

响应面法优化发芽大豆富集多肽的培养液组分

白青云¹, 唐军涛², 顾振新²

(1. 淮阴工学院生命科学与化学工程学院, 江苏 淮安 223003; 2. 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 以浸润方式培养大豆, 考察赤霉素(GA₃)、CaCl₂等10种添加物对发芽大豆多肽富集的影响, 对呈显著正效应的添加物进行最适浓度优化, 并探讨各组分浓度对发芽大豆多肽富集的影响。结果表明: GA₃、CaCl₂、AlCl₃和MnSO₄对发芽大豆多肽富集有显著正效应; Box-Behnken试验结果显示, 发芽大豆中多肽含量与培养液组分浓度之间的二次多项模型显著($P < 0.05$), 可预测发芽大豆中多肽的富集; 其中GA₃、CaCl₂、AlCl₃和MnSO₄最适浓度分别是61.00 μmol/L、11.20 mmol/L、10.13 mmol/L和12.17 mmol/L, 在此条件下培养的发芽大豆中多肽含量达到162.57 mg/g, 分别是对照和原料大豆的2.10倍和3.97倍, 由此表明优化后的培养液组分能显著提高发芽大豆多肽含量。

关键词: 发芽大豆; 多肽; 富集; 培养液组分; 响应面

Optimization of Culture Solution for Polypeptide Accumulation in Germinated Soybeans by Response Surface Methodology

BAI Qing-yun¹, TANG Jun-tao², GU Zhen-xin²

(1. School of Life Science and Chemical Engineering, Huaiyin Institute of Technology, Huaian 223003, China;

2. College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: The effects of 10 components in the culture solution on the accumulation of polypeptides after 5 days of soybean germination by means of infiltration were investigated. Using Plackett-Burman experiment design, GA₃, CaCl₂, aluminium chloride (AlCl₃) and manganous sulfate (MnSO₄) were identified as main factors that significantly positively affect polypeptide accumulation. The quadratic polynomial regression model for polypeptide content in germinated soybean versus the four variables established based on Box-Behnken experiment design was statistically significant ($P < 0.05$) and could allow the prediction of polypeptide accumulation. The optimal concentrations of GA₃, CaCl₂, AlCl₃ and MnSO₄ in the culture solution were 61.00 μmol/L, and 11.20, 10.13, 12.17 mmol/L, respectively. The polypeptide content in germinated soybean cultured under these conditions was 162.57 mg/g, which was 2.10-fold and 3.97-fold higher than the control and non-germinated soybean, respectively. Therefore, the optimized culture solution can significantly increase polypeptide content in germinated soybean.

Key words: germinated soybean; polypeptide; accumulation; culture solution composition; response surface methodology

中图分类号: TS214.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)24-0172-06

大豆中蛋白质含量丰富, 氨基酸组成平衡, 富含维生素和矿物质, 以及低聚糖、异黄酮和皂苷等多种生理活性物质。因此, 大豆营养价值远高于其他植物食品^[1]。由于大豆蛋白组成复杂, 分子结构高度压缩并折叠, 因而大豆蛋白溶解性较差。另外, 大豆蛋白具有一定的抗原性, 部分人群存在对大豆蛋白过敏的现象, 降低了大豆蛋白消化率和生物效价^[2]。据报道, 人

体摄入的蛋白质经消化道酶促水解后, 主要是以小肽形式被吸收的, 以游离氨基酸形式吸收的比例则很小, 而且肽类的生物效价和营养价值均高于氨基酸^[3]。将大豆蛋白水解为肽类物质不但易被人体消化吸收, 而且也提高了对人体的生理价值^[4]。植物种子在发芽过程中, 被激活的内源蛋白酶和新合成的蛋白酶会水解种子贮藏蛋白质, 生成一定量的肽或游离氨基酸等小分

收稿日期: 2011-06-06

基金项目: 淮阴工学院科研基金面上项目(HGB0909)

作者简介: 白青云(1973—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: baiqy@hyit.edu.cn

子物质。目前,关于大豆发芽过程中肽类物质变化、富集的研究鲜见报道。大豆籽粒经过发芽后,内源蛋白酶活力提高,蛋白质水解成更易被人体消化吸收的小分子肽,植酸等抗营养因子被降解,大豆营养价值得到提高^[5]。

本研究以大豆为原料,采用浸润方式培养大豆,通过在培养液中添加CaCl₂等酶激活剂的方法提高发芽大豆中蛋白酶的活力,从而提高多肽的富集量。在多种考察因素中,利用Plackett-Burman试验设计筛选出对发芽大豆多肽富集具有显著正效应的因素,并通过Box-Behnken设计确定培养液中各正效应因素的浓度,得到发芽大豆富集多肽的最佳培养液组分。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

供试大豆(*Glycine max* (L.) Merr)为东北小黄豆,于4℃避光保存。

谷胱甘肽 北京 Solarbio 公司;酪蛋白 美国 Sigma 公司;其他试剂均为分析纯。

TDL-40B 离心机 上海安亭仪器厂;PYX-DHS-BS 型隔水式电热恒温培养箱 江苏太仓市实验设备厂;UV-2802 型紫外可见分光光度计 上海尤尼柯仪器有限公司;DHG-9030A 型电热恒温鼓风干燥箱 上海一恒科技有限公司。

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,以1%(V/V)次氯酸钠溶液浸泡消毒30min,去离子水清洗3遍后,25℃浸泡6h;然后转入白磁盘中(上下各垫两层纱布),在30℃恒温培养箱中避光培养;每隔一定时间向白磁盘中浇入一定量培养液,以保持培养环境的湿润。发芽5d后将大豆芽取出,用去离子水冲洗干净并吸干表面水分,在液氮中速冻,然后储存于-20℃冰箱中备用。

1.2.2 Plackett-Burman 试验设计

表1 Plackett-Burman 试验设计因素水平表

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the variables tested in Plackett-Burman design

组分浓度/(mmol/L)	编码	编码水平	
		低(-1)	高(1)
GA ₃ /(μmol/L)	X ₁	0	100
KCl	X ₂	0	10
CaCl ₂	X ₃	0	10
AlCl ₃	X ₄	0	10
MgSO ₄	X ₅	0	10
ZnSO ₄	X ₆	0	10
CuSO ₄	X ₇	0	10
MnSO ₄	X ₈	0	10
FeSO ₄	X ₉	0	10
L-半胱氨酸	X ₁₀	0	10

为选择对发芽大豆多肽富集有显著正效应的组分,本研究选用赤霉素(GA₃)、金属离子等10种添加物,按Plackett-Burman设计进行不同组合的添加试验,每种添加物设置两个水平,因素编码及水平设计见表1。

1.2.3 响应面试验设计

根据Plackett-Burman试验结果,对呈显著正效应的因素采用Box-Behnken设计进行浓度优化试验,各组分编码水平见表2,以多肽含量作为考察值。

表2 培养液组分优化的Box-Behnken设计因素水平表

Table 2 Coded values and corresponding actual values of the variables tested in Box-Behnken design

自变量	符号	编码值		
		-1	0	1
GA ₃ 浓度/(μmol/L)	X ₁	0	50	100
CaCl ₂ 浓度/(mmol/L)	X ₂	0	10	20
AlCl ₃ 浓度/(mmol/L)	X ₃	0	10	20
MnSO ₄ 浓度/(mmol/L)	X ₄	0	10	20

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液组分浓度和最大富集量,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。

1.2.5 多肽含量测定

称取2.00g样品,于研钵中加入8mL PBS缓冲液(pH7.0、0.2mol/L),研磨成匀浆后定容至50mL。然后将此匀浆在离心力1677×g条件下离心15min,上清液采用双缩脲法测定多肽含量^[6]。

1.2.6 数据处理与统计分析

采用“Design-Expert”统计软件(Version 7.0 Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN, USA)对响应面试验得到的数据进行线性回归和方差分析,数据符合泰勒二次多项式模型:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

式中:Y为响应值;β₀为体系的中心点,β_i、β_{ii}和β_{ij}分别为一次项、二次项和交互项的系数;X_i、X_{ii}和X_iX_j分别为一次项、二次项和交互项的自变量。

所有的二次拟合模型采用等高线图分析,表示自变量水平和响应值之间的关系,同时计算各自变量的线性、二次和交互作用的回归系数,分析二次拟合模型响应值的变异原因。通过P值(0.01、0.05、0.10)考察模型及其因素的显著性,利用所建立的二次多项式模型预测最佳工艺参数。实验重复3次,结果以“平均值±标准差”表示。

表6 响应面试验设计表及其响应值

Table 6 Box-Behnken experimental design and results

试验号	X_1	X_2	X_3	X_4	多肽含量/(mg/g)
1	0	0	10	10	85.52 ± 3.24
2	100	0	10	10	116.04 ± 4.21
3	0	20	10	10	90.89 ± 3.57
4	100	20	10	10	128.94 ± 5.48
5	50	10	0	0	127.32 ± 5.13
6	50	10	20	0	88.60 ± 3.27
7	50	10	0	20	115.06 ± 5.41
8	50	10	20	20	141.96 ± 5.19
9	0	10	10	0	63.13 ± 3.15
10	100	10	10	0	81.80 ± 3.23
11	0	10	10	20	88.08 ± 4.11
12	100	10	10	20	119.45 ± 4.37
13	50	0	0	10	131.93 ± 6.38
14	50	20	0	10	152.74 ± 6.35
15	50	0	20	10	135.97 ± 4.51
16	50	20	20	10	133.74 ± 4.24
17	0	10	0	10	78.89 ± 2.98
18	100	10	0	10	133.66 ± 5.76
19	0	10	20	10	86.51 ± 3.21
20	100	10	20	10	129.70 ± 4.39
21	50	0	10	0	89.69 ± 3.87
22	50	20	10	0	119.85 ± 4.34
23	50	0	10	20	139.27 ± 4.98
24	50	20	10	20	128.54 ± 4.52
25	50	10	10	10	164.01 ± 6.53
26	50	10	10	10	154.25 ± 6.41
27	50	10	10	10	163.41 ± 6.44
28	50	10	10	10	160.52 ± 6.37
29	50	10	10	10	163.38 ± 6.43

表7 回归方程方差分析

Table 7 Analysis of variance for the regression model established based on Box-Behnken experimental design

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	P值
模型	23499.25	14	1678.52	48.44	< 0.0001
X_1	3908.52	1	3908.52	112.79	< 0.0001
X_2	263.86	1	263.86	7.61	0.0154
X_3	44.52	1	44.52	1.28	0.2761
X_4	2186.25	1	2186.25	63.09	< 0.0001
X_1X_2	14.20	1	14.20	0.41	0.5325
X_1X_3	33.52	1	33.52	0.97	0.3421
X_1X_4	40.35	1	40.35	1.16	0.2988
X_2X_3	132.72	1	132.72	3.83	0.0706
X_2X_4	417.78	1	417.78	12.06	0.0037
X_3X_4	1076.65	1	1076.65	31.07	< 0.0001
X_1^2	12011.76	1	12011.76	346.63	< 0.0001
X_2^2	891.15	1	891.15	25.72	0.0002
X_3^2	835.88	1	835.88	24.12	0.0002
X_4^2	6040.94	1	6040.94	174.32	< 0.0001
残差	485.15	14	34.65		
总变异	23984.4	28			

注: $R^2 = 0.9789$; $R_{SN} = 24.073$ 。

对回归模型进行方差分析(表7), 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($P = 0.1924$)检验不显著, 回归模型的决定系数为0.9829, 说明该模型能够解释98.29%的变化。因此, 此模型可

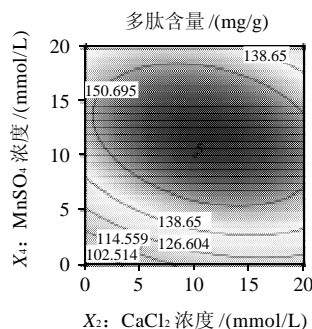
用于分析和预测发芽大豆中多肽含量。

从结果可以看出, GA_3 对多肽含量的影响极显著($P < 0.0001$); $CaCl_2$ 和 $MnSO_4$ 及其二者交互作用对多肽含量的影响显著($P < 0.05$); $AlCl_3$ 和 $MnSO_4$ 的交互作用也对多肽含量具有显著影响($P < 0.0001$), 而 $AlCl_3$ 对多肽含量无显著影响($P < 0.1$)。描述4种组分浓度与发芽大豆多肽含量之间关系的多项式模型如下:

$$Y = 161.11 + 18.05X_1 + 4.69X_2 + 13.50X_3 - 10.22X_2X_4 + 16.41X_3X_4 - 43.03X_1^2 - 11.72X_2^2 - 11.35X_3^2 - 30.52X_4^2 \quad (4)$$

式中: Y 为多肽含量的预测值/(mg/g); X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 分别代表 GA_3 /($\mu\text{mol/L}$)、 $CaCl_2$ /(mmol/L)、 $AlCl_3$ /(mmol/L) 和 $MnSO_4$ /(mmol/L) 的浓度。

由发芽大豆培养液中 $CaCl_2(X_2)$ 和 $MnSO_4(X_4)$ 浓度与多肽含量之间关系的等高线图(图1)可知, 多肽含量随 $CaCl_2$ 和 $MnSO_4$ 浓度的变化呈现出较大波动, 其总体表现为曲线形效应。由方差分析结果可知, 两组分之间存在显著交互作用($P < 0.05$)(表7)。当 $CaCl_2$ 和 $MnSO_4$ 浓度取值较低时, 多肽含量随二者浓度的提高而增加, 但当 $CaCl_2$ 浓度大于11.2mmol/L、 $MnSO_4$ 浓度大于12.17mmol/L时, 多肽含量反而下降。如表7所示, $CaCl_2$ 和 $MnSO_4$ 的浓度各自的一次项和二次项均对肽含量均有显著影响($P < 0.05$), 其线性正效应和二次负效应可以解释图1所观察到的曲面。

图1 $CaCl_2(X_2)$ 和 $MnSO_4(X_4)$ 的浓度对发芽大豆中肽含量影响的等高线图Fig.1 Contour plot showing the effects of $CaCl_2$ and $MnSO_4$ concentrations on polypeptide content in germinated soybean

由发芽大豆培养液中 $AlCl_3(X_3)$ 和 $MnSO_4(X_4)$ 浓度与多肽含量之间关系的响应面图(图2)可知, 随着 $AlCl_3$ 和 $MnSO_4$ 浓度的逐渐升高, 发芽大豆中的肽含量波动较大。当 $AlCl_3$ 为10.13mmol/L、 $MnSO_4$ 为12.17mmol/L时, 发芽大豆多肽含量最高。随着二者浓度的进一步升高, 多肽含量呈下降趋势。

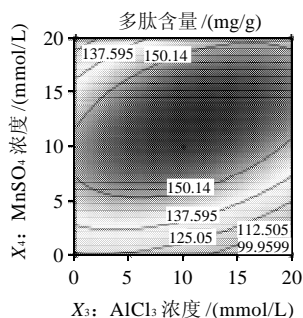


图2 AlCl_3 (X_3)和 MnSO_4 (X_4)浓度对发芽大豆中肽含量影响的等高线图

Fig.2 Contour plot showing the effects of AlCl_3 and MnSO_4 concentrations on polypeptide content in germinated soybean

2.3 模型优化与验证

表8 验证性实验结果

Table 8 Results of validation experiments

处理	添加物				多肽含量/(mg/g)	
	GA_3 /($\mu\text{mol/L}$)	CaCl_2 /(mmol/L)	AlCl_3 /(mmol/L)	MnSO_4 /(mmol/L)	实测值	预测值
最优组合	61.00	11.20	10.13	12.17	162.57 ± 6.25	164.83
随机组合	0	10.00	10.00	10.00	92.16 ± 3.38	90.35

通过拟合方程4可以得到,培养液中各组分的最适浓度分别为 GA_3 61.00 $\mu\text{mol/L}$ 、 CaCl_2 11.20 mmol/L、 AlCl_3 10.13 mmol/L和 MnSO_4 12.17 mmol/L,发芽大豆多肽含量的预测值为164.83 mg/g。经验证(表8),以此培养液培养得到发芽大豆多肽含量为162.57 mg/g,说明预测值和实际值之间存在较高的拟合度,所建立的模型是可靠的,可以用来描述组分浓度与响应值之间的关系。以最适浓度的培养液培养的发芽大豆中多肽含量是对照(未添加各组分, 77.37 mg/g)的2.10倍,是原料(40.96 mg/g)的3.97倍,说明优化后的培养液能显著提高发芽大豆中多肽含量。

3 讨论与结论

大豆种子在萌发时,环境中的多种外源激素和金属离子对种子的生长发育具有显著的影响^[9-11]。发芽大豆内各种酶的活化与合成受到多种因素调控^[12]。本研究结果表明, GA_3 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 等外源激素和金属离子能促进大豆发芽,提高发芽大豆中蛋白酶活力,显著增加发芽大豆多肽含量。

GA_3 是一种天然的四环二萜类植物生长调节剂,在植物生长和发育的过程中发挥重要作用^[13]。据报道,谷物在发芽过程中,其胚乳所分泌的赤霉素可以促进淀粉酶、蛋白酶等水解酶的合成,在此作用下,种子中的贮藏物质被分解成小分子物质,供种子生长发育利用^[14]。

本实验中,外源赤霉素有促进大豆种子萌发的作用,通过影响蛋白酶活力来调控蛋白质代谢,促进多肽的积累。糙米发芽过程中情形也是如此^[15]。

金属离子已经被证实能够激活或抑制蛋白酶活力。低浓度的 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 有提高蛋白酶活力的作用,但浓度过高时则抑制其活力^[16-18]。较低浓度的 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Mg^{2+} 对大豆萌芽与生长及内源酶系的启动具有促进作用,但当这些离子浓度过高时,促进作用开始减弱,甚至抑制大豆的萌发生长^[19-21,11]。本试验结果表明, Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 对发芽大豆中的肽富集量具有显著正效应($P < 0.05$),而 Al^{3+} 无显著影响。

Al^{3+} 是生态系统中离子循环最旺盛的元素之一,通常情况下对植物无毒,但酸性环境中,可溶性铝盐对多数植物产生毒害^[22]。 Al^{3+} 虽不属于植物生长的必需元素,但其在植物生长过程中起着非常重要的作用。本研究中PB试验结果表明, Al^{3+} 对发芽大豆中肽富集量影响显著且呈现正效应,而在浓度优化试验中却无显著影响,其原因可能是 Al^{3+} 和培养液中其他添加物质存在显著交互作用。在浓度优化试验中,由于减少了培养液的组分,这种交互作用不复存在,因而对发芽大豆中多肽的富集量无显著影响。

本研究通过响应面法优化了发芽大豆多肽富集的培养液组分,其中 GA_3 、 CaCl_2 、 AlCl_3 和 MnSO_4 对发芽大豆中多肽富集具有显著正效应,这4种组分的最适浓度分别是61.00 $\mu\text{mol/L}$ 、11.20 mmol/L、10.13 mmol/L和12.17 mmol/L。在此条件下培养的发芽大豆中多肽富集量达到162.57 mg/g。

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] 邓勇,吴煜欢.大豆多肽研究与开发:现状·问题·建议[J].中国农业大学学报,1999,4(4): 89-93.
- [3] CLEMENTE A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition[J]. Trends Food Science and Technology, 2000, 11(7): 254-262.
- [4] 高春霞.大豆多肽生理活性的应用与前景分析[J].大豆通报,2006(4): 18-22.
- [5] 苗颖.大豆发芽降低植酸效果及其高钙豆乳的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2003.
- [6] 鲁伟,任国谱,宋俊梅.蛋白水解液中多肽含量的测定[J].食品科学,2005,26(7): 169-171.
- [7] LOTFY W A, GHANEM K M, EL-HELOW E R. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs[J]. Bioresource Technology, 2007, 98(18): 3470-3477.
- [8] RAVIKUMAR K, RAMALINGAM S, KRISHNAN S, et al. Application of response surface methodology to optimize the process variables for reactive red and acid brown dye removal using a novel adsorbent[J]. Dyes and Pigments, 2006, 70(1): 18-26.
- [9] BEEVERS L, SPLITTSTOESSER W E. Protein and nucleic acid

- metabolism in germinating peas[J]. Journal of Experimental Botany, 1968, 19(4): 698-711.
- [10] 刘鹏, 徐根娣, 姜雪梅. 铝对大豆种子萌发的影响[J]. 种子, 2003(1): 30-32.
- [11] 周化斌, 姜丹, 金卫挺. 锰对大豆种子萌发的影响[J]. 种子, 2003(4): 22-23.
- [12] 《大豆生理学》编写组. 大豆生理[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 224-236.
- [13] DONG Yanjun, KAMIUTEN H, YANG Zhongnan, et al. Mapping of quantitative trait loci for gibberellic acid response at rice (*Oryza sativa* L.) seedling stage[J]. Plant Science, 2006, 170(1): 12-17.
- [14] YOMO H, VARNER J E. Control of the formation of amylases and proteases in the cotyledons of germinating peas[J]. Plant Physiology, 1973, 51(4): 708-713.
- [15] 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.
- [16] JONES B L. Endoproteases of barley and malt[J]. Journal of Cereal Science, 2005, 42(2): 139-156.
- [17] ZHANG Chunling, ZHAO Changxin, DONG Liang. Study on the adding metal ion to increase the activity of enzyme systems in home-made barley malt[J]. Food Science, 2006, 27(11): 195-199.
- [18] ORLOWSKI M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system[J]. Biochemistry, 1990, 29(45): 10289-10297.
- [19] 杨卫韵, 徐根娣, 钱宝英, 等. Fe^{3+} 浸种对大豆种子萌发的影响[J]. 种子, 2004, 23(4): 32-34.
- [20] 宋松泉, 傅家瑞. 钙对种子萌发的调节作用[J]. 种子, 1991(5): 34-37.
- [21] 王芳, 姜丹. 硫酸镁浸种对大豆种子萌发的影响[J]. 浙江师范大学学报, 2003, 26(4): 394-397.
- [22] 应小芳, 刘鹏, 徐根娣. 土壤中的铝及其植物效应的研究进展[J]. 生态环境, 2003, 12(2): 237-239.