养时间对发芽大豆中多肽含量的影响

Fig.2 Effect of culture time on the content of polypeptides in germinated soybean

如图2所示,随着培养时间的延长,发芽大豆中

多肽含量呈先增加后减少的变化趋势,在第5天达到最大值154.49mg/g后开始下降。与发芽初期相比较,发芽5d后的大豆中多肽含量提高了3.75倍。由此可见,5d的培养时间较适合大豆发芽富集多肽。

2.1.3 培养温度对发芽大豆中多肽含量的影响

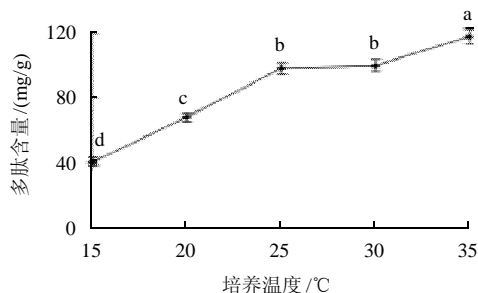


图3 培养温度对发芽大豆中多肽含量的影响

Fig.3 Effect of culture temperature on the content of polypeptides in germinated soybean

如图3所示,随着培养温度由15℃上升到25℃,发芽大豆中的多肽含量显著上升($P < 0.05$),而在25~30℃范围内多肽含量升高不显著;当培养温度由30℃上升至35℃时,发芽大豆中的多肽含量继续上升并达到最大值118.01mg/g,是15℃培养条件下所得发芽大豆中多肽含量的2.87倍。因而,30~35℃较适宜于大豆发芽富集多肽。

2.2 发芽大豆中多肽富集的响应面优化研究

2.2.1 模型建立与分析

在单因素试验的基础上,选用三因素三水平Box-Behnken试验设计对大豆发芽富多肽的工艺进行优化,结果见表2。

表2 大豆发芽富集多肽工艺的响应面设计方案及结果

Table 2 Box-Behnken experimental arrangement and results for responses surface analysis

试验号	X ₁ pH	X ₂ 培养时间/d	X ₃ 培养温度/℃	多肽含量/(mg/g)
1	4	4	30	134.53 ± 6.64
2	6	4	30	74.18 ± 8.54
3	4	6	30	153.03 ± 3.62
4	6	6	30	152.61 ± 9.02
5	4	5	25	125.30 ± 2.73
6	6	5	25	101.77 ± 5.05
7	4	5	35	122.46 ± 5.08
8	6	5	35	97.88 ± 6.91
9	5	4	25	86.01 ± 3.77
10	5	6	25	140.80 ± 6.25
11	5	4	35	100.80 ± 1.42
12	5	6	35	124.93 ± 6.15
13	5	5	30	133.56 ± 5.9
14	5	5	30	133.11 ± 6.27
15	5	5	30	140.56 ± 6.12
16	5	5	30	141.11 ± 5.87
17	5	5	30	143.21 ± 5.54

利用Design-Expert 7.0分析软件对表2数据进行二次多元回归拟合,得到发芽大豆中多肽含量对编码自变量X₁、X₂和X₃的二次三项回归方程为: $Y = 138.31 - 13.61X_1 + 21.98X_2 - 0.98X_3 + 14.98X_1X_2 - 0.27X_1X_3 - 7.67X_2X_3 - 5.50X_1^2 - 4.22X_2^2 - 20.96X_3^2$ 。

表3 回归方程方差分析

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for the built regression equation predicting the content of polypeptides in germinated soybean

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	8658.80	9	962.09	44.58	< 0.0001
X ₁	1481.88	1	1481.88	68.66	< 0.0001
X ₂	3865.64	1	3865.64	179.10	< 0.0001
X ₃	7.64	1	7.64	0.35	0.5707
X ₁ X ₂	897.80	1	897.80	41.60	0.0004
X ₁ X ₃	0.28	1	0.28	0.01	0.9122
X ₂ X ₃	235.07	1	235.07	10.89	0.0131
X ₁ ²	127.49	1	127.49	5.91	0.0454
X ₂ ²	75.02	1	75.02	3.48	0.1045
X ₃ ²	1849.10	1	1849.10	85.67	< 0.0001
残差	151.08	7	21.58		
总变异	8809.88	16			

对上述回归模型进行方差分析(表3),结果表明,该模型达到了极显著水平($P < 0.0001$),回归方程的失拟性检验是极不显著的($P = 0.4810$),回归模型的决定系数为0.9829,信噪比为20.748,表明回归方程的拟合度和可信度均很高,该模型能够解释98.29%的变化,因此,该模型可用来对发芽大豆中的多肽含量进行分析和预测。各因素的F值可以反映出各个因素对试验指标的重要性,从方差分析表可知, $F_1 = 68.66$, $F_2 = 179.10$, $F_3 = 0.35$,可见pH值和培养时间对发芽大豆中多肽的富集量具有显著的影响,而培养温度对多肽富集量的影响较小。X₁X₂和X₂X₃两组交互作用对多肽富集量均具有显著影响,其交互作用等高线如图4、5所示。

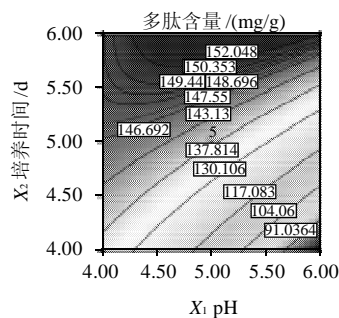


图4 pH值和培养时间对发芽大豆中多肽含量影响的等高线图

Fig.4 Contour plot showing the effects of pH and culture time on the content of polypeptides in germinated soybean

图4显示了在培养温度为30℃时,pH值和培养时间以及其交互作用对发芽大豆中多肽含量的影响。pH值对多肽含量的影响较大,培养时间对多肽含量的影响较小。当培养时间一定时,在pH4~5.2范围内,多肽含量随着pH值的升高而增加,在pH5.2处达到最大值;当pH值大于5.2时,多肽含量随着pH值的升高而下降。当pH值固定时,多肽含量随着培养时间的延长而增加,并在第6天时达到最大值。

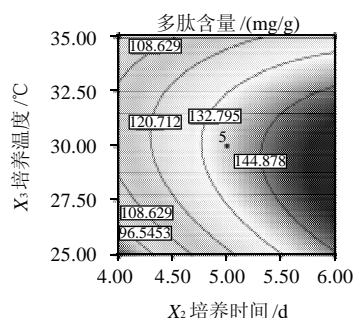


图5 培养时间和培养温度对发芽大豆中多肽含量影响的等高线图
Fig.5 Contour plot showing the effects of culture temperature and time on the content of polypeptides in germinated soybean

图5显示了在pH值为5.0时,培养时间和培养温度及其交互作用对发芽大豆中多肽含量的影响。培养时间对多肽含量的影响较大,培养温度对多肽含量的影响较小。当培养时间一定时,多肽含量随着培养温度的升高(15~29℃)而增加,且在29℃处达到最大值;当培养温度高于29℃时,多肽含量随着温度的升高而下降。当培养温度固定时,多肽含量随着培养时间的延长而增加,并在第6天时达到最大值。

2.2.2 模型优化

根据响应面试验结果,运用试验模型得到大豆发芽富集多肽的最佳条件为:以pH值为5.2的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(5mmol/L)作为培养液,培养时间为6d,培养温度为29.0℃。在此条件下,模型预测的最大多肽富集量为157.03mg/g。

2.3 发芽大豆中多肽富集工艺条件的验证

为考察模型的可靠性和准确性,随机选取一组试验组合和最佳试验组合进行验证性实验,比较实测值和预测值之间的吻合度。验证实验结果表明,发芽大豆中多肽含量的实际值与预测值之间吻合,说明实验得到的

模型有效且可靠。在优化的实验条件下,发芽大豆中的多肽含量高达159.38mg/g,是原料大豆中多肽含量(40.96mg/g)的3.83倍。

3 讨论

培养液pH值、培养时间和培养温度对发芽大豆中的多肽含量变化影响显著,原因可能是pH值、温度和培养时间通过对蛋白酶活力及酶促反应过程的影响,进而影响到种子发芽过程中多肽含量的变化^[7]。在种子发芽过程中,由于贮藏物质不断被降解,导致了植物体内生化反应的pH值不稳定,将反应置于缓冲体系中,可以稳定反应的pH值,提高肽含量^[8]。而温度会影响种子发芽与酶蛋白质的构象、酶与激活剂的亲和力及参与酶促反应功能团的解离等,所以不同的种子萌发有不同的最适温度,如26℃(糙米)^[9]、20℃(高粱)和17℃(大麦)可以产生较高含量的肽类物质^[10]。因此建立的发芽条件和发芽大豆多肽富集量之间的二次多项式模型可用于预测其变化趋势。

通过研究发现,大豆发芽过程富集多肽的最适培养条件为:以pH5.2的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(5mmol/L)作为培养液,培养温度29.0℃、培养时间6d。在此条件下,发芽大豆中的多肽含量为159.38mg/g,是原料大豆中多肽含量的3.83倍。

参考文献:

- [1] 权静,卢定强.大豆功能性成分的研究现状[J].大豆通报,2004(3): 27-29.
- [2] GRASES F, PRIETO R M, SIMONET B M. Phytase prevents tissue calcification in femoral rats[J]. Biofactors, 2000, 11(3): 171-177.
- [3] KOMATSUZAKI N, TSUKAHARA K, TOYOSHIMA H, et al. Effect of soaking and gaseous treatment on GABA content in germinated brown rice[J]. Journal of Food Engineering, 2007, 78(2): 556-560.
- [4] WEBB K E, Jr. Intestinal absorption of protein hydrolysis products: a review[J]. Journal of Animal Science, 1990, 68(9): 3011-3022.
- [5] 杨润强,龚晓峰. 孵育法富集麦胚多肽工艺参数优化[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 22-25.
- [6] ENARI T M, PUPUTTI E, MIKOLA J. Fractionation of the proteolytic enzymes of barley and malt[M]. Madrid: Proceedings of the EBC Congress, 1967: 37-44.
- [7] 李墨,安家彦. 玉米发芽过程中酶系最适条件的确定[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(11): 4403-4404.
- [8] 温焕斌. 富含多肽的发芽糙米制备工艺及其抗氧化活性研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.
- [9] AGU R C, PALMER G H. The effect of temperature on the modification of sorghum and barley during malting[J]. Process Biochemistry, 1997, 32(6): 501-507.